

T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

# YÖREMİZDE DERİN VEN TROMBOZU OLGULARINDA FAKTÖR V LEİDEN MUTASYON SIKLIĞI

111442

DOKTORA TEZİ

Vet. Hekim Sevgi KALKANLI

111442

TEZ YÖNETİCİSİ

Doç. Dr. Orhan AYYILDIZ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM BİLİM VE TEKNOLOJİ BAKANLIĞI  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

DİYARBAKIR — 2001

## İÇİNDEKİLER:

	Sayfa No
Önsöz	i
Giriş ve Amaç	1
Genel Bilgiler	4
Materyal ve Metod	56
Bulgular	74
Tartışma	82
Özet	88
Summary	89
Kaynaklar	90

## Ö N S Ö Z

Doktora eğitimim süresince tartışmasız olarak çok önemli emekleri geçen ve her aşamada yardım ve desteklerini gördüğüm İç Hastalıkları ABD Başkanı Kıymetli Hocam Sayın Prof. Dr. Ekrem Müftüoğlu' na en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez konusunun belirlenmesinde ve planlanmasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Orhan Ayyıldız' a teşekkür ederim.

Bilgi ve deneyimleri ile yol gösterici olan Bölüm Hocalarım Sayın Prof. Dr. Turgay Budak' a, Sayın Prof. Dr. Ali Kelle' ye ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Nail Alp' e ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmamın yürütülmesinde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Sayın Doç. Dr. Sabri Batun' a ve ayrıca Sayın Yrd. Doç. Dr. Naci Tiftik' e ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Burhaneddin Zincircioğlu' na, çalışma metodunun oluşturulmasında yardım ve desteğini gördüğüm Sayın Arş. Gör. Selahaddin Tekeş' e, APC direnç tayininde yardımlarından dolayı Sayın Dr. Abdullah Altıntaş' a, Merkez Laboratuvarı Koagülometre biriminden Laboratuvar teknisyeni Sayın Sevim Akcan' a, başta Sayın Prof. Dr. Kıymet Aksoy olmak üzere Çukurova Üniversitesi Biyokimya ABD öğretim üyeleri ve teknik elemanlarına, Çukurova Üniversitesi Hematoloji ABD öğretim elemanlarından Sayın Arş. Gör. Kahraman Tanrıverdi' ye, kan örneklerinin toplanmasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Erdoğan Cebeci ve Göğüs Kalp Damar Cerrahi ABD Öğretim Üyeleri ve elemanlarına teşekkür ederim.

Aileme ve özellikle sevgili ablam Hediye Kalkanlı Harputluoğlu' na destekleri, ilgi ve sabırları için teşekkür ederim.

Vet. Hekim Sevgi KALKANLI

## GİRİŞ VE AMAÇ:

Trombofili başlığı ile tanımlanan tromboza yatkınlık kavramı daha çok derin ven trombozuna, ( Deep Vein Thrombosis, DVT ) yatkınlığı yansıtır. Gelişmiş ülkelerde DVT görülme sıklığı ortalama 1/ 1000' dir (38) ve yaşamın erken dönemlerinde bu oran 1 / 100.000 iken ileri yaşlarda 1 / 100 sıklığına ulaşır (56,64). Tromboz çoğunlukla alt ekstremitelerin derin venlerinde gelişir ve buradan kopan embolilere bağlı olarak gelişen pulmoner emboliler ciddi bir sorun oluşturur. Tromboz daha az sıklıkla üst ekstremitelerde, serebral sinüslerde, retina venlerinde, hepatic ve renal venlerde gelişebilir. Kalıtsal ve edinsel faktörler tromboz oluşumunda rol oynar. Ancak tromboz oluşumu multifaktöriyel olarak gelişmektedir. Sağlıklı bir bireyde birden fazla olumsuz faktörün bir arada bulunması tromboz riskini belirgin biçimde artırmaktadır (81).

1990 yılının başında Amer ve arkadaşları, trombozlu bir hastada aktive protein C' nin aktivitesini inhibe eden plazmadaki bir kısmın varlığını ileri sürdüler. Daha sonra Dahlbäck tarafından aktive protein C direncinin mekanizması tanımlandı. 1994 yılında da Bertina bu anomalinin faktör V geninin ekson 10 bölgesi üzerindeki bir mutasyondan kaynaklandığını buldu (6). Bu mutasyonun sonucunda, 506. sırada yer alan Arginine'inin yerine Glutamine' in geçmesi ile faktör V Leiden sentezlenir. Mutasyon faktör V' in aktive protein C tarafından tanınan, parçalanan ve inaktive edilen bölgesinde lokalizedir. Faktör Va Leiden' in protein Ca tarafından inaktivasyonu, normal faktör Va' ya göre daha zordur (18). Aktive protein C direncine neden olan başka mutasyonlar da rapor edilmiştir. Faktör V geninin ekson 7 bölgesi üzerinde Arginine-306' nın yerine Threonine' nin geçmesi ile oluşan faktör V Cambridge (86) APC direncine yol açarken, aynı eksonda , Arg-306' nın yerine Glycine' nin geçmesi ile oluşan faktör V Hong Kong (12) faktör V geni üzerinde oluşan, ancak APC ile ilişkilendirilememiş ve klinik önemi henüz belirlenememiş yeni tanımlanmış bir mutasyondur. Ekson 13' te A 4070 G (His 1299 Arg) değişimi R2 haplotipi olarak isimlendirilir. Bu mutasyon Somali, Güney Hindistan, İtalya ve Güney Kıbrıs' da aynı sıklıkta görülmektedir (0.075). Aynı eksonda Somali kökenlilerde A 3935 G değişimi (His 1254 Arg) R3 haplotipi olarak belirlenmiştir. Kıbrıs kökenlilerde allel sıklığı 0.065 olarak bulunmuştur. Bu bölge 27 bp' lik bir dizinin 31 tekrarından oluşmaktadır. Ekson 13 üzerinde oluşan bu iki mutasyon da APC direncine yol açmaktadır (40,76).

Faktör V Leiden mutasyonu otozomal dominant kalıtım gösterir ve sıklıkla beyaz ırkta görülen bu anomali özellikle taşıyıcıda diğer risk faktörleri de eklendiğinde yüksek tromboz riskine sebep olur. Faktör V Leiden mutasyonu; Caucasian' larda % 2 - 7 oranında yüksek bir prevalansa sahiptir (58). Faktör V Leiden mutasyonunun varlığını, Zvelin en az 30.000-34.000 yıl önceye dayandırmıştır (89).

İlk kez 1993' te Dahlbäck ve arkadaşları tarafından tanımlanan APC' ye direnç (19) kalıtsal trombofililerin en sık karşılaşılan nedenlerindedir. İlk kez venöz tromboz saptanan hastalarda % 20 APC direnci saptanırken, anormal aile öyküsü olan hastaların % 50' sinde saptanmıştır.

Kanın dolaşımında pıhtılaşmadan akışkanlığının sağlanması ve damar bütünlüğünün bozulduğu durumlarda pıhtılaşma sistemi ile dışarı akışın engellenmesi ve bu kısmın tamirine olanak sağlanması hemostaz dengesinin düzenli çalışmasına bağlıdır. Bu denge prokoagülan ve antikoagülan sistemin uyumlu bir şekilde çalışması ile sağlanır. Prokoagülan sistemin yetersiz çalışması veya antikoagülan sistemin fazla çalışması kanama diatezine yol açarken, prokoagülan sistemin aktivasyonu ve antikoagülan sistemin yetersizliği tromboza neden olur (76).

Antitrombin III pıhtılaşma sisteminde trombin, Xa, IXa, XIa ve XIIa' yı inhibe eder (4). Heparin sülfat, antitrombinin etkinliğini büyük ölçüde artırır. Heparinin antitrombin etkinliğini 1000 kattan fazla artırdığı bilinmektedir. Heterozigot antitrombin eksikliği genel popülasyonda çok düşük oranda görülüp trombozlu hastalarda görülme oranı % 1' dir ve tromboz riskini 5 kat artırır (76).

Endotel yüzeyindeki trombomodulin trombin ile birleşerek protein C' yi aktive protein C' ye dönüştürür. APC kofaktör protein S' nin etkisi ile faktör Va ve faktör VIIa' yı inaktive eder (25). Heterozigot protein C eksikliği trombozlu hastaların yaklaşık % 3' ünde saptanır ve tromboz riskini 7 kat artırır.

Protein S, APC' nin kofaktörüdür ve protein S eksikliğinde tromboz riski protein C eksikliğine göre daha düşüktür (40).

Protrombin molekülünde 20210 nolu guaninin yerini adenin almıştır. Normal popülasyonda % 2.3, trombozlu hastalarda % 6.2 ve familiyal trombozlularda ise % 18 oranında saptanmıştır (56). İspanyol popülasyonunda ise % 6.5 oranında tespit edilirken, aynı popülasyondaki venöz trombozlu hastalarda oran % 17.2 olarak saptanmıştır. Dolayısıyla bu mutasyonun venöz tromboz riskini 3 kat artırdığı görülmüştür (71).

Yukarıda bahsedilenlerden de anlaşılacağı gibi trombofili nedenleri çok sayıda ve değişken olup faktör V Leiden bunların arasında en başta yer alan neden olarak görülmektedir. Bu amaçla, ülkemizde daha önce araştırılmamış olan, DVT olgularında faktör V Leiden mutasyon sıklığını araştırmayı planladık.



## GENEL BİLGİLER:

### TROMBOZ

Devamlılığı bozulmamış kardiovasküler sistem içinde pıhtılaşmış bir kan kitlesinin oluşması tromboz olarak bilinir ve kitlenin kendisine trombus denir. Kanın pıhtılaşması yırtılmış bir damara tıkaç oluşturduğunda hayat kurtarıcı olabilir, hayati bir yapıyı besleyen bir damarı tıkadığında ise yaşamı tehlikeye sokabilir. Ayrıca trombusun bir bölümü ya da tamamı kopup ayrılarak, kan akımıyla uzak bölgelere sürüklenen bir embolus oluşturabilir. Dolayısıyla, sıklıkla kullanılan tromboembolizm teriminin de gösterdiği gibi tromboz ve embolizm birbiriyle sıkı ilişkilidir. Hem tromboz hem de embolizmin olası sonucu, infarksiyon olarak bilinen hücre ve dokuların iskemik nekrozudur. Kalp, akciğer ve beynin tromboembolik infarktleri gelişmiş ülkelerde başta gelen hastalık ve ölüm nedenleridir (16).

Bir trombusun gelişimine normal hemostaz işleminin uygunsuz uyarılmasının sonucu olarak bakılabilir. Hemostazı, doku incinmesinden sonra vasküler sistemin bütünlüğünü koruyan konakçının savunma mekanizması olarak tanımlayabiliriz. Koordine cevabı oluşturmak için tamir mekanizması, immun ve diğer inflamatuvar olaylarla birlikte çalışır. Hemostatik sistem genellikle hareketsizdir, fakat doku incinmesi yada doku hasarını takiben bu sistemler hızlı bir şekilde aktive olur (55). Bir damar yırtıldığında, endotel kaynaklı güçlü bir vazokonstriktör olan endotelin gibi bazı faktörlerle etkisi muhtemelen arttırılan refleks nörojen mekanizmalara bağlı olarak, hemen kasılır. Bu damar kasılması iyi gelişmiş müköler duvarları olan damarlarda en belirgindir, fakat aynı zamanda metaarterioller ile kapillerlerin birleşme yerlerinde bulunan sfinkter mekanizmalarında da meydana gelir ve dolayısıyla kapillerlere kan akımını durdurur. Eğer trombositler ve pıhtılaşma sistemi uyarılmamışsa, kısa süre içinde damar kasılması hafifler ve kanama yeniden başlar. Bunu izleyen hemostaz olayını üç temel faktöre göre inceleyebiliriz:

1. Endotelyum
2. Trombositler
3. Pıhtılaşma sistemi

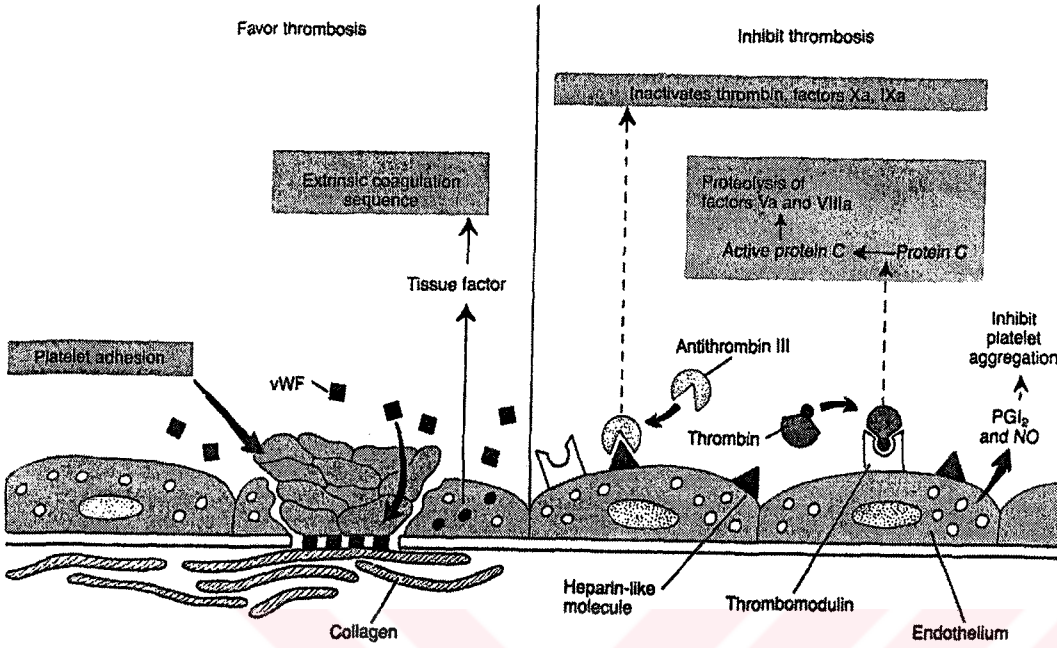
1.Endotelyum : Endotel hücreleri, hemostaz-pıhtılaşma sisteminin çeşitli görünüşlerini düzenler. Bir yandan antitrombosit, antikoagülan ve fibrinolitik özelliklere sahip iken, diğer taraftan pıhtılaşmayı başlatıcı fonksiyonları vardır.

Antitrombosit etkileri : Sağlam endotel kanın trombositlerini ve pıhtılaşma sistemi proteinlerini şiddetli trombojen etkiye sahip olan subendotelyal yapılardan, özellikle kollajenden yalıtır. Kan akımı içindeki trombositler endotele yapışmazlar. Bu antitrombosit etki, prostasiklin yapımına bağlı olmayıp, endotelin plazma membranının iç yüzüne ait görünmektedir. Fokal endotel zararının ardından, trombositler aktive olduklarında, çevredeki zarar görmemiş endotel hücrelerine yapışmaları, güçlü trombosit kümeleşmesi inhibitörü ve etkin vazodilatatörler olan prostasiklin ve nitrik oksidin etkileri ile engellenir. Prostrasiklin bilinen bir arasıdonik asid türevidir, nitrik oksid ise L-argininin enzimatik dönüşümüyle ortaya çıkan endotel kaynaklı bir gevşeticidir. Bunların endotel hücrelerinde sentezi, adenosin difosfat (ADP), trombin ve pıhtılaşma sırasında oluşan daha başka serum faktörleri tarafından uyarılır.

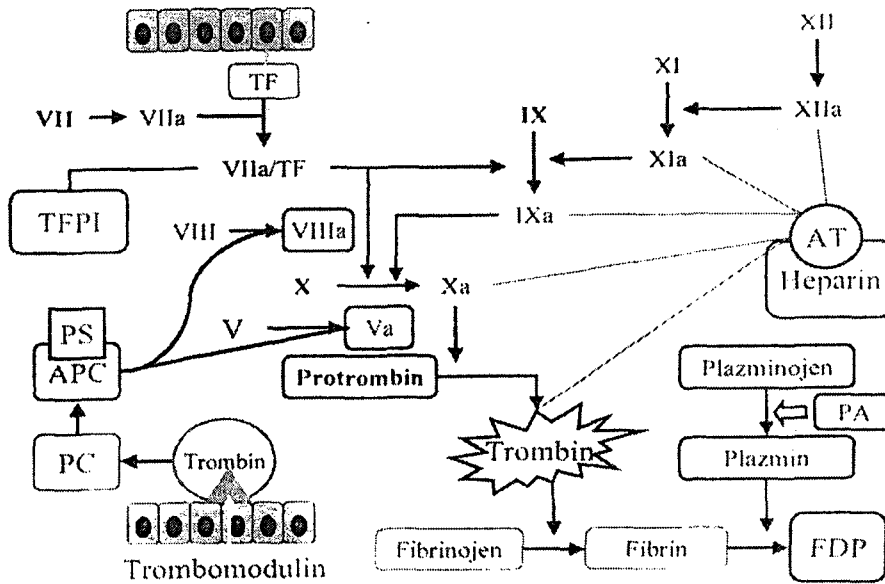
Antikoagülan özellikler : Bunlar, membrana ilişik heparin benzeri moleküller ve özgün bir trombin reseptörü olan trombomodulin tarafından oluşturulur (Şekil 1) (16). Heparin benzeri moleküller, etkilerini dolaylı olarak yaparlar. Bunlar, trombin ve faktör Xa' da dahil olmak üzere bir çok başka pıhtılaşma faktörünü inaktive eden, serumda doğal olarak bulunan antikoagülan protein antitrombin III' ün etkisini güçlendirirler. Trombomodulin de dolaylı etki gösterir. Trombine bağlanır ve bu şekilde onu, pıhtılaşmayı sağlayan bir faktörden pıhtılaşmayı engelleyici bir faktöre dönüştürür. Trombomoduline bağlanan trombin, güçlü bir doğal antikoagülan olan protein-C' yi aktive eder. Aktive olan protein-C, faktör Va ve VIIIa'yı enzimatik olarak parçalar ve pıhtılaşmayı inhibe eder. Endotel hücreleri tarafından sentez edilen protein S, protein C'nin antikoagülan etkisine kofaktör olarak yardım eder (Şekil 2).



Şekil 1. Endotel hücrelerinin protrombotik ve antitrombotik aktivitelerinden bazılarının şematik resmi. Profibrinolitik ve antifibrinolitik özellikler gösterilmemektedir.



Şekil 2. Pıhtılaşmada inhibitör mekanizmalar (TF:Doku faktörü, TFPI:Doku faktörü yolu inhibitörü, AT:Antitrombin. PC:Protein C, PS:Protein S, APC:Aktive protein C, PA:Plazminojen aktivatörü, FDP:Fibrinojen/fibrin yıkım ürünleri).



Fibrinolitik özellikler : Endotel hücreleri, kan pıhtılarına karşı, kanda fibrinolitik aktiviteyi başlatan ve endotel yüzeylerinden fibrin birikintilerini temizlemeye yardım eden plazminojen aktivatörlerini sentez ederek yanıt verir. Endotel hücreleri bir yandan pıhtılaşma ve tromboza karşı dururken, öte yandan hem trombositleri hem de pıhtılaşma proteinlerini etkileyerek hemostaza öncülük ederler. Endotel zararı hemostazın ilk basamağına yol açar. Endotel hücreleri trombositlerin kollajene ve diğer yüzeylere yapışması için gerekli olan vonWillebrand faktörünü (v WF) sentezler ve serbestleştirir. Zarara uğrayan ya da bir dürtü alan (örneğin tümör nekroz faktörü veya interlökin-1 ile temas eden) endotel hücrelerinden serbestleşen doku faktörü, pıhtılaşma sisteminin ekstresek yolunu harekete geçirir. Endotel hücreleri aynı zamanda, aktive olmuş faktör IX ve X için yapışma bölgeleri de içerirler ve hücreye bağlanan faktörler, solusyon içindekilerden daha etkin görünürler. Endotel hücrelerinin bir başka tromboz yapıcı etkisi de, fibrinolizi baskılayan bir plazminojen aktivatörü inhibitörünün salgılanması yoluyla olur (16).

Özetle, sağlam endotel hücreleri çok yönlü fonksiyon gösterebilmekle birlikte, başlıca; trombosit yapışmasını ve pıhtılaşmanın başlamasını inhibe etmeye yarar. Tersine, endotel hücresi zararı pıhtılaşmaya karşı mekanizmaların kaybı demektir ve bu yüzden hemostaza ve tromboza yardım eder.

2. Trombositler : Trombositler yuvarlak ya da oval, 2-4 mikron çapında küçük disk şeklinde hücrelerdir. Kemik iliğinde megakaryositlerden oluşurlar. Megakaryositler kemik iliğinde hemopoetik serinin en büyük hücreleridirler. Kemik iliğinde ya da kana geçtikten bir süre sonra özellikle pulmoner kapillerlerden geçmeye çalışırken parçalanarak trombositleri oluştururlar. Trombositlerin kandaki normal konsantrasyonları milimetreküpde 150,000-400,000'dir (35). Dolaşım içindeki şekilleri ile, bir glikokaliksle kaplanmış tipik bir plazma membranı içinde yer alan oldukça yassı diskler gibi görünürler. Trombositler içinde spesifik iki tip granül vardır. Alfa granülleri fibrinojen, fibronektin, faktör V ve faktör VIII, trombosit faktörü 4 (heparini nötralize edici bir polipeptid) ve trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) içerirler. Diğer granüller, adenin nükleotidleri (adenozin difosfat, adenozin trifosfat), iyonize kalsiyum, histamin, serotonin (5-HT) ve epinefrinin metabolizma dışı birikiminin depolanma yerini oluşturan, elektron yoğun cisimciklerdir. Glikoprotein molekülleri kısmen yada tamamen hücre membran lipid bilayer'ine penetre olmuştur. Bu glikoprotein molekülleri, adhesiv proteinler, pıhtılaşma faktörleri ve diğer trombositler için reseptör olarak görev yaparlar. Önemli membran proteinleri ve ilgili fonksiyonları Tablo 1'de gösterilmiştir. Trombosit

yüzeyinde en bol bulunan glikoproteinler glikoprotein IIb ve IIIa'dır. Bu heterodimer iki glikoprotein fibrinojen, vWF ve fibronektin gibi adhesiv proteinler için reseptör olarak görev yaparlar. IIb-IIIa kompleksi integrin ailesinin üyesidir. Glikoprotein Ib, vWF ve trombin için reseptör görevi görür. Trombosit ile damar duvarları arasındaki etkileşimde bu reseptör temel bir görev üstlenmiştir (55).

TABLO 1. Önemli trombosit membran proteinleri.

Glikoprotein	Reseptörleri
Ia	Kollajen
IIa	Fibronektin, laminin
Ic	Fibronektin, laminin
Ib/IX	vWF, trombin
IIb/IIIa	Fibrinojen, vWF, fibronektin, Vitronektin
IV	Kollajen, trombospondin
V	Trombin

Bir damarın zarara uğramasıyla birlikte trombositler, subendotelyal kollajen, kapiller bazal membranı, fibroblastlar ve düz kas hücreleri gibi damar duvarının bir çok elemanı ile temas ederler. Bunların hepsi trombosit yapışmasına yol açabilmekle birlikte, en kuvvetli uyaran kollajendir.Örneğin, kollajenle temas eden trombositler; 1. Yapışma, 2.Serbestleştirme reaksiyonu ve 3. Kümeleşme olarak sıralanabilecek bir dizi değişikliğe uğrarlar. Bunların tümüne birden trombosit aktivasyonu adı verilir.

1. Trombositin kollajene yapışması büyük ölçüde von Willebrand faktörü ile etkileşim aracılığı ile olur. Bu büyük molekül, trombositin yüzey reseptörleri, özellikle glikoprotein Ib ile açığa çıkan kollajen arasında köprü işlevi görür (16).

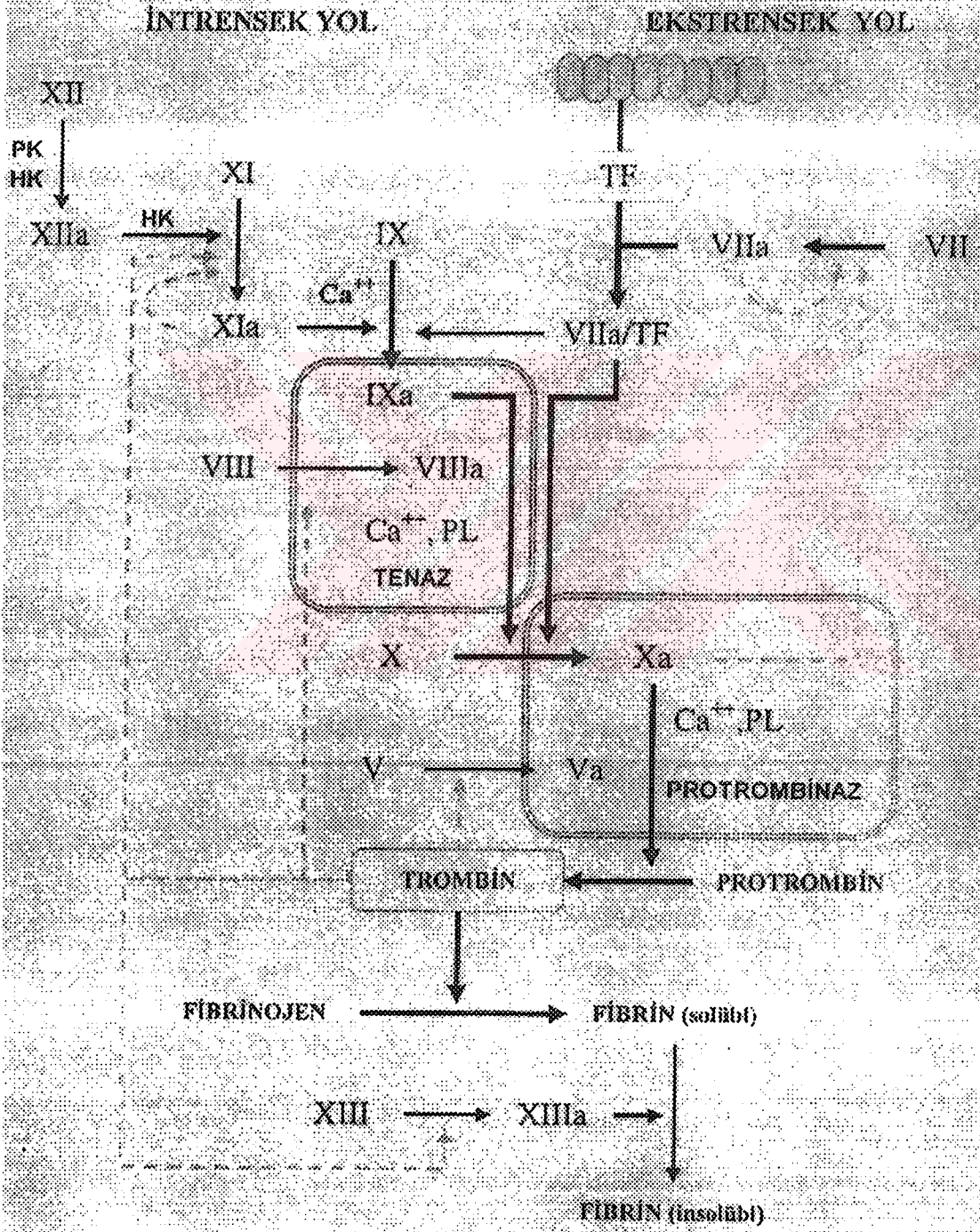
2. Trombositlerin subendotelial kollajene yapışmalarını hemen ADP, serotonin ve diğer çeşitli trombosit içeriğinin serbestleştiği sekresyon izler. ADP sekresyonu özellikle önemli bir olaydır, çünkü ADP trombosit kümeleşmesine neden olur ve aynı zamanda diğer trombositlerden ADP salgılanmasını artırır. Böylece, giderek büyüyen bir trombosit kümesinin oluşmasına yol açacak, kendi kendini yineleyen bir mekanizma kurulmuş olur. Başlangıçta trombosit kümeleşmesi geri dönebilir niteliktedir, dolayısıyla damar duvarındaki gedik geçici bir hemostatik tıkaç ile kapatılır. Fakat çok geçmeden trombin, tromboksan A<sub>2</sub> ve artan miktarlardaki ADP'nin etkisi altında trombositler sıkışır ve kalıcı bir kümeleşmiş trombosit kitlesi oluşur. TXA<sub>2</sub> trombositler tarafından sentezlenen bir prostaglandindir ve prostasiklin gibi, arasıdonik asid metabolizmasının siklooksijenaz yolunun bir ürünüdür. Bununla birlikte, prostasiklin (PGI<sub>2</sub>) ve TXA<sub>2</sub> ters etkilere sahiptirler, prostasiklin trombosit kümeleşmesini inhibe eder ve damarları genişletir; oysa TXA<sub>2</sub> güçlü bir kümeleştirici ve damar daraltıcıdır. PGI<sub>2</sub> ve TXA<sub>2</sub>'nin karşılıklı rolleri, insanda trombosit fonksiyonunun düzenlenmesinde, normal koşullarda trombosit kümeleşmesini ve pıhtılaşmayı önleyen, endotel zararı oluştuğunda ise hemostatik tıkaçın oluşmasını sağlayan hassas bir denge kurar (16).

3. Damarın zarara uğradığı yerde trombosit kümesinin oluşması bir çok yönden işe yarar. Küçük damarlarda, tek başına kanı durdurucu bir tıkaç olarak kanamanın kontrol altına alınması için yeterli olabilir. Kümeleşmiş trombositler platelet faktör 3'ü pıhtılaşma mekanizması için hazır hale getirir. Platelet faktör 3 (öteki trombosit içeriklerinden farklı olarak) salgılanan bir ürün olmayıp, daha çok trombositin yüzeyinde aktive olan veya bir şekilde ortaya çıkan bir fosfolipid bileşimidir. Bu olgu özellikle önemlidir, çünkü pıhtılaşma mekanizmasının her bir basamağı bir fosfolipid yüzeye gereksinim gösterir. Bu nedenle, trombosit yüzeyi kendisi de güçlü bir trombosit kümeleştirici faktör olan trombinin birikimi için bir liman oluşturur. Böylece, trombosit sisteminde, pıhtılaşma mekanizmasına katkıda bulunarak hemostatik tıkaç oluşumunu destekleyen, kendi kendini devam ettiren bir dönüşüm halkası oluşur. Pıhtılaşmanın son ürünü olan fibrin kümeleşmiş trombositleri birbirine kaynaştırır (16).

3. Pıhtılaşma Sistemi : Hemostaz olayının üçüncü komponenti, trombus oluşumunda başlıca yardımcılarından biridir. Pıhtılaşma mekanizması temelde, eriyebilir bir plazma proteini

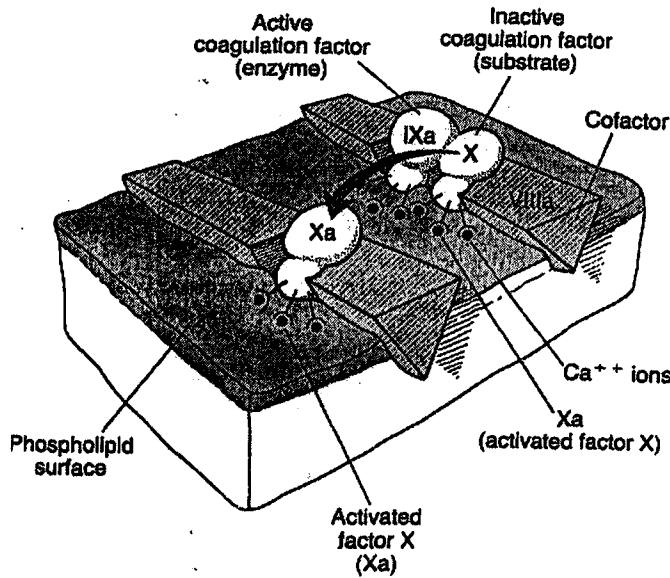
olan fibrinojeni erimez lifsel protein olan fibrine dönüştüren trombinin oluşumu ile sonuçlanan, bir dizi proenzimlerin aktif enzimlere (serin proteazlar) dönüşmesi olayıdır (Şekil 3).

Şekil 3. Pıhtılaşma şalesi.İntrensek ve ekstrinsek pıhtılaşma yolları arasındaki ortak bağlantının şematik olarak açıklaması.



Pıhtılaşma yolundaki her bir reaksiyon, bir enzim (aktif pıhtılaşma faktörü), bir substrat (pıhtılaşma faktörünün proenzim hali) ve bir kofaktörden (reaksiyon hızlandırıcı) oluşan bir reaksiyon topluluğunun bir araya gelmesiyle ortaya çıkar. Bu komponentler bir fosfolipid yüzeyde toplanırlar ve kalsiyum iyonları tarafından birleştirilirler. Bu yüzden, pıhtılaşma aktive olmuş trombositlerin yüzeyi gibi, böyle bir topluluğun bir arada olabildiği yerlere sınırlı kalma eğilimindedir. Kanın pıhtılaşmasında anahtar reaksiyonlardan biri olan faktör X'un Xa'ya dönüşümü şekil 4' te şematik olarak açıklanmıştır. Kanın pıhtılaşma şemasını, faktör X'un aktive olduğu noktada birleşen ekstrinsek ve intrinsek yollara ayırmak gelenek olmuştur (Şekil 3). Bununla birlikte, böyle bir ayırımın muhtemelen in vitro test yöntemlerinin bir yanıltması olduğu, intrinsek ve ekstrinsek denilen yollar arasında bir çok bağlantının bulunduğu bugün bilinmektedir. Yollar arasında böyle bir bağlantının önemli bir örneği, faktör IX'un faktör IXa'ya dönüşümünün sadece intrinsek yolun kontakt-aktive olan faktörleriyle değil, aynı zamanda ekstrinsek yolun başlatıcısı olan faktör VII ile de oluştuğunun gösterilmesidir (Şekil 3) (16).

Şekil 4. Faktör X' in, faktör Xa' ya dönüşümünün şematik açıklaması. Reaksiyon kompleksi bir enzim (Faktör IXa) bir substrat (Faktör X) ve bir reaksiyon akselatörü (Faktör VIIIa) içermektedir ve trombositlerin yüzeyinde toplanmıştır.  $Ca^{++}$  toplanmış komponentleri birarada tutar ve reaksiyon için gereklidir.



Pıhtılaşma sistemi aktive olduğunda, pıhtılaşmanın tüm damar sistemine yayılmaması için, olayın damar zararının olduğu yerde sınırlı tutulması gerekir. Doğal olarak bulunan anti-koagülanlar üç ana gruba ayrılırlar :

1. Antitrombin III ile örneklenen anti-trombinler, trombinin ve faktör IXa, Xa, XIa ve XIIa gibi öteki serin proteazların etkilerini inhibe etme özelliği ile belirlenirler. Antitrombin endotel üzerindeki heparin benzeri moleküllere bağlanarak veya tedavi amacıyla heparin verilmesiyle aktive olur.
2. Protein C ve Protein S, kofaktör Va ve VIIIa'yı inaktive etme yetenekleriyle belirlenen, vitamin K'ye bağımlı iki proteindir ve pıhtılaşma sisteminde reaksiyon hızlandırıcılar olarak iş görürler. Protein C endotele ilişkin trombomodulin tarafından aktive olur.
3. Plazminojen-plazmin sistemi fibrini parçalamaya ve fibrin polimerizasyonunu kontrol etmeye yarar. Plazminojenin, aktif hali olan plazmine proteolitik olarak dönüşmesi ya faktör XII'ye bağımlı bir yoldan, ya da plazminojen aktivatörleri (PA) ile olur. İki grup plazminojen aktivatörü vardır: Ürokinaz benzeri PA(uPA) plazmada ve çeşitli dokularda bulunur ve sıvı halindeki plazminojeni aktive eder. Doku tipi PA(tPA), başlıca endotel hücreleri tarafından sentezlenir ve fibrine yapıştığı anda aktive olur. Fibrine olan ilgisi tPA'ya çok daha yararlı bir tedavi maddesi haline getirir. Fibrin parçalanma ürünleri serbestleştiklerinde güçlü anti-koagülanlar olarak iş görürler. Plazminojen aynı zamanda, bir bakteri ürünü olan streptokinaz ile de aktive olur (16).

Tromboz oluşumuna ortam hazırlayan etkiler; endotel zedelenmesi, kan akımında durgunluk veya çalkantılar ve kanın pıhtılaşma eğiliminin artmasıdır.

Endotel zedelenmesi tromboz oluşumundaki en önemli ve kendi başına bile tromboz oluşturabilen tek faktördür. Bu özellik, ağır aterosklerozlu damarlardaki, özellikle aortadaki ülserli plaklar üzerinde, damarların travma ya da iltihaba bağlı zedelenme yerlerinde ve myokard enfarktüsü ya da herhangi tür bir myokardite bağlı olarak endokard zarara uğradığında kalp boşluklarında tromboz oluşma sıklığı ile açıkça kanıtlanır. Zarar, kolay anlaşılmasın yapıda olabilir (hipertansiyonun yaptığı hemodinamik etki, bakteri toksinleri veya endotoksinler) ve homosistinüri, hiperkolesterolemi ve sigara dumanından absorbe edilen maddeler gibi farklı etkiler de endotel zedelenmesinin nedenleri olabilirler. Bu durumların çoğunda açık seçik ve belli, başka durumlarda ise belirsiz olarak, endotel zararı ve

subendotelyal kollajenin, (aynı zamanda öteki trombosit aktivatörlerinin) açığa çıkması, trombositlerin yapışması, doku faktörünün serbestleşmesi ve prostasiklin ve plazminojen aktivatörünün lokal olarak baskılanması vardır. Bununla birlikte, endotel zararının elektron mikroskopik incelemede dahi saptanamayacak kadar gizli olabileceğini de vurgulamak gerekir (16).

Staz ve çalkantılı akımlar, yarattığı staz cepleriyle birlikte, önemli tromboz yapıcı etkenlerdir. Normal laminer kan akımında şekilli elemanlar bir plazma tabakası ile endotel yüzeyinden ayrı tutulur. Staz ve çalkantılı akımlar, laminer akımı bozar ve trombositlerin endotelle temas etmesine yol açar, aktive olan pıhtılaşma faktörlerinin kritik düzeyin altına kadar sulandırılmasını engeller, pıhtılaşma faktörü inhibitörlerinin bölgeye ulaşmasını geciktirir, trombosit kümelerinin ve çok yavaşlamış olan akım içinde veya durgunluk ceplerinde ortaya çıkmaya başlayan fibrinin oluşmasına izin verir, endotel hücrelerinin hipoksisini ve zararını arttırarak trombosit ve fibrin birikimine ortam hazırlar ve aynı zamanda tPA serbestleşmesini azaltır, çalkantılı akım endotel zararı oluşturur. Venalarda kan akımının yavaş olmasından dolayı, staz venöz akımda daha üstün bir role sahiptir. Çeşitli araştırmacılar, derin baldır venlerinde, kapakçıkların arkasındaki sinüslerde oluşan venöz trombozların kaynağını belgelemişlerdir. Benzer bir durum olasılıkla, atrial fibrilasyon veya mitral stenozdaki gibi ağır atrium dilatasyonu olduğunda kalp orikülalarında meydana gelir. Staz ve çalkantılı akım, temeldeki damar hastalığı ve endotel zararı nedeniyle esasen tromboza yatkın yerler olan anevrizmalar içinde tromboz oluşumuna tartışmasız olarak katkıda bulunmaktadır.

Kanın pıhtılaşma eğiliminin artması ( hiperkoagülabilité ) kanın ya da daha özgün olarak pıhtılaşma mekanizmasının, tromboza ortam hazırlayacak bir biçimde değişmesi olarak tanımlanabilir. Bu, tromboz oluşumunda sık rastlanan bir neden değildir. En iyi anlaşılmiş ve örnek niteliğindeki pıhtılaşma eğilimi artışı vakaları, doğal antikoagülanlar olan antitrombin III, protein C veya protein S' in kalıtsal olarak eksik olduğu durumlardır. Bu hastalar ilk gençlik veya erken erişkin yaşlarında venöz tromboz ve tekrarlayan tromboemboliler ile ortaya çıkarlar. Bu kalıtsal hastalıklar oldukça nadir olmakla birlikte, bu gibi hastalarda tromboza eğilimin temelini anlamak kolaydır (81). Oysa, nefrotik sendrom, şiddetli travma ve yanıklar, gebeliğin geç dönemi, kalp yetmezliği ve yaygın kanser gibi daha sık rastlanan klinik tablolarındaki tromboz eğiliminin patogenezi çok daha zordur. Bu durumlardan bazılarında, örneğin kalp yetmezliğinde veya travma sonrasında staz ya da damar zararı gibi etkiler asıl önemli mekanizmalar olabilir. Fakat yaygın kanserli veya gebeliğin geç dönemindeki hastalarda



tromboz sıklığı ve oral kontraseptif kullanan kadınlarda venöz ve arteryel tromboz sıklığının artması, ortam hazırlayıcı mekanizma olarak, pıhtılaşma eğilimi artışını gösterir. Ne yazık ki bu durumların çoğunda pıhtılaşma eğilimi artışının temelini kesin olarak belirlemek zordur. Oral kontraseptif kullananlarda plazma fibrinojeni, protrombin, faktör VII, VIII ve X' un konsantrasyonlarında bir artış, aynı zamanda fibrinolitik aktivitede bir azalma gösterilebilir, yine de laboratuvar testleri ve artmış tromboz arasında bir neden sonuç ilişkisini kanıtlamak mümkün olmamıştır. Yaygın kanserli hastalarda nekrotik tümör hücrelerinden trombojenik faktörlerin salgılanması veya prokoagülan maddelerin serbestleşmesi, tromboza eğilimin artmasının nedeni olarak öne sürülmüştür.

Anyonik fosfolipidlere ( lupus antikoagülan ) karşı yüksek oranlarda otoantikör taşıyan bazı hastalar yüksek bir arteryel veya venöz tromboz sıklığı gösterirler. Bunlardan bazılarında sistemik lupus eritematöz gibi iyi tanımlanmış bir otoimmün hastalığın belirtileri vardır; fakat diğerlerinde, tromboz başlıca ya da tek klinik belirtidir. Antifosfolipid antikörlerinin canlıda hangi mekanizma ile trombozu başlattığı bilinmemektedir. Olasılıklar arasında trombosit kümeleşmesinin uyarılması, endotel hücrelerinde prostasiklin yapımının baskılanması, protein C yapımının engellenmesi vardır. Özetle, bazı yol gösterici klinik ve laboratuvar delillerine rağmen, artmış pıhtılaşma eğiliminin trombogenezdeki rolünü kanıtlamak zordur. Bu genellemenin dışında kalanlar, sadece kalıtsal antitrombin III, protein C veya S eksiklikleridir (16).

#### Klinikle İlişki :

Trombozlar iki nedenden dolayı hayati önem taşır; arter ve venlerin tıkanmasına neden olurlar ve muhtemel embolizm kaynakları oluştururlar. Venöz trombozlar vücudun alt bölümlerinde konjesyon ve ödeme neden olabilirler. Fakat, çok daha tehlikeli bir sonuç trombozların, en sık olarak da bacak venlerinde oluşmaların, ABD' de başlıca ölüm nedenlerinden biri olan pulmoner embolizm ve enfarktlara neden olmalarıdır. Bunun tersine, arteryel trombozlar da emboliye yol açabilmekle birlikte bundan daha önemli olan bunların, koroner damarlar tutulduğunda myokard enfarktı veya serebral damarlar tutulduğunda beyin enfarktı oluşturan, tıkaçıcı etkisidir (16,81).

Venöz trombozların çoğu tıkaçıcı trombozlardır. Bu trombozların büyük bölümü yüzeysel veya derin bacak venlerinde ortaya çıkarlar. Yüzeysel trombozlar genellikle safen sisteminde,

özellikle de varisler olduğunda oluşur. Bu trombozlar lokal konjesyon ve şişmeye, ağrıya ve hasta venin gidişi boyunca hassasiyete neden olurlar, fakat nadiren emboliye yol açarlar. Yine de lokal ödem ve venöz akımının bozulması derinin hafif travmalarla infekte olmasına ve variköz ülserlere ortam hazırlar. Asıl tehlikeli olanlar bacağın büyük venlerindeki ( popliteal, femoral ve ilyak venler gibi ) derin trombozlardır, çünkü bunlar embolizm yapabilirler. Bunlar aynı zamanda, ayak ve bilekte ödeme neden olabilir ve baldır kaslarında baskı ile ( baldır kaslarını sıkarak veya ayağa zorlu dorsifleksiyon yaptırarak ) ağrı ve hassasiyet oluştururlar. Buna Homans bulgusu denir. Bununla birlikte hastaların yaklaşık yarısında bu trombozlar tümüyle belirtisiz kalır ve ancak embolizm yaptıklarında anlaşılırlar. Venöz tıkanıklık, kısa sürede yeni bypass kanallarının açılmasıyla giderilir. Derin bacak venlerindeki trombozun en tehlikeli yönü, bunların emboli ve enfarkt oluşturmalarıdır. Burada iki tanı üzerinde durmak gerekir. Tromboflebit tanımı sıklıkla flebotromboz vakalarına kullanılmaktadır. Çünkü, bazen lokal olarak gözlenen ağrı, hassasiyet ve kızarıklık, damar duvarındaki kronik bir iltihabi reaksiyonun bulguları olarak yorumlanmakta ve bu nedenle tromboflebit adı verilmektedir. Bununla birlikte, morfolojik incelemeler nadiren bu damarların duvarında ciddi bir iltihabi infiltrasyon göstermektedir. Ağrı, hassasiyet ve kızarıklığı lokal staza, ödeme ve tutulan damarın gerilmesine bağlamak daha akılcıdır. Bu nedenle flebotrombozla tromboflebit arasında klinik olarak geçerli bir ayırım yoktur (16).

Sıklıkla venöz tromboz oluşan klinik tablolar; kalp yetmezliği, şiddetli travma ve yanıklar, ameliyat veya doğum sonrası durumlar, nefrotik sendrom, yaygın kanser, tüm ağır hastalıklar ve oral kontraseptif kullanımıdır. Kalp yetmezliği venöz akım yavaşlamasının açık bir nedenidir. Travma, cerrahi girişim ve yanıklar özellikle fiziksel aktivitenin azalmasına, damar duvarı zararına, dokulardan prokoagülan maddelerin serbestleşmesine ve tPA aktivitesinin azalmasına yol açar. Ameliyat sonrasında derin ven trombozunun görülme sıklığı genel cerrahi girişimlerden sonra % 15-30, ortopedik girişimlerden sonra % 45-70 olarak saptanmıştır. Doğum sonrası ve lohusalık dönemlerinde tromboza ortam hazırlanmakta, faktörlerin çoğu birlikte etkili olurlar. Doğum sonrasında damar travması ve trombosit kümeleştirici ve muhtemelen prokoagülan maddeleri taşıyan amnion sıvısının pelvis venlerine girme olanağı vardır. Bunlara ek olarak gebeliğin 3. trimestrinde ve doğum sonrasında ayrı bir venöz tromboz eğilimi olur. Bu durum, " süt bacağı " ya da " phlegmasia alba dolens " ağrılı beyaz bacak olarak tanımlanır. Bu eğilimin nedeni tam olarak aydınlanmamışsa da, pıhtılaşma eğiliminin artmasına ve aynı zamanda fibrinoliz olayının kısmen baskılanmasına bağlanmıştır (16, 64).

İç organ kanseri, özellikle de karın içi tümörleri (pankreas kanseri gibi) olan hastaların vücutlarındaki herhangi bir yerde tromboz oluşumuna eğilim, ilk defa Trousseau tarafından bildirilmiştir ve Trousseau belirtisi olarak tanımlanır. Sıklıkla bir yerde oluşan tromboz kaybolup bir başka yerde tromboz ortaya çıkar ve gezici tromboflebit denen tabloya yol açar. Bu tromboza yatkınlığın temelinde muhtemelen yaş, cerrahi girişimler, yatağa bağımlı olmak ve ayrıca tümör hücrelerinde prokoagülan maddelerin serbestleşmesi sonucu pıhtılaşma eğiliminin artması gibi bir çok faktör yer almaktadır. Kanserde, tromboz eğilimine yol açan pek çok muhtemel mekanizma vardır. Spesifik klinik tabloya hiç bakmaksızın, ileri yaş, yatak istirahati ve hareketsizlik tehlikeyi arttırır. Yaşlılıkta fiziksel aktivitenin azalması, bacakların alt bölümünde kasların ( venler üzerindeki ) sağıcı etkisini azaltır ve venöz dönüşün azalmasına neden olur. Hareketin engellenmesi ( immobilizasyon ) ve yatak istirahati de aynı özellikleri taşır. Oral kontraseptif kullanan kadınlarda tromboz gelişme riski artmaktadır. 35-45 yaş arası kadınlarda riskin en yüksek olduğu ve bunun yanında sigara içmenin trombotik hastalık tehlikesini oldukça arttırdığı bildirilmektedir (16,40,80). Tromboza yatkınlığa neden olan herediter ve kazanılmış faktörler tablo 2' de verilmiştir.

TABLO 2. Tromboza eğilimin arttığı durumlar.

Kalitsal Risk Faktörleri	Edinsel Risk Faktörleri
Hemostatik Sistem	Yaşlılık
Antitrombin III eksikliği	Hareketsizlik
Protein C eksikliği	Şişmanlık
Protein S eksikliği	Büyük cerrahi girişim
Faktör V Leiden mutasyonunun yol açtığı Aktive Protein C Direnci	Travma ve yanık
Protrombin gen mutasyonu	Malignite
Fibrinojen varyantları	Gebelik
Hiperhomosisteinemi	Oral kontraseptifler
Faktör VIII yüksekliği	Antifosfolipid sendromu
<b>Diğer sistemler</b>	Konjestif kalp yetmezliği
Diabet	Myokard enfarktüsü
Orak hücreli anemi	Nefrotik sendrom
Konjenital kalp hastalıkları	İnfeksiyonlar

Artmış Lipoprotein A	Hiperviskozite
Hipertrigliseridemi	Dehidratasyon
	Paroksizmal gece hemoglobinürisi
	Myeloproliferatif hastalıklar
	Vaskülitler
	Heparine bağlı trombositopeni
	Kemik ilgi nakli

Arteriyel trombozlar özellikle, myokard enfarktüsü, romatizmal kalp hastalığı, ağır ateroskleroz ve aort ya da diğer büyük arterlerde anevrizması olan hastalarda gelişir. Genellikle diskinetik myokard kasılması veya kardiyak düzensizliklerin gelişmesinden dolayı, tutulan kalp boşluğunda aynı zamanda staz ve çalkantılı akım da mevcuttur. İlerlemiş yaş, yatak istirahati ve dolaşım bozukluğu da sorunu artırır. Romatizmal kalp hastalığı genellikle mitral kapakta belirgin darlığa ve bununla birlikte, genişlemiş sol atrium ve orikula da staza yol açar. Aynı zamanda kardiyak aritmiler de stazı artırabilir. Gelişmiş ülkelerdeki başlıca ölüm nedenlerinin ( myokard enfarkti ve inme ) temelinde yer alan ağır ateroskleroz, artık açık seçik olan nedenlerden dolayı, trombozu başlatan başlıca faktörlerden biridir. Tıkanmaya bağlı tüm ciddi olaylara ek olarak, aortada ve kalp boşluklarındaki trombozlardan sıklıkla küçük parçacıklar koparak, beyin, böbrek, bacaklar ve dalakta embolizm yapar. Diğer doku ve organlar da tutulabilir. Fakat beyin, böbrekler ve dalak kan akımlarının fazlalığından dolayı başlıca hedefleri oluştururlar. İlyak, femoral ve bacağın alt bölümündeki daha distal arterler, aortik kan akımı hattının son duraklarını oluştururlar (16,40,81).

Bir çok yüksek risk taşıyan klinik hastalığa yer verilmekle birlikte, trombozun herhangi bir klinik tablo içinde ve bazen tümüyle sağlıklı, aktif, genç insanlarda, özellikle işleri uzun süre ayakta durmayı veya oturmayı gerektirenlerde de oluşabileceğini vurgulamak gerekir. Bu yüzden, hiç kimse buna karşı korumalı değildir ve sonuçta tromboz kendine özgü yapıda, önceden kestirilemeyen, şaşırtıcı bir hastalıktır (16).

Venöz tromboza sahip bireylerde kalıtsal trombotik bozukluklar yaygın bir şekilde bulunur. Buna rağmen, kalıtsal AT III, protein C ve protein S eksiklikleri bu bireylerde %10'dan daha azdır( Tablo 3); ailesel tromboz hikayesi olan, tekrarlayan venöz tromboza sahip

ve 50 yaşın altında olup tromboz hikayesi yeni olan hastalarda ise bu defektler 7 kat daha fazla bulunur. APC direnci ( faktör V Leiden'den dolayı ), protrombin gen mutasyonu ve hiperhomosisteinemi'de çok yaygın bir şekilde bulunan defektlerdir ve bu yüzden, ailesel tromboz hikayesi olmayan, 50 yaşın üzerindeki idiopatik venöz trombozun ilk evresindeki hastaların önemli bir çoğunluğunda bu defektler bulunur. Böyle hastalarda faktör V Leiden, protrombin gen mutasyonu ve hiperhomosisteinemi'nin varlığı mutlaka araştırılmalıdır (40).

TABLO 3. Venöz Trombozlu hastalarda defektlerin yaygınlığı.

Aktive protein C ( faktör V Leiden )	% 12 – 40
Antitrombin III, protein C,protein S eksiklikleri	% 5 – 15
Protrombin gen mutasyonu	% 6 – 18
Hiperhomosisteinemi	% 10 – 20
Bilinmeyen	~% 15 – 66

#### Aktive Protein C Direnci :

Dahlbäck ve arkadaşları, 1993' yılında familyal thrombofilia için yeni bir mekanizma tanımladılar. Aktif parsiyel tromboplastin zamanı ( PTT ) araştırmalarında APC' ye zayıf cevap veren, ailesel venöz tromboembolizmi hikayesi olan kişiler bulmuşlar. APC inhibitörlerinde

yada fonksiyonel protein S eksikliğinde olduğu gibi, APC direnci için tanımlanmış mekanizmalar hariç tutulmuştur. Probandların klinik olarak etkilenmiş akrabalarında uygulanan PTT testinde APC direnci görülmüş ve anormalliğin kalıtsal olduğu iddia edilmiştir. Yine faktor IXa ve faktor Xa' ya dayalı testlerde de probandların APC' ye zayıf antikoagülant cevap verdikleri görülmüştür. Bu gözlemlerine dayanarak Dahlbäck şu hipotezi öne sürmüştür: Bu hastalarda, APC' nin antikoagülant etkisini desteklemek için protein S ile ilgili fonksiyonları olan henüz tanımlanamamış bir plazma kofaktörünün eksikliği söz konusudur. Dahlbäck' ın bu incelemeleri sayesinde, APC direncini araştırmak için kullanılan PTT testlerinin geliştirilmesi kolaylaşmıştır. Dahlbäck ve Svensson venöz tromboz şikayeti ile başvuran 104 İsveçli hastada yapmış oldukları araştırmada, bu hastaların % 33' ünde APC direnci saptadılar (74). Trombozu başlatan nedenler olarak hastaların % 60' ında, hamilelik ve oral kontraseptif kullanımı gösterilmiştir. Yapılan ailesel çalışmalar, APC direnci bulunan akrabalarda, bu defektin bulunmadığı akrabalara oranla tromboz sıklığının önemli bir şekilde daha yüksek olduğunu göstermiştir. Amerika' da Griffin ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, nedeni bilinmeyen venöz tromboembolizme sahip, 50 yaşın altındaki hastalarda APC direnci yaklaşık olarak % 50 civarında bulunmuştur (33). İtalya ve Avusturyada'ki diğer gruplarda, nedeni bilinmeyen venöz trombozlu hastalarda APC direncini göstererek Dahlbäck ve Svensson' u onaylamışlardır (40). Hollandalı araştırmacılar tarafından Leiden' de yapılan çalışmaların, APC direncinin klinik ilgisini ve moleküler temelini anlamamıza çok önemli katkıları olmuştur. 1987' de, Hollanda' nın genel popülasyonunda venöz trombozun risk faktörlerini incelemek için Leiden Thrombophilia Merkezinde çalışmalar başlatıldı. Protein C eksikliği ile ilişkili venöz trombozun gerçek riskini tanımlamak için sarfedilen bu gayretler bir girişimden daha ileriye gitmiştir. Ancak bu çalışmalar neticesinde bir paradoks ortaya çıktı: Protein C eksikliği görülen ailelerde, venöz tromboz sıklığı oldukça yüksekti, ama 200-500 sağlıklı gönülden birinde de protein C eksikliği söz konusuydu. Bu çalışmaları doğrulayan kriter, bu anlaşmazlığın altında yatan nedenin majör bir faktörün olacağı hissini veriyordu. Dahlbäck' ın çalışmalarını izleyen Leiden'deki bir grupta, APC direncine sahip 301 hastayı araştırmışlar. Yetmiş yaşın altında, objektif testlerle derin ven tromboz tanısı doğrulanmış, Leiden Thrombophilia Merkezinde antikoagülant tedavisini tamamlamış, ayakta tedavi gören hastalar çalışmaya alınmıştır. Kanserli hastalar çalışmanın dışında bırakılmıştır. Her trombozlu hasta aynı yaş ve cinsiyetteki sağlıklı kontrolleri ile karşılaştırılmıştır. APC direnci trombozlu hastalarda % 21 ve sağlıklı kontrollerinde ise % 5 oranında bulunmuştur. APC direnci, sağlıklı kontrollerle venöz trombozlu olgularda karşılaştırıldığında kontrollere göre venöz trombozda 7 kat daha fazla olduğunu hesaplamışlardır( Tablo 4 ). Bu çalışmadaki APC direncinin,

bahsedilen diğer çalışmalarinkinden daha düşük sıklıkta bulunması tromboz için farklı seçim kriterlerinin uygulanmasından ileri gelmiştir (43).

TABLO 4. Leiden Thrombophilia Merkezinin Verileri: Ortak risk faktörlerinden dolayı genel popülasyonda derin ven trombozunun ilk epizodu için rölatif ve absolüd riskler.

	Risk	İnsidans/100 kişi yıllar	Kaynak
Normal	-	0,008	
Hiperhomosisteinemi	2,5 x ↑	0,02	
Protrombin gen mutasyonu	2,8 x ↑	0,022	56
Oral kontraseptifler	4 x ↑	0,03	80
Faktör V Leiden heterozigot	7 x ↑	0,057	43
Oral kontraseptifler + faktör V Leiden	35 x ↑	0,285	80
Faktör V Leiden homozigot	80 x ↑	0,5 – 1	65

APC direncinin en sık nedeni Arginine 506' nın Glutamine 506' ya mutasyonunu içeren Arg 506 Gln yada faktör V Leiden olarak isimlendirilen faktör V' deki bir defektir. Bu başlangıçta APC' ye bağlanan faktör Va' daki kısımdır ve bu dizideki değişiklik faktör Va molekülünü mutant kılar; böylece enzim tarafından inaktivasyonu önlenir (6). PTT araştırmalarında, Hollandalı APC dirençli hastaların % 90' nında Arg 506 Gln yer değişikliğinin, APC direncine neden olduğu bulunmuş ve sağlıklı Hollandalılardan seçilmiş kontrollerde yapılan araştırmada da bu mutasyonun % 2-4 oranında olduğu tespit edilmiştir. APC dirençli hastaların büyük çoğunluğu faktör V Leiden mutasyonu için heterozigottur. Ancak, PTT araştırmalarına göre homozigot hastaların büyük çoğunluğunda APC direncinin yüksek olduğu saptanmıştır (6). Homozigotlarda trombotik risk heterozigotlara oranla daha yüksektir. ( Tablo 4 ) (65,91). APC direnci heterozigot hastalar, protein C, AT III ve muhtemelen protein S genlerindeki mutasyonlarla birlikte olabilir (42). AT III ve faktör V genleri 1. kromozomun uzun kolu üzerinde yer almışlardır ve bu yüzden, ailedeki etkilenmiş bireylerin hepsinde faktör V Leiden mutasyonu ile AT III mutasyonu birlikte kalıtılır. Bu durumun çok ciddi trombotik diatezlere de neden olduğu sanılmaktadır.

Son zamanlarda, faktör V geninde ( aktive kofaktörde ikinci APC direnç kısım aralığı ) Arginine 306' da bir mutasyonun olduğundan bahsedilmektedir. Faktör V Leiden mutasyonunun bulunmadığı, APC direncinin mevcut olduğu, proksimal venöz trombozlu, 49 yaşında bir erkek hastadan söz edilmiştir (86). Hastada ve herhangi bir trombotik hadisesi olmayan annesinde yapılan sekans analizinde, Arg 306 Thr ( Faktor V Cambridge ) mutasyonu gösterilmiştir. Ancak bu mutasyonun çok nadir görüldüğü bildirilmektedir. Venöz tromboemboli tanısı konmuş 602 birey arasından ancak 17 hastada Arg 306 ' da mutasyon görülmüştür. Venöz tromboz hikayesi olan 2 Çinli hastada, faktör V geninin 7. eksonunda ( A 1090 G ) Arg 306 Gly mutasyonu belirlenmiştir (12). Bu yeni mutasyonun tanımlandığı bu iki kişi APC direnci yönünden araştırılmış, ancak sonuçlar menfi bulunmuştur. Bununla birlikte, kontrol olarak çalışmaya alınan 40 kişiden sadece 1 kişide tanımlanan ve APC direnci ile ilgili olmayan bu anormalliğin klinik önemi kesinlik kazanmamıştır. APC direncini oluşturan dominant mekanizmanın faktör V Leiden mutasyonunun olmasına rağmen, Dahlbäck' in orjinal hipotezinde ileri sürdüğü APC' nin antikoagülant aktivitesini destekleyen ikinci bir plazma kofaktörün varlığına dair veriler mevcuttur (86).

Amerikalı hekimlerin Halk Sağlığı çalışmaları, faktör V Leiden' in venöz tromboz için bir risk faktörü oluşturduğu hakkında önemli veriler sağlamıştır. Sekiz yıl altı ay boyunca, 40 yaşın üstündeki 14.916 sağlıklı erkek gözlenmiş ve bu kişilerin % 6' sında pulmoner emboli yada derin ven trombozunun başlangıcı tespit edilmiş bu kişilerin % 12' sinde de (121 kişiden 14' ü) heterozigot faktör V Leiden mutasyonu tespit edilmiştir (61). Venöz tromboemboli için rölatif risk bu bireylerde, diğer risk faktörü bulunmayan kişilere oranla 3.5 kat artmıştır. Yine bu çalışma, venöz trombozlu daha yaşlı hastalarda bu mutasyonun daha sık olduğunu göstermiştir (60,61). Venöz tromboz oluşturan diğer risk faktörlerinin bulunmadığı, 60 yaşın üzerindeki venöz trombozun başlangıç evresinde bulunan 31 erkek hastanın 8' inde faktör V Leiden heterozigot bulunmuştur ( % 26 ) (61). Faktör V Leiden mutasyonu taşıyan kadınlarda, hamilelik ve oral kontraseptif kullanımının venöz tromboz riskini önemli bir şekilde artırdığı belirtilmiştir. Halk sağlığı hekimleri, yakın geçmişte ameliyat olmuş erkek hastalarda ve kanserin ilk evrelerinde bulunan erkek hastalarda trombotik riskin 1,7 kat artacağını göstermiştir, bu da istatistiksel olarak önemli bulunmadı (61).

Arteriyel trombozlu vakalarda faktör V Leiden gibi yaygın protrombik risk faktörlerinin olup olmadığı belirlenmelidir (52). AT III, protein C ve protein S eksiklikleri gibi diğer



trombofilik olayların arteriyel trombozu artırdığı hakkında ikna edici bir bilgi mevcut değildir (61), ancak bu ilginin değerlendirilmesi bu defektlerin rölatif seyrekliği ile zorlaştırılmamalıdır. Arteriyel tromboz tanısını koymak için genellikle faktör V Leiden mutasyonu, APC direnci ve AT III, protein C, protein S eksiklikleri araştırılmaz; bu vakalarda lupus antikoagülantı / yükselmiş antifosfolipid antikor titresi ve hiperhomosisteinemi gibi faktörler araştırılır. Ancak bu faktörler venöz trombozlu vakalarda da değerlendirilmelidir ( Tablo 5 ).

TABLO 5. Tromboz Olgularında Araştırılması Gereken Koagülasyon Defektleri.

Anormallikler	Arteriyel	Venöz
Faktör V Leiden	-	+
Antitrombin III eksikliği	-	+
Protein C eksikliği	-	+
Protein S eksikliği	-	+
Protrombin gen mutasyonu	?	+
Hiperhomosisteinemi	+	+
Lupus antikoagülant / antifosfolipid sendromu	+	+

Amerikalı halk sağlığı hekimlerinin, sigara içimi düşük, 40 yaşın üstündeki erkeklerde yapmış oldukları araştırmalar sonucunda miyokard enfarksiyonu yada stroke ile faktör V Leiden arasında bir ilgi bulunamamıştır. Yine İtalya’ da yapılan bir çalışmada, 45 yaşın altındaki miyokard enfarksiyonlu hastalarda, faktör V Leiden mutasyonunun bu hastalığın insidansını artıran bir durum olarak görülmemiştir (40). Ayrıca, faktör V Leiden için homozigot mutasyon taşıyan 36 Fransız hastada, arteriyel tromboz ile ilgili her hangi bir bulguya rastlanılmamıştır. Bununla birlikte son zamanlarda vaka kontrol çalışmasından alınan son veriler, faktör V Leiden heterozigotluğunun, 18 - 44 yaşları arasındaki genç kadınlarda miyokard enfarksiyonu için risk faktörü olduğunu belirlemiştir. Ancak bunun için, miyokard enfarksiyonunu oluşturan diğer kardiyak risk faktörlerinde birlikte bulunması gerekir. Faktör V Leiden mutasyonunun varlığı, miyokard enfarksiyon riskinin yaşlara oranla 2.4 kat daha artacağı ilişkisi kurulmuştur (miyokard enfarksiyon’lu hastalarla kontroller karşılaştırıldığında, 79 hastanın 8’inde, yani % 9.5’ u, kontrollerin % 4.1’ i). Faktör V Leiden ile ilgili miyokard enfarksiyon riskinin sadece sigara içenler arasında 3 kat daha fazla bulunduğu gözlenmiştir. Sigara içmeyen ve faktör V Leiden mutasyonu taşımayan kadınlarla, sigara içen

ve mutasyonu taşıyan kadınlar karşılaştırıldığında; sigara içen ve mutasyonu taşıyan kadınlarda miyokard enfarksiyon riskinin 30 kat daha fazla olduğu Rosendaal ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. İlginçtir ki; ileri yaş, obezite, hiperkolesterolemi, hipertansiyon, diabet, ailesel iskemik kalp hastalığı ve postmenapozal statü (cerrahi olarak oluşmuş) gibi diğer kardiyak risk faktörleri kalp ile ilgili olaylarla ilişkilidir, düşük dozda oral kontraseptif kullanımı ise ilgili değildir. Miyokard enfarktlerinde, yine protrombin gen mutasyonu da risk faktörü oluşturmaktadır (40,64).

TABLO 6. Değişik toplumlarda faktör V Leiden G 1691 A sıklığı.

Toplumlar	Sıklık (%)
Normal Beyazlar	2-7
Zenci Afrika	0.0
Asya	0.1
Fas	1.1
Batı Hint Adaları	2.9
Hollanda	2.9
Kuzey Doğu Almanya	7.1
Polonya	5
Arjantin	5
Kosta Rika	2
Venezuela	2.4
Punjab	1.3
Japonya	0
Brezilya	2
Zenci	<1
Türkiye	7-10
Kıbrıs Türkleri	12.2
Azerbaycan	14

Faktör V Leiden mutasyonu için heterozigotluğun prevalansı, Hindistan popülasyonunda, İsrail Araplarında, Yahudilerde, Avrupa dahil, Caucasian' larda %1 ile % 8.5 arasındadır.

Görünüşe göre, Afrika zencilerinde, Çinlilerde, Japonlarda yada Amerikan Yerli popülasyonunda bu mutasyon mevcut değildir (59). Haplotip analiz yapmak için faktör V geninde dimorfik alanlar kullanan Zivelin ve arkadaşları, farklı etnik geçmişe sahip Caucasian' larda mutasyonun temeli olarak kurucu bir etkinin varlığı hakkında veriler sağlamışlardır (89). Caucasian, Afrika ve Doğulu popülasyonların farklılıklarını değerlendirdikten sonra Zivelin ve arkadaşları bu mutasyonun yaklaşık olarak 30.000 yıl önce ortaya çıktığını tahmin etmişlerdir (89). Değişik toplumlarda faktör V Leiden G 1691 A sıklığı tablo 6' da gösterilmiştir.

Faktör V Leiden mutasyonu ve tip I faktör V eksikliğinin yol açtığı heterozigot APC direncinin bulunduğu hastaların birbirinden ayrılması ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu bireylerin, homozigot faktör V Leiden mutasyonu taşıyan hastalar gibi PTT testlerinde şiddetli APC direncine sahip oldukları aşikardır (onlar yalancı homozigotturlar). Tromboza bu hastalar, yalnız heterozigot faktör V Leiden mutasyonu taşıyan akrabalarından daha çok eğilim gösterirler, bunların klinik fenotipleri homozigot faktör V Leiden mutasyonu taşıyan hastalara benzemektedir.

Faktör V geninde çeşitli polimorfizmler mevcuttur. Bunlar Leu 1257 Ile ve His 1299 Arg gibi iki amino asidin yer değiştirmesi ve B domain proteinlerini kodlayan ve aktivasyonu ortadan kaldıran 13. eksonda oluşan Ser 1240 için kodon dimorfizmi şeklinde oluşan polimorfizmlerdir. İtalyan popülasyonunda parsiyal faktör V eksikliğinin bulunduğu kişilerde, Arg 1299 ( R2 ) kodlayan allelin sıklığı % 30, kontrol grubunda ise % 7.5 oranındadır. R2 polimorfizm içeren faktör V gen haplotip ( HR2 ) uzanımı hafif APC direnç fenotipine katkı sağlar; Arg 830 Lys ve Arg 837 His, amino asit yer değişiklikleri ile sonuçlanan nükleotid transversiyonları da içermektedir. En düşük APC direnç oranlarına sahip hastalarda faktör V Leiden sıklığını arttırmasına ve hafif APC direnci ile ilgili olmasına rağmen, HR2 haplotipi henüz venöz trombozu artıran bir risk faktörü olarak gösterilememiştir (40).

Dahlbäck'in başlattığı çalışmalar, APC direncini araştıran bir test olarak hizmet veren PTT' ye dayalı testlerin geliştirilmesini kolaylaştırmıştır. PTT, APC' nin standart miktarının varlığı veya yokluğunda çalışır ve iki pıhtılaşma zamanı APC oranına dönüştürülür. Sonuçlar normal dizilerin oranı ile karşılaştırılarak yada normal birleştirilmiş plazma kullanımı içeren APC direnç oranlarına normalleştirilerek tartışılır. Pıhtılaşma laboratuvarlarında, bu birinci jenerasyon APC direnç testini kavramsal olarak hazırlamak kolay ve basit olmasına rağmen,

dikkatli bir standardizasyon ve en azından 50 kontrolde normal dizinin belirlenmesini gerektirir. PTT reagentlerinden ve pıhtılaşma testlerinde kullanılan aletlerden testin karakteristik performansı etkilenmektedir. Bu yüzden bu format kullanılarak uygulanan bir takım testlerde faktör V Leiden mutasyonunun sipesifikliği ve sensitivitesi yeterli düzeyde saptanamamaktadır. Diğer pıhtılaşma defektlerinin yol açtığı anormal PTT' li yada antikoagülant alan hastalarda bu testle araştırma yapılamaz, ve yine hamile kadınlarda yada akut trombotik hadiseli hastalarda bu test geçersizdir. Alışlagelmiş bir uygulama olarak Warfarin alan hastalarda APC direnci test edilemez, aynı zamanda lupus antikoagülanlı hastalarda da testin yapılıp yapılmayacağı tartışılmaktadır (70).

APC direncinin hemen hemen bütün vakalarının altında yatan nedenin faktör V Leiden olduğunun keşfi ile faktör V Leiden mutasyonu için uygun bir standardizasyon yapılarak neredeyse % 100 sensitiv ve % 100 sipesifik sonuçların elde edilmesine olanak sağlayan ikinci – jenerasyon pıhtılaşma testleri APC direncinin belirlenmesini kolaylaştırmıştır. Ya PTT' ye dayalı testler yada doku faktörü – faktör V' e bağlı testler kullanılarak, faktör V' in eksik olduğu plazmanın yeterli miktarı ile hasta plazması dilue edilerek yukarda sözü edilen başarıya ulaşılmıştır. Testte yapılan bu modifikasyon ile, faktör V' den ayrı olarak diğer pıhtılaşma faktör eksikliklerinin yol açtığı anormal PTT sonuçlu hastalar yada antikoagülan kullanan hastalarda doğru sonuçların elde edilmesi sağlanılmıştır (40).

APC direncini oluşturan dominant neden gerçekte faktör V Leiden mutasyonudur; bu mutasyonu araştırmak için, periferik kanda dolaşan mononükleer hücrelerden elde edilen genomik DNA' nın analizi ile bu defektin tanısını koymak oldukça ilgi çekicidir. Faktör V Leiden mutasyonunu içeren DNA fragmentinin, polimeraz zincir reaksiyonu ( polymerase chain reaction, PCR ) ile amplifikasyonu gerçekleştirilir ve elde edilen PCR ürünü Mnl 1 restriksiyon ( restriction endonülease ) enzimi ile muamele edilip, sindirimi ( digestion ) sağlandıktan sonra ethidium bromide ile boyanmış agaroz jelde analiz edilir (6). Faktör V cDNA' da 1691. nükleotidde G' nin yerine A' nın geçmesi ile ( CGA' dan CAA' ya ) Arg 506 Gln mutasyonunun oluştuğu görülür. Allel spesifik oligonükleotid problemler ile hibridizasyonu içeren yöntem bir diğer tanı yaklaşımıdır (90).

Bu gün, ikinci – jenerasyon pıhtılaşma testi kullanılarak APC direncini test etmek, faktör V Leiden' li hastaların tanısını koymak için en etkili yaklaşım olarak görülmektedir. Faktör V Leiden genotipi ve bunların APC direnç testlerinin sonuçları arasında mükemmel bir uyumun

sağlandığı laboratuvarlarda böyle onaylayıcı testler yapmanın gereksiz olduğu tartışılabilmesine rağmen, düşük APC direnç oranına sahip hastaların mutasyonunun genotiplendirilmesi yapılmalıdır.

Faktör V Leiden mutasyonu taşımayan APC dirençli bazı hastaların APC direncinin belirlenmesinde birinci – jenerasyon PTT’ ye dayalı testler kullanılabilir. Bu tip APC direncinin klinik imaları değişkendir. Böyle bireylerin belirlenmesinde bu testlerin uygulanması en iyisi tromboz araştırma merkezleri ile sınırlandırılmalıdır. Bununla birlikte iki grup, faktör V Leiden mutasyonundan kaynaklanmayan APC direnci ile ilişkili serebrovasküler hastalıklı bireyler bildirmişlerdir. Bu iki grubun yapmış olduğu çalışmalardan birinde araştırmacılar, mutasyonu taşıyanlar ve taşımayanların optimal ayırımı için bir cut-off değeri kullanan alışlagelen uygulamanın aksine APC’ ye duyarlı hastaları 5 kategoriye ayırmışlardır (78). İstatistiksel analizler, faktör V Leiden mutasyonundan bağımsız olarak serebrovasküler hastalıkları artıran bir risk ile ilgili olarak düşük APC cevabını göstermişlerdir.

#### Antitrombin III Eksikliği :

1965 yılında Egeberg, AT III konsantrasyonu % 40-50’ nin altında olan, tromboz öyküsüne sahip bireylerden oluşmuş Norveçli bir aile tanımlamıştır. Diğer araştırmacıların takip eden çalışmalarında da Egeberg’ in tanımladığı benzer klinik ve laboratuvar anormalliğine sahip başka aileler bulunmuştur.

AT III eksikliği, otozomal dominant kalıtım gösterir ve bu yüzden her iki cinsiyette eşit bir şekilde etkilenir (4,75). Kalıtsal AT III eksikliği iki ana tipe ayrılarak incelenmektedir. Tip I eksiklik durumu, normal proteaz inhibitör moleküllerinin biyolojik sentezlerinin azalması ile oluşur (4). Bu vakalarda, kandaki AT III’ ün fonksiyonel aktivitesi ile antijen düzeyi paralel bir şekilde azalmaktadır. Bu bozukluğun moleküler temelini ya AT III geninin başlıca sentezinde bir delesyon yada, yaygın bir şekilde küçük delesyonlar / insersiyonlar (<22 baz çifti), yada tek baz yer değişiklikleri oluşturur. Yakın zamanda elde edilen bilgilere göre, Tip I eksiklikli hastalarda 80’ e yakın farklı mutasyon tespit edilmiştir. İkinci tip AT III eksikliği, proteaz inhibitöründe meydana gelen bir moleküler defekt ile oluşur. AT III’ ün plazma düzeyi oldukça azalmıştır ve fonksiyonel aktivitede de azalma görülmesine rağmen, AT III’ ün immünolojik aktivitesi belirgin bir şekilde normal kalmıştır.

Kanda AT III eksikliği immünoassay yöntemlerle ölçülmüş ve genel popülasyonda 5000-2000 kişiden 1' inde bu eksikliğin var olduğu tahmin edilmiştir. Bununla birlikte, son zamanlarda AT III-heparin kofaktör aktivitesi fonksiyonel testler kullanılarak ölçülmüş ve genel popülasyonda AT III eksikliğinin prevalansı 1/ 250-500 olarak bulunmuştur (47,75).

Familyal AT III eksikliği görülen kişilerin yaklaşık % 55' inin venöz tromboz vakaları olduğu, bu araştırmaların yayınlandığı makaleler gözden geçirilerek saptanmıştır (21). Örneklerin yaklaşık % 42' sinde klinik bulgular spontan bir şekilde gelişirken, geriye kalan % 58' i ise hamilelik, oral kontraseptif kullanımı, cerrahi operasyon yada travma ile ilişkilendirilmiştir (21). Hastalık en sık olarak bacağın derin venlerini ve mezenterik venleri tutar. Bireylerin yaklaşık olarak % 60' ında tekrarlayan trombozlar gelişirken, % 40' ında da pulmoner embolinin klinik işaretleri görülür.

Sas, 1974 yılında anormal protein (Tip II ) varlığına yol açan AT III fonksiyonel eksikliği bulunan ilk aileyi rapor etmiştir. Bu eksikliğe sahip bir çok ailede, AT III aktivitesinin iki farklı fonksiyonel test temel alınarak alt kategorileri yapılmıştır. Birinci test AT III-heparin kofaktör testidir. Test; faktor Xa ve trombin gibi koagülasyon enzimlerinin nötralizasyonunu katalizleyen ve inhibitör üzerinde lysyl residuelerine bağlanan heparinin etkinliğini ölçmeye dayanır. İkinci test ise progresiv AT III aktivite testidir; heparinin varlığında trombinin enzimatik aktivitesini nötralize etmek için bu inhibitörün kantitatif kapasitesini ölçmeyi amaçlar (40).

#### Protein C Eksikliği :

1981' de, Griffin ve arkadaşları; tekrarlayan trombozları bulunan, protein C antijeninin plazma düzeyleri normalin % 50' sinin altında değerlere sahip çeşitli aileler tanımlamışlardır. Sonra gelen araştırmacılarda heterozigot protein C eksikliği saptanmış pek çok başka aileler bildirmişlerdir (7,24).

Heterozigot protein C eksikliği otozomal dominant kalıtım gösterir ve protein C eksikliğinin daha şiddetli formu otozomal resesif bozukluktur (25,26,67,73). Heterozigot protein C eksikliği olan hastaların fenotipi, kalıtsal AT III eksikliğine benzerdir. Şiddetli bir şekilde etkilenen ailelerde protein C eksikliği olan bireylerin yaklaşık % 75' inin başından bir veya daha fazla trombotik olay geçmiştir. Yaklaşık % 70' inde görünüşte ilk epizot spontan

olarak oluşur. Geriye kalan % 30' u akut trombotik olayların gelişimi esnasında bilinen risk faktörleri ( hamilelik, parturition, kontraseptif tablet kullanımı, operasyon, travma ) ile ilişkilidir. Hastalık en fazla bacağıın derin venlerini, iliofemoral venlerini ve mezenterik venlerini tutar. Etkilenen hastaların yaklaşık olarak % 63' ünde tekrarlayan venöz tromboz gelişir ve yaklaşık olarak % 40' ında da pulmoner emboliye ait belirtiler görülür. Protein C eksikliği olan hastalarda, bir kaç serebral venöz tromboz vakasında (87) olduğu gibi bacağıın venlerinin süperfisiyal tromboflebitinin de sıklığı yüksektir (9). Kalıtsal protein C eksikliğinin görüldüğü genç yetişkin hastalarda, yine nonhemorajik arteriyel strok' un da geliştiğı bildirilmiştir.

Miletich ve arkadaşları,(48) sağlıklı yetişkin kan dönörlerinde yaptıkları araştırmada, 200-300 kişiden birisinde heterozigot protein C eksikliğinin mevcut olduğunu göstermişlerdir, halbuki Tait ve arkadaşlarının araştırmasında, sağlıklı genel popülasyonda bu oran 500 kişiden 1 kişi olarak saptanmıştır. Bu çalışmalara alınan bireylerin hiç birisinde daha önce tromboz hikayesine ait bulgular tespit edilememiştir. Leiden Thrombophilia Araştırma Merkezinde yapılan çalışmaların sonucunda, genel popülasyonda heterozigot protein C eksikliği görülen bireylerde derin ven tromboz riskinin, normal kişilerle karşılaştırıldığında 7 kat daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir (43).

İmmünolojik ve fonksiyonel testler kullanılarak, heterozigot protein C eksikliğinin başlıca iki subtipi belirlenmiştir. Tip I eksiklik durumu, plazma protein C düzeyi yaklaşık normalin % 50' nin altında ve hem immünolojik hem de biyolojik aktivitenin azalmasıyla karakterize en yaygın şeklidir. Protein C eksikliği görülen hastalarda yapılan genetik defekt araştırmaları 160' tan fazla farklı mutasyonun belirlenmesine neden olmuştur. Tip I eksikliğıne sahip bireylerde en yaygın mutasyonlar nonsense ve missense mutasyonlarıdır. Tip I protein C eksikliği ile sonuçlanan mutasyonların diğere tipleri; promotor mutasyonlar, splice site anormallikleri, in-frame delesyonları, frameshift delesyonları, in-frame insersiyonları ve frameshift insersiyonlarıdır. Tip II eksikliğıne sahip ailelerde ki etkilenmiş bireylerin immünolojik testleri protein C düzeyinin normal olduğunu göstermiştir, ancak zimojen düşük fonksiyonel düzeye sahiptir. Tip II protein C eksikliğıne sahip hastalarda tek nokta mutasyonları görülür (40).

## Protein S Eksikliği :

1984 yılında, bir kaç ailenin üyelerinde, tekrarlayan venöz tromboz tanımlanmış ve bu kişilerin protein S düzeylerinin azalmış olduğu gösterilmiştir. Bu araştırmayı destekleyen bu bozukluğa sahip bir çok başka aileler de bildirilmiştir (38). Heterozigot protein S eksikliği otozomal dominant kalıtım gösterir ve protein S eksikliğinin çok ciddi formu otozomal resesif kalıtım gösteren bozukluklardır. Heterozigot protein S eksikliğine sahip hastaların klinik görünümü AT III yada protein C eksikliğinde görülen bulgulara ana hatları ile benzemektedir. Hollandalı 12 ailenin protein S eksikliğine sahip 71 üyesinde yapılan araştırmada, bu bireylerin % 74' ünde derin ven trombozu, % 72' sinde süperfisiyal tromboflebit ve % 38' inde de pulmoner emboli bulunmuştur. Warfarin' in neden olduğu cilt nekrozu da heterozigot protein S eksikliği bulunan hastalarda tanımlanmıştır (40). Nadiren protein C veya protein S eksikliğinin homozigot eksikliği tromboza yol açabilir ve bu, bebeklerde purpura fulminans oluşturur (8).

Protein S, K vitaminine bağlı ve karaciğerde, endotel hücrelerinde, megakaryositlerde, leydig hücrelerinde sentezlenen bir glikoproteindir. Normal şartlar altında plazmada total protein S antijeninin yaklaşık % 60' ı C4b- bağlayan protein ile kompleks oluşturmuş bir şekilde bulunur. Aktive protein C' nin antikoagülant etkilerine arabuluculuk eden bir kofaktör olan ve fonksiyonel olarak aktive olan serbest protein S ise plazmadaki protein S' nin % 40' ını oluşturur (25).

Total protein S antijeninin en güvenilir ölçümleri radioimmünoassay ve enzyme-linked immunosorbent assay teknikleri ile yapılır. Protein S C4b-bağlayan protein kompleksinin ayırımını sağlayan, plazma örneklerinin dilusyonunu içeren tekniklerdir. Bu amaçla, polyethylene glycol presipitasyon kullanılarak plazmada protein S ile C4b-bağlayan protein ayrıştırılır (13) ve süpernatant fraksiyonunun immünoassay ile serbest protein S' nin kantitasyonu yapılabilir. Şimdilerde artık, serbest forma spesifik antikörlerin kullanıldığı monoklonal antikora dayalı immünoenzimatik testler, spesifik bir şekilde serbest protein S' nin ölçümünü mümkün kılmıştır. Fonksiyonel testler; APC' nin antikoagülant etkisine bir kofaktör olarak hizmet veren protein S' nin varlığına dayalı metodlardır. Bununla birlikte, bu testlerin bazıları protein S için spesifik değildir, aktive protein C direnci ile karakterize defektlere sensitivdir ve bunların kullanımı fonksiyonel protein S eksikliğinin hatalı tanısına yol açabilir (40).



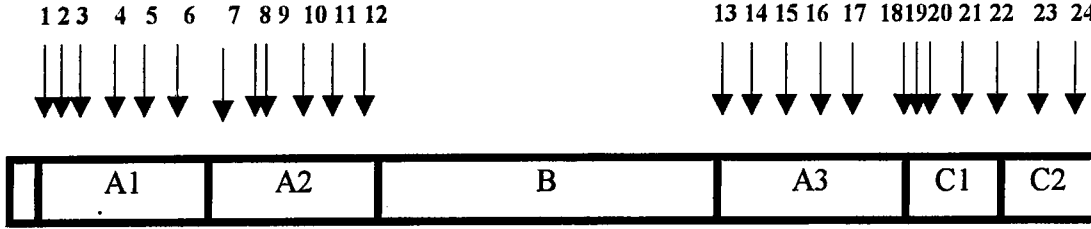
## İnsan Koagülasyon Faktör V Geninin Yapısı :

Protrombinaz kompleksi tarafından trombin jenerasyonu hemostaz ve trombozda can alıcı bir olaydır. Bu kompleks faktör Xa, faktör Va, protrombin, kalsiyum ve fosfolipid ya da hücre yüzeyi içerir. Faktör Va, faktör Xa tarafından protrombinin aktivasyonunda, önemli bir protein kofaktörü olarak görev alır. Faktör V' in çoğu kanda dolaşır; bununla birlikte kandaki faktör V' in % 25' i trombositlerin  $\alpha$  - granüllerinde depolanır. Trombosit aktivasyonu sırasında trombositlerin  $\alpha$  -granüllerinde depolanan faktör V serbest bırakılır. Faktör V' in biyosentezinin büyük bir kısmı karaciğer ve megakaryositlerde yapılır. Bir kısmı da, vasküler düz kas hücrelerinden, T - hücrelerinden ve endotelial hücrelerden sentezlenmektedir (18,28).

1986' da Kane ve Davie, 1987'de Kane ve arkadaşları ve yine 1987' de Jenny ve arkadaşları ilk olarak cDNA klonlaması yaparak, insan faktör V' in amino asit dizisini tanımladılar. Olgun protein 2196 amino asit içermektedir. Faktör V cDNA' nın analizinin sonucunda, domain yapısı sırasıyla A1 - A2 - B - A3 - C1 - C2 olan çeşitli tipte internal tekrarlarla organize olmuş proteinlerden oluşmaktadır (Şekil 5). A, B ve C domainleri sırasıyla, her biri yaklaşık olarak 350, 836 ve 150 amino asit içermektedir. 1984' te Toole ve arkadaşları ve yine aynı yıl Vehar ve arkadaşları, Faktör V' in, homolog olmayan B domaini hariç % 40 oranında faktör VIII' e benzediğini göstermişlerdir. Faktör X' un aktivasyonunda faktör VIII a' nın rolü, protrombin aktivasyonunda faktör Va' nın aldığı role benzemektedir. 1984' te Ortel ve arkadaşları, plazmada bakır-bağlayan seruloplazmin proteininde üçe katlanmış bir şekilde var olan A domaininin, faktör VIII ve faktör V' in yapısındaki yaklaşıklık olarak % 30 oranında benzediğini bulmuşlardır. 1990 yılında da Stubbs ve arkadaşları tarafından, faktör V ve faktör VIII' deki C domainin, göğüs epitel hücre proteini olarak tanımlanmış murinde ki ikiye katlanmış C domainine % 40 oranında benzediğini göstermişlerdir (18).

1988 yılında, Wang ve arkadaşları, faktör V geninin birinci kromozomda yerleştiğini bildirmişlerdir (1q21 - 25 ). Faktör V geni 72 ile 2820 bp arasında büyüklüklere sahip 25 eksondan meydana gelmiştir. 1990 yılında, Watson ve arkadaşları, faktör V geninin, lökosit adezyon moleküllerinden selektin ailesinin de yer aldığı, 300 kb' lık bir bölgeyi kapladığını göstermişlerdir (18).

Şekil 5. Faktör V geninin ekson-intron ve domain yapısı. Kutular faktör V'in domain yapılarını göstermektedir. Domainlerin özellikleri önceden tespit edilen aminoasit dizisine uyumlu olarak harflerle gösterilmiştir. Oklar, olgun mRNA'dan ayrılmış intron bölgelerini işaret etmektedir. Faktör V genindeki her bir intron numarayla gösterilmiştir.



#### Protrombin Gen Mutasyonu:

1996 yılında, Leiden' deki araştırmacılar protrombin geninin 3'-untranslated bölgesinde 20210 nükleotidinde G' nin yerine A' nın geçişiyle yükselmiş plazma protrombin düzeyi ve venöz trombozu artıran bir riskin oluştuğunu göstermişlerdir (29,56). Venöz trombozlu seçilmiş hastaların protrombin geninin direkt bir şekilde dizisinin çıkarılması ile keşfedilmiş olan bu mutasyon, protrombin mRNA' nın polyadenylation' un aralık kısmına yakın yada 3'-untranslated bölgesinin son pozisyonunda lokalize olmuştur. Yükselmiş plazma protrombin konsantrasyonunun trombotik riski artırdığı muhtemeldir.

Venöz tromboz hikayesi olan ailelerde ve bireylerde yapılan araştırmalarda protrombin gen mutasyonu % 18 oranında bulunmuştur ve bu hastaların % 40' ı da faktör V Leiden mutasyonu taşımaktadır. Sağlıklı popülasyonda yapılan araştırmada da, sağlıklı 100 kontrolden sadece 1 kişide bu mutasyon tespit edilmiştir (56).

Leiden Thrombophilia Araştırma Merkezi'nde, venöz trombozlu hastaların % 6.2' sinde, sağlıklı kontrollerin de % 2.3' ünde protrombin gen mutasyonu bulunmuştur (56). Bu mutasyon, venöz tromboz riskini 2.8 kat daha artırmaktadır ( tablo 4 ) ve bu etki hem bütün yaş gruplarında hem de cinsiyetlerde söz konusudur. Hollanda popülasyonunda protrombin gen mutasyonunun allel sıklığı % 1.2 oranındadır, yaklaşık olarak faktör V Leiden mutasyonunun

allel sıklığının yarısı kadardır, bu da venöz tromboz için en yaygın ikinci genetik risk faktörün protrombin gen mutasyonu olduğunu göstermektedir. (56).

#### Hiperhomosisteinemi :

Homosistein diyetle alınan metiyoninden dimetilasyon sonucu türeyen, sülfidril içeren bir aminoasittir. Bundan 30 yıl kadar önce hiperhomosisteinemi ile tromboz ilişkisi tanımlanmış olmakla birlikte, bu ilişkiye ait yeterli bilgiler ancak günümüzde elde edilmiştir. Hiperhomosisteineminin, bireylerde hem arteriyel hem de venöz tromboz riskini artırdığı bildirilmiştir. Hiperhomosisteinemi kalıtsal ya da edinsel olarak gelişebilir. Kalıtsal hiperhomosisteineminin en sık görülen nedeni metilentetrahidrofolat enzimidaki termolabil varyasyondur ve etkinliği normal enzimin % 50' sidir. 677 nolu nükleotidde sitozin ile timin yer değiştirmiştir. Mutasyon normal popülasyonda % 5-12 arasında saptanabilir. Nutrisyonel faktörler de hiperhomosisteinemiye yol açabilir ( düşük B6, B12 ve folik asit alımı ). Renal yetmezlikte de gelişebilir (76).

Homosisteinin bireylerde; endotel hasarı oluşturarak, protein C aktivasyonunu ve trombomodulin ekspresyonunu engelleyerek, doku plazminojen aktivatörünün endotele bağlanmasını bloke ederek, nitrik oksit ve prostasiklin yapımını bozarak, heparin sülfat ekspresyonunu engelleyerek, trombosit adezyonunu artırarak, LDL oksidasyonunu uyarmak suretiyle oluşturduğu etkilerle tromboz oluşumuna yol açabileceği ileri sürülmektedir(1).

Plazma homosistein düzeyi sıvı kromatografi yöntemiyle gösterilebilir. Ancak son zamanlarda uygulama kolaylığı ve düşük maliyet nedeni ile immunoassay yöntemler geliştirilmiştir. Normal değeri 18.5 umol/ lt' nin altıdır. Kan örnekleri aç karnına alınmalı ve eritrositlerin homosistein içermelerinden dolayı plazma suratle ayrılmalıdır (76).

#### Antifosfolipid Antikorları :

Antifosfolipid antikorları ana komponenti fosfolipid olan biyolojik membranlara reaktif antikorlardır. Antifosfolipid antikorlarının varlığı, çeşitli fosfolipid antijenlerin kullanıldığı immunosorbent testlerle ( ELISA ) direkt olarak gösterilebildiği gibi, kan pıhtılaşma zamanında fosfolipid bağımlı testlerde uzamanın saptanması sonucu lupus antikoagülan aktivitesi ile de ortaya konabilir. Antifosfolipid antikorlara sahip bireylerde arteriyel ve venöz tromboza eğilim,

trombositopeni ve kadınlarda tekrarlayan fetus kaybı tablosu bilinmektedir ve bu durum ‘antifosfolipid antikor sendromu, AFS’ adını alır. Altında herhangi bir hastalığın bulunmadığı AFS’ na primer AFS adı verilir. Sistemik Lupus Eritematöz gibi hastalıklara, malignitelere, infeksiyonlara ve ilaçlara bağlı sekonder AFS gelişebilir (76).

Tanıda fosfolipidlere karşı antikorların direkt gösterilmesi yanı sıra lupus antikorları varlığının da araştırılması önemlidir. Çünkü bazı bireylerde lupus antikorları pozitif iken antifosfolipid antikorları negatif ya da lupus antikorları negatif iken antifosfolipid antikorları pozitif bulunabilir. ELISA yöntemi ile uzun süreden beri kullanılan tanı yöntemi, fosfolipid yapısında olan kardiolipine karşı antikorların varlığının saptanmasıdır. Günümüzde birden fazla fosfolipid kompleksi içeren ve bunlara karşı antikorları ortaya koyan testler vardır. Karşılaşılan antikorlar sıklıkla IgG veya IgM yapısındadır. Antikorların IgM veya IgG yapısında olması sürecin akut veya kronik oluşu ile ilgili değildir ve her iki antikorun bireysel varlığı tromboz ile yakın ilişki gösterebilir. Antikorlar sadece fosfolipidlere özgü olmayıp fosfolipidlerle kompleks yapan bazı proteinlere karşı ( beta-2-glikoprotein 1, protrombin, aneksin V gibi ) veya bu kompleks sonucu ortaya çıkan yeni antijenik yapılara karşı olabilir. Her laboratuvar kendi normal değerlerini bulmalıdır. Genellikle normal değerden 3 standart sapma fazla ve üzerindeki değerler pozitif olarak kabul edilir. Lupus antikor kavramı, sistemik lupus eritematozis’ e spesifik olmaması yanı sıra in vitro pıhtılaşma testlerinde uzama göstermesine karşın in vivo tromboza eğilim ile birlikte olması yönünden doğru bir adlandırma değildir. Ancak bu adlandırma uzun süredir kullanılmaktadır ve yerleşmiştir. Koagülasyon testleri genellikle aPTT bazlıdır. Russell Viper Venom isimli yılan zehrinin kullanıldığı modifiye testler vardır(57). Koagülasyon testinde uzama saptanan hastalarda bu uzamanın faktör eksikliğine bağlı olmadığı normal plazma ile 1/1 hacimde karıştırmayı takiben düzelmenin olmaması ile ortaya konabilir. Ortama fosfolipid eklenmesi ile koagülasyon testinde düzelmenin gösterilmesi ise doğrulama testi olarak kullanılmalıdır (76).

Tedavi :

Trombozun tedavi ve/veya profilaksisinde kullanılan ilaçlar üç başlık altında toplanabilir:

1. Antikoagülanlar : Heparin ve oral antikoagülanlar,
2. Antiagreganlar ( anti-trombosit ajanlar ) ve
3. Trombolitik ( fibrinolitik ) ilaçlar.

İlk iki grupta yer alanlar oluşmuş bir trombozun ya da tromboembolik olayın büyümesini ve yayılmasını ya da yeniden tromboz oluşumunu önlemede kullanılırlar. İkinci grupta yer alan ilaçlar ise trombositlerin işlevlerini bozarak etki gösterirler ve arteriyel tromboembolizmin profilaksi ve tedavisinde kullanılırlar. Bu ilaçlar; Aspirin, Tienopiridin türevleri (Tiklapidin ve Klopidoğrel) ve trombosit glikoprotein IIb ve IIIa reseptörü blokajı yapanlar olarak üç grupta tanımlanır. Trombolitik tedavi ise oluşmuş bir trombosun erken evrede eritilmesini sağlar.

Klinikte kullanılan antikoagölan ilaçlar ise;

A. Heparin

1. Standart (fraksiyonlanmış) heparin (FH),
2. Düşük molekül ağırlıklı heparinler (DMAH).

B. Oral antikoagölanlar

C. Yeni antitrombotik ilaçlar (Heparinoidler, direkt antitrombin etkisi gösterenler).

DVT' unda heparin tedavisi; oluşmuş trombozun yayılmasını, PE' yi, trombozun tekrarını ve post-trombotik sendromu önlemek amacıyla kullanılır. Heparin oluşmuş bir trombosu eritmez. Bu sebeple, son yıllarda tromboembolizmin profilaksi ve tedavisinde standart heparinin yerini, standart heparinin kimyasal yöntemler ya da enzimlerle depolimerizasyonu sonucu elde edilen DMAH' ler almıştır. Biyolojik yarı ömürlerinin 2-4 kat daha uzun (sc injeksiyondan sonra 3-6 saat) ve biyoyararlılıklarının daha iyi olması, vücut ağırlığına göre sabit dozlarda günde 1 ya da 2 kez sc uygulanmalarına olanak sağlar.

Ülkemizde bulunan oral antikogölan kumarin grubundan warfarin' dir. Başlangıç dozu 5 mg/gün' dür. Oral antikoagölanlarla tedavi süreleri; distal (baldır venlerinde) tromboz ve geçirilmiş VTE öyküsü bulunmayan vakalarda 3 ay, proksimal DVT ya da PE ve geçirilmiş VTE öyküsü bulunmayanlarda 3-6 ay, geçici klinik risk faktörünün (ortopedik cerrahi, travma) mevcudiyetinde 6 hafta-3 ay, metastazlı kanserin varlığında uzun süre, faktör V Leiden mutasyonu taşıyanlarda 6-12 ay ve antitrombin, protein C ve protein S eksikliklerinin mevcudiyetinde ise yaşam boyu kullanılması tavsiye edilir. Ayrıca tekrarlayan trombozlarda 6-12 ay ya da yaşam boyu, gebelik söz konusu olduğunda ise doğuma kadar heparin (DMAH), doğumdan sonra 4-6 hafta da oral antikoagölan önerilmektedir (76).

## DNA' DA MUTASYON VE MUTASYON TÜRLERİ :

DNA molekülü, normal şartlar altında protein kılıfla sarılmış ve çift sarmalı oluşturan bazlarla birbirine sıkıca tutunmuş, oldukça stabil bir durumdadır. Ancak in vivo olarak, fiziksel yada kimyasal ajanlar, metabolizma ürünü olan serbest radikaller, alkali ajanlar tarafından ya da replikasyon sırasında oluşan kusurlar yüzünden bir takım değişikliğe uğrayabilir (1,69).

Organizmada gen rekombinasyonunun dışında DNA' da meydana gelen değişikliklere mutasyon denir. Yine, kromozomun yapı ve sayısındaki değişiklikler ya da genlerin yapısında oluşan fiziksel ve kimyasal değişmelerin hepsi için genel olarak mutasyon ( başkalaşım ) terimi kullanılmaktadır. Mutasyonlar mikroskobik ya da submikroskobik olabilirler. Oluşan bu DNA kusurları, hücrede yer alan bazı tamir mekanizmalarıyla ortadan kaldırılabilir. DNA' da meydana gelen mutasyon ya replike olarak kuşaklar boyu aktarılabilir veya mutasyonun ağırlığına göre hücre bu mutasyonu taşıyamaz ve ölür. DNA' nın her iki sarmalında kusur meydana gelirse bu kusurun onarımı imkansızdır. Bu durumda ya hücre ölür ya da bu mutasyon yeni bir özellik olarak dölden döle aktarılır (1,69).

Mutasyonlar değişik yayınlarda farklı şekilde sınıflandırılmaktadır. Ancak mutasyonlar genel olarak gen mutasyonu, kromozom mutasyonu ve genom mutasyonu diye üç grupta toplanabilir. Bunlardan sırasıyla gen mutasyonu; DNA molekülünde gen düzeyinde ortaya çıkan değişiklikler, kromozom mutasyonları; mikroskobik olarak belirlenen yapısal değişiklikler ve genom mutasyonu ise kromozom sayılarında görülen artma ya da eksilmeler olarak tanımlanır.

DNA' da gözlenen mutasyonlar yapı ve etkilerine göre kabaca dört grupta toplanabilir.

Bunlar:

1. Uzunluk mutasyonları,
2. Nokta mutasyonları,
3. Tersine mutasyonlar ve
4. Baskılayıcı mutasyonlardır.

1. Uzunluk Mutasyonları :

Genetik materyalde görülen artma ya da eksilmeler sonucu ortaya çıkan mutasyonlardır. Bu mutasyonların üç türü bulunmaktadır.

- a) Eksilme ya da aradan çıkma ( Delesyon ) : Kromozomun herhangi bir segmentinin kaybolmasıyla oluşan genetik madde eksilmesidir. Delesyon, parental translokasyon, tek dallı bir ilmeğin kesilmesiyle oluşan yanlış eşleşme ya da eşit olmayan crossing-over sonucu meydana gelebilir.
- b) Artma ( Duplikasyon ) : Kromozomun herhangi bir segmentinin iki katına çıkmasıyla oluşan mutasyon türüdür.
- c) Araya girme ( İnsersiyon ) : Bir ya da daha çok sayıdaki nükleotidin fazladan gen yapısına girmesiyle oluşan mutasyondur (1,69).

## 2. Nokta Mutasyonları :

Bir gende bir nükleotid düzeyinde meydana gelen ve genin kromozom üzerindeki yerini değiştirmeyen başkalaşımlardır. Nokta mutasyonlarında bir nükleotid baz başka bir nükleotid bazla yer değiştirir. Bir gende meydana gelen nokta mutasyonları DNA seviyesinde ve protein seviyesinde kodonlar üzerinde bıraktığı etkiye göre iki şekilde incelenir.

### a) DNA seviyesinde mutasyonlar :

1. Karşılıklı geçiş ( transisyon türü subtitisyon ) : Bir pirimidinin diğer bir pirimidinle, ya da bir pürin bazının diğer bir pürin bazı ile yer değiştirmesi şeklinde ( AT → GC ) oluşur.
2. Çaprazlama geçiş ( tranversiyon türü subtitisyon ) : Bir pürin bazı ile bir pirimidin bazının veya bir pirimidin ile bir pürin bazının yer değiştirmesi şeklinde ( AT → CG ) meydana gelir.

### b) Protein seviyesinde ya da kodonlar üzerinde bıraktıkları etkiye göre mutasyonlar : Bu grup mutasyonlar dörde ayrılır:

1. Sessiz mutasyon ( Silent mutasyon ) : DNA baz dizisinde meydana gelen bir başkalaşım mRNA kodonunda değişikliğe neden olur. Sonuçta; aminoasit sırası değişmediğinden yani aynı aminoasit için bu aminoasidi taşıyan diğer kodon olduğundan sentezlenen proteinin özelliği değişmez. Örneğin; AGG kodonu CGG olarak değişmesine rağmen, her iki kodon arginine'i kodlamaktadır (Tablo 7).
2. Yanlış anlamlı mutasyon ( Missense mutasyon ) : Gende bir baz dizisinde meydana gelen bir başkalaşım mRNA kodonunda da değişiklik oluşturur ve sonuç olarak farklı

bir aminoasit taşınmasına neden olur. Bu da protein molekülünde yapısal değişikliğe neden olur (Tablo 7).

3. Anlamsız mutasyon ( Nonsense mutasyon ) : Protein sentezini sonlandıran stop kodonun kodlanmasına sebep olan ve protein sentezini yarıda bırakan mutasyon türüdür. Yani proteinin yapısal kısmı oluşmadan protein sentezi durdurulur. Glisin'i kodlayan CAG kodonunun stop kodonu olan UAG kodonuna dönüşmesi gibi (Tablo 7).
4. Çerçeve kayması ( Frameshift mutasyon ) : Bir gende üç baz çiftinden daha az ya da daha çok küçük delesyonlar tarzında gerçekleşen mutasyon türüdür. Bu mutasyon sonucu hem transkripsiyon hem de mRNA' daki okuma çerçevesinde olan değişme sonucu önemli kusurlar ortaya çıkabilir (Tablo 7).

TABLO 7. Protein seviyesinde ya da kodon üzerinde meydana gelen etkiye göre mutasyon örnekleri.

DNA baz dizisi	mRNA dizisi	Aminoasit dizisi	Mutasyon türü
CTA TTC CGA ACA	GAU AAG GCU UGU	Asp-Lys- Ala-Cys	Normal dizi
CTA TTT CGA ACA	GAU AAA GCU UGU	Asp-Lys-Ala-Cys	Silent
CTA CTC CGA ACA	GAU GAG GCU UGU	Asp-Glu-Ala-Cys	Missense
CTA ATC CGA ACA	GAU UAG GCU UGU	Asp-Stop	Nonsense
CTA TTT CCG ACA	GAU AAA GGC UGU	Asp-Lys-Gly-Cys	Frame-shift

### 3. Tersine Mutasyonlar ( Reverse Mutation ) :

Mutant fenotiplerden yabanıl tiplerin ya da yabanıl tiplerden mutant fenotiplerin oluşmasına neden olan mutasyonlardır. Yabanıl tiplerden anormal fenotipleri oluşturan



mutasyonlara ileri mutasyonlar, anormal fenotiplerden yabancı fenotipleri oluşturan mutasyonlara ise geri mutasyonlar adı verilir.

Tek yerli mutasyonlar : Gende yalnızca bir nükleotidin değişimi ile; önce ileri mutasyonla gendeki bir kodonun değişmesi sonucu oluşan mutasyon, geri mutasyonla ortadan kalkar. Örneğin; bir gendeki AAA (Lys) yapısındaki bir kodon, mutasyonla GAA (Glu) şekline döner, ancak geri mutasyonla yeniden AAA (Lys) şeklini alır (69).

#### 4. Baskılayıcı Mutasyonlar :

Bir gende ilk oluşan bir mutasyondan ayrı bir yerde ortaya çıkan ve ilk mutasyonun etkisini tersine çeviren ikinci mutasyona baskılayıcı mutasyon denir.

- a) Gen içi baskılayıcı mutasyonlar ( Intragenic suppressor mutations ) : Aynı gen içinde bir başka nükleotidin değişmesi sonucu oluşan mutasyonlardır. Bu mutasyonlar sonucu DNA üzerindeki kodonlar değişecek ve yeni bir kayıt sırası ortaya çıkmış olacaktır.
- b) Gen dışı baskılayıcı mutasyonlar ( extragenic suppressor mutations): DNA molekülünde mutasyona uğramış genden başka bir gende meydana gelen mutasyona gen dışı baskılayıcı mutasyon denir (69).

#### POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU:

Polimeraz zincir reaksiyonu ( Polymerase Chain reaction, PCR ) yöntemi; bir organizma veya mutant gene ilişkin normal ya da parçalanmış DNA ya da RNA' nın in vitro çoğaltılmasına imkan veren bir yöntem olup, 1985' te Kary Mullis ve arkadaşlarınca ortaya atılmış, daha sonra Saiki ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. PCR yöntemi avantajları nedeniyle moleküler biyoloji, tıp, arkeoloji gibi değişik alanlarda uygulanılabilen bir yöntem olmuştur (69). PCR bir invitro nükleik asit amplifikasyon metodudur (51). Metod basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullar altında çoğaltılmasıdır. Bu buluşundan dolayı Kary Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülüne hak kazanmıştır (1). 1 µg' dan daha az DNA materyalinden 24 saat gibi kısa bir süre içinde sonucun alınıp tanının konabilmesi PCR yönteminin en avantajlı yönlerinden biridir. Ayrıca bu yöntemde DNA amplifikasyonu in vitro koşullarda

gerçekleştirilmekte, belirli bir noktada amplifikasyon durdurulduğu zaman onun devam etmediğinden emin olunmaktadır (69).

PCR yöntemi kısaca bir gen ya da DNA bölgesinin, bu hedef bölgenin uç (flanking) bölgelerine bağlanan oligonükleotid primerler aracılığıyla bir dizi replikasyon (siklus,döngü) geçirerek çoğalması işlemidir. PCR' nin gerçekleşebilmesi için ortamda amplifiye olacak çift sarmal DNA fragmenti ve iki adet tek sarmallı oligonükleotid ve bunlara ek olarak bir protein bileşeni olan DNA polimeraz enzimi, uygun deoksiribonükleotid trifosfatlar ( dNTP mix ), bir tampon ve tuz solusyonlarının bulunması gerekir(69). PCR, bir çeşit "in vitro klonlama"dır; PCR tekniği tek veya çift iplikçikli DNA' yı RNA' ya hedef olarak kullanabilir. PCR; reaksiyonu DNA' nın iki zincirinin yüksek ısı ile ayrılmasını ( denatürasyon ); daha sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA' ya bağlanmasını ( hibridizasyonu, annealing ); sonra zincirin uzamasını ( polimerizasyon, extension ) çift iplikçikli DNA' ların sentezi ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım ( denatürasyon / primer bağlanması / DNA sentezi ) bir PCR siklusunu oluşturur. Her adım farklı ısılarda gerçekleştirilir(1). Bu evreler:

1. Denatürasyon evresi
2. Primer bağlanması ( annealing ) evresi ve
3. Primerlerin uzaması ( extension ) evresidir.

1.DNA' nın denatürasyonu : Bu evrede çoğaltılması istenen çift sarmal DNA; sarmalları bir arada tutan hidrojen bağlarını ayırmak üzere denatüre edilerek tek sarmal haline getirilir. DNA sarmallarının birbirinden ayrılması için uygulanabilecek fiziksel ve kimyasal yöntemler olmasına karşın 95-100°C' ye kadar ısıtmak en basit ve etkin bir yöntem olarak uygulanmaktadır. Tipik denatürasyon süreleri 95 °C' de 30 sn. ya da 97 °C' de 15 sn.dir. Eğer örnekte çoğaltılması istenen genetik materyal RNA ise önce reverz transkriptaz enzimi ile DNA kopyası oluşturulur, sonra bu kopya primere kalıplık eder (1,69).

2.Primerlerin bağlanması ( annealing ) : Bu evrede primer adı verilen ve çoğaltılması istenen DNA için spesifik olan oligonükleotid; ilk evrede elde edilen DNA tek sarmalı üzerinde kendisine komplementer olan nükleotid dizisi ile hibridize olur ( annealing ). Primerler, orjinal ( hedef ) DNA sarmalının amplifikasyonunu başlatmak amacıyla kullanılırlar. Bu nedenle primer ( öncü ) olarak adlandırılmışlardır. PCR uygulamalarında kullanılan primerler minimum 17-19 nükleotidden oluşmuş oligomerlerdir. Genelde uygulamada 0.1-0.5 µM. arası primer

konsantrasyonları optimal değerler olarak kabul edilir. Her bir primer, örnekteki orjinal DNA sarmalının 3' veya 5' sarmalından birinin tamamlayıcısı ve çoğaltılacak olan DNA bölgesine özgüdür. Primerlerin bağlanması aşamasında deney ortamının ısısı 40-60°C' ye düşürülür. Primer eşleşmesi ve bağlanması için gereken ısı ve süre amplifikasyon primerlerinin konsantrasyon ve uzunluğuna bağlıdır. Eşleşmenin sonuç verdiği deney ortamı ısısı 55-72°C iken 0.2 µM. primer konsantrasyonunda eşleşme için birkaç saniyelik süre yeterlidir (69).

3.Primerlerin uzatılması (extension) ve amplifikasyon: Annealing tamamlandıktan sonra primer hibridleştiği tek sarmalın karşılığını sentezler. Bu sentez için termostabil özelliği olan ve *Thermus aquaticus* adlı bakteriden elde edilen Taq polimeraz enzimi kullanılır. Bu enzim DNA sentezi için daha yüksek optimum ısıya (  $T_{opt}$  ) sahiptir. DNA kalıbının yapısına bağlı olmak üzere Taq polimeraz enzimi, enzim molekölü başına, saniyede 150 nükleotide yaklaşan spesifik aktivite ile 75-80 °C arasında  $T_{opt}$ ' a sahiptir. Nükleotidleri orjinal DNA sarmalına komplementer olacak biçimde primere eklenir ve uzatır. Oluşan yeni DNA sarmalları bir sonraki döngüde primerler için kalıp olarak rol oynarlar. Primerlerin uzatılması aşamasında 70-75 °C' lerde ısı uygulanır. 72°C' de nükleotid eşleşme hızı; tampon, pH, tuz konsantrasyonu ve DNA kalıbının yapısına bağlı olarak saniyede 35-100 nükleotid olarak gerçekleşir. 72 °C' de bir dakikalık uzama süresi 2 kb uzunluğundaki bir amplifikasyon ürünü için yeterli kabul edilir (69). PCR boyunca biriken ürünlerin boyu iki primerin boyu ve hedef DNA bölgeleri arasındaki mesafelerin toplamı kadardır. Matematiksel olarak amplifikasyon  $(2^n - 2n) X$  formölü ile ifade edilir.

$n$  = Döngü sayısı

$2n$  = Birinci ve ikinci döngü sonucunda oluşan boyları bilinmeyen ürünler.

$X$  = Orijinal kalıbın kopya sayısı.

Potansiyel olarak her döngünün % 100 verimle gerçekleştiği varsayılırsa, örneğin 20 döngü sonucu  $2^{20}$  kat ürün meydana gelir (77).

İlk birkaç siklus :

İlk birkaç siklus, spesifik DNA parçalarının hedef DNA' da yapışabilecekleri yerleri tarama fazıdır. Amplifikasyon daha sonra başlar. PCR' ın tüm siklusları, bir önceki siklusda sentezlenen örneklerin denatürasyonu ile başlar. İlk birkaç siklusun optimizasyonu, çok az miktarda DNA örneği ile yola çıkılan durumlarda, tarama olayı aşırı miktarda sarf malzemesine

karşın az DNA' ya karşı oluşmaktadır. Az DNA' nın bulunması PCR' ın tarama fazında primer ile DNA' nın birbirleri ile karşılaşma şanslarını azaltır. Öyle ki primer- primer karşılaşmaları daha fazla olur. Bu ise primer dimerlerinin ve diğer artefakların oluşmasına yol açar. Bu problemi ortadan kaldırmak için Booster PCR kullanılmıştır. İlk birkaç siklusda primer dilue edilerek reaksiyona konur, daha sonraki sikluslarda ise primer miktarı artırılarak reaksiyona eklenir (1,46).

PCR verimini etkileyen önemli bir faktör, DNA polimeraz enzimidir. Normalde enzim miktarı, 25-30 PCR döngüsü sonucunda hedef dizi artışı ve temel denatürasyon nedeniyle sınırlayıcı bir etken haline gelir. Verimliliği azaltan bir diğer faktör de konsantrasyonu artan hedef dizilerin primer ile bağlanma yarısıdır (77).

Günümüzde PCR yöntemi mutasyonların tanımlanması, adli tıba ilişkin parmak izi analizleri, allelik dizi değişimlerinin tanımlanması, bakteriyel ve viral infeksiyonların taranması, invitro fertilizasyon yapılan tek hücrede, implantasyon öncesi genetik testlerin yapılması ve sonra implantasyon gerçekleştirilmesi ile bebeğin normal doğmasının sağlanması, prenatal tanı ve filogenetik çalışmalar ile gen dizi analiz çalışmaları ( sekanslama ) gibi işlemlerde çok kullanılan bir yöntem haline gelmiştir (1,69).

#### PCR' ın Temel Bileşenleri :

PCR' ın temel bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve  $MgCl_2$  ' dür.

Kalıp DNA : PCR' da genomik DNA' lar, plazmid ve faj DNA' ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. Bu kalıp DNA molekülleri amaca göre cDNA, genomik DNA, genomik kitaplıklar halinde, ya araştırma laboratuvarları ve kliniklerden ya da ticari olarak elde edilir (77).

Polimeraz Enzimleri : DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orjinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfattan uzun polinükleotid zincirin sentezini kataliz ederler. Bu enzimler, sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına ( primerlere ) gerek duyarlar. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin

serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP' lerin nükleofilik etki yapmalarıyla, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır.

Termostabil DNA polimeraz enziminin PCR' da kullanılmaya başlanması araştırma ve klinik laboratuvarlarında rutin olarak yapılan deneylere teknolojik olarak büyük bir avantaj sağlamıştır. Önceleri kullanılan *Escherichia coli*' nin DNA polimeraz I enziminin Klenow fragmenti sıcaklığa dayanıklı olmadığı için, her PCR döngüsünde denatürasyon aşamasından sonra yeniden enzim ekleme zorunluluğu duyulmaktaydı. Ancak günümüzde kullanılan termostabil DNA polimerazlarla bu sorun ortadan kalktığından enzimin amplifikasyonun başlangıcında tüplere konulması yeterli olmaktadır (1,51,77).

Serbest Magnezyum (  $MgCl_2$  ): Konsantrasyonun azalması ile Taq Polimeraz doğruluğu arttırılabilir. dNTP, DNA ve proteinlerin tümü  $Mg^{+2}$  iyonunu bağladıklarından; her PCR protokolunda Mg konsantrasyonu ampirik olarak ayarlanmalıdır. Reaksiyon pH' sı düşürüldüğünde; Taq polimerazın hata oranı azalır. pH 8.2' ye doğru çıktıkça hata oranı artmaktadır. Her üç ünitlik pH değişikliğinde nokta mutasyonu oranı 60 kat, Frameshift hata oranı ise 11 kat artış gösterir (1).

DNA örneği, EDTA-Sitrat gibi örnekde şelasyon yapan ajanların olması, dNTP, protein serbest magnezyumu etkileyen faktörlerdir. Fazla Mg, enzimin spesifikliğini azaltır. Azı, enzimin inaktif olmasına yol açar. Mg solüsyonu, eritildikten sonra vortekslenir. Bu üniform bir solüsyon elde etmek için yapılır, basit ama gereklidir, çünkü  $MgCl_2$  çöker. Taq polimeraz miktarı önerildiği miktarda olmalıdır. Fazla konulması ile; oluşan PCR ürünlerinin miktarı artmaz ve artefakt oluşmasını artırır.

Oligonükleotidler : PCR' da genellikle  $1\mu M$  konsantrasyonda bulunurlar. Bu miktar genellikle, 30 siklusluk bir PCR için yeterlidir. Yüksek konsantrasyonda olmaları halinde; ektopik noktalara yapışma olabilir ve böylece istenen hedef DNA dışında bölgelerde çoğalmaya başlar. Eğer yeterli konsantrasyonda değilse; bu takdirde PCR ürünü çok azdır. Oligonükleotid yapımı, bu iş için geliştirilmiş " otomatik cihazlar " ile sentezlenirler. Bu cihazlar 100 nükleotide kadar sentez yapabilecek niteliktedir. Üretim miktarı-nanomole-düzeyindedir. Modern cihazlarla sentez edilen kısa oligonükleotidler özellikle daha öteye saflaştırılmadan kullanılabilir, ancak uzun oligonükleotidler söz konusu ise Poliakrilamid jel elektroforezi gerekebilir. Bu özellikle mRNA' nın 5' sonunu haritalamak için primer-uzaması yapılacak ise

gereklidir. Oligonükleotidler genellikle liyolifize toz olarak satın alınırlar. Bir ml steril-filtre edilmiş su içinde, bir steril mikrofuj tüpde eritilir. Solüsyon, vortexlenir. Bu solüsyon sıklıkla hafif bir bulanıklık gösterebilir. Bunun nedeni insoluble benzamidlerin ortamda bulunmasıdır. Oda ısısında 5 dk. süreyle 12.000 g' de santrifuj edilir. Süpernatant, steril bir mikrosantrifuj tüpe aktarılır. Solüsyon, 3 kez 400 µl n-butanol ile ekstrakte edilir. Her ekstraksiyondan sonra; üstteki organik faz atılır. Bir evaporatörde kurutulur, altta sarı-krem beyazı bir toz kalır. Tekrar 200µl steril su ile eritilir. Primer tasarımı yapılırken bir takım şartları yerine getirmek gerekir. Öncelikle oligonükleotid dizisi " özgün " olmalı, 3' ucunda G.C olmalı ( 1-2G/C nükleotidi ), baz dağılımı ve kompozisyonu rastgele olmalı ( G/C % 45-55 olmalı ), primer uzunluğu ( 18-25 baz ), iki primer aralığı-kompozisyonu ( 100-600 bp), uygun Tm olmalı, primerin kendisinin ve/veya antisense primeri komplementer olmamalı. Bilgisayar aracılığı ile özel olarak tasarlanmış programlarla da " primer " tasarımı yapmak mümkündür (1).

Melting Temperature Hesaplanması : Hedef diziye tam uyan bir oligonükleotid kullanırken; basitçe " Melting Temperature " ( erime ısı ) hesaplanması ile hibridizasyon koşulları belirlenebilir. 20 nükleotid' den daha kısa oligonükleotidler için Tm şu şekilde hesaplanır :

$$T_d = 4 ( G + C ) + 2 ( A + T ) (46).$$

Ancak bu yaklaşım uzun oligonükleotidler için uygun olmaz. O zaman Fritsch' in yaptığı bir formül kullanılabilir :

$$T_m = 81.5 - 16.6 ( \text{Log } 10 [ \text{Na}^+ ] + 0.41 ( \% G + C ) - ( 600 / N )$$

( N : zincir uzunluğu )

dNTP Karışımı : Deoksiribonükleozid trifosfatlar ( dATP, dGTP, dTTP, dCTP ) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dörütlü karışım halinde ticari olarak sağlanır. Deoksiribonükleozid trifosfatların her birinin konsantrasyonunun birbirine eşit olması gereklidir. Taq DNA polimeraz düşük dNTP konsantrasyonlarında ( 10 - 100 µM ) kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PCR 100 µM dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir. Ayrıca optimal dNTP konsantrasyonu; MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonuna, reaksiyon koşullarına, primer konsantrasyonuna, çoğaltılmış ürünün boyuna, PCR döngü sayısına bağlıdır. Yapılacak PCR için en uygun dNTP konsantrasyonu deneysel olarak belirlenmelidir. Ardarda yapılacak dondurma-çözdürme işlemleri, dNTP' nin raf ömrünü kısaltacağından; dNTP' ler kullanılacak miktarlar kadar ayrılanıp, derin dondurucularda ( -20 °C ) saklanmalıdır (1,77).

Tamponlar : Standart PCR tamponu 50 mM KCl, 10 mM Tris.Cl ( oda ısısında pH 8.3 ), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> ihtiva eder. 72°C' de inkübe edildiğinde pH yaklaşık 7.2' ye düşer. Divalent katyonların ortamdaki varoluğu çok önemlidir. Magnezyum iyonları Mangan' a göre daha etkindir ve kalsiyum iyonları ise inefektiftir. Mg<sup>+2</sup> ' un optimal konsantrasyonu oldukça düşük olduğundan ( 1.5 mM ); DNA hazırlanışında yüksek konsantrasyonda şelasyon yapıcı ajanların bulunmaması ( EDTA ) gerekir. Ayrıca fosfatlar gibi negatif yüklü iyonik gruplarda ( dNTP ) olmamalıdır. O nedenle DNA 10 mM Tris.Cl ( pH 7.6 ); 0.1 mM EDTA ( pH 8.0 ) içinde çözülmelidir (1).

Bir PCR ilk kez kurulduğunda Mg<sup>+2</sup> konsantrasyonu optimizasyonu sağlamak için ayarlanmalıdır. Burada Tris.Cl ( 10mM ) ve KCl ( 50 mM ) olarak sabit tutulup; MgCl konsantrasyonu 0.05-5 mM arasında ( 0.5 mM artışla ) denenir. PCR' da Mg konsantrasyonunun etkilediği komponentler şunlardır :

1. Primer yapışması,
2. PCR ürünü ve template' lerin dissosiasyonu ( birleşip ayrılmaları ),
3. PCR ürününün spesifitesi,
4. Primer-dimer artefaktların oluşması,
5. Taq polimeraz enzim aktivitesi ( Taq-polimeraz enziminin çalışabilmesi için serbest Mg olması gereklidir).

Bir dNTP stok solüsyonu ( 50 mM ) 1N NaOH ile pH' sı 7.0 olacak şekilde ayarlanır. Reaksiyon üzerine mineral oil eklenir. Bu örneğın evaporasyonuna engel olur. Bu yağdan kloroform ile kurtulunur. Aquöz faz, amplifiye DNA' yı taşımaktadır (1,46,51,77).

Isı : Taq Polimeraz 50°C' lik ısı üzerinde incelendiğinde 23-30°C→ 70-80°C arasında arttıkça; ortaya çıkacak hata oranı artar. DNA' nın yüksek ısı ve düşük pH' da inkübasyonu; DNA hasarına yol açar, bu da potansiyel mutasyon olasılığını arttırır. En sık görülen DNA hasar şekli sitozinin urasil oluşturacak şekilde deaminasyonudur. Urasil, timin ile aynı kodlama potansiyeline sahip olduğundan; urasil' in DNA polimeraz ile replikasyonu; C.G → T.A transizyon mutasyonuna yol açar. PCR' da sitozin deaminasyonunun oluşma riski; en çok

denatürasyon basamağındadır. Sitozinin deaminasyonunun oranı tek iplikçikli DNA' da 80 °C' de  $1 \times 10^{-8}$  / sn; 95°C' de  $2 \times 10^{-7}$  / sn' dir.

İkinci tip DNA hasarı; N-glycosylic bağların hidrolizi sonucunda spontan base release ( serbest kalışı ) ile oluşur. Bu hidrolitik reaksiyon oranı; önemli ölçüde, yüksek ısıda ve düşük pH' da artar. DNA' nın depürinasyonu pH 7.4 ve 70°C' de yaklaşık  $4 \times 10^{-9}$  / sn oranında oluşur. Depirimidinyasyon ise 20 kez daha yavaştır (  $2 \times 10^{-10}$  / sn ve 80 °C ). Pirimidin salınımı, 95°C' ye doğru ısı arttıkça, artar. Benzer olarak depürinasyon, ısı arttıkça artış gösterir. pH' nın düşürülmesi ile de spontan pürin kayıp oranını artırır. Bu spontan baz hidrolizi; DNA' da apürinik / apirimidinik ( AP ) noktaların oluşmasına yol açarak, DNA Polimeraz sentezini inhibe eder. Bazı olgularda, DNA polimerazlar bu AP noktalarını tamir edebilir. Bu nedenle, PCR inkubasyon sürelerinin yüksek ısılarda minimumda tutulması uygundur (1).

Siklus Sayısı : PCR siklus sayısının artırılması ile de hata oranı artar. Örneğin 20 siklusda 1/10.000 hata oranı " 1000 nükleotidde 1 " iken, bu 50 siklusda 1/400 nükleotid düzeyine çıkar. Bu hata sıklığı, aşağıdaki formülle hesaplanabilir.

$$\text{Error sıklığı (f)} = \frac{n(\text{siklus}) \times p(\text{beklenen nükleotid hatası})}{2}$$

2

Bu kaba bir yaklaşımdır, çünkü dizide oluşabilecek bir hata, PCR sonuna kadar aynı şekilde / sayıda kalabileceği gibi; bir kumar makinasında olduğu gibi artış da gösterebilir. Bir PCR reaksiyonunda 25-30 siklus yeterlidir. Bu siklus sayısının üzerinde çalışıldığı takdirde, Taq DNA Polimerazın miktarı azalmaktadır. Amplifikasyon 37°C' de çok daha iyi olmasına karşın; " mispriming " (yanlış bağlanma) önemli ölçüde artar. 50°C' de ise mispriming azalır, spesifite artar ama PCR ürün miktarı daha azdır. Bir kb uzama için 1 dk' lık süreç yeterlidir (1).

#### MUTASYON DURUMUNA GÖRE UYGULANAN TANI YÖNTEMLERİ :

Rekombinant DNA teknolojisindeki ilerlemeler kalıtsal hastalıkların tanısına yönelik yeni yöntemlerin gelişmesine de neden olmuştur. Bu tanı yöntemleri direkt ve indirekt yöntemler olmak üzere iki başlık altında toplanmaktadır.

Kalıtsal hastalıkların moleküler temeli bilinen türlerinde direkt, moleküler defektin bilinmediği durumlarda ise indirekt yöntemlerden yararlanılır. Ancak ikinci yöntemde



taşıyıcıların belirlenmesi ve prenatal tanı için informatif kişiye ve pedigrî analizine ihtiyaç duyulmaktadır (69).

#### 1. Direkt Analiz Yöntemi :

Rekombinant DNA teknolojisinde bir tek gendeki bozukluktan kaynaklanan ve bozukluğun yapısı moleküler düzeyde tanımlanmış düzensizliklerde mutasyonların doğrudan belirlenmesi işlemi direkt gen analizi olarak adlandırılır. Mutasyonların direkt olarak tanımlanması için hastalık ya da özellikten sorumlu genin klonlanmış ve nükleotid dizisi belirlenmiş olması gerekir.

Direkt Analiz Yöntemi; incelenen bir kalıtsal hastalık açısından, hasta, taşıyıcı ve sağlam fenotiplerin belirlenmesi ile taşıyıcı taramalarına imkan verdiği için hem doğum öncesi tanı ve hem de popülasyon taramalarında başarıyla kullanılmaktadır. Gen teknolojisinde mutasyonların gösterilmesi; DNA' daki ya delesyon ya da nokta mutasyonlarının taranması şeklinde yahut Allele Spesifik Oligonükleotid ( ASO ) problemlerle veya mutasyona özgül RFLP' ler kullanılarak gerçekleştirilir (69).

Delesyon Analizleri : DNA' daki küçük delesyonlar PCR, büyük delesyonlar Southern blot yöntemi ve daha büyük mutasyonlar ( 0.5-10 Mb uzunlukta ) ise, Pulsed Field Gel Electrophoresis ( PFGE ) yöntemi ile incelenir. Bazı durumlarda oluşan mutasyonlarda DNA fragmentlerinin uzunluğundaki değişiklik gözlenemeyebilir. Delesyon türü mutasyon varlığında amplifikasyon primerleri DNA' ya bağlanamadığı için çoğalma gerçekleşemez. Bu durum, pozitif kontrol eşliğinde agaroz jel elektroforezi yapılarak mutasyon gösterilebilir (69).

Nokta Mutasyonu Analizleri : Kalıtsal hastalıklara neden olmaları açısından nokta mutasyonlarına delesyonlara göre daha sık oranda rastlanır. Nokta mutasyonlarının hem heterojen hem de çok küçük değişimler olmaları nedeniyle tanımlanmaları daha zordur. Bu mutasyonların analizlerinde PCR yaygın olarak kullanılmaktadır (20,69).

#### Allele Spesifik Oligonükleotid ( ASO ) Problemlerle Mutasyon Analizi :

Kimi durumlarda meydana gelen spesifik bir mutasyon; herhangi bir restriksiyon enziminin kesim bölgesine rast gelmiyorsa mutasyona uğrayan ve PCR ile çoğaltılan bu bölge

ASO problemleri ( 17-30 nükleotid ) ve dot blot yöntemi uygulanarak analizi yapılabilir. Çoğaltılan ve incelenecek olan DNA örnekleri Dot blot cihazı kullanarak bir vakum altında membranlara aktarılır. ASO problemlerinden biri normal, diğeri ise mutant dizi ile komplementerlik gösterir. <sup>32</sup>P ya da kimyasal ajanlarla işaretli ASO problemleri hedef DNA dizisi ile hibridizasyona sokulur. Hibrid DNA parçaları naylon membran üzerinde siyah noktalar halinde görülür. Hibridize fragmentlerin otoradyografi işlemleri gerçekleştirilir. Sonuçta mutasyon içeren alleller belirlenerek ve hibridizasyonun olup olmadığına bakılarak homozigot ve heterozigot mutant bireyler ile normal bireyler belirlenir (2,69).

Allele Özgü Amplifikasyon ( Amplification Refractory Mutation System, ARMS) Yöntemiyle Mutasyon Analizi:

ASO problemleri hibridizasyon yöntemine alternatif bir mutasyon tarama yöntemi olarak yaygın bir kullanım alanına sahip olan ARMS yöntemi, PCR tabanlı bir mutasyon tarama yöntemidir. PCR' a dayalı ürünlerin elektroforetik olarak kontrolü ile sonuç alınabilen kolay ve uygulanabilir bir yöntemdir. Bu yöntemin uygulanması sırasında yaygın mutasyonlarla karakterize patolojilerin moleküler düzeyde tanınması yapılabilmektedir. İn-vitro gen amplifikasyonunda kullanılan primerler bu yöntemde 3 çeşit olup bunlardan bir tanesi yaygın primer, diğeri ilgili gen için olası ve yaygın mutasyonlardan birini içeren primer, üçüncüsü ise normal gen için dizayn edilen primerdir. Mutant ve normal primerler yaygın primerlerle aynı tüpte 2 ayrı primer seti kullanılarak ( yaygın / normal ve yaygın / mutant ) PCR gerçekleştirilmekte ve ürünler elektroforetik olarak kontrol edilmektedir. ARMS uygulamasında 2 tüp 4 primer kullanılır. A tüpüne normal forward primer ve reverse ( common ) primer, B tüpüne ise mutant forward primer ve reverse primer konur. Hedef DNA' da mutasyon yoksa yalnız A tüpünde reaksiyon olur. Mutasyon varsa yalnız B tüpünde amplifikasyon olur. Eğer kişi taşıyıcı ise her iki tüpte reaksiyon olur.

ARMS yöntemi dot blot yöntemine göre daha kısa sürede sonuç alması ve radyoizotop kullanılmaması gibi nedenlerle avantajlı gibi görülmektedir. Ancak bilinen yaygın mutasyonlardan yola çıkılarak sonuç alındığından bilinmeyen mutasyonların tanınmasında sıklıkla başvurulan bir yöntem değildir. Ne var ki ilgili az sayıda mutasyon bakımından homojenite gösteren toplumlarda ARMS sıklıkla uygulanan bir yöntemdir (2,69).

## DNA' da Yeni Mutasyon Tarama Çalışmaları :

DNA' da yeni oluşan nokta mutasyonların gösterilmesinde bazı değişik metodlar geliştirilmiştir (34). Bunlar;

- \*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ( DDGE),
- \*Single Strand Conformation Polymorphism ( SSCP ),
- \*Chemical Cleavage of Mismatch Method ( CCM ),
- \*Heterodubleks Analiz ( HDA ) ve
- \*Protein Truncation Test ( PTT ) yöntemidir.

DDGE ve SSCP yöntemleri bir ya da birkaç nükleotid kusuru taşıyan tek sarmallı DNA' nın hareket değişikliğine, CCM yöntemi ise nükleotid bazları arasında bir bozukluğun olup olmamasına göre ortaya konan kimyasal reaktiviteye bağlıdır. Bu üç yöntem, DNA baz dizisindeki gerçek değişiklikleri tanımlayamaz. Ancak, yeni mutasyonların saptanmasında ön tarama yöntemi olarak kullanılır. Bu yöntemler, gen ( ekson ) içinde yer alan herhangi bir mutasyonun yalnızca varlığını belirler. Denatürasyonu yapılan DNA fragmentlerinin birinde bir mutasyon varsa sekonder yapı değiştiğinden mutant fragmentin jeldeki göçü normal fragmente göre farklılık gösterir (72). Bu ön tanı işleminden sonra, mutasyonu taşıyan fragment baz dizi analizine tabi tutularak kesin tanımlanması yapılır (69).

**DDGE Yöntemi :** DDGE metodu ile mutasyon analizinin temeli DNA' nın denatürasyonuna yani sarmalların birbirinden ayrılması esasına dayanır. Yöntemin dayandığı en önemli ilkelere biri dubleksin bir ucunun erimeye başladığı andan itibaren elektroforetik mobilitenin önemli oranda azalmaya başlaması durumudur. Düşük erime noktalarındaki bir nokta mutasyonu dublekslerin açılmasını etkilemektedir. Dolayısıyla bu diziler denatüre edici ajan-oranı basamaklı bir şekilde artan jelde, elektroforetik olarak ayırt edilmektedir. Homodubleksler ile heterodublekslerin erime noktası farklı olduğundan elektroforetik olarak normal ve mutant homodubleksler ile heterodubleksler birbirinden rahatlıkla ayırt edilebilecektir.

DDGE' nin zorluğu jel konsantrasyonunun ayırt edilmesi ile yakından ilgilidir. Bu amaçla baz dizisine bağlı olarak erime haritası çıkartılabilen bilgisayar simülasyonlarından yararlanılabilmektedir. Optimum jel yürütme süresi ve nokta mutasyonunun nasıl bir etki

yapabileceğinin belirlenmesine ilişkin bilgileri de verebilen bu simülasyonlardır. İncelenen örneğin uçlarından birine 30-50 bp uzunluğunda GC dizileri ( Clamp ) takılarak belirlenmektedir. Dolayısıyla 3' lü hidrojen bağından ve GC zenginliğinden dolayı yapay bir yüksek erime bölümü oluşturularak mutasyon yada polimorfizmlerin belirlenmesine imkan tanınmaktadır.

Bu yöntemin dezavantajı, incelenebilen DNA fragmentinin 500 bp'den küçük olmasındadır (2,34,69).

**SSCP Yöntemi :** PCR-Single Strand Conformation Polimorfizmi tekniği ile DNA' da oluşan tek baz değişikliklerini belirlemek mümkündür. Bu non-denaturan jellerde tek iplikçikli DNA' da oluşan değişimin, jelde yürüme farklılığının belirlenmesine dayanan bir tekniktir. En büyük avantajı, kısa sürede çok sayıda örnekte mutasyon taranmasını mümkün kılmasıdır.

Aynı boyuttaki ssDNA; kendilerinde ki değişikliklere bağlı olarak non-denatüre jelde farklı pozisyonlarda yürürler. Komplementer iplikçikler ve tek baz değişikliği gösteren DNA parçaları ise değişik migrasyon gösterirler (1).

SSCP analizinin duyarlılığı yani mutasyonları tarama özelliği % 35-100 arasında değişir. Bu yöntemde duyarlılık üzerine en önemli etkenlerden biri incelenen DNA fragmentinin uzunluğudur (15). DNA fragmentinin uzunluğu artarsa tekniğin duyarlılığında düşme olur. Örneğin 300 bp' den kısa fragmentlerde başarı % 99 dolayında iken 300-450 bp' lik fragmentlerin incelenmesinde aynı oran % 90 seviyesine düşmektedir. SSCP' nin uygulandığı mutasyon analizlerinde PCR ürünlerinin küçük tutulması istenir. Daha popüler bir yöntemdir. Bu yöntemde önce, ya uzun DNA molekülünün RE ile kesimi ya da PCR yöntemi ile küçük DNA fragmentleri elde edilir. Sonra bu çift sarmallı DNA fragmentleri denatüre edilerek tek sarmallı hale getirilir. Daha sonraki aşamada ise non-denatüre kondisyonlarda poliakrilamid jel elektroforezi yapılır.

Mutasyon analizi için olduğu kadar polimorfizmlerin saptanmasında da kullanılan bir yöntemdir. Tek sarmal konformasyon polimorfizmi analizinde tek bir nükleotidteki değişim katlanmayı ve yeniden şekillenmeyi değiştirir. Bu değişim elektroforetik mobilitede aynı düzeyde etki yapmaktadır (15). Dolayısıyla diğer bazı mutasyon analiz yöntemlerinde olduğu gibi heterozigot konumdaki bir değişim elektroforetik olarak dört farklı tek sarmal DNA bandı

vermektedir. Bu dört band normal allelin anlamlı ve anlamsız dizisi ile mutant allelin anlamlı ve anlamsız dizisini içermektedir. Tek sarmal DNA moleküllerinin renatürasyonu ile elektroforetik olarak normal çift sarmal, mutant çift sarmal ve iki heterodubleks ( normal anlamlı / mutant anlamsız ve normal anlamsız / mutant anlamlı ) olmak üzere dört farklı çift sarmal molekül ortaya çıkmaktadır (53,72,82).

Uzunlukları 5-50 cm arasında değişen SSCP jellerin uzunlukları yanlış negatiflerin önlenmesi açısından önem taşımaktadır. Yanlış negatifitenin önlenmesinde bir diğer özellik renatürasyon sonucu oluşan heterodubleks ya da homodubleksin engellenmesi için PCR ürününü seyreltmek olabilir. Bunun dışında jele yüklenen örneğe formamid, sodyum hidroksit, üre ya da metilmerkürük hidroksit gibi denatüran ajanların eklenmesi de bu yönde yarar sağlayabilmektedir. SSCP yöntemi karmaşık bir yöntem olmadığı ve çok fazla sofistike araç ve gerece dayanmadığı için oldukça önemli avantajlara sahiptir. Bu avantajlara ek olarak radyoaktif işaretlemenin yanısıra çoğunlukla floresan işaretli primerlerin ya da gümüş boyamanın kullanılması da yöntemin yaygın olarak kullanımını ve sıklıkla uygulama alanı bulmasını sağlamıştır. Ancak mutasyonun tam yerinin saptanamaması, tetkik edilen DNA fragmentinin büyüklüğünün sınırlı olması, jel sonuçlarının yorumlanma güçlüğü, ısı ve iyon değişimi gibi faktörlerin optimize edilmesindeki güçlükler SSCP yönteminin dezavantajları olarak değerlendirilmektedir (34,53,66,68,69,72,82).

**Protein Truncation Test ( PTT ) Yöntemi :** PCR' ın transkripsiyon ve translasyon ile kombinasyonuna dayalı bir mutasyon tanıma yöntemi olan bu yöntemde in-vitro RNA ve protein sentezi yapılmakta ve sentez edilen proteinin SDS – PAGE ' deki mobilitesi dikkate alınarak sonuca gidilmektedir. Diğer yöntemlere göre daha az sıklıkla kullanılan bu yöntem rutin amaçtan çok araştırma amaçlı kullanılmakta ve mutant gen – mutant ürün karşılaştırılması açısından uygun bir yöntem olarak değerlendirilmektedir (69).

**Heterodubleks Analiz ( HDA ) Yöntemi :** Normal ve mutant DNA moleküllerinin ısı ile denatüre edilip tekrar renatürasyonu ile heterodubleks molekülleri oluşur. Denatüre edici olmayan poliakrilamid jellerde heterodubleks ve homodubleks moleküller farklı mobilite gösterdiklerinden mutant DNA tanımlaması yapılabilmektedir. HDA için gerekli olan optimum DNA fragmenti uzunluğu 200 – 600 bp arasında olmakla birlikte bu uzunluğun dışına çıktığı durumlar da olmaktadır. Optimizasyon, uygulanabilirlik ve sonuçların değerlendirilmesi açısından heterodubleks analizi SSCP' ye benzemekte ve onunla benzer avantaj ve

dezavantajları taşımaktadır. Ancak SSCP ve HDA yöntemlerinin nokta mutasyonlarının taranmasında birlikte kullanılması, yöntem dezavantajlarını ortadan kaldırmakta ve yaklaşık % 95' lere varan oranlarda mutasyon tanımlaması yapılabilmektedir (34,69).

Chemical Cleavage of Mismatch Method ( CCM ) : Mutasyonun yaklaşık olarak yerinin belirlenmesi ve taranan amplifiye DNA' da birden fazla mutasyonun olup olmadığının test edilmesi için oldukça uygun bir yöntem olan yanlış eşleşme yöntemi iki şekilde uygulanır. İlk uygulama şekli; mutant ve normal tip RNA heterodublekslerinin RNaz enzimi ile kesilmesi ve ürünlerin elektroforezde izlenmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde normal RNA ve test edilen RNA hibridize edildikten sonra RNaz enzimi ile muamele edilerek elektroforeze alınır. İkinci uygulama şekli ise; yanlış eşleşmeleri enzimlerle değil, kimyasal maddelerle keserek mutasyonun belirlenmesidir. Bu yöntemde RNA değil, DNA hibritleri kullanılmaktadır. Yöntemin temeli, yanlış eşleşme yapmış bazlarla özel kimyasalların reaksiyona girerek bu bazların piperidin ile kesilebilir hale geçmesi temeline dayanır. Timin ve Sitozin bazlarının yanlış eşleşmeleri durumunda sırasıyla Tekroksid / Piperidin ve Osmiyum hidroksilamin / Piperidin ile kesilir. Sonuç olarak Adenin ile Guaninin' de karşı anlamlı dizilerinde Timin ve Guanin dönüşümü olacağından mutasyonlar tespit edilebilmektedir (34,69).

## 2. İndirekt Analiz Yöntemi :

RE teknolojisindeki ilerlemeler ve 1500 dolayında RE' nin bulunması, çok sayıdaki marker lokusların belirlenmesine imkan sağlamıştır. Kişiler; DNA yapıları ve özellikle protein kodlamayan ve önemli regülatör fonksiyonu bulunmayan DNA bölgeleri bakımından farklılıklar gösterir . Bu durumda RE ile kesilme sonucu oluşan DNA fragmentlerinde kişiler arasında büyük varyasyon olması gerekir. Ancak yapılan çalışmalarda yapısal lokuslardaki normal varyasyon miktarının çok küçük olduğu gözlenmiştir. Diğer taraftan, insan genomunun bütün bölgeleri boyunca DNA yapısında zararsız kalıtsal varyasyonlar, yani bir bireyin genomu her 100 – 200 nükleotid de 1 – 2 baz değişimi içermekte , fakat bu durum kişilerde önemli bir hastalığa yol açmamaktadır. İnsan genomundaki bu değişikliklere DNA polimorfizmi denir.

Polimorfizm örnekleri çoğu kez intron, yani genin proteine çevrilmeyen bölgelerinde yer alır. Ancak bu değişimler kimi zaman hastalığa neden olan bir genin içinde veya çok yakınında yer alabilirler. Bu durumda polimorfizmin kalıtımı bize hastalığın tanısı için yardımcı olur. Polimorfizm örnekleri Mendeliyen kurallarına göre kalıtılırlar. İnsan genomunda tek baz

değişiklikleri çok sıktır. Bazılarına göre bu sıklık her 100 baz çiftinde bir olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nükleotid değişikliklerinin büyük çoğunluğu zararsızdır. İnsan genomunda yer alan DNA polimorfizm örnekleri genel olarak 3 grupta değerlendirilebilir. Bunlar :

- a) Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmleri ( Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP ),
- b) Değişken sayıda ardışık dizi polimorfizmleri ( Variable Number of Tandem Repeats, VNTR ) ve
- c) Basit dizi tekrarları ( Simple Sequence Repeats, SSR ) dır (69).

#### Restriction Fragment Length Polymorphism :

DNA Polimorfizmi, DNA üzerinde hastalığa neden olmayan, suskun nükleotid değişimleri olarak tanımlanır. Eğer bu polimorfizmler, bir restriksiyon enzimi kesme bölgesinin yok olmasına ya da yeniden oluşmasına neden olurlarsa; kolaylıkla saptanabilirler. DNA, bu enzimlerle kesildiğinde farklı uzunlukta parçalar oluşur ve analizlerde değişik pozisyonlarda görülürler. Bunlara " Restriction fragment length polymorphism " denir (55).

RFLP analizinin temeli, anne ve babanın iki ayrı alleli taşıyan iki kromozomunun birbirinden ayırt edilmesine ve aile içinde daha önceden bulunan hasta bir çocuk yardımı ile hangi kromozomun riskli olduğunun, yani hangi kromozomun mutasyona uğramış alleli ( yani bozuk geni ) taşıdığına saptanmasına dayanır.

RFLP analizinde, iki kromozom birbirinden gen içinde ya da gen yakınında bulunan bir DNA polimorfizminin bulunması (+); ya da bulunmaması (-) ile ayrılır. Analizin kesinliği kullanılan polimorfik işaretin, hastalık loküsüne yakınlığı ile doğrudan ilişkilidir. Hastalık loküsüne mümkün olduğunca yakın; gen içi işaretlerin kullanımı tanının kesinliğini % 99' a kadar artırır. Kullanılan genetik işaret ve hastalık loküsü birbirine ne kadar yakınsa rekombinasyon olasılığı o kadar küçüktür ki bu da analiz için avantajdır (1,2).

1980' de Botstein, White, Skolnick ve Davis, insan genomundaki tüm genlerin haritalanması için RFLP kullanımını önerdiler. Bunu takip eden çok kısa bir sürede insan genomunun RFLP' ye dayalı bir haritası çıkarılmış oldu. Bunu hızlandıran bir faktör de; bazı ailelerin standart olarak kullanılmasıdır. Özellikle Mormon Kilisesine bağlı her türlü geçmiş

kalıtsal bilgilerin detaylı olarak elde olduğu ailelerin varlığı ile ortaya çıkarılmıştır. Paris' de 1983' de Jean Dausset ve Daniel Cohen tarafından kurulmuş olan Centre d' Etude du Polymorphisme Humaine ( CEPH ) insan genetik haritasını dikkatlice seçilmiş aileler bazında araştırmaktadır. Burada her ailede en büyük ebeveynler sağdır ve ortalama çocuk sayısı sekizdir. İlk RFLP, beta globin gen kümesinde kullanılmıştır. Kistik fibrosis geni ilk kez sadece RFLP kullanılarak klonlanan gendir (1,2).

PCR – RFLP' de Sorunlar : RFLP analizinde sık olarak kullanılan PCR tekniğinde bazı sorunlar oluşabilir;

- Kısmi kesim, özellikle heterozigot gibi görünenlerde dikkat etmek gerekmektedir.
- Allelik Dropot, bir dizideki variant, oligonükleotid dizisinin bir kromozoma bağlanmasına engel olur. Böylece, sadece bir kromozoma ait PCR ürünü oluşur ki bu da yanlış sonuca yol açabilir. Ya Southern Tekniği uygulanarak ya da yeni primerler tasarlanarak bu sorun önlenir.
- Farklı Baba, gerçek babanın bilinmemesi ya da saklanması halinde yanlış sonuç alınır.
- PCR İle RFLP yapılırken primerler dizayn edilirken restriksiyon enzim kesim noktaları ortaya gelecek şekilde yapılır. Bazen bir restriksiyon endonükleaz, PCR tamponunda çalışmayabilir; o takdirde PCR ürünü saflaştırılır. Daha sonra enzimle muamele gerçekleştirilir. Standart Fenol / Kloroform ekstraksiyonu ve etanol presipitasyonu ile pürifikasyon yapılır ya da pürifikasyon için değişik kimyasal maddeler içeren ticari kitler kullanılır (1,2).

RFLP' ler mutant gene bağlı olma özelliklerinden yararlanılarak informatif ailelerde prenatal tanıda uygulanmaktadır. En faydalı RFLP' ler tandem olarak tekrarlayan kısa DNA dizilerinden oluşan çok değişken bölgeler ( Hipervariable Regions, HVR ) dir. Bir loküsten çok sayıda polimorfik fragment ortaya çıktığından, kişiler iki farklı büyüklükte fragmente sahip olacaktır. Dolayısıyla böyle loküsler genetik markerlar olarak çok faydalıdır. Eğer DNA baz dizisindeki varyasyon yeni bir restriksiyon endonükleaz bölgesi oluşturuyor ya da önceden varolan bir bölgeyi ortadan kaldırıyor o zaman ortaya çıkmaktadır. Böyle polimorfizm yalnızca 2 türe sahip olur. Bu türler genellikle eğer kesim yapabilen enzim bölgesi varsa allel (+) olarak, yoksa (-) olarak gösterilmektedir. RFLP yöntemiyle, bir polimorfik DNA dizisi bakımından homozigot (+/+) / (-/-) veya heterozigot (+/-) kişiler belirlenir.



RFLP' lerin genetik tanıda kullanılmasının iki önemli dezavantajı bulunmaktadır. Bunlardan ilki; hastalık geni ile polimorfik bölge arasındaki rekombinasyon olasılığıdır. Yani mayoz bölünme sırasında homolog kromozomlar arasında rekombinasyon olacağından polimorfizm ile hastalığa neden olan gen crossing over ile birbirinden ayrılabilmesi ve beraber kalıtılabilmesidir. Polimorfik bölge gene ne kadar yakınsa, rekombinasyon olasılığı da o kadar az olur. Bu nedenle RFLP' lerin uygulanmasının etkili olabilmesi için markerin hastalığı oluşturan mutasyon bölgesine çok yakın olması gerekmektedir. RFLP' lerin kullanılmasında ikinci önemli dezavantaj, pedigrî analizleri için informatif kardeş ya da akrabaların bulunma zorluğudur. Yani, kullanılan polimorfizm için risk taşıyan ve tanı için başvuran ailenin informatif olması gereğidir. Hasta bir çocuğa sahip oblige taşıyıcı olan anne-babanın normal ve mutant allellerinin RFLP' ler ile ayırt edilebilmesi yani heterozigotluklarının kanıtlanması gereklidir (69).

RFLP; kalıtım çalışması için yapısal heterozigotluğun kaybının incelenmesi için doku tiplemesinde, prenatal tanıda, babalık tayininde, gen klonlamasında, enfeksiyon ajanların ( bakteriler, virüsler ) birbirlerinden farklılıklarının belirlenebilmesinde kullanılabilir (1).

#### Variable Number of Tandem Repeats :

Variable number of tandem repeats ( VNTR ) lokuslarının en önemli özellikleri ardışık tekrar sayılarının ve tekrar birimlerindeki nükleotid dizilerinin değişim göstermesidir. Bu nedenle büyük oranda allelik varyasyon gösterirler. Bu varyasyonların eşit olmayan çapraz geçişler veya replikasyon karması ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. Uzunluk polimorfizmlerinin moleküler temeli insülin geni ile ilişkili VNTR lokusuna ait çok sayıdaki allelerin nükleotid dizisinin belirlenmesi ile açığa çıkarılmıştır. Ardından diğer VNTR lokuslarının analizi ile ardışık tekrar kopyalarının sayısının çok değişken olduğu, birden yüzlerce keze kadar değişebildiği saptanmıştır. Bir lokusta çok sayıda farklı değişken dizilerin varlığı sonucu toplumda çok sayıda allel ( hiperallelizm ) oluşur ve çok sayıda birey heterozigot olur. Bazı VNTR lokuslarında heterozigotluk % 100' lere kadar varmaktadır. VNTR lokusları yüksek polimorfik özellikleri nedeniyle önemli genetik belirleyiciler olarak kabul edilirler. Bu nedenle VNTR; gen haritalanması, kimliklendirme, paternite testleri, adli tıp, prenatal tanı ve kanser ile ilgili odakların belirlenmesinde yaygın olarak kullanılır.

VNTR analizleri için kullanılan yöntemler PCR tekniği ile değişken sayıda ardışık tekrarlar içeren DNA fragmentlerinin bu yörelere komplementer uygun primerlerle

amplifikasyonu, amplifiye ürünün jelde yürütülmesi ve daha sonra etidiyum bromit ile boyanarak UV ışık altında gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Amplifiye ürünün uzunluğu doğrudan mevcut tekrar birimlerinin sayısı ile orantılıdır. Bireylerin bir VNTR lokusu için biri bir kromozomdan, diğeri diğeri kromozomdan olmak üzere maksimum iki farklı alleli vardır. Her bir allel ebeveynlerden kalıtılmaktadır (2).

#### Simple Sequence Repeats ( SSR ) :

SSR' ler veya mikrosatellitler genetik olarak VNTR' lere benzer. Ancak tekrar birimlerinin uzunluğu yaklaşık 2 – 5 bp arasındadır. STR lokusları da VNTR lokusları gibi gen içinde şifrelenmeyen diziler olup, genellikle kromozomların subtelomerik bölgelerinde yerleşmişlerdir ve genom içinde dağınık halde bulunurlar(2). DNA molekülünde yer alan bu basit dizi tekrarları çok küçük diziler olduğundan yalnızca PCR analizi ile tanımlanabilir. SSR örnekleri basit diziler içinde yer alan tekrarlar olması nedeniyle polimorfik yapıya sahiptirler. Bir SSR içeren DNA molekülünün amplifikasyonu değişken büyüklükte fragmentler üretir (69).

## MATERYAL VE METOD:

### Örneklerin Toplanması :

Çalışmaya, Eylül 1999 ile Ekim 2000 tarihleri arasında, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Kliniği ve Polikliniği ile Göğüs Kalp Damar Cerrahi Kliniğine ve Polikliniğine başvuran ilk defa Derin Ven Tromboz tanısı konmuş hastalar ile kontrol amacıyla gelen DVT' u tanısı konmuş toplam 61 hasta ve İç Hastalıkları Polikliniğine başvuran, yapılan muayene ve tetkikler sonucunda DVT öyküsü olmayan 320 sağlıklı birey kontrol grubu olarak alındı. Hastaların 27' si erkek, 34' ü kadındı. Yaş aralığı erkeklerde 17 - 75 yaş, kadınlarda 16 - 57 yaş idi. Kontrol grubunda ki bireylerin 150' si erkek, 170' i kadındı. Yaş aralığı erkeklerde 18 - 50 yaş, kadınlarda 16 - 45 yaş idi.

Hasta ve kontrol grubunda ki bireylerden vakutainer yöntemiyle 5 cc venöz kan EDTA içeren disposable tüplere alındı. Ayrıca sağlıklı örneklerden sitrat içeren disposable tüplere de yine vakutainer yöntemiyle 2 cc kan alındı. Kan alınırken, kontaminasyon ve hemoliz oluşmamasına dikkat edildi. Sağlıklı kontrol grubundan alınan sitratlı kanlar 2500 g ile 15 dakika santrifüj edildikten sonra plazmaları ayrıldı ve en çok 6 saat içinde çalışmaya alındı. EDTA' lı tüplere alınan kanlar ise DNA eldesinin yapılacağı zamana kadar -20°C' de saklandı.

### Gereçler :

Sitrat'lı ve EDTA' lı tam kan tüpleri ( 2 ve 3 ml' lik )

Polypropylene santrifüj tüpleri ( 15 ve 50 ml' lik ) Corning

Pipet uçları ( 200 ve 1000 µlt' lik )

Slikon, steril mikrosantrifüj tüpleri ( 1.5 ml' lik ) Becman

Thermowell tüpler ( 0.8 ml' lik ) Corning

Mikro pipet seti

2 - 20 µlt Genex Beta

10 - 100 µlt Genex Beta

20 - 200 µlt Genex Beta

1 - 10 µlt Socorex

100 - 1000 µlt Socorex

P 100 µlt	Gilson
Plastik pastör ( transfer ) pipetleri	SAMGO
Plastik öze	
Steril eldiven	
Spektro fotometre	
Mikrosantrifüj	Sigma 1 - 15
Soğutmalı santrifüj	Beckman CS – 6R
Su banyosu	Jencons Julabo SW20
Rotary mix	Denley Spiramix S
Deepfreeze	Revco
Etüv	Heraeus
Otoklav	
Analitik terazi	Sartorius Max 6108
Isıtıcı / karıştırıcı	Genesis Hotplate / Stirer Jencons
pH metre	HI 931400 Jencons
Thermal cycler	Techne Cyclogene
UV seçenekli Laminar Flow Hood	
Agaroz jel elektroforez sistemi	Sub-cell GTWIDE MINI BIO-RAD
Poliakrilamid jel elektroforez sistemi	Mini Protean II BIO-RAD
UV Transluminatör	Mini-Transilluminatör BIO-RAD
Fotoğraf makinesi	Standart Electrophoresis Hood BIO-RAD
	Wide / Long Electrophoresis Hood BIO-RAD

**Ayrıçlar :**

Tris-HCl	Sigma
Sucrose	Sigma
MgCl <sub>2</sub>	Sigma
Triton-X100	Sigma
EDTA	Sigma
NaCl	Sigma
SDS (Doedecylsulfat Natriumsalz)	Sigma
Sodium Perchlorate	MERCK
Kloroform	Sigma
Ethanol	Sigma

Boric Acid	MERCK
Gelatin	Sigma
Bromophenol blue	Sigma
Xylene cyanole FF	Sigma
KCl	Sigma
Mineral Oil	Sigma
BSA	Sigma
DMSO	Sigma
Formamide	Sigma
APS	Sigma
TEMED	Sigma
Formaldehyde	Sigma
Gliserol	Sigma
Acrylamide	Sigma
N, N'- Methylene- bis-Acrylamide	Sigma
Agarose	Sigma
Nusieve Agarose	Sigma
Ethidium Bromide	Sigma
Primer-F5R	Tıb Molbiol
Primer-F5F	Tıb Molbiol
Mnl I	MBI Fermentas
Water	Sigma

Lökosit DNA Eldesi :

Ayrıçlar :

Parçalayıcı (Lizis ) Tamponu ( Reaktif A ) pH 8.0

10 mM Tris-HCl

320 mM Sucrose

5mM MgCl<sub>2</sub>

990 ml distile su

Otoklav edilir

% 1 Triton-X100 eklenip karıştırılır ve +4°C' de saklanır.

Reaktif B: pH 8.0

400 mM Tris-HCl

60 mM EDTA

150 mM NaCl

1000 ml distile su

Otoklav edilir

% 1 SDS ( Doedcyl natrium sulfate ) eklenip karıştırılır ve oda sıcaklığında saklanır.

5 M Sodium Perchlorate

Otoklav gerekmez.

Kloroform, Etanol

TE Buffer: pH 8.0

1 M Tris-HCl

0.5 M EDTA

99 ml bidistile su

Otoklav edilir

Hücre Preperasyonu :

1. Kanlar Sodyum EDTA' lı tüplere alınır.
2. Santrifüj +4°C için ön soğutmaya hazırlanır. 50 ml' lik polypropylene santrifüj tüplerine 5-10 ml kan konulur. Üzerine 40-45 ml lizis tampon eklenir.
3. Elle hafifçe 2 dakikalık bir süre için karıştırılır.
4. +4 °C' de 10 dakika süre ile 3000 rpm' de santrifüj edilir. Hücrelere zarar vermeksizin süpernatant atılır.

#### Hücre Lizisi :

1. Tüplere 2 ml reaktif B eklenir ve hafifçe karıştırılarak hücre çökeltilerinin çözümleri sağlanır.
2. Bu süspansiyon 15 ml' lik kapaklı polypropylene tüplere aktarılır.

#### Deproteinizasyon :

1. Su banyosu 65°C' ye kadar ısıtılır.
2. Her bir tüpe 5 M' lik Sodyum Perklorat' tan 500 µl eklenir ve tüpler kan döndürme ( rotary mix ) cihazına konular, oda ısısında 15 dakika süre ile karışması sağlanır.
3. Tüpler 65°C' lik su banyosunda 30 dakika süreyle bekletilir.

#### DNA Ekstraksiyonu :

1. Her bir tüpe daha önceden -20°C' de bırakılmış Kloroform' dan 2 ml eklenir.
2. Tüpler oda sıcaklığında 10 dakika rotary mix' e konular.
3. Rotary mix' den alınan tüpler 1400 rpm' de 10 dakika santrifüj edilir

#### DNA Presipitasyonu :

1. DNA içeren faz ( Üstteki berrak tabaka ) plastik pastör pipetlerini kullanarak 15 ml' lik yeni bir santrifüj tüpüne aktarılır.
2. DNA içeren volümün 2 katı kadar soğuk etanol ( Daha önceden soğutulmuş ) ilave edilir. Hafifçe karıştırılarak DNA' nın presipite olması sağlanır.
3. Plastik öze ile presipite olan DNA alınır ve 3-5 dakika süre dışarda bekletilerek kuruması sağlanır.
4. 1.5 ml' lik eppendorf tüplerine 200 µl TE buffer konur.
5. Üzerinde DNA' nın kuruması sağlanan plastik öze kesilerek, içinde TE buffer bulunan tüpe konur.

Uzun süre saklanılacaksa -20°C, hemen yada bir hafta içinde kullanılacaksa +4°C' de saklanabilir. DNA' nın derişimi hesaplanarak, amplifikasyona hazır hale getirilir.

DNA derişimi (  $\mu\text{g} / \text{mlt}$  ) = OD<sub>260</sub> X Seyreltme Faktörü X 50\*

$\mu\text{g} / \text{mlt} = \text{OD}_{260} \times 30 \times 50$

\*1 cm ışık yollu küvette 1 OD' ye karşılık gelen  $\mu\text{g} / \text{mlt}$  biriminden DNA miktarı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu :

PCR Amplifikasyonunda Kullanılan Ayıraçlar : (55)

DNA polymerase : *Thermus aquaticus* DNA polymerase, Taq DNA Polymerase, 5 Ü /  $\mu\text{lt}$ , Sigma, -20 °C' de saklanır.

10 X PCR Tamponu : 100 mM Trizma- HCl, pH 8.3, 25°C

500 mM KCl

15 mM MgCl<sub>2</sub>

% 0.01 ( w/v ) gelatin, Sigma, -20°C' de saklanır.

25 mM MgCl<sub>2</sub> : Sigma, -20°C' de saklanır.

2 mM dNTP' ler : Sigma, -20°C' de saklanır.

PCR primerleri : Upstream primer, 5'- TGC CCA GTG CTT AAC AAG ACC A

Downstream primer, 5'- TGT TAT CAC ACT GGT GCT AA (6,23)

HPLC Grade 30 nm'lik sentez skalalık

TIB MOLBIOL, -20°C' de saklanır.

Mineral oil : İnce ve steril, tepkimeyi buharlaşmadan korur. Sigma, oda sıcaklığında saklanır.

Gel Loading Solüsyonu : % 0.25 ( w7v ) Bromophenol blue

% 0.25 ( w/v ) Xylene cyanole FF

% 40 ( w/v ) Sucrose, Sigma, 2-8°C' de saklanır.



100 bp DNA Ladder : 500 µg / ml

10 mM Tris-HCl, pH 8.0

1mM EDTA, BioLab, -20°C' de saklanır.

Baz çiftleri; 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 ve 100' dür.

Step Ladder, 50 bp : 50 µg

10 mM Tris-HCl

10 mM NaCl

1mM EDTA, pH 7.5, Sigma, -20°C' de saklanır.

Baz çiftleri; 3147, 2674, 900, 800, 700, 600, 500, 450, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50' dir.

PCR Amplifikasyonunda Kullanılan Cihaz :

Thermal cycler : Techne Cyclogene.

Amplifikasyon Protokolü : (6,23,55)

Bir örnek için ; Final volüm 50µlt olacak şekilde,

10 X PCR Tamponu	5 µlt
2 mM dNTP karışımı	2 µlt
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µlt
Primer I	0.5 µlt
Primer II	0.5 µlt
Formamide	2 µlt
DNA polimeraz	0.5 µlt
Saf su	34.5 µlt

Tepkimeyi buharlaşmadan korumak için PCR karışımının üstüne ince bir tabaka halinde mineral oil konur. Daha sonra DNA mineral oil'i geçerek PCR karışımına miktarı 1µlt olacak şekilde eklenir.

PCR Programı :(6,23,55)

Denatürasyon : 94 °C 5 dakika

Denatürasyon : 94 °C 40 saniye

Annealing : 59 °C 40 saniye 40 döngü

Extension :72 °C 40 saniye

Final extension : 72 °C 10 dakika

10 µlt PCR ürünü 2µlt Gel Loading solüsyonu ile karıştırılır ve 1 X TBE tamponunda ethidium bromide boyanmış % 2' lik agaroz jelde, jelin ilk kuyucuğuna DNA size marker yüklenmiş olarak, 80 - 120 V akımda 45 dakika yürütülür. DNA fragmentleri UV transillüminatör üzerinde incelenir ve daha sonra fotoğraflanır.

Agaroz Jelin Hazırlanması : (55).

% 2' lik Agaroz jel hazırlığı; 2 gram agaroz 100 mlt pH 8.3, TBE tamponunda çözülür.( TBE; Tris-Borat-EDTA ).

10 X TBE Tamponu : 108 gr Tris Baz

55 gr Borik Asit

40 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0

1 lt distile su ile tamamlanır.

Otaklav edilir, oda sıcaklığında saklanır.

Ethidium bromide : 10 mg / mlt

Yöntem :

Agaroz jel TBE tamponunda eritildiğinde bulanıktır. Çözündükten sonra rengi berraklaşır, 60 - 65°C' ye kadar soğutulur. Plak düz bir zemin üzerine yerleştirilir. Dengeli olması sağlanır. Taraklar plak üzerine yerleştirilerek jel daha fazla soğumadan kalınlığı 0.5 cm olacak şekilde ve tek seferde plağa dökülür. 15 – 20 dakika kadar donması için beklenir. Plak, TBE tamponu

içeren elektroforez tankı içine yerleştirilir. Daha sonra tarak, plağın iki tarafı desteklenerek tam ortasından dikkatlice bir defada çekilir. Jel üzerinde kuyucuklar oluşmuştur.

Masanın üzerine bir parça parafilm konur ve bunun üzerine 2 µlt gel loading solüsyonu damlatılır. Her bir boya damlacığının üzerine 10 µlt PCR ürünü eklenip iyice karıştırılır ve kuyucuklara aplikasyon yapılır. Jelin ilk kuyucuğuna DNA size marker yüklenir. 80 – 120 voltta 45 dakika elektroforez sürdürülür. Elektroforez sonunda jel tanktan çıkartılarak ethidium bromide içinde bantların boyanması sağlanır. Saf suda boya artıkları temizlenir ve UV transillüminatör üzerinde bantlar izlenir ve fotoğrafı çekilir (2).

### PCR Ürününün Restriksiyon Enzim Digestiyonu : (6,23,55)

Mnl 1: MBI Fermentas, 300 U, µlt / 10 U, -20°C' de saklanır.

Buffer G 10 mM Tris-HCl, pH 7.5

10 mM MgCl<sub>2</sub>

50 mM NaCl

0.1 mg / ml BSA

### Gel Loading Solüsyonu

100 bp DNA Ladder

PCR ürünü

Bir örnek için; Final volüm 20 µlt olacak şekilde,

Mnl 1 = 0,2 µlt

Buffer G = 2 µlt

BSA = 0.2 µlt

PCR ürünü = 17.6µlt

Hazırlanan karışım yaklaşık olarak 18 saat 37°C' de inkubasyona bırakılır. İnkubasyon süresi sona erdiğinde, enzim aktivitesinin sonlandırılması için 2 dakika 95°C' de tutulur.

% 3' lük agaroz jelde 80 – 120 V akımda 45 dakika yürütülür. Jelin ilk kuyucuğuna DNA size marker ( 100 bp DNA Ladder ) konur ve aplikasyon yukarda belirtildiği gibi yapılır. Sonuçlar UV transillüminatörde yorumlanır ve fotoğrafı çekilir.

% 3' lük agaroz jel yerine poliakrilamid jel de kullanılabilir.

#### Poliakrilamid Jel Elektrofrez ( PAGE ) : (15)

Akrilamid monomerleri, çapraz bağlayıcılar yardımıyla kovalent olarak birbirine bağlanıp uzun zincirler oluşturarak polimerize olurlar. En sık kullanılan çapraz bağlayıcı N,N'- Metilen bisakrilamiddir. Poliakrilamidin polimerizasyonu amonyum persulfat ile başlatılır ve N, N, N', N'-tetrametilendiamid ( TEMED ) ile katalize edilir.

#### Ayırçılar :

1. Akrilamid Stok Solüsyon : 100 gr akrilamid ve 2.7 gr bisakrilamid bir miktar saf suda çözülür ve 250 ml saf su ile tamamlanır.
2. Tris-Borat-EDTA ( 10 X TBE ) Tamponu :

1 M Trisma base	121.1 gr
1 M Borik Asit	61.83 gr
0.1 M EDTA	200 mlt

1 litre su ile tamamlanır ve pH 8.0' a ayarlanır.

3. Amonyum Persulfat ( APS )
4. TEMED

#### Yöntem :

Kalınlığı 3 mm boyutları 10x10 olan bir çift cam deterjan ile çok iyi yıkandıktan sonra etil alkolden geçirilir. Camlardan yuvarlak kenarlı olana özel lastik şerit takılarak iki cam kışkaçlarla birbirine tutturulur. Camların arasına, kenarlara gelecek şekilde, 0.5 mm kalınlığında " spacer " lar yerleştirilir. Camların üst kısımları farklı uzunlukta olup jel dökerken uzun olan kısım zemine 45° açı oluşturacak şekilde eğilir ve hazırlanan jel iki cam arasına dökülerek doldurulur. Hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilir. Jel dökülür dökülmez tarak yerleştirilir. Bir miktar jel, bir ependorf tüpüne alınarak donup donmadığı kontrol edilir. Jelin donduğundan emin olduktan sonra, iki cam arasına sıkıştırılmış olan lastik şerit dikkatlice çıkartılır.

Elektroforez tankı, 1 X TBE tamponu ile doldurulur. Camlar tanka dikey olarak yerleştirilir ve tamponla ıslanması sağlanarak, kuyuları zedelemeyen, tarak çıkartılır. Kuyular tamponla yıkanarak jel artıklarından temizlenir (2).

% 6'lık poliakrilamid jelin içeriği : Akrilamid Stok	3 mlt
Saf su	10.5 mlt
10 X TBE	1.5 mlt
TEMED	15 µlt
Amonyum Persulfat	100 µlt

Her bir kuyuya digestiyon ürününden 20 µlt ve 1.5 µlt xylencyanol boyası karıştırılarak aplike edilir. 150 V' ta 1 saat yürütülür. Daha sonra, etidyum bromid içinde birkaç saniye tutulduktan sonra 15 dakika saf suda bekletilerek, UV transilluminatör üzerinde oluşan bantlar izlenir ve fotoğraflanır.

#### Sonuçların Yorumlanması :

Kişi 1691 pozisyonunda G aleli taşıyorsa, 37, 67 ve 163 bp' lik restriksiyon fragmentleri, 1691 pozisyonunda A aleli taşıyorsa, 67 ve 200 bp' lik restriksiyon fragmentleri gözlenir.

Kişi her iki aleli taşıyorsa, 37, 67, 163 ve 200 bp' lik restriksiyon fragmentleri gözlenir.

Sonuç olarak Mnl I ile yapılan PCR – RFLP yöntemi moleküler bir teknik olup faktör V Leiden mutasyonunun taranmasında etkili bir şekilde kullanılabilir. Bu yöntem ile faktör V eksikliğinin gerçek tipi belirlenebilmekte ve ayrıca yanlış sonuçların bertaraf edilmesini sağlamaktadır. Testin pahalı oluşu bir dezavantaj ise de ayırıcı tanıyı sağlamasından dolayı tercih edilen bir yöntemdir.

Aktive Protein C Direncinin ( APC - R ) Tayini : (33,57)

#### Testin Prensipleri :

Aktive protein C direncinin ( APC – R ) tayini, PCa varlığında ve kalsifiye edilmiş bir ortamda, test edilen plazmanın pıhtılaşma zamanındaki oldukça küçük uzamalar göz önünde bulundurularak yapılır. STA – Staclot APC – R sisteminde; dilüe edilmiş test plazmasının

koagülasyonu, faktör V' ce yetersiz plazma ve Crotalus viridis helleri venomunun varlığında sağlanır. Bu venom faktör X' u aktive eder ve bu yüzden koagülasyon şelalesini aşağı yönde etkiler, böylece de koagülasyonu yukarı yönde etkileyebilecek bütün faktörleri elimine eder. PCa varlığında normal bir plazmanın pıhtılaşma zamanındaki uzama, reaktif 3 tarafından faktör Va' yı inaktive etmek için ortama sağlanan PCa' nın kapasitesinden kaynaklanır.

#### Kit Reaktifleri :

Kit içinde üç adet barkod eki bulunmaktadır; Reaktif 1, 2 ve 3 için bir adet ve her bir kontrol ( reaktif 4 ve 5 ) için birer adet. Barkodlar, lot numarası, kitin kod numarası, reaktifin kod numarası, son kullanma tarihi, reaktif 4 ve 5' in STA analizörü ile belirlenmiş pıhtılaşma zamanları ile ilgili bilgileri içerir.

4 x 2 mlt Reaktif 1 ( Faktör V yetersiz plazma )

4 x 2 mlt Reaktif 2 ( Yılan Zehiri )

4 x 2 mlt Reaktif 3 ( Aktive Protein C )

4 x 1 mlt Reaktif 4 ( Normal Kontrol )

4 x 1 mlt Reaktif 5 ( Patolojik Kontrol )

Reaktif 1 : Faktör V' ce immüno – eksik ve fosfolipidlerce zenginleştirilmiş, dondurulmuş, kuru insan plazması.

Reaktif 2 : Dondurulmuş, kuru Crotalus viridis helleri venomu.

Reaktif 3 : Kalsiyumlu ortamda, dondurulmuş, kuru, insandan elde edilmiş aktive protein C içeren şişe.

Reaktif 4 : Negatif kontrol olarak kullanılan, dondurulmuş, kuru, sitratlı insan plazması.

Reaktif 5 : Pozitif kontrol olarak kullanılan, dondurulmuş, kuru, sitratlı insan plazması.

Reaktifler 2 - 8°C arasında saklanır. Açılmamış vialer bu sıcaklıkta saklandıklarında son kullanma tarihine kadar stabilitelerini korurlar.

#### Numune Hazırlığı :

9 ölçek kan, 1 ölçek trisodyum sitrat 0.109 M ( % 3.2 ) antikoagülant içine alınır. 2500 g ile 15 dakika santrifüj edilir. Trombositleri uzaklaştırmak için 4°C' de çift santrifüj tavsiye edilir. Plazmanın mümkün olduğunca çabuk toplanması gerekir. Plazma hazırlandıktan sonra -

20°C' de 8 saat, -80°C' de 6 ay stabildir ( Plazmalar toplandıktan sonra iki saat içinde dondurulmalıdır ). Donmuş plazmalar kullanılmadan önce 37°C' de 15 dakika bekletilir ve iyice karıştırmak için çalkalanmalıdır. Plazmalar eritildikten sonra sadece bir kez kullanılır.

#### Reaktif Hazırlama ve Saklama :

Reaktif 1 : Her bir vial 2 ml distile su ile hazırlanır. Hazırlanan solüsyon oda sıcaklığında ( 18 - 25°C ) 60 dakika bekletilir. Kullanmadan önce hafifçe çalkalanır. Hazırlanan solüsyon STA Analizörü üzerinde ( 15 - 19°C ) 8 saat stabildir.

Reaktif 2, 3,4 ve 5'te de hazırlama ve saklama Reaktif 1'de olduğu gibidir.

STA – Owren Koller, STA benzeri bir cihaz da gereklidir. Ancak bu malzemeler kit içinde yoktur.

#### Yöntem :

Hasta plazmaları : Hasta numuneleri dilüe edilmeden kullanılır. Dilüsyonlar Owren – Koller tamponu ile cihaz tarafından otomatik olarak yapılır. Hasta bilgileri manuel olarak klavye kullanılarak veya barkod okutularak girilebilir. Daha sonra plazmalar numune çekmecesine yerleştirilir. Cihazdan gelen sinyal sesi hasta bilgilerinin ve numunelerin çekmedeki pozisyonlarının cihaz tarafından onaylandığını gösterir. Daha sonra yapılacak test seçilir.

Kalite Kontrol : Sonuçların doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini sağlamak için lot – spesifik reaktif 4 ve 5 gereklidir. Reaktifleri hazırladıktan sonra, viallerdeki barkodlu etiketler STA cihazının barkod okuyucusuna okutulur. STA cihazı tarafından gösterilen reaktif hacmi onaylanır. Sonra, STA model cihazda, kontrol viali herhangi bir numune çekmecesinden 8, 9, 10 numaralı veya diğer pozisyonlardan herhangi bir yerine yerleştirilir. STA Compact model cihazda, kontrol viali ürün çekmecesinden 1 – 18 veya 35 – 38 numaralı pozisyonlardan herhangi birine yerleştirilir. STA cihazından gelen sinyal sesi reaktiflerin tanımının ve pozisyonlarının cihaz tarafından onaylandığını gösterir. Eğer yeni bir lot reaktif kullanılacak ise, Reaktif 4 ve 5' in barkodundaki bilgilerin cihaza aktarılması gereklidir. Bunun için reaktifin barkodu STA cihazının barkod okuyucusuna okutulur.

Numuneleri yerleştirdikten sonra cihazın talimatları takip edilir. Numuneler yüklenir yüklenmez cihaz APC – R testini otomatik olarak yapar.

#### Sonuçlar :

Test edilen plazmaların pıhtılaşma zamanları saniye cinsinden STA Compact cihazının “ Test Status ” ekranında gözlenir. Reaktif 4 ve 5 değerlerinin, kontrol kutusu içerisinde bulunan << Assay Value >> belgesinde yer alan aralığın içinde kalmasına dikkat edilir. Eğer kontrol değerleri bu aralığın dışında ise tüm hasta sonuçlarına şüphe ile bakılmalıdır. Test ile ilgili tüm etmenler kontrol edilmelidir, gerekirse testler yenilenmelidir.

Cihazın bakım prosedürünün kullanıcı kılavuzunda belirtilen şekilde yapılması gereklidir. Şüpheli numuneler ( mikroklot içeren, hemolizli v.b. ) kullanılmamalıdır. Plazmadaki düşük faktör V seviyesi ( < % 50 ) yanlış negatif sonuçlara yol açar ( pıhtılaşma zamanı  $\geq$  120 saniye ). Bununla birlikte, plazmadaki düşük faktör V seviyesinde ( < % 50 ) bulunan pozitif sonuçlar ( pıhtılaşma zamanı < 120 saniye ) geçerli sonuçlardır.

STA cihazı ile STA – Staclot APC – R prosedürü uygulanarak test edilen plazmalar; pıhtılaşma zamanları 120 saniyeye eşit veya daha yüksek çıkarsa APC – R negatif, 120 saniyeden düşük çıkarsa APC – R pozitif olarak değerlendirilir.

Bazı transplant hastalarda genetik testler ile aktivite testleri arasında sonuç farklılıkları gözlenebilir. STA – Staclot APC – R prosedürü 1 IU / ml’ ye kadar olan heparin seviyelerine duyarsızdır. Moleküler biyoloji yardımıyla, testi etkileyebilecek özelliklere sahip olan faktör V Leiden varlığı belgelenen plazmalar STA – Staclot APC – R prosedürüne göre test edildiğinde aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur:

Protein S yetersiz plazmalar ( protein S seviyesi % 23-55 arasında, n=27, 7’ si APC – R pozitif )

Lupus antikoagülanlı plazmalar ( n=20, 2’ si APC – R pozitif )

Heparin tedavisi gören hastaların plazmaları ( UFH veya LMWH, n=47, 4’ ü APC - R pozitif )

Oral antikoagülant alan hastalar ( n=53, 12’ si APC – R pozitif )

Bütün bu durumlarda testte bir etkileşim görülmemiştir.



Fluorimetrik PCR :

Prensip :

Yakın zamanda, kapiller çalışan mikrohacimli, hızlı ısı kontrollu bir fluorimetre geliştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonunun çok kısa sürede gerçekleşmesini sağlamaktadır. Ortaya çıkan ürünün " erime noktalarının " tayini ile farklı mutasyonların analiz edilmesi bilgisayar ortamında saptanmaktadır (1).

Light Cycler – Faktör V Leiden Mutation Detection Kit' i, hibridizasyon problemleri ve Light Cycler cihazı kullanarak cam kapillerde polimeraz zincir reaksiyonunun spesifik olarak adaptasyonu ile örneklerde faktör V Leiden nokta mutasyonunu belirlemek için kullanılır (45). Real – time fluorescence PCR ve fluorescence resonance energy transfer ( FRET ) yöntemi ile trombofilia ile ilişkilendirilmiş olan;

Faktör V Leiden ( G 1691 A )	(45,49,50,83)
Protrombin ( G 20210 A )	(49,83)
Metilentetrahidrofolat Reduktaz ( C 677 T )	(83)
Hemokromatozis ( G 845 A )	(50)

gibi bu mutasyonları en hızlı bir şekilde tespit etmek için Light Cycler geliştirilmiştir.

Yöntem :

Spesifik bir çift hibridizasyon prob kullanarak floresans ile ampikon tespit edilir. İki farklı oligonükleotid içeren hibridizasyon problemleri, PCR siklusunun annealing fazında amplifiye olmuş fragmentlerin internal dizisine hibridize olur. İlk prob 5'- end ucunda Light Cycler-Red 640 ile işaretlenmiş, diğer prob ise 3'-end ucunda floresan ile işaretlenmiştir. Bu metodla spesifik PCR ürünlerinin Real-time olarak görüntülenmesi, hedef gen bölgesine komplementer ve birbirine yakın olarak dizayn edilmiş hibridizasyon problemleri ve bunların hedef diziyeye bağlanmaları sayesinde gerçekleştirilmektedir. ,

Kit içeriği :

Gerekli gereçler : LightCycler cihazı

LightCycler Kapillerleri

Vial	Marka	İçerik ve kullanımı
1 yellow cap	LightCycler-Factor V Leiden Mutation Detection Mix, 10x	<input type="checkbox"/> 1 x 64 µlt [10x] <input type="checkbox"/> Faktör V geni için spesifik, kullanıma hazır hibridizasyon prob mix -Primer : işaretlenmemiş -Hibridizasyon prob 1 ( mutasyon prob ): 3'-end ucu fluorescein ile işaretlenmiş -Hibridizasyon prob 2 ( anchor prob ) : 3'- end ucu phosphory'lenmiş ve 5'-end ucu LightCycler-Red 640 ile işaretlenmiş Faktör V geninin genotiplendirilmesi ve amplifikasyonu için
2 red cap	LightCycler-Factor V Leiden Reaction Mix, 10x	<input type="checkbox"/> 1 x 64 µlt[10x] <input type="checkbox"/> PCR için kullanıma hazır reaction mix <input type="checkbox"/> Taq DNA polimeraz içeren, reaksiyon buffer ve dNTP mix ( dTTP'nin yerine dUTP' li )
3 purple cap	Kontrol hedef	<input type="checkbox"/> 1 x 22 µlt [ 0.5 ng/µlt ] <input type="checkbox"/> kontrol reaksiyon için heterozigot plazmid DNA
4 color-less cap	H <sub>2</sub> O, steril, PCR-grade	<input type="checkbox"/> 1 x 1 ml <input type="checkbox"/> Final reaksiyon volümünü ayarlamak için

Kit komponentlerinin saklanma koşulları :

1 yellow cap : LightCycler-Faktör V Leiden Mutasyon Tespit Mixi, 10x

- \* -15/ -25°C arasında saklanır
- \* Bir kez çözüldükten sonra bir daha dondurulamaz
- \* Işık alan yerde saklanmaz

2 red cap : LightCycler-Faktör V Leiden Reaksiyon Mix, 10x

- \* -15/ -25°C arasında saklanır

- \* Bir kez çözüldükten sonra bir daha dondurulamaz

2 purple cap : Kontrol hedef

- \* -15/ -25°C arasında saklanır

Protokol : Protokol dört programdan oluşur.

Program 1 : İnsan genomik DNA' nın denatürasyonu

Program 2 : Hedef DNA' nın amplifikasyonu

Program 3 : Genotip belirlenmesi için Melting curve

Program 4 : Termal bölme ve soğutma roturu

Master Mixin Hazırlanması :

1. Buz üzerinde tutulan 1.5 ml' lik reaksiyon tüpü içinde mix hazırlanır :

Komponent	Volüm	Final konsantrasyonu
H <sub>2</sub> O, steril, PCR-grade ( vial 4, colorless cap )	14 µlt	
LightCycler-Faktör V Leiden mutasyon tespit mixi ( vial 1, yellow cap )	2 µlt	1 x
LightCycler-Faktör V Leiden reaksiyon mix ( vial 2, red cap )	2 µlt	1 x
Total volüm	18 µlt	

2. Hafifçe karıştırılır.

Önceden soğutulmuş LightCycler kapillerlerine 18 µlt master mix pipetlenir.

Test edilecek hastalardan elde edilmiş genomik DNA' dan 2 µlt eklenir.

Pozitif kontrol olarak, kontrol hedeften ( vial 3, purple cap ) 2 µlt alınıp eklenir.

Negatif kontrol olarak, 2 µlt H<sub>2</sub>O, steril, PCR-grade ( vial 4, colorless cap ) eklenir.

3.Kapillerler adaptöre yerleştirilir ve 3000 rpm' de 5 saniye bir spin yapılır.

4.LightCycler cihazının rotoruna kapillerler yerleştirilir.

5.Daha önce bilgisayarda programları yapılmış LightCycler çalıştırılır.

Yorum :

PCR sonrası LightCycler cihazı sıcaklığı yavaş yavaş yükselterek Melting Curve analizini gerçekleştirmektedir. Melting curve analizi ile sıcaklığa karşı PCR ürünlerinin verdiği floresans eğrisi elde edilmektedir. Bu eğrinin negatif türevinin hesaplanması ile de Melting peakler elde edilmektedir.

Doğal alleller ile mutant alleller, farklı nükleotid dizisine sahip oldukları için farklı sıcaklıkta melting peakler vereceklerdir.

Hedef DNA içeren...	Melting peaklerin sayısı	Melting peaklerin T <sub>M</sub> ' si	Melting peakler arasındaki ΔT
Wild tip genotip	1	65°C	-
Heterozigot genotip	2	65°C 57°C	8°C
Mutant genotip	1	57°C	-

Erime noktaları ( Melting temperature, T<sub>M</sub> ), çalışmalar arasında ± 2.5°C' lik bir çeşitlilik gösterebilir. Ayrıca, heterozigot genotiplerin melting peakleri ile ΔT arasında ± 0.75°C' lik bir çeşitliliğin olması kabul edilebilir bir değerdir.

Tromboz sebebi olarak düşünülen mutasyonlardan birinin rutin olarak tespitinin gerekliliğinde; doğru, hızlı, güvenilir ve maliyeti diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında oldukça uygun olan bu yöntemde, 32 örnek 40 dakikadan daha az bir sürede sonuçlanmaktadır (49). Bu yöntemde enzim digestiyonu ya da elektroforez sistemi gerekli değildir (49).

## BULGULAR:

Sağlıklı popülasyonda aktive protein C ( APC ) direnç sıklığı taraması yapılarak, APC direnci saptanan bireylerde faktör V Leiden ( FVL ) mutasyonu araştırıldı. APC direnci aPTT automated kullanılarak, modifiye yöntemle koagülometrik olarak çalışıldı. STA cihazı ile STA-Staclot APC-R prosedürü uygulanarak test edilen plazmalar; pıhtılaşma zamanları 120 saniyeye eşit veya daha yüksek olan 286 birey APC-R negatif, 120 saniyeden düşük 34 birey ise APC-R pozitif olarak değerlendirildi (Tablo 8).

APC direnci saptanan 34 sağlıklı birey ile 61 DVT' lu hastada da FVL mutasyonu araştırıldı. Faktör V geninin, mutasyon olan nükleotidi içeren 267 bp' lik bölümü amplifiye edilerek (Şekil 6), mutasyonun varlığı Mnl I restriksiyon enzimi kullanılarak Restriction Fragment Length Polymorphism ( RFLP ) analizi ile araştırıldı (Şekil 7-11). DVT vakalarında FVL mutasyon araştırması, yine Real-time fluorescence PCR ve fluorescence resonance energy transfer ( FRET ) yöntemi kullanılarak Light Cycler ile de teyit edilmiş oldu (Şekil 12).

Analiz sonuçları yorumlandı ve 1691 pozisyonunda G aleli taşıyan 46 DVT' lu hasta ve 5 sağlıklı birey tespit edilirken (%75.4, %90.9); 1691 pozisyonunda A aleli taşıyan 1 DVT' lu hasta ve 7 sağlıklı birey tespit edildi (%1.6, %2.1). Yine her iki aleli taşıyan 14 DVT' lu hasta ve 22 sağlıklı birey saptandı (%22.9, %6.8). Kontrol grubunda APC direnç sıklığı da %10.6 olarak belirlendi (Tablo 8).

TABLO 8. Faktör V Leiden Mutasyonunun Güney Doğu Anadolu Bölgesindeki Popülasyonda Dağılımı.

	N	APC-R	%	GG	%	GA	%	AA	%	Allel sıklığı
Kontrol	320	34	10.6	291	90.9	22	6.8	7	2.1	9.0
DVT	61			46	75.4	14	22.9	1	1.6	24.5

FVL mutasyonu taşımayan DVT' lu hastaların 24' ü kadın (yaş aralığı 16-52 yaş) 22' si erkekti (yaş aralığı 17-75 yaş). DVT' lu 15 hastanın, heterozigot mutasyon taşıyanların 10' u kadın (yaş aralığı 18-57 yaş) 4' ü ise erkekti (yaş aralığı 48-67 yaş). Homozigot mutasyon taşıyan tek bir hasta vardı ve cinsiyeti de erkekti (67 yaş).

Kontrol grubundaki heterozigot mutasyon taşıyan sağlıklı bireylerin 6' sı kadın (yaş aralığı 18-45 yaş) 16' sı erkekti (yaş aralığı 33-47 yaş), homozigot mutasyon taşıyan sağlıklı bireylerin 3' ü kadın (yaş aralığı 21-40 yaş) 4' ü erkekti (yaş aralığı 37-50 yaş), FVL mutasyonu taşımayan sağlıklı bireylerin ise 3' ü kadın (yaş aralığı 16-43 yaş) 2' si erkekti (yaş aralığı 18-39 yaş).

Hastaların bir kısmında trombozun oluşmasında görev alan bir takım predispoze faktörler söz konusuydu. Hamilelik ile başlayan DVT' lu vakalar 2,23,24,25,27 ve bu hastalardan 2 ile 25 numaralı hastalar heterozigot mutasyon taşıyıcısı olarak tespit edildi; doğumdan sonra DVT' nun görüldüğü vakalar 22,30,40,42,58 ve bu hastalardan 30 ile 42 numaralı hastalar heterozigot mutasyon taşıyıcısı olarak tespit edildi; cerrahi müdahale sonrası DVT' nun görüldüğü vakalar 20,26,33,34,38,39,44 ve 38 numaralı hasta heterozigot mutasyon taşıyıcısı olarak tespit edildi ve travma sonrası oluşmuş DVT' nun görüldüğü vakalar 11,13,28,36 numaralı hastalardı. Ateşli silahla yaralanma sonucunda 49 numaralı hastada, yılan sokması sonrasında 56 numaralı hastada (heterozigot mutasyon taşıyıcısı) ve immobilizasyon sonucu 57 numaralı hastada DVT gelişmiştir.

DVT' nun ilk olarak ortaya çıktığı hasta sayısı 36, tekrarlayan DVT' ye sahip hasta sayısı ise 25 vakaydı. 46 ile 52 numaralı vakalarda DVT ilk olarak ortaya çıkmış ve Pulmoner Emboli de birlikte oluşmuştur. Tekrarlayan DVT' u görülen 18 numaralı hastada Pulmoner Emboli de gelişmiştir. Ancak DVT ile birlikte pulmoner embolinin bulunduğu bu üç hastanın da FVL mutasyonunu taşımadığı saptanmıştır (Tablo 9).

TABLO 9. Derin Ven Trombozlu hastalara ait bulgular.

Hasta No	Cinsiyeti	Yaşı(yıl)	OK*	Predispoze faktörler	Aile Öyküsü	DVT' nun ilk epizodu	DVT' nun tekrarlayan	Pulmoner Emboli	FVL GG	FVL AG	FVL AA
1	K	29	H	H	H	-	E	-	E	-	-
2	K	34	H	E#	E	-	E	-	-	E	-
3	Er.	46	Erkek	H	H	E	-	-	E	-	-
4	Er.	27	Erkek	H	H	E	-	-	E	-	-
5	K	30	H	H	H	E	-	-	E	-	-
6	Er.	44	Erkek	H	H	E	-	-	E	-	-
7	Er.	44	Erkek	H	H	E	-	-	E	-	-
8	K	30	H	H	H	-	E	-	-	E	-
9	Er.	17	Erkek	H	H	E	-	-	E	-	-
10	Er.	63	Erkek	H	E	E	-	-	E	-	-
11	Er.	48	Erkek	Eα	E	E	-	-	E	-	-
12	Er.	48	Erkek	H	H	-	E	-	E	-	-
13	Er.	37	Erkek	Eα	H	-	E	-	E	-	-
14	Er.	40	Erkek	H	H	-	E	-	E	-	-
15	Er.	37	Erkek	H	H	E	-	-	E	-	-
16	K	50	H	H	E	-	E	-	E	-	-
17	Er.	48	Erkek	H	H	-	E	-	-	E	-
18	K	21	H	H	H	-	E	E	E	-	-
19	Er.	67	Erkek	H	H	-	E	-	-	-	E
20	K	52	H	E¶	H	E	-	-	E	-	-
21	Er.	61	Erkek	H	H	-	E	-	E	-	-
22	K	32	H	E§	H	E	-	-	E	-	-
23	K	27	H	E#	H	-	E	-	E	-	-
24	K	38	H	E#	H	-	E	-	E	-	-

25	K	38	H	E#	H	-	E	-	-	E	-
26	K	31	H	E¶	H	E	-	-	E	-	-
27	K	26	H	E#	H	E	-	-	E	-	-
28	K	16	H	Eα	H	-	E	-	E	-	-
29	Er.	75	Erkek	H	E	E	-	-	E	-	-
30	K	57	H	E§	E	-	E	-	-	E	-
31	Er.	67	Erkek	H	H	-	E	-	-	E	-
32	Er.	59	Erkek	H	H	E	-	-	E	-	-
33	Er.	42	Erkek	E¶	E	-	E	-	E	-	-
34	K	21	H	E¶	E	-	E	-	E	-	-
35	Er.	49	Erkek	H	H	-	E	-	-	E	-
36	Er.	56	Erkek	Eα	H	-	E	-	E	-	-
37	K	31	H	H	H	-	E	-	E	-	-
38	K	48	H	E¶	H	E	-	-	-	E	-
39	K	50	H	E¶	H	E	-	-	E	-	-
40	K	25	H	E§	H	E	-	-	E	-	-
41	K	45	H	H	H	E	-	-	E	-	-
42	K	23	H	E§	H	E	-	-	-	E	-
43	K	47	H	H	H	E	-	-	-	E	-
44	Er.	20	Erkek	E¶	H	E	-	-	E	-	-
45	Er.	26	Erkek	H	H	E	-	-	E	-	-
46	K	35	H	H	H	E	-	E	E	-	-
47	K	46	H	H	H	-	E	-	E	-	-
48	Er.	49	Erkek	H	E	-	E	-	E	-	-
49	K	50	H	EΨ	H	E	-	-	E	-	-
50	K	24	H	H	H	-	E	-	E	-	-
51	Er.	49	Erkek	H	H	E	-	-	-	E	-
52	Er.	29	Erkek	H	H	E	-	E	E	-	-
53	K	48	H	H	H	E	-	-	E	-	-
54	K	33	H	H	H	E	-	-	E	-	-
55	K	49	H	H	H	E	-	-	E	-	-
56	K	18	H	Eζ	H	E	-	-	-	E	-



57	Er.	33	Erkek	Eç	H	E	-	-	E	-	-
58	K	35	H	Eş	H	E	-	-	E	-	-
59	K	35	E	H	H	E	-	-	-	E	-
60	Er.	55	Erkek	H	H	E	-	-	E	-	-
61	K	54	H	H	H	E	-	-	-	E	-

\*OK: Oral Kontraseptif kullanımı

FVL: Faktör V Leiden

DVT: Derin Ven Trombozu

PE : Pulmoner Emboli

E : Evet, H : Hayır, K : Kadın, Er.: Erkek

# : Hamilelik

§ : Doğum

¶ : Cerrahi Müdahale

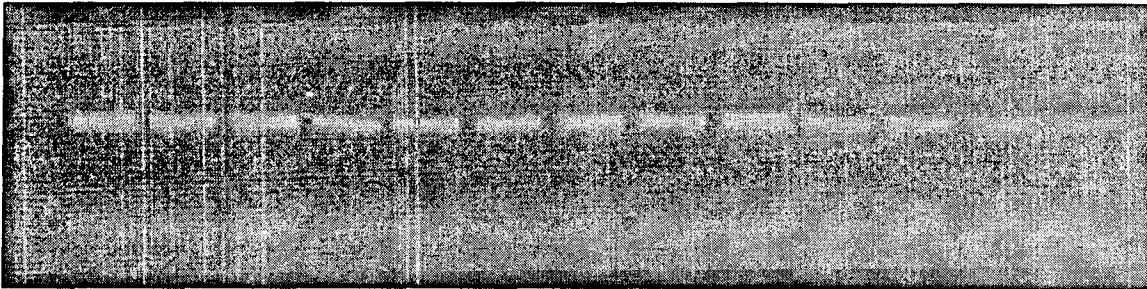
□ : Travma

∅ : İmmobilizasyon

Ψ : Ateşli silah yaralanması

ζ : Yılan Sokması

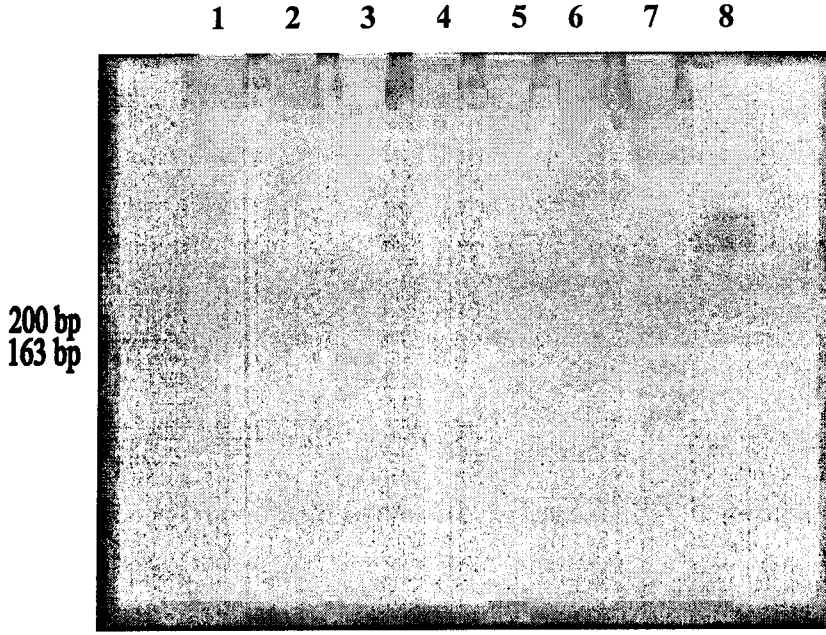
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



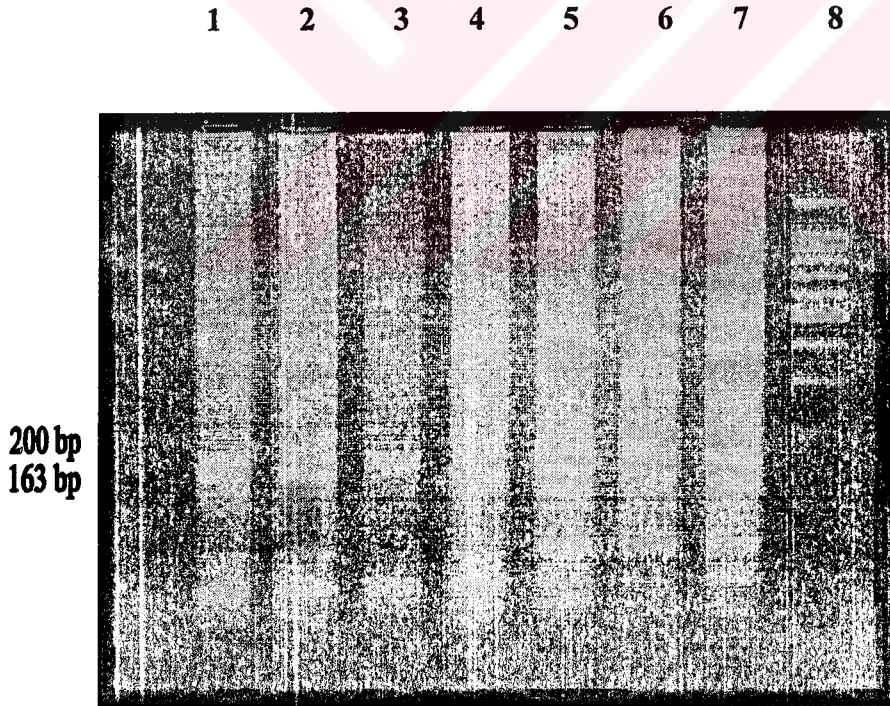
267 bp

Şekil 6. Faktör V geninin, mutasyon olan nükleotidi içeren 267 bp' lik bölümü amplifiye edildi.

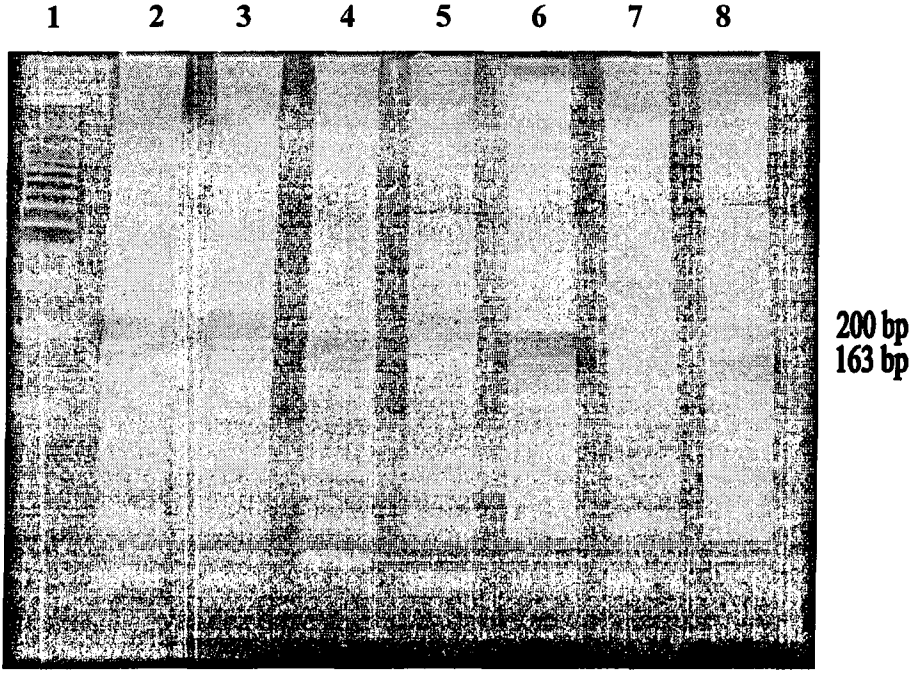
1. Markır (Step Ladder, 50 bp), 2-14. 267 bp' lik PCR ürünü.



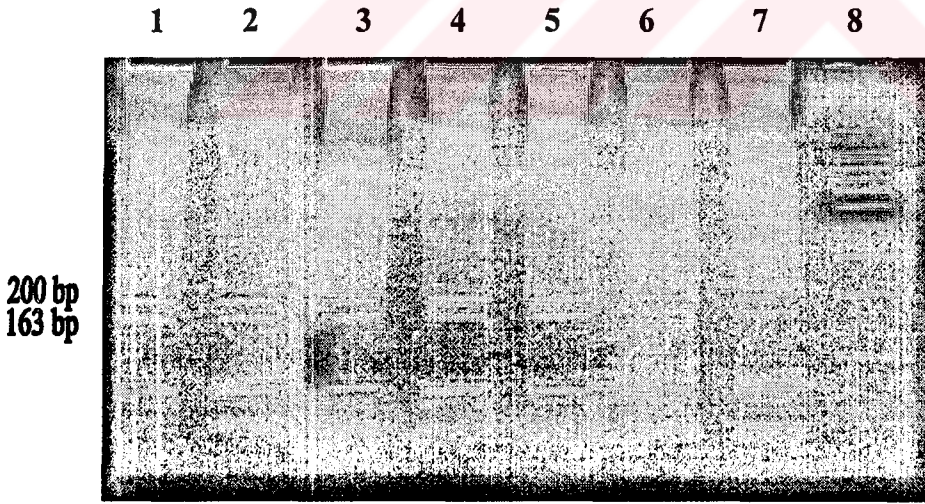
Şekil 7. Faktör V geninin 267 bp' lik fragmentinin Mnl 1 restriksiyon enzimi ile sindirimi. 1,4 – 7. Heterozigot genotip, 2. Homozigot genotip, 3. Normal genotip, 8. Markır (100 bp, DNA Ladder).



Şekil 8. Faktör V geninin 267 bp' lik fragmentinin Mnl 1 restriksiyon enzimi ile sindirimi. 1,3,5. Normal genotip, 2,6,7. Heterozigot genotip, 4. Homozigot genotip, 8. Markır (100 bp, DNA Ladder).

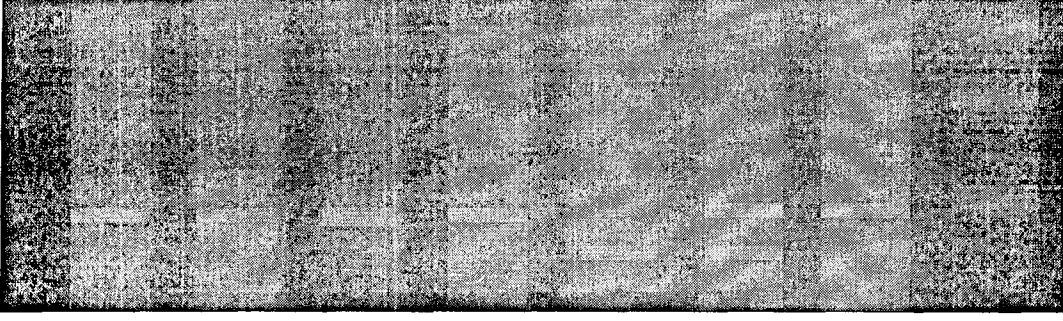


Şekil 9. Faktör V geninin 267 bp' lik fragmentinin Mnl 1 restriksiyon enzimi ile sindirimi. 1. Markır (100 bp, DNA Ladder), 2,3,7. Heterozigot genotip, 4,6,8. Normal genotip, 5. Homozigot genotip.

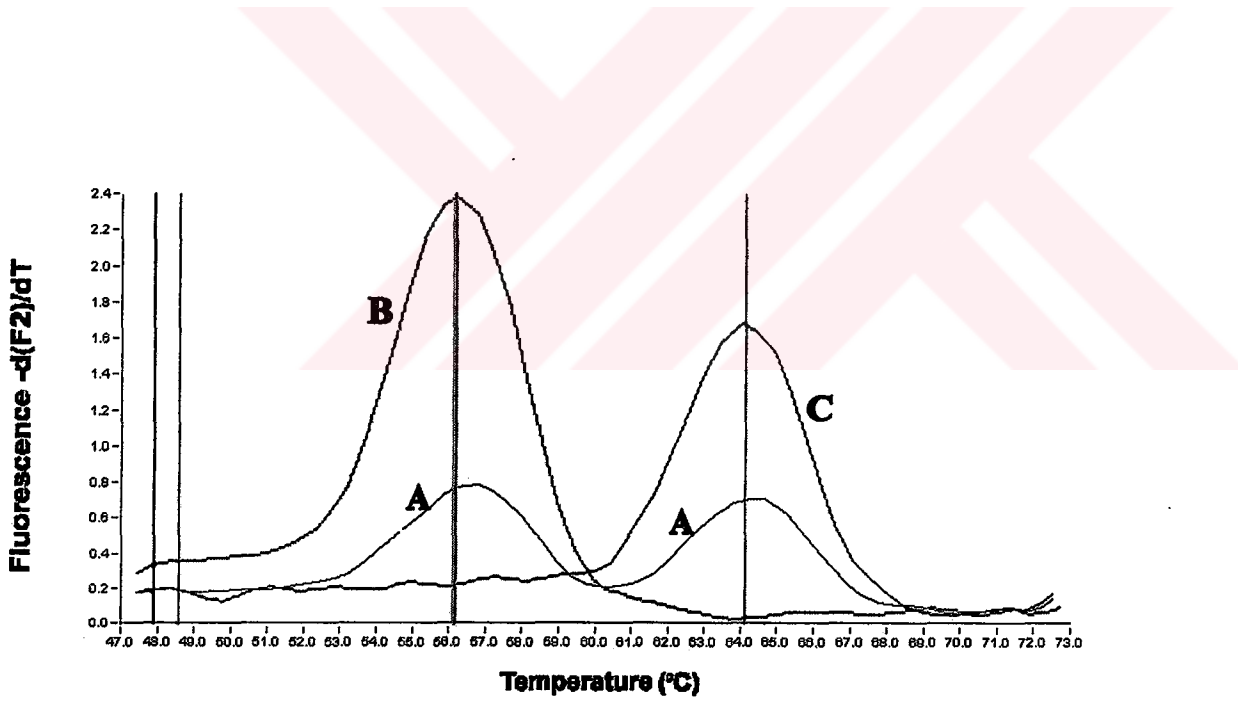


Şekil 10. Faktör V geninin 267 bp' lik fragmentinin Mnl 1 restriksiyon enzimi ile sindirimi. 1-7. Heterozigot genotip, 8. Markır (100 bp, DNA Ladder).

1 2 3 4 5 6 7 8



Şekil 11. Faktör V geninin 267 bp' lik PCR ürününün Mnl I restriksiyon enzimi ile sindirimi. 1-4,7. Homozigot genotip,5. Normal genotip, 6. Heterozigot genotip, 8. Markır (100 bp, DNA Ladder).



Şekil 12. Real time PCR ve floresan rezonans enerji tansferi (FRET) ile faktör V Leiden mutasyonunun hızlı tespiti. (A) Heterozigot genotip, (B) Homozigot genotip, (C) Normal genotip.

## TARTIŞMA :

Protein C sistemi, trombozu sınırlamak için önemli antikoagülant özellikler içermektedir. Protein C sisteminin stimülasyonu, endotel hücrelerinin yüzeyinde trombinin trombomoduline bağlanmasına bağlıdır. Protein C, vitamin K' ya bağımlı bir zimojendir, ve trombin – trombomodulin kompleksi tarafından bir serin proteaza aktive olur (23-26,85). Aktive protein C, protein S' nin varlığında selektif bir şekilde koagülasyon faktörleri Va ve VIII' yi inaktive eder (26-28,30,55,79,81,85). 1993 yılında, Dahlbäck ve meslektaşlarınca tanımlanan APC direncini, özellikle ailesel öyküsü olan venöz tromboembolizmi seçilmiş genç hastalarda, çeşitli gruplar da gösterdiler (6,19,27,33,43,74,84,91). Kısa bir süre sonra APC direncini oluşturan nedenin faktör V genindeki 1691. nükleotidteki G' nin yerine A' nin geçmesi ile oluşan faktör V Leiden ( Arg 506 Gln ) mutasyonunun olduğunu Bertina ve arkadaşları keşfettiler (6). Bu pozisyonda arjinin amino asidinin varlığı, aktive protein C tarafından faktor V' in proteolitik inaktivasyonu için temel teşkil etmektedir (61). Faktor V Leiden molekülü, APC tarafından inaktive olmaya dirençlidir; onların prokoagülant aktivitelerine engel olur ve böylece tromboza predispoze bir durum yaratır (23).

Önceleri, sadece protein S, protein C ve antitrombin III eksiklikleri gibi bilinen kalıtsal koagülasyon defektlerinin hiperkoagülasyona yol açtığı sanılmaktaydı (23). Heterozigot protein C eksikliğinin insidansı 1/200 –1/300 (48) olarak, Antitrombin III eksikliğinin frekansı da 1/2000 (23) olarak tespit edilmiştir. Yine antitrombin III eksikliğinin asemptomatik prevalansı 1/500 olarak Tait ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (75). Bununla birlikte; Conard ve arkadaşları, tromboz gelişen kadınlardaki antitrombin III eksikliği riskinin tahminen % 55 kadarını hamilelikle ilişkilendirmişlerdir (14). Bu proteinlerin eksiklikleri otozomal dominant olarak kalıtılır (23,43,67,74). Bu eksiklikler hiperkoagülasyonun nadir nedenleri olmasına rağmen, trombozlu hastalarda bu kalıtsal eksikliklerin araştırılması tavsiye edilmektedir.

APC direnci, venöz tromboza sahip hastalarda diğer bilinen kalıtsal antikoagülant proteinlerin herhangi birinin eksikliğinden, en azından 10 kez daha yaygın olarak görülür (38,48,74). Venöz trombozlu hastalar arasında tanımlanmış en yaygın bir defektir (3,27,33,43,74) ve otozomal bir kalıtım gösterir (43,74). Venöz trombozlu seçilmiş hastalar ( Kanser ile ilişkisi olmayan hastalardır ) arasında APC direncinin prevalansı % 20 ile % 60 arasında değişmektedir (6,27,33,74).

APC' ye zayıf cevabı bireylerde, DVT riski 7 kat artmaktadır (43), trombozlu hastalarda APC' ye zayıf cevabın prevalansı % 21 iken, sağlıklı kontrollerin de bu anormalliğin prevalansı % 5 olarak Koster ve arkadaşlarınca bildirilmiştir (43). APC direnci İsveç kontrol grubunda % 7 olarak belirlenmiştir (74). Faktör V Leiden mutasyonu, APC direnci ile ilişkilendirilmiş trombotik hadiseler için moleküler temeli teşkil eder (84).

Pıhtılaşma kofaktörü V ( Faktör V ), hemostazın regülasyonunda çeşitli kritik fonksiyonları olan yüksek moleküler ağırlıklı bir glikoproteindir(18,28). Aktive formu olan faktör Va, faktör Xa ve Ca<sup>++</sup> ile birlikte ve birbirlerini etkileyerek protrombinin trombine dönüşümünde rol oynar. Bu kompleks, trombosit yada diğer fosfolipid içeren yüzeylerin üzerinde bir araya gelerek, protrombinin trombine dönüşümünde faktör Xa' nın tek başına yaptığı katalizmeden 278.000 kez daha hızlı bir oranda gerçekleştirir (26,28,55,81). Yine faktör Va, endotel hücrelerin yüzeyinde ve fluid fazdaki trombin tarafından protein C'nin aktivasyonunda bir kofaktör olarak hizmet eder (28). Sonuç olarak, faktör V kan koagülasyonunda önemli bir regülatör rolü yerine getirmesi açısından son derece önemli fonksiyonlara sahip bir moleküldür (26,28).

APC direncinin nedeni olarak; vakaların % 90-95' inden fazlasında faktör V genindeki tek nokta mutasyonu gösterilmektedir (32). Faktör V Leiden mutasyonunun allel sıklığı ile ilgili başlangıç çalışmaları, Hollanda' da asemptomatik bireylerde gerçekleştirilmiştir (6). Bertina ve arkadaşları bu çalışmada mutasyonun allel sıklığını % 2 olarak tespit etmişlerdir. Benzer bir şekilde Beauchamp ve arkadaşları sağlıklı İngiliz popülasyonunda % 1.7 (5), Rees ve arkadaşları ise % 4 (58) oranında allel sıklığı bildirdiler. 1995 yılında Ridker ve arkadaşları, Kuzey Amerika' da predominant olan Caucasian popülasyonunda yaptıkları çalışmada ise allel sıklığı % 3 olarak saptadılar (61). Bu bulgular; faktör V genindeki Leiden mutasyonunun, Kuzey Amerika ve Avrupa Caucasian popülasyonunda en yaygın monojenik bozukluk olduğunu ortaya koydu (32).

Rees ve arkadaşları, venöz tromboembolizm için önemli risk faktörü olan faktör V Leiden' in varlığı için, 24 popülasyonda 1690 birey incelediler. Avrupalı 618 birey arasında allel sıklığı % 4.4 iken, en yüksek prevalansa % 7 ile Yunan popülasyonunda rastlanıldı (58). Asya Minor de allel sıklık % 0.6 iken, Afrika, Güney Asya, Avustralya ve Amerikalılardan elde edilen 1600 kromozomun hiç birinde faktör V Leiden mutasyonu bulunmadı (58). Gregg ve arkadaşları 1997 yılında, Amerikada bu mutasyonun sıklığını araştırmak için 602 sağlıklı bireyi

incelediler ve mutant allelin sıklığını % 1.65 ile en yüksek Hispanic Amerikalılarında, % 0.87 ile en düşük Afrika Amerikalılarında tespit ederken, Asya Amerikalıları ile Yerli Amerikalılarda ise bu mutasyonu bulamadılar (32). Bu çalışmalar, bu popülasyonlarda tromboembolik hastalıkların nadir olarak bulunabileceğini göstermektedir. Ayrıca Güney Orta Pensilvanya popülasyonunda ise mutasyonun sıklığı % 7.9 olarak saptandı (10). Faktör V Leiden allelinin genel popülasyondaki prevalansı % 3 ile % 9 arasında değişmektedir (5,37,43,54). Avrupalılarda saptanan bu yüksek prevalans sebebiyle, bu popülasyonda faktör V Leiden mutasyonunun araştırılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Venöz tromboz, Avrupalılarda önemli morbidite ve mortalite nedeni olan yaygın bir hastalıktır (58).

Muhtemelen son 100.000 yıl içinde ilk Avrupalılar arasında tek bir nokta mutasyonu olarak ortaya çıkan faktör V Leiden mutasyonunun, Avrupa civarı ile merkezlenen popülasyonda bulunulduğuna şimdilerde inanılmaktadır (17,59,89). Faktör V Leiden Hindistan Yarımadasında ( Allel sıklığı % 1.2 (58)) nispeten yaygın değildir ve Avrupalıların göçü nedeniyle, bu popülasyonda mutasyon ortaya çıkmış olabilir (59). Dağıstan' da faktör V Leiden prevalansı yüksek bulunmuştur ( Allel sıklığı % 4.5 (58)). Avrupa' da saptanan prevalansa benzerlik göstermektedir. Mutasyonun Güney Doğu Avrupa / Batı Asya orjinli olduğu tahmin edilmektedir (59). Ko ve arkadaşları Çin popülasyonunda mutasyonu % 0.1 olarak tespit ettiler (41). 1997 yılında Chaa ve arkadaşları, Hong Kong' taki Çinli popülasyonda Arg 506 Gln mutasyonunun nadir olarak bulunduğunu bildirirken, faktör V geninin 7. eksonunda Arg 306 Gly yer değişikliği ile sonuçlanan, ancak APC direnci ile ilişkisi bulunmayan farklı bir mutasyonun varlığını duyurdular (12). Yine Cox ve arkadaşları, faktör V geninin 13. eksonunda dört farklı polimorfizm saptadılar (2298-T/C, 2325-C/T, 2391-G/A ve 2833-A/T) (17,59). Faktör V genindeki intronik bölgelerin direkt dizi analizleri yapılarak, biri intron 9' da diğeri ise intron 16'da olan iki yeni polimorfizm tanımlandı. İtron 9' da ki polimorfizm Leiden mutasyonu için tanımlanan bölgeye çok yakındı (11). Son zamanlarda da, faktör V geninde (Aktive kofaktörde ikinci APC direnç kısım aralığı) arjinin 306' da (Arg 306 Thr , faktör V Cambridge ) bir mutasyonun olduğundan bahsedilmektedir. APC direnci ile ilgili olan bu mutasyonun çok nadir görüldüğü bildirilmektedir (86).

Faktör V Leiden mutasyonunun Türk popülasyonundaki insidansı ile ilgili olarak bir çok araştırma yapılmıştır. Özbek ve arkadaşlarının 120 sağlıklı kan dönörü ile yaptıkları çalışmada, bireylerin % 9.16' sının bu mutasyonu taşıdığı belirlendi (54). Gürgey ve arkadaşları da 81 sağlıklı kişide araştırmalarını gerçekleştirerek, prevalansı % 7.1 olarak saptarken, 16 trombozlu

çocuğun 8' inde de faktör V Leiden mutasyonunu tanımladılar (36). Türkiye' nin güneyinde mutasyonun sıklığını araştırmak için Kurt ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da allel sıklığını % 4.9 olarak buldular (44). Bu sonuçlar, Avrupa popülasyonlarındaki prevalansla uyumludur.

Faktör V Leiden mutasyonu, tromboza predispozisyon yaratan şimdiye kadar bilinen en yaygın defektir ve bu nedenle bireysel yada ailesel tromboz öyküsü bulunan kişilerde bu mutasyonun araştırılması çok önemlidir (23). Bireysel yada ailesel tromboz öykünün mevcudiyetinde bu mutasyonun taşıyıcı oranı % 20 ile % 60 arasında olduğu tahmin edilmektedir (74). Koeleman ve arkadaşları, protein C mutasyonu ile faktör V Leiden mutasyonunu birlikte taşıyan bireyler ile, bu defektlerden sadece birini taşıyan bireyleri karşılaştırarak, iki defekti bir arada bulunduran bireylerde tromboz riskinin daha çok arttığını gösterdiler (42).

Bu moleküler defekt için heterozigot olan çok sayıda birey tanımlanmasına rağmen az sayıda homozigot taşıyıcı saptanmıştır (6,31,72,84,91). Ancak homozigot bireylerde tromboz riski, heterozigot bireylere oranla daha yüksek bulundu. Bu sonuç, ilk kez tromboza maruz kalmış homozigot genç hastalarda rapor edildi (65).

Vandenbroucke ve arkadaşları, oral kontraseptif kullanan kadınlar arasında yaptıkları incelemeler sonucunda bu kişilerde tromboz riskinin 4 misli arttığını gösterdiler (31,62,65,84). Faktör V Leiden mutasyonu taşıyanlar ile taşımayanlar arasında tromboz riski karşılaştırıldığında, mutasyonu taşıyanlarda risk 8 kat artmıştır. Oral kontraseptif kullanmayan ve mutasyonu taşımayan kadınlarla, oral kontraseptif kullanan ve mutasyonu taşıyan kadınlar karşılaştırıldığında ise oral kontraseptif kullanan ve mutasyonu taşıyan kadınlarda tromboz riski 30 kat daha fazla olarak bulundu (84).

Hamilelik ile ilgili venöz tromboembolizmin 2000 ya da 1000 doğumda bir sıklıkta görülebileceği tahmin edilmektedir (29). Hamilelik sırasında, pıhtılaşma faktörlerinden faktör I, VII, VIII ve X' da artış, protein S' de bir azalma ve fibrinolizin inhibisyonundan oluşan bir takım protrombotik olaylar cerayan etmektedir. Muhtemelen, bu fenomen venöz tromboz riskini 5 kat artırmada bu dönemde katkı sağlayacaktır. Özellikle antitrombin, protein C ve protein S'nin kalıtsal eksikliğine sahip kadınlarda, gebelik döneminde ve doğum sonrasında venöz tromboz riskinin arttığı bildirilmiştir (14). Genel obstetrik popülasyonda Leiden mutasyonunun



sıklığı % 3 olarak bulunduğu için hamilelik esnasında tromboz hadisesi olan kadınlarda bu mutasyonun genetik testlerle araştırmak gerekliliği ortaya çıktı (23). Grandone ve arkadaşları , Güney İtalya da 42 hasta ve 212 kontrol grubunda yaptıkları araştırmada; faktör V Leiden mutasyonunu hasta grubunda % 23.8, kontrol grubunda ise % 1.9 olarak heterozigot taşıyıcılığı tespit ettiler (29). Nedeni bilinmeyen tekrarlayan abortus vakalarında bu mutasyonun rol oynadığı düşünülmektedir. Ridker ve arkadaşları, bu vakalarda mutasyonun prevalansını 2.2 kat artmış olduğunu gösterdiler (63).

İdiopatik venöz tromboembolizm öykülü 77 erkek hastada yapılan araştırma neticesinde; faktör V Leiden mutasyonunun tekrarlayan tromboz riskini 4-5 kat artırdığını gösterdi (62). Bu hastalara uzun süre antikoagülant tedavi verildiği için mutasyonun araştırılması önemli bulundu (62).

Venöz tromboz yılda 1/1000 oranında görülür (64). Kabaca belirtmek gerekirse yılda, 40 yaşından daha genç olan 10.000 kişiden 1 kişide ve 75 yaşından daha yaşlı olan 100 kişiden ise 1 kişide tromboz görülmektedir (64). Tromboz riskinin yaşa bağımlı olarak niçin arttığı tam olarak açık olmamasına rağmen; sebebin morbidite artışı, kas tonusunun azalması ve mobilite azalmasının bir kombinasyonu olduğu tahmin edilmektedir (40,64,81). Genel popülasyonda tromboembolik olayların insidansı yaş ile artma eğilimi gösterir. Kalıtsal trombofilialı kişilerde bile hastalığın ortaya çıkışı 30' lu 40' lı yaşlara rastlar, çocukluk çağlarında çok nadirdir, hatta pek görülmez (23,37). Ridker ve arkadaşları görünürde sağlıklı olan erkeklerde, DVT' nun ilk olarak görüldüğü yaşı 63.2 olarak hesapladılar (61). Yetmiş yaşında ya da daha ileri yaşlardaki Leiden mutasyonlu erkekler arasında venöz tromboembolizmin insidans oranı, aynı yaş grubundaki mutasyonsuz erkeklere nazaran önemli bir miktarda yüksek bulundu. Halbuki, 50 yaşından daha genç erkeklerde ki insidans oranı mutasyonu taşıyanlar ile taşımayanlar arasında hemen hemen benzer bulundu (60). Yetişkinlerde kalıtsal protrombotik şartların rolü iyi tesis edilmiştir, çocuklarda ise trombotik hastalıklar oldukça nadir olarak bulunur (37).

Zenz ve arkadaşlarının verilerine göre; akut strok bulunan çocuklarda faktör V Leiden mutasyonu risk oluştururken, protrombin gen mutasyonu ise bu gruptaki çocuklarda, görünürde, risk faktörü oluşturmaz (88).

Akut ya da subakut serebral semptomlara sahip ve özellikle ailesel ya da bireysel venöz tromboembolizm öyküsü olan genç hastalarda kalıtsal protein C eksikliği mutlaka

düşünülmelidir (78,87). Serebral venöz tromboz vakalarının % 10 ile % 20' sinde faktör V Leiden mutasyonu mevcuttur (22).

Heijmans ve arkadaşları 1998 yılında, faktör V Leiden heterozigot taşıyıcılığın popülasyon mortalitesini etkilemediğini rapor ettiler. Mutasyonu taşıyanlar ile taşımayanlar arasında ölüm oranları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmediği gibi her iki cinsiyette de oran birbirinden farklı değildi. Yine mutasyonu taşıyan ve sigara içenler ile sigara içmeyen taşıyıcılar arasında kardiyovasküler hastalıktan dolayı ölüm riski yaklaşık olarak benzer bulundu (39). Amerika' da yılda 50.000-100.000 ölümün birincil nedeni olarak pulmoner emboli gösterilmektedir. Diğer ölümlerin 1000' inin 10' unda da esas ölüm nedenine katkıda bulunmaktadır (61).

Çalışmamızda, Güney Doğu Anadolu Bölgesinde sağlıklı popülasyonda APC direncinin sıklığını %10.6 olarak saptarken, APC direnci oluşturan faktör V Leiden ( G 1691 A, R 506 Q ) mutasyonunun sıklığını ise % 9.0 olarak belirledik. DVT' lu olgularda da faktör V Leiden mutasyonunun sıklığını % 24.5 olarak bulduk. Daha önce Türk popülasyonunda yapılan çalışmalarda, APC direnci oluşturan faktör V R506Q mutasyonunun sağlıklı bireylerde ve trombozlu olgularda sıklığının sırasıyla % 4-9 ile % 20-30 arasında olduğu belirlenmişti ve bizim sonuçlarımızla da uyumludur. Sonuç olarak, Güney Doğu Anadolu bölgesindeki sağlıklı popülasyonda ve DVT' lu olgularda faktör V Leiden sıklığı yurt içi ve yurt dışında bildirilen oranlara benzer olduğu saptandı.

Faktör V gen mutasyonunu gösteren PCR-RFLP yöntemi ile eş zamanlı olarak APC sensitivite oranının saptanması ve bu şekilde direncin belirtilmesi, özellikle edinsel APC direncinin ortaya konması yönünden yararlı olacaktır.

## Ö Z E T :

Aktive protein C direnci (APC-R), son zamanlarda venöz tromboz gelişiminde en yaygın kalıtsal risk faktörü olarak tanımlanmaktadır. APC direnci vakalarının % 90' nından fazlasında faktör V genindeki tek nokta mutasyonu (1691. nükleotiddeki G' nin yerine A' nın geçişi ) neden olmaktadır; APC aralık kısmında arjininin (R)506 ile glutaminin (Q) yer değiştirmesi ile oluştuğu tahmin edilmektedir. Faktör V Leiden (FVL) mutasyonu venöz tromboembolizm riskini 7 kat artırmaktadır.

Güney Doğu Anadolu Bölgesi'nde FVL prevalansını belirlemek amacıyla çalışmamıza, Eylül 1999 ile Ekim 2000 tarihleri arasında, farklı yaş ve cinsiyette 320 sağlıklı birey ve 61 Derin Ven Trombozlu (DVT) hasta, toplam 381 birey aldık. APC direnci, 320 sağlıklı kontrolde ölçülerek; 34 APC-R pozitif (% 10.6) bulundu. FVL genotipi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve restriksiyon analizi ile belirlendi. Sonuçlar, real time PCR ve floresan rezonans enerji transfer (FRET) içeren hızlı bir metod ile teyit edildi.

FVL mutasyonunun sıklığı DVT' li hastalarda % 24.5 (15 / 61), sağlıklı bireylerde ise % 9 (29 / 320)' du. FVL mutasyonu olmaksızın APC direncinin pozitif olması, faktör V molekülündeki farklı bir mutasyondan kaynaklandığını düşündürdü.

Sonuç olarak, Güney Doğu Anadolu Bölgesi' nde, FVL mutasyonunun DVT vakalarında yaygın olarak bulunduğunu bu çalışmamız ortaya koymaktadır.

## S U M M A R Y :

Resistance to activated protein C (APC) has recently been identified as the most common inherited risk factor in the development of venous thrombosis. APC resistance in more than 90 % of cases is caused by a single point mutation in the gene for factor V (G to A transition at nucleotide position 1691), which predicts the replacement of arginine (R) 506 in the APC cleavage site with a glutamine (Q). The factor V Leiden mutation (FVL) leads to a seven fold increased risk of venous thromboembolism.

From September, 1999, to October, 2000, a total of 381 individuals, including 320 healthy subjects and 61 patients with Deep Vein Thrombosis (DVT), different in age and sex, were consecutively entered into our study to determine the prevalence of FVL in the population of the Southeastern Anatolia Region. APC resistance was also measured in 320 healthy subjects; 34 of them had an APC-R positive (10.6 %). The FVL genotypes were identified by a polymerase chain reaction and restriction analysis. The results were confirmed with a rapid method based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) and real time polymerase chain reaction.

The frequencies of fVL mutation were 24.5 % (15 / 61) in patients with DVT and 9 % (29 / 320) in healthy persons. APC-R without the FVL expression suggest a different type of mutation in the Factor V molecule.

In conclusion; we suggest that factor V Leiden mutation is common in the population of the Southeastern Anatolia Region in DVT.

## KAYNAKLAR

1. Akar, N.: Klinik Moleküler Patoloji' ye Giriş, Antıp A.Ş., Ankara, 1999, 154-206.
2. Aksoy, K., Kayrın, L., Tuli, A., Attila, G., İnal, T., C., Yalın, E.: Tanıda DNA Teknikleri. Adana, 2000.
3. Allaart, C., F., Poort, S., R., Rosendaal, F., R., Reitsma, P., H., Bertina, R., M., Briet, E.: Increased risk of venous thrombosis in carriers of hereditary protein C deficiency defect. *The Lancet*, 341:134-138, 1993.
4. Ambruso, D., R., Leonard, B., D., Bies, R., D., Jacobson, L., Hathaway, W., E. and Reeve, E., B.: Antithrombin III deficiency: Decreased synthesis of a biochemically normal molecule. *Blood*, 60:78-83, 1982.
5. Beauchamp, N., J., Daly, M., E., Cooper, P., C., Preston, F., E., Peake, I., R.: Rapid two-stage PCR for detecting factor V G1691A mutation. *The Lancet*, 344:694-695, 1994.
6. Bertina, R., M., Koeleman, B., P., C., Koster, T., Rosendaal, F., R., Dirven, J., R., Ronde, H., van der Velden, P., A., Reitsma, P., H.: Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*, 369:64-67, 1994.
7. Bovill, E., G., Bauer, K., A., Dickerman, J., d., Callas, P. and West, B.: The clinical spectrum of heterozygous protein C deficiency in a large New England Kindred. *Blood*, 73:712-717, 1989.
8. Branson, H., E., Katz, J., Marble, R., Griffin, J., H.: Inherited protein C deficiency and Coumarin-responsive chronic relapsing Purpura Fulminans in a newborn infant. *The Lancet*, 19:1165-1168, 1983.
9. Broekmans, A., W., Veltekamp, J., J. and Bertina, R., M.: Congenital protein C deficiency and venous thromboembolism. *The New England Journal of Medicine*, 309:340-344, 1983.

10. Burick, A., Wisotzkey, J., D., Najarian, M., P., Monk, J., S., Rhoads, J., E.: The role of preoperative factor V Leiden screening in different geographic populations. *The American Surgeon*, 63:547-550, 1997.
11. Castoldi, E., Lunghi, B., Mingozzi, F., Ioannau, P., Marchetti, G., Bernardi, F.: New coagulation factor V gene polymorphisms define a single and infrequent haplotype underlying the factor V Leiden mutation in Mediterranean populations and Indians. *Thrombosis and Haemostasis*, 78:1037-1041, 1997.
12. Chaa, W., P., Lee, C., K., Kwong, Y., L., Lam, C., K. and Liang, R.: A novel mutation of Arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese. *Blood*, 4:1135-1139, 1998.
13. Comp, P., C., Doray, D., Patton, D. and Esmon, C., T.: An abnormal plasma distribution of protein S occurs in functional protein S deficiency. *Blood*, 67:504-508, 1986.
14. Conard, J., Bauer, K., A., Gruber, A., Griffin, J., H., Schwarz, H., P., Horellou, M., H., Samama, M., M., Rosenberg, R., D.: Normalization of markers of coagulation activation with a purified protein C concentrate in adults with homozygous protein C deficiency. *Blood*, 82:1159-1164, 1993.
15. Corral, J., Iñiesta, J., A., Conejero, R., G., Vicente, V.: Detection of factor V Leiden from a drop of blood by PCR-SSCP. *Thrombosis and Haemostasis*, 76(5):735-737, 1996.
16. Cotran, R., S., Kumar, V., Robbins, S., I.: *Pathologic Basis of Disease*, 5. Th Edition, W. B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, 1994, 99-110.
17. Cox, M., J., Rees, D., C., Martinson, J., J., Clegg, J., B.: Evidence for a single origin of factor V Leiden. *British Journal of Haematology*, 92:1022-1025, 1996.
18. Cripe, L., D., Moore, K., D., and Kane, W., H.: Structure of the gene for human coagulation factor V. *Biochemistry*, 31:3777-3785, 1992.

19. Dahlbäck, B., Malm, J.: Some remarks on the epidemiology of thrombotic disorders-rebuttal to the letter of Drs. F. Rodeghiero and A. Tosetto. *Thrombosis and Haemostasis*, 69:529,1993.
20. Dean, M.: Resolving DNA mutations. *Nature Genetics*, 9:103-104,1995.
21. Demers, C., Ginsberg, J., S., Hirsh, J., Henderson, P. and Blajchman, M., A.: Thrombosis in antithrombin III deficient persons. *Annals of Internal Medicine*, 116:754-761,1992.
22. Derex, L., Philippeau, F., Nighoghossian, N., Ttoullas, P.: Postpartum cerebral venous thrombosis, congenital protein C deficiency, and activated protein C resistance due to heterozygous factor V Leiden mutation. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 65:801-802,1998.
23. Dizon-Townson, S., D., Nelson, L., M., Jang, H., Varner, M., W., Ward, K.: The incidence of the factor V Leiden mutation in an obstetric population and its relationship to deep vein thrombosis. *Am. J. Obstet Gynecol.*, 176:883-886,1997.
24. Esmon, C., T., Fukudome, K., Mather, T., Bode, W., Regan, L., M., Kurosawa, D.,J.,S., Kurosawa, S.: Inflammation, sepsis, and coagulation. *Haematologica*, 84:254-259,1999.
25. Esmon, C., T., Gu, J., Xu, J., Qu, D., Kurosawa, D., J., S., Kurosawa, S.: Regulation and functions of the protein C anticoagulant pathway. *Haematologica*, 84:363-368,1999.
26. Esmon, C., T.: Protein-C:Biochemistry, physiology, and clinical implications. *Blood*, 62:1155-1158,1983.
27. Faioni, E., M., Franchi, F., Asti, D., Sacchi, E., Bernardi, F., Mannucci, P., M.: Resistance to activated protein C in nine thrombophilic families: interference in a protein S functional assay. *Thrombosis and Haemostasis*, 70(6):1067-1071,1993. Gewirtz, A., M., Keefer, M., Doshi, K., Annamalai, A.,E., Chiu, H., C. and Colman, R., W.: Biology of human megakaryocyte factor V. *Blood*, 67:1639-1648,1986.
28. Gewirtz, A., M., Keefer, M., Doshi, K., Annamalai, A., E., Chiu, H., C. and Colman, R., W.: Biology of human megakaryocyte factor V. *Blood*, 67: 1639-1648,1986.

29. Grandone, E., Margaglione, M., Colaizzo, D., D'Andrea, G., Cappucci, G., Brancaccio, V., Di Minno, G.: Genetic susceptibility to pregnancy-related venous thromboembolism: Roles of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 179:1324-1328,1998.
30. Greengard, J., S., Eighinger, S., Griffin, J., H., and Bauer, K., A.: Brief report: Variability of thrombosis among homozygous siblings with resistance to activated protein C due to an Arg→Gln mutation in the gene for factor V. *The New England Journal of Medicine*, 331:1559-1562,1994.
31. Greengard, J., S., Sun, X., Xu, X., Fernandez, J., A., Griffin, J., H., Evatt, B.: Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. *The Lancet*, 343:1361-1362,1994.
32. Gregg, J., P., Yamane, A., J., and Grody, W., W.: Prevalence of the factor V Leiden mutations in four distinct American ethnic populations. *American Journal of Medical Genetics*,73:334-336,1997.
33. Griffin, J., H., Evatt, B., Wideman, C. and Fernandez, J., A.: Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood*, 82:1989-1993,1993.
34. Grompe, M.: The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genetics*, 5:111-117.1993.
35. Guyton, A., C., Hall, J., E.: *Textbook of Medical Physiology*, ninth edition, W. B. Saunders, Pennsylvania, 1996,463-473.
36. Gürgey, A., Mesci, L.: The prevalence of factor V Leiden (1691G→A) mutation in Turkey. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 39:313-315,1997.
37. Hagstrom, J., N., Walter, J., Langner, R., B., Amatniek, J., C., Manno, C., S., High, K., A.: Prevalence of the factor V Leiden mutation in children and neonates with thromboembolic disease. *The Journal of Pediatrics*, 133:771-781,1998.



38. Heijboer, H., Brandjes, D., P., M., Büller, H., R., Sturk, A., Cate, J., W., T.: Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-vein thrombosis. *The New England Journal of Medicine*, 323:1512-1516,1990.
39. Heijmans, B., T., Westendorp, R., G., J., Knook, D.,L., Kluft, C., Slagboom, P.,E.: The risk of mortality and the factor V Leiden mutation in a population- based cohort. *Thrombosis and Haemostasis*, 80:607-609,1998.
40. Hoffman, R., Bauer, K., A., et al: *Haematology*, Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000,2009-2033.
41. Ko, Y., Hsu, T., Wu, S.,Ko, Y., Chang, C., Wang, S., Chen, W., Cheng, N., Kuo, C., Chiang, C., Lee, Y.: The G1691A mutation of the coagulation factor V gene (factor V Leiden) is rare in Chinese: an analysis of 618 individuals. *Human Genetic*, 98:176-177,1996.
42. Koeleman, B., P., C., Reitsma, P., H., Allaart, C., F., and Bertina, R., M.: Activated protein C resistance as an additional risk factor for thrombosis in protein C-deficient families. *Blood*, 84:1031-1035,1994.
43. Koster, T., Rosendaal, F., R., Ronde, H., Briët, E., Vanderbroucke, J., P., Bertina, R., M.: Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *The Lancet*, 342:1503-1506,1993.
44. Kurt, C., Tanrıverdi, K., Koçak, R.: The frequency of factor V Leiden southern of Turkey. *Annals of Medical Sciences*, 8:56-57,1999.
45. Lay, M., J., and Wittwer, C., T.: Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clinical Chemistry*, 43(12): 2262-2267,1997.
46. McPherson, M., J., Hames, B., D., Taylor, G., R.: *PCR 2 A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1995,1-22.

47. Meade, T., W., Dyer, S., Howarth, D., J., Imeson, J., D. and Stirling, Y.: Antithrombin III and procoagulant activity: Sex differences and effects of the menopause. *British Journal of Haematology*, 74:77-81,1990.
48. Miletich, J., Sherman, L., and Broze, G.: Sence of thrombosis in subjects with hetetozygous protein C deficiency. *The New England Journal of Medicine*, 317:991-996,1987.
49. Nauch, M., März, W., and Wieland, H.: Evaluation of the Roche Diagnostics LightCycler-Factor V Leiden Mutation Detection Kit and the LightCycler-Prothrombin Mutation Detection Kit. *Clinical Biochemistry*,33(3): 213-216,2000.
50. Neoh, S., H., Brisco, M., J., Firgaira, F., A., Trainor, K., J., Turner, D., R., Morley, A., A.: Rapid detection of the factor V Leiden (1691G>A) and haemochromatosis (845G>A) mutation by fluorecence resonance energy transfer (FRET) and real time PCR. *Journal of Clinical Pathology*, 52:766-769.1999.
51. Newton, C., R., Rickwood, D., Hames, B., D. : PCR Essential Data, John Wiley & Sons, Chichester, 1995, 73-127.
52. Nowak-Göttl, U., Koch, H., G., Aschka, I., Kohlhase, B., Vielhaber, H., Kurlemann, G., Oleszcuk-Raschke, K., Kehl, H., G., Jürgens, H., and Schneppenheim, R.: Resistance to activated protein C (APCR) in children with venous or arterial thromboembolism. *British Journal of Haematology*, 92:992-998,1996.
53. Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., and Sekiya, T.: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:2766-2770,1989.
54. Özbek, U., Tangün, Y.: Frequency of factor V Leiden in Turkey. *International Journal of Hematology*, 64:291-292,1996.
55. Perry, D., J., Pasi, K., j.: Hemostasis and Thrombosis Protocols, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey,1999, 3-21, 275-285.

56. Poort, S., R., Rosendaal, F., R., Reitsma, P., H. and Bertina, R., M.: A common genetic variation in the 3' -Untranslated Region of the Prothrombin Gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis, *Blood*, 88:3698-3703, 1996.
57. Quehenberger, P., Handler, S., Mannhalter, C., Kyrle, P., A., and Speiser, W.: The factor V (Leiden) test: Evaluation of an assay based on dilute russell viper venom time for the detection of the factor V Leiden mutation. *Thrombosis Research*, 96:125-133,1999.
58. Rees, D., C., Cox, M., Clegg, J., B.: World distribution of factor V Leiden. *The Lancet*, 346:1133-1134,1995.
59. Rees, D., C., Clarke, K., Martin, P., G., Keeling, D., M.: Factor V Leiden haplotypes in two homozygotes of Asian origin. *British Journal of Haematology*, 102:1380-1385,1998.
60. Ridker, P., M., Glynn, R., J., Miletich, J., P., Goldhaber, S., Z., Stampfer, M., J. and Hennekens, C., H.: Age-specific incidence rates of venous thromboembolism among heterozygous carriers of factor V Leiden mutation. *Annals of Internal Medicine*, 126:528-531,1997.
61. Ridker, P.,M., Hennekens, C., H., Lindpaintner, K., Stampfer, M., J., Eisenberg, P., R., Miletich, J., P.: Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *The New England Journal of Medicine*, 332:912-917,1995.
62. Ridker, P., M., Miletich, J.,P., Stampfer, M.,J., Goldhaber, S.,Z., Lindpainter, K., Hennekens,C., H.: Factor V Leiden and risks of recurrent idiopathic venous Thromboembolism. *Circulation*, 92:2800-2802,1995.
63. Ridker, P., M., Miletich, J., P., Buring, J., E., Ariyo, A., A., Price, D., T., Manson, J., E., Hill, J., A.: Factor V Leiden mutation as a risk factor for recurrent pregnancy loss. *Annals of Internal Medicine*, 128:1000-1003,1998.

64. Rosendaal, F., R.: Risk factors for venous thrombotic disease. *Thrombosis and Haemostasis*, 82(2):610-619,1999.
65. Rosendaal, F.,R., Koster, T., Vandenbroucke, J., P., Reitsma, P., H.: High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (Activated protein C resistance). *Blood*, 85:1504-1508,1995.
66. Sanguinetti, C., J., Neto, E., D.,Simpson, A., J., G.: Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques*, 17:915-915,1994.
67. Seligsohn, U., Berger, A., Abend, M., Rubin, L., Attias, D., Zivelin, A., Rapaport, S., I.: Homozygous protein C deficiency manifested by massive venous thrombosis in the newborn. *The New England Journal of Medicine*, 310:559-562,1984.
68. Sheffield, V.,C., Beck, J., S., Kwitek, A., E., Sandstrom, D.,W., and Stone, E.,M.: The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*, 16:325-332,1993.
69. Solak, M., Bağcı, H., Şengil, A., Z., Öztaş, S.: Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA Teknolojisi, Teknik Hazırlık Baskı, Ankara, 2000,117-137.
70. Solymoss, S.: Factor V Leiden: Who should be tested? *Canadian Medical Association*, 155(3):296-298,1996.
71. Souto, J., C., Coll, I., Llobet, D., del Rio, E., Oliver, A., Mateo, j., Borrell, M., Fontcuberta, j.: The Prothrombin 20210A allele is the most prevalent genetic risk factor for venous thromboembolism in the Spanish population. *Thrombosis Haemostasis*, 80:366-369,1998.
72. Spinardi, L., Mazars, R., and Theillet, C.: Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Research*, 19(14):4009,1991.
73. Sun, X., Evatt, B., and Griffin, J.,H.: Blood coagulation factor Va abnormality associated with resistance to activated protein C in venous thrombophilia. *Blood*,83:3120-3125,1994.

74. Svensson, P., J., and Dahlbäck, B.: Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *The New England Journal of Medicine*, 330(8):517-522,1994.
75. Tait, R., C., Walker, I., D., Davidson, J., F., Islam, S., I., A. and Mitchell, R.: Antithrombin I activity in healthy blood donors: Age and sex related changes and the prevalence of asymptomatic deficiency. *British Journal of Haematology*, 75:141-142,1990.
76. Tangün, Y., Aydınok, Y., Demirkan, F., Kavaklı, K., Köroğlu, A., Omay, S., B., Özsan, H., Tombuloğlu, M. ve Ündar, B.: Hematoloji Birinci Basamak Kursu Eğitim Kitabı. Türk Hematoloji Derneği, İzmir,2000,61-91.
77. Temizkan, G., Arda, N.: Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitabevleri,1999,57-67.
78. van der Bom, J., G., Bots, M., L., Haverkate, F., Slagboom, P., E., Meijer, P., de Jong, P., T., V., M., Hofman, A., Grobbee, D., E. and Kluft, C.: Reduced response to activated protein C is associated with increased risk for cerebrovascular disease. *Annals of Internal Medicine*, 125:265-269,1996.
79. van Hinsbergh, V., W., M., Bertina, R., M., van Wijngaarden, A., van Tilburg, N., H., Emeis, J., J., and Haverkate, F.: Activated protein C decreases plasminogen activator-inhibitor activity in endothelial cell-conditioned medium. *Blood*, 65(2):444-451,1985.
80. Vandenbroucke, J., P., Koster, T., Briët, E., Reitsma, P., H., Bertina, R., M., Rosendaal, F., R.: Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *The Lancet*, 344:1453-1457,1994.
81. Verstraete, M., Fuster, V. and Topol, E., J.: Cardiovascular Thrombosis: Thrombocardiology and Thromboneurology, Second Edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1998, 59-75.
82. Vidal-Puig, A., and Moller, D., E.: Comparative sensitivity of alternative single-strand conformation polymorphism (SSCP) methods. *BioTechniques*, 17(3):490-496,1994.

83. von Ahsen, N., Schütz, E., Armstrong, V., W., and Oellerich, M.: Rapid detection of prothrombotic mutations of Prothrombin (G20210A), Factor V (G1691A), and Methylenetetrahydrofolate Reductase (C677T) by Real-Time Fluorescence PCR with the LightCycler. *Clinical Chemistry*, 45(5): 694-696, 1999.
84. Voorberg, J., Roelse, J., Koopman, R., Büller, H., Berends, F., ten Cate, J., W., Mertens, K., van Mourik, J., A.: Association of idiopathic venous thromboembolism with single point-mutation at Arg506 of factor V. *The Lancet*, 343:1535-1536, 1994.
85. Walker, F., J., and Fay, P., J.: Regulation of blood coagulation by the protein C system. *The FASEB Journal*, 6: 2561-2567, 1992.
86. Williamson, D., Brown, K., Luddington, R., Baglin, C. and Baglin, T.: Factor V Cambridge: A new mutation ( Arg 306 Thr ) associated with resistance to activated protein C. *Blood*, 91:1140-1144, 1998.
87. Wintzen, A., R., Broekmans, A., W., Bertina, R., M., Briët, E., Briët, P., E., Zecha, A., Vielvoye, G., J. : Cerebral haemorrhagic infarction in young patients with hereditary protein C deficiency : Evidence for "spontaneous" cerebral venous thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*, 290:350-352, 1985.
88. Zenz, W., Bodó, Z., Ploho, J., Streif, W., Male, C., Bernert, G., Rauter, L., Ebetsberger, G., Kaltenbrunner, K., Kurnik, P., Lischka, A., Paky, F., Ploier, R., Höfler, G., Mannhalter, C., Muntean, W.: Factor V Leiden and Prothrombin Gene G 20210 A variant in children with ischemic stroke. *Thrombosis Haemostasis*, 80: 763-766, 1998.
89. Zivelin, A., Griffin, J., H., Xu, X.: A single genetic origin for a common Caucasian risk factor for venous thrombosis. *Blood*, 89:397, 1997.
90. Zotz, R., B., Maruhn-Debowski, B., Scharf, R., E.: Mutation in the gene coding for coagulation factor V and resistance to activated protein C: Detection of the genetic mutation by oligonucleotide ligation assay using a semi-automated system. *Thrombosis and Haemostasis*, 76(1): 53-55, 1996.

91. Zöller, B., Dahlbäck, B.: Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *The Lancet*, 343: 1536-1538.1994.

