

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

**SİGARA İÇEN VE İÇMEYEN
GEBELERDE
AKTİVE PROTEİN C REZİSTANSININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ
DR. ÜZEYİR KALKAN
TEZ DANIŞMANI: YRD. DOÇ. DR. SAMET KAFKAS
AYDIN - 2003

TC

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

**SİGARA İÇEN VE İÇMEYEN
GEBELERDE
AKTİVE PROTEİN C REZİSTANSININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ
Demirbaş No. : 24861
Tasnif No. :
Geliş Şekli : BA.

UZMANLIK TEZİ

DR. ÜZEYİR KALKAN

TEZ DANIŞMANI: YRD. DOÇ. DR. SAMET KAFKAS

AYDIN-2003

ÖNSÖZ

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalında asistan olarak göreve başladığım andan itibaren, eğitim ve öğrenimim süresince yetişmemi sağlayan, bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum, değerli hocam sayın Prof. Dr. Ergün Onur'a teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Bilgi ve deneyimlerinden her zaman yararlanma fırsatı bulduğum ve eğitimimde önemli katkıları olan Yrd. Doç. Dr. Ali Rıza Odabaşı ve Yrd. Doç. Dr. Hasan Yüksel ile uzmanlık tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Samet Kafkas'a çok teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasındaki yardımlarından dolayı Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Zahit Bolaman'a; Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Çiğdem Yenisey'e, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı araştırma görevlisi Dr. Esin Kulaç ve öğretim üyesi Prof. Dr. Gül Ergör'e; SSK Ege Doğumevi Klinik Şef Yardımcısı Dr. Muzaffer Sancı ve asistanlarına; Dicle Üniversitesi Biyokimya Anabilim dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Sabri Batum'a; Adnan Menderes Üniversitesi Hematoloji Laboratuvarı teknisyenlerinden İlker Topalca'ya ve hasta takibindeki yardımlarından dolayı poliklinik hemşiresi sayın Emel Narin, sekreterlerimiz Melek Arslanhan ve Banu Yorulmaz'a çok teşekkür ederim.

Eğitim ve öğrenimim süresince beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma, ebe ve hemşire arkadaşlarıma, tüm klinik personeline şükranlarımı sunarım.

ÖZET

Aktive protein C (APC), koagülasyon sırasında, işlemde kofaktör olarak görev yapan faktör Va ve faktör VIIIa'yı proteolitik olarak inaktive eder; koagülan rolünü kısıtlar. APC'ye herhangi bir nedenle gelişen rezistans, venöz tromboz için önemli bir risk oluşturur. Vakaların çoğunda APC rezistansı gelişimi, faktör V geninde oluşan bir nokta mutasyona bağlıdır. Bu mutasyon, faktör V (1691 G→A) Leiden mutasyonu olarak adlandırılır ve özellikle Avrupa ülkelerinde yaygındır.

Bazı çalışmalar, aktive protein C'ye edinsel rezistansın, gebeliğin getirdiği normal bir bulgu olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalarda, gebelerde APC rezistansı, faktör V Leiden mutasyonu saptanmasa da gözlenmiştir. Faktör V Leiden mutasyonunun saptanmadığı olgularda görülen aktive protein C'ye rezistansın önemi, henüz saptanamamıştır.

Buna yönelik olarak, bu çalışmada hemostatik sistemde önemli değişikliklerin olduğunu bildiğimiz gebelikte; sigara içen ve içmeyen gebeler arasında bir dizi hemostatik parametrenin gebelik boyunca nasıl değişim gösterdiğini; APC sensitivite oranlarına bu değişimin nasıl yansıdığını; sigaranın direkt veya dolaylı bir faktör olarak bu hemostatik parametrelere etki edip etmeyeceğini incelemeyi amaçladık.

Çalışmamızı, sigara içen 42 ve içmeyen 138 gebe olmak üzere toplam 180 sağlıklı gebe tamamladı. Sonuç olarak:

1. Gebeliğin ilerleyen haftalarında APC sensitivite oranı azalmaktadır. Bu değişim, gebeliğin getirdiği, edinsel bir durum olarak gözükmemektedir.
2. Gebeliğin seyri boyunca, APC sensitivite oranı, sigara içen gebelerde içmeyenlere göre daha fazla etkilenmektedir.
3. Gebeliğin seyrinde, koagülasyon faktörlerindeki değişim, sigara içmeyen gebelerde mevcut literatürle uyumludur. Sigara içen gebelerde ise koagülasyon faktörlerinin gösterdiği değişim farklıdır.
4. Sigara içen grupta, hemostatik parametrelerde görülen bu farklı seyrin, APC sensitivite oranına etki ettiği çalışmamızda gösterilse de, klinik öneminin anlaşılabilmesi ve altta yatan mekanizmaların aydınlatılabilmesi için moleküler düzeyde daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

İÇİNDEKİLER

• GİRİŞ	1
• AMAÇ.....	3
• GENEL BİLGİLER.....	4
• GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
• KULLANILAN İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER VE BULGULAR.....	22
• TARTIŞMA.....	29
• SONUÇ.....	40
• KAYNAKLAR.....	41

GİRİŞ

Normal hemostatik mekanizmalar, kanın vasküler sistem içinde akışkan halde kalmasını sağlar. Bu mekanizmanın düzenlenmesinde damar duvarı, kanın şekilli elemanları ve plazma proteinleri uyumlu bir ilişki içindedir.

Koagülasyona eğilim yaratan ve trombotik olaylara yol açabilen birçok hereditör ve edinsel hastalık/durum tanımlanmıştır. Bunlar arasında yer alan aktive protein C rezistansı, familial trombofilinin en sık nedeni olup ilk kez Dahlback ve arkadaşları tarafından familial trombozlu bir ailede bildirilmiştir (1).

Aktive protein C rezistansı, invitro test temelinde plazmada anormal olarak azalmış antikoagülan yanıtı tanımlamaktadır. 1993 Yılında, Dahlback, nedeni bilinmeyen venöz trombozlu ailelerde aktive parsiyel tromboplastinle elde edilen yanıtın bozukluğu sonrası aktive protein C rezistansının varlığını yayınlamıştır (1). Bir yıl sonra da, üç laboratuvar tarafından hereditör aktive protein C rezistansında, altta yatan nedenin faktör V geninde oluşan bir noktasal mutasyon olduğu bildirilmiştir. Mutasyon sonucu olarak faktör V'i kodlayan gende, 10. ekzondaki 1691.ci nükleotitte, guanin'in adeninle yer değiştirmesiyle (G1691A) faktör V'in yapısında 506.pozisyondaki arginin'in glisin'in yerine (Arg506Gln) geçtiği rapor edilmiştir. Bu mutasyon şekli, FV Leiden, Gln-506-faktör V veya Q faktör V olarak adlandırılmıştır. Faktör V gen haplotipi, R₂ olarak adlandırılır. Normalde var olması, tromboz riski oluşturmaz; ancak, R₂ haplotipi Gln-506-faktör V alleli ile bir arada bulunduğu zaman tromboz riski oluşturabilmektedir (2,3,4). G1691A sonucu faktör V'in aktive protein C tarafından yıkımı gerçekleşmemiş olur ve faktör V'in inaktivasyonu normale göre 10 kat daha yavaş gerçekleşir. Ortamda, protrombinaz kompleksi tarafından kullanılabilecek daha fazla oranda faktör V mevcut hale gelir. Sonuç olarak da trombin'in prokoagulant aktivitesinde artma, yani hiperkoaguabl durum ortaya çıkar (5,6).

APC rezistansı, edinsel olarak, antifosfolipid antikor sendromu, HELLPS sendromu, faktör VIII düzeyinin yüksek olması, oral kontraseptif kullanımı ve kanserde de oluşabilir (7,8).

İki küçük çalışma, aktive protein C'ye edinsel rezistansın, gebeliğin getirdiği normal bir bulgu olduğunu göstermiştir (9,10). Bu çalışmalarda, gebelerde APC rezistansı, faktör V Leiden mutasyonu saptanmasa da gözlenmiştir. Faktör V Leiden mutasyonunun saptanmadığı olgularda görülen aktive protein C'ye rezistansın önemi henüz belirlenememiştir.

AMAÇ

Bu çalışmada, hemostatik sistemde önemli değişikliklerin olabileceğini düşündüğümüz gebelikte:

- 1.Sigara içen ve içmeyen gebeler arasında bir dizi hemostatik parametrenin gebelik boyunca nasıl bir değişim göstereceği,
- 2.APC sensitivite oranlarına bu değişimin nasıl yansıtacağı,
- 3.Sigaranın direkt veya dolaylı bir faktör olarak bu hemostatik parametrelere etkisi araştırıldı.

GENEL BİLGİLER

1. Kanın koagülasyonu:

Plazma proteinleri, hücresel komponentlerle mükemmel bir uyum içerisinde çalışarak vücutta yaralı herhangi bir bölgeden kan kaybını önler (hemostaz). Hemostazın 5 komponenti mevcuttur:

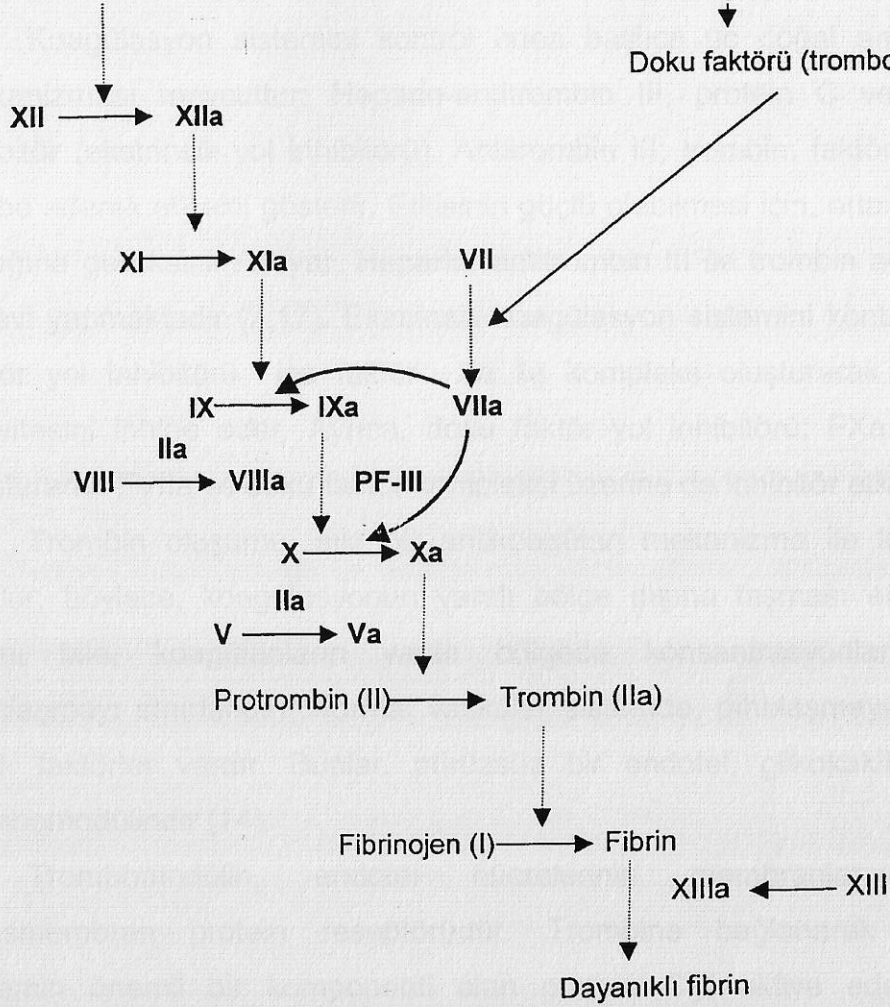
- 1.Vasküler kontraksiyon: Yaralanan damar bölgesinden kan kaybını azaltır.
- 2.Trombosit tıkaçının oluşturulması (primer hemostaz): Kapillerlerde, küçük arteriol ve venüllerde mikro delikleri kapatır.
- 3.Kanın pıhtılaşması (sekonder hemostaz): Fibrin depolanması, yaralanan bölgede kanın akışkanlığını engeller.
4. Fibrinolizis.
5. Koagülasyonun kontrol altında tutulması.

Plazma ve dokularda, koagülasyonda rol alan 50'nin üzerinde molekül tanımlanmıştır. Bu faktörler, prokoagülanlar ve antikoagülanlar olarak sınıflandırılır. Normal fizyolojik koşullar altında, koagülasyonu etkileyen kofaktörler ve inhibitörlerden oluşan kompleks bir sistem ile prokoagülanlar ve antikoagülanlar arasında mükemmel bir denge mevcuttur. Normalde, kanın akışkanlığının sağlanması için, dengenin baskın olduğu taraf antikoagülanlar lehinedir. Ancak; vasküler bir yaralanma durumunda, antikoagülasyon baskılanır ve denge, koagülasyon tarafına kayar. Bu nedenle, bu dengeyi değiştiren herhangi bir durum, kanama (örn: hemofili) veya tromboembolik bir bozuklukla (örn: trombofili) sonuçlanır (11,12).

Koagülasyon, iki yolla gerçekleşir. Birincisi, ekstrinsik yoldur: Çevre dokunun yaralanması ve vasküler yaralanma sonucunda başlar; pıhtılaşmayı başlatmak için doku faktörlerine gereksinim duyar. İkincisi, intrinsik yoldur: Kanın içerisinde başlar ve ekstrinsik yolun aksine, pıhtılaşmayı başlatmak için kanın dışında herhangi bir elemanın katılımına gereksinim duymaz (şekil.1).

İç (intrinsik) yol

- Yüzeyle temas
(hasarlanmış yüzey)
- Prekallikrein
- Yüksek moleküler ağırlıklı kininojen



Şekil.1: İntrinsik ve ekstrinsik pıhtılaşma yolu.

Vasküler yaralanmadan sonra pıhtılaşma, her iki yolla, aynı anda başlatılır. Her iki yol, pek çok zimojen (FXII, FX, protrombin) ve prokofaktörlerden (FV, FVIII) oluşur (13-16). Koagülasyonun başlamasıyla bu zimojen ve prokofaktörler, aktif formlarına dönüşürler. Bu iki mekanizma, FX'un aktive edilme basamağında kesişir. Aktif FX, FV ve trombosit veya doku fosfolipitleri ile birleşerek Protrombin Aktivatör Kompleks (PAC)'i oluşturur. Bu

PAC, protrombinin trombine dönüşümünü başlatır. Üretilen trombin, proteolitik olarak FVIII ve FV'i pozitif feed back ile aktive eder. Aktive olmuş FVIII, FX'un aktive edilmesinde; FV ise PAC oluşumunda rol alır. Böylece, proteolitik etkisini prokofaktörler üzerinde, hatta kendi üzerinde de gösteren trombin, koagülasyonu hızlandırır. Sonuç olarak, düzenleyici antikoagülan mekanizmalar çalışana kadar pıhtılaşma işlemi devam eder.

Koagülasyon sistemini kontrol eden başlıca üç doğal antikoagülasyon mekanizması mevcuttur: Heparin-antitrombin III, protein C ve doku faktör inhibitör (ekstrinsik yol inhibitörü). Antitrombin III; trombin, faktör Xa ve XIa'yı inhibe ederek etkisini gösterir. Etkisinin güçlü olabilmesi için, ortamda heparinin varlığına gereksinim duyar. Heparin, antitrombin III ile trombin arasında köprü görevi yapmaktadır (2,17). Ekstrinsik koagülasyon sistemini kontrol eden doku faktör yol inhibitörü ise faktör Xa ile kompleks oluşturarak faktör Xa'nın aktivitesini inhibe eder. Ayrıca, doku faktör yol inhibitörü; FXa ile kompleks oluşturarak FVIIa ve doku faktör kompleksi üzerine de inhibitör etki gösterir (18).

Trombin oluşumu, sıkı bir antikoagülan mekanizma ile kontrol altında tutulur; böylece, koagülasyonun yaralı bölge dışına taşması engellenir. Kan akımı bile, koagülanların yaralı bölgede konsantrasyonlarını azaltarak pıhtılaşmayı sınırlandırır. Normal vasküler sistemde, pıhtılaşmayı önleyen belli başlı faktörler vardır. Bunlar, pürüzsüz bir endotel, glikokakiks tabaka ve trombomodülin (14).

Trombomodülin, endotel hücrelerinin membranlarında bulunan transmembran protein reseptörüdür. Trombine bağlanarak antikoagülan sistemin önemli bir komponenti olan protein C'yi aktive eder. Protein C antikoagülan sistemi, trombin oluşumunu düzenleyen mekanizmalardan bir tanesidir.

Protein C'e bağlı olarak koagülasyonun kontrol altında tutulduğu bu yol, diğer antikoagülan mekanizmalardan farklılık gösterir. Doku faktör yol inhibitörü ve antitrombin III'ün rol oynadığı antikoagülan mekanizmalar, koagülasyon sisteminde proteaz komponentlerin inhibisyonu ile ilgili iken, aktive protein C, koagülasyon sisteminde nonproteolitik düzenleyici proteinlerden FVa ve FVIIIa'yı inhibe etme özelliğindedir (19).

Koagülasyon esnasında, trombin ve trombomodülün kompleks aktif protein C, membrana bağlı FVa ve FVIII'nın kısmi proteolizi ile koagülasyonu inhibe eder. Bu proteoliz, diğer plazma proteinlerinin (FV ve protein S) varlığıyla desteklenir. FV ve protein S, APC'nin sinerjistik kofaktörüdür (20,21). APC' nin uzun yarı ömrü, FV ve FVIII'in aktif formlarını spesifik olarak inaktive etmesi, APC'nin bir antikoagülan olarak dolaşımdaki fonksiyonunu belirler. Ancak, FV ve FVIII moleküllerinin APC tarafından inaktivasyonu önlenirse, plazmanın APC'ye olan yanıtı azalır. Bu durum, aktive protein C rezistansı (APCR) olarak adlandırılır ve kalıtsal bir trombofiliye yol açabilir.

Aktive protein C rezistansı, invitro test temelinde plazmada anormal olarak azalmış antikoagülant yanıtı tanımlamaktadır. 1993 Yılında, Dahlback, nedeni bilinmeyen venöz trombozlu ailelerde aktive parsiyel tromboplastinle elde edilen yanıtın bozukluğu sonrası, aktive protein C rezistansının varlığını yayınlamıştır (1). Bir yıl sonra da, üç laboratuvar tarafından hereditör aktive protein C rezistansında altta yatan nedenin faktör V geninde noktasal mutasyon olduğu; mutasyonel olarak faktör V'i kodlayan gende, 10. ekzondaki 1691. nükleotitte guanin'in adeninle yer değiştirmesi (G1691A) sonucu faktör V'in yapısında 506.pozisyondaki arginin'in glisin'in yerine (Arg506Gln) geçtiği rapor edilmiştir. Bu mutasyon şekli; FV Leiden, Gln-506-faktör V veya Q faktör V olarak adlandırılmıştır. Faktör V gen haplotipi, R₂ olarak adlandırılır. Normalde var olması, tromboz riski oluşturmaz ancak; R₂ haplotipi, Gln-506-faktör V alleli ile bir arada bulunduğu zaman tromboz riski oluşturabilmektedir (2,3,4). G1691A sonucu, faktör V'in aktive protein C tarafından yıkılımı gerçekleşmemiş olur ve faktör V'in inaktivasyonu normale göre 10 kat daha yavaş gerçekleşir. Ortamda, protrombinaz kompleksi tarafından kullanılabilecek daha fazla oranda faktör V mevcut hale gelir. Sonuç olarak da, trombin'in prokoagulant aktivitesinde artma yani pıhtılaşmaya eğilim ortaya çıkar (5,6).

Trombofili, multifaktöriyel bir hastalık olarak tanımlanır. Venöz tromboza yol açan faktörler, ilk kez Virchow tarafından, 1856 yılında tanımlanmıştır (22,23). Değişik bazı klinik durumlar, artmış venöz tromboz riski ile ilişkilidir. Örnekler; ortopedik cerrahi geçiren hastalar; pankreas, gastrointestinal sistem, akciğer, genitoüriner sistem ve meme kanseri olguları olarak sıralanabilir.

(24). Bunlara ek olarak; gebelik, oral kontraseptif kullanımı, travma, obezite ve immobilizasyon, altta yatan hastalığa bakılmaksızın ana risk faktörü sayılır (23,25,26,27).

Kalıtsal koagülasyon bozukluklarından antitrombin eksikliği, protein S eksikliği, protein C eksikliği en iyi bilinen genetik faktörlerdir. Son zamanlarda, aktive protein C rezistansının (APCR), beklenmeyen trombofili oluşumunda diğer bütün genetik faktörler içerisinde en sık rastlanan predispozan faktör olduğu gösterilmiştir (26,28,29).

2. Protein C:

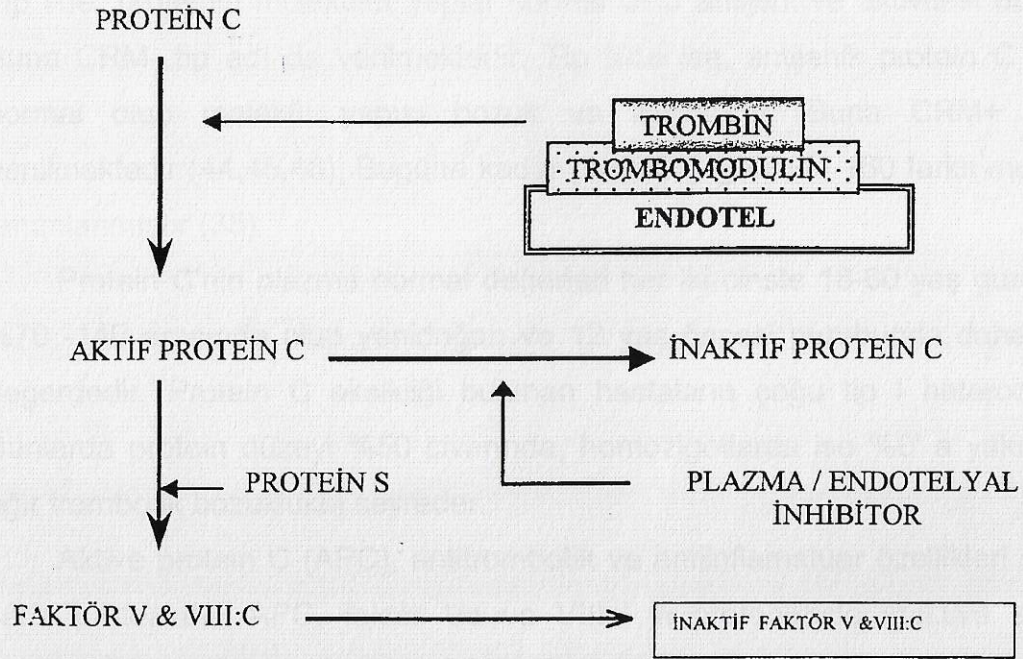
Protein C, 1960-1961'de, ilk kez Seegers'in laboratuvarında Mammen, Ulutin ve Seegers tarafından bir laboratuvar çalışması sırasında izole edilmiş ve Autoprotrombin-II antikoagulan diye adlandırılmıştır. 1976'da Stenflo, plazmadan vitamin K'ye bağımlı yeni bir faktör izole etti ve bu proteini kromatografide 3'üncü fraksiyon olan C fraksiyonunda elde ettiği için buna protein C adını verdi (30). Seegers'in laboratuvarında bu protein ile Mammen, Ulutin ve Seegers'ın Autoprotrombin II-A'sını karşılaştırarak bunların aynı madde olduğunu gösterdi. Bugün, Autoprotrombin II-A yerine protein C terimi tercih edilmektedir (31).

Protein C bir serin proteaz olup, 62000 mol ağırlığında iki polipeptid zincirinden oluşur. Hafif zincir 155 aminoasitten, ağır zincir 262 aminoasitten olmak üzere, protein toplam 406 aminoasitten oluşmuştur (32). Hafif zincir, amino ucunda Gla bölgesi ve iki epidermal-growth faktör benzeri bölge; ağır zincir ise serin proteaz içerir (32,33,34).

Protein C, karaciğerde ve testisin Leydig hücrelerinde yapılan vitamin K'ye bağımlı bir proteindir. Karaciğerde, inaktif prekürsör olarak sentezlenir ve beta-hidroksilasyon, gamma-karboksilasyon ve glikolizasyon sonrası disülfid bağları ile birbirine bağlı olan çift zincirli olgun protein olarak kana salınır (35,36).

Trombin , protein C'yi Arg 159 ile Leu 170 noktalarından keserek 12 aminoasitlik bir bölgeyi ayırır ve protein C'yi aktif hale getirir. İn vivo koşullarda trombin, endotel yüzeyinde bir reseptör olan trombomoduline bağlanır,

prokoagulan etkisini yitirir ve protein C'yi hızla aktive eder. Protein C, trombin tarafından aktive edilir fakat bu aktivasyon ileri derecede yavaştır (37). Trombomodulin, bu aktivasyonu hızlandırır ve ortamdaki Ca^{++} bu hızlandırmayı aktive eder. Protein C, bazı yılan zehirleri tarafından da aktive edilir (şekil.2).



Şekil.2: Protein C'nin aktivasyonu

Aktive protein C (APC), faktör Va ve faktör VIIIa'yı inhibe eder (38,39). Tek zincirli olan faktör V, trombinin etkisiyle iki zincirli hale dönüşür. Çift zincirin ağır zinciri aktive protein C tarafından parçalanır. Bu olayda, protein S sinerjik etki gösterir ve aktive protein C'nin etkisini güçlendirir. Protein C, protrombin aktivatör inhibitörü (PAI) de inhibe ederek fibrinolitik etki gösterir (40). Plazmada, protein C'nin fonksiyonel aktivitesinin yarılanma ömrü 20-30 dakikadır. Aktive protein C'nin inhibisyonu, protein C inhibitör ve alfa1-antitripsin tarafından sağlanmakla birlikte alfa2-makroglobulin ve alfa2-antiplazminin de protein C'yi inhibe ettiği gösterilmiştir. Aktive protein C, elastaz ve katepsin G tarafından yıkılır.

Protein C'nin miktarı, insan plazmasında 65 nM olup yarılanma ömrü 10 saattir (31,40).

Protein C geni 2. kromozomda q 13-14 bölgesinde bulunur. 11.2 kb DNA uzunluğundadır. 9 ekzon ve 8 introndan oluşmaktadır. Diğer K vitaminine bağlı proteinlerle yapı ve dizi homolojisi gösterir (41,42). Kalıtsal protein C eksikliğine bağlı tromboz eğilimi ilk kez 1981 yılında tanımlanmıştır (43). Genetik geçişi genellikle otozomal dominant formda olan Protein C eksikliğinin iki tipi vardır: Tip I'de, proteinin moleküler yapısı normal olup antijeni ve aktivitesi düşüktür. Buna CRM- tip adı da verilmektedir. Tip II'de ise, antijenik protein C miktarı normal olup molekül yapısı bozuk ve işlevsizdir. Buna CRM+ tip de denilmektedir (44,45,46). Bugüne kadar protein C geninde 160 farklı mutasyon tanımlanmıştır (35).

Protein C'nin plazma normal değerleri her iki cinste 18-60 yaş gurubunda %70 -140 arasında olup yenidoğan ve 12 yaş öncesi gurubunda daha düşük değerdedir. Protein C eksikliği bulunan hastaların çoğu tip I heterozigottur. Bunlarda protein düzeyi %50 civarında, homozigotlarda ise %0' a yakındır ve ağır trombotik bozuklukla seyreder.

Aktive protein C (APC), antitrombotik ve antiinflamatuvar özellikleri olan bir serin proteazdır. APC, faktör Va ve VIIIa' yı proteolizisle inaktive eder ve böylece iki anahtar enzim olan faktör Xa ve trombin oluşumu inhibe olur. APC, pıhtı lizisini de arttırabilir. Bu profibrinolitik etki, plazminojen aktivatör inhibitör tip 1 (PAI-1) inaktivasyonu ile oluşmakta ve gerek in vivo gerekse in vitro olarak izlenmektedir. Antiinflamatuvar etki mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen endotel ve monositlerden inflamatuvar sitokinlerin salınımının inhibisyonu ile ilişkili olabilir. APC' nin dolaşımında yarı ömrü 20 dakika olup çeşitli proteaz inhibitörleri (başlıca protein C inhibitör) ile yıkılır ve nötralize edilir (47).

3. Protein S:

Protein S, ilk defa 1977 yılında Di Scipio tarafından tanımlanmış, 70.000 D moleküler ağırlığında, 635 aminoasit büyüklüğünde, sentezi K vitaminine bağımlı, tek zincirli bir plazma glikoproteinidir (37,48). Karaciğerde, endotel hücrelerinde, megakaryositlerde ve testis leyding hücrelerinde sentezlenir. Normal bireylerde plazma konsantrasyonu 25 mikrogr/ml'dir (41).

Protein S (PS); aktif protein C' nin, FVa ve FVIIIa' yı inaktivasyonunda nonenzimatik kofaktördür. Plazmada %40'ı serbest, %60'ı C4b bağlayıcı proteine (C4b-BP) bağlı olarak dolaşır (59,60). Sadece serbest kısmı aktive protein C' ye kofaktörlük yapar. BP düzeyindeki değişiklikler de serbest PS oranını, dolayısıyla PS aktivitesini etkiler (41,45).

Protein S, tenaz ve protrombinaz komplekslerini inhibe edebilir. Bu reaksiyon aktif protein C' den bağımsızdır. Protein S, ayrıca tirozinkinaz reseptörüne ve damar düz kas hücrelerinde spesifik reseptörlere bağlanarak hücre proliferasyonuna katılır. Protein S geni, 3. kromozomda 3p11.1-3p11.2 bölgesinde lokalizedir . Trombozdaki risk faktörlerinden biri de protein S eksikliğidir. Otozomal dominant kalıtım gösterir (48).

4. Faktör V:

Pıhtılaşma faktörü, faktör V (FV); başlıca karaciğerde, monosit makrofaj sisteminde ve megakaryositlerde üretilir. Dolaşımda, tek zincirli glikoprotein şeklinde bulunur ve yarılanma ömrü 11-15 saattir. Moleküler ağırlığı, yaklaşık olarak 330.000 daltonudur. Tüm dolaşımdaki faktör V'in %18-25'i trombositlerce yapılır. Yapı ve fonksiyon olarak faktör VIII'e benzer. Trombositten fakir plazmadaki konsantrasyonu 7-10 mikrogram/ml'dir. Yaklaşık olarak faktör V'in %80'i plazmada serbest olarak bulunurken, %20'si trombositlerde depolanır. Trombosit faktör V'i, aktif trombositlerden salgılanabilir ve hemostazda önemli rol oynar (49,50,51).

Aktive faktör V (FVa), aktive protein C tarafından inaktive edilir. Protein C, pıhtılaşmayı önleyici etkisini esas olarak faktör Va ve faktör VIIIa'yı inaktive ederek gösterir. Fibrinolizisi hızlandırıcı etkisi de vardır. Bu etkilerini gösterebilmesi için önce trombin tarafından aktive edilerek aktive protein C'ye dönüştürülmesi gerekir. Pıhtılaşma sırasında oluşan trombin, trombomodulin adı verilen endotel hücre reseptörlerine bağlanınca fibrinojeni fibrine dönüştürme özelliğini kaybeder; antikoagülan ajan olan protein C'yi aktive eder ve antikoagülan özellik kazanır (52).

Faktör Va'nın, aktive protein C tarafından inaktivasyonu bifazik bir reaksiyondur ve aktive protein C, trombosit kökenli faktör V'i tamamen inaktive edemez (53).

5. Faktör VIII:

Faktör VIII (FVIII), yüksek molekül ağırlıklı (~300000) bir glikoproteindir. Plazmada FVIII (0.1-0.2 mg/L), FV'e (10 mg/L) oranla 50-100 kat daha az miktarda bulunur. Koagülasyonun aktiflenmesinin erken dönemlerinde, trombin ya da faktör Xa' nın etkisi ile aktif hale gelir ve koagülasyon sisteminde kofaktör olarak fonksiyon görür (21).

Son yıllarda, derin ven trombozlu hastalarda, FVIII düzeyinin yüksek olduğu ve bu durumun ailesel olabildiği bildirilmektedir (54). Ancak henüz FVIII'in artışına neden olan genetik bir değişim tanımlanamamıştır.

FVIII düzeyi, pek çok gen tarafından kontrol edilmekte ve edinsel olarak da artabilmektedir. Faktör VIII'i kodlayan en az 3 genin olduğu bilinmektedir ve çok sayıda lokus tarafından pıhtılaşma faktörlerinin konsantrasyonlarını etkilemektedir. Bu genlerden biri, ABO kan grubunu kodlayan gendir ve 0 grubu bireylerde faktör VIII düzeyi ve von Willebrand faktör düzeyi daha düşük konsantrasyonlardadır. Ancak, bugüne kadar faktör VIII artışına sebep olan bir gen tanımlanamamıştır (55).

Genel popülasyonun %11'inde faktör VIII düzeyi 1500 IU/L üzerinde bulunurken trombozlularda bu oran %25'e çıkmıştır. Yüksek konsantrasyona sahip bireylerde tromboz riski 6 kat artmaktadır (40,54).

6. Faktör V (1691-G→A) Leiden mutasyonu ve aktive protein C rezistansı (APCR):

1993'ten Bu yana trombofili konusundaki bilgilerimiz önemli ölçüde arttı. 1993 Yılında, B. Dahlback ve arkadaşları, ailevi venöz tromboz için yeni bir risk faktörü ortaya koydular. Bu durum, APTZ değerinin bozulması ile karakterize aktive protein C rezistansı olarak tanımlandı. Bir yıl sonra da, aktive protein C

rezistansının büyük bölümünün faktör V geninde olan bir nokta mutasyon sonucu ortaya çıktığı rapor edildi (52,53).

Protein C sisteminin fizyolojik rolü, vücudu inflamatuvar yan etkilere karşı korumak ve antikoagülan etkisiyle mikrosirkülasyonun devamlılığını sağlamaktır (51,52). Protein C'ye bağlı olarak koagülasyonun kontrol altında tutulduğu bu yol diğer antikoagülan mekanizmalardan farklılık gösterir. Doku faktör yol inhibitörü ve antitrombin III'ün rol oynadığı antikoagülan mekanizmalar koagülasyon sisteminde proteaz komponentlerin inhibisyonu ile ilgili iken, aktive protein C koagülasyon sisteminde nonproteolitik düzenleyici proteinlerden FVa ve FVIIIa'yı inhibe etme özelliği ile işlev görür (19). Bu modelde endotel hasar bölgesinde oluşan trombin, ortamda bulunan trombomodule; büyük damarlardaki endotelial hücrelerde bulunan endotelial protein C reseptörü (EPCR), protein C'ye bağlanır (56). Trombin-trombomodulin kompleksi protein C'yi katalitik olarak aktive edebilme özelliğindedir. Trombin-trombomodulin kompleksi ile EPCR'ye bağlı protein C, serbest protein C'ye göre daha etkin olarak aktive edilebilme özelliğindedir. Aktive olan protein C'nin bir kısmı EPCR'den ayrılarak hızla mikrosirkülasyona geçer. EPCR'ye bağlı olarak kalan protein C antikoagülant aktivitesini kaybetmiş olarak bulunur. EPCR'ye bağlı olarak kalan protein C faktör Va'yı inaktive etme özelliğine sahip değildir. Aktive protein C, endotelial hücre yüzeyindeki protein S ile devamlı etkileşim halindedir. Bu etkileşim aktive protein C'nin trombosit ve diğer endotelial hücre yüzeyine bağlanmasını kolaylaştırır. Hücre yüzeyine bağlı olarak bulunan aktive olan protein C, faktör Va ve VIIIa'yı inaktive edebilme özelliğindedir (17,57). Aktive protein C aracılığıyla Faktör Va'da, ilk olarak Arg⁵⁰⁶ parçalanmaya başlar bunu Arg³⁰⁶ ve Arg⁶⁷⁹ bölgeleri izler (58).

Faktör V Leiden mutasyonu, faktör V geninin 1691 no'lu nükleotidinde 506 pozisyonundaki arginin yerine glutamin gelmesiyle oluşan bir nokta mutasyondur. Bertina ve Zoller'in yayınlarında bu mutasyonun otozomal dominant geçiş gösterdiği belirtilir (4,59). Bu mutasyon nedeniyle, faktör Va inaktivasyonunda, Arg⁵⁰⁶ pozisyonunda olan hızlı faz yıkımı gerçekleşemez; faktör Va, yalnız yavaş reaksiyonla inaktive edilir. Böylece aktive protein C'ye karşı bir rezistans oluşur. Pürifiye edilen mutant faktör Va, aktive protein C

tarafından normal faktör Va'ya oranla 10 kat daha yavaş inaktive edilir. Bu; dolaşımdaki aktive faktör V miktarını ve devamlı bir pıhtılaşma olması nedeni ile pıhtılaşmaya eğilimi artırır (53).

Protein C'nin koagülasyon sistemindeki aktivitesi, protein S ve faktör Xa tarafından etkilendir. Protein S, Arg³⁰⁶ bölgesine etki ederek 2. yavaş fazı hızlandırır ve faktör Va yıkımını artırır. Faktör Xa ise tersine, Arg⁵⁰⁶ bölgesine etki ederek hızlı fazı spesifik olarak inhibe eder. Buradan da anlaşılacağı üzere Arg⁵⁰⁶ bölgesi mutasyona uğradığından, faktör Xa etki edemeyerek faktör V Leiden geliştiğinde, yıkımını engelleyemez. Ancak protein S'nin Arg³⁰⁶ bölgesine etkisi nedeniyle faktör V Leiden yıkımı 20 kat artar; bu nedenle aktive protein C'ye olan sensitivite farkları azalır. Eğer protein S eksikliği söz konusu ise, tromboz olasılığı çok daha fazla olur (53).

APC rezistansı edinsel olarak, antifosfolipid antikor sendromu, HELLP sendromu, faktör VIII düzeyinin yüksek olması, oral kontraseptif kullanımı, kanser ve gebelikte de oluşabilir (7,8). Heterozigot faktör V Leiden ile tip I faktör V eksikliği (faktör V aktivite ve antijen düzeyinde azalma) birlikteliği tanımlanmıştır. Bu kişilerde tromboza eğilim çok belirgin olup homozigot faktör V Leiden'i taklit edebilir; bu nedenle de psödohomozigot faktör V Leiden olarak adlandırılır (60).

İyi bir standardizasyon ile yapılan APC sensitivite oranına dayalı APCR testi basit, hızlı ve güvenilirdir. FV Leiden için spesifite ve sensitivitesi %85-90 veya daha fazladır. Dışarıdan standart protein C eklendiğinden, plazma protein C değişiklikleri test sonuçlarını etkilemez. Hasta plazmalarının FV den fakir plazma ile (1+4) dilüe edilmesi sonucu geliştirilen modifiye APCR testinin FV Leiden mutasyonu için %100 spesifite ve sensitivite gösterdiği belirtilmektedir (61,62).

Svensson ve Dahlback, 1994 yılında, aile hikayesi olmayan 104 ve aile hikayesi olan 211 venöz trombozlu hastada APCR'ı araştırdılar. Aile hikayesi olan hastaların %45'inde APCR saptadılar. Bu oran, aile hikayesi olmayanlara ve kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olacak şekilde yüksekti. Aile araştırmalarında, APCR'nin hereditör otozomal dominant bir hastalık olduğunu belirlediler (3).

Sun ve arkadaşları, 1994 yılında, tromboz ve APCR'ye sahip 2 hastanın plazmalarına FV ya da FVIII'den yoksun plazma ekleyerek APCR ölçümlerini tekrarlamışlar; FV eksik plazma eklendiğinde rezistansın devam ettiğini, FVIII eksik plazma eklendiğinde ise rezistansın olmadığını gözlemlemişler; sonuç olarak APCR' nin anormal FVa nedeniyle geliştiğini bildirmişlerdir (63).

1994 Yılı'nın başlarında Mann ve arkadaşları, APC'nin, FVa'yı, ağır zincirindeki Arg³⁰⁶, Arg⁵⁰⁶ ve Arg⁶⁷⁹ pozisyonlarında lokalize üç peptid bağınyı yıkarak inaktif hale getirdiğini gösterdiler (64). Aynı yıl; Bertina, Greengard, Voorberg ve Zöller adlı araştırmacılar, birbirine yakın zaman içinde FV geninde tek nokta mutasyon (1691. nükleotitte G→A) sonucunda, FVa'nın APC tarafından dominant yıkım noktasında argininin yerine glutaminin geçtiğini belirlediler (Faktör V:Q⁵⁰⁶ veya Faktör V Leiden) (4,65,66).

Williamson ve arkadaşları, 1998 yılında, APCR pozitif olan ve FV Leiden mutasyonu saptanmayan venöz trombozlu 17 hastanın birinde, FV geninde 1091 pozisyonunda gerçekleşen G→C mutasyonu sonucunda Arg³⁰⁶ bölgesinde arginin yerine treonin geçtiğini belirlediler (Faktör V Cambridge) (67). Aynı yıl Çin'de, Chan ve arkadaşları, bu kez pozisyon 1090'da gelişen mutasyon sonucunda Arg³⁰⁶ bölgesinde arginin yerine glisin geçtiğini gösterdiler (68). Tanımlanan bu iki mutasyonun etkileri ve tromboza katkılarını belirlemek için yeni araştırmalara gereksinim vardır.

1995 Yılında, Rosendaal ve arkadaşları, 471 hasta üzerinde FV Leiden'in venöz tromboz üzerine riskini araştırdılar. Riskin, heterozigotlarda 7, homozigotlarda 80 kat daha fazla olduğunu ve homozigot mutasyonun daha sık olarak kadınlarda izlendiğini bildirdiler (69).

1997 Yılında, Fianni ve arkadaşları, 341 trombozlu hastanın %15'inde (kontrol grubunda %2) APCR ve FV Leiden mutasyonu saptadılar. APCR'li hastalarda ilk trombotik atağın, %56 alt ekstremitte derin venlerinde, %23 yüzeysel tromboflebitler şeklinde ortaya çıktığını gözlemlediler. Ayrıca hastalarda ilk trombotik atak için risk faktörlerini ayrıntılı olarak bildirdiler (62).

Dekker ve arkadaşları, 1995 yılında, preeklampsinin etyopatogenezinde, ilk defa diğer faktörlerin yanında APCR'nin de katkısı olabileceğini belirttiler (70).

Dizon ve arkadaşları, 1996 yılında, 158 preeklampsili hastada, %8.9 oranında FV Leiden mutasyonu saptadılar. Bu oran %4.2 olan kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksekti. Sonuç olarak FV Leiden mutasyonu olan kişilerde preeklampsisi riskinin yüksek olduğunu, bu hastaların özellikle venöz tromboz yönünden izlemelerinin uygun olacağını bildirdiler (71).

1995 Yılında Cumming ve 1997 yılında Walker; birinci, ikinci, üçüncü trimestr gebelerde ve gebe olmayan kontrol grubunda yaptıkları çalışmada ikinci ve üçüncü trimestrde, APCR izlenme sıklığının istatistiksel açıdan anlamlı olacak şekilde yükseldiğini, bu durumun FVIII artışı ve serbest protein S düzeylerinde düşme ile ilişkili olduğunu bildirdiler. FV Leiden sıklığının %7.3 olarak saptandığı çalışmada, gruplar arasında fark olmadığı ortaya konuldu (72,73).

1996 Yılında, Mathonnet ve arkadaşları, gebe olan grupta, kontrol ve oral kontraseptif alan gruba göre anlamlı derecede yüksek APCR bildirdiler. APCR yüksek oranda saptanmasına rağmen bu çalışmada FV Leiden mutasyonu saptanmamıştır (74). Aynı dönemde, FV Leiden mutasyonu olmaksızın, oral kontraseptif kullananlarda, kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek APCR saptandı. Bu gözlemler sonucunda, yani mutasyon olmaksızın APCR izlenmesi, edinsel APCR tanımını gündeme getirdi (75).

1996 Yılında, Rotmensch ve arkadaşları, 7 hastada (3 hasta preeklampsili, diğer 4 hastada erken dönemde intrauterin bebek ölümü, abortus ve intrauterin gelişme geriliği mevcut) APCR ve FV Leiden mutasyonunu çalışmışlar, olguların tümünde APCR saptamışlar ve olguların 2'sinde homozigot, 5'inde ise heterozigot mutasyon bildirmişlerdir (76).

1997 Yılında, Hallak ve arkadaşları, tromboz gösteren 15 gebede FV Leiden sıklığını %46.6 bildirdiler. Sonuç olarak, mutasyon varlığının, gebelik ve puerperiumda tromboz riskini belirgin arttırdığını ifade ettiler (50).

1997 Yılında, Lindqvist ve arkadaşları, 2480 vakadan oluşan geniş bir gebe topluluğunda FV Leiden mutasyonu araştırarak venöz tromboemboli, intrapartum kan kaybı, fetal kayıp, preeklampsisi ve intrauterin gelişme geriliği gibi gebelik komplikasyonlarının oranlarını karşılaştırdılar. Kontrol grubunda %11 gibi yüksek bir oranda mutasyon saptanan bu çalışmada, gebelik

komplikasyonları yönünden, mutasyon saptanan grupta saptanmayan gruba göre fark izlenmedi. Ancak, mutasyon saptanan grupta venöz tromboemboli sıklığının 8 kat arttığını ve intrapartum kan kaybının 2 kat düşük olduğunu ortaya koydular (77).

1999 Yılında, van Pampus ve arkadaşları, 158 preeklampsili ve 67 normal gebeyi APCR, antikardiolipin antikorlar ve hiperhomosisteinemi yönünden araştırdılar. APCR, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunduğu halde bu olguların ancak yarısında FV Leiden mutasyonu saptandı ve mutasyon yönünden fark anlamlı değildi. Bu çalışmada olguların %40'ında, hatta 28. haftadan önceki dönem göz önüne alınırsa %60'ında, hemostatik testlerde bozukluk bildirildi. Perinatal ölüm, APCR saptanan grupta saptanmayana göre daha sıklıkla ve benzer sonuçlar antikardiolipin antikorlar için de geçerliydi. APCR saptanan olguların yaklaşık yarısında mutasyon saptanmaması nedeniyle preeklampside, APCR'nin mutasyondan ziyade normal gebelik, oral kontraseptif kullanımı ve serebral iskemik hastalıklarda olduğu gibi edinsel olabileceğini bildirdiler (78).

Walker ve arkadaşları, 1997'de yayınladıkları makalede, aktive protein C rezistansının gebeliğin ikinci ve üçüncü trimesterlerinde arttığını; bunun, diğer koagülasyon proteinlerinin konsantrasyonlarında olan değişikliğe bağlı, normal gebeliğin getirdiği edinsel ve fizyolojik bir durum olduğunu bildirdiler (73).

7. Faktör V (1691-G→A) Leiden mutasyonu prevalansı:

Henüz, tam olarak bütün dünyayı içeren bir prevalans çalışması yayınlanmamış olmasına rağmen Rees ve arkadaşları, faktör V (1691 G→A) Leiden mutasyonunun 24 ayrı toplumda dağılımını yayınladı (79). Sonuçlar, Avrupa'da heterojenitenin yüksek olduğunu, fakat etnik gruplara, coğrafi bölgelere bağlı olarak değişim gösterdiğini; Japon, Çin, Afrika, Amerika toplumlarında mutasyon görülmediğini ortaya koymuştur. Faktör V Leiden mutasyonu prevalansı batı toplumlarında %2-10 oranında değişmektedir.

Türkiye, üç kıtanın birleşim yerinde bulunmaktadır ve Asya ile Avrupa arasında bir köprüdür. Coğrafi yerleşimine bağlı olarak Anadolu, tarihte bu üç

kitadan değişik ırkların ve etnik grupların bir araya gelmesine neden olmuştur. Bu da mutasyonun prevalansını etkilemektedir.

Gül ve arkadaşları, İstanbul'da yaptıkları çalışmada, 107 sağlıklı hastada %10.7 heterozigotluk buldular. Akar ve arkadaşları ise Ankara'da, 285 hastada yaptıkları çalışmada, %9.8 faktör V Leiden heterozigotluğu ve %4.91 allel frekansı buldular (80). Yine, Akar ve arkadaşları, Faktör V (1691G→A) Leiden mutasyon frekansını Türk Kıbrıs halkında %12.2 olarak buldu. Daha önceki araştırmalar Yunan ve Güney Kıbrıs halkındaki allel frekansını %7.0-8.0 olarak göstermişti. Bu değer, Avrupa'nın en yüksek değeridir (81).

GEREÇ VE YÖNTEM

Olgular

Çalışmaya, Şubat 2002-Mart 2003 tarihleri arasında, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Polikliniği'ne ve Şubat 2003-Mayıs 2003 tarihleri arasında Sosyal Sigortalar Kurumu Ege Doğumevi ve Kadın Hastalıkları Eğitim Hastanesi Gebe Polikliniği'ne başvuran 193 gebe alındı. Gebeler, sigara içme durumlarına göre (sigara içen grup: En az iki yıldır, günde 5 adet veya daha fazla, gebelikte bırakılmamış; sigara içmeyen grup: Yaşam boyu ve gebelikte hiç sigara içmemiş) iki gruba ayrıldı. Çalışmayı 180 gebe tamamladı. 13 Gebe, çeşitli nedenlerle (abortus, preeklampsi, hipertansiyon vs.) çalışma kriterlerine uymadığı için çalışmadan çıkarıldı. 138 Gebe sigara içmeyen grubu, 42 gebe sigara içen grubu oluşturdu.

Her iki grupta bulunan gebelerin; bilinen veya sonradan tanı konan sistemik hastalığı, ilaç kullanım öyküsü; preeklampsi, habitüel abortus, intrauterin ex öyküsü; ailede derin ven trombozu veya emboli öyküsü yoktu.

Genetik çalışma için, APCR saptanan ilk 18 hastadan örnek alındı.

Gereçler

1. APCR, FV, FVIII, serbest protein S, protein C kitleri: (Instrumentation Laboratory Company, USA)
2. Instrumentation Laboratory ACL Advance marka koagülometre cihazı.
3. Coulter GEN-S analizör.
4. Real Time PCR (Roche) (Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi)
5. LightCycler-Faktör V Leiden saptama kitleri (Roche)
6. Yüksek saflıkta PCR template hazırlama kitleri (Roche)
7. – 80° C derin dondurucu.
8. Santrifüj

Yöntem

Kan örnekleri, gebelerin antekübital venlerinden, minimal staz ile, vacutainer kullanılarak alındı. Kan alma işlemi, gebelik izlemi sırasında çalışılan diğer parametreler için kan alındığı sırada gerçekleştirildi. %3.8 Sodyum sitrat içeren plastik tüplere (Vacutest IN®) alınan 3 adet 2 ml'lik kan örnekleri, örnekleme sonrası 20-40 dk içerisinde, oda sıcaklığında, 3500 g'de 5 dakika santrifüj edilerek plazmalarından ayrıldı. Plazma örnekleri, 1.5 ml'lik tüplere konarak test zamanına kadar -80 derecede korundu. Örneklemenin yapıldığı gün, 0.04 ml EDTA içeren 2 tüpe (Vacuette®) alınan 2'şer ml kan ile, hemoglobin, hematokrit ve trombosit sayısı çalışıldı ve sonuçlar kaydedildi. Diğer tüp, genetik analiz için +4 derecede saklandı.

APCR'nin belirlenmesi

Modifiye APC resistance kit: IL Test™ APC™ resistance V (Instrumentation Laboratory Company) kullanıldı. Bu testte plazma örnekleri FV reagent plazma ile seyreltilerek APTZ reagent ile belli bir standart periyot içinde inkübe edilir. Koagülasyon CaCl_2 eklenmesi ile tetiklenerek APC varlığında ve yokluğunda APTZ ölçülür. APC varlığında ölçülen APTZ'nin, APC yokluğunda ölçülen APTZ'ye oranı APC sensitivite oranını verir. 2'nin altındaki değerler APC rezistansını göstermektedir.

IL Test™ APC™ resistance V'in içeriği:

- APTZ Reagent: 2 x 4 ml pürifiye fosfolipid ile birlikte kolloidal silika.
- FV Reagent plazma: 2 x 4 ml FV'den fakir insan plazması.
- APC / CaCl_2 : 2 x 2 ml APC ve CaCl_2 kombinasyonu.
- CaCl_2 : 2 x 2 ml CaCl_2 ve sığır serum albumini kombinasyonu.
- APC kontrol plazma level 1: 2x1 ml liyofilize insan plazması.
- APC kontrol plazma level 2 : 2 x 0.5 ml liyofilize insan plazması.

Testin Hazırlanması:

1-APTZ Reagent: Kullanımdan önce vortex ile iyice karıştırılır.

2-FV Reagent plazma: 4 ml tip II su ile sulandırılarak iyice çözülmesi sağlandıktan sonra 15-25 derecede 30 dakika karıştırılır.

3-APC / CaCl_2 : 2 ml tip II su ile sulandırılarak iyice çözülmesi sağlandıktan sonra 15-25 derecede 30 dakika karıştırılır.

4- CaCl_2 : Kullanıma hazırdır.

5-APC kontrol plazma level 1: 1 ml tip II su ile sulandırılarak iyice çözülmesi sağlandıktan sonra 15-25 derecede 30 dakika karıştırılır.

6-APC kontrol plazma level. 2: 0.5 ml tip II su ile sulandırılarak iyice çözülmesi sağlandıktan sonra 15-25 derecede 30 dakika karıştırılır.

Tam bir çalışma için, normal ve anormal kontrollerin kullanılması önerilmektedir. Bu kitte APC kontrol plazma level 1 ve 2 bu amaç için kullanılmaktadır.

Diğer parametreler

FV, FVIII, serbest protein S, protein C parametreleri için yine aynı firmanın (Instrumentation Laboratory Company, USA) kitleri kullanıldı. Bu parametreler ve APCR, Instrumentation Laboratory ACL Advance marka koagülometre cihazı ile çalışıldı.

Trombosit sayısı, hemoglobin (Hb), hematokrit (Hct), Coulter GEN-S analizör ile belirlendi.

Genetik analiz, Real time PCR ile Roche firmasının kitleri kullanılarak Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Laboratuvarı'nda yapıldı.

KULLANILAN İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER VE BULGULAR

İstatistiksel hesaplamalar için SPSS Windows 11.0 programı kullanıldı. Anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

Gruplar arası yaş, vücut-kütle indeksi (BMI) ortalamalarının karşılaştırılması için T testi kullanıldı.

Sigara içen gebelerin yaş ortalaması 27.29 ± 4.91 ; içmeyen gebelerin yaş ortalaması 27.96 ± 4.67 'dir. İki grup yaş ortalamaları arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı değildir ($t = 0.82$, $SD = 178$, $p = 0.416$).

İki grupta, BMI ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($t = 0.60$, $SD = 178$, $p = 0.548$). Sigara içen grupta BMI ortalaması 25.77 ± 5.13 , içmeyen grupta BMI ortalaması 25.26 ± 3.99 'dur.

Çalışmaya alınan gebelerin, sigara içme durumları ve trimestrlere göre dağılımı tablo 1'de verilmiştir.

			SİGARA İÇME DURUMU		TOPLAM
			içmiyor	içiyor	
TRİMESTR	1 (6-14hf)	SAYI %	49 35,5%	11 26,2%	60 33,3%
	2 (15-28hf)	SAYI %	58 42,0%	12 28,6%	70 38,9%
	3 (29-41hf)	SAYI %	31 22,5%	19 45,2%	50 27,8%
TOPLAM		SAYI %	138 100,0%	42 100,0%	180 100,0%

Tablo.1: Çalışmaya alınan gebelerin, sigara içme durumları ve trimestrlere göre dağılımı.

Trimestr grupları arasında, sigara içme durumu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($\chi^2 = 8.350$, $SD = 2$, $p = 0.015$). Bu farkın, elle yapılan ileri analiz ile III.trimestr grubundan kaynaklandığı saptanmıştır. I. ve II. trimestr grupları arasında, sigara içme açısından anlamlı bir fark yoktur. Sonuç olarak, III. trimestr gebelerde sigara içme durumu, I. ve II.trimestrdaki gebelere göre anlamlı ölçüde fazladır.

Sigara içen ve içmeyen gebelerde parametrelerin ortalamaları ve standart sapmaları tablo 2'de gösterilmiştir.

PARAMETRE (Normal değer aralığı)	SİGARA İÇME DURUMU	GRUPTAKİ HASTA SAYISI	ORTALAMA	STANDART SAPMA
Faktör V (%50-150)	içmiyor içiyor	138 42	74,87 59,73	28,21 34,42
Faktör VIII (%50-150)	içmiyor içiyor	138 42	90,04 72,75	41,42 30,02
Serbest Protein S (%53.2-109.1)	içmiyor içiyor	138 42	58,90 55,44	15,87 14,34
Protein C (%71.8 -146.2)	içmiyor içiyor	138 42	109,76 104,54	20,18 23,13
Trombosit sayısı (150-400 $10^3/mm^3$)	içmiyor içiyor	138 42	272,99 237,33	260,77 56,48
Hemoglobin (gr/dl)*	içmiyor içiyor	138 42	12,21 12,10	1,09 1,34
Hematokrit * (%)	içmiyor içiyor	138 42	34,88 35,26	2,98 3,77
APCR (<2)**	içmiyor içiyor	138 42	2,04 1,87	0,23 0,27

Tablo.2: Çalışılan parametrelerin ortalamaları ve standart sapmaları.

* Gebelik süresince trimestrlere göre normal aralık değişmektedir.

** 2 ve üzerindeki değerler normal kabul edilmektedir.

Sigara içen ve içmeyen gruplar arasında, parametrelerin ortalamalarının farkları T testi ile hesaplandı. Ortalamaların istatistiksel olarak farklarının anlamlılığı ve test değerleri tablo 3'te gösterilmiştir.

PARAMETRE	t	SD	p
Faktör V	2.60	58.74	0.010*
Faktör VIII	2.97	92.96	0.004*
Protein C	1.42	178	0.158
Serbest Protein S	1.26	178	0.208
APCR	3.71	60.09	0.000**
Trombosit sayısı	1.50	169.07	0.137
Hematokrit	-0.61	57.38	0.547
Hemoglobin	0.47	58.36	0.641

Tablo.3: Her iki grubun ortalamaları arasındaki farklar.

*İstatistiksel olarak anlamlı.

**İstatistiksel olarak çok anlamlı

İki grup parametreleri trimestrlere göre, ayrı ayrı karşılaştırıldı. Karşılaştırma için Mann-Whitney U testi kullanıldı:

I. trimestrde olan tüm gebeler, sigara içme açısından değerlendirildiğinde; sigara içen I.trimestr gebeler [(S+1)] ile sigara içmeyen I. trimestr gebelerin [(S-1)] çalışılan parametrelerinin ortalamaları arasındaki fark şöyledir: (S+1) grubunun protein C ortalaması, (S-1) grubunun ortalamasından anlamlı düzeyde düşüktür (M-W U=143, p=0.016). Diğer parametrelerin ortalamaları arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

II. trimestrde olan tüm gebeler, sigara içme açısından değerlendirildiğinde; sigara içen II.trimester gebeler [(S+2)] ile sigara içmeyen II. trimester gebelerin [(S-2)] çalışılan parametrelerinin ortalamaları arasındaki fark şöyledir: (S+2) grubunun APCR ortalaması, (S-2) grubunun ortalamasından anlamlı düzeyde

düşüktür (M-W $U=219$, $p=0.044$). Diğer parametrelerin ortalamaları arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

III. trimestrde olan tüm gebeler, sigara içme açısından değerlendirildiğinde; sigara içen III.trimestr gebeler [(S+3)] ile sigara içmeyen III. trimestr gebelerin [(S-3)] çalışılan parametrelerinin ortalamaları arasındaki fark şöyledir: (S+3) grubunun FV, FVIII, APCR ortalamaları, (S-3) grubunun ortalamalarından anlamlı düzeyde düşüktür (M-W $U=148$, $p=0.003$; M-W $U=125.50$, $p=0.001$; M-W $U=131$, $p=0.001$). Diğer parametrelerin ortalamaları arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

Tüm hastalar için, trimestrlere göre yapılan karşılaştırmalarda T testi kullanıldı ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi:

İlk trimestrde olan gebelerin (T1) hematokrit düzeyi, II. trimestrde olan gebelerin (T2) düzeyinden anlamlı ölçüde yüksek bulundu ($t= 2.117$, $SD=128$, $p=0.036$). (T1)'in protein C düzeyi, (T2)'nin düzeyinden anlamlı ölçüde düşük bulundu ($t= -2.629$, $SD=128$, $p=0.010$). Diğer parametrelerin ortalamaları arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

(T1)'in serbest protein S, APCR, hemoglobin ve hematokrit düzeyleri; III. trimestrde olan gebelerin (T3) düzeylerinden anlamlı ölçüde yüksek bulundu ($t= 3.526$, $SD=106.79$, $p=0.001$; $t= 3.123$, $SD=108$, $p=0.002$; $t= 2.798$, $SD=108$, $p=0.006$; $t= 2.596$, $SD=108$, $p=0.011$). Diğer parametrelerin ortalamaları arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

(T2)'nin FV, APCR, trombosit sayısı düzeyleri, (T3)'ün düzeylerinden anlamlı ölçüde yüksek bulundu ($t= 2.505$, $SD=95.43$, $p=0.014$; $t= 2.258$, $SD=118$, $p=0.026$; $t= 2.939$, $SD=118$, $p=0.004$). Diğer parametrelerin ortalamaları arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

Sigara içmeyen gebelerin, trimestrlere göre parametrelerinin ortalamaları T testi kullanılarak karşılaştırıldı:

İlk trimestrdeki gebelerin protein C düzeyi, II. trimestrdeki gebelerin düzeyinden anlamlı olarak düşük bulundu ($t= -2.013$, $SD=105$, $p=0.047$). Diğer parametrelerin ortalamaları arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

İlk trimestrdeki gebelerin serbest protein S düzeyi, III. trimestrdeki gebelerin düzeyinden anlamlı olarak yüksek ($t=3.526$, $SD=106.79$, $p=0.001$); FVIII düzeyleri anlamlı olarak düşük ($t= -2.972$, $SD=78$, $p=0.004$) bulundu. Diğer parametrelerin ortalamaları arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

II. trimestrdeki gebelerin Protein C düzeyi, III. trimestrdeki gebelerin düzeyinden anlamlı olarak yüksek bulundu ($t= 2.160$, $SD=87$, $p=0.034$). Diğer parametrelerin ortalamaları arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

Sigara içen gebelerin, trimestrlere göre parametrelerinin ortalamaları ise Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Buna göre:

I. ve II. trimestrdeki gebelerin, parametrelerinin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

İlk trimestrdeki gebelerin FV, serbest protein S, APCR, trombosit sayısı, hemoglobin ve hematokrit düzeyleri, III. trimestrdeki gebelerin düzeylerine göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu (M-W $U=49$, $p=0.017$; M-W $U=53$, $p=0.027$; M-W $U=58$, $p=0.045$; M-W $U=36$, $p=0.03$; M-W $U=42.5$, $p=0.008$; M-W $U=58$, $p=0.045$). Protein C düzeyi ise, ilk trimestrde III. trimestre göre anlamlı ölçüde düşük bulundu (M-W $U=56$, $p=0.037$). Diğer parametrelerin düzeyleri arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

II. trimestrdeki gebelerin FV ve trombosit sayısı düzeyleri, III. trimestrdeki gebelerin düzeylerine göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu (M-W $U=63.5$, $p=0.041$; M-W $U=52$, $p=0.012$). Diğer parametrelerin düzeyleri arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

Sigara içen ve içmeyen gebe grubunda, trimestrlere göre APC sensitivite oranlarının dağılımı tablo 4 ve tablo 5'te gösterilmiştir.

SİGARA İÇEN GEBELER			APC sensitivite oranı		TOPLAM
			<2	2 ve >2	
TRİMESTR	1	SAYI	5	6	11
		%	%11,9	%14,3	%26,2
	2	SAYI	8	4	12
		%	%19,0	%9,5	%28,6
	3	SAYI	15	4	19
		%	%35,7	%9,5	%45,2
TOPLAM		SAYI	28	14	42
		%	%66,7	%33,3	%100,0

Tablo.4: Sigara içen gebe grubunda, trimestrlere göre APC sensitivite oranlarının dağılımı.

SİGARA İÇMEYEN GEBELER			APC sensitivite oranı		TOPLAM
			<2	2 ve >2	
TRİMESTR	1	SAYI	15	34	49
		%	%10,9	%24,6	%35,5
	2	SAYI	23	35	58
		%	%16,7	%25,4	%42
	3	SAYI	13	18	31
		%	%9,4	%13	%22,5
TOPLAM		SAYI	51	87	138
		%	%37	%63	%100,0

Tablo.5: Sigara içmeyen gebe grubunda, trimestrlere göre APC sensitivite oranlarının dağılımı.

Genetik analizi yapılabilen 18 gebenin sigara içme durumu ve APCR'ye göre dağılımı tablo 6 ve tablo 7'de gösterilmiştir.

Faktör V Leiden			Sigara içme durumu		TOPLAM
			İçmiyor	İçiyor	
Genetik analiz	Mutasyon yok	SAYI %	11 %61,1	2 %11,1	13 %72,2
	Homozigot	SAYI %	1 %5,6	0 %0	1 %5,6
	Heterozigot	SAYI %	3 %16,7	1 %5,6	4 %22,2
TOPLAM		SAYI %	15 %83,3	3 %16,7	18 %100,0

Tablo.6: Genetik analizi yapılan gebelerin sigara içme durumuna göre dağılımı

Faktör V Leiden			APC sensitivite oranı		TOPLAM
			>2	2 ve <2	
Genetik analiz	Mutasyon yok	SAYI %	11 %61,1	2 %11,1	13 %72,2
	Homozigot	SAYI %	1 %5,6	0 %0	1 %5,6
	Heterozigot	SAYI %	4 %22,2	0 %0	4 %22,2
TOPLAM		SAYI %	16 %88,9	2 %11,1	18 %100,0

Tablo.7: Genetik analizi yapılan gebelerin APCR'ye göre dağılımı.

TARTIŞMA

Koagülasyona eğilim yaratan ve trombotik olaylara yol açabilen birçok hereditör ve edinse hastalık/durum tanımlanmıştır. Bunlar arasında yer alan aktive protein C rezistansı, familyal trombofilinin en sık nedeni olup ilk kez Dahlback ve arkadaşları tarafından familyal trombozlu bir ailede bildirilmiştir (1).

Aktive protein C (APC), koagülasyon sırasında, işlemde kofaktör olarak görev yapan faktör Va ve faktör VIII'a'yı proteolitik olarak inaktive eder; koagülan rolünü kısıtlar. APC'ye herhangi bir nedenle gelişen rezistans, venöz tromboz için önemli bir risk oluşturur. Vakaların çoğunda APC rezistansı gelişimi, faktör V geninde oluşan bir nokta mutasyonuna bağlıdır. Bu mutasyon, faktör V (1691 G→A) Leiden mutasyonu olarak adlandırılır ve özellikle Avrupa ülkelerinde yaygındır.

1995 Yılında Cumming ve 1997 yılında Walker; birinci, ikinci, üçüncü trimestr gebelerde ve gebe olmayan kontrol grubunda yaptıkları çalışmada ikinci ve üçüncü trimestrde, APCR izlenme sıklığının istatistiksel açıdan anlamlı olacak şekilde yükseldiğini, bu durumun FVIII artışı ve serbest protein S düzeylerinde düşme ile ilişkili olduğunu bildirdiler. FV Leiden sıklığının %7.3 olarak saptandığı çalışmada, gruplar arasında fark olmadığı ortaya konuldu (72,73).

1996 Yılında, Mathonnet ve arkadaşları, gebe olan grupta, kontrol ve oral kontraseptif alan gruba göre anlamlı derecede yüksek APCR bildirdiler. APCR yüksek oranda saptanmasına rağmen bu çalışmada FV Leiden mutasyonu saptanmamıştır (74). Aynı dönemde, FV Leiden mutasyonu olmaksızın, oral kontraseptif kullananlarda, kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek APCR saptandı. Bu gözlemler sonucunda, yani mutasyon olmaksızın APCR izlenmesi, edinse APCR tanımını gündeme getirdi (75).

Bazı çalışmalar, aktive protein C'ye edinse rezistansın, gebeliğin getirdiği normal bir bulgu olduğunu göstermiştir (9,10). Bu çalışmalarda, gebelerde APC rezistansı, faktör V Leiden mutasyonu saptanmasa da gözlenmiştir. Faktör V Leiden mutasyonunun saptanmadığı olgularda görülen aktive protein C'ye edinse rezistansın nedenleri ve önemi henüz tam olarak saptanamamıştır.

Sigara kullanımı ve gebeliğe olan etkileri ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu araştırmaların çoğu korelasyon çalışmalarıdır. Bunlarda neden olarak gösterilen faktörlerin mekanizmalarını açıklamaya yönelik çalışmalar ve veriler oldukça kısıtlıdır (82-85).

Bu verilerin doğrultusunda, hemostatik sistemde önemli değişikliklerin olduğunu bildiğimiz gebelikte, sigara içen ve içmeyen gebeler arasında bir dizi hemostatik parametrenin seyrini, APC sensitivite oranlarını ve küçük bir grupta, faktör V Leiden mutasyon sıklığı incelendi.

İki grup, trimestr faktörü gözetilmeksizin karşılaştırıldığında, APCR düzeyi sigara içen grupta istatistiksel olarak daha düşüktür. APCR ile ilişkili olabilecek parametrelerden FV ve FVIII düzeyinin de sigara içen grupta istatistiksel olarak daha düşük olduğunu bulduk. Protein C ve serbest protein S ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Daha önce yapılan çalışmalarda FVIII düzeyi ile APCR arasında negatif bir ilişki olduğu, sonuçta artan FVIII ile APCR'nin azaldığı bildirilmiştir (73,86). Çalışmamızda da bulgular, aynı ilişkiye işaret etmektedir. Bazı literatür bilgileri, FV düzeyinin gebelik süresince ihmal edilebilir bir değişim gösterdiğini ve APCR ile korelasyonu bulunmadığını göstermektedir (73,74,86-89). Ancak; çalışmamızda FV düzeylerinin, özellikle II. ve III. trimestr grupları arasındaki farkı istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir ($p=0.014$). I. ile III.trimestr ve I. ile II. trimestr FV düzeyleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Dolayısıyla, bu çalışmada istatistiksel olarak anlamlı fark gösteren FV düzeyinin, yine fark gösteren APCR düzeyine etkisinin olabileceği düşünüldü.

Gebelik süresince APC sensitivite oranının, trimestr ilerledikçe bir miktar düştüğü ve bunun gebeliğin getirdiği fizyolojik, edinsel bir durum olduğu öne sürülmüştür (72,73). Bu nedenle, tüm çalışma grubu içerisinde yer alan gebelerin, bulundukları trimestrlere göre APC sensitivite oranlarının değişebileceği ve bu faktörün APCR düzeyleri karşılaştırılırken göz önünde bulundurulması gerektiği önerildi.

Çalışmamıza aldığımız gebelerde, trimestr grupları arasında, sigara içme durumu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($\chi^2=8.350$, $SD=2$, $p=0.015$). Bu farkın, elle yapılan ileri analiz ile III.trimestr grubundan

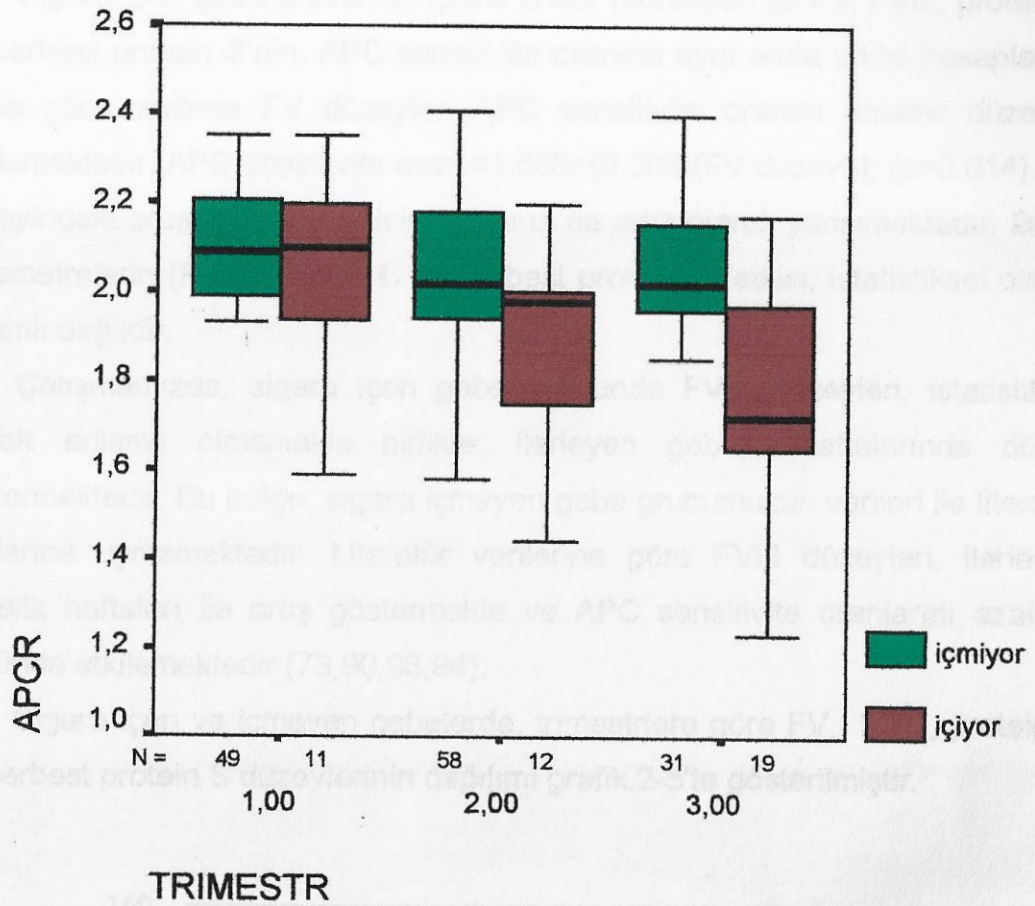
kaynaklandığı saptanmıştır. Sonuç olarak, III. trimestr gebelerde sigara içme durumu, I. ve II. trimestr'deki gebelere göre anlamlı ölçüde fazladır.

Bütün bu verilerin ışığında, tüm gebeler ele alındığında, APCR düzeyine etki edebileceğini düşündüğümüz sigara içimi, trimestr, FV ve FVIII bağımsız değişkenlerinin aynı andaki etkisi çoklu lineer regresyon analizi ile değerlendirildi. Sonuçta, sigara içme durumu, trimestr ve FV düzeyinin APC sensitivite oranlarına etkilerinin istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.015$, $p=0.002$, $p=0.002$), FVIII düzeyinin ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu. Gebelikte sigara içimi, ileri trimestrde olma, APC sensitivite oranını azaltma yönünde; FV düzeyinin yükselmesi ise artırma yönünde etki etmektedir. Bu analiz sonucunda, APC sensitivite oranı aşağıdaki formül ile hesaplanabilmektedir:

$$\text{APC sensitivite oranı} = 2.036 + [(-0.132)(\text{sigara içme durumu})] + [(-0.06)(\text{trimestr})] + [(0.0014)(\text{FV düzeyi})]$$

APCR' nin ve APCR'ye etkiyen bazı koagülasyon parametrelerinin gebelik süresince değişim gösterdiği pek çok çalışmada bildirilmiştir (90-92). Bu nedenle, çalışma gruplarının trimestrlere göre parametrelerinin karşılaştırılarak değerlendirilme yapılması gereklidir. Buna göre:

I. trimestrde olan tüm gebeler, sigara içimi açısından değerlendirildiğinde; sigara içen ve içmeyen gebelerin APC sensitivite oranları arasında anlamlı bir fark yoktur. II. ve III. trimestrde ise; sigara içen gebelerin APC sensitivite oranı ortalaması, sigara içmeyen gebelerin ortalamasından anlamlı düzeyde düşüktür. Sigara içen ve içmeyen gebe gruplarında, trimestrlere göre APC sensitivite oranının dağılımı grafik 1'de gösterilmiştir.



Grafik.1: Sigara içen ve içmeyen gebe gruplarında, trimestrlere göre APC sensitivite oranının dağılımı.

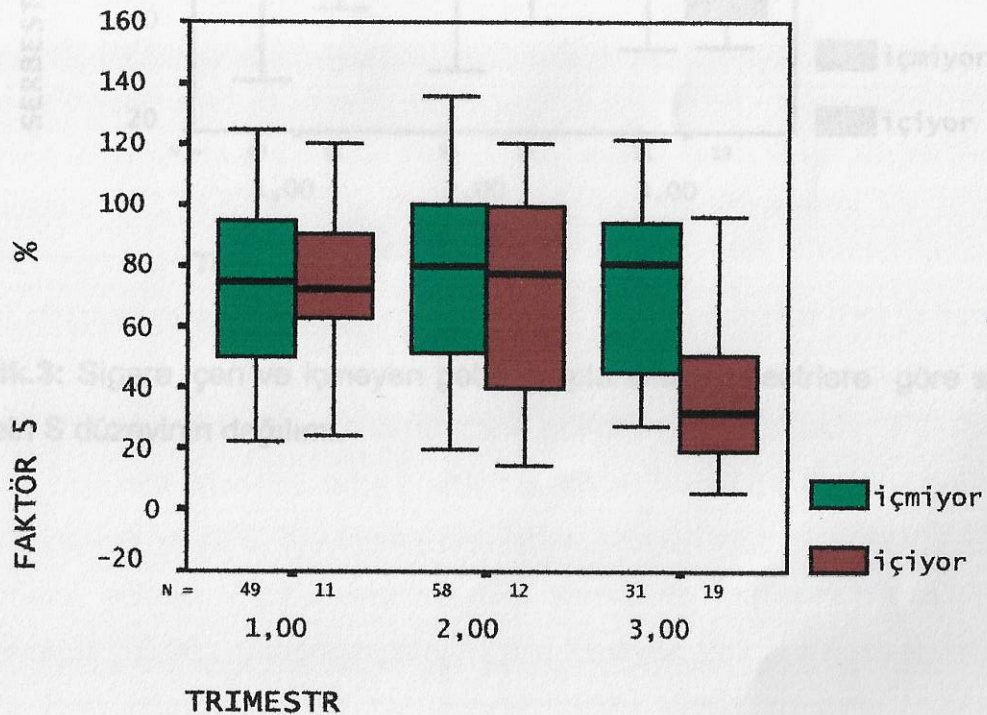
Sigara içen gebelerde, gebelik ilerledikçe APC sensitivite oranı giderek düşme eğilimi göstermektedir. Bu düşüş, trimestrlere karşılaştırıldığında I-III trimestrlere arasında, istatistiksel olarak da anlamlıdır ($p=0.045$).

Sigara içmeyen gebelerde ise, APC sensitivite oranının gebeliğin ilk trimestrine göre ilerleyen trimestrlere düşme eğiliminde olduğu ancak bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Gebeliğin ilerlemesiyle APC sensitivite oranında görülen düşme eğilimi mevcut literatür (87,90) ile uyumlu olmakla birlikte, sigara içen grupta izlenen istatistiksel olarak anlamlı, daha fazla düşüşün APCR'ye etkileyen koagülasyon faktörleriyle olan ilişkisi, her grupta ayrı ayrı incelendi. İki grup arasındaki fark; sadece, sigara içme ve trimester faktörü dışında, çalıştığımız koagülasyon parametreleri ile de ilişkisi araştırıldı.

Sigara içen gebe grubunda, çoklu lineer regresyon ile FV, FVIII, protein C ve serbest protein S'nin, APC sensitivite oranına aynı anda etkisi hesaplandı. Buna göre, sadece FV düzeyleri APC sensitivite oranını anlamlı düzeyde etkilemektedir [APC sensitivite oranı= $1.688+(0.003)(\text{FV düzeyi})$]; ($p=0.014$). FV düzeyindeki artış, APC sensitivite oranına da artış olarak yansımaktadır. Diğer parametrelerin (FVIII, protein C ve serbest protein S) etkisi, istatistiksel olarak anlamlı değildir.

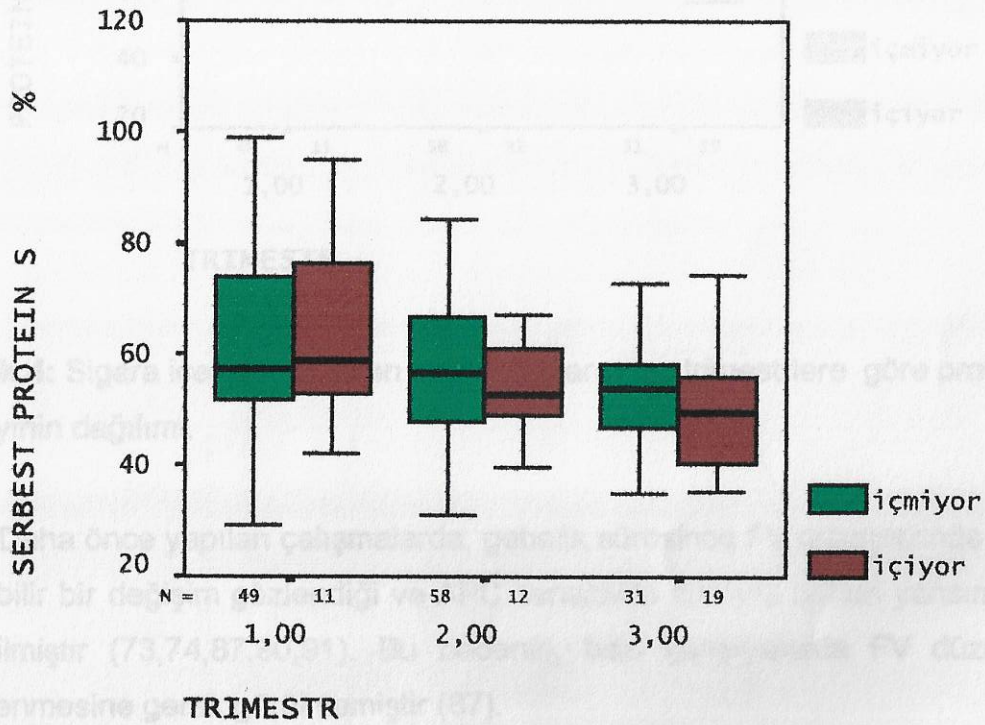
Çalışmamızda, sigara içen gebe grubunda FVIII düzeyleri, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, ilerleyen gebelik haftalarında düşüş göstermektedir. Bu bulgu, sigara içmeyen gebe grubumuzun verileri ile literatür verilerine uymamaktadır. Literatür verilerine göre FVIII düzeyleri, ilerleyen gebelik haftaları ile artış göstermekte ve APC sensitivite oranlarını azaltma yönünde etkilemektedir (73,90,93,94).

Sigara içen ve içmeyen gebelerde, trimestrlere göre FV, FVIII, protein C ve serbest protein S düzeylerinin dağılımı grafik.2-5'te gösterilmiştir.

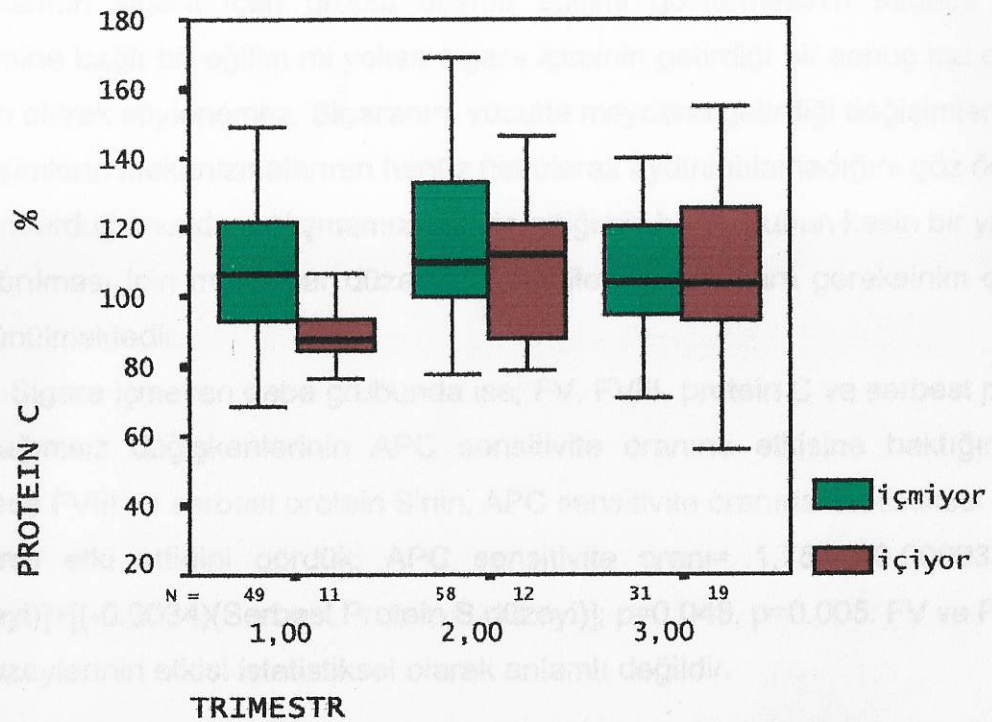


Grafik.2: Sigara içen ve içmeyen gebe gruplarında, trimestrlere göre FV düzeyinin dağılımı.

Serbest protein S düzeyleri, sigara içen grupta, gebelik ilerledikçe anlamlı ölçüde azalma göstermiştir. Protein C düzeyleri ise, farklı olarak II. trimestrde bir artış göstermiştir. Çalışmamızda, sigara içen bu grup içinde serbest protein S ve protein C'nin, APC sensitivite oranlarına anlamlı bir etkisinin olmadığı çoklu lineer regresyon ile gösterildi. Dolayısıyla verilerimiz, mevcut literatür ile çelişmemektedir (90,95).



Grafik.3: Sigara içen ve içmeyen gebe gruplarında, trimestrlere göre serbest protein S düzeyinin dağılımı.



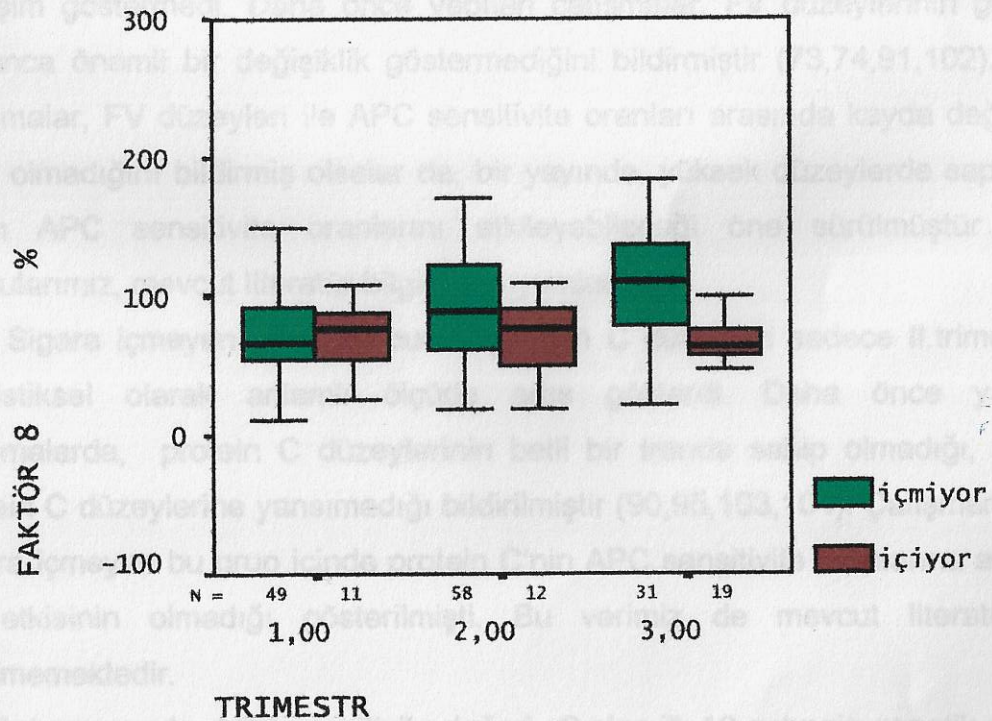
Grafik.4: Sigara içen ve içmeyen gebe gruplarında, trimestrlere göre protein C düzeyinin dağılımı.

Daha önce yapılan çalışmalarda, gebelik süresince FV düzeylerinde ihmal edilebilir bir değişim gözlemlendiği ve APC sensitivite oranına bunun yansımadağı bildirilmiştir (73,74,87,90,91). Bu nedenle, bazı çalışmalarda FV düzeyinin incelenmesine gerek görülmemiştir (87).

Çalışmamızda, sigara içen grupta, FV düzeyinin özellikle II ve III.trimestrde giderek düştüğü ve bunun istatistiksel olarak anlamlı ölçüde olduğu bulundu. Sigara içmeyen, normal gebelerin dahil edildiği bir çalışmada FV düzeyleri gebelik boyunca lineer bir artış göstermiş, ancak bu artışın fonksiyonel protein C düzeylerine ve APC sensitivite oranlarına yansımadağı bildirilmiştir (73). İki çalışmada, yüksek FV düzeylerinin APC sensitivite oranlarını etkileyebileceği bildirilmiştir (90,96). Çalışmamızda, sigara içmeyen grupla karşılaştırıldığında, sigara içen grupta izlenen FV düzeylerindeki düşüşün; aynı grupta APC sensitivite oranlarını da düşüreceği ilişkisi çoklu lineer regresyon analizi ile gösterildi. Ancak, yukarıdaki literatür bilgilerinden ve sigara içmeyen gebe grubumuzun bulgularından farklı olarak, FV düzeylerinin ve APC sensitivite

oranlarının sigara içen grupta düşme eğilimi göstermesinin sadece hasta seçimine bağlı bir eğilim mi yoksa sigara içiminin getirdiği bir sonuç mu olduğu kesin olarak söylenemez. Sigaranın, vücutta meydana getirdiği değişimler ve bu değişimlerin mekanizmalarının henüz net olarak aydınlatılamadığını göz önünde bulundurduğumuzda; çalışmamızda elde ettiğimiz bu bulgunun kesin bir yargıya ulaştırılması için moleküler düzeyde daha ileri çalışmalara gereksinim olduğu düşünülmektedir.

Sigara içmeyen gebe grubunda ise; FV, FVIII, protein C ve serbest protein S bağımsız değişkenlerinin APC sensitivite oranına etkisine baktığımızda; sadece FVIII ve serbest protein S'nin, APC sensitivite oranına istatistiksel olarak anlamlı etki ettiğini gördük: $APC\ sensitivite\ oranı = 1.750 + [(0.00093)(FVIII\ düzeyi)] + [(-0.0034)(Serbest\ Protein\ S\ düzeyi)]$; $p=0.048$, $p=0.005$. FV ve Protein C düzeylerinin etkisi istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Grafik.5: Sigara içen ve içmeyen gebe gruplarında, trimestrlere göre FVIII düzeyinin dağılımı.

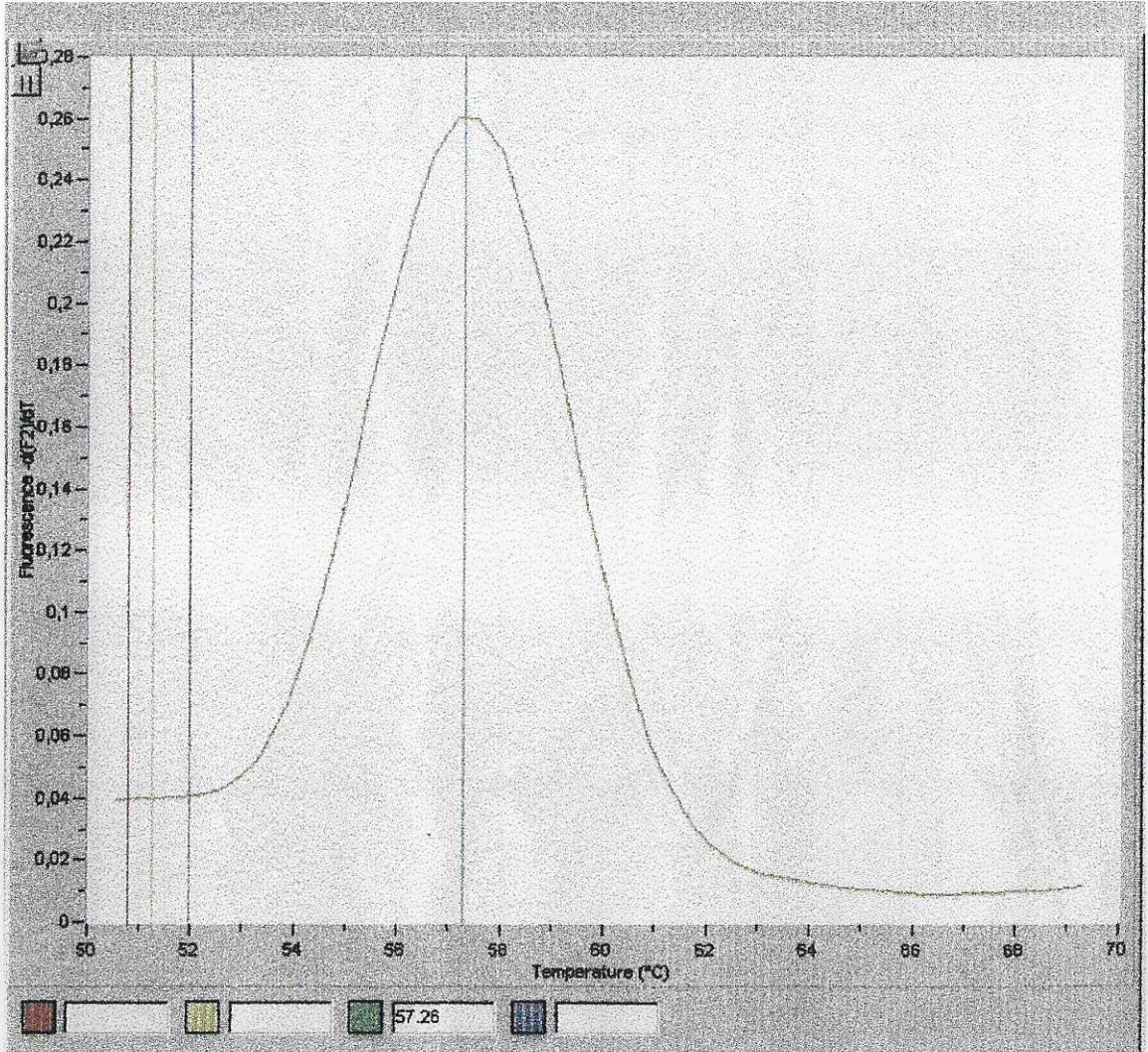
FVIII düzeyleri, normal gebelikte, trimestr ilerledikçe artma eğilimindedir; bu artış, pek çok çalışmada bildirilmiştir (73,90,93,94). Prokoagulan bir substrat olan FVIII arttıkça, aktive protein C'nin fonksiyonel antikoagulan aktivitesi azalmakta ve bu APC sensitivite oranında azalmayla sonuçlanmaktadır. Çalışmamızda da, sigara içmeyen gebe grubunda, mevcut literatür ile uyumlu bulgular elde edildi.

Serbest protein S düzeyleri, sigara içmeyen gebe grubunda da, gebelik ilerledikçe düşme eğilimi gösterdi. Bu düşüş, I-III. trimestrler arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir. Bu veriler literatür ile uyumludur (90,92,97-100). Serbest protein S, aktive protein C'nin kofaktörü olarak görev yapar. Serbest protein S düzeylerindeki düşüş, olasılıkla aktive protein C'nin enzimatik aktivitesini azaltmakta ve APC sensitivite oranında düşmeye neden olmaktadır. Bu bilgi, deneysel bir çalışmada da desteklenmiştir(101).

FV düzeyleri, sigara içmeyen gebe grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermedi. Daha önce yapılan çalışmalar, FV düzeylerinin gebelik boyunca önemli bir değişiklik göstermediğini bildirmiştir (73,74,91,102). Bazı çalışmalar, FV düzeyleri ile APC sensitivite oranları arasında kayda değer bir ilişki olmadığını bildirmiş olsalar da, bir yayında, yüksek düzeylerde saptanan FV'in APC sensitivite oranlarını etkileyebileceği öne sürülmüştür (96). Bulgularımız, mevcut literatür bilgisi ile uyumludur.

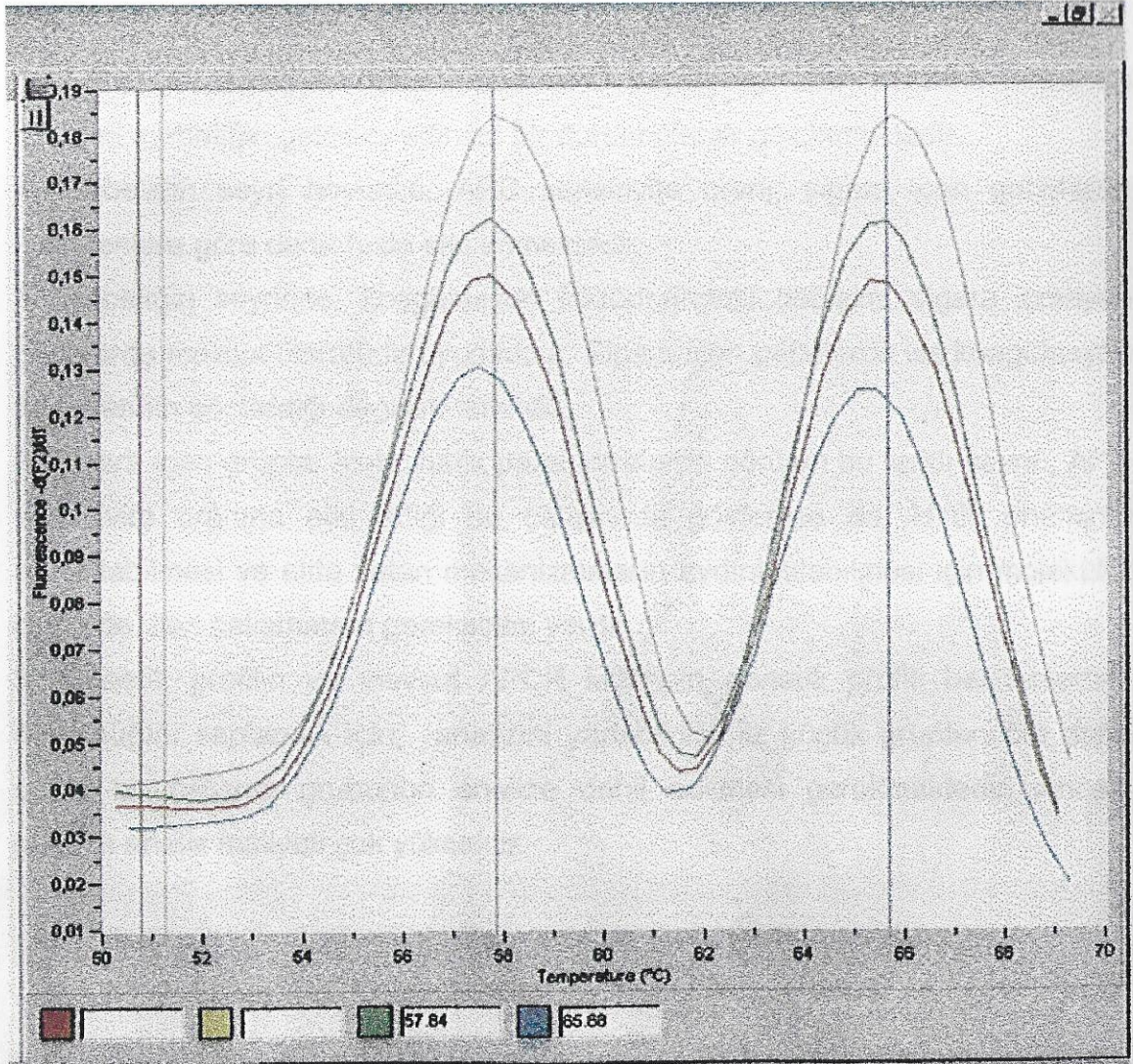
Sigara içmeyen gebe grubunda protein C düzeyleri sadece II.trimestrde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artış gösterdi. Daha önce yapılan çalışmalarda, protein C düzeylerinin belli bir trende sahip olmadığı, aktive protein C düzeylerine yansımadağı bildirilmiştir (90,95,103,104). Çalışmamızda, sigara içmeyen bu grup içinde protein C'nin APC sensitivite oranlarına anlamlı bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Bu verimiz de mevcut literatür ile çelişmemektedir.

Çalışmamızda, APC sensitivite değeri <2 olan ilk 18 gebenin genetik analizi yapıldı. Gebelerin 1'inde homozigot; 4'ünde heterozigot Faktör V Leiden mutasyonu saptandı. 13 Hastada mutasyona rastlanmadı.



Şekil 3: Genetik analizde homozigotluk saptanan hastanın grafiği (real time PCR).

Şekil 4: Genetik analizde heterozigotluk saptanan hastanın grafiği (real time PCR).



Şekil 4: Genetik analizde heterozigotluk saptanan 4 hastanın grafiği (real time PCR).

SONUÇ

1. Gebeliğin ilerleyen haftalarında APC sensitivite oranı azalmaktadır. Bu değişim, gebeliğin getirdiği edinsel bir durum olarak gözükmektedir.
2. Gebeliğin seyri boyunca, APC sensitivite oranı, sigara içen gebelerde içmeyenlere göre daha fazla etkilenmektedir.
3. Gebeliğin seyrinde, koagülasyon faktörlerindeki değişim, sigara içmeyen gebelerde mevcut literatürle uyumludur. Sigara içen gebelerde ise koagülasyon faktörlerinin gösterdiği değişim farklıdır.
4. Sigara içen grupta, hemostatik parametrelerde görülen bu farklı seyrin, APC sensitivite oranına etki ettiği bu çalışmada gösterilse de, klinik öneminin anlaşılabilmesi ve altta yatan mekanizmaların aydınlatılabilmesi için moleküler düzeyde, ileri çalışmalara gereksinim vardır.
5. Genetik profilin ve mevcut APCR kitlerinin genetik profili belirlemedeki duyarlılığını saptamak için, analizini yapabildiğimiz küçük gruptan öte daha geniş bir çalışma grubunun analize dahil edilmesi gerekmektedir. Ancak, genetik analiz maliyeti çok yüksektir.

KAYNAKLAR

- 1.Dahlback B, Carlsson M, Svensson P: Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: Prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Nati Acad Sci USA*, 90:1004,1993.
- 2.Seligsohn U, Libertsy A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med* 344:1222-1231, 2001.
- 3.Sevenson P, Dahlback B: Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med*. 330:517,1994.
- 4.Bertina M, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RS, de Ronde H, Vandervelden PA, Reistma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 369:64-7, 1994.
- 5.Goodnight SH, Griffin JH. Hereditary thrombophilia. In:Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, editors. *William's Hematology* Mc Graw Hill Co pp:1697-1714, 2001.
- 6.Greengard JS, Sun X, Xu X et al. Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. *Lancet* 343:1361-1367, 1994.
- 7.Gren D, Mailekel K, Sushko E et al. Activated-protein C in cancer patients. *Haemostasis*. 27:112-118, 1997.
- 8.Bozzo M, Carpani G, Leo L et al. HELLP syndrome and factor V Leiden. *Eur Jour Gynecol Repr Biol* 95:55-58, 2001.
- 9.Fernandez JA, Estelles A, Gilabert J, Espana F, Aznar J. Functional and immunologic protein S in normal pregnant women and in full-term newborns. *Thromb Haemostas*. 61: 474-478; 1989
- 10.Sundstrom S, Olsson M, Holmberg PA, Lecander I, Astedt B, Ranby M. Determination of PAI-1 activity in pregnancy plasma requires the use of single-chain tPA. *Fibrinolysis*. 2 (Suppl 1): 35; 1988.
- 11.Dahlback B. Physiological Anticoagulation, Resistance to APC and VTE. *Journal f Clinical Investigation*. 94: 923-927, 1994.
- 12.Majerus PW. Bad Blood by Mutation. *Nature*. 369: 14-15, 1994.

13. Graham JB, Barrow ES, Reisner HM, Edgel CS. The Genetics of Blood Coagulation. *Advances in Human Genetics*. 13: 1-18, 1983.
14. Guyton AC. *Textbook of Medical Physiology*, eighth ed, Philadelphia: W.B. Saunders, 1991.
15. Kane WH, Davie EW. Cloning of a cDNA Coding for Human Factor V, a Blood coagulation Factor Homologous to Factor VIII and Ceruloplasmin. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 83: 6800-6804, 1986.
16. Dahlback B, Zöller B, Sdotter BA, Frutos PG. Resistance to APC as an Additional Genetic Risk Factor in Hereditary Deficiency of Protein S. *Blood*. 85: 3518-3523, 1995.
17. Esmon CT. Regulatory Mechanisms in Hemostasis: Natural Anticoagulants. In: Hoffman R, Benz AJ Jr, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P. editors. *Hematology: Basic Principles and Practice* Churchill Livingstone Philadelphia. pp:1817-1824, 2001.
18. Broze G Jr, Warren LA, Novotny WF et al. The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: Insight into its possible mechanism of action. *Blood* 71:335-342, 1988.
19. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS et al. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10212-10217, 1996.
20. Dahlback B, Shen L. FV and Protein S as Synergistic Cofactors to APC in Degradation of FVIIIa. *The Journal of Biological Chemistry*. 269:18735-18738, 1994.
21. Dahlback B, Inherited Thrombophilia: Resistance to Activated Protein C as a Pathogenic Factor of VTE. *Blood*. 85: 607-614, 1995a.
22. Behrman RE, Kleigman R (editors). *Essentials of Pediatrics*, Philadelphia: W.B. Saunders, 1990.
23. Wilson JD, Brunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK (editors). *Principles of Internal Medicine*, 12 th edition. New York: McGraw-Hill, 1991
24. Donati MB. Pathogenesis of Thrombosis in Cancer. *Vessels*. 2: 4-8, 1996.

25. Behrman RE, Nelson WE, Vaughan VC, Kleigman R. Textbook of Pediatrics, 14 th edition, Philadelphia: W.B. Saunders, 1992.
26. Bertina RM, Reitsma PH, Rosendaal FR, Vandenbroucke JP. Resistance to APC and Factor V Leiden as Risk Factor for VT. *Thrombosis and Haemostasis*. 74:449-453, 1995.
27. Vandenbroucke JP, Koster T, Briet E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased Risk of Venous Thrombosis in Oral Contraceptive Users Who are Carriers of Factor V Leiden Mutation. *Lancet*. 344: 1453-1457, 1994.
28. Dahlback B. New Molecular Insights into the Genetics of Thrombophilia: Resistance to APC Caused by Arg 506 to Gln Mutation in Factor V as a Pathogenic Risk Factor for Venous Thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*. 74: 139-148, 1995b.
29. Gouault-Heilmann M, Leroy C, Levent M, Pignon JM, Mondenca C. The 1691G→A Mutation in the Factor V Gene: Relationship to Activated Protein C (APC) Resistance and Thrombosis in 65 Patients. *Thrombosis and Haemostasis*. 75: 4-10, 1996.
30. Amiral J, Martinoli JL. Laboratory Assay for Coagulation Protein C. *Thrombosis and Hemorrhagic Disease*. 125-131, 1985.
31. Ulutin O.N. Doğal İnhibitörler. *Hemostaz ve Tromboz*. 7-23, 1997.
32. Miyata T, Sakata T, Zheng YZ, Tsukamoto H, Umeyana H, Uchiyama S, Ikusaka M, Yoshioka A, Imanaka Y, Fijimura H, Kambayashi J, Kato H. Genetic characterisation of protein C deficiency in Japanese subjects using a rapid and nonradioactive method for single-strand conformational polymorphism analysis and a model building, *Thrombosis Haemostasis*. 76(3):302-11, 1996.
33. Miyata T, Zheng YZ, Sakata T, Kato H. Protein C Osaka with aberrant propeptide processing loss of anticoagulant activity due to an amino acid substitution in the protein C precursor. *Thrombosis Haemostasis*. 1003-1008, 1995.
34. Miyata T, Zheng YZ, Sakata T, Tsushima H, Kato H. Three missense mutations in the protein C heavy chain causing type I and type II protein C deficiency. *Thrombosis Haemostasis*. 71(I):32-37, 1994.

- 35.**Reitsma PH, Bernardi F, Doig RG, Gandrille S, Greengard JS, Ireland H, Krawczak M, Lin B, Long SR, Poort, SR, Saito H, Sala N, Witt L, Cooper DN. Protein C deficiency. A database of mutations, 1995 update. *Thrombosis Haemostasis*. 73(5):876-89, 1995.
- 36.**Couture P, Demers C, Morissette J, Delage R, Jomphe M, Couture L, Simard J. Type I protein C deficiency in french canadians: Evidence of a founder effect and association of specific protein C gene mutations with plasma protein C levels. *Thrombosis Haemostasis*. 80: 551-556, 1998.
- 37.**Lippincott WW. Principles of Haemostasis and Thrombosis. *Haematology*. 415-419, 1999
- 38.**Ireland H, Thompson E, Lane DA. Gene mutations in 21 unrelated cases of phenotypic heterozygous protein C deficiency and thrombosis. *Thrombosis Haemostasis*. 75(6):870-76, 1996.
- 39.**Soria JM, Berg LT, Fontcuberta J, Kakkar VV, Estivill X., Cooper DN, Sala N. Ectopic transcript analysis indicates that allelic exclusion is an important cause of type I protein C deficiency in patients with nonsense and frameshift mutations in the PROC gene. *Thrombosis Haemostasis*. 75(6):870-76, 1996.
- 40.**Marlar RA, Mastovich S. Hereditary protein C deficiency: A review of the genetics, clinical presentation, diagnosis and treatment. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 1:319-330, 1990.
- 41.**Davie EW, Reiner AP. Introduction to hemostasis and vitamin K-dependent coagulation factors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 3181-223, 1995.
- 42.**Kario K, Polchavel RK, Hoshide S, Shimada K, Matsuo M. Protein C gene polymorphism and hypertensive cerebrovascular disease in Japanese. *Thrombosis Haemostasis*. 79:1215-16, 1998.
- 43.**Zheng YZ, Sakata T, Matsusue T, Umeyama H, Kato H, Miyata T. Six missense mutations associated with type I and type II protein C deficiency and implications obtained from molecular modeling. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 5:687-95, 1994.

44. Millar DJ, Bevan D, Chitolie A, Reynaud M, Chisholm M, Kakkar VV, Cooper DN. Three novel mutations in the protein C (PROC) gene causing venous thrombosis. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 138-40, 1995.
45. İliçin G, Ünal S, Biberoğlu K, Akalın S, Süleymanlar G. Pıhtılaşma Bozuklukları. *Temel İç Hastalıkları*. 1350-70, 1996.
46. Doig RG, Begley CG, McGrath KM. Hereditary protein C deficiency associated with mutations in exon IX of the protein C gene. *Thrombosis Haemostasis*. 72(2):203-8, 1994.
47. Greenberg C, Orthner C. Blood coagulation and fibrinolysis In: Lee R, Lukens J, Greer J, Foerster J, Paraskevas F, Rodgers G, eds *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10 th ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 710, 1999.
48. Bick RL, Kaplan H. Syndromes of thrombosis and hypercoagulability. Congenital and acquired causes of thrombosis. *Medical Clinics of North America*. 82(3):409-33, 1998.
49. Bithell TC. Blood coagulation, In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, editörs. *Wintrobe's Clinical Haematology* 9th edition. Philadelphia: Lee & Febiger 1993 p:566-591, 1993.
50. Hallak M, Senderowicz J, Cassel A, Shapira C, Aghai E, Auslender H, Abramovici H. Activated protein C resistance (factor V Leiden) associated thrombosis in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 176:889-93, 1997.
51. Cooper ON, Krawezak M. Factor V and activated protein C resistance. *Venous thrombosis: From genes to clinical medicine*. 1997 BIOS Scientific Publishers Oxford. 119-136, 1997.
52. Kraus M. The anticoagulant potential of the protein C system in hereditary and acquired thrombophilia; pathomechanisms and new tools for assessing the clinical relevance. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 24(4), 1998.
53. Rossing J, Hemker CH, Tans G, Molecular biology and pathophysiology of APC resistance: current insights and clinical implications. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 24(4), 1998.
54. Walker ID. Thrombophilia in pregnancy. *Journal of Clinical Pathology*. 53(8):573-80, 2000.

55. Rosendaal FR. Venous thrombosis. A multicausal disease. *N Engl J Med* 353;Apr(3):1167-73, 1999.
56. Regan LM, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S et al. The endothelial protein C receptor: Inhibition of activated protein C anticoagulant function without modulation of reaction with proteinase inhibitors. *J Biol Chem* 271:17499-17456, 1996.
57. Esmon CT, Xu J, Gu JM et al. Endothelial protein C receptor. *Thromb Haemost* 82:251-257, 1999.
58. Kalafatis M, Bertina RM, Rand MD et al. Characterization of the molecular defect in factor V R506Q. *Biol Chem* 270:4053-4058, 1995.
59. Zöller B, Dahlback B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet* 343:1536-1538, 1994.
60. Guasch JF, Lensen RP, Bertina RM. Molecular characterization of a type I quantitative factor V deficiency in a thrombosis is "pseudo homozygous" for activated protein C resistance. *Thromb Haemost* 77:252-259, 1997.
61. Rosen S, Sturk A. Activated protein C resistance - A major risk factor for thrombosis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 35 (7): 501, 1997.
62. Dahlback B. Resistance to activated protein C caused by the R506Q mutation in the gene factor V is a common risk factor for venous thrombosis. *Journal of Internal Medicine* 242:1, 1997.
63. Sun X, Evatt B, Griffin J: Blood coagulation factor V_a abnormality associated with resistance to activated protein C in venous thrombophilia. *Blood* 83:3120, 1994.
64. Rosing J, Hemker C, Tans G. Molecular biology and pathophysiology of APC resistance: Current insights and clinical implications. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis*, 24:329, 1998.
65. Voorberg J, Roelse J, Koopman R. Büller H, Berends F, ten Cate J, Mertens K, von Mourik J. Association of idiopathic venous thromboembolism with single point-mutation at Arg⁵⁰⁶ of factor V. *Lancet* 343:1535, 1994.

- 66.Zöller B, Dahlback B: Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet*, 343: 1535, 1994.
- 67.Williamson D, Brown K, Luddington R, Baglin C, Baglin T. Factor V Cambridge: A new mutation (Arg³⁰⁶ →Thr) associated with resistance to activated protein C. *Blood*. 91:1140, 1998.
- 68.Franco R, Elion J, Tavella M, Santos S, Zago M. The prevalence of factor V Arg³⁰⁶→Thr (Factor V Cambridge) and factor V Arg³⁰⁶ →Gly mutations in different human populations. *Thromb Haemost*. 81:312, 1999.
- 69.Rosendaal F, Koster T, Vandenbroucke J, Reitsma P. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (Activated protein C resistance). *Blood*. 85:1504,1995.
- 70.Dekker G, de Vries P, Doelitzsch P, Huijgens P, von Blomberg B, Jakobs C, van Geijn H. Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 173: 1042, 1995.
- 71.Dizon D, Nelson L, Baston K, Ward K. The factor V Leiden mutation may predispose women to severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 175:902, 1996.
- 72.Cumming A, Tait R, Fildes S, Yoong A, Keeney S, Hay C. Development of resistance to activated protein C during pregnancy. *British Journal of Haematology*, 90: 725,1995.
- 73.Walker M, Garner P, Keely E, Rock G, Reis M. Changes in activated protein C resistance during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 177: 162,1997.
- 74.Mathonnet F, Mazancourt P, Bastenaire B, Morot M, Benettar N, Beufe S, Borg J, Guidicelli Y. Activated protein C sensitivity ratio in pregnant women at delivery. *British Journal of Haematology*. 92:244,1996.
- 75.Olivieri O, Friso S, Manzota F, Guella A, Bernardi F, Lunghi B, Girelli D, Azzini M, Brocco G, Russo C, Corrocher R. Resistance to activated protein C in healthy women taking oral contraceptives. *British Journal of Haematology*. 91:465,1995.

76. Rotmensch S, Liberati M, Mittelman M, Rafeal Z. Activated protein C resistance and adverse pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol.* 177: 170, 1997.
77. Lindqvist P, Svensson P, Marsal K, Grennert L, Luterkort M, Dahlback B. Activated protein C resistance (FV:Q⁵⁰⁶) and pregnancy. *Thromb Haemost.* 81:532, 1999.
78. Pompus M, Dekker G, Wolf W, Huijgens P, Koopman M, Blomberg M, Büller H. High prevalence of hemostatic abnormalities in women with a history severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 180:1146, 1999.
79. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet.* 346:1133-34, 1995.
80. Gül A, Özbek U, Öztürk C, İnanç M, Koniçe M, Özçelik T. Coagulation factor V gene mutation increases the risk of venous thrombosis in Behçet's disease. *Br J Rheumatology.* 35:1178-80, 1996.
81. Akar N, Akar E, Dalgın G, Sözüöz A, Ömürlü K, Cin Ş. Frequency of factor V (1691 G→A) mutation in Turkish population. *Thromb Haemost.* 78:1527-29, 1997.
82. Di Franza JR, Lew RA. Effect of maternal cigarette smoking on pregnancy complications and sudden infant death syndrome. *J Fam Pract.* 40:1-10, 1995.
83. Castles A, Adams EK, Melvin C, Kelsch K. Maternal outcomes affected by smoking during pregnancy. a meta-analysis. Draft Manuscript. Atlanta, Georgia: Centers for Disease Control, Division of Reproductive Health; January 1997.
84. Krohn M, Voight L, McKnight B, Dalin JR, Starzyk P, Benedetti TJ. Correlates of placental abruption. *Br J Obstet Gynaecol.* 94:333-40, 1987.
85. Rochat R, Koonin L, Atrash H and Jewett J. Mortality in the United States: Report from the maternal mortality collaborative. *Obstet Gynecol.* 72:91-7, 1988.
86. Vasse M, Leduc O, Borg JY, Chretien MH, Monconduit M. Resistance to activated protein C: Evaluation of three functional assays. *Thrombosis Research.* 76 (1): 47-59, 1994.

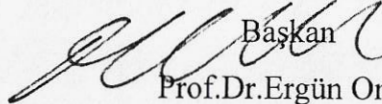
- 87.Kjellberg U, Andersson NE, Rosen S, Tengborn L, Hellgren M. APC resistance and other hemostatic variables during pregnancy and puerperium. *Thromb Haemost.* 81:527-31, 1999.
- 88.Spannagle M, Dick A, Assman A, Heineman L, Schramm W. Resistance to APC in women using oral contraceptives. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis*, 24(5):423-30,1998.
- 89.Ronde H de, Bertina RM. Laboratory diagnosis of APC resistance: A critical evaluation of test and the development of diagnostic criteria. *Thromb Haemost.* 72:880-86, 1994.
- 90.Clark P, Brennard J, Conkie A, McCall F, Greer A, Isobel D, Walker D. Activated protein C sensitivity, Protein C, Protein S and coagulation in normal pregnancy. *Thromb Haemost.* 79:1166-70, 1998.
- 91.Schilt A, Col-de Beys C, Moriau M, Lavenne-Pardonge E. Acquired activated protein C in pregnancy. *Thrombosis Research.* 84(3):203-206, 1996.
- 92.Cerneca F, Ricci G, Simeone R, Malisano M, Alberico S, Guaschino S. Coagulation and fibrinolysis changes in normal pregnancy. *Eur J of Obst Gynecol and Rep Biol.* 73: 31-36, 1997.
- 93.Cumming AM, Tait RC, Fildes S, Hay CR. Diagnosis of APC Resistance during pregnancy (letter). *Br J Haematol.* 92 (4): 1026-9, 1996.
- 94.Bokarewa MI, Wramsby M, Bremme K, Blomback M. Variability of the response to activated protein C during normal pregnancy. *Blood Coag Fibrinol.* 8: 239-44,1997.
- 95.Gatti L, Tenconi PM, Guarneri D et al. Hemostatic parameters and platelet activation by flow cytometry in normal pregnancy: A longitudinal study. *Int J Clin Lab Res.* 24 :217-9, 1994.
- 96.Freyburger G, Bilhou-Nabera C, Dief S et al. Technical and biological conditions influencing the functional APC resistance test. *Thromb Haemost.* 73 (3): 460-65, 1996.
- 97.Faught W, Garner P, Jones G, Ivey B. Changes in protein C and protein S levels in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 172(1pt1) :147-50, 1995.
- 98.Malm J, Laurell M, Dahlback B. Changes in the plasma levels of vitamin K-dependent protein C and S and of C4b-binding protein during pregnancy and oral contraception. *Br J Haematol* 68: 437-443, 1988.

- 99.**Gilabert J, Fernandez JA, Espana F, Aznar J. Estelles A. Physiological coagulation inhibitors (protein S, protein C and antithrombin III) in severe preeclamptic states and in users of oral contraceptives. *Thromb Res* 49: 319-329, 1988.
- 100.**Bremme K, Ostlund E, Almqvist I, Heinonen K, Blomback M. Enhanced thrombin generation and fibrinolytic activity in normal pregnancy and the puerperium. *Obstet Gynecol* 80: 132-137, 1992.
- 101.**De Ronde K, Bertina RM. Laboratory diagnosis of APC-resistance: A critical evaluation of the test and the development of diagnostic criteria. *Thromb Haemost.* 72:880-6, 1994.
- 102.**Colucci B, Ciavaralla N, Giliberti MG, Semeraro N. Resistance to activated protein C (APC): Influence of factor V levels (letter). *Thromb Haemost.* 72(6):987-8, 1994.
- 103.**Manucci PM, Vigano S, Botasso B et al. Protein C antigen during pregnancy, delivery and puerperium. *Thromb Haemost.* 52:217,1984.
- 104.**Gonzales R, Alberca I, Vicente V. Protein C levels in late pregnancy and in women on oral contraceptives. *Thromb Res.* 39:637-40, 1985.

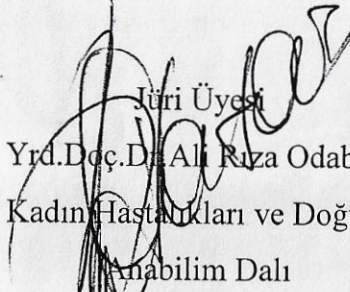
ADNAN MENDELER ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
KÜTÜPHANE VE DOKÜMANTASYON
DAİRE BAŞKANLIĞI

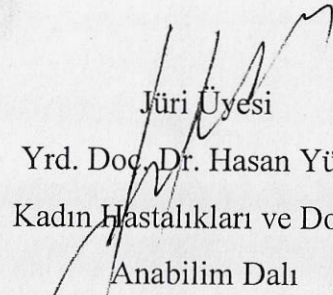
UZMANLIK TEZİ TUTANAĞI

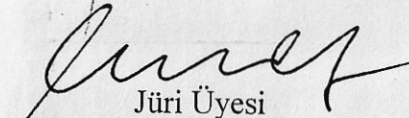
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalımız uzmanlık öğrencisi Dr. Üzeyir Kalkan'ın "Sigara İçen ve İçmeyen Gebelerde Aktive Protein C Rezistansının Karşılaştırılması" isimli tezi aşağıda isimleri yer alan jürimiz tarafından incelenerek başarılı bulunmuş ve kendisinin sınava alınmasına karar verilmiştir.

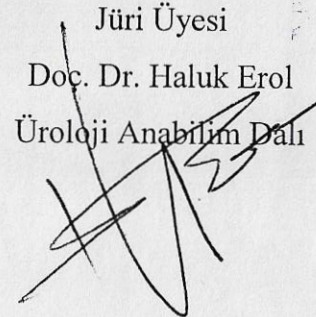

Başkan
Prof. Dr. Ergün Onur

Kadın Hastalıkları ve Doğum
Anabilim Dalı


Jüri Üyesi
Yrd. Doç. Dr. Ali Rıza Odabaşı
Kadın Hastalıkları ve Doğum
Anabilim Dalı


Jüri Üyesi
Yrd. Doç. Dr. Hasan Yüksel
Kadın Hastalıkları ve Doğum
Anabilim Dalı


Jüri Üyesi
Yrd. Doç. Dr. Samet Kafkas
Kadın Hastalıkları ve Doğum
Anabilim Dalı


Jüri Üyesi
Doç. Dr. Haluk Erol
Üroloji Anabilim Dalı

ADNAN MENDİLER
REKTÖRLÜĞÜ
KÜTÜPHANE VE DOKÜMANLAR
DAİRE BAŞKANLIĞI