



ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TTBB BİYOLOJİ VE GENETİK A.D.

KORONER ARTER HASTALARINDA PROTROMBİN GENİNDEKİ G20210A MUTASYONUNUN TESPİTİ

Tıbbi Bio. ZEHRA SEDA ÜNAL

144435

Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Lisans Üstü Eğitim Yönetmeliği'nin
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
İçin Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI TEZ ÖNERİSİ Olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI

Yrd.Doç. Dr.FATMA SILAN

DÜZCE
Şubat,2005

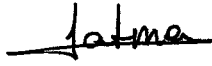
Sağlık Bilimleri Enstitüsünün Onayı

Doç. Dr. Yusuf AKCAN

Enstitü Müdürü



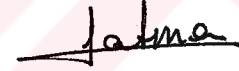
Bu tezin Yüksek Lisans derecesinde bir tez olarak gerekli çalışmaları yerine getirdiğini onaylarım



Yrd. Doç. Dr. Fatma SILAN

Ana Bilim Dalı Başkanı

Okuduğumuz bu tezin Yüksek Lisans derecesinde bir tez olarak yayınlanması düşüncemize göre, amaç ve kalite olarak tamamen uygundur.

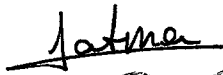


Yrd. Doç. Dr. Fatma SILAN

Tez Danışmanı

Jüri Üyeleri

1. Yrd. Doç. Dr. Fatma SILAN



2. Yrd. Doç. Dr. Coşkun SILAN



3. Yrd. Doç. Dr. İdris ŞAHİN





Teşekkür;

Tezimin hazırlanma ve yazım aşamasında desteğinden ve emeklerinden dolayı; gisini ve sevgisini esirgemeyen; tez danışmanım **Yard. Doç. Dr. Fatma Sılan'a** ve **Yard. ç. Dr. Coşkun Sılan'a**; tez yazım aşamasında iş yerimde gösterdikleri anlayışları için; **Bio. . Fatma Özbakır** ve **Semra Güvenç'e**, tez çalışmasını birlikte yaptığım ve hiçbir zaman dımlarını esirgemeyen arkadaşım **Bio. Cansu Zafer'e** ve manevi destekleri için **aileme** ıssız teşekkürler...

Simge ve Kısaltmalar

A, Adenine, Adenin

a, Active , aktif (FVa, FXa...vb)

AD, Akut Darlık

APC, Activated Protein C, Aktive Protein C

APCR, Activated Protein C Resistance, Aktive Protein C Resistansı

Apo, Apolipoprotein

AY, Akut Yetmezlik

bmi, Body-mass Index, Beden-kitle İndeksi [$\text{ağırlık (kg)} / \text{uzunluk}^2 (\text{m}^2)$]

C, Cytocine, Sitozin

DM, Diabetes mellitus, Diyabet

F, Factor, Faktör (FII, FV, FVIII,...vb)

FVL, Factor V Leiden, Faktör V Leiden

G, Guanine, Guanin

HT, Hipertansiyon

HDL, High Density Lipoprotein, yüksek molekül ağırlıklı lipoprotein

KAH, Koroner Arter Hastalığı

kb, kilobaz

KKH, Koroner Kalp Hastalığı

LDL, Low Density Lipoprotein, düşük molekül ağırlıklı lipoprotein

MI, Miyocardial Infarction, Miyokard infarktüsü

MTHFR, Methylenetetrahydrofolate reductase, Metilen Tetra HidraFolat Redüktaz

MW, Molecular Weight, molekül ağırlığı

PCR, Polimeraz Chain Reaction, Polimeraz zincir reaksiyonu

PT, Prothrombin Time, Pıhtılaşma zamanı

T, Timin

VTE, Venöz Tromboembolizm

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Koroner Arter Hastalığı	2
2.1.1. Koroner Arter Hastalığı Nedenleri	2
2.1.2. Koroner Arter Hastalığı Risk Faktörleri	3
2.1.3. Koroner Arter Sonuçları Nelerdir?	8
2.2. Tromboz	8
2.2.1. Arterial Tromboz	10
2.2.2. Venöz Tromboz	12
2.3. Hemostaz ve Koagülasyon Mekanizmaları	13
2.3.1. Hemostaz	13
2.4. Protrombin ve Protrombin G20210A Mutasyonu	25
2.4.1. Protrombinin Yapısı	25
2.4.2. Protrombin geni	
2.4.3. Pıhtılaşma mekanizmasında FII Molekülünün Rolü	27
2.4.4. Allelik Varyantlar	28
2.4.5. Protrombin G20210A ve Hastalıklarla ilişkileri	28
GEREÇ ve YÖNTEMLER	33
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri	39
3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	39
3.3. Çalışmada Kullanılan Kitler ve Özellikleri	40
3.3.1. DNA İzolasyon Kiti	40
3.3.2. PRONTO- DIAGNOSTİC Mutasyonu	40
3.4. Çalışılan Hasta Grubu	41
3.5. Çalışma Yöntemi	41
3.5.1. Periferik Kandan DNA izolasyonu	41

3.5.2. Elde Edilen DNA Saflığının Ölçülmesi	43
3.5.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR):	44
3.5.4. Pronto Kiti ile Mutasyon tayini;	45

BULGULAR	51
-----------------	-----------

SONUÇ	55
--------------	-----------

TARTIŞMA	56
-----------------	-----------

ÖZET	59
-------------	-----------

SUMMARY	60
----------------	-----------

KAYNAKLAR	61
------------------	-----------

1- RESİMLEMELER LİSTESİ	71
--------------------------------	-----------

10.1.Şekiller	71
10.2.Tablolar	71
10.3.Fotoğraflar	72

ÖZGEÇMİŞ	73
-----------------	-----------

EKLER	74
--------------	-----------

12.1. FII Hasta Takip Formu	74
12.2. Çalışma Yapılırken çekilen Fotoğraflar	75

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Tüm dünyada en önemli mortalite ve morbidite nedenlerinden biri olan koroner arter hastalığı gelişimi multifaktöryel olup çok sayıda edinsel ve kalıtsal faktörün değişik mekanizmalarla bu gelişime katkıda bulunduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar sonucu; özellikle kadınlar için, kişilerin yaşı küçüldükçe koroner arter hastalığındaki genetik faktörlerin önemi artmaktadır.¹

Koroner arter hastalığı kalbin etrafını çevreleyerek kalp kasını besleyen koroner arterlerin tıkanıklığına veya daralmasına verilen addır. Nedeni koroner arterlerin aterosklerozudur.² Koroner arterlerin bir pıhtı ile ani ve tamamen tıkanması sonucunda, bu damarın beslediği bölgenin beslenememesine bağlı olarak kalp kasında (miyokard) doku ölümü miyokard infarktüsü (MI) ile sonuçlanan tromboza neden olur.

Tromboz gelişiminde damar hasarı, kan akımında yavaşlama (staz, kanın bileşimindeki değişiklikler olmak üzere üç farklı faktör rol oynamaktadır. Tromboz gelişiminde arterial ve venöz sistemde farklı etyolojilerin rol oynadığı düşünülmektedir. Arterial sistemde endotel hasarı ve trombosit fonksiyon bozuklukları tromboz gelişiminde ön plandayken, venöz sistemde meydana gelen trombozda ise çoğunlukla pıhtılaşma sistemini kontrol altında tutan doğal inhibitör mekanizmaları bozulmaları rol oynar.³

Tromboembolizm oluşumunda hamilelik, oral kontraseptif kullanımı, uzun süre hareketsizlik ve cerrahi müdahaleler gibi edinsel faktörler ve bir çok kalıtsal faktör rol oynamaktadır. Nedeni tanımlanabilen kalıtsal trombotik vakaların %20 sinde protrombin G20210A mutasyonunun rol oynadığı bildirilmiştir. Protrombin geninde meydana gelen nokta mutasyonu (G $\Rightarrow$ A) sonucunda plazma protrombin düzeyinin arttığı gözlenmiştir. Bu mutasyonun sıklığı genel popülasyonda %2- 2,5 iken trombozlu bireylerde % 6-6,2 ve tromboz riskini 2-3 kat arttırmaktadır. ⁴ Protrombin mutasyonu taşıyan bireyler koroner arter hastalığı ve miyokard infarktüsü, pulmoner ve serebral tromboembolizm ve preeklampsi için yüksek risk altında bulunmaktadır.

Bu araştırmamızda, koroner arter hastalığı ve miyokard infarktüsünün, protrombin (G20210 A) mutasyonu ile ilişkisinin olup olmadığını saptamayı planladık.

2-GENEL BİLGİLER:

2.1.KORONER ARTER HASTALIĞI (KAH):

Kalbin kasılmasını sağlayan miyokard adı verilen kas tabakasının beslenmesi (oksijenlenmesi) koroner denilen damar vasıtasıyla gerçekleştirilir. ⁵ Koroner arter hastalığı kalbin etrafını çevreleyerek kalp kasını besleyen koroner arterlerin tıkanıklığına veya daralmasına verilen addır. Nedeni koroner arterlerin aterosklerozudur (damar sertliği). Bu darlık sonucu kalp kasına sunulan oksijen miktarı azalır ve iskemik kalp hastalığı denilen tablo ortaya çıkar. Ülkemizde erişkinlerden elde edilen verilere göre koroner arter hastalığı prevalansı 3.8 olarak saptanmıştır.²

Koroner arter hastalığı kronik ve ilerleyici bir hastalık olduğundan ömür boyu tedavi gerektirir. Koroner arter hastalığında, kullanılan ilaçlar koroner arterlerin genişletilerek veya kalbin oksijen ihtiyacının azaltılarak anjina pectoris (AP) ataklarının önlenmesine yöneliktir. AP miyokard iskemisinin klinik semptomlarından biridir. Eğer miyokard oksijen gereksinimi, oksijen sunumundan fazla olursa iskemi gelişir. İskemiye bağlı göğüs ağrısına angina pectoris denir.

2.1.1.Koroner arter hastalığı nedenleri;

- koroner ateroskleroz
- koroner embolisi: trombus, kalsifik, yağ, hava, infektif endokardit, miksoma
- konjenital koroner anomalileri: anormal orijin, aberrant koroner arterler, koroner A-V fistül, koroner anevrizma
- arteritis: PAN (Poliartiritis Nodosa), SLE (sistemik lupus eritematozus), RA(romatoid artrit), sfiliz, Takayasu Hastalığı, Kawasaki Sendromu
- travma: koroner laserasyon, tromboz ,radyasyon
- koroner mural kalınlaşma ve/veya intimal proliferatif hastalıklar: Homosistinüri, Fabry hastalığı, mukopolisakkaridozlar, pseudoksantoma elastikum, amiloidoz, kistik medial nekroz, kontraseptif steroidler

- hematolojik(insitu trombozis): polistemia vera, trombositosis, DIC (dissemine intravasküler koagülasyon), hiperkoagulabilite, trombositopenik purpura
- miyokardiyal istem-sunu orantısızlığı: AD,AY, CO zehirlenmesi, tirotoksikosis, uzamış hipotansiyondur.²⁻⁵

2.1.2.Koroner kalp hastalığı (KKH) risk faktörleri;

Koroner arter hastalığı ateroskleroz (damar sertliği) nedeni ile koroner arterlerin daralması sonucunda ortaya çıkar. Kesin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, etkisi gösterilmiş risk faktörleri mevcuttur. Bu risk faktörlerini üç gruba ayırabiliriz; birinci grup değiştirilebilir risk faktörleri, ikinci grup değiştirilemeyecek risk faktörleri, üçüncü grup ise yeni risk faktörleridir.

2.1.2.1.Değiştirilemeyecek risk faktörleri:

Yaş, cinsiyet ve kalıtım değiştirilemeyecek risk faktörlerindendir. Erkeklerde 45, kadınlarda 55 yaş üzerinde olmak, kadınlarda post-menapozal (adetten kesilme sonrası) dönemde veya östrojen replasman tedavisi almamışlarda erken menapoz döneminde risk artmış haldedir. Erkeklerde kadınlara göre yaklaşık dört kat daha sık görülür. Kadınlarda bulunan östrojen hormonu koruyucudur. Bu nedenle kadınlarda görülme sıklığı bu hormonun azaldığı menapoz sonrası dönemde artar. Erkeklerde en fazla 50-60 yaşları arasında, kadınlarda ise 60-70 yaşları arasında görülür.

Prematüre KKH aile hikayesi: 1. derece erkek akrabalarında 55, 1. derece kadın akrabalarında 65 yaşından önce infarktüs veya ani ölüm bulunması riskin yüksek olduğunu düşündürür.²

2.1.2.2.Değiştirilebilecek risk faktörleri:

Doğum kontrol haplarının uzun süreli kullanılması, sigara içmek, aşırı alkol ve kahve tüketimi, hiperlipidemi: Total kolesterol>200 mg/dl (LDL-C $\geq$ 130 mg/dl)'dan yüksek olması, HDL kolesterolün (HDL-C)<40mg/dl (erkek), HDL-C<45 mg/dl (kadın) olması, hipertansiyon (kan basıncının 140/90 mmHg'den yüksek olması) ve antihipertansif tedavi alıyor olmak, diabetes mellitüs, kan kalsiyum düzeyinin yüksek

olması, obezite, stres ve fizik aktivite azlığı değiştirilebilecek risk faktörleri arasında yer alır.⁵⁻⁶

Negatif risk faktörleri:

HDL kolesterolün 60 mg/dl'den yüksek olması negatif risk faktörü olarak kabul edilmektedir.²

2.1.2.3.Yeni risk faktörleri:

Lipoprotein (a):

Artmış Lp (a) düzeyi ile birlikte artmış LDL düzeyleride bulunuyorsa, koroner arter hastalığı için risk oluşturmaktadır. Lipoprotein (a), LDL'ye benzer. Apo (a) denilen apoproteinle bağlanır. Apo (a) plazminojene benzer yapıdadır. Fibrin pıhtısının erimesinde önemli bir plazma proteindir. Lp (a)'nın 30mg/dl üzerinde olması durumunda, plazminojenin trombolitik aktivitesini inhibe etmekte ve koroner arter hastalığı için risk oluşturmaktadır.⁶ Serum seviyesinin 30mg/dl den daha yüksek olması çocukluk çağında tromboemboli riskini arttırmaktadır.⁷

Fibrinojen:

Çeşitli prospektif epidemiyolojik çalışmalar fibrinojenin koroner arter hastalığı için bir risk faktörü olduğunu göstermektedir. Yüksek fibrinojen düzeylerinin (>300 mg/dl) hastalarda miyokard infarktüsü ve inme riskini arttırdığı birçok çalışmada gösterilmiştir.⁶

CRP: (C-Reaktif protein)

İnflamasyonun göstergesi olan C- reaktif protein (CRP) düzeylerinin (>2.1 mg/dl) MI riskini arttırmada hiperkolesterolemi ile sinerjistik etkisi olduğu ortaya çıkmıştır. Yüksek CRP ile MI, inme ve kardiyovasküler ölüm arasında anlamlı bir ilişkinin olduğu görülmüştür. Kardiyak spesifik enzimlerden troponinin (-) olduğu vakalarda CRP kararsız angina pectoris vakalarında risk belirleyici olarak kullanılabilir.⁶

Faktör VIII Düzeyinde Artış:

Faktör VIII>150 IU/dl olanlarda tromboemboli riskinde artış olduğu gözlenmiştir.⁶

Düşük anti-oksidan düzeyleri:

E vitamini, β-karoten, C vitamini gibi antioksidanların koroner arter hastalığı riskini azaltılabileceği düşünülmüştür. Ancak bugüne kadar yapılan çalışmalarda antioksidan vitamin kullanımının koroner arter hastalığı riskini azalttığı kesin olarak gösterilememiştir.⁷

Antitrombin III Eksikliği

Bir plazma glikoproteinidir. Trombin ve IXa, Xa, XIa, XIIa ve kallikreini inhibe eder. Fibrin oluşumunun en güçlü inhibitörüdür. Etkisi heparin varlığında yaklaşık 1000 kat artar.

Trombozun akut döneminde, nefrotik sendromda, heparin kullananlarda, karaciğer yetersizliği olanlar, yaygın damar içi pıhtılaşması olanlarda, preeklamside, oral kontraseptif kullananlarda, postoperatuar dönemde AT düzeyi düşük saptanır.⁷

Protein S ve protein C Eksikliği

Protein C karaciğerde sentezlenen ve K-vitamine bağımlı bir glikoproteindir. Trombin ve trombomodulin molekülü tarafından aktive edilir. Aktif Protein C (APC), FV ve FVIII'i selektif olarak proteolize uğratar. Bu etki için Protein S ile kompleks oluşturması ve uygun fosfolipid yüzeyi olmalıdır.

Protein S karaciğer, endotel, megakaryosit ve leydig hücrelerinde sentezlenen ve K-vitaminine bağımlı diğer bir glikoproteindir. Aktif Protein C (APC) için kofaktör görevi görür. Ayrıca tenaz ve protrombinaz komplekslerini APC'den bağımsız olarak inhibe eder. Plazmada % 40 serbest geri kalanı ise (C4b) bağlı şekildedir.⁷

Aktive protein C ve kofaktör protein S varlığında proteolizle faktör Va ve Faktör VIIIa'yı inaktive ederek antikoagülan etkisini gösterir. Eksikliklerinde tromboza eğilim artar.⁶

Aktive protein C rezistansı:

Protein C, karaciğerde üretilen vitamin K bağımlı bir proteindir. Bu protein koagülasyon sırasında trombomodülin adlı bir reseptörle etkileşerek FV ve FVIII'in aktif formlarını inhibe eder. Bu inhibisyon antikoagülan bir etki oluşturur. Ve koagülasyon sürecini düzenler.⁸⁻⁹ Faktör V üzerinde APC'nin kesim bölgelerini kodlayan nukleotidlerde oluşan mutasyonlar, FV molekülünün aktif protein C'ye karşı direnç oluşturmaya neden olur. APC direnci, FV'in kritik bölgelerinde oluşan çeşitli mutasyonlardan kaynaklanır. Bu mutasyonlar sonucunda doğal antikoagülan olan Pr C , Faktör V' e bağlanarak koagülasyon inhibisyonunu gerçekleştiremez ve pıhtılaşma kontrolsüz olarak devam eder. Otozomal dominant geçişli bir hastalıktır. Heterozigotlarda 3-8, homozigotlarda ise 50-80 kat tromboza yatkınlık artmaktadır⁷⁻⁹

Faktör V'in kritik bölge mutasyonlarından en iyi bilinen ve yaygın olanı Faktör V Leiden mutasyonu olup çoğunlukla APC direnci olarakta isimlendirilmektedir. FV leiden mutasyonu 1994'te Bertina ve arkadaşları tarafından tanımlanmış ve bunun APCR direncinden sorumlu olan bir nokta mutasyonu (G1691A; FVR506Q) olduğu belirtilmiştir.¹³⁻¹⁵ FVa'nın aktif protein C tarafından primer olarak inaktive edildiği bölge 506. aminoasit olan argininin (arg veya R) bulunduğu bölgedir. FV genini 10. ekzonunda, normalde 506. aminoasidi kodlayan kodonda guanin olan 1691. nukleotidin tek baz mutasyonu ile adenine dönüşmesi sonucunda argini glutamine dönüşür.¹⁶ Bu mutasyon varlığında FV'in doğal antikoagülan olan protein C- protein S sistemine karşı duyarlılığı azalır ve FVa APC tarafından inaktive edilmeye dirençli hale gelir. İşte bu mutant faktöre FV Leiden adı verilmektedir. FV geninin protein C inaktivasyonuna direnç göstermesi, normal FV'e göre aktive protein C'nin etkisi ile çok daha yavaş inaktive olması hiperkoagülabl bir ortam oluşturmaktadır.⁶ Trombofili nedenlerinin başında gelir. Sıklığı beyaz ırkta %3-8, zencilerde %1'den azdır. Türkiyede de sağlıklı bireylerde taşıyıcılık %7-10 arasında saptamıştır.¹⁷⁻¹⁸ Gürvey ve Mesçi Türk popülasyonunda FV Leiden mutasyonu sıklığını %8 olarak belirtmişlerdir.¹⁹

Protrombin G20210 A:

1996 yılında Poort ve arkadaşları tarafından, Protrombin geninin 3' translasyon yapılmayan bölgesinde, 20210. nükleotidte, guanin yerine adenin nükleotidinin geldiği tek baz değişim mutasyonu (G⇒A nükleotid transisyonu) tanımlanmıştır.²³⁻²⁷ GG genotipine sahip normal bireylerde plazmada protrombin konsantrasyonu, 1.05 U/ml iken, GA genotipli yani heterozigot mutasyon taşıyıcısı bireylerde bu oranın 1.32 U/ml olduğu ve G20210A mutasyonunun, plazma protrombin miktarının artmasına neden olduğu bildirilmiştir.²⁸⁻³⁰ Homozigot formunun sıklığı oldukça düşüktür %0.015 olarak belirlenmiştir.

Hiperhomosistinemi (MTHFR)

Metionin metabolizma bozukluğudur. Bir sülfidril aminoasit olan homosisteinin metionine dönüşümünde metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi (MTHFR) gereklidir. Bu enzim, 5,10-metilentetrahidrofolatın, metionin oluşumunda bir kofaktör olan 5-metilentetrahidrofolata indirgenmesini katalizler.⁹ MTHFR geninin 677. nükleotidinde sitozin yerine timin gelmesi ile oluşan tek baz değişiminin (C→T), azalmış enzim aktivitesine ve artmış homosistein konsantrasyonuna neden olduğu bildirilmiştir.³¹⁻³³ Sistation beta sentaz ve metilen tetrahidrofolat redüktaz genlerindeki mutasyon sonucunda plazma homosistein düzeyi artar.³⁴

Toplulun yaklaşık %5-10'unun metilen tetra hidro folat redüktaz C677T taşıdığı ve hafif hiperhomosisteinemi olduğu bilinmektedir.²⁰ Normal değerleri: 1-6yaşta 3,87±1,4 mmol/l, 7-11 yaşta 8,7±1,4 mmol/l, 12-17 yaş 13,54±1,44 mmol/l). Aterosklerotik damar hastalığı için plazma homosistein değerinin 15µ mol/L üzerinde olmasının bağımsız risk faktörü olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.⁶ Açlık plazma homosistein konsantrasyonu normalde 5-15µmol/L iken, orta hiperhomosistinemide 30-100 µmol/L, ciddi formunda ise 100 µmol/L'den fazladır.³⁵ Bu ağır formun en sık nedeni sistation-β-sentaz enziminin homozigot eksikliğidir ve mental retardasyon, ektopik lens, iskelet anomalileri, prematür vasküler hastalıklar ve tromboembolizm ile karakterize klasik homosistünüri klasik tablosu gelişir. Çok hafif yüksekliğinin bile tromboz riskini arttırdığı belirtilmektedir. Toplumda %5-10 oranında rastlanılır ve tromboz riskini 2,5 kat

arttırır. Bu etkisini doku faktör düzeyini arttırarak yaptığı düşünülmektedir. Edinsel homosistein yüksekliğine neden olan sebepler arasında renal yetersizlik, hipotiroidizm, metotreksat tedavisi, teofilin, fenitoin ve oral kontraseptif kullanımı vardır. Folik asit, B6 ve B12 vitamin eksikliği de hiperhomosisteinemiye yol açar. Bu genel toplumda tespit edilen homosistein yüksekliğinin %67'sinden sorumludur.³¹ Homosisteinin koroner arter hastalığı riskini; endotel ve antikoagülan aktivite üzerine olumsuz etkileri yoluyla yaptığı düşünülmektedir.⁶ Diğer kalıtsal nedenli trombozlar genellikle venöz tromboz nedeni olurken , hiperhomosisteinemi arteriyel ya da venöz tromboz nedeni olabilir³⁶

2.1.3.Koroner arter hastalığının sonuçları nelerdir?

Koroner arter hastalığı kronik ve ilerleyici bir hastalıktır ve ömür boyu tedavisi gerekmektedir. En önemli nokta düzeltilebilir risk faktörlerinin kontrol altına alınması ve hastanın yaşam tarzını buna göre düzenlemesidir. Koroner arter hastalığının en önemli ve hayatı tehdit edebilen sonucu miyokard enfarktüsüdür. Yapılan tüm ilaç tedavileri, cerrahi tedavi (koroner bypass) ve balon ile genişletme tedavisi hastanın miyokard enfarktüsü geçirmesini önlemeye ve hastanın anjina pektoris atakları geçirmeden kaliteli bir yaşam sürmesine yöneliktir.

Yapılan çeşitli çalışmalarda ailesel yatkınlık tespit edilmiştir. Ailesinde en az bir kişide yüksek lipid düzeyi, hipertansiyon, erken koroner arter hastalığı başlangıcı veya koroner arter hastalığı olan aile bireyleri koroner arter hastası olma açısından daha yüksek risk taşımaktadır

2.2.TROMBOZ

Tromboz, damar içerisinde uygun olmayan yer ve zamanda hemostazın fibrin pıhtısı oluşturmak üzere aktivasyonu ile oluşan patolojik bir olaydır.⁷⁻⁹ Prokoagülan, antikoagülan ve fibrinolitik faktörler arasındaki hassas dengelerdeki bozukluklar sonucu oluşur.⁹ Tromboz gelişiminde 3 faktör rol oynamaktadır:

1-Damar endoteli

2-Kan akımında yavaşlama (staz)

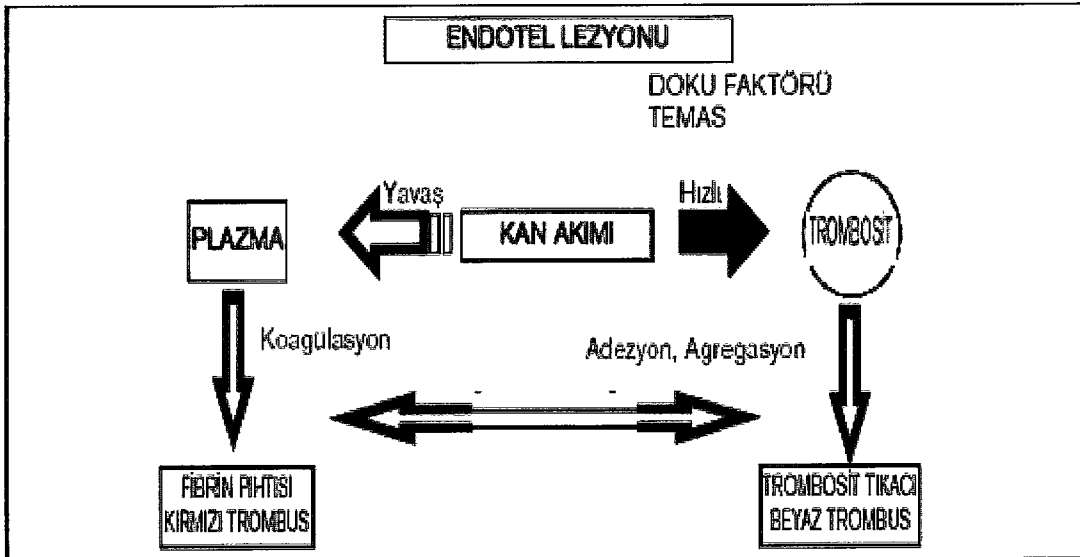
3-Kanın bileşimindeki değişiklikler

Tromboz gelişimi multifaktöryel olup çok sayıda edinsel ve kalıtsal faktörün bu gelişime katkıda bulunduğu bilinmektedir. Arteriyel ve venöz sistemde trombus formasyonlarının farklı olmasından dolayı bu iki sistemde farklı etyolojilerin rol oynadığı düşünülmektedir.³ Kalıtsal trombofililerin tamamının venöz tromboz eğilimine neden olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.³⁷⁻³⁸

Hiperhomosisteinemi dışındaki kalıtsal nedenlerin arteriyel tromboz eğilimini gösteren çalışmalar çok az sayıdadır. Kalıtsal trombofili nedenlerinden birini taşıyan bireylerde tromboz riski artar, ancak yaşamları boyunca hiç trombotik atak geçirmemeleri de mümkündür. Bazen de bu kişilerde tekrarlayan ataklar arasında uzun süre asemptomatik dönemler olabilir. Bu durum, tek başına kalıtsal nedenlerin yeterli olmadığını, tromboz gelişiminde edinsel faktörlerin de önemli olduğunu vurgulamaktadır.

37

Arteriyel trombozlarda endotel hasarı ve trombosit fonksiyonları önem kazanırken, venöz trombozlarda staz ve pıhtılaşma- fibrinolitik siste ait bozukluklar ön plana çıkmaktadır (şekil 1). Bundan dolayı arteriyel trombuslar beyaz, venöz trombuslar kırmızı olarak adlandırılır.⁷



Şekil 1: Tromboz oluşum mekanizması

2.2.1. ARTERİYEL TROMBOZ

Arteryel trombozun en bilinen nedeni, aterosklerotik damar hastalığını takiben endotelde oluşan hasardır. Tipik olarak dorsal aort ile iliak arterler ve koroner arterler gibi geniş ve orta ölçüdeki arterleri kapsar. Arterlerdeki değişimlerin bir sonucu olarak, lipid ve lipoprotein materyalleri subendotelyal tabakalar içerisinde birikir. Bu birikimlerin endotel tabakalarının nontrombojenik karakterini değiştirerek trombosit tutunma ve agregasyonunu kolaylaştıran bir çevre oluşturduğu düşünülmektedir. Bu aktivitenin son ürünü fibrin birikimi üzerinde bir trombosit tıkaçının oluşmasıdır. Kan koagülasyon sisteminin daha ileri aktivasyonu, ilave fibrin birikimini arttırarak total damar tıkanmasına yol açar. ⁷ Beyaz trombus olarak bilinen arteryal trombuslar, fibrin ve trombosit tabakalarından oluşmuş olup hasarlı arter duvarına sıkıca bağlanırlar. Arteryal trombusun en bilinen şekilleri akut miyokard infarktüsü ve serebrovasküler kazalardır. ⁸⁻⁹ Bu tür olgularda MI'nden sorumlu olabilecek birçok mekanizma ortaya atılmıştır ancak bu mekanizmalar kesinlik kazanmamıştır. Bunlardan birisi de kalıtsal bir pıhtılaşma kusuru olan faktör II (protrombin) mutasyonudur. ⁴⁰

Ateroskleroz ve Tromboz

Aterosklerotik kardiyovasküler hastalık diffüz bir olaydır. Koroner arterleri, karotid, vertebral, serebral ve periferik arterleri tutabilir. Bir arter yatağını ilgilendiren risk faktörleri diğer arter sistemlerini de etkileyebilir. Dolayısıyla bir kimsede aynı anda birden fazla arter sistemi tutulumu görülebilir.

Arteriyoskleroz arterlerin kalınlaşma ve sertleşmesini gösteren bir terimdir. Aterosklerozda farklı olarak arterin intima tabakasında genellikle lipidden zengin ekzantrik yerleşimli plaklar vardır.

Bu lezyonlar damar lümenini değişik derecede daraltabilirler ve plak rüptürü olursa tromboz gelişerek arteri tıkar, distal bölgede iskemi ve nekroza yol açarlar. Bu olayın klinik sekelleri miyokard infarktüsü, serebral infarktüs ve ekstremité iskemisi veya gangrenidir. ⁸

Arter endotelinde zedelenme yapabilen nedenler şunlardır: Arterlerin dallanma yerlerindeki kronik fizyolojik zedelenmeler, hipertansiyon, hiperkolesterolemi,

sigaradaki kimyasal iritanlar, vazoaaktif aminler, immün kompleksler ve infeksiyonlardır. Zedelenme sonucu lipid ve monositler o bölgeye birikir. İçeri giren monositler makrofaja dönüşür, LDL okside olur, okside LDL makrofajlara girerek köpük (foam) hücrelerine dönüştürür. Böylece aterom plağı meydana gelir. LDL'nin girişinin azalması veya çıkışının artması plak gelişimini engelleyecektir. Aksine lipidden zengin plaklar rüptüre müsaittirler ve bunların plak kabukları incedir. Lipid içeriğı az olan, fibröz dokusu fazla sert plakların kabukları da kalın olduğundan rüptüre olma riski düşüktür. Plak bölgesinde çeşitli faktörlerin etkisiyle vazokonstrüksiyon meydana gelebilir. İçinde lipid yükü fazla olan tip IV ve tip Va plakların kabukları da incedir ve lümeni kritik derecede daraltmadıkları halde rüptüre olup, trombüs gelişimiyle klinikte akut koroner sendrom gelişimine yol açar.⁵⁻⁶

Miyokard enfarktüsü nedir?

Koroner arterlerdeki daralmanın bir pıhtı ile tamamen tıkanması sonucunda, bu damarın beslediğı bölgenin beslenememesine bağı kalp kasında (miyokard) doku ölümü meydana gelmesidir. Bu ölü doku kalbin pompa fonksiyonunu olumsuz etkileyeceğinden kalp yeterince kan pompalayamayabilir ve kalp yetmezliğı oluşabilir.

Akut Mİ gelişiminde çatlamış aterosklerotik plak üzerine trombüs oturması ile koroner arterin tıkanması temel mekanizmadır. Ancak bazı miyokard infarktüslerinde böyle bir aterosklerotik plak yoktur ve koroner arterler normaldir.⁸

İnme (stroke) Nedir ?

Beyine giden damarların aniden tıkanmasına bağı olarak, kan akımının aniden azalması veya durmasıdır. Buna iskemik inme denir. İnme vakalarının yaklaşık %80'i iskemiktir (beyin arterlerinde kan pıhtılarının oluşmasına bağı), geri kalanları ise hemorajiktir (kan damarının yırtılmasına bağı beyin kanaması).

2.2.2.VENÖZ TROMBOZ

Venöz tromboz, lokal olarak venlerde oluşan trombosun dolaşımında tıkanıklığa yol açmasıdır. En önemli nedenleri: kan akımında yavaşlama (staz) ve pıhtılaşma sistemine ait bozukluklardır. Venöz trombus genellikle bacağın derin venlerinde, nadiren mezenter, beyin, retina ve karaciğer venlerinde oluşur. Fibrin, eritrosit ve trombositlerden oluşmuş olan bu yapıya kırmızı trombus adı da verilir. Oluştukları damar yüzeyinden koparak dolaşıma katılabilir ve embolizme neden olabilirler. En sık görülen formları alt ekstremitte derin ven trombozu ve pulmoner embolidir.³⁵

Derin Ven Trombozu (DVT):

Toplardamarlardaki pıhtının neden olduğu damar tıkanması hastalığıdır. Eğer genetik bir yatkınlıkta varsa uzun süre hareketsiz kalma sonucunda alt ekstremitede oluşan kan göllenmesi, damar içi basıncının artmasına ve damar iç duvarında minimal zedelenmelere yol açar. Ayrıca kan sıvısının bir kısmının damar dışına sızması, damar içindeki kanı yoğunlaştırır; kişinin sıvı alımı da yeterli değilse, kanın konsantrasyonu daha da artar. Sonuçta kanın akışının durgunlaşması, kanın yoğunlaşması ve damar iç duvarındaki zedelenmeler pıhtı oluşumunu kolaylaştırır. Pıhtının damarı tıkayarak dolaşım bozukluğu yapmasından daha tehlikeli olan, buradan kopan pıhtı parçalarının yaşamsal organlarda damar tıkanmalarına yol açmasıdır.

Pulmoner Tromboembolizm:

Pulmoner arter ve dallarının sistemik venlerden gelen venöz trombüs ile tıkanmasıdır.

Protrombin geninde 20210GA mutasyonu varlığı tekrarlayan venöz tromboz için; anlamlı bir derecede artan risk oluşturmaktadır.³¹

Trombofili araştırmasının yapılmasının önerildiği durumlar:

- Ailede trombus öyküsü olması
- Tekrarlayan trombus
- 46 yaşından küçük olan olgular
- İdiyopatik venöz trombozlu olgular

-Sağlıklı bireyler için önemsiz olan provokasyonlardan sonra oluşan trombozlarda (uzun yolculuklar,hamilelik,oral kontraseptif alımı)

- Arteriyel ve venöz tromboz birlikteliğinde
- Artelyel tromboz ve tekrarlayan fetal kayıp varlığında
- Nadir olması beklenen bölgelerde saptanan trombozlarda
- Kumarine bağlı cilt nekrozları varlığında
- Neonatal purpura fulminans saptanan olgularda
- Antikoagulan tedaviye direçli olgularda

-Gezici yüzeysel tromboflebit varlığında, hastaların trombofili yönünden araştırılması önerilmektedir. ³⁵

2.3.HEMOSTAZ ve KOAGULASYON MEKANİZMALARI

2.3.1. Hemostaz;

Kan; gaz transportu, metabolizma, hormonlar, immün savunma yoluyla hücresel iletim dahil birçok anahtar fizyolojik olayı düzenler. ⁸ Normal koşullarda kan, damar içinde sıvı halde olan bir dokudur. Damar sistemindeki kanın akışkanlığı, kalbin pompalama gücü, damar sisteminin kasılabilir olması, göğüs boşluğundaki negatif basınç, venöz damarlarda kanın geriye dönüşünü engelleyen kapakçıklar gibi faktörler tarafından sağlanır. Bununla birlikte damar iç yüzeyinde, endotel hücrelerin oluşturduğu kaygan yüzeyde kanın akışkanlığında önemli bir etkindir. ⁴¹

Belli bir hemoreolojik değişikliğin hangi düzeyde bir dolaşım bozukluğuna neden olacağı, öncelikle damar sisteminin fonksiyonel durumuyla yakından ilişkilidir. Sağlıklı bireylerde hemen bütün damar yataklarının önemli bir vazodilatasyon rezervi vardır. Bu rezerv özellikle fonksiyonları açısından kritik olan organ ve dokular için bir emniyet mekanizmasıdır. Çeşitli hastalık süreçlerinde ör:aterosklerotik ve tromboembolik olaylarda bu rezerv önemli ölçüde azalabilir hatta ortadan kalkabilir. Bu durumda ki hastalarda ciddi klinik bulgular ortaya çıkabilir. ⁴²

Hemostaz, kanın dolaşımında sıvı halde kalmasını sağlayan fizyolojik bir mekanizmadır. Bu mekanizma ile kanın sıvı halde kalması sağlandığı gibi, kan damarlarında herhangi bir travma sonucu oluşan kanama durdurulur ve daha sonra aynı

damarın fonksiyonunu devam ettirmesi için damarın pıttıdan temizlenmesi sağlanır. Hemostaz ve koagölasyon çoğu zaman aynı anlamda kullanılsada; koagölasyon sadece hemostazın bir fazıdır.⁴³

Hemostaz, kan kaybının önlenmesi ve kanamanın durdurulması olarak ımlanabilir.

Hemostazı sağlayan mekanizmalar:

- 1- Kan kaybının önlenmesi amacıyla:
 - Damarların yapısal bütünlüğünün sağlanması
 - Trombosit fonksiyonların yerine getirilmesi
- 2- Kanamanın durdurulması amacıyla:
 - Damar yapısında reaksiyonel değışikliklerin (vazokonstüriksiyon gibi) oluşması
 - Trombosit pıhtının meydana gelmesi
 - Kanın koagölasyonu olarak sıralanmaktadır.⁴³

Hemostaz ; **vasküler endotel, trombositler ve koagölasyon sistemi ve fibrinolitik sistem** birliktelięiyle gerçekleşir.⁴³

2.3.1.1.Vasküler Endotel:

Kan damarlarının iç yüzeyinde tek katlı bir tabaka oluşturan endotel hücreleri ; 10-15µm genişliğinde, 20-25µm uzunluğunda, uzamış nukleusları ile damarın uzun ekseni boyunca sıralanmış poligonal hücrelerdir.⁴⁴ Damar endoteli; nontrombojenik bir iç yüzey oluşturduğu gibi, vücudun değışik dokuları ile akım halinde bulunan kan arasında seçici bir geçirgenlik görevinde üstlenir.⁴⁵⁻⁴⁶ Normal koşullarda endotel yüzeyinin sağlam olması ve kanın sürekli akım halinde bulunması, pıhtılaşma sisteminin ve trombositlerin kendiliğinden aktive olmasını engeller.⁴⁷

Damar endotel hücrelerinin kan ve dokuya bakan yüzeyleri birbirinden farklı olup 50-60 angstrom kalınlığındaki kana bakan yüzeyleri heparan sülfat, dermatan sülfat ve heparin içeren, antitrombotik bir yüzey oluşturan proteoglikan bir tabaka ile kaplıdır. Heparan sülfat doğal bir antikoagöl olan antitrombin III'ü (AT III) üretir.⁸ AT III; pıhtılaşma mekanizmasında fibrinojeni fibrine dönüştürmekten sorumlu trombin, FXIIa, FXIa, FXa ve FIXa gibi bazı pıhtılaşma faktörlerini inhibe etmekle görevli bir plazma proteinidir. Dış membran trombomodülin gibi bazı reseptörleri içerir. Trombomodülin,

kuvvetli bir pıhtılaşma inhibitörü olan protein C'nin trombin tarafından aktivasyonunu hızlandırır. Protein C; FV ve FIII'ü inaktive ederek ve plazminojen aktivatörlerinin konsantrasyonunu artırarak trombozu kontrol altına alır.

Endotel hücrelerinden sentezlenen protein S'de aktif protein C'nin antikoagülan aktivitesinde kofaktör olarak görev alır. Aktif protein, ayrıca damar endotelini uyararak plazminojenin plazmine dönüşümünde gerekli olan doku plazminojen aktivatörünün salgılanmasını sağlar. tPA inaktivasyonu; yine endotel hücresinde sentezlenen ve ürokinazı (UK) nötralize eden plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI-1) tarafından gerçekleştirilir. Plazminojenin, fibrin parçalanmasından sorumlu proteolitik bir enzim olan plazmine dönüşümünde gerekli diğer doğal aktivatör; endotel hücrelerinde ve böbrek hücrelerinde sentezlenen ürokinazdır.³⁹

Damar endotel hücreleri, kuvvetli bir trombosit anti-agreganı ve vazodilatör olan prostasiklini (PGI₂) de sentezler ve salgılar. Prostrasiklinler, trombosit zarında bulunan reseptörlere bağlanarak adenilat siklazı uyarıp trombosit cAMP düzeyini yükseltirler. Bu yükselme trombositlerin şekil değişikliğini, agregasyonunu, kollajen ve von Willebrand faktörüne bağlanmayı, sonuç olarak trombus oluşumunu engelleyici bir rol üstlenir. Aktiflenmiş trombositlerin membranı üzerinde özgün bir reseptörle etkileşerek trombositlerin subendotel bileşene ve kollajene adezyonunu kolaylaştıran von Willebrand faktörü de endotel hücreleri tarafından sentezlenir. Endotelin antikoagülan ve prokoagülan özellikleri tablo1'de numaralandırılmıştır.⁴³

Endotelin antikoagülan özellikleri:

- 1- prostosiklin sentezi,
- 2- trombomodulin sentezi,
- 3- doku plazminojen aktivatörü (t-PA) sentezi

Endotelin prokoagülan özellikleri;

- 1- von-Willebrand faktör sentezi,
- 2- tissue(doku) faktörü sentezi,
- 3- plazminojen aktivatör inhibitör (PAI-i) sentezi,

Tablo:1 endotelin prokoagülan ve antikoagülan özellikleri

Endotelde meydana gelebilecek bir hasar yapının bozulmasına ve nontrombojenik yüzeyin ortadan kalkmasına ve tromboz ile sonuçlanabilecek olayların gelişimine neden olur. ⁴⁶ Ortaya çıkan subendoteldeki kollagen lifleri trombosit adezyonu ve agregasyonuna neden olur. Aktive olmuş trombositlerden salınan ADP ve tromboksan, çevredeki diğer trombositleri de aktive ederek trombosit tıkaçının büyümesini sağlar. Ayrıca subendoteldeki kollagen liflerinin aktive ettiği faktör XII, trombosit yüzeyinde aktive olan faktör XI ve haraplanmış endotel hücrelerinden salınan bir doku faktörü koagülasyon mekanizmasını işletmeye başlatır.

2.3.1.2.Trombositler:

Kanda ki şekilli elementlerin en küçüğü trombositlerdir. Kanın pıhtılaşmasında (trombosis) oynadıkları rolden ötürü bu ismi almışlardır. 2-4 µm çapında, yuvarlak ya da oval şekilli, nukleusu olmayan hücrelerdir. Kırmızı kemik iliğinde bulunan ve megakaryosit denilen hücrelerden ayrılmış ufak parçalardır. Megakaryositlerin, 40-70 µ'luk çapı vardır ve ortasında küme halinde birçok çekirdek bulunur. Amiboid hareket ve özellikleri olan bu hücreler, kırmızı kemik iliğinde ve kan hücrelerinin dışındadır. Megakaryositlerin pseudopodları, sinüslerin çeperindeki endotel hücrelerinden geçerken ayrılan ufak parçalar trombositlerdir ve dolaşıma katılırlar. ⁴¹

Trombositler çok çeşitli koagülasyon faktörleri ile interaksyona girerken trombinde güçlü bir trombosit uyarıcı olarak dikkat çeker. Trombositler koagülasyon olayını membran yüzeyinde ki fosfatidil serin (PS) aracılığıyla yapmaktadırlar. ⁴³

Trombositlerin subendotelial kollagen veya trombin ile stimülasyonu prokoagulan fosfolipidin ekspoz olmasını sağlar. Bu sırada trombositler belirgin şekil değişikliğine uğrar ve membrandan mikroveziküler oluşur. Trombositlerin prokoagulan transformasyonu tamamen koagülasyonun gerektiği yerlerde (damar duvarında kollagen varlığında veya fibrin pıhtısı içinde) gerçekleşir. Trombositlerden salınan ADP Ca²⁺ iyonunu potansiyalize edici etki gösterir. Trombositlerden FV sekresyonunda bu aşamada gerçekleşir.

Trombositler etkilerini lokal olarak koagülasyon faktörlerinde artış, koagülasyon faktörlerinin optimal fonksiyonları için gerekli yapısal değişikliğin sağlanması,

koagülasyon kompleksinde substrat transferini kolaylaştırma ve nihayet koagülasyonun aktivasyonunu sadece zedelenen bölgede aktive etme şeklinde gerçekleştirir.⁴³

2.3.1.3.Koagulasyon mekanizması:

Koagulasyon, sıvı haldeki kanın akamaz duruma gelmesi, katılaşmasıdır. Herhangi bir nedenle, örneğin bir yaralanma sonucunda küçük bir damar kesilecek olursa, hasardan 1-3 saniye sonra trombositler gerek birbirleriyle birleşerek gerekse direkt olarak zedelenen damar endoteline, özellikle kollajene yapışarak, adeta bir tıkaç meydana getirirler. Bununla beraber zedelenen damarda lokal bir vazokonstriksiyon olur. Kan akımı yavaşlar böylece kanamanın durdurulması hızlandırılır. Bu esnada damarda gözlenen vazokonstriksiyon; trombositlerden serbestlenen serotoninin, çeperdeki düz kasların kasılmasıyla sağlandığı düşünülmektedir.

Bir tarafta zedelenen yerde trombosit tıkaçı oluşur ve damar içinde de pıhtı oluşumu ile ilgili mekanizmalar faaliyete geçer ve meydana gelen pıhtı, yara yerini kapatır. Böylece yaralanan damardan kan akımı durdurulmuş olur.⁴⁸

Pıhtılaşmanın esası, kanda erimiş halde bulunan fibrinojen proteininin trombin fermentinin etkisiyle, katı ve erimeyen fibrine çevrilmesine dayanır. Fibrin, birçok ince liflerden oluşan bir ağ yaparak, lifler arasındaki boşluklarda ve ilmiklerde kanın şekilli elementlerini, serum denilen fibrinojensiz sıvısını tutar. Dolaşım sistemindeki kanda trombin maddesi yoktur; bunun inaktif ana maddesi, protrombindir. Pıhtılaşma esnasında dokulardan açığa çıkan tromboplastin ve plazmada bulunan Ca^{++} iyonlarının etkisiyle protrombin aktif hali olan trombine çevrilir.⁴¹

Kanın pıhtılaşması için bu 4 maddeden (fibrinojen, protrombin, Ca ve tromboplastin) başka madde ve faktörler gereklidir. Pıhtılaşma mekanizmasını için gerekli olan bu faktörler tablo 2’de kısaca gösterilmiştir. Bu proteinler; fibrinojen grubu, protrombin grubu ve kontakt grubu olarak üç temel grupta toplanır.

Fibrinojen grubu faktörleri; Faktör I, V, VIII, XIII’tür.

Protrombin grubunu oluşturan faktörler; Faktör II, VII, IX, X’dur. Bu faktörler vitamin K’ya bağımlı olarak sentezlenen stabil faktörlerdir.

Kontakt grubu faktörleri: Faktör XI, XII, prekallikrein ve yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HMWK) olup koagülasyonun intrinsik yolunda görev alırlar.⁴¹

	Proteinler	Kandaki miktarı (µg/ml)	Molekül ağırlıkları	Kromozom
Zimojenler Gla içeren	Protrombin (FII)	100-150	72,000	11p11-q12
	Faktör VII	0,5	50,000	13q34
	Faktör IX	4-5	56,000	Xq27.1-q27.2
	Faktör X	8-10	56,000	13q34
	Protein C	4-5		2q13-q14
Zimojenler Gla içermeyen	Faktör XI	5	160,000	4q32-q35
	Faktör XII	30	76,000	5q33
	Prekallikrein	50	82,000	4q35
	Faktör XIII A zinciri	10	320,000	6p24-p25
	Faktör XIII B zinciri	22		1q31-q32.1
Çözünür kofaktörler	Faktör V	5-10	300,000	1q21-q25
	Faktör VIII	0,1-0,2	300,000	Xq28
	VWF	10		12p13.2
	Protein S	25*		3p11.1-q11.2
	Protein Z	2-3		
	HMW-kininogen doku faktörü	-	108,000	1p21-p22
	Trombomodulin	-		20p12-cen
Yapısal proteinler	Fibrinojen	2000-4000	330,000	4q23-q32
İnhibitör proteinler	Antitrombin III	150-400		1q23-q25
	Doku faktör yolu inhibitörü	0,1		2q31-q32.1
	Protein Z'ye bağımlı Proteaz inhibitör	1-1,6		

*protein S'in yaklaşık %60'ı C4b bağlayıcı protein ile kompleks halinde bulunur.

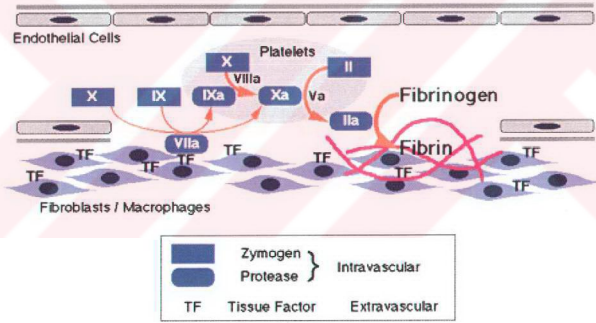
Tablo2: Koagülasyon Proteinlerinin Özellikleri ⁴²

Kan pıhtılaşmasında üç esas faz vardır:

- 1- inaktif FX'un aktif hale geçmesi
- 2- protrombinin aktif hali olan trombine çevrilmesi
- 3- fibrinojenin fibrine dönüşmesi

Pıhtılaşma mekanizması ekstrinsik ve intrinsik ve ortak yol olmak üzere üç sisteme bağlı olarak meydana gelir. Damardan alınan kan bir tüpe konulup yabancı bir yüzeye temasıyla, 4-8 dakika sonra pıhtılaşır, bu intrinsik mekanizma ile olur. İntrinsik sistem dolaşımda ki kanda bulunan prokoagulan yapılardır. Eğer kana doku

tromboplastini ilave edersek, pıhtılaşma 10-15 saniye gibi kısa bir sürede meydana gelecektir. Bu koşullarda pıhtı oluşumu ekstrinsik mekanizma ile açıklanır. Ekstrinsik sistem, kanda bulunan ve vücut dokularından köken alan enzimleri kullanır. Kesilen bir damardan akan kanın pıhtılaşması her iki mekanizmasının ortaklaşa çalışması ile olur. Sağlam damar endoteli ile temasta olan kanda pıhtılaşma faktörleri inaktif haldedir. Damar endotelinde en ufak bir zedelenme, doku tromboplastininin açığa çıkmasına neden olur ve ekstrinsik sistem aktif hale geçer (şekil 2). Aynı zamanda kanın zedelenen damar kesiti ve subendotel doku ile temas etmesi intrinsik sistem aktivasyonu başlar. Gerçekte bütün olay bir enzimin diğer bir enzimi aktive etmesine dayanan oto-katalitik mekanizmadır. Her iki yolda da bir grup enzim, kofaktör ve iyondan oluşan ve protrombini aktif trombine dönüştüren protrombin aktivatör kompleksi adı verilen adı verilen kompleks oluştururlar. Sonra aktiflenmiş trombin, fibrinojenin fibrine dönüşümünü katalizler.⁴¹



şekil 2: Koagülasyon Başlangıcı⁴⁸

İntrinsik yol:

İntrinsik yol; kontakt aktivasyon faktörlerinin; prekallikrein, yüksek molekül ağırlıklı kininojen, FXII ve FXI'un görev aldığı pıhtılaşma yoludur. Kanın yabancı bir yüzeyle veya zedelenen damarda subendotel doku veya kollajenle temasa gelmesinde, ilk

önce XII. Faktör aktive olur ve F XIIa proteolitik enzimine dönüşür. HMW kininojen ve prekallikrein varlığında FXIIa enzimatik etkisiyle FXI'in inaktif zimojenini, aktif serin proteaz olan FXIa'ya dönüştürür. Bu aktif koagulasyon faktörü FIX'u aktif FIXa'ya çevirir. Aktive FI; iyonize kalsiyum, fosfolipidler ve aktiflenmiş FVIII ile beraber protrombin aktivatör kompleks oluşumunda anahtar bir başlangıcı olan FX'u FXa'ya dönüştürür. Aktive edilmiş FX, FV ve trombsit fosfolipidi ile birleşerek protrombin aktivatör kompleksini oluşturur. Bu kompleks protrombini trombine parçalar ve trombin molekülü, fibrinojenin fibrine dönüşümünü katalizler.⁴⁸

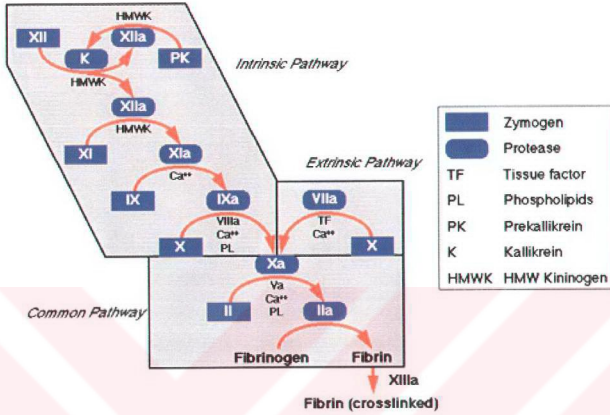
Ekstrinsik yol;

Doku hasarı sonucu ortaya çıkan doku tromboplastininin, dolaşıma girmesiyle başlar. Doku tromboplastini hem protein hemde lipid elementlerine sahiptir. Doku tromboplastininin protein kısmı çeşitli fosfolipidlerle etkileşme yeteneğindedir. Doku tromboplastini FVII'nin aktifleşmesini katalizler. Aktiflenmiş FVII, iyonize Ca ile birlikte FX'nun aktiflenmesini sağlar. Aktive FX, doku tromboplastininin bir parçası olarak serbestlenen fosfolipid ve FV ile protrombin aktivatörü denilen bir kompleks yapar. Bu kompleks protrombini (FII), trombine (FIIa) parçalar (Şekil:3). Protrombin aktivatör kompleksi içinde FV önce inaktiftir, pıhtılaşma başlayınca trombinin proteolitik etkisiyle aktive olur, bu aktivasyon daha sonra protrombin aktivasyonu hızlandırır . Son protrombin aktivatör kompleksinde aktive FX, gerçek bir proteaz olarak protrombini trombine parçalar. Aktif bir enzim olan trombin plazmada erimiş halde bulunan fibrinojeni dayanıksız fibrine çevirir.

Ortak yol:

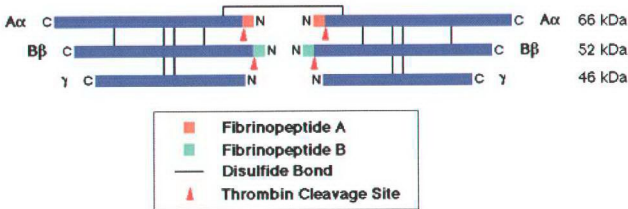
Ekstrinsik ve intrinsik sistemler, FX'nun FXa'ya aktive olmasıyla ortak yolda birleşirler. FXa, FII, FV, Ca iyonları ve fosfolipidlerle birleşilerek protrombin aktivatör kompleksi oluşturulur. Bu kompleks protrombinin (FII) trombine (FIIa) dönüşümünü katalizler. Trombinin fibrinojen üzerindeki proteolitik etkisiyle fibrin monomerleri polimerize olarak uzun fibrin liflerini oluştururlar.(resim). trombinin pıhtılaşma mekanizmasında ki diğer bir etkisi FXIII'ü (fibrin stabize edici faktör) katalize etmektir. Aktif FXIII, Ca iyonlarının yardımıyla pıhtıdaki dayanıksız fibrini peptit bağlarıyla

birbirine bağlar ve dayanıklı hale getirir. Kanda bu faktör eksikliğinde meydana gelen pıhtı çabuk parçalanır. (şekil:3)

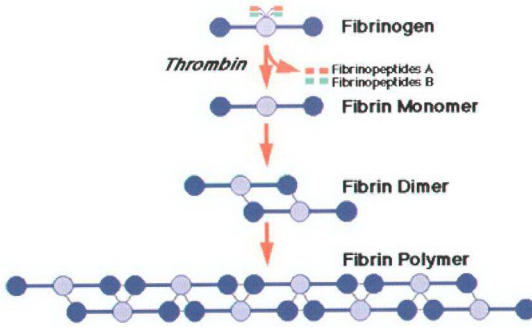


Şekil 3: Koagülasyon Kaskadı

Fibrinojen disülfid bağlarıyla bağlı 3çift polipeptid zinciri içerir.(şekil 4) Moleküler ağırlığı yaklaşık 330.000'dir. Trombin fibrinojeni fibrinopeptid A (16 aa) ve fibrinopeptid B (14 aa) olarak Aα ve Bα zincirlerinin N-terminal uçlarından ayırarak fibrin monomerlerine çevirir. Fibrinopeptidlerin hareketi fibrin monomerlerinden; jel içerikli uzun polimerlerin oluşumuna izin verir. (Şekil 5)



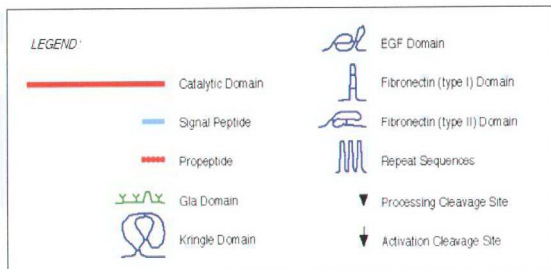
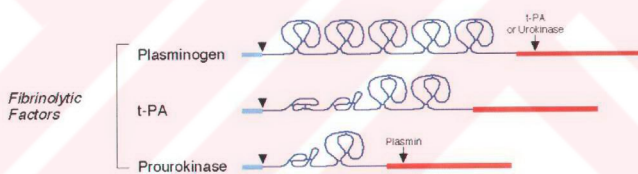
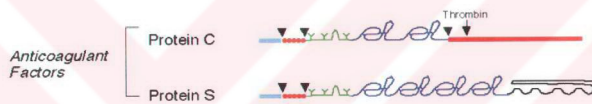
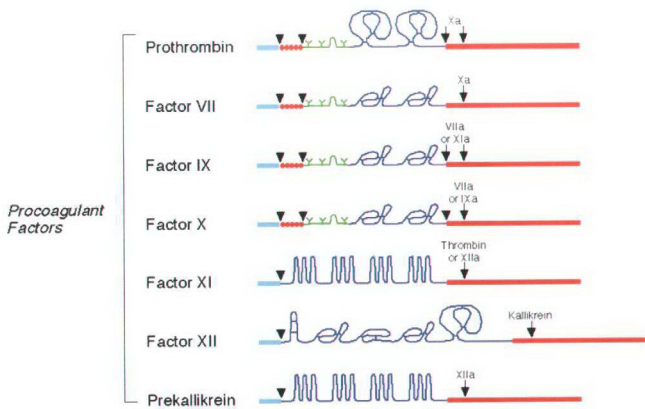
şekil 4: fibrinojenin yapısı



şekil 5: fibrin polimerizasyonu

Koagülasyon proteaz zimojenlerinin yapısı:

Her bir koagülasyon proteini hepatositler tarafından sentezlenip kan akımına verilirken sinyal peptitleri içerir. Endoplazmik retikuluma geçiş sırasında bu sinyal peptidlerden kurtulurlar. Her bir zimojenin karboksi (C) terminal ucunda ki yaklaşık 200 aminoasitlik bölge tripsinle homologdur ve aktif serin, aspargin ve histidin rezidüleri içerirler (katalitik domain). Bu proteinler aynı zamanda EGF ve fibronektin gibi proteinlere homolog bölgeleri de içerirler. Bu bölgeler proteazlarla spesifik interaksiyonlarda ve onların substratları, kofaktörler ve/veya inhibitörlerinin yanında gereklidir. Koagülasyon faktörlerinin yapıları şekil 6' da gösterilmiştir.⁴⁸

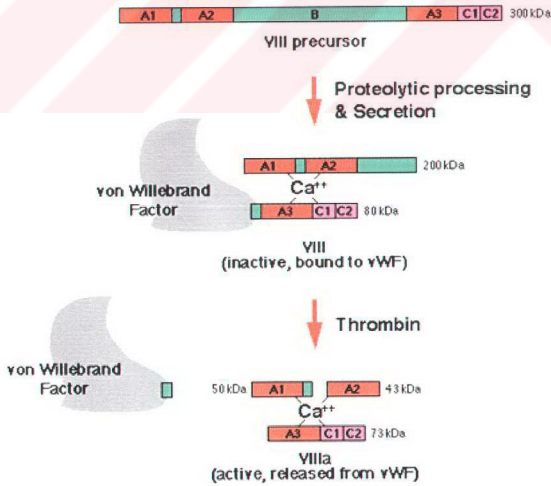


şekil 6: Koagülasyon faktörlerinin yapıları

Faktör II, VII, IX ve X N-terminal uçlarında birbirlerine homologdurlar. Sinyal peptidin ayrılmasından sonra endoplazmik retikulum veya golgi içerisinde bir karboksilasyon meydana gelir ve her bir proteinin bir propeptid bölgesine bağlanır(Şekil 6) Böylece 10-12 glutamat rezidüsünü (glu), γ -karboksilglutamata (gla) çevirir (gla domainine bitişik). Sekresyon öncesinde karboksile polipeptitten, propeptid ayrılıyor. Gla rezidüleri Ca iyonlarını bağlar ve bu koagülasyon faktörlerinin aktivasyonu için gereklidir. Gla sentezi için vitamin K'ya ihtiyaç duyulur. γ -karboksilasyon esnasında vitamin K oksidize olur ve hemen sonrasında azalması bir düzen içerisinde gerçekleşir. Böylece siklus devam eder. Antikoagülan ilaç warfarin vitamin K redüksiyonunu engeller ve aktive FII, VII, IX ve X'nun sentezini durdurur.⁴⁸

Non-enzimatik protein kofaktörleri:

F V , F VIII, doku faktörü ve yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HMWK) dir. F V ve VIII büyük plazma proteinleridir ve bakır-bağlama proteini seruloplazmine homolog tekrar bölgeleri içerirler (A1, A2 ve A3 domainleri şekil7).



şekil-7 Trombinin Factor VIII ile aktivasyonu

Trombin faktör V ve VIII'i , prekürsör durumundaki hallerinden 50 kat daha aktif hale getirir (şekil 7). Aktive olmuş FV ve FVIII'nin bilinen enzim aktivitesi yoktur. Bunun yanında FXa ve IXa'nın proteolitik etkinliğini artırıcı kofaktör olarak işlev görürler.

Doku faktörü integral membran proteinidir ve aktive olmuş monosit yüzeyinde, virüs sitokinlerine maruz kalan endotelial hücrelerde ve diğer hücrelerde ekprese olurlar. Doku faktörü plazmada bulunmaz ve çoğunlukla FVIIa'nın proteolitik etkinliğini artırır.

48

2.3.1.4.Fibrinolitik sistem:

Fibrin birikimiyle aktive olan fibrinolitik sistemde, fibrinolizisi (fibrin yıkımını) sağlayan madde plazmindir. Plazminin inaktif öncüsü olan plazminojenin; aktif bir proteaz olan plazmine dönüşmesini sağlayan en önemli faktör doku plazminojen aktivatörüdür (t-PA). Damar içi fibrin yıkımı, damarda kan akımının engellenmesine yanıt olarak endotel hücrelerinden salgılanan tPA düzeyine bağlıdır.⁸⁻⁹

2.4.PROTROMBİN VE PROTROMBİN G20210A MUTASYONU

2.4.1.Protrombinin Yapısı:

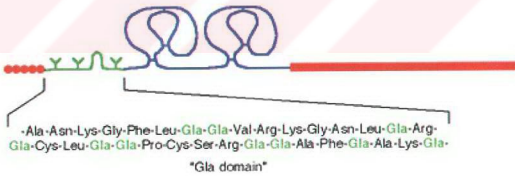
Protrombin, molekül ağırlığı 72,000 ve yarılanma ömrü 60 saat olan bir proteindir. 579 aminoasit içerir. N-terminal bölgesinde Ala-Asn-Thr-phe-leu aminoasitleri vardır.⁵⁰ Vitamin K'ya bağımlı tek zincirli bir glikoprotein olup ağırlığının %8'i karbohidrattan oluşmaktadır. Karaciğerde sentezlenir. Bu yüzden karaciğer hasarlarında aktivitesi azalmaktadır. Protrombin dolaşıma verildiğinde propeptid ve sinyal peptidi içermemektedir.⁴⁹

Protrombin öncü proteini 271 aminoasitten oluşan bir öncü dizi (pro kısmı), 49 aminoasit içeren hafif zincir, 259 aminoasitlik katalitik zincir ve dolaşıma katılmayan 43 aminoasitten oluşan bir amino terminal zinciri olmak üzere 4 bölgeden oluşmuştur.⁵⁰ Pro kısmında yapısal olarak birbirine benzeyen fakat fonksiyonel olarak farklı iki bölge vardır. Protrombin kringle 1 ve 2. Bu iki bölge çok benzer şekilde üç disülfid bağı taşır, her biri ilmeğe benzediği için "kringle" adı verilmiştir. Kringle 1, 1-156. aminoasitler

arasında ki bölge, kringler 2 ise 157-274. aminoasitler arasındaki bölgedir. Her iki bölgenin tersiyer yapılarının benzer olmasına rağmen, primer yapılarında ki aminoasit dizileri çok farklıdır. Bir serin proteaz prekürsörü olan protrombinin pro kısmında ki bölgelerin yapısal olarak bağımsızlığı ispatlanmıştır.⁴⁹

Protrombin %8,2 karbonhidrat içerir ki bunlar kringler 1 asparginin 78 ve 100. rezidülerinde lokalizedir. Katalitik domain 3 aktif bölge içerir; His 363, Asp 419 ve Ser 525.⁵⁰ Ama K vitaminine bağımlı proteinlerin çoğunda bulunan Epidermal Büyüme Faktörü Bölgesi (EGF) yerine iki ilmek (kringle) bölgesine sahiptir; bu bölge aktivatör, substrat, reseptör gibi diğer proteinleri bağlamaktadır (şekil 8).

Kringle 1'in NH₂- terminal ucunda ki yaklaşık 40 aminoasitlik dizi ayrı bir bölge oluşturur. Buna Gla bölgesi denir, 10 tane Gla bölgesi bulunur. Bunların 6 tanesi çift olarak yerleşmiştir. Bu yerleşim şekli K vitamini bağımlı proteinlerde de görülmektedir. (Şekil 8) Gla içeren NH₂-terminal bölgede kristal yapı düzensizdir. Bu membran bağlama özelliğinde esnek bir yapıya ihtiyaç duymasındandır. Normal protrombin molekülü Ca iyonu varlığında konformasyonel değişime uğrar ve membran lipidlerine kendiliğinden bağlanma özelliği kazanır.⁴⁹



şekil-8 protrombin Gla bölgesi ve kringle yapısı

Vitamin K, öncü zincirdeki glutamik asit rezidülerinin, γ - karboksiglutamik asit rezidülerine dönüşümü için gereklidir. Koagulasyon mekanizmasında protrombinin trombine dönüşümünü sağlamak için, protrombin aktivatör kompleksini oluşturan FXa, FVa, Ca⁺⁺ ve fosfolipidlerin protrombin öncü molekülü üzerinde bağlanma bölgeleri farklıdır. Ca⁺⁺ ve fosfolipidler öncü dizinin γ -karboksiglutamik asit rezidülerine (Gla

bölgesine), FVa, öncü dizide bulunan “kringle 1” ve “kringle 2” adı verilen bölgelerden “kringle 2”ye bağlanır. Protrombin aktivasyon reaksiyonunun gerçekleşmesi için Ca^{++} gerekli bir element olup, FVa ve fosfolipilerin varlığında reaksiyonun hızını 20,000 kat arttırmaktadır. Fosfolipid etkisiyle substrat için Km değeri 150 kat düşer ve FV ile FX’nun kompleks içinde ki oranları 1/1 olduğunda reaksiyonun Vmax’u 1000 kat yükselir.

50

FXa’nın protrombin molekülünü Arg271-Thr ve Arg320-ile bölgelerinden kesmesi ile 271 aminoasitlik öncü bölge ayrılır, hafif zincir ve ağır zincir birbirine disülfid bağları ile bağlı kalırlar.⁹ Kesim sonucunda oluşan yapı; 49’u hafif, 259’u ağır zincirde olmak üzere toplam 308 aminoasitten oluşan trombin molekülüdür. Trombinin hafif zincirinde Arg 284-thr bölgesinde meydana gelen son kesim işlemi ile 13 aminoasit daha kaybedilerek trombin oluşumu tamamlanır. 71000 dalton ağırlığında olan protrombinden kesim işlemi sonucunda oluşan trombinin molekül ağırlığı 34500 daltondur.⁹

2.4.2.Protrombin geni:

İnsan protrombin geni kromozom 11’de sentromere yakın yerleşimlidir.⁴⁹ 11. kromozomun p11-q12 bölgesine lokalize edilmiş olup, uzunlukları 25-315 nukleotit arasında değişiklik gösteren 14 ekzon, 84-9447 nükleotid uzunluğu arasında değişen 13 intron,^{49, 50} 5’-translasyonu yapılmayan bölge (5’-UTR) ve 3’- translasyonu yapılmayan bölgeden (3’-UTR) oluşmuş 21 kilobaz uzunluğunda bir gendir.^{28, 29} Protrombin geninin 5’ “flanking” bölgesi promoter kısmı içerir ve iki veya daha fazla cis etkili “enhancer” dizisi ihtiva eder. Cis-etkili diziler promoter, enhancer veya sessizleştirici olarak etki gösteren DNA parçalarıdır. Diğer birçok promoterden farklı olarak protrombinin promoter kısmında ‘TATA box’ bulunmaz. Başlangıç metionininden itibaren 3-38 bp arasında çok sayıda transkripsiyonu başlatma potansiyeline sahip bölgeye sahiptir. Protrombinin alışılmadık bir özelliği 5’ “flanking” bölgesinde çok sayıda tekrarlayan diziye sahip olmasıdır. Genin %41’i Alu tekrarlarından oluşur. Bu dizilerin fonksiyonu bilinmemektedir.⁴⁹

2.4.3. Pıhtılaşma mekanizmasında F II molekülünün rolü

Protrombin kan koagülasyon kaskadının final bölümüne katılır. FXa, FVa, Ca iyonları ve fosfolipidler varlığında trombine dönüşür. Trombin fibrin pıhtı oluşumunu gerçekleştirmek için fibrinojenin 2α ve 2β zincirinin N- terminal uçlarından fibrinopeptid Ave B'ye yapıştır. Trombin aynı zamanda FV, FVIII, FXIII ve protein C'yi aktive eder. Buna ek olarak trombin sulfatid, heparin veya dermatan sülfat ile negatif olarak yüklenmiş yüzeylerin varlığında FXI aktivasyonunuda gerçekleştirebilir. Bu önemli interaksiyonlarda trombin bağlanır ve plateletlerde, endotelyum ve diğer hücreler üzerinde spesifik membran reseptörlerini tetikler ve hücresel fonksiyonların gerçekleşmesini sağlar. Bunlar platelet aktivasyonu, agregasyon ve intraselüler granül içeriklerinin salınımıdır.⁵⁰

Gende protrombin eksikliği nedeni olarak bildirilen mutasyonlardan en önemlileri 1986 yılında tanımlanan Protrombin BARCELONA, 1987'de keşfedilen Protrombin-TOKUSHİMA, 1988 ve 1989 yıllarında bulunan Protrombin QUICK I ve II, 1992'de tanımlanan Protrombin-HIMI mutasyonlarıdır. Protrombin-TOKUSHİMA; hipoprotrombinemiye (molekülün az miktarda sentezlenip plazmada düşük seviyede olmasına), protrombin-BARCELONA.QUICK I-II, HIMI mutasyonları ise normal miktarlarda , fakat anormal yapıda protein sentezlenmesi sonucunda düşük biyolojik aktivite olarak tanımlanan disprotrombinemiye neden olurlar.⁵⁰

2.4.4. Allelik varyantlar:

Protrombin Tip3 [F2, GLU157LYS]

Board ve Shaw protrombin tip 3'ün pozisyon 157'de lizinin glutamik asitle substitüsyonu olduğunu gösterdiler. Protrombinin tüm aminoasit dizisinin keşfinden sonra , bu varyant protrombinde gösterilen ilk spesifik değişimdir.⁵¹

Protrombin Barcelona [F2, ARG271CYS]

Arg 271 ve thr 272 arasında ki peptit bağı, Faktör Xa'nın kesimi gerçekleştirdiği 2 bölgeden biridir. Rabiet ve ark .argininin pozisyon 271 de sisteinle yer değiştirmesi sonucunda protrombin Barcelona defekti oluştuğunu göstermişlerdir.⁵²

Protrombin Tokushima [F2, ARG98TRP]

Protrombin Tokushima'da FVa, fosfolipidler ve Ca iyonları varlığında, FXa ile trombine dönüşüm normal olarak gerçekleşir. Buna rağmen; yeni üretilen trombin yalnızca %21'lik protrombin aktivitesi gösterir ve platelet agregasyon aktivitesini azaltır. Hedner ve Davie, anormal molekülün katalitik zincirindeki Arginin 98 triptofana dönüşümünün, Arginine CGG için C'nin T'ye dönüşümü ile olduğunu saptamışlardır.⁵³ Miyeta mutasyonu ARG418TRP olarak farklı bir numaralandırma sistemiyle tanımlamıştı.⁵⁴ Shirakami ve Kawauchi 1984'te soyağacı çalışmalarının sonuçlarına göre probandlarının disprotrombinemi (arg 418trp mutasyonu sonucu) ve hipoprotrombinemi için çift heterozigotluk gösterdiği bildirmişler; bu hastanın moleküler karakterizasyonu Iwahana tarafından 1992'de gösterilmiştir.⁵⁵

Protrombin Quick I [F2, ARG382CYS]

Konjenital bir fonksiyon bozukluğu olan Quick normal protrombin aktivitesinin %2'sinden azını gösteren bir hastanın plazmasından Henriksen ve Owen tarafından 1987'de izole edilmiştir.⁵⁶ Bu protrombin bozukluğunun trombin Quick I ve trombin Quick II olmak üzere iki distrombin oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir. Moleküler genetik çalışmalar hastanın kompaund (çift) heterozigot olduğunu göstermiş ki hastanın ebeveynlerinde akrabalık bulunmuyormuş. Henriksen ve Mann (1988) arg382cys mutasyonunun CGC→TGC dönüşümü sonucunda protrombin Quick I'in oluştuğunu rapor etmişlerdir.⁵⁷ Banfield ve MaacGillivray (1992) insan, kertenkele, alabalık, mersin balığı gibi çeşitli balıklarda; toplam 11 tür üzerinde yaptıkları çalışmalarda; bu küçük arginin rezidüsünün muhafaza edildiğini göstermişlerdir.⁵⁸

Protrombin Quick II [F2, MET337THR]

Henriksen ve Mann 1989'da protrombin Quick II'deki mutasyonun GGCnin GTC dönüşümünde valinin glisin-558 substitusyonu ile gerçekleştiğini göstermişlerdir.⁵⁹ Her iki mutasyon Quick I ve Quick II normal protrombin aktivitesinin %2'sinden azı gerçekleştirilen bir hastadan izole edilmiştir.⁶⁰

Protrombin Himi I [F2, MET337THR]ve protrombin Himi II [F2, ARG388HIS]

Morishita (1992), protrombin geninde oluşan, konjenital bir fonksiyon bozukluğu olan protrombin Himi üzerine çalışmış. Bu mutasyonun fibrinojen pıhtılaşma aktivitesinin azalması ile ilişkili olduğu ve aynı zamanda sentetik substratlara karşı hidrolitik aktivitesini tam olarak gösterdiğini saptamışlar. Protrombin geni 14 exon ve 13 introndan oluşup, trombin kısmı 8'den 14'e kadar olan kısımda kodlanıyormuş. Çünkü yapılan çalışmalarda protrombin Himi defektine trombin kısmındaki anormalitenin neden olduğu sonucuna varılmıştır.⁶¹ Exon 8'den 14'e kadar olan genomik DNA bölgesini single strand konformasyon polimorfizm analizi ile incelenmiştir. Exon 10'da 2 varyant taşıyıcı bulunmuş. Bir alel varyantı babada bulunmuş ve proband ile kız kardeşi tarafından kalıtılmış. Bu kalıtılan protrombin Himi I, pozisyon 8751'de T'nin C'ye transisyonu, kodon 337'de treoninin metionine substitüsyonu ile sonuçlanmış. Bu kompaund heterozigotta diğer bir alel anneden kalıtılmış. Pozisyon 8904'te G'nin A'ya transisyonu, kodon 388'de histidinin arginine substitüsyonuyla sonuçlanmış ve bu mutasyon da Protrombin Himi II olarak adlandırılmıştır.⁶¹

Hipoprotrombinemi [F2, 1-BS INS, 4177T]

PCR bazlı single strand konformasyon polimorfizm (PCR-SSCP) yardımıyla dizi izlediğinde, temelde hipoprotrombinemi gösteren protrombin Tokushimalı hastada disprotrombinemi ve hipo-protrombinemi için kompaund heterozigotluk saptanmış . Bu hipoprotrombinemi protrombin geninde pozisyon 4177de timin (T) tek baz insersyonu olarak tespit edilmiştir (Iwana 1992)⁶² Frame-shift mutasyonu sonucunda; değişmiş bir aminoasit dizisi hem kodon 114 ve exon 7'de prematür terminasyon kodonu (TGA) kodon 174'te meydana gelmiştir. Exon 7, trombin dizisinden önce olan kringle 2 domainini kodlar, frame-shift sonucunda geçersiz bir protrombin fenotipi oluşur. Hipoprotrombinemi kalıtımının babadan olduğu kanıtlanmıştır.

Protrombin Denver I [F2, GLU300LYS] ve Protrombin Denver II [F2, GLU309LYS]

Montgomery (1980) Protrombin Denver olarak açıklanan bir disprotrombinemi çeşidi açıklamıştır. Proband; profilaktik faktör replasmanı ile tedavi edilen ciddi seyreden, hemofili benzeri kanama bozukluğuna sahipmiş. Akrabaları hastalıkla ilişkili bir durum

göstermiyorlarmış. Lefkowitz de (2000) protrombin Denver II olarak adlandırılan diğer bir mutasyon tanımlamıştır. Hastanın glu300-lys (denver I) ve glu309lys (denver II) için kompaund heterozigot olduğu bulunmuş. Faktör II aktivitesi 5 unite/dl ve faktör II antijeni 21 ünite/dl imiş. Fonksiyonel defektin zimojenin enzime dönüşüm aktivasyonunda olduğu bildirilmiştir.⁶³

Disprotrombinemi [F2, ARG67HIS]

Akhavan (2000) semptomları ekimozlar ve majör bir travmaya dönüşen tek bir hematoma olan distrombinemili İranlı bir kızda; protrombin geninde homozigot bir arg67→his(R67H) mutasyonunu açıklamışlardır.⁶⁴

Hiperprotrombinemi [F2, ARG67HIS]

Poort (1996) 3' başlangıçta protrombin untransle bölgesinde sık görülen genetik bir varyasyonu açıklamıştır.⁶⁵ Bu pozisyon 20210 (Degen ve Davie 1987) G'nin A'ya transisyonu ile oluşan bir mutasyon, yükselmiş plazma protrombin seviyeleri ve artmış venöz tromboz riski ile ilişkilidir.⁶⁶ Bununla birlikte; protrombin taşıyıcısı her birey artan protrombin düzeyine sahip değildir ve ara fenotip ile tromboz riski arasında zayıf bir ilişki gösterirler.⁶⁷ Yükselmiş protrombin düzeyinin mutasyonlu genle birlikte mRNA stabilitesinin değişimiyle meydana gelebileceği düşünülmüştür. Carter ve arkadaşları bu durumu hücre kültüründe denemiş ve protrombin mutasyonunun yalnızca mRNA yıkım etkinliğiyle kalmadığını, aynı zamanda protrombin mRNA'sının yıkım oranındaki değişiminden sorumlu olduğunu göstermişler.²⁸

Gehring (2001) 20210 G-A mutasyonunun 3' başlangıç ucunda meydana gelen sinyal etkinliğinde F2 20210G-A'nın yeni bir fonksiyonel mutasyon kazanmasıyla, mRNA birikiminde ve protein sentezinde artışa neden olduğunu göstermiştir.⁶⁸

Rees (1999) 22 farklı Avrupa dışı ülkeden örnekleri analiz etmiş ve Avrupa dışında çok nadir görülen, FV Leiden benzeri, protrombin 20210 G→A varyantını bulmuştur. 1811 Avrupalı olmayan kişi test edilmiş ve yalnızca bir Hintli'de heterozigot mutasyon saptanmıştır.⁶⁹

Öner (1999) da FV Leiden mutasyonu ve protrombin 20210 G→A mutasyonunun her ikisi için de heterozigot olan bir hastada Budd-Chiari sendromu bildirmişler. 20210 G→A mutasyonuna kısaca PM (protrombin mutasyonu) adını verdiler.⁷⁰

Trombofilik ailelerin probandlarında bu tek baz substitüsyonu %18, özel olarak seçilmemiş tekrarlayan derin ven trombozlu hastalarda %6 ve sağlıklı kontrollerde %2 olarak bulunmuştur. Rosendaal (1998) 11 merkez ve 9 ülkeden aldığı verilerde toplam 5527 hasta üzerinde değerlendirme yapmış ve 20210A mutasyonu için 111 heterozigot taşıyıcı bulunmuş. Sonuç olarak prevalans %2 olarak değerlendirilmiştir. Bu Güney Avrupada yaklaşık %3; Kuzeydekilerin (%1,7) yaklaşık 2 katı yüksek değerde bulunmuş.

⁷¹ Protrombin varyantları Asya ve Afrika ırklarında çok nadir olduğu görülmektedir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda Gürvey ve ark. na göre protrombin G20210A mutasyonu %2.3 ve Akar'a göre %2,7'dir. Ayrıca Akar'a göre Kıbrıslı Türklerde bu defekt %8.1'dir. ⁴⁹

Protrombin gen mutasyonu sıklıkla Kafkas toplumlarında görülmektedir. % 1-4 arasında genel populasyonunda heterozigot formda bulunur. ¹⁸ Bu mutasyonun Hindistan, Kore, Afrika ve Kuzey Amerika yerlilerinde sıklığı çok azdır. Bununla birlikte İspanyollarda bu oranın %6 olduğu rapor edilmiştir. ²⁶

Zimelin 1998'de 20210 G→A polimorfizminin tek veya tekrarlayan mutasyonel olaylardan orijin alıp almadığını belirlemek için 133 Kafkaslıkla ilişkisi olmayan (10 homozigot ve 123 heterozigot) Yahudi, Avustralyalı ve Fransız orijinli kişide 16-21 kb aralığında FII geninde 4 dimorfizmin alel sıklığına bakmış. Kontrol grubu olarak 110 Kafkas varmış. Herbir dimorfizm için belirgin alel farklılıkları, çalışma grupları arasında ($P=0,0007$ veya daha az) gözlenmiş, güçlü linkage dengesizliği ve yıkıcı bir etki akla getirmiş. Gerçekten; bir founder haplotip mutant alellerde %68 oranında bulunmuş ve sadece 20210 normal alellerinde %34'müş ($P<0,0001$). Bu veri FII polimorfizmi için bir tek orjin olduğunu kuvvetli bir şekilde destekler niteliktedir. Çünkü polimorfizm Kafkas-dışı toplumlarda çok nadir veya yok, muhtemelen Afrikalılar; Afrikalı olmayanlardan ve Kafkasların Mongoloid populasyonlardan ayrımı sonrasında meydana gelmiş olabilir. ⁷²

2.4.5. Protrombin G20210A ve Hastalıklarla ilişkileri:

Protrombin G20210A ve Koroner Arter hastalığı ilişkisi:

Rosendaal (1997) kadınlarda bu mutasyonun miyokard infarktüsü (MI) için 4 kat yükselmiş bir risk gösterdiğini;⁷³ Daggen da (1998) erkeklerde bu mutasyonun bulunmasının MI için riski 1,5 kat artırdığını belirlemiştir. ⁷⁴Franco (1999) 400 sağlıklı kontrolde 20210 alel sıklığını %1 olarak bulmuş. Bu oran aterosklerotik hastalığı gelişen 263 hastada %2,7 olarak bulunmuş. Hasta grubundaki her heterozigot miyokard infarktüsü geçirmiş olan hastalarmış. Buna ek olarak; elde edilen veriler venöz ve arterial hastalıklarda mutasyonun rolünü anlamaya katkıda bulunup, aşırı trombin üretiminin mutasyonla ilişkisine delil sağlamıştır.⁷⁵

Amerika'da ani koroner ölüm gerçekleşen 168 hasta ve 606 kontrol üzerine yapılan bir çalışmada protrombotik mutasyonlardan; prothrombin G20210A ve FV Leiden mutasyonlarının artmış bir risk göstergesi olmadığı belirtilmiştir.¹⁸ Yine Amerikada yapılan geniş kapsamlı bir çalışmada miyokard infarktüsü ve protrombin mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir.⁷⁶ Bu çalışmaya benzer bir çalışma Türkiye'nin güneyinde yapılmış, 55 yaş altı MI'lı hastalarda protrombin mutasyonunun MI gelişiminde anlamlı bir risk faktörü olmadığı gösterilmiştir.⁷⁷ Orta Doğu Arab popülasyonunda koroner arter hastalığı olan bir gruptaki çalışmada ise protrombin G20210A mutasyonu için yine anlamlı bir riskten bahsedilmemiştir.⁷⁸ İtalyan Kafkaslarından ülkenin merkezinde ve güney bölgelerinde yaşayan 247 MI'lı hastada ve 247 sağlıklı yaş ve cinsiyet uyumlu kontrolde 20210A protrombin aleli için heterozigot sıklığı; hastalarda %6,5 ve kontrollerde %2,8 olarak bulunmuş. Bu oran ailesinde MI hikayesi olan hastalarda %8,7'ye kadar çıkmış. Sonuç olarak bulgular MI'lı aile hikayesi olan, diğer major kardiovasküler risk faktörleri olmayan veya anjiyografisinde sınırlı koroner hastalığı bulunan hastalarda; kontrollerle karşılaştırıldığında, 20210A protrombin alel varlığı akut koroner sendrom için riskte anlamlı bir artış göstermektedir. ²⁹

Prohaska (1999) anjiyografi ile doğrulanan 284 koroner arter hastasında protrombin geninin 20210 G→A polimorfizmi varlığına bakmış ve bunu 340 sağlıklı kontrolle karşılaştırmıştır. Mutasyonun prevalansı her iki grup içinde benzermiş. 294 venöz tromboz hastasında ise sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında mutasyon sıklığında hafif artış saptanmış.

Protrombin G20210A ve Arterial Tromboz İlişkisi:

Laczica (2002) sağ pulmoner arterinde total tıkanma olan ve buna bağlı kronik tromboembolik pulmoner hipertansiyon gelişen 19 yaşında bir kadında, tip I antitrombin eksikliği ve protrombin 20210GA mutasyonu için çift heterozigotluk bildirmiştir. Pulmoner vasküler durum, pulmoner tromboendarrektomi ile başarılı bir şekilde düzeltilmiş ve ilk klinik müdahale sonrası 24 hafta içerisinde düzelme gözlenmiştir.⁷⁹

Protrombin G20210A ve Venöz Tromboz İlişkisi:

Chomouard (1999) faktör II 20210 G→A mutasyonunun sıklığını, idiopatik portal ven trombozu olan 10 beyaz Avrupalı hastada çalışmış; ortalama yaşları 50,4 olan 5 kadın, 5 erkekte 20210 G→A mutasyonunun sıklığı %40 bulunmuş. Portal ve derin ven trombozu olmayan kontrollerde % 4,8 olarak değerlendirilmiş. Bu hastalarda FV 1691 G→A mutasyonunun sıklığı portal ven trombozlularda ve kontrollerde benzermiş; ancak derin ven trombozlularda artmış bir sıklık bulunmuş.⁸⁰

De Stefano (1999) FV Leiden 1691 G→A ve FII protrombin 20210 G→A'nın her ikisi için heterozigot olan hastalar bulmuş ve bunların tek başına faktör V Leiden mutasyonu bulunan taşıyıcılara göre tekrarlayan tromboz için 2,6 kat artmış bir riskleri olduğunu ortaya koymuştur.⁸¹

Cornal (1999) bir İspanyol ailede 20210A protrombin mutasyonu için homozigot 3 kişi tanımlamış ve bu kişiler FVL mutasyonu için de heterozigotlarmış. İki mutasyonun birleşmesiyle erken yaşta venöz tromboz olma riskleri artmış. Buna rağmen FV Leidenle ilişkisinde bile, 20210A protrombin mutasyonunun homozigot durumunda da trombotik olayların tetiklenmesi için ek risk faktörlerine ihtiyaç vardır.⁸²

Gürvey (2001) 146 trombozlu hastanın 45'inde (%30,8) FV Leiden mutasyonu saptamış. Bunlardan 7si homozigot, 38'i heterozigot taşıyıcı imiş. 10 tane de protrombin G20210 A mutasyonu saptanmış(%6,8). Bunun yanında 6 hastada da hem protrombin hem de FV mutasyonunun ikisi birden (%4,1) bulunuyormuş.⁸³

Souto (1999) bir ailede trombotik hastalığın 20210 A varyantıyla ilişkisinin kompleksliğini rapor etmiş. İdiopatik trombofilili proband üzerinden soy araştırması

yapılmış. Tromboembolizm hikayesi olan aile üyeleri 20210A varyantı için heterozigotlarmış. Buna ek olarak 4 akrabası heterozigot ve 2 tane de 20210A mutasyonu için homozigotmuş ve klinik belirtileri gösteriyorlarmış. İki homozigottan biri 51 diğeri 19 yaşındaymış.⁸⁴

De Stefano heterozigot bölge taşıyıcılarında ki ilk venöz tromboz geçirme riskiyle, normal genotipli hastalarda, kendiliğinden gelişen tekrarlayan venöz tromboembolizm geçirme riskine benzer olduğunu ortaya koymuş. Protrombin mutasyonu taşıyıcılarının ilk geçirdikleri venöz tromboz sonrasında normal genotipli hastalardaki gibi ve aynı süre antikoagülanla tedavi edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.⁸⁵

Portekizde yaş ortalaması 27 olan bir grupta protrombin mutasyonunun venöz tromboembolizm için anlamlı bir risk taşıdığı gösterilmiş. 100 kişilik kontrol grubunda oran % 5 iken; 40 venöz tromboembolizmli hastada; oran %12,5 bulunmuş.⁸⁶

Protrombin G20210A ve Tip I Diabet İlişkisi:

Humpert (1999) tip I diabetli 384 hastayı protrombin 20210 G→A protrombin polimorfizmi için taramış ve 9 hastada bu varyantı bulmuş. Koroner kalp hastalığı, nefropati veya retinopatisi olan diabetik hastalarda protrombin 20210 G→A protrombin polimorfizminin bulunması koroner kalp hastalığı insidansında bir artış göstermemiş. Meyer (1999) kandan PCR- SSCP metoduyla FV Leiden ve FII protrombin 20210 G→A mutasyonu için genotiplemeyi açıklamıştır.

Protrombin G20210A ve Ani İşitme Bozukluğu:

Ani işitme bozukluğu, vestibular disturbans (tinnitus) nedeni olan temel faktörlerden biri akut labirent iskemisi olduğu; ve ani işitme kaybının ortaya çıkmasının kohlear kan sirkülasyon bozukluğu ile olduğu düşünülmektedir. Mercier (1999) protrombin geninin 20210A alelinin perseptif sağırılık için risk faktörü olduğunu göstermiştir.. Spontan derin ven trombozu olan 368 hastanın (ortalama yaş:41), 18'inde (12 kadın ve 6 erkek), akut unilateral işitme kaybı bulunmuş. Bu 18 hastanın 6'sı 20210 aleli için heterozigotmuş. Aynı laboratuvarında benzer zamanda 365 nontrombotik hasta üzerinde hemorojik semptomlar veya trombositopeni için çalışılmış; 4 hastada akut unilateral perseptif sağırılık saptanmış. 395 nontrombotik ve nonhemorajik cinsiyet ve yaş

karşılaştırmalı kontrollerde de 6 tane akut unilateral perseptif işitme kaybı olan hasta bulunmuş.⁸⁷

Protrombin G20210A Prevalansı ve Rölatif Risk					
	Sağlıklı bireylerin prevalansı %	Venöz Tromboz		Arteriyel Tromboz*	
		Prevalans (%)	RR	Prevalans (%)	RR
Poort SR ⁶⁵	2.3	6.2	2.8		
Cumming AM ⁹⁵	1.2	5.5	5.4		
Schobess R ⁹⁷	3	8.4	3.0		
Ridker PM ⁷⁶	3.9	6.4	1.7	3.5	0.95
Rosendaal ⁷³	1.6			5.1	4.0
Araujo F ⁹⁸	5			3.8 [†]	-
Arruda VR ⁹⁹	0.7			3.2 [‡]	-

Tablo 3: Protrombin G20210A prevalansı ve rölatif risk

notlar:

RR - rölatif risk

* serebral iskemi, MI, stabil olmayan anjina içerir

† sağlıklı kontrollerde anlamlı farklılık yok

‡ sağlıklı kontrollerde anlamlı farklılık görülmüş. (P=0.03)

Tromboz riskini 2.7-3.8 kat arttıran G20210A mutasyonunun, heterozigot formunun genel popülasyonda sıklığı %2-2.3, trombozlu bireylerde %6-6.2, tromboz aile öyküsü olanlarda %18 olup, bu mutasyonun venöz tromboz için yaygın kalıtsal risk faktörlerinden olduğu bildirilmiştir.⁸⁸

Fransa Bask bölgesinde yaşayan yaş ortalaması 34,5 olan; literatürlere göre protrombin mutasyonu taşıma ihtimali olan 103 hasta üzerinde bir çalışma yapılmış. Bu hastalarda tekrarlayan ailesel venöz tromboz hikayesi, genç yaşta felç geçirme, tekrarlayan maternal fetal bozukluklar (preeklampsi, düşük, gelişim geriliği vs..) gibi hastalıklar bulunuyormuş. 5 hastada (%4,8) taşıyıcılık bulunmuş. Bunlardan ikisi homozigot, üçü heterozigotmuş (biride FV Leiden içinde heterozigotmuş).⁸⁹

Batı avrupada protrombin G20210A prevalansı üzerine çeşitli yayınlar yapılmış. Bunlarda çeşitli trombofilili ve sağlıklı popülasyonlar karşılaştırılmış. Aşağıda ki tabloda kısaca çalışma gruplarını ve prevalansları gösterilmiştir (tablo 4).

ülke	Hastaların profilleri	PT20210A prevalansı	Referans
Hollanda	Kişisel/ailesel venöz trombozlu hastalarda	18% (5/28)	(65)
	İlk defa venöz tromboz geçirenler	6.2% (29/471)	
	Kontrol grubu	2.3% (11/474)	
İngiltere	İlk veya tekrarlayan venöz tromboz olaylarında	5.5% (12/219)	(95)
	Kontrol grubu	1.2% (2/164)	
İtalya	Serebral ven trombozular	20% (8/40)	(30)
	Kontrol grubu	3% (4/120)	
İtalya	İskemik inme (<50 yaş)	12.5% (9/72)	(96)
	Kontrol grubu	2.5% (5/198)	
İtalya	Açıklanamayan geç fetal kayıplı kadınlarda	8.9% (6/67)	(90)
	Kontrol grubu	3% (7/232)	
Almanya	Tekrarlayan spontan düşüğü olan kadınlarda	6.7% (7/102)	(92)
	Kontrol grubu	0.4% (1/128)	
italya	Fetal gelişim geriliği olan kadınlar	11.5% (7/61)	(91)
	Kontrol grubu	1.6% (1/93)	
Fransa (Bask bölgesi)	Çalışmanın tümündeki hastalarda	4.8% (5/103)	(89)
	İlk veya tekrarlayan venöz trombozlu hastalarda	7.7% (3/39)	
	Doğumsal bozukluğu olan kadınlarda	2.3% (1/44)	
	Sadece Basklarda	4.5% (1/22)	
	Kontrol grubu*	3.2% (9/283)	

Tablo-4 Çeşitli ülkelerde trombofili ve kontrol karşılaştırmaları

*İspanyadan sağlıklı Bask popülasyonu.

Protrombin G20210A ile Kadınlarda Oral Kontraseptif Kullanımı ,Tekrarlayan Düşükler, Fetal Gelişim Geriliği ve İlişkisi:,

Östrojen içerikli oral kontraseptifler ve hormonlar kan pıhtısı oluşum riskini arttırmaktadır. Protrombin mutasyonlu bayanlarda oral kontraseptif kullanımıyla 16 kez DVT gelişim riskini arttırdığı gözlenmiştir. Beyinde pıhtı oluşumunda da anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır. Oral kontraseptif kullanımının ilk 6-12. aylarında pıhtı oluşumu daha sık meydana gelmektedir. Sadece progestin içerikli kontraseptiflerin riski arttırmadığı görülmüştür. Hormon replasman tedavisinde ise risk 2-4 kat arasında artış göstermiştir. ²⁵

G20210A prothrombin-gene mutasyonu ve Faktör V Leiden mutasyonunun; kadınlarda hamilelik süresince ve doğum sonrası dönemde, venöz tromboembolizm riskinin artmasıyla ilişkili olduğu ve her iki mutasyonun birden bulunmasıyla riskin; mutasyonun tek başına bulunmasına göre katlar derecede arttığı belirtilmiştir. ³²

İtalya’da yapılan bir çalışmada; açıklanamayan fetal kayıplı 67 hastadan 6’sında; %8.9’unda protrombin G20210 A mutasyonu bulunmuş. Bu oran kontrol grubunda %3 olarak saptanmıştır. ⁹⁰

Yine İtalya’da fetal gelişim geriliği olan 61 kadın hastadan 7’sinde mutasyon saptanmış.(% 11.5). Bu oran kontrol grubunda %1.6’larda, 93 sağlıklı kontrolden yalnızca 1’inde bulunmuş. ⁹¹

Almanya’da tekrarlayan spontan düşüğü olan kadınlarda protrombin mutasyonunu taşımalarının anlamlı bir risk faktörü olup olmadığına bakılmış, tekrarlayan spontan düşüğü olan 102 hastadan 7’sinde (%6.7) G20210A saptanmıştır. Kontrol grubunda bu oran % 0.4 olarak bulunmuştur. ⁹²

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER:

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri

Agaroz (Sigma)
Ependorf Tüpleri (0.5-1.5)
Etanol %70-%100
Etidyum Bromid (Sigma)
PBS
Pipet Uçları
Taq Polimeraz (Fermentaz)
Zefiran

3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı (Vestel)
Derin Dondurucu (Arçelik)
Distile Su Cihazı
Elektroforez Güç Kaynağı (Thermo EC250-90)
Elektroforez Tankı (Thermo Midicell primoEC330)
İnkübatör (Heraus)
Hasas Terazı (Precisa XP220 A)
Laminar Kabin (Heraus)
Manyetik Karıştırıcı (IKA RCT basic)
Mikropipetler (Eppendorf, 2-20, 20-200, 200-1000)
Mikrosantrifüj (Eppendorf 5415R)
pH Metre (Metler Toledo)
Santrifüj (Heraus)
Su Banyosu (Polyscience)
Spektrofotometre (Schmadzu)
Termal cycler (PalmCycler/ Corbet research)
UV görüntüleme (Vilber Lourmat)
Vortex (IKA MS1)

3.3. Çalışmada Kullanılan Kitler ve Özellikleri

3.3.1. DNA İzolasyon Kiti

QIAmp DNA izolasyon kiti spin kolon yöntemi ile DNA izolasyonu yaptık. Kit ile 200 µl kan örneğinden mutasyon analizi için gereken DNA miktarı sağlanabilmiştir.

Kit içerisinde yer alan kimyasallar ve gereçler:

- QIAamp Spin columns
- Toplama tüpleri (2 ml'lik)
- Buffer AL* (19ml)
- Buffer AW1 (19 ml)
- Buffer AW2 (13ml)
- Buffer AE (12 ml)
- QIAGEN proteaz
- Proteaz çözücü (1,2 ml)

3.3.2. PRONTO- DİAGNOSTİC Mutasyon Kiti

Biz bu çalışmamızda prontodiagnostics (REF 9923) Amplification Mix, PRONTO ThromboRisk (Factor V gene, Prothrombin gene, MTHFR gene) üçlü kiti kullandık. Bir kutuda 32 hastalık analiz için gerekli malzemeler sağlanmıştır.

Kit ELISA yöntemi ile PCR sonrası, hibrit DNA ların tespitine dayanarak renk oluşumunu gözlemlememizi sağlıyor ve direkt mutasyon tespiti ile FVL varlığını veya yokluğunu kesin olarak doğruluyor.

- Kit içerisinde yer alan kimyasallar ;
- Buffer 2 -3ml
- Solution C-130µl
- Solution D-100µl
- ColoRed Oil-13ml
- Assay Solution-100ml
- Wash Solution (20x)-100ml
- HRP Conjugate- 450µl

TMB Substrate-40ml

Stop Solution (1M H₂SO₄)- 30ml

PRONTO TromboRisk Plates x2

Detection Plates x2

3.4. Çalışılan Hasta Grubu

Çalışmamızda Abant İzzet Baysal Üniversitesi Düzce Tıp Fakültesi Kardiyoloji kliniğinde Miyokard infarktüsü tanısı ile yatarak tedavi gören veya infarktüs sonrası poliklinik kontrolüne gelen hastalarla görüşüldü. Hastalara çalışmanın amacı, kabul ederlerse kendilerinden 0,2 ml kan alınacağı ve mutasyon saptanması durumunda birinci derece akrabalarından da test yapılarak riskli olanların saptanabileceği bildirilerek gönüllü olanlar çalışmaya alındı. 30 MI geçirmiş hasta ve 30 sağlıklı kontrolün kanı alındı. Kontrol grubu olarak aynı sayıda ve cinsiyette, tromboembolik komplikasyonu olmamış sağlıklı gönüllülerle görüşülüp bilgilendirilme sonrası çalışmaya dahil edildiler. Sistemik Lupus Eritematozus, Behçet Hastalığı, Marfan Sendromu, Homosistünüri, cerrahi müdahale, immobilizasyon gibi tromboemboli için riski olan hastalar çalışma dışında bırakıldı.

3.5.Çalışma Yöntemi

Hastalar hakkında EK1 deki hasta bilgi formu dolduruldu ve konu hakkında bilgilendirilerek onay alındı. Cilt alkolle temizlenerek brakiyal venden steril enjektörle 0,2ml kan alındı. Hastalara sonuçları rapor edildi ve raporlar sonucu gerekli görülen hastalara genetik danışma verildi.

3.5.1. Periferik Kandan DNA izolasyonu

Çalışmamızda QIAmp DNA izolasyon kiti ; QIAmp spin kolon ile DNA izolasyon yöntemini kullandık. Bu kit ile 200 µl kan örneğinden mutasyon analizi için gereken DNA miktarı sağlanabilmiştir. Metod seçiminde hastalardan mümkün olan en az miktarda kan alınması amaçlanmıştır. Ayrıca method, sterilizasyon açısından güvenilir olması ve çalışma süresinin diğer methodlara kıyasla kısa ve pratik olması açısından tercih edilmiştir.

QIAamp spinkolon ile DNA izolasyon yöntemi

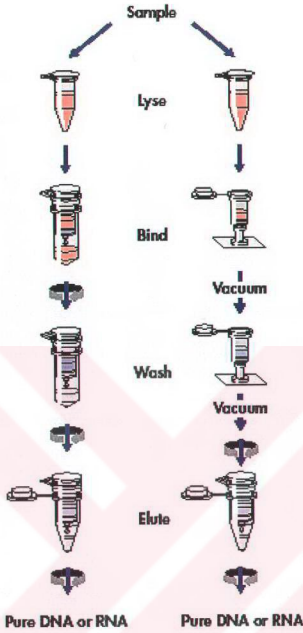
200 µl kan örneğinden 3-12 µg DNA elde edilebilecek bir yöntemdir eğer daha az örnek var ise PBS (fosfat buffer solusyonu) ile örnek hacmi artırılır.

Hazırlık: Örnekler oda sıcaklığına getirilirken su banyosu 56 C ye ayarlanır. Buffer AL su banyosuna konarak inkübe edilir.

Metod:

- 1- 1,5 ml lik ependorf tüpü içine 20 µl protease konur.
- 2- Üzerine 200 µl kan eklenir.
- 3- Kanın üstüne 200 µl buffer AL konur ve 15 sn vortekslenir.
- 4- Ependorf tüpü su banyosuna alınarak 56 C de 10 dk inkübe edilir.
- 5- Mikrosantrifüj (kısa süreli çevirme)
- 6- 200 µl etanol (%96-100) eklenerek 15 sn vortekslenir.
- 7- Mikrosantrifüj
- 8- Ependorftaki karışım dikkatlice spinkolona boşaltılır.
- 9- 8000 rpm de 1 dk santrifüj edilir.
- 10- Spinkolon altında yer alan dolu koleksiyon tüpü yeni temiz 2 ml lik tüp ile değiştirilir.
- 11- Spinkolon için e 500 µl AW1 buffer eklenir 8000 rpm de 1 dk santrifüj edilir.
- 12- Spinkolon altında yer alan dolu koleksiyon tüpü yeni temiz 2 ml lik tüp ile değiştirilir.
- 13- Spinkolon için e 500 µl AW2 buffer eklenir 14 000 rpm de 3 dk santrifüjlenir.
- 14- Spinkolon altında yer alan dolu koleksiyon tüpü yeni temiz 1,5 ml lik ependorf tüpü ile değiştirilir.
- 15- Spinkolon içine 200 µl buffer AE (veya distile su) eklenir. 1-5 dk oda ısısında beklenir.
- 16- 8000 rpm de 1 dk santrifüjlenir.
- 17- Spinkolon atılır. Ependorf içerisinde çözünmüş saf DNA kalmıştır. Kapağı kapatılarak kullanılmak üzere kaldırılır. (Şekil 9)

**QIAamp Spin Column Procedure
in microfuges on vacuum manifolds**



Şekil 9: Spinkolon yöntemi ile DNA izolasyonu

3.5.2.Elde Edilen DNA Saflığının Ölçülmesi:

QIAamp spinkolon yöntemiyle elde edilen DNA'nın mutasyon analizine geçmeden önce saflığı kontrol edildi.

Bunun için; elde edilen DNA'lar 1:200 oranında sulandırıldı. 5 mikrolitre DNA; 995 mikrolitre distile su ile sulandırıldı. Bu miktar spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçüldü. (280 nm dalga boyunda ölçüm elimizde ki protein miktarını ölçmek için kullanılır.)

* DNA miktarını hesaplamak için kullandığımız formül:

$$\begin{aligned} & 260 \text{ nm}'de \text{ ölçülen değer} \times \text{sulandırma miktarı} (200) \times \text{sabit değer} (50) \\ & = \text{DNA'nın konsantrasyonu (mikrogramDNA/ mikrolitre)} \end{aligned}$$

* DNA verimliliği ise:

$$260 \text{ nm}'de \text{ ölçülen değer} / 280 \text{ nm}'de \text{ ölçülen değer} = \text{VERİMLİLİK}$$

Bu değerin 1,6- 1,8 arasında olması DNA'nın kaliteli olduğunu gösterir. Bu değerin 1,7 olması tercih edilir. Bu aralıkların altında ki değerler alkolün fazla olduğunu; yukarısında ki değerler ise protein kontaminasyonun olduğunu gösterir.

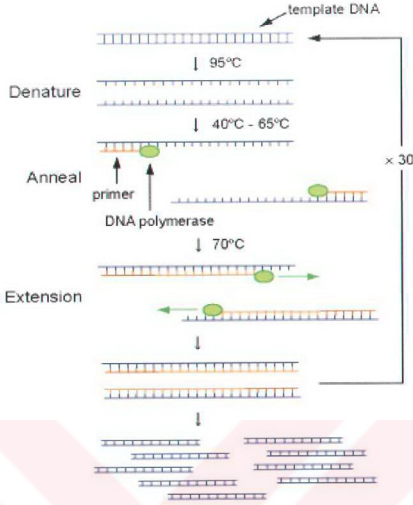
3.5.3.Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR):

Metod basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılmasıdır. PCR, bir çesit "in vitro klonlama"dir. PCR, reaksiyonu DNA'nin iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasına (denatürasyon); daha sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasına (annealing); sonra zincirin uzamasına (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. (Sırasıyla 94°C-98°C; 37°C-65°C; 72°C). PCR tekniği tek veya çift iplikçikli DNA'yi; RNA'ya hedef olarak kullanabilir. (şekil 9)

Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer (18-20 baz uzunluğunda) kullanılarak; bu iki primer ile sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır.

PCR için:

- 1) DNA örneği, genelde genomik DNA
- 2) Çoğaltılacak olan bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer,
- 3) dNTP'ler (A,T,C,G),
- 4) Isıya dayanıklı DNA-Polimeraz enzimi,
- 5) Uygun pH ve iyon koşullarını (Mg+2) sağlayan tampon karışımı gereklidir



şekil 10: PCR mekanizması

PCR Yapılırken laboratuvarında Dikkat Edilenler:

PCR, tek bir molekül DNA'yı dahi çoğaltabileceğinden; reaksiyon karışımlarının DNA molekülleri ile kontamine olması engellenmeye çalışıldı. Kontaminasyonun engellenmesi için:

1. PCR'ı UV ışıqla donatılmış "laminar flow hood" içinde gerçekleştirdik. Kullanılmanın dışında UV ışıkları açık tutuldu. Kabin içinde yalnızca PCR için kullanılan mikrotüpler; disposabl eldiven, pipetler bulundu. Otomatik pipetler çok sık kontaminasyon kaynağı olduklarından; positive-displacement pipetleri ve tıkaçlı pipet uçları kullanıldı.

2. PCR reaksiyonuna baslarken, temiz bir eldiven giyildi ve eldivenler sık sık değiştirildi.

3. Sarf malzemesi küçük hacimlerde saklandı. Bunları hazırlarken tüm malzemelerin yeni ve steril olmasına dikkat edildi.

4. Sarf malzemelerini taşıyan mikrotüpleri açmadan önce mikrosantrifüj yapıldı. Bu işlem eldivenlerin ve pipetlerin kontaminasyonuna engel olmak için yapıldı.

5. Reaksiyon tüpüne en son DNA eklendi.

6. Reaksiyon tüpüne DNA eklenirken; hava kabarcıkları olusturulmamaya dikkat edildi. (Ek 2- fotoğraf 2)

3.5.4. Pronto Kiti ile Mutasyon tayini;

Çalışmada Pronto adlı bir kit kullanılmıştır. Bu kit ile DNA dizilerinde önceden tanımlanmış polimorfizmler; single nukleotid primer extension ELİSA yöntemi ile tayin edilir. Tek nukleotidli DNA dizi polimorfizmlerinin saptanmasında hızlı güvenilir ve kullanımı kolay bir yol olduğu için bu kiti kullanmayı tercih ettik.. Bu yöntem; amplifikasyon sonrası mutasyon tayin sistemi, single nukleotid primer uzama yöntemini kullanır. Bu yöntem DNA polimerazın nukleotidleri elangasyon iplikciğine birleştirmesine dayanan yüksek spesifiteden yararlanır. Pronto sisteminin, bütün genotipleme formatında her bir mutasyon bölgesi, 96 kuyucuklu mikrotiter platelerin iki kuyusunda test edildi.

a. DNA amplifikasyonu:

QIAamp spin kolon yöntemi ile elde edilen DNA'nın amplifikasyonudur. Öncelikle kontrol grubu ve hasta grubundan alınan kanlar DNA amplifikasyon reaksiyonları için hazır hale getirildi. Örnekler için mini ependorf tüplerinden hazırlandı. Önce Amplifikasyon mixi hazırlandı. Her bir örnek için 19 µl Basic Amplification mix'i ile 0.4 µl Taq Polimeraz karışımı toplam 19.4 µl üzerine 3 µl DNA pipetlendi. Ve PCR 1 uygulandı.

PCR 1

1. basamak: 94°C de 5 dk
2. basamak: 94°C de 30 sn
66°C de 20 sn
72°C de 20 sn

PCR 1'in 2. basamağı 15 döngü gerçekleştirirdi

3. basamak: 72°C de 2dk

4. basamak: 94°C de 30 sn

58°C de 30 sn

72°C de 30 sn

PCR 1'in 4. basamağı 25 döngü gerçekleştirildi.

5. basamak: 72°C de 5 dk.

PCR 1 sonrasında amplifiye DNA elde edildi. Test edilecek mutasyonu kuşatan DNA fragmentleri çoğaltıldı. Bu çoğaltılan DNA primer extension (uzama) reaksiyonu için substrattır.

b. DNA'ların Kalitatif Analizi için jel elektroforez işlemi:

Amplifikasyon sonrasında DNA'nın kontrolü için jel elektroforezi yapıldı. Yükleme yapılacak jelin hazırlanması için; 2gr Agaroz 100ml 0,5xTEB ile ocak üzerinde manyetik karıştırıcıyla kaynatılarak çözündürüldü ve 60 °C'ye getirildikten soğutulduktan sonra sıvı haldeki agaroz jel, kalıba döküldü ve taraklarla birlikte soğumaya bırakıldı. Jel yüklemeye hazır hale geldikten elektroforez tankına alındı. Ve DNA örneklerimizden 1-2 µl ve boya olarak kullandığımız EtBr'den de 1-2 µl pipetajla karıştırılarak eklendi. İlk kuyuya marker sonrakilere DNA'lar yüklendi. 120V'da 30 dakika yürütüldükten sonra jel UV altında incelendi. Jele yüklenen örneklerde protrombin mutasyonuna spesifik 420 bp'lik bantlar görüldü. (Ek 2- Fotoğraf 3)

c. Amplifikasyon sonrası uygulama:

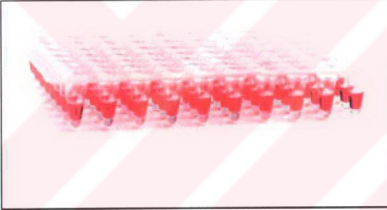
Amplifiye DNA'ya bağlanmamış özgür nükleotidlerin inaktivasyonu alkali fosfat ile sağlanır. Böylece primer extension reaksiyonunu engellemeleri önlenmiş olur.

d. Primer Extension Reaksiyonu:

Single- nükleotid primer extension reaksiyonu 96 kuyucuklu termo-plateler ile yürütülür. Her bir kuyucuk 5' uçtan işaretli primerler içerir. Bu primerler test edilen DNA'nın farz edilen mutasyon bölgesinin yanına hibridize olur ve ortamda bulunan tekli nükleotid türleride bu test edilen bölgede kendilerine komplementer nükleotidlere bağlanırlar ve bu 5' işaretli primerin tekli biotinylate nükleotidlerle uzaması sağlanır. Her post amplifikasyona uğratılmış örnek her bir mutasyon için iki kuyucukta test edilir. Biri

mutant alel için, diğeri kuyu ise yaban tip (normal) alel için kullanılır. Test edilen hastanın genotipine göre primer ile birleşme olur. Plate thermel- cyclers'a yerleştirilir ve kısa primer extension reaksiyonu yerini alır.

Çalışmada ise; 60 µl Pronto Buffer 2 + 3 µl Solusyon C + 2 µl Solusyon D karışımı hazırlandı. Bu karışım üzerine Amplification mix karışımı DNAmızdan 15 µl eklendi. Karışım pipetaj ile homojenize edildi .Su banyosu veya PCR 37°C'ye ayarlandı ve 30 dk inkübe edildikten sonra PCR 95°C'ye getirilip tekrar 10 dk inkübe edildi. (Bu aşama 4 saat bekleyebilen bir aşamadır.) Pronto platetinde mutasyona özel mutant ve wild tipi taşıyan kuyucuklara 8 µl mix (karışım) pipetlendi. Bu işlem yapılırken pipetin kuyucuklara değmemesine dikkat edildi. Sonra her kuyuya colored oil damlatıldı. (Şekil 10) Colored şişesininde kuyulara değmemesine dikkat edildi. (Ek 2- fotoğraf 4)



Şekil 11: Primer Extension plağı

PCR 90°C'ye geldikten sonra; termo-plate PCR 2 aşamasına tabi tutuldu.

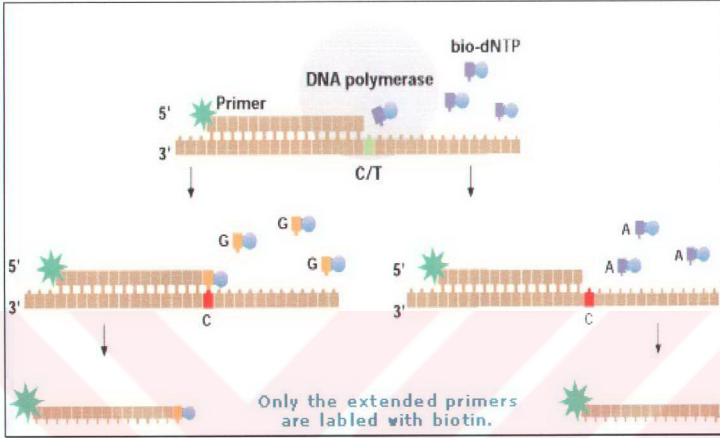
PCR 2

1. basamak: 94°C 15 sn

2. basamak: 94°C 30sn

52°C 10sn

2. basamak 20 döngü şeklinde gerçekleşir. (Bu aşama da örnekler 24 saat + 4°C'de bekleyebilir.



şekil 11: Primer extension reaksiyonu

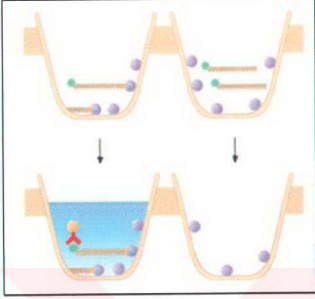
e. ELİSA ile mutasyon tayini:

Colored yağın içindeki yaklaşık 8µl olan Reaksiyon ürünleri streptavidin kaplı ELİZA platelerine transfer edildi. Kuyucuklara 100 µl yeşil renkli Assay buffer eklenerek dilüe edilerek 10 dakika oda ısısında inkübe edilir.

Wash Buffer (yıkama solüsyonu) hazırlanırken: her bir örnek için 1500 µl wash buffer x20, 28500 µl distile su ile karıştırılarak hazırlandı..

Kısa inkübasyon sonrasında bağlanmamış primerler Wash Buffer ve 4 kez 350 µl WB ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Ve bağlananlar içinde ortama peroksidaz işaretli anti korlar (HRP konjugat) eklendi ve bu konjugat 5' antijenik yapıyı primerlere bağlanırlar. (Her bir örnek için HRP konjugattan 10 µl; 1000 µl Assay buffer ile dilüe edildikten sonra 100 µl bu karışımdan eklendi) 10 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Ve tekrar 4

kez WB ile yıkandı.Yıkama sonrasında konjugatla bağlanmamış primerler ortamdaki uzaklaşır ortama eklenen 100 µl TMB- substrat varlığında bir peroksidaz reaksiyonu meydana gelir 15 dakika beklenir ve koyu mavi bir renk; konjugatla bağlanma olan pozitif kuyucukların her birinde kendini gösterir. (Şekil 11)



şekil 11: Eliza yöntemi



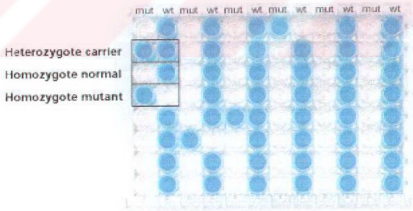
: TMB substrat



: 5' işaretli primer

• : HRP konjugat

Test edilen her bir mutasyon bölgesi için en az bir kuyunun maviye boyanmış olması gerekir. (Şekil 12)



Şekil 12: Mutasyon Tayininde Elisa Sonuçlarının değerlendirilmesi

Bizim hastalarımıza ilişkin eliza plağı görüntüsü Ek-2'de fotoğraf 5'te gösterilmiştir.

4. BULGULAR:

Çalışmamızda 30 hasta ve 30 kontrol grubuyla çalışıldı ve protrombin G20210A mutasyonu tespit edildi. Koroner arter hastalığı olan yaşları 40-80 arasında değişen hastalarda 3 tane mutasyonu taşıyan birey bulundu. Kontrol grubunda ise 1 homozigot bireye rastlandı. Ortalamalar arasında ki farkın anlamlılığını belirlemek için ki kare testi kullanıldı. Değerlerin düşük sayıda olduğu değerlendirmelerde fisher testi uygulandı. ($P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı). Sonuçlara ilişkin tablolar aşağıda verilmiştir.

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	MI geçirdiği yaş	Trombotik epizot	Aile Öyküsü	Hormon Kullanımı	FII Mut. olan	
1	K	72	70	H	H	H		Wild tip
2	K	60	57	H	E	H		Wild tip
3	E	43	43	H	H	H		Wild tip
4	E	77	70	H	H	H		Wild tip
5	E	50	50	H	H	H		Wild tip
6	E	41	40	H	E	H		Wild tip
7	K	47	40	E	E	H		Wild tip
8	E	52	52	H	H	H		Wild tip
9	K	71	68	H	H	H		Wild tip
10	K	55	54	H	H	E	-/+	heterozigot
11	K	81	78	H	H	H		Wild tip
12	E	62	62	H	E	H	-/+	heterozigot
13	E	67	65	H	H	H		Wild tip
14	K	40	38	H	H	E		Wild tip
15	K	71	69	H	H	H		Wild tip
16	E	54	52	H	E	H		Wild tip
17	E	58	58	H	H	H		Wild tip
18	K	79	77	H	H	H		Wild tip
19	K	73	70	H	E	H		Wild tip
20	E	43	42	H	H	H		Wild tip
21	E	55	55	H	E	H		Wild tip
22	E	59	59	H	H	H		Wild tip
23	E	80	79	H	H	H		Wild tip
24	E	46	43	H	H	H	-/+	heterozigot
25	E	71	71	H	H	H		Wild tip
26	E	69	68	H	H	H		Wild tip
27	E	65	65	H	H	H		Wild tip
28	E	55	52	H	H	H		Wild tip
29	E	67	53	E	H	E		Wild tip
30	K	64	63	H	E	H		Wild tip

Tablo 5: Hasta grubumuzun özellikleri ve mutasyon analizi sonuçları

Kontrol No	Cinsiyet	Yaş	ProtrombinG20210A Mutasyonu
1	K	24	Wild tip
2	E	36	Wild tip
3	E	61	Wild tip
4	K	36	Wild tip
5	K	30	Wild tip
6	E	28	Wild tip
7	K	24	Wild tip
8	E	30	Wild tip
9	K	48	homozigot
10	E	24	Wild tip
11	E	60	Wild tip
12	E	42	Wild tip
13	K	34	Wild tip
14	K	30	Wild tip
15	K	26	Wild tip
16	E	39	Wild tip
17	E	36	Wild tip
18	K	27	Wild tip
19	E	43	Wild tip
20	E	46	Wild tip
21	E	64	Wild tip
22	E	63	Wild tip
23	K	31	Wild tip
24	K	27	Wild tip
25	E	29	Wild tip
26	K	52	Wild tip
27	E	22	Wild tip
28	E	47	Wild tip
29	E	43	Wild tip
30	K	54	Wild tip

Tablo 6: Kontrol grubumuzun özellikleri ve mutasyon analiz sonuçları

Cinsiyet	Birey sayısı	Yaş Ortalaması	MI geçirdiği yaş ortalaması	Mutasyonlu birey sayısı	Mutasyonlu birey oranı
Kadın	11	63.4 (40-73)	62.2(40-78)	1	%9,1
Erkek	19	58.6 (41-80)	56.7(40-79)	2	%10,5
Toplam	30	61(40-80)	59.45(40-79)	3	%10

Tablo 7: Hasta grubumuzun cinsiyete göre mutasyon oranları

Cinsiyet	Birey sayısı	Yaş Ortalaması	Mutasyonlu birey sayısı	Mutasyonlu birey oranı
Kadın	13	34.1 (24-54)	1	% 7,7
Erkek	17	41.9 (22-64)	-	-
Toplam	30	38 (22-64)	1	% 3,3

Tablo 8: Kontrol gurubumuzun özellikleri ve protrombin mutasyon oranları

	Birey sayısı	Yaş ortalaması	Mutasyonlu birey sayısı	Mutasyonlu birey oranı
55 yaş altı kadın	3	44	1	%33.3
55 yaş üstü kadın	8	69	-	-
55 yaş altı erkek	10	48.2	1	%10
55 yaş üstü erkek	9	66.2	1	%11,1
Toplam	30	59.5	3	%10

Tablo 9: MI geçirme yaşına göre mutasyon oranları

	MI geçirmiş	Sağlıklı Kontrol
FII mutasyonu olan	3	1
normal (wild)	27	29

Tablo 10: MI geçirenler ve sağlıklı kontrol gruplarında mutasyon oranının istatistik değerlendirmesi

$$X^2 = 1,07$$

p = 0.305 istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

	MI geçirmiş kadın	Sağlıklı Kadın
FII mutasyonu olan	1	10
normal (wild)	1	12

Tablo 11: MI geçiren kadınlar ve kontrol grubunda yer alan sağlıklı kadınlarda görülen mutasyon oranının istatistik değerlendirmesi

$$X^2 = 0.02$$

p = 0.717 istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

	MI geçirmiş erkek	Sağlıklı erkek
FII mutasyonu olan	2	-
normal (wild)	17	17

Tablo 12: MI geçiren erkekler ve kontrol grubunda yer alan sağlıklı erkeklerde görülen mutasyon oranının istatistik değerlendirmesi
 $p = 0,999$ istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

	normal (wild)	FII mutasyonu olan
MI geçirmiş 55 yaş altı hasta	10	2
55 yaş altı Sağlıklı kontrol	25	1

TABLO 13: MI geçiren hastalar ve kontrol grubunda, 55 yaş ve altında yer alanlarda, FII mutasyonunun bulunma oranlarının istatistiki olarak değerlendirilmesi
 $p = 0,229$ istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur

	normal (wild)	FII mutasyonu olan
MI geçirmiş 55 yaş ve üstü hasta	17	1
55 yaş ve üstü Sağlıklı kontrol	4	0

TABLO 14: MI geçiren hastalar ve kontrol grubunda, 55 yaş üstünde yer alanlarda, FII mutasyonunun bulunma oranının istatistik değerlendirilmesi
 $p = 0,818$ istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

5. SONUÇ

Bizim çalışmamız Düzce'deki hem MI'lı hemde normal kontrollerin protrombin G20210A mutasyonu için literatürlere benzer sıklık göstermektedir. Mutasyon sıklığında 55 yaş altı hasta grubunda kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Populasyon sıklığının kesin olarak saptanabilmesi için daha fazla kişiden analiz yapılmalıdır.

6.TARTIŞMA:

Koroner arter hastalığı (KAH) tüm dünyada önemli mortalite ve morbidite nedenlerinden biridir. KAH kalbin etrafını çevreleyerek kalp kasını besleyen koroner arterlerin tıkanıklığına veya daralmasına verilen addır. Nedeni koroner arterlerin aterosklerozudur (damar sertliği).

Trombofilik ailelerin probandlarında bu tek baz substitüsyonu %18, özel olarak seçilmemiş ardarda gelen derin ven trombozlu hastalarda %6 ve sağlıklı kontrollerde %2 olarak bulunmuştur. Rosendaal (1998) 11 merkez ve 9 ülkeden aldığı verilerde toplam 5527 hasta üzerinde değerlendirme yapmış ve 20210A mutasyonu için 111 heterozigot taşıyıcı bulunmuş. Sonuç olarak prevalans %2 olarak değerlendirilmiştir. Bu Güney Avrupada yaklaşık %3; Kuzeydekilerin (%1,7) yaklaşık 2 katı yüksek değerde bulunmuş.

⁷¹ Protrombin varyantlarının Asya ve Afrika ırklarında çok nadir olduğu görülmektedir.

Dönmez ve arkadaşları akut MI'lı 96 hastada G20210A mutasyonunu %4.2 kontrol grubunda ise %2.6 olarak bildirmişlerdir. Hasta grubunda oran daha yüksek olmakla birlikte fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ⁷⁷

Reiner ve arkadaşları ani koroner ölüm görülen 145 hastada protrombin mutasyonunu 3 hastada (%2) kontrol grubunda ise %3 olarak bulmuşlar ve ani koroner ölümle ilişkili bulmamışlardır. ¹⁸

Protrombin gen mutasyonu sıklıkla kafkas toplumlarında görülmektedir. % 1-4 arasında genel popülasyonda heterozigot formda bulunur. ¹⁸ Bu mutasyonun Hindistan, kore, Afrika ve kuzey Amerika yerlilerinde sıklığı çok azdır. Bununla birlikte ispanyollarda bu oranın %6 olduğu rapor edilmiştir. ²⁶

Gürvey (2001) 146 trombozlu hastanın 10 'nunda protrombin G20210 A mutasyonu bulmuş ve Türkiye'deki trombozlu hastalarda mutasyon sıklığını %6.8 olarak bildirmişlerdir. ⁸³

Rosendaal (1997) kadınlarda bu mutasyonun miyokard infarktüsü (MI) için 4 kat yükselmiş bir risk gösterdiğini ⁷³ ; Daggen da (1998) erkeklerde bu mutasyonun bulunmasının MI için riski 1,5 kat arttırdığını belirlemiştir. ⁷⁴

Duante- mangoni ve ark. MI geçirmiş 66 hastayı Anjina Pektorisi (AP) olan ve MI'yı olmayan 106 hastayla karşılaştırdıklarında MI grubunda %1.5, AP grubunda %0,9 olarak saptamışlardır. Arada ki fark anlamlı bulunmamıştır. ⁹³

Ranjith ve ark. güney afrikalı MI geçirmiş 45 yaş altındaki hastalarda protrombin mutasyonu bulamamışlardır. ⁹⁴

Rosendaal ve ark. MI geçirmiş 79 kadında 20210GA genotipini %5.1; kontrollerde ise %1.6 olarak bulmuşlardır ve sigara içmek gibi bir majör kardiyovasküler risk faktörüyle birlikte olduğunda MI riskinin arttığını bildirmişlerdir. ⁷³

Dagen ve ark. 70 yaş altında Mıgeirmi erkek hastalarda G20210A genotipini %1,8; kontrollerde 1,2 olarak bulmuş ve MI riskinin %50 arttırdığını hesaplamışlardır. Eğer G20210A genotipiyle birlikte sigara içimi, hipertansiyon, diabetes mellitüs ve ya obezite gibi major kardiyovasküler risk faktörlerinden biri daha varsa MI riskini 3 ila 6 kat arttırdığını hesaplamışlardır. ⁷⁴

Çeşitli çalışmalarda kontrol grupları karşılaştırıldığında ;G20210A genotipinin Almanya'da %0,4 ⁹² , İtalyada %1,6-3 ⁹⁰⁻⁹¹⁻⁹⁵ , İngilterede 1,2 ⁹⁵ , Hollanda da 2,3 ⁶⁵ , Fransa da 3,2 ⁸⁹ ve suudi arabistanda %1,7 ⁷⁸ olarak saptandığı görülmektedir. Bizim çalışmamızda kontrol grubunda %3.3 saptanmış olup literatürlerle uyumludur.

Burzotta ve ark. MI geçiren hastalarda protrombin mutasyonunu (PM) %6.5, kontrollerde ise 2.4 bulmuşlardır. Aile hikayesi olan hastalarda ise G20210A genotipi %8.7 olarak hesaplanmıştır. ²⁹ Bizim çalışmamızda PM saptadığımız hastaların tümü sigara kullanıyordu. Birinin ayrıca hipertansiyon ve hiperkolesterolemisi vardı. Bu durum Rosendaal'in bulgularıyla uyumludur. ⁷³

Suudi Arabistanda Khaled ve ark. KAH olanlarda G20210A genotipinin %2.1, kontrol grubunda ise %1,7 olarak saptamışlardır farkın anlamlı olmadığını bildirmişlerdir.

78

Segev ve ark. 50 yaş altında kalp krizi geçiren hastalarda protrombin mutasyonunu %10,6 oranında bulmuşlardır. ¹⁰⁰

Bizim çalışmamızda da MI geçiren grupta G20210A genotipi kontrol grubundan yüksek oranda bulunmuştur. Bu durum literatürlerde ki bilgilerle uyumludur. PM genotipi özellikle diğer risk faktörleri ile birlikte olduğunda MI riskini arttırmaktadır.

Günümüzde kalıtsal trombofilinin öncelikli olarak düşünüldüğü ve araştırıldığı hastalar ;

-40-45 yaşından önce oluşan ve nedeni açıklanamayan venöz tromboembolizm atakları olanlar,

-tekrarlayıcı, gezici ve masif tromboz öyküsü bulunanlar,

-Alışılmamış venöz bölgelerde (mezenterik serebral venler vs) tromboz gelişenler,

- Ailesinde trombombolizm öyküsü saptananlar,
- Neonatal tromboz öykülüler,
- Warfarine bağlı deri nekrozu öyküsü olanlardır.³⁵

Bizim çalışmamızda PM saptadığımız hastaların hiçbiri önceden VTE atağı geçirmemişti. Oysa MI gibi ciddi mortalite ve morbiditesi olan son derece önemli bir sağlık problemiyle karşı karşıyaydılar. Riski arttıran mutasyonların taranmasıyla; belki bu hastaların MI geçirmeden önce belirlenerek daha uygun tedavi ve takibi sağlanabilirdi

Hasta grubumuzdaki mutasyon oranı kontrol grubundan belirgin olarak fazla olmakla birlikte hastalarda saptadığımız mutasyonların heterozigot olmasına karşın kontrol grubunda saptadığımız bir kişideki mutasyonun homozigot olması dikkat çekicidir. Bu kişinin ailesinde tromboz hikayesi olmadığı gibi kendisi de 4 gebelik geçirmesine ve sigara içmesine rağmen hiç tromboz geçirmemişti. Bu durum penetrans eksikliği olarak değerlendirilmiştir. Kişiye artmış riski açısından genetik danışma verilmiş, 1° akrabalarına mutasyon analizi yapılması ve koagülasyon sistemiyle ilgili başka bir ek patoloji olup olmadığının (ör: faktör eksikliği) araştırılması önerilmiştir.

7. ÖZET:

Tüm dünyada en önemli mortalite ve morbidite nedenlerinden biri koroner arter hastalığıdır. KAH gelişimi multifaktöryeldir ve çeşitli edinsel ve kalıtsal risk faktörlerinin bu hastalıkta değişik mekanizmalarla etki ettiği bilinmektedir.

Protrombin pıhtılaşmanın kontrolünde temel bir rol oynamaktadır. Normalde protrombin FXa ve FVa kompleksi varlığında trombine dönüşür. Trombine pıhtılaşmanın gerçekleşmesinde temel aşamalardan olan fibrinojenin fibrine dönüşmesinde ihtiyaç vardır.

Mutasyonun protrombin geninin 3' untransle bölgesinde; 20210 nükleotid pozisyonunda G'nin A'ya substitüsyonu sonucu; artmış protrombin aktivitesi ve plazma konsantrasyonu düzeyleriyle anlamlı olarak ilişkili olduğu ve bu durumun artmış trombin miktarına neden olduğu bulunmuş. Mutasyon bu etkisi nedeniyle artmış arterial ve venöz tromboz riski ile ilişkilidir.

Protrombin gen mutasyonu sıklıkla kafkas toplumlarında görülmektedir. % 1-4 arasında genel popülasyonda heterozigot formda bulunur. Bu mutasyonun Hindistan, Kore, Afrika ve kuzey Amerika yerlilerinde sıklığı çok azdır. Bununla birlikte ispanyollarda bu oranın %6 olduğu rapor edilmiştir

Bizim çalışmamızda otuz koroner arter hastasında protrombin G20210A mutasyonu için üç heterozigot bulundu (%10) ve kontrol grubunda otuz sağlıklı kişi içinde bir homozigot kadın saptandı (%3). Hasta grubuyla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı.

Anahtar kelimeler: Koroner arter hastalığı, tromboz, miyokard infarktüsü, protrombin G20210A

8.SUMMARY:

All over the world the coronar artery disease (CAD) is the most important mortality and morbidity factor. The development of CAD is multifactorial and it is known that numbers of hereditary and acquired risk factors are involved this process with different mechanisms.

Prothrombin plays a central role in blood coagulation. Normally prothrombin cleaved by Xa-Va complex to form thrombin. Thrombin is required in order to convert fibrinogen into fibrin, which is the primary goal of coagulation.

The mutation in the 3' untranslated region of prothrombin gene (a G to A substitution at nucleotide position 20210), has been found to lead to significantly associated with elevated levels of prothrombin activity and prothrombin plasma concentration and this leads to an increased amount of thrombin. From the cause of this effect the mutation is associated with an increased risk for arterial and venous thrombosis.

The prothrombin gene mutation is seen more commonly in the caucasian population. About 1-2% of the general population is heterozygous for the prothrombin gene mutation (PGM). PGM is relatively uncommon in native populations of India, Korea, Africa and North America. In contrast; in Spain rates of 6% have been reported.

In our study three heterozygous, out of thirty patients with CAD of which were found to have prothrombin G20210A mutation (10%). And in our control group there was a homozygous woman out of thirty healthy person (3%). There wasn't a significant difference between patient and control groups.

Key Words: coronary artery disease, thrombosis, Myocardial infarction, prothrombin G20210A

9-KAYNAKLAR

- 1- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Thomphson& Thomphson Genetics in Medicine, Phileadelphia; WB Saunders 2001:300-301
- 2- <http://www.medinfo.hacettepe.edu.tr> Koroner Arter Hastalıkları. Kardiyoloji Anabilim Dalı 18.11.2004
- 3- Küçükkaya R, Trombofilide Tanı yöntemleri, XXVII. Ulusal Hematoloji Kongresi. IV. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu 11-13 Kasım 1999;27-37
- 4- Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Goncalves MS, Costa FF, Prevalence of the prothrombin gene variant (nt20210A) in venous thrombosis and arterial disease. Thromb Haemost. 1997 Dec;78(6):1430-3
- 5- http://www.internetdoktoru.com/pages_koroner.htm (koroner Kalp Hastalığı) 17.11.2004
- 6- <http://www.omertoprak.com/yenirisk.htm> Koroner Arter Hastalığı Gelişimi için Yeni Risk Faktörleri 17.11.2004
- 7- Celkan.T, Çocukluk çağında kalıtsal nedenli tromboz., Türk Pediatri Arşivi 2003; 38:131-145
- 8- Ulutin T, Cengiz M, Yüksel A. Hemostaz s:47-56. Koagülasyon proteinleri ve faktörleri: s:57-64, Fibrinolizis s:65-70, Tromboz s:91-96 Ulutin T editör. Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü, Tıbbi Biyoloji Ders Notları, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2000
- 9- Altınışık J, Trombozlu Hastalarda Faktör V Leiden (G1691A) ve Protrombin G20210A Mutasyonlarının Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı., 2001
- 10- Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, Inherited thrombophilia: Part 1. Thromb Haemost 1996;76:651-662
- 11- Wijk R, Nieuwenhuis K, Berg M, Huizinga E, Meijden B, Kraaijenhagen R, Five novel mutations in the gene for human blood coagulation factor V associated with type I factor V deficiency. Blood, 15 July 2001; 98:358-367

- 12- Cripe LD, Moore KD, Kane WH. Structure of the gene for human coagulation factor V. *Biochemistry*. 1992;31(15):3777-85.
- 13- Braun A, Müller B, Rosche AA. Population study of the G1691A mutation (R506Q, FV Leiden) in human Factor V gene that is associated with resistance to activated protein C. *Hum Genet* 1996;97:263-264
- 14- Berber E, Kavaklı K, Akar N, Çağlayan SH, R506Q (FV Leiden) and R485K Mutations in the Factor V Gene: Incidence in Deep Venous Thrombosis and Hemophilia A Patients *Turkish Journal of Haematology* 2003; 20: 221-225
- 15- Uçar F, Ovalı E, Önder E, Değer O, Özdemir F, Faktör V Leiden Biyokimyası, Genetiği, Risk Grupları ve Moleküler Düzeyde Tayini, *İbni Sina Tıp Dergisi* 6: 2001;27-33
- 16- Zenz W, Bodo Z, Plotho J, Streif W, Male C, Bernert G, Rauter L, Ebetsberger G, Kaltenbrunner K, Kurnik P, Lischka A, Paky F, Ploier R, Hofler G, Mannhalter C, Muntean W. Factor V Leiden and prothrombin gene G 20210 A variant in children with ischemic stroke. *Thromb Haemost*. 1998;Nov;80(5):763-6
- 17- Vurkun M, Vural O, Demir M, Turgut B, Gürvey A, Parlak H, Duran N, The Prevalence of Activated Protein C Resistance and F V Leiden in Healthy Population of Edirne, Turkey. *Turkish Journal of Haematology* 2002; 19(2): 287-291
- 18- Reiner A, Rosendaal F, Reithsma PH, Lemaitre RN, Pearce RM, Friedlander Y, Raghunathan TE, Psaty BM, Siscovick DS, Factor V Leiden, Prothrombin G20210A, and Risk of coronary Death in Apparently Healthy Persons. *American Journal of Cardiology* 2002; 90:66-68.
- 19- Gurgey, A.; Mesci, L. The prevalence of factor V Leiden (1691G-A) mutation in Turkey. *Turk. J. Pediat*. 1997;39: 313-315,
- 20- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/> Factor V deficiency
- 21- Akar N, Yılmaz E, Akar E, Deda G, Sipahi T. Factor V (His 1299 Arg) in Young Turkish Patients with Cerebral Infarct Haemostasis 2000;30:118-122
- 22- Ulutin O, editör. Anadolu ve Kıbrıs Türkü Sağlıklı, Arteriosklerozlu ve Pediyatrik Trombozlu Olgularda EPCR Geni 23 BÇ İnsersyonu Dağılımı. 4. Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji Kongresi, Edirne; 26-28 Eylül 2003;277

- 23- Hagstrom JN, Walter J, Bluebond-Langner R, Amatnick JC, Manno CS, High KA. Prevalence of the factor V Leiden mutation in children and neonates with thromboembolic disease. *J Pediatr* 1998; 133: 777–81.
- 24- www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/prothrombin
- 25- Varga EA, Moll S, Prothrombin 20210 A mutation (Factor II mutation) circulation 2004;110:15-18
- 26- <http://www-admin.med.uiuc.edu/hematology/PtProthrombin.htm> (University of Illinois - Urbana/Champaign, Carle Cancer Center)
- 27- Lucotte G, Champenois T, Duplex PCR-RFLP for simultaneous detection of FV Leiden and Prothrombin G20210A. *Mol. Cell. Probes* 2003 Oct;17(5): 267-9
- 28- Gelfi C, Viganò A, Ripamonti M, Wait R, Begum S, Biguzzi E, A proteomic analysis of changes in prothrombin and plasma proteins associated with the G20210A mutation. *Proteomics* 2004; 4, 2151-2159
- 29- Burzotta F, Pacioroni K, De Stefano V, Chiusolo P, Manzoli A, Casorelli I, Increased prevalence of G20210A prothrombin gene variant in acute coronary syndromes without metabolic or acquired risk or with limited extent of disease. *European Heart Journal* 2002;23,26-30
- 30- Martinelli I, Sacchi E., Landi G., Taioli E., Duca F., Mannucci PM. High Risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin gene mutation and in users of oral contraceptives. *N Engl J Med* 1998;338:1793-1797
- 31- Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet*. 1999 Apr 3;353(9159):1167-73
- 32- Gerhardt A., Scharf RE, Beckmann MW, Struve S, Bender HG, Pillny M, Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium. *The New England Journal of Medicine* 2000; 342; 6: 374-379
- 33- Donnelly JG, Rock GA. Genetic determinants of heritable venous thrombosis: genotyping methods for factor V(Leiden)A1691G, methylenetetrahydrofolate reductase C677T, prothrombin G20210A mutation, and algorithms for venous thrombosis investigations. *Clin Biochem*. 1999 Apr;32(3):223-8.
- 34- Yap S, Naughten ER, Wilcken B, Wilcken DE, Boers GH. Vascular complications of severe hyperhomocysteinemia in patients with homocystinuria due to

- cystathionine beta-synthase deficiency: effects of homocysteine-lowering therapy. *Semin Thromb Hemost.* 2000;26(3):335-40.
- 35- Küçükkaya R. Trombofilide Tanı Yöntemleri. 27.Ulusal hemotoloji kongresi, IV. Mezuniyet sonrası Eğitim kursu. 11-13 Kasım 1999
- 36- Nowak-Gottl U, Strater R, Heinecke A, Junker R, Koch HG, Schuierer G, von Eckardstein A. Lipoprotein (a) and genetic polymorphisms of clotting factor V, prothrombin, and methylenetetrahydrofolate reductase are risk factors of spontaneous ischemic stroke in childhood. *Blood.* 1999 Dec 1;94(11):3678-82.
- 37- Anton N, massicotte P, venous Tromboembolism in Pediatrics. *Semin Vasc Med* 2001; 1: 111-21
- 38- Revel-Vilk S, Massicotte P. Thromboembolic diseases of childhood. *Blood Rev.* 2003 Mar;17(1):1-6.
- 39- Mitchell RN, Cotran RS Hemodynamic Disorders. *Trombosis and Shock Robbins Pathologic Basis of Disease*, sixth edition. Cotron R.S., Kumar V, Collins T. (eds) B. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders, 1999;5,113-133.
- 40- Albert JS. Myocardial infarction with angiographically normal coronary arteries. *Arch Intern Med.* 1994 Feb 14;154(3):265-9.
- 41- Terzioğlu M, Yiğit G, Oruç T. Kan Pıhtılaşması ve kanamanın durdurulma mekanizmaları (Koagülasyon ve Hemostaz) Fizyoloji Ders Kitabı cilt II. İstanbul, 1993;177-225
- 42- Oğuz K. Başkurt Kanın akışkanlık özelliklerinin fizyopatolojik önemi s:13-21/ Nesrin Emekli koagülasyon ve inflamasyon s:69-77 Ulutin O, editor. 5. Tromboz, Hemostaz ve Anjioloji Kongresi İstanbul;7-9 Mayıs 2004.
- 43- Ferhanoglu B. Koagülasyon mekanizması. Ulutin O, editor. 4. Tromboz, Hemostaz ve Anjioloji Kongresi Edirne; 26-28 Eylül 2003;45-55.
- 44- Ulutin T. Endotel Hücre Biyolojisi VI. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi. Pamukkale Üni. Tıp Fak. Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı, Denizli; 2-5 Kasım 2000;33-35.
- 45- Turgeon ML. Principles of Hemostasis and Thrombosis. Ch:6, p:398-422, Disorders of hemostasis and Thrombosis ch:27 p:423-449 *Clinical Hematology* Mary Louse Turgeon (editor) Third Edition. Lippincott Williams&Wilkins Philadelphia, 1999

- 46- Vural Ö. Damar Endotelinin antienflamatuvar ve antitrombojenik özellikleri. Ulutin O, editor. 4. Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji Kongresi. 26-28 Eylül 2003 Edirne;71-75
- 47- İliçin G, Ünal S, Biberoglu K, Akalin S, Süleymanlar G. Pıhtılaşma Bozuklukları. Temel İç Hastalıkları Güneş Kitabevi LTD Şti, Ankara 1996: 1350-1370
- 48- <http://www.tollefsen.wustl.edu/projects/coagulation/coagulation>
- 49- Uras F, Uras AR. Protrombin. Ulutin O, editor. 4. Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji Kongresi Edirne; 26-28 Eylül 2003; 85-95
- 50- Scriver, Beaudet, Valle, Sly, Childs, Kinzler, Vogelstein. The Metabolic&Molecular Bases of Inherited Disease. New York: Mc Graw- Hill (pub), (8th ed.) III, Chapter:134-204: 2001; 4297-4300.
- 51- Board PG, Shaw DC. Determination of the amino acid substitution in human prothrombin type 3 (157 glu-to-lys) and the localization of a third thrombin cleavage site. Brit. J. Haemat. 1983;54: 245-254
- 52- Rabet MJ, Furie B C, .:Molecular defect of prothrombin Barcelona: substitution of cysteine for arginine at residue J. Biol. Chem. 1986;261: 15045-15048
- 53- Hedner U, Davie E W (editors) Introduction to hemostasis and the vitamin K-dependent coagulation factors.In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The Metabolic Basis of Inherited Disease. New York: McGraw-Hill (pub.) (6th ed.) II 1989; 2107-2134.
- 54- Miyata T, Morita T, Inomoto T, Kawauchi S, Shirakami A, Iwanaga S, Prothrombin Tokushima, a replacement of arginine-418 by tryptophan that impairs the fibrinogen clotting activity of derived thrombin Tokushima. Biochemistry 1987; 26: 1117-1122.
- 55- Iwahana H, Yoshimoto K, Shigeakiyo T, Shirakami A, Saito S, Molecular and genetic analysis of a compound heterozygote for dysprothrombinemia of prothrombin Tokushima and hypoprothrombinemia. Am J Hum Genet 1992 Dec;51(6):1386-95
- 56- Henriksen RA, Owen WG, Characterization of the catalytic defect in the dysthrombin, thrombin Quick. J. Biol. Chem. 1987; 262: 4664-4669,
- 57- Henriksen RA, Mann KG, :Identification of the primary structural defect in the dysthrombin thrombin Quick I: substitution of cysteine for arginine-382. Biochemistry 1988; 27: 9160-9165.

- 58- Banfield D K, MacGillivray R T, Partial characterization of vertebrate prothrombin cDNAs: amplification and sequence analysis of the B chain of thrombin from nine different species. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1992; 89: 2779-2783,
- 59- Henriksen R A, Mann KG, Substitution of valine for glycine-558 in the congenital dysprothrombin thrombin Quick II alters primary substrate specificity. *Biochemistry* 1989; 28: 2078-2082,
- 60- Owen C A, Henriksen R A, McDuffie F C, Mann K G, Prothrombin Quick: a newly identified dysprothrombinemia. *Mayo Clin. Proc* 1978; 53: 29-33,.
- 61- Morishita E, Saito M, Kumabashiri I, Asakura H, Matsuda T, Yamaguchi K, Prothrombin Himi: a compound heterozygote for two dysfunctional prothrombin molecules (met-337-to-thr and arg-388-to-his). 1992; *Blood* 80: 2275-2280,
- 62- Iwahana H, Yoshimoto K, Shigekiyo T, Shirakami A, Saito S, Itakura M. Detection of a single base substitution of the gene for prothrombin Tokushima. The application of PCR-SSCP for the genetic and molecular analysis of dysprothrombinemia. *Int J Hematol.* 1992 Feb;55(1):93-100.
- 63- Lefkowitz JB, Haver T, Clarke S, Jacobson L, Weller A, Nuss R, The prothrombin Denver patient has two different prothrombin point mutations resulting in glu300-to-lys and glu309-to-lys substitutions. *Brit. J. Haemat* , 2000; 108: 182-187
- 64- Akhavan S, Mannucci P M, Lak M, Mancuso G, Mazzucconi MG, Rocino A, Identification and three-dimensional structural analysis of nine novel mutations in patients with prothrombin deficiency. *Thromb. Haemost.* 2000 84: 989-997
- 65- Poort S., Rosendaal F., Reitsma P., Bertiner., A Common Genetic Variation in 3' – untranslated Region of the Prothrombin Gene is associated with elevated prothrombin Levels and an Increase in venous Thrombosis. *Blood* 1996; 88:3698-3703.
- 66- Degen S J F, Davie E W, Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry* 1987; 26: 6165-6177.
- 67- Absen N, Lewezuk P, Schütz E, Oellerich M, Ehrenreich H, Prothrombin Activity and Concentration in Healthy Subjects with and without the Prothrombin G20210A Mutation. *Thrombosis Research* 2000; 99: 549-556.
- 68- Gehring N H, Frede U, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Vetter B, Hentze M W, Increased efficiency of mRNA 3-prime end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nature Genet.* 2001; 28: 389-392.

- 69- Rees DC, Chapman NH, Webster MT, Guerreiro JF, Rochette J, Clegg JB, Born to clot: the European burden. *Brit. J. Haemat.* 1999; 105: 564-566.
- 70- Oner AF, Arslan S, Caksen H, Ceylan A, Budd-Chiari syndrome in a patient heterozygous for both factor V Leiden and the G20210A mutation on the prothrombin gene. (Letter) *Thromb. Haemost* 1999; 82: 1366-1367
- 71- Rosendaal FR, Doggen C J M, Zivelin A, Arruda V R, Aiach M, Siscovick D S, Geographic distribution of the 20210 G to a prothrombin variant. *Thromb. Haemost.* 1998;79: 706-708.
- 72- Zivelin A, Rosenberg N, Faier S, Kornbrot N, Peretz H, Mannhalter C. A single genetic origin for the common prothrombotic G20210A polymorphism in the prothrombin gene. *Blood* 1998; 92: 1119-1124.
- 73- Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Psaty BM, Raghunathan TE, A common prothrombin variant (20210 G to A) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997; 90: 1747-1750.
- 74- Doggen C JM, Cats VM, Bertina RM, Rosendaal FR, Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210A. *Circulation* 1998; 97: 1037-1041.
- 75- Franco RF, Trip MD, Cate H, Ende A, Prins MH, Kastelein JJP, Reitsma PH, The 20210G-A mutation in the 3-prime-untranslated region of the prothrombin gene and the risk for arterial thrombotic disease. *Brit. J. Haemat* 1999; 104: 50-54
- 76- Ridker PM, Hennekens C, Miletich J, G20210A Mutation in Prothrombin Gene and Risk of Myocardial Infarction, Stroke, and Venous Thrombosis in a Large Cohort of US Men . *Circulation.* 1999; 99:999-1004
- 77- Dönmez Y, Kanadaşı M, Tanrıverdi K, Demir M, Demirtaş M, Çaylı M., Prothrombin 20210GA and Factor V Leiden Mutations in Patients Less Than 55 Years Old with Myocardial Infarction. *Jpn Heart J.* 2004; 45(3):505-512
- 78- Abu-Amro KK, Wyngaard CA, Kambouris M, Dzimirli N, Prevalance of the 20210 G→A Phrothrombin variant and Its Association with Coronary Artery Disease in a Middle Eastern Arab Population. *Arch Pathol. Lab Med* 2002; 126(9):1087–1090.

- 79- Laczika K, Lang IM, Quehenberger P, Mannhalter C, Muhm M, Klepetko W, Unilateral chronic thromboembolic pulmonary disease associated with combined inherited thrombophilia. *Chest* 2002; 121: 286-289.
- 80- Chamouard P, Pencreach E, Maloisel F, Grunebaum L, Ardizzone JF, Meyer A, Frequent factor II G20210A mutation in idiopathic portal vein thrombosis. *Gastroenterology* 1999; 116: 144-148.
- 81- De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Chiusolo P, Casorelli I, The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. *New Eng. J. Med.* 1999; 341: 801-806
- 82- Corral J, Zuazu-Jausoro I, Rivera J, Gonzalez-Concejero R, Ferrer F, Vicente V, Clinical and analytical relevance of the combination of prothrombin 20210A/A and factor V Leiden: results from a large family. *Brit. J. Haemat.* 1999;105: 560-563
- 83- Gürvey A, Haznedaroğlu IC, Egesel T, Buyukasik Y, Ozcebe OI, Sayinalp N, Dündar SV, Bayraktar Y, The common genetic thrombotic risk factors: FV Leiden and Prothrombin G20210A in adult Turkish patients with Thrombosis. *Am J Hematol.* 2001 Jun;67(2): 107-11.
- 84- Souto J C, Mateo J, Soria JM, Llobet D, Coll I, Borrelli M, Fontcuberta J, Homozygotes for prothrombin gene 20210 A allele in a thrombophilic family without clinical manifestations of venous thromboembolism. *Haematologica* 1999; 84: 627-632,
- 85- De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Rossi E, Chiusolo P, The risk of recurrent venous thromboembolism among heterozygous carriers of the G20210A prothrombin gene mutation. *Brit. J. Haemat.* 2001;113: 630-635,
- 86- Mansilha A, Araujo F, Sampaio S, Cunha LM, Braga A, G20210A mutation and venous thromboembolism in young people. *Cardiovascular surgery* 2002;10:45-4.
- 87- Mercier E, Quere I, Chabert R, Lallemant JG, Daures JP, Berlan J, The 20210A allele of the prothrombin gene is an independent risk factor for perception deafness in patients with venous thromboembolic antecedents. (Letter) *Blood* 1999; 93: 3150-3152.
- 88- Genoud V, Castanon M, Bizzacchi JA, Korin J, Kordich L, Prevalance of three prothrombotic polymorphisms: Factor V G20210A and Methylenetetrahydrofolate

- Reductase (MTHFR) C677T in Argentina. *Thrombosis research* 2000;100:127-131
- 89-Bauduer F., Ducout L., Freyburger G. Assessment of the 20210 G to A prothrombin variant in a sample of patients from the French Basque Country with Various thrombophilic conditions. *Ann Hematol* 2003; 82:353-356
- 90-Martinelli I., Taioli E., Cetin I., Marinoni A., Gerosa S., Villa MV.,Bozzo M., Mannucci PM. Mutation in coagulation factors in women with unexplained late fetal loss. *N Engl J.Med* 2000; 5: 1015-1018
- 91-Martinelli P, Grandone E, Colaizzo D, Paladini D, Sciannname N, Maraglione M, Familial Thrombophilia and the occurrence of fetal growth restriction. *Haematologica* 2001; 86:428-4331
- 92-Pihusch R, Buchholz T, Lohse P, Rubsamen H, Rogenhofer N, Hasbargen U, Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. *Am J Reprod Immunol.* 2001; 46: 124-131
- 93-Durante- Mangoni E, Davies GJ, Ahmed N, Ruggiero G. The prothrombin G20210 A polymorphism in patients with myocardial infarction. *Blood coagul. Fibrinolysis.* 2002 Oct;13 (7): 603-8
- 94-Ranjith N, Pegararo RJ., Rom L. Hemostatic gene polymorphisms in young Indian Asian subjects with acute myocardial infarction. *Med Sci Monit.* 2003 Oct;9(10):417-21
- 95-Cumming AM, Keeney S, Salden A, Bhavnani M, Shwe KH, Hay CR, The Prothrombin Gene 20210A Variant: Prevalence in UK anticoagulant Clinic Population. *Br J Haematol.* 1997; 98: 353-355
- 96-De Stefano V, Chiusolo P, Paciaroni K, Casorelli I, Rossi E, Molinari M., Prothrombin G20210 A mutant genotype is a risk factor for cerebral vascular ischemic disease in young patients. *Blood* 1998;91: 3562-3565
- 97-Schobess R, Junker R, Auberger K, Munchow N, Burdach S, Nowak-Gottl U Factor V G1691A and prothrombin G20210A in childhood spontaneous venous thrombosis--evidence of an age-dependent thrombotic onset in carriers of factor V G1691A and prothrombin G20210A mutation. *Eur J Pediatr.* 1999; Dec;158(3):105-8.

- 98- Araujo F, Santos A, Araujo V, Henriques I, Monteiro F, Meireles E, Moreira I, David D, Maciel MJ, Cunha-Ribeiro LM. Genetic risk factors in acute coronary disease. *Haemostasis*. 1999;29(4):212-8
- 99-Arruda VR, Siquiera LH, Chiaparini LC, Coelho OR, Mansur AP, Ramires A, Annichino-Bizzacchi JM.. Prevalence of the prothrombin gene variant 20210 GA among patients with myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 1998;37:42-45.
- 100-Segev A, Ellis MH, Segev F, Friedman Z, Reshef T, Sparkes JD. High Prevalence of Thrombophilia Among Young Patients with Myocardial Infarction and Few Conventional Risk Factors. *Int. J. Cardiol*. 2005 Feb;98(3):421-4

10. RESİMLEMELER LİSTESİ

10.1.Şekiller:

sayfa

Şekil- 1 Tromboz oluşum mekanizması	9
Şekil- 2 Koagülasyon Başlangıcı	19
Şekil- 3 Koagülasyon kaskadı	21
Şekil- 4 Fibrinojenin yapısı	21
Şekil- 5 Fibrin polimerizasyonu	22
Şekil- 6 Koagülasyon faktörlerinin yapıları	23
Şekil- 7 Trombinin Factor VIII ile aktivasyonu	24
şekil- 8 Protrombin Gla bölgesi ve kringle yapısı	26
şekil- 9 Spinkolon yöntemi ile DNA izolasyonu	43
Şekil-10 PCR mekanizması	45
Şekil- 11 Primer Extension plağı	48
şekil- 12 Primer extension reaksiyonu	49
şekil- 13 Eliza yöntemi	50
şekil- 14 Mutasyon Tayininde Elisa Sonuçlarının değerlendirilmesi	50

10.2.Tablolar:

Tablo- 1 Endotelin prokoagülan ve antikoagülan özellikleri	15
Tablo- 2 Koagülasyon Proteinlerinin Özellikleri	18
Tablo- 3 Protrombin G20210A prevalansı ve rölatif risk	36
Tablo- 4 Çeşitli ülkelerde trombofili ve kontrol karşılaştırmaları	37
Tablo- 5 Hasta grubumuzun özellikleri ve mutasyon analizi sonuçları	52
Tablo- 6 Kontrol grubumuzun özellikleri ve mutasyon analiz sonuçları	53
Tablo- 7 Hasta grubumuzun cinsiyete göre mutasyon oranları	53
Tablo- 8 Kontrol grubumuzun özellikleri ve protrombin mutasyon oranları	54
Tablo- 9 MI geçirme yaşına göre mutasyon oranları	54

Tablo- 10: MI geçirenler ve sağlıklı kontrol gruplarında mutasyon oranının istatistik değerlendirmesi	54
Tablo-11: MI geçiren kadınlar ve kontrol grubunda yer alan sağlıklı kadınlarda görülen mutasyon oranının istatistik değerlendirmesi	54
Tablo-12: MI geçiren erkekler ve kontrol grubunda yer alan sağlıklı erkeklerde görülen mutasyon oranının istatistik değerlendirmesi	55
Tablo- 13: MI geçiren hastalar ve kontrol grubunda, 55 yaş ve altında yer alanlarda, FII mutasyonunun bulunma oranlarının istatistiki olarak değerlendirmesi	55
Tablo 14: MI geçiren hastalar ve kontrol grubunda, 55 yaş üstünde yer alanlarda, FII mutasyonunun bulunma oranlarının istatistiki olarak değerlendirmesi	55

10.3.Fotoğraflar:

EK 2	76,77,78
-------------	----------

11.ÖZGEÇMİŞ

Adı soyadı : Zehra Seda Ünal

Doğum yeri ve tarihi: Almanya 20/08/1978

Eğitim Durumu:

1988-1995 Düzce Anadolu Lisesi

1996-2002 İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi. Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü

2002- Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi

Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üzerinde çalıştığı Konular: Otoimmün hastalıklarda indirekt immün flouresan yöntemi ile analiz, Eliza yöntemi, Trombozlu hastalarda protrombin G20210A, FV Leiden, MTHFR mutasyonları analizi.

Yayınları: Silan F, Demirci L, Egeli A, Onder HI, Ozturk O, **Unal ZS**, syndromic etiology in children at schools for the deaf in Turkey. Int J. Pediatr Otorhinolaryngol. 2004 Nov; 68(11):1399-406

11-EKLER

11.1. FII Hasta Takip Formu

EK 1

Düzce Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Protrombin G201210A Mutation (Faktör II) Hasta Bilgi Formu

Hasta adı:/...../200...

Refere eden klinik: Prot.No: FII.....

Adres:

Telefon:

Yaşı:

Cinsiyeti:

Memleketi:

eğitim durumu:

işi:

evli/bekar

çocuk sayısı

sigara e/h

alkol: e/h

hiperkolesterolemi: e/h

kolesterol düzeyi.....

diyabet: e/h

HT e/h.....

obezite

e/h

boy

..... cm

ağırlık.....kg

bmi:.....

MI geçirip geçirmediği:

geçirdiği yaş

Ailede

Kardiyovasküler hastalık:

başlangıç yaşı

Ailede

Cerrahi müdahale geçirip geçirmediği:

Derin ven trombozu e/h geçirdiği yaşı ailede

Pulmoner embolizm e/h geçirdiği yaşı ailede

Serebral iskemik hastalık-inme

Behçet; Lupus; Diğer;

Oral kontraseptif kullanımı infertilite

Hamilelik Abortus 2. Trimestr kaybı 3. Trimestr kaybı

Preeklampsi ölü doğum: intrauterin gelişme geriliği:

Nöral tüp defekti:

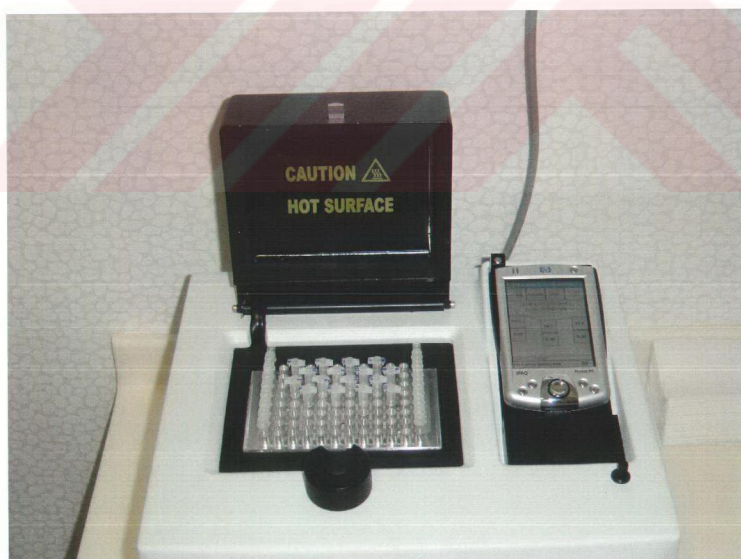
Aile ağacı:

istatistik değerlendirmesi

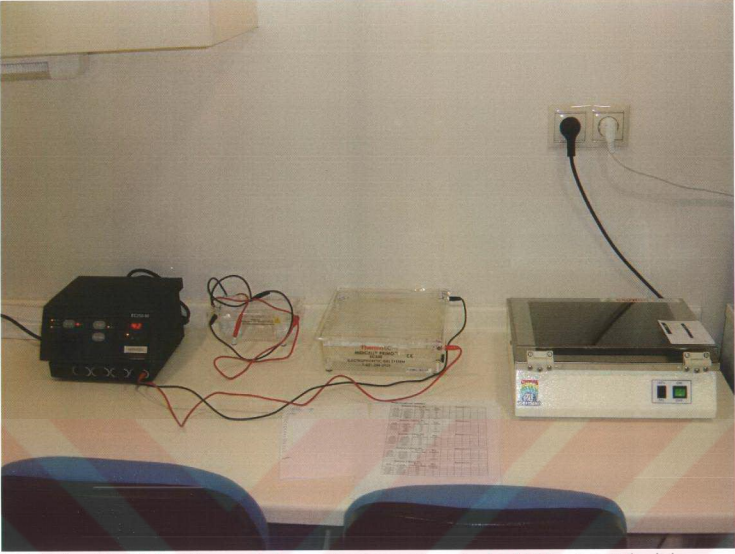
11.2. Çalışma Yapılırken çekilen Fotoğraflar:



Fotoğraf 1: Laminar kabin



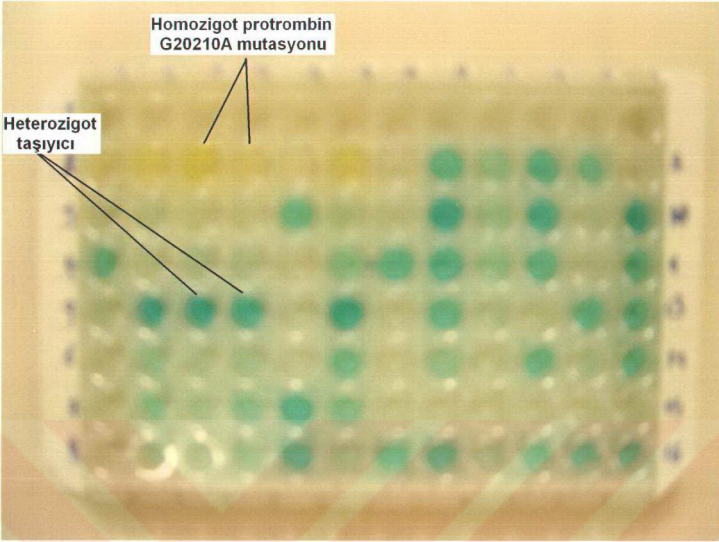
Fotoğraf 2: PCR



Fotoğraf 3: Elektroforez güç kaynağı, elektroforez tankı, U.V. görüntüleyici



Fotoğraf 4: Primer extention plate



Fotoğraf 5: Eliza plağında mutasyon tayini