



T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TROMBOZ ve TROMBOZ RİSKİ TAŞIYAN  
OLGULARIN PROTEİN C DÜZEYLERİ ve  
F VIII POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ**

137995

DOKTORA TEZİ  
Biokimya Uzm. NEZAKET EREN

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

137995

DANIŞMAN  
Prof. Dr. NESRİN EMEKLİ

**Y.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
BİYOİMMÜNOLOJİ MERKEZİ**

İstanbul – 2002

## TEŐEKKÜR

Tez çalıőmam ve bütün doktora eğitimim süresince sahip olduğu bilgi birikimini, desteğini ve hoőgörüsünü esirgemeyen, güzel insan danıőmanım sayın hocam Prof.Dr.Nesrin Emekli'ye sonsuz teőekkürler.



HEA-063/171001 no'lu bu proje Marmara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

	<i>Sayfa</i>
KISALTMALAR	iii
ÖZET	iv
SUMMARY	v
1- GİRİŞ VE AMAÇ	1
2- GENEL BİLGİLER	4
2.1. Hemostaz	4
2.2. Endotel	6
2.3. Trombositler	10
2.4. Koagulyasyona Genel Bakış	15
3- F VIII MOLEKÜLÜNÜN ÖZELLİKLERİ	27
3.1. F VIII'in Plazmadaki Moleküler Şekilleri	28
3.2. F VIII'in Proteolitik Enzimler Tarafından Kofaktör Aktivasyonu	30
3.3. F VIII'in Fonksiyonları	32
3.4. Plazmada F Xa'nın, F VIII'i Aktive Etmesinde Minimal Etkisinin Temeli	32
3.5. F VIII'in Bağlanması	33
3.6. F VIIIa'nın Faktör IX ile Etkileşimi	33
3.7. F VIII'nin Kofaktör Fonksiyonu	34
3.8. F VIII'in İnaktivasyonu	34
3.9. F VIII'in Sentez ve Metabolizması	36
3.10. F VIII'in Hücre ve Damar Duvarı ile Etkileşimi	39
3.11. F VIII'in Yapı ve Fonksiyon İlişkileri	40
3.12. F VIII ve Endotel Hücreleri	41
4- F VIII'in MOLEKÜLER GENETİĞİ	42
4.1. F VIII cDNA'sı Genler ve Ekspresyonları	44
5- ARTERYEL VE VENOZ TROMBOZİSTE F-VIII VE DİĞER HEMOSTAZ PARAMETRELERİ	48
6- KAN PIHTILAŞMASININ DOĞAL İNHİBİTÖRLERİ	51
6.1. Protein C	51
6.2. Protein C Sentezi ve Yapısı	52
6.3. Protein C'nin Plazma Düzeyi	54
6.4. Protein C'nin Biyolojik Fonksiyonu	54
6.5. Protein C Eksikliği	55
6.6. Aktif Protein C Rezistansı	56
6.7. Aktif Protein C'nin Plazmadan Uzaklaştırılması	57
6.8. Protein C Ölçüm Yöntemleri	58
7- MATERYAL METOD	60
8- BULGULAR	77
9- TARTIŞMA	86
10- KAYNAKLAR	96

**KISALTMALAR**

IKH	: İskemik kalp hastalığı
KAH	: Koroner arter hastalığı
KKH	: Koroner kalp hastalığı
MI	: Miyokard infarktüsü
CVA	: Serebro vasküler akseden
DVT	: Derin ven trombozu
BMI	: Body Mass İndeks
CRP	: C-reaktif protein
ESR	: Eritrosit sedimentasyon hızı
APC-R	: Aktif protein C rezistansı
bç	: Baz çifti (bp)
AT-III	: Antitrombin III
F VIII:C	: Faktör VIII koagülant aktivitesi
F VIII:Ag	: Faktör VIII antijen
PC	: Protein C
APC	: Aktif protein C
Ptz	: Protrombin zamanı
aPTT	: Active partial thromboplastin time
PC-Ag	: Protein C antijen
F VIIIa	: Aktif Faktör VIII
FVa	: Aktif Faktör V
PCAT	: Protein C activity-dependent clotting time
PGI <sub>2</sub>	: Prostatiklin
C4b	: C4 binding protein
PAI-1	: Plazminojen aktivatör inhibitör-1
GP	: Glikoprotein
PG	: Prostaglandin
IP <sub>3</sub>	: İnozin trifosfat
VNTR	: Variable number tandem repeat
PCR	: Polimeraz chain reaction
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	: Restriction fragment length polimorphism
REA	: Restriction enzim analizi
ARC	: Arteriosclerosis Risk in Communities

## ÖZET

Bu çalışmada koroner anjiyografi ile, koroner kalp hastalığı tanısı konmuş 58 hasta ve yine koroner anjiyografi sonucunda hiçbir damar patolojisi olmadığı tespit edilmiş 20 kontrol grubunda, bu hastalığın risk faktörleri arasında bulunan hemostaz parametrelerinden protein C antijen ve aktivitesi, aktive protein C rezistansı, F VIII:C, F VIII: Ag ile F VIII gen polimorfizmi ilişkisi ile diğer risk faktörlerinin, ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

F VIII:C, F VIII eksik plazma kullanılarak koagulometrik yöntemle, F VIII:Ag, Protein C:Ag ELISA yöntemi ile protein C aktivitesi koagulometrik yöntemle, APC-R ise protein C antikoagülan kapasitesinin koagulometrik yöntemle tespiti ile tayin edildi.

çalışıldı. Polimorfizm analizi PCR/RFLP ve agaroz jel elektroforezi teknikleri kullanılarak yapıldı. aPTT, protrombin zamanı, fibrinojen, APC, APC rezistansı koagulometrik yöntemle, serum lipid düzeyleri ise enzimatik yöntemle tayin edildi.

Literatüre uygun olarak F VIII:C ve F VIII: Ag değerleri birbiri ile korele idi ( $r=0.774$ ,  $p=0$ ). F VIII:C, F VIII: Ag, fibrinojen ve HDL-kolesterol değerlerini hasta grubunda, kontrollere göre anlamlı derecede yüksek bulduk (sırasıyla;  $p<0.001$ ,  $p<0.07$ ,  $p<0.002$ ,  $p<0.07$ ) (Tablo 1). Hasta grubumuzun alel sayısı 76, kontrol grubumuzda ise 29 idi. Bcl-1/intron 18 RFLP (+)'lığı hasta grubunda (%71) daha yüksekti. Hind III/intron 19 RFLP (+)'lığı için bu (%19) idi.

Hasta grubumuzda, en yüksek heteroziyotluk oranı St 14 VNTR polimorfizminde görüldü bu oran Hind III/İntron 19 RFLP polimorfizmi için %6.57, Bcl-1/intron 18 polimorfizmi için ise %11.8 idi.

St14 VNTR için PCR neticesinde, kontrol grubumuzu oluşturan 20 kişide (29 kromozom) 13 farklı alel, hasta grubumuzu oluşturan 58 kişide (76 kromozom) 17 farklı alel bulunmuştur. Kontrol grubumuzda en sık rastlanan aleller 700 bp (%13.8), 1300 bp (%20.7), aleller, hasta grubunda en sık rastlanan aleller ise 700 bp (%19.4), 1480 bp (%13.2) idi.

Bcl-1/intron 18 polimorfizmi ile fibrinojen ( $r=0.306$   $p<0.01$ ) ve St 14 VNTR ( $r=-0.245$   $p<0.05$ ) arasında zayıf bir korelasyon; Hind III/İntron 19 RFLP polimorfizmi arasında orta derecede negatif bir korelasyon ( $r=-0.599$ ,  $p<0.0$ ) vardı.

Hind III/İntron 19 RFLP polimorfizmi ile protein C aktivitesi, ( $r=0.296$ ,  $p<0.05$ ), protein C:Ag ( $r=-0.316$   $p<0.05$ ) zayıf korelasyon vardı.

F VIII:C ve F VIII:Ag ile polimorfizmler arasında bir ilişki bulunmadı.

Sonuç olarak Bcl-1/intron 18 RFLP (+)'liğinin hasta grubunda fazla (%71) görülmesi, fibrinojenle aralarındaki korelasyon, buna karşılık Hind III/İntron 19 RFLP (+)'lığının hasta grubunda düşük (%19) olması, protein C: Ag ve aktivitesi ile pozitif ailesinde MI öyküsü olanlarla negatif bir korelasyon göstermesi anlam taşımaktadır.

Sonuç olarak; Bcl 1/İntron 18, Hind III/İntron 19 için heterozigotluğun hasta grubunda daha yüksek olması, St 14 VNTR-RFLP için hasta ve kontrollerde en sık rastlanan alellerin farklı olması KKH'lığı ise bu polimorfizmlerin ilişkisini düşündürülebilir.

## 11- SUMMARY

In this study we aimed to identify the association of coronary heart disease factors F VIII:C, F VIII:Ag with F VIII gene polymorphisms as well as the association of other coronary risk factors with F VIII:C, F VIII:Ag and F VIII gene polymorphisms.

A study group of 58 patients with coronary heart disease and a control group of 20 patients without any coronary disease (both diagnosed with coronary angiogram) have been studied.

Polymorphisms Analysis has been made by using Polymerase Chain Reaction (PCR), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and Agarose Gel Electrophoresis Methods. ELISA method for protein C:Ag and F VIII:Ag, Coagulometric Method with deficient plasma for F VIII:C and F VIII, Coagulometric Method for prothrombin time, for aPTT, for fibrinogen, for APC and for APC-R, Enzymatic Method for serum lipid levels have been used.

In line with findings of other studies we found that F VIII:C and F VIII:Ag values were correlated ( $r=0.774$ ,  $p=0$ ) we also found that F VIII:C, F VIII:Ag, Fibrinogen and HDL Cholesterol levels were significantly higher in the study group compared to the control group (respectively,  $p<0.001$ ,  $p<0.07$ ,  $p<0.002$ ,  $p<0.07$ ).

The Study Group had 79 alleles where as the control group had 29 alleles. Positivity of Bcl-1/Intron 18 RFLP was higher in the study Group (%71). The rate for Hind III/Intron 19 RFLP positivity was lower (%19). The highest rate of heterozygosity in the study group was seen in St 14 VNTR polymorphism; This rate was %6.57 for Hind III/Intron 19 RFLP polymorphism and %11.8 for Bcl-1/Intron 18 polymorphism.

Bcl-1/Intron 18 polymorphism had a weak correlation with fibrinogene ( $r=0.306$   $p<0.01$ ) and St 14 VNTR ( $r=-0.245$   $p<0.05$ ) and a mild negative correlation with Hind III/Intron 19 Polymorphism ( $r=-0.599$ ,  $p<0.00$ ).

Hind III/Intron 19 RFLP polymorphism had a weak correlation with protein C activity ( $r=0.296$ ,  $p<0.05$ ) protein C:Ag ( $r=0.284$ ,  $p<0.05$ ) and patients having MI history in their family ( $r=-0.316$ ,  $p<0.05$ ).

Studied polymorphisms did not reveal any association with F VIII:C nor with F VIII:Ag. However in conclusion higher heterozygosity levels of Bcl-1/Intron 18 and Hind III/Intron 19 in the Study Group and different frequency of alleles for ST14 VNTR-RFLP in the Study and Control Group suggest an association between CHD and these polymorphisms.

Considering the size of F VIII gene in order to clarify the genetic factors causing high levels of F VIII:C and F VIII:Ag, there is a need to make further research in larger populations.

## 1- GİRİŞ ve AMAÇ

Ateroskleroz, genellikle yirminci yüzyılın hastalığı olarak kabul edilmesine rağmen. M.Ö. üçüncü yüzyıla ait Mısır ve Peru mumyalarında, bu hastalığa ait izler bulunmuştur. Ancak kesin olan; bu hastalığın yirminci yüzyılda epidemi boyutlarına ulaştığı ve ABD ve Avrupa'da ölüm sebepleri arasında birinci sıraya yerleştiğidir.

Klinik olarak ateroskleroz genellikle multiorgan tutulumu ile karşımıza çıkmaktadır. Ülkemizde, ateroskleroz sonucu gelişen koroner arter hastalıklarının ve bunun sonucunda oluşan myokard infarktüsünden ölüm oranları gelişmiş, refah düzeyi yüksek ülkelere benzemektedir. Ateroskleroz oluşumu ile ilgili bir çok hipotez vardır ve her geçen günde, hastalığın edinsel veya kazanılmış risk faktörlerine yenileri eklenmektedir(48, 73, 98, 161, 171).

Dislipidemide, yükselmiş lipid seviyeleri (Total Kolesterol > 200 mg/dl), HDL Kolesterol < 35 mmg/dl, LDL - kolesterol > 130 mg/dl, Trigliserid > 150 mg/dl, Lp (a) < 0.05 g/L), aterosklerozun belki de en iyi bilinen en eski risk faktörleridir (10, 13, 47, 73, 109, 141, 145, 171, 173, 185).

Hastalığın hemostaz bağlantısı ile ilgili çalışmalar; yaklaşık 160 yıl geriye dayanmaktadır. 1841'de Carl ve Rokitansky, hastalığın fibrin dahil kan komponentlerinin intimada anormal birikimi ile ilgili olduğunu ifade etmiştir. Daha sonra 1882'de Virchow endoteldeki hasara karşı doku cevab teorisini ortaya atmıştır(166).

Ateroskleroz ve arteryel tromboembolizm sonucu gelişen hastalıkların başlıca ölüm nedenlerini oluşturması, bu hastalığı oluşturan edinsel ve kazanılmış risk faktörlerinin iyi etüd edilmesine sebep olmuş ve pekçok araştırmacı, bu konu üzerinde odaklanmıştır.

Arteriyel ve venöz trombüs sonucunda oluşan CVA, DVT, İKH ve MI ve aterogenezin çok hızlı olduğu diyabet gibi bir çok hastalıkta; koagülasyon faktörleri ve diğer hemostaz parametrelerinin aktivite ve antijen seviyelerinde değişiklikler olduğu yapılan çok sayıda çalışmada bildirilmiştir. Aterosklerotik vasküler hastalıkların patogenezinde, hemostatik sistemin önemli rol oynadığını gösteren hatırı sayılır derecede

kanıt vardır(6, 7, 25, 26, 45, 51, 59, 86, 107, 124, 134, 135, 142, 143, 148, 182, 193, 196, 198).

Yapılan ilk çalışmalarda, F VIII ve venöz tromboz ilişkileri incelenmiştir. 1966'da Penick ve arkadaşları ilk defa yüksek F VIII:C ile trombofili arasındaki pozitif ilişkiyi tanımladı. Sağlıklı toplumun %11'i, 150 IU/dl'den daha yüksek F VIII:C seviyelerine sahipler. Bu kişiler F VIII:C < 100 IU/dl olanlarla karşılaştırıldıklarında, venöz-tromboz açısından beş veya altı defa daha fazla risk taşımaktadırlar(76, 112, 144, 149).

Yüksek F VIII:C seviyelerinin artmış arteriyel hastalık sıklığı ile ilgili olabileceği uzun zamandır bilinmektedir. Hemostatik parametrelerle majör iskemik kalp hastalıkları riski arasındaki ilişki ARIC kapsamında, genel populasyonda yapılan epidemiyolojik çalışmalarla ispatlanmış, yüksek F VIII: C seviyeleri ile periferal vasküler hastalık ve koroner kalp hastalığı arasında anlamlı ilişki olduğu gösterilmiştir(36, 131, 132, 133).

F VIII yüksekliğine yol açan mekanizmalar henüz aydınlatılamamıştır. Trombotik hastalarda intra-familyal F VIII artışının tespiti, F VIII yüksekliğinin genetik kökenli olduğunu düşündürmüştür(90, 102). Artık bu yüksekliğe yol açan nedenlerin genetik kökenli olduğuna dair ortak bir görüş vardır. F VIII'in dolaşımında vWF ile kompleks halinde bulunması ve vWF'ün, F VIII'i degradesyondan koruması gerçeğine dayanarak, vWF'in F VIII bağlama bölgesindeki polimorfizmler incelenmiştir. Yine benzer olarak, F V-Leiden'de olduğu gibi, F VIII'in, APC tarafından yıkılma bölgelerindeki mutasyonların, F VIII yüksekliğine yol açabileceği düşüncesi ile bu bölgelerdeki mutasyonlara bakılmıştır. Fakat ilişki bulunamamıştır. Daha sonra F VIII geni üzerinde yapılan polimorfizm çalışmalarının hiç biri böyle bir ilişkiyi teyit etmemiştir. Buna rağmen araştırmacılar F VIII yüksekliğinin moleküler temelini aydınlatmak amacıyla daha fazla polimorfizm çalışmalarının yapılmasının gerekliliğini savunmaktadırlar (1, 63, 106, 114).

Biz bu bilgiler ışığı altında yaptığımız çalışmamızda ateroskleroz ve arteriyel trombozis sonucu oluşan koroner arter hastalığı, koroner anjiyografi ile tespit edilmiş kişilerde, F VIII geni üzerinde, intron 18 bölgesinde Bel-1, Intron 19 bölgesinde Hind III ve DS52 (st 14) bölgesinde VNTR polimorfizmlerini analiz ederek, bu polimorfizmlerin, koroner arter hastalığı risk faktörlerinden olan, sigara, obezite (vücut kitle indeksi olarak), dislipidemi ve son yıllarda bu hastalık grubu için, risk faktörleri arasına sokulan hemostaz

parametrelerinden fibrinojen, F VIIı:C, F VIII: Ag, protein C aktive, protein C: Ag değerleri ile APC-R sıklığının polimorfizmlerle ilişkisi ve bunların KAH patogenezindeki yerini incelemek istedik.

Ayrıca F V Leiden'dekine benzer şekilde, ylık faktör VIII: C seviyeli koroner arter hastalarında; F VIII'in APC yıkım bölgelerinde bir nokta mutasyonu olabilir hipotezi ile ylık F VIII değerlerine, ylık veya normal protein C birlikteliğinin ve bunlara APC rezistansının eşlik edip etmediğini izleyerek de literatüre ışık tutmak istedik.



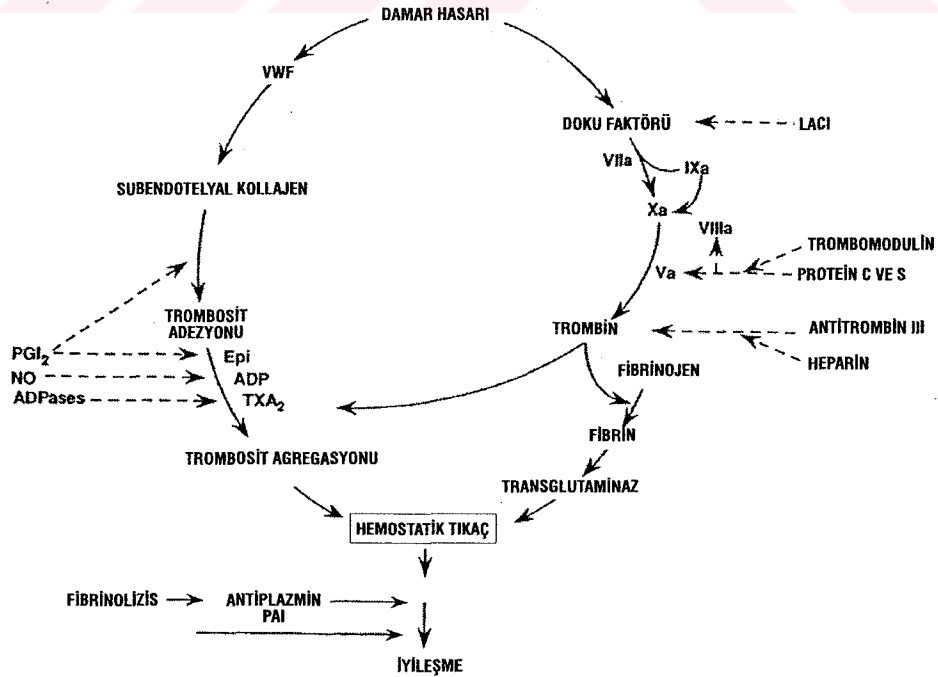
## 2- GENEL BİLGİLER

### 2.1. HEMOSTAZ

Vasküler bütünlüğün bozulmasının sonrasında, kanamanın durması olayına hemostaz adı verilmektedir. Hemostazın amacı kanamaların önlenmesi ve aşırı pıhtılaşmanın denetlenmesi olarak özetlenebilir. Bu görevin yerine getirilebilmesi için bir dizi karmaşık olayın düzen içinde gerçekleştirilmesi gerekir. Bu düzeni sağlayan mekanizmalar şöyle gruplandırılabilir:

- 1- Vasküler spazm
- 1- Trombosit tıkaçı oluşumu (primer hemostaz)
- 1- Kan pıhtılaşması (Sekonder hemostaz)
- 1- Pıhtı içinde fibroz büyüme ve fibrinolizis

Normal damar endoteliumu, kan koagülasyonunu, trombosit agregasyonunu ve fibrinolizi sağlayarak, kanın dolaşımında pıhtılaşmadan akışını temin eder (Şekil 1).



Şekil 1: Hemostaza genel bakış(32)

Endotel hücreleri ayrıca, subendotelial tabakalarda bulunan yüksek reaktiviteye sahip elementlerden, kan hücreleri ve plazma faktörlerini ayırarak; koruyucu bir bariyer de sağlar. Bu komponentler, platelet adhezyonunu sağlayan vWF ve kollajen gibi adeziv proteinleri, kan koagülasyonunu tetikleyen; fibroblast ve makrofajlarda lokalize olmuş bir membran proteini olan **Doku Faktörünü** içerirler(2). Yaralanma ile birlikte vasküler bütünlüğün bozulmasına bağlı olarak vücuttan hızla kan kaybı olmaktadır. Olayın başlangıcında zedelenen damar duvarı, trombositlerden açığa çıkan serotonin, birtakım sinirsel refleksler, hem de yerel miyojenik spazm etkisiyle kasılır. Damar duvarındaki kasılma, o anda yırtık damardan geçen kan akımını azaltır. Kan akımındaki azalma kan kaybını azaltır, fibrin tıkaç oluşumunu uyarır. Damarın yaralanma veya kesilmesi ile subendotelial dokular açığa çıkar. Böylelikle kan ile temasa geçen subendotelial doku elemanları, trombositleri aktive ederek, trombositlerin adhezyon ve agregasyonuna sebep olurlar. Bunun sonucunda da hemostatik tıkaç oluşumu stimüle edilir, kan koagülasyonu aktiflenir. Aktive olan trombositlerin membran reseptörlerinden glikoprotein I<sub>b</sub>, subendotelial doku elemanlarından vWF vasıtası ile endotele adhere olur. Trombositler yine kendi membran glikoproteinleri olan GP IIb/IIIa vasıtası ile bir başka trombosit üzerindeki GPIIb/IIIa ya fibrinogen aracılığı ile köprü şeklinde bağlanır ve trombositler agregate olur. VWF ve fibrinogen trombositlerin agregasyon ve ikmalini sağlayan kofaktörlerdir. Trombositin alfa granüllerinden proteinlerin sekresyonu, tromboxan A<sub>2</sub> sentezi, spesifik proteinlerin fosforilasyonu ve intrasellüler Ca translokasyonu aracılığı ile sağlanır. Trombositler tarafından salınan veya plazmadan türeyen Faktör V gibi protein kofaktörler, trombositlerin yüzeyinde enzim-kofaktör birleşmesini (için bir kaynak gibi yardım ederler) sağlarlar. Bunun sonucunda, protrombin de aktive olur ve sonuçta trombin oluşur. Oluşan trombin trombositleri stimüle eder. Faktör V ve VIII'i aktive kofaktörlere çevirerek kendi üretimini çoğaltır. Trombinin protrombin üzerine dolaysız proteolitik etkisi vardır. Onu parçalayarak daha çok trombin oluşturur; böylece de kendi kendini çoğaltır. Ayrıca protrombin aktivatöründe görevli bazı pıhtılaşma faktörlerini (Faktör V, VII, VIII, IX, X, XI, XII) etkinleştirir (Şekil 1). Trombositlerde ise agregasyon meydana getirir. Bir kere belirli bir miktarda trombin meydana gelince onun etkisi ile daha fazla pıhtılaşma ve daha fazla trombin oluşması; kan pıhtılaşmasını giderek artıran bir kısır döngü demektir. Böylece kan pıhtısı başka bir olay bu büyümeyi durduruncaya kadar büyümeye devam eder(2, 3, 14, 32, 68).

Bu hücrel ve moleküler reaksiyon patlaması, endotel hücresi tarafından sentezlenen, PGI<sub>2</sub> gibi antitrombotik lipidlerin, trombomodulin gibi proteinlerin ve nikrik oksid gibi inorganik bileşiklerin ve heparan gibi polisakkaritlerin sentez ve sekresyonun çok iyi organize olmuş hücrel düzenlemesi ve bazı plazma proteaz inhibitörleri (bunların en önemlisi; Faktör IXa, Xa ve trombin için AT-III; Faktör XIIa, Faktör XII ve kallikrein gibi kontakt sistem enzimleri için C1 inhibitör; Faktör XIa için  $\alpha_1$  antitripsin ve genel bir back-up olarak da  $\alpha_2$  makro-globulin) tarafından düzenlenir. Trombinin başlıca substratı fibrinojendir. Trombinin başlangıç hidrolizinden sonra, fibrin pıhtısı oluşur. Polimerizasyonun erken evrelerinde fibrin monomer molekülleri, birbirine oldukça gevşek hidrojen ve hidrofob bağlar ile bağlanır. Bu sırada polimer zincirler henüz zayıftır, kolaylıkla kopabilir. Bu aşamada, diğer bir plazma globulini olan ve trombin tarafından aktive olmuş enzim faktör XIIIa'nın enzimatik etkisi ile, yanyana gelmiş polimer zincirler arasında kovalent-çapraz bağlar kurulur. Oluşan pıhtının fibrinolize rezistansı artar(14, 32, 68, 77, 194).

Bir plazma zimojeni olan plazminojen, endotel hücrelerinden salınan plazminojen aktivatörleri (tPA) tarafından, plazmine çevrilir. Bu işlem en az üç plazminojen aktivatör inhibitörleri (tPAI) ile düzenlenir. Plazmin, anti-plazminin varlığından dolayı, dolaşımdaki fibrinojen üzerine normal olarak etkisizdir. Buna rağmen, plazmin, fibrin pıhtısının üzerinde inhibitörlerden korunur ve fibrinolizis gerçekleşir. Bunun sonunda da fibrin yıkım ürünleri (fdp) oluşur. Pıhtının erimesi, kollajenin kapanması (deposition), fibröz doku oluşumu ve yara iyileşmesi için zemin hazırlar. Hemostazın ana hatlarını böylece özetledikten sonra, hemostazda önemli rol alan hücreleri ve hücrel elemanları ve fonksiyonlarını gözden geçirelim(14, 32, 52, 68, 100).

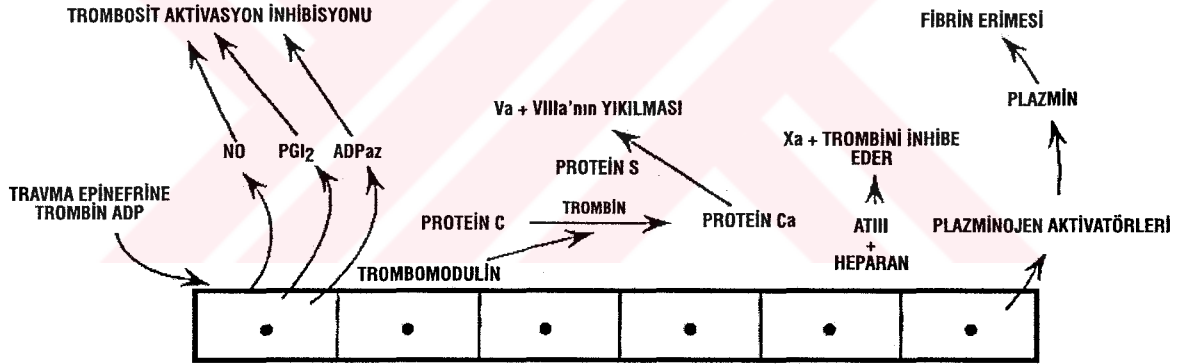
## 2.2. ENDOTEL

Tüm kan damarlarının iç yüzeyinde tek tabakalı endotel hücreleri uzanır ve akan kan ile sürekli temas halindedir. Endotel hücreleri, hücreleri damara bağlayan subendotel üzerinde otururlar ve çok fonksiyonlu hücrelerdir. Hemostazisin düzenlenmesi, vasküler tonusun denetimi, kan ve dokular arasında solitlerin hareketinin denetimi, bu

görevlerdendir. O halde artık endotel tüm vücuda yayılmış metabolik olarak aktif bir doku kabul edilebilir(14,145).

Damar cidarında endotel hücreleri parke taşı görüntüsünde bir tek tabaka oluştururlar. Boyutları 10-50  $\mu\text{m}$ 'den 25-40 mikrometreye kadar değişen bu poligonal hücreler uzun eksenleri kan akımına paralel olacak şekilde yerleşmişlerdir(145).

Normal endotel, dolaşımda kanın pıhtılaşmadan akışını temin eder. Bunu da, kan koagülasyon inhibitörlerini üreterek, vasküler tonüsü ve permeabiliteyi ayarlayarak, subendoteliyal reaktif maddelerden, hemostatik kan komponentlerini ayıran bir zarf temin ederek sağlar. Endotel hücreleri bazal membran ve extrasellüler matriks elemanları olan kollajen, fibronekten ve vWF gibi adheziv proteinleri sentez ve sekrete ederler (Şekil 2).



Şekil 2: Endotel hücrelerinde gerçekleşen reaksiyonlar(32)

Endotel, yüzeyinde trombomodulin ve heparan-sulfatı sentez ve sekrete ederek kan koagülasyonunu inhibe eder; doku plazminojen aktivatör (tPA), plazminojen aktivatör inhibitörlerini (PAI) sentez ve sekrete ederek fibronilizi düzenler, PGI<sub>2</sub> ve nitrik oksitleri salarak platelet agregasyonunu inhibe eder, vazokonstriksiyonu indükleyen endotelinleri ve vazodilatasyon oluşturan PGI<sub>2</sub> ve NO'yu sentezleyerek damar tonusunu regüle eder(14, 32, 77, 94, 182).

Eğer endotel kan hücrelerine daha fazla geçirgen olursa; damar duvarı veya ekstra-vasküler destek dokuların yapısal anomalilerinden dolayı vazokonstriktif cevap bozulursa

veya fizyolojik fibrinolizis, plazminojen aktivatör inhibitörünün (PAI) normal üretimi ile kontrol edilemezse, oluşan defektif vasküler fonksiyon anormal kanamaya sebep olabilir. Endotel hasarı ile birlikte olan kanama, immun kompleksler ve virüsler aracılığı ile olabilir. İnflamatuvar durumlarda lökositlerden salınan proteolitik enzimler, endotel hücreleri etkiler ve konnektif doku proteinlerini değiştirir ve vaskülitik hastalıklarda görülen peteşiyal hemorajilerin oluşumuna da katkıda bulunur(32, 68).

Endotel hücreleri, trombin gibi enzimler, interlökin-1 (IL-1) tümör nekrozis faktör (TNF) ve  $\gamma$  interferon ( $\gamma$ -INF) gibi sitokinler, DDAVP (1 Desamino-8-D-arginin-vazopressin-Desmopressin asetat-bir vazopresin analogudur. Normal kişilerde Faktör VIII ve vWF'ün titresini artırır) ve endotoxin gibi sentetik hormonlar tarafından stimüle edildiğinde; non-trombojenik koruyucu özelliklerini kaybederler, doku faktörü (TF) ve plazminojen aktivatör inhibitör 1 (PAI-1)'in sentezi indüklenir ve yüzeye bağlı trombomodulin konsantrasyonu, sitokinler ve endotoksin tarafından azaltılır. DDAVP, yüksek molekül ağırlıklı vWF multimerlerinin salınımını artırırken, incinmiş damar duvarına trombosit adhezyonunu artırabilir. Endotelial hücreler, integrinler diye adlandırılan reseptörler ihtiva ederler. Bunlardan VLA tipi, fibronektin ( $\alpha_1 \beta_1$ ), kollagen ( $\alpha_2 \beta_1$ ), Laminin ( $\alpha_3 \beta_1, \alpha_6 \beta_1$ ) bağlanmasına müsaade eder; sito-adheziv tipi vitronektin reseptördür. Endotelial hücreler, inter sellüler adezyon molekülleri de ihtiva ederler. Bu endotelial adhezyon molekülleri, lökosit adezyonu için counter-reseptör olarak rol oynar(32, 64).

Endotel, hem metabolik, hem de yapısal olarak heterogendir. Mesela; konverting enzim pek çok endotel hücresi tarafından sentezlenir, fakat başlıca aortik endotelinde sentezlenir. Kardiak küçük damar endotelinde sentezlenemez. Diğer taraftan; thromboxan A2 çoğu endotel hücrelerinde sentezlenmez; fakat pulmoner arteriyel endotelde sentezlenir. Endotel hücre turn-over'ı dinlenme durumlarında düşüktür. Endotel hücrelerinin stratejik mevki doku ile kan arasındaki transport işlemlerinin regüle edilmesini sağlar. Bu hücreler, hücrelerin ve solitlerin pasif transferini önleyen selektif geçirgen bir bariyer oluştururlar. Hidrofilik moleküllerin transendotelial geçişi vasiküller aracılığı ile (endositoz), yahut da hücreler arası boşluklardan (difüzyon) olur. Plazma zarı tarafından oluşturulan veziküller bazen tüm sitoplazma boyunca devam ederler ve transport için çok önemli kanalımsı yapılar oluştururlar. Yüzeydeki çukurluklar ve vesiküller, reseptör aracılı endositozda da rol oynarlar. Bu bağlamda en önemli makromoleküllerden biri LDL'dir(14, 68).

Endotelin incelmesi ve artmış fenestasyon, trombositopeni ile birlikte olan bariyer-fonksiyon kaybından sorumlu olabilir. Trombositopeni eritrositlerin damar dışına akışını (çıkışını) indükler ve klinik olarak pateleşi ortaya çıkar. Bu olay post-kapiller venüler inter-endotelyal kanallarda vuku bulur(32).

Endotel hücreleri ileri derecede negatif yüklüdür. Bu da negatif yüklü trombositlerin endotel yüzeyi tarafından itilmesine neden olur. Bu anyonik yüzey, damar zedelenmesi ile indüklenen hemostatik reaksiyonların intravasküler yayılımının sınırlanmasında, diğer antitrombotik özellikler kadar önemlidir. Böylece, hemostatik plak oluşan bölgelere yakın endotel hücrelerinde sentezlenen ve salınan  $PGI_2$  intravasküler trombosit agregasyonunu inhibe eder. Trombomodulin ve heparan-sülfat endotel yüzeyine bağlı iki trombin inhibitörüdürler, hemostatik plaktan başka, inter-vasküler fibrin yayılımını da sınırlarlar. Bir glikozaminoglikan olan ve damar endotel yüzeyinde ortaya çıkan heparan-sülfat, AT-III'ü aktive eder, trombin ve Faktör Xa'nın inhibisyonunu katalizler(14, 32, 44, 194).

Yine endotel yüzeyinde açığa çıkan trombomodulin, trombinin bağlar ve onun fibrinojeni yıkan enzimatik etkisini inhibe eder. Protein C'nin aktivasyonunu belirgin derecede artırırken aynı zamanda, trombositler ve Faktör Va ile VIIIa'yı aktive eder. Protein C ise tersine; Faktör Va ve VIIIa'yı inaktive eder, fibrinolizi artırır. Bunu da muhtemelen bir plazminojen aktivatör inhibitörünü (PAI) bağlayarak yapar. Trombomoduline bağlanan trombin; dolaşımdaki AT-III ile de inaktive edilir, bu aktivasyon heparan-sülfat tarafından hızlandırılır. Protein C aktivitesi, protein C-inhibitör (PAI-3) kadar,  $\alpha_1$ -proteinaz inhibitör tarafından da kontrol edilir, bir kofaktör olan protein S tarafından ise, stimüle edilir. Protein S C4b ile kontrol edilir. Protein S'in %60'ı C4b ile kompleks oluşturur; bu şekilde C4b inaktivasyondan korunur. Protein C tarafından fibrinolizin artırılışı protein S'e bağlıdır. Trombinin trombomoduline bağlanması, koagülan etkinin kaybolmasına ve aktive protein C'nin gücünün yükselmesine sebep olur. Böylece trombogenesis inhibe olur(14, 32, 81).

Endotel hücreleri tarafından  $PGI_2$ 'nin sentezi trombin, epinefrin ve travma gibi stimuluslar tarafından stimüle edilir. Histamin, ATP ve asetilkolini içeren diğer agonistler, hücre guanilat siklazını stimüle ederler, bu da hücre içi sıklık guanozin monofosfat (GMP) seviyesini yükseltir. Sonuçta nitrik asit (NO) (daha önce endotelyel hücre gevşetici faktör –

Endothelial cell relaxing factor – olarak adlandırılırdı). Böylece uygun bir stimulus sentezine maruz kalan endotel hücreleri, vazodilatasyon mediatörleri ve trombosit fonksiyonunu inhibe eden mediatörleri sağlar. Stimüle edilmiş endotel hücreleri, vazokonstriksiyon dahil, tam zıt etkilere sahip endothelinler olarak bilinen bir grup peptidleri de sentezler. Endotel hücreleri, plazminojen aktivatörlerini de meydana getirirler. Plazminojen aktivatörleri, fibrin mevcudiyetinde, fibrinolizi başlatır. Duyarlı hastalarda bir kanama eğilimini tetikler. Kanama eğilimi, sentetik ve doğal fibrinolitik inhibitörlerle kontrol edilebilir. PAI-1 farklı bir zaman diliminde, farklı stimulusa cevap olarak meydana getirilir. PAI-1'in eksikliği, kanama eğilimine sebep olur. Karşı konulmamış bir fizyolojik fibrinolizis, hemostatik dengeyi bozar(68, 81).

Endotel hücreleri; PAI-1'in sentez ve salınımı, vWF'ün salınımı ve doku faktörünün sentez ve mevcudiyeti ve hücre membranına bağlı trombomodulinin azalışı ile karakterize bir pro-koagülan cevabı oluşturmak için, sitokinler ve diğer mediatörler tarafından stimüle edilir. Post-operatif ve post-travmatik olarak fibrinolitik işlevin durması PAI-1'in sentezinin artışı ile ilgilidir ve doku hasarına cevap olarak meydana getirilmiş sitokinler aracılığı ile olur. Bu cevap; yeni oluşmuş pıhtıyı erken çözülmeden korur. Aynı zamanda post-operatif venöz tromboz riskini de artırır(14, 68, 81).

Damar duvarında endotel lümeninden türeyen mediatörler ve karşıt mediatörler arasındaki karmaşık ilişki ve hatta arter ve venlerin vazomotor regülasyonu hemostasis ve yara iyileşmesini etkiler. Bu vasküler işlemlerin hepsi, trombositlerde ve plazma koagülasyonunda, fibrinolitik ve inhibitör yollardaki benzer kompleks işlemler, normal hemostazisi sürdürmek için uyum içerisinde hareket ederler. Buna rağmen, ara sıra hemostatik cevap fazladır ve intravasküler trombozise yol açar(14, 68).

### 2.3. TROMBOSİTLER

Trombositlerin hemostaza katkısı bu fizyolojik prosesin ana komponentini oluşturmaktadır. Gerekli reaksiyonlar; trombositlerin kan damarının kesik ucuna adezyonunu, adezyon yapan trombositlerin subendotelial alana seçilmesini, depolanmış trombosit kümelerinin sekresyonunu ve büyük trombosit agregatlarının oluşumunu kapsamaktadır. Ek olarak; Trombosit membranı pıhtılaşma faktörlerinin absorpsiyon ve

toplanması için uygun bir hale gelir ve pıhtılaşma hızlanır. Neticede; trombositler fibrin ağıyla desteklenir aksi taktirde oluşan tıkaç kolay ezilebilir, dayanıksız trombositlerden oluşacaktır. Sıkı trombosit fibrin pıhtısı sonradan gerileyerek daha küçük bir hacim alır ki bu da yine trombositlere bağımlı olarak gerçekleşir.

Trombositler normal damar endotel hücrelerine yapışmazlar; ama endotel hasarında örneğin; hasarlanmış damar duvarı söz konusu olduğunda; adeziv proteinlerin, VWF'ün trombosit glikoprotein kompleksi GPIb/IX vasıtası ile, fibrinojen ve fibronektinin integrin reseptörleri vasıtasıyla yapışmasını sağlarlar. Her ne kadar bu bir basitleştirme olabilirse de; bu adeziv proteinlerin trombositlerden subendotelyal bağ dokuya bir köprü oluşumuna katıldığı düşünülüyor(169).

Bu olayların önemi; hastalarda GPIb/IIIa'in eksik olduğu Bernard-Soulier hastalığında meydana gelen kanamayla veya VWF'ün azaldığı ya da defektli olduğu von Willebrand hastalığıyla tanımlanabilir(140).

Trombosit GPIV ve Integrin Ia/IIa kompleksi ile kollegenin etkileşimi diğer adhesiv olaylardandır. Kollajenin bu her iki platelet reseptörlerinin anormallikler kanamaya sebep olur.

Trombositler subendotelyuma bir kere yapışınca olunca subendotelyum yüzeyine yayılırlar, diğer trombositlerde kan akımı ile taşınır, önce adhere olmuş trombositlerin bazal tabakasına sonra birbirine adhere olur ve agregre olmuş bir trombosit kitlesi oluşur. Trombosit agregasyonundaki önemli bir olay, yüzey membran GPIIb/IIa'nın düzenindeki değişikliğin indüklenmesidir. Bu değişiklik, GPIIb/IIIa'ya, fibrinojen kadar, VWF, fibronektin ve vitronektini bağlama kapasitesi kazandırır. Fibrinojen divalant yapısından dolayı agregasyonda en önemli komponenttir. Fibrinojen plateletler arasında bir köprü oluşturarak agregasyona katkı sağlar(32, 68).

Trombosit yüzeyindeki bazı integrinler adhesiv plazma proteinleri için reseptör görevi yaparlar. Vitronektin reseptörleri gibi heterodimerler, hem kan hem de endotelyal hücrelerin yüzeyinde bulunurlar. VWF ve kollagen, dinlenme halindeki trombositler ile etkileşebilirken, fibrinojen yalnızca aktive trombositler üzerinde bir integrin olan GPIIb/IIIa ile yüksek affiniteli bir bağ oluşturur. Konjenital bir bozukluk olan

Glanzmann's trombastenisinde; GPIIb/IIIa kompleksi yetersizdir ve fibrinojen bağlanmasındaki defekt, bir kanama eğilimi oluşturur. Yine, konjenital afibrinojenimide, görülen kanama trombosit agregasyonundaki bir anormallikten kaynaklanır.

En önemli trombosit agonistleri, proteolitik bir enzim olan trombin, adenosine difosfat (ADP), kollajen, araşidonik asit, ve epinefrindir. Bunlardan yalnızca epinefrin trombosit şeklinde hatırı sayılır bir değişiklik oluşturmaz. Bu agonistler için trombosit yüzeyinde spesifik reseptörler vardır.

Reseptör agonist komplekslerinin bir çoğu trombosit membranı üzerinde protein bağlanması yaparak etkileşir, bunun için, G protein diye adlandırılan guanosin tri-fosfata (GTP) gereksinim vardır. Trombosit membranındaki iyon-permeabl kanallarına proteinlerin bağlanması, iyon akışını module eder, özellikle de iyonize kalsiyum içeri doğru hareket eder. Protein-kinazlara bağlanmış olan diğer agonistler reseptör proteininin kendisi üzerinde bazı bölgeleri fosforilize ederler. Bazı kimyasal olaylara, trombositlerin diskoid şekillerinin normal olarak sürdürülmesini sağlayan ekvotal mikrotübül bantların kayboluşu, depo granüllerinin santralizasyonu ve pösodopodlerin oluşumu gibi görülen etkiler eşlik eder. Stimülatör agonistler, fosfolipaz-C'nin aktivasyonuna sebep olurlar. Bu da fosfotidil-inositol-bifosfati (PIP<sub>2</sub>) parçalar ve inositol-trifosfat (IP<sub>3</sub>) di-acilgliserol oluşur. IP<sub>3</sub>, kastaki sarkoplazmik retikuluma analog olan dense-tabuler sistem olarak bilinen, kalsiyum depo organelleri üzerindeki reseptörler ile etkileşir ve iyonize kalsiyumun mobilizasyonuna sebep olur. Bu kalsiyumun sitoplazmik konsantrasyonunu artırır(14, 32).

Trombosit aktivasyonu ile ilgili birçok proses; kalsiyum bağımlı proseslerdir. Bunlar, spesifik kinazlar tarafından, miyozinin hafif zincirinin fosforilasyonu, fosfolipaz A<sub>2</sub> enzimi tarafından membran fosfolipidlerinden araşidonik asitin açığa çıkmasıdır. Fosfolipaz A<sub>2</sub>, fosfotadil kolin ve diğer fosfolipidlerden araşidonik asiti açığa çıkarır. Araşidonik asit, siklo-oksijenaz enzimi tarafından, prostaglandin, endoperoxitler ve sonunda güçlü trombosit agonisti olan tromboxin A<sub>2</sub> PGD<sub>2</sub> gibi stabil prostaglandinlere çevrilir. PGD<sub>2</sub>, trombosit aktivasyonunu inhibe eder ve negatif bir feed-back sistemi oluşturarak, trombosit aktivasyonunun modülasyonuna yardımcı olur. Aspirin'in en geniş kullanım amacı, trombositler üzerine olan bu majör etkisinden dolayıdır. Intraselüler yüksek kalsiyum konsantrasyonları (mesela; trombosit stimülasyonundan sonra olan)

nötral sistein proteas'ı (calpain) aktive eder bu da sito-skeletal proteinlerin yeniden şekillenmesine katkıda bulunur ve reseptör proteinleri yıkar(32, 68).

Fosfolipaz C'nin katalizlediği reaksiyonun bir ürünü olan  $IP_3$  gibi Diacilgliserol de, hemen her yerde bulunan bir enzim olan Protein-kinaz C'yi trombositlerde aktive eder. Protein kinaz C'de, kinaz aktivasyonunun bir markırı olan 47 kDa'luk bir proteini fosforile eder. Bu protein kesin olarak tanımlanmamıştır. Fakat negatif feed-back oluşturan bir fosfotaz olabilir ve sonuçta  $IP_3$  tarafından yükseltilmiş iyonize kalsinin miktarı düşürülür. Diacitgliserol trombosit aktivasyonu sırasında olan kalsiyumdan bağımsız "calcium-independent" reaksiyonlardan sorumludur, iyonize kalsiyum birlikte protein C'yi aktive eder, sekresyon stimule olur(32).

Trombositler, içlerinde farklı intrasellüler elemanları taşıyan birkaç çeşit granül ihtiva ederler. Bu hemostazda açıklandığı gibi,, "densegranuller" (dense bodies) Serotonin, adenosine tri fosfat ATP, ADP, pirofosfat ve kalsiyum ihtiva eder,  $\alpha$  granüller fibrinojen, VWF, Faktör V, yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HK, high-molecular weight kininojen), fibronektin,  $\alpha_1$  anti-tripsin,  $\beta$  tromboglobulin trombosit faktör 4 (Platelet factor 4-PF4) trombosit kaynaklı büyüme faktörü (Platelet derived growth factor) ve lizozomlardır (asit hidrolazları ihtiva ederler). Trombositlerin stimülasyonunu takiben bu granüllerin santralizasyonu sonucu yapısal kontraktıl elemanları aktive olur. Aktin filamentinin polimerizasyonu, miyozinin fosfolizasyonu, reseptör aracılı stimülasyona platelet cevabındaki göze çarpan reaksiyondur. Yükselmiş sitoplazmik kalsiyumun mevcudiyeti, intra-seluler kanalikullerin membranları ile granüler zarfın füsyonuna sebep olur ve granül muhteviyatı dışarı sekrete edilir(14, 194).

ADP'nin iki reseptör ile etkileştiği düşünülmektedir. Bunlardan biri, aggregin (100 kDa) trombositlerin şeklini değiştirir ve agrege eder, yapısı bilinmeyen ikincisi, stimule edilmiş adenilat siklaz aktivitesini azaltır ve trombosit sıklık AMP'sinin miktarını düşürür. Trombositler ile epinefrinin etkileşiminden sorumlu  $\alpha_2$ -adrenerjik reseptör klonlanmış ve zincir analizi yapılmıştır. Tromboxan  $A_2$  ve  $PGH_2$ 'nin de reseptörleri de bağlaması gösterilmiştir. Bütün bu reseptör-agonist etkileşimleri sonucunda, fonksiyonel fibrinojen bağlama bölgeleri meydana çıkar. Fakat bunun mekanizması henüz aydınlanmamıştır(32, 182, 194).

Trombositler aktive olunca yüzeylerinde, spesifik plazma koagülasyon faktörleri için reseptörler belirir özellikle de Faktör V (Va), trombositler tarafından sekrete edilir ve trombosit yüzeyinde açığa çıkar hem de, plazma Faktör V'i, trombosit yüzeyine bağlanır. Aktif trombosit yüzeyinde beliren anyonik fosfolipidlerle birlikte yüzeyde açığa çıkmış reseptörler, Faktör Va'nin de bir bağlanma bölgesi olarak fonksiyon görürler. Böylece de Faktör Xa tarafından protrombinin trombine çevrilmesi için etkin katalitik bir ortam temin ederler. Trombositler üzerinde Faktör IXa'nın bağlandığı ve Faktör X'u Xa'ya çeviren benzer bir sistem daha vardır(14, 194).

Trombosit aktivasyonu ve onun etkilerini düzenleyen ve en önemlisi, siklik 3',5' AMP olan birkaç regülatör madde vardır. İnsan eritrositleri hariç, hemen hemen tüm hayvan hücreleri ve trombositler adenilat-siklaz ihtiva ederler. Bu enzim, ATP'ı cAMP'ye çevirir. Adenilat siklaz, trombositlerde araşidonik asit ürünleri olan prostoglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), endotel hücrelerinde ise prostosiklin (PGI<sub>2</sub>) tarafından güçlü olarak aktive edilir. Trombositler siklik AMP'yi AMP'ye çeviren siklik nükleotid fosfodiesterazları ihtiva ederler. Bunlar da intra-sellüler cAMP konsantrasyonlarını regüle ederler. cAMP, ATP bağımlı bir kalsiyum pompa sisteminin fosforilasyonuna aracılık eder bunun sonucunda kalsiyum sitozolden atılır. Yeterli konsantrasyonlarda, cAMP yalnızca trombositlerin agregasyon, sekresyon ve şekil değişikliğini inhibe etmekte kalmaz, aynı zamanda trombositlerin yüzey adezyonunu da inhibe eder(182, 194).

Trombosit aktivasyonunun diğer kontrolörleri, endotel hücreleri üzerinde bulunan, ADP'yi yıkan bir ekto-enzim (ADP az) ve güçlü bir trombin inhibitörü olan trombomodüldür. Endotel hücreleri ATP gibi agonistler tarafından stimule edildiğinde, EDRF (endothelium derived relaxing, factor veya nitrik oksid-NO) üretirler. Bu da, cGMP (sıklık gurinozin monofosfat) miktarını artırarak, trombosit fonksiyonlarını inhibe eden güçlü bir vasodilatördür. Son çalışmalar, trombositlerin L-argininden nitrik-oksit (NO) oluşturma kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir. Bu da sıklık GMP konsantrasyonunu yükseltir, c-GMP'da intrasellüler güçlü bir trombosit aktivitesi regülatörüdür(194).

## 2.4. KOAGÜLASYONA GENEL BAKIŞ

Kan koagülasyon prosesi, memeli dolaşım sisteminin bütünlüğünü sağlar. Vasküler hasara cevap olarak kan, vasküler elementler, doku ve plazma proteinlerinin etkileşimini içeren regüle bir seri kompleks olaylar vasıtası ile hemostatik mekanizma tetiklenir. Bu cevap mekanizması çoğunlukla vasküler hasarın tabiatından bağımsızdır. Aynı proses, başlatıcı olay, bir delinme hasarı veya kanın içinde veya kan damarının kendisindeki patoloji olup olmadığına bakılmaksızın tetiklenir. Hücrel ve moleküler cevabını sonucunda, hemoraji, kontrollü hemostasis veya tromboz oluşur(14, 32).

Hemostatik cevap bir enzimatik reaksiyonlar şelalesi olarak tanımlanabilir. Bu reaksiyonlar bir grup plazma proenzimini, aktif formlarına çevirir. Prosesin en son enzimi  $\alpha$  trombin'dir. Bu da çözünür plazma fibrinojenini sınırlı bir proteoliz ile, çözünmez fibrin polimerlerine çevirir.

Koagülasyon testlerini intrinsik ve ekstrinsik yol diye bölmek geleneksel (ve in-vitro laboratuvar testleri için faydalı) olmasına rağmen böyle bir ayırım in-vivo olarak gerçekleşmez. Çünkü doku faktörü/faktör VIIa kompleksi, Faktör X kadar, Faktör IX'uda aktifler(14, 68, 100).

### Ekstrinsik Sistem

İn-vivo kan koagülasyonunun başlangıç yolu ekstrinsik sistemdir. Bu sistemin komponentleri hem kan, hem de vasküler elementlerden oluşur. En önemli komponenti, bir kofaktör olarak fonksiyon gören doku faktörüdür. Doku faktörü tek bir polipeptid zincirinden ibaret intrinsik bir membran proteindir. Ekstrinsik sistemde olay, Faktör VII ve doku faktörü ile başlar. Doku faktörünün kan dolaşımını dışında yer alması nedeni ile bu yola ekstrinsik sistem yolu denmiştir.

Doku faktörü, kofaktör olarak fonksiyon yapar, bu yönden kontakt fazda, HK (high moleküler weight kininogen-yüksekmolekül ağırlıklı kininogen) ile, intrinsik sistemde Faktör VIII'de ve "son ortak yolda" da faktör V'in fonksiyonları ile benzer. Ekstrinsik yol inhibitörü lipoprotein-associated coagulation inhibitör denen bir proteindir ve Faktör Xa'nın varlığında Doku Faktör/Faktör VII kompleksini inhibe eder. Doku faktörü,

makrofajlarda ve endotel hücrelerinde sentezlenir. Sentez ve interlökin-1 (IL-1) ve tümör nekrosis faktör (TNF) gibi sitokinler ve endoksin tarafından indüklenir(32, 68, 100).

Ekstrinsik yolun başlıca plazma komponenti Faktör VII'dir. Faktör VII, Vitamin K'ya bağımlı bir grup proteinden (bunlar; Faktör IX, X protrombin ve protein C'dir) biridir ve pro-zimojen olarak sentezlenir ve sınırlı sayıda bir proteolitik kesilme ile serin proteaza çevrilerek aktif forma döner. Protein S'de vitamin K'ya bağımlı bir proteindir, bir zimojenden ziyade bir kofaktördür. Bu proteinlerin ortak yanları molekülün N terminal ucunda bulunan  $\gamma$ -karboksi glutamik asit kalıntılarına sahip olmalarıdır. Gla-proteinleri olarak da isimlendirilen bu proteinlerin amino terminal bölgesindeki glutamik asitlerin bir kısmı post-translasyonel bir modifikasyonla gama-karboksi glutamik asite dönüşür. Bu dönüşüm öncesinde moleküle pro-peptid denir. Bunlarda hiç Gla bulunmaz ve biyolojik aktivite göstermezler. K vitamini Gla oluşumunu katalizleyen karboksilaz enziminin kofaktörüdür. Gla kalsiyum iyonlarını bağlayarak (bir Gla artığının iki karboksil grubuna bir kalsiyum bağlanır) proteinin üç boyutlu yapısının değişmesine sebep olmaktadır. Bu sayede koagülasyon proteinleri, negatif yüklü membranlara, özellikle fosfatidil-serine bağlanabilmektedir. Aktive olmuş trombositlerde membran değişiklikleri olur, reseptörlerin miktarı ve konumu farklılaşır. Aktivasyon sırasında, fosfatidil-serum membranının dış yüzeyinde bağlanmaya hazır konuma geldiği için koagülasyon proteinlerinin bağlanması kolaylaşmaktadır(14, 32, 183).

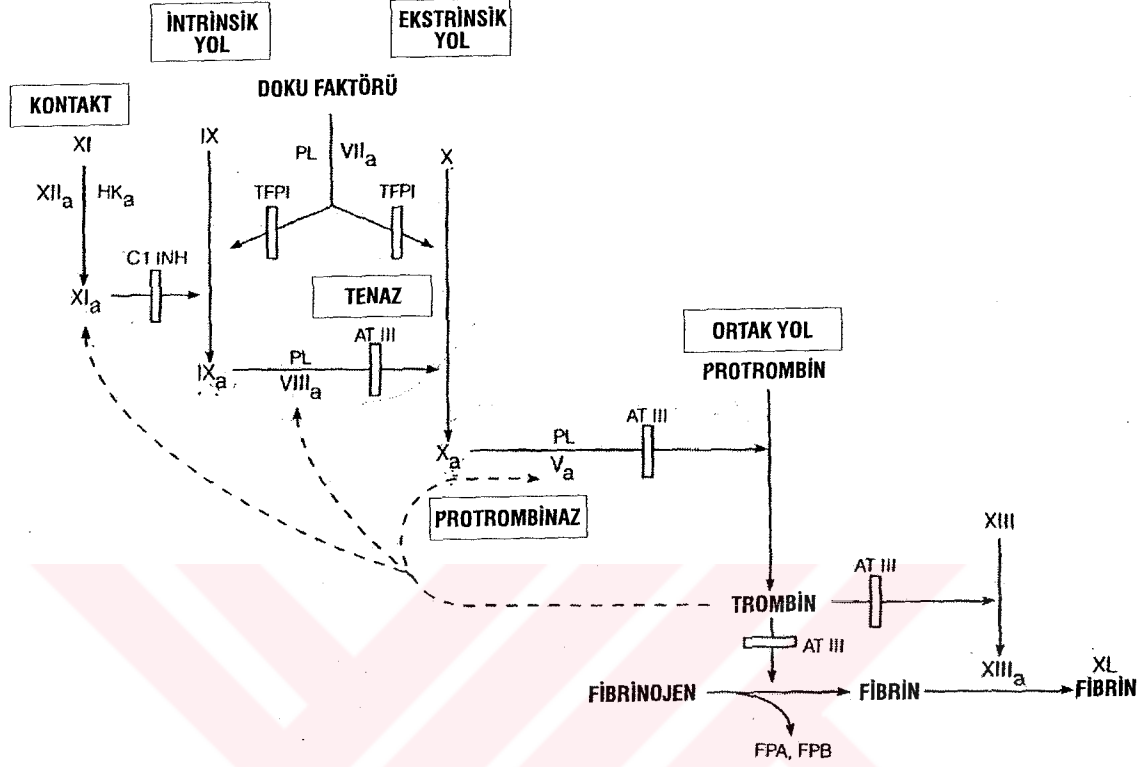
Faktör VII'nin koagülasyon aktivitesi, kontakt sistemdeki Faktör XIIa ile veya Faktör VII'nin kendi substratlarından biri olan IXa ile artırılır. Bu aktivasyon için doku tromboplastini gerekir ve Faktör VII, daha aktif formu olan VIIa'ya çevrilir. Koagülasyon şelalesinin birkaç seviyesinde intrinsik ve ekstrinsik yollarda etkileşim olur. Zimojen faktör VII, minimal, fakat belirli bir proteaz aktivitesine ve oto-aktivasyon kapasitesine sahiptir. Faktör Xa, önce Faktör VII'yi VIIa'ya çevirir sonra inaktive eder. Yani hem pozitif hem de negatif feed-back etki gösterir.

Aktive edilmiş monositler veya hasarlanmış endotel hücreleri üzerinde toplanan Faktör VIIa/Doku faktörü enzim kompleksi başlıca iki substrata sahiptir. Bunlar, her ikisi de vitamin K'ya bağımlı proteinler olan, Faktör IX ve Faktör X'dur. Her iki proteinin de kesilmesi ile serin proteazlar olan Faktör IXa ve Xa oluşur ve bunlar membrana bağlı kalırlar. Bu faktörlerin Gla residüleri uygun kofaktörlerin mevcudiyetinde daha sonra

reaksiyonları kolaylaştırırlar. Faktör IXa'nın, Faktör X'u, Xa'ya çevirmesi için gerekli kofaktör, Faktör VIII'dir(32, 183).

Faktör VIII, plazmada, çoğunlukla VWF ile nonkovalent bir kompleks olarak bulunur, koagulasyondaki fonksiyonu, Faktör IXa'nın, Faktör X'u, Xa'ya çevirisini hızlandırmaktır. Faktör VIII ve IX'un eksikliği hemofili sendromlarının temelini oluşturur ve klasik hemofili A ve B'ye sebep olur. Bu da bilinen hemorajik durumların ortaya çıkmasına yol açar. Faktör VIII ve IX'un eksikliği ile ilgili hemorajik durumların benzerliği, Şekil 3'de görüldüğü gibi her ikisinin de X'nun aktivasyonu için önemli olan "Tenase" kompleksi içinde yer almasındandır. Faktör VIII ve IX'un konsantrasyonları, klinik bozuklukların şiddetini belirler. Bu iki faktörün eksikliği ile ilgili en ağır klinik tablo, spontan eklem hemorajileri (hemartroz) ile açığa çıkar. Bu durumda faktör VIII ve IX seviyeleri %0 ile %1 olur. Faktör seviyeleri %5 ile 30 olursa semptomlar hafiftir. Ameliyat gibi ciddi travma hariç görülmeyebilir de %30'un üzerindeki aktivite ekseriye normal hemostasis için yeterlidir(14, 32).

Faktör VIIa/Doku faktörü kompleksi ile, Faktör Xa'ya direkt çevrilisinde, Faktör VIII ve IX'a ihtiyaç yoktur. Bununla beraber, Faktör VII ve X eksikliği benzer hemorajik durumları gösterir. Bunları birbirinden ayırmak için spesifik koagulasyon faktör aktivitelerinin tayin edilmesi gerekir. Doku faktöründe klinik olarak ayırtedilebilir bir azalma tespit edilmemiştir.



Şekil 3: Koagülasyon mekanizması(32)

### İntrinsik Yol

Ekstrinsik sistem ile paralel olan intrinsik sistem, tamamıyla vasküler sistem içinde bulunan komponentler vasıtası ile başlatılan koagülasyon olarak tanımlanabilir. Bu yolun sonunda dimerik bir serin proteaz olan Faktör XIa tarafından Faktör IX aktiflenir. Faktör XIa, Faktör VII'den bağımsız olarak kan koagülasyonunu sağlar. Bununla beraber pıhtılaşma işleminde bu iki yol arasında önemli bir fark vardır. Faktör IX'un, XIa tarafından aktivasyonunu yalnızca iyonize kalsiyum varlığında olurken, Faktör IX'un, VIIa tarafından aktivasyonu için kalsiyum ve bir protein kofaktör olan ve hücre membranı (lipid tabakası) içine gömülü doku-faktörüne ihtiyaç vardır (Şekil 3). Buna karşılık Faktör XI'in XIa'ya çevrişi, anyonik polimerlere kanın teması ile, kalsiyumun yokluğunda bile olur(3, 14, 100).

Yüzey aktivasyonundaki olaylar, plazma proteolitik kaskadı için mantıksal bir kavrayış oluşturur, bir çok temel prensibi izah eder. Bununla beraber hemostasiste intrinsik koagülasyon yolunun başlangıcında kontakt sistem proteinlerinin rolü hâlâ

sorgulanmaktadır. Çünkü Faktör XI'deki bir eksiklik yalnızca hafif bir kanama diyatezine sebep olmaktadır ve de İntrinsik yolda Faktör XIa tarafından aktiflenen Faktör IX ekstrinsik yolun proteinleri olan Faktör VII/Doku faktörü kompleksi tarafından da aktiflenmektedir. Kontakt sistem proteinleri, kompleman aktivasyonu, fibrinolizis ve kinin formasyonu gibi inflamatuvar cevabın başlatılmasına da iştirak ederler. Kardio-pulmoner bypass da olduğu gibi kan yabancı bir yüzey ile karşılaştığı zaman kontakt sistem önem kazanır. Zimojen Faktör XII (Hegeinan faktör) son derece iyi regule edilmiş bu reaksiyonlar serisinin ilk proteinidir cam, kaolin ve deksfran-sülfat gibi negatif, yüklü yüzeylere ve sülfatidlere bağlanır. Bu aktive edici yüzeylere bağlandıktan sonra, oto-aktivasyon ile reaksiyon zinciri oluşur ve zimojenlerin tek bağlı disülfid köprülerini kırar bunun sonucunda da serin proteinlerin katalitik bölgesi açığa çıkar. Faktör XII'nin ağır zinciri yüzeye bağlanarak, enzimin lokal konsantrasyonunda ve substratları olan prekalikrein ve Faktör XI üzerindeki etkisini artırır. Bunun sonucunda kalikrein ve Faktör XIa oluşur. Daha ileri kırılmalar sonucunda, bir Hegeman Faktör (XII) fragmanı serbestleşir ve sıvı faza diffuze olur. Bu enzimin, pre-kalikreini kalikrein çevirme kapasitesi olmasına rağmen, yüzeye karşı affinite kaybı olması, kan koagülasyonuna daha etkin katılımını engeller(14, 32, 68, 145).

Faktör XIIa'nın başlıca iki substratı, pre-kalikrein ve Faktör XI'dir. Bunların ikisi de HK (high-molecular weight kininogen) ile nonkovalent bağlı bimoleküler bir kompleks şeklinde yüzeylere tutunmuş halde, bulunurlar ve zimojenler ile enzimlerin etkileşimini kolaylaştırırlar. Kofaktör, enzim ve substratın oluşturduğu bu moleküler topluluk, kan koagülasyonunda tekrarlayan bir durumdur. Böylece moleküler reaksiyonlar, maksimal hız ve etkinliğe sahip olurlar. Koagülasyon sistemindeki son reaksiyonlar için, bir fosfolipid ve hücre membranı yüzey temin ederken, kontakt sistem için negatif yüklü bir yüzey esastır (Şekil 3).

Kalikreinin iki substratı üzerine olan etkisi, koagülasyon sisteminin her yerinde tekrarlayan pozitif feed-back prosese örnektir. Kalikrein faktör XII'yi parçalar ve XIIa'ya çevirir, böylece kontakt aktivasyon hızlanır. Kalikrein ayrıca HK'da parçalar ve bir nanopeptid olan bradikinin serbest hale geçer (bu da hipotansiyon ve gram-negatif sepsis ile ilgilidir). Arta kalan kininojensiz kinin (aktif HK) yüzeye, intakt profaktörden en az on defa daha iyi bağlanır. Böylece daha fazla prekalikrein aktive yüzey ile birleşir(32).

Koagulasyon sisteminin negatif feed-back regulasyonu da karakteristiktir. Örnek reaksiyon, kalikrein tarafından Faktör XIIa'nın faktör XII'ye etkilenmesidir. Bu yüzey-bağlı koagulasyonu durduran bir etkidir. Faktör XIa ayrıca, koagülan aktiviteye sahip HK'nın hafif zincirini kırar, böylece onun kofaktör aktivitesini yok eder, bu arada XIa kendisi de aktive yüzeyden ayrılır.

HK'nın fonksiyonu ve regülasyonu, koagulasyon sistemindeki profaktörler ve kontrol için prototip oluşturur. Kalikrein tarafından HK'nın aktivasyonu, aktive HK'nın, faktör XIa tarafından yıkımı, trombin tarafından Faktör V ve VIII'in aktivasyonuna ve aktive protein C tarafından da faktör Va ve VIIIa'nın yıkımına benzer.

Kontakt sistemle ilgili bu üç proteinin yani, faktör XII (Hegeman faktör), prekalikrein ve HK'nın herbirinin eksikliği trombin oluşumunun yavaşlamasına ve in-vitro uzamış pıhtılaşma ve parsiyel tromboplastin zamanına sebep olur, fakat kanama diyatezlerine yol açmaz. Yalnızca faktör XI eksikliği hemostatik bir bozukluğa yol açar. Bu klinik gözlemler, damar zedelenmesine verilen in-vivo cevapla bu ilk üç kontakt protein by-pass edildiğini gösterir. Bu da direkt olarak faktör XI'in aktivasyonunu sağlayan bir reaksiyonun varlığını gerektirir. Trombin, elektrik yüklü bir yüzeyde, faktör XI'i doğrudan aktive edebilmektedir. Aktive olmuş trombositlerin fizyolojik koşullarda; faktör XI'in trombin ile aktivasyonu için bir yüzey oluşturduğu anlaşıldıktan sonra, Faktör XII, HK ve prekalikreinin hemostaz için neden gerekli olmadığı anlaşılmıştır. Bu sonuçlar hemostazda doku faktörünün temel fizyolojik aktivatör olduğu kavramını birlikte getirmiştir(32, 100, 123).

Faktör XI eksikliği, etkilenmiş kişilerin yaklaşık yarısında, yalnızca hafif bir hemostaz bozukluğuna sebep olduğu için, muhtemelen kan koagulasyonu, in-vivo olarak, ekstrinsik yol vasıtası ile Faktör IX ve X tarafından başlatılır.

Hem ekstrinsik veya hem de intrinsik yol ile, Faktör Xa bir kere oluştuktan sonra, protrombini trombine çevirir. Vitamin K bağımlı diğer faktörler gibi protrombin de, fosfolipide kalsiyum bağlanmasını sağlayan belli fonksiyonel domainlere sahiptir (N-terminal ucundaki 10 Gla residüsü). Bu bölge  $\beta$ -hidroksiaspartik asit veya asparajin ihtiva eden epidermal growth faktöre benzer ve Ca'a, bir kofaktör (Faktör V) etkileşim bölgesine, bir aktivasyon peptid bölgesine ve katalitik merkez ihtiva eden bir bölüme bağlanabilir.

Faktör Xa tarafından protrombinin uygun olarak kırılmasından sonra, N-terminal Gla kısmı uzaklaştırılır ve sonuçta oluşan iki trombin molekülü fosfolipid yüzeyden ayrılır. Protrombinaz kompleksinin (Faktör Xa, Faktör V, fosfolipid ve kalsiyum) bu dört komponentinin etkileşimi, protrombin aktivasyonunun hızında belirgin derecede artış sağlar, bu hız; yalnızca enzim (Faktör Xa) ve substrat ile (protrombin) başarılandır 300.000 defa daha fazladır. Trombosit membranı üzerinde “protrombinaz kompleksine” katılan Faktör V, olasılıkla trombosit  $\alpha$  granüllerinden kendisinin sekresyonunu ve plazma membranı ile birleşmesini sağlar ve aktive trombositlere, Faktör Xa'nın bağlanması için bir reseptör gibi yardım eder. Trombositlerle bu ilişkisi nedeni ile, Faktör V eksikliğinin kanama belirtileri, kalitatif trombosit bozukluklarındakine benzeyebilir. Faktör V'den bağımsız olarak; Faktör Xa tarafından protrombin aktivasyonunun alternatif yolları, malignan hücrelerde, hipoksik endotel hücrelerde ve makrofajlarda gösterilmiştir(14, 32).

Kan koagülasyon proteinleri, ortak özelliklerine, aktivitelerine veya lokalizasyonlarına göre gruplandırılabilir. Mesela; kontakt sistem zimojenlerinin her üçü, negatif yüklü yüzeylere karşı affinite gösterirler. Fosfolipidlere yönelmiş enzimler, N-terminal domainlerindeki, glutamik asit residülerinin, K-vitaminine bağımlı karboksilasyonuna gereksinin duyarlar. Enzimatik aktiviteye sahip olmayan prokofaktörler, biyolojik yüzeyler üzerine, pıhtılaşma faktörlerinin tutunmasını ve etkileşimini kolaylaştırırlar. Bir diğer grup oluşturan faktörler; trombin için substrat olarak görev yapanlardır. Mesela kofaktör V ve VIII (aktive edilir, sonra inaktive edilir). Protein C (aktive edilir). Protrombin (pre-trombine parçalanır). Protein S (inaktive edilir), Faktör XIII (aktif-fibrin stabilize eden faktör oluşması) ve fibrinojen (fibrinopeptidlerin serbesleşmesi). Bundan başka, faktör VIII ve IX'un eksikliği ile, onların “tenase” kompleksindeki işbirliğinden dolayı aynı klinik bozukluklar ortaya çıkar. Ayrıca, Faktör V, fibrinojen, adhesiv proteinler olan fibronektin, VWF ve trombospondin hepsi trombositlerin  $\alpha$  granüllerinde depolanır(14, 32, 100).

Plazma proteolitik inhibitörler'i (PI) hem koagülasyon, hem de fibrinolitik reaksiyonların hızını ve yayılımını sınırlandırmaya ve kontrol etmeye yardımcı olur. Kontakt sistemin başlıca inhibitörü C1 inhibitördür ve Faktör XIIa'nın plazma inhibitör kapasitesinin %95'den sorumludur. Bu kalikrein için %50'den fazladır. C1 inhibitörün herediter eksikliği kanamadan ziyade anjiyoderma'ya sebep olur.  $\alpha$ -antitripsin, faktör XIa'nın majör inhibitörüdür fakat daha önemli bir rolü, nötrofil elastazı inhibe etmesidir. İnhibitör eksikliğinde, akciğer alveollerinde elastaz baskılanamadığı için amfizem görülür.

AT-III, Faktör IXa, Xa ve trombinin majör inhibitörüdür. Trombinin total miktarını nötralize etmek için gerekenin üç katı AT-III olmasına rağmen, kanda trombin oluşur. AT-III'deki %40 ile %50'lik bir azalma trombotik bozukluklara yatkınlık yaratır(14, 32, 68).

Gerçekte; konjenital AT-III eksikliği, dikkat çekecek şekilde artmış venöz tromboembolizm riski ile birlikte dir. Bu da inhibitörlerin majör regülatör rol oynadığını gösterir. Prokoagulant ve antikoagulant güçler arasında çok ince bir denge mevcuttur. Trombinin katalitik bölgesindeki serin, AT-III'in aktif merkezindeki bir arginin ile reaksiyona girer ve kovalent inaktif bir kompleks oluşur. AT-III tarafından oluşturulan inhibisyon heparin tarafından güçlendirilir. Heparin, ileri derecede sülfatlanmış bir glikoz-aminoglikandır. Özellikle vücutta kılcal damarları çevreleyen bağ dokusunun bazofil nitelikteki mast hücreleri çok bol miktarda heparin üretirler. Kanın bazofil hücreleri de fonksiyon bakımından mast hücrelerinin aynıdır ve plazmaya devamlı olarak az miktarda heparin salarlar. Heparin, AT-III'deki bazik bir gruba bağlanır ve AT-III'ün trombin inaktivasyon hızını artırır. Trombin fibrine bir kere bağlanınca AT-III/Heparin ve dermatan-sülfatın varlığında seçici olarak trombinin inaktive eder (Faktör Xa'yı değil)(32, 178).

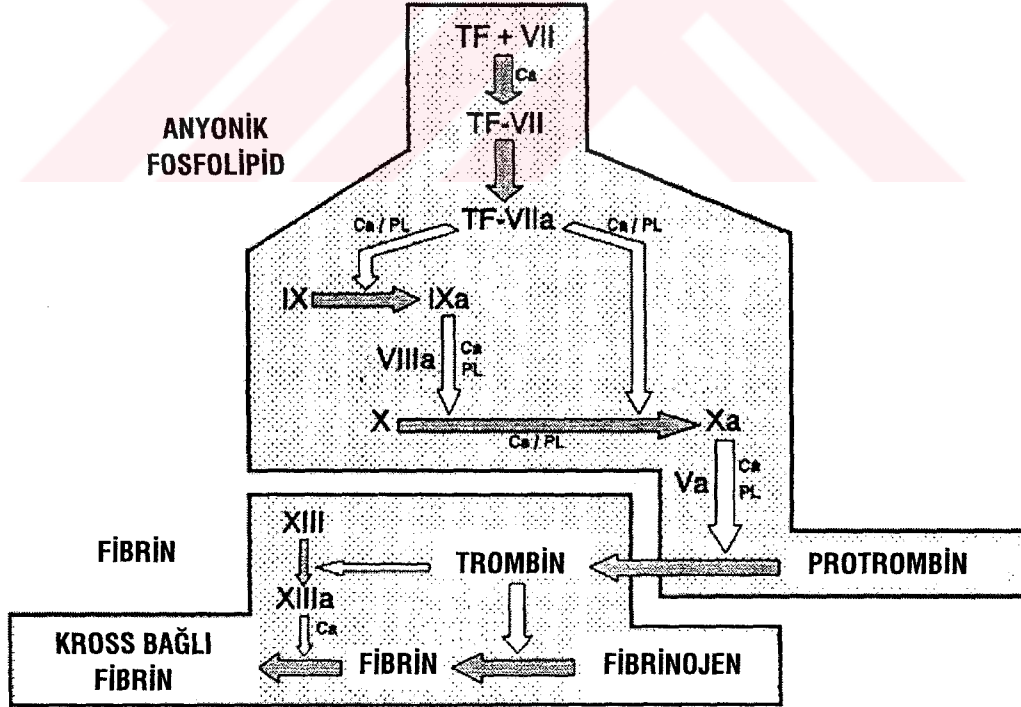
Memeli hücreleri, heparine benzer ikinci bir proteo-glikan daha sentezlerler, bu Heparan-sülfat'dır. Bir heparan-sülfat proteo-glikanı, kovalent bağlı 50-150 dısakkarid ünitesinden ibaret, spesifik yapıli bir kor protein ihtiva eder: Heparin ve heparan-sülfatın kor proteinlerinin yapısı farklıdır. Heparanın kor proteini küçük nispeten basit yapıli, heparan-sulfatınki ise büyük ve çok çeşitli yapılardadır. Heparin proteo-glikanı, mast granüller içerisinde, heparan-sülfat proteoglikanları hücre yüzeyinde ve matriksin çevresinde lokalize olmuştur(32, 178).

$\alpha_2$ - makro-globulin, birçok plazma koagulantı ve fibrinolitik enzimler için ikinci bir back-up inhibitördür.  $\alpha_2$  makro-globulin birçok serin proteazı inhibe eder. Bunlar; trombin, faktör Xa, plazmin, kalikrein, elastraz, kollagenaz ve katepsin e'dir.  $\alpha_2$  – Makroglobulin, enzimler ile hem 1:1 hem de 2:1 oranında enzim inhibitör kompleksleri (stokiometrik olarak) oluşturur.  $\alpha_2$  makroglobulin içine "hapsedilmiş" proteazlar, sınırlı bir fonksiyonel aktivite gösterirler. Başka bir deyişle,  $\alpha_2$  – makroglobulin-enzim kompleksi, enzim aktivitesi için bir ambar bir depo görevi yapar burada, enzim aktivitesi bu enzimleri tamamıyla inhibe eden dolaşımdaki diğer inhibitörlerin etkisinden korunur. Enzim- $\alpha_2$  makroglobulin kompleksi 15-30 dakikada retikulo-endotelial sistem tarafından temizlenir. Ağır  $\alpha_2$  makroglobulin eksikliği ile ilgili bir klinik bozukluk tanımlanmamıştır.

$\alpha_2$  – antiplazmin, plazmin etkisinin primer inhibitörüdür. Kötü bir stimulusa karşı oluşan sistemik fibrinojenolitik cevabı engeller. Etkilenmiş bölgede, trombine karşı oluşan fibrinolitik cevabı sınırlandırır ve tam bir yara iyileşmesi oluncaya kadar hemostatik plağın kalmasını sağlar.  $\alpha_2$  – antiplazmin eksikliğinde, hemostatik plaki, yara iyileşmesinden önce çözülür, bu da kanama ile neticelenir(14, 32, 72, 178)

### Fibrin Oluşumu ve Fibrinolizis

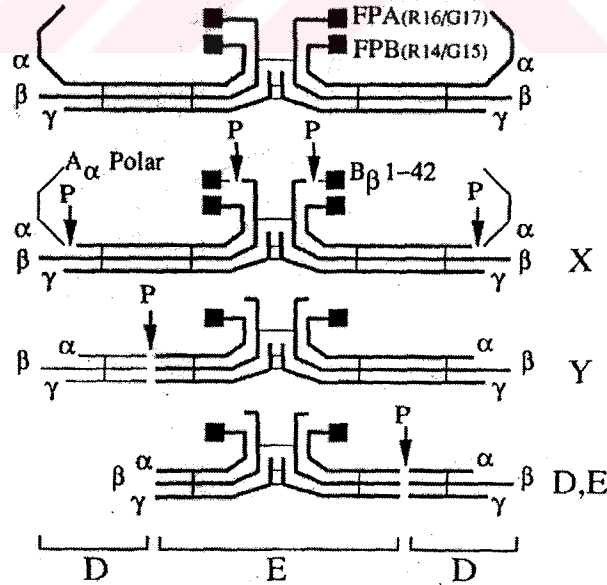
Trombin, fibrinojen, Faktör XIII, V ve VIII, trombosit membran glikoprotein V, protein S ve protein C'yi kapsayan birçok substrat üzerine etkilidir. Bunu yaparken de; hemostatik plak oluşum proseslerinde, plağın oluşmasında, oluşum hızında ve sınırlandırılmasında santral bir role sahiptir. Faktör VIII ve V üzerindeki güçlendirici etkisi “tenase” ve “protrombinase” kompleksinde bir artış husule getirir. Oluşan bu kompleksler, hemostatik bir fibrin pıhtısı oluşturmaya yetecek kadar trombin “patlaması”na yol açarlar ve fibrin ipliği oluşur(14, 68, 100) (Şekil 3, 4).



Şekil 4: Fibrin oluşumunda önemli basamaklar ve ilgili faktörlerin sistemdeki yeri(14)  
TF: Doku faktörü, PL: Fosfolipid

Koagulasyon genellikle aktifleterek şeklini değiştiren trombosit yüzeyinde başladığı zaman (intrinsik sistem), trombin oluşumu ekstrinsek koagulasyon (aktive endotel hücrelerinde, makrofajlarda bulunan bir membran proteini olan doku faktörünün açığa çıkması ile başlatılan) sistemindekinden daha yavaştır. Ekstresek yolda trombin, trombosit agregasyonu üzerine daha büyük bir etkiye sahiptir.

Fibrin ipliklerinin oluşumu, hemostasisin, ikinci fazını oluşturur (ilki primer, platelet agregatı oluşumudur). Fibrinin prekürsörü olan fibrinojen, molekül ağırlığı 340.000 olan büyük bir glikoproteindir hem plazma, hem de trombosit  $\alpha$  granüllerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Fibrinojen, Faktör XIII, fibronektin,  $\alpha_2$  – antiplazmin inhibitör, plazminojen ve plazminojen aktivatörü gibi proteinlerle de etkileşir. Bu modifiye proteinlerin, yüzey konsantrasyonu ve lokalizasyonu, fibrin oluşumu, kross-bağlanma ve fibrin erimesi işlemlerinin düzenlenmesinde etkilidir. Bunlar,  $2A\alpha$  ( $M_r=66.500$ ),  $2B\beta$  ( $M_r=52.000$ ) ve  $2\gamma$  ( $M_r=46.500$ ) zincirleri diye adlandırılır (Şekil 5).  $A\alpha$ ,  $B\beta$  zincirlerinin amino uçlarından trombin tarafından koparılması ile fibrinopeptid A (FPA) ve fibrinopenthal B (FPB) olarak adlandırılan küçük peptidler salınır. Bu üç çift peptid zinciri disülfid bağları ile birbirine bağlıdır(14, 32, 100).



Şekil 5: Fibrinojen molekülü ve parçalanma ürünleri olan X, Y, D ve E fragmanlarının(14) şematik olarak görünümü

FPA: Fibrinopeptid A, FPB: Fibrinopeptid B, P: Plazmin

Fibrinojeni santral domaini, altı polipeptid zincirinin, disulfid köprüleri ile amino uçlarından ibarettir ve disulfid-knot (N-DSK) olarak adlandırılır. Bu dimerik globuler santral domain, globuler karboksi-terminal domainlere, helikal halkalanmış domainlerle bağlanır. Bu da fibrinojen yapısının tri-noduler modelini destekler. Trombin, fibrinojenin santral domainine bağlanır ve fibrinopeptid A ve B'ler koparılır ve fibrin monomerleri oluşur. Bu peptid kırılmaları santral domainde bağlanma bölgeleri açığa çıkarır. Bu bağlanma bölgeleri, diğer fibrin monomerlerinin karboksi-terminalinde komplementer bölgelere sahiptir bu komplementer bağlanma bölgeleri bir iplikte molekülün yarısı ile, diğer iplikte molekülün farklı domaini ile karşı karşıya gelecek konfigürasyonda, iki iplikli protofibrillerin oluşumlarına yol açarlar. Protofibriller daha sonra kalın fibrin iplikleri içinde agrege olurlar ve kalın fiber ağının içinde dallanırlar(14, 68)

Plazmin fibrin ve fibrinojeni çok sayıda anjinil ve lizil bağlarında düzenli bir sırada parçalar ve çözünür bir seri yıkım ürünleri oluşur. Plazmin ile kesilme sonucu, fibrinojen ve fibrin içindeki yapısal domainleri ortaya çıkar.  $A\alpha$ ,  $B\beta$ ,  $\gamma$  zincirlerim, di-sülfid bağlı amino terminalinden oluşan santral domaini E-domaini olarak adlandırılır. Bu santral E domaini molekülün her iki ucundaki, karboksi-terminal O-domainine her üç zinciri de kapsayan helezon şeklinde bir  $\alpha$  helik yapılu peptid zincir ile bağlıdır. Fibrinojen'in plasmin tarafından sindirimi, başlangıçta  $A\alpha$ , olan uzantısını ve  $B\beta$  1-42 fragmanı kırar sonuçta X pragmanı (250 kD) oluşur, bu fibrinojen hâlâ pıhtı oluşturabilir. Plasmin daha sonra fragman X'den bir D fragmanı salar (100 kD) ve fragman Y oluşur (150 kD). Fragman Y daha ileri bir yıkılma ile, fragman D ve E (50 kD) oluşur (Şekil 5). Fibrin monomerlerinin spontan agregasyonu ile oluşan pıhtı farklı fibrin moleküllerinin yan zincirleri arasında kovalent çapraz bağların oluşumu ile stabilize olur. Bu çapraz bağlanma reaksiyonu Faktör XIIIa diye adlandırılan(fibrini stabilize eden faktör) bir enzim tarafından katalizlenir. Trombin faktör XIII'ü XIIIa'ya çevirir. Faktör XIIIa, aktif bir transamidazdır (fibrini stabilize eden faktör veya transglutamaz)(14, 32, 145).

### **Fibrin Yıkımı**

Çapraz bağları olmayan fibrinin plazmik yıkılımı sonucunda da 1-14'süz  $B\beta$  zincirinden koparılan  $B\beta$  15-42 hariç, fibrinogenden oluşan yıkım ürünlerinin aynıdır. Çapraz bağlı fibrin yıkımı, çapraz bağlı olmayan fibrin yıkımından farklıdır. İlkinde degradasyon daha yavaştır. Çünkü, yoğun çapraz bağlantılar, bir kompleks içinde

monomerleri bağlar ve ağ gibi örülmüş bir yapı oluşur. Bu da, plazminin protolitik etkisinden monomerleri korur. Bir diğer fark, başlangıç kırılmaları fibrinojendeki gibi aynı ve tüm proteaza hassas bölgelerde çapraz  $\alpha$  polimerlerini ve bağlantıyı temin eden halkalı helazon bölgeleri yıkar(14, 32). İskeletin yıkım ürünleri,  $\gamma$  terminal kısımlarının çapraz bağlı bağlar ile veya halkalanmış helezon yapılar ile uzunlamasına bağlanmış domainleri ile iki iplikli protofibrillerin non-kovalent bağlar ile yanyana uzunlamasına bağlanmış domainlerinden ibarettir. Plazmin D ve E domainleri arasındaki bağı koparır, fakat iki D domaini arasında faktör XIIIa tarafından oluşturulan bağı koparamaz. Bunun sonucu olarak iki D domaini arasındaki çift bağlı bağlantı vardır ve son ürün D-dimer olur, fibrin yıkım ürünlerinin plazminin fibrinojeni yıkımı durumunda, fibrinojen üzerinde F-XIIIa tarafından oluşturulan çift bağ olmadığı için, yıkım ürünleri fibrinojenin yalnızca D ve E parçalarını içerir. Bu da DIC (Disseminata Intravascular Coagulation) de neden iki çeşit yıkım ürünü bulunduğunu açıklar. Bunlardan biri direkt fibrinojen yıkımından (D ve E domainleri) ve diğerleri fibrin yıkımlarından (D-dimer ve E domainleri) oluşur. Fibrin yıkım ürünleri, farklı moleküler ağırlıklı fragmanların bir karışımıdır. Bunların en küçüğü de D-dimer'dir. Bu komplekslerin hepsi genellikle D-dimer diye adlanır. D-dimer onların ortak yapısı olduğu için, hepsi, D-dimer dahil kovalent çift bağla karşı oluşturulmuş monoklonal antikorlarla tanımlanır(14, 32, 100).

### 3- FAKTÖR VIII MOLEKÜLÜNÜN ÖZELLİKLERİ

Faktör VIII/von Willebrand faktör (F VIII/vWF) kompleksi, birbirine non-kovalent bağlar ile bağlanmış halde dolaşan iki plazma proteininden ibarettir. Her iki komponentte, haemostasise önemlidir fakat onların fonksiyonel ilişkileri henüz çok iyi anlaşılammıştır. Faktör VIII, intrinsik koagulasyon yolunun ortalarında koagulasyona iştirak eder ve FX'nun aktivasyonunda, faktör IX ile bağlanmasına yardımcı olur. İlerki adımın sonucunda fibrinojenin fibrine çevrilişi hızlanır. Von Willebrand faktörü primer haemostasise katkıda bulunur. Bunu da incinmiş damar duvarında subendotelial substratlara, trombosit bağlanmasını destekleyerek yapar. Bunun sonucunda da trombosit platelet plağı oluşumu artar. F VIII/vWF kompleksi iki farklı kromozom tarafından kontrol edilir ve bu proteinler, birbirinden bağımsız embroyonik germ tabakaları tarafından sentezlenir. Von Willebrand faktörü, dolaşımında faktör VIII'i proteolizisten korur ve tahminen hemastasise de gerekli bölgelere lokalize olmasına yardımcı olur. Fakat diğer taraftan bu iki proteinin bağlantısını izah eden biyolojik temel tam olarak aydınlatılamamıştır. Son zamanlara kadar F VIII/vWF iki veya üç fonksiyonlu bir tek madde olarak düşünülüyordu, fakat, niçin farklı özellik ve klinik belirtilere sahip iki herediter hastalığın her ikisinin de, bir tek protein içinde mevcut abnormalitelerden oluştuğu aydınlatılamamıştır. Son bir kaç yıl içinde moleküler biyoloji ve biokimyanın en yeni tekniklerini kullanan çok sayıdaki çalışmalar, Faktör VIII/von Willebrand faktör kompleksi hakkındaki bilgilerimizi çok hızlı bir şekilde genişletmiştir(32, 80, 83, 119, 192, 193).

Şimdi artık Hemofili A'nın X kromozomunun F VIII geni içinde veya ona yakın bir kaç farklı mutasyon nedeniyle oluştuğu ve mutasyonlarında faktör VIII molekülünün defektif sentezine ve yokluğuna sebep olduğu biliniyor. vWF'nü kodlayan gen lokusa da lokalize edilmiştir, fakat çok heterojen bir hastalık olan von-Willebrand hastalığının moleküler genetiği hakkındaki bilgilerimiz henüz başlangıç safhasındadır. Bu hastalığın birkaç-variantının en yaygın belirtisi, vWF'nün sentez, fonksiyon ve salınımının eksiklik veya abnormalitesi sebebiyle mikrovasküler kanamalara artmış bir eğilimin olmasıdır(79, 83, 115).

Normal kan koagülasyonu içinde önemli bir role sahip protein kofaktörlerin bulunduğu hızlı bir enzimatik reaksiyon dizisini gerektirir. İki plazma protein kofaktörü, Faktör V veya Faktör VIII (antihemofitik faktör), bu reaksiyonları hızlandırır ve her ikisinin de yokluğu birkanama bozukluğuna sebep olur. Hemofili A (klasik hemofili), sekse bağlı akut bir kanama bozukluğu olarak yüzyıllardır tanınmasına rağmen normal, plazmanın hemofilik hastaların pıhtılaşma zamanlarını kısaltma kabiliyeti ilk defa 1911'de Addis tarafından bildirildi. Daha sonra Patek ve Taylor kısmi olarak plazmada bu aktif materyali tanımladıktan sonra "Antihemofilik globulin" diye adlandırılmasını önerdiler. Antihemofilik faktörün plazma eksikliğinin neticesi olan hemofili kavramı genel olarak kabul edildi ve eksik komponent International Committee on Thrombosis and Haemostasis tarafından Faktör olarak VIII tanımlandı(67, 83, 193).

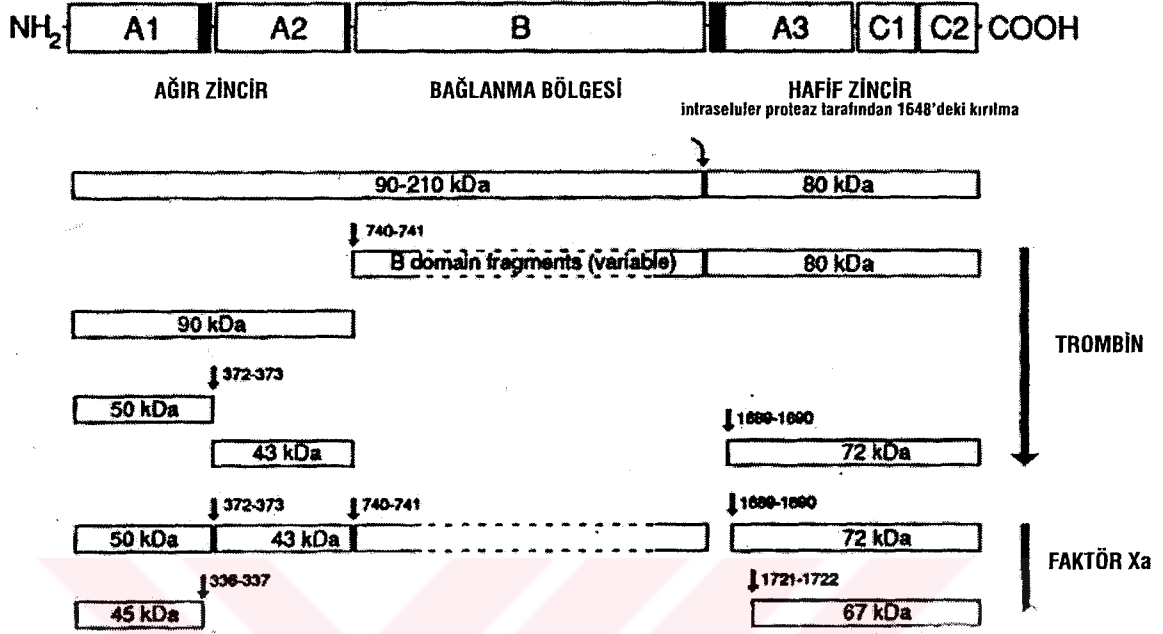
Faktör VIII profaktör halinde plazmada dolaşan büyük molekül ağırlıklı gliko-proteindir ve trombinin proteolyzisi ile aktif kofaktöre çevrilir ve bir plazma zimojeninin koagulant proteolitik bir enzime çevrilişi için önemlidir. Faktör VIII, X kromozom geni ürünüdür. X kromozomundaki lokasyonunun bulunması ve klasik hemofilin klinik önemi, Faktör VIII geni üzerinde yoğun araştırmalara sebep olmuştur. 1984'de F VIII geninin klonlanmasından beri bir hayli bilgi toplanmıştır. Faktör VIII, von Willebrand faktör ile nonkovalent bir kompleks halinde dolaşımında bulunur. Bu özellik onu proteolizden korur ve aktif hemostasis bölgelerinde konsantrasyonunu sağlar. Faktör VIII'in vWF ile nonkovalen bağlanması, bu iki protein için yıllardır bir literatür kargaşasına sebep olmuştur ve kesin olmayan terminolojiler de halâ problemlere sebep olmaktadır. Faktör VIII ve vWF'ün farkı 1970'lerin ortalarına kadar ayırt edilmedi. İlk yayınlarda Faktör VIII olarak tanımlananın gerçekte F.VIII/vWF kompleksi idi. Bu komplekste, proteinin yalnızca %1 ile %2'si F.VIII'dir. bu sebepten belirtilen özellikler gerçekte vWF'nün özellikleridir(67, 83, 101).

### 3.1. FAKTÖR VIII'in PLAZMADAKİ MOLEKÜLER ŞEKİLLERİ

F.VIII/vWF kompleksinin üzerinde yapılan uzun çalışmalardan sonra F.VIII ve vWF olmak üzere iki ayrı proteinden oluştuğu bulunmuştur. F.VIII'in plazma konsantrasyonu (yaklaşık 50 ng/ml) vWF'e kıyasla (5-10 µg/ml) son derece düşüktür. F.VIII ve vWF arasındaki güçlü ilişki ve F.VIII'in instabilitesi, F.VIII'in anlaşılmasında

bilimsel gelişmeyi geciktirmiştir. F.VIII'in kendi başına tek bir madde olduğu ilk olarak yüksek iyonik kuvvete, 0.25 M Ca<sup>++</sup> ve EDTA'lı ortamda jel filtrasyonu uygulandığında VIII:C'nin vWF'den dissosiyeye olması ile ispat edilmiştir. Daha sonraki bir kaç çalışma gösterdi ki, iki proteinden birine karşı jel-immobilize antitadiler kullanan immunoadsorbet kromatografi yöntemleri ile F.VIII'i veya vWF'i izole etmek mümkündür. F.VIII/vWF kompleksinin diğer üyesi ise yüksek iyonik konsantrasyonda veya Ca<sup>++</sup> ortamında serbestleştirilir. İleri derecede saflaştırılmış F.VIII'in SDS-PAGE jel elektroforezi çalışmaları sayesinde F.VIII'in doğal polipeptidleri ve aktivasyon/inaktivasyon fragmentleri ve ebatları hakkında bilgi edinilmiştir. İnsan plazma F.VIII'I bir heterodimer olup 80 kDa'luk karboksi terminal hafif zincir ve ~92-180 kDa.luk değişik uzunluklarda amino terminal zincirinden oluşur. F.VIII'in yapısını anlamak için farklı araştırmacılar tarafından yapılan F.VIII gen klonlamaları ve amino asit zincirlerinin tayini F.VIII'in moleküler yapısının tanınmasında önemli ilerlemeler sağlamıştır. ~9 kb.lık mRNA'nın primer "translation" ürünü 2.332 amino asitten oluşan bir protein olup 3 tane A(A1,A2,A3) 1 tane B, 2 tane de C(C1,C2) olmak üzere tekrarlayan domain'lerden oluşmuştur (Şekil 6). Aynı tip domamin her tekrarında amino asitlerin %30'u için homoloji gözlenir(67, 80, 83, 119, 191, 193).

İnsan F.VIII, F V ve bakır bağlayan bir plazma proteini olan seruloplazminin ortak bir domain yapısına sahip olduğu gözlenmiştir. F.VIII ve F.V'in amino terminal ağır zincir bölgelerinde %40 civarında benzer amino asit zinciri vardır. Bunlar F. V'de 1 ile 709 a.a.leri, F.VIII de 1-740 amino asitlerini içerir. Aynı şekilde, bu iki protein arasında F V'de 1546-2196 ve F. VIII de 1689-2196 residülerinde %40 civarında benzer a.a. vardır. Bu ağır ve hafif zincir fragmentleri, trombin tarafından proteolysis ile aktif forma çevrildiğinde meydana gelir. Bu iki proteinde ağır ve hafif zincir segmentleri arasında var olan zincir benzerliğinin aksine, iki molekülün santral bağlanma bölgeleri açık bir benzerliğe sahip değildir. F. V her bir moleküde yalnızca 1 atom demir ihtiva eder. Faktör VIII de bakır olup olmadığı bilinmemektedir. Faktör VIII ve Faktör V'in fonksiyonları oldukça benzer. İkisi de sırasıyla serin proteaz koagülasyon faktörleri olan IX ve X'nu aktive edilebilen kofaktörlerdir ve her ikisi de aktive protein C tarafından degradasyona duyarlıdır (Şekil 6).



Şekil 6: F VIII molekülünün proteolitik yıkılması(32)

Her iki koagülasyon proteini, her biri 350 amino asit ihtiva eden 3 A domaini ihtiva eder. İlk ve ikinci A domaini ağır zincir üzerindedir. Üçüncüsü hafif zincirin amino-terminal ucundadır. Herbir kofaktörde 3 üncü domaini yaklaşık 15 a.a'lık 2 C domaini takip eder (Şekil 6). Bu C domainleri %35-50 aynı amino asit zincirine sahiptir. Bağlayıcı B domaini 2. ve 3. A domainleri arasında uzanır ve 740 ile 1689 residüleri arasında lokalize olmuştur B domaini exon 14 tarafından kodlanır. B domaininin fonksiyonu bilinmemektedir, prokoagülan aktiviteye de katkısı yoktur(32, 80, 82, 93).

### 3.2. FAKTÖR VIII'İN PROTEOLİTİK ENZİMLER TARAFINDAN KOFAKTÖR AKTİVASYONU

Faktör VIII koagülan aktivitesi olmayan büyük bir profaktör olarak kanda dolaşır. Faktör VIII'in trombin tarafından parçalanışı önemli bir pozitif feed-back mekanizmayı başlatır. Faktör VIII, Arg 327-Ser 373, Arg 740-Ser 741 ve Arg 1689-Ser 1690 bölgelerinde trombin tarafından bölünür. Arg 740 daki bölünme aktivite için önemli değilken, eğer F.VIII prokoagülan fonksiyona sahip olursa, diğer iki bölünme zorunlu gibi görülmektedir. F.VIII'in trombin aktivasyonu kalsiyum gerektirir. 2 mM ile optimal

bölünme ve yüksek konsantrasyonlarda inhibisyon olur. F. V gibi F. VIII de, trombinin bağlanma bölgelerine bitişik negatif yüklü bir grup amino asit (328 ile 380, 717 ile 725, 1648 ile 1694) ihtiva eder. Trombin parçalanmasını kolaylaştırmada bu anyonik bölgelerin fonksiyonu modifiye F.VIII proteinlerinin çalışmalarından henüz aydınlatılamamıştır. F VIII 80 kDa ağırlığında hafif bir zincir (1649 ile 2332 rezidüleri) ve değişebilen miktarlarda bağlayıcı B bölgesi ihtiva eden bir seri ağır zincirden ibarettir. Bu heterojen ağır zincirler (Mr 90 ile 210 kDa). İlki 711. amino asitten başlayan bazısı 1648 residüsüne kadar uzanan ortak bir amino terminal yapısına sahiptir. Bu ağır ve hafif zincirler, ilişkilerini ve prokagülan güçlerini sürdürmek için divalent bir katyona ihtiyaç gösteren heterodimentlerin bir grubu olarak dolaşımında bulunurlar(67, 97, 155, 168, 193).

Trombin veya Faktör Xa'ya maruz bırakıldığında Arg 740 daki bölünme geçici olarak heterojen ağır zinciri 90 kDa.luk parçalara çevirir. Arg 732'deki bölünme bu ağır zinciri 54 ve 44 kDa'luk fragmanlara çevirir. Bunun her ikisinin de prokoagülan aktivite için önemli olduğu görülmüştür. Prokoagülan fonksiyon için, hafif zincirin amino terminalinden küçük bir parçanın bölünmesi de elzemdir (1649 ile 1689 residülerini kaldıran). Lollar ve Parker Arg 1689'daki bölünmenin F. VIII'in vWF den ayrılmasında rol aldığını söylemiştir. Lollan ve Parker bölünmüş ağır zincir/bölünmemiş hafif zincirin (trimer), vWF'ün yokluğunda prokoagülan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

F.VIII'in vWF'e bağlanması bozulmamış bir hafif zincirin mevcudiyetine bağlıdır. Aktive edilmiş F.VIII, kofaktör fonksiyonuna sahip olmak için vWF'den ayrılmalıdır. F.VIII/vWF kompleksinin proteolitik aktivasyonu sonucu olan hafif zincir bölünüşü ile kompleks dissosiyasyon olmaktadır; ağır zincir kırılması ile de kofaktör fonksiyonu aktive olmaktadır. Hafif zincir kırılışının önce olduğu söylenmiştir. Aktivasyonda hız sınırlayıcı adımın Arg 372'deki bölünme olduğunu gösteren kinetik veriler elde ettiler. VWF ve F.VIII bağlantısının hafif zincir bölünüşü için, trombinin katalitik etkisinde, 8 defalık bir artışa sebep olduğu, fakat ağır zincir üzerinde 372 ve 770 residülerindeki bölünmeye etkili olmadığını buldular: Bütün bunların, F.VIII, vWF ile bağlı olduğu zaman hafif zincir bölünüşünün, ağır zincir bölünüşünden önce olduğunu göstereceğini söylediler. F.VIII, Faktör Xa tarafından da aktive edilebilir. Fakat bu reaksiyon kesin olarak kalsiyum ile birlikte anyonik fosfolipidleri gerektirir ve trombin aktivasyonundan daha yavaş bir hızla ilerler. Faktör Xa'nın, F.VIII'i Arg 336-Met 334 ve Agr 172-Ala 1722'deki bölme bölgeleri hariç diğer bölme bölgeleri ayırır. Bu residüde, Arg 1721'in modifikasyonu

trombinin bölme etkisinin eksikliğinden, prokoagulan aktivitede bir azaltma yapmaz. Çünkü koruyucu F. Xa aracılığı ile F. VIII bölünür(67, 79, 80, 84).

### 3.3. FAKTÖR VIII'İN FONKSİYONLARI

vWF'e kıyasla F. VIII'in etki mekanizması hakkında pek az şey bilinmektedir. Fosfolipid ve  $Ca^{++}$  iyonlarının varlığında, serin proteaz, Faktör IXa tarafından Faktör X'un enzimatik aktivasyonuna, F.VIII'in non-enzimatik kofaktör aktivitesiyle kan koagülasyonuna yardımcı olduğu genel olarak kabul edilmektedir. F.VIII'in non-enzimatik kofaktör aktivitesi trombin tarafından aktive şekle Faktör VIIIa'ya dönüştürülmesine veya F. X(Xa)'a bağımlıdır. Eğer Faktör IXa ortamda yoksa, VIIIa'nın, F. X'a karşı hiç bir aktivitesi yok gibidir. Fakat F. VIII'in varlığı IXa'nın F. X'a karşı katalitik aktivitesini en az 500 kez artırır.(32, 67, 155).

### 3.4. PLAZMADA FAKTÖR Xa'NİN FAKTÖR VIII'İ AKTİVE ETMESİNDE MİNİMAL ETKİSİNİN TEMELİ

Faktör VIII'in, Faktör Xa tarafından trombine göre daha yavaş aktive edilmesinin nedeni, yüksek derecede saflaştırılmış Faktör VIII ile çalışmaları sonucu, vWF'nün inhibitör etkisine bağlanmıştır. vWF'nün fizyolojik konsantrasyonları F VIII'in F Xa tarafından aktivasyonunu belirgin olarak inhibe eder, trombin tarafından yapılan aktivasyonunu etkilemez. Yalnızca çok yüksek Faktör Xa konsantrasyonları (10  $\mu\text{g/ml}$ ), vWF ile kompleks teşkil etmiş, Faktör VIII'I böler ve aktive eder.

Fosfolipidlerin varlığında; Faktör IX'da, Faktör VIII, aktivitesinde geçici bir artışa sebep olur. Bu reaksiyon trombin ve Faktör Xa ile olan reaksiyona benzer tarzda olur. Bu etkileşimin fizyolojik anlamı bilinmiyor. Bununla beraber aktivasyon için gerekli Faktör IXa konsantrasyonu (0,5  $\mu\text{M}$ ), plazma Faktör IX konsantrasyonundan büyüktür. Pieters ve arkadaşları, tromboplastin ile aktive edilmiş plazmada Faktör Va ve VIIIa oluşumunu incelediler. Trombin oluşumunu bloke etmek için hirudin kullanarak yaptıkları çalışmalar sonucunda, Faktör V ve Faktör VIII aktivasyonunun, Faktör Xa ile değil, trombin vasıtası ile olduğunu söylediler(32, 79, 155).

### 3.5. FAKTÖR VIII'İN BAĞLANMASI

Faktör VIII'in vWF'ne bağlanması biyolojik olarak önemlidir. Son yıllarda Faktör VIII'in bazı tabî reseptörleri tanınmıştır. Soberano ve arkadaşları(168) trombine maruz kaldıktan sonra, F. VIII'den oluşan aktivasyon peptidlerinin trombositlerle olan ilgisini arştırdı. Fakat bu bağlanmanın spesifitesi açıkça belirtilmedi. Diğer araştırmacılar aktive olmamış Faktör VIII'in trombositlerle olan etkileşimini gösterdiler. Trombinle aktive olunca Faktör VIII/vWF kompleksinden Faktör VIII serbest hale geçer ve trombosit yüzey fosfolipidlerine bağlanırlar. Trombositlere bağlı Faktör VIII, stimüle trombositlere Faktör IX'un bağlanmasına yardımcı olur. Tahminen Faktör VIIIa'nın spesifik bağlanma bölgesi, F IXa'nın ağır zinciri üzerindedir. Sonuç olarak son yıllarda Faktör VIII reseptörleri üzerinde yapılan çalışmalar şunu işaret etmiştir. İntrinsik koagülasyonda Faktör VIII-IX-X komponentleri aktivitelerini trombosit ve endotel hücre yüzeylerinde gösterirler. Çünkü aktive olmamış ve aktive Faktör IX ve Faktör X'nun spesifik bağlayıcıları burada mevcuttur.(8, 32, 166, 168).

### 3.6. FAKTÖR VIIIa'NIN FAKTÖR IX İLE ETKİLEŞİMİ

Yapılan çalışmalar  $Ca^{++}$  ve fosfolipid varlığında Faktör VIIIa'nın Faktör IXa ile stabil kompleks oluşturduğunu göstermiştir. Faktör VIIIa'ya bağlanmada; Faktör IX'un ağır zinciri önemli rol oynar. Çünkü Faktör IX'un ağır zincirine bağlanan monoklonal antikorların, tenase kompleksinin oluşumunu engellediği gözlenmiştir. Tenase kompleksinde Faktör VIIIa ve IXa'nın 1:1 stoichiometric kompleks halinde foszfolipide bağlı olarak bulunduğu bildirilmiştir(166).

### 3.7. F VIII'İN KOFAKTÖR FONKSİYONU

Faktör VIII'in tenaz kompleksindeki (Faktör IXa, Faktör VIIa, Faktör X ve fosfolipid bağlanışı) rolü, Faktör V'in protrombinaz kompleksindeki rolüne benzer Fosfolipid Km'i çeşitli mekanizmalarla düşürür. Enzimi ve substratı üzerinde toplaması Km'in düşmesindeki sebeplerdendir. Faktör VIIIa konsantrasyonu çok düşük olduğundan, kompleksin yapısındaki Faktör VIIIa'nın ölçümü güçtür. Gerçekten de halâ daha Faktör VIIIa ve Faktör X etkileşimi konusunda kantitatif veriler yoktur(67, 80, 193).

### 3.8. FAKTÖR VIII İNAKTİVASYONU

Koagülasyon olayı çok sayıda feed-back loop'u tarafından düzenlenir. Faktör VIIIa ve Va trombin oluşumunu artırır. Trombin ayrıca endotel hücre yüzeyinde bulunan trombomoduline bağlanır. Bu oluşan kmopleks protein C'ye aktive eder. Aktive protein C (APC), Faktör Va ve Faktör VIIIa'yı inaktive eden bir serin proteazdır. Faktör Va ve Faktör VIIIa'nın ağır zincirleri APC'nin esas substratıdır. Ağır zincirin parçalanması (deavage), kofaktör aktivitesinin kaybolmasına sebep olur. Çünkü Faktör VIII'in ağır zinciri Faktör IXa ve X; Faktr V'in ağır zinciri Faktör Xa ve protrombinin bağlanma yeridir. Bu reaksiyon solüsyonda hızlı oluşmaz, APC tarafından kofaktör inaktivasyonu protein S (diğer bir kofaktör), kalsiyum ve anyonik fosfolipid ya da hücre yüzeyi varlığında gerçekleşir. Faktör VIIIa APC tarafından proteolitik olarak inaktive edilir. APC Faktör VIII'I trombinden farklı olarak parçalıyor, ve sonucunda aktivasyon olmuyor. Kritik kopma Arg 336-Met.337 arasında olur. Bu bölge trombin ve Faktör Xa tarafından yavaş bir şekilde koparılır(31, 57). Rekombinant Faktör VIII de Arg 336 yerine isolösin geldiğinde, Faktör VIII aktivitesinin artması bu bulguyu destekler(151). Bu modifiye proteinin artmış spesifik aktivitesinin, proteolize rezistansının artmasından kaynaklandığına inanılır. APC, Ca ve fosfolipid varlığında Faktör VIIIa ağır zincirini bir başka bölgeden daha koparır. Walker ve arkadaşları büyük ağır zincirlerin 980 k-Da'luk peptidler (Arg 740'dan kopma) ve daha küçük peptidlere (Arg 552 ve Arg 336'dır. Kopma sonucu) parçalandığını saptadılar (159-160). Protein S eklendiğinde tüm kopmaların hızı arttığı gibi VIII:C nin inaktivasyon hızı da artar. Daha kompleks çalışmalar da Faktör Va ile Faktör VIIIa'nın APC için yarıştığını gösterdiler. Bu kompetisyon konsantrasyona bağlıdır ve Faktör Va ve Faktör VIIIa APC'nin ekivalan substratlarıdır. Faktör V, APC'nin

Faktör Va'ya göre güçsüz bir substratı iken, aktive edilmemiş Faktör VIII, APC tarafından hızla parçalanır. Walker(190) bunu Faktör VIII'in trombin ya da Faktör Xa tarafından aktive edilmeden önce de iki zincirli bir molekül olmasına bağlamaktadır, oysa inaktif Faktör V tek zincirli bir yapı gösterir(31, 37, 52, 108).

Faktör IX ve IXa, saflaştırılmış Faktör VIII'in; APC tarafından inaktivasyonunu engeller(57). Faktör VIII, yeniden vWF ile kombine edilirse APC tarafından inaktivite edilme hızı 10-20 kat azalır. Protein S eklenmesi Faktör VIII/vWF kompleksinin inaktivasyon hızını artırmaz. Faktör VIII'in trombin tarafından aktivasyonu, APC inaktivasyonunun ve protein S'in bu aktivasyonu artırıcı etkisinin geri kazanılmasını sağlar. Rick ve arkadaşları da vWF'ünün APC tarafından Faktör VIII aktivasyonunu yavaşlattığını gösterdiler. Bu araştırmacılar vWF varlığın da Faktör IXa'nın da, Faktör VIII'i APC etkisinden koruduğunu öne sürdüler. Aynı grup vWF'nün, Faktör VIII'in APC'ye fosfolipid yüzeye bağlanmayı engelleyerek, Faktör VIII'i koruduğunu ileri sürdüler. APC sadece F VIIIa'nın ağır zincirinde kopmaya sebep olur. Ancak APC'nin F.VIIIa'nın hafif zinciri ile de etkileştiği gösterilmiştir(31, 190).

Faktör VIIIa, Faktör Va'ya göre çok daha dayanıksızdır. Trombin ve Faktör Xa aktivasyonundan sonra, Faktör VIIIa kofaktör aktivitesini hızla kaybeder. Trombin inhibitörleri, Faktör VIII aktivasyonunu bloke ettiği halde, trombin tarafından aktive edilmiş Faktör VIII'i stabilize etmezler. Kinetik çalışmalar Faktör VIII inaktivasyonuna sebep olabilecek herhangi bir kopmanın olmadığını göstermiştir(31, 57). Sonuç olarak, Faktör VIIIa'nın instabilitesinin nonenzimatik konformasyon değişikliğine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Faktör VIII'in çok düşük olan plazma düzeyleri de, Faktör VIIIa instabilitesinin sebebi olabilir. Aktivite kaybının alt birim disosiasyonuna bağlı olabileceği ileri sürülmektedir. Stabil, trombin tarafından aktive edilmiş domuz Faktör VIII (160 k-Da heterodimer) Lollar ve Parker(123) tarafından son yıllarda tanımlanmıştır. Ancak stabil kalabilmesi için pH 6'da ve yüksek konsantrasyonda (>20 nm) saklanmalıdır. Faktör VIIIa, pH 7-8 arasında koagülan aktivitede keskin ve irreversibl düşüş gösterdiği için bu şartlar gereklidir. PH'ya bağlı aktivite kaybı heterodimerden 44 k-Da lık A2 alt biriminin kaybı ile birliktedir. Serbest A2 alt birimi suda iyi çözünmez ve bu belki de irreversibl aktivite kaybının sebebidir. Faktör VIII fonksiyonu için A2 domaininin gerekli olduğu birbirinden bağımsız iki araştırıcı grup tarafından teyit edilmiştir. Ayrıca A2 domaininin, A1/Hafif zincir dimerinin A1 domaini ile ilişkili olduğu konusunda kanıtlar

bulunmuştur. Domuz Faktör VIII'ine göre, insan Faktör VIII'inin azalmış prokoagülan aktivitesinin (%10 ünite/mg tabanında) nedeni A2 alt biriminin heterodimere daha zayıf bağlanması gibi görünmektedir(31, 57, 123, 108, 190).

Bu çalışmalar pH ve konsantrasyona bağlı alt birim dissosiasyonunun, fizyolojik koşullarda; Faktör VIII inaktivasyonunun sebebi olabileceğini düşündürmektedir. Zincir içi çapraz bağlar oluşturan bir reaktif ile muamele edilmiş Faktör VIII'in daha stabil kalması bunu doğrular. Trombin ile aktive edilmiş domuz Faktör VIII'i üzerine, Faktör Xa ve fosfolipidin stabilize edici etkisi, Faktör VIIIa dissosiasyonunun sınırlayan protein/protein etkileşimlerinden dolayı da olabilir. Düşük konsantrasyonlarda Faktör Xa, Faktör VIII'i aktive ederken, bu aktivasyonu birçok koşul altında inaktivasyon izler. Faktör Xa, birçok başka Faktör VIII kopmalarına da sebep olur. Bunlar arasında Arg 33 ve Arg 1721 vardır. Arg 336, başlıca APC koparılma bölgesidir. Arg 1721'in tek başına kopmasının Faktör VIII inaktivasyonu için yeterli olup olmadığı belli değildir(31, 57, 123).

### 3.9. F VIII'İN SENTEZİ VE METABOLİZMASI

Yapılan çok sayıdaki çalışmaya rağmen, henüz Faktör VIII'in nerede sentezlendiği kesin olarak belirlenememiştir(80, 82, 83, 101). Ulutin ve ark.(181) lökosit kültürlerinde F VIII'e benzer aktivite tespit etmişlerdir. İlk çalışmalarda organlara giren çıkan damarlarda faktör ölçülmüştür. Yine hayvanların belirli organları çıkarıldıktan sonra plazma Faktör VIII düzeyi ölçülmüştür. İn-vitro olarak hayvanların çeşitli organlarında dolaşan sıvının Faktör VIII düzeyi saptanmıştır. Faktör VIII eksikliği olan hayvanlara çeşitli organ transplantasyonları yapılarak Faktör VIII eksikliğinin ortadan kalkıp kalkmadığı incelenmiştir(80).

KC perfüzyon çalışmaları bu organın Faktör VIII kaynağı olduğu görüşünü destekleme eğilimindedir. Bu çalışmalarda saptanan Faktör VIII, güçlü insan anti-faktör VIII'i tarafından inaktive edilir ve sikloheksimik Faktör VIII yükselmesini bloke eder. Hemofilik hastalara karaciğer transplantasyonundan sonra, bu organın Faktör VIII sentezlediği saptanmıştır. Ciddi hepatik yetmezlik Faktör VIII eksikliğine sebep olmaz. Birçok çalışma, birçok organ bulunan tek bir tip hücrenin Faktör VIII'in başlıca kaynağı olduğunu düşündürmektedir. Bu hücre tipinin fibroblastlar, lenfositler, monosit/

makrofajlar ve vasküler endotel hücreleri olabileceği düşünülmektedir. Bugüne kadar, bu hücrelerin doku kültürlerinde immunolojik çalışmalarla Faktör VIII sentezi olduğu gösterilememiştir. Endotel hücrelerin rolü belirli olmadığı halde, yeni histokimyasal çalışmalar, Faktör VIII'in hepatik sinusoidal endotel hücrelerinde sentezlendiğini düşündürmektedir. Dalağın, akciğerin ve lenf nodlarının mono-nükleer non-lenfoid hücreleri de monoklonal Faktör VIII antikoları ile boyanmaktadır. İnsan dalak, böbrek ve karaciğer homojenizatlarının anti-Faktör VIII'I nötralize etmesi ve guinea pig. Karaciğer, dalak, akciğer ve böbreğinde Faktör VIII:Ag. Saptanması Faktör VIII'in çok sayıda dokuda sentezlendiği düşüncesini desteklemektedir. Faktör VIII cDNA problemleri ile yapılan northern blot analizlerinde plasenta böbrek, dalak, lenf nodu, kas, hepatosit ve T hücre hibridomasını da içeren bir çok doku ve hücrede Faktör VIII mRNA'sı saptanmıştır(96,179). Ancak diğer çalışmalarda insan göbek veni endotel hücreleri, kemik iliği, timus, periferik lenositler ve hepatoma hücre dizilerinde Faktör VIII mRNA'sı saptanmıştır. Bilinen memeli hücre dizilerinin hiçbiri Faktör VIII ekspres etmediği için, Faktör VIII sentezine ilişkin çalışmalar, Faktör VIII cDNA sını aşılınmış, insan memeli hücre dizilerinde sınırlı kalmıştır. Bu çalışmaların çoğu Kaufman ve arkadaşları(98) tarafından yayınlanmıştır. Çin Hamster'i ovaryum hücrelerinden elde edilmiştir. Bu araştırmacılar Faktör VIII'I 230 k-Da'luk primer translasyon ürünü halinde ER (endoplazmik retikulum) lümeninde saptadılar. ER lümeninde translasyon ürününden 19 rezidülük sinyal peptidi koparılır ve N-bağlı glikozilasyon geçerkeleşir. Çin hamster'i ovaryum hücrelerinde sentezlenen Faktör VIII'in önemli bir bölümü asla sekrete edilmez. Bu protein E.R.'da immünglobulin ağır zinciri bağlayıcı protein (B.P) ile kompleks oluşturarak kalır. Faktör VIII'in bir bölümü golgi aparatına transfer edilir. Burada ağır zincirin N-bağlı glikozilasyon bölgeleri hibrid ya da kompleks tip yapılara modifiye olur O-bağlı glikozilasyonlar görülür. İki tirozin rezidüsünün sülfatlanması da golgi de gerçekleşir. Bunun ardından Faktör VIII, Arg-1648'den koparılır(16, 32, 179).

vWF varlığında ağır ve hafif zincirler, metal iyonları tarafından stabilize edilen kompleks üzerinde toplanır, ortama sağlanır vWF'ü olmadığında, Faktör VIII'in hafif ve ağır zincirleri birleşemez ve yıkılır. İki peptid metal iyon kompleksinde bir araya geldikten sonra vWF'ünü uzaklaştırıp stabil Faktör VIII'I saflaştırmak mümkündür. Bu gözlem vWF'ünün, zincirlerin birleşmeleri için gerekli olduğunu düşündürmektedir. Fosfolipid ve vWF'ü, Faktör VIII'in hafif zincirine bağlanmak için yarıştığından, vWF'üne bağlanma

hafif zincirin intraselluler fosfolipid yüzeylerden ayrılmasını destekleyebilir. Böylece bu hafif zincirler ağır zincirle birleşebilir.

Kaufman ve grubu(96, 97, 98) hamster ovaryum hücrelerinde efektif Faktör VIII sentezi için vWF'ünün mutlaka bulunması gerektiğini ortaya koyduktan sonra, vWF ve Faktör VIII'I birlikte eksprese eden hücreler hazırladı. Bu hücrelerde, kültür ortamına serum eklenmediği halde, Faktör VIII aktivitesinin biriktiğini saptadı. Bu çalışma Çin hamsteri ovaryum hücrelerinde Faktör VIII'in RNA birikimi, proçesi ve Faktör VIII sekresyonunun vWF'ne göre; daha az efektif olduğunu açıkça göstermektedir. Yine de aynı anda hem Faktör VIII, hem de vWF eksprese eden hücre dizilerinin, sadece Faktör VIII eksprese edenlerden 10-20 kat daha fazla Faktör VIII eksprese ettikleri gösterilmiştir. vWF gereksinimine ek olarak, Kaufman'ın(96, 97, 98) çalışmaları doku kültürlerinde sınırlı Faktör VIII ekspresyonunun iki nedeninin daha olduğunu belirledi. Faktör VIII gen kopya sayısı ve transkripsiyon aktivitesi vWF'den 20-30 kat fazla olduğu halde, durgun-durum (steady-state) m-RNA düzeyleri benzerdi. Araştırmacılar Faktör VIII ekspresyonunun az olmasını proses ve sekresyonun inefektif olması kadar Faktör VIII mRNA'sının birikiminin olmasına bağladılar(16, 179).

Saflaştırılmış insan Faktör VIII'I, 80 k-Da hafif zincir ve uzunluğu değişken olan 590-210 k-Da) ağır zinciri ve B domaininin daha küçük ya da büyük bölümlerini içeren peptidden oluşur. Yukarıda söz edildiği gibi heterojenitenin nedeni B domain bölgelerinin hücre içindeki proteolitik kopmasıdır. Bu proteolize sebep olan enzimler henüz karakterize edilememiştir. Hamster böbrek hücreleri tarafından recombinant teknoloji ile üretilen Faktör VIII'in polipeptid paterni, plazmadan saflaştırılan ile aynıdır. Bu bulgu proteolizin önemli ölçüde sentez, sekresyon ve proses sırasında gerçekleştiğini düşündürür. Kaufman ve arkadaşları faktör VIII'in intrasellüler prosesini ve hücreden sekresyonunu inceledi. Bu araştırmacılar faktör VIII'in arg 1648 rezidüsünden koparılıp 80 k-da luk hafif zincirin ve diğer bölgelerdeki kopmanın değişen büyüklüklerde (90-200 k-da) ağır ve diğer zincirlerinin oluşumunun golgi aygıtında gerçekleştiğini gösterdiler. Hücre kültür ortamında az miktarda tek zincirli Faktör VIII saptanmıştır. Hatta bir çalışmada molekül kitlesi >300 k-Da olan insan Faktör VIII'i saptanmıştır(16, 67, 97).

Plazmada Faktör VIII, vWF ile nonkovalent kompleks oluşturur. VWF endotel hücreleri ve trombositlerde sentezlenen büyük bir glikoproteindir. Plazma Faktör VIII

konsantrasyonu 200 ng/ml iken vWF konsantrasyonu 15-60 kez daha fazladır (3-12 µg/ml). Bu iki proteinin plazmadaki rölatif konsantrasyonu sabittir. vWF konsantrasyonunu etkileyen faktörler, her iki proteinin plazma konsantrasyonunu da etkiler(16, 67, 97). Bugüne kadar; Faktör VIII'in metabolik akıbeti gizli kalmıştır. Bu konudaki çalışmalar herediter Faktör VIII eksikliği olan hastalarda; transfüzyondan sonra Faktör VIII düzeylerinin ölçülmesi ile sınırlıdır. Hemofiliklere Faktör VIII transfüzyonu yapıldıktan sonra, bu hastaların plazma Faktör VIII düzeyleri hızla düşer (t 1/2 8-12 h). Faktör VIII:Ag düzeyleri de aynı hızla düşer. Bu veriler plazma Faktör VIII düşüşünün basitçe kofaktör inaktivasyonuna bağlı olmadığını gösterir. Von Willebrand hastalığı olan kimselere normal plazma veya krioprisipitat transfüzyonundan sonra, plazma Faktör VIII düzeyinde ilerleyici bir yükselme görülür. Bu kimselerin Faktör VIII genleri normaldir. Bu yanıtın nedeni ise, vWF'nün; Faktör VIII sentez ve sekresyonu artırmasıdır. Ek olarak vWF, Faktör VIII'in dolaşımdan uzaklaştırılmasını önler. İn vitro çalışmalar Faktör VIII'in, vWF'ü tarafından stabilize edildiğini göstermiştir. Ciddi von Willebrand hastalığı olan kimseler vWF içermeyen Faktör VIII transfüzyonu yapıldığında, Faktör VIII'in t 1/2 sinin çok kısa olması bu etkiyi kanıtlamaktadır(96, 80, 116).

### 3.10 F VIII'İN HÜCRE VE DAMAR DUVARI İLE ETKİLEŞİMİ

#### 1- FAKTÖR VIII VE TROMBOSİTLER

Fosfolipid eklenmeden, trombine bağlı, Faktör VIII aktivasyonu tespit edilebilirken, taze yıkanmış trombositlerin bu reaksiyonu önemli ölçüde artırdığı gözlemlenmiştir. Veriler düşük trombin konsantrasyonu kullanıldığında, bu etki için trombosit aktivasyonunun gerektiğini, ancak trombosit granül içeriğinin serbestleşmesinin gerekli olmadığını göstermiştir. Fosfatidil etanolamin ve fosfatidil kolin vesiküller kullanılarak yapılan çalışmalarda güçlü başlangıç hızının lipid konsantrasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir(32, 84).

Faktör VIIIa'nın aktive trombositlere afinitesinin dinlenme durumundaki trombositlerden daha fazla olduğunu ve trombosit aktivasyonunun kofaktöre bağlı trombin ve Faktör Xa oluşum hızını artırdığı gösterilmiştir. Ahmet ve ark., aktive olmayan trombositlerin Faktör IXa tarafından, Faktör X'nun aktive edilmesini hızlandırmadığı

(trombin tarafından aktiflenmiş Faktör VIII bulunsun ya da bulunmasın) halde, trombin tarafından aktive edilmiş trombositler Km'i 2500 kezden daha fazla azaltır ve Faktör VIII'in Kcat'i > 7500 kat artırmasına olanak sağlar. Bu araştırmacılar ayrıca; Faktör VIII ve Faktör 10'un trombin tarafından aktive edilmiş trombositlerin üzerindeki Faktör IXa reseptörlerinin afiinitesini 5 kat artırır. Aktive trombositlerin Faktör VIII için tek tip bağlanma bölgesi olduğunu söylenmiştir. Faktör VIII'in hafif ve ağır zincirlerinin, trombositler ve Ca<sup>++</sup> içeren ortamda inkübe edilince trombositlere bağlandığı gösterildi. Oysa EDTA varlığında sadece hafif zincir trombositlere bağlanıyordu(32, 84, 155).

### 3.11. F VIII'in FAKTÖR YAPI VE FONKSİYON İLİŞKİLERİ

Yapılan çalışmalar, yaklaşık 1000 amino asitten oluşan yüksek derecede glikozile B domaininin Faktör VIII koagülasyon aktivitesi için veya vWF ile etkileşimi için gerekli olmadığını göstermiştir. B domaini eksik olan Faktör VIII'in prokoagülan aktivitesi, trombinle etkileşimden sonra aynı derecede kalır. Prokoagülan aktivite elde edebilmek için cDNA'nın hem ağır hem hafif zincirinin olması gerektiği gösterilmiştir. Plazma Faktör VIII'nin ayrı ayrı hafif ve ağır zincir polipeptidleri de VIII:C aktivitesinden yoksundurlar. Fakat tekrar birleşip rejenere olabilirler ve bu dimer kompleksi oluşum hızı için, vWF önemlidir(54,80).

Bölgeye yönelik mutagenез yoluyla (yani şüpheli kesinti bölgelerindeki tek nükleik asitlerin değişimiyle) 90 k-Da'luk ağır zincirin trombin kesinti bölgesinde Arg 372 ve Arg-1689'un(98) F VIII'in trombin aktivasyonu ve F VIII'in fonksiyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir. Faktör VIII molekülünün fonksiyonel bölgelerinin haritalanması için, Fulcher ve arkadaşları son zamanlarda Faktör VIII bölgeleri boyunca uzanan Faktör VIII'in tekrarlayan zincirlerinden oluşan 15 amino asit'lik sentetik peptidlerden büyük bir seri oluşturdu. Her peptide karşı spesifik antitadiler kullanarak 80 k-da'luk hafif zincirin amino terminal ucu ve ağır zincirin, trombinle aktive edilmiş 54 k-Da.luk fragmanının her birinin Faktör VIII fonksiyonu için önemli bir epitope içerdiği öne sürüldü(98, 193).

### 3.12. FAKTÖR VIII VE ENDOTEL HÜCRELERİ

Hücre yüzeylerinin Faktör Xa oluşumunu desteklediği yönünde bulgular saptanmaya başlamıştır. Örneğin Stern ve arkadaşları sağlam inek aort endotelinin; hem Faktör X, hem de Protrombin aktivasyonunu artırdığını göstermiştir. Bu çalışmalarda; damara bağlı F IXa; Faktör VIII/vWF varlığında Faktör X'u, eksojen fosfolipid eklenmediği halde aktive ettiği gösterilmiştir(80).



#### 4- F VIII'in MOLEKÜLER GENETİĞİ

Yakın zamanlarda F VIII geninin klonlanması ve karakterize edilmesi Hemofili A da DNA hibridizasyon analizlerinin yapılmasına imkân vermiştir. Bu da hemofili A'nın moleküler genetiğinin anlama ve yorumlanmasının kilometre taşı olmuştur. Kalıtsal hastalıklar konusunda yapılan bir çok çalışmada birçok tipte mutasyonun F VIII genini etkileyebildiği ve hemofiliye sebep olabileceği saptanmıştır. Örneğin; delesyonlar, missense ve nonsense mutasyonlar genetik hastalıklardan sorumlu olabilir.

DNA analizlerine ait yakın zamanlardaki bir değerlendirme Antonarakis ve ark. Tarafından(2, 3, 57, 58, 179) sunulmuştur. Yaklaşık 500 farklı hemofili A vakasına ait DNA'ları inceleyen; Dunga'nın her tarafındaki çeşitli grupların deneyimlerinden, 39 F VIII genine bağımlı moleküler defekt açıklığa kavuşturulmuştur (19 delesyon, 20 nokta mutasyonu). Bilgilerin çoğu çok sayıda restriksiyon enzimi ile parçalandıktan sonra genomik DNA'yı inceleyen laboratuvarlardan elde edilmiştir. Hemofiliklerde delesyon ve mutasyonların belirlenmesinde Taq I özellikle yararlı bir enzimdir. Bu enzim, CpG dimerini içeren TCGA dizisini tanıır. Youssoufian ve ark(3). Bu dimerin mutasyon için "hot-spot" olduğunu vurgulamışlardır. Çünkü sitozinin 5' pozisyonunda metillenme ve bunu takiben deaminasyon meydana geldiğinden sitozin-timine dönüşür. Bu da CG nin TG'ye dönüştüğü mutasyonların sıklığını açıklar ve antisense DNA zincirinde C'nin T'ye dönüşümü, kodlanan DNA'da, CG'nin CA'ya dönüşmesine sebep olur. Hemofili A ailelerinde bir çok delesyon belirlenirken, sınırlar hepsinde aynıdır. Bu konudaki bir istisna 22 exonda 5,5 kb'lık bir delesyondur. Bu delesyonlarda ciddi hemofili A'ya sebep olur. Bu delesyon frameshift (çerçeve kayması)'e sebep olmaz. Delesyonu olan bir çok hasta F VIII'i karşı antikor oluşturur (İnhibitör oluşumu). Bu durum delesyonun genişliği ve pozisyonu ile korelasyon göstermez. Hatta tümüyle gen delesyonuna bağlı F VIII eksikliği, mutlaka inhibitör oluşumuna sebep olur. Buna karşılık delesyonlar ve inhibitörlerin birlikte bulunmaları şeklinde karşılıklı bir ilişkinin olmadığını söyleyen araştırmacılar vardır. Trombinin F VIII'I 372 ve 1689 a-asit rezidülerinden kopardığı tartışmalıdır. Bu bölgelerdeki mutasyonların hemofili A'ya sebep olması şaşırtıcı değildir. Bu, F VIII'in genomik DNA bölgeleri amplifiye edilerek belirlenir. DNA sentezi için primerler kullanılır ve çok sayıda siklusta amplifikasyon sağlanır. Daha sonra amplifiye

olan ürün oligo-nukleotid proplar kullanılarak belirlenir. Alternatif olarak, CRM-pozitif hemofili A plazmalarından elde edilen non-fonksiyonel proteinin trombin tarafından parçalanıp parçalanmadığı belirlenir(2, 3, 67, 78, 121, 167).

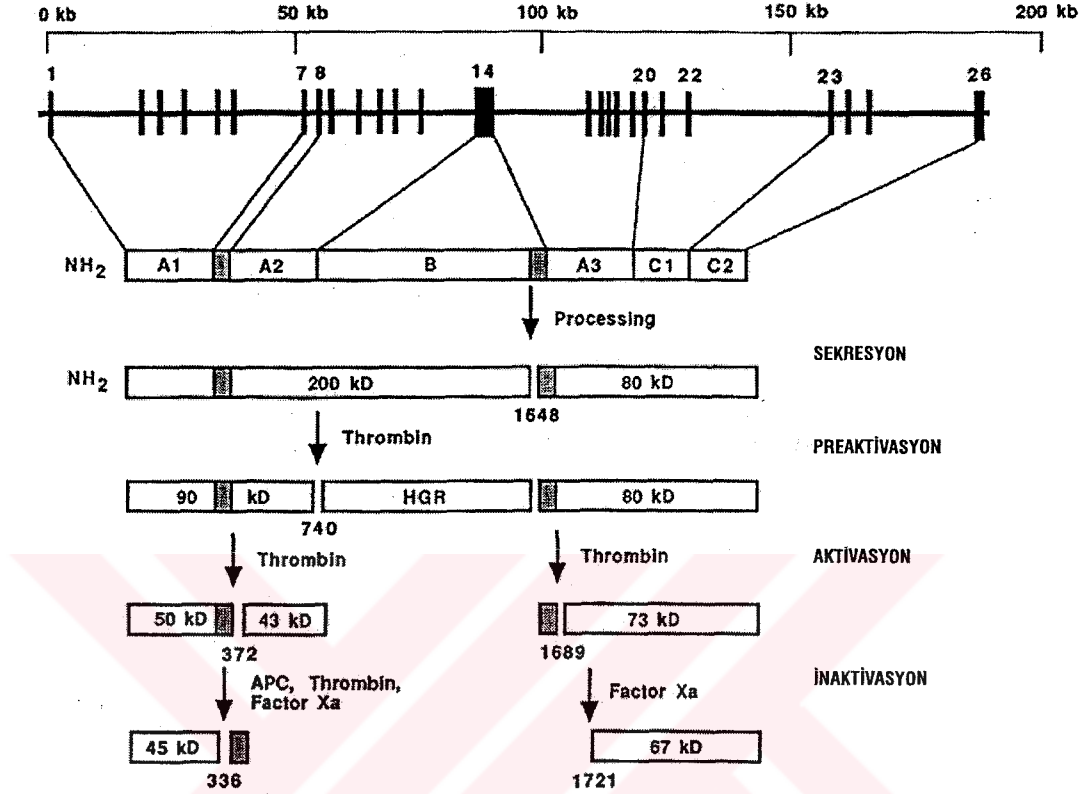
F VIII gen mutasyonlarının karakterize edilmesi, F VIII geninin büyüklüğü nedeniyle yavaştır. Restriksiyon enzim etki bölgelerini etkileyen çok sayıda potansiyel mutasyonun, southern blot analizinin rezolüsyon sınırı altında kalan çok küçük delesyonların ve intronlardaki mutasyonların saptanması güçtür. Bugün bu güçlükler denatüre edici gradyent jel elektroforezi kullanılarak aşılabilmektedir(78, 105). Bu teknikle, göreceli olarak büyük DNA segmentlerindeki tek nükleotid değişiklikleri saptanabilir (288-289). Bu yöntemle plazması en azından az miktarda Faktör VIII bulunan bir çok hastada spesifik mutasyon saptanmıştır (46 hastanın 41'inde). Fakat bu yöntem ciddi hemofili A'da moleküler defekti saptamada daha az başarılıdır. Higuchi ve ark.(78) Kodlanan bölgelerin %99'unu, splice junctionların %94'ünü, promotor bölgeleri ve poliadenin bölgelerini incelediği halde; ancak 30 hastanın 16'sında mutasyon tespit edebildiler. Diğer bir yaklaşımda lökosit mRNA'sının incelenmesidir, oldukça hızlı bir prosedürdür. Bu yöntemle F VIII gen dizileri saptanabilir. Bu metod kullanılarak, ciddi hemofili A'sı olan 24 hastanın 24 de de spesifik defekt saptanmıştır. Yine bu yöntemle intron 22'de sıradışı mutasyonlar kümesi de tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar exon 22 ve 23'ün defektif bağlanmasına ve ciddi hemofiliye sebep olur. Tek nükleotidleri kapsayan nokta mutasyonlara ait araştırmalar, aynı kodon bölgesindeki farklı tek baz substitüsyonlarının farklı genotiplere neden olduğunu ve farklı kodonlardaki aynı baz substitüsyonlarının da farklı genotiplerle sonuçlandığını göstermiştir. Hemofili A'lı her bir aile F VIII geninde kendisine ait belirli bir mutasyona sahiptir(78, 105, 197). Von Willebrand hastalığında da F VIII eksikliği vardır. Bu hastalıkta F VIII'in prokoagülan aktivitesinin azalması X kromozomundaki gen defektine bağlı değildir. Aktivitedeki azalma plazma vWF'deki kalitatif ve kantitatif değişikliklere bağlıdır. F VIII'in efektif sentezi için vWF'ü gerektiği gibi, F VIII'in plazmada stabilizasyonu için de gereklidir. Bu nedenle von Willebrand hastalığında hem F VIII hem de vWF düzeyinin düşük olması şaşırtıcı değildir(197).

#### 4.1. FAKTÖR VIII cDNAs, GENLERİ VE EKSPRESYONLARI

Faktör VIII (relative molecular mass-Mr mass 330.000) kan koagülasyonunun intrinsik fazının ortalarında koagülasyona iştirak eder. Başlıca karaciğerde sentezlenir ve plazmaya sekrete edilir. Dolaşımında vWF ile kompleks halinde bulunur. Faktör VIII, Faktör IXa, kalsiyum ve fosfolipidlerin varlığında, F-X'nun, Faktör Xa'ya çevrilişini hızlandıran bir kofaktör olarak fonksiyon yapar. Faktör VIII, kofaktör aktivitesini göstermeden önce trombin ve diğer serin proteazlar tarafından minör bir protealize maruz kalmalıdır(80, 193, 197).

Faktör VIII tek zincirli bir polipeptid olarak sentezlenmesine rağmen, plazmada başlıca iki zincirli bir molekül olarak bulunur. Bu da, biyosentez, sekresyon ya da plazmada molekülün dolaşımı sırasında bir proteaz ve proteazlar tarafından Arg 1648'deki peptid bağının kırılması ile olur. Fakat, kofaktör olarak F. VIII koagülant aktivitesi için, trombin ve diğer proteazlar tarafından yapılan minör proteolizlere gerek vardır. Bu proteolitik yıkılma, başlıca Arg 740 da olur ve bir hafif zincir (1-740 amino asitlerini içeren) bir ağır zincir oluşur (1649 ile 2332). Bu iki zincir birlikte Ca tutarlar. Bağlayıcı polipeptid zincir (741-161,8 aasitleri) karbonhidrattan zengindir ve preolitik yıkımlara dayanıklıdır. Daha sonra hafif zincirin Arg 372 de, ağır zincirin Arg 1689'da ilave kesilmeler olur. Faktör VIII'in aktivasyon ve inaktivasyonundan sorumlu olan trombin tarafından yapılan kesilmeler henüz kesin olarak açık değildir(80, 113, 197).

Trombin tarafından oluşturulmuş ağır ve hafif zincirler arasında asparajan N-bağlanmış 25 adet karbonhidrat zincir bulunur. O-bağlı karbonhidrat zincirler tespit edilmemiştir. Faktör VIII moleküllerde yedi tirozin sülfatlanma bölgesi tespit edilmiştir. Bunlar, hafif zincirin 50 kd.luk fragmanında Tyr 349, hafif zincirin 43 kd'luk fragmanında Tyr 395, 718, 719 ve 723 ve ağır zincirin 50 kd'luk fragmanında Tyr 164 ve 1680'dir. Hafif zincirdeki tirozin residüleri rekombinant F. VIII de kısmen sülfatlanmıştır ve residülerin sülfatlanması F VIII'in koagülant aktivitesini etkilemez. Diğer taraftan, ağır zincirdeki tirozin residüleri rekobninat F VIII de tamamıyla sülfatlanmıştır ve Tyr 1680'in sülfatlanması Faktör VIII ile von Willebrand faktörünün bağlanması için önemlidir (Şekil 8).



Şekil 7: F VIII geni ve molekülün işlevsel organizasyonunun şematik olarak görünümü(32)

Faktör VIII'in RNA'sı yaklaşık 9000 nükleotid uzunluğundadır ve 19 amino asitlik bir lider sekuansı ve 2332 amino asitlik bir matür proteini kodlar. Tirozinde sonlanan bu matür polipeptid zincir ibir TGA stop kordonu ve 1802 nükleotidli kodlamayan sekuens ile takip edilir. AAT AAA'nın polianedilasyon ve işleme bölgesi poliadenilasyon sinyalden 19 nükleotid ilerdedir(27, 117, 121).

Faktör VIII'in amino asit zinciri iki tıp internal homoloji ihtiva eder. İlk internal homoloji 1 ile 329, 380 ile 711, 1649 ve 2019 residülerinde lokalize olmuş bir triplikate zincirden ibarettir. Bu tekrarlayan zincirler birbirleri ile yaklaşık %30 homolojiye sahiptir.

Bu üçlü tekrar grubunda ikinci ve üçüncü tekrarlar 983 a-a ile ayrılır ve N bağlı glukolizasyon bölgelerinde çok yüksektir. Molekülün karboksi-terminal ucunda lokalize oluştur (2020 ile 2124 ve 2175 ile 2332 residüler arası). Arka arkaya dizilmiş bu iki tekrar %40 homoloji gösterirler. Daha önce de bahsedildiği gibi bu triplikate tekrarların en dikkat eder özelliği, Faktör V ve 6 bakır atomu ihtiva eden bir plasma proteini olan seruloplazmin

ile olan yüksek homolojileridir. Ayrıca da, Faktör VIII in ilk ve üçüncü domainlerinde benzer pozisyonlarda, seruloplazmin ligandların bağlanması için amino asitler de mevcuttur. Bu da bakır gibi metallere bağladığını gösterir(118).

F-VIII geni X kromozomunun uzun kolunun ucuna yakından Xq 2,8 bölgesinde yer alır ve 26 exon, 25 intron ihtiva eden yaklaşık 186 kb.lık bir DNA ihtiva eder. Exonlar, 69'dan 310.6'ncı nukleotide kadar uzanır. İtronlar ise 200 nukleotidden 32,4 kb'a kadar değişir. İtronların altısı çok büyüktür ve 14 kb'ın üzerinde bir DNA ihtiva eder. Proteinin merkezinde bulunan bağlama bölgesi çok büyük bir exon olan, exon 14 tarafından kodlanır. Genin yaklaşık %5'i exonlar tarafından işgal edilmiştir. Arta kalan %95 kodlamayan DNA'dır. RNA haritalama çalışmalarından mRNA sentezinin başlanıcı için bir başlama kısmı tespit edilmiştir. Bu da mRNA sentezinin çoğunlukla, başlangıç meteonunundan 170 nukleotid önce lokalize olmuş bir G de başladığını göstermiştir. MRNA başlangıç bölgesinen 30 Gp (Gaz çifti) kadar önce bir TA TAAA nın bir TATA kutusu da vardır. İlginç olarak, 22 intron (Faktör VIII geninin) zıt yönde ilerleyen (oriented) bağımsız bir gen ihtiva eder (CpG adası). Bu gen 2 ek transkript ile ilişkilidir. Bir transkript 1,8 kb uzunluğundadır, VIIIA adını almaktadır ve F VIII'in aksi yönde okunmaktadır. Memelilerde ender rastlanan ve intron içinde bulunan genlerden bir örnek olan bu gen bölgesinin intronları yoktur ve F-VIII geninin 300-500 kb yukarı ucunda iki kopyası daha olduğu saptanmıştır(14, 27, 58, 87, 97, 106, 122, 197).

Hemofili hastalarından elde edilen çok büyük miktarda genomik DNAs çeşitli metodlar kullanılarak analiz edilmiştir. Bu metodlar Southern Blotting oligonükleotid hibridizasyon, direkt nukleotid zincir analizi, fragmantların kimyasal veya enzimatik kesilmesi, denatüre graident jel elektroferizene single strand (teli iplikcik jel elektroforezi. Bu metodların çoğu, polimeraz zincir reaksiyonu ile genomik DNA'nın in vitro amplifikasyonunu içerir. İnsan büyük hacminden, kompleks genomik yapısından kişisel vakalar arasındaki heterojen mutasyonlardan ve de nöro mutasyonların yüksek sıklıkta olmasından dolayı, Faktör VIII genini analiz etmek çok zordur. Faktör VIII geninin çalışmaların çoğu, hemofiliklerde yapılmıştır ve bunlarda %1 ile %5 inde delesyon ve inseriyonlara rastlanmıştır. Faktör VIII gen defektlerinin çoğu, nokta mutasyonlar tarafından meydana getirilir. Çoğu delesyonlar ve nonsense mutasyonlardır (terminasyon kordonları oluşturur) ve ucu kesilmiş Faktör VIII moleküllerini oluşturur bu da hemofiliye sebep olur(58,97). Orta ve hafif ağırlıktaki hemofilik olgularının çoğu, tek nokta

mutasyonlarından dolayıdır. Bu da Moleküler biyosentezini, ve stabilitesini bozar(117). Yalnızca birkaç mutasyonun Faktör VIII'in moleküler abnormalitesinden olduğu ispatlanmıştır. Bunlar, Arg-372 ve Arg 1689'un Cys veya His de ve Tyr 168'in Phe ile yer değiştirmesidir. Bunun sonucunda Faktör VIII akitvasyon için gerekli olan trombin kesilmesine direnç kazanır. Tyr 1680, von Willebrand faktörünün hafif zincirinin bağlanma bölgesindedir. Daha önce de bahsedildiği gibi bu residunun sülfatlanması Faktör VIII'in, kendisini stabilize eden von Willebrand faktörü ile etkileşimi için esastır. Diğer çok sayıda mutasyonlarda hemofili A ile neticelenir fakat, Faktör VIII molekülünün eksiklik veya disfonksiyonunun kesin mekanizması henüz anlaşılamamıştır(117,179).



## 5- ARTERİYEL VE VENOZ TROMBOZİSTE F VIII VE DİĞER HEMOSTAZ PARAMETRELERİ

F VIII ve tromboz riski ilişkisini inceleyen çalışmalar önce F VIII ve venöz tromboz riski üzerine odaklanmıştı. Penick ve arkadaşları ilk defa yüksek F VIII:C ve trombili arasındaki pozitif ilişkiyi tanımladı. Sağlıklı toplumun %11'inin 150 IU/'de den daha yüksek F VIII:C'ne sahip olduğu, bu kişilerin, F VIII:C'nin 100 IU/dl'den düşük olduğu kişilerle karşılaştırıldığında beş veya altı defa daha fazla venöz tromboz riski taşıdığı birçok çalışmada gözlenmiştir(76, 107, 112, 149, 157, 175).

Komphuisen ve O'Donnel ayrı ayrı yaptıkları çalışmalarda yüksek F VIII:C seviyeleri ile F VIII:Ag seviyelerinin ileri derecede korele olduğunu bunun da, yüksek F VIII:C seviyelerinin, kan koagülasyonu esnasında, koagülasyon sisteminin aktivasyonu neticesi olmadığını ve artmış F VIII-proteininin (F VIII:Ag) gerçek bir göstergesi olduğunu söylemişlerdir(112, 157).

Normal popülasyonda F VIII:C geniş bir aralığa sahiptir ve paralel olmayan bir yayılım gösterir. Ayrıca F VIII:C iyi tanımlanmış bir akut faz reaktandır, hamilelikte oral kontraseptiv kullanan kadınlarda ekzersiz travma ve infeksiyonları takiben yükselir. Bu durumlarda artmış tromboembolik hastalıklarla birlikte dir(152).

Yüksek F VIII seviyelerinin, artmış arteriyel hastalık riski ile korele olduğu uzun zamandır bilinmektedir. The Nothwick Park Heart Study grubu ARIC kapsamında yaptıkları çalışmalarda yüksek F VIII seviyelerinin, koroner kalp hastalığı riskini artırdığını bildirmişlerdir. Fakat vWF ve F VIII'in plasma konsantrasyonları birbiriyle çok ilişkili olduğu için, trombogenesisde her bir proteininin ayrı ayrı yüksekliğinin etkilerini çözümlenmek zordur(45,132,162,173).

Rumley yaptığı çalışmada MI veya İKH ölümleri ile F VIII:C arasındaki ilişkiyi doğrulamış, F VIII:C'nin fibrin oluşumuna fazlalaştırarak arteriyel trombozisin fibrin komponentini artırdığını söylemiştir(162).

Bir koagulasyon faktörü olan fibrinojen, hemostazisin çok önemli bir adımında rol alır. Fibrinojenin pıhtı oluşumundaki rolünden başka platelet agregasyonunda bir kofaktör olarak rol alır(169). Ayrıca düz tas hücrelerinin migrasyon ve proliferasyonuna stimule eder bu da aterosklerotik plakların bir komponentidir. Kan viskozitesini artırır ve trombus oluşumuna katkıda bulunur(132). Fibrinojen aynı zamanda bir akut faz reaktanı olduğu için, ateroskleroz gelişmesindeki inflamatuvar aktiviteyi yansıtır. Fibrinojenin bu özellikleri yüksek plazma fibrinojen değerleri ile koroner kalp hastalığı insidansı ve aterosklerotik risk faktörleri arasında pozitif ilişkiyi açıklar(9, 12, 51, 195).

Protein C, antekoagulan sistemini önemli bir komponentidir. Vitamin K'ya bağlı bir plasma proteini bir serin proteazdır. Thrombin-thrombomedulin kompleks tarafından endotel hücreleri üzerindeki aktivasyonundan sonra seçici olarak koagulasyon faktörlerinden F-Va ve F VIII'yı proteolitik olarak yıkıp reaktif ederek, pıhtı oluşumunu sınırlandırır(52). Protein C bu etkisini etkin olarak yapmak için nonenzimatik bir kofaktör ve yine vitamin K bağımlı bir plasma proteini olan protein S'e ihtiyaç duyar(31, 37, 53).

Protein C'nin etki mekanizmalarına dayanarak, birçok araştırmacı, azalmış protein C seviyelerinin, fibrin oluşumunu aşırı artırıp trombosise katkıda bulunabileceğini söylemişlerdir(33, 74, 135, 175). Bu güne kadar yapılan pek çok çalışmada, "azalmış protein C tromboembolitik risk artısına sebep olur" hipotezini teyit etmiştir. Genç ve orta yaşlı kişilerde artmış bir venöz trombos riski, kazanılmış veya kalıtsal protein C eksikliği ile birlikte(21). Bir kaç vakada da protein eksikliği ve arteriyel trombozis ilişkisi de teyit edilmiştir(5, 50, 31, 38).

Dahlback ve arkadaşları(74) ilk defa bir çok ferdinde genç yaşta rekurent venöz trombozis görülen bir ailede, trombozisin kazanılmış ve herediter risk faktörlerini dışladıktan sonra, etkilenmiş kişilerin plazmalarını aktive protein C ilave edip aPTT testi uyguladı ve beklediğinden biraz daha uzun neticeler gözdledi. Bunun da aktive protein C'nin antikoagulan etkisine karşı bir resistansı gösterdiğini söyledi(39, 174) ve bunu, koagulasyon konusunda son on yılda yapılan en önemli keşif olarak niteledi. Venöz trombozislili hastaların yaklaşık %40'ında bu defekt vardı(174). Bu çalışmalar %20'den %60'a uzanır bir prevalansı teyit eden çalışmalarla da desteklerdi(108). Şimdi artık, protein C rezistansı olan vakaların çoğunda; F-V geninde bir nokta mutasyonunun bulunduğu açıklığa kavuşturulmuştur. Bu da F-V'I, APC'nin inaktivasyonuna karşı

duyarsız hale getirir. Bu mutasyon, 1691'inci nükleotid pozisyonunda bir G-A subtetasyonundadır. Bunun sonucunda, APC'nın F-V molekülünü proteolizise uğrattığı ağır zincirindeki bölgeden (Ag-306, Ag-506, Arg-679) 506 pozisyonundaki argininin, glutamin ile yer değiştirir. Bu mutasyon F-V Leiden mutasyonu olarak bilinir. Mutant faktör Va, 506'ncı pozisyonundaki kırılmaya rezistans kazanır. Bu da, normal faktör Va'dan daha yavaş inaktive olur. Bunun sonucunda da, trombin oluşumunda artış ve hiperkoagülasyon durumu oluşur. Bundan başka, sebebi Leiden mutasyonu olmayan, "kazanılmış" bir APC rezistansı ile birlikte olan inflamatuvar hastalıklar, hamilelik, oral kontraseptiv kullanımı gibi bazı fizyolojik ve patolojik durumlar da sözkonusudur. Bu klinik durumlarda yüksek Faktör VIII seviyeleri bildirilmiştir(116, 129). Enteresan olan F-V Leiden mutasyonu taşıyan trombozisi kişilerde, birlikte F VIII yüksekliğinin de bulunmasıdır(6, 12, 40, 174).

APC rezistansı başlıca F-V Leiden tarafından oluşturulur, fakat artmış F VIII:C gibi diğer şartlarda APC rezistansına yol açabilir(76). Yüksek F VIII konsantrasyonları, protein C, protein S ve APC rezistansı gibi inhibitörlerin eksikliklerine benzer olarak, trombozisi riskini gösterir(174, 184).

F VIII yüksekliğine yol açan mekanizmalar henüz aydınlatılamamıştır. Son raporlarda, trombotik hastalarda intra-familiyal F VIII artışı bildirilmiştir(92). Bütün bu veriler F VIII seviyelerini kontrol eden genetik komponentlerin varlığını önermektedir.

İntra-familiyal çalışmalarından elde edilen verilere dayanarak F VIII genindeki genetik değişikliklerin yüksek F VIII seviyelerine sebep olabileceği hipotezi geliştirilmiştir. Minswelt(127) ve arkadaşları ile Komphuisen(92) ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalar sonucunda F VIII geninde, F VIII yüksekliğine sebep olan bir değişiklik bulamamışlar fakat F VIII geninin daha ileri polimorfizm analizlerinin bu ilişki açıklayabileceğini savunmuşlardır(90, 124).

## 6- KAN PIHTILAŞMASININ DOĞAL İNHİBİTÖRLERİ

Aktive prokoagülan faktörlerin, temel doğal plazma inhibitörlerinden biri antitrombin III (AT III)-heparansülfat sistemidir. Bu sistem trombin, faktör Ixa ve Xa gibi enzimlerin inhibisyonundan sorumludur. Diğer önemli bir sistem Protein C (PC)- Proteins (PS) ve Trombomodulin (TM) sistemidir. Bu sistem faktör Va ve VIIIa gibi önemli işlevlere sahip protein kofaktörlerin inaktivasyonundan sorumludur(163). Yeni bulunan ve kan pıhtılaşma sisteminin aktivasyonunu kontrol edebileceği düşünülen bir sistem de, doku faktörü yolu inhibitörü (tissue factor pathway inhibitor, TFPI) dır. Bu inhibitörlerin önemli özelliği, substratları olan prokoagülan, aktif kompleks halindeyken bunlara karşı inaktif olmalarıdır. Başka bir deyişle, multiprotein komplekslerinden ayrılan substratlara karşı aktiftirler(163).

Prokoagülan enzimlerin diğer inhibitörleri arasında heparin kofaktör II (HCII), alfa-2 makroglobulin (AMG), alfa-1 antitripsin (AAT) ve C1 esteraz inhibitörü (C1-INH) vardır.

### 6.1. PROTEİN C

#### 1- Protein C Aktivitesinin Bulunuşu

K vitaminine bağlı plazma proteinleri trombinle etkileştiğinde antikoagülan aktivite gözlenmiştir. Kimi araştırmacılar önceleri bu aktiviteyi autoprotrombin II-A olarak isimlendirdiler. Daha sonraları önceden autoprotrombin II-A olarak bilinen ve pıhtılaşma zamanını uzatan bu madde protein C olarak isimlendirildi(49, 172). Araştırmacılar bu aktivitenin K vitaminine bağlı proteinlerin oluşturduğu protrombin kompleksinden kaynaklandığını düşünmüşlerdir(31, 183).

Araştırmacılar tavşanların juguler venlerine bolus şeklinde trombin enjekte edildiğinde (20 v/kg) güçlü bir antikoagülan aktivitenin ortaya çıktığını ve trombin enjeksiyonundan sonra aldıkları kanda fibrinojen, fibrin yıkım ürünleri ya da trombin

zamanında bir değişiklik olmadığı halde parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) nı yüksek buldular. Antikoagülan etki, trombin enjeksiyonundan sonra 90 dakika devam ediyor ve giderek kayboluyordu. Gözlenen bu aktivitelerin daha önceki araştırmacıların bulduklarına benzediğini ancak bu aktiviteyi oluşturan trombin miktarının in vivo koşullarda çok daha az olduğunu ileri sürdüler(31).

K vitamini, karaciğerde protrombin, faktör VII, IX ve X'nun N terminalindeki glutamik asit residülerinin, gamma karboksi glutamik asit residülerine (G1a rezidüleri) dönüşümünde kofaktör olarak işlev görür. G1a rezidüleri bu proteinlerin kalsiyum iyonlar ve negatif yüklü fosfolipid yüzeylerle etkileşimini sağlar(183, 200).

Stenflo K vitaminine bağlı proteinleri immunolojik yöntemlerle belirleyip, iyon-değişim kromatografisi ile ayırdı. Kromatografi kolonundan dört protein piki elde etti ve bunları A,B,C ve D olarak isimlendirdi. Daha sonra A pikinin faktör IX, B pikinin protrombin ve D pikinin faktör X olduğunu gösterdi. Üçüncü pikin ne olduğu Seegers ve grubu(31) aktif protein C ve daha önce bulunmuş autoprotrombin II A'nın immünolojik olarak aynı olduğunu göstermesine kadar bir sır olarak kaldı(31, 172).

## 6.2. PROTEİN C SENTEZİ VE YAPISI

Protein C, sendtezi K vitamini bağlı olarak karaciğerde gerçekleştirilen glikoprotein yapısında bir serin proteazı zimojenidir. Karaciğerde tek zincir halinde sentezlenir. Post translasyonel modifikasyonlarla hafif (21000) ve ağır (41000) zincirlerden oluşan yapıya dönüştürülür. İki zincir birbirine disülfid bağı ile bağlıdır. İnsan protein C geni kromozom 2q13-q14'de bulunur. Protein C geninde 9 ekson vardır. Bu eksonlar genomik DNA'da 11 Kb'lık bir bölgeyi kaplarlar. Protein C geninin kodladığı mRNA, protein kodlayan bölge (2-9 eksonlar) ile trnaslasyonu yapılmayan 5 (exon 1'de 53 bp ve exon 2'de 21 bp) ve 3' (294 bp) bölgelerini içerir(153).

Protein C aminoasit dizisi üzerinde yapılan çalışmalarda, yapısal ve fonksiyonel olarak önem taşıyan bölgeler gösterilmiştir. (-42) den (-1)'e kadar olan bölüme prepro dizi denir. Bu bölüm proteinin sekresyonunu sağlayan, (-42) ile (-25) rezidüleri arasında yer alan hidrofobik pre diziyi ve (-24) ile (-42) rezidüleri arasında yer alan, K vitaminine bağlı

karboksilazın protein C molekülünü tanınması için gerekli olan diziyi içerir. Matür hafif zincirde 155 amino asit vardır. Matür hafif zincirin 1-45 amino asit arasındaki bölümüne Gla bölümü denir. Bu bölgede 9 tane gamakarboksi glutamik asit bulunur. Gla bölümü amfipatik bir helixle sonlanır ve bunun iki tane EGF (epidermal growth factor) bölümü izler. [46-91 ve 91-236 rezidüleri]. 262 aminoasitten oluşan matür ağır zincir, aktivasyon peptidi ile katalitik bölgeyi içerir. Katalitik bölge (170-419. amino asitler) bütün serin proteazlarında homologdur. Bu bölgede üç tane katalitik bölge rezidüsü bulunur. Modifikasyona uğramamış protein C molekülünde hafif ve ağır zincirler arasında K<sup>156</sup>-R<sup>157</sup> şeklinde gösterilen bir dipeptid mevcuttur(183, 201).

Protein C molekülü sentezledikten sonra bir çok modifikasyon geçirir. Bu modifikasyonlar arasında gamma karboksilasyon,  $\beta$  hidroksilasyon, glikolizasyon, prepropeptid, K<sup>156</sup>-R<sup>157</sup> dipeptidin koparılması sayılabilir. Gamma karboksi glutamik asit rezidüleri protein moleküllerinin Ca<sup>++</sup> iyonları ve negatif yüklü fosfolipid yüzeyleriyle etkileşimini sağlar. Kumarin türevleri bu proteinin K vitaminine bağlı modifikasyonunu önler ve kumarin tarafından modifiye edilen bu proteinler hemostazda fonksiyon görmezler(125, 172).

Protein C molekülünün uğradığı ikinci modifikasyon glikozilasyondur. İnsan protein C'si plazmada çok sayıda glikoformlarda bulunur. Glikozilasyon endoplasmik retikulumda gerçekleşir. Glikozile edici enzim spesifik olarak asparagin rezidülerindeki karbonhidrat yan zincirlerine tutunur. Son yıllarda, glikoproteinlerin fonksiyonel özelliklerini gösterebilmeleri için gerekli olan karbonhidrat yan zincirler araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Azota bağlı karbonhidrat yan zincirlerin plazma klirensi, sinyal iletimi, reseptör aktivasyonu, intrasellüler katlanma ve aktivite dahil olmak üzere çok sayıda fonksiyonu kontrol edebildikleri bilinmektedir. Protein C'nin glikozilasyon derecesi fonksiyonel aktivitesini etkileyebilir. Nitekim sialik asit rezidülerinin nöraminidaz etkisi ile uzaklaştırılması protein C molekülünün antikoagülan aktivitesinin artmasına yol açmaktadır(172).

Protein C molekülünün geçirdiği modifikasyonlardan birisi de Asp 71 pozisyonundaki rezidüsünde  $\beta$  hidroksilasyon şeklindedir. Bu rezidünün Gla bölgesinden bağımsız Ca<sup>++</sup> bağlama bölgesi olduğuna inanılır.

Protein C endotel hücre yüzeyinde Arg 169-Leu 170 arasındaki bağın alfa-trombin-trombomodulin kompleksleri ile koparılması sonucunda aktifleşir. Trombomodulin trombinle 1:1 kompleks oluşturur. Trombomodulinin trombine afinitesi yüksektir(83). Trombin tek başına da protein C'yi aktive edebilir. Ancak alfa-trombin-trombomodulin kompleksleri protein C aktivasyonunu 20.000 kez hızlandırır. Trombine ek olarak factor Va protein C aktivasyonunda kofaktör olarak işlev görür. Protein C, bir faktör X aktivatörü olan Russell's viper venom (RVV) tarafından da aktive edilir. Bu venom da, protein C'den trombinin kopardığı peptidi koparır(172). Faktör Xa da protein C'yi aktive eder. Agkistrodon contortrix yılanının venomu protein C'yi spesifik olarak ve trombine oranla çok daha hızlı aktive eder(194). Aktive protein C'nin amidolitik ve esterolitik etkisi vardır(172).

Yakın geçmişte faktör Xa'nın trombomodulinle kompleks oluşturup, aktif protein C oluşumunu hızlandırdığı gösterilmiştir(89).

### 6.3. PROTEİN C'NİN PLAZMA DÜZEYİ

İnsan plazmasında protein C konsantrasyonunu Stenflo(172) 2-6 mg/L olarak bildirmiştir. İkedo ve Griffin yetişkinlerde protein C normal düzeyinin 2-4 mg/L olduğunu tespit etmişlerdir(40). APC plazma düzeyleri ise yaklaşık olarak 40 pmol/L'dir(66).

Erişkin protein C antijen aktivite düzeyine ancak hayatın ikinci dekadında ulaşır(176). İlk iki ayda dolaşımda aktif olmayan bir protein C kalıntısı bulunabilir. Dolan(43) plazma protein C düzeyinin yaşla birlikte arttığını gösterdi.

### 6.4. PROTEİN C'NİN BİYOLOJİK FONKSİYONU

Protein C'nin biyolojik fonksiyonu kanın sıvı durumunu sürdürmektir. Bunun için protein C en az iki farklı mekanizma ile işlev görür.

(1) Antikoagülan etki: Faktör Va ve Faktör VIIIa yı  $Ca^{++}$ , fosfolipid ve protein S'nin varlığında proteolitik olarak inaktive etmesinin bir sonucudur(60, 69, 81, 176).

(2) Fibrinolitik etki: Bu etkisi plazminogen aktivator inhibitörlerini inhibe etmesine bağlı olabilir(60, 81, 176).

Protein C'nin işlev yapabilmesi için Trombomodülin'e bağlanması gerekir, bu bağlanmada Protein S kofaktör olarak işlev yapar. Protein S de protein C gibi K vitaminine bağlı olarak sentezlenir(53, 69, 71, 104).

## 6.5. PROTEİN C EKSİKLİĞİ

Fenotipe göre iki tip protein C eksikliği vardır: Tip I ve Tip II. Tip I en sık görülen formdur. Bu tipte hem protein C antijenik düzeyi hem de aktivitesi azalmıştır. Antijenik düzey ve aktivitelerdeki azalma normal fonksiyon gören protein C molekülünün sentezinin ya da stabilitesinin azalmasına bağlıdır. Tip II de protein C aktivitesi, protein C miktarından çok daha fazla azalmıştır. Bu tipte spesifik aktivitesi düşük anormal bir protein C molekülü sentezlenir(60, 153).

Homozigot ve bileşik heterozigotlarda protein C antijen ve/veya aktivite düzeyi tespit edilemeyecek kadar düşüktür. Bu hastalarda sıklıkla neonatal purpura fulminans ve massif venöz tromboz görülür. Homozigot ve bileşik heterozigotların bir bölümünde ise protein C düzeyi düşük ancak ölçülebilir düzeydedir. Bu hastalarda çocukluk ve adolesans dönemde trombotik semptomlar görülmeyebilir(62).

Heterozigot protein C eksikliği olan hastalar göreceli olarak daha az etkilenirler. Bir çok ailede eksiklikle trombotik eğilim arasında açık bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Tipik olarak ilk semptom 15-30 yaşları arasında görülür. Ailedeki bazı heterozigot bireyler geç yaşlara kadar asemptomatik kalabilirler.

Venöz trombozla birlikte bulunan heterozigot protein C eksikliği prevalansının 1/15000 olduğu hesaplanmıştır. Heterozigot protein C eksikliği ile tromboz arasındaki ilişki konusunda birbiri ile çelişen iki grup veri vardır.

Birincisi, sıklıkla homozigot veya bileşik heterozigotların anne ve babalarının öz ve soy geçmişlerinde tromboz yoktur. İkincisi, sağlıklı kan donörlerinde yapılan çalışmalarda

heterozigot protein C eksikliğinin sağlıklı kimselerin 1/200-300'ü etkilediği bulunmuştur. Bu kimselerin kendileri ve akrabalarında geğirilmiş tromboz öyküsü yoktur. Bu gözlemlere dayanılarak şimdiye kadar bilinmeyen faktörlerin (örn.: aynı kompensasyon mekanizmaları, epistatik etkiler, çevresel faktörler ya da protein C'de anormalliğin tipi vb) trombotik olayın ortaya çıkmasına katkıda bulunabileceği düşünölmüştür(6, 60, 172).

## 6.6. AKTİF PROTEİN C RESİSTANSI

Protein C'nin fizyolojik önemi homozigot protein C eksikliği olan hastalarda dramatik bir şekilde gözlenir. Bu hastalarda genellikle neonatal dönemde dissemine intravasküler koagölasyon gelişir. Bu homozigot hastaların ebeveynleri ile ailedeki diğer heterozigotların trombotik semptomlar göstermedikleri bildirilmiştir. Bu verilere göre, trombotik semptomlara bakılarak rotein C eksikliğinin otozomal kesesif bir hastalık olduğu söylenebilir. Sağlıklı kan donörlerinde protein C eksikliği prevalansı %01-%05 arasındadır. Bu oran otozomal resesif bir hastalık için uygundur(116).

Şaşırtıcı olarak hem ailelerde hem de toplumda yapılan başka çalışmalarda heterozigot protein C eksikliğinin artmış tromboz riskiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bir çok çalışmalarda trombotik hasta grubunda heterozigot protein C eksikliği prevalansı (%2-%9) sağlıklı kan donörlerinden yüksek bulunmuştur. Hatta semptomatiklerin birinci derece heterozigot yakınlarında, non-heterozigot birinci derece yakınlarına göre tromboz riskinin arttığı gösterilmiştir(94). Bu gözlemlere dayanılarak rotein C eksikliğinin otozomal dominant bir hastalık olduğu kabul edilmesi gerekirdi(64).

Bu çalışmaların tümü protein C eksikliği olan aileler arasında da tromboz riski açısından değişkenlik olduğunu gösteriyordu. Bu değişkenliğin protein C gen defektinden kaynaklanması pek olası değildir. Çünkü klinik olarak resesif ve dominant görünen ailelerde plazma protein C düzeyleri aynı idi. Daha önemlisi klinik olarak resesif ya da dominant olan ailelerde protein C genindeki mutasyonun aynı olduğu bulundu. Bu nedenle klinik olarak dominant protein C eksikliği olan ailelerdeki trombotik olayların nedeni, heterozigot protein C eksikilđine eklenen bir risk faktörü ya da faktörlerinin birlikte etkisinin bir sonucu olabilirdi. Trombofilinin ailesel olması diğer risk faktörünün de ailesel olabileceğini düşündürdü(94, 164, 201).

Dählback ve Svensson derin ven trombozu için güçlü bir risk faktörü tanımladılar. Çalışmalarında bazı ailelerde APC'ye yanıt olarak oluşan antikoagülan etkinin zayıf olduğunu gösterdiler. Bu ailelerde trombofili vardı. Bu durumu APC rezistansın abağladılar(60, 94).

APC rezistansının venöz tromboz için güçlü bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir. APC rezistansı faktör V (FV) genindeki bir mutasyonla ilişkilidir. Mutasyon, anormal faktör V molekülü "FV Leiden" oluşumuna sebep olur. Bu molekülde Arg506'nın yerini Gln almıştır. Arg 506 APC'nin parçaladığı bölümlerden birinde yer alır(11, 60, 94).

## 6.7. AKTİF PROTEİN C'NİN PLAZMADAN UZAKLAŞTIRILMASI

Aktif protein C'nin sitratlı plazmada yarı ömrü 31 dk, tam kanda 18 dakikadır. Sitratlı kanda yapılan immunblot analizleriyle APC-protein C inhibitör (APC-AAT) kompleksleri saptanmıştır. Tam kan ek olarak iki tane daha APC-inhibitör kompleksi içerir. Bunlardan biri  $Mg^{++}$ , diğeri  $Ca^{++}$  tarafından stimüle edilir.  $Ca^{++}$  tarafından stimüle edilen APC-alfa-2 makroglobulin (APC-AMG) kompleksidir, ancak  $Mg^{++}$  tarafından uyarılardan edilenin ne olduğu bulunamamıştır. APC-PCI kompleksi ile birlikte göçen APC-alfa-2 antiplazmin (APC-AAP) komplekslerinin varlığı da gösterilmiştir. Saflaştırılmış AMG ve AAP APC'yi  $Ca^{++}$  varlığında inhibe eder. APC ve faktör Xa'nın AMG, APC'nin AAP tarafından inhibisyonu  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  ve  $Mn^{++}$  tarafından stimüle edilir. Trombinin AMG- plazminin AAP tarafından inhibisyonunu EDTA veya  $Ca^{++}$  değiştirmez. Bu divalant metal iyonlarının, inhibitörlerden çok APC ve Faktör Xa'yı etkilediği düşündürmektedir. PCI ve AAT önemli APC inhibitörleridir. AMG ve AAP metal iyonuna bağımlı yardımcı inhibitörlerdir(72).

PCI, APC'yi yavaş inhibe eder. Bu inhibitör daha önce plazminojen aktivatör inhibitörü III (PAI-III) olarak da isimlendirilmiştir. Çünkü ilk olarak insan idrarında bir plazminojen aktivatörü olan ürokinaz ile kompleks oluşturmuş halde izole edilmiştir. APC'nin PCI tarafından inhibisyonunu heparin ve diğeri sülfatlanmış polisakkaritler artırır. Plazma proteaz inhibitörlerinden AAT de APC'yi inhibe eder. Hem PCI hem de AAT plazma proteaz inhibitörlerinin serpinler ailesine yer alır. PCI'nin aminoasit dizisi AAT'e çok benzer. Diğeri serpinler gibi PCI ve AAT hedef enzimi, enzime açılıla bağı

kovalent kompleksler oluşturarak inhibe eder. Serpin proteaz kompleksleri reseptör-bağımlı bir mekanizma ile dolaşımdan hızla uzaklaştırılırlar. In vitro olarak APC PCI ile AAT'den çok daha hızlı kompleks oluşturur. Ancak AAT plazmada daha yüksek konsantrasyonda bulunduğundan APC'nin in vivo inhibisyonunda her iki inhibitörün katkısı önemli olabilir. PCI-APC komplekslerinin hızlı klirensi bu komplekslerin hızlı katabolize olmasının bir sonucudur. Bu komplekslerin katabolizması AT III-trombin kompleksinin hızlı katabolizması gibi damar duvarındaki glikozaminoglikanlara bağlı değildir. Plazma serpinleri ile kompleks oluşturmuş proteazların tek bir reseptörle etkileşim sonucu plazmadan uzaklaştırıldığı öne sürülmüştür. Martin Laurel ve ark. APC'nin PCI ve AAT ile oluşturduğu komplekslerin plazma klirenslerinin ve katabolizma hızlarının farklı olduğunu gösterdi. Bu bulgu reseptörlerin, kompleksin serin bölümünü tanıdığı ve bu tanınmanın inhibitörden inhibitöre değiştiği hipotezini desteklemektedir(60).

## 6.8. PROTEİN C ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

Protein C miktarının ölçülmesi ve biyolojik aktivitesinin belirlenmesi için bir çok yöntem geliştirilmiştir. Protein C miktarının ölçülmesinde elektroimmün assay, aktivasyon peptidi için RIA ve ELISA yöntemleri kullanılır(154). Bu immunolojik ölçümler molekülün biyolojik aktivitesi hakkında bilgi vermez. Öte yandan fonksiyon ölçümleri plazmada spesifik protein C inhibitörlerinin bulunması ve trombinin in vitro olarak protein C'yi yavaş aktive etmesi nedeniyle güçtür. Bazı araştırmacılar protein C'yi plazmadan ve dolayısı ile inhibitöründen baryum sitrat veya alüminyum hidroksit ile adsorbsiyon yolu ile ayırdıktan sonra trombin veya trombin-trombomodulin kompleksi ile aktive ederler(154). Bu aktif protein C, aPTT ölçüm yöntemi ile ya da düşük moleküler ağırlıklı kromojenik substratlar kullanılarak ölçülür. Ancak çok merkezli ve farklı yöntemlerle yapılan çalışmalar sonucunda Protein C sonuçlarının değişken olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda Agkistrodon contortrix yılanının venomunda bulunan bir faktör (Protac™)'un protein C'nin spesifik aktivatörü olduğu belirlendi. Bu venomun aktivasyon özellikleri şöyle sıralanabilir:

- 1- Bu aktivatör plazma varlığında fonksiyon görür.
- 2- Protein C için spesifiktir.
- 3- Protein C'yi trombinden çok daha hızlı aktive eder.

Bugün çok sayıda ticari kitle bu protein C aktivatörü bulunur.

Hem kantitatif hem de fonksiyonel ölçümleri dezavantajı belirli bir standartlarının olmayışıdır. Bir çok araştırmacı standardizasyon için kendi hazırladığı normal insan plazma havuzunu kullanır ve bunun antijenite ve aktivitesini %100 kabul eder. 1987 yılında WHO protein C için “ilk uluslararası standardı” yaptı ve bu standartla protein C miktarı “international unit” olarak belirlendi(194).

Fonksiyonel ölçümler (koagülasyon inhibisyonu ölçümü ve amidolitik ölçüm) molekülün farklı özelliklerini ölçerler. Amidolitik ölçüm molekülün serin proteaz bölümünde konformasyon bozukluğu olup olmadığını gösterir. Serin proteaz bölümü molekülün bir enzim gibi hareket etmesini sağlar. Koagülasyon inhibisyonu ile ölçüm molekülün iyi bir şekilde gamma karboksillenip karboksillenmediğini gösterir. Gamma karboksilasyon gerçekleşmediğinde (warfarin tedavisinde olduğu gibi) üretilen Protein C'nin antikoagülan aktivitesi bozulur molekül fizyolojik olarak fonksiyon görmez(194).

Protein C araştırmaları, protein C'nin iyi karakterize edilmiş bir standardının olmaması ve farklı ölçüm yöntemleri arasındaki değişkenlik nedeniyle güçtür. Rekombinant aktive protein C standartlarının kullanılması bu konudaki sorunların çözümüne yardımcı olacaktır(194).

Hemofililerde normal kanama zamanına sahip olmalarına rağmen, bu hastalar uzamış kanama zamanına sahiptiler. Von Willebrand uzamış kanama zamanının trombotopenide de bulunduğunu biliyordu. Bu yüzden hastaların trombotitlerini saydı ve normal buldu.

Bu sebepten bu hastaların trombotit fonksiyonlarında özellikle trombus oluşumunda kalitatif bir bozukluk olduğu sonucunu çıkardı ve in-vitro trombus oluşumunu ölçen bir alet geliştirdi ve bu hastaların kanının abnormal davranış olduğunu gördü. Fakat, platelet fonksiyonlarındaki anormalliğin trombotit içi mi trombotit dışı mı olduğunu tayin edemedi.

## 7- MATERİYEL METOD

Olgularımız Koşuyolu Kalp Damar Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, kalp damar cerrahisi bölümüne, koroner anjiyografi olmak üzere yatan hastalar oluşturdu. Koroner anjiyografi olan 142 olgudan aşağıdaki kriterlere esas alınarak 58 hasta grubu 20 adet de kontrol grubu seçildi. Hasta grubumuz koroner anjiyografi ile iskemik kalp hastalığı tespit edilmiş, bir, iki veya üç koroner damarı çeşitli yüzdelerde tıkalı 58 hasta oluşturdu. Koroner anjiyografi yapılan 142 hastadan bu 58 hastayı seçerken yukarıdaki özellikler yanında, ailesinde arteriyel ve venöz tromboz sonucu oluşan İKH, MI, CVA, DVT gibi hastalıklara sahip olanlar ve bu hastalıklara hem kendisinin hem de aile fertlerinin daha genç yaşlarda maruz kalanların seçilmesine özen gösterildi.

Kontrol grubumuzu, koroner anjiyografi olan bu 142 olgudan, hiçbir damar patolojisi tespit edilemeyen 20 kişi oluşturdu. Bu gruptaki kişilerin, biyokimyasal, karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri de normaldi.

Her iki grupta da lipid profili olarak; total kolesterol, trigliserid, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, VLDL-kolesterol değerleri, hemostaz ve koagülasyon parametrelerinden, PT, aPTT, fibrinojen, Faktör VIII:C, Faktör VIII:Ag, protein C aktivitesi ve protein C:Ag, normalize-ARC-rezistansı (n APC-R) testleri yapıldı.

Faktör VIII gen polimorizmine bakmak için elde edilen DNA'larda PZR-REA (PCR-RFLP) metodu ile Bcl-1, Hind III ve ST14 VNTR, polimorfizmleri analiz edildi.

Kanlar, anjiyo planlanan hastalardan bir gün önce sabah 08.00-10.00 saatleri arasında bir gecelik açlıktan sonra alındı. Kan alımı esnasında venöz stazdan sakınıldı. Hemostaz parametreleri için kanlar I kısım sitrat 9 kısım kan oranında sitratlı (0,109M, %3.2 trisodyum sitrat ihtiva eden) vakumlu tüplere alındı. Lipid ve diğer biyokimyasal parametreler için jelli vakumlu tüpler kullanıldı. Polimorfizm çalışmasında kullanılacak DNA'lar için de vakumlu EDTA'lı tüpler kullanıldı.

Sitratlı tüplerden bir tanesi dört saat içinde soğutmalı santrifüjde 2500 g'de 10' dakika santrifüj edildi. Plazmalar, faktör VIII:C tayini için  $-70^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırıldı. Hemostaz parametrelerden PT, aPTT ve fibrinojen hemen çalışıldı, diğerleri için kan santrifüjden sonra  $-20^{\circ}\text{C}$  de muhafaza edildi. EDTA'lı kanlardan DNA'lar aynı gün elde edilip, polimorfizm çalışması için  $2-8^{\circ}\text{C}$  de muhafaza edildi. Lipid profili aynı gün çalışıldı.

## KULLANILAN YÖNTEMLER

**Faktör VIII:C tayini:** Faktör VIII eksik plazmanın aPTT testini uzatması prensibine dayanan koagulometrik yöntemle BCS otomatik koagulometresinde (Dade-Behring) çalışıldı. F VIII:C tayini için yeni bir ELISA yöntemi de geliştirilmiştir(61).

Yöntemde, hasta plazması eşit oranda FVIII eksik plazma (Dade Behring) ile karıştırılıp ve aktive parsiyel tromboplastin (pathromtin-Dade Behring) zamanı teste uygulanır. Hasta plazmasında F VIII koagülasyon aktivitesi düşük ise, F VIII'den eksik plazmadaki eksikliği karşılamayacağı için; parsiyel tromboplastin zamanı uzayacaktır. Pıhtılaşmanın oluşması için geçen zaman, hasta plazmasındaki F VIII koagulan aktivitesi ile ters orantılıdır. Sonuçlar, standart insan plazmasının (Standart Human Plasma-Dade-Behring) imidazol tampon veya en az sağlıklı 10 kişiden elde edilen plazma havuzunun, F VIII eksik plazma aktivasyonu ile çizilen kalibrasyon eğrisinden değerlendirilir. F VIII koagulan aktivitesi normalin %'si olarak verilir. Kitte verilen referans aralıkları normalin %70-150'sidir.

**Faktör VIII C: Ag tayini:** Stago'nun Aserochrom Faktör VIIC: Ag kiti kullanılarak ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemi ile çalışıldı).

**Test prensibi:** Faktör VIII:Ag'ne karşı oluşturulmuş spesifik fare monoklonal antikolar ile kaplı plastik strip (mikro-eliza plate'ler) ölçülecek olan Faktör VIIC:Ag'nini yakalar, sonra Faktör VIII:Ag nin farklı bir determinantına karşı hazırlanmış, yabanturpu peroxidazı ile işaretli ikinci bir fare monoklonal antikoları destek faza bağlı Faktör VIII:Ag nine bağlanır (sandviç oluştururlar). İkinci antikora bağlı peroxidaz; üre peroxid varlığında (oluşan hidrogen peroksit varlığında) orto-fenilendiamin substratına bağlanarak aktive olur ve sonra substrattan ayrılır. O-fenilendiaminin oksitlenmesi ve reaksiyon kuvvetli bir asit (sülfirik asit) ile durdurur. Oluşan rengin

492 nmde okunan şiddeti, plazmadaki Faktör VIII C:Ag nin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Neticeler yüzde cinsinden verilir.

**Protein C:Ag tayini,** stago frimasının, Aserchrom Protein C kiti kullanılarak ELISA yöntemi ile çalışıldı.

**Test Prensipleri:** Spesifik tavşan anti-insan protein C antikorları ile kaplı strip, ölçülecek olan protein C'yi yakalar. Sonra, tavşan anti-protein C antikorları ile peroksidaz, birlikte protein C'nin ortamda kalan antijenik determinantlarına bağlanır. "sandviç" oluştururlar: Bağlanan bu peroksidaz enzimi, hidrojen, peroksit varlığında orto-fenilen diamin substratına bağlanarak aktive olur ve sonra substrattan ayrılır. Reaksiyon kuvvetli bir asit ile durdurulduğunda oluşan rengin yoğunluğu plazmada bulunan protein C konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

**Protein C aktivitesi tayini:** Koagulometrik yöntemle BCS tam otomatik koagulometresinde (Dade-Behring) yapıldı. Hasta plazmasındaki protein C, protein C aktivator reaktifinde (Dade-Behring) bulunan özel bir yılan venomu ile aktive edilir. Aktive protein C, protein C eksik plazmada (Dade Behring) bulunan Faktör V ve Faktör VIII'I inhibe eder. Bu inhibisyon sonucunda aPTT uzar aPTT'daki uzama, hasta numunesinde bulunan protein C aktivitesi ile doğru orantılıdır. Sonuçlar, standart insan plazması (Dade-Behring) kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisinden değerlendirilir. Protein C aktivitesi normalin yüzdesi olarak ifade edilir. Kitin referans aralıkları %70-140'tır.

**Protein C rezistansı tespiti:** Koagulometrik yöntemle, protein C'nin antikoagülan kapasitesinin tayini ile yapılır. Bu da normal olmayan APC varlığında, aktive parsiyel tromboplastin zamanının uzamasına bağlıdır. Birinde aktive protein C olan (PACT), diğerinde olmayan [PACT/0] iki ayrı aPTT tayini yapılır. Birinci tüpün, ikinci tüpe oranı (APC-sensitivity) ratio (APC-SR)] APC-duyarlılık oranıdır. Bunun referansın APC duyarlılık oranına bölümü, normalize edilmiş APC duyarlılık oranını yani APC-rezistansını verecektir(111).

**Testin prensibi:** Plazma, protein C aktivatörü (Agkistrodon contortrix venomu) ve kontakt faz aktivatörü ile muamele edilerek, endojen protein C ve intrinsik koagülasyon

kaskadı aktive edilir. Kalsiyum iyonlarının ilavesi ile koagulasyon tetiklenir. Aktive protein C, endojen protein S ile birlikte, prokoagulatör kofaktörler VIIIa ve Va'yı inaktive eder. Bu da pıhtı oluşumunu geciktirir. Pıhtı oluşumu için geçen zaman tayin edilir (PCAT = Protein C Activity-dependent Clotting Time). Aynı deney protein C aktivatörü ilave edilmeden de yapılarak PCAT/0 tayin edilir. Protein C sisteminin azaldığı plazmalarda veya protein C'ye direnç olan plazmalarda koagulasyon zamanında küçük uzamalar olacaktır. Test prosedürü veya aktivatör konsantrasyonundaki varyasyonlardan kaçınmak için sonuçlar "normal oran" olarak ifade edilir.

(PACT: PCAT/0) numune

$$NR = \frac{\text{PACT: PCAT/0}}{\text{SV/(PCT: PCAT/0) standart plazma}}$$

NR: normalized ratio

SV: sensitivity value (Standard insan plazmasının sensitivite değeri)

Kit normalleri, 0.69-1.56'dır.

**Protrombin zamanı tayini:** Sitratlı plazmaya ilave edilen tromboplastin ve kalsiyumun optimal miktarları koagulasyonu başlatır. Fibrin pıhtısının oluşumu için geçen zaman protrombin zamanının saniye cinsinden değerini verir. Tayinler, otomatik BCS (Dade Behring) koagulometresinde Dade Behring'in reaktifleri (Thromborel S) kullanılarak yapılmıştır.

Kit normalleri: 10-12 saniyedir.

**Fibrinojen tayini:** Modifiye Clauss metodu(30) ile yapıldı. Sitratlı plasma; kalsiyumlu ortamda trombinin aşırısı ile muamele edildiğinde pıhtılaşma için geçen zaman numunenin fibrinojen konsantrasyonu ile orantılıdır. Neticeler çizilen kalibrasyon eğrisinden değerlendirilir sonuçlar gr/dl olarak değerlendirilir.

Kit normalleri: 180-350 gr/dl'dir.

**aPTT tayini:** Sitratlı plasma, fosfolipid ve intrinsik koagulasyon sisteminin faktörlerinin aktivasyonunu sağlayan bir yüzey aktivatörünün optimal miktarları,

kalsiyumlu ortamda muamele edildiğinde fibrin pıhtısının oluşması için geçen zaman saniye cinsinden aPTT değerlerini verir.

Kit normalleri: 26-36 saniyedir.

**Kolesterol, trigliserid tayini:** Hitachi 747 oto-analizöründe enzimatik yöntemle HDL-kolesterol tayini ise, homojen enzimatik kolorimetrik test ile Hitachi 912 oto-analizöründe ölçüldü.

### **FAKTÖR VIII GEN POLİMORFİZM ANALİZİ**

Faktör VIII geninin Bcl-1 için Intron 18 bölgesinden, Hind III için intron 19 bölgesinden seçilen primerler kullanılarak PZR-REA (PCR-RFLP) metodu uygulanmıştır. Ayrıca OXS52 (St14) bölgesinden seçilen primerler ile de VNTR analizi yapılmıştır.

### **KULLANILAN CİHAZLAR**

Soğutmalı, soğutmasız santrifüj: Hettich, EBA 35 Germany.

UV Transluminatör: OWI Scientific Inc. USA

Thermocycler: MJ Research PTC-160 Minicycler, USA

Elektroforez: Horizontal Jel-Elektroforezi Bio-Rad, USA

Elektroforez güç kaynağı: OWL-Scientific

Derin dondurucu: -20°C, Ariston, Italy

Derin dondurucu: -86°C

Mikrodalga Fırın: Bosch Germany

Hassas Terazisi: Scaltec, USA

Kamera: EDAS, Electrophoresis Documentation system. Kodak, USA

PH metre: Schott Gerate (Germany)

Pipet takımı: Gilson (USA)

Vortex: Nüve

Isıtıcı manyetik karıştırıcı: Nüve

**KULLANILAN KİMYASAL MADDELER**

- 1- Ammonium klorid: NM4CP, A-4514 SIGMA
- 2- Potasyum bikarbonat:  $\text{KHCO}_3$ , P9144 SIGMA
- 3- EDTA disodyum tuzu dihidrat, E5134 SIGMA
- 4- Tris (TRIZMA BASE), T6066 SIGMA
- 5- Sodyum klorür: S9888 SIGMA
- 6- Lauril sulfat (SDS-Sodyum dodesil sulfat), L4509 SIGMA
- 7- Proteinaz K: P2308 SIGMA
- 8- Borik asit: BO252 SIGMA
- 9- Etidium bromid: E 4391 SIGMA
- 10- Primerler BMI Fermentas
- 11- DNA standardı (DNA-size marcer)
- 12- Bcl-1 – MBI Fermentas
- 13- Hind III – MBI Fermentas
- 14- Ficoll 400: F9378 SIGMA
- 15- Brom fenol blue: B6896 SIGMA
- 16- Ksilen siyanol: X-4126 SIGMA
- 17- Etanol
- 18- Sodyum hidroksit: C754962 Merck
- 19- Hidroklorik asit (%37 Merck K-13190/14)

**KULLANILAN ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI****DNA izolasyonunda kullanılan çözeltilerin hazırlanması****Hücre Parçalama Tamponu (Lysis Buffer)**

- 8.74 gr – amonyum klorür
- 1 gr – potasyum bikarbonat
- 200 µl – 0.5M EDTA

900 ml dd H<sub>2</sub>O eklenir, eritilir.

PH = 7.4'e 1N sodyum hidroksit ile ayarlanır.

1000 ml'ye dd H<sub>2</sub>O ile tamamlanır.

Isıya dayanıklı cam şişelerde 120°C'de 15 dakika otoklavlanır  
+4°C'de saklanır.

### **Çekirdek Lizis Tamponu (nuclei lysis bufer)**

25 ml – 4M sodyum klorür

50 ml – 0.5M EDTA

1000 ml'ye dd H<sub>2</sub>O ile tamamlanır.

120°C'de 15 dakika otoklavlanır.

Oda ısısında saklanır.

### **0.5M EDTA solusyonu (pH 8.0)**

186.1 gr – EDTA

800 ml – dd su karıştırıcı yardımıyla çözülür

pH = 8.0 e 1N sodyum hidroksit ile ayarlanır.

1000 ml'ye dd H<sub>2</sub>O ile tamamlanır.

120°C'de 15 dakika otoklavlanır.

Oda derecesinde saklanır.

### **1M sodyum klorür çözeltisi**

23.36 gr sodyum klorür

800 ml dd H<sub>2</sub>O manyetik karıştırıcı ile çözülür

1000 ml'ye dd H<sub>2</sub>O ( ile tamamlanır.

120°C'de 15 dakika otoklavlanır

Oda derecesinde saklanır.

**TE tamponu (Tris-EDTA)**

3.152 gr – Tris-HCL (pH 8)

200 µl – 0.5M EDTA solusyonu

800 ml dd su eklenir manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülür.

120°C’de 15 dakika otoklavlanır.

Oda derecesinde saklanır.

**1M Tris tamponu (stok)**

121.1 gr – Tris baz

42 ml – hidroklorik asit

800 ml – dd su eklenir, eritilir.

1000 ml’ye dd su ile tamamlanır/120°C’de 15’ otoklavlanır oda derecesinde saklanır.

**9.5 Molar amonyum asetat**

80 ml – dd su çözülür.

100 ml’ye dd su ile tamamlanır.

0.22 mikronluk filtreden geçirilerek steril edilir.

4°C’de saklanır.

**Proteinaz K (20 mg/ml)**

20 mg proteinaz K (steril gode içine)

1 ml’ye dd steril su ile tamamlanır

-20°C’de saklanır.

**%10’luk sodyum Dodesil sülfat (SDS)**

10 gr – SDS (tozlarını kaldırmamaya dikkat ederek)

80 ml – dd H<sub>2</sub>O (karıştırıcı yardımıyla çözülür)

pH'sı 7.2'ye ayarlanır.  
0.22 mikronluk filtreden geçirilerek steril edilir.  
Oda ısısında saklanır.

### **Agaroz Jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler**

#### **Agaroz jel yükleme tamponu (5x)**

20 gr Ficoll 400  
1 gr SDS  
0.2 ml 0.5M EDTA solusyonu  
1 ml 1M Tris (pH 8.0)  
200 mg Brom fenol blue  
200 mg ksilen siyanol  
100 ml'ye dd su (steril) tamamlanır.  
Oda derecesinde saklanır.

#### **5x Tris-Borik asit-EDTA (TBE) Tamponu**

54 gr – Tris baz  
27.5 gr – Borik asit  
20 ml – 0.5M EDTA (pH8) çözeltisi  
800 ml – dd su ilave edilir çözülür.  
1000 ml'ye dd su ile tamamlanır.

#### **Etidyum Bromür (10 mg/ml)**

10 gr – etidyum bromür  
10 ml'ye – dd su (steril) ile tamamlanır.

**Tablo 1: Çalışmada kullanılan primerler**

Markır	Bölge	5'-primer zinciri-3'	Kaynaklar
Bcl-1 F*	Intron 18	TAA AAG CTT TAA ATG GTC TAG GC	KOGAN ET AL, 1987
Bcl-1 R**		TTC GAA TTC TGA AAT TAT CTT GTT C	
Bcl-1 R*	Intron 19	AAG GTC CTG GAG GGC GAG CAT	Graham et al, 1990
Hind III F		AAG GTC GGA TCC GTC CAG AAG	
ST14 F	0xs52 (ST 14)	GGC ATG TCA TCA CTT CTC TCA TGT T	Chol et al. 2000
St14 R		CAC CAC TGC CCT CACGTC ACT T	

\*F: forward  
\*\*R: reverse

### DNA Ekstraksiyonu

Hastalardan alınan tüm EDTA'lı kan örneklerine, Miller ve arkadaşları tarafından geliştirilen "Tuzla çöktürme" (salting out) yöntemi uygulandı. Yöntemde sırasıyla uygulanan basamaklar aşağıdaki gibidir:

- 1- 1000 ml hücre parçalayıcı (cell lysis) tampon 500 ml EDTA'lı kan ependorfa konulup çalkalanır.
- 2- En az 15 dak buzdolabında bekletilir.
- 3- +4°C 5 dak 13.000 rpm'de santrifüj edilir.
- 4- Dökülür. Dipte kalan sıvı pipetle beyaz çökeltiye değmeden dikkatlice çekilir.
- 5- 250 ml saf lizis tampon eklenip, alt üst edilir. Pipetle tekrar çekilir.
- 6- 500 ml hücre lizis tamponu eklenir, karıştırılır (vorteks ile).
- 7- +4°C 5 dk 13.000 rpm'de santrifüj edilir.
- 8- Dökülür. Pipetle çekilir.
- 9- 250 ml çekirdek lizis tamponu eklenir, karıştırılır (vorteks ile) (Bu aşamada örnekler derin dondurucuda saklanabilir).
- 10- PCR tüpüne 5 µL SDS ve 5 µl pronaz E eklenir. Üzerine karıştırdığımız (vorteks ile) örnek konulur.
- 11- 70°C'de 10 dk inkübe edildikten sonra salting out'la çalışmaya devam edilir.

- 12- Üstüne 250 µl 5 M NaCl + 250 µl distile su (5 M NaCl: 10 ml suda 2.9 g tuz çözülür).
- 13- Vortekslenir.
- 14- 8 C'de 13.000 rpm'de 5 dk santrifüjde çevir.
- 15- 450 µl süpernatantı başka ependorfa al.
- 16- Üstüne 900 µl %99.5 absolü alkol ekle.Alt üst et.
- 17- 8 C'de 13.000 rpm'de 8 dk santrifüj.
- 18- Dök. 300 µl %70 etanol ekle.
- 19- 8 C'de 13.000 rpm'de 8 dak santrifüj.
- 20- Dökülüp kurutuldu ve 50 µl distile su ile sulandırıldı.

### **Bcl I Polimorfizmi**

Intron 18, Bcl 1 polimorfizmi PCR-RFLP metodu ile analiz edildi. Analizde kullanılan primerler Kogan ve ark.(106) Tarafından 1987'de yayınlanmış makaleden alındı. Her vaka için saflaştırılmış DNA örneklerinden PCR yapıldı. PCR miksi aşağıda verilen değerlere göre hazırlandıktan sonra thermosycleyer makinesine koyularak Bcl 1 programı çalıştırıldı. 35 sikludan oluşan programın adımları aşağıda belirtildiği şekilde oluşturuldu.

PCR miksi;

<b>Materyal</b>	<b>Miktar</b>
dH2O	15.9 µl
PCR buffer	2.5 µl
Mg <sup>++</sup>	2.0 µl
Primer Bcl 1-F	1.0 µl
Primer Bcl 1-R	1.0 µl
dNTP	0.5 µl
Taq polimeraz	0.1 µl
DNA	2.0 µl
<b>Toplam</b>	<b>25.0 µl</b>

**Bcl 1 PCR programı (Amplifikasyon koşulu)**

94°C 4 dak  
94°C 30 s  
54°C 30 s      35 siklus  
72°C 30 s  
72°C 8 dak

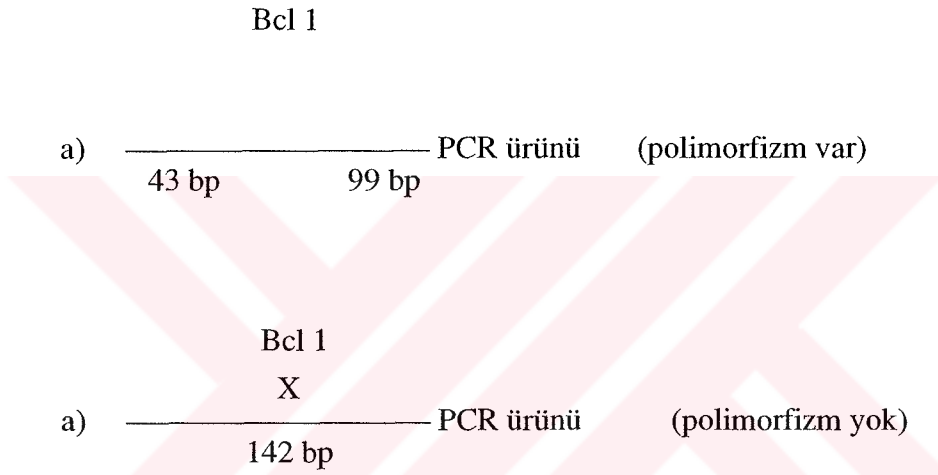
PCR sonucu 142 bp'lik bir ürün elde edilmektedir. PCR ürününün kalitesini ve miktarını belirlemek için 5 µl PCR ürünü 3 µl agaroz yükleme boyası ile karıştırılarak %2'lik agaroz gelinde 120 volt'luk elektrik akımında EtBr ile görüntülendi. Eğer PCR ürünü istenen kalitede olduğunda RFLP analizi uygulandı.

RFLP analizi için aşağıda belirtildiği şekilde bir miks hazırlandı ve tüplerde restriksiyon enzimlerinin çalışabilmesi için tüpler 37°C'de en az 3 saat tutuldu.

Restriksiyon miksi;

<b>Materyal</b>	<b>Miktar</b>
ddH <sub>2</sub> O	7.7 µl
PCR ürünü	10.0 µl
Bcl 1 enzimi	0.3 µl
Buffer	2.0 µl
<b>Toplam</b>	<b>20.0 µl</b>

Oluşan restriksiyon ürünleri %4'lük agaroz geli üzerinde EtBr boyama yöntemi ile görüntülendi. Gelde gözlenen polimorfizme özgü restriksiyon parça profiline göre, polimorfizmin olup olmadığı belirlendi. Eğer Bcl 1 polimorfizmi varsa Bcl 1 restriksiyon enzimi, 142 bp'lik PCR ürününü 43 bp ve 99 bp'lik iki parçaya ayırır. Polimorfizm yok ise, Bcl 1 enzimi PCR ürünü üzerinde kendine özgü tanıma dizisini bulamayacağından dolayı PCR ürünü kesilmeden kalacaktır (Şekil 8).



Şekil 8: Bcl 1 restriksiyon enziminin 142 bp'lik PCR ürününü kesim bölgeleri a-polimorfizm var b-normal.

### Hind III polimorfizmi

Hind III polimorfizmi PCR-RFLP metodu ile analiz edildi. Analizde kullanılan primerler Graham ve ark. Tarafından(63) 1990'da yayınlanmış makaleden alındı. Her vaka için saflaştırılmış DNA örneklerinden PCR yapıldı. PCR miksi aşağıda verilen değerlere göre hazırlandıktan sonra termocycler makinesine koyularak Hind III programı çalıştırıldı. 35 siklusa oluşan programın adımları aşağıda belirtildiği şekilde oluşturuldu.

PCR miksi;

Materyal	Miktar
ddH <sub>2</sub> O	15.9 µl
PCR buffer	2.5 µl
Mg <sup>++</sup>	2.0 µl
Primer Hind3-F	1.0 µl
Primer Hind3-R	1.0 µl
dNTP	0.5 µl
Taq polimeraz	0.1 µl
DNA	2.0 µl
<b>Toplam</b>	<b>25.0 µl</b>

Hind III PCR programı;

94°C 4 dak

94°C 40 s

54°C 45 s      35 siklus

72°C 2 dak

70°C 8 dak

PCR sonucu 738 bp'lik bir ürün elde edilmektedir. PCR ürününün kalitesini ve miktarını belirlemek için 5 µl PCR ürünü 3 µl agaroz yükleme boyası ile karıştırılarak %2'lik agaroz jelinde 120 voltluk elektrik akımında yürütülüp, EtBr ile görüntülendi. Eğer PCR ürünü istenen kalite ise RFLP analizi uygulandı.

RFLP analizi için aşağıda belirtildiği şekilde bir miks hazırlandı ve tüplerde restriksiyon enzimlerinin çalışabilmesi için tüpler 37°C'de en az 3 saat tutulur.

Restriksiyon mixi;

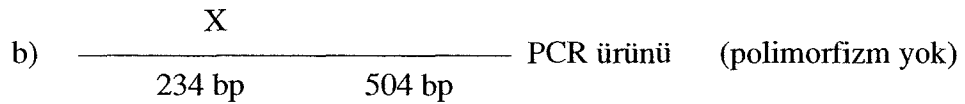
Materyal	Miktar
ddH <sub>2</sub> O	7.7 µl
PCR ürünü	10.0 µl
Hind III enzimi	0.3 µl
Buffer	2.0 µl
<b>Toplam</b>	<b>20.0 µl</b>

Oluşan restriksiyon ürünleri %2'lik agaroz geli üzerinde EtBr boyama yöntemi ile görüntülendi. Gelde gözlenen polimorfizme özgü restriksiyon parça profiline göre polimorfizmin olup olmadığı belirlenir. Eğer Hind III polimorfizmi varsa Hind III restriksiyon enzimi 738 bp'lık PCR ürününü 77 bp, 157 bp ve 504 bp'lık üç parçaya ayırır. Polimorfizm yok ise Hind III enzimi PCR ürünü üzerinde kendine özgü tanıma dizilerinden birini bulamayacağından dolayı PCR ürünü bir yerden keserek 234 bp ve 504 bp'lık iki parça oluşur (Şekil 9).

Hind III

a)  PCR ürünü (polimorfizm var)

Hind III

b)  PCR ürünü (polimorfizm yok)

Şekil 9: Hind III restriksiyon enziminin 738 bp'lık PCR ürününü kesim bölgeleri a- polimorfizm var, b- polimorfizm yok

### St14 VNTR Analizi

St14 VNTR polimorfizmi PCR metodu ile analiz edildi. Analizde kullanılan primerler Choi ve ark.(28) Tarafından 2000'de yayınlanmış makalesinden alındı. Her vaka için saflaştırılmış DNA örneklerinden PCR yapıldı. PCR miksi aşağıda verilen değerlere göre hazırlandıktan sonra MJ Research makinesine koyularak St14 VNTR programı çalıştırıldı. 35 siklustan oluşan programın adımları aşağıda belirtildiği şekilde oluşturuldu.

PCR mix;

Materyal	Miktar
ddH <sub>2</sub> O	15.8 µl
PCR buffer	2.5 µl
Mg <sup>++</sup>	2.0 µl
Primer St14-F	1.0 µl
Primer St14-R	1.0 µl
dNTP	0.5 µl
Taq polimeraz	0.2 µl
DNA	2.0 µl
<b>Toplam</b>	<b>25.0 µl</b>

St14 VNTR PCR programı (Amplifikasyon koşulu)

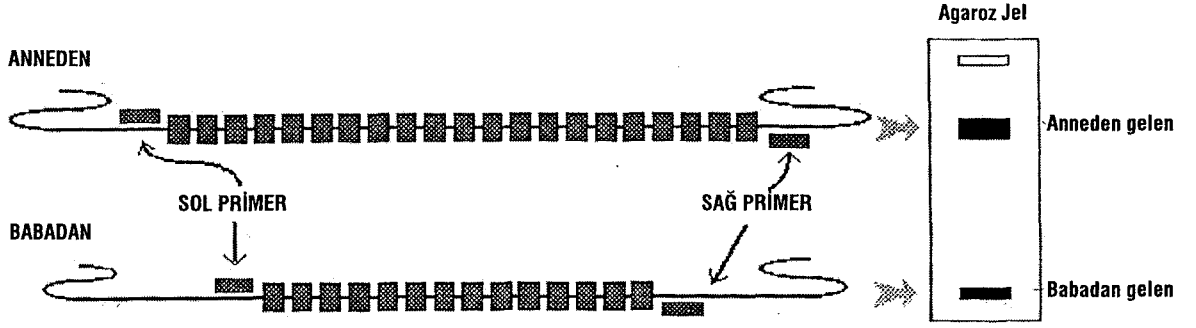
94°C 4 dak

93°C 45 s

58°C 3 dak 30 s 35 siklus

62°C 8 dak

PCR sonucu oluşabilecek ürünün uzunluğu 700 bp ile 3000bp arasındadır. 6 µl PCR ürünü 3 µl agaroz yükleme boyası ile karıştırılarak %1'lik agaroz gelinde 120 voltluk elektrik akımında yürütüldü. PCR ürününün boyunu belirleyebilmek amacı ile her jele DNA standardı yüklendi. Gözlenen PCR bantlarının boyu VNTR artışı ile doğru orantılı olarak büyümektedir. Her VNTR artışı PCR band boyunu 60 bp arttırmaktadır (Şekil 10).



**Şekil 10:** Biri anneden diğeri babadan gelen, tekrarlayan baz dizilerinin sayıları farklı 2 allel ve onların agaroz jeldeki elektroforetik göçleri görülmektedir.

### Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatiksel Yöntemler

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 9.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır.

- Gruplararası farklılıkların değerlendirilmesinde ki kare ve Fisher Testi kullanılmıştır.
- Genotip ve allelerin, hemostaz parametreleri, lipid profili ve aterosklerotik risk faktörleri üzerindeki etkisi için student t testi kullanılmıştır.
- Tüm parametrelerin birbiri ile ilişki Spearman korelasyon testi ile korelasyon katsayılarına göre değerlendirilmiştir.
- Allel frekansları, gen sayım metoduna göre tespit edilmiştir.

## 8- BULGULAR

Çalışmamızı oluşturan sağlıklı kontrol grubu ve anjiyo ile koroner arter hastası olduğu tespit edilmiş çalışma grubumuza ait, çalışmada kullanılan parametrelere ait bilgiler Tablo 2 ve 3’de verilmiştir.

**Tablo 2: Çalışma gruplarına ait bilgiler**

	Kontrol	Hasta Grubu
Total kolesterol (mg/dl) (x±SD)	192.3±34.9	195±34.0
Trigliserid (mg/dl) (x±SD)	154.0±50.54§	177.64±73.6
LDL-kolesterol (mg/dl) (x±SD)	117.52±26.9	117.67±28.0
HDL-kolesterol (mg/dl) (x±SD)	46.75±8.9	42.36±10.19*
VLDL-kolesterol ((mg/dl) (x±SD)	30.78±18.1	35.62±14.7
PTZ (saniye) (x±SD)	11.74±1.1	13.18±11.75
aPTT (saniye) (x±SD)	33.38±4.2	33.26±10.5
Fibrinojen (mg/dl) (x±SD)	379.57±57.5	445.52±119.2**
F VIII:C (%) (x±SD)	101.92±33.54	138.17±34.9***
F VIII:Ag (%) (x±SD)	115.45±31.62	128.0±25.1*
ProC:Ag (%) (x±SD)	103.35±21.8	105.46±15.5
n APC-SR (+) (olanlar/olmayanlar (-))	0.96±0.15	0.82±0.19
Protein C akt. % (x±SD)	125±21.1	122.35±25.6

PTZ: Protrombin zamanı; aPTT; aktive parsiyel tromboplastin zamanı;

FVIII:C: Faktör VIII koagulan aktivite; F VIII:Ag: Faktör VIII antigen;

ProC:Ag: Protein C antigen; n-APC-SR-SR-normalized (aktive protein C sensitivty ratio) (aktive protein C rezistansı)

\*p<0.07, \*\*p<0.002, p<0.000

**Tablo 3: Çalışma gruplarına ait bilgiler**

	<b>Kontrol</b>	<b>Hasta Grubu</b>
Örnek sayısı K/E (n)%	8(%40)/12(%60)	20(%34.5)/38(%65.5)
Yaş ortalamaları (x±SD)	56±10	53±10
Sigara kullanımı (%) süre >10 yıl	11(%55)/9(%45)	39(%67)/19(%32.8)
İçenler n(%)/içmeyenler n(%)		
Diyabet var/yok (%)	1(%5)/19(%95)	12(%21.1)/45(%78.9)
Bir damarı tıkalı olanlar (n/%)	-	6(%8.8)
İki damarı tıkalı olanlar (n/%)	-	33(%57.9)
Üç damarı tıkalı olanlar (n/%)	-	19(%33.3)
Ailede KAH hikayesi var/yok (%)	7(35)/13(65)	36(62.1)/22(37.9)
Ailede CVA hikayesi var/yok (%)	13 (%65)/7(%35)	18(%31)/40(%69)
Ailede DVT hikayesi var/yok (%)	3(%15)/17(%85)	11(%19)/47(81)
Vücut kitle indeksi kg/m <sup>2</sup> (x±SD)	27.17±4.8	26.2±3.8

K: Kadın; E: Erkek; KAH: koroner arter hastalığı; CVA: serebrovasküler aksedan, DVT: Derin ven trombozu

İstatistiksel olarak fibrinojen, HDL kolesterol, F VIII:C, F VIII:Ag değerler hasta grubunda, kontrol grubundan anlamlı derecede daha yüksekti (p değerleri sırasıyla (p<0.002, p<0.007, p<0.000, p<0.007 idi) (Tablo 1).

Tüm olgularımızda koroner anjiyografi öncesi lipid profili bozuk olanlar, anjiyo öncesi üç hafta süreyle lipid düşürücü ilaç almışlardır. İki grup arasında lipid profili açısından anlamlı fark olmamasını buna bağlamaktayız.

Kontrol ve hasta grubunun yaş ortalamaları birbirine çok yakındı. Aile hikayesi, BMI ve diğer kişisel özellikler açısından fark yoktu (Tablo 3).

**Tablo 4: F VIII:C, F VIII:Ag değerlerinin 0 (sıfır) kan grubu taşıyan ve taşımayan kontrol ve hasta grubumuzdaki ortalama değerleri**

	KONTROL		HASTA	
	0 grubu	0 harici	0 grubu	0 hariç
n (%)	5 (%25)	15 (%75)	18 (%31.1)	40 (%68.9)
F VIII:C $\pm$ SD	112 $\pm$ 18.7	99. $\pm$ 35.9	126.16 $\pm$ 44.3	124.29 $\pm$ 50.7
F VIII:Ag $\pm$ SD	115.25 $\pm$ 12.8	115.5 $\pm$ 35.1	124 $\pm$ 25.07	129 $\pm$ 25.3

Kontrol grubumuzda 0 kan grubu taşıyanlarda F VIII:C 0 kan grubu taşımayanlara göre düşüktür. Fakat ne kontrol, ne hasta grubunda, iki grup içinde F VIII:C ve F VIII:Ag yönünden fark yoktu (Tablo 4).

F VIII:Ag ve F VIII:C'si değerleri hem kontrol hem de hasta grubumuzda birbiri ile korele idi (sırasıyla;  $r=0.695$ ,  $r=0.763$ ).

Hasta grubumuz F VIII:Ag ile aPTT ve fibrinojen arasında zayıf bir korelasyon vardı (sırasıyla;  $r=-0.43$ ,  $r=0.423$ ). F VIII:C için de aynı ilişki geçerliydi (sırasıyla;  $r=0.563$ ,  $r=0.563$ ) F VIII:C ile ptz arasında da zayıf negatif bir korelasyon vardı.

St 14 VNTR için, PCR neticesinde kontrol grubumuzu oluşturan 20 kişide (29 kromozom) 13 farklı allel, hasta grubumuzu oluşturan 58 kişide (76 kromozom) 17 farklı allel bulunmuştur (Tablo 5,6). Kontrol grubunda en sık rastlanan alleller 700 bp (%13.8), 1300 bp (%20.7) 1600 bp (%10.3), 1850 bp (%10.3) idi. Hasta grubunda en sık rastlanan alleller ise 700 bp (%19.4), 1480 bp (%13.2), 1600 bp (%10.5), 1660 bp (%10.5) idi. Diğer alleller her iki grup içinde daha az sıklıkta idi (Tablo 5, 6, 7).

**Tablo 5: Kontrol grubunda St 14 VNTR polimorfizminin alel sıklıkları**

Allellerin sayısı	Aleller (bp)	Sıklığı (n)*	%
1	700	4	13.8
2	1170	1	3.4
3	1300	6	20.7
4	1360	2	6.9
5	1480	1	3.4
6	1540	1	3.4
7	1600	3	10.3
8	1660	1	3.4
9	1720	2	6.9
10	1780	2	6.9
11	1840	1	3.4
12	1850	3	10.3
13	2400	2	6.9
		29	100

N: x kromozomu sayısı

**Tablo 6: Hasta grubunda St 14 VNTR polimorfizminin alel sıklıkları**

Allellerin sayısı	Aleller (bp)	Sıklığı (n)*	%
1	700	14	19.4
2	1240	1	1.4
3	1300	6	8.3
4	1360	6	8.3
5	1420	2	2.8
6	1480	10	13.9
7	1520	1	1.4
8	1540	4	5.6
9	1600	8	11.1
10	1660	8	11.1
11	1720	1	1.4
12	1790	1	1.4
13	1840	3	4.2
14	1850	1	1.4
15	2040	2	2.8
16	2100	3	4.2
17	2890	1	1.4
		4	Eksik
		76	100

n: X kromozom sayısı

**Tablo 7: St 14 VNTR polimorfizminde hasta ve kontrollerde en sık rastlanan alleller ve rastlanma yüzdeleri**

	(St 14 VNTR) Alleller (bp)	Alel sıklığı (%)
KONTROL	700	13.8
	1300	20.7
	1600	10.3
	1850	10.3
HASTA	700	19.4
	1480	13.2
	1600	10.5
	1660	10.5

Bcl-1/Intron 18 RFLP için, kontrol grubumuzda 29 allelden 1'i (%3.4), hasta grubumuzda 76 allelden 9'u (%11.8) heterozigotluk gösterdi (Tablo 8).

Hind III/Intron 19 RFLP için kontrol grubumuzda heterozigot paternler gözükmedi. Hasta grubumuzda 5 allel (%6.57) heterozigot patern verdi (Tablo 8).

St 14 VNTR RFLP analizinde, kontrol olgularının 29 allelinden 5'i (%7.2) hasta grubumuzun 72 allelinden 13'ü (%17.1) heterozigot patern gösterdi (Tablo 8).

**Tablo 8: Kontrol ve hasta gruplarında F VIII geninde Bcl-1, Hind III, ST 14 VNTR polimorfizmlerinin alel sıklıkları**

Polimorfizm	X kromozomlarının sayısı	Alel sıklıkları %		Heterozigot oranı %
		+ n (%)	- n (%)	n (%)
Bcl-1 K/H	29/76	24(82.8)/54(71.1)	5(17.2)/22(28.9)	(1)3,4/11.8(9)
Hind III K/H	29/76	4(13.8)/19(26)	25(86.2)/54(74)	(0)0/6.57(5)
St 14 VNTR K/H	29/72	(%44) 13 allel/17 allel (%22)		(5) 17.2/17.1(13)

K: Kontrol, H: hasta, VNTR: Variable number tandem repeat. (+) ve (-) semboller restriksiyon bölgesinin varlığını veya yokluğunu gösterir (sırasıyla)

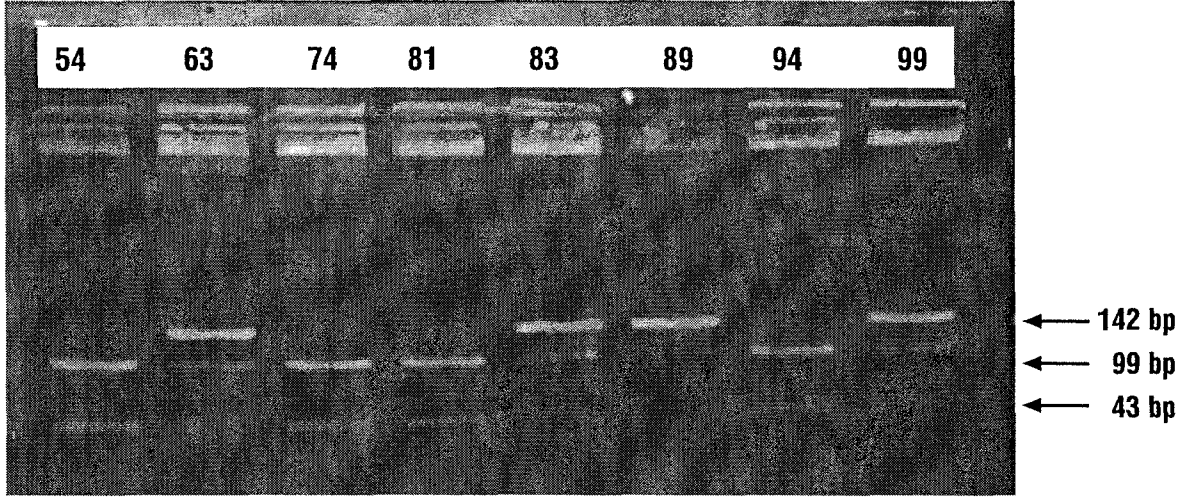
Bcl 1/Intron 18 polimorfizmi kontrol grubumuzdaki 29 alell'den 24'ünde pozitif (%82.8). Bu oran hasta grubunda biraz daha düşüktü (%71.1) (Tablo 8).

Hind III/Intron 19 polimorfizmi (+)'lığı hasta grubumuzda %19 idi bu oran kontrollerde %13.8 idi.

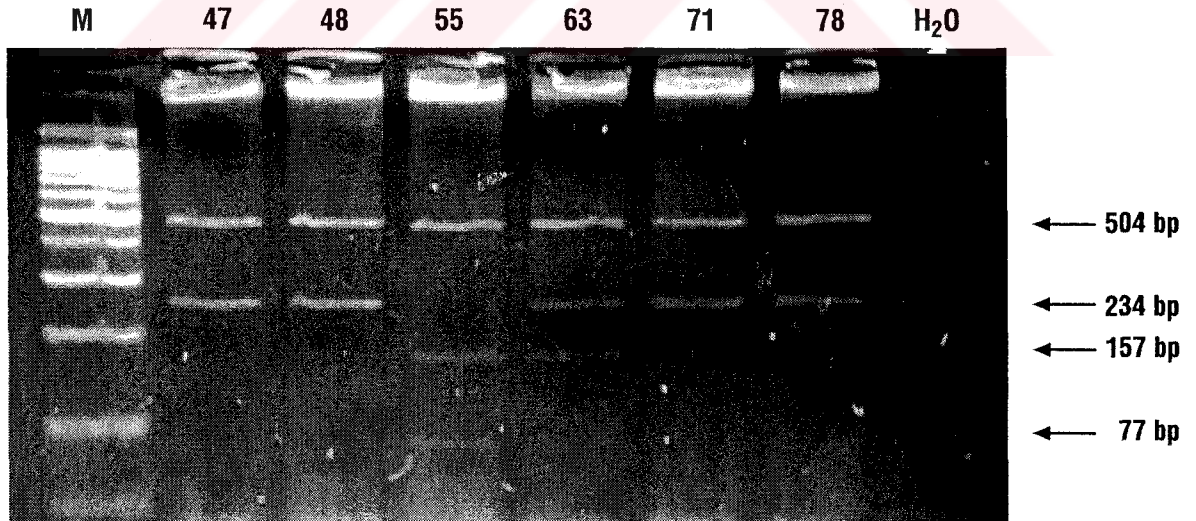
Bcl 1/Intron 18 polimorfizmi ile Hind III/Intron 19 polimorfizmi arasında negatif bir korelasyon vardı ( $r=-0.519$ ). St 14 VNTR ile de negatif zayıf bir korelasyon vardı. Bcl 1/Intron 18 polimorfizmi ile, ailesinde DVT olanlar arasında negatif zayıf bir korelasyon vardı ( $r=-0.344$ ). Bcl 1/Intron 18 polimorfizmi ile fibrinojen arasında da zayıf bir korelasyon gözlemlendi ( $r=0.316$ ).

Hind III/Intron 19 polimorfizmi ile PC:Ag ( $r=0.295$ ) ve DVT ( $r=0.284$ ) arasında zayıf bir korelasyon vardı.

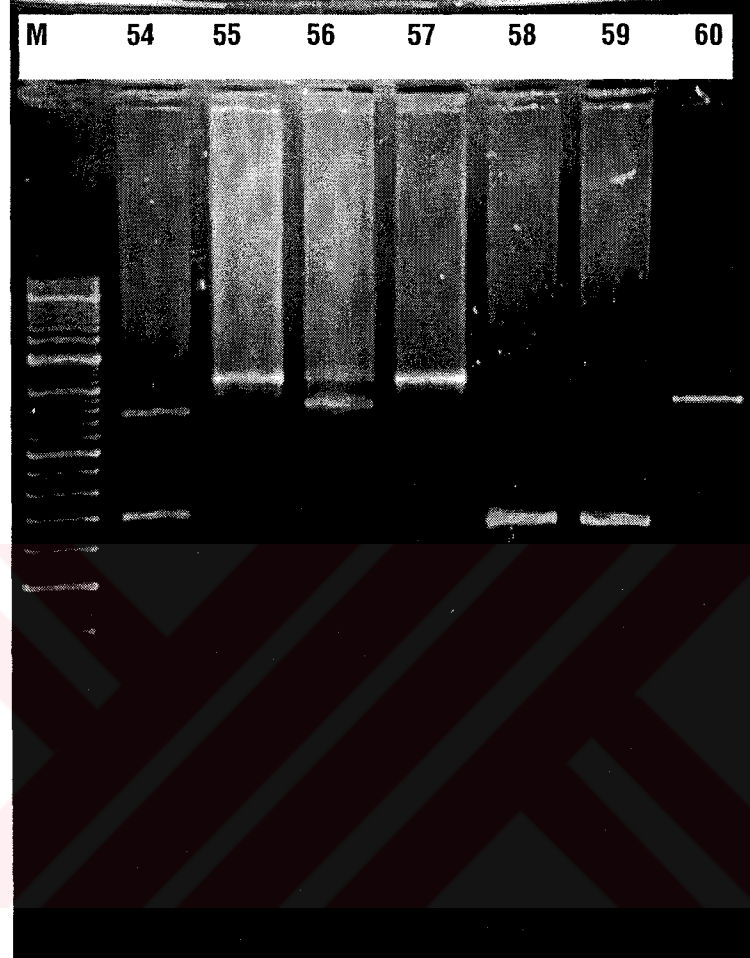
Şekil 11, 12 ve 13'de bazı olgulara ait üç ayrı polimorfizm çalışmasının agaroz-jel elektroforezleri gösterilmektedir.



**Şekil 11:** Bcl-1 restriksiyon ürünlerinin %4'lük agaroz gelinde görüntülenmesi 54, 63, 74, 94 nolu vakalar Bcl-1 polimorfizmini heterozigot (veya hemizigot) 63, 83 ve 99 nolu vakalar Bcl-1 polimorfizmini heterozigot olarak taşımaktadır. 89 nolu vakada Bcl-1 polimorfizmi bulunmamaktadır.



**Şekil 12:** Hind III restriksiyon ürünlerinin %2'lik agaroz gelinde görüntülenmesi. 55 nolu vaka Hind III polimorfizmini heterozigot (veya hemizigot), 63 nolu vaka Hind III polimorfizmini heterozigot olarak taşımaktadır. 47, 48, 71 ve 78 nolu vakalarda Hind III polimorfizmi bulunmamaktadır. Gelde görülen size markırının bant boyları 100 bp'lik artış göstermektedir.



**Şekil 10:** St VNTR PCR ürünlerinin %1'lik agaroz gelinde görüntülenmesi 54 nolu vaka 700 bp ve 1300 bp'lik iki allel, 55 ve 57 nolu vakalar 1720 bp'lik allel, 56 nolu vaka 1360 bp ve 1780 bp'lik iki allel, 58 ve 59 nolu vakalar 700 bp'lik allel ve 60 nolu vaka 1910 bp'lik alleli taşımaktadır. Gelde görülen size markörünün bant boyları 100 bp'lik artış göstermektedir.

## 9- TARTIŞMA

Ateroskleroz ve arteriel tromboz sonucu oluşan kardiyovasküler hastalıklar gelişmiş ülkelerde ölüm sebepleri arasında birinci sırayı işgal etmektedir. Ülkemizde koroner arter hastalığına bağlı ölüm oranlarının, gelişmiş ve refah düzeyleri yüksek ülkelere benzemesi şaşırtıcıdır. Türk kardioloji derneği 1990 yılından itibaren 10 yıl süren “TEKHARF” çalışması bunu açıkça göstermektedir. Bu çalışmaya göre, bu hastalıktan ölüm oranı erkeklerde 1200/100.000, kadınlarda ise 800/100.000’dir(146). Kanada’da ise yıllık ölümlerin %40’ının koroner arter hastalığından ileri geldiği bildirilmiştir(17).

Toplum sağlığı ve insan morbidite ve mortalitesi açısından çok önemli olan bu hastalık grubunun etyolojisi ve patogenezi üzerindeki çalışmaları yoğunlaşmıştır. Yazarlar hastalığın edinsel ve kazanılmış risk faktörlerine devamlı yenilerini eklemiş, dikkatlerini bu faktörlerin birbiri ile olan ilişkilerine ve risk faktörlerine hastalıktaki patolojik değerlerinin nedenlerinin aydınlatılmasına yöneltmişlerdir. Son yıllardaki çalışmalarla ateroskleroz ve arteriel tromboz sonucu oluşan kardiyovasküler hastalıkların, Protein C, F VIII ve fibrinojen gibi bir çok hemostaz parametresi ve koagulasyon faktörleri ile ilişkisi kanıtlanmıştır. Fakat bu parametrelerin hastalıktaki patolojik değerlerine yol açan mekanizmalar çoğu için, henüz aydınlatılamamıştır. Şimdi çalışmalar, bu mekanizmaların genetik kökenli olup olmadığının araştırılmasına odaklanmıştır(15, 26, 41, 99, 110, 131, 132, 133, 137, 148, 162, 177).

Biz çalışmamızda, arteriyel tromboz ve ateroskleroz sonucu oluşan kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde rol alan önemli risk faktörlerinden, Faktör VIII koagulan aktivitesi (F VIII:C) faktör VIII antijeni (F VIII:Ag), Protein C aktivite, antijen, protein C rezistansı ve fibrinojen gibi hemostaz ve koagulasyon parametrelerinin miktarlarını, KAH’lıkları ve KAH’lılığı olmayan grupta çalıştık. Çalışılan bu parametrelerin F VIII genindeki bir polimorfizmle ilişkisi olup olmadığını, KAH’nın sigara, obezite, cinsiyet, MI, CVA, DVT, Diabet yönünden aile hikayesine sahip olma gibi risk faktörleri ile korelasyonunu incelemek istedik.

Hemostatik parametreler ve major iskemik kalp hastalıklarının riski arasındaki ilişkiyi prospektif olarak genel popülasyonda inceleyen rapor edilmiş ilk çalışma, ARIC kapsamında Meade ve arkadaşlarının(131, 133, 134) orta yaşlı erkeklerde 16 yıl süreyle yaptığı epidemiyolojik çalışmadır. Bu çalışmadan alınan en son raporda, başlangıç F VIII:C ve vWF değerlerini, daha sonra ilk defa majör bir IKH'lığı geçiren grup ile, fetal seyreden IKH'lı grupta, IKH'lığı geçirmeyen gruptan daha yüksek buldular ve yüksek F VIII:C seviyelerinin arteriyel trombozisin ilerlemesine katkıda bulunabileceğini söylediler. **Hatta bir çok yazar, hemofili A'da görülen düşük iskemik kalp hastalığı mortalitesini de bu hastalıkta görülen düşük F VIII seviyelerine bağladılar(160).** Meade ve arkadaşları yaptıkları çalışmayla(132), yüksek F VIII değerlerinin arteriyel venöz trombozis veya aterosklerozun bir sebebi mi? yoksa sonucu mu sorusuna cevap bulmuşlardır.

Son elde edilen epidemiyolojik kanıtlar yüksek F VIII:C ile periferik vasküler hastalık(36) ve KKH'lığı(4, 75, 158) güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir. Leiden Trombophilia Study grubu(108, 144) raporlarından birinde, F VIII:C ile venöz tromboembolizm arasında anlamlı ilişki olduğunu belirtmiştir(15,108,115). Bu analizlere göre F VIII:C>150 IU/ml olanlar, F VIII<100IU/ml olanlarla kıyaslandığında, trombozis riski 4.8 defa daha artmaktadır.

Rumley ve arkadaşları da(162), MI veya IKH'lığı ölümleri ile F VIII:C'nin ileri derecede korele olduğunu buldu ve F VIII:C'nin fibrin oluşumunu ilerlettiğini ve arteriyel trombozisin fibrin komponentini artırarak bu hastalıklara zemin hazırladığını söyledi. Diğer bir çok araştırmacı da bu bulguyu desteklemiştir(42, 75).

Folsom ve arkadaşlarının(56) prospektif çalışmalarında, başlangıçta sağlıklı olan ve 5 yıl süreyle izlenen büyük bir grupta, F VIII:c, F VIII:Ag, Protein C:Ag, ATIII aktivitesi, fibrinojen, lökosit sayımı, trombosit sayımı gibi, hemostatik parametrelerin başlangıç değerlerini tespit ettiler. İzlenen sürede KKH'lığı geçiren grubun, fibrinojen, F VIII:C, vWF, değerleri, lökosit sayısı, geçirmeyen gruba göre anlamlı derecede yüksekti. Protein C, aPTT, ATIII değerleri ve trombosit sayısı ortalamaları iki grup arasında farklı değildi. F VIII:C ile fibrinojen ( $r=0.26$ ), aPTT ( $r=0.031$ ), vWF ( $r=0.7$ ) arasında korelasyon vardı.

Biz F VIII:C, F VIII:Ag ortalama değerlerini iki grup arasında farklı bulduk, bu fark F VIII:C'de daha güçlüydü (sırasıyla;  $p<0.000$ ,  $p<0.07$ ). aPTT değerleri açısından iki

grup arasında bir fark yoktu. Çalışmamız bu açıdan Folsom ve arkadaşlarının çalışmasına uygundu.

Conlan ve arkadaşları(34) da aterosklerozun bilinen bazı risk faktörleri ile F VIII ve vWF'ün ilgisini araştırdı. F VIII:C ve vWF ile yaşam stili, yaş, cinsiyet, ırk ve biyokimyasal faktörlerle ilişkiyi değerlendirdi.

Conlan'ın çalışmasına göre(34) kadınlar erkeklerden daha yüksek F VIII değerlerine sahipti. Bazı çalışmalarda, cinsiyetin etkisinin olmadığı(9, 88, 130, 150) veya erkeklerin daha yüksek, F VIII seviyelerine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu da seks hormonlarının F VIII'in sentez ve salınımlarında etkisi olabileceğini akla getirir.

Bizim çalışmamızda, F VIII:C ve F VIII:Ag ve cinsiyet arasında bir fark yoktu. Çalışmamız bu bakımdan, Jeramic, Balleisen, Kerr ve Pitney'in çalışmalarına uygundu(12, 88, 102, 150).

Conlan(34) F VIII:C ile sigara arasında negatif bir korelasyon buldu. Meade ve ark.(130)'da bu ilişkiyi bulmuştu. Buna karşılık F VIII:C ve sigara arasında bir ilişki bulunmadığını rapor eden yazarlar da vardır(12,23,85).

Bizim çalışmamızda da hasta grubumuzda, sigara ile F VIII:Ag ( $r=-0.450$ ) F VIII:C ( $r=-0.298$ ), fibrinojen ( $r=-0.346$ ) arasında zayıf bir korelasyon vardı.

1960'dan beri, 1970'lerin başlarına kadar yapılmış birçok çalışma, ABO kan grupları ile koroner arter hastalıkları(131, 136, 158) atherosclerosis(70, 103) ve venöz tromboembolik hastalıklar(76,157) arasında bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir(131, 144). ABO kan grupları ile plazma F VIII(127, 147) vWF (6, 10, 12, 24, 147, 188) arasında bir ilişki bulunmuştur. aPTT gibi, bazı global koagülasyon testleri ve ABO fenotipleri arasında da bir ilişki bildirilmiştir(127). Souto ve arkadaşları(170)'da ABO kan grupları ile vWF arasında anlamlı bir ilişki ( $p=0.0007$ ), F VIII:C ve aPTT arasında zayıf bir ilişki ( $p<0.1$ ,  $p=0.13$ ) buldu, sonuçta ABO fenotip ve genotiplemesinin trombofil riskinin teyidi için değerli bir komponent olabileceğini ve tromboz profilaksi ve tedavisinin belirlenmesinde yol gösterebileceği çeşitli araştırmacılar tarafından söylendi(23,24,70, 88,147,189).Conlan ve arkadaşları(34) aterosklerotik risk faktörlerinin ilişkisini incelemek için yaptıkları

çalışmada, F VIII seviyelerini değerlendirirken kan gruplarını dikkate almadılar. Gerekçe olarak da, Amerikan toplumunda 0 kan grubu sıklığı siyah ve beyazlarda benzer olmasına rağmen, F VIII seviyeleri siyah ırkta, beyazlara göre belirgin şekilde daha yüksekti. Bu mantıkla 0 kan grubu taşıyanların da, F VIII seviyeleri açısından fark olamayacağına inandıklarını açıkladılar.

Biz, hasta grubunda F VIII:C ( $p=0.89$ ) F VIII:Ag ( $p=0.45$ ) de kan grupları arasında bir fark bulamadık. 0 kan grubuna sahip olanlarla (F VIII:C= $126.16\pm 44$ , F VIII:Ag= $124.\pm 25$ ) 0 kan grubu haricinde kan grubuna sahip olanların (F VIII:c= $124.29\pm 50$ , F VIII:Ag= $129.6\pm 25$ ) F VIII:C ve F VIII:Ag ortalama değerleri birbirine çok yakındı. Normal olgularımızda da durum böyleydi.

Conlan ve arkadaşları(34) diğer yazarların(35) bulgularına uygun olarak, F VIII:C ve vWF değerlerinin yaş ile arttığını buldular. Bunun da yaşlı kişilerde aterosklerozun artmış prevalansını açıkladığını belirttiler.

Biz de yaş ile F VIII:Ag arasında zayıf bir korelasyon bulduk ( $r=0.375$ ). Buna karşılık F VIII:C ile yaş arasında bir ilişki yoktu. Yaş ile fibrinojen arasında da ( $r=0.332$ ) zayıf bir korelasyon vardı.

Kamphuisen ve ark.(92,112) ile O'Donnel ve ark.(144) ayrı ayrı yaptıkları çalışmalarda, F VIII:C ile F VIII:Ag seviyelerinin ileri derecede korele olduğunu teyit ettiler. Yüksek F VIII:C seviyelerinin, kan koagülasyonu esnasında, koagülasyon sisteminin aktivasyonu neticesi olmadığını ve artmış F VIII:Ag (F VIII proteininin)'nin gerçek bir göstergesi olduğunu söylediler(112,157).

Biz F VIII:C ve F VIII:Ag arasında güçlü bir korelasyon bulduk ( $r=0.774$ ,  $p<0.000$ ). Bu bulgu Kamphuisen(92) ve O'Donnel'in(144) bulgularına uygundu.

Myrenge ve ark.(39) ile Conlan ve ark.(34) F VIII:C ile HDL-kolesterol, trigliserid arasında zayıf bir korelasyon buldular. Iso ve ark.(85), F VIII:C ile trigliserid ve kolesterol arasında pozitif bir ilişki, Balleisen ve ark.(12), F VIII:C ile LDL kolesterol arasında negatif bir ilişki buldu.

Biz, F VIII:C, F VIII:Ag ile lipid fraksiyonları arasında bir ilişki gözlemedik. Her iki grubumuzda hiperlipidemisi olanlar, anjiyo öncesi yaklaşık bir ay süreyle lipid düşürücü ilaç alıyorlardı. Bu sebepten bu bulgunun doğruyu yansıtmadığı kanısındayız.

Biz, F VIII:Ag ile aPTT arasında negatif ( $r=-0.4.30$ ,  $p<0.001$ ) ve fibrinojen ile pozitif ( $r=0.423$ ,  $p<0.001$ ) zayıf bir korelasyon bulduk. Bu neticeler Folson(56) ve ark.'nın bulgularına uygundu.

F VIII:C ile aPTT arasında ( $r=-0.563$   $p<0.000$ ), ptz arasında ( $r=-0.283$   $p<0.03$ ) negatif zayıf bir korelasyon, fibrinojen ile pozitif ( $r=0.568$ ,  $p<0.000$ ) orta derecede bir korelasyon vardı.

F VIII ve fibrinojenin bir akut faz reaktanı olduğu bilinmektedir. O'Donnel (142, 144) yaptığı çalışmada, trombofili taraması için müracaat eden hastalarda F VIII seviyelerini değerlendirmek istedi. Olguları ilk epizoddan en az üç ay sonra değerlendirmeye aldı ve yine de, F VIII seviyelerinin, bir akut faz cevabı olup olmadığını test etmek için, CRP, ESR ve fibrinojen değerlerini de tespit etti ve F VIII ve F VIII:Ag'nin bu parametrelerden bağımsız olarak yükseldiğini buldu(144).

Bizim çalışma grubumuzda, MI geçiren az sayıda olgunun, MI'dan sonra en az üç aylık bir süre geçirmiş olanlar çalışmaya alındı. Bu husus dikkate alındığı içinde, diğer akut faz reaktanları çalışılmadı(36, 56, 75, 132, 148, 195, 199).

Yüksek plazma fibrinojen değerlerinin, akut faz reaktanı olarak yükseldiği durumlar dışında, aterosklerotik risk faktörü olduğu, aterogenezin hızlı olduğu diabette ve aterosklerozun sonucu olan KKH'da yükseldiği ispat edilmiştir(95, 132, 148, 195, 199). Folsom(56) yaptığı prospektif çalışmada, fibrinojen, F VIII, lökosit sayımı arasında pozitif ilişkiyi teyit etmiştir; F VIII, AT-III, protein C ve trombosit sayımı ile de ilişki bulamamıştır. Fibrinojenin, KAH'lığının diğer faktörleri ile korele olduğunu söyleyen çalışmalar da yapılmıştır. Fibrinojen değerleri ile yaş arasında da pozitif ( $r=0.475$ ) bir ilişki vardı. Özellikle erkeklerde yapılmış küçük çalışmalar fibrinojen ile KKH'lığı(132, 195) ve diğer aterosklerotik vasküler hastalıklar(51) arasında pozitif ilişkileri teyit etmiştir(132).

Biz de fibrinojen değerlerini, hasta grubumuzda, normal olgulara göre anlamlı derecede yüksek bulduk (sırasıyla;  $x=445.5\pm 119$ ,  $x=379.5\pm 57$   $p<0.002$ ) (Tablo 1). Fibrinojen değerleri ile ptz arasında da negatif bir korelasyon vardı ( $r=-0.377$   $p<0.002$ ).

nemli bir doğal antikoagulan olan protein C, koagulasyon kaskadının önemli kofaktrlerinden FVa ve VIIa'yı inaktive ederek fonksiyon görür. Eksikliğinde fibrin oluşununun hızlanması kaçınılmazdır bu da arteryel ve venöz trombozun gelişmesine katkıda bulunur(22, 65, 162). Yapılan çalışmaların çoğu proteinC ve venöz tromboz ilişkisi ile ilgilidir(21, 43, 45, 56, 62, 65, 126). Folsom, KKH'lıklı grupta, sağlıklı kontroller arasında protein C ve AT-III açısından bir fark bulamadı(56). Protein C:Ag'nın akut faz reaktanı etkisinden bağımsız olarak, Diabet ve IKH'da yükseldiğini gösteren, çalışmalar vardır(5,186).

Biz de, kontrol ve hasta grubunun, APC ve Protein C:Ag değerlerini farklı bulmadık (sırasıyla(APC) $x=125\pm 21$ ,  $x=122.35\pm 25.6$ ) (Tablo 1) (PC: Ag için sırasıyla;  $x = 103.32\pm 21.8$ ,  $x=105.46 \pm 15.5$ ) (Tablo 2). PC:Ag ile trigliserid arasında çok zayıf pozitif bir korelasyon vardı ( $r=0.270$ ) ptz ( $r=-0.293$ ) ve ailesinde MI yks olanlarla da ( $r=-0.316$ ) negatif zayıf korelasyonlar vardı.

APC ile; kolesterol arasında ( $r=0.309$ ) pozitif zayıf bir korelasyon vardı. PC:Ag ve APC değerleri arasında zayıf bir korelasyon vardı ( $r=0.296$ ).

APC ile, PC:Ag ve kolesterol arasındaki ilişki Aslan(9) ve Eren'in(9) bulgularına uygundu.

Son yıllarda, aktive protein C'nin, antikoagulan etkisine karşı kalıtımsal bir rezistans bulundu(39) ve bu rezistansın trombofili ile ilgili olduğu söylendi. Çoğu vakada APC rezistansı (APC-R) faktör V genindeki bir nokta mutasyon dolayısı ile oluşur. F-V geni üzerinde APC'nin kesim noktalarından biri olan Arg-506'nın glisin ile yer değiştirmesi sonucu; F Va, APC'nin inaktivasyonuna normalden daha az duyarlı hale gelir. Buna FV-Leiden denir(39). APC-R genel populyasyonda oldukça sık rastlanır (%3 ile %5) bu kişilerde venöz trombo-embolizm sıklıdır(108, 174). Kalıtımsal trombofilili vakalarının %60 ile %70'inden F-V Leiden sorumludur. F V-Leiden mutasyonu bulunmayan, geri

kalan %30 ile %40 vakadaki moleküler defektin açıklanması belki de hemostaz konusunda gelecek on yılın en önemli keşfi olacaktır(31, 41, 128).

Kombine olmuş protrombotik faktörlerin tromboz riskini artırdığı gösterilmiştir(164) F V-Leiden ile kombine olmuş, protein C, protein S gen defektli ailelerde, tromboza yatkınlığın tek defektten daha fazla olduğu(60, 93, 94, 116, 138, 180) ve bu duruma yüksek F VIII seviyelerinin eşlik ettiği gösterilmiştir. Araştırmacılar, trombofilik ailelerde, yüksek trombotik eğilimin sebebini de, muhtemelen iki veya daha fazla (genetik) risk faktörünün kombine olmasına bağlamışlardır. En yaygın risk faktörü olarak da yükselmiş F VIII seviyelerini, en olası aday olarak göstermişlerdir(120).

Marcucci ve arkadaşları F V-Leiden mutasyonundan bağımsız olarak postmenoposal kadınlarda, yüksek F VIII seviyelerine eşlik eden APC-R tespit etti ve APC-R'nin, postmenoposal kadınlarda venöz tromboz riskinin göstergesi olabileceğini savundu(128).

Bizim çalışmamızda, kontrol ve hasta grubumuzdaki APC-R değerleri arasında anlamlı bir fark vardı ( $r=0.02$ ) (Tablo 1).

Ateroskleroz, arteriyel ve venöz trombozlu hastalarda, F VIII yüksekliğinin olduğu ispat edilmiştir(94, 115, 157, 159). Fakat bu yüksekliğin mekanizması hâlâ açıklanamamıştır. Bu mekanizmanın genetik kökenli olduğu konusunda fikir birliği vardır(1, 93, 118). Günümüzde araştırmacılar, F VIII geni üzerindeki bir mutasyonun bu yüksekliğe sebep olup olmadığını anlamak için yoğun olarak çalışmaktadırlar.

F VIII geni üzerine yapılan ailevi çalışmalar(165), F VIII genindeki, genetik değişikliklerin, yüksek F VIII seviyelerine sebep olabileceği konusunda mantıksal hipotezler ortaya çıkarmıştır(93, 94, 114, 138).

F V-leiden mekanizmasına benzer olarak; F VIII yüksekliğine, APC'nin, F VIII geni üzerindeki kesim noktalarında, bir mutasyonun sebep olabileceği düşünülmüştür(156). Tekrarlayan tromboembolizmi veya rastgele seçilmiş 125 hastada F VIII geni üzerinde APC'nin kesim noktaları olan Arg-336 ve Arg562 amino asit

pozisyonlarında bir mutasyonun varlığını araştırdı. Fakat, bu amino asit pozisyonlarında bir mutasyon bulamadı(156).

Manswelt ve ark.(127) İle diğer araştırmacılar(120) yaptıkları çalışmada, F VIII geni üzerinde, F VIII yüksekliğinin sebebi olarak bir mutasyon bulamadılar.

Bowen ve ark.(19) yüksek F VIII seviyelerinin bir determinantı olabileceği dūřüncesi ile vWF geninin, F VIII bağlama bōlgelerinde bir polimorfizm olup olmadığına baktılar ve bu bōlgelerde bir amino asit substitusyonu/polimorfizminin, trombozisl hastalarda yüksek F VIII seviyelerinin sebebinin açıklayamayacağını söylediler(19).

F VIII geni üzerindeki polimorfizm çalışmalarının hemen hepsi, hemofili A taşıyıcılarının tayini ve prenatal teşhis için yapılmıştır. Polimorfizmlerin ırklara gōre değişiklik gōstermesi(29,167), F VIII geni üzerinde, polimorfik restriksiyon enzim bōlgelerinin ve bu bōlgeleri tanıyan daha fazla markırın bulunmasına sebep olmuştur. Bunlar içinde en sık çalışılanlar da, Bcl I/Intron 18 polimorfizmi 18, Hind III/Intron 19(87). Xa I/Intron 22 polimorfizmi(20, 26), Bgl I/ekson 26 polimorfizmi(18) Intron 13/22 dinukletid tekrar polimorfizmleri(118) ve F VIII geninden 4cM (sentimorgan) uzaklıkta lokalize olmuş St 14 VNTR polimorfizmleridir.

Akar ve arkadaşları(1), F VIII geninde iki intronik polimorfizm (Intron 25 C-T ve Intron 18 Bcl-1) alıştı ve Yüksek F VIII seviyeleri ile ilişki bulamadı. Buna rağmen, bazı intraeksonik polimorfizmlerin hastalığın ortaya çıkışı ve gidişini etkileyebileceğini ve F VIII geninin daha ileri intraeksonik polimorfizm analizlerinin, yüksek F VIII seviyelerinin rolünü açıklayabileceğini söyledi. Ateroskleroza neden olabileceği dūřüncesi ile başka genlerde de polimorfizm çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla Yılmaz ve İsbir kolesterol ester transfer protein (CETP) geninde polimorfizmlere bakmışlar ve anlamlı polimorfizmler bulmuşlardır.

şimdilerde; F VIII yüksekliğini açıklamak için F VIII geni üzerinde yapılan genetik çalışmalar trombozisl hastalar üzerine odaklanmıştır.

Çalışmamız şu bakımlardan önem taşımaktadır:

Hasta olgularımızda, eğer yüksek F VIII:C değerlerine yüksek veya normal APC ve artmış APC-R'ı eşlik ediyorsa bunun F VIII'e karşıda bir rezistanının göstergesi olabileceği düşüncesi ile bu her üç parametreyi de çalıştık. Şimdiye kadar böyle bir ilgi, KKH'lı hastalarda çalışılmamıştı. Biz hasta grubunda gerçekten artmış bir rezistans gözledik ( $p<0.02$ ). APC değerlerimiz de hasta grubunda azalmamıştı (normal,  $x=125\pm 21.1$ ; hasta  $x=122.35\pm 25.6$ ). F VIII:C, F VIII:Ag değerleri, F VIII:C'de daha fazla olmak üzere hasta grubunda yüksekti (sırayla,  $p<0.000$ ,  $p<0.07$ ). Bu tablo mantıksal olarak, KKH'lı kişilerde bir APC-R'nı gösteriyor olabilir.

Çalışmamız ayrıca F VIII gen polimorfizminin, F VIII:C, F VIII:A, APC, PC:Ag, APC-R seviyeleri ile ilişkisini, ateroskleroz veya arteriyel trombozis sonucu oluşan, koroner kalp hastalıklı grupta, ilk olarak araştırılması açısından önem taşımaktadır.

Hasta grubumuzun toplam alel sayısı 76, kontrol grubumuzda ise 29 idi. Bcl 1/Intron 18 RFLP için heterozigotluk oranı hasta grubunda (%71.1), Hind III/Intron 19 RFLP'den daha yüksekti(%26). Bcl 1/Intron 18 RFLP ile F VIII arasında bir korelasyon yoktu, Hind III/Intron 19 ile ( $r=-0.519$ ) St 14 VNTR polimorfizmi arasında ( $r=-0.245$ ) negatif korelasyonu vardı.

Bcl 1/Intron 18 RFLP polimorfizminin fibrinojen ile pozitif ( $r=0.316$ ) ailesinde DVT hikayesi olanlarla negatif ( $r=-0.344$ ) zayıf korelasyonu vardı.

Hind III/Intron 19 polimorfizmi, PC:Ag ile ( $r=0.295$ ) pozitif, ailesinde DVT hikayesi olanlarla ( $r=0.284$ ) zayıf korelasyonlar gösterdi.

Bcl 1/Intron 18 RFLP için hastaların %11.8'inde, Hind III/Intron 19 RFLP için %6.57'sinde, St 14 VNTR için ise %17.1'inde heterozigot patern vardı.

Hind III/Intron 19 RFLP için kontrol grubunda hiç heterozigot patern yoktu.

St 14 VNTR RFLP analizinde hasta grubundaki alel sıklığı, kontrollerden yüksekti (sırasıyla 17-13 alel). Hasta grubunda en sık rastlanan alel 700 bp'lık (%19.4) kontrol grubunda ise 1300 bp (%20.7)'lik aleldir. Alellerin baz uzunlukları farklı değildi.

**Sonuç olarak:**

Çalışmamız ateroskleroz veya arteriel tromboz sonucu oluşan koroner kalp hastalıklarında F VIII gen polimorfizminin, F VII:C, F VII:Ag gibi risk faktörleri ve diğer risk faktörleri ile ilişkisini araştıran ilk çalışma olması bakımından önem taşımaktadır.

Bcl I/Intron 18 RFLP ve Hind III/Intron 19 RFLP için heterozigotluğun hasta grubunda kontrol grubundan daha yüksek olması ve hatta Hind III/Intron 19 RFLP için kontrol grubunda hiç heterozigotluğa rastlanmaması, St 14 VNTR-RFLP için hasta grubunda en sık rastlanan alel ile (700 pb-%19.4) kontrol grubunda en sık rastlanan alelin (1300 bp, %20.7) farklı olması. Bu polimorfizmlerin KKH açısından anlam taşıdığını düşündürmektedir.

Çalışılan üç polimorfizm ile F VII:C ve F VII:Ag arasında bir korelasyon yoktu.

F VIII:C, F VIII:Ag yüksekliğinin genetik kökenini araştırmak için, F VIII geninin büyüklüğü de gözönüne alınırsa, daha büyük populasyonlarda, daha fazla çalışmanın yapılması ihtiyacı açıktır.

## 12- KAYNAKLAR

- 1- Akar N., Duman T., Gökçe H.: High factor VIII antigen levels are not associated with factor VIII gene polymorphisms. *Turk J Haematol* 3:399-400, 2002.
- 2- Antonarakis S.E., Waber P.G., Kittur S.D.: Hemophilia A detection of molecular defects and of carriers by DNA analysis. *N Eng J of Med* 33: 842-848, 1985.
- 3- Antonarakis S.E., Yousouffian H., Kazazarian H.H.: Molecular genetics of hemophilia A in man. *Mol Biol. Med.* 4:81-94, 1987.
- 4- ARIC Investigators: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study design and objectives *Am. J. Epidemiol.* 129:687-702, 1989.
- 5- Aslan B., Eren N.: Diabetik Hastalarda Protein C ve Trombomodülin Düzeyleri, Tez. Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul 1996.
- 6- Atalay S., Akar N., Tutar H.E.: Is high levels of factor VIII a possible risk factor for intracardiac thrombosis? *International J of cardiology.* 81:289-290, 2001.
- 7- Badimon L., Fusker V.: von Willebrand factor and atherosclerotic cardiovascular disease. *Atherosclerotic Cardiovascular Disease. Hemostasis and Endothelial Functions* (ed. by Francis B.P.) s..53-85. Marcel Dekker. New York, 1992.
- 8- Bajaj S.P., Rapaport S.I., Maki S.L.: A monoclonal antibody to factor IX that inhibits the factor VIII: Ca potentation of factor X activation system. *J. Biol. Chem.* 260:11574, 1985.
- 9- Bolleisen L., Assman G., Bailey J., Epping P.H. Schulte H., van de Loo, J.: Epidemiological study on factor VII, factor VIII in fibrinogen in an industrial population II. Baseline data on the relation to blood pressure; blood glucose, uric acid and lipid fractions. *Thromb Haemost* 54:721-723, 1985.

- 10- Bainton D., Miller N.E., Bolton C.H. Yarnell J.W.G., Sweetnam P.M., Baker I.A., Lewis B., Elwood P.C.P.: Plasma triglyceride and high-density lipoprotein cholesterol as predictors of ischaemic heart disease in British men. The Caephillly and Speedwell collaborative heart disease studies. *British Heart Journal*, 68. 60-66, 1992.
- 11- Beauchamp N.J., Daly M.E., Cooper P.C., Makris M., Preston F.E., Peake I.R.: Molecular basis of protein S deficiency in three families also showing independent inheritance of factor V Leiden. *Blood*. 88:1700-1707, 1996.
- 12- Belleisen L., Bailey J., Epping P.H. Schulte H. Van de Loo J.: Epidemiological study on factor VII, factor VIII and fibrinogen in an industrial population: 1. Baseline data on the relation to rige, gender, hody-weight, smoking, alcholo, pill-asing and menopause. *Thromb. Haemostasis*. 54:475-479, 1985.
- 13- Bern M.M., Cassani M.P., Horton J.: Changes of fibrinolysis and factor VIII coagulant, antigen, and ristocetin cofactor in diabetes mellitus and atherosclerosis. *Thrombosis Research* 19:831-9, 1980.
- 14- Beutler E., Lichtman A.M., Coller S.B., Kipps J.T.: *Williams Hematology*. S.1239-50, 1219-30, 5. baskı McGraw Hill Companies, 1995.
- 15- Bloemenkamp K.W.M., Helmerhost F.M., Rosendaal F.R.: Venous thrombosis, oral contraceptives and high factor VIII levels. *Thromb Haemost* 82, 1024-7, 1999.
- 16- Bloom A.I.: The biosynthesis of factor VIII. *Clin. Haem.* 8:53-59, 1979.
- 17- Blooth G.L.: Preventive health care. update. *C.M.A.J.* 163:21-23, 2000.
- 18- Bowen D.J., Hampton K.K.: Analysis of the Bg/I restriction fragment length polymorphism in the human factor VIII gene using 'virtual PCR' - a novel approach employing the polymerase chain reaction in the absence of sequence information for the locus. *J Hum Genet* 98:219-22, 1996.

- 19- Bowen D.J., Maclean R.M., Pellard S., Collins P.W.: High concentrations of coagulation factor VIII and thrombosis: is the factor VIII-binding domain of von Willebrand factor implicated? *British J of Haematol* 113:655-657, 2001.
- 20- Brasi C.D., Bowen D.J., Collins P.W.: specific analysis of the Intron 22 Xba I polymorphism of human factor VIII gene using long-distance PCR. *British J of Haematol* 107, 566-8, 1999.
- 21- Broekmans A.W.: Hereditary protein C deficiency. *Haemostasis* 15:233-240, 1985.
- 22- Broekmans A.W., van der Linden I.K., Veltkamp J.J., Bertina R.M.: Prevalence of isolated protein C deficiency in patients with venous thrombotic disease and in the population. *Thromb. Haemostas* 50:350 (Abst), 1983.
- 23- Stormorken H., Erikssen J.: Plasma antitrombin III and Factor VIII antigen in relation to angiographic findings, angina and blood groups in middle-aged men. *Thromb. Haemost* 38:874-80, 1977.
- 24- Caekebeke-Peerlinck K.M.J., Koster T., Briët E.: Bleeding time, blood groups and von Willebrand factor. *Br. J. Haematol* 73)217-220, 1989.
- 25- Catto A.J., Carter A.M., Barrett J.H., Bamford J.: von Willebrand and factor factor VIII: C in acute cerebrovascular disease. *Thromb Haemost* 77, 1104-8, 1997.
- 26- Chamless L.E., Shahar E., Sharrett A.R.: Association of transient ischemic attack/stroke symptoms assessed by standardized questionnaire and algorithm with cerebrovascular risk factors and carotid artery wall thickness. *Am J Epidemiol* 144, 857-866, 1996.
- 27- Chen C., Fang X., Zhu J.: The gene expression of coagulationfactor VIII in mammalian cell lines. *Thrombosis Research* 95, 105-115, 1999.

- 28- Choi Y.M., Hwang D., Choe J.: Carrier detection and prenatal diagnosis hemophilia A in a Korean population by PCR-based analysis of the BcII/intron 18 and st 14 VNTR polymorphisms. *J Hum Genet* 45, 218-223, 2000.
- 29- Chowdhury MR, Hermann FH, Schroder W, Lambert CT, Lalloz MR, Lnyton M, Kumbnani HK, Kabra M, Menon PS, Verma I.C.: Factor VIII gene polymorphisms in the Asian Indian population *Haemophilia* Nov, 6(6):625-30, 2000.
- 30- Clauss A.: Gerinungsphysiologische schelmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta Haematol* 17:237, 1957.
- 31- Clouse I.H., Comp. P.C.: The regulation of hemostasis the protein C system. *New England Journal of Medicine*. 314. 1298-1304, 1986.
- 32- Colman W.R., Hirsh J., Marder J.V., Salzman W.E.: Hemastosis and Thrombosis. *Basic Principles and Clinical Practice*. S.3-16, 29-33, 114-16, Haemostasis. 3. baskı Lippincott Company, 1994.
- 33- Conrad J., Samama M.: Inhibitors of coagulation, atherosclerosis and arterial thrombosis. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis* 12:87-90, 1986.
- 34- Conlan M.G., Folsom A.R., Finch A., Davis C.E., Sorlie P., Marcucci G., Wu K.K.: Association of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, sex and risk factors for atherosclerosis. *Thromb and Haemost* 70, 380-385, 1993.
- 35- Cooperberg A.A. Tatelbaum J.: The concentration of antihemophilic globulin (AHG) related to age. *Brit. J. Haematol* 6:281-7, 1960.
- 36- Cortellano M., Boschetti C., Cofrancesco E., Zanussi C., Catalano M. de Gaetrino G., Gabrielli L., Lombardi B., Specchio G., Tavazzi L. Tremoli E. Dela Volpe A., Polli E.: The PLAT Study group. Hemostatic function in relation to atherothrombotic ischemic events in vascular disease patients. Principal results. *Atheroscler. Thromb.* 12:1063-70, 1992.

- 37- Dahlbäck B.: Protein S and C4-binding protein: Components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb. Haemost.* 66:49, 1991.
- 38- Dahlbäck B., Carlsson M., Svensson P.J.: Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:1004-1008, 1993.
- 39- Dahlbäck B.: Inhibition of the protein C cofactor function of human and bovine protein S by C4-binding protein J. *Biol Chem.* 261:120-122, 1986.
- 40- Dahlbäck B., Stentflo J.: The protein C anticoagulant system. In: *Stammatogannopoulos G., Niehuis A.W., Mayerus P.M.: Eds. The Molecular Basis of Blood Disease.* Philadelphia. P.A. Saunders: 598-628, 1994.
- 41- de Rande H. Roger M.B.: Laboratory diagnosis of APC-resistance A critical evaluation of the test and the development of diagnostic criteria. *Thrombosis and Haemostasis* 72:880-886, 1994.
- 42- Denson K.W.E.: The ratio of factor VIII-related antigen and factor VIII biological activity as an index of hypercoagulability and intravascular clotting. *Thromb. Res.* 10:107, 1977.
- 43- Dolan G., Neal K., Cooper P., Brown P., Preston F.E.: Protein C, antithrombin III and plasminogen: effect of age, sex and blood group. *British J of Haematol* 86, 798-803, 1994.
- 44- Dustin M.L., Garcia-Aguilar J., Hihhs M.L.: Structure and regulation of leukocyte adhesion receptor LFA-1 and its counterreceptors ICAM-1 and ICAM-2. *Cold Spring Harbor Sym. Quant Biology* 54:573, 1989.
- 45- Egeberg O.: Clotting factor levels in patients with coronary atherosclerosis. *Scand. J Clin. Lab. Invest.* 14. 253-8, 1962.

- 46- El-Maarri O., Oldenburg J., Çağlayan S.H.: Intron 22-specific long PCR for the Xba I polymorphism in the factor VIII gene. *British J of Haematol* 105:1120-22, 1999.
- 47- Emekli N.: *Basic and Applied Biochemistry* M.Ü.Teknik Eğitim Fak. Matbaası, s.352-356, 1994.
- 48- Emekli N.: *Glikozaminoglikanlar ve Ateroskleroz, Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji Kongre Kitabı*, s.263, 2002.
- 49- Emekli, N., Ulutin, O.N.: The protective effect of Autoprotrombin II-A *Haematologica*, 65:641-644, 1980.
- 50- Emekli, N.B., Demirkaya, E., Denктаş, M.: Serebrovasküler thromboembolizmli olgularda protein C düzeylerinin incelenmesi. *Ege Üniv. Nörolojik Bilimler Dergisi* 4:14-17, 1984.
- 51- Ernst E., Resch K.L.: Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann intern Med* 118:956-963, 1993.
- 52- Esmon C.T.: The protein C anticoagulant pathway. *Arterioscler. Throm.* 12:135-140, 1992.
- 53- Esmon C.T.: The roles of protein C and thrombomodulin in regulation of blood coagulation. *J. Biol. Chem.* 264:4743, 1989.
- 54- Fay P.J.: Reconstitution of human factor VIII from isolated subunits *Biochem Biophys.* 262:525-31, 1988.
- 55- Falsom A.B., Wu, K.K., Dans C.E., Conlan, M.G., Sorlie P.D., Saklo M.: Population correlates of plasma fibrinogen and factor VII Putentive cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis.* 91:191-205, 1991.
- 56- Falsom A.R., Wu K.K., Rosamond W.D.: Prospective study of hemostatic factors and incidence of coronary heart disease. *Circulation* 96:1102-1108, 1997.

- 57- Fulcher C.A, Gardinen J.E.,Griffin J.H., Zimmerman T.S.: Proteolytic inactivation of human factor VIII. procoagulants protein by activated human protein C and its analogy with factor V. *Blood* 63:486, 1984.
- 58- Fulcher C.A., Houghten R.A., de Graaf M.S., Roberts J.R., Zimmerman T.S.: Synthesis peptide probes of factor VIII immunology and function. *Thromb Haemost* 58:356 1987.
- 59- Fuster V., Badimon L, Chesebro JH.: Importance of experimental models for the development of clinical trials on thromboatherosclerosis. *Circulation* 839:(supp IV) 315, 1991.
- 60- Giddings J.C. ve Bloom A.L.: Inhibition of activated protein C in combined factor V/VIII deficiency. *Thrombos. Haemostas.* 46:61, 1981.
- 61- Girma J.P., Fressinaud E., Houllier A., Laurian Y., Amiral J., Meyer D., Inserin U.: Assay of factor VIII:Ag and VIII: C. In 294 haemophilia A patents by a new commercial ELISA with monoclonal antibodies. *Haemophilia* 4:98-103, 1997.
- 62- Gladson C.L. Schnerrer I., Hach V., Beck K.H. Griffin J.H.: The frequency of type I heterozygous protein S and protein C deficiency in 141 unrelated young patients with venous thrombosis. *Thromb. and Haemos* 59:18-22, 1988.
- 63- Graham J.B., Kunkel G.R., Fawlkas D.M. and Lord S.T.: The utility of a Hind III polymorphism of factor VIII examined by rapid DNA analysis. *Brit. J. Haematol.* 76, 75-79, 1990.
- 64- Greengard S.G., Eichinger S., Griffin J.H., Bauer A.K.: Variability of thrombosis among homozygous siblings with resistance to activated protein C due to an Arg-G In mutation in the gene for factor V. *The New England Journal of Medicine.* 333:1559-62, 1994.

- 65- Griffin J.H., Moshen D.F., Zimmerman T.S. Kleiss A.J.: Protein C and athithrombotic protein is reduced in hospitalized patients with intravascular coagulation. *Blood* 60:261-264, 1982.
- 66- Gruber A., Mori E., Zaggo GJ, Waxman L, Griffin HG.: Alteration of fibrin network by activated protein C. *Blood*. 83, 8: 2541-2548, 1994.
- Gtschier J.W.I., Wood T.M., Garalka K.L., Wion E.Y. Chen D.H., Eaton G.A., Vehar D.J., Capon R.M.L.: Characterization of Human Factor VIII. *Nature* 312. 326-330, 1984.
- 68- Guyton C.A.: *Textbook of Medical Pyssiology*. 5. baskı, s.165-85. Cilt 1. Bölüm II. W.B. Saunders Company, 1977.
- 69- Hackeng T.M., Hessing M., Veer C., Meiyer Huizingal F., Meiyers J.C.M., Groot PG, Van Mourik J.A., Bauma M.N.: Protein S binding to human endothelial cells is required for expression of cofactor activity for activated protein C. *The J. Bio. Chem.* 3993-4000, 1993.
- 70- Hall R., Bunch G.A., Humprey C.S.: The frequencies of ABO blood group and secretors of ABH group substances in peripheral atherosclerosis. *Atheroscler.* 14:241-246, 1971.
- 71- Hayashi T., Zushi M., Vamamoto, S., Suzuki K.: Further localization of binding sites for thrombin and protein C in human thrombomodulin. *The J. Bio. Chem.* 265 (33): 20156-20159, 1990.
- 72- Heeb JM., Gruber A., Griffin J.H.: Identification of divalent metal independent inhibition of activated protein c by  $\alpha 2$  antiplasmin in blood and comparisans to inhibition of factor Xa, thrombin, and plasmin. *J. Biol. Chem.* 26:17606, 17612, 1991.
- 73- Hegele R.A.: Environmental modulation of atherosclerosis and points in familial hypercholesterolemia. *Atheroscler Suppl*, 3:5-7, 2002.

- 74- Heijboer H., Brandes D., Buller H.R., Sturk A., Len Cate J.W.: Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-vein thrombosis. *N. Engl. J. Med.* 323:1512, 1990.
- 75- Heinrich J., Balleisen I., Schulte H., Assmann G., van de Loo J.: Fibrinogen and factor VIII in the prediction of coronary risk: results from the PROCAM Study in Healthy Men. *Arterioscler. Thromb.* 14:54-59, 1994.
- 76- Henkens C.M.A., Bom V.J.J., van der Meer J., Lowered A.P.C.: Sensitivity ratio related to increased factor VIII-clotting activity. *Thromb Haemost.* 74:1198-1199, 1995.
- 77- Hession C., Osborn C., Goff D.: Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: Direct expression, cloning and functional interaction. *Proc Natl. Acad. Sci.* 87. 1673, 1990.
- 78- Higuchi M., Antonarakis S.E., Kasch L.: Molecular characterization of mild-to-moderate hemophilia A: detection of the mutation in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8307-8311, 1991.
- 79- Hill-Eubricks D.C., Lollar P.: von Willebrand factor is a cofactor for thrombin-catalyzed cleavage of the factor VIII light chain. *J. Biol. Chem.* 265:17854, 1990.
- 80- Hogen L.W.: The factor VIII complex structure and function *Blood* 58. 822-833, 1981.
- 81- Householder Glen T.: The Role of Endothelium in in vivo Anticoagulation. I. Oral Maxillofac Surg. 49:507-511, 1991.
- 82- Hoyer L.W.: Factor VIII: New perspectives. *Trans Med Rev.* 1. 113-122, 1987.

- 83- Hoyer L.W., Edward G.W., Colman W.R. : Coagulation Cofactors: Factors V and VIII in: Colman W.R., Hirsh J., Marder J.V., Salzman W.E.: Hemostasis and Thrombosis Basic Principles and Clinical Practice. S.109-27, 3.Baskı Lippincott Company, 1994.
- 84- Hultin M.B.: Modulation of thrombin-mediated activation of factor VIII: C by calcium ions, phospholipid and platelets. Blood 66:53-56, 1985.
- 85- Iso H., Folsan A.B., Wu K.K., Finch A., Munyar R.G., Sato S., Shimamoto T., Terao A., Komachi Y.: Hemostatic variables in Japanese and Caucasian men. Plasma fibrinogen. Factor VIIc, factor VIIIc. And von Willebrand factor and their relation to cardiovascular disease risk factors. Am. J. Epidemiol 130:925-934, 1989.
- 86- Jansson J.H., Nilsson T.K. Johnsen O.: von Willebrand factor in plasma: a novel risk factor for recurrent myocardial infarction and death. Brit. Hearth. J. 66:351-355, 1991.
- 87- Jarjanazi H., Timur A.A., El-Maarri O.: Analysis of two microsatelite repeat polymorphisms of the factor VIII gene in the turkish population. Brit J of Haematol. 100:589-593, 1998.
- 88- Jeremic M., Weisert O., Gedde D.T.W.: Factor VIII (AHG) levels in 1016 regular blood donors. The effect of age sex and ABO blood groups. Scand J. Clin. Lab. Invest 36:461-466, 1976.
- 89- Kalatatis M., Swords NA; Rand MD, Mann KG.: Membrane dependent reactions in blood coagulation role of the vitamin K Dependent enzyme complexes Biochem et Biophy Acta 1227:113-129, 1994.
- 90- Kamphuisen P.W., Hauwing-Dustermaat J.J. von Houwelingen H.C., Erkenboom J.C.J., Bertina R.M., Rosendaal F.R.: Familial clustering of factor VIII and von Willebrand factor levels. Throm Haemost 79:323-327, 1998.

- 91- Kamphuisen P.W., Eikenboom J.C.J., Rosendaal F.R.: High factor VIII antigen levels increase the risk of venous thrombosis but are not associated with polymorphisms in the von Willebrand factor and factor VIII gene. *British J of Haematol* 115:156-158, 2001.
- 92- Kamphuisen P.W., Eikenboom J.C.J., Vos H.L., Pablo R, Sturk A., Bertina, R.M., Rosendaal F.R.: Increased levels of factor VIII and fibrinogen in patients with venous thrombosis are not caused by acute phase reactions. *Thromb Haemost* 89. 680-683.1999.
- 93- Kamphuisen P.W., Lensen R., Houving-duistermaat J.J.: Heritability of elevated factor VIII antigen levels in factor V Leiden families with thrombophilia. *British J of Haematol* 2000, 109, 519-522, 2000.
- 94- Kamphuisen P.W., Rosendaal F.R., Eikenboom J.C.J.: Factor V antigen levels and venous thrombosis. Risk profile, interaction with factor V Leiden and relation with factor VIII antigen levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1382-6, 2000.
- 95- Kannell W.B., Wolf P.A., Castelli W.P., D'Agostino R.B.: Fibrinogen and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *JAMA* 258:1183-1186, 1987.
- 96- Kaufman R.J., Dorner A.J., Fass D.N.: von Willebrand factor elevates plasma factor VIII without induction of factor VIII messenger RNA in the liver. *The American Society of Hematology* 93, 193-197, 1999.
- 97- Kaufman R.J., Wasley L.C., Dorner A.J.: Synthesis, processing and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*. 263. 6352-62, 1988.
- 98- Kaufman R.J., Pitman D.D., Wasley L.C., Foster W.B., Amphlett, G.W. and Giles A.R.: Directed mutagenesis in the study of the requirements for factor VIII activity in vitro and in vivo. *Thromb Haemostas* 58:537, 1987.

- 99- Kawasaki T., Kaida T., Arnout J.: A new animal model of thrombophilia confirms that high plasma factor VIII levels are thrombogenic. *Thromb Haemost* 81, 306-311, 1999.
- 100- Kemahlı S.: Hemostaza yeni yaklaşım. Hücreye dayalı hemostaz mekanizması. *Tromboz Hemostaz ve Angiyoloji Kongre Kitabı*. s.207-210, 2002.
- 101- Kemball C.G., Edwards S.J., Sewerin K., Andersson L.O., Barrowcliffe T.W.: Factor VIII procoagulant protein interacts with phospholipid vesicles ura its 80kDa light chain. *Thromb Haemost* 60. 442, 1987.
- 102- Kerr C.B., Preston A.E., Barr A. Biggs R.: Further studies on the inheritance of factor VIII. *Brit. J. Haematol.* 12:212-33, 1966.
- 103- Kingsbury K.J.: Kelation of ABO blood groups to atherosclerosis. *Lancet* 1:199-203, 1971.
- 104- Koeleman B.P.C. van Rump D., Hamulyak K., Reitsma R.H., Bertina R.M.: Factor V Leiden. An additional risk factor for thrombosis in protein S deficient families. *Thrombosis and Haemostasis*. 74. 580-583, 1995.,
- 105- Kogan S., Gitschier J.: Mutations and a polymorphism in the factor VIII gene discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2092-96, 1990.
- 106- Kogan S.C, Dohert M. and Gitchier J.: An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseries by analysis of amplified DNA sequences. *New Eng. J. Med.* 317, 985-990, 1987.
- 107- Koster T, Blaan A.D., Briet E., Vanderbrouche J.R., Rosendaal F.R.: Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet* 345. 152-5, 1995

- 108- Koster T., Rosendaal F.R., de Ronde H.: Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C. Leiden Thrombophilia study. *Lancet* 342:1503-1506, 1993.
- 109- Kotake H., Oikawa S.: Primary hypertriglyceridemia: (Article in Japanese) *Nippon Rinscho*, 12:2782-2788, 1999.
- 110- Kraaijenhagen R.A., Anker P.S., Koopman M.M.W.: High plasma concentration of factor VIII c is a major risk for venous thromboembolism. *Thromb. Haemost* 83:5-9, 2000.
- 111- Kraus M., Noath M., Fickenscher K.: The PCAT-a sample screening assay for assessing the functionality of the protein C. Anticoagulant pathway. *Thromb. Res.* 79:217-222, 1995.
- 112- Kamphuisen P.W., Eikenborn J.C.J, Vos H.I., Blann A.D., Rosendaal F.R., Bertina R.M.: High levels of factor VIII antigen are an important risk factor of deep-vein thrombosis (Abstract) *Blood* 90. 398a, 1997.
- 113- Krishnan S., Kolbe H.V.J., Lepage P., Faur T., Bauerwald R., dela Salle H., Muller C., Bihoreau N., Paobantonacci P., Carolyn R., Meulien P., Pavirani A.: Thrombin cleavage analysis of a novel antithrombin factor variant. *Eur. J. Haem.* 199:637-644,1991.
- 114- Kürekçi A.E.: Çocukluk çağı trombozlarında FVIII düzeylerinin önemi, Tez, Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, ankara 2000.
- 115- Kyrle P.A., Minar E. Hirschl M.: High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. *The New England J of Medicine.* 343, 457-462, 2000.
- 116- Laffan M., Manning R.: The influence of factor VIII on measurement of activated protein C resistance. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 7:761-765, 1996.

- 117- Lalloz M.R.A., Mcvey J.H., Pattinson J.K.: Haemophilia A diagnosis by analysis of a hipervariable dinucleotide repeat within the factor VIII gene. *Lancet* 338, 207-11, 1991.
- 118- Lalloz M.R.A., Schwaab R., Mcvey J.H.: Haemophilia A diagnosis by simultaneous analysis of two variable dinucleotide tandem repeats within the factor VIII gene. *British J of Haematol* 86:804-809, 1994.
- 119- Legaz M.E., Schmer G., Counts R.B., Davie E.W.: Isolation and characterisation of human factor VIII (antihemophilic factor). *J. Biol. Chem.* 248:3946-3955, 1973.
- 120- Lensen R., Bertina R.M., Vandenbroucke J.P., Rosendaal F.R.: High factor VIII levels contribute to the thrombotic risk in families with factor V leiden. *British J of Haematol* 114:380-386, 2001.
- 121- Levinson B., Kenwick S., Gamel P., Fischer K. Gitschier J.: Evidence for a third transcript from the human factor VIII Gene. *Genomics.* 14. 585-589, 1992.
- 122- Levinson B., Kenwick S., Nakich D., Hammonds G., Gitschier J.: Transcribed gene in an intron of the Human Factor VIII Gene. *Genomics* 7:589-592, 1990.
- 123- Lollar P., Parker C.G.: Subunit structure of thrombin activated porcine factor VIII. *Biochemistry* 26:666, 1989.
- 124- Lowe G.D.O.: Hemostatic risk factors for arterial and venous trombosis. *Recent Advances in Blood Coagulation*, 7:69-96, 1997.
- 125- Mann K.G., Jenny K.J., Krishnaswamy S.: Cofactor Proteinc in the Assembly and Expression of Blood Clotting Enzyme Complexes. *Ann. Rev. Biochem.* 57:915-956, 1988.

- 126- Mannucci P.M., Boyer C., Tripodi A., Vianco-D'Aneglo S., Wolf M., Valsecchi C., D'Aneglo A., Meyer D., Larrieu M.J.: Multi-center comparison of five functional and two immunological assays for protein C. *Thrombosis and Haemostasis*. 57, 44-48, 1987.
- 127- Mansvelt E.F.G., Laffan M., McVey J.H., Tuddenham E.: Analysis of F VIII gene in individuals with plasma factor VIII: C levels and associated venous thrombosis. *Thromb Haemost* 80:561-5, 1998.
- 128- Marcucci R., Abbate R., Fedi S., Gori A.M., Brunelli T., Bruni V., Bucciantini S., Micheli S., Pepe Y., Prisco D., Gensini G.F.: Acquired activated protein C resistance in postmenopausal women is dependent on factor VIII: C levels. *Am J Clin pathol* 111:769-772, 1999.
- 129- Mathonnet F., de Mazancourt P., Deninger M.H.: Role of factor VIII on activated protein C resistance ratio in inflammatory disease. *Br. J. Haematol.* 95:423-425, 1996.
- 130- Meade T.W., North W.R.S., Chakrabarti R., Haines A.P., Stirling Y.: Population-based distributions of haemostatic variables. *British Medical Bulletin*. 33, 283-288, 1977.
- 131- Meade T.W., Cooper J.A., Stirling Y., Howarth D.J., Ruddock V., Miller G.J.: Factor VIII, ABO blood group and the incidence of ischaemic heart disease. *Br. J. Haematol* 88:601-607, 1994.
- 132- Meade T.W., Mellows S., Bozovic M., Miller G.J., Chkrabanti R.R., North W.R.S., Haines A.P., Stirling Y., Imeson J.D., Thompson S.G.: Haemostatic function and ischaemic heart disease; principal results of Nortwick Park Heart Study *Lancet* 2:533-537, 1986.
- 133- Meade T.W., North W.R.S., Chkrabarti R., Stirling Y., Haines A.P., Thompson S.G.: Haemostatic function and cardiovascular death: early results of a prospective study. *Lancet* 1. 1050-1054, 1980.

- 134- Mettinger K.L.: A study of haemostasis in ischemic cerebrovascular disease 1: abnormalities in factor VIII and antithrombin. *Thromb Res* 26:183-192, 1982.
- 135- Miletich, J.P., Prescott S.M., White R., Mayerus P.W., Bovill E.G.: Inherited predisposition to thrombosis. *Cell* 72:477, 1993.
- 136- Modelia J.H., Levene C., Papier Ch., Goldbourn U., Dreyfuss F., Oron D., Neugeld H., Riss E.: Blood groups, myocardial infarction and angina pectoris among 10.000 adults males. *N. Eng. J. Med.* 285:1348-1353, 1971.
- 137- Muntean W.E., Borkenstein M.H., Haas J.: Elevation of factor VIII coagulant activity over factor VIII coagulant antigen in diabetic children without vascular disease. a sign of activation of the factor VIII coagulant moiety during poor diabetes control. *Diabetes* 34, 140-144, 1985.
- 138- Mustafa S., Mannhalter C., Rintelen C., Kyrle P.A., Knöbl P., Lechner K., Pahinger I.: Clinical features of thrombophilia in families with gene defects in protein C or protein S combined with factor V leiden. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 9. 85-89, 1998.
- 139- Myreng Y., Aursens I., Hijermann I., Stormorken H., Sand T., Hellem A.: von Willebrand factor and cardiovascular risk. *Thromb Res.* 41:867-871, 1986.
- 140- Nurden A.T., Caen J.P.: The different glycoprotein abnormalities in thrombasthenic and Bernard-Soulier platelets. *Semin Hematol* 16. 274, 1979.
- 141- O'Brien KD., Échaid A.: The biology of the artery wall in atherogenesis. In the *medical Clinics of North America, Lipid disorders* Ed. Hunninghake, WB Saunders Company, Vol. 1-62, 1994.
- 142- O'Donnell J., Munford A.D., Manning R.A., Lafgan M.: Elevation of F VIII: C in venous thrombosis is persistent and independent of the acute phase response. *Thromb Haemost* 83. 10-3, 2000.

- 143- O'Donnell J., Laffan M.: Elevated plasma factor VIII levels-anovel risk factor for venous thromboembolism. Clin Lab. 47:1-6, 2001.
- 144- O'Donnell J., Tuddenham E.G.D., Manning R.: High prevalence of elevated factor VIII levels in patients referred for thrombophilia screening: Role of increased synthesis and relationship to the acute phase reaction. Thromb and Haemost 77, 825-828, 1997.
- 145- Onat T., Emerk K. (eds): Temel Biyokimya; Bölüm VI; Özben, T., İnal, M., Aykaç Tokar G., Tanyalçın, T.: Lipidler, Saray Medikal Yayıncılık San. ve Tic.Ltd.Şti., 2. Baskı, s.175-180, İstanbul, 1996.
- 146- Onat A. ve arkadaşları: Türkiye Kalp Raporu. Türk Kardiyoloji Derneği. Yenilik Basımev. İstanbul 2000.
- 147- Ortavik K.H., Magnus P., Reisner H., Berg K., Graham J.B., Nance W.: Factor VIII and factor IX in a twin population: Evidence for a major effect of ABO locus on factor VIII level. Am. J. Hum. Genet. 37:89-101, 1985.
- 148- Ostermann H., van de Loo J.: Factors of hemostatic system in diabetic patients. Haemostasis 16, 386-416, 1986.
- 149- Penick G.D., Deyanov I.I., Roberts H.R., Webster W.P.: Elevation of factor in hyper-coagulable states. Thrombosis and Diathermy Haemorrhagic Supplement, 20. 39-48, 1966.
- 150- Pitney W.R., Kirk R.L., Arnold B.J., Stenhouse N.S.: Plasma antihemophilic factor (factor VIII) concentrations in normal families. Br. J. Haematol 8:421-8, 1962.
- 151- Pittman D.D., Kaufman R.J.: Proteolytic requirements for thrombin activation of anti-hemophilic factor (Factor VIII). Pro Natl. Acad Sci. USA 82:2429, 1988.
- 152- Preston A.E., Barr A.: The plasma concentration of factor VIII in the normal population. Brit J. Haemat. 10. 238-45, 1964.

- 153- Reistma P.H., Poort S.R., Bernardi F., Gandrille S., Long GL, Sala N., Cooper D.N.: Protein C Deficiency: A Database of Mutations. *Thromb. Haemos* 69 (1) 77-84, 1993.
- 154- Richards S.M., Olson T., Keyes L.D.: Quantitative and functional assays compared for determination of zymogen and activated human protein C. *Clin Chem.*, 11:1892-1896, 1990.
- 155- Rick M.E., Hoyer L.W.: Thrombin activation of factor VIII. *Br. J. Haematol.* 38. 107-119, 1978.
- 156- Roelse J.C., Koopman M.M.W., Büller H.R., Cate J.W.T.: Absence of mutations at the activated protein C cleavage sites of factor VIII in the 125 patients with venous thrombosis. *Brit J of Haem* 92, 740-743, 1996.
- 157- Rosendaal F.R.: High levels of factor VIII and venous thrombosis. *Thromb Haemos* 83. 12, 2000.
- 158- Rosendaal F.R.: Factor VIII and coronary heart disease. *Eur. J. Epidemiol.* 8:71-5, 1992.
- 159- Rosendaal F.R., Koster T., Vandenbraucke J.P., Reitsma P.H.: High risk of thrombosis in Patients Homoz.gous for factor V-Leiden (Activated protein C resistance). *Blood* 85:1504-1508, 1995.
- 160- Rosendaal F.R., Vrekamp I., Smit C., Brocker-Vriends H.J.T., Van Dijke H. Vandenbroucke J.P., Hermans J., Surmeijer T.P.P., Bredius A.: Mortality and causes of death in Dutch haemophiliacs 1973-86. *British Journal of Haematology* 71. 71-76, 1989.
- 161- Ross R.: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, vol 362:801-809, 1993.

- 162- Rumley A., Lowe G.D.O., Sweetnam P.M., Yarnel J.W.G., Ford R.P.: Factor VIII, von Willebrand factor and the risk of major ischemic hearth disease in the Caerphilly hearth study. *British J of Haematol* 105, 110-116, 1999.
- 163- Sala N., Foncuberta J., Rutland MLL.: New Biological Concepts on Coagulation Inhibitors. *Intensive Care Med* 19:53-57, 1993.
- 164- Salomon O., Steinberg D.M., Zivelis A., Gitel S., Dardik R., Rosenberg N., Berliner S., Inhal A., Many A., Lubetsky A., Varon D., Martinavitz U., Selingsohn U.: Single and combined prothrombotic factors in patients with idiopathic venous thromboembolism: Prevalence and risk assessment. *Arteriosclerosis. Thrombosis and Vascular Biology*. 19, 511-518, 1999.
- 165- Schambeck C.M., Hinney K., Haubitz I.: Familial clustering of high factor VIII levels in patients with venous thromboembolism. *Arterioscler thromb vasc biol*. 2001, 21, 289-292, 2001.
- 166- Schwartz C.J., Valente A.J., Kelly J.L., Sprague E.A., Edwards E.H.: Thrombosis and the development of atherosclerosis. Rokitanski revisited. *Semin Thromb Hemost* 14:189, 1988.
- 167- Shetty S., Chosh K., Pathare A., Colah R., Badakare S., Mohanty D.: Factor VIII and IX gene polimorphisms and carrier analysis in Indian population. *Am J Hematol*; 54(4):271-5, 1997.
- 168- Soberano M.E., Clance D., Zucker M.B.: Binding of thrombin-activated human factor VIII of platelets. *Br. J. Haematol* 64. 571-585, 1986.
- 169- Solum, N.O., Stomorten H.: Influence of fibrinogen in the aggregation of washed human blood platelets induced by ADP, trombin, collagen and adrealine. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory investigation*. 17:170-182, 1975.

- 170- Souto J.C., Almasy L., Muniz-Diaz E.: Functional effects of the ABO locus polymorphism on plasma levels of von Willebrand factor, factor VIII, and activated partial thromboplastin time. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20, 2024-2028, 2000.
- 171- Sönmez H., Süer S., Ulutin T., Kökoğlu E., Üçışık N.: The relationship of various factors in pathogenesis of atherosclerosis, *Clinical and Applied Thrombosis/Haemostasis*, 4:105-110, 1998.
- 172- Stenflo J.: Structure and Function of Protein C. *Sem. Thromb. Haemostas.* 2:109-121, 1984.
- 173- Sugrue D.D., Tragner I., Thomson G.R., Vere V.J., Dimeson J., Stirling Y., Meade T.W.: Coronary artery disease and haemostatic variables in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Br. Heart J.* 53:265-8, 1985.
- 174- Svensson P.J., Dahlbäck B.: Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N. Eng. J. Med.* 330:517-522, 1994.
- 175- Tabernero M.D., Tomas J.F., Alberca I., Orgao A., Barrasca A.L. Vicente V.: Incidence and clinical characteristics of hereditary disorders associated with venous thrombosis. *Am. J. Hematol.* 36:249, 1991.
- 176- Teunonenbroek A., Peters M, Sturck A., Borm J.J.J., Brederveld CC.: Protein C Activity and Antigen Levels in Childhood. *Eur. J. Pediatr* 149:774-778 (1990).
- 177- Thomson S.G., Kienast J., Pyke S.D.M.: Haemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *New England Journal of Medicine.* 332-635-641, 1995.
- 178- Tollefson D.M., Mayerus P.W., Blank M.K.: Heparin cofactor II. *J. Biol Chem.* 257-2162, 1981.

- 179- Toole J.J., Knopf J.L., Wozney J.M., Sulzman L.A., Buecker J.L., Pittman D.D., Kaufman R.J., Brown E., Schomaker C., Orr E.C., Amphlett G.W., Foster B., Coe M.L., Knutson G.J.: Molecular cloning of c DNA encoding for human antihemophilic factor. *Nature*. 312:342-347, 1984.
- 180- Tosetto A., Rodeghiero F., Martinelli I., De Stefrino V., Hissiaaglia E., Chiusolo P., Mannucci P.M.: Additional genetic risk factors for venous thromboembolism in carriers of factor V Leiden mutation. *British Journal of Haematology*. 103, 871-876, 1998.
- 181- Ulutin O.N., Becit N., Aktuğlu G.: Synthesis of factor VIII like activity in leucocyte cultures obtained from normal health donors and hodgkins' cases. *New Ist. Cont. To Clin. Sci.* 10:139-141, 1972.
- 182- Ulutin O.N.: Atherosclerosis and Hemostasis, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 12:2-10, 1986.
- 183- Uras F.: K vitaminine bağlı proteinler (Gla proteinleri) Tromboz Hemostaz ve Angiyoloji Kongre Kitabı. s.63, 2000.
- 184- Van der Meer, J.F.M., Koster T., Vanderbroucke J.P., Briet E., Rosedaal F.R.: The Leiden thrombophilia study (LETS). *Thromb Haemost* 78:631-635, 1997.
- 185- van Ost B.A., Veldeluyzen B.F.E., van Houwelingen H.C., Timmermans A.P.M., Sixma, J.J.: Tests for platelet changes, acute phase reactants and serum lipids in diabetes mellitus and peripheral vascular disease. *Thromb. Haemostasis* 48:289-293, 1982.
- 186- Vigano S., Mannucci P.M., D'Angelo A., Gelfi C., Gensini G.F., Rostrigno C., Neri Serneri G.G.: Protein C antigen is not an acute phase reactant and is often high in ischemic heart disease and diabetes. *Throm. Haemostasis* 52. 263-266, 1984.

- 187- Wahlberg T.B., Blombäck M., Magnusson D.: Influence of sex, blood group, secretor character, smoking habits, acetylsalicylic acid, oral contraceptives, fasting and general health state on blood coagulation variables in randomly selected young adults. *Haemostasis*. 14:312-9, 1984.
- 188- Wahlberg T.B., Blombäck M.: Overmark I Blood coagulation studies in 45 patients with ischemic cerebrovascular disease and 44 patients with venous thromboembolic disease. *Acta. Chir Scand*. 152:347-349, 1980.
- 189- Wahlberg T.B., Savidge G.F., Blombäck M., Weichel B.: Influence of age and blood groups on 15 blood coagulation laboratory variables in a reference material composed of 80 blood donors *Vox Sang*. 39:301-308, 1980.
- 190- Walker F.J., Chavin S.I., Fay P.J.: Inactivation of factor VIII by activated protein C and protein S. *Arc Biochem Biophys* 252:322, 1987.
- 191- Weiss H.J., Hoyer L.W.: von Willebrand factor. Dissociation from antihemophilic factor procoagulant activity. *Science*: 182-1149-1151, 1973.
- 192- Weiss H.J., Kohwa, S.: Molecular forms of antihemophilic globulins in plasma, cryoprecipitate and after thrombin activation. *Br. J. Hematol* 18. 89-100, 1970.
- 193- Vehar G.A., Keyt B., Eaton D.: Structure of human factor VIII. *Nature* 312:337-42, 1984.
- 194- Weksler B.B., Marcus A.S., Jaffe E.A.: Synthesis of prostaglandin I<sub>2</sub> (prostacyclin) by a cultured human and bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci. USA* 74. 3922-3926, 1977.
- 195- Wihlmsen L, Svardsudd K, Korsan-Bengtson K.: Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. *New England Journal of Medicine*, 311. 501-505, 1984.

- 196- Wolfgang E.M., Martin, H.B., Joseph H.: Elevation of factor VIII coagulant antigen in diabetic children without vascular disease. *Diabetes*. 439:140-144, 1985.
- 197- Wood W.J., Capon D.J., Simonsen C.C.: Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clone. *Nature* 312:330-335, 1984.
- 198- Yardımcı, T., Yaman, A., Ulutin, O.N.: The characterization of platelet GGT and its relation in the cases of atherosclerosis, *Clinical and Applied Thrombosis/ Haemostasis*, 1:103-113, 1995.
- 199- Yarnell J.W.G., Baker I.A., Sweetnam P.M., Bainton D., O'Brien J.R., Whitehead R.J., Elwood P.C.: Fibrinogen viscosity and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease: the caerphilly and speedweel Collaborative Heart Disease Studies. *Circulation*. 83:836-844, 1991.
- 200- Yılmaz H., İsbir T.: Miyokard infarktüsü geçirmiş hasta grubunda risk faktörü olarak kolesterol ester transfer protein (CETP) gen lokusundaki kritik polimorfizmlerin incelenmesi. *Tez, İstanbul* 200
- 201- Zhang Li., Castellino FJ.: The Contributions of Individual  $\gamma$ -Carboxyglutamic acid Residues in the Calcium-Dependent Binding of Recombinant Human Protein C to Acidic Phospholipid Vesicles. *The J. Bio. Chem* 268 (16):1240-12045, 1993.
- 202- Zöller B., Bernsdotter A., Garcia de Frutos P. Dahlbäck B.: Resistance to activated protein C as an additional genetic risk factor in hereditary deficiency of protein S. *Blood*. 85. 3518-23, 1995.

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Doktora öğrencisi Nezaket EREN'in, çalışması jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalı Doktora tezi olarak uygun görülmüştür.

İMZA

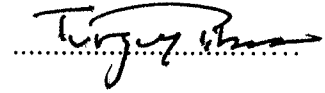
Tez Danışmanı : Prof.Dr.Nesrin EMEKLİ  
Üniversitesi : Marmara



Üye : Prof.Dr.Turay YARDIMCI  
Üniversitesi : Marmara



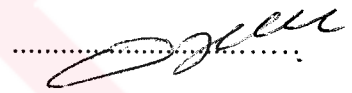
Üye : Prof.Dr.Turgay İSBİR  
Üniversitesi : İstanbul



Üye : Prof.Dr.Emine KÖKOĞLU  
Üniversitesi : İstanbul

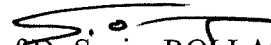


Üye : Prof.Dr.Ayşen YARAT  
Üniversitesi : Marmara



ONAY

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 12... / ..3.. / 2003 tarih ve ..2... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

  
Prof.Dr.Sevim ROLLAS  
Müdür