

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**ANTİFOSFOLİPİD SENDROMUNDA AKTİVASYONLA
UYARILAN SİTİDİN DEAMİNAZ (AID) GENİNİN
TRANSKRİPSİYON ANALİZİ**

Biyolog Tuğba VARLIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2011

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**ANTİFOSFOLİPİD SENDROMUNDA AKTİVASYONLA
UYARILAN SİTİDİN DEAMİNAZ (AID) GENİNİN
TRANSKRİPSİYON ANALİZİ**

Biyolog Tuğba VARLIK

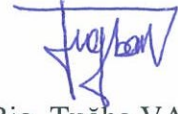
**Tez Danışmanı
Yard. Doç. Dr. Veysel Sabri HANÇER**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2011

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezindeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



Bio. Tuğba VARLIK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. ANTİFOSFOLİPİD SENDROMU (AFS)	5
4.1.1. Antifosfolipid Antikorlar	9
4.1.2. Patogenez.....	11
4.1.3. Epidemiyoloji	13
4.1.4. Klinik Belirtiler	13
4.1.5. Tanı.....	16
4.1.6. Tedavi	18
4.2. AKTİVASYONLA UYARILAN SİTİDİN DEAMİNAZ (AID)	20
5. MATERYAL VE YÖNTEM	23
5.1. MATERYAL	23
5.1.1. Sarf Malzemeler	23
5.1.2. Cihazlar.....	23
5.2. YÖNTEM	24
5.2.1. Total RNA İzolasyonu	24
5.2.2. Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi.....	24
5.2.3. cDNA Sentezi	25
5.2.4. cDNA Varlığının Doğrulanması.....	26
5.2.5. AID Geni için Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	26
6. BULGULAR	29
6.1. AID GENİNİN ANLATIMI.....	30
6.1.1. Total RNA İzolasyonu ve Kalitatif Tayini	30
6.1.2. cDNA sentezi ve Kalitatif Tayini	30
6.1.3. Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Q RT-PCR) Analizleri	31

7. TARTIŞMA.....	35
8. SONUÇ.....	38
9. TEŞEKKÜR.....	39
10. KAYNAKLAR.....	40

TABLolar LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1 : Otoantikorlarla ilişkili tromboz mekanizmaları 1998 Sapporo Kriterleri.....	6
Tablo 2 : AFS'de otoantikorlarla ilişkili tromboz mekanizmaları	8
Tablo 3 : Antifosfolipid Sendromunda Klinik Bulgular.....	15
Tablo 4 : Harris (1987) Antifosfolipid Sendromu Tanı Kriterleri.....	16
Tablo 5 : 1992 Alarcon-Segovia Antifosfolipid Sendromu Tanı Kriterleri	17
Tablo 6 : Gebelikte antifosfolipid sendromu için önerilen heparin dozları.....	19
Tablo 7 : cDNA sentezi için kullanılan bileşenler.....	26
Tablo 8 : Gerçek Zamanlı PZR için PZR Bileşenleri.....	27
Tablo 9 : AID transkript varlığının belirlenmesinde kullanılan Gerçek Zamanlı PZR	27
programı	
Tablo 10 : AFS ve sağlıklı kontrollerde AID ve HPRT düzeylerinin karşılaştırılması.....	29

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Protrombinin trombine dönüşmesinde rol alan faktörler	10
Şekil 2: DNA Editing ve RNA Editing Modeli	21
Şekil 3: Total RNA örnekleri.....	30
Şekil 4: cDNA sentezi ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görünümleri.....	31
Şekil 5: Kontrol bireylerinde AID cDNA miktarları.....	32
Şekil 6: AFS hastalarında AID cDNA miktarları.....	32
Şekil 7: Kontrol bireylerinde referans gen HPRT1'in cDNA miktarları.....	33
Şekil 8: AFS hastalarında HPRT1'in cDNA miktarları	33

SİMGE VE KISALTMALAR

AID	: Aktivasyonla İndüklenen Sitidin Deaminaz
AFA	: Antifosfolipid Antikoru
AFS	: Antifosfolipid Sendrom
AKA	: Antikardiyolipin
APOBEC-1	: Apolipoprotein B mRNA Editing Catalytic Polypeptide 1
ASP	: APOBEC-1 Uyarıcı Protein
CSR	: Sınıf Çevrim Rekombinasyonu
DVT	: Derin Ven Trombozu
ELISA	: Enzyme Linked İmmunosorbent Assay
GC	: Gen Dönüşümü
HPRT1	: Hipoksantin fosforiboziltransferaz 1
Ig	: İmmunglobulin
IgVH	: İmmunglobulin Ağır Zincir Gen
IgVL	: İmmunglobulin Hafif Zincir Gen
INR	: İnternasyomal Normalize Oran
LA	: Lupus Antikoagulanı
PE	: Polietilen
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PCR	: Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SHM	: Somatik Hipermutasyon
SLE	: Sistemik Lupus Eritematozus
V geni	: Variable – Değişebilen Bölge Geni

T.C. İstanbul Bilim Üniversitesi, Bilimsel Araştırmaları Değerlendirme Kurulu (BADK) tarafından 25.02.2011 tarih ve 2011/5 numaralı karar ile onaylanmıştır.

Bu tez, T.C İstanbul Bilim Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 3 Mayıs 2010 tarih ve 2010/SAĞ-004 numaralı onay ile desteklenmiştir.

Araştırma Projesi No: TB6/0502010

1. ÖZET

Antifosfolipid sendromu (AFS), arteriyel ve venöz tromboz eğilimi, tekrarlayan düşükler ve antifosfolipid antikorlarının varlığı ile karakterize bir hastalıktır. AFS’de tromboz gelişiminde; klinik tablodan negatif yüklü fosfolipidler ve fosfolipid-protein komplekslerine karşı oluşmuş olan antifosfolipid antikorlarının (lupus antikoagülanı, antikardiyolipin antikorları ve anti- β 2 glikoprotein-I antikorları) sorumlu olduğu düşünülmektedir. Immünglobulin (Ig) çeşitliliğine sebep olan başlıca üç B lenfosit mekanizması vardır. Bunlar somatik hipermutasyon (SHM), gen dönüşümü (GC) ve sınıf çevrim rekombinasyonudur (CSR). Bu üç önemli mekanizmanın AID (aktivasyonla uyarılan sitidin deaminaz) denilen bir protein ile kontrol edildiği bildirilmiştir. AID’in Ig dışı genlerde de DNA hasarı oluşturduğu ve genom stabilitesini bozduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda, immün çeşitliliğe sebep olan AID geninin anlatım düzeyini belirleyerek, AFS’deki otoimmuniteye katkısının varlığını araştırmayı amaçladık. 70 AFS tanısı konan hasta ile 70 sağlıklı erişkin kontrolden oluşan 2 grubun periferik kan örneklerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Total RNA örnekleri cDNA’ya çevirildi. Hedef gen (AID) ve referans gene (HPRT1) ait tasarlanan primer ve proplar kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Q PCR) yapıldı. Böylece referans ve hedef gene ait cDNA’lar çoğaltıldı. Genlerin ekspresyon düzeyleri ölçülerek, veriler kaydedildi. Elde edilen istatistiksel analizler sonucunda AID mRNA düzeyinin, AFS hastalarında sağlıklı erişkin gruba oranla 40 kat fazla bulunduğu hesaplandı.

AID geninin fazla anlatımı somatik hipermutasyon oranında artış ve otoantikor oluşumunda etkili olabilir. Sonuç olarak, AID proteininin AFS’de otoantikor oluşumunda anahtar rol oynayabileceği gözlenmiştir. Daha fazla ve kontrol bireyi ile yapılacak çalışmalarla bu sonuçların desteklenmeye ihtiyacı vardır.

2. SUMMARY

Antiphospholipid syndrome (APS), a disease characterized by the presence of arterial and venous thrombosis tendency, recurrent abortions and antiphospholipid antibodies. The development of thrombosis in APS; negatively charged phospholipids and phospholipid-protein complexes formed against with antiphospholipid antibodies (lupus anticoagulant, anticardiolipin antibodies and anti- β 2-glycoprotein I antibodies) are thought to be responsible in the clinical features. There are three main B-lymphocyte mechanism which caused Immunoglobulin (Ig) diversity. These are somatic hypermutation (SHM), Ig gene conversion (GC) and class switch recombination (CSR). These three important mechanisms have been shown to be controlled by an enzyme called AID (Activation Induced Cytidine Deaminase), and also it has been shown that AID can cause breaking the stability of the genome and creating DNA damages in non-Ig genes.

In this study, by measuring expression levels of AID gene which leads to immune diversity, we aimed to identify its effect of autoimmunity on APS. 70 APS patient and 70 healthy individuals peripheral blood samples are used for total RNA isolation. cDNA has been prepared by using the total RNA isolated from the samples. Q-PCR has been evaluated by using the target gene (AID) and a reference gene (HPRT1) primers and probes and the reference and target cDNA's have been replicated. The expression levels of the target gene and the references have been measured and the data have been analyzed statistically. The results of the statistical analyses have shown that the APS patients have 40 times increased expression levels on AID gene mRNA versus healthy individuals.

Increased expression levels of AID gene not only causes somatic hypermutation ratio but also has a probability to increase the production of autoantibodies. To sum up it has been seen that AID gene may have a key role on the production of autoantibodies in APS patients.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Antifosfolipid sendromu (AFS), arteriyel ve venöz tromboz eğilimi, tekrarlayan düşükler ve antifosfolipid antikorlarının (AFA) varlığı ile karakterize olup, edinsel trombofili nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Sendromun patogenezi tam olarak aydınlatılamamakla birlikte, klinik tablodan negatif yüklü fosfolipidler ve fosfolipid-protein komplekslerine karşı oluşmuş olan antifosfolipid antikorlarının (Lupus antikoagülanı-LA ve antikardiyolipin antikorları-AKA) sorumlu olduğu düşünülmektedir. AFS'de trombotik komplikasyonlar hastaların morbidite ve mortalitesini etkileyen en önemli faktördür. Trombotik olaylar erken yaşta gelişir, hem arteriyel hem de venöz sistemde olabilir ve tekrarlama riski yüksektir. von Willebrand Faktör (vWF), faktör VIII'in taşıyıcı proteini olup, vasküler endotel hücrelerinden büyük multimerler halinde plazmaya salınır (1).

Serumda uzun süre yüksek miktarda saptanan antifosfolipid antikorların varlığı, arter ve/veya ven trombozlar, trombositopeni, tekrarlayıcı fetüs kayıpları AFS olarak tanımlanmıştır. Sendromun patogenezi tam olarak aydınlatılamamakla beraber, klinik tablodan negatif yüklü fosfolipid ve/veya fosfolipid bağlayan proteinlere karşı gelişen heterojen bir otoantikor grubu olan Antifosfolipid antikorlar (AFA) sorumlu tutulmaktadır.

AFA'ların; AFS ve diğer otoimmün hastalıkların üzerinde oynadıkları rolleri, bu antikorlara olan ilgiyi arttırmıştır. Böylece AFA'lar çok sayıdaki araştırmaya konu olmuş ve venöz ve arteriyel trombozun önemli sebepleri arasında gösterilmiştir.

AFA'ların pozitif saptandığı klinik tablo olan AFS; altta yatan herhangi bir hastalık ile beraber görülüyorsa sekonder AFS, herhangi bir hastalık olmadan ortaya çıkıyorsa primer AFS olarak adlandırılır.

AID (aktivasyonla indüklenen sitidin deaminaz), sitidin deaminaz ailesinin bir üyesidir (2). Onikinci kromozomun kısa kolunun 13. bölgesinde yerleşiktir. Beş ekzondan oluşturulan mRNA'dan 198 aminoasitlik bir protein oluşturulmaktadır (3-5). Antikor dağarcığının çeşitlenmesine sebep olan üç mekanizma vardır. Bunlar somatik hipermutasyon (SHM), sınıf çevrim rekombinasyonu (CSR) ve gen dönüşümüdür (GC) (6). Antikor çeşitliliğine neden olan SHM mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır. AID proteininin bulunması bu olaya ışık tutmuştur (7).

AID, sadece Ig genlerinde değil, proto-onkogenler de dahil olmak üzere, farklı genlerde de DNA hasarı oluşturabilir ve genom stabilitesini bozabildiğinden, güçlü bir

mutatördür (6). AID geninin anlatımı sadece B hücrelerinin SHM ve CSR fonksiyonlarının gerçekleştiği germinal merkezlerde gerçekleştirilmektedir (8).

Bu çalışmada, kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Q-PCR) yöntemi ile AID geninin anlatımı ile AFS arasında bir ilişki olup olmadığı araştırıldı.

4. GENEL BİLGİLER

Otoimmün hastalıklar, farklı dokulara karşı humoral immün cevap aracılığıyla gelişen kronik heterojen bir hastalık grubudur. Otoimmün hastalıkların özelliklerinden biri, sistemik dolaşımında ya da spesifik bazı dokularda otoantikörlerin bulunmasıdır (9).

Vasküler tromboz veya tekrarlayan düşükler ve lupus antikoagulan antikörleri (LA) veya antikardiyolipin immunoglobulin G (IgG) ya da M (IgM) antikörlerinin varlığının en az 6 hafta arayla, 2 ya da daha çok kez gösterilebildiği otoimmün bozukluk AFS olarak tanımlanır (10). Aşırı pıhtılaşma sendromu en sık görülenidir ve bu sendromların % 28'ini oluşturur (11).

AFS; Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) gibi başka bir majör otoimmün hastalıkla birlikte olduğunda sekonder, tek başına bulunduğu primer AFS olarak sınıflandırılır (12).

4.1. ANTİFOSFOLİPİD SENDROMU (AFS)

Wasserman, konjenital sifilizli fetüslerin karaciğer ekstrelerini kullanarak bir sifiliz tarama testi geliştirdi (Wasserman reaksiyonu) (13). Mary Pangborn bu testin antijenik unsurunun bir fosfolipid (kardiyolipin) olduğunu gösterdi (14, 15). Sifiliz testi yaygınlaşmaya başladıkça, bazı kişilerde yalancı pozitif sonuçlandığı dikkati çekti (16). 1952'de sifiliz testi yalancı pozitif olan SLE'li iki hastanın plazmalarında in vitro olarak pıhtılaşma testlerini uzatan bir madde olduğu bulundu (17). Donald Feinstein ve Samuel Rappaport bu maddeye 'lupus antikoagülanı' (LA) adını verdi (18). 1963'te Bowie ve arkadaşları, LA ile tromboz arasında ilişki olduğunu ileri sürdüler (19, 20). 1980'de Firkin ve arkadaşları LA ile tekrarlayan düşükler arasında ilişki olduğunu bildirdi (21). 1983 yılında Harris ve Hughes tarafından orijinal olarak tanımlanan 'Antikardiyolipin Sendrom' kliniğinde, LA'nın tromboz, abortus ve serebral bilgiler mevcuttu (22, 23). Aynı yıl antikardiyolipin antikörleri tanımlandı ve ardından ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) yöntemiyle antikardiyolipin (AKLA) testi geliştirildi (24, 25). Hasta serumunda bulunan antikörlerin kardiyolipinden başka diğer fosfolipidlere de bağlandığı saptandı ve 1987'de Hughes ve arkadaşları tarafından Antifosfolipid Sendromu teriminin daha uygun olduğu bildirildi (26, 27).

SLE gibi benzeri hastalıklara eşlik etmeyen olgular 'primer AFS' olarak tanımlandı (28). 1990'da birbirinden bağımsız olarak iki grup; Avustralya'dan McNeil ve arkadaşları (29), Hollanda'dan Galli ve arkadaşları (30) antifosfolipid antikorlarını saf olarak elde ettiler ve bunların direkt olarak kardiyolipine bağlanmadığını gösterdiler. AKLA'nın kardiyolipine bağlanabilmesi için β -2 glikoprotein-I (B2GPI) adlı bir kofaktörle bağlanması gerektiği anlaşıldı. Bazı vakalarda ise lupus antikoagülanı etkisi yaratan antikorların kofaktör olarak protrombini kullandığı gösterildi (31, 32). 1992'de Asherson 'katastrofik' antifosfolipid sendromunu tanımladı (33).

1998'de Japonya'nın Sapporo kentinde (Tablo 1.), '8th International Symposium on Antiphospholipid Antibodies' adlı sempozyumda AFS sınıflama kriterleri değiştirildi (34).

Klinik Kriterler

1. Tromboz: Herhangi bir doku veya organda arteriyal, venöz veya küçük damar trombozuna yol açan bir veya daha fazla klinik atak olması,
2. Gebelik morbiditesi:
 - a. Bir veya daha fazla sayıda, 10. Gestasyon haftası ve daha ileri dönemde, morfolojik olarak olduğu ultrason veya direkt muayene ile gösterilmiş fetüs kaybı,
 - b. Ağır preeklampsi, eklampsi veya plasental yetersizlik nedeniyle 34. Gestasyon haftası veya daha ileri dönemde, morfolojik anomalisi olmayan, bir veya daha fazla prematüre doğum yapması,
 - c. Üç veya daha fazla 10. gestasyon haftasından önce açıklanmayan spontan düşüklere olması (kromozom anomalisi, annede hormonal veya anatomik bir patoloji saptanmamalı)

Laboratuvar Kriterleri

1. Orta veya yüksek titrede antikardiyolipin IgG veya IgM antikorlarının pozitifliği**
2. Testlerin β 2-GPI'e bağımlı standart ELISA yöntemiyle araştırılması gereklidir. Lupus antikoagülanı pozitifliği** . ISTH kriterlerine göre:
 - a. Fosfolipide bağımlı pıhtılaşma testlerinin (tarama testleri: aktive parsiyel tromboplastin zamanı, kaolin pıhtılaşma zamanı, sulandırılmış protrombin zamanı, textarin zamanı) uzamış olması,
 - b. Tarama testinin trombositten fakir normal plazma ile karışım yapıldığında düzelmemesi,
 - c. Başka koagülopatilerin (örneğin FVIII inhibitörü veya heparin kullanımı) dışlanması gereklidir.

*Tamı için en az bir klinik ve bir laboratuvar kriter olmalıdır.

**En az 6 hafta arayla, 2 veya daha fazla ölçümde pozitif bulunmaları gereklidir.

Tablo 1. Otoantikorlarla ilişkili tromboz mekanizmaları 1998 Sapporo Kriterleri*

2006 yılında 11. Uluslararası Antifosfolipid Sempozyumu'nda AFS kriterleri yeniden düzenlendi ve günümüzde de hala bu kriterler kullanılmaktadır. Düzenlemeye göre klinik kriterler aynı kalırken, laboratuvar kriterleri değişti. Anti-beta2- glikoprotein-I, immünglobulin G ve M laboratuvar kriterlerine eklendi. Antifosfolipid antikorlarının 12 hafta arayla en az iki kez pozitif olması ve 40 ünite üzerindeki değerlerin pozitif kabul edilmesi gerektiği belirtildi. 12 hafta arayla bakılan en az iki Anti-beta-2 glikoprotein I antikor (IgG ya da IgM) düzeylerinin serum veya plazmada orta veya yüksek düzeyde olması (>99. persantil) kriterler arasında sayıldı (35).

AFS, belirli klinik belirtilerin varlığı ve dolaşımında orta ve yüksek seviyede antifosfolipid antikorların varlığı ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. Daha çok arteriyel ve venöz trombozlar, otoimmün trombositopeni ve fetal kayıplar ile seyrederek (10, 36, 37).

AFS'yi temsil eden AFA normal hemostazı etkilerler. Antikardiyolipin antikorlar antifosfolipid antikorların en fazla incelenenleri olmuştur (38). Bu otoantikorların hiperkoagülabilitiyi direkt olarak etkilediği yaygın olarak kabul edilen bir görüştür. AFS'de klinik bulguların çeşitliliği birden fazla patofizyolojik sürecin rol aldığını düşündürmektedir. Hastaların bir kısmında venöz tromboza neden olurken, diğerlerinde arteriyel tromboza neden olmaktadır (39, 40). Venöz trombozlar arteriyel trombozlara göre daha siktir (41). AFS patogenezinde; çok yönlü ve protein C, doku faktörü inhibitörü ve annexin A5 gibi doğal antikoagülan yollarının inhibisyonu; endotel hücreleri, monositler ve/veya trombositlerin aktivasyonu dahil olmak üzere çok sayıda mekanizma içerir (42).

Çok çeşitli prokoagülan mekanizmalardan önemlileri Tablo 2.'de gösterilmiştir (40). Otoantikorlar öncelikle in vivo hücre membranındaki hemostatik mekanizmaları bozarak normal hemostazı etkilerler. Prokoagülan ve antikoagülan reaksiyonları oluşturan enzimler, kofaktörleri ve bunların substratları fosfolipid membran üzerinde denge durumundadırlar. Otoantikorlar membran proteinlerine bağlanarak bu reaksiyonların kinetiklerini değiştirirler. Bu etkilerini, proteinlerin membrandan ayrılmasını yavaşlatıp proteinlerin etkileşimlerini bloke ederek veya diğer proteinlerin fosfolipid membrana erişimini engelleyerek gerçekleştirirler. Otoantikorlar belirli hücreleri uyararak çeşitli moleküllerin ekspresyon ve sekresyonunu değiştirir (39, 40).

Antikoagülan reaksiyonların inhibisyonu
Protein C yolunun inhibisyonu
Protein C aktivasyonunun inhibisyonu
Aktive protein C'nin inhibisyonu
Antitrombin aktivitesinin inhibisyonu
Annexin V'in yer değiştirmesi
β 2-GPI antikoagülan aktivitesinin inhibisyonu
Hücre aracılı olaylar
Monositlerde doku faktörü ekspresyonu
Endotelial hücrelerde prokoagülan aktivitenin artması
Doku faktörünün ekspresyonu
Adhezyon moleküllerinin ekspresyonu
Eikozanoidlerdeki bozulma
Endotelial hücrelerde prostosiklin üretiminin azalması
Trombositlerdeki tromboksan A2 üretiminin artması
Trombositlerde aktivasyon/ agregasyon artışı

Tablo 2. AFS'de otoantikorlarla ilişkili tromboz mekanizmaları

AFS ilk olarak tanımlandığında Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) ile yakın ilişkili olduğu gözlemlendi. Fakat daha sonra aynı sendromun altta bir hastalık durumu olmadan da ortaya çıktığı saptandı ve bu tablo primer AFS olarak adlandırıldı. Primer AFS'nin SLE ile görülen sekonder AFS'den ayrılması için çalışmalar yürütüldü. Uluslararası çok merkezli çalışma ile her iki durumda da çok fazla ortak bulgular olduğu gözlemlendi. Hemolitik anemi, endokardiyal kapak hastalığı ve nötrapani gibi bulguların sekonder AFS'de daha sık görüldüğü belirtildi (43).

AFS'nin klinik alt grupları:

1. Primer AFS
2. Diffüz bağ dokusu hastalıkları ile birlikte olan AFS (Sekonder AFS)
3. SLE sınıflandırma kriterlerini doldurmayan fakat SLE'nin bazı özelliklerini taşıyan hastalarda AFS
4. İlaçlar, malign hastalıklar veya infeksiyonlarla birlikte görülen AFS (Sekonder AFS)
5. Üç veya daha fazla organda akut damar tıkanmaları ile seyreden "Katastrofik AFS" olarak özetlenebilir (33, 43).

Çoğu AFS'li hastada trombotik olay izole olup, tekrarlama ilk olaydan aylar veya yıllar sonra olmaktadır. AFA pozitif hastaların çok az kısmında ölümle sonuçlanabilen, tüm vücutta geniş vasküler oklüzyonlarla karakterize tablo katastrofik AFS olarak adlandırılmış olup en az üç farklı organ tutulumu, günler ve haftalar içinde gerçekleşir. Büyük ve küçük damarlarda çok sayıda tromboz görülmektedir. Böbrek, en sık tutulan organ olup bunu akciğer, santral sinir sistemi, kalp ve cilt izlemektedir. Ağır trombositopeni, çoklu organ yetmezliği, solunum güçlüğü ve hipertansiyonla vakalar başvurmaktadır. Mortalite oranı % 50 oranında olup ölüm nedeni çoklu organ yetmezliğidir (44, 45).

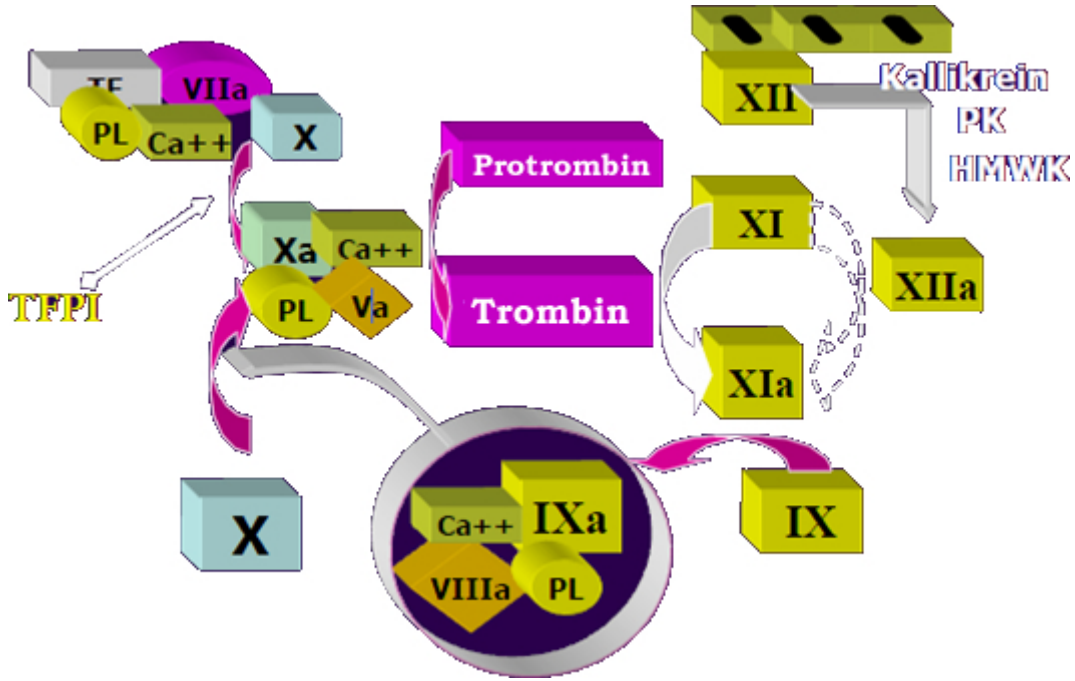
4.1.1. Antifosfolipid Antikorlar

Antifosfolipid Antikorlar (AFA) organizmada bulunan çeşitli negatif yüklü fosfolipid ve/veya fosfolipid bağlayan proteinlere karşı oluşan heterojen bir otoantikor ailesidir. Bunların arasında en çok çalışılan antikardiyolipin antikorlarıdır (AKA) (46, 47). AFA'ların özellikle de AKA'ların otoimmün hastalıklarda tekrarlayan arteriyer/venöz tromboz, trombositopeni, nörolojik bulgular, gebelik kaybı ve pulmoner hipertansiyondaki rollerinin bulunması ile üzerlerindeki ilgiyi arttırmıştır (48, 49, 50).

AFS'de 4 farklı tipte antifosfolipid antikor saptanmıştır. Bunlar:

1. Yalancı pozitif VDRL (venereal disease research laboratory/zührevi hastalık araştırma laboratuvarı): Antifosfolipid antikor sendromunda saptanan ilk otoantikordur. Duyarlılığı ve özgünlüğü çok düşük olduğundan dolayı antifosfolipid antikor sendromu tanısında kullanılmaz.
2. Lupus antikoagulanları (LA): LA anyonik fosfolipidlere bağlı olup plazma proteinlerine karşı (protrombin veya annexin V gibi) oluşan antikorlardır ve protrombinin trombine

dönüşmesinde rol oynayan faktörler arasında bulunmaktadır (Şekil 1.). LA protrombinin trombine dönüşmesini sağlayan protrombin ve faktör Xa'nın fosfolipidlere kalsiyuma bağımlı bir şekilde bağlanmasını inhibe eder. Bu nedenle protrombinaz kompleksinin oluşmasını bloke eder ve in vitro şartlarda aktive parsiyel tromboplastin (aPTT) zamanı, dRVVT (dilute Russel's viper venom time), kaolin pıhtılaşma zamanı ve nadiren protrombin zamanını uzatır.



Şekil 1. Protrombinin Trombine Dönüşmesinde Rol Alan Faktörler

3. Antikardiyolipin antikorlar (AKA): Antikardiyolipin antikorlar kardiolipin ve fosfatidilserin gibi fosfolipitlere karşı reaksiyon gösteren antikorlardır ve IgM, IgA, IgG, ve IgG1-4 subgrupları vardır. Özellikle IgG2 türündeki antikardiyolipin antikorlarda tromboz riski daha yüksektir. AKA ve LA büyük oranda beraberlik gösteren otoantikorlardır. Ancak bazı olgularda herhangi biri tek başına pozitif saptanır.

4. Anti- β 2 glikoprotein-I antikorlar: β 2 glikoprotein-I'e karşı oluşan antikorlar, primer ve sekonder antifosfolipid antikor sendromunun büyük çoğunluğunda pozitif saptanır. Genellikle diğer antifosfolipid antikorlar ile birlikte görülmesine karşılık, olguların yaklaşık % 11'inde tek başına pozitif saptanır (41).

4.1.2. Patogenez

AFS'li hastalarda trombozun patogenezi tam olarak aydınlatılamamakla beraber, LA ve AKA'nın kolaylaştırıcı bir rol oynadığı kabul edilmektedir (51). AFA antikorlar, AFS patogeneziinde doğrudan etkili otoantikordlardır. AFA hedef antijenlerinin, hemostaz için oldukça önemli olması ve antikör düzeyleri ile klinik komplikasyonlar arasında doğrudan ilişki gözlenmesi anlamlıdır (52). AFA'ların hayvan modellerinde tromboz gelişimi ve gebelik kayıpları arasında nedensel bir ilişki gösterilmiş olmasına karşılık; bu tür bir neden-sonuç ilişkisi insanlar arasında gösterilememiştir (53).

AFS patogeneziine ilişkin farklı hipotezler öne sürülmüştür ve bunların beraber bulunarak patogeneziinde rol oynaması söz konusudur (54) ve bu mekanizmaların bir kısmı aşağıda sıralanmıştır:

1. Yağ asitlerinin oksidasyonu: Fosfolipidlerin oksidasyonu ve oksitlenmiş fosfolipidlerin yıkım ürünleri ile farklı proteinlerin kombinasyonları sonucu oluşan yeni epitoplara karşı AFA'lar oluşabilir. Atmosfere mağruz kalınması ile fosfolipidlerin oksidasyonundaki artışa bağlı olarak da kardiyolipine bağlı antikörler artar. Bu bulgular ile de AFS'de antioksidan ilaçların tromboz eğilimini azaltabileceği rapor edilmiştir (41).

2. Annexin-V antikoagülantının olası rolü: Fosfolipid ve kalsiyum bağlayıcı bölgeleri dışbükey yüzünde yerleşmiş, içbükey disk şeklinde bir protein olan Annexin V'in, anyonik fosfolipidlere karşı yüksek afinitesi vardır. Koagülasyon faktörlerini fosfolipid yüzeylerden ayırma yeteneği sayesinde antikoagulan etkisi göstermektedir (54). Heparan sülfat, annexin-V'in fosfolipid yüzeyine bağlanmasına yardımcı olur veya bu bağı stabilize eder (55). Annexin-V, plasental trofoblastlarda yapısal olarak eksprese edilir ve intervillöz sıvı akışkanlığını sağlar (56). Pre-eklamptik hastalarda, annexin-V'in plasental trofoblastlar tarafından eksprese edilmesi indüklenmiş olabilir; bu da aşırı pıhtılaşmaya yol açabilir (57).

Annexin-V, vasküler endotel hücreleri tarafından eksprese edilebilir (54) ve AFA'lar, plasental trofoblastlar ve vasküler endotel hücrelerin yüzeyinden, β -2 glikoprotein I'e bağlı olarak annexin V'i ayırabilir. Böylece trombogenezisi destekleyebilir (58). Antifosfolipid antikör- β 2-GPI kompleksleri, annexin-V kalkanını bozar ve fosfolipidleri belirgin şekilde ortaya çıkarır. Böylelikle anyonik fosfolipid yüzeyde net bir artış meydana gelir ve pıhtılaşma desteklenir (59).

3. Fosfatidilserinin (Ptd-Ser) olası rolü: Ptd-Ser güçlü bir yüzey prokoagulanıdır ve normalde hücre membranının iç yüzünde yer alır. Apoptoz esnasında hücre yüzeyinde kabarcıklar oluşur ve bu kabarcıklar çok fazla miktarda Ptd-Ser içerir. Ptd-Ser'in koagülasyonu indüklemesinin yanı sıra otoantikor yapımına neden olma özelliği de vardır. Annexin V, Ptd-Ser'i bağlar ve prokoagulant durumunun oluşmasını önler. Antifosfolipid antikorlar bu anti-protrombotik kılıfın oluşmasını engelleyebilir (41).

4. Doku faktörünün ekspresyonu: Doku faktörü, hem interensek, hem de ekstrensek yollarda normal pıhtılaşmanın esas başlatıcısıdır (60). Kanla temas halindeki hücrelerin yüzeyinde dinlenme halinde doku faktörü bulunmaz; ancak doku faktörü lipopolisakkaridler veya endotoxin (61), immün kompleksler (62) gibi çeşitli maddelerle indüklenip eksprese edilebilir. AFS'deki IgG antifosfolipid antikorunun da doku faktörü ekspresyonunu indüklediği düşünülmüştür ve doku faktörü indüklenmesi ile, Faktör VII aktive olarak pıhtılaşma başlar (63).

5. Protein-C, Protein S ve diğer koagülasyon faktörlerinin inhibisyonu: Protein C yolu, trombin, endotel hücrelerin yüzeyinde trombomoduline bağlandığı zaman başlar ve endojen antitrombotik bir mekanizma olarak rol oynar (64). Trombin, trombomoduline bağlı olduğunda prokoagulan özelliğini kaybeder ve protein C'yi aktif şekline dönüştürür. Aktive olmuş protein C (APC), serbest protein S ile birleşerek faktör Va ve VIIIa'yı parçalar. Antifosfolipid antikorlar, protein C'nin, trombomodulin–trombin kompleksiyle aktivasyonunun azalması, APC-protein S kompleksinin birleşmesini önlemek, APC aktivitesinin inhibisyonu gibi protein C yoluyla çeşitli mekanizmalarla etkileşebilir (65, 66). Bununla birlikte AFS'li hastalarda çoğu kez protein S eksikliği görülmektedir (67).

6. AFA, doğrudan endotel hücre hasarına neden olarak da tromboza katılabilir (52). Antifosfolipid antikorları endotel hücrelerini aktive etmesi sonucu adezyon moleküllerinin sentezinde, sitokinlerin salınımında, arakidonik asit metabolitlerinin üretiminde artış gözlenebilir. AFA damar endotelinin hasarında rol alabilirler (68).

Özellikle ana hedefi antifosfolipid antikorların trombozla ilişkisi üzerine yoğun hipotezler geliştirilmiştir. Sonuçta antifosfolipid antikorların primer hemostaz (endotel ve trombositler) ve sekonder hemostaz (koagülasyon sistemi ve fibrinolitik sistem) elemanları üzerine çeşitli basamaklarda patolojik etkileşim içerisinde bulunarak trombofili ve tromboz tablolarının çeşitli organ sistemlerinde ortaya çıktığı düşünülmektedir (69).

4.1.3. Epidemiyoloji

Antifosfolipid antikorların prevalansı genç sağlıklı erişkinlerde %1-5'tir. Bu oran, yaşla birlikte doğru orantıda ve özellikle kronik hastalığı olan yaşlı hastalarda artmakla birlikte sıklığı %12-25'dir (41, 70). Bununla birlikte SLE vakalarının ise %35'inde antifosfolipid antikorları tespit edilebilmektedir (10).

AFA'lı hastalarda trombotik bir olay için risk faktörleri; LA'nın bulunması, yüksek AKA IgG düzeyi ve trombotik olay hikayesidir (65). AKA'lı hastalarda IgG düşükse, trombotik bir olay riski yılda %1, IgG yüksekse %6, genel toplumda ise bu oran %0.1'dir (70). SLE'li hastalarda LA'nın bulunması, trombotik olay riskini 5.6 kat (71), SLE ya da trombotik hikayesi olmayanlarda ise 11.1 kat artırır (72). Daha önceden trombotik bir olay geçirilmiş ise, yeni bir tromboz riskini 5 kat artırır (73).

Epidemiyolojik çalışmalarda AFA-pozitif kişilerde tromboz riskinin arttığı gösterilmişse de, herhangi bir trombotik atak veya gebelik kaybı olmayan normal bireylerde de yüksek- pozitif AFA değerleri bulunabilmektedir. Bu nedenle AFS'da tromboz gelişiminde başka edinsel ve kalıtsal risk faktörlerinin de etkisi olabileceği düşünülmektedir (74).

4.1.4. Klinik Belirtiler

AFS'nin en sık görülen klinik belirtisi, venöz tromboz ve özellikle bacaklardaki derin ven trombozu (DVT)'dur (43, 75). Arteriyel tromboz, venöz trombozdan daha seyrek görülür. Beyin, arteriyel trombozun en sık olduğu bölgedir ve arter tıkanmalarının yaklaşık yarısı felç ve geçici iskemik ataklara neden olur. Koroner damar tıkanmaları, arter tıkanmalarının yaklaşık dörtte birini oluşturur ve geriye kalanlar pedal arterler, renal ve retinal gibi farklı damar yataklarını etkiler. Kalp kapak anormallikleri, özellikle sekonder AFS'lilerde sıkça görülür (75).

AFS'li kadınlar, pre-embriyonik veya embriyonik periyod yerine, fetal süreçte düşük yaparlar ve bu da APS'li kadınların anatomik olarak normal fetüslerin büyük çoğunluğunu kaybetmeleri anlamına gelir (43, 76).

Aynı zamanda, gebeliğe bağlı hipertansiyon ve utero-plasental yetmezlik insidansları yüksektir ve bu da prematür doğum ve/veya intrauterin büyüme geriliklerine yol açar (59). Antifosfolipid antikorların yönettiği trofoblastik annexin-V etkileşimleri, lokal trombozlara ve zayıf plasental perfüzyona yol açabilir (77). AFA pozitif bulunan hastalarda tromboz ve fetus kayıpları dışında da klinik ve laboratuvar bulgular bildirilmiştir (78) (Tablo 3.).

Sistem	Semptom ve Klinik Bulgular
Arteriyal sistem	Küçük, orta, büyük boyutlarda arterlerde trombozlar görülebilir.
Venöz sistem	Küçük, orta, büyük boyutlarda venlerde trombozlar görülebilir.
Kardiyovasküler	AMI, angina pectoris, kalp kapak anomalileri, kalp kapaklarında vejetasyonlar, non bakterial trombotik (Libman Sacks) endokarditi, ateroskleroz, periferik damar hastalığı, miyokardit, klodikasyo intermittans.
Pulmoner	Pulmoner emboli, pulmoner hipertansiyon, pulmoner alveoler kanama, sıkıntılı solunum sendromu, fibrozan alveolit.
Hematolojik	Trombositopeni, otoimmün hemolitik anemi, trombotik trombositopenik purpura, hemolitik üremik sendrom.
Nörolojik	Geçici iskemik atak, SVA, kore, konvülziyon, multi-infarakt demans, transvers miyelit başta olmak üzere spinal sendromlar, ensefalopati, migren, pseudo-tümör serebri, serebral venöz tromboz, mononöritis mültipleks, Sneddon sendromu amorozis fugaks
Oftalmolojik	Retinal arter trombozu, retinal ven trombozu.
Obstetrik	Gebelik kaybı, intrauterin büyüme-gelişme geriliği, HELLP sendromu, oligohidroamnioz, preeklampsi-eklampsi, utero-plerantal yetersizlik, infertilite.
Gastrointestinal	Budd-Chiari sendromu, hepatik infarkt, intestinal infarkt, iskemik kolit, pankreatit, intestinal veno-oklüzif hastalık, hepatik veno-oklüzif hastalık.
Endokrin	Adrenal yetersizliği, testis infarktüsü, prostat infarktüsü, hipofiz nekrozusu ve yetersizliği.
Dermatolojik	Reynaud fenomeni, livedo retikularis, yüzeysel tromboflebit, spinter hemorajiler, bacak ülserleri, ciltaltı nodüller, mavi parmak sendromu, akrosiyanoz, cilt infarktleri.
Diğer	Psikoz, kognitif bozukluklar, kemik infarktleri, avasküler nekroz.

Tablo 3. Antifosfolipid Sendromunda Klinik Bulgular

4.1.5. Tanı

Antifosfolipid sendromu için tanı kriterleri ilk olarak 1987 yılında Harris ve ark. tarafından geliştirilmiştir (Tablo 4.)

Klinik
Venöz tromboz
Arteriyal tromboz
Tekrarlayan fetal kayıp
Trombositopeni
Laboratuvar
IgG AKA (orta-kuvvetli pozitif)
IgM AKA (orta-kuvvetli)
Lupus antikoagülanı

Tablo 4. Harris (1987) Antifosfolipid Sendromu Tanı Kriterleri

Bu kriterlerde klinik ve laboratuvar olarak 2 ana grup vardır (36). Daha sonra 1992’de Alarcon-Segovia ve ark. bu kriterleri geliştirerek Alarcon-Segovia tanı kriterlerini tanımladılar (79) (Tablo 5.).

AFS bulguları;

Tekrarlayan fetal kayıplar
Venöz tromboz
Bacak ülserleri
Livedo retikularis
Hemolitik anemi
Trombositopeni
Arteriyel tromboz

Kesin AFS Tanısı : >5 SD AKA* + 2 klinik bulgu

Olası AFS Tanısı : >5 SD AKA* + 1 klinik bulgu
>2 SD AKA** + 2 klinik bulgu

Kuşkulu AFS Tanısı: >5SD AKA* + klinik bulgu yok
>2SD AKA** + 1 klinik bulgu
>Negatif SD AKA + en az 2 klinik bulgu

*>5 SD AKA : Sağlıklı kontrollerin AKA ortalamasının, 5 standart sapma üstü değerle

**>2 SD AKA: Sağlıklı kontrollerin AKA değerlerinin ortalamasının, 2 ile 5 standart sapmasının arasındaki değerler

Tablo 5. 1992 Alarcon-Segovia Antifosfolipid Sendromu Tanı Kriterleri

ISTH'nin 'International consensus statement on preliminary criteria for AFS' çalışmasıyla AFS tanısı için gereken klinik ve laboratuvar kriterler belirlenmiştir (10) ve hastalığın tanısı için günümüzde Sapporo kriterleri kullanılmaktadır (34) (Tablo 1.)

AFS tanısı için klinik bulguların laboratuvar bulguları ile desteklenmesi gerekmektedir (80). Bu konuda, AKA'ların belirlenmesinde önceleri lupus antikoagülanı (LA) ve sifiliz için uygulanan standart serolojik testlerden yararlanılmakta idi. Son zamanlarda ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), tercih edilen yöntemler arasındadır (49). AKA ve LA'nın farklı antikor gruplarını temsil ettiği ortak pozitiflik oranının % 40-60 olduğu bilinmektedir. AKA tespit edilen hastaların bir kısmında, LA beraber bulunabilirse de; bir çoğunda LA birlikteliğinin olmayacağı ve LA pozitifliği tespit edilen hastaların tamamında da AKA birlikteliğinin olmayacağı belirtilmiştir (81). AFS'den şüphelenilen vakalarda kesin ve doğru sonuç için mutlaka her iki antikor grubuna yönelik testlerin yapılması gerekmektedir. Aynı zamanda AFA'lar sağlıklı popülasyonda, başta lupus olmak üzere sistemik otoimmün hastalıklarda, infeksiyonlarda, bazı ilaçlarla tedavi sırasında ve bazı malign hastalıklarda ortaya çıkabilirler (46, 82, 83).

4.1.6. Tedavi

AFA saptanan; fakat klinik belirti ve bulgu bulunmayan kişilerde öncelik olarak tromboza yatkınlığı tetikleyen hareketsizlik, oral kontraseptifler, östrojen tedavisi ve sigara içme gibi faktörler saptanmalı ve elimine edilmelidir. AFS, çoğu kez hızlanmış aterosklerozla ilişkili olduğundan, hiperlipidemi, hipertansiyon ve diabetes mellitus gibi risk faktörleri tedavi edilmelidir (65). Asemptomatik AFA varlığında, oral antikoagülan veya düşük doz aspirin tedavisi tartışmalıdır (84–86). Ig G tipinde yüksek titrede AKA pozitifliği ve/veya inatçı LA aktivitesi olan asemptomatik hastalarda, ve yakın izlem önerilmektedir. Yine de aspirinin, AFS'li hastalarda derin ven trombozu (DVT) ve polietilen (PE)'e karşı korunma sağlayıp sağlamadığı hala tartışmalıdır. Aspirin, AKA'lı erkeklerde trombozdan korunma sağlamadığı halde (87), AFS'li olup daha önceden gebelik kaybı olan kadınlarda hastalığa karşı korunma sağladığı bildirilmiştir (85). Hopkins Lupus kohort çalışmasında, hidroksiklorokin AFA titresini azaltarak, tromboza karşı koruyucu olabileceği rapor edilmiştir (88).

Gebelikte AFS tedavisi için, multidisipliner yaklaşım ve gebelik öncesi yeterli bilgilendirme gerekmektedir. Gebeyi yakın takip çok önemlidir. Normal gebelerin %2'sinde düşük titrede AFA pozitifliği mevcuttur. AFA'ları pozitif olan ve fetal kayıp öyküsü olmayan gebelerde tedavi gereksizdir. Ancak AFA titresini yüksek olan hastalara düşük doz aspirin tedavisi verilebilir. Bir fetal kayıp öyküsü var ve AKA yüksek titrede pozitif ise, mutlaka düşük doz aspirin verilmelidir (89). Cuadrado ve Lopez-Pedreranın önerdikleri protokole daha önce tromboz ya da gebelik kaybı olmayan hastalarda tedavisiz yakın takip veya düşük doz aspirin tedavisi kullanılmaktadır (90).

Antifosfolipid sendromu tanısı konan kadınlarda, gebelikten 6. postpartum döneme kadar heparin tromboprofilaksisi ya da antikoagülasyon önerilmektedir. Heparin tedavisine, çoğunlukla düşük doz aspirin (80 mg/gün) eklenmekle birlikte aspirinin gebeliğin ilk trimesterindeki güvenilirliği hala şüphelidir (91). Bazı araştırmacılar AFA-pozitif kişilerin riskli durumlarda (operasyon, puerperal dönem vb) profilaksi alması gerektiğini savunmaktadır, ancak bu konuda yapılmış kontrollü bir çalışma yoktur (92, 93). Antifosfolipid sendromu olan gebelerin kontrol muayeneleri birinci ve ikinci trimesterde her iki haftada, daha sonrasında ise haftada bir yapılmalıdır ve gebelikte antifosfolipid sendromu için önerilen heparin dozları Tablo 6.'da özetlenmektedir (94).

<p>Profilaksi rejimleri</p> <p>Tromboz hikayesi olmayan tekrarlayan embriyo ya da fetüs kayıpları, preeklampsi ya da şiddetli plasenta yetmezliğine bağlı preterm doğum yapan kadınlarda;</p> <p>Standart heparin</p> <ol style="list-style-type: none">1. 7500-10000 U gebeliğin ilk 3 ayında 2x1, 2. Ve 3. Trimesterde 10000 U 2x1 “düşük moleküler ağırlıklı heparin”,2. Enoxaparin 40 mg 1x1 veya dalteparin 5000 U 1x1 ya da3. Enoxaparin 30 mg 2x1 veya dalteparin 5000 U 2x1.
<p>Antikoagülasyon rejimleri</p> <p>Tromboz hikayesi olan kadınlarda;</p> <p>Standart heparin</p> <ol style="list-style-type: none">1. aPTT izlemine tedavi aralığında her 8-12 saatte bir “düşük molekül ağırlıklı heparin”,2. Ağırlığa göre (enoxaparin 40 mg 1x1 ya da 16. Gebelik haftasına kadar dalteparin 5000 U 1x1, 16. Gebelik haftasına kadar dalteparin 5000 U 1x1, 16. Gebelik haftasından sonra 2x1).

Tablo 6. Gebelikte Antifosfolipid Sendromu İçin Önerilen Heparin Dozları

Trombotik bir olaydan sonra tedavi aşamasında, bazı çalışmalarda, warfarinle antikoagülasyonun, tekrarlayan trombozları azaltmada yararlı olduğu gösterilmiştir (88, 95, 96). Ayrıca, 147 hasta bireyi içeren bir çalışmada, Khamasta ve arkadaşları, internasyomal normalize oranı (INR) ≥ 3.0 'da tutmak üzere yapılan yüksek yoğunluklu warfarin tedavisinin, düşük-yoğunluklu warfarin \pm aspirin ya da tek başına aspirinden belirgin şekilde daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (yıllık tekrar oranları sırasıyla 0.013, 0.23 ve 0.18'dir). Warfarin tedavisi sırasında kanama komplikasyon oranları ise bir hasta için yılda 0.071 ve ağır kanama oranı ise 0.017 olarak hesaplanmıştır (97). Warfarin tedavisine ara verildiğinde ya da bırakıldığında tromboz olayları devam edeceğinden bu tedavi ömür boyu devam etmelidir (64). Warfarin tedavisi AFS'li kadınlara tavsiye edilmemektedir (98).

4.2. AKTİVASYONLA UYARILAN SİTİDİN DEAMİNAZ (AID)

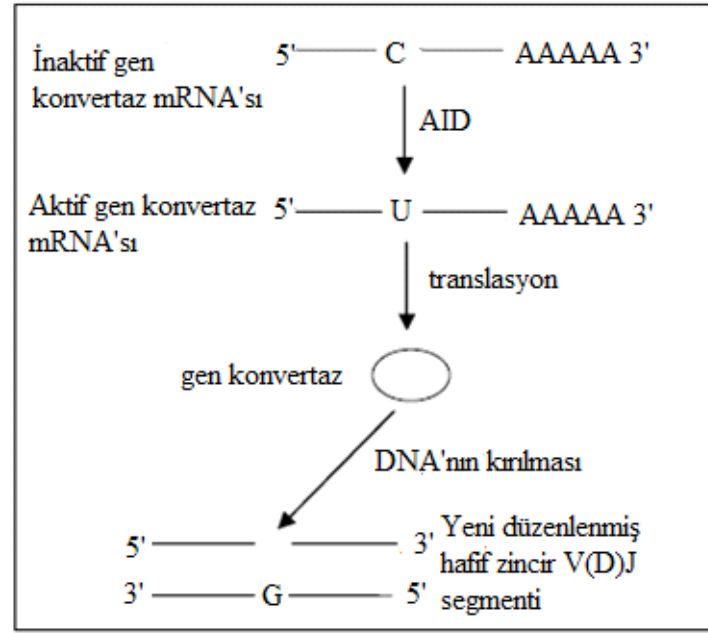
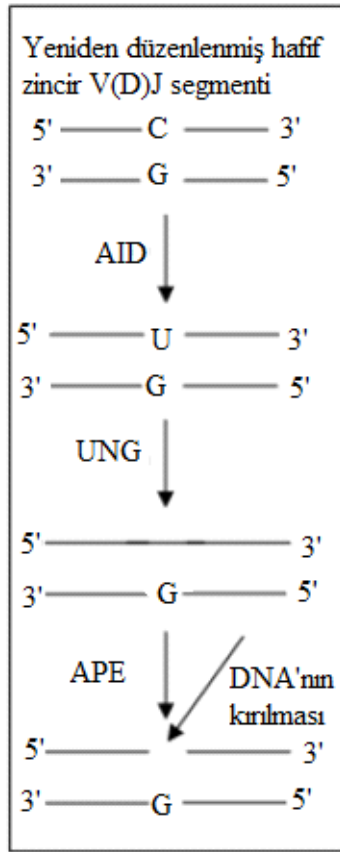
Aktivasyonla indüklenen sitidin deaminaz, sitidin deaminaz ailesinin bir üyesidir (2). İmmunoglobulin (Ig) çeşitliliğinde büyük önem taşıyan üç reaksiyon için gereklidir. Bunlar; bunlar somatik hipermutasyon (SHM), sınıf çevrim rekombinasyonu (CSR) ve gen dönüşümüdür (GC) (3, 5). AID proteininin sentroblast B hücrelerinde tanımlanması sınırlıdır ve AID proteini olmayan farelerde, SHM ve CSR görülmemektedir (3). AID proteini veya Urasil DNA glikozilaz (UNG) gibi trans faktörlerin haricinde bazı cis acting faktörler de bu sistemde etkili olmaktadır (99, 100).

AID'in önemli bir kısmı B hücrelerinin sitoplazmasında bulunur. Aynı zamanda nükleusta iki şıklı yerleşim sinyali ve karboksi-uçlu bir nükleustan çıkma sinyali bulunur (101, 102) ve nükleus çıkışı baskılandığında nükleus içinde bulunur (103). B hücreleri sınıf çevrim rekombinasyonu için uyarıldığında ise gerek nükleustaki gerekse sitoplazmadaki AID düzeyleri yükselir (104, 105).

AID'in, DNA'daki sitozin bazını urasil bazına deaminasyonunu sağlayarak SHM mekanizmasını başlattığı düşünülmektedir (107, 108) ve Ig genlerindeki tek sarmallı DNA içindeki sitidin kalıntılarını deamine ederek bu reaksiyonu başlattığına inanılmaktadır. Bu reaksiyonun Ig dışı genlerde genom stabilitesini bozma ve DNA hasarı oluşturma olasılığı bulunmaktadır. Biyokimyasal çalışmalarda AID'in ssDNA'ya özgü bir sitidin deaminaz olduğu ve düz dsDNA ya da DNA-RNA hibridleri üzerinde aktivitesinin olmadığı ya da çok az olduğu görülmekle birlikte, güncel yayınlarda çift zincir DNA'da da iş gördüğü gösterilmiştir (108-112).

APOBEC-1 (Apolipoprotein B mRNA Editing Catalytic Polypeptide 1) geni sitidin deaminaz ailesinin üyesini kodlar. Kodlanan protein APOBEC-1 tamamlama faktörü (ACF) ve APOBEC-1 uyarıcı protein (ASP) ile holoenzim oluşturur (113). AID proteini, mRNA üzerinde değişiklik yapan APOBEC-1 proteini ile benzerdir. Bu protein apoB mRNA'da C bazını U bazına çevirir ve böylelikle bir durma kodon ve küçük bir protein üreterek farklı reseptörlere bağlanmasını sağlar (114). Bu olay; AID proteinin mRNA üzerinde değişiklik yapmasıyla bir endonukleaz enziminin üretilmesi ve bu enzimin değişebilen (V) geninde etkili olması ile SHM, GC ve CSR olaylarını başlattığı düşüncesine neden olmuştur (115).

AID proteinin fonksiyonunu açıklamak için iki zıt görüş vardır. Birincisi RNA editing model, diğeri ise DNA editing modeldir (Şekil 2.).



A) DNA editing modeli

B) RNA editing modeli

Şekil 2. DNA Editing ve RNA Editing Modeli; AID Proteini İle Başlayan DNA Editing Ve RNA Editing Modeli.

DNA editing modeline göre; AID sitozin (C) nükleotidini deaminasyon yaparak (U) nükleotidine çevirir ve böylelikle G/U yanlış çaprazlaşması olur. UNG proteini urasili DNA'dan kopartır, apürinik/aprimidinik (AP) endonükleaz enzimi kalan bağları keser ve bir boşluk oluşturur (Şekil 2.A). En son olarak da DNA polimeraz zeta (pol zeta) gibi translezyonal polimerazlar tarafından tamir edilir ve hipermutasyona neden olur (4, 116, 117).

Son çalışmalarda, DNA editörü olarak çalışması nedeni ile de-metilasyon yollarında anahtar bir molekül olabileceği görüşü savunulmaktadır. RNA editing modeli ise asıl olarak AID proteininin RNA üzerinde değişiklik yapan enzimle (APOBEC-1) benzer olmasından kaynaklanmaktadır (3). RNA editing modeline göre; AID proteini tanımlanmamış bir mRNA'yı tanır ve C bazını U bazına çevirir. Bu mRNA'dan bir

endonükleaz enzimi üretilir ve V geninde veya switch bölgesinde DNA' yı keser (Şekil 2.B.) (4, 116, 117).

AID'in Ig ve Ig dışı gibi tüm genlerde mutasyon oluşturma yeteneği vardır ve bu nedenle yaygın genom hasarı oluşturmalarını önlemek için kontrol altında tutulması gerekir. AID'in aşırı sunumu somatik hipermutasyon oranını artırmaktadır (118, 119, 120). Bu da fizyolojik koşullar altında AID'in somatik hipermutasyon ve sınıf çevrim rekombinasyonu için hız sınırlayıcı bir faktör olduğunu düşündürür.

5. MATERİYAL VE YÖNTEM

Çalışma grubu 2006-2009 yılları arasında İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı polikliniğinde takip edilen, trombotik komplikasyonların doppler ultrasonografi, ventilasyon perfüzyon sintigrafisi, venografi, splenoportografi, manyetik rezonans anjiyografi, koroner anjiyografi, periferik anjiyografi ile doğrulanmış olan kesin primer AFS tanısı konmuş olgulardan oluşturuldu.

KLL hastaları ve sağlıklı erişkin kontrol grubunun periferik kan örneklerinden öncelikle total RNA izolasyonu yapıldı. Daha sonrasında total RNA örneklerinden cDNA elde edildi. Hedef gen (AID) ve referans gene (HPRT1) ait primer ve prob kullanılarak Q RT-PCR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) ile hedef ve referans gene ait cDNA' lar çoğaltıldı. Genlerin ekspresyon düzeyleri ölçülerek kaydedildi.

5.1. MATERİYAL

5.1.1. Sarf Malzemeler

Total RNA İzolasyon Kiti	Filtreli Tüp	Oligo-dT primer
1.5 ml santrifüj Tüpü	Distile Su	0.5 ml santrifüj Tüpü
Bağlanma Tamponu	Sosyüm Asetat	Ribonükleaz inhibitörü
Eritrosit Bağlanma Tamponu	EDTA	dNTP Mix
Yıkama Tamponu-I	cDNA Sentez Kiti	Capillar

5.1.2. Cihazlar

Real-Time PCR	Santrifüj	Vortex
Thermal Cycler	Elektroforez Sistemi	

5.2. YÖNTEM

5.2.1. Total RNA İzolasyonu

70 hasta bireyi ve 70 kontrol bireyi için, içerdiği özel filtreli tüpleri ile periferik kandan izolasyon yapılma amaçlı DNaz I uygulamasını da kapsayan ticari bir kit (Roche, High Pure RNA Isolation Kit) kullanılarak Total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Eritrosit parçalama tamponu ya da fikol solüsyonu kullanılarak periferik kandan lökositler ayrılıp, 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. 400 µl bağlanma tamponu eklenerek çalkalamalı karıştırıcıda 15 saniye karıştırıldı. Karışım toplama tüpü içine yerleştirilmiş filtreli tüpe aktarıldı ve oda sıcaklığında 10.000 dev./dak. hızda 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpüne geçen sıvı atıldı. Filtreli tüpün üzerine 90 µl DNaz I inkübasyon tamponu ve 10 µl DNaz I içeren karışım eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 15 dakika sonrasında 500 µl Yıkama Tamponu-I eklenip 10.000 dev./dak. hızda 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpüne geçen sıvı atıldı ve filtreli tüpe 250 µl Yıkama Tamponu-II eklenip 13.000 dev./dak. hızda 4 dakika santrifüjlendi. Filtreli tüp toplama kabından çıkartıldıktan sonra 1.5 ml'lik boş bir santrifüj tüpünün içerisine yerleştirildi. Üzerine 50 µl çözücü tampon eklenip ve 10.000 dev./dak. hızda 1 dakika santrifüjlendi. Filtreden geçerek santrifüj tüpünde toplanan, içerisinde RNA çözeltilisini içeren yaklaşık 25-30 µl sıvı -70°C'de saklandı.

5.2.2. Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi

Morfolinopropan sülfonikası (MOPS) agaroz jeli hazırlamak için 0.5 gram agaroz 36 ml RNaz içermeyen distile su içerisine konuldu ve agaroz tamamen çözülmeye kadar ısıtıldı. Çözelti oda ısısında veya musluk altında elle dokunulabilir sıcaklığa erişene kadar soğutuldu ve içerisine yürüme tamponu olan MOPS'dan 5 ml ve %37'lik formaldehitden 9 ml eklendi. Kabarcıkların oluşmamasına dikkat edilerek karıştırıldı. MOPS ve formaldehit eklenmesi zaten soğutulmuş olan agaroz jel çözeltilisinin daha fazla soğumasına neden olacağı için, dökme işlemi agaroz tamamen jel haline dönüşmeden hızlı bir şekilde gerçekleştirildi. Son olarak etidyum bromür eklenerek 75 °C'de 10 dakika ısıtılıp buz

üzerine alınan total RNA örnekleri, jel katılaştıktan sonra kuyucuklara yüklendi. 28 ve 18S rRNA'lar yoğunluklarından dolayı, tipik iki bant olarak görüldü.

10X MOPS hazırlanışı:

0.4 M MOPS, pH 7.0

0.1 M sodyum asetat

0.01 M EDTA

5.2.3. cDNA Sentezi

Kontrol ve hasta gruplarına ait elde edilen total RNA örneklerinden ticari bir kit (Fermentas, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) kullanılarak cDNA'ya dönüştürüldü. Üretici firmanın önerdiği şekilde işlemler gerçekleştirildi.

1. RNA çözeltisi -70°C 'den alınarak buz üzerine konuldu.
2. Spektrofotometrede ölçüm yapılarak 1 μg RNA içerecek hacimde çözelti alındı.
3. Üzerine 1 μl Oligo-dT primer 100 μM ve toplam hacmi 20 μl 'ye tamamlayacak kadar nükleazsız DEPC'li distile su eklendi.
4. Çözelti 0,5 ml'lik PCR tüpünde karıştırıldı ve 70°C 'de 5 dk bekletildi ve hemen buza konuldu.
5. Buz üzerinde konularak sırasıyla, 4 μl tepkime tamponu, 1 μl ribonükleaz inhibitörü (20U/ μl), 1 μl dNTP karışımı eklendi.
6. Karışım Pipet ile karıştırılıp 37°C 'de 5 dakika bekletildi.
7. 1 μl M-MuLV ters transkriptaz (20U/ μl) eklenerek 42°C 'de 1 saat ardından 70°C 'de 10 dk bekletilip, buza konuldu.
8. Elde edilen cDNA $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Nükleazsız DEPC'li steril su	Reaksiyon hacmi 20 μ l'ye tamamlandı
Oligo-dT primer 100 μ M	1 μ l
Total RNA	1 μ g
0,5 ml'lik PZR tüpünde karıştırıldıktan sonra 70°C'de 5 dakika bekletildi ve tüpler hemen buza alındı. Karışımın üzerine aşağıda belirtilen maddeler eklendi.	
Reaksiyon tamponu 10Mm	4 μ l
dNTP karışımı	1 μ l
Ribonükleaz inhibitörü (20U/ μ l)	1 μ l
Pipet ile karıştırılıp 37°C'de 5 dakika bekletildi. Karışımın üzerine 1 μ l M-MuLV ters transkriptaz (20U/ μ l) eklendi ve 42°C'de 1 saat bekletildi. Ardından 70°C'de 10 dakika bekletilerek reaksiyon sonlandırıldı. Buzda soğutulan örnekler -20°C'de saklandı.	

Tablo 7. cDNA Sentezi İçin Kullanılan Bileşenler

5.2.4. cDNA Varlığının Doğrulanması

Revers Transkripsiyon basamağından sonra elde edilen örneklerdeki cDNA varlığı % 1.5 (w/v)'luk agaroz jelde cDNA'ların varlığı ve kalitesi kontrol edildi.

5.2.5 AID Geni İçin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Hedef gen olan AID geninin periferik kandaki anlatım düzeyini belirlemek için AID cDNA'sına özgün primerler CCACTATGGACAGCCTCTTGA ve TGGTTAAGTTTTACAGGCG) ve FAM (6-karboksifloresein) işaretli prob, "Probe Finder 2.36" yazılımı ile tasarlandı ve sentezletirildi. Referans gen Hipoksantin

fosforiboziltransferaz 1 (HPRT1) için de primer ve prob tasarlanıp sentezletirildi. Tablo 8.'de belirtilen PZR bileşenleri ile hazırlanan 20 µl'lik reaksiyon karışımına Tablo 9.'da verilen çoğaltım programı "LightCycler 2.0" (Roche) cihazı kullanılarak uygulandı.

PZR Bileşenleri	µl/Tüp
Nükleazsız steril distile su	10.3 µl
10X Taq tamponu	2 µl
dNTP karışımı (25mM)	1 µl
AID-F primer (10pmol/µl)	1 µl
AID-R primer (10pmol/µl)	1 µl
AID prob (15pmol/ µl)	1 µl
MgCl ₂ (25mM)	1.5 µl
Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	0.2 µl
Cdna	2 µl
Toplam Hacim	20 µl

Tablo 8. Gerçek Zamanlı PZR için PZR Bileşenleri

Program Türü	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	95	5 dk	-
Denatürasyon	95	10 sn	45
Bağlanma	55	15 sn	
Uzama	72	15 sn	

Tablo 9. AID transkript varlığının belirlenmesinde kullanılan Gerçek Zamanlı PZR programı

Her deneyde, yaklaşık miktarları önceden bilinen kontrol cDNA'ları da kullanılarak PZR verimi hesaplandı. Hedef ve referans gene (HPRT1) ait çoğaltılan cDNA'ların miktar değerlendirilmesi yapıp (Şekil 5.-Şekil 8.) farklılık oranları nicel olarak ortaya koyuldu.

6. BULGULAR

AFS hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında hedef gen olan AID düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Unpaired t test; t=3.984; p<0.001). AFS hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında referans gen olan HPRT1 düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Mann Whitney U test; U=1247.5; p=0.986).

	AFS (n=70)	Sağlıklı Kontrol (n=70)	P
Ortalama AID ED	36.67	42.17	< 0.001
Ortalama HPRT1 ED	30,05	30,12	0.986

Tablo 10. AFS ve sağlıklı kontrollerde AID ve HPRT düzeylerinin karşılaştırılması

Denklem 1. Pfaffl Denklemini

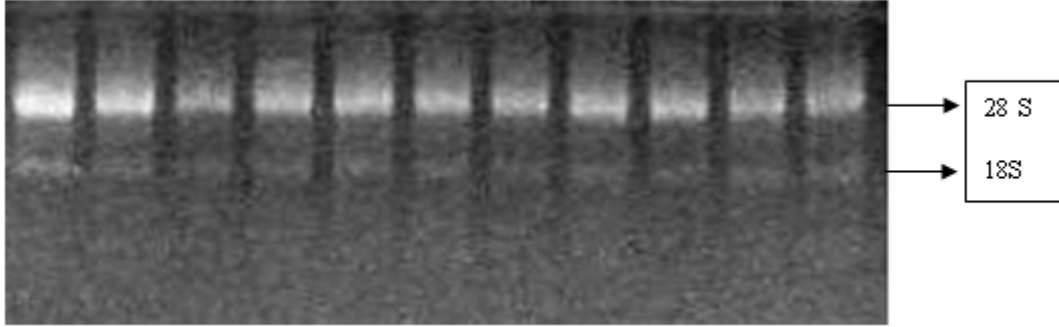
$$\text{Oran} = \frac{(E_{\text{hedef}})^{\Delta \text{ED hedef (kontrol-hasta)}}}{(E_{\text{referans}})^{\Delta \text{ED referans (kontrol-hasta)}}}$$
$$\text{Oran} = \frac{1,98^{5,5}}{1,97^{0,07}} = 39,7$$

E: PZR verimi, ED: Eşik değeri, Q- RT PZR sırasında her örneğin logaritmik faza girdiği döngü numarası.

6.1. AID GENİNİN ANLATIMI

6.1.1. Total RNA İzolasyon ve Kalitatif Tayini

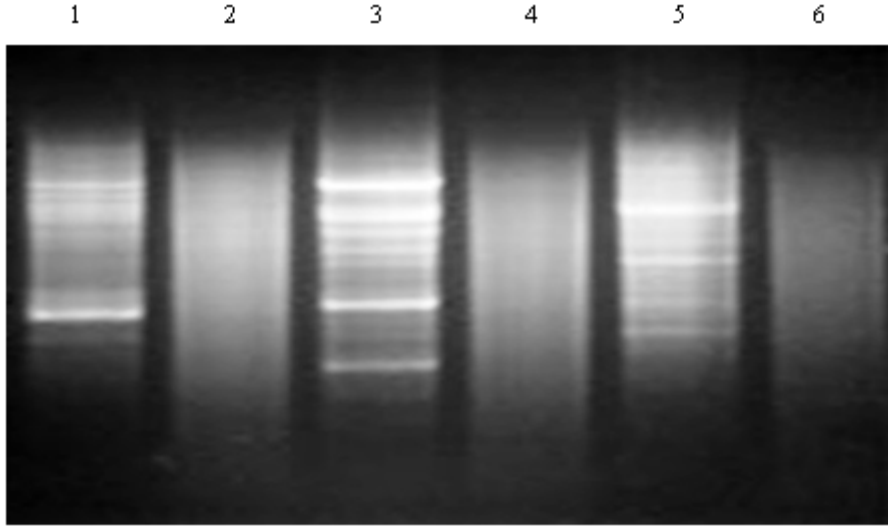
Total RNA izolasyonu, 70 AFS hastasına ve 70 sağlıklı kontrolden oluşan kontrol grubuna ait periferik kan örneklerinden Materyal ve Yöntem bölümünde 5.2.1.'de belirtilen yönteme göre gerçekleştirildi. Total RNA'nın parçalanmadan izole edilmesinin kanıtı olan 28S ve 18S'lik ribozomal RNA'lara ait bantlar formaldehit agaroz jel elektroforezinde parlak ve keskin şekilde gözlemlendi (Şekil 3.).



Şekil 3. Total RNA örnekleri. Fotoğrafta 28S ve 18S'lik rRNA'lar görülmektedir.

6.1.2. cDNA Sentezi ve Kalitatif Tayini

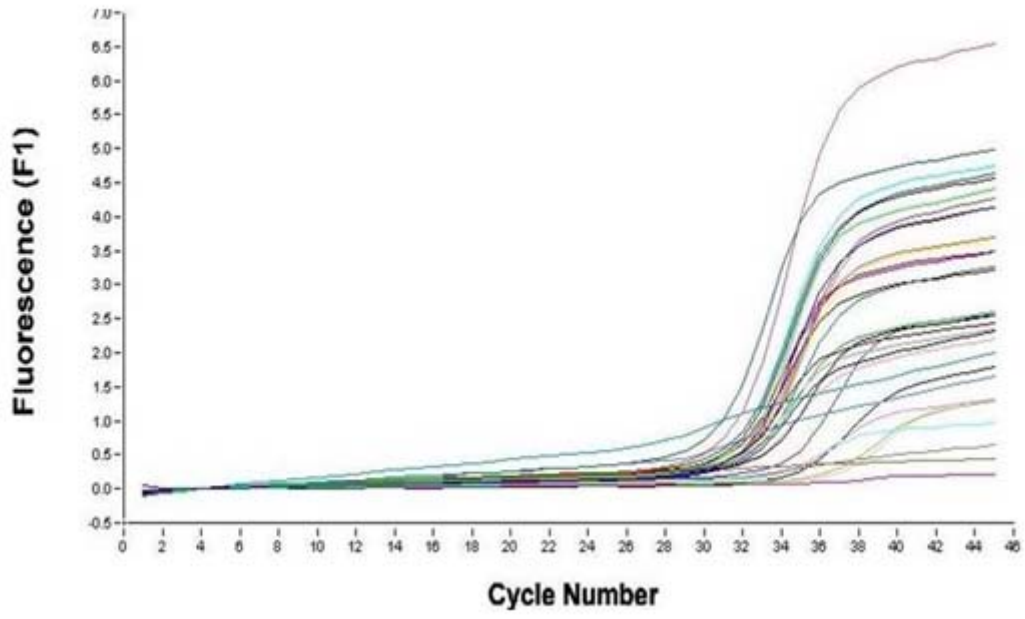
Total RNA örneklerinden cDNA sentezi, Materyal ve Yöntem Bölümü 3.2.3'de belirtilen yönteme göre yapıldı. Elde edilen cDNA örneklerinden 5'er µl alınıp %1,5 (w/v)'luk agaroz jelde analizi yapıldı. cDNA'lara ait bantlar UV ışık altında gözlemlendi (Şekil 4.).



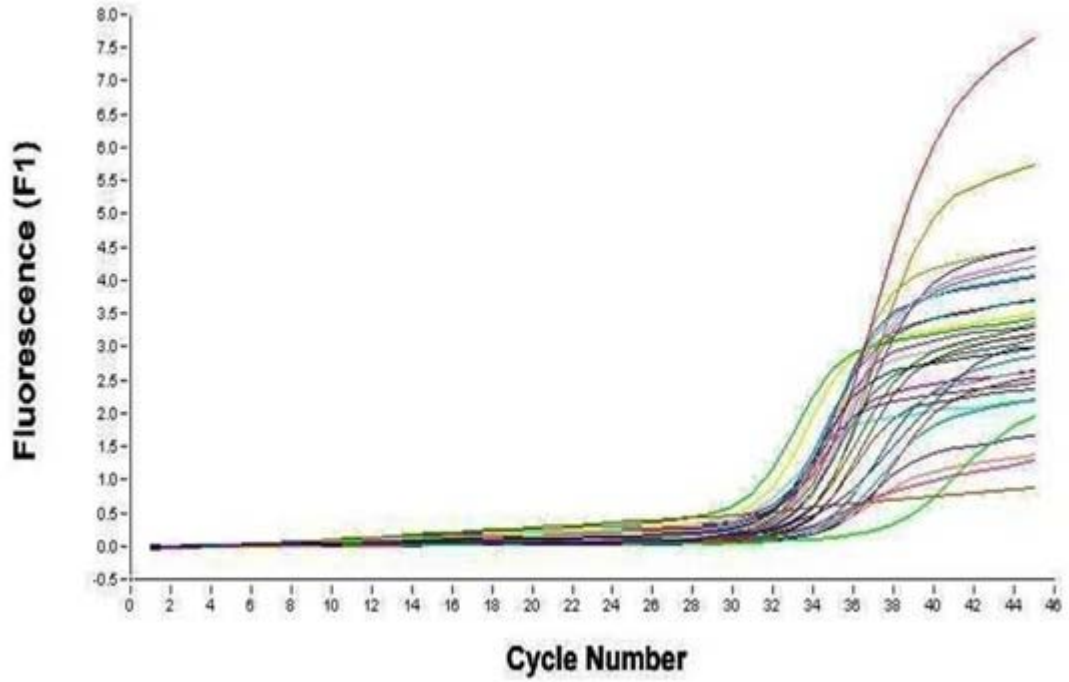
Şekil 4. cDNA sentezi ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görünüşleri. 1-6 cDNA örnekleri.

6.1.3. Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Q RT-PCR) Analizleri

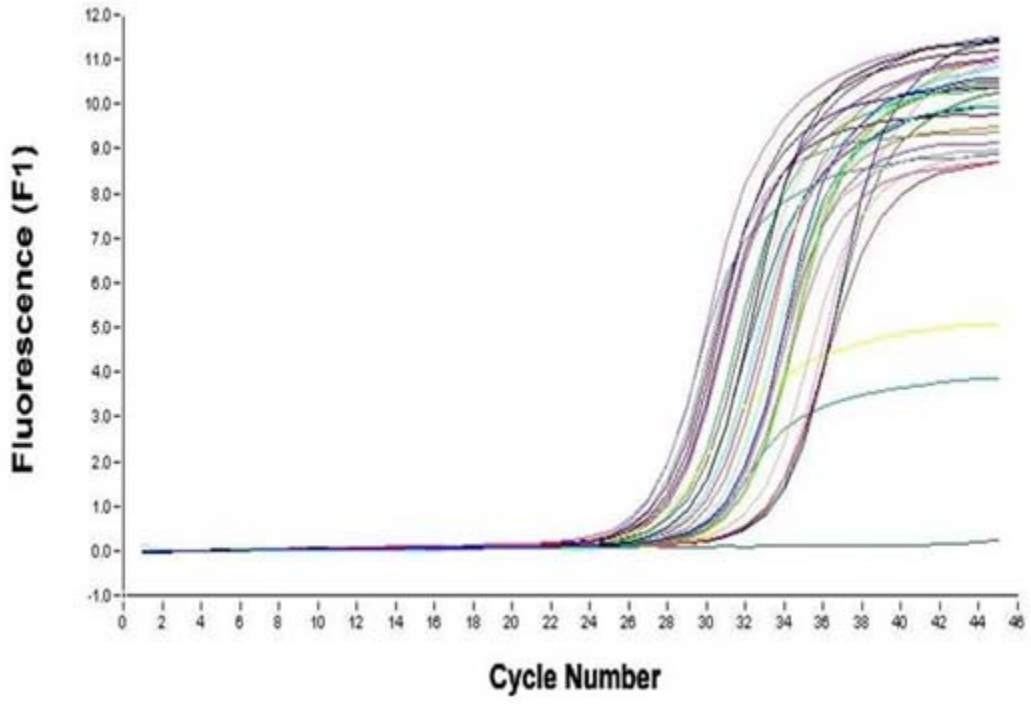
İzole edilen total RNA örneklerinden AID genine ait olan mRNA'ları belirlemek için Materyal ve Yöntem Bölümü 5.2.3.'de belirtildiği gibi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. Kontrol ve hasta bireylere ait hedef gen olan AID ve referans gen olan HPRT1'e ait eşik değerlere göre belirlenen cDNA miktarları Şekil 5. , 6. , 7. ve 8.'de verildi.



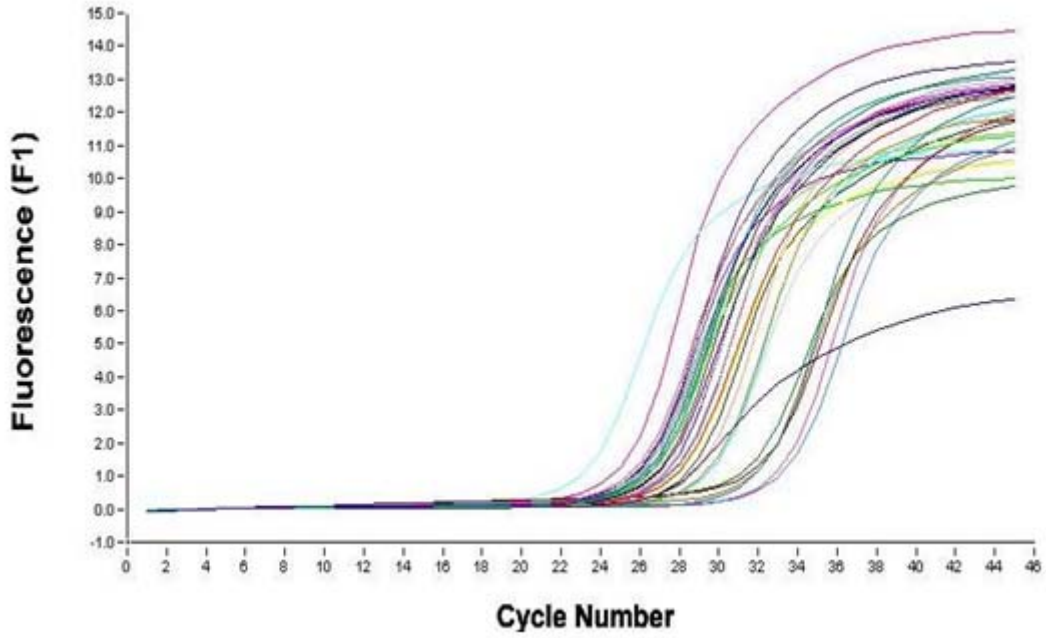
Şekil 5. Kontrol bireylerinde AID cDNA miktarları



Şekil 6. AFS hastalarında AID cDNA miktarları.



Şekil 7. Kontrol bireylerinde referans gen HPRT1'in cDNA miktarları.



Şekil 8. AFS hastalarında HPRT1'in cDNA miktarları.

Q- RT PZR sonucu elde edilen mRNA miktar verileri ile Pfaffl denklemi kullanılarak hesaplama yapıldı. Hedef gen/referans gen sonucu 39,7 olarak bulundu. Buna göre hedef gen olan AID mRNA miktarının AFS grubunda, kontrol grubunun yaklaşık 40 katı kadar olduğu belirlendi.

7. TARTIŞMA

Harris ve Hughes tarafından 1983 yılında orijinal olarak tanımlanan “Antikardiyolipin Sendrom” kliniğinde tromboz, abortus ve serebral bilgiler mevcuttu (22). Hasta serumunda bulunan antikörlerin kardiyolipinden başka diğer fosfolipidlere de bağlandığı saptandı ve Antifosfolipid Sendrom (AFS) terimi tanımlandı (27).

AFS, arteriyel ve venöz tromboz eğilimi, dolaşımında orta ve yüksek seviyede antikörlerin varlığı ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. Sendromun patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. AFS’de trombotik olaylar erken yaşta gelişebilir, hem arteriyel hem de venöz sistemde olabilir ve tekrarlama riski yüksektir.

Antikor çeşitliliğinde rol oynayan mekanizmalar hala tam olarak çözülememiştir. Aktivasyonla indüklenen sitidin deaminaz (AID), Ig çeşitliliğinde büyük önem taşıyan SHM, GC ve CSR reaksiyonları için gereklidir ve Ig, Ig dışı gibi tüm genlerde mutasyon oluşturma yeteneği vardır. Bu mekanizmalar insanlarda ve farelerde başlıca SHM ve CSR; sığır, at, koyun, domuz gibi çiftlik hayvanlarında ve kuşlarda ise GC ve yine CSR’dır (99, 115, 121, 122). SHM, immunglobulin ağır zincir (VH) ve immunglobulin hafif zincir (VL) genlerinde nokta mutasyonlara yol açarak daha yüksek afiniteli antijen bağlayan bölge oluşturur (123, 124). Normal vücut hücrelerinin aksine, B hücrelerinde düzenlenmiş V genine has olan bu mutasyon, yabancı organizmalara karşı antikörlerin olgunlaşması sonucu, bu organizmalara daha iyi bağlanabilme yeteneği kazandırır. B hücrelerinin sistemik otoimmün hastalıkların gelişiminde, sitokinlerin ve otoantikörlerin üretiminde kritik bir rol oynadığı, aynı zamanda antijen sunumu gibi bazı mekanizmaları da desteklediği bilinmektedir. Bununla birlikte otoantikörlerin sistemik otoimmün hastalıklarda karakteristik bir rol oynadığı bilinmesine rağmen, patogenezi hala tartışma konusudur (2).

Muramatsu ve arkadaşlarının 2000 yılında farelerde yaptıkları çalışmada, AID proteini olmayan farelerde SHM ve CSR görülmemiş (3) ve bununla birlikte Revy ve arkadaşlarının otosomal resesif kalıtsal bir hastalık olan Hyper-IgM (HIGM2) olan farelerde yaptığı çalışmada, AID proteini aktif olmadığından antikor çeşitliliğinde etkili olan SHM ve CSR bulunmamıştır (5). AID proteini eksikliğinde ulaşılan bu sonuçları destekleyen diğer bir çalışmada, AID proteini aktif olmayan tavuk B lenfosit hücresi olan DT40 hücrelerinde GC görülmemiştir (125). Ig çeşitliliğinde önem taşıyan SHM, GC ve

CSR için gerekli olduğu düşünölen AID geni ile yapılan araştırmalarda bir başka grup farklı sonuçlara ulaşmıştır.

Chen ve arkadaşlarının bir çalışmasında, C57BL/6 (B6 background), AID-/- fareleri, B6-lymphoproliferative (lpr) ve AID-/- lpr farelerini kullanarak AID'in otoimmüneye katkısı araştırılmıştır. Buna göre, AID-/- lpr farelerinde B hücreleri büyümelerinin ve bazı hastalık belirtilerinin lpr farelerine göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. AID-/- lpr fareleri ile B6-lpr fareleri karşılaştırıldığında, AID-/- lpr olanlarda daha şiddetli böbrek patolojisi ve IgM antikolarının önemli ölçüde yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak da AID eksikliğinin B hücrelerini otoimmüneye yönlendirdiği ve AID-/- lpr farelerde GC oluşumunun kesin şekilde arttığı gösterilmiştir. B hücrelerindeki GC artışı AID-/- lpr farelerinde otoimmüneye şiddetine katkı sağlayabilmektedir. Aynı zamanda yapılan çalışmada kontrol grubu B6 fareleri, AID-/-, lpr ve AID-/- lpr fareleri üzerinde splenomegali incelenmiştir. Buna göre kontrol grubu ve AID-/- arasında anlamlı bir fark görölmemiştir. Aynı zamanda lpr ve AID-/- lpr fareleri karşılaştırıldığında, lpr farelerine oranla AID eksikliği olan lpr farelerinde ileri derecede gelişmiş bir splenomegali göze çarpmaktadır (2). Bu çalışmanın sonuçlarına göre; AID eksikliği, kontrol grubunda otoimmüneye katkı sağlamamakla birlikte; hasta gruplarında anlamlı bir şekilde hastalığın evrelerinin daha şiddetli olmasına neden olduğu anlaşılmaktadır.

Quartier ve arkadaşlarının, otozomal resesif Hyper-IgM sendromu görölen 29 hastada yapılan klinik, immünojenik ve genetik analizler sonucunda, AID eksikliği olan hastalarda otoimmün ve inflamatuvar bozukluklar görölmüştür (126). Hase ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da AID eksikliğinin B hücrelerinin dengesiz çoğalmasına yol açan çeşitli mekanizmalara yol açtığı ileri sürölmüştür. Bu çalışmaların sonuçları da Chen ve arkadaşlarının bulgularını desteklemektedir (127).

McCarthy ve arkadaşları, B-KLL'li 20 hastanın kan örneklerinde AID mRNA ekspresyonunu incelemişlerdir. Bu alışma sonucunda 8 vakada AID mRNA ekspresyonu ve 2 eklentili varyantını belirlerken; 12 olgu ve 5 normal periferik kan B hücre örneğinde ise standart şartlar kullanarak herhangi bir ekspresyon saptamamışlardır. Yüksek oranda AID eksprese eden 8 vakadan 7'sinde mutasyon gözlenmemiştir. Bu durum, mutasyonsuz grubun inaktif veya defektif somatik hipermutasyonlu B hücrelerinden oluştuğunu ve kötü bir prognoz belirleyicisi olduğunu bize göstermiştir (128).

Heintel ve arkadaşlarının 2004 yılında, B-KLL'li 80 hasta kan örneklerinde yaptığı çalışmada, mononökleer hücrelerde Q PCR yöntemi ile AID mRNA ifadesini

incelemişlerdir. AID ekspresyonunu 80 hastanın 45'inde farklı seviyelerde saptamışlardır (129). AID'in B-KLL'de kötü bir prognostik faktör olabileceği vurgulanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları ile benzer olan bir çalışmada, KLL'li hasta grubunda AID ekspresyonunun sekiz kat fazla olduğu, AID'in fazla ekspresyonunun bu hastalardaki nokta mutasyonları ve kromozom kırıklarının nedeni olabileceği bildirilmiştir (130). B-KLL ile ilgili yapılan bir başka çalışmada KLL hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında AID düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmiştir. 50 B-KLL hastası ve 50 sağlıklı erişkinden alınan kan örneklerinde mRNA ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. AID mRNA düzeyleri B-KLL hastalarında, sağlıklı erişkin grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek hesaplanmıştır (118). AID ekspresyonunun fazlalığı ile meydana geldiği düşünülen otoimmün antikorlar, Zan ve arkadaşlarının MRL/faslpr/lpr fareleri kullanarak yaptıkları çalışmalarında da gösterilmiştir. Lupus eğilimli bu farelerde, DNA lezyonları ve bununla birlikte belirgin bir şekilde gelişmiş SHM ve CSR oluştuğu gösterilmiştir. Lupus B hücrelerinde otoantikorların düzenlenmesinin bozulmasının, AID'in uyarılmasıyla ilişkili olduğu görüşü desteklenmektedir. AID'in tetiklenmesi ile fazla ekspresyonunun, otoimmün antikor oluşumu için kritik olduğunu düşündürmektedir (131).

Yukarıda tartışılan farklı hasta grupları ile yapılan çalışma sonuçları ekspresyon fazlalığı açısından bu tezin sonuçları ile uyumla birlikte, AFS ve AID ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmadığı için sonuçlarımızı doğrudan tartışmamaktayız. Bulgularımızı değerlendirdiğimizde, farklı hasta gruplarında yapılan çalışmalara göre; AID geninin fazla ifade edilmesi otoimmün bir hastalığın meydana gelmesini etkileyebileceği gibi, eksikliğinde ise hastalığın şiddetini arttırdığı düşünülebilir.

8. SONUÇ

AID geni ile ilgili gerçekleştirilen çalışmaların ışığında, bu genin otoimmün hastalıkları etkilediği ve ortaya çıkmasında tetikleyici rol oynadığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda 70 AFS hastası ile 70 sağlıklı erişkinde kan örneklerinde AID mRNA ekspresyon düzeyleri araştırıldı. AID mRNA miktarının, AFS hastalarında sağlıklı erişkin grubuna göre 40 kat fazla olduğu hesaplandı.

AID'in bu aşırı sunumu sonucunda, somatik hipermutasyon oranını artırma ihtimali ile birlikte, otoantikor oluşum mekanizmasında anahtar moleköl olabileceği düşünülmüştür.

9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana tuttuğu ışık ile ilerlediğim bu yolda deneyimlerini, bilgi birikimini, yardımlarını esirgemeyen; özgüvenimi yeniden kazandıran Enstitü Müdürü Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ'a;

Hiç bıkmadan, usanmadan ve güler yüzünü hiç eksik etmeden, yetişmemde üzerimde kuşkusuz çok büyük emeği olan, bilimsel birikimini benimle paylaşan, her daim desteğini arkamda hissettiğim tez danışman hocam Yard. Doç. Dr. Veysel Sabri HANÇER'e;

Tez sürecim boyunca elini ve desteğini üzerimden çekmeyen, dostluğuyla her zaman yanımda olduğu için İpek YAŞA'ya;

Tezimin başlangıcından itibaren görüşlerini, yardımlarını, bilgisini benimle paylaştığı ve dostluğu ile beni yalnız bırakmadığı için Öğr. Gör. Nihan AYTEKİN'e;

Lisans dönemimin bana verdiği en güzel hediye; hayatımın her anını benimle hissederek yaşayan, tez dönemimin tüm sancılı aşamalarında anlayışını, sevgisini benden mahrum etmediği için; olmayan kardeşimin yerini boşluk kalmayacağına dolduran hayatımın demir başı Tuğba AYDOĞAN'a;

Tez yazım dönemimde benimle sabahlara kadar nöbet tutan, tüm kahrımı çeken, desteğini, anlayışını, sevgisini benden esirgemeyen; evimi, hayatımı paylaştığım canım dostum Gözde ÖZ'e;

Her koşulda yanımda olduğunu bilmenin verdiği güven ve huzur ile sırtımı yasladığım; hayatımdaki en iyi dostum Fırat TUNCAL'a;

Onlara sahip olarak hayatta her zaman herkesden bir adım önde ve çok şanslı olduğumu düşündüğüm; beni bu günlere getiren, pamuk gibi olan kalbinde dinlendiğim, kocaman güvenine ve sevgisine sırtımı dayadığım; desteği, emeği için Dünyada hiçbir şeyi ondan fazla sevemeyeceğim canım babam Erkan VARLIK'a,

Kendimden çok düşündüğüm, mümkün olsa da hiç yanından ayrılmam dediğim, hayattaki tüm sıfatları fazlasıyla üstlenen; yaptığı tüm fedakarlıklar ve desteği için, kesinlikle gerçek bir melek olduğuna inandığım hayatımın meleği, canım annem Müzeyyen VARLIK'A ve tüm aileme;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

10. KAYNAKLAR

1. Goodnight SH. Antiphospholipid antibodies and thrombosis. *Curr Opin Hematol.* 1994, 1: 354-361
2. Chen L, Guo L, Tian J, Zheng B, Han S. Deficiency in activation-induced cytidine deaminase promotes systemic autoimmunity in *lpr* mice on a C57BL/6 background. *Clin Exp Immunol.* 2010, 159:169-175.
3. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell.* 2000, 102:553-563.
4. Martin A, Bardwell PD, Woo CJ, Fan M, Shulman MJ, Scharff MD. Activation-induced cytidine deaminase turns on somatic hypermutation in hybridomas. *Nature.* 2002, 415:802-806.
5. Revy P, Muto L, Levy Y, et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell.* 2000, 102:565-575.
6. Kotani A, Kakazu N, Tsuruyama T, Okazaki I, Muramatsu M, Kinoshita K, Nagaoka H, Yabe D, Honjo T. Activation-induced cytidine deaminase (AID) promotes B cell lymphomagenesis in Emu-cmyc transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* . 2007, 104:1616-1620.
7. Sarıbaşak N. Rev1 geninin DT40 hüçlerinde ‘‘knock out’’ edilerek somatik hipermutasyona etkisinin incelenmesi. İstanbul, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2005.
8. Muramatsu M, Sankaranand VS, Anant S, Sugai M, Kinoshita K, Davidson NO, Honjo T. Specific Expression of Activation-induced Cytidine Deaminase (AID), a Novel Member of the RNA-editing Deaminase Family in Germinal Center B Cells. *J Biol Chem.* 1999, 274:18470-18476.
9. Gibson DS, Banha J, Penque D, Costa L, Conrads TP, Cahill DJ, O'Brien JK, Rooney ME. Diagnostic and prognostic biomarker discovery strategies for autoimmune disorders. *J Proteomics.* 2010, 73:1045-60.
10. Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med.* 2002, 346:752-763.
11. Thomas RH. Hypercoagulability syndromes. *Arch Intern Med.* 2001, 161:2433-2439.

12. Park KW. Antiphospholipid syndrome. *Int Anesthesiol Clin.* 2004, 42:45-57.
13. Wasserman A, Neisser A, Bruck C. Eine serodiagnostische reaktion bei syphilis. *Dtsch Med Wochenschr.* 1906,32:745-746.
14. Pangborn MC. A new serologically active phospholipid from beef heart. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1941, 48:484.
15. Pangborn MC. Isolation and purification of a serologically active phospholipid from beef heart. *J. Biol Chem.* 1942, 143:247.
16. Moore JE, Mohr CF. Biologically false positive serological tests for syphilis. Type, incidence, and cause. *JAMA.* 1952, 150:467-473.
17. Conley CL, Hartmann RC. A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1952, 31:621-622.
18. Feinstein DI, Rappaport SI: Acquired inhibitors of blood coagulation. *Prog Hemost Thromb.* 1972, 1:75-95.
19. Bowie EJ, Thompson JH, Pascuzzi CA, Owen CA. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *J Lab Clin Med.* 1963, 62:416-430.
20. Mueh JR, Herbst KD, Rapaport SI. Thrombosis in patients with lupus anticoagulant. *Ann Intern Med.* 1980, 92:156-159.
21. Firkin BG, Howard MA, Radford N. Possible relationship between lupus inhibitor and recurrent abortion in young women. *Lancet.* 1980, 2:366.
22. Hughes GR. Thrombosis, abortion, cerebral disease and the lupus anticoagulant. *Br Med J.* 1983, 287:1088-1089.
23. Boey ML, Colaco CB, Gharavi AE, Elkon KB, Loizou S, Hughes GRV. Thrombosis in Systemic lupus erythematosus: striking association with the presence of circulating lupus anticoagulant. *Br Med J.* 1983, 287:1021-1023.
24. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 1983, 2:1211-1214.
25. Harris EN, Pierangeli S. The anticardiolipin ELISA test. *Clinical Immunol Newslett.* 1991, 11:33-37.
26. Hughes GR, Khamashta MA. The antiphospholipid syndrome. *J R Coll Physicians Lond.* 1994, 28(4):301-304.
27. Harris EN, Baguley E. Clinical and serological features of the antiphospholipid syndrome (APS). *Br J Rheum.* 1987, 26:1-9.

28. Asherson RA: A 'primary' antiphospholipid syndrome?. *J Rheumatol.* 1988, 15:1742-1746.
29. McNeil HP, Chesterman CN, Kirilis SA: Anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulants compose separate antibody subgroups with different phospholipid binding characteristics. *Br J Haematol.* 1989,73:506-513.
30. Galli M, Comfurius P, Maassen C. et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet.* 1990, 335:1544-1547.
31. Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RF. Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid bound human prothrombin. *Thromb Haemost.* 1991, 66:629-632.
32. Permpikul P, Rao LV, Rapaport SI. Functional and binding studies of the roles of prothrombin and β -2 glycoprotein-I in the expression of lupus anticoagulant activity. *Blood.* 1994, 83:2878-2892.
33. Asherson RA: The catastrophic antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol.* 1992, 19:508-512.
34. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum.* 1999, 42:1309-1311.
35. Kaul M, Erkan D, Sammaritano L, Lockshin MD. Assesment of the 2006 revised antiphospholipid syndrome classification criteria. *Ann Rheum Dis.* 2006, 66:927-930.
36. Greaves M. Antiphospholipid antibodies and thrombosis. *Lancet.* 1999, 353:1348-1353.
37. De Groot PG, Derksen RH: Pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost.* 2005, 3:1854-1860.
38. Sargent LA, Kahwa EK, Wilks RJ. Re. Antikardiyolipin antibodies are not an independent risk factor for stroke. *Stroke.* 2001, 32:1234-1237.
39. Roubey RAS. Tissue factor pathway and the antiphospholipid syndrome. *J Autoimm.* 2000, 15:217-20.
40. Kahraman R. Antifosfolipid sendromunda doku faktörü düzeyi ve doku faktörü promotor bölge -603A/G polimorfizminin değerlendirilmesi. İstanbul, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ABD, Uzmanlık Tezi, 2008.
41. . Pay S, Antifosfolipid antikor sendromu. İç Hastalıklarında Kanıta Dayalı Tıp. 2000, 311-329.

42. Krone KA, Allen KL, McCrae KR. Impaired fibrinolysis in the antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep.* 2010, 12:53–57.
43. Vianna JL, Khamashta MA, Ordi-Ros J, et al. Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: A European multicenter study of 114 patients. *Am J Med.* 1994, 96:3-9.
44. Erkan D, Cervera R, Asherson RA. Catastrophic antiphospholipid syndrome: Where do we stand? *Arthritis Rheum.* 2003, 48:3320-3327.
45. Asherson RA. The catastrophic antiphospholipid syndrome: A review of the clinical features, possible pathogenesis and treatment. *Lupus.* 1998, 2:55-62.
46. Mc Neil HP, Chesterman CN, Krilis SA. Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies. *Adv Immunol.* 1991, 49:193-280.
47. Cullis PR, Hooper MJ, de Kruijff B, Verkleij AJ, Tilcock CPS. Structural Properties and Functional Roles of Phospholipids in Biological Membranes. Chapter I in Phospholipids and Cellular Regulation. Ed: Kuo JF. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1998.
48. Love PE, Santoro SA. Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med.* 1990, 112:682-698.
49. Deleze M, Orica CV, Alarcon-Segovia D. Occurrence of both hemolytic anemia and thrombocytopenic purpura (Evans' syndrome) in systemic lupus erythematosus. Relationship to antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol.* 1988, 15:611-615.
50. Greaves M, Cohen H, MacHinn SJ, Mackie I. Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol.* 2000, 109:704-715.
51. Feinstein DJ. Lupus anticoagulant, thrombosis, and fetal loss. *N Eng J Med.* 1985, 313:1348-1350.
52. Santoro, SA. Antiphospholipid antibodies and thrombotic predisposition: Underlying pathogenetic mechanisms. *Blood.* 1994, 83:2389-2391.
53. Park KW. The Antiphospholipid syndrome. *Int Anesthesiol Clin.* 2004, 42:45-57.
54. Rand JH. Molecular pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Circ Res.* 2002, 90:29-37.
55. Capila I, Hernaiz MJ, Mo YD, Mealy TR, Campos B, Dedman JR, Linhardt RJ, Seaton BA. Annexin V–heparin oligosaccharide complex suggests heparan sulfate-mediated assembly on cell surfaces. *Structure.* 2001, 9:57-64.

56. Krikun G, Lockwood CJ, Wu XX, Zhou XD, Guller S, Calandri C, Guha A, Nemerson Y, Rand JH. The expression of the placental anticoagulant protein, annexin V, by villous trophoblasts: immunolocalization and in vitro regulation. *Placenta*. 1994, 15:601-612.
57. Shu F, Sugimura M, Kanayama N, Kobayashi H, Kobayashi T, Terao T. Immunohistochemical study of annexin V expression in placentae of preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest*. 2000, 49:17-23.
58. Rand JH, Wu XX, Andree HA, Ross JB, Rusinova E, Gascon-Lema MG, Calandri C, Harpel PC. Antiphospholipid antibodies accelerate plasma coagulation by inhibiting annexin-V binding to phospholipids: a “lupus procoagulant” phenomenon. *Blood*. 1998, 92:1652-1660.
59. Oshiro BT, Silver RM, Scott JR, Yu H, Branch DW. Antiphospholipid antibodies and fetal death. *Obstet Gynecol*. 1996, 87:489-493.
60. Nemerson Y. The tissue factor pathway of blood coagulation. *Semin Hematol*. 1992, 29:170-176.
61. Mackman N. Regulation of the tissue factor gene. *FASEB J*. 1995, 9:883-889.
62. Schwartz BS, Edgington TS. Immune complex-induced human monocyte procoagulant activity. I. a rapid unidirectional lymphocyte-instructed pathway. *J Exp Med*. 1981, 154: 892-906.
63. Vermeylen J, Hoylaerts MF, Arnout J. Antibody-mediated thrombosis. *Thromb Haemost*. 1997, 78:420-426.
64. Esmon CT. The anticoagulant and anti-inflammatory roles of the protein C anticoagulant pathway. *J Autoimmun*. 2000, 15:113-116.
65. CİNEMRE H, YILDIZ Ö. Antifosfolipid Antikor Sendromu. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*. 2004, 2:39-47.
66. De Groot PG, Horbach DA, Derksen RH. Protein C and other cofactors involved in the binding of antiphospholipid antibodies: relation to the pathogenesis of thrombosis. *Lupus*. 1996, 5:488-493.
67. Ames PR, Tommasino C, Iannaccone L, Brillante M, Cimino R, Brancaccio V. Coagulation activation and fibrinolytic imbalance in subjects with idiopathic antiphospholipid antibodies—a crucial role for acquired free protein S deficiency. *Thromb Haemost*. 1996, 76(2):190-194.

68. Hörkkö S, Miller E, Dudl E, et al. Antiphospholipid antibodies are directed against epitopes of oxidized phospholipids. Recognition of cardiolipin by monoclonal antibodies to epitopes of oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1996, 98(3):815-825.
69. Kekilli M, Beyazıt Y, Aksu S, Haznedaroğlu İC. Antifosfolipid Sendromu Klinik Belirtileri. *Turkiye Klinikleri J Med Sci.* 2005, 25:565-568.
70. Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmun.* 2000, 15:145-151.
71. Wahl DG, Guillemain F, de Maistre E, Perret C, Lecompte T, Thibaut G. Risk for venous thrombosis related to antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus—a meta-analysis. *Lupus.* 1997, 6:467-473.
72. Wahl DG, Guillemain F, de Maistre E, Perret C, Lecompte T, Thibaut G. Meta-analysis of the risk of venous thrombosis in individuals with antiphospholipid antibodies without underlying autoimmune disease or previous thrombosis. *Lupus.* 1998, 7:15-22.
73. Finazzi G, Brancaccio V, Moia M, Ciaverella N, Mazzucconi MG, Schinco PC, Ruggeri M, Pogliani EM, Gamba G, Rossi E, Baudo F, Manotti C, D'Angelo A, Palareti G, De Stefano V, Berrettini M, Barbui T. Natural history and risk factors for thrombosis in 360 patients with antiphospholipid antibodies: a four-year prospective study from the Italian Registry. *Am J Med.* 1996, 100(5):530-536.
74. Küçükaya R, İnanç M, Pekçelen Y. İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları, Hematoloji, XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi, 2004, 21:1
75. Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J, Derksen RH, Machin SJ, Barquinero J, Outt HH, Harris EN, Vilardell-Torres M, Hughes GR. The “primary” antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine (Baltimore).* 1989, 68:366-374.
76. Lockshin MD, Qamar T, Druzin ML, Goei S, Magid MS, Jovanovic L, Ferenc M. Antibody to cardiolipin as a predictor of fetal distress or death in pregnant patients with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 1985, 313:152-156.
77. Lima F, Khamashta MA, Buchanan NM, Kerslake S, Hunt BJ, Hughes GR. A study of sixty pregnancies in patients with the antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 1996, 14:131-136.
78. Galli M, Barbui T. Prevalence of different anti-phospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus and their relationship with the antiphospholipid syndrome. *Clin Chem.* 2001, 47:985-987.

79. Alarcon-Segovia D, Perez-Vazquez ME, Villa AR, Drenkard C, Cabiedes J. Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.* 1992, 21:275-286.
80. Nalbant S, Antifosfolipid antikor sendromu. Türk İç Hastalıkları Uzmanlık Derneği, İç Hastalıkları Dergisi. 2007, 14:83-90
81. Atamer T. Antifosfolipid Sendromunun tanısında laboratuvar. XXVI. Ulusal Hematoloji Kongresi, 31 Ekim-3 Kasım 1998, Hematoloji 1998, Ankara, Mart Matbaacılık Hizmetleri A.Ş. 1998, 243-245.
82. Sammaritano LR, Gharavi AE, Lockshin MD. Antiphospholipid antibody syndrome: Immunologic and clinical aspects. *Semin Arthritis Rheum.* 1990, 20:81-96.
83. Navarro M, Cervera C, Teixido M, Reverter JC, Font J, López-Soto A, Monteagudo J, Escolar G, Ingelmo M. Antibodies to endothelial cells and to β 2-glikoprotein I in the antiphospholipid syndrome: prevalence and isotype distribution. *Br J Rheumatol.* 1996, 35:523-528.
84. Khamashta MA. Management of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 1996, 5:463-466.
85. Ginsburg KS, Liang MH, Newcower L, Goldhaber SZ, Schur PH, Hennekens CH, Stampfer MJ. Anticardiolipin antibodies and the risk for ischemic stroke and venous thrombosis. *Ann Intern Med.* 1992, 117:997-1002.
86. Erkan D, Merrill JT, Yazici Y, et al. High thrombosis rate after fetal loss in antiphospholipid syndrome: Effective prophylaxis with aspirin. *Arthritis Rheum.* 2001, 44:1466-1467.
87. De Wolf F, Carreras LO, Moerman P, Vermeylen J, Van Assche A, Renaer M. Decidual vasculopathy and extensive placental infarction in a patient with repeated thromboembolic accidents, recurrent fetal loss, and a lupus anticoagulant. *Am J Obstet Gynecol.* 1982, 142:829-834.
88. Petri M. Hydroxychloroquine use in Baltimore Lupus Cohort: Effects on lipids, glucose and thrombosis. *Lupus.* 1996, 5:516-522.
89. Şahan C, Cengiz K. Primer Antifosfolipid Sendromu. *O.M.U Tıp Dergisi.* 2005, 22:100-111.
90. Cuadrado MJ, Lopez-Pedreira C. Antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Med,* 2003, 3:129-139.

91. Ginsberg JS, Greer I, Hirsh J. Use of antithrombotic agents during pregnancy. *Chest*. 2001, 119:122-131.
92. Greaves M, Cohen H, Machin SJ, Mackie I. Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol*. 2000, 109:704-715.
93. Gezer S: Antiphospholipid syndrome. *Dis Mon* 2003, 49:696-741.
94. Branch DW, Khamashta MA. Antiphospholipid Syndrome: Obstetric Diagnosis, Management and Controversies. *Obstet Gynecol*. 2003, 101:1333-1344.
95. Yıldırım Y, Özyılkan Ö. Kanserin Tromboembolik Komplikasyonları ve Tedaviye Yönelik Yaklaşımlar. *Acta Oncol Turc*. 2009, 42:86-91.
96. Rosove MH, Brewer PM. Antiphospholipid thrombosis: clinical course after the first thrombotic event in 70 patients. *Ann Intern Med*. 1992, 117:303-308.
97. Khamashta MA, Cuadrado MJ, Mujic F, Taub NA, Hunt BJ, Hughes GR. The management of thrombosis in the antiphospholipid-antibody syndrome. *N Engl J Med*. 1995, 332:993-997.
98. Derksen RH, de Groot PG, Kater L, Nieuwenhuis HK. Patients with antiphospholipid antibodies and venous thrombosis should receive long term anticoagulant treatment. *Ann Rheum Dis*. 1993, 52:689-692.
99. Arakawa H, Saribasak H, Buerstedde JM. Activation-induced cytidine deaminase initiates immunoglobulin gene conversion and hypermutation by a common intermediate. *Plos Biology*. 2004, 2:179.
100. Di Noia J, Neuberger M.S. Altering the pathway of immunoglobulin hypermutation by inhibiting uracil DNA glycosylase. *Nature*. 2002, 419:43-48.
101. Ito S, Nagaoka H, Shinkura R, Begum N, Muramatsu M, Nakata M, Honjo T. Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004, 101:1975-1980.
102. McBride KM, Barreto V, Ramiro AR, Stavropoulos P, Nussenzweig MC. Somatic hypermutation is limited by CRM1-dependent nuclear export of activation-induced deaminase. *J Exp Med*. 2004, 199:1235-1244.
103. Shinkura R, Ito S, Begum N, Nagaoka H, Muramatsu M, Kinoshita K, Sakakibara Y, Hijikata H, Honjo T: Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat Immunol*. 2004, 5:707-712.
104. Basu U, Chaudhuri J, Alpert C, Dutt S, Ranganath S, Li G, Schrum JP, Manis JP, Alt

FW. The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature*. 2005, 438:508-511.

105. Schrader C, Linehan EK, Mochegova SN, Woodland RT, Stavnezer J. Inducible DNA breaks in Ig S regions are dependent on AID and UNG. *J Exp Med*. 2005, 202:561-568.

106. Teng G, Papavasiliou F.N. Immunoglobulin Somatic Hypermutation. *Annu. Rev. Genet*. 2007, 41:107–120.

107. Larson ED, Maizels N. Transcription-coupled mutagenesis by the DNA deaminase AID. *Genome Biol*. 2004, 5:211.

108. Chaudhuri J, Tian M, Khuong C, Chua K, Pinaud E, Alt FW. Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature*. 2003, 422:726-730.

109. Bransteitter R, Pham P, Scharff M, Goodman M. Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003, 100:4102-4107.

110. Bransteitter R, Pham P, Calabrese P, Goodman MF. Biochemical analysis of hypermutational targeting by wild type and mutant activation-induced cytidine deaminase. *J Biol Chem*. 2004, 279:51612-51621.

111. Pham P, Bransteitter R, Petruska J, Goodman M. Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature*. 2003, 424:103-107.

112. Dickerson SK, Market E, Besmer E, Papavasiliou FN. AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. *J Exp Med*. 2003, 197:1291-1296.

113. Ikeda T, Abd El Galil KH, Tokunaga K, Maeda K, Sata T, Sakaguchi N, Heidmann T, Koito A. Intrinsic restriction activity by apolipoprotein B mRNA editing enzyme APOBEC1 against the mobility of autonomous retrotransposons. *Nucleic Acids Res*. 2011, 39:5538-5554.

114. Navaratnam N, Morrison J.R, Bhattacharya S, Patel D, Funahashi T, Giannoni F, Teng B.B, Davidson N.O, Scott J. The p27 catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme is a cytidine deaminase. *J Biol Chem*. 1993, 268:20709–20712.

115. Kinoshita K, Honjo T. Linking class-switch recombination with somatic hypermutation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001, 2:493–503.

116. Okazaki I.M, Kinoshita K, Muramatsu M, Yoshikawa K, Honjo T. The AID enzyme induces class switch recombination in fibroblasts. *Nature*. 2002, 416:340-345.

117. Yoshikawa K, Okazaki I.M, Eto T, Kinoshita K, Muramatsu M, Nagaoka H, Honjo T. AID enzyme induced hypermutation in an actively transcribed gene in fibroblasts. *Science*. 2002, 296:2033-2036.
118. Köse M. Aktivasyonla indüklenen sitidin deaminazın (AID) ekspresyon düzeyi ile klinik lenfositik lösemnin prognozu arasındaki ilişki. İstanbul, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 2010.
119. Woo C.J, Martin A, Scharff MD. Induction of somatic hypermutation is associated with modifications in immunoglobulin variable region chromatin. *Immunity*. 2003, 19:479-489.
120. Rada C, Jarvis JM, Milstein C. AID-GFP chimeric protein increases hypermutation of Ig genes with no evidence of nuclear localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002, 99:7003-7008.
121. Muramatsu M, Honjo T. Complex layers of genetic alteration in the generation of antibody diversity. *Trends Immunol.* 2001, 22: 66-68.
122. Arakawa H, Buerstedde JM. Immunoglobulin gene conversion: insights from bursal B cells and the DT40 cell line. *Dev Dyn.* 2004, 229:458-464.
123. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 1983, 302:575-581.
124. Weigert MG, Cesari IM, Yonkovich SJ, Cohn M. Variability in the lambda light chain sequences of mouse antibody. *Nature*. 1970, 228:1045-1047.
125. Harris R.S, Sale J.E, Petersen-Mahrt S.K, Neuberger M.S. AID is essential for immunoglobulin V gene conversion in a cultured B cell line. *Curr Biol.* 2002, 12:435-438.
126. Quartier P, Bustamante J, Sanal O, Plebani A, Debré M, Deville A, Litzman J, Levy J et al. Clinical, immunologic and genetic analysis of 29 patients with autosomal recessive hyper-IgM syndrome due to Activation-Induced Cytidine Deaminase deficiency. *Clin Immunol.* 2004, 110:22-9.
127. Hase K, Takahashi D, Ebisawa M, Kawano S, Itoh K, Ohno H. Activation-Induced Cytidine Deaminase Deficiency Causes Organ-Specific Autoimmune Disease. *Plos One*. 2008, 3:3033.
128. McCarthy H, Wierda WG, Barron LL, et al. High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) and splice variants is a distinctive feature of poor-prognosis chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003, 101:4903-490.
129. Heintel D, Kroemer E, Kienle D, Schwarzinger I, Gleiss A, Schwarzmeier J, Marculescu R, Le T, Mannhalter C, Gaiger A, Stilgenbauer S, Döhner H, Fonatsch C,

Jager U, German CLL Study Group. High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) mRNA is associated with unmutated IGVH gene status and unfavourable cytogenetic aberrations in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 2004, 18:756-762.

130. Hancer VS, Kose M, Diz-Kucukkaya R, Yavuz AS, Aktan M. Activation-induced cytidine deaminase mRNA levels in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2011, 52:79-84

131. Zan H, Zhang J, Ardeshna S, Xu Z, Park SR, Casali P. Lupus-prone MRL/faslpr/lpr mice display increased AID expression and extensive DNA lesions, comprising deletions and insertions, in the immunoglobulin locus: concurrent upregulation of somatic hypermutation and class switch DNA recombination. *Autoimmunity*. 2009, 42:89-103