



**T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**HEMOFİLİ A HASTALARINDA İNTRON 1 VE
FAKTÖR V LEİDEN MUTASYONLARININ
SAPTANMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Erkan KARAKURT

KAYSERİ – 2009



T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

HEMOFİLİ A HASTALARINDA İNTRON 1 VE
FAKTÖR V LEİDEN MUTASYONLARININ
SAPTANMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Erkan KARAKURT

Danışman
Prof. Dr. Türkan PATIROĞLU

KAYSERİ – 2009

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	III
KISALTMALAR	IV
TABLO LİSTESİ.....	V
ŞEKİL LİSTESİ.....	VI
ÖZET.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. KANIN PIHTILAŞMA MEKANİZMASI	3
2.2. TANIMI	6
2.3. KLİNİK BULGULAR	7
2.4. FAKTÖR VIII PROTEİNİ.....	9
2.4.1. Faktör VIII proteininin yapısı, işlevi, sekresyon ve aktivasyonu.....	10
2.4.2. Sekresyon ve aktivasyon	12
2.5. HEMOFİLİ GENETİĞİ.....	13
2.5.1. F VIII Geninin Yapısı	13
2.5.2. Hemofilide genetik Tanı	15
2.5.3. Hemofili A’ da Moleküler Patoloji ve Sorumlu Mutasyonlar	17
2.5.3.1. Nokta Mutasyonları	17
2.5.3.1.1. C p G Dinükleotid Mutasyonları	18
2.5.3.1.2. Missense Mutasyonlar.....	18
2.5.3.1.3. Nonsense mutasyonlar	19

2.5.3.2. Geniş Delesyonlar ve İnsersiyonlar	19
2.5.3.3. Küçük Delesyonlar ve İnsersiyonlar	20
2.5.3.4. Gen inversiyonları	20
2.5.3.4.1. İntron 22 İnversiyonu.....	20
2.5.3.4.2. Hemofili A’da İntron 1 İnversiyonu	22
2.6. FAKTÖR V LEİDEN MUTASYONU VE HEMOSTAZDAKİ YERİ	25
3. HASTALAR ve YÖNTEM.....	28
3.1. DNA İZOLASYONU	28
3.2. İNTRON 1h-1 İNVERSİYON YÖNTEMİ	29
3.3. İNTRON 1h-2 İNVERSİYON YÖNTEMİ	29
3.4. FAKTÖR V LEİDEN METOTU.....	30
4. BULGULAR.....	33
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇLAR	42
7. KAYNAKLAR	43
EKLER.....	51
KABUL ONAY	59

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarımın tüm aşamalarında değerli katkılarından dolayı tez danışmanım Prof. Dr. Türkan PATIROĞLU'na, çok değerli bilgi ve tecrübeleriyle bizlere örnek olup yetişmemizde emeği olan, ana bilim dalı başkanı Türkan PATIROĞLU nezdinde tüm hocalarıma en kalbi teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam esnasında genetik çalışmalarda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Munis DÜNDAR nezdinde Genetik Ana Bilim Dalı çalışanlarına, tezin laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen Ankara Üniversitesi Hemotoloji Bilimdalı Prof. Dr. Nejat AKAR'a, birlikte eğitim gördüğümüz asistan arkadaşlarıma, bugünlere gelmemde büyük emeği olan, desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen aileme, gerek asistanlığım boyunca gerekse tezimde desteğini esirgemeyen eşime ve çocuklarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Cenap Erkan KARAKURT

Kayseri–2009

KISALTMALAR

µl	: Mikrolitre
APC	: Aktive protein C
APCR	: Aktive protein C rezistansı
aPTT	: Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı
Arjinin®	: Arjinin rezidüsü (eklenti)
bp	: Baz çifti
Bv	: B domainin değişen kısmı
CEN	: Sentromer
DF/TF	: Doku faktörü
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
Domain	: Yapısal kısım
ER	: Endoplazmik Retikulum
F	: Faktör
FVIII-c	: Faktör VIII'in aktif parçası
FVIII-vWF	: Faktör VIII'in taşıyıcı stabilize kısmı
HMWK	: Yüksek molekül ağırlıklı kinonojen
kb	: Kilo baz
kD	: Kilo dalton
Mb	: Megabayt
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
PC	: Protein C
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Pl	: Platelet
Ps	: Protein s
PT	: Protrombin Zamanı
TEL	: Telomer
TFPI	: Doku faktör yolu inhibitörü
vWF	: Von Willebrand faktör

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Hemofili A hastalarının kliniği ile FVIII düzeyleri arasındaki ilişki.....	8
Tablo 2. Faktör VIII Domain yapısı ve özellikleri	11
Tablo 3. FVIII geni ve kod aldığı proteinin özellikleri	14
Tablo 4. F VIII geninin ekzon ve intronları baz uzunlukları.....	14
Tablo 5. Populasyonlardaki intron-1 inversion sıklığı.	24
Tablo 6. Birinci Reaksiyon için PCR içeriği (İntron 1h-1)	29
Tablo 7. İkinci Reaksiyon için PCR içeriği (İntron 1h-2).....	29
Tablo 8. FVL mutasyonu için PCR içeriği.....	31
Tablo 9. Homozigot doğal (wild), heterozigot ve homozigot mutant tip hastaların pik tm dereceleri	31
Tablo 10. Hemofili A hastalarının genel özellikleri ve İntron 1 inversiyon mutasyonu..	33
Tablo 11. Hemofili A hastalarının genel özellikleri ve FVL mutasyonu	34
Tablo 12. FVL mutasyonu saptanan hastalar ve hemofilik artropati	34
Ek Tablo 1. Hastaların fenotipik özellikleri.....	51
Ek Tablo 2. Hastaların fenotipik özellikleri (devam)	52
Ek Tablo 3. Hastaların Fenotipik özellikleri (devamı)	53
Ek Tablo 4. Hastaların fenotipik özellikleri (devam)	54
Ek Tablo 5. Hemofili A hastalarında F V leiden ve İntron 1 inversiyon mutasyonu sonuçları.....	55
Ek Tablo 6. PCR amplifikasyonunda kullanılan primer dizileri.....	56
Ek Tablo 7. PCR amplifikasyonunda kullanılan primer dizileri (Devamı)	57
Ek Tablo 8. Kimyasal maddeler ve enzimler.....	58

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Plazma serin proteazları ve vasküler endotelyal faktörlerin rol oynadığı koagülasyon kaskadı ve sınırlayıcı fibrinolitik sistem	4
Şekil 2. Pıhtılaşma yolunun şematik anlatımı.....	5
Şekil 3. DF/FVIIa ile başlayan yeni koagülasyon kaskadı	6
Şekil 4. Faktör VIII' in moleküler yapısı ve koagülasyon kaskadı	9
Şekil 5. Faktör VIII proteininin yapısı, sekresyonu ve inaktivasyonu.....	12
Şekil 6. Faktör VIII geninin yapısı	14
Şekil 7. X'e bağlı resesif geçiş gösteren Hemofili A kalıtımının gösterimi	15
Şekil 8. Faktör VIII' in yapısını gösteren ribbon (şerit) modeli	18
Şekil 9. FVIII yapısına göre hemofili A' nın missense mutasyon bölgeleri.....	19
Şekil 10. İnsan Faktör VIII geninin genomik organizasyonu.	21
Şekil 11. FVIII geninde intron 22 deki inversiyonun şematik görünümü.	21
Şekil 12. Kontrol ve intron 1 inversiyon mutasyonlu hastada (UKA 29) faktör VIII intron 1'in PCR amplifikasyonu.....	22
Şekil 13. Faktör VIII intron 1 diyagramı ve ileri sürülen inversiyon modeli	23
Şekil 14. FVIII int1h ile ilişkili inversion için PCR testi.	25
Şekil 15. Aktive PC ve antikoagülan mekanizma.....	27
Resim 1. Faktör VIII geninin 1. İntronundaki inversiyon tipi mutasyonun analizi.....	30
Resim 2. Real Time polimeraz zincir reaksiyonu ile FVL (G1691A) mutasyonu	32

HEMOFİLİ A HASTALARINDA İNTRON 1 VE FAKTÖR V LEİDEN MUTASYONLARININ SAPTANMASI

ÖZET

Amaç: Hemofili A hastalarında intron-1 inversiyon mutasyonunun saptanması ve trombofiliye yatkınlık sağlayan Faktör V Leiden (FVL/ G1691A) mutasyonu sıklığı ile bu mutasyonun hastaların klinik özelliklerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Hastalar ve Yöntem: Bu çalışmada, inhibitör negatif ortalama yaşları 3 yıl (2ay-14yaş) olan yedisi ağır 16'sı orta ve dokuzu hafif olmak üzere 32 hemofili A'lı hastanın plazma örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonu ile intron-1 h-1 ve intron 1 h-2 bölgeleri ve "Real Time" polimeraz zincir reaksiyonu ile FVL (G1691A) mutasyonu çalışıldı.

Bulgular: Hemofili A'lı 32 hastanın hiçbirinde intron-1 inversiyon mutasyonu saptanmadı. Hemofili A'lı 32 hastanın dördünde heterozigot FVL mutasyonu saptandı. Hiçbir hastada homozigot FVL mutasyonu saptanmadı. Ağır tip hemofili A olan yedi hastadan kardeş olan ikisinde, heterozigot FVL mutasyonu saptandı ve bu hastaların her ikisinde de hedef eklem oluşması nedeniyle radyonüklid sinovyektomi yapıldı. Hafif hemofili A fenotipine sahip dokuz hastanın ikisinde de heterozigot FVL mutasyonu saptandı. Bu hastaların yıllık kanama sayısı 1–2 arasında değişmekte idi. Heterozigot FVL mutasyonu saptanmayan hafif hemofili A hastaları ile FVL mutasyonu saptanan iki olgu arasında kanama sayısı ve ciddiyeti açısından fark bulunamadı. FVL mutasyonu tespit edilen ve edilmeyen hastaların hiçbirinde tromboz gözlenmedi.

Sonuç: İntron-1 inversiyonu hastalarımızın hiçbirinde saptanmamıştır. Bu nadir mutasyonun hastalarımızda saptanmamasının nedeni hasta sayımızın azlığı olabilir. Bu çalışmada ikisi ağır ikisi hafif hemofili A olan toplam dört hastada heterozigot FVL mutasyonu saptandı. Ancak hasta sayısının azlığından dolayı FVL mutasyonu ile kanama sayısı ve hemofilik artropati arasında anlamlı ilişki bulunamadı. Literatürde belirtilen FVL'in kanama üzerine olan koruyucu etkisini gösterebilmek için daha fazla veriye ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Hemofili A, FVIII gen yapısı, İntron 1 inversiyon mutasyonu, FV Leiden mutasyonu

INTRON 1 AND FACTOR V LEIDEN MUTATION IN PATIENTS WITH HEMOPHILIA-A

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to identify the intron 1 inversion mutation in the Hemophilia-A patients and to investigate the factor V Leiden (FVL/G1691A) mutation, and a possible relationship between this mutation and the clinical features of the patients.

Patients and method: In this study 32 (severe 7, moderate 16, mild 3) hemophilia-A patients without inhibitor were enrolled. The patients' ages varied from 2 months to 14 years (median age 3 years-old). Plasma samples were studied by polymerase chain reaction for intron 1 h-1 and intron 1 h-2; and real time polymerase chain reaction for FVL (G1691A)

Results: We did not identify intron 1 mutation in any of our patients. Heterozygote FVL was found in 4 patients. However, no homozygote was determined in any of the patients. Out of 7 patients with severe hemophilia A 2 patients, who were brothers, were determine to have heterozygote FVL, and these two patients both have radioisotope synovectomy for target joint. There was not any difference in bleeding number and its severity between patients with mild hemophilia A who were not found to have heterozygote FVL mutation and the FVL mutation two patients who were determined. We did not observe thrombosis in our patients with or without FVL mutation.

Conclusion: We did not determine intron 1 mutation. The absence of determining intron 1 mutation can be result of the small number of our patient. We also determined four heterozygote FVL mutations in (2 severe and 2 mild type) hemophilia-A patients. Because of the small number of the patients, no correlation between FVL mutations and bleeding number and hemophilic artropathy was detected. Further studies with large numbers of patients are necessary for confirming the protective effect of FVL mutations in hemophilia patients, which has been postulated by the medical literature.

Key words: Hemophilia A, factor VIII gene structure, Intron 1 inversion mutation, Factor V Leiden mutation.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hemofili A, kanın pıhtılaşma sisteminde yer alan faktör VIII'in kalıtsal olarak eksikliği, yokluğu veya işlevinin bozuk olması sonucu ortaya çıkan, X'e bağlı resesif geçiş gösteren, kronik komplike bir hastalıktır (1). Hastalık antik çağlardan beri bilinmektedir. Kraliyet mensuplarında görüldüğü için 'Kralların hastalığı' olarak da anılır. Hastalığın bilimsel ilk tanımı 936-1013 yılları arasında yaşayan Endülüslü bilgin Ebu-l Kasım Zehravi tarafından yapılmıştır. Güncel hemofili tanımı, 1920 yılında yapılmış ve 1937 de patogenezi açıklanmıştır. Hemofili sıklığı; 10.000 erkek doğumda 1 dir (2,3).

Her iki faktörü kodlayan genlerin X kromozomu üzerine haritalanması ve DNA dizisinin çıkarılması 1984/85 yıllarına rastlar. Özellikle FVIII' in büyük ve karmaşık genlerden biri olmasına rağmen haritalanması ve ekzon dizilerinin bilinmesi sayesinde bu genler moleküler patolojisi sıklıkla çalışılan ve DNA analizine dayalı tanı yöntemlerinin ilk uygulandığı genler arasındadır (4).

Tanımlanmış en büyük gen olan, F VIII geni içerisinde intron 22 inversiyonu başta olmak üzere şimdiye kadar 600'den fazla heterojen gen mutasyonu bildirilmiştir (5). Hastaların % 40'ında intron 22 içerisindeki inversiyona rastlanırken, % 30-35'inde nükleotid değişiminden oluşan noktasal mutasyonlara rastlanmaktadır. Hastaların % 5-10'unda küçük delesyonlar ve insersiyonlar tanımlanırken, hastaların az bir kısmında % 5 görülen gen delesyonları, ağır hemofili ve tedavi sonrası yüksek oranda inhibitör gelişmesiyle sonuçlanır (6). Bagnall ve arkadaşları (7) hastaların yaklaşık % 5'inde intron 22 inversiyonu dışında da inversiyon olduğunu bildirmişlerdir. İtron 1

içerisindeki bu inversiyon, Faktör VIII geninin 1. ekzonunu genden ayırmakta ve X kromozomunun telomer bölgesindeki C6.1A geninin yanına lokalize etmektedir.

Bu genlerin yeni analizleri, ilgili proteinlerin yapı ve işlev benzerliklerinin analizine, hemorajik ve tromboembolik bozukluk bulunan hastalarda fenotip ve genotip korelasyonlarının tanımlanmasına izin vermiştir.

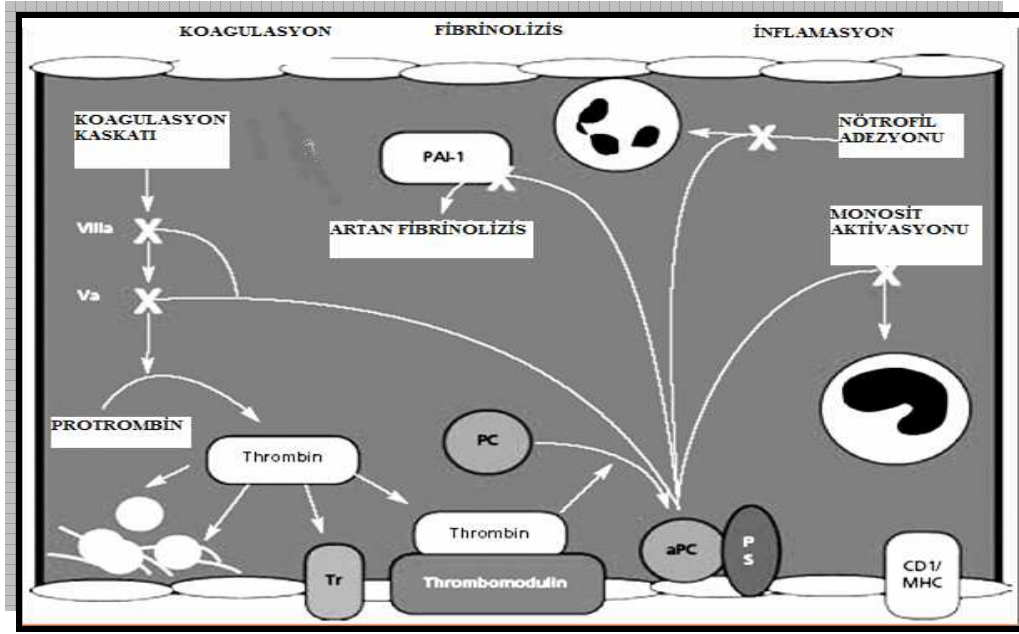
Bu çalışmada; Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji bilim dalında takip ve tedavi edilen hemofili A'lı hastalardaki FVIII geni int1h bölgesinde olabilecek mutasyonun polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle araştırılması ve eşlik eden diğer mutasyonlar açısından özellikle trombofiliye yatkınlığa yolaçan Faktör V leiden (FVL) mutasyonunun sıklığı ve hemofili A hastalarının kliniğine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANIN PIHTILAŞMA MEKANİZMASI

Klasik hemostatik mekanizma, vasküler cevap, trombosit adezyonu, pıhtı formasyonu, pıhtı stabilizasyonu, düzenleyici antikoagülanlar tarafından hasarlanan bölgeye pıhtının sınırlanması ve fibrinolizis vasıtasıyla vasküler açıklığın tekrar kurulması ve vasküler iyileşmeyi içerir (Şekil-1) (9).

Bu süreçte 100'den fazla plazma proteini görev alır. Plazma proteinlerinin çoğu bulunuş sıralarına göre Roma rakamı ile faktör (F) olarak adlandırılır. FXII, FXI, FX, FIX, FVII ve FII'yi kapsayan plazma glikoproteinleri, sindirim proteazları olan tripsin ve kemotripsinle yapısal benzerlik gösterirler. Her biri, bir ya da iki peptid bağının proteolizisinin sınırlanmasıyla inaktif formdan aktif forma çevrilir ve roma rakamından sonra 'a' ile gösterilir (10,11). Pıhtılaşma sistemindeki mekanizmalar, ilk kez 1964 yılında Macfarlane ve Davie ile Rattnof tarafından ortaya atılan şelale hipotezi ile açıklanmaya çalışılmıştır. Bu şemada bazı serin proteazların birbiri ardı sıra aktivasyonları sonucunda trombin oluşur ve fibrinojen fibrine dönüştürülür (12). Koagülasyon proteinleri ile birlikte membran yüzeyleri ve metal iyonları da sistem içinde önemli rol oynarlar (12,13).



Şekil 1. Plazma serin proteazları ve vasküler endotelial faktörlerin rol oynadığı koagülasyon kaskadı ve sınırlayıcı fibrinolitik sistem

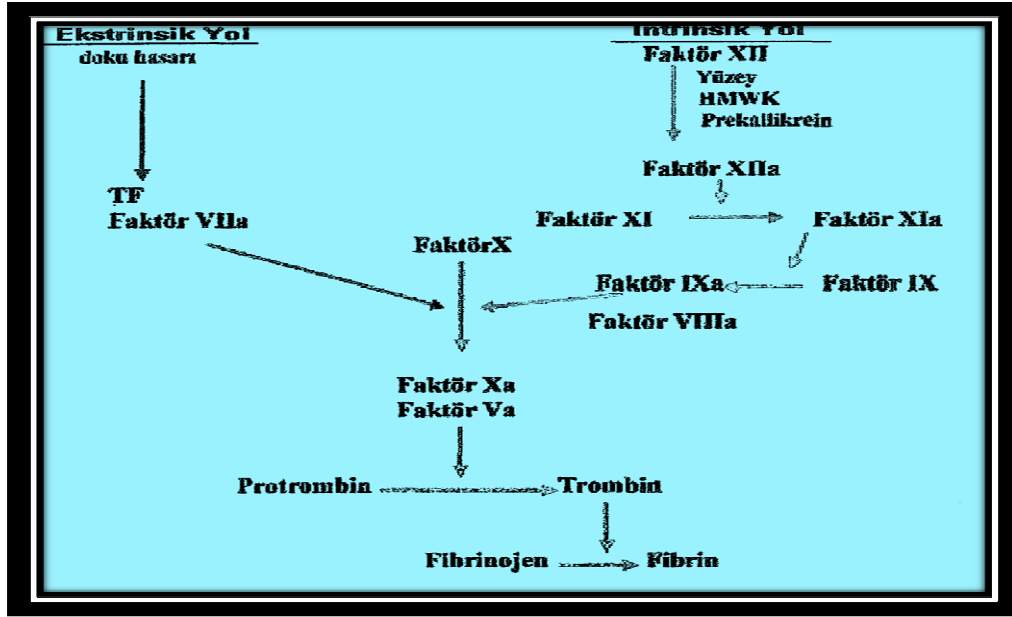
Kanın pıhtılaşması iki temel mekanizma ile gerçekleşir. İlki pıhtılaşmada yer alan tüm aktörlerin kanın kendi içinde yer aldığı intrinsik yol, diğeri de bir membran proteini olan doku faktörünün rol oynadığı ekstrinsik yoldur (14).

İntrinsik yol; kanın kendi içinde başlayan mekanizmalar sorumludur. Bu yoldaki F XII, F XI, F IX, FX ve F II aktive olduktan sonra proteolitik enzim görevi görürken, F V ve Faktör VIII sadece kofaktör görevi görür.

Ekstrinsik yol; damar duvarı ve etrafındaki dokunun hasarlanması sonucu açığa çıkan doku faktörü, kollajen ve mediatörlerin rol oynadığı kabul edilir. Eskiden bilinenin aksine bu iki yol birbirinden bağımsız olarak fonksiyon görmemektedir.

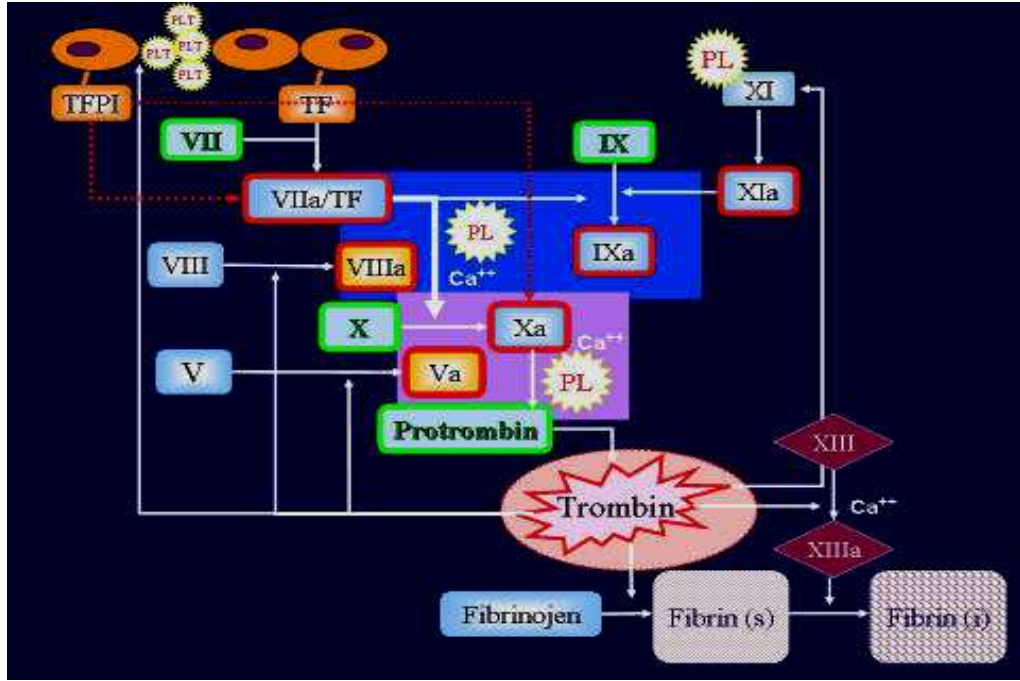
Koagülasyon olayı; Faktör XII' nin aktivasyonuna dayanır. Endotel zedelenmesi sonucu inaktif haldeki faktör XII aktif faktör XII a' ya dönüşür. Bundan sonra hızlı zincirleme reaksiyonlarla Faktör XI' in XI a' ya dönüşmesiyle devam eder. İntrensek yolda aktifleşmiş faktör IX a' nın daha sonra trombositlerin sağladığı fosfolipid yüzeyde Faktör VIII, PF3 ve kalsiyumun birleşmesiyle meydana gelen tenaz ara kompleksi ile Faktör X, X a' ya dönüştürülür. Doku hasarıyla aktive olan faktör VII a, IX. Faktörün IX a' ya dönüşümünü sağlar. Faktör VII a, IX a ve Ca kompleksi yine faktör X' u aktifleştirerek faktör X a' ya dönüştürürler. Bundan sonra gelişen reaksiyonlar zinciri

her iki yol için de aynıdır. Faktör X a, PF3 ve kalsiyumun ortamda bulunmasına faktör V' in de katılmasıyla meydana gelen protrombinaz kompleksi ile protrombin trombin' e dönüşür. Trombin fibrinojenin fibrin monomerlerine dönüşümünü sağlar. Bu kırılan fibrin monomerleri; Faktör XIII'ün aktifleşmesiyle, monomerler arası çapraz bağlantının sağlanması ve daha dayanıklı suda çözünmeyen fibrin'e dönüşmeyi sağlamaktadır (Şekil-2) (15).



Şekil 2. Pıhtılaşma yolunun şematik anlatımı

Son yıllarda, koagülasyonun FVIIa-DF kompleksi ile başladığı; ancak F IX ve FVIII' in hemostazın sağlanması için kesin gerekli olduğu yeni koagülasyon şeması ortaya çıkarılmıştır. F VII a-DF, FX'un güçlü bir aktivatörüdür ve fibrin pıhtısını oluşturmak için intrinsik yolu tamamen devre dışı bırakabilir (9). Bu şemada, doku faktör yolu inhibitörü (TFPI) geri besleme mekanizmasıyla invivo ortamda FVII a-DF kompleksini inhibe etmektedir (Şekil-3) (16,17).



Şekil 3. DF/FVIIa ile başlayan yeni koagülasyon kaskadı

Hemofili ve hemofili benzeri hastalıklar hemostaz sürecinde gerekli olan prokoagulan bir proteinin kanda eksikliği veya fonksiyon bozukluğu sonucu gelişen kalıtsal, kanamaya yatkınlıkla seyreden bir grup hastalıktır. Bu hastalıklar arasında hemofili, en sık rastlanan gurubu oluşturur. Diğer taraftan her iki yolu da etkileyen, pıhtılaşma kaskadının olmazsa olmazı olan FVIII'in yokluğu veya bozukluğu ciddi kanama diyatezi ile seyreder. Diğerlerinden daha sık görülmesi; belki çok karmaşık moleküler yapının değişik fragmanlardaki, etkilenme oranının yüksek olması, bir o kadar da pıhtılaşma sistemindeki her iki yolda da önemli rol oynaması sayılabilir.

2.2. HEMOFİLİNİN TANIMI

Bugünkü anlamda Hemofili 1920 yılında tanımlanmış ve 1937 yılında patogenezi ancak anlaşılmıştır. Faktör VIII eksikliği Hemofili A, Faktör IX eksikliği Hemofili B (Christmas hast.) olarak adlandırılır (18). Kanama ortak kliniği oluşturur. Hemofili hastalarının % 85' i hemofili A ve % 15'i hemofili B dir. Bununla ilgili tarihsel bilgiler eski Musevi yazıtlarına kadar dayanır (9,19).

Hemofili A, X'e bağlı resesif geçiş gösteren, F VIII eksikliğine bağlı yaşam boyu devam eden bir kanama bozukluğudur. Ancak hastalık vakaların % 20-25'inde de novo yani ebeveynlerde olmadan ve ilk defa o kişide ortaya çıkan mutasyonlar ile oluşur.

Hemofili tüm dünyada yaygındır ve değişik ırklarda sıklığı yaklaşık 10.000 erkek çocukta 1 dir. Taşıyıcı kadınların sıklığı hasta erkeklerin iki katıdır (9,20).

Hemofili A hastası olan bireyler kanın pıhtılaşmasında rol oynayan FVIII proteininin kanda ya normal düzeyinin altında olması ya da tamamen yok olmasından dolayı normal bireylerde görülenden daha uzun bir pıhtılaşma süresi göstermektedirler. Hemofili A'da fenotipik olarak, parsiyel tromboplastin zamanı (PTT) gibi tarama testleriyle tanı konur. Uzamış PTT, FVIII ve FIX' u içeren çeşitli faktörlerin koagülan aktivitesinde eksikliğin bir işaretidir. PTT'nın anormal olduğu her durumda, spesifik faktör testleri eksik faktörün saptanması için gereklidir. Bu bireylerde asıl sorun dış kanamalardan çok eklem yerlerinde, kaslarda ve yumuşak dokularda meydana gelen iç kanamalardır. Kan içerisindeki FVIII düzeyine göre üç değişik hemofili A tipi bulunmaktadır (21,22).

2.3. KLİNİK BULGULAR

Çocuklarda spontan veya çeşitli etkenler sonucu meydana gelen kanamaların sıklığı ve ihtiyaç duyulan faktör desteğine bağlı olarak hemofili ağır, orta veya hafif olarak belirlenir. Klinik bulguların şiddeti plazmadaki Faktör VIII düzeyleriyle doğrudan ilişkilidir (15).

A-Ağır tip hemofili; hastaneye başvuru sıklığı en fazla olan gruptur. Yaşamın erken dönemlerinde, tekrarlayıcı ve spontan kanamalar ortaya çıkar. Faktör VIII düzeyi % 1'in altındadır. Minör travmalar sonrası deri altında geniş kanamalar ve derin kas içi hematomları gelişebilir. Enjeksiyon ve sünnet sonrası aşırı kanamalar görülebilir. Hastaların % 90'nına 3-4 yaşlarında tanı konur.

B-Orta tip hemofili; nadiren spontan kanamalar görülür. Minör travmalardan sonra önemli ölçüde kanamalar görülür. Bir iki yaş arasında semptomlar başlar. Çocukluk döneminde tanı konulur. Faktör düzeyi % 1-5 arasındadır.

C-Hafif tip hemofili; ağır travma ve cerrahi girişim sonrası kanama olur. Diş eti ve burun kanamalarına eğilim vardır. Bu tip hemofili, adölesan çağa kadar tanı almayabilir. Faktör düzeyi % 5-25 arasındadır, Tablo 1'de özetlenmiştir (18, 23, 24).

Tablo 1. Hemofili A hastalarının kliniği ile FVIII düzeyleri arasındaki ilişki

Fenotipi	Faktör VIII düzeyi	Semptomlar	Tanı yaşı
Ağır tip	<%1	Sık spontan kanama; minör travma, cerrahi, ya da diş çekimi sonrası anormal kanama	Yaşamın ilk yılında
Orta tip	%1-5	Spontan kanama nadirdir; minör travma, cerrahi, yada diş çekimi sonrası anormal kanama	Ortalama 2-3 yaşlarında
Hafif tip	>%5-25	Spontan kanama yok; majör travma, cerrahi, yada diş çekimi sonrası anormal kanama	Sıklıkla hayatın ilerleyen dönemlerinde

Faktör VIII için hemostatik düzey 30-40 U/dl dir. Yenidoğanda Faktör VIII düzeyleri, doğum eyleminin ortaya çıkardığı akut faz cevabından dolayı, suni olarak yükselmiş olabilir. Bu durum özellikle normale yakın düzeyde faktörü olan hastalarda önemli olabilir. FVIII plasentayı geçemediğinden yenidoğan döneminde sefal hematoma, enjeksiyon yerinde kanama ve göbek kordonundan kanama görülebilir. Yeni doğanın hemorajik hastalığı düşünülen her hastada hemofili de akla gelmelidir. Hemofilinin ortalama tanı yaşı ağır tip için 9 ay, orta tip için 22 aydır. İlk başvuru semptomu % 30 vakada sünnet kanaması, % 1-2 vakada ise yenidoğan döneminde intrakranial kanamadır (9, 15, 25).

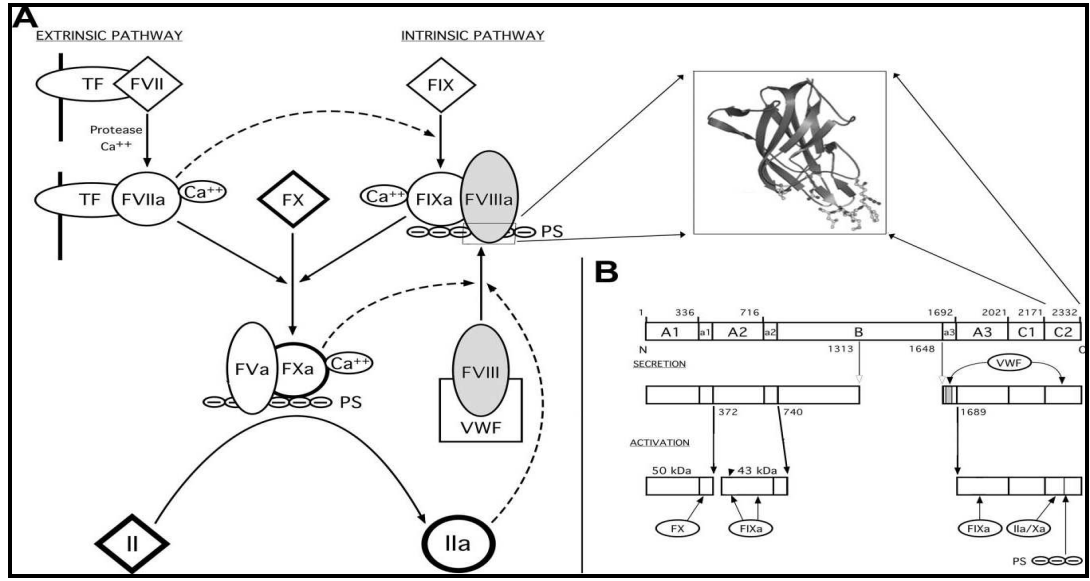
Hemofilili süt çocukları genellikle emekleme ve hareket kabiliyetini kazandığı 11-12'inci aylarda semptom verirler. Hemofilide en sık görülen kas-iskelet sistemi tutulumu eklem içine kanamalardır. Hemofili hastalarında tekrarlayan eklem içi kanamalar daha belirgin olarak faktör düzeyi %1'in altında olan ağır hemofilili

hastalarda gözlenir. En sık tutulan eklemler sırasıyla; diz, dirsek ve ayak bileğidir (26, 27).

Hemofilik artropati gelişimi multifaktöryel bir süreçtir. Bu sürecin bileşenleri synovia, kıkırdak, kemik, kan damarları ve kandır. Genetik yapının da etkisi olabileceği düşünülmektedir. Yakın zamana kadar tekrarlayan kanamaların eklem hasarı oluşturduğu düşünülürken, son zamanlarda invitro ve invivo çalışmalar, tekrarlayan kanamaların yanı sıra kısa süreli kanama sonrasında da kondrosit metabolizmasının bozulması sonrası kartilaj hasarının gelişebildiğini göstermiştir. Synovial hücrelerin hipertrofi ve hiperplazisi sonucu synovia kalınlaşır ve villus oluşturma eğilimi gözlenir. Bu hassas alanda, mikro travmalar sonrası kanamalar oluşur ve süreç tekrarlar. Eklem kavitesinin kan ile tekrarlayan karşılaşması sinovitis ve kartilaj yıkımı gibi iki ana problemi oluşturur. Aynı eklemden tekrarlayan kanamalar eklem kapsülünde kalınlaşma ve dejenerasyon, sonuçta eklem kontraktürüne yol açar. Bunların sonucunda da komşu kemik dokusunda osteoporoz ve kas güçsüzlüğü olur ve ankiloz gelişir (28-31). En sık ölüm sebebi intrakranial kanamalardır. Yeni doğan dönemi dışında özellikle orta ve ağır hemofilili çocuklarda kafa travması sonrası hayatı tehdit eden kanama görülebilir. Trakea çevresine masif kanamalar, akut solunum yetmezliğine yol açabilir. Gastrointestinal sistem kanamaları da hayatı tehdit edebilir (15, 32, 33).

2.4. FAKTÖR VIII PROTEİNİ

Küçük ve büyük moleküler yapıları iki farklı kısımdan oluşmaktadır. Büyük kısım VIII-vWF dolaşımdaki faktörü hidrolizden koruyarak daha uzun süre dolaşımda kalmasını sağlar. Hemofili A'da VIII-vWF göreceli olarak normal kaldığı halde, asıl pıhtılaşma kaskadında görev alan, küçük kısım VIII-c azalmıştır. Bunun doğal sonucu olarak, pıhtılaşma kaskadının başlangıç ortak yolundaki FX aktive olamamaktadır. Sonuçta travma ve kesiler de durdurulamayan kanamalara yol açmaktadır (Şekil-4) (34, 35).



Şekil 4. Faktör VIII' in moleküler yapısı ve koagülasyon kaskadı

2.4.1. Faktör VIII proteininin yapısı, işlevi, sekresyon ve aktivasyonu

Faktör VIII; 265 kD moleküler ağırlığa sahip geniş bir glikoproteindir. Enzimatik aktivitesi yoktur. Fakat FIX tarafından FX'un aktivasyonunda kofaktör olarak rol oynar. FVIII, Ca^{+2} ve yüzey fosfolipidleri varlığında tepkimenin hızını 10.000 kat artırır. En geniş ve en az kararlı koagülasyon faktörü olup, plazmada vWF ile nonkovalent kompleks halinde dolaşıma katılır. vWF, FVIII'i erken proteolitik yıkımdan korur. Yetişkinlerde yaklaşık 12 saatlik yarı ömre sahiptir. FVIII sentezinin temel bölgesi hepatositlerdir, ayrıca vücutta diğer birçok dokuda da sentezlenir. FVIII; 19 aminoasitlik bir sinyal peptid, 2351 aminoasitlik tek bir zincir öncüsü olarak sentezlenir ve disülfid bağı formasyonu, karbonhidrat zincir yapışması, proteolitik kesilmeler ve diğer modifikasyonları da içeren ko- ve post-translasyonel modifikasyonlara uğrar. Aminoasit dizisi, üç tekrarlı domain yapısı gösterir; A.B ve C sırasıyla A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2). Ağır zincir A1-A2-B domainlerden oluşurken, hafif zincir A3-C1-C2 domainlerden oluşur. Tablo-2'de özetlenmiştir.

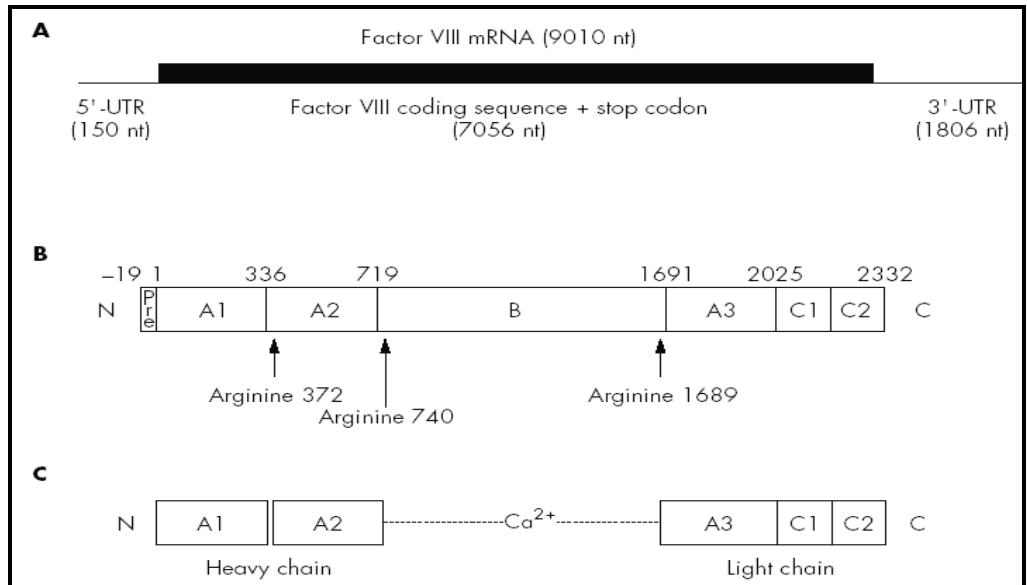
A1 (AA 1-329), A2 (380-711) ve A3 (AA 1649-2019) bölgeleri genin yaklaşık %30'unu kapsar. A2 ve A3 bölgeleri arasında yer alan ve N glikolizasyon kısımlarını içeren B bölgesinin bilinen bir fonksiyonu yoktur (35,36).

Tablo 2. Faktör VIII Domain yapısı ve özellikleri

F VIII Domainleri	Domain Uzunluğu	Görevi	Önemi
Domain A; FV ve Serüloplazminin A domainleriyle ortak domain yapısına sahiptir.	Yaklaşık 350 a.a	Ca ⁺² a bağlanır ve katalitik kofaktör aktivitesi için esansiyeldir.	FVIII a'da A2 domaini, A1 ve A3 ile ara yüzeyi boyunca meydana gelen mutasyonlar, aktif proteinin stabilitesini azaltarak hemofiliye neden olabilir.
Domain B; tek bir gen tarafından kodlanmıştır.	748-1648 a.a	Proteolitik aktivasyon sırasında kesilir.	Büyük bir kısmı(>700 aminoasit) silinse bile FVIII aktivitesinde değişiklik olmaz.
Domain C; FV ve Diskoidin I ile %20-30 benzerlik gösterir.	Yaklaşık 150 a.a	İzole C2'de trombin, FXa ve WF için önemli bağlanma bölgeleri içerir.	C1ve C2, FX aktivasyonunu kolaylaştırmak için FIX ve FX zimojenlerine de bağlanabilir.

2.4.2. Sekresyon ve aktivasyon

FVIII sentezi için temel bölge karaciğerdir. Sekresyonun başlangıç evresi, glikolizasyonun meydana geldiği endoplazmik retikulum (ER) lümenindeki olgun 2332 aminoasitlik polipeptidin translokasyonunu içerir. ER'mun içinde, FVIII çok sayıda şaperon proteinle etkileşimde bulunur. Bundan dolayı, FVIII proteinin önemli bir kısmı ER içinde tutularak, FVIII'in golgi aparatına taşınması sınırlandırılır. FVIII sekresyondan önce ve sonra proteolitik sürece yüksek derecede duyarlıdır ve dolaşan FVIII'in yalnız küçük bir fraksiyonu tek zincir şeklindedir. Proteinin çoğunluğu, a3-A3-C1-C2 domainlerini kapsayan C-terminal hafif zinciri (80kD) ve A1-a1-A2-a2-Bv (Bv: B domaininin değişir ölçüsü) domainlerini kapsayan N-terminal ağır zincirin (90-200 kD) heterodimeri olarak dolaşır. Bu iki zincir, ortada kalsiyum olacak biçimde non-kovalent olarak birleşir. Sekresyon üzerinde sinyal peptid uzaklaştırılır, tek zincir ağır ve hafif zinciri şekillendirmek için arjinin ® 1648'den sonra kesilir ve B domaini uzaklaştırılır (34,35). Aktif FVIII, hızlı olarak kofaktör işlevini kaybeden, kararlı olamayan bir moleküldür. Buna FVIII a heterodimerinden düşük çözünürlükteki A2 alt ünitesinin ayrılmasının neden olabileceği düşünülmektedir (Şekil-5), (35-37).



Şekil 5. Faktör VIII proteininin yapısı, sekresyonu ve inaktivasyonu

(A) Faktör VIII m RNA' sı

(B) Yeni sentezlenen faktör VIII proteini pre halindeyken +19 a.a ve matür haldeyken total 2332 a.a' i ve total 2351 a.a'i mevcut. Arjinin rezidülerinin C uçları trombinin proteolitik aktivitesini göstereceği yerlerdir.

(C) Aktive faktör VIII

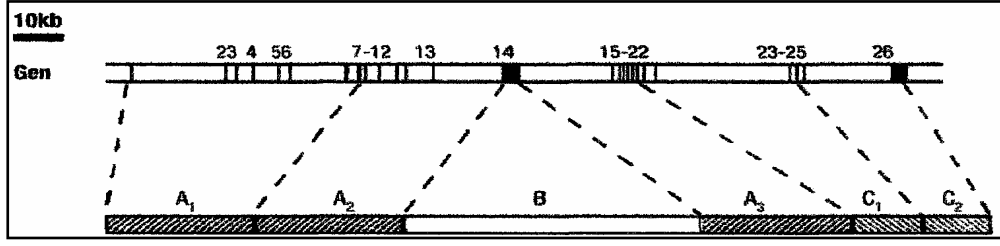
2.5. HEMOFİLİ GENETİĞİ

2.5.1. F VIII Geninin Yapısı

Yirmi altı ekzondan oluşan 186 kb lık büyük bir gen olup, X kromozomunun uzun kolu üzerinde, telomere 1Mb uzaklıkta, Xq28 pozisyonunda yer almaktadır ve X kromozomunun yaklaşık % 0. 1'ini temsil eder. FVIII proteini ve kod aldığı proteinin özellikleri (Tablo-3)'de verilmiştir. Yirmi altı ekzon içerisinde ekzon 14 (3106bp) ve ekzon 26 (1958bp) en büyük ekzonları oluşturmaktadır. Ekzon 14 bütün genin % 40'ını oluşturmaktadır. Diğer ekzonların büyüklüğü 69bp (ekzon5) ile 313bp (ekzon1) arasında değişmektedir. Ekzon ve intron büyüklükleri Tablo 4'de verilmiştir (20,38).

FVIII geninin ekzonları arasında yer alan intronların büyüklüğü ise 200bp (intron 17) ile 32.4kb (intron 22) arasında değişim göstermektedir. İntron 22, FVIII geni içerisindeki en büyük intron olmasının yanı sıra özel yapısıyla da önem taşımaktadır. Bu intron içerisinde FVIII A ve FVIII B adı verilen ve FVIII proteinin yapımından sorumlu olmayan iki küçük gen bulunmaktadır. FVIII A geni 837 bp büyüklüğünde olup FVIII genine ters yönde kodlarken FVIII B geni 651 bp büyüklüğünde olup FVIII geniyle aynı yönde kodlamaktadır. İki gen arasında bir CpG adası bulunmakta ve her iki gen içinde çift taraflı olarak promotor görevi yapmaktadır. FVIII A ve CpG adası birlikte yaklaşık 9.5 kb büyüklüğünde olup int22h olarak adlandırılmakta ve intron 22 içinde birden çok homolog kopyalar halinde görülmektedir (int22h-1, int22h-2, int22h-3) (39).

FVIII geni 6 değişik yapısal kısımdan (domain) oluşmaktadır. Bu yapısal farklılık gösteren kısımlar A₁,A₂,B,A₃,C₁ ve C₂ kısımlarıdır. A₁, A₂ ve A₃ kısımları kendi içerisinde C₁ ve C₂ kısımları ise kendi içerisinde homolog yapı göstermektedir (40). İnsan Faktör VIII geninin yapısı şekil-6'da gösterilmiştir.



Şekil 6. Faktör VIII geninin yapısı

Tablo 3. FVIII geni ve kod aldığı proteinin özellikleri

Protein	Kromozom	Ekzon	cDNA (bp)	mRNA (kb)	Olgun/Öncü Protein(ma)	MW (kD)	Plazma Kons. (mg/mL)	Yarı Ömrü
FVIII	Xq28	26	7053	9.0	2332/2351	265	0.1	8-12

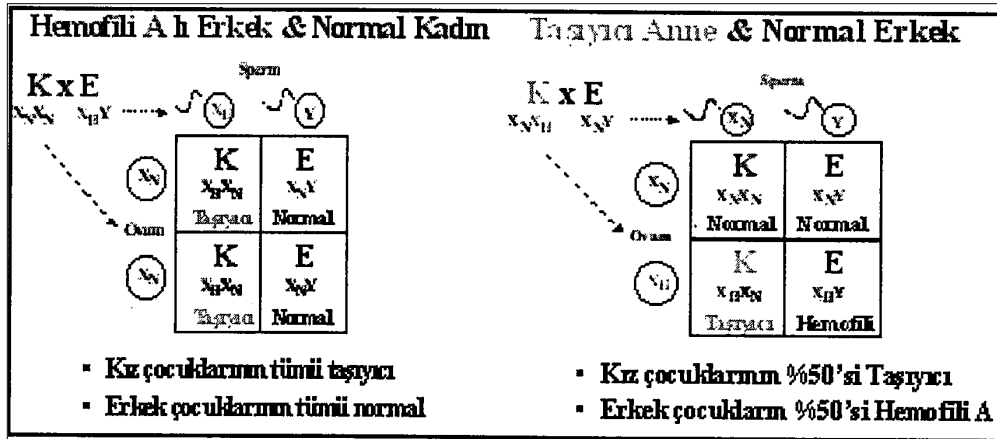
Tablo 4. F VIII geninin ekzon ve intronları baz uzunlukları

Ekzon	Uzunluk (bp)	İntron	Uzunluk (kb)
1	313	1	22.9
2	122	2	2.6
3	123	3	3.9
4	213	4	5.4
5	69	5	2.4
6	117	6	14.2
7	222	7	2.6
8	262	8	0.3
9	172	9	4.8
10	94	10	3.8
11	215	11	2.8
12	151	12	6.3
13	210	13	16.0
14	3106	14	22.7
15	154	15	1.3
16	213	16	0.3
17	229	17	0.2
18	183	18	1.8
19	117	19	0.6
20	72	20	1.6
21	86	21	3.4
22	156	22	32.4
23	145	23	1.4
24	149	24	1.0
25	177	25	22.4
26	1958		

2.5.2. Hemofilide genetik Tanı

Hemofili A, X'e bağı resesif geçiş gösterir ve genetik lokusu, X kromozomunun uzun kolunun terminal bölgesinde yer almaktadır. Her iki faktörü kodlayan genlerin X kromozomu üzerine haritalanması ve DNA dizisinin çıkarılması 1984/85 yıllarına rastlar. Özellikle FVIII'in büyük ve karmaşık genlerden biri olmasına rağmen haritalanması ve ekzon dizilerinin bilinmesi sayesinde bu genler moleküler patolojisi sıklıkla çalışılan ve DNA analizine dayalı tanı yöntemlerinin ilk uygulandığı genler arasındadır (4).

Hasta bir erkek, normal genotipe sahip kadınla evlense, bu ailenin tüm kız çocukları, babalarından aldıkları X kromozomuyla taşıyıcı olacaklardır. Yine erkek çocuklar anneden X kromozomu alacaklarından sağlıklı olacaklardır. Taşıyıcı bir kadın, sağlıklı bir erkekle evlenecek olursa, bu çiftin kız çocukları genotipik olarak % 50 normal, % 50 olasılıkla taşıyıcı olacaktır. Erkek çocukların % 50 si hasta, % 50 si ise sağlıklı olacaktır. Şekil-7'de Hemofili için olasılıklar özetlenmiştir. Taşıyıcı bir anne ile hemofilili bir babanın evlenmesi sonucu, çocuklarının % 50'si hemofili, % 25'i taşıyıcı ve % 25'i normal olacaktır (41).



Şekil 7. X'e bağı resesif geçiş gösteren Hemofili A kalıtımının gösterimi

Hemofilinin dişilerde görülmesi X inaktivasyonuna veya nadiren hem anneden hem babadan iki defektif X allelin kalıtılmasına bağlıdır. Hastalığın genotipi FVIII geninde meydana gelen mutasyonların saptanması ile belirlenir. Olguların % 20-25'i yeni mutasyonlardır (de novo), yani ebeveynlerde olmayan ve ilk defa kişinin kendisinde başlayan mutasyonlardır. Bu durumda mutasyon annenin gametlerinden birinde oluşmuştur. Ailede bir tek hasta birey vardır ve anne taşıyıcı değildir. Ailesel geçişli

hemofilide ise hastalık ailede birden çok bireyde görülür ve hastanın annesi taşıyıcı durumdadır (42).

Hastaların yaklaşık % 15-25' inde FVIII aktivitesini düşüren antikorlar oluşur. Ancak inhibitörlerin oluşumu sadece mutasyon tipine değil aynı zamanda MHC antijenlerine de bağlıdır. FVIII' in A2, A3 ve C2 bölgesindeki epitoplara antikor oluşumunda önemlidir. İnhibitor oluşumu replasman tedavisinde olduğu kadar gen tedavisi protokolleri için de önemli bir sorun oluşturur (43,44). Bin dokuz yüz seksen dört yılından bu yana yaklaşık 2500 hemofili A hastasında hemofilinin moleküler temeli gen yapısı düzeyinde incelenmiştir ve mutasyonlar sürekli güncellenen bir veritabanında tutulmaktadır (<http://europium.mrc.rpms.ac.uk>). Hemofili A veritabanında 821 hasta girişi vardır. Bunlardan 44'ü Türk hastalarında saptanan mutasyonlardır (4).

Hemofilide moleküler genetik tanı özellikle sporadik vakalarda, yani ailede tek hasta birey varsa, ilgili gendeki mutasyonun saptanması daha öncelikli olmalıdır. Hastalığa sebep olan mutasyon tanımlandığında aile içinde olası taşıyıcıların kesin olarak belirlenmesi ve doğum öncesi tanı kesin olmaktadır. Bunun için dikkat edilmesi gereken en önemli konu, olası taşıyıcıların taşıyıcılık testini hamile olmadan yaptırmış olmalarıdır. Çünkü mutasyon tarama testinin zaman açısından hamilelik dönemi içinde yapılması uygun olmamaktadır. Taşıyıcıların belirlenmesi ve doğum öncesi tanı amaçlı hemofili genetik analizi ayrıca, gen içinde veya yakınında bulunan DNA dizi polimorfizimlerinin kullanılmasına da dayandırılabilir (8). Bir markırın tanıda kullanılabilmesi için aile ağacında o markır için heterozigot bir hasta annesinin bulunması şarttır. Bu durumda anne informatiftir ve bağlantı analizine dayalı genetik tanı yapılabilir. Ailede tek hasta varsa DNA polimorfizimleri ile taşıyıcıların saptanması çok kesin değildir. Bu durumda DNA bağlantı analizi ile annenin taşıyıcı olmadığı söylenebilir ama taşıyıcı olduğu veya erkek bir fetüsün hasta olacağı söylenemez. Bir hemofili hastasının mutasyonunun bilinmesi; i) ailesindeki taşıyıcıların belirlenebilmesi ve doğum öncesi tanı yapılabilmesi için, ii) ileride inhibitör oluşumu hakkında bilgi verebileceği için tedavi stratejisinin saptanması açısından, iii) ileride geliştirilebilecek gen tedavisi yöntemlerinin uygulanabilmesi için büyük önem taşımaktadır (4,36, 45).

Hastalığa yol açan mutasyonun saptanabildiği durumda taşıyıcı ve doğum öncesi tanı kesinlik kazanır. İnversiyon mutasyonlarının analizi ağır hemofilide % 40 kesin tanı olanağı sağlamaktadır.

Sonuç olarak DNA bağlantı analizi kullanılarak test edilen kadınların % 95'ine tanı verilebilmektedir. DNA eldesi için fetal örnekler 10-14. haftada koryonik villus biyopsisi veya 10-20. haftalar arasında amniyosentez ile yapılmaktadır.

2.5.3. Hemofili A' da Moleküler Patoloji ve Sorumlu Mutasyonlar

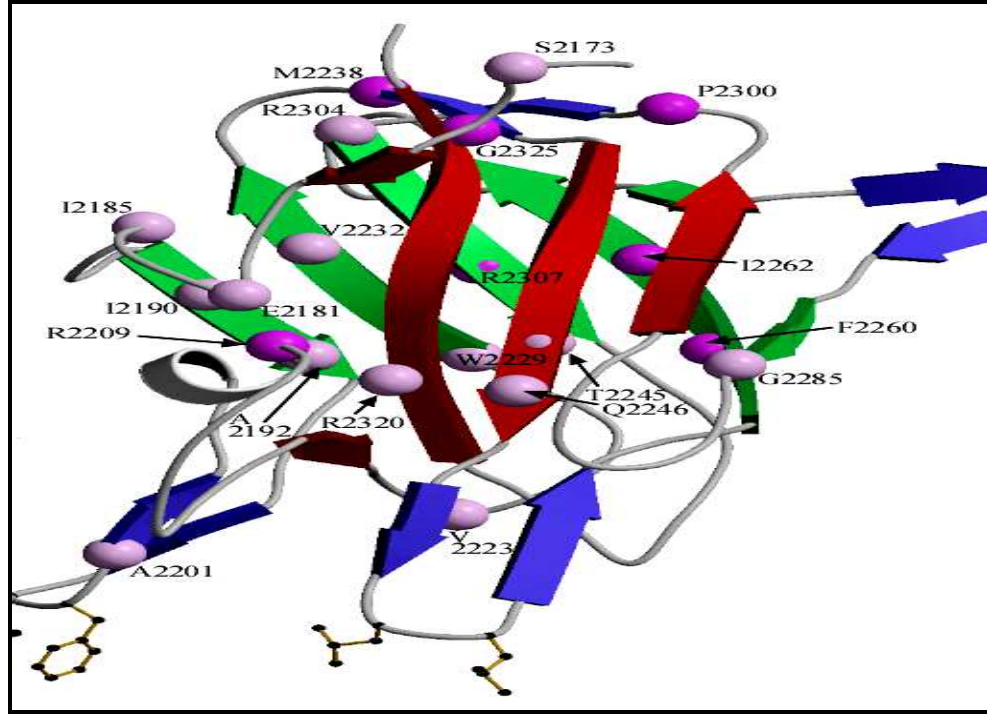
F VIII geni oldukça büyük heterojen bir gendir ve çok sayıda mutasyon bildirilmiştir. Hemofili A'ya yol açan, kandaki faktör VIII düzeylerinin düşmesiyle ilgili mutasyonlar oldukça zengin çeşitliliğe sahiptir. Hastaların % 40'ında intron 22 içerisindeki inversiyona rastlanırken, % 30-35' inde nükleotid değişimlerinden oluşan nokta mutasyonlarına rastlanmaktadır. Hastaların % 5-10'unda küçük delesyonlar ve insersiyonlar tanımlanırken % 5'inde büyük delesyonlar tanımlanmaktadır. Faktör VIII geni içerisinde meydana gelen delesyon, insersiyon ve stop kodonuna neden olan nonsens mutasyonlar gerek aminoasit kodlanması sırasındaki değişimlerle gerekse kodlanmanın sona erdirilmesiyle, FVIII proteinin prematür kalmasına yol açmaktadır. Bu mutasyonlar dışında, FVIII geni içerisinde kodlama yapmayan bölgeler (intronlar) içerisinde de polimorfizimler saptanmıştır (20,21).

2.5.3.1. Nokta Mutasyonları

Hemofili mutasyon veritabanında 821 hastada en az 553 nükleotid değişimi rapor edilmektedir. Bunlardan 44'ü kırpılma bölgesi, 75'i anlamsız ve 434'ü yanlış anlamlı mutasyonlardır. Nonsens mutasyon taşıyan hastaların ikisi hariç hepsinde ağır fenotip görülmektedir. Yaklaşık % 45'inde inhibitör oluşumu vardır. Kırpılma bölgesinde mutasyon taşıyan hastaların hiç birinde inhibitör oluşumuna rastlanmazken, bu oran yanlış anlamlı mutasyon taşıyan hastalarda % 2 dir. Yanlış anlamlı mutasyon taşıyan hastaların yaklaşık yarısında hafif ve orta şiddette hemofili görülür. Büyük olasılıkla bu hastalarda FVIII proteini normal miktardadır, ancak değişik işlevsel bozuklukları vardır.

Nokta mutasyonlarının % 45'i, 69 CpG dinükleotidinin olduğu yerde oluşan C >T transisyonlarıdır. Başka birçok gende olduğu gibi FVIII geninde de CG dinükleotidleri mutasyon "hot spot"larını oluşturur. Nokta mutasyonlar erkek gametlerde 5-10 kat fazla görülmesine rağmen delesyonlar dişi gametlerde 5 kat fazla görülür. Ortalama erkek / dişi mutasyon oranı 3. 6 dır. Türk hastalardaki hemofili A mutasyon profili, veritabanı ile karşılaştırıldığında nokta mutasyonlarının daha yüksek, büyük delesyonların ise daha

düşük olduğu görülmektedir (20,45). Hemofilili bir hastada FVIII proteinini ve mutasyon bölgelerini gösteren şerit model Şekil-8’de gösterilmiştir.



Şekil 8. Faktör VIII’ in yapısını gösteren ribbon (şerit) modeli

Koyu mor sferler pıhtılaşma faktörünün ciddi mutasyon bölgesini belirtir. (Resim orjinal olarak Fred Hutchinson Kanser Araştırma Merkezinden yayınlanmıştır.)

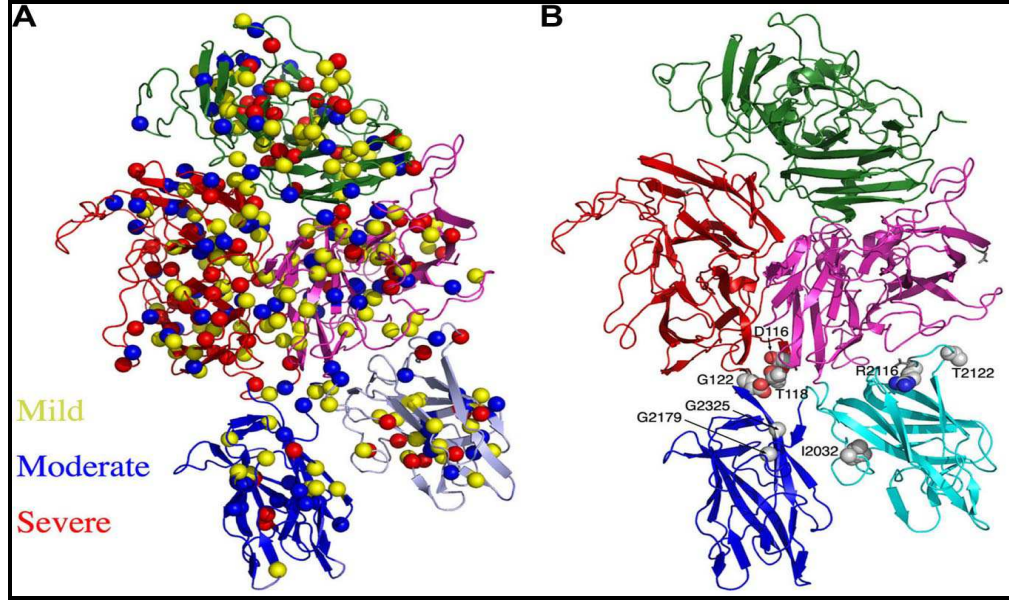
2.5.3.1.1. C p G Dinükleotid Mutasyonları

Bu CG dinükleotidleri, genel sıcak nokta olarak bilinir ve mutasyonlar memeli DNA’sında 5’CG rezidüsünün tek metilasyon bölgesi olması nedeniyle meydana gelir. Bu sitozinler, 5-metil sitozin üretmek için bir metil transferaz tarafından metillenir. 5-metil sitozin non enzimatik bir tepkimede deamine olduğunda timin üretilir. Kaydedilmiş CG TG ya da CG CA değişimi, FVIII geninde tanımlanan nokta mutasyonlarının % 38’inden sorumludur (46).

2.5.3.1.2. Missense Mutasyonlar

Missense mutasyonlar, Hemofili A’dan en fazla sorumlu olan mutasyon tipidir. Bu mutasyonlar, aminoasit değişimine yol açan nükleotid değişimleridir. Bu nükleotid değişimleri, B domainini kodlayan ve missense mutasyondan yoksun ekzon 14 dışında, FVIII geninin başından sonuna yayılmıştır. Missense mutasyonların çoğunda antijen

seviyesi, FVIII aktivitesiyle orantılı olarak çok düşüktür. Hastalığın ağırlığı mutasyonun tipine ve yerleşimine bağlıdır (Şekil-9), (47,48).



Şekil 9. FVIII yapısına göre hemofili A' nın Missense mutasyon bölgeleri.

(A) Hemofili A fenotipi; “hafif”, “orta” ve “ağır” semptom belirtileri sırasıyla, % 6 ila % 30, %1 ila % 5 ve % 1’den daha az plasma FVIIIa aktivite düzeyleriyle koreledir. (B) C domainsi diğer her iki parçası C1, C2 ile birlikte ve A3 domainine karşılık gelen yüzeyler arasında mutasyonların varlığı gösterilmektedir.

2.5.3.1.3. Nonsense mutasyonlar

Kırk sekiz farklı kodondaki 115 nonsense mutasyon bu hastalıktaki toplam nokta mutasyonlarının yaklaşık % 20’sinden sorumludur. Genellikle Arjinin eklenti noktasına etki etmektedir. Bu hastaların tamamına yakınının ağır tip hemofili A’ya sahip oldukları rapor edilmiştir (49).

2.5.3.2. Geniş Delesyonlar ve İnsersiyonlar

Geniş delesyonlar, hemofili A’daki karakterize mutasyonların % 5-10’undan sorumludur. Delesyonlar genellikle FVIII aktivitesi hiç olmayan ağır hemofili A ile sonuçlanır. FVIII delesyonu olan hastaların yaklaşık % 38’inde inhibitor oluşumuna rastlanmaktadır (50). FVIII geninde, 200 bp’den büyük 105 geniş delesyon tanımlanmıştır. Bunlardan hiç biri birbirinin tekrarı değildir, dolayısıyla FVIII geninin herhangi bir bölgesinin delesyon ve insersiyonlara hassas olmadığı görülmektedir (20).

Sommer ve arkadaşları FVIII geninin Alu'ca zengin doğası olduğunu rapor etmişlerdir. Bu güne kadar yalnız 3 geniş insersiyon mutasyonu rapor edilmiştir. Kazazian ve arkadaşları L-1 elementinin insersiyonunu, Sukarova ve arkadaşları bir Alu tekrarının insersiyonunu rapor etmişlerdir (51,52).

2.5.3.3. Küçük Delesyonlar ve İnsersiyonlar

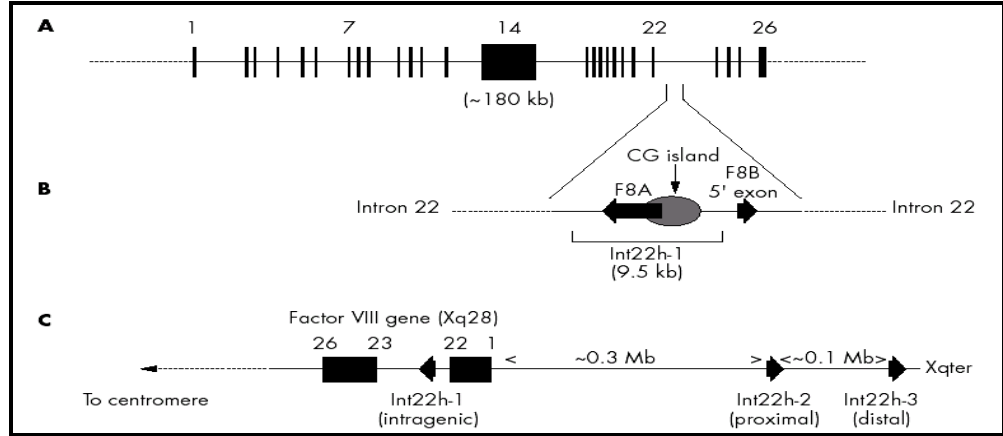
Küçük delesyonlar ve insersiyonlar, 200 bp' den aşağı büyüklüklerle tanımlanırlar. Ağır hemofili A fenotipine sahiptirler. Yaklaşık olarak 1-150 bp arasında değişen 59 insersiyon ve 143 delesyon kaydedilmiştir (51). Bunlardaki bir tek nükleotid, predominant olarak eklenmiş ya da silinmiştir. En az 64 farklı küçük delesyon rapor edilmiştir. Bunların çoğu kodon kaymasına sebep olduğu için translasyonun erken sonlanmasına neden olmaktadır. Bunlarda inhibitiör gelişimi 7 kat daha az görülür (20,50).

2.5.3.4. Gen inversiyonları

Bugüne kadar FVIII genini etkileyen iki farklı intrakromozomal inversiyon tanımlanmıştır. İntron dizilerinde ve faktör VIII geninin yukarı bölgelerinde bulunan ters yönde dizi tekrarları arasında oluşan kromozom içi rekombinasyonlar iki büyük inversiyon mutasyonundan sorumludur (53). İntron 22 inversiyonu hemofili A hastalarının mutasyonlarının araştırılmasında ilk olarak test edilebilecek derecede sık görülen bir mutasyondur. Bunun kadar sık olmasa da intron1 inversiyon mutasyonu da görülmektedir (21). Ağır hastaların % 40'ında FVIII intron 22 inversiyon mutasyonu, % 2-5'inde ise intron 1 inversiyon mutasyonu görülür. İnversiyonlar neredeyse tamamen erkek gametlerde meydana geldiği için hasta annelerinin hepsi taşıyıcı durumdadır. İnhibitör oluşumu önemli ölçüde yüksektir (20).

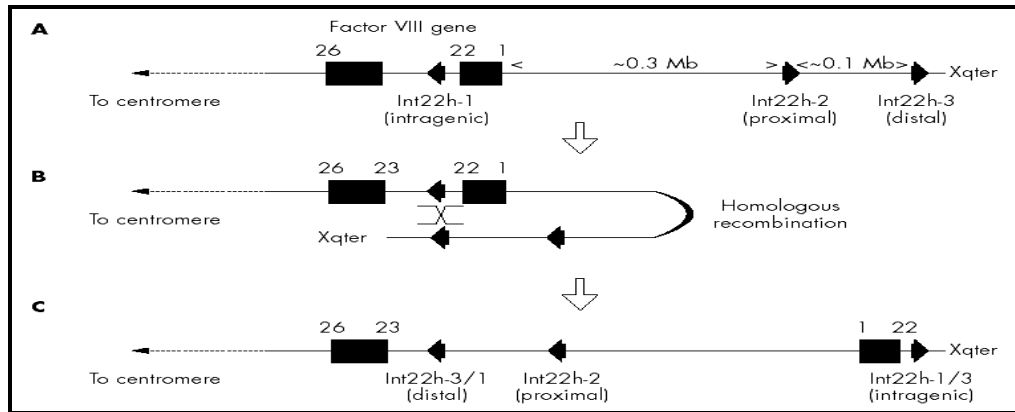
2.5.3.4.1. İntron 22 İnversiyonu

Dünyadaki tüm ağır hemofili A'lı olguların % 45'inden bu mutasyon sorumludur (şekil-10). İntron 22 inversiyonu intronik gen FVIII ile X kromozomunun telomer bölgesi üzerinde lokalize olmuş bir gen arasındaki krossingover (kromozomların mayoz bölünme esnasında karşılıklı parça değişimi olayı) sonucu meydana gelmekte ve FVIII geninin ekson 1 den ekson 23'e kadar olan bölümünü ekson 23'den sonraki kısımdan parçalamakta ve sonuçta ağır tip hemofili hastalığı oluşmaktadır (Şekil-11) (54,55).



Şekil 10. İnsan Faktör VIII geninin genomik organizasyonu.

(A/B) Faktör VIII genindeki intron 22 bölgesinde bulunan CG adasının, intragenik F8A ve Eksonun 5' ucundaki F8B geni. (C) İntron22h-1 ve homologlarının gen içerisindeki yerleri



Şekil 11. FVIII geninde intron 22 deki inversiyonun şematik görünümü.

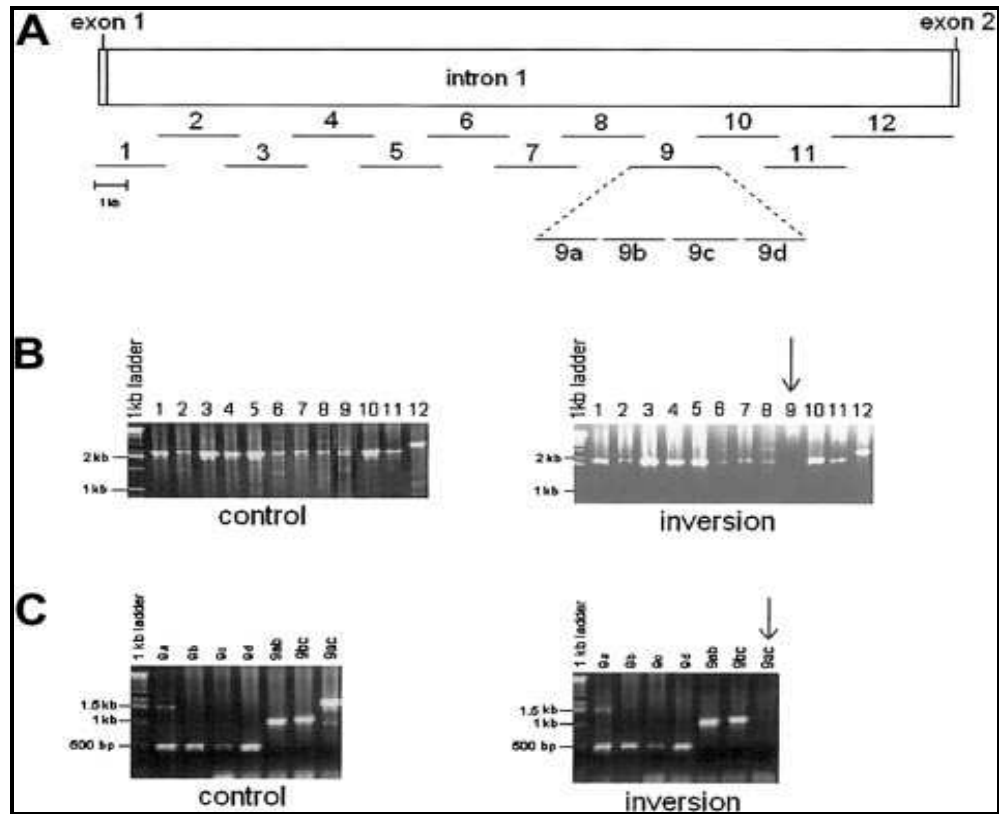
(A) FVIII geninin normal konfigürasyonu

(B) İnversiyon ve homolog rekombinasyonun gerçekleşmesi

(C) Ekzon 1'den 22'ye kadar telomere doğru yer değiştirmiş ve normal oryantasyonunun tersine yerleşmiş ve ekson 1'den 26'ya kadar transkripsiyonu mümkün olmadığından ciddi hemofili A ile sonuçlanır.

2.5.3.4.2. Hemofili A'da İntron 1 İnversiyonu

Tanımlanmış en büyük gen olan, bu gen içerisinde intron 22 inversiyonu başta olmak üzere şimdiye kadar 600 den fazla heterojen gen mutasyonu bildirilmiştir (5). Hastaların % 40'ında intron 22 içerisindeki inversiyona rastlanırken, % 30-35'inde nükleotid değişiminden oluşan noktasal mutasyonlara rastlanmaktadır. Hastaların % 5-10'unda küçük delesyonlar ve insersiyonlar tanımlanırken, hastaların az bir kısmında % 5 görülen gen delesyonları, ağır hemofili ve tedavi sonrası yüksek oranda inhibitör gelişmesiyle sonuçlanır (6). Bagnall ve arkadaşları (7) hastaların yaklaşık % 5'inde intron 22 inversiyonu dışında da inversiyon olduğunu bildirmişlerdir (Şekil-12,13). İntron 1 içerisindeki bu inversiyon, FVIII geninin 1. ekzonunu genden ayırmakta ve X kromozomunun telomer bölgesindeki C6.1A geninin yanına lokalize etmektedir (7).

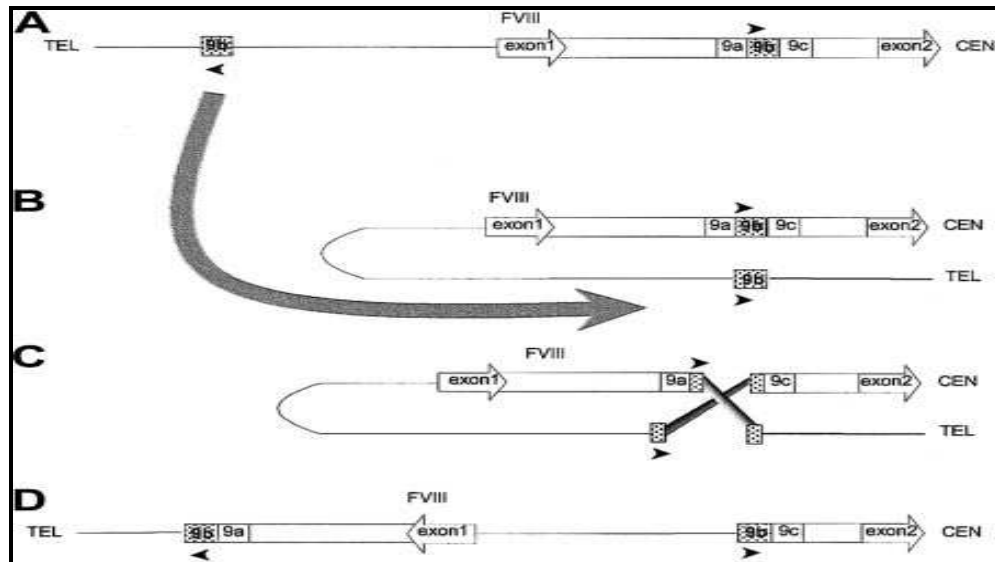


Şekil 12. Kontrol ve intron 1 inversiyon mutasyonlu hastada (UKA 29) faktör VIII intron 1'in PCR amplifikasyonu.

(A) Amplifikasyon stratejisi. Numaralandırılmış çizgilerle gösterildi. Her bir segment PCR ile çoğaltıldı. Segment 9 ise eşlik eden dört reaksiyonu (9a dan 9d'ye kadar gösterecek şekilde genişletildi.

(B) PCR ürünleri; Solda kontrol ve sağda hastalardan elde edilen PCR ürünleri koşturulmuştur. Sağda hasta grubunda segment 9'da şekilde görüldüğü gibi ürün yoktur.

(C) Segment 9 soldaki kontrol ve sağdaki hasta DNA'sında PCR ile çoğaltılmıştır. Burada a segmentinden c'ye kadarki 1.5 kb lık kısmı (9ac,ok) hasta DNA'sında amplifiye olmamıştır. Bununla birlikte hastada, a + b ve b + c (9ab ve 9bc) segmentlerinden oluşan 1-kb'ı aşan segmentler 9a'dan 9d'ye kadar olan diğer bölümler gibi amplifiye olmuştur (7).



Şekil 13. Faktör VIII intron 1 diyagramı ve ileri sürülen inversiyon modeli

(A) Çubuklar 9a ve 9c dizileri tarafından yanlardan çevrelenen, tekrarlayan bir 9b dizisi kapsayan, eksonlar tarafından yandan çevrilen (kopyalamanın yönünü göstermek için çizilen), faktör VIII intron 1'i gösterir. Ok başları tekrarlayan dizilerin yerlerini gösterir. Büyük eğri ok homolog rekombinasyon için gerekli katlanmayı gösterir.

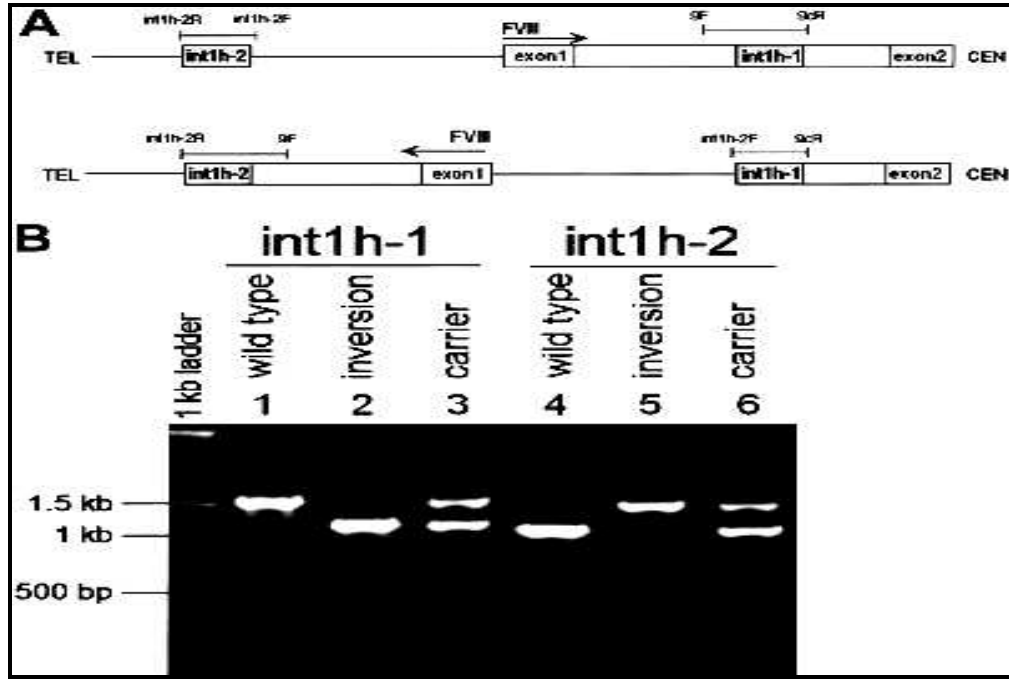
(B,C) Tekrarlayan iki 9b arasındaki homolog rekombinasyon inversiyonun orjinini açıklamak için ileri sürülmüştür. D) İnversiyon rekombinasyondan meydana gelir. Şekil neden hasta DNA'sında 9ab ve 9bc segmentinin amplifiye olduğunu ama 9ac segmentinin amplifiye olmadığını anlatmaktadır. CEN: Sentromeri göstermektedir; TEL, telomerik (7).

İntron 1'in (int1h) 1,0 kb'lık bölgesinin bir kopyası, yaklaşık 140 kb ile FVIII genine telomerik ve 5' doğrultusunda uzanır (Şekil-13). Bu ekstragenik bölge, int1h-2 olarak adlandırılır. İnt1h'in ekstragenik kopyaları ve FVIII (int1h-1) arasındaki homolog rekombinasyon, ağır hemofili A ile sonuçlanır. İlk zamanlarda İngiliz toplumunda yapılan bir çalışmada % 5 sıklıkta olduğu bildirilmişken, sonraki çalışmalarda bu sıklığın yaklaşık % 2 olduğu gösterilmiştir. Farklı toplumlarda, vakaların % 2'sinden intron 1 inversiyon mutasyonlarının sorumlu olduğu Tablo-5'de gösterilmiştir (7,56).

Tablo 5. Populasyonlardaki intron-1 inversion sıklığı.

Populasyon/referans	Hasta Sayıları	İntron-1 inversion	Sıklığı (%)
İspanya	79	4	5.06
İtalya I	20	1	5.0
İngiltere I	209	10	4.78
Çek cumhuriyeti	162	7	4.32
Hindistan I	80	3	3.8
Almanya	1127	23	2.04
İngiltere II	595	11	1.85
İtalya II	293	5	1.71
Hindistan II	241	3	1.24
Macaristan	104	0	0
Total	2910	67	2.30
(Factor VIII intron-1 inversion: frequency and inhibitor prevalence J. SCHRÖDER*, O. EL-MAARRI*, R. SCHWAAB*, C. R. MÜLLER† and J. OLDENBURG*† *Institute of Experimental Haematology and Transfusion Medicine, University of Bonn, Bonn, Germany ; and †Institute of Human Genetics, University of Würzburg, Würzburg, Germany.)			

Ülkemizde yapılan bir çalışmada da intron 1 inversiyon mutasyonunun saptanması için uygulanan polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi benzer şekilde, Türk hastalarında görülen sıklığında % 1-2 olduğu rapor edilmektedir (53).



Şekil 14. FVIII int1h ile ilişkili inversion için PCR testi.

(A) Normal (üst) bir diyagram ve inversion (alttaki) DNA PCR primerleri ve reaksiyonlara ilave olarak ilişkili dizilerin oryantasyonu ve lokalizasyonunu gösterir.

(B) İnt1h-1'in Amplifikasyonu için 9cR, 9F, and int1h-2F primerleri (Şerit 1, 2 ve 3) ve int1h-2'in Amplification için int1h-2F, int1h-2R, and 9F primerleri (Şerit 4, 5 ve 6) kullanılır. Kontrol ve inversiyon erkeklerdir; Taşıyıcı dişilerdir (7).

2.6. FAKTÖR V LEİDEN MUTASYONU VE HEMOSTAZDAKİ YERİ

Faktör V (FV/ labil faktör), karaciğerde sentezlenen, yarılanma ömrü 12-36 saat olan, tek zincirli bir glikoproteindir (57). Faktör V % 80'i plazmada bulunurken % 20'si trombositlerde bulunur. Trombositlerin içinde bulunan FV, alfa granül'de depolanır ve trombosit aktivasyonu sırasında salınır. Aktif faktör Va (FVa), Faktör Xa, Ca^{+2} ve fosfolipid beraberce protrombinaz kompleksini oluştururlar. FVa'nın ağır zincirinde üç tane APC yıkım bölgesi bulunur. Trombin oluşumu Protein C'yi aktive eder ve APC FVa'yı enzimatik olarak parçalayarak pıhtılaşma sürecini kontrol eder Şekil-14, (57,58).

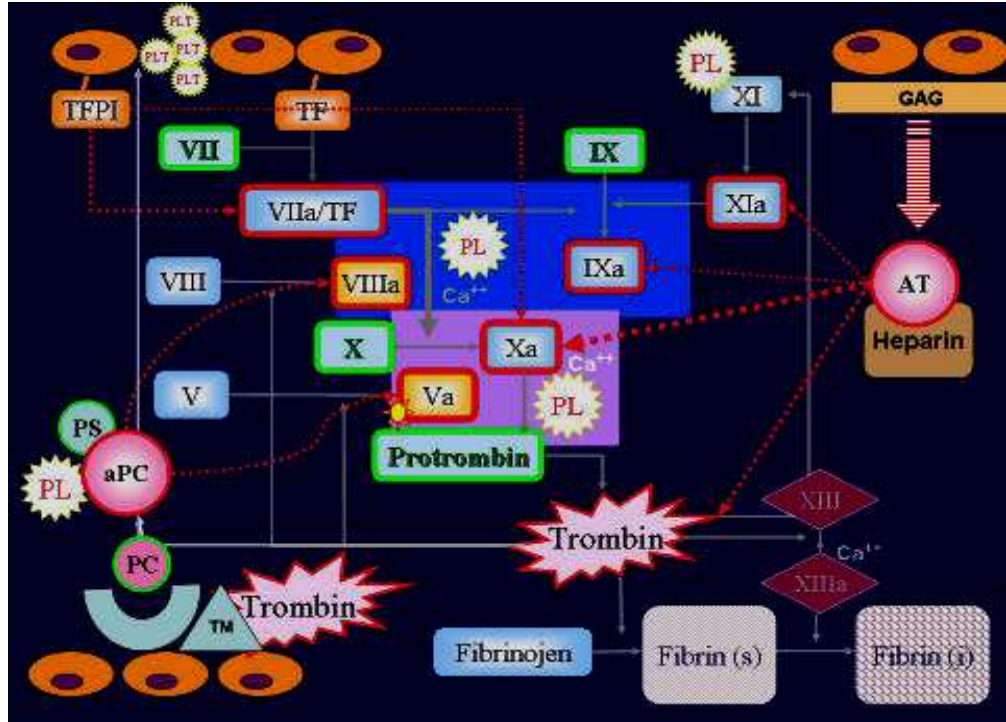
Fizyolojik koşullarda prokoagülan ve antikoagülan mekanizmalar bir denge içerisinde çalışırlar. Bunun bozulduğu durumlarda kanama ya da tromboemboliye yol açan patolojiler meydana gelir. FV eksikliği ilk defa 1947 yılında O'wren tarafından

bildirilmiş ve parahemofili olarak adlandırılmıştır. Sonraki yıllarda moleküler genetik tekniklerdeki gelişmelerle birlikte FV eksikliğinin 6 farklı tipi bulunmuştur (57).

Protein C karaciğerde vitamin K'ya bağlı bir glikoprotein olup, koagülasyon yolunda trombomodülin adındaki reseptörle etkileşerek, FV ve FVIII'in aktif formlarını inhibe eder. Bin dokuz yüz doksan üç yılında Dahlback ve arkadaşları tarafından bazı plazma moleküllerinin antikoagülan moleküllere karşı bir direnç gösterdiği bulunmuş ve bu moleküller aktifleşmiş protein-C (APC) olarak tanımlanmıştır (59). Bin dokuz yüz doksan dört yılında Bertina ve arkadaşları APC direncinden (APCR) sorumlu olan FV gen bölgesinde, ekson 10'da, bir nokta mutasyon tanımlamış (G1691A, FVR506Q) ve bu anormal form Faktör V leiden (FVL) olarak adlandırılmıştır. APCR aktive olan FV'in inaktivasyonunu geciktirerek sonuçta aşırı koagülasyonun ortaya çıkmasına yol açmaktadır (57).

FV'de oluşan bu mutasyon APC tarafından tanınan majör proteolitik kesim bölgesini yok eder ve FV, APC'ye karşı direnç geliştirmiş olur (60). FVL normal FV'den 10 kat daha yavaş inaktif olur ve dolaşımda daha uzun süre kalır. Bunun sonucunda protrombin F1+2 fragmanlarında ve diğer aktive koagülasyon markırlarında artış ve koagülasyona yatkınlık oluşur (61).

Bu değişiklik sonucu yüksek oranda tekrarlayan venöz, belki de arteriyel trombozların meydana geldiği bilinmektedir. FV Leiden heterozigot bireylerde tromboz riski 5-10 kat homozigot bireylerde ise risk 50-100 kat artar. Aktive edilmiş protein C direnci insidansı normal bireylerde % 3-5, tromboz öyküsü olan hastalarda % 50 civarındadır (58, 62).



Şekil 15. Aktive PC ve antikoagulan mekanizma

(APC), kofaktör işlevi gören Protein S (PS) ile birlikte FVa VE FVIIIa'yı parçalayarak inaktive eder. APC'ye direnç; FV genindeki bir nokta mutasyonu (G1691A) sonucu ortaya çıkan anormal FV molekülü (faktör V leiden) APC tarafından parçalanamaz (sarı kırmızı yıldız) bir diğer deyişle, mutant Faktör V, apc'nin inhibitör etkisine direnç gösterir (APC'ye direnç).

3. HASTALAR ve YÖNTEM

Bu çalışma 04.03.2006 tarihinde TT-06-17 nolu kararla fakültemiz etik kurul onayını aldı.

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalında hemofili A tanısıyla takip edilen tamamı erkek olan 32 hasta çalışmaya alındı. Hastalardan alınan 2 ml kan örnekleri, EDTA'lı tüplerde, Erciyes Üniversitesi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarına ulaştırıldı.

Hemofili A hastalarının tiplendirilmesi kanama sıklığı ve mevcut faktör düzeylerine göre belirlendi. Buna göre; faktör düzeyleri % 5'in üzerinde olan hafif tip, faktör düzeyleri % 1-5 olanlar orta tip ve % 1'in altında olanlar ağır tip olarak kabul edildi. Buna göre hastalar yedisi ağır, 16'sı orta ve dokuzu hafif olmak üzere sınıflandırıldı.

Bu çalışmadaki hastaların inhibitör düzeyleri negatifti. İlk tanı yaşına göre, ortanca yaş 21 ay (min: 2ay; max: 168 ay) olarak bulundu.

Hastaların plazma örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonu ile intron-1 h-1 ve intron 1 h-2 bölgelerindeki inversiyon mutasyonu polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle araştırıldı. Yine aynı hastalarda "Real Time" polimeraz zincir reaksiyonu ile FVL (G1691A) mutasyonu çalışıldı.

3.1. DNA İZOLASYONU

Hemofili A hastalarından alınan 2 ml kan örneklerinden Magna Pure LC (Roche) otomatik DNA izolasyon cihazında DNA izolasyonları yapıldı. Elde edilen DNA örneklerinde moleküler yöntemlerle FVIII geni int22h, intron1h ve FVL mutasyonları araştırıldı.

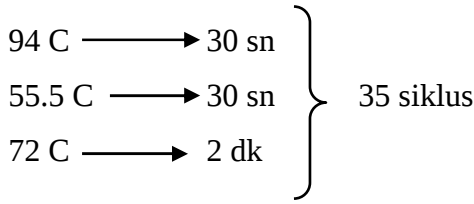
3.2. İNTRON 1h-1 İNVERSİYON YÖNTEMİ

Tablo 6. Birinci Reaksiyon için PCR içeriği (İntron 1h-1)

5 µl PCR Buffer µl (mikrolitre)
3 µl MgCl
3 µl dNTP
2.5 µl Primer F (5'GTTGTTGGGAATGGTTACGG)
2.5 µl Primer R (5'CACCACATCCAAACTCATGC)
2.5 µl DMSO (Dimetilsülfoksit)
0.5 µl Taq DNA polimeraz (5U µl)
5 µl DNA örneği

Toplam volüm 50 µl'ye distile su ile tamamlandı.

PCR Yöntemi



Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde koşturuldu.

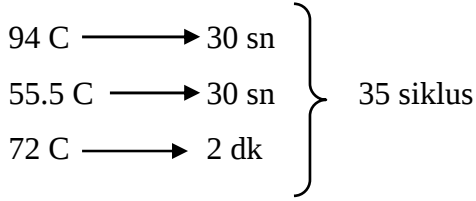
3.3. İNTRON 1h-2 İNVERSİYON YÖNTEMİ

Tablo 7. İkinci Reaksiyon için PCR içeriği (İntron 1h-2)

5 µl PCR Buffer
3 µl MgCl
3 µl dNTP
2.5 µl İnt1h-2F(5' GGCAGGGATCTTGTTGGTAAA)
2.5 µl İnt1h-2R(5' TGGGTGATATAAGCTGCTGAGCTA)
2.5 µl DMSO
0.5 µl Taq DNA polimeraz (5U µl)
5 µl DNA örneği

Toplam volüm 50 µl'ye distile su ile tamamlandı

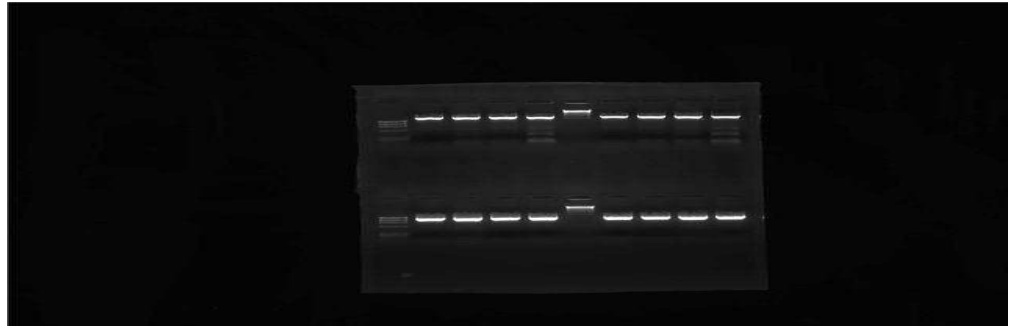
PCR Yöntemi



Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde koşturuldu.

İntron 1h-1'de jelde görülecek bantlar; Normal 1900bp (base/pair) ve Mutant (inversiyon varlığında); 1300bp olarak görüldü. Erkekler ya normal olacaktır ya da mutant; kadınların ise ikisini birden göstererek taşıyıcı oldukları görüldü.

İntron 1h-2'de jelde görülecek bantlar; Normal 1300bp ve Mutant (inversiyon varlığında) 1900bp, kadın taşıyıcılarda her iki PCR'da iki bantta alınır. Aşağıdaki Resim-1'de bu mutasyonlara ait olan bant dizilimleri gösterildi.



Resim 1. Faktör VIII geninin 1. İntronundaki inversiyon tipi mutasyonun analizi

Üst Dizi: Bir (1) numara boyut markırı (fermantas), 2-5 numara F8 intron1h-1 hasta örneği, 6 numara boyut markır (fermantas), 7-10 numara F8 intron1h-1 hasta örneğidir. Alt Dizi: 1 numara boyut markırı (fermantas), 2-5 numara F8 intron1h-2 hasta örneği, 6 numara boyut markırı (fermantas), 7-10 numara F8 intron1h-2 hasta örneğidir.

3.4. FAKTÖR V LEIDEN METOTU

Aynı hasta gurubunda “Real Time” polimeraz zincir reaksiyonu ile FVL (G1691A) mutasyonu çalışıldı, Resim 2’de gösterildi.

FVL çalışması, Real Time PCR cihazı (Roche, Germany) ile çalışıldı. Roche marka, referans No: 03 610 179 001 olan FVL kiti kullanıldı. G1691A değişimi Melting curve yöntemi kullanılarak tayin edildi.

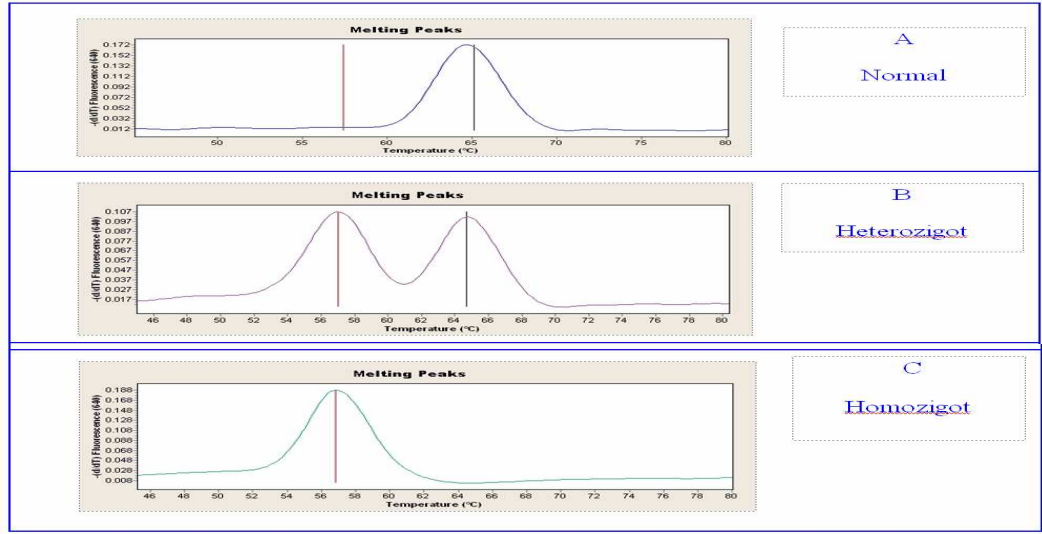
Tablo 8. FVL mutasyonu için PCR içeriği

	Volüm/reaksiyon
FVL DIL, vial 4	11 µl
FVL MD Mix, vial 1	2 µl
FVL R Mix, vial 2	2 µl
Total volüm	15 µl

Hasta sayısına ve 1 tane negatif kontrol için, kullanmak üzere PCR mix hazırlandı. On beşer µl'lik kapillerler içerisine paylaştırıldı. Mixlerin üzerine 5'er µl DNA örnekleri pipetaj yapılarak mix'in üzerine eklendi. Daha sonra örnekler Light Cycler içerisine yerleştirildikten sonra program başlatıldı. Bundan sonraki süreçte Tablo 9'da belirtildiği üzere sadece $65 \pm 2,5$ °C'de pik gösteren reaksiyon homozigot normal, hem 65 °C'de hemde 57 °C'de pik gösteren heterozigot, sadece 57 °C'de pik gösteren reaksiyon homozigot mutant genotip olarak kabul edildi.

Tablo 9. Homozigot doğal (wild), heterozigot ve homozigot mutant tip hastaların pik tm dereceleri

Template DNA containing the...	Number of melting peaks	Tm of melting peaks
Homozigot normal genotip	1	$65\text{ C} \pm 2.5\text{ C}$
Heterozigot genotip	2	$65\text{ C} \pm 2.5\text{ C}$ $57\text{ C} \pm 2.5\text{ C}$
Homozigot mutant genotip	1	$57\text{ C} \pm 2.5\text{ C}$



Resim 2. Real Time polimeraz zincir reaksiyonu ile FVL (G1691A) mutasyonu

4. BULGULAR

Aralarında akrabalık bağı bulunan dört (4) ve akrabalık bağı bulunmayan yirmi sekiz (28) hemofili A hastası olmak üzere toplam 32 hasta çalışmaya alındı. Daha önce planlanan intron 22 inversiyon mutasyonunun tespiti teknik sebeplerden dolayı yapılamadı. Faktör VIII geninde yer alan intron 1 bölgesindeki mutasyonun bulunup bulunmadığı araştırıldı. Hemofili A hastalarının iki tanesinde amplifikasyon gözlenmedi. Diğer kontrol DNA'ların tümünde amplifikasyon meydana geldi. Çalışmaya katılan 32 Hemofili A hastasından hiçbirinde İntron 1 inversiyon mutasyonu saptanmadı (Tablo 10).

Tablo 10. Hemofili A hastalarının genel özellikleri ve İntron 1 inversiyon mutasyonu

Hemofili Tipi	N	Tanı yaşı	İntron 1 inversiyon mutasyonu
Hafif	9	48ay	yok
Orta	16	36ay	yok
Ağır	7	7ay	yok
Toplam	32	Ortanca yaş 21 ay (2ay-168ay)	yok

Hemofili A'lı 32 hastanın dördünde heterozigot FVL mutasyonu saptandı (Tablo 11,12). Hiçbir hastada homozigot FVL mutasyonu saptanmadı. Ağır tip hemofili A olan yedi hastadan kardeş olan ikisinde, heterozigot FVL mutasyonu saptandı ve bu hastaların her ikisinde de hedef eklem oluşması nedeniyle radyonüklid sinovyektomi yapıldı. Hafif hemofili A fenotipine sahip dokuz hastanın ikisinde de heterozigot FVL mutasyonu saptandı. Bu hastaların yıllık kanama sayısı 1–2 arasında değişmekte idi. Heterozigot FVL mutasyonu saptanmayan hafif hemofili A hastaları ile FVL mutasyonu saptanan iki olgu arasında kanama sayısı ve ciddiyeti açısından fark bulunamadı. FVL mutasyonu tespit edilen ve edilmeyen hastaların hiçbirinde tromboz gözlenmedi.

Tablo 11. Hemofili A hastalarının genel özellikleri ve FVL mutasyonu

Hemofili Tipi	N	Tanı yaşı	FVL Mutasyon Saptanan hasta
Hafif	9	48ay	2
Orta	16	36ay	-
Ağır	7	7ay	2
Toplam	32	Ortanca yaş 21 ay (2ay-168ay)	4

Tablo 12. FVL mutasyonu saptanan hastalar ve hemofilik artropati

Hemofili Tipi	N:4	Hemofilik artropati FVL Mutasyon Saptanan hasta
Hafif	2	yok
Ağır	2	Olgu1.Her iki diz (Denver 20 ve 28) ve her iki ayak bileği, Olgu 2.Sol diz (Denver skoru 17)

5. TARTIŞMA

Hemofili sekonder hemostazda görev alan, yumuşak trombosit kümesini sert fibrin tıkaçı haline dönüştüren, prokoagülan bir proteinin kanda eksikliği veya bozukluğu sonucu gelişen kalıtsal bir gurup kan veya kanama hastalığıdır. Bu hastalıklar içinde en sık görülen hemofili A hastalığıdır.

Hemofili A 10.000 erkekten yaklaşık 1-2 kişiyi etkileyen X'e bağlı resesif geçiş gösteren, en yaygın görülen, bir kanama bozukluğudur (30). Faktör VIII (FVIII) protein aktivitesinin kısmen ya da tamamen bozukluğundan kaynaklanmaktadır. Klinik olarak çok heterojendir; Ağır tip (FVIII pıhtılaşma aktivitesi % 1 den az), orta tip (FVIII pıhtılaşma aktivitesi % 1-5) veya hafif tip (FVIII % 5- 25) olabilir. Moleküler genetik testler ile hemofili A hastalarının % 98'inde, FVIII geninde hastalığa neden olan mutasyonlar tespit edilebilir. Mutasyonların saptanması taşıyıcıların belirlenmesine ve prenatal tanıya olanak sağlar (38,63).

Doğum öncesi tanı ve taşıyıcıların tespiti genellikle FVIII geninin içinde yada uç kısımlarında bulunan DNA dizi polimorfizimlerinin kullanılmasına dayanmaktadır. Son yıllarda gelişen moleküler teknikler ve yöntemler sayesinde hastalığa yol açan mutasyonun tespiti doğrudan mümkün olmaktadır.

Hemofili kanama bulgularıyla en sık hastanelere başvuru alan, tedavi maliyetinin yüksekliği nedeniyle ciddi sorun yaratan ve toplumda sık görülen doğumsal bir hastalıktır. Dünyanın her köşesinde, her ırk ve millette rastlanılabilen hemofilinin tedavisi; kişiye, aileye ve ülkeye yüksek maliyetler getirmektedir. Tüm dünyada yaklaşık 400.000 hemofili hastası ve yurdumuzda 4.000 civarında hemofili hastası

olması gerekirken izlenen hasta sayısı bu rakamın yarısı kadardır. Türkiyede her yıl 100 yeni hemofili hastası doğmaktadır. Bunların % 80'i yeterince tedavi hizmetlerinden faydalanamamakta, hayatları komplikasyonlar ile sürmekte, hayat kalitesi azalmakta veya kanamayla kaybedilmektedirler (64).

Hemofili A X'e bağlı geçiş göstermektedir. Bu yüzden doğum öncesi ailelere, genetik danışmanlık hizmetinin verilerek prenatal tanı yöntemlerinin uygulanması önem taşımaktadır. Yine bir diğer önemli konu, Hemofili A' lı bir çocuğu olan ailenin genetik çalışmaları yapılarak, ilgili gendeki mutasyonlar tespit edilerek, doğacak çocuğun hemofili A hastası olup olmadığı prenatal tanı yöntemleriyle saptanabilmektedir. Taşıyıcı tespiti ve doğum öncesi tanının yapılabilmesi için en azından bölgemize özgü mutasyonların, gelişen moleküler yöntemlerle tespiti sağlanarak, taşıyıcı ve doğum öncesi tanı kesinleştirilir (20).

Hastalık X kromozomunun Xq28 bölgesinde yerleşik faktör VIII genindeki oldukça heterojen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu nedenledir ki hastalığa yol açan mutasyonun tespiti oldukça zordur. Ayrıca bu hastalığa yol açan mutasyonların yaklaşık % 30'u ailede taşıyıcı olmaksızın meydana gelen denovo mutasyonlardır. Hastalığın halen kesin bir tedavisi olmamakla birlikte, günümüzde genetik çalışmalarda kat edilen yol ümit vericidir (18, 38).

Hafif/orta hemofili A ve ciddi hemofili A'lıların yaklaşık yarısından FVIII genindeki değişik mutasyonlar sorumludur. Nokta mutasyonları (tek nükleotid değişimleri) en yaygın gen bozukluğudur ve yaklaşık hastaların % 90'ında mevcuttur. Delesyonlar ikinci en yaygın gen defektidir, hastaların yaklaşık % 5-10'unda mevcuttur ve genellikle ciddi hastalıkla ilişkilidir (64). İnsersiyonlar ve yeniden düzenlenmeler /inversiyonlar oldukça nadirdir ancak özellikle intron 22 inversiyon mutasyonları bunun dışındadır ve tüm hastaların % 20'sinden sorumludur ve daima ciddi hastalığa yol açar (ciddi hemofili A'lı hastaların % 40'ından sorumlu mutasyon) (54,65).

İntron 22 inversiyonu intronik gen FVIII ile X kromozomunun telomer bölgesi üzerinde lokalize olmuş bir gen arasındaki krossingover sonucu meydana gelmekte ve FVIII geninin ekzon 1 den ekzon 23 e kadar olan bölümünü ekzon 23 den sonraki kısmından parçalamakta ve sonuç olarak ağır tip hemofili hastalığına yol açmaktadır. İntron 22 inversiyonu hemofili A hastalarının mutasyonlarının araştırılmasında ilk olarak test edilebilecek derecede sık görülen bir mutasyondur (21).

Bin dokuz yüz doksan iki yılına kadar ciddi vakaların yaklaşık %50 sinde (Tüm hemofili A hastalarının %20'si) FVIII geninin bağlantı noktası ya da kod diziliminde mutasyonlar bulunamıyordu. Daha sonra Naylor ve arkadaşları ile Lakich ve arkadaşları (54, 65) bir birinden bağımsız olarak FVIII geninin içinde 200-300 kb lık zıt iki parçaya ikiye ayıran bir inversiyonun, ağır hastaların yaklaşık %50 sinde hemofili A'nın sebebi olduğunu açıkladı. Bu inversiyon FVIII geninin intron 22 içinde inth 22h-1 (homolog intron 22 bölge 1) olarak gösterilen, 9.5 kb lık bir bölge ve FVIII geninden zıt yönde 200-300 Kb lık bir bölgede lokalize olan, bu 9.5 Kb lık bölgenin (inth22h-2 ve inth22h-3) en az iki diğer ekstrasjenik kopyasının birisi arasında intrakromozomal homolog bir rekombinasyona sebep olduğu bulundu. Proksimal inversiyon proksimal kopyayı (inth 22h-2) içerir ve distal inversiyon daha çok distal kopyayı (inth 22h-3) içerir (40,65).

Tüm hemofili A hastalarına göre inversiyon sıklığını bildiren diğer çalışmalar % 23'den % 35'e kadar değişen oranlardaydı. Bu uyumsuzluk her bir popülasyonda çalışılan örnek büyüklüğüyle ilişkili olabilir (66).

Meksikada yapılan bir çalışmada; Mantilla-Capacho ve arkadaşları (67) 31 ağır tip hemofili A hastasından 14'ünde inversiyon 22 mutasyon (% 45) bildirmişler. Diğer popülasyonla karşılaştırıldığında önemli bir farklılığın olmadığı gösterilmiştir.

Osman el-Maarri ve arkadaşları (68) Türk hemofili A hastalarındaki intron 22 inversiyon sıklığıyla ilişkili yaptıkları bir çalışmada 141 hemofili A hastasının 41'inde (% 29) ve ağır vakalarında % 42'sinde intron 22 inversiyon mutasyonu tespit etmişler. Bu vakaların 32'sinin (% 78) distal inversiyon paterni ve 9'unun (% 22) proksimal inversiyon paterni gösterdiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada hemofili A hastalarında en sık görülen intron 22 mutasyonu teknik nedenlerden dolayı çalışılmamış olup, ikinci sıklıkta görülen ve ilk olarak 2002 yılında tanımlanan intron-1 inversiyon mutasyonu varlığını PCR yöntemiyle taradık.

Hemofili A hastalığı ve Faktör VIII geni arasındaki bağlantı açıkça ortaya konulmuş olmasına rağmen hemofili A hastalarının yaklaşık % 2'sinde gen içerisinde mutasyonlara rastlanmamıştır (68).

Bagnall ve arkadaşları (7) hastaların yaklaşık %5' inde intron 22 inversiyonu dışında da inversiyon olduğunu bildirmişlerdir. Intron 1 içerisindeki bu inversiyon, Faktör VIII

geninin 1. ekzonunu genden ayırmakta ve X kromozomunun telomer bölgesindeki C6.1A geninin yanına lokalize etmektedir.

Ciddi hemofili A'lı hastalarda ikinci en yaygın mutasyon intron 1'de inversiyondur. Sıklığı %1.8' den - %5'e kadar değişmektedir.

Schröder J. ve arkadaşlarının (70) yaptıkları bir çalışmada; Faktör VIII geni 1. İntronunda yer alan inversiyon tipi mutasyon analizi İtalyan toplumundaki Hemofili A hastalığının ağır formunu bulunduran 21 hastada yapılan tarama sonucunda 1 hastada (% 5) saptanmıştır (89). İngiliz toplumundaki ağır hemofili A tipindeki 209 hastada yapılan mutasyon taraması sonucunda 10 (% 4.78) hastanın bu mutasyona sahip olduğu saptanmıştır (7). Alman toplumundaki 1127 hemofili A hastasında yapılan mutasyon analizinde 23 (% 2.04) hasta da bu mutasyon saptanmıştır (70). Macaristanda yapılan bir çalışmada 104 hasta popülasyonundan hiç birinde intron-1 inversiyon mutasyonu saptanmamıştır. Hindistanda yapılan bir çalışmada 241 hastadan 3'ünde (% 1.24) saptanmıştır. Buna göre diğer milletlerdeki intron-1 inversiyon mutasyonu dağılımı; % 0- % 5.06 arasında seyretmekte, ortalama sıklığı % 2.3 olarak bulunmuştur.

Fidancı ve arkadaşları (53), Türk hemofili A hastaları arasında, İntron 1 inversiyon mutasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada; 112 hastadan 2'sinde intron 1 inversiyon mutasyonu tespit edildi. Bu hastalar intron 22, nokta mutasyonları ve inhibitör gelişimi yönünden negatif sınırlarda idi. Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile, benzer şekilde, Türk hastalarında görülme sıklığının % 1-2 (%1.8) olduğu bildirildi.

Pehlivan ve arkadaşları (71), aralarında akrabalık olmayan 44 Türk Hemofili A hastasında (ağır form 30, orta form 11, hafif form 3) Faktör VIII geninde yer alan İntron 1 bölgesindeki inversiyon tipi mutasyonunun bulunup bulunmadığı araştırılmış, Faktör VIII geninin 1.İntronunda bir mutasyonun olmadığı belirlenmiştir. Ancak 1 hastada bu bölgeninde içinde yer aldığı en az 2 farklı mutasyonun bulunabileceği indirekt yolla belirlenmiştir.

Hasta popülasyonumuzun tamamı erkek olan, otuz iki hastanın 2'sinde yöntem çalışmadı ve amplifikasyon elde edilemedi. Bu şekilde 30 hastada intron 1 inversiyon mutasyonu PCR yöntemiyle çalışıldı. Hiç birinde intron 1 inversiyon mutasyonu saptanmadı. Bu nadir görülen intron 1 inversiyon mutasyonunun bizim toplumumuzda

diğer belirtilen toplumlardaki görölme yüzdelere benzer olduğu, ancak hasta sayımızın yeterli olmaması görölme şansını azaltmış olabilir.

İntravasküler alanda prokoagölün ve antikoagölün faktörlerin denge halindedir. Bu dengenin bozulması halinde hayatı tehdit eden ve bazen kalıcı sekellere yol açan kanamalar veya trombozlar görölabilir (72).

Hemofi A hastalarında özellikle ağır tipte en yüksek oranda kanama kliniğıyle karşılaşılır. Kanama sıklığı hemofilide morbidite ve mortalitenin en önemli sebebidir. Bu yüzden kanama sıklığının ve maliyetlerin azaltılmasına yönelik yeni tedavi yöntemleri arayışı halen devam etmektedir.

Dahlback ve arkadaşları (59) 1993 yılında bazı plazma moleküllerinin antikogölün moleküllere karşı bir direnç gösterdiğini bulmuş ve bu molekülleri aktifleşmiş protein-C (APC) olarak tanımlamışlardır. Bin dokuz yüz doksan dört yılında ise FV gen bölgesinde 506. aminoasit pozisyonundaki tek bir nükleik asitin yer değıştirmesi (G→A) sonucu APC direncinden sorumlu olan bir nokta mutasyonu tanımlanmış (G1691A, FVR506Q) ve bu mutasyon FVLeiden (FVL) olarak adlandırılmıştır (73).

APC direnci, aktive olan FV'in inaktivasyonunu geciktirerek prokoagölün aktivitenin inhibisyonunu engelleyerek, aşırı koagölasyonunun ortaya çıkmasına neden olmaktadır (57). En yaygın trombofilik kalıtsal defekt olan, FVLeiden mutasyonu APCR'nin % 90'ından sorumludur (74). Yine İsviçrede yapılan bir araştırmada APCR olan 50 aileden 47'sinde ve hastaların % 90'ından fazlasında FVL mutasyonu saptanmıştır. FVL homozigot olanların heterozigotlara göre daha şiddetli etkilendikleri görölmüştür (62).

FVL mutasyonu otozomal dominant olarak kuşaktan kuşağı iletilir ve bu patalojinin sıklığı toplumlar arasında bölgeden bölgeye ve etnik gruplara göre değışiklik gösterir (57, 75). FVL mutasyonunun sıklığı normal popülasyonda ortalama % 4-6 olarak bildirilmekle birlikte, sağlıklı Türk popülasyonundaki yüzdesi ise % 7.1-9.1 olarak bildirilmiştir. Avrupanın değışik popülasyonlarında yapılan çalışmalarda % 2-15 gibi farklı sıklıklar bildirilmiştir. Yunan popülasyonunda taşıyıcı sıklığı % 8 olarak bildirilmiştir (76). Bu mutasyonun sıklığı İngiltere ve ABD için % 4-6, Flemenk toplumu için % 2-4, İspanya ve İtalya da % 2 civarında, İsveç toplumu için de % 7 bulunmuştur. Diğer toplumlardaki sıklığın da yaklaşık bu düzeylerde olduğı

sanılmaktadır. Mutasyon, genel olarak beyaz ırkta daha yaygın olarak görülürken Asya ve Afrika toplumlarında daha seyrek görülmektedir. FVL mutasyonu Orta doğuda Araplarda ve Yahudilerde de görülmektedir (75,77).

Lucotte ve Mercier FVL mutasyonunun kaynağını araştırmışlar ve mutasyonun 21 bin-34 bin yıl önce Anadolu ve Kafkaslarda ortaya çıktığını, neolitik çağdaki göçlerle 10 bin yıl önce Avrupa ve Hindistana yayıldığını bildirmişlerdir (77). Ayrıca mutasyonun Kafkas halkında diğer toplumlardan daha sık görüldüğü bildirilmiştir (75).

Homozigot FVL mutasyonu sıklığı 1/5000- 1/8000, heterozigot sıklık ise %3-7 dir. Olguların %50'sinde aile öyküsü pozitifdir (72).

Gürgey ve arkadaşları (78) 146 yetişkin trombozlu hastada FVL sıklığını % 30,8 olarak tespit etmiştir. Bunların % 4,8'i homozigot, % 26'sı ise heterozigot olarak bulunmuştur. Türk popülasyonunda FVL ve Faktör 2 G20210A mutasyonu sıklığı % 41,6 olarak bildirilmiştir (78). Aynı mutasyonlar trombozlu Türk çocuklarında % 32 olarak bulunmuştur (79).

Trombotik olaylar erişkinler'e göre çocuklarda oldukça az oranda görülmektedir. Heterozigot FVL mutasyonu tromboz riskini 5-10 kat, homozigot FVL mutasyonu ise 50-100 kat artırmaktadır. Bu mutasyonun özellikle homozigot olan tipinde yüksek oranda tekrarlayan venöz ve/veya arteriyel trombozlar gözlenmektedir.

Zöller ve arkadaşları normal kişilerin % 8'inin, FVL için heterozigot bireylerin % 20'sinin ve homozigotların % 40'ının 33 yaşından önce venöz tromboz geçirdiğini bildirmişlerdir (62).

Inbal, Wu ve Dönmez' in çalışmalarında miyokard infarktusu geçiren hastalarda, FVL mutasyonu kontrol gurubundan fazla bulunmamıştır (80, 81, 82). Ancak Rosendal ve Segev elli yaşın altında kalp krizi geçirenlerde FVL mutasyonunun sık olduğunu bildirmişlerdir (83, 84).

Bayra ve arkadaşları serebrovasküler trombozlu hastalarda da FVL mutasyonunu sık bulmuşlar ve riski arttırdığını bildirmişlerdir (85). Bu saptanan mutasyonlar çoğunlukla heterozigot durumdadır. Heterozigot mutasyonun arteriyel trombozdan çok tekrarlayan venöz trombozlara neden olduğu bildirilir.

Hemofili hastalarında görülen FVL veya faktör II G20210A mutasyonu gibi trombofili mutasyonlarının yıllık kanama sayısında azalmaya ve eklem hasarı skorlarında düşmeye neden olduğu bildirilmektedir (86-87). İn vitro çalışmalarda aktive protein C inhibitörlerinin hemofili tedavisinde adjuvan olarak kullanılabileceği önerilmektedir (88).

Kurnik ve ark. (86) yaptıkları çok merkezli bir çalışmada, ağır hemofili A'lı 107 çocukta % 7,4 oranında FVL mutasyonu saptamışlardır. FVL veya faktör II G20210A mutasyonu saptanan hastalarda yıllık kanama sayısı ve eklem hasarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır.

Berber ve arkadaşları (87) FVL mutasyonunun hemofili A fenotipini modifiye eden bir etkisinin olup olmadığını araştırdıkları çalışmalarında hasta sayısının kısıtlı olmasından dolayı net bir sonuca ulaşamamışlardır.

Bu çalışmada hemofili A hastalarında trombofiliye yatkınlık sağlayan FVL (G1691A) mutasyonu sıklığı ve bu mutasyonun hastaların klinik özelliklerine etkisi araştırıldı. Real time PCR yöntemiyle, heterozigot FVLeiden (G1691A) mutasyonu 32 hastadan 4'ünde (% 12.5) tespit edildi. FVL mutasyonu tespit edilen ve edilmeyen hastaların hiçbirinde tromboz gözlenmedi. Çalışmamızdaki hastaların hiç birinde aile öykülerinde trombofiliye yatkınlık yoktu.

Çalışmamızda ağır tip hemofili A olan yedi hastadan kardeş olan ikisinde, heterozigot FVL (G1691A) mutasyonu saptandı ve bu hastaların her ikisinde de kanamanın sık görülmesi nedeniyle hedef eklemlerine radyonüklid sinovyektomi yapıldı. Hafif hemofili A fenotipine sahip dokuz hastadan ikisinde de heterozigot FVL mutasyonu saptandı. Bu hastaların yıllık kanama sayıları 1–2 arasında değişmekte idi. Heterozigot FVL mutasyonu saptanmayan hafif hemofili A hastaları ile FVL mutasyonu saptanan iki olgumuz arasında kanama sayısı ve ciddiyeti açısından fark bulunamadı.

Bu çalışmada da Berber ve arkadaşlarının (87) çalışmasına benzer olarak FVL mutasyonu ile kanama sayısı ve hemofilik artropati arasında, hasta sayısının azlığından dolayı anlamlı ilişki bulunamadı. Literatürde belirtilen FVL mutasyonunun kanama üzerine olan koruyucu etkisini gösterebilmek için daha fazla veriye ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

1. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı tarafından takip edilen, onamları alınmış 32 hemofili A hastasında PCR yöntemi ile Faktör VIII geninin İntronunda inversiyon tipi mutasyon araştırıldı ve hastaların hiçbirinde İntron 1 inversiyon mutasyonu saptanmadı.
2. Çalışmamızda dört hemofili A hastasında heterozigot faktör V Leiden mutasyonu tespit edildi (% 12.5).
3. Faktör VIII geninin heterojenik yapısının olması ve yüzlerce mutasyon görülebilmesi ve adeta kişiye özel mutasyonların olması nedeni ile daha gelişmiş moleküler test tekniğine ve yeni verilere ihtiyaç olduğu sonucuna varıldı.

7. KAYNAKLAR

1. Hoyer LW. Hemophilia A. N Engl J Med 1994, 330: 38-47.
2. Memorandum. Prevention and control of haemophilia. Bull WHO 1991, 69: 17-26.
3. RW Colman, J Hirst, VJ Marder, et al. Clinical manifestations and hemophilias A and B. In: Hemostasis and thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Eds: J.B. Lippincot, Philadelphia: 1987: 97-111.
4. Çağlayan S.H, Hemofilide Genetik Tanı. 6. Ulusal Hemofili Kongresi, Kongre Metinleri, Antalya, 2009, 139-140.
5. Kemball-Cook G, Tuddenham EG. The factor VIII mutation database on the World Wide Web: the haemophilia Amutation, search, test and resource site. Nucleic Acids Res.1997;25: 128-132.
6. Jacquemin M, Lavend'homme R, et al. A novel cause of mild/moderate hemophilia A: mutations scattered in the factor VIII C1 domain reduce factor VIII binding to von Willebrand factor. Blood 2000; 96: 958-965.
7. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, et al. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. Blood 2002; 99: 168-174.
8. Çağlayan SH, Gökman Y, Kırdar B. Polymorphisims associated with the FVIII and FIX genes in Turkish population. Haemophilia 1995;1: 184-189.
9. Corrigan JJ. Hemorrhagic and thrombotic diseaseses. In: Nelson Textbook of pediatrics, 17 th Ed. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson Hal B (eds.) (Saunders Co, Philadelphia, 2004: 1651-1660.
10. Oldenburg J, Schwab R. Molecular biology of blood coagulation. Semin Thromb Haemost, 2001: 27: 313-324.
11. Fruie B, Fruie BC. The molecular basis of blood coagulation. Cell, 1988; 53: 505-518.

12. Davie E W, Ratnoff O D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*, 1964; 145: 1310-1312.
13. Dündar S, Karakuş S. Koagülasyon sistemi. *T J H O*, 2004; 14: 172-178.
14. Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biological amplifier. *Nature*, 1969; 202: 495-498.
15. Montgomery RR, Scott JP: Hemostasis: Diseases of the fluid phase, In: Nathan DG, Oski FA (eds), *Hematology of infancy and Childhood*, Philadelphia: WB Saunders Company, 1993: 1301-1324
16. Israels LG, Israels ED. *Mechanisms in Hematology*. 2 nd. Ed., England: Core Health Science Inc; 1996.
17. Broze GJ. Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Ann Rev Med*, 1995; 46: 103-112.
18. Bolton-Maggs PHB and Pasl RJ. Hemophilias A and B. *Lancet*, 2003; 361: 1801-1808.
19. Di Michelle D. Hemophilia 1996: New approach to an old disease. *Pediatr Clin North Am* 1996; 43: 709-736.
20. Çağlayan SH. Hemofili moleküler genetiği. *Temel Moleküler Hematoloji Kursu*, İstanbul, 2004: 95-98.
21. Ün C. Hemofili A hastalığının moleküler temelleri. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2002; 3: 43 – 47.
22. Kuter DJ, Rosenberg RD. Hemorrhagic Disorders III. Disorders of hemostasis. In: Beck WS. Eds. *Hematology*, 5th Ed., Massachusetts: The Mit Press, 1991: 577-598.
23. Lusher JM. Hemophilia A and B. In: Lilleyman J, Hann I and Blanchette V, eds. *Pediatric Hematology*, 2nd ed.,** Churchill Livingstone 1999; 585-601.
24. Arkin S. Hemostatic disorders. In. Lanskovsky P (eds) *Manual of Pediatric Hematology and Oncology* 4th ed., New York: Elsevier Academic Press, 2005: 295-328.

25. Bell B, Canty D, Audet M. Hemophilia: An updated review. *Pediatrics Review* 1995; 16: 290-298.
26. Thompson A. Molecular Biology of Hemophilias. *Progress Haemos Thromb*, 1991; 10: 175-214.
27. Arnold, WD., Hillgartner, M. W. Hemophilic arthropathy. Current concepts of pathogenesis and management. *J Bone Surgery*. 1977; 59: 287-305.
28. Jansen NW, Roosendaal G, Wenting MJ, et al. Very rapid clearance after a joint bleed in the canine knee cannot prevent adverse effects on cartilage and synovial tissue. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008.
29. Hooiveld M, Roosendaal G, Vianen M, et al. Blood-induced joint damage: long-term effects in vitro and in vivo. *J Reumatol* 2003; 30: 339-344.
30. Lafeber FP, Miossec P, Valentino LA. Physiopathology of Haemophilic arthropathy. *Haemophilia* 2008;4: 3-9.
31. Raffini L, Manno C. Modern management of haemophilic arthropathy. *Br J Haematol* 2007; 136: 777-787.
32. Vergin C. Hemofilide klinik bulgular. Hemofilik Çocuk ve Sorunları 1. Nişli G (ed). Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1995, 5-14.
33. Lee GR, Bithell TC, Foerster J, et al. Hereditary Coagulation disorders. In *Winthrobe's Clinical Hematology*. Lea and Febiger Co, Philadelphia, 1993, 1422-1473.
34. Vehar GA, Keyt B, Eaton D, et al. Structure of human factor VIII, *Nature*, 1984; 321: 337-342.
35. White C.G, Shoemaker C.B. Factor VIII Gene and Hemophilia A. *The Journal of The American Society of Hematology*, 1989; 73: 1-12
36. Kazazian HH, Tuddenham EG, Antonarakis SE. Hemophilia A and parahemophilia: Deficiencies of coagulation factors VIII and V. In: *The metabolic and Molecular Bases of inherited Disease*, Mc Graw-Hill Inc, New York, 1995, 7 3241-3267.

37. Lollar P, Parker CG. pH-dependent Denaturation of thrombin-activated porcine factor VIII. *J Biol Chem*, 1990; 265: 1688-1692.
38. Gitschier J, Wood WI, Goraika TM, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*, 1984; 312: 326-330.
39. Brasi D.C, Bowen J.D, Collins W. P, et al. The CpG island in intron 22 of the factor VIII gene is predominantly methylated on the X chromosome of human males. *JHG*, 2002; 47: 239-242.
40. Naylor JA, Buck D, Green P, et al. Investigation of the human factor VIII intron 22 repeated region (inth22h) and the associated inversion junctions. *Hum. Mol. Genet*, 1995; 7: 1217-1224.
41. Özkınay F., Nişli G. Hemofili A ve B için genetik danışma ve prenatal tanı. Hemofili Çocuk ve Sorunları 1. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1995, 67-75.
42. J. E. Sadler, E:W Davie; Hemophilia A, Hemophilia B, and von Willebrand Disease, in *Molecular Basis of Blood Diseases* Ed. 680-718
43. Saenko EL, Scandella D.A. Mechanism for inhibition of factor VIII binding to phospholipid by von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 13826-13833.
44. N.S. Key; Inhibitors in congenital coagulation disorders, *British Journal of Haematology* 2004; 127: 379-391.
45. Pipe S.W, Saint-Remy J-M, Walsh C.E. New hightechnology products for the treatment of haemophilia, *Hemophilia* 2004; 10: 55-63.
46. Shima M, Ware J, Yoshioka A, et al. An arginine to cysteine amino acid substitution at a critical thrombin cleavage site in a dysfunctional factor VIII molecule. *Blood*, 1989; 74: 1612-1617.
47. Goodeve AC, Peake IR. The molecular basis of hemophilia A: genotype-phenotype relationships and inhibitor development. *Semin Thromb Hemost*, 2003; 29: 23-30
48. Youssoufian H, Kazazian HH Jr, Phillips DG, et al. Recurrent mutations in hemophilia A give evidence for CpG mutations hotspots. *Nature*, 1986; 324: 380.

49. Van de Water N, Williams R, Ockelford P, et al. 20. 7 kb deletion within the factor VIII gene associated with LINE-1 element insertion. *Thromb Haemost*, 1998; 79: 938-942.
50. Çağlayan S.H, Hemofilide Genetik Tanı. 6. Ulusal Hemofili Kongresi, Kongre Metinleri, Antalya, 2009, 49-50.
51. Sukarova E, Dimovski AJ, Tchacarova P, et al. An Alu insert as the cause of a severe form of hemophilia A. *Acta Haematol*, 2001; 106: 126-129.
52. Tavassoli K, Eigel A, Wilke K, et al. Molecular diagnostics of 15 hemophilia A patients: characterization of eight novel mutations in the factor VIII gene, two of which result in exon skipping. *Hum Mutat*, 1998; 12: 301-303.
53. Fidancı İ.D, Aydoğdu T, Çağlayan H.S. Intron 1 inversion mutation among Turkish hemophilia A patients. *T J H* 2006; 23: 33-36.
54. Naylor JA, Brinke A, Hasrock S, et al. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum. Mol. Genet.* 1993; 11: 1772-1778.
55. Cutler JA, Mitchell MJ, Smith MP, et al. The identification and classification of 41 Novel Mutations in the Factor VIII gene (F8C). *Human Mutation* 2002;19: 274-278.
56. Ghosh K, Shetty S, Mohanty D. Inversion of intron 1 is a rare cause of severe hemophilia A in Indian population. *J.T.H.* 2004; 2: 1481-1482.
57. Uçar F, Ovalı E, Önder E, Değer O, Özdemir F: Faktör V Lieden Biyokimyası Genetiği, Risk grupları ve Moleküler Düzeyde Tayini. *İbni Sina Tıp Dergisi* 2001; 6; 60-65.
58. Ulutin T, Cengiz M, Yüksel A, Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü Tıbbi Biyoloji Ders Notları 1, Nobel Tıp Kitapevleri, 2000; 45-109.
59. Dahlback B, Carlsson M, Svenson PJ: Familial thrombophilia due to a previously unrecognized characterized by poor anticoagulant response to activated Prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90;1004-1008.

60. Basaran N: Faktör V Leiden Mutasyonu. Anadolu Kardiyoloji Dergisi 2001; 1; 246.
61. Kujovich JL: Factor V Leiden Thrombophilia In: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2004. Available at <http://www.genetests.org>.
62. Zöller B, Svensson PJ, He X, Dahlback B: Identification of the Same Factor V Leiden Mutation in 47 out of 50 Thrombosisprone Families with Inherited Resistance to Activated Protein C. The American Society for Clinical Investigation 1994; 94; 2521-2524
63. Tuddenham EGD, Shwaab R, Seehafer J, et al. Hemophilia A: data base of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene, 2nd ed. Nucl Acids Res 1994; 22: 3511-3535.
64. Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B:molecular insights. Mol Pathol 2002; 55: 127-44.
65. Lakich D, Kazazian H Jr, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. Nature Genet 1993; 5: 236-241.
66. Vnencak-jones CL, Phillips III JA, Janco RL, et al. Analysis of factor VIII gene inversion mutations in 166 unrelated haemophilia A families: frequency and utility in genetic counseling. Haemophilia A 1996; 2: 18-23.
67. Mantilla-Capacho JM, Beltran-Miranda CP, Luna-Zaizar H, et al. Frequency of Intron 1 and 22 Inversions of Factor VIII Gene in Mexican Patients With Severe Hemophilia A. AJH 2007; 82; 283-287.
68. El-Maarri O, Kavakli K, Çağlayan SH, Intron 22 inversions in the Turkish haemophilia A patients: prevalence and haplotype analysis. Haemophilia 1999; 5; 169-173.
69. Çağlayan SH, Gökman Y, Kırdar B. Polymorphisms associated with the FVIII and FIX genes in Turkish population. Haemophilia 1995; 1: 184-189.
70. Schröder J, El-Maarri O, Schwaab R, et al. Factor VIII intron-1 inversion: frequency and inhibitor prevalence. JTH 2006; 4; 1141-1143.

71. Pehlivan M, Pehlivan S, Büyükkeçeci F, ve arkadaşları. Türk hemofili A hastalarında faktör VIII geninin 1. intronundaki inversiyonun araştırılması. XXX. Ulusal Hematoloji Kongresi İstanbul, 2003; 3: 20–26.
72. Tunç B. Çocukluk çağında tromboz. Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci. 2005; 1: 33-47.
73. Silan F, Zafer C. Faktör V Leiden mutasyonu. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi. 2004; 1: 33-36.
74. Bauer KA. Inherited disorders of thrombosis and fibrinolysis. In Nathan DG, Ginsburg D, Orkin SH, et al. Hematology of infancy and childhood. Philadelphia: Saunders; 2003; 1: 1583-1596.
75. Lucotte G, Champenois T. Dublex PCR-RFLP for simultaneous detection of Factor V Leiden and Prothrombin G20210A, Mol. Cell. Probes 2003; 17: 267-269.
76. Eskandari G, Demirkan F, Esskandari MM, ve ark. Cerrahi Girişim Yapılacak Hastalarda Factor V Leiden ve Protrombin G20210A Mutasyonlarının Prevelansı. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 4: 389-392.
77. Lucotte G, Mercier G: Population Genetics of Factor V Leiden in Europe. Blood Cells, Molecules, and Diseases 2001; 27: 362-367.
78. Gürgey A, Haznedaroğlu İC, Egesel T ve ark. Two common genetic thrombotic risk factors: factor V leiden and protrombin G20210A in adult Turkish patients with thrombosis. A J H 2001; 67: 107-111.
79. Gürgey A, Arslan D. Outcome of non-catheter-related thrombosis in children: influence of underlying or coexisting factors. JPHO. 2001; 23: 159-164.
80. Inbal A, Freimark D, Modan B, Chetrit A, Matetzky S, Rosenberg N, Dardik R, Baron Z, Seligsohn U: Synergistic Effects of Prothrombotic Polymorphisms and Atherogenic Factors on the Risk of Myocardial Infarction in Young Males. Blood.1999; 93; 7: 2186-2190,
81. Wu HB, Tsongalis GJ: Correlation of polymorphisms to coagulation and biochemical risk factors for cardiovascular diseases. A J C. 2001; 15: 1361-1366.

82. Dönmez Y, Kanadasi M, Tanriverdi K, ve arkadaşları, 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.
83. Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, et. al, A common prothrombin variant (20210G to A) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1; 1997: 90; 1747-1750.
84. Segev A, Ellis MH, Segev F, et al.: High prevalence of thrombophilia among young patients with myocardial infarction and few conventional risk factors. *International Journal of Cardiology*, 2005; 98: 421-424.
85. Bayra N, Altınışık J, Somay G, Ulutin T: Factor V Leiden mutation in cerebrovascular disease. *Clin. Appl. Thrombosis Hemostasis*. 2005; 2: 11
86. Kurnik K, Kreuz W, Horneff S, et al. Effects of factor V G1691 A mutation and factor II G20210A variant on the clinical expression of severe hemophilia A in children-results of a multicenter study. *Haematologica* 2007; 92: 982-985.
87. Berber E, Kavaklı K, Akar N, et al. R506Q (FV Leiden) and R485K mutations in the Factor V Gene: Incidence in Deep Venous Thrombosis and Hemophilia A Patients *TJH* 2003; 20: 221-225.
88. Butenas S, Orfeo T, Kalafatis M, et al. Peptidomimetic inhibitors for activated protein C: implications for hemophilia management. *JTH* 2006; 4: 2411-2416.
89. Riccardi F, Tagliaferri A, Manotti C, et al. Intron 1 factor VIII gene inversion in a population of Italian hemophilia A patients. *Blood*, 2002; 100: 3432-3450.

EKLER

Ek Tablo 1. Hastaların fenotipik özellikleri

Sıra no	Hasta adı	Tanı yaşı	Memleketi	Protokol No	Fenotipi	F. düzeyi	Geliş Şikayeti	Hemofilik artropati
11	M S	4	Kırşehir	1418669	aPTT: 74.9	F8<%1 İnhibitör(-)	Deride morluklar ve durdurulama yan kanama	RNS yapıldı.
29	Y C K	6 ay	Kayseri	1591697	aPTT: 127.6	0.2 İnhibitör(-)	Sağ bacadta morluk ve şişlik	
05	A.S.Y	12 ay	Maraş	1031760	aPTT: >1dk	2.2 İnhibitör(-)	Sünnet sonrası kanama	Hemofilik Artropati
19	S T	4y 9ay	Niğde	1040658	aPTT:62	4 İnhibitör(-)	Çarpmaya bağlı morluğun devam etmesi	
16	H B	6y 4ay	Nevşehir	1215542	aPTT:60.4	1.52 İnhibitör(-)	Burun kanaması	
20	AA	2y	Kayseri	706766	aPTT:46	14.98	Dişeti kanaması	yok

Ek Tablo 2. Hastaların fenotipik özellikleri (devam)

**	K D	6.5y	Gemerek/Sivas	1402195	aPTT:59. 2	4.47 İnhibitör(-)	Ailede hemofili A öyküsü ve kanamanın uzun sürmesi	
18	M S	8y	Kayseri	1492619	-	-	Dış Merkez	
06	Y K	2.5 y	Kayseri	1217530	aPTT: 60sn	%1 İnhibitör(-)	Vücutta sebat eden ekimotik lezyonlar ve uzun süren kanama	RNS yapıldı.
27	H MÖ	12 ay	Kayseri	1648672	aPTT: 2dak'dan uzun	%1/% İnhibitör(-)	Yaklaşık 7 ay geçmeyen vücutta morluklar ve sefal hematom	Her iki ayak bileğine RNS
13	A.F.Ö	2ay	Kayseri	1221820	aPTT:65	%1/ İnhibitör(-)	Erkek kardeşinde hemofili olması, beyin kanaması	Sağ dize RNS yapıldı.
14	E.İ.B	2 y	Kayseri	1111370	aPTT: 107 sn	%5 İnhibitör(-)	Sağ dizde şişlik	FTR +, RNS yönünden değerlendiriliyo r
12	F Ö	14 y	Niğde	1334040	aPTT: 52.1	%5 İnhibitör(-)	Tekrarlayan burun kanaması	

Ek Tablo 3. Hastaların Fenotipik Özellikleri (devamı)

10	P K	11 ay	Kayseri	1351891	aPTT:85	%0 İnhibitör(-)	Vücutta morluklar ve dayıda Hemofili A öyküsü	
4	E D	18 ay	Kayseri	1191306	aPTT:83.8	%0.5 İnhibitör(-)	Diş eti kanaması	
01	A S	6ay	Kayseri	1120094	aPTT:67	%2.2	Düşme sonrası intrakranial kanama	
23	H S	13 ay	Kayseri	1064522	aPTT:64	%8 İnhibitör(-)	Aralıklı diş eti kanaması ve Hemofilili kardeş öyküsü	
31	M C Y	6y	Kırşehir	1591912	aPTT:-	%0.4 İnhibitör(-)	11 aylık iken vücutta morluklar ortaya çıkma	
02	Ö F Ş	18 ay	Kayseri	761993	aPTT>1dk	%0.4 İnhibitör(-)	Aşı yapılan kolda hematoma.	

Ek Tablo 4. Hastaların fenotipik özellikleri (devam)

15	S B	2.5y	Kayseri	996135	aPTT: 60sn	%5.5 İnhibitör(-)	Travma sonrası durdurulamayan ağız içi kanama	yok
09	G Y	7y	Kırşehir	1348269	aPTT: 66	%2 İnhibitör(-)	Sağ dizde hematom	yok
03	A Ç	1 y	Kayseri	1224439	aPTT:6 3	%4.7	Frenilum yırılmasına bağlıdurdurulamayan kanama	yok
08	O A Ç	1.5 y	Kayseri	1191676	aPTT: 49	%12 İnhibitör(-)	Travma sonrası ağız içi kanama ve göbek kanaması	yok

Ek Tablo 5. Hemofili A hastalarında F V leiden ve İntron 1 inversiyon mutasyonu sonuçları

KAYSERİ HEMOFİLİ A HASTA LİSTESİ					
		YAŞ	FVL (G1691A)	F8 intron1 h1	F8 intron1-h2
1	A.S	6ay	G/G	Normal	Normal
2	Ö.F.Ş	18 ay	G/G	Normal	Normal
3	A.Ç	1 y	G/G	Normal	Normal
4	E.D	18 ay	G/G	Normal	Normal
5	A.S.Y	12 ay	G/G	Normal	Normal
6	Y.K	2.5 y	G/G	Normal	Normal
7	O.Ç	1.5 y	G/G	Normal	Normal
8	G.Y*	7y	G/G	çalışmadı	Normal
9	P.K	11 ay	G/G	Normal	Normal
10	M.S	8y	G/G	Normal	Normal
11	F.Ö	14 y	G/G	Normal	Normal
12	A.F.Ö**	2ay	G/A	Normal	Normal
13	E.İ.B	2 y	G/G	Normal	Normal
14	S.B	2.5y	G/G	Normal	Normal
15	H.B	6y 4ay	G/G	Normal	Normal
16	E.H.H	12ay	G/G	Normal	Normal
17	M.S	4y	G/G	Normal	Normal
18	S.T	4y 9ay	G/G	Normal	Normal
19	A.A	2y	G/G	Normal	Normal
20	O.T**	8ay	G/A	Normal	Normal
21	D.Y	6.5y	G/G	Normal	Normal
22	H.S	13 ay	G/G	Normal	Normal
23	G.G	3y	G/G	Normal	Normal
24	H.S	12ay	G/G	Normal	Normal
25	H.M.Ö**	12 ay	G/A	Normal	Normal
26	İ.T	5y	G/G	Normal	Normal
27	Y.C.K	6 ay	G/G	Normal	Normal
28	Y.E.B*	4y	G/G	çalışmadı	Normal
29	M. C.Y	6y	G/G	Normal	Normal
30	S.Y	5y	G/G	Normal	Normal
31	M. S.Y	8ay	G/G	Normal	Normal
32	Ö.K**	12ay	G/A	Normal	Normal

*Çalışmaya alınan iki hastada metot çalışmadı. **Çalışmaya katılan dört hastada Faktör V leiden mutasyonu tespit edildi.

Ek Tablo 6. PCR amplifikasyonunda kullanılan Primer dizileri

Primer	Dizi
Vectorette	
224	CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAATCGCT
Faktör VIII intron 1 primerleri	
1F	GGGAGCTAAAGATATTTTAGAGAA
1R	AAATAAATCCAATAGCCAACAAG
2F	TTGTCATATGGCATGAGAGAGGGAT
2R	CAATTCATTTGATAAAGCCAAC
3F	GCAGCTGGTATCATCTGAATTG
3R	ATGCACCATTGCTGGTAGAGG
4F	AGGGCTGCACTCCTTAGTGA
4R	GAACTTGAGGTGGGCAAAGATTTC
5F	GAAATCTTTGCCACCTCAA
5R	GGTTTTCCCATGCTGTTCAC
6F	AATCATGGTGGAAGGCAAAG
6R	GGAACACTCATACTTTGGTAGTG
7F	TTGGATTGTTTCCCCTTTTG
7R	CCAACATGAAGAAACCCTGTCTAC
8F	GCTCTTGATCCTGTTCCCTCTCTG
8R	GATCTGAGGCGGACAGTTTC
9F	GTTGTTGGGAATGGTTACGG
9R	CACCACATCCAACTCATGC
10F	GAGGCAAGTTGTCTGGACCTATATAG
10R	CCATCCTGGCTAACATGGTGAAACCC
11F	TTTGTTTGTTGTTTGCATCT
11R	GCATTTGTCTTTTCATGACTGG
12F	CATGCTACGACATAGATGAACC
12R	TGGCAGCTGCACTTTTAACTGC

Ek Tablo 7. PCR amplifikasyonunda kullanılan Primer dizileri (Devamı)

Faktör VIII intron 1 segment 9 primerleri	
9aF	TTCCTAACAGGCCACAGACC
9aR	CACCCGAGAAAGCACGTAGT
9bF	GGAGTGAAATGCAGGGCTAC
9bR	TCAGGTTGCAGACAAAGCAG
9cF	GCGTTTTCCCTCAGTTACCA
9cR	CTAGCTTGAGCTCCCTGTGG
9dF	GAGGCAAGTTGTCTGGACCT
9dR	ATGGCTTACAAAGGGCATGA
Int1h-2 primerleri	
Int1h-2F	GGCAGGGATCTTGTTGGTAAA
Int1h-2R	TGGGTGATATAAGCTGCTGAGCTA
Int1h repeat primerleri	
Int1hF	GCCCTCAGCCAGTACAGAAAGTCA
Int1hR	CCTTTGGGAGAATTCATTGCCAGCT
Faktör VIII-VBP1 chimeric mRNA primerleri	
FVIII 1A	TGGGAGCTAAAGATATTTTAGAGAA
VBP1 PRIMEX1	ACTTATACTTCTGGTACTGTTTCATCCAGC
FVIII 1C (nested)	GAATTAACCTTTTGCTTCTCCAGTTGAAC
VBP1 3-M (nested)	TGTTTCATGAAGGAATCTAC

Ek Tablo 8. Kimyasal Maddeler ve enzimler

Amonyum Klorür	Amonyum Bikarbonat	NaCl	EDTA-Na₂
SDS	Proteinaz K	Doymuş fenol çözeltisi	Kloroform
Etanol	Primerler	dNTP' ler	Taq DNA Polimeraz
<i>Hind</i> III	<i>Alw</i> NI	<i>Taq</i> I	<i>Xmn</i> I
100 bç DNA Ladder	Phi x174 DNA/ <i>Hinf</i> I		

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

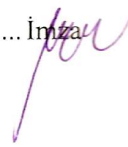
Dr. Erkan KARAKURT'a ait **"HEMOFİLİ A HASTALARINDA İNTRON 1 VE FAKTÖR V LEİDEN MUTASYONLARININ SAPTANMASI"** jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Çocuk Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

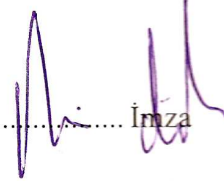
Tarih :

İmza :

Başkan.....Türkan PATIRÖĞÜ.....İmza 

Üye.....Prof. Dr. M. Necmi Arslan.....İmza 

Üye.....Prof. Dr. Mustafa Alçaklı.....İmza 

Üye.....Prof. Dr. Muris Dündar.....İmza 

Üye.....Doç. Dr. M. Hakan Poyrazoğlu.....İmza

