



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KOYUN VE KUZU AKCİĞERİNDEN İZOLE EDİLEN DOKU
FAKTÖRÜ AKTİVİTESİNDE LİPİTLERİN ETKİSİ**

ASLIHAN TENKEKİGİL

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof.Dr.NESRİN EMEKLİ

İstanbul, 2017

TEŞEKKÜR

Lisansüstü öğrenimim boyunca her türlü yardım ve desteği sağlayan, büyük bir sabır ve titizlikle bilgi ve tecrübelerini aktararak gelişmemi sağlayan, inandığım ve güvendiğim değerli danışman hocam İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Nesrin EMEKLİ'ye, tez çalışmam sırasında yardımını gördüğüm Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğr.Gör.Yrd.Doç.Dr. Turan DEMİRCAN'a

Tez çalışmamın yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğr.Gör. Halil ŞENOL ve eşi Arş.Gör. Ayşe Merve ŞENOL'a

Tez çalışmam esnasında ilgisini ve yardımını gördüğüm sevgili arkadaşım ve değerli meslektaşım İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya doktora öğrencisi Ramila HAJIYEVA'ya

Bugünlere gelmemde, hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, fedakarlıkları ve bana duydukları güven ile yaşamımın her döneminde yanımda olan, bana cesaret veren ve beni asla yalnız bırakmayan aileme ve Mehmet AE TEKCANLI amcama

Sonsuz teşekkür ederim.

TEZ ONAYI FORMU	i
BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vi
TABLO ALTLARI	viii
ŞEKİL ALTLARI	ix
RESİM ALTLARI	x
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Doku Faktörü ve Tarihçesi	6
4.2. Hemostatik Sistem ve Doku Faktörü.....	7
4.2.1. Tromboplastin Jenerasyon Testi (TGT)	11
4.3. Doku Faktörünün Moleküler Yapısı.....	12
4.4. Doku Faktörünün Genetiği	13
4.5. Doku Faktörünün Bulunduğu Yerler	13
4.6. Doku Faktörü İnhibitörü.....	15
4.7. Doku Faktörünün Trombofilideki Rolü	15
4.8. Doku Faktörünün Koroner Arter Hastalığındaki Rolü.....	16
4.9. Doku Faktörü İnflamasyon ve Sitokin İlişkisi	18
4.10. Doku Faktörü Sepsis ve İnflamasyon İlişkisi.....	18
4.11. Doku Faktörünün Sinyal İletimindeki Rolü	21
4.12. Doku Faktörünün Kanserdeki Rolü.....	21
4.13. Pıhtılaşma Yolaklarında Lipitler	21
4.13.1. Fosfolipidler.....	22
4.13.2. Fosfolipidlerin Fonksiyonları ve Pıhtılaşmadaki Rollerini.....	22
4.14. Protrombin Zamanı Testi (PTZ) ve Önemi	23
4.15. Lipid ve Fosfolipid İnceleme Yöntemleri	25

5. MATERYAL ve METOD	29
5.1. Doku Faktörünün Elde Edilmesi ve Aktivite Tayini	29
5.2. Liyofilizasyon.....	32
5.3. Lipid Ekstraksiyonu	33
5.4. İnce Tabaka Kromatografisi	33
5.5. Fosfor Tayini	35
6. BULGULAR	38
7.TARTIŞMA ve SONUÇ	45
8.KAYNAKLAR	51
9.ETİK KURUL ONAYI	64
10.ÖZGEÇMİŞ	67

KISALTMALAR

aFL	:Antifosfolipid antikorlar
AHG	:Antihemofilik globulin
aPTT	:Aktive parsiyel tromboplastin zamanı testi
CRP	:C-Reaktif Protein
DF	:Doku faktörü (Tissue Factor (TF), Faktör III (FIII), CD 142)
EPCR	:Endotel hücre protein C reseptörü
FSF	:Fibrin Stabilize Edici Faktör
FI	:Faktör I (fibrinojen)
FII	:Faktör II (protrombin)
FIII	:Faktör III (doku faktörü)
FIV	:Faktör IV (kalsiyum)
FV	:Faktör V(proakselerin,labil faktör,plazma akseleratör globulin)
FVII	:Faktör VII (prokonvertin, stabil saktör, otoprotrombin I)
FVIII	:Faktör VIII (antihemofilik globulin, antihemofilik faktör A)
FIX	:Faktör IX (christmas faktör, antihemofilik faktör B, otoprotrombin II)
FX	:Faktör X (Stuart-Power faktör, otoprotrombin III)
FXI	:Faktör XI (plazma tromboplastin antesedan (PTA), antihemofilik faktör C)
FXII	:Faktör XII (Hageman faktör)
FXIII	:Faktör XIII (fibrin stabilize edici faktör (FSF), Laki Lorand faktör, plazma transglutaminaz)
HMWK	:Yüksek molekül ağırlıklı kininojen, Williams faktör, Fitzgerald faktör, Washington faktör
hrTF	:İnsan rekombinant doku faktörü
INR	:Uluslararası normalleştirilmiş oran
ISI	:Uluslararası duyarlık indeksi
LDL	:Düşük yoğunluklu lipoprotein
PAF	:Platelet aktive edici faktör
PAI-1	:Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1
PAR	:Proteraz aktive edici reseptörler

PC	:Fosfatidilkolin
PE	:Fosfatidiletanolamin
PF3	:Platelet faktör 3
PKC	:Protein kinaz C
PS	:Fosfatidilserin
PTZ	:Protrombin zamanı testi (PZ, PT, PTZ)
PZİ	:Protrombin zamanı indeksi
PZr	:Protrombin zamanı oranı
rTF	:Rekombinant tromboplastin
SM	:Sfingomiyelin
sTF	:Tromboplastinin hücre dışı alanı
TF	:Tissue factor
TFPI	:Doku faktörü yolu inhibitörü
TGT	:Tromboplastin jenerasyon testi
TLC	:İnce tabaka kromatografisi
TNF- α	:Tümör Nekroz Faktör-Alfa
WHO	:Dünya sağlık örgütü
VEGF	:Vasküler endotelial büyüme faktörü
vWF	:Von Willebrand Faktör
β^2 GP1	:Beta-2 glikoprotein-1

TABLO ALTLARI

Tablo 4.2. Pıhtılaşma faktörlerinin (proteinlerinin) bazı özellikleri.

Tablo 4.5. Çeşitli dokularda doku faktörü ekspresyonu.

Tablo 4.8. Bazı hücrelerde TF sentezini aktifleşitiren ve inhibe eden moleküller.

Tablo 4.14. Protrombin zamanlarının değişik şekillerde ifadesi.

Tablo 5.1. Protrombin zamanı testi 37 °C lik su banyosunda aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 6.1 TF aktivitesi değerleri.

Tablo 6.2. Total lipit miktarları.

Tablo 6.3. Gravimetrik olarak bulunan total fosfolipit miktarları.

Tablo 6.4. Kuzu akciğerinden elde edilen doku tromboplastininin major fosfolipit gruplarına ait (PE, PC, PS, SM) fosfor konsantrasyonları, miktarları ve % değerleri.

ŞEKİL ALTLARI

Şekil 4.2. Koagülasyon kaskadında fosfolipidlerin rol oynadığı basamaklar.

Şekil 4.2.1 Koagülasyon sistemi ve klinikte sıklıkla kullanılan pıhtılaşma testleri.

Şekil 4.3. Membran yüzeyinde düzenlenmiş FVIIa ve TF'nin hücre dışı alanının (sTF) kristal yapıları.

Şekil 4.8. Doku faktörünün aterosklerotik plak içinde görünüşü (52).

Şekil 4.13.1. Fosfolipidlerin sınıflandırılması.

Şekil 4.14. Protrombin zamanı testinde ekstrinsek sistemde gerçekleşen reaksiyonlar.

Şekil 4.15. TLC'de maddelerin ayrılması.

Şekil 6.1. Ölçümler sonucu elde edilen fosfor standart grafiğinin bir doğru haline getirilmiş hali.

Şekil 6.2. Kuzu akciğerinden elde edilen doku tromboplastininin major fosfolipit gruplarına ait (PE, PC, PS, SM) fosfor miktarlarının değişimi (mg).

Şekil 6.3. Kuzu akciğerinden elde edilen doku tromboplastininin major fosfolipit gruplarına ait (PE, PC, PS, SM) fosfor miktarlarının değişimi (%).

RESİM ALTLARI

Resim 4.15. Ayırma hunisinde ayrılan fazlar.

Resim 6.1. Tromboplastin ekstraktı.

Resim 6.2. Saflaştırılmış doku tromboplastini.

Resim 6.3. Liyofilize edilen tromboplastin ekstraktları.

Resim 6.4. TLC ile ayrılan fosfolipid fraksiyonları.



1. ÖZET

KOYUN VE KUZU AKCİĞERİNDEN İZOLE EDİLEN DOKU FAKTÖRÜ AKTİVİTESİNDE LİPİTLERİN ETKİSİ

Tromboplastin, Faktör III ve CD 142 adlarıyla da bilinen doku faktörü (DF) pıhtılaşma sistemini başlatmaktan sorumlu bir membran glikoproteinidir. Molekülün yapısında pıhtılaşma sisteminin aktivasyonunu başlatan fosfolipidler önem taşır. DF geçmişten günümüze pıhtılaşma sisteminin takibinde önemli bir araç olarak kullanılmaktadır. İlerleyen teknolojiyle DF'nin birçok hastalığın patogenezinde de etkin olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada koyun ve kuzu akciğerinden izole edilen DF'nin aktivitesinde lipitlerin etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bunun için DF ekstraktı ve saflaştırılmış DF hazırlandı. Lipidler ekstrakte edildi. Ekstraksiyonla ayrılan lipid ve protein kısımlarının, hazırlanan DF ekstraktının ve saflaştırılmış DF'nin aktivitesi protrombin zamanı testi ile tayin edildi. DF ekstraktı daha sonra kullanılmak üzere liyofilize edildi. Bu ekstraksiyon kullanılarak gravimetrik olarak toplam lipid tayini yapıldı. İnce tabaka kromatografisi (TLC) ile fosfolipidler belirlendi ve fosfolipid standartları kullanılarak major fosfolipidlerden fosfatidilkolin (PC), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilserin (PS) ve sfingomiyelinin (SM) yerleri tesbit edildi. DF ekstraktındaki fosfolipid miktarlarını belirlemek için her bir örneğe fosfor tayini yapıldı.

Kuzu akciğerinden elde edilen DF ekstraktı koyunununkinden daha aktif bulunmuştur. DF'nin ekstraksiyonla ayrılan lipid kısmında aktivite görülürken, protein kısmında görülmemiştir. İkisi bir aradayken en yüksek aktiviteye sahip oldukları görülmüştür. Saflaştırma işlemi aktiviteyi düşürmüştür. DF'de fosfolipidlerin sıralaması PE>PC>PS>SM şeklinde tesbit edilmiştir.

Bu çalışmanın sonuçları kendi ürettiğimiz DF'nin standardize edilerek protrombin zamanı testinde kullanılabilceğini göstermiştir ve bulgularımız tromboplastin üretiminde literatüre katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Doku faktörü, protrombin zamanı, PC, PE, PS, SM, TLC

2. ABSTRACT

EFFECT OF LIPIDS IN TISSUE FACTOR ACTIVITY ISOLATED FROM SHEEP AND LAMB LUNG

The Tissue factor (TF), also known as thromboplastin, Factor III and CD 142 is a membrane glycoprotein responsible for initiating the clotting system. Phospholipids that activate the activation of the coagulation system in the molecular structure are important. TF is used has always been an important tool in the monitoring of the coagulation system. In parallel with the advancing technology, it is known that TF is also effective in the pathogenesis of many diseases.

In this study, it was aimed to investigate the effect of lipids on the activity of TF isolated from sheep and lamb lung. For this, TF extract and purified TF were prepared and lipids were extracted. The activity of lipid and protein fractions separated by extraction, the TF extract prepared and the purified TF were determined by prothrombin time test. The TF extract was lyophilized for later use. Using this extraction, total lipid was determined by gravimetric method. Phospholipids were identified by thin layer chromatography (TLC) and major phospholipids such as phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS) and sphingomyelin (SM) were determined by using phospholipid standards. To determine the amounts of phospholipids in the TF extract, phosphors assignment have been done spectrophotometrically for each sample.

The TF extract from lamb lung found more active than sheep lung. The TF activity was observed in the lipid fraction separated by extraction, but not in the protein fraction. A two together, it was found to have the highest activity. Purification decreased activity. Sequence of phospholipids in the TF obtained from lamb lung was determined as PE> PC> PS> SM.

The results of this study show that the TF we produce can be standardized and used in the prothrombin time test and our findings will contribute to the literature in the production of thromboplastin.

Key words: tissue factor, prothrombin time, PC, PE, PS, SM, TLC

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Sağlıklı yaşam için normal çalışan bir koagülasyon sistemi gereklidir. Bu yol kanın dışarıya akmasını önleyen bir savunma sistemi olarak da kabul edilebilir. Günümüzde TF'nin koagülasyon sisteminin her basamağında etkili olduğu da kabul edilmektedir (1,2).

Kan pıhtılaşması ya da koagülasyon, doku hasarına hızlı bir yanıttır (3). Koagülasyon damar yaralanması sonucunda kanamayı durdurmak için fibrin ağının oluşumunu düzenleyen plazmadaki kompleks reaksiyon kaskadıdır ve ana başlatıcısı olan TF hemostaz, tromboz, anjiyogenez, kanser ve bağışıklıkta hayati rol oynar. Koagülasyon reaksiyonların sadece küçük bir bölümü kan plazmasında ortaya çıkar. Tüm ana süreçler endotel hücreleri, hasar görmüş subendotelyum veya bu hücreler tarafından dökülen mikroparçacıklar ile aktif trombositlerin membranlarında lokalize iki boyutlu tepkimelerdir. Trombin ve kollajen gibi güçlü ajanlar ile trombosit uyarılması, fosfatidilserinin dışa doğru yönelmesine yol açar ve bu da koagülasyon faktörlerinin etkin bir şekilde bağlanmasını sağlar. Serin proteaz intrinsek sistemin enzimatik komplekslerinde kritik rol oynar. Proteinlerin gama-karboksiglutamik asit açısından zengin bölgeleri ile negatif yüklü fosfolipidlerin bağlanmasına çoğunlukla kalsiyum köprüleri aracılık eder. Pıhtılaşmanın artışı ile birlikte bu bağlanma, plazma inhibitörlerinden koagülasyon faktörlerinin korunması için önemlidir. Pıhtılaşma faktörlerinin fosfatidilserin içeren membranlara bağlanması tüm zara bağlı reaksiyonların ilk adımıdır (4-7).

Hemostatik sistemi başlatmaktan sorumlu bir membran glikoproteini olan TF, bir apoprotein kısmı ve parsiyal tromboplastin aktivitesinin ekspresyonu için gerekli olan bir fosfolipid kısmından oluşur. Hücre hasarı sonrasında, TF'nin fosfolipidleri kana sızar ve Ca^{+2} varlığında Faktör VII (FVII) veya Faktör VIIa (FVIIa) ile bir kompleks oluşturur. Bu kompleks direk olarak ekstrinsek yolda Faktör X (FX)'u ve ayrıca intrinsek yolda Faktör IX (FIX)'u aktifleştirir (8-10) Fosfolipidlerin ve kalsiyum iyonlarının bulunması halinde pıhtılaşma etkindir (11).

TF, kan damarlarının adventisya tabakasından ve epidermal, stromal, glial hücreleri tarafından sentezlenir (5,12,13). Ayrıca normalde TF aktivitesine sahip olmayan lökositlerin damar ortamında yada kollajene maruz kaldığında TF

sentezleyebildiği gösterilmiştir (14). Yaralanma, damar yırtığı sonucu kanamalarda damar dışındaki TF ile temas olduğunda pıhtılaşma süreci başlatılır. Dolaşımdaki FVII, TF'ne bağlandığında, hızlı bir şekilde FVIIa'ya dönüştürülür (15). FVIIa / TF kompleksi FIX ve FX'u aktifleştirebilmektedir (16).

FVIIa'nın TF'ne bağlanması preolitik aktivitesini neredeyse üç kat yükseltir (17,18). Bununla birlikte IXa veya Xa faktörlerinin kofaktörlerine farklı bağlanması, FVIIa'nın TF'ne bağlanması tamamıyla kalsiyum gerektirmez ve ilişkinin afinitesi aniyonik fosfolipidin varlığıyla yükselir. FVIIa / TF tarafından FIX ya da X'un kırılması anyonik fosfolipid tarafından arttırılır. Bu etki substratın arttırılmış bağlanmasından çok VIIa / TF kompleksinin katalitik verimliliği üzerinde fosfolipidin etkisinden kaynaklanır (19-21).

Kumarin gibi oral vitamin K antagonistleri ile başarılı bir antikoagulan tedavisi, kanama riskini azaltan etkili bir antikoagulasyon için hastanın protrombin zamanı testinin (PTZ) dikkatle izlenmesi gerekir. PTZ pıhtılaşma testi; karaciğer yetmezliği, sepsis ve diğer hastalıklara bağlı koagülatörlerin değerlendirilmesinde ve ameliyat öncesi kanama riskinin tayininde plazma pıhtılaşma sistemlerinin genel olarak araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. PTZ testlerinde kullanılan TF reaktifi, pıhtılaşmayı tetikleyen TF içerir. Orjinal olarak hayvan ya da insan kaynaklı ekstraktlar ham dokudan elde edilir (5,22).

Son zamanlarda rekombinant teknolojiyle fosfolipid vezükülleri içeren tromboplastinler de üretilmeye başlanmıştır. İnsan doku faktörü içeren yeni nesil rekombinant tromboplastinleri (rTF) optimal pıhtılaştırma aktivitesi için fosfolipid vezükülleri içine dahil edilen integral membran proteinleridir. rTF'ler, FVII seviyelerine aşırı duyarlı olmasından dolayı eleştirilmektedir. FVII'nin plazma yarı ömrü kısadır, bu yüzden özellikle oral antikoagulan tedavinin başlangıcında FVII seviyelerinde dalgalanma olur (22).

TF'lerin yanıtları ve oral antikoagulanların sebep olduğu koagulasyon yetersizliklerinin yanıtları değişkendir. Bu düzeltilmezse oral antikoagulan dozu kabul edilemez farklılıklara yol açabilir. TF duyarlılık farklılıklarını telafi etmek için bir kalibrasyon sistemi (Uluslararası Duyarlılığı İndeksi (ISI)) geliştirilmiştir (23). Üretici firmalar, ürettiği TF'yi dünya sağlık örgütüne (WHO) gönderirler ve oradan bir ISI değeri alırlar. Böylece hastaların değişik laboratuarlarda ölçülen protrombin

zamanları standartize edilir. WHO'nun standardize ettiği bir TF kullanılırsa laboratuvarlar arası veya ülkeler arası farklılıklar ortadan kalkacaktır (22-24).

Pıhtılaşma yetersizliklerinin ve oral antikoagüan tedavisinin takibi için PTZ testinde kullanılan tromboplastin reaktiflerinin aktif maddesi TF'dir. TF reaktifleri beyin, akciğer ya da plasenta ekstraterinden saflaştırılan kompleks karışımlardır. Son zamanlarda rekombinant teknolojiyle fosfolipid vezükülleri içeren TF'ler de üretilmeye başlanmıştır. TF'ler, K vitaminine bağımlı pıhtılaşma faktörlerinin seviyelerindeki azalmaya karşı çok duyarlıdır. Üretilen TF'lerin içeriğindeki farklılıklar protrombin zamanı testinin sonuçlarını etkilemektedir. Oral antikoagüan tedavinin izlenmesinde kullanılan Uluslararası Duyarlılık İndeksi (ISI) ve Uluslararası Normalleştirilmiş Oran (INR) bu durumu telafi etmiştir. INR sistemi genellikle sepsis veya karaciğer yetmezliği olan hastaların pıhtılaşma bozukluklarının izlenmesinde kullanılır (22).

Hayati organları tehdit eden arteriyel tromboembolizmin başlıca sorumlusu olarak kabul edilen koagülasyon inflamasyon olaylarında, ekstresek ve intrinsek koagülasyon mekanizmasının tetikleyicisi durumunda olan TF önemli bir yer tutar (25,26).

Emekli ve Ulutin (27) tavşan beyninden elde ettikleri TF ile oluşturdukları yaygın damar içi pıhtılaşmasında Protein C'nin etkisini gösterdiler.

Beyin gibi TF yönünden zengin dokulardan elde edilen TF'nin çok az miktarı bile yaygın damar içi pıhtılaşması için yeterli olduğundan geçmiş yıllarda TF'nin kanda bulunduğu düşünülmezdi. İn vitro çalışmalarda TF Quick yöntemiyle PTZ ölçümünde kullanıldığı için ekstresek adı ile anılmıştır. Günümüzde TF'nin hem ekstresek hem de intrinsek pıhtılaşmayı başlattığı ve kanda ölçülebilen miktarlarda bulunduğu kanıtlanmıştır (28).

TF ile ilgili çalışmalar 1800'lü yıllarda başlamış günümüzde ise, bu membran proteinin pek çok metabolik faaliyet içinde olduğu bildirilmiştir (27).

Bu çalışmada amacımız laboratuvarda kullanımı geçmişten günümüze devam eden, çeşitli organlarda bulunan ve farklı fonksiyonları olan DF'nin etkin maddesi olan lipidlerin aktivitedeki değişimlerinin ve fosfolipid içeriğinin görsel olarak belirlenmesidir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Doku Faktörü ve Tarihçesi

TF koagülasyon kaskadının ana başlatıcısıdır ve trombositler, lökositler, fibroblastlar ve endotel hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücrelerin yüzeyinde ve damar duvarını çevreleyen yumuşak kas hücrelerinde bulunan 47-kDa'lık transmembran bir glikoproteindir. TF bir hasara veya hücre dışı uyarılara bir yanıttır. Hücre dışı bölgesi, molekülün %80'nini oluşturan FVII / FVIIa bağlanma yerine ve immunoglobulin benzeri beta sandviç katlama yerine sahiptir. TF kan pıhtılaşmasına ek olarak, iltihap, embriyonik gelişme, anjiyojenez, tümör metastazı, hücre yapışması/göçü ve doğal bağışıklık dahil bir çok olayda rol oynar (7).

Endopeptidaz ve eksopeptidaz aktivitesi olan TF organizmadaki tüm dokulardan elde edilebilir. Pıhtılaşma mekanizmasında FVII'ye bağlanarak onu aktif şekli olan FVIIa'ya dönüştürür. Moleküler yapısının dokudan dokuya farklılık gösterdiği düşünülmektedir. Beyin, akciğer ve plasenta TF açısından zengin olan organlar arasındadır. Tükürükteki TF ağızdaki yaraların ve kanamaların çabuk geçmesi için önemlidir. Quick ve iki safhalı protrombin zamanı ölçüm yönteminde beyin ve akciğerden elde edilen TF'ler kullanılır.

Günümüzde kanıta dayalı olarak kabul edilen pıhtılaşma sisteminin temelleri 1892 yılında Schmidt, 1905 yılında Morawitz tarafından atılmıştır. O tarihlerde pıhtılaşma ile ilgili bilgiler aşağıda özetlendiği gibidir.

Doku Faktörü



Trombin



1900'lü yılları takip eden uzun bir süre pıhtılaşma mekanizmasındaki gelişmeler TF yani ekstrinsek sistem merkezli olmuştur (29).

19. yüzyılda Paul Morawitz kan koagülasyonu ile ilgili ilk teoriyi yayınlamıştır. Morawitz'e göre koagülasyon dört faktör arasındaki etkileşim ile oluşur. Bu faktörlerden üç tanesi plazmada bulunan protrombin, kalsiyum ve fibrinojendir. Dördüncü faktör olan trombokinaz (bugün tromboplastin veya tissue factor olarak bilinir) ise trombosit ve lökositlerde bulunur. Kan yabancı bir doku veya yüzey ile temas ederse trombosit ve lökositler agregasyon oluşturur ve TF salını gerçekleşir. TF ile protrombin etkileşimi kalsiyumun da ortamda bulunması ile trombin oluşumuna yol açar. Trombin ise fibrinojenin fibrine dönüşümünü sağlar. Hasarlanmış doku hücreleri TF'nin ikinci kaynağıdır ve yara yerinde kanın daha hızlı pıhtılaşmasını sağlar (30-32).

Yüzyılın ortalarında yeni bir faktör keşfedildi. Pıhtılaşma mekanizmasının başlangıcının iki yol ile meydana geldiği fikri ortaya atıldı. Birinci yol Morawitz'in TF aracılıklı yolu olup doku hasarı sonrası organizmanın kanamaya karşı kendini savunması, ikinci yol ise; *in vitro* olarak kanın cam gibi negatif yüklü yüzey ile karşılaştığında plazma proteini FXIII (Hageman faktörü) aracılığı ile gerçekleşen yol olarak tanımlanmıştır (30-35).

4.2. Hemostatik Sistem ve Doku Faktörü

Kan, endotel hücreleri ile kaplı damarlarda pıhtılaşmadan dolanır. Endotel dışında bir yüzeyle karşılaştığında hemen pıhtılaşır. Dolaşan kanda mikro düzeylerde dahi bir pıhtı olması, kılcal damarları tıkayarak ilgili organın oksijenlenmesini ve beslenmesini engelleyeceği için hayati tehlike oluşturduğu gibi bir kesi ya da hasar bölgesinde pıhtının meydana gelmemesi kanın dışarı akmasını sağlayarak yine hayati tehlike oluşturur. Bu fizyolojik olaylar hemostaz adı verilen sistemin çeşitli bölümleri arasındaki biyokimyasal dengenin iyi işlemesine bağlıdır (29).

Hemostaz; damar sistemi, trombositler sistemi, koagülasyon sistemi ve fibrinolitik sistem olarak birbirini takip eden yollardan oluşur. Koagülasyon mekanizması ise pıhtı oluşumu ile sonuçlanan üç basamaktan oluşur. Bu basamaklar; yavaş ve en önemli basamak olan intrinsik yol, hızlı ve erken aktive olan basamak ekstrinsik yol ve fibrin yapımı için gerekli son basamak ortak yoldur. Koagülasyonun başlamasında primer yol ekstrinsik yoldur. Ekstresek ve intrensek yolların ilk kısımları farklıdır, sonraki kısım her iki durum için de ortaktır.

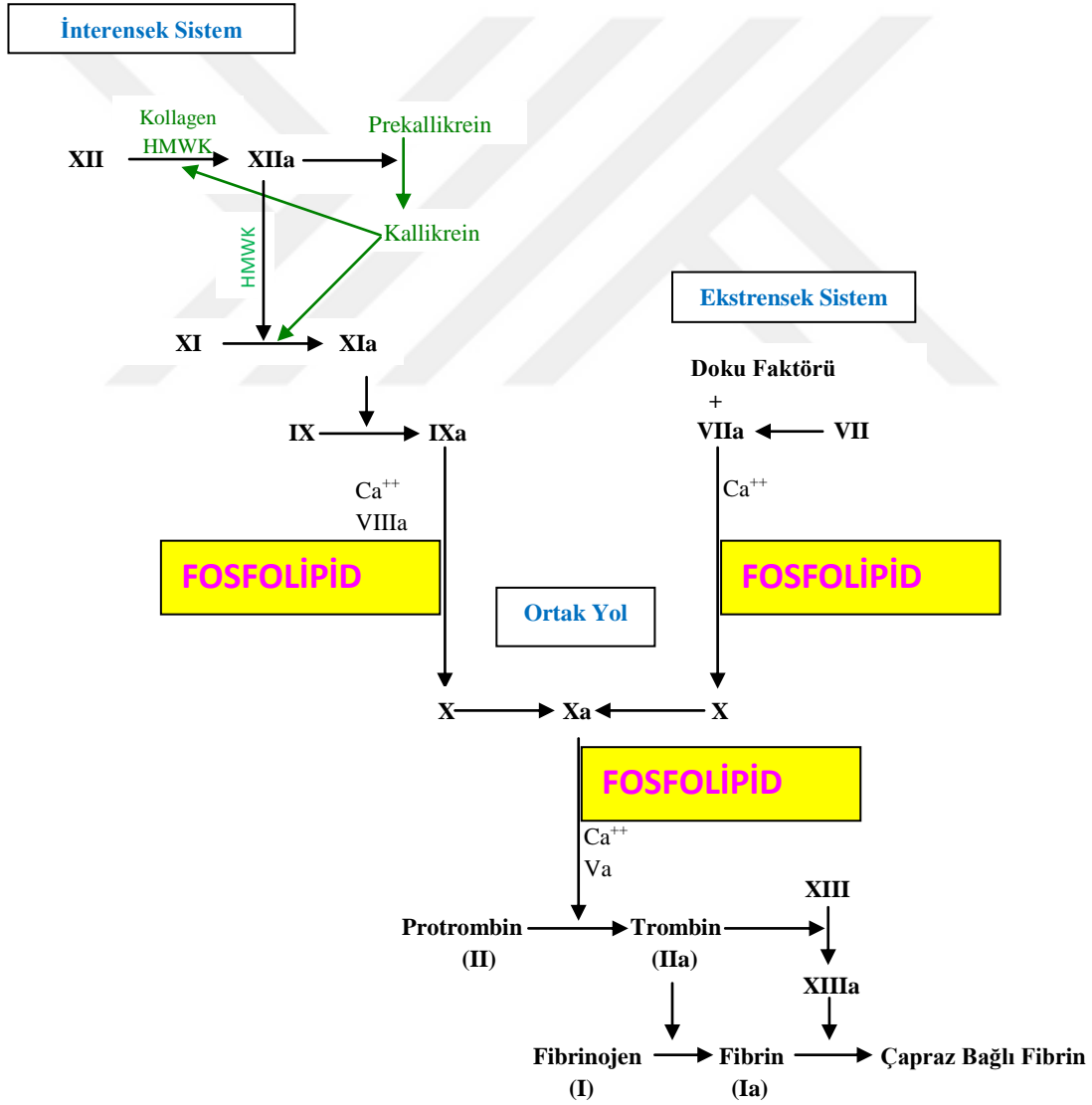
Ekstresek yol damar duvarı ve çevresindeki dokuların travmaya uğramasıyla başlar, intrinsek yol kanın kendi içinde başlar (29).

Ekstresek Yol: Bu yol, damar duvarı veya damar-dışı dokuların travmaya uğraması ile aktive olur ve TF tarafından başlatılıp hızla aktive olur. TF, endotel hasarlanması ile dokulardan salınmakla beraber trombositler ve monosit/makrofajlar tarafından da sentezlenmektedir. TF, doku membranlarından gelen fosfolipitler ile önemli bir proteolitik enzim içeren bir lipoprotein kompleksidir. Ca^{++} varlığında TF'nin lipoprotein kompleksi FVII'yi aktive edip (FVIIa) onunla bir kompleks oluşturur (5,29). Normalde kanda az miktarda da olsa (0,59-8,4 ng/ml) FVIIa bulunmaktadır. TF/FVIIa kompleksi bir taraftan FIX'u aktive ederken, diğer taraftan da FX'u FXa'ya dönüştürür. TF hem direkt olarak, hem de FIX'u aktive etmek suretiyle indirekt olarak, Ca^{++} yardımı ile, FX'u aktifleştirir; yolun bundan sonraki kısmı intrinsek yolla ortaktır. Aktif Faktör X, TF'nin parçası olan doku fosfolipitleriyle ya da trombositlerden serbestlenen fosfolipitlerle birlikte FV ile birleşerek protrombin aktivatörü adı verilen kompleksi oluşturur ve protrombinin trombine (FIIa) dönüşümü sağlar (5,29,36).

İntrinsek Yol: Plazma içinde oluşan bu yol kanın kendisinin travmaya uğraması veya kanın travmatize bir damar duvarındaki kollajenle teması sonucu başlar. Kanın travmaya uğraması; FXII ve trombosit fosfolipitlerinin aktifleşmesine ve trombosit fosfolipitlerinin serbestleşmesine neden olur. Hasarlanan damar duvarındaki subendotelyal kollajenle temasıyla da Hageman faktörü (FXII) aktifleşir. Kanın travmaya uğraması veya damar duvarındaki kollajenle teması kandaki FXII'nin yanında trombositleri de etkiler. FXIIa, FXI'i FXIa'ya dönüştürür. FXIa, FIX'u aktifleştirir. FXIa, FVIII, trombosit fosfolipitleri ve travmatize trombositlerden salınan 'trombosit faktör 3' (PF3) birlikte etki göstererek FX'u aktive ederler. FXIIa'nin başlattığı reaksiyon zincirindeki faktörlerden her biri Ca^{++} ve diğer bazı faktörlerin yardımıyla kendisinden sonra gelen faktörü aktive eder. İntrinsek yolun son aşaması ekstresek yolun son aşamasıyla aynıdır. Yani, FXa, FV ve trombosit veya doku fosfolipitleriyle birleşerek protrombin aktivatörü kompleksini oluşturur. Protrombin aktivatörü de potrombinin trombine parçalanmasını başlatır (5,37,38).

Ortak Yol: Bu yolda; FXa, Ca^{++} 'un, Labil faktör'ün (FV) ve trombosit kaynaklı fosfolipid misellerinin yardımı ile protrombini (FII) trombine (FIIa)

dönüştürür. FIIa, fibrinojenin (FI) fibrine dönüşmesini başlatır. FI'nin iki peptit zincirinin her birinden iki peptit parçası koparılır ve fibrin monomerleri (FIa) oluşur. Bir transglutaminaz'ın (aktive edilmiş FXIIIa) yardımı ile FIa kovalent çapraz bağlarla polimerize olur; böylece suda çözünmeyen ve plazmin ve diğer proteolitik enzimlere dirençli olan sağlam fibrin oluşur. Fibrin iplikleri, kan dolaşımındaki eritrositleri ve lökositleri hapseden kırmızı pıhtının matrisini oluşturur. Böylece pıhtı oluşumu ve büyümesiyle koagülasyon kaskadı sonuçlanır. FIIa, FXIII'ü de aktifleştirir. Ayrıca, trombosit agregasyonunun güçlü bir uyarıcısıdır (5,39-41). Aşağıdaki şekilde bu yollar özetle görülmektedir.



Şekil 4.2. Koagülasyon kaskadında fosfolipidlerin rol oynadığı basamaklar.

Kan ve dokularda kan pıhtılaşmasını etkileyen 50'den fazla madde bulunmuştur. Bundan pıhtılaşmayı sağlayanlara prokoagülan, pıhtılaşmayı inhibe edenlere antikoagülan denir. Kanın pıhtılaşp pıhtılaşmaması, bu maddeler arasındaki dengeye bağlıdır. Pıhtılaşma faktörlerinin birçoğu çok düşük konsantrasyonlarda bulunan yüksek oranda glikozillenmiş bir plazma proteini grubudur. TF dışındakiler plazmadadır ve aktifleşmek için bir proteolitik aktivasyona ihtiyaç duyarlar. Bazıları K vitamini bağımlıdır ve glutamik asit zincirinin modifikasyonu ile sonuçlanan bir dizi enzimatik modifikasyona uğrarlar. Bu durum, tromboembolik olayların önlenmesinde ve tedavisinde K vitamini antagonistlerinin kullanımına imkan tanır (29,42,43). Pıhtılaşma faktörleri ve bazı özellikleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 4.2. Pıhtılaşma faktörlerinin (proteinlerinin) bazı özellikleri.

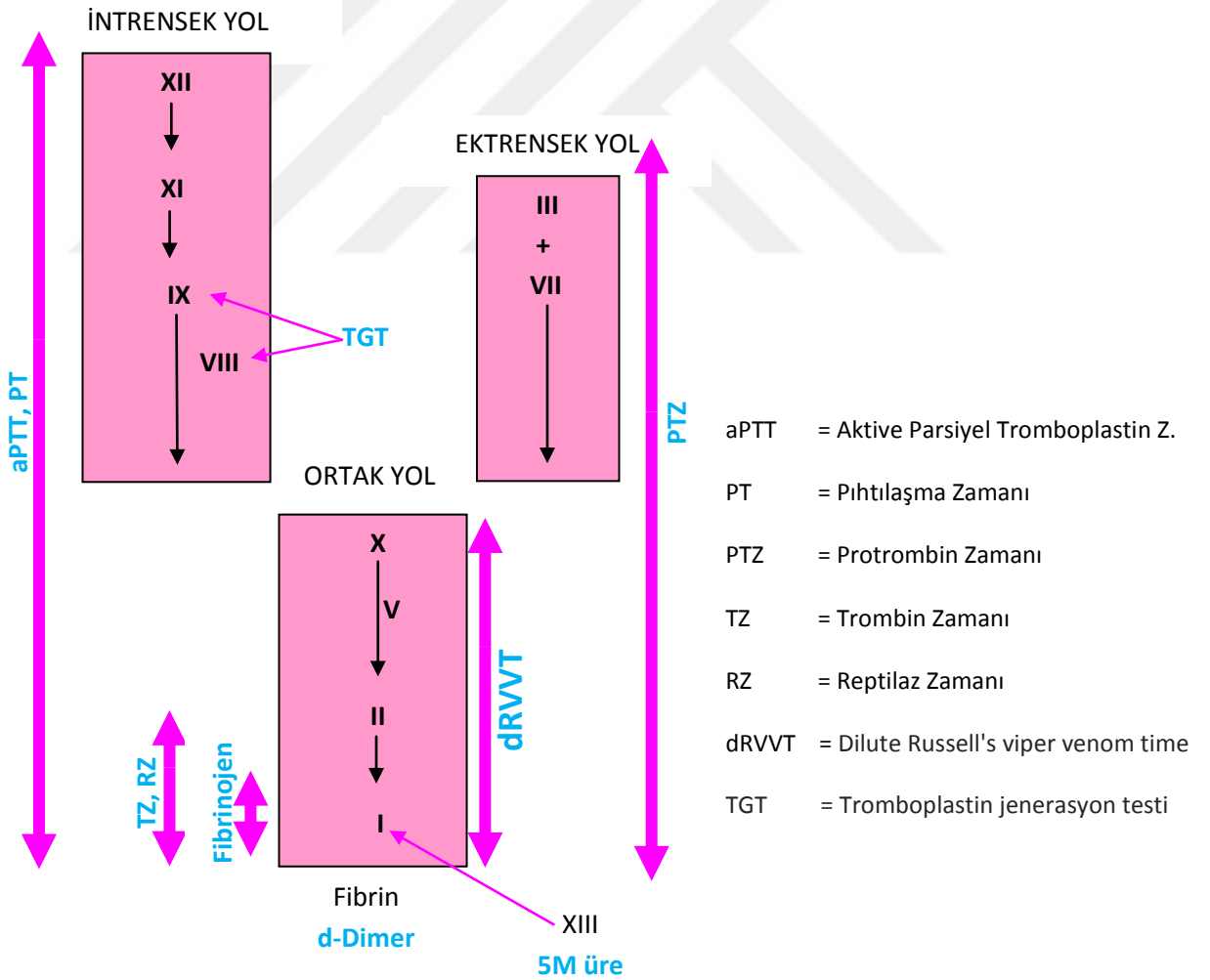
No	Adı	Yapısı	Fonksiyonu
I	Fibrinojen	Plazma Proteini	Ortak yol, fibrin öncüsü, pıhtı oluşturur
II	Protrombin	Vit.K bağımlı serin proteazı	Ortak yol, trombin öncüsü, IIa,I,V,VII,VIII,XI,XIII, Protein C ve trombositleri aktifleştirir
III	Doku Faktörü	Lipoprotein	Ekstresek yol, VIIa'nın kofaktörü
IV	Kalsiyum	İyon	Pıhtılaşma faktörlerinin fosfolipidlere bağlanması, intrinsek yolun ilk iki basamağı dışındaki tüm reaksiyonların başlatılması, hızlandırılması, K vit. bağımlı faktörlerin aktivasyonu
V	Proakselerin, Labil faktör	Seruloplazmin benzeri protein	Ortak yol, X'un kofaktörü, protrombinaz kompleksini oluşturur
VII	Prokonvertin, Otoprotrombin I	Vit. K bağımlı serin proteaz	Ekstresek yol, proenzim, IX ve X'nu aktifleştirir
VIII	Antihemofilik faktör A	Seruloplazmin benzeri protein	İntrinsek yol, IX'un kofaktörü, tenaz kompleksini oluşturur
	Von Willebrand Faktör (vWF)	Multimerik yapıda protein	Trombosit adezyonu, VIII'e ve subendoteldeki kollajene bağlanma, FVIIIc için taşıyıcı protein
IX	Christmas Faktör, Antihemofilik faktör B, Otoprotrombin II	Vit. K bağımlı serin proteaz	İntrinsek yol, proenzim, X'nu aktifleştirir, VIII'le tenaz kompleksini oluşturur
X	Stuart-Power Faktör, Otoprotrombin III	Vit. K bağımlı serin proteaz	Ortak yol, proenzim, II'yi aktifleştirir, V'le protrombinaz kompleksini oluşturur
XI	Antihemofilik Faktör C	Serin proteaz öncüsü	İntrinsek yol, proenzim, IX'u aktifleştirir
XII	Hageman Faktör	Serin proteaz	İntrinsek yol, proenzim, faktör XI, VII ve prekallikrein'i aktifleştirir
	Prekallikrein, Fletcher Faktör	Serin proteaz	Enzim, XII ve prekallikrein'i aktifleştirir, HMWK'yı böler
	Yüksek Molekül Ağırlıklı Kininojen (HMWK)	Bağlanma proteini	Kofaktör, XII, XI ve prekallikrein'in karşılıklı aktivasyonu
XIII	Fibrin Stabilize Edici Faktör (FSF)	Transglutaminaz	Ortak yol, proenzim, fibrin monomerlerini fibrin polimerlerine dönüşümü, fibrinin çapraz bağlanması

4.2.1. Tromboplastin Jenerasyon Testi (TGT)

FVIII ve FIX eksikliğini ayırmak için tromboplastin jenerasyon testi kullanılır. Sulandırılmış plazma trombosit yerine geçen bir madde varlığında rekalsifiye edilir ve normal sitratlı plazmaya aşırı kalsiyumla birlikte inkübe edilmiş karışımının alt örnekleri eklenerek tromboplastin oluşumu test edilir.

Bozuk olan test plazma ilavesiyle düzeliyorsa FVIII eksikliği, serum ilavesiyle düzeliyorsa FIX eksikliği, her ikisinin ilavesiyle düzeliyorsa FXI eksikliği düşünülür. Çünkü normal plazmada FVIII ve FXI, normal serumda ise FIX ve XI bulunur (44-48).

Koagülasyon sistemi ve klinikte sıklıkla kullanılan pıhtılaşma zamanları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



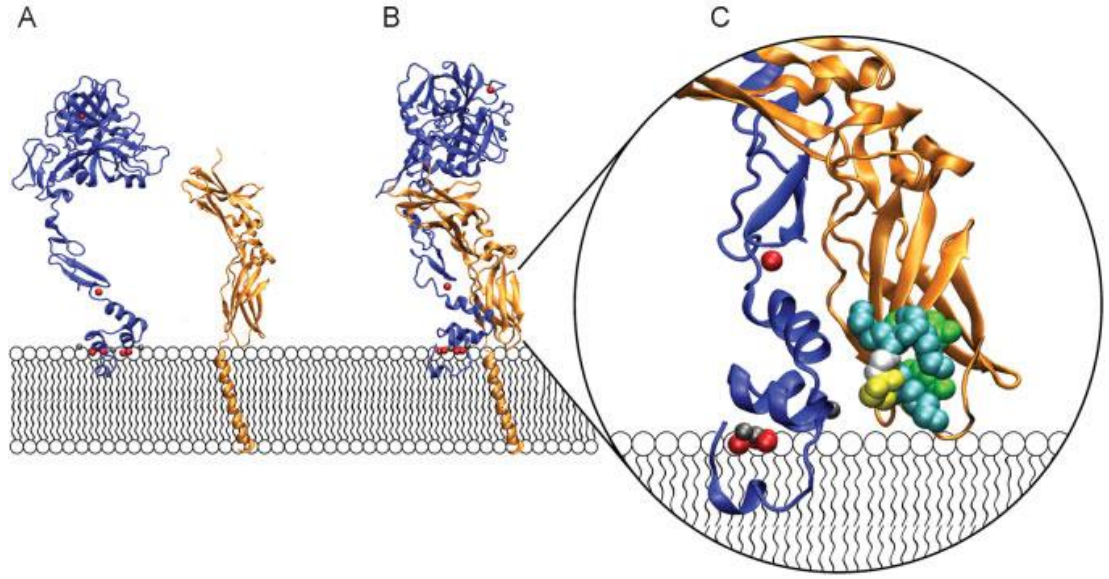
Şekil 4.2.1 Koagülasyon sistemi ve klinikte sıklıkla kullanılan pıhtılaşma testleri.

4.3. Doku Faktörünün Moleküler Yapısı

Hüresel bir kofaktör ve reseptör olan TF'nin molekül yapısı ve içeriği elde edildiği kaynağa göre değişir. Farklı oranlarda fosfolipid, protein ve karbohidrat içeren TF'nin molekül ağırlığı da geniş bir aralık içinde değişir. Wintrobe's Clinical Hematoloji'sinde TF'nin molekül ağırlığının 53,000-425,000 kDa arasında değiştiği, aktif protein agregatlarının ise 1,500,000 kDa kadar olabileceği bildirilmiştir (49,50). Çok fonksiyonlu TF'nin molekül yapısı 3 bölümde incelenir (34);

- Amino terminalin bulunduğu ekstraselüler bölge,
- Hücre membranının içinde kalan bölge,
- Sinyal iletiminde görev alan ve karboksi terminal ucunu içeren bölge.

Hücre membrane yüzeyinde FVIIa ve TF'nin hücre dışı alanının (sTF) kristal yapıları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Membran yüzeyinde düzenlenmiş FVIIa ve TF'nin hücre dışı alanının (sTF) kristal yapıları.

Bu şekilde (A) FVIIa (mavi) uzatılmış bir şekle sahiptir ve membran çift tabakalarında anyonik fosfolipidlere N-terminal GLA alanıyla bağlanır (burada membrana temas halinde gösterilmektedir). Ca^{++} (kırmızı küreler) ve Mg^{++} (gri küreler) gibi iki değerli katyonların GLA alanıyla koordinasyonu, uygun alan katlanması ve fonksiyonu için kritik önem taşır. Bir Ca^{++} iyonu, FVIIa'nın birinci epidermal büyüme faktörü benzeri alanına ve ayrıca bu proteinin proteaz alanına bağlanır (membrandan en uzaktaki alan). TF'nin izole edilmiş dış ortamı (sTF,

turuncu) membran yüzeyine tek bir transmembran heliks vasıtasıyla bağlandığı gibi tasvir edilmiştir. (B) sTF-FVIIa kompleksinin kristal yapısı ile TF'nin transmembran heliksi. (C) TF'nin yakından gösterimi (TF'nin substrat bağlayıcı eksozit bölgesi). Allojik olarak aktifleşen FVIIa'ya ek olarak, TF'nin membran-proksimal kalıntılar yoluyla FIX ve FX protein substratlarıyla doğrudan etkileştiği düşünülmektedir. TF kalıntıları Tyr¹⁵⁷, Lys¹⁵⁹, Ser¹⁶³, Gly¹⁶⁴, Lys¹⁶⁵, Lys¹⁶⁶ ve Tyr¹⁸⁵ (Van Der Waals yarıçapı olarak gösterilir ve aşağıdaki gibi kimliklere göre renklendirilir-teal: lizin, beyaz: glisin, sarı: serin, yeşil: tirozin) mutageniz çalışmalarını ile gösterildiği gibi alt katmanla etkileşime önemli ölçüde katkıda bulunur (Şekil C, şekil B'den 45 ° döndürülür) (49).

TF toplam 263 amino asit içerir. Bunların 219 tanesi ekstraselüler bölgede, 23 tanesi transmembran bölgede ve 21 tanesi intraselüler bölgede bulunur. TF'nin lipid kısmı; kolesterol, serebrozid, gangliosid ve fosfolipidlerden oluşmaktadır. Fosfolipid içeriği ise fosfotidiletanolamin, fosfotidilserin, fosfotidilkolin, sfingomyelin, fosfotidilinositol, lizofosfotidiletanolaminden oluşur. Protein kısmında doku faktörü aktivitesi vardır ancak lipid bileşiminin eklenmesiyle bu aktivite 950 kez artar. TF'nde bulunan fosfolipilerin negatif yüklü olması koagulan aktivite için önemlidir. TF'nin kofaktör fonksiyonunu tam gösterebilmesi için yapısındaki proteinler ve fosfolipidlerin bir arada olması gerekir (34).

4.4. Doku Faktörünün Genetiği

TF geninin lokalizasyonu kromozom üzerinde 1p21-p22 bölgesindedir. TF'nin DNA sekuansı 6 ekson ve 5 introndan oluşur ve yaklaşık 13 kb uzunluğundadır. Birinci ekson sinyal peptidini kodlar. 2, 3, 4 ve 5. eksonlar ekstraselüler kısmı kodlar, 6. ekson transmembran ve sitoplazmik kısmının kodlayıcısıdır. Ayrıca 6. Ekson doku faktöründe 3'-UTR denilen translasyona uğramayan bölgeyi kodlar. TF genin promotor bölgesi -383 ve -121 baz çifti (BP) arasındadır (28).

4.5. Doku Faktörünün Bulunduğu Yerler

TF hücrede transmembran protein olarak bulunur. Önceki yıllarda TF'nin sadece ekstraselüler dokularda makrofajlar, monositler ve fibroblastlar tarafından

eksprese edildiği kabul edilirken daha sonraki çalışmalar dokuların farklı bölgelerinde TF ekspresyonunun olduğunu göstermiştir.

Sağlıklı insanların plazma ve serumunda ölçülebilecek miktarlarda inaktif olarak bulunan TF, çeşitli ajanların etkisi ile ve patolojik durumlarda değişim gösterir. Kanamanın çabuk durdurulması için beyin, akciğer, miyokardium, plasenta ve uterusda doku faktörünün fazla olduğu düşünülmektedir. TF'nin olduğu dokularda ekstrensek yolla, olmadığı dokularda ise intrinsek yolla kanama durdurulur. Bu bilgilere dayanarak dokuya spesifik hemostazın olduğu anlaşılmaktadır (28). Çeşitli dokuların TF aktivitesi aşağıdaki tablodaki gibidir.

Tablo 4.5. Çeşitli dokularda doku faktörü ekspresyonu. (-) yok, (+) zayıf aktivite, (+ +) orta aktivite, (+ + +) güçlü aktivite, (D) değişebilen aktiviteyi gösterir (12).

Deri	Epidermis	(+++)
	Dermis	(-)
Barsak	Mukoza	(+++)
	Submukoza	(-)
	Muskularis	D(+)
Damarlar	İntima	(-)
	Media	D(+)
	Adventisya	(++)
	Kapiller	(-)
Kalp	Miyokard	(+++)
	Endokard	(-)
	Kardiak kapaklar	(-)
Akciğer	Bronşial mukoza	(++)
	Bronşial submukoza	(-)
	Alveolar septae	(+)
	Alveolar epitel hücresi	(++)
	Alveolar makrofaj	D(+)
Beyin	Meninges	(+)
	Serebral korteks	(+++)
Böbrek	Glomerüller	(+++)
	Tubuler	(-)
	İnterstitiyum	(-)
Dalak	Kapsul	(++)
	Trabekul	(+++)
	Splenic cord	(-)
	Limhoid yüzeyler	(-)
Karaciğer	Hepatositler	(+)
	Kupfer hücreleri	(-)
	Safra yolu epiteli	(-)
Adrenal glands	Korteks	(-)
	Medulla	(+)
Periferel sinir	Schwan hücreleri	(++)
	Aksonlar	(-)
İskelet kası	Miyosit	(-)
	Perimisyum	(-)

4.6. Doku Faktörü İnhibitörü

Doku faktörü yolu inhibitörü (TFPI) kılcal damarların endotel hücrelerinde sentezlenen bir proteaz inhibitördür ve TF'nin düzenleyicisidir. TFPI'nin etkilediği başlıca molekül FXa ve FVIIa/TF kompleksidir. TFPI yaşam için gereklidir çünkü TF'nin aşırı uyarılması yaygın damar içi pıhtılaşması sendromunda olduğu gibi yaygın trombotik tıkanmalara neden olacağından TF'nin kontrolü sağlanmalıdır. TFPI dördümlü kompleks (TFPI, TF, VIIa, Xa) oluşturarak TF, FVIIa ve FXa'yı inhibe eder. Bu kompleksin oluşması için kalsiyum iyonları ve anyonik fosfolipid membran gereklidir (28,51).

4.7. Doku Faktörünün Trombofilideki Rolü

Trombofil pıhtıyı (trombusu) seven anlamında kullanılan bir terimdir. Trombus oluşumunu tetikleyen TF'nin kanda artması trombofilinin başlıca nedenidir. Önceleri kanın damar duvarındaki doku faktörüne maruz kalması trombus için önemli bir risk kabul edilirken günümüzde kan veya plazma kökenli TF'nin dolaşımında bulunması tromboza neden olan etken olarak kabul edilir. TF ekspresyonunun artışı aterosklerozun başlıca nedenidir. Koroner kalp hastalıklarında TF antijeninin arttığı görülmüştür. Dolaşımdaki doku faktörü miktarı ve aktivitesinin diyabet, hiperlipidemi, ateroskleroz ve sigara içenlerde arttığı bildirilmiştir (28,38,52-54).

TF, trombositler ve megakaryositler tarafından da ekspresse edilir. Trombositlerdeki TF varlığından sorumlu olduğu düşünülen ana mekanizma TF pozitif mikropartiküllerin bulunmasıdır. TF, megakaryosit olgunlaşmasını karakterize eden ve fonksiyonel olarak aktif olan ve trombin oluşumunu tetikleyebilen yeni salınan trombositlerin bir alt kümesine aktarılmış olan, endojen olarak sentezlenmiş bir proteindir (55).

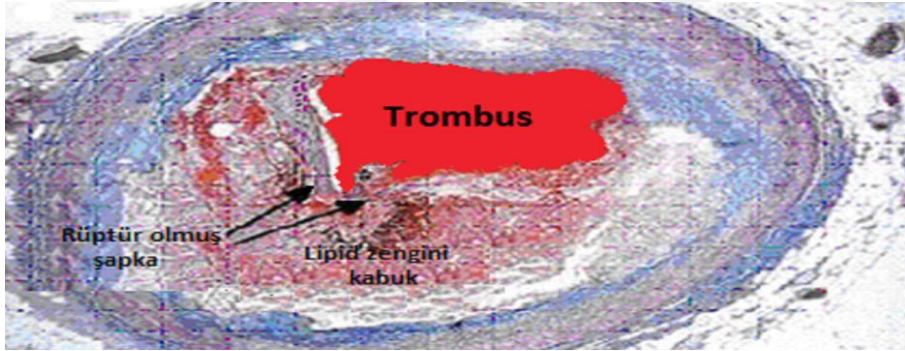
TF artan ekspresyonu trombotik olayları teşvik eder. Son zamanlarda tromboz, bağışıklık, sinyal transdüksiyonu, yara iyileşmesi, inflamasyon, hücre çoğalması, anjiyogenez, kanser, tümör metastazı ve büyümesinde TF'nin rolü olduğu bildirilmiştir. Hücre kaynaklı mikropartiküller koagülasyon ve inflamasyona destek olduğundan aterogenezle ilgili olduğu ve bu yüzden Tip 2 diyabetin ateroskleroz ile

ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Burada TF ve mikropartiküller metabolik sendromun bileşenleri ile ilişkilidir, koagülasyon ile değil (56-59).

Günümüzde koagülasyon-inflamasyon olaylarında, ekstrinsek ve intrinsek koagülasyon mekanizmasının tetikleyicisi olan TF arteriyel tromboembolinin başlıca sorumlusu olarak kabul edilir (60-62). Koroner kalp hastalıklarında TF artar. Aterosklerozda TF aterosklerotik plaklardaki makrofajlardan türeyen köpük hücrelerinde eksprese edilir. Plak yırtılması sonucunda açığa çıkan TF miyokard infarktüsünün başlıca nedenidir (29,38,52).

4.8. Doku Faktörünün Koroner Arter Hastalığındaki Rolü

Günümüzde TF, akut koroner sendromunun önemli bir trombus ajanı olarak kabul edilir. TF, aterosklerotik plak içeren bütün hücresel elementlerde ortaya çıkarılabilir. Aşağıdaki şekilde aterosklerotik plak içinde özel boyası ile boyanan TF molekülleri görülmektedir.



Şekil 4.8. Doku faktörünün aterosklerotik plak içinde görünüşü (52).

Normal şartlarda damarın mediasında TF az miktarda eksprese edilirken damar hasarında artmaya başlar. Bazı interlökinler, endotoksinler, trombin, TNF, serbest oksijen radikalleri, forbol esterleri, immun kompleksler, ilerlemiş glikozilasyon ürünleri, CD40' in ligantına bağlanması gibi çeşitli etkenlerle de TF modüle edilir (63-68).

TF'nin sinyal iletiminde etkin olduğunun anlaşılmasıyla birlikte, sinyal iletiminde etkin olan nükleotidlerle de ilişkisi araştırılmıştır. Özellikle kardiovasküler

sistemdeki etkileri üzerinde çalışmalar yapılmış ve koroner arterlerdeki endotel hücrelerindeki TF'nin ekspresyonunun bir nükleotid reseptör aracılığı ile gerçekleştiği bildirilmiştir (64). Araştırmacılar P2Y reseptörlerinin TF up-regülasyonunda etkin olduğunu ve bu yolun baskılanması ile TF'nin trombus yapıcı etkisininin azalacağını ileri sürmüşlerdir (69).

Endotel hücreleri normalde TF ekspresyonu yapmazlar. Endotel disfonksiyonu olduğunda hücre yüzeyinde TF belirir. TF kanda dolanmakta olan FVII için güçlü bir kofaktör ve reseptördür. Bundan dolayı endotel disfonksiyonu yapan ajanlar (hiperlipidemi, özellikle LDL-C) TF'nin hücre yüzeyinde görünür (69,70).

Hiperlipidemide kandaki TF değeri ve karaciğerdeki TF aktivitesi artar, bu da trombus lehine bir bulgudur (71,72). Fregula ve ark. (73) özellikle akış hızı yüksek olan damarlardaki hasarda TF'nin trombus oluşumunu hızlandırdığını bildirmişlerdir.

TF ekspresyonunun ve dolaşımdaki varlığının kontrolü çok iyi yapılmakta fakat bu kontrol mekanizmalarının nasıl olduğu iyi bilinmemektedir. FVII aktivasyonunda plazmadaki lipoproteinlerin etkin olduğu ve TF ile FVII aktivasyonunun ayrı olduğunu bildiren çalışmalar vardır (74).

Pan ve ark. (75) TFPI'nün aşırı ekspresyonu ile kan kolesterolunun aşırı yükselmesinin önlendiğini bildirmişlerdir. Bu etki, uzun zamanda aterosklerotik plak oluşumunda azalma olacağını düşündürür.

Silveira ve ark. (69) hiperlipemide FVII ve FIX aktivasyonunda artış olduğu halde, FXII aktivasyonunda artış olmadığını bildirmişlerdir, ayrıca FXI ve FIX eksik hastaların postprandial FVII aktivasyonunda artış olmadığını fakat FXII eksik hastalarda postprandial FVII aktivasyonunda artış olduğunu göstermişlerdir.

Mayer ve ark. (76) plazma lipoproteinlerinin özellikle çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL)'nin in vivo olarak TF ve FVII aktivitesini başlattığını, protrombinaz kompleksinin fonksiyonlarını da hızlandırdığını bildirmişlerdir.

Plazmadaki FVII'nin koagulan aktivitesinde, triaçilgliserollerden zengin şilomikron ve VLDL arasında pozitif korelasyon olduğu (77), vitamin K'ya bağımlı pıhtılaşma faktörleri ile, plazmadaki VLDL arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (42).

Tablo 4.8. Bazı hücrelerde TF sentezini aktifleştiren ve inhibe eden moleküller (28).

Hücre tipi	Aktivatörler	İnhibitörler
Endotel hücreleri	TNF- α Endotoksin lipopolisakkarit (LPS) VEGF TGF- β Trombin o-LDL Forbol esterleri	Heparin bağlı büyüme faktörü Artan cAMP (forskolin, dibutyryl cAMP)
Düz kas hücreleri	PDGF Trombin Angiotensin II MCP-1 Serum Forbol esterleri	
Monosit/Makrofaj	Endotoksin lipopolisakkarit VEGF İmmun kompleksler o-LDL T lenfositler ve ürünleri (örn:CD40) Forbol esterleri	TGF- β Artan cAMP Salisilatlar
Fibroblastlar	TGF- β Serum PDGF	IL-4,10,13

4.9. Doku Faktörü İnflamasyon ve Sitokin İlişkisi

Sitokinler, TF ekspresyonunu arttırarak prokoagulant aktivite sağlarken diğer taraftan da trombomodulin/ProteinC antikoagulant yolunu inhibe ederler ve doğal antikoagulant sistemini baskırlar. Endotoksin ve TNF- α gibi inflamasyon belirteçleri kan hücreleri üzerindeki TF ekspresyonunu sağlarlar. TF kan hücrelerinde özellikle monositlerde bulunur ve endotoksinlerle, komplement aktivasyonu ile, C- Reaktif Protein (CRP) ile, veya TNF- α gibi enflamatuvar sitokinlerin etkisi ile açığa çıkar. Damar içindeki hücreler özellikle monositler kanda mikropartikül halinde dolaşan TF'nin kaynağıdır. İnflamatuvar sitokinler TF ekspresyonunu arttırarak kanda trombus oluşumuna neden olurlar (68,78-82).

4.10. Doku Faktörü Sepsis ve İnflamasyon İlişkisi

Sepsis (Septisemi, Kan zehirlenmesi), enfeksiyona verilen sistemik yanıt sonucu gelişen inflamasyon ve koagülasyonla karakterize klinik bir tablodur, kana bakteri ya da toksin karışmasıdır.

Gram negatif bakteriler ile oluşturulan deneysel sepsislerde TF salınımının, prokoagulan TF'nin ve TF/FVIIa kompleksinin arttığı görülmüştür. Monositler, Neisseria Menengitis sepsisi olan hastalarda TF salınımını artırır. Hastalığın ciddiyeti TF düzeyleri ile orantılıdır. Sepsisin ilerlemesinde TF/FVIIa tarafından başlatılan koagülasyon kaskadının önemli olduğu düşünülmektedir (30,81,82).

Bakarewa ve ark. (83) TF'nin güçlü bir inflamatojenik ajan bildirmişlerdir. TF bunu monosit ve içindeki kemokinleri salgılatarak yapar.

İnfluenza gibi virüsler, monositlerde ve endotel hücrelerinde TF ekspresyonunu tetikler ve koagülasyon kaskadını etkinleştirir ve bu da DIC'e neden olabilir. İnfluenza A/H1N1 aynı zamanda trombositleri aktive eder ve mikroveziküllerin salınımını indükler (84).

Son yıllarda TF ile ilgili önemli diğer bir bulgu da kanda ölçülebilecek miktarda TF'nin bulunuyor olmasıdır. Bu bulgu, 1990'lı yılların sonunda farklı araştırmacılar tarafından "blood borne TF-kan kaynaklı TF" ya da "circulating TF-dolaşan TF" adı ile bildirilmiştir (85). Eskiden kanda TF bulunmadığı düşünülürdü. Butanos ve ark. (34) sağlıklı insanların kanında dolanan TF miktarının koagülasyonu etkilemeyecek kadar düşük olduğunu söylemişlerdir. Bazı araştırmacılara göre dolanan TF oluşan pıhtının kenarına tutunmaktadır (86). Ancak ne amaçla tutunduğu anlaşılmamıştır.

Mikropartiküller (MPs) monosit, apoptoz uygulanan hücreler ve tümör hücreleri gibi aktive hücreler tarafından salınan küçük zar vesikülleridir. Tam uzunluktaki doku faktörü (fTF), FVII / VIIa için bir transmembran reseptör olup, sağlıklı bireylerin kanlarında esasen saptanamaz. Bu hastalık durumunda plazmadaki aktif fTF'nin çoğunluğu, MPs üzerinde bulunur (87).

Sirozlu hastalar dolaşımdaki MP TF aktivitesinde artışa sahiptir ve bu da bu hastalarda pıhtılaşma ve trombozun aktivasyonuna katkıda bulunabilir (88).

Kanser gelişiminde ve yayılmasında doku faktörünün rolü iyi belirlenmiştir. Dolayısıyla, endotel hücrelerinin yaşlanmasının ardından TF'yi indüklemeye kabiliyetlerini kaybetme bulgusu, yaşlanma programının ek ve yeni bir anti-kanser mekanizması olduğunu düşündürmektedir (89).

Mikropartiküller (MPs) küçük prokoagulant membran vezikülleridir. Farklı protrombotik koşullarda yükselmiş TF taşıyan MPs'ler bulunur ve MP-birleşmişTF

aktivitesinin, sebepsiz derin ven trombozu (DVT) patogenezinde etkisi olabileceği düşünülmüş ancak TF taşıyan MPs'lerin, sebepsiz DVT patogenezinde belirleyici bir rol oynamadığı görülmüştür (90).

TF ekspresyonu, inflamatuvar aterosklerotik plaklarda trombojenikliğe bağlı olarak artar. Kan yoluyla taşınan TF'nin trombojeneze katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Birkaç çalışmada dolaşımdaki TF düzeyleri ile inme arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Dolaşımdaki yüksek TF düzeylerinin iskemik inme için potansiyel risk faktörleri olduğuna dair kanıtlar vardır (91).

TF, hücre dışı alanda iki disülfid içerir. TF disülfidlerinin (alkilasyonlu ya da alkilasyonsuz) redüksiyonu, membrana bağımlı FX aktivasyonu ve membrandan bağımsız sentetik substrat hidrolizinde FVIIa katalitik fonksiyonunun TF düzenlenmesini ortadan kaldırır (92).

Anjiyogenezin yanı sıra eklem içindeki pannus oluşumu da romatoid artrit (RA) patolojik sürecinde, eklem kıkırdağı ve kemiğin erozyonunda önemli bir rol oynamaktadır. TF, RA'nın pannus oluşumunda da rol oynar (93).

TF, doğuştan gelen bağışıklık ve sepsiste önemli rol oynamaktadır. TF sepsisteki intravasküler pıhtılaşmada önemli bir başlatıcı bileşen olup, uzun pentraxin3 (PTX3), TF'nin lipopolisakarit (LPS) tarafından başlatılmış transkripsiyonunu artırır. LPS ve E. coli koagülasyon sistemini TF'nin tamamlayıcı ve CD14'e bağımlı bir üst regülasyonu ile aktive ederek protrombin aktivasyonunu başlatır (94).

Kalp yetmezliği (Heart failure (HF)), kalbin vücudun dokularına yeterince kan temin edemediği bir kardiyovasküler hastalıktır. Pıhtılaşma sisteminin harekete geçirilmesi, hastalığın seyrini ciddi şekilde zorlaştıran tromboembolik olaylarla sonuçlanır. İnflamasyonun neden olduğu pıhtılaşmada en önemli rolü TF oynar. Anjiyogenez, hücre göçü, hücre dışı matris regülasyonu ve inflamasyon gibi birçok pıhtılaşma dışı aktivitede de yer alır. Endotokseminin deneysel modellerinde anti-TF antikolları kullanılarak TF engellendiğinde, iltihabın neden olduğu koagülasyon tamamen inhibe edilebilir. Benzer şekilde, TF'nin bloke edilmesi, reperfüzyon sırasında tavşan kalplerinin iskemik alanında kan akışını geliştirmiştir. Dilate kardiyomiopati ve hipertansif kalp hastalığı olan hastalardaki azalmış kardiyak TF ekspresyonu geliştiği gösterilmiştir. İskemi ve iskemi-reperfüzyon koşulları TF

ekspresyonunu tetikler. insan koroner arter endotel hücrelerinin, çok düşük seviyelerde TF ifade ettiği gösterilmiştir (95).

4.11. Doku Faktörünün Sinyal İletimindeki Rolü

TF iki ayrı mekanizma aracılığı ile hücresi sinyalinde yer almaktadır:

1. Doku Faktörünün sitoplazmik etki alan üzerinden proteoliz bağımsız sinyal gönderir (sinyali iletmek için filamin 1 içeren hücre içi bir bağlantı sağlar)

2. FVII'nin aktivasyonunu yoluyla proteoliz bağımlı sinyal, bu sinyal proteaz tarafından aktive edilen reseptörleri aktive eder ki bu da bir çok yolu etkileyebilir (7).

TF'nin sitoplazmik bölgesinin fosforilasyona uğramasıyla TF-FVIIa-FIXa, koagülasyonun çeşitli kademelerinde PAR1 ve PAR2'yi aktifleştirir. TF-FVIIa kompleksi hücre içindeki sinyalizasyonu ya trombin üzerinden ya da doğrudan hızlandırır (73,96).

4.12. Doku Faktörünün Kanserdeki Rolü

Pıhtılaşma sistemi aktivasyonunun tümör anjiogenezini kolaylaştırdığı düşünülmektedir. TF, koagülasyon sisteminin başlatıcısı olduğundan bu hipotezlerin merkezindedir. Bir tümörün büyüebilmesi için, anjiogenezin (yeni damarların oluşması) indüklenmesi gerekir. Bunun için, endotelial hücrelerdeki proanjiogenik ve antianjiogenik faktörler arasındaki denge değişmelidir. TF bu dengeyi ayarlar. Birçok tümörde TF salınımı görülür. Tümör hücreleri monosit, makrofaj veya endotelial hücreler gibi konak hücreleri ile birlikte TF salınımını artırır. Bazı çalışmalarda, tümör hücre membranının TF'sinin metastazı arttırdığı görülmüştür (30,37,97-100).

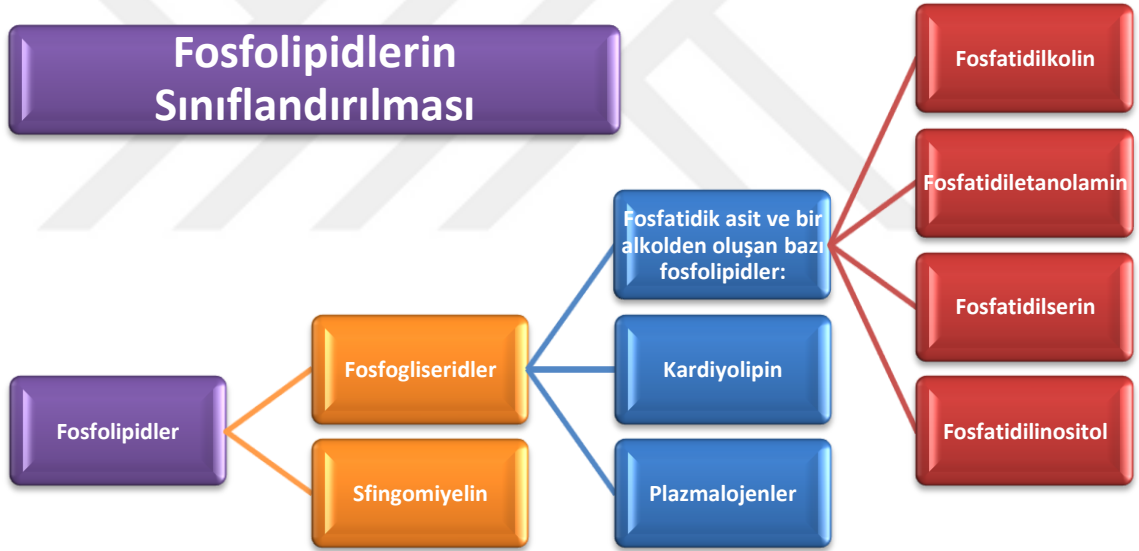
4.13. Pıhtılaşma Yolaklarında Lipitler

Hemostatik sistemin her kademesinde lipitlerin özellikle fosfolipitlerin önemli roller vardır. 1965 yılında Hecht tarafından yapılan çalışmayla lipitlerin kan pıhtılaşması üzerindeki etkileri yoğun bir araştırma konusu olmuştur. Lipitler protrombin aktivasyonunun intrensek ve ekstrensek yollarında önemli bir rol oynar. (101,102).

4.13.1. Fosfolipidler

Hücre membranlarının yapısındaki temel lipid türü fosfolipidlerdir ve miktarları hücreden hücreye, alınan diyet ve çevreye göre değişir. Fosfolipidler, hidrofilik bir polar başa (fosfat grubu ve ona bağlı serin, etanolamin, kolin vs.) ve hidrofobik, non-polar iki hidrokarbon kuyruğa sahip amfipatik moleküllerdir. Fosfolipidlerin başlıca sentez yeri karaciğerdir.

Fosfolipidler, fosfodiester bağı ile ya gliserole yada sfingozine bağlanırlar. Gliserol ve sfingozin alkol türevleridir. Fosfogliseridler, gliserolden türetilen fosfolipidlerdir ve bir gliserol omurgası, iki yağ asidi ve fosforillenmiş alkolden oluşurlar. Sfingomiyelinden türetilen fosfolipidler sfingomiyelinlerdir ve özellikle sinir hücre membranlarında bulunurlar (103-106).



Şekil 4.13.1. Fosfolipidlerin sınıflandırılması.

4.13.2. Fosfolipidlerin Fonksiyonları ve Pıhtılaşmadaki Rollerini

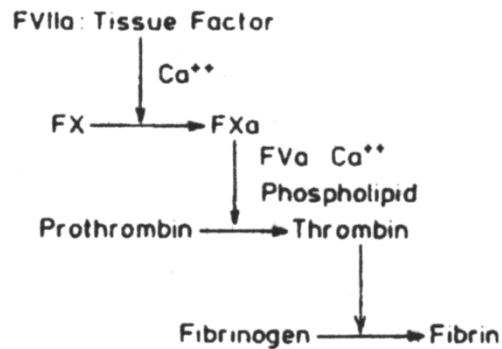
Koagülasyon şelalesinin bazı faktörlerinin aktif hale gelmesi için fosfolipidlerle temas etmesi gerekir. Aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) testi ile kontrol edilen intrinsek yolda FX'un aktive olarak Xa'ya dönüştüğü aşamada

IXa ve VIIIa ile birlikte fosfolipidlere de ihtiyaç duyulur. Protrombin zamanı (PTZ) testi ile kontrol edilen ekstrinsek yolda ise FVIIa, TF ile birlikte fosfolipidler de FX'un Xa'ya dönüştürülmesinde rol oynar. Ortak yolda protrombinin trombine dönüşmesi aşamasında da FXa aynı ekstrinsek yolun son aşamasındaki gibi, hem doku faktörünün parçası olan hem de trombositlerden salınan fosfolipidlerle birleşerek, Ca^{++} varlığında FVa'ya bağlanır ve "protrombin aktivatörü" özelliği kazanır.

Hemostaz fosfolipid bir yüzeyde gerçekleşir. Trombosit fosfolipidi birincil yer olarak hizmet eder. Trombosit membranlarının iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserin, dış yüzeye geçerek protrombinaz enzim kompleksinin etkileşeceği bir platform oluşturur. Daha sonra TF ekspresyonunu ve adezyon moleküllerini aktive eder (106-112).

4.14. Protrombin Zamanı Testi (PTZ) ve Önemi (26-29)

Bu test ekstrinsek sistemin göstergesidir ve TF kullanılarak yapılır. *In vitro* şartlarda sisteme TF ve kalsiyum ilave edilerek ekstrinsek sistem ile pıhtının meydana gelmesi ölçülür. Oral antikoagülanla tedavi edilen hastaların yegane takip testidir. Aşağıdaki şekilde protrombin zamanı ile ölçülen pıhtılaşma faktörlerinin akış şeması yani ekstrinsek sistem görülmektedir.



Şekil 4.14. Protrombin zamanı testinde ekstrinsek sistemde gerçekleşen reaksiyonlar.

Sağlıklı kişilerden alınan plazmalar kullanılarak dokuların tromboplastik aktiviteleri Quick metoduna göre tespit edilir. Tromboplastin kaynağı olarak doku ekstraktları kullanılır. 0.02M CaCl₂ ilavesinden sonra fibrin oluşumu için geçen süre saniye olarak tayin edilir. Aktivite süre ile ters orantılı olarak değişir.

Normal protrombin zamanı 11-16 saniye arasında değişir. Burada kullanılan tromboplastinin etkisi vardır. Kimi tromboplastinler çok aktif kimileri daha az aktiftir. Bu nedenle her laboratuvarın kendi standardizasyonu çok büyük önem taşır.

Quick'in bir safhalı protrombin zamanı çok kullanışlı testtir fakat kullanılan tromboplastinlere göre farklılık gösterdiği için bir standardizasyona gidilmiştir.

ISI= International Sensitivity Index

INR= International Normalized Ratio

Protrombin zamanı değerleri laboratuvaradan laboratuvara çok değişim göstermektedir. Bu nedenle yukardaki değerlerle bir standardizasyon getirilmiştir.

Normal protrombin zamanı 12 saniye, hastaninkisi ise 24 saniye ise; bunların birbirine bölümü $24:12=2.0$ eder. Yani sonuç oran olarak verilmiştir. Fakat aşağıda görüldüğü gibi, ISI katsayısı da hesaba katılır.

INR= (Hasta PT/Normal PT) ISI

ISI = Laboratuvarın tromboplastini/Standart tromboplastin

PTZ testi laboratuvarlarda manuel olarak yapıldığı gibi, foto optik yöntemlerle de yapılır.

Değişik kaynaklı tromboplastinlerin aktivitelerinin farklılığından kaynaklanan farklı sonuçları ve değişik değerlendirme sistemlerinin yarattığı karışıklıkları ortadan kaldırmak, özellikle oral antikoagulan tedavide belirli standartları sağlayabilmek için INR (uluslararası normalleştirme oranı) sistemi kullanılmaya başlanmıştır. INR hasta protrombin zamanının normal kontrolün protrombin zamanı ile kıyaslanması ve bu değerlerin ISI (uluslararası duyarlılık indeksi) üssünün alınması ile hesaplanır. ISI ise laboratuvarın tromboplastininin standart tromboplastine oranlanması ile elde edilir. Hesaplanması karmaşık matematiksel işlemler ve geniş mukayeseli çalışmalar gerektirdiğinden bu değer tromboplastin ayırıcını hazırlayan ticari firmalar tarafından bildirilir. Aşağıdaki tabloda protrombin zamanları ve INR değerleri görülmektedir. WHO biyolojik standartlarına göre terapötik sınırlar 2-4 arasındadır.

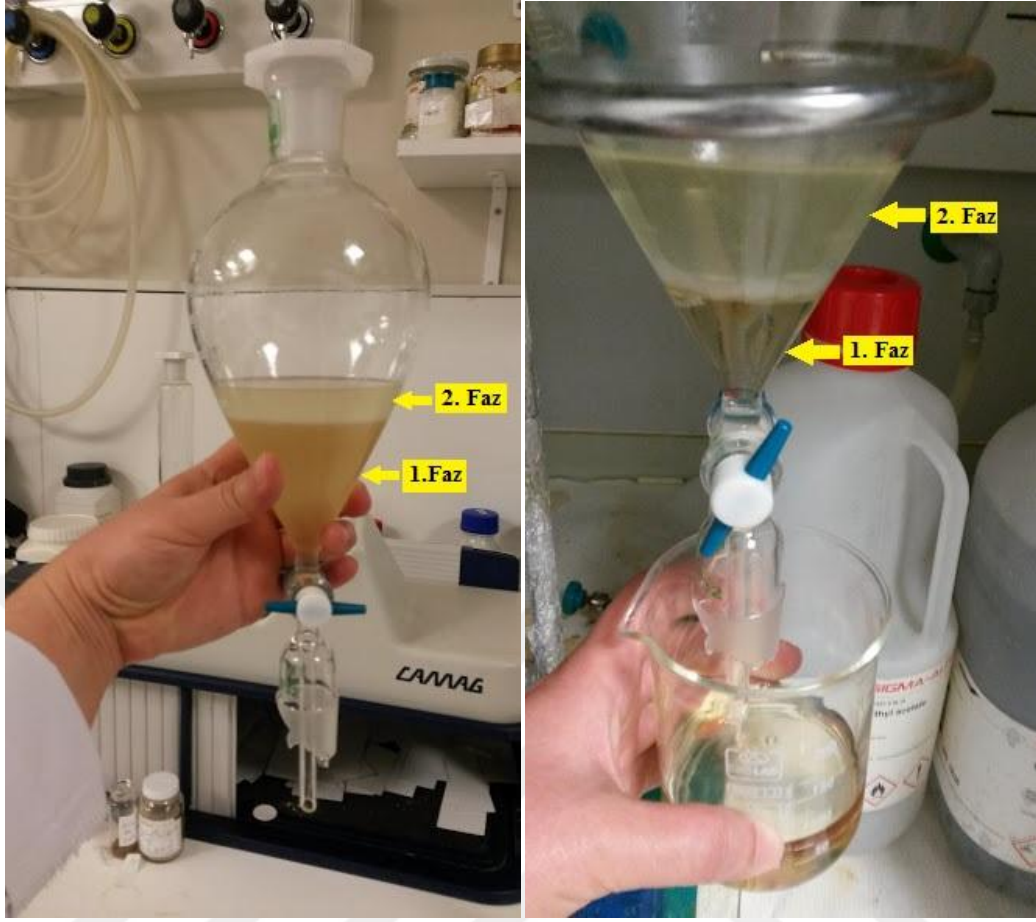
Tablo 4.14. Protrombin zamanlarının değişik şekillerde ifadesi (29).

PT Zaman	PT Oran	PT İndeks	(%) Aktivite	INR
12	1.0	100	100	1.0
13.2	1.1	91	74	1.2
14.4	1.2	83	57	1.5
15.6	1.3	77	48	1.8
16.8	1.4	71	41	2.2
18	1.5	67	35	2.7
19.2	1.6	62	31	2.9
20.5	1.7	59	28	3.4
21.6	1.8	56	25	3.9
22.9	1.9	53	23	4.4
24	2.0	50	21	4.9
25.5	2.1	48	20	5.5
26.5	2.2	45	18.5	6.1
27.6	2.3	43	17.4	6.8
28.8	2.4	42	16.4	7.5
30	2.5	40	15.4	8.2
36	3.0	33	12	12.5

4.15. Lipid ve Fosfolipid İnceleme Yöntemleri

Bir karışımdan istenilen maddenin uygun bir çözücü ile çekilerek ayrılması işlemine ekstraksiyon (çekme, özütleme ile ayırma) denir. Bu bir saflaştırma değil ayırma yöntemidir. Ekstraksiyon hem laboratuvar çalışmalarında hem de ilaç, petrol, kozmetik, gıda gibi birçok endüstriyel alanda kullanılan bir ayırma işlemidir. Ayrılacak maddenin katı veya sıvı olmasına bağlı olarak sıvı-sıvı veya katı-sıvı ekstraksiyon metotlarından biri uygulanır ve ayırma gerçekleştirilir.

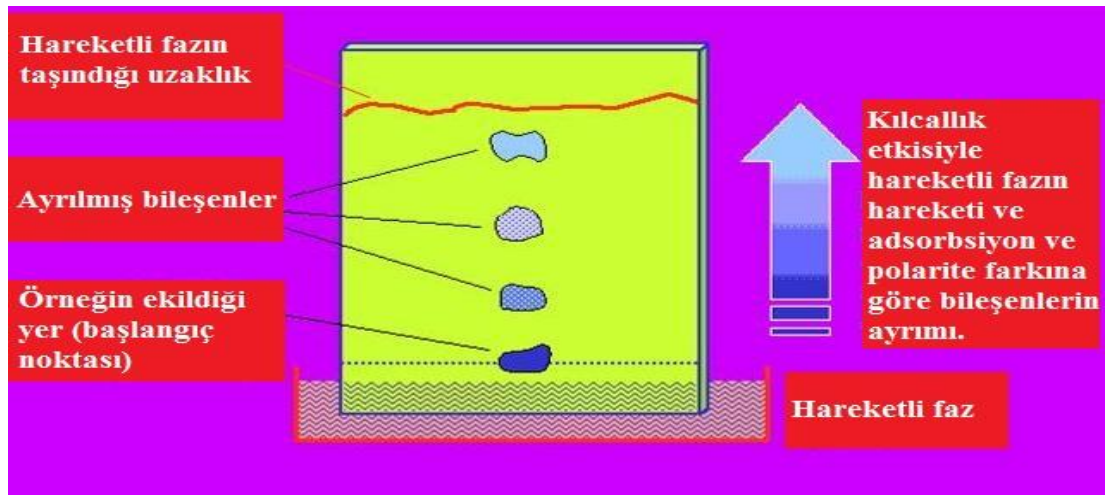
Biz çalışmamızda bir sıvı-sıvı ekstraksiyonu olan Blich ve Dyer (113) metodunu kullandık. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, homojen bir karışımdaki maddelerden birinin, uygun bir çözücü yardımıyla ayrılması işlemidir. Çözücü, ekstraksiyondan sonra bir ayırma hunisi yardımıyla çözeltiden ayrılır. Fazlar, net bir şekilde birbirinden ayrıldıktan sonra musluk açılır ve ayrılan maddeler farklı kaplara alınır (114). Ayırma hunisinde ayrılan fazlar aşağıda gösterilmiştir.



Resim 4.15. Ayırma hunisinde ayrılan fazlar.

TLC bileşikleri ayırmak, karışımdaki bileşenlerin sayısını belirlemek, belli bir maddenin karışımda olup olmadığını anlamak, reaksiyonun yürüyüşünü kontrol etmek, kolon kromatografisi için uygun koşulu belirlemek, kolon kromatografisi ile ayırımı gözlemek, ürün saflığını kontrol etmek gibi amaçlar için kullanılan, çözücü gücü yüksek ve hızlı sonuç veren bir katı-sıvı adsorpsiyon kromatografisidir. Katı ve sıvı fazdan oluşan bu kromatografi yönteminde sabit faz katı, hareketli faz sıvıdır. Hareketli sıvı faz olarak hekzan, toluene, etil asetat, kloroform, aseton, metanol, asetik asit, su vs. gibi kimyasal çözücüler kullanılır. Sabit katı faz için silika jel (SiO_2), alüminyumoksit (Al_2O_3), toz selüloz gibi maddeler kullanılır. Bu yöntemde etkin mekanizma adsorbsiyondur. Boyutları 5x10 ile 20x20 cm arasında değişen özel olarak hazırlanmış cam, alüminyum veya plastik levhalar kullanılır. Üzeri silika jel, alümina gibi adsorbanla kaplanmış olan bu plakalar hazır olarak satılabildiği gibi laboratuvar da hazırlanabilir. Adsorblayıcı tabakanın kalınlığı yapılacak analizin

cinsine göre 0,25-2 mm arasında değişir. Laboratuvarda hazırlanan plakalar kullanılmadan önce 110⁰C'deki etüvde 1-2 saat kurutularak aktifleştirilir ve hemen kullanılır. Ayrılacak madde karışımının adsorban üzerine kapiller tüp ile damlatılmasına ekme işlemi denir. Düzgün ekme yapılabilmesi için başlangıç noktası ve uygulama noktaları kurşun kalemle yüzeyi zedelemekten hafifçe çizilir. Ekim yapılan plaka kuruduktan sonra, içinde hareketli faz olan tankın içine daldırılıp tankın kapağı kapatılır. Tankın içindeki hareketli faz miktarı uygulama noktasını geçmemeli, tank çözücü buharıyla doygun olmalıdır. Bunun için tankın bir kenarına süzgeç kağıdı yerlertirilebilir. Plaka tanka pens yardımıyla tek seferde yerleştirilmeli ve kapağı kapatılan tank hareket ettirilmemelidir. Kapiller etkisiyle hareketli faz plakanın üst kısmına geldiğinde (tepeye 0,5 cm kalmalı) plaka tanktan yine pens yardımıyla çıkartılır ve kuruması beklenir. Sonrasında yürütölen maddeler renkli ise, zonlar kurşun kalemle işaretlenir, renksiz ise zonlar görünür hale getirilerek değerlendirilir. Bunun için; UV ışık, iyodin buharıyla boyama (kahverengimsi renk oluşur), ninhidrin metodu (aminoasitleri pembe gösterir) gibi yöntemler uygulanır. TLC, hem nitel (kalitatif) hem de nicel (kantitatif) analizlerde kullanılmaktadır. Aşağıdaki şekilde TLC tankına yerleştirilen ekilmiş plakada maddelerin ayrımı görölmektedir.



şekil 4.15. TLC'de maddelerin ayrılması.

Ayırım, plakanın alt kısmına damlatılan karışımdaki maddelerin farklı hızlarla yukarı ilerlemesiyle sağlanır. Bu kromatografi türünde hareketli fazın sabit faz

üzerinden ilerleyişi, aşağıdan yukarı doğrudur. Çözücü, kılcallık (kapiller) etkisi ile TLC plakası üzerinde yürür. Yürüme hızı ayrılan maddenin, katı fazın ve çözücünün polaritesine bağlıdır. Yani karışım halindeki maddeler polarite farklarına göre birbirinden ayrılır. TLC’de katı faz çok polarken sıvı faz daha az polardır. Bu yüzden polar moleküller katı faza çok iyi tutunurlar. Hareketli faz o maddeleri fazla ilerletemediğinden bu maddeler hareketli fazın ilerlediği yöne göre geride kalırlar. Buna karşın nonpolar moleküller çok polar olan katı fazla temas etmediklerinden hızla hareket yönünde ilerlerler (115).

Bu çalışmada polar ve çözünmeyen bir madde olan silika jel üzerine ekilen lipid ekstresinin, kimyasal çözücü karışımı ile doyurulmuş (hareketli faz) bir kapalı sistem içinde (TLC tankı) çözücünün kılcallık etkisiyle yukarıya doğru hareketiyle birlikte yürüyen lipidlerin yüklerine göre plak ekim yerinden farklı uzaklıklara göç etmesi sağlandı. Silika jel çok polardır ve polar lipidler silika jele sıkıca tutunduğundan fazla uzağa göç edemezler. Nötral lipidler ise ekim noktasından çok daha fazla uzağa göç ederler.

Toplam fosfor miktarı Vanadomolibdofosforik asit yöntemine göre spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Asidik şartlarda fosfor, amonyum molibdat ile reksiyona girerek vanadomolibdofosforik asit oluşturur. Oluşan asit vanadium artan konsantrasyonlarda sarı renk verir. Sarı rengin yoğunluğu numunede mevcut fosfat konsantrasyonu ile orantılıdır. Vanadomolibdofosforik sisteminin sarı renk oluşturmasının kesin yapısı bilinmemektedir, fakat renk oksivanadyum ve oksimalibdenum köklerinin PO_4 ’deki O ile yer değiştirmesiyle renk veren heteropoli bir bileşik meydana getirmesiyle ilgilidir. Metot uzun süredir biyolojik materyallerin analizinde kullanılmaktadır (116,117).

5. MATERYAL ve METOD

5.1. Doku Faktörünün Elde Edilmesi ve Aktivite Tayini

Cohen and Chargaff (118,119) ve Chargaff et al. (120) tarafından tarif edilen prensiple özetlenen metotla koyun ve kuzu akciğerlerinden ayrı ayrı doku tromboplastini ekstraktı, kuzu akciğerinden de saflaştırılmış doku tromboplastini hazırlandı. Aşağıda tarif edilen bu metotlar diğer dokularda da kullanılabilir.

Kullanılan Kimyasal Maddeler

% 0.9'luk NaCl

Borat tamponu (pH 8.6, iyonik güç:0.15)

Borat tamponu (pH 8.6, iyonik güç:0.15) hazırlanması: 0.05 M sodyum tetraborat (12.367 g H₃BO₃ üzerine 100 mL 1 N NaOH çözeltisi eklenip, son hacim 1 L'ye saf su ile tamamlandı).

Akciğer'den elde edilen tromboplastin ekstraktı (kuzu, koyun)

1. Taze kesilen henüz doğal sıcaklığını kaybetmemiş kuzu ve koyun akciğerleri buz kabı içinde laboratuvara getirildi. İkisi de ayrı ayrı çalışıldı. Trakea, bronş ve büyük ana kan damarlarından temizlendi. Damarlarından ve diğer oluşumlardan ayrılan akciğer dokusu makasla yaklaşık 1cm'lik parçalar halinde kesilerek buz kabında toplandı ve akan musluk suyu altında yıkandı.
2. Yıkanmış akciğer darası alınmış bir beher içinde tartıldı ve homojenizatörde homojenize edildi. Lipid analizi için 20 gr. koyun, 20 gr. kuzu homojenizatı ayrı ayrı +4⁰C'lik buzdolabına konuldu.
3. Ağırlığı kadar %0.9 luk NaCl çözeltisi ilave edilerek iyice karışması için bir kere daha homojenize edildi.
4. 200ml'lik bir mezura konulan homojenata uzun bir cam baget yerleştirildi ve karıştırılmaya başlandı. 10 dakika yavaş yavaş karıştırıldı. Daha sonra bu homojenat içindeki cam baget ile +4 °C'deki buz dolabına yerleştirildi. 20 dakika ara ile 5 dakika karıştırmaya 4 saat boyunca devam edildi ve daha sonra 24 saat buzdolabında bekletildi.

5. 24 saat buz dolabında karıştırmadan bekletilen süspansiyon ertesini gün son kez 5 dakika karıştırdıktan sonra 4 katlı gazlı bez yerleştirilmiş bir huniden süzöldü.

6. Çökelti atıldı ve süpernatant kısmı eppendorf tüplerine yerleştirildi.

Süpernatant kısmı taze akciğer doku tromboplastin ekstraktıdır ve aylarca -20°C'de saklanabilir. Kullanılacağı zaman oda sıcaklığında eritilir ve yeniden homojenize hale getirilir. Bakteri üremesini engellemek için koruyucu olarak %0.5'lik fenol konsantrasyonu ilave edilebilir. +4°C'de fenol ile depolandığında, aktivitesi en az bir ay süreyle stabil kalır.

Elde edilen her iki tromboplastin ekstraktından (koyun ve kuzu) PTZ testi çalışıldı.

Kuzu ekstraktınının 80 gr'mı liyofilize edildi geriye kalan koyun ve kuzu ekstraktları daha sonra PTZ testinde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

Akciğer Tromboplastini (kuzu)

Kuzu akciğerinden, akciğer tromboplastini izole edildi (118,119,120). Akciğer tromboplastini, tromboplastin ekstraktınının saflaştırılmasıyla elde edilir. Bu prosedür aşağıda tarif edildiği gibidir.

1. Akciğer tromboplastin ekstraktınının (kuzu) hazırlanması için yukarıdaki ilk dört adım (1-4 adımlar) takip edildi.
2. Bu süspansiyon gazlı bez ile süzöldü ve filtrat 3 defa 2700xg'de (4°C) 45 dakika santrifüj edildi.
3. Kırmızımsı ve bulanık süpernatant, ultrasantrifüjde 30000xg'de (4°C) 25 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatant atıldı ve çöken miktarın 3 katı kadar borat tamponu (pH 8.6, iyonik güç:0,15) ile çözdüröldü. Tekrardan ultrasantrifüjde 30000xg'de (4°C) 25 dakika santrifüj edildi.
5. Süpernatant atıldı ve çökelti daha önce olduğu gibi aynı miktarda borat tamponunda çözüldü.
6. Çözünmemiş partiküllerin bertaraf edilmesi için, malzeme 5000xg (4°C) 20 dakika süreyle santrifüjlendi.
7. Süpernatant alınarak bir kez daha ultrasantrifüjle 25 dakika boyunca 30000xg santrifüjlendi.

8. Çökelti çözünmemiş parçacıklarının temizlenmesi için tekrar aynı miktarda borat tamponunda çözüldü ve 20 dakika boyunca 5000xg'de santrifüj edildi.
9. Süpernatant berrak ve renksiz hale gelene kadar 4 kez dönüşümlü olarak yüksek ve düşük hızda santrifüjlendi.
10. Son çökelti borat tamponu (pH 8.6, iyonik güç 0.15) içinde eritildi (su kullanılarak da çözünebilir) ve PTZ analizi için kullanıldı. Kalan kısmı -80°C'de saklandı.

Doku Faktörü Aktivitesi Tayini

Akciğer dokusundan elde ettiğimiz homojenatlar TF aktivitesi tayininde TF kaynağı olarak kullanıldı. Aktivite Quick'in 'tek basamaklı protrombin zamanı testi' ile TF'nin eşit miktarda plazma ve 0.02M CaCl₂ ile karıştırılması sonucu pıhtı oluşumu için geçen sürenin (sn) ölçülmesi şeklinde yapıldı. Pıhtının oluşum süresi TF aktivitesi ile ters orantılı olduğundan sürenin uzaması azalmış TF aktivitesinin göstergesidir.

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Trombositten fakir plazma (sitratl plazma): Bunun için sağlıklı kişiden sitratlı kan (9ml kan + 1 ml % 3.8'lik sitrat) alınarak plazması ayrılır. Biz mavi kapaklı sodyum sitratlı tüpe kan alıp 1500 x g'de 15 dakika oda ısısında santrifüj ederek trombositten fakir plazma plazma elde ettik.

Tromboplastin: Elde ettiğimiz tromboplastin ekstraktı kullanıldı.

CaCl₂ Hazırlanması:

Stok CaCl₂ Çözeltisi (0.2 M): 100 ml çözelti için, 2.22 g CaCl₂ biraz dH₂O ile çözülür ve toplam hacim dH₂O ile 100 ml ye tamamlanır.

Seyreltik CaCl₂ Çözeltisi (0.02 M): 1 ml stok kalsiyum klorür çözeltisi üzerine 9 ml dH₂O konur ve karıştırılır. 37°C'de tutulur (taze hazırlanır).

Tablo 5.1. Protrombin zamanı testi 37 °C lik su banyosunda aşağıdaki gibi çalışılır.

	Deney Tüpü İçine
Doku Homojenatı	0.1 ml
2 dakika inkübe edilir.	
Plazma	0.1 ml
Karıştırılır ve 1-2 dakika inkübe edilir.	
0.02 M'lık CaCl₂ Çözeltisi	0.1 ml
Karıştırılır, pıhtı oluşumu için geçen süre kronometre ile tayin edilir.	

5.2. Liyofilizasyon

Liyofilizasyon (dondurarak kurutma), bir solüsyonun içinden suyun alınarak kuru maddenin ortaya çıkarılmasıdır. Kuru madde solüsyondan çok daha stabildir. Solüsyon içerisindeki su çıkarıldığı için materyal fazla yer kaplamaz ve artan kuru madde etkinliğini kaybetmez. Bu yöntemle, solüsyon ilk önce -40 ila -50 °C'ye kadar soğutulur ve vakumlandıktan sonra yavaşça ısıtılarak buzun buhara dönüşerek suyun solüsyondan ayrılması sağlanır. Bu işleme süblimasyon denir.

Liyofilizasyon işlemi, genellikle ilaç üreticileri tarafından aşı ve enjeksiyon ilaçları gibi ürünlerin raf ömrünü uzatmak amacıyla kullanılır. Maddeden suyun ayrılması ile ürünün saklanması ve nakledilmesi çok daha kolaylaşmakta ve sonradan tekrar orijinal formunu kolayca alabilmektedir.

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sıvı nitrojen

Metod

Elde ettiğimiz tromboplastin ekstraktının (kuzu) 80gr.'mı 2'ye bölünüp plastik beherlere alındı. 1. beherdeki tromboplastin ekstraktı sıvı nitrojen ile toz haline getirilerek, 2. beherdeki ise direk olarak Labconco FreeZone Stoppering Tray Dryer marka liyofilizasyon cihazına konuldu.

1. beherdeki tromboplastin ekstraktının toz haline getirilmesinde şu prosedür izlendi; porselen havana biraz sıvı nitrojen dökülüp soğuması sağlandı, buharı uçunca tromboplastin ekstraktı eklendi ve tekrar sıvı nitrojen dökülüp ezildi.

Böylece 1. beherdeki tromboplastin ekstraktı toz haline getirildi. Burada önemli olan çalıştığımız bütün malzemenin önceden sıvı nitrojenle soğutulmasıdır. Liyofilize edilmiş tromboplastin ekstraktları +4⁰C'lik buzdolabına konuldu.

5.3. Lipid Ekstraksiyonu

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kloroform	Metanol
%4'lük CaCl ₂	Azot gazı

%4'lük CaCl₂ hazırlanması: 0.8 gr CaCl₂ tartılarak distile suyla 20 ml'ye tamamlandı.

Metod

Bir sıvı-sıvı ekstraksiyonu olan Bligh ve Dyer (113) metoduyla lipidler ekstrakte edildi. Lipid analizi için +4⁰C'lik buzdolabında sakladığımız 20 gr. koyun ve kuzu örnekleri alındı ve ikisi de ayrı ayrı çalışıldı. 100 ml metanol/kloroform (1/2) ile birlikte homojenize edildi. Homojenizat 20 ml metanol-kloroform ile yıkama yapılarak bir balon joje içerisine filtre kağıdı ile süzüldü ve süzüntüye 20 ml %4'lük CaCl₂ ilave edilerek balon jojenin kapağı kapatıldı. 1 gece +4⁰C'lik buzdolabında bekletildi. Ertesi gün faz oluşumu gözlemlendi. İçerik ayırma hunisine alınarak alt faz darası alınmış bir balon jojeye alınıp, hem üst fazda hem de alt fazda PTZ testi çalışıldıktan sonra üst faz atıldı. Alt fazda bulunan lipid ekstraktının çözücüsü azot buharı altında uçuruldu ve tartıldı. Böylece gravimetrik olarak total lipit miktarı tesbit edildi. Kuzu akciğerinden elde edilen lipid ekstraktı kullanılarak İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile fosfolipidler belirlendi.

5.4. İnce Tabaka Kromatografisi

Kullanılan Alet ve Cihazlar

Rotary evaporator (Heidolph)

Silika Jel Kaplı Alüminyum Tabaka (Silica Gel 60 F254 Merck)

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kloroform (Merck)	Metanol (Merck)	Trietilamin (Merck)
Fosfolipid standartları (Sigma)	Distile su	Azot gazı

Serik sülfat belirtecinin hazırlanması: 2 gr. seryum (IV) sülfat tetrahidrat 100 ml %10'luk H₂SO₄'de çözüldü.

Metod

Akciğer lipid ekstraktlarından fosfolipid fraksiyonlarının ayrılması için TLC yöntemiyle total fosfolipid ve fosfolipid fraksiyonları yapıldı. Bunun için Merck'in 20X20 cm ebatlarında hazır silika jel plakları kullanıldı. Önceden azot gazı altında çözücüsü uçurulan kuzu lipid ekstraktının üzerine 5 ml kloroform: metanol (2:1) karışımından ilave edildi. TLC plakaya alt kenarından 2 cm yükseklikte ekim yapıldı. Fosfolipid standartları 40'ar mikrolitre kapiller tüp kullanılarak birbirinden 1 cm aralıklı olacak şekilde, lipid ise preparatif olarak ekildi. Plak dışarıda bir müddet bekletmek suretiyle kloroform:metanol karışımı kurutuldu. Ekim yapılan plak önceden içine kloroform-etanol-su-trietilamin (30:35:7:35) konarak 1.5 saat bekletilen ve böylece solventle doygunluğa ulaşması sağlanan TLC cam tankına ekim yapılan taraf altta kalacak şekilde yerleştirildi ve kapağı kapatıldı (121). Tankın içi iyi bir saturasyon elde etmek için süzgeç kağıdı ile kaplanmıştır. Solvent yaklaşık 0.5-1 cm olacak şekilde tanka konulmuştur. Plagın göçtürülme işlemi, yaklaşık tüm plak ıslanmaya kadar 45 dakika sürdü. Plak tanktan çıkartılarak kurumaya bırakıldı ve ikinci defa tankın içine kondu. Böylece fosfolipidler ekim noktasından yukarı doğru yürüyerek daha iyi ayrıldı. Sonra plak tanktan çıkartılarak kurumaya bırakıldı ve çözücüsü böylece uçuruldu. Fosfolipid standartlarının olduğu kısım makasla kesildi, üzerine serik sülfat belirteci pulvarizatör kullanılarak püskürtüldü ve manyetik karıştırıcının üzerine konularak ısıtıldı. Böylece renklerin belirginleşmesi sağlandı. Makasla kestiğimiz ve boyadığımız fosfolipid standartlarının olduğu kısım, preparatif ekim yaptığımız ve yürüttüğümüz fosfolipidlerin olduğu kısım ile yan yana konulup standartların ve fosfolipidlerin ayrılan fraksiyonlarının yerleri belirlenerek işaretlendi. Daha sonra fosfolipidlerin olduğu kısımlar ayrı ayrı kesilerek her biri ayrı ayrı erlenlere alındı ve üzerlerine kloroform:metanol (2:1) çözeltisi eklendi. İyice

çalkalanarak lipitlerin çözücü sistemine geçmesi sağlandı. Süzgeç kağıdıyla süzüldü ve darası alınmış bir balona alındı. 40 °C Rotary evaporator kullanılarak çözücüleri uçuruldu ve tartım yapıldı. PS ve SM'nin daha iyi ayrılabilmesi için 3. kez TLC'de yürütülmüştür. Bunun için; PS ve SM'nin olduğu kısım birlikte kesildi ve fosfolipidlerin silikadan kurtulması işlemleri yapıldı. TLC ve bütün işlemler tekrarlanarak en sonunda tartım yapıldı. Bu yöntemle elde edilen örnekler fosfor tayini için hazır hale getirildi, her bir örneğe fosfor tayini yapıldı.

5.5. Fosfor Tayini

Toplam fosfor miktarı Vanadomolibdofosforik asit yöntemine göre spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sodyum metabisülfid

KH_2PO_4

Distile su

Azot gazı

%5'lik Amonyum molibdat

%72'lik Perklorik asit

Amidol (2,4-Diaminofenoldihidrochloride)

%5'lik Amonyum molibdat hazırlanması: 5 gr amonyum molibdat distile su ile 100'e tamamlanır.

%72'lik Perklorik asit hazırlanması: Bir mezura önce 28 ml distile su sonra da 72 ml perklorik asit eklenir.

Amidol (2,4-Diaminofenoldihidrochloride) reaktifinin hazırlanması: Sodyum metabisülfid 2 gr tartılır ve 100ml distile suda çözünüp 0.5 gr amidol ile karıştırılır.

Standart fosfat çözeltisi hazırlanması: 0.043 gr KH_2PO_4 tartılıp 100 ml distile suda çözülür. Bu stok (standart) çözeltidir ve 1 mg/ml fosfor içerir. Standart fosfor çözeltisinden seyreltme işlemi ile standartlar hazırlandı.

Seyreltme:

- 1 ml stok + 9 ml distile su
- 2 ml stok + 8 ml distile su
- 3 ml stok + 7 ml distile su
- 4 ml stok + 6 ml distile su
- 5 ml stok + 5 ml distile su
- 6 ml stok + 4 ml distile su
- 7 ml stok + 3 ml distile su
- 8 ml stok + 2 ml distile su
- 9 ml stok + 1 ml distile su

Metod

TLC ile fosfolipid fraksiyonlarına ayrılan numunenin miktarı fosfor tayini ile belirlendi. Bu işlem için; %72'lik Perklorik asit, %5'lik Amonyum molibdat, Amidol (2,4-Diaminofenoldihidrochloride) reaktifi ve standart fosfat çözeltisi kullanıldı.

Amidol reaktifi için 0.5 gr amidol 100 ml %20'lik sodyum metabisülfid çözeltisinde çözüldü. Standart fosfat çözeltisi için 0.043 gr KH_2PO_4 'ı 100ml distile suda çözüldü ve böylece stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözelti distile su ile seyreltme yapılarak standart çözeltiler hazırlandı.

Total Fosfor Tayini

TLC ile elde edilen fosfolipid ekstraktına 10 ml kloroform:metanol (2:1) eklenip 1 ml alındı ve azot gazı altında kloroform:metanol çözücüsü uçuruldu. Fosfolipid üzerine 0.4 ml perklorik asit eklendi. 4 dakika bekletildikten sonra tüpe 4.2 ml distile su, 0.2 ml amonyum molibdat ve 0.2 ml amidol reaktifi katılarak vorteksle homojenize edildi. Tüpün ağzı kapatılarak benmaride 7 dakika inkübe edildi. Benmariden sonra oda sıcaklığına getirildi ve daha sonra spektrofotometrede

köre karşı 830 nm absorbans değeri okutuldu. Aynı işlem fosfat standartları için de yapıldı.

Standart fosfor grafiği hazırlanması: Standart grafiğinde; konsantrasyonu 1 ml'sinde 1 miligram fosfor bulunan fosfor standardı kullanılıp bu stok çözeltilerden 1 mililitre, 2 mililitre, 3 mililitre, 4 mililitre, 5 mililitre, 6 mililitre, 7 mililitre, 8 mililitre, 9 mililitre alınarak her birine toplam hacim 10 mililitre olacak şekilde distile su ilave edildi. Her bir tüpe stok çözeltilerden 1ml alınarak üzerlerine 0.4 ml perklorik asit eklenip 4 dakika bekletildikten sonra tüplere 4.2 ml distile su, 0.2 ml amonyum molibdat ve 0.2 ml amidol reaktifi katılarak vorteksle iyice homojenize edildi. Tüplerin ağzı kapatılarak benmaride 7 dakika inkübe edilip ve daha sonra 15 dakika oda sıcaklığına getirilip, spektrofotometrede köre karşı 830 nm absorbans değeri okutuldu. Elde edilen absorbans değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek fosfor standart grafiği elde edildi.

Ölçümler sonucu elde edilen fosfor standart grafiğindeki doğrunun denklemi $y=2.789x+0.0275$ 'tir. Ölçümle bulunan absorbans değerleri bu denklemde yerine konularak fosfor konsantrasyonları ve miktarları hesaplandı.

6. BULGULAR

Bu çalışmada koyun ve kuzu akciğerinden ayrı ayrı izole edilen TF'nin aktivitesinde lipidlerin etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla mezbahadan taze kesilen henüz doğal sıcaklığını kaybetmemiş kuzu ve koyun akciğerleri buz kabı içinde laboratuvara getirilip damarlarından ve diğer oluşumlardan temizlenmiştir. İki akciğer de ayrı ayrı çalışılmıştır. Homojenize edildikten sonra 20 gr. örnek lipid analizi için +4⁰C'lik buzdolabına konulmuş geri kalanıyla Cohen and Chargaff (118,119) ve Chargaff et al. (120) tarafından tarif edilen prensiple özetlenen metodla doku tromboplastini ekstraktı (koyun ve kuzu) ve saflaştırılmış doku tromboplastini (kuzu) hazırlanıp Quick (1935) yöntemi kullanılarak protrombin zamanı testi ile aktiviteleri tayin edilmiştir.

Kullandığımız prosedür ile başlangıç dokusunun 100 gramından, 65 mg saflaştırılmış akciğer tromboplastini (kuzu) elde edilmiştir. Aşağıda doku tromboplastin ekstraktı ve saflaştırılmış doku tromboplastini görülmektedir.



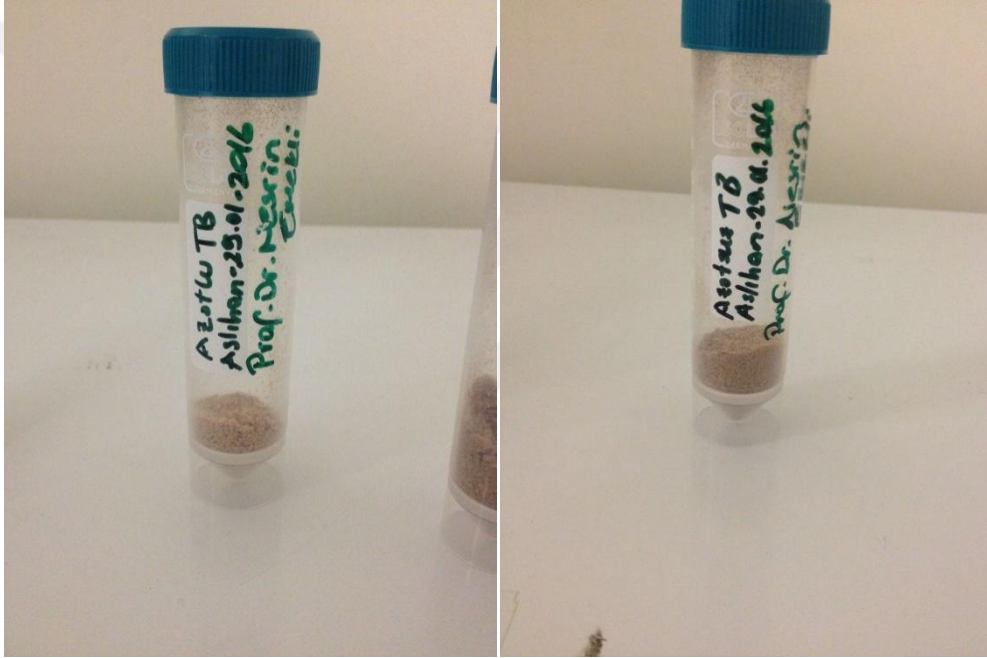
Resim 6.1. Tromboplastin ekstraktı.



Resim 6.2. Saflaştırılmış doku tromboplastini.

Tromboplastin ekstraktının (kuzu) 80 gr'ı Labconco FreeZone Stoppering Tray Dryer cihazı ile liyofilize edilmiştir. Bunun için tromboplastin ekstraktının (kuzu) 80gr.'mı 2'ye bölünüp plastik beherlere alınmış, 1. beherdeki tromboplastin ekstraktı sıvı nitrojen ile toz haline getirilerek, 2. beherdeki ise direk liyofilizasyon cihazına konulmuştur.

1. beherdeki tromboplastin ekstraktı 13 günde, 2.'deki 15 günde kurumuştur. Liyofilize edilmiş tromboplastin ekstraktları +4⁰C'lik buzdolabında saklanmaktadır. Aşağıda liyofilize edilmiş örnekler görülmektedir.



Resim 6.3. Liyofilize edilen tromboplastin ekstraktları. İlk resimde sıvı nitrojen ile toz haline getirilerek, ikincisinde direkt olarak liyofilize edilen tromboplastin ekstraktları görülüyor.

Koyun ve kuzu akciğerleri ayrı ayrı çalışılarak bir sıvı-sıvı ekstraksiyonu olan Bligh ve Dyer (113) metoduyla lipidler ekstrakte edilmiş, ekstraksiyonla ayrılan lipid ve protein kısımlarının aktivitesi Quick (1935) yöntemi kullanılarak protrombin zamanı testi ile tayin edilmiştir. Aşağıdaki tabloda TF aktivitesi değerleri görülmektedir.

Tablo 6.1 TF aktivitesi değerleri.

	Lipid ekstraksiyonuyla ayrılan lipid kısmı	Lipid ekstraksiyonuyla ayrılan protein kısmı	Doku tromboplastini ekstraktı	Saflaştırılmış doku tromboplastini
Kuzu TF aktivitesi (sn)	19	-	12	17
Koyun TF aktivitesi (sn)	25	-	19	saflaştırılmadı

Kuzu akciğerinden elde edilen doku tromboplastin ekstraktı koyununkinden daha aktif bulunmuştur. Tromboplastinin ekstraksiyonla ayrılan lipid kısmında aktivite görülürken, protein kısmında görülmemiştir. İki bir aradayken en yüksek aktiviteye sahip oldukları grlmştir. Saflaştırma işlemi aktiviteyi dşrmştir.

Bu ekstraksiyon kullanılarak gravimetrik olarak toplam lipid tayini yapılmıştır. Koyun akciğerindeki lipid miktarı kuzu akciğerinden daha fazla bulunmuştur. Aşağıdaki tabloda 20'şer gramlık koyun ve kuzu akciğerlerinden elde edilen total lipid miktarları grlmektedir.

Tablo 6.2. Total lipid miktarları.

20 gr tam doku	Total lipid miktarı (gr)
Koyun akciğeri	9.89
Kuzu akciğeri	9.75

Yine bu ekstraksiyon kullanılarak TLC ile fosfolipidler belirlenmiş ve fosfolipid standartları kullanılarak major fosfolipidlerden fosfatidilkolin (PC), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilserin (PS) ve sfingomiyelinin (SM) yerleri tesbit edilmiştir. Aşağıdaki resimde, TLC ile ayrılan fosfolipid fraksiyonları grlmektedir.



Resim 6.4. TLC ile ayrılan fosfolipid fraksiyonları. PE=Fosfatidiletanolamin, SM=Sfingomiyelin, PC=Fosfatidilkolin, PS=Fosfatidilserin

Daha sonra fosfolipidlerin olduğu kısımlar ayrı ayrı kesilerek her biri ayrı ayrı erlenlere alınmış ve üzerlerine kloroform:metanol (2:1) çözeltisi eklenmiştir. İyiçe çalkalanarak lipidlerin çözücü sistemine geçmesi sağlanmış, süzgeç kağıdıyla süzülüp darası alınmış bir balona alınmıştır. 40 °C Rotary evaporator kullanılarak çözücüleri uçurularak tartım yapılmıştır. Total olarak PE 43 mg, PC 26 mg, PS 7.2 mg, SM 3.5 mg bulunmuştur.

Tablo 6.3. Gravimetrik olarak bulunan total fosfolipit miktarları.

	Total fosfolipit miktarı (mg)
PE	43
PC	26
PS	7.2
SM	3.5

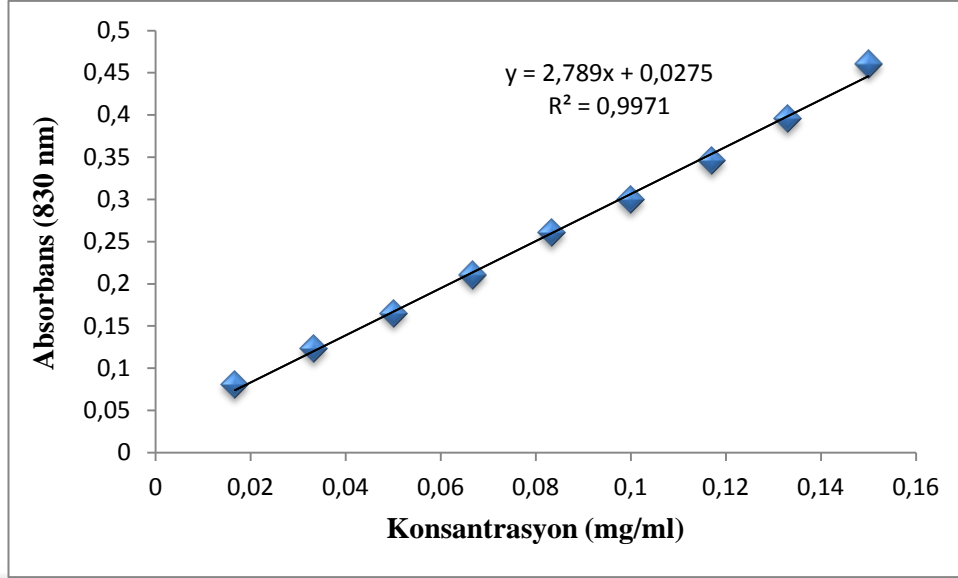
Kuzu akciğerinden elde edilen doku tromboplastininde fosfolipidlerin sıralaması PE>PC>PS>SM şeklinde tesbit edilmiştir.

Elde edilen her bir örneğe fosfor tayini yapılmıştır ve toplam fosfor miktarı Vanadomolibdofosforik asit yöntemine göre spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

TLC ile elde edilen fosfolipid ekstraktına 10 ml kloroform:metanol (2:1) eklenip bundan 1 ml alınmış, azot gazı altında kloroform: metanol çözücüsü uçurulmuş ve fosfolipid üzerine 0,4 ml perklorik asit eklenip 4 dakika bekletildikten sonra tüpe 4,2 ml distile su, 0,2 ml amonyum molibdat ve 0,2 ml amidol reaktifi katılarak vorteksle homojenize edilmiştir. Tüpün ağzı kapatılarak benmaride 7 dakika inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına getirilip spektrofotometrede köre karşı 830 nm absorbans değeri okutulmuştur. Aynı işlem fosfat standartları için de yapılmıştır.

Standart grafiğinde; konsantrasyonu 1 ml'sinde 1 miligram fosfor bulunan fosfor standardı kullanılıp bu stok çözeltilerden 1 mililitre, 2 mililitre, 3 mililitre, 4 mililitre, 5 mililitre, 6 mililitre, 7 mililitre, 8 mililitre, 9 mililitre alınarak her birine toplam hacim 10 ml olacak şekilde distile su ilave edilmiştir. Her bir tüpe stok çözeltilerden 1ml alınarak üzerlerine 0,4 ml perklorik asit eklenip 4 dakika bekletildikten sonra tüplere 4,2 ml saf su, 0,2 ml amonyum molibdat ve 0,2 ml amidol reaktifi katılarak vorteksle iyice homojenize edilmiştir. Tüplerin ağzı kapatılarak benmaride 7 dakika inkübe edilmiş ve daha sonra 15 dakika oda sıcaklığına getirilip, spektrofotometrede köre karşı 830 nm absorbans değeri okutulmuştur. Elde edilen absorbans değerleri 0.08, 0.123, 0.165, 0.210, 0.26, 0.3, 0.346, 0.395, 0.46'dır. Bu değerler konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek fosfor standart grafiği elde edilmiştir.

Aşağıdaki şekilde ölçümler sonucu elde edilen fosfor standart grafiğinin bir doğru haline getirilmiş hali ve doğrunun denklemi ($y=2.789x+0.0275$) gösterilmektedir. Ölçümle bulunan absorbans değerleri bu denklemde yerine konularak fosfor konsantrasyonları ve miktarları hesaplanmıştır.



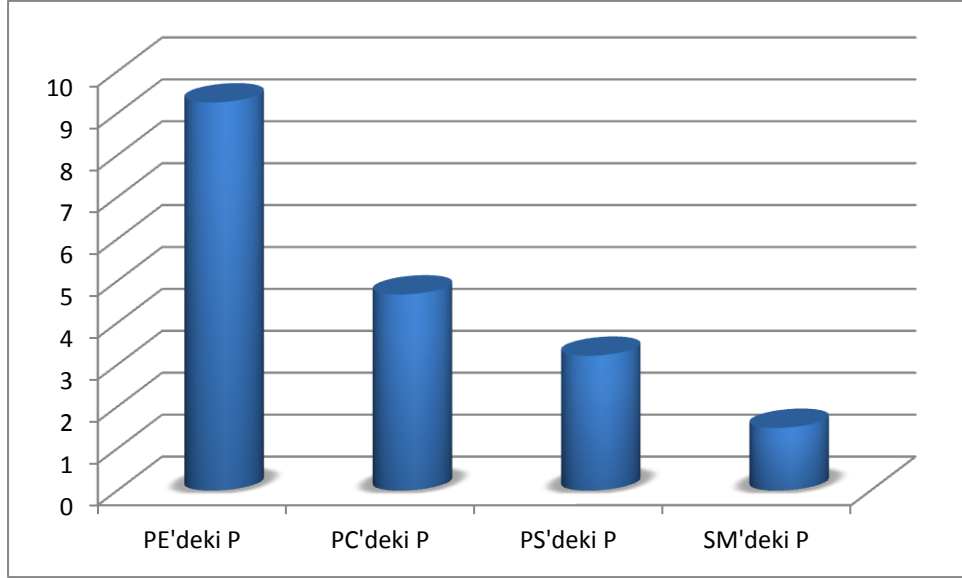
Şekil 6.1. Ölçümler sonucu elde edilen fosfor standart grafiğinin bir doğru haline getirilmiş hali.

Aşağıdaki tabloda kuzu akciğerinden elde edilen doku tromboplastininin major fosfolipit gruplarına ait fosfor konsantrasyonları, miktarları ve % değerleri verilmiştir.

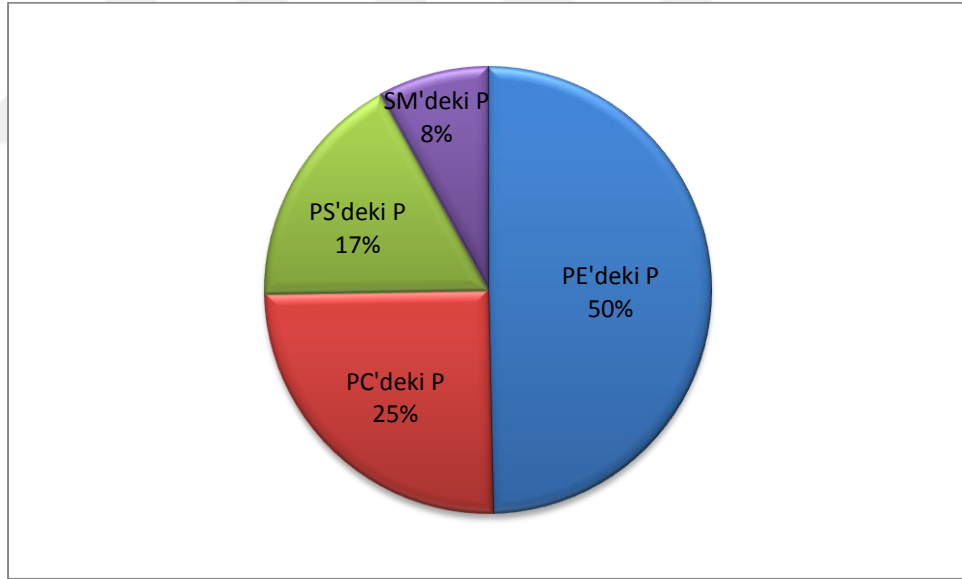
Tablo 6.4. Kuzu akciğerinden elde edilen doku tromboplastininin major fosfolipit gruplarına ait (PE, PC, PS, SM) fosfor konsantrasyonları, miktarları ve % değerleri.

	Absorbans (830 nm)	Konsantrasyon (mg/ml)	mg	%
PE	0.458	0.1543564	9.261384	50
PC	0.245	0.077984941	4.679096	25
PS	0.177	0.053603442	3.216207	17
SM	0.097	0.024919326	1.49516	8

Kuzu akciğerinden elde edilen doku tromboplastinindeki fosfolipidlerde bulunan fosfor miktarının sıralaması PE>PC>PS>SM şeklinde tesbit edilmiştir. Aşağıdaki şekillerde fosfolipitlerde bulduğumuz fosfor miktarları mg ve % olarak görülüyor.



Şekil 6.2. Kuzu akciğerinden elde edilen doku tromboplastininin major fosfolipit gruplarına ait (PE, PC, PS, SM) fosfor miktarlarının değişimi (mg).



Şekil 6.3. Kuzu akciğerinden elde edilen doku tromboplastininin major fosfolipit gruplarına ait (PE, PC, PS, SM) fosfor miktarlarının değişimi (%).

7.TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada koyun ve kuzu akciğerinden ayrı ayrı izole edilen TF'nin aktivitesinde lipitlerin etkisi incelenmiş ve lipid ekstraksiyonundaki fosfolipidlerin ayrımı yapılarak içeriğindeki fosfor miktarı ölçülmüştür.

Bu amaçla mezbahadan taze kesilen henüz doğal sıcaklığını kaybetmemiş kuzu ve koyun akciğerleri buz kabı içinde laboratuvara getirilip damarlarından ve diğer oluşumlardan temizlenmiştir. İki akciğer de ayrı ayrı çalışılmıştır. Homojenize edildikten sonra 20 gr. örnek lipid analizi için +4⁰C'lik buzdolabına konulmuş geri kalanıyla Cohen and Chargaff (118,119) ve Chargaff et al. (120) tarafından tarif edilen prensiple özetlenen metotla doku tromboplastini ekstraktı (koyun ve kuzu) ve saflaştırılmış doku tromboplastini (kuzu) hazırlanıp Quick (1935) yöntemi kullanılarak protrombin zamanı testi ile aktiviteleri tayin edilmiştir.

Kuzu akciğerinden elde edilen doku tromboplastin ekstraktı koyununkinden daha aktif bulunmuştur. Tromboplastinin ekstraksiyonla ayrılan lipit kısmında aktivite görülürken, protein kısmında görülmemiştir. İkisi bir aradayken en yüksek aktiviteye sahip oldukları görülmüştür. Saflaştırma işlemi aktiviteyi düşürmüştür. Koyun akciğerindeki lipit miktarı kuzu akciğerinden daha fazla bulunmuştur. Kuzu akciğerinden elde edilen doku tromboplastininde fosfolipidlerin sıralaması PE>PC>PS>SM şeklinde tesbit edilmiştir.

Kullandığımız prosedür ile başlangıç dokusunun 100 gramından, 65 mg saflaştırılmış akciğer tromboplastini elde edilmiştir.

Liyofilizasyon işleminde azotla dondurulan tromboplastin ekstraktı direk cihaza konulandan daha çabuk kurumuştur.

TF, hemostatik sistemi başlatmaktan sorumlu bir membran glikoproteinidir. Bir apoprotein kısmı ve parsiyal tromboplastin aktivitesinin ekspresyonu için gerekli olan bir fosfolipid kısmından oluşur. TF ile ilgili çalışmalar 1800'lü yıllarda başlamış günümüzde ise artan yoğunlukla devam etmektedir. Çünkü pıhtının ön planda olduğu kalp damar hastalıkları günümüzde de ölüm ve kaliteli yaşamı tehdit yönünden ilk sırada yerini korumaya devam etmektedir. Bu nedenle TF ekspresyonunun artışı trombofilinin başlıca nedeni kabul edilir. Bu membran proteinin pek çok metabolik faaliyet içinde olduğu bildirilmiştir (29,69,122).

1886'da Wooldridge kanda bulunmayan fakat dokuda bulunan bir maddenin pıhtılaşmayı hızlandığını bildirmiş (29) ve bu doku homojenatlarının çok dilüe olarak dahi hayvanlara enjekte edildiğinde ani ölümlerin görülmesi (69), dokuda pıhtı oluşturan çok güçlü bir ajan olduğu fikrinin ortaya atılmasına neden olmuştur (86).

TF kanla temas ettikten sonra ekstrinsek ve intrinsek sistem uyarılır. TF'nin aktifleşmesiyle oluşan trombin bir taraftan sağlam pıhtı oluşmasını sağlarken bir taraftan da trombositleri uyararak aktifleştirir ve trombosit adezyon, sekresyon ve agregasyonu hızlanır. Aterotromboz ve hiperkoagülasyon birbirinin hem tetikleyicisi hem de sonucudur (38,51-53).

TF, FVIIa için hem kofaktör, hem de reseptördür ve normalde sadece monosit, makrofaj gibi hücrelerde sentezlenir. Subendotelde bulunan TF damar hasarı ile kana karışır ve burada plazma proteinleri ile karşılaşınca hemostaz ve trombusu başlatır (29). FVII aktivitesindeki artışın koroner arter hastalıkları ile orantılı olduğunu bildirilmiştir (74).

Hemostazın başlatıcısı olan TF'nin fosfolipidleri hücre hasarı sonrasında kana sızar ve Ca^{++} varlığında FVII veya FVIIa ile bir kompleks oluşturur. Bu kompleks direkt olarak ekstrinsek yolda FX'nu ve ayrıca intrinsek yolda FIX'u aktive eder. Bunun sonucunda da pıhtı oluşur. Pıhtılaşma yetersizlikleri, oral antikoagulan tedavisinin takibi, trombofili tedavisinin takibi gibi nedenlerle çok kullanılan protrombin zamanı testi (PTZ) aynı zamanda önemli bir karaciğer fonksiyon testidir. Çünkü bir pıhtılaşma proteini olan protrombin, karaciğer sentez kabiliyetini kaybettiği zaman sentezlenemez. Rutin laboratuvarlarda ekstrinsek pıhtılaşma sistemini değerlendirmede kullanılan TF'nin kan ve hücrelerdeki etki mekanizması ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (28,29).

TF kanda FIX ve FX yönünde FVIIa'nın proteolitik aktivitesini arttıran bir kofaktör gibi işlev görür. Doku faktörünün kofaktör fonksiyonunun tam olabilmesi için pıhtılaştırıcı fosfolipidler ile bağlantılı olması gerekir (123). Bulduğumuz literatüre göre Chargaff ve ark. akciğer tromboplastinini incelediler ve saflaştırdıkları tromboplastinin %7.7 nitrojen ve %1.6 fosfor içerdiğini bildirmişlerdir. 1940'lı yıllarda elde edilen bu verilerle akciğer tromboplastini bir lipoprotein olarak sınıflandırıldı. Tromboplastin alkol-eter çözeltisi ile ekstre edildiğinde orijinal

ağırlığının yaklaşık %50'sinin azaldığı görüldü. Geri kalan %50'sinin %40-45'i de aşağıdaki lipid içeriğine sahip olduğu gösterildi: %19 kolesterol, %18 trigliserid ve %63 fosfolipid. Fosfolipidlerin içeriği ise: %25 lesitin, %25 sefalin ve %12 sfingomiyelin'den oluşmaktaydı. Lipid ekstraksiyonundan sonra geri kalan materyal protein ve karbonhidratlardan oluşuyordu. Williams fosfolipidlerin pıhtılaşmada güçlü bir enzimatik aktivite gösterdiğini bildirmiştir (32,33).

1960'lı yıllarda çeşitli araştırmacılar tam tromboplastik aktivite için lipid ve protein kısmının bir arada olması gerektiğini bildirdiler. Protein kısmı etkisiz kalırken lipidin kendisinin intrinsek yolda bir parsiyel tromboplastin gibi çalıştığını gördüler. Lipid ve protein kısımlarını yeniden birleştirerek tam tromboplastin aktivitesi elde ettiler. Protein kısmının analizi 15 aminoasidi gösterirken lipid kısmının PE, PC, PS, PI, lizofosfatidiletanolamin ve SM'yi kapsadığı görülmüştür (32,33).

Kan pıhtılaşmasında fosfolipidlerin etkisi yoğun bir şekilde araştırılmış ve çelişkili raporlar yayınlanmıştır. Örneğin, PS, bir platelet aktifleştiricisi olarak tarif edilmiştir. Fakat aynı zamanda tromboplastin jenerasyon testinin bir inhibitörü olduğu ve infüzyon sırasında bir antikoagulan olduğu belirtilmiştir. PE bir pıhtılaşma hızlandırıcısı olarak tarif edilmiştir. Baz araştırmacılar PE ve PC kombinasyonunu daha etkin bulurken bazıları PC ve PS kombinasyonu daha etkin buldular. Bu çelişkili sonuçlar büyük olasılıkla sistemlerin farklılığından kaynaklanmaktadır. Fosfolipid partiküllerinin kolloidal yapı farklılıkları, pH veya iyon, çeşitli fosfolipidlerin kompozisyon oranı veya saflığı, fosfolipidlerdeki doymamış yağ asitlerinin oranı da bu farklılıkları desteklemiş olabilir. Sadece tek asitten oluşan veya negatif yüklü fosfolipid içeren süspansiyonlar önemli ölçüde aktiftir (32,33).

Çalışmalar CD142 olarak da isimlendirilen doku faktörünün kanda da bulunduğunu, çok yönlü fonksiyon yaptığını, sitokinlerle ilişkili oldukları için inflamasyonun da tetiklendiğini, ya da artan sitokinlerin TF'yi etkileyerek trombus oluşumunu hızlandırdığı bildirilmektedir (83,124).

TF hem arteriyel tromboemboli oluşumunda, hem de sinyal iletiminde yer aldığı için koagülasyon ve inflamasyonda başlıca rolü oynar (69,78-80).

Hiperkoagülasyon, inflamasyon, hiperlipidemi ve lipid peroksidasyonu arterlerde ateroskleroz gelişmesini hızlandırır ve özellikle koroner arter hastalıkları için ciddi bir risk faktörüdür (69,80).

Dolaşımdaki TF'nin çeşitli biçimleri tarif edilmiş ve trombojen olarak tanımlanmıştır. Tromboz oluşumuna plazma TF'sinin katkısına yeni bir bakış açısı kazandırmayı amaçlayan her yıl daha deneysel ve epidemiyolojik çalışmalar yayınlanmıştır. Trombozu azaltmak veya önlemek için TF koagülan fonksiyonunun doğrudan hedeflenmesi, kanama komplikasyonlarına bağlı olarak riskli olabilir (125).

TF aktifleşmesinde fosfatidilserinin (PS) hücre zarının dışında açığa çıkmasının kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir. Son moleküler dinamik simülasyon çalışmaları, TF ektodomaininin doğrudan PS ile etkileşime girebileceğini akla getirmektedir. Bazı çalışmalar PS ile etkileşime giren TF'nin, hücre yüzeyinde TF koagülan aktivitesine katkıda bulunduğunu ve ayrıca, varsayılan lipid bağlama bölgesinin dışındaki TF bölgelerinin TF'nin PS'ye bağlı aktifleşmesine katkıda bulunabileceğini de göstermektedir (126).

1935 yılında Quick; TF'yi kullanarak kendi adı ile anılan ve günümüzde hala çok kullanılan, protrombin zamanı testini (PTZ) keşfetmiştir. Bu testin aktif maddesi doku tromboplastinidir (34). Tromboplastin reaktifleri beyin, akciğer ya da plasenta ekstrallerinden saflaştırılan kompleks karışımlardır. Orjinal olarak hayvan ya da insan kaynaklı ekstraktlar ham dokudan elde edilir (22).

Son zamanlarda rekombinant teknolojiyle fosfolipid vezükülleri içeren tromboplastinler de üretilmeye başlanmıştır. İnsan doku faktörü içeren yeni nesil rekombinant tromboplastinleri (rTF), FVII seviyelerine aşırı duyarlı olmasından dolayı eleştirilmektedir. FVII'nin plazma yarı ömrü kısadır, bu yüzden özellikle oral antikoagülan tedavinin başlangıcında FVII seviyelerinde dalgalanma olur (5,22).

Tromboplastin saflaştırması için Quick tavşan beyni ekstraktı kullanırken, bazıları insan ve sığır beyni kullandı. Güncel PTZ sistemleri tromboplastin reaktiflerinin üç farklı türünün kullanımına dayanır: insan, tavşan ve sığır. Reaktifler genellikle tavşan veya insan TF'si içerir ve dokulardan ekstre ya da rekombinant DNA teknolojisi ile hazırlanırlar. PTZ testinin sonucu tromboplastinin doğası ve kullanılan yöntemle sıkı bir şekilde bağlıdır. Orjinal Quick testinin pek çok değişik

versiyonu kullanılmıştır. Tromboplastinin kalitesi, belirleyici bir öneme sahiptir. Farklı tromboplastinler aynı test plazması için çok farklı sonuçlar verebilir. PTZ testinin modifikasyonlarının çokluğu ve üretilen tromboplastinlerin farklılığı karışıklığa neden olmuştur. (105).

Karaciğer yetmezliği ile ilgili bazı çalışmalarda farklı tavşan beyni veya tavşan beyni, insan plasentas ve insan rekombinant tromboplastinleri ile elde edilen INR değerleri karşılaştırılırken aralarında nispeten zayıf bir korelasyon olduğu rapor edilmiştir (22).

TF'ler, K vitaminine bağımlı pıhtılaşma faktörlerinin seviyelerindeki azalmaya karşı çok duyarlıdır. Üretilen TF'lerin içeriğindeki farklılıklar PTZ testinin sonuçlarını etkilemektedir. TF'lerin yanıtları ve oral antikoagulanların sebep olduğu koagülasyon yetersizliklerinin yanıtları değişkendir. Bu düzeltilmezse oral antikoagulan dozunun kabul edilemez farklılıklara yol açacağı görülmüş ve TF duyarlılık farklılıklarını telafi etmek için bir kalibrasyon sistemi (Uluslararası Duyarlılık İndeksi (ISI) ve Uluslararası Normalleştirilmiş Oran (INR)) geliştirilmiştir. Üretici firmalar, ürettiği TF'yi dünya sağlık örgütüne (WHO) gönderirler ve oradan bir ISI değeri alırlar. Böylece hastaların değişik laboratuvarlarda ölçülen protrombin zamanları standartize edilir. WHO'nun standardize ettiği bir TF kullanılırsa laboratuvarlar arası veya ülkeler arası farklılıklar ortadan kalkacaktır (22,123).

Başlangıçta, protrombin zamanları manuel tekniklerle yapıldı. Günümüzde, çoğu klinik laboratuvarlarda pıhtılaşma zamanlarının belirlenmesine yönelik otomatik aletler (koagülometreler) kullanılmaktadır. ISI'nın sadece tromboplastin reaktifine değil aynı zamanda kullanılan koagülometre türüne bağlı olduğu da bilinmektedir. Birçok tromboplastin üreticisi şimdi reaktifler için enstrümana özgü ISI değerleri sağlar. Bir tromboplastinin kalibrasyonu, aynı türün benzer preparatları veya aynı tipteki benzer preparatlar arasında kıyaslamalar yapıldığında genel olarak daha doğru sonuç verir. Bir tromboplastinin kalibrasyonu aynı tür veya aynı tipin benzerleri arasında yapılan hassas karşılaştırmalıdır. Bu nedenle WHO insan, tavşan ve sığır tromboplastinleri için Uluslararası Referans preparatları oluşturmuştur. Kalibrasyon aynı türün tromboplastinleri arasında yapılır (123).

Bazı araştırmacılar FV ve FVII eksiklikleri INR değerleri benzer olduğunda bile karaciğer hastalığı olan hastalarda oral antikoagulan kullananlardan genellikle daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bu nedenlerden dolayı, tromboplastinlerin çeşitli pıhtılaşma faktörü eksikliklerine nasıl cevap verdiğini anlamak önemlidir. Hemen hemen aynı ISI değerlerindeki tromboplastinlerin pıhtılaşma faktörlerine farklı hassasiyetleri olabilir (22,123).

Bütün memelilerin doku ekstreleri (doku tromboplastinleri) güçlü pıhtı oluşturma aktivitesine sahiptir. Laboratuvarda koagulasyon faktörlerini araştırmak veya bu faktörlerin klinik amaçlı tesbitinde doku ekstreleri önemli rol oynar. Geçmişte timus, testis, plasenta, akciğer, beyin ve diğer organ ekstreleri kullanılmıştır ancak akciğer ve beyin tromboplastinleri bu tür araştırmalarda daha çok kabul grmştir. Tromboplastinler temel olarak çeşitli organların ham ekstrelerinin salın veya buffer solüsyonlarıyla işlenmesiyle elde edilmiştir. Bu ham ekstreler kimyasal değildir. Bunlar pıhtıyı tetikleme aktivitesinin yanında, pıhtıyı geciktirici aktiviteye sahip maddeler ve plazma veya kan pıhtılaşmasına hiç etkisi olmayan materyalleri de içerir. Araştırma amaçlı çalışmalarda bu ham ekstratlar daha çok saflaştırılmalıdır. Böylece bunlar kimyasal olarak hem lipoprotein hem de predominant lipid özelliği kazanır. Ekstrat, heterojen bir kompozisyonu gösterir. Akciğer tromboplastin ekstraktı daha fazla saflaştırılarak "akciğer tromboplastini" elde edilir. Bu material esas olarak bir lipoproteindir (35). Biz bu nedenle kısaca özetlenen genel bilgiler ve tartışma bölümünde kısaca özetlenen tromboplastinin lipid kısmını inceledik.

Sonuç olarak, insan organizmasında bu kadar etkin rolleri olan doku faktörünün (DF) aktivitesinde lipidlerin etkisi ile ilgili n çalışmamız bundan sonraki çalışmalarımıza alt yapı oluşturacaktır. Bu çalışmanın sonuçları kendi ürettiğimiz DF'nin standardize edilerek protrombin zamanı testinde kullanılabileceğini göstermiştir ve bulgularımız tromboplastin üretiminde literatüre katkı sağlayacaktır.

8.KAYNAKLAR

- 1- Witkowski M, Landmesser U, Rauch U. Tissue factor as a link between inflammation and coagulation. *Trends in cardiovascular medicine* 26.4:297-303, 2016.
- 2- Dydek EV, Chaikof EL. Simulated thrombin generation in the presence of surface-bound heparin and circulating tissue factor. *Annals of biomedical engineering* 44.4.1072-1084, 2016.
- 3- Mackman N. The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. *Anesthesia and analgesia* 108.5:1447, 2009.
- 4- Woei-A-Jin FJSH, Tesselaar MET, Rodriguez PG, Romijn FPHTM, Bertina RM, Osanto S. Tissue factor-bearing microparticles and CA19.9:two players in pancreatic cancer-associated thrombosis&quest.*British Journal of Cancer*, 2016.
- 5- Dahlbäck B. Blood coagulation. *The Lancet*. 355(9215).1627-1632, 2000.
- 6- Podoplelova NA, Sveshnikov AN, Kurasawad JH, Sarafanovd AG, Chamboste H, Vasil'evf SA, Deminaa IA, Ataulakhanova FI, Alessig MC, Pantelev MA. Hysteresis-like binding of coagulation factors X/Xa to procoagulant activated platelets and phospholipids results from multistep association and membrane-dependent multimerization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1858.6.1216-1227, 2016.
- 7- Mackman N. The many faces of tissue factor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7.s1:136-139, 2009.
- 8- Leea RD, Barcelb DA, Williamsa JC, Wang JG, Bolesa JC, Manlyc DA, Keya NS, Mackman N. Pre-analytical and analytical variables affecting the measurement of plasma-derived microparticle tissue factor activity. *Thrombosis research* 129.1:80-85, 2012.
- 9- Armstead VE, Opentanova IL, Minchenko AG, Lefer AM. Tissue factor expression in vital organs during murine traumatic shock: role of transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *Anesthesiology*. 91:1844–1852, 1999.

- 10-** Aras O, Shet A, Bach RR, Hysjulien JL, Slungaard A, Hebbel RP, et al. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood*. 103: 4545–4553, 2004.
- 11-** Rao LV, Pendurthi UR. Tissue factor-factor VIIa signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25: 47-56, 2005.
- 12-** Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol*. 134:1087, 1989.
- 13-** Eddleston M, de la Torre JC, Oldstone MB, Loskutoff DJ, Edgington TS, Mackman N. Astrocytes are the primary source of tissue factor in the murine central nervous system. A role for astrocytes in cerebral hemostasis. *J Clin Invest*. 92:349, 1993.
- 14-** Giesen PLA, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roqué M, Fallon JT et al. Blood-borne tissue factor: Another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2311, 1999.
- 15-** Rao L, Rapaport SI. Activation of factor VII bound to tissue factor: a key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6687, 1988.
- 16-** Østerud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5260, 1977.
- 17-** Shigematsu Y, Miyata T, Higashi S, Miki T, Sadler JE, Iwanaga S. Expression of human soluble tissue factor in yeast and enzymatic properties of its complex with factor VIIa. *J Biol Chem* 267:21329, 1992.
- 18-** Lawson JH, Butenas S, Mann KG. The evaluation of complex-dependent alterations in human factor VIIa. *J Biol Chem* 267:4834, 1992.
- 19-** Neuenschwander PF, Morrissey JH. Roles of the membrane-interactive regions of factor VIIa and tissue factor. The factor VIIa Gla domain is dispensable for binding to tissue factor but important for activation of factor X. *J Biol Chem* 269:80001, 1994.
- 20-** Butenas, S. Tissue factor structure and function. *Scientifica*, Article ID 964862, 15 pages, 2012.

- 21-** Krishnaswamy S, Field KA, Edgington TS, Morrissey JH, Mann KG. Role of the membrane surface in the activation of human coagulation factor X. *J Biol Chem* 267:26110, 1992.
- 22-** Smith SA, Comp PC, Morrissey JH. Phospholipid composition controls thromboplastin sensitivity to individual clotting factors. *J Thromb Haemost.* 4: 820-827, 2006.
- 23-** Hirsh J, Fuster V, Ansell J, Halperin JL. American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Guide to warfarin therapy. *Circulation.*107: 1692–711, 2003.
- 24-** Zehnder JL, Leung LLK, Landaw SA. Clinical use of coagulation tests. Waltham, MA: UpToDate, 2008.
- 25-** Wolberg AS, Mast AE. Tissue factor and factor VIIa–hemostasis and beyond. *Thrombosis research*, 129, S1-S4, 2012.
- 26-** Emekli N. Temel ve Uygulamalı Biyokimya. p.403-450 Nobel Tıp Kitapevleri Tic.Ltd.Şti. İstanbul, 2004.
- 27-** Emekli NB, Ulutin ON. Some properties of autoprothrombin II-A anticoagulant, *Recent Progress in Blood Coagulation and Thrombosis Research. Bibliith Haem.*44:15-20,1978.
- 28-** Oktay NŞ, Deneysel Hiper ve Hipotiroidi Yapılmış Hiperlipidemik Sıçanların LDL Oksidasyonu ve Trombusa Eğilimlerinin İncelenmesi. M.Ü. Biyokimya A.B.D. Doktora Tezi, s.43-59, İstanbul, 2011.
- 29-** Emekli N. Temel ve Uygulamalı Biyokimya s.445-458, 4. Baskı, Akademi Matbaası Marmara Yayınları. İstanbul, 2006.
- 30-** Tayhan M, Jinekolojik Malignitelerde Doku Faktörü Yolu İnhibitör (TFPI) Düzeyleri, Haseki E.A.H, Uzmanlık Tezi, s.5-33, İstanbul, 2005.
- 31-** Hecht ER, Cho MH. Seegers WH. Thromboplastin: Nomenclature and preparation of protein-free material different from platelet factor 3 or lipid activator. *American Journal of Physiology--Legacy Content.* 193(3). 584-592, 1958.
- 32-** Mammen EF. Physiology and Biochemistry of Blood Coagulation. in: *Thrombosis and Bleeding Disorders Theory and Methods.* Eds. Bang

- NU, Beller FK, Deutsch E, Mammen EF. Academic Press, New York-London, s.24-26, 1971.
- 33-** Beller FK and Graeff H. Equipment and General Requirements of the coagulation Laboratory. in: Thrombosis and Bleeding Disorders Theory and Methods. Eds. Bang NU, Beller FK, Deutsch E, Mammen EF. Academic Press, New York-London, s.57-59, 1971.
- 34-** Butenas S, Orfeo T, Mann K. Tissue factor in coagulation: Which? Where? When?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1989-96, 2009.
- 35-** Mammen EF. Purification of Plasma Thromboplastin. in: Thrombosis and Bleeding Disorders Theory and Methods. Eds. Bang NU, Beller FK, Deutsch E, Mammen EF. Academic Press, New York-London, s.167-172, 1971.
- 36-** Lindahl TL, Ramström S, Boknäs N, Faxälv L. Caveats in studies of the physiological role of polyphosphates in coagulation. *Biochemical Society Transactions*. 44(1). 35-39, 2016.
- 37-** Nomura S, Niki M, Nisizawa T, Tamaki T, Shimizu M. Microparticles as Biomarkers of Blood Coagulation in Cancer. *Biomarkers in cancer*. 7.51, 2015.
- 38-** Tatsumi K, Mackman N. Tissue factor and atherothrombosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 22(6). 543-549, 2015.
- 39-** Antoniak S, Tatsumi K, Hisada Y, Milner JJ, Neidich SD, Shaver CM, Mackman N. Tissue factor deficiency increases alveolar hemorrhage and death in influenza A virus-infected mice *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 14: 1238-1248, 2016.
- 40-** Arderiu G, Peña E, Badimon L. Angiogenic microvascular endothelial cells release microparticles rich in tissue factor that promotes postischemic collateral vessel formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 35(2). 348-357, 2015.
- 41-** Wong AE, Kwaan HC, Grobman WA, Weiss, Wong CA. Microparticle source and tissue factor expression in pregnancy. *Annals of hematology*. 94(8). 1285-1290, 2015.
- 42-** Xu N, Dahlback B, Ohlin AK, Nilsson A. Association of vitamin K dependent coagulation proteins and C4b binding protein with triglyceride rich lipoproteins of human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 18:33-39, 1998.

- 43-** Mathieu E, Van Dreden P, Aulagnier J, Grusse M, Dreyfus JF, François D, Vasse M. Decreased levels of procoagulant phospholipids in bleeding patients treated by vitamin K antagonists. *Thrombosis research*. 137. 36-40, 2016.
- 44-** Miyares MA, Davis K. Newer oral anticoagulants: a review of laboratory monitoring options and reversal agents in the hemorrhagic patient. *Am J Health Syst Pharm* 69.17 :1473-1484, 2012.
- 45-** Biggs R, Douglas AS. The thromboplastin generation test. *Journal of clinical Pathology* 6.1: 23, 1953.
- 46-** Hicks ND, Pitney WR. A rapid screening test for disorders of thromboplastin generation. *British journal of haematology* .3.2:227-237, 1957.
- 47-** Van den Besselaar AMHP, Witteveen E, Tripodi A. Calibration of combined thromboplastins with the International Standard for Thromboplastin, rabbit, plain. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 9.4 : 881-882, 2011.
- 48-** Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clinical chemistry*. 62(5). 699-707, 2016.
- 49-** Gajsiewicz JM, Morrissey JH. Structure–Function Relationship of the Interaction between Tissue Factor and Factor VIIa. In *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. Thieme Medical Publishers. 41.07.682-690, 2015.
- 50-** Fleck RA, Rao LV, Rapaport SI, Varki N. Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thromb Res*.59:421-437, 1990.
- 51-** Pan Shuchong, White TA, Witt TA, Chiriac A, Mueske CS, Simari RD. Vascular directed tissue factor pathway inhibitor overexpression regulates plasma cholesterol and reduces atherosclerotic plaque development. *Circ Res*.105:713-720, 2009.
- 52-** Taubman MB, *Atherosclerosis, thrombosis and coroner artery disease*. Ed: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U: *Williams Hematology*, s.1743-52, 6. Ed. Mc Graw-Hilb. 2001.
- 53-** ten Cate H, Hemker HC. Thrombin Generation and Atherothrombosis: What Does the Evidence Indicate?. *Journal of the American Heart Association*.5(8). e003553, 2016.

- 54-** Camera M, Toschi V, Brambilla M, Lettino M, Rossetti L, Canzano P, Tremoli E. The role of tissue factor in atherothrombosis and coronary artery disease: insights into platelet tissue factor. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. Vol. 41. No. 07. Thieme Medical Publishers, 2015.
- 55-** Brambilla M, Facchinetti L, Canzano P, Rossetti L, Ferri N, Balduini A, Toschi V. Human megakaryocytes confer tissue factor to a subset of shed platelets to stimulate thrombin generation. *Thrombosis and haemostasis* 114.3: 579-592, 2015.
- 56-** Cimmino G, Ciccarelli G, Golino P. Role of tissue factor in the coagulation network. In *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. Thieme Medical Publishers. 41.07. 708-717, 2015.
- 57-** Kopec AK, Luyendyk JP. Coagulation in liver toxicity and disease: Role of hepatocyte tissue factor. *Thrombosis research*, 133, S57-S59, 2014.
- 58-** Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, Sturk A, Smit JW, Radder JK. Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 106.19:2442-2447, 2002.
- 59-** van Es N, Bleker S, Sturk A, Nieuwland R. Clinical Significance of Tissue Factor–Exposing Microparticles in Arterial and Venous Thrombosis. In *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. Thieme Medical Publishers. 41.07: 718-727, 2015.
- 60-** Day SM, Reeve JI, Pederson B, Farris DM, Myers DD, Im M, Wakelfield TW, Mackman N, Fay WP . Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from primarily from the blood vessel wall. *Blood*. 105:192-198, 2005.
- 61-** Emekli N. Biochemical Aspects of Haemostasis. In: *Basic and Applied Biochemistry*. Sayfa:341-417, Marmara Üniversitesi Yayınları No.556, Dişhekimliği Fakültesi Yayın No.3. İstanbul, 1994.
- 62-** Sie P. The value of laboratory tests in the diagnosis of venous thromboembolism. *Haematologica*. 80(suppl):57-60, 1995.
- 63-** Iqbal O, Tobu M, Aziz S, Gerdisch M, Da Valle M, Demir M, Fareed J. Successful use of recombinant hirudin and its monitoring by ecarin-clotting

time in patients with heparin-induced thrombocytopenia undergoing off-pump coronary artery revascularization. *J Card Surg.* 20(1):42-51, 2005.

- 64-** Ding L, Ma W, Littmann T, Camp R, Shen J. The P2Y2 nucleotide receptor mediates tissue factor expression in human coronary artery endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry.* 286(30). 27027-27038, 2011.
- 65-** Liu Y, Zhang L, Wang C, Roy S, Shen J. Purinergic Control of Tissue Factor Transcription in Human Coronary Artery Endothelial Cells: New AP-1 Site and Negative Regulator. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 35.Suppl 1: A190-A190, 2015.
- 66-** D'Andrea D, Ravera M, Golino P, Rosica A, De Felice M, Ragni M, Gargiulo A. Induction of tissue factor in the arterial wall during recurrent thrombus formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.*23.9:1684-9, 2003.
- 67-** Drake TA, Ruf W, Morrissey JH, Edgington TS. Functional tissue factor is entirely cell surface expressed on lipopolysaccharide-stimulated human blood monocytes and a constitutively tissue factor-producing neoplastic cell line. *The Journal of cell biology,* 109(1), 389-395, 1989.
- 68-** Bonderman Diana, Teml A, Jakowitsch J, Adlbrecht C, Gyöngyösi M, Sperker W, Maurer G. Coronary no-reflow is caused by shedding of active tissue factor from dissected atherosclerotic plaque. *Blood* 99.8 : 2794-2800, 2002.
- 69-** Kılıç B, Batirel S, Akdeste Z, Emekli N. Deneysel Hiperlipidemi ve Apo-B Konjugatı Uygulamasının Kan Doku Faktörü Seviyesi ve Karaciğer Doku Faktörü Aktivitesi Üzerine Etkileri. *MÜSBED.* 2(2):64-71, 2012.
- 70-** Yi L, Huang X, Guo F, Zhou Z, Dou Y, Huan J. Yes-associated protein (YAP) signaling regulates lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in human endothelial cells. *Surgery* 159.5: 1436-1448, 2016.
- 71-** Kopec AK, Luyendyk JP. Coagulation in liver toxicity and disease: Role of hepatocyte tissue factor. *Thrombosis research,* 133, S57-S59, 2014.
- 72-** Rautou PE, Tatsumi K, Antoniak S, Owens AP, Sparkenbaugh E, Holle LA, Mackman N. Hepatocyte tissue factor contributes to the hypercoagulable state in a mouse model of chronic liver injury. *Journal of hepatology.* 64(1).53-59, 2016.

- 73-**Fregula CF, Marchese P, Gruber A, Ruggeri ZM, Ruf W. P2X7 receptor signaling contributes to tissue factor-dependent thrombosis in mice. *J Clin. Invest.*7:2932-2944, 2000.
- 74-**Kjalke M, Silveira A, Hamsten A, Hedner U, Ezban M. Plasma lipoproteins enhance tissue factor-independent factor VII activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*20:1835- 1841, 2000.
- 75-**Pan Shuchong, White TA, Witt TA, Chiriac A, Mueske CS, Simari RD. Vascular directed tissue factor pathway inhibitor overexpression regulates plasma cholesterol and reduces atherosclerotic plaque development. *Circ Res.*105:713-720, 2009.
- 76-**Mayer MP, Tracy RP, Tracy PB, van't Veer C, Sparks CE, Mann KG. Plasma lipoproteins support prothrombinase and other procoagulant enzymatic complexes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*18:458- 465, 1998.
- 77-**Mitropoulos KA, Miller GJ, Reeves BEA, Wilkes HC, Cruickshank JK. Factor VII coagulant activity is strongly associated with the plasma concentration of large lipoprotein particles in middle aged men. *Atherosclerosis.*76:203-208, 1989.
- 78-**Reganon E, Vila V, Martinez – Sale V, Vaya A, Aznar J. Inflammation, fibrinogen and thrombin generation in patients with previous myocardial Rinfarction. *Haematologica.*87:740-745, 2002.
- 79-**Edén D, Siegbahn A, Mokhtari D. Tissue factor/factor VIIa signalling promotes cytokine-induced beta cell death and impairs glucose-stimulated insulin secretion from human pancreatic islets. *Diabetologia.* 58(11). 2563-2572, 2015.
- 80-**Maugeri N, Manfredi AA. Tissue factor expressed by neutrophils: another piece in the vascular inflammation puzzle. In *Seminars in Thrombosis and Hemostasis.* Thieme Medical Publishers. 41.07.728-736, 2015.
- 81-**Xue M, Sun Z, Shao M, Yin J, Deng Z, Zhang J, Han Y. Diagnostic and prognostic utility of tissue factor for severe sepsis and sepsis-induced acute lung injury. *Journal of translational medicine* 13.1: 1, 2015.

- 82-** Shi D, Song Z, Yin J, Xue M, Yao C, Sun Z, Sun S. Genetic variation in the tissue factor gene is associated with clinical outcome in severe sepsis patients. *Critical Care* 18.6:1, 2014.
- 83-** Bakarewa MI, Morrissey JH, Tarkowski A. Tissue factor as a proinflammatory agent. *Arthritis Res.*4:190-195, 2002.
- 84-** Rondina MT, Tatsumi K, Bastarache JA, Mackman N. Microvesicle Tissue Factor Activity and Interleukin-8 Levels are Associated with Mortality in Patients with Influenza A/H1N1 Infection. *Critical care medicine.* 44.7, 2016.
- 85-** Day SM, Reeve JI, Pederson B, Farris DM, Myers DD, Im M, Wakelfield TW, Mackman N, Fay WP . Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from the blood vessel wall. *Blood.*105:192-198, 2005.
- 86-** Mackman N, Taubman M. Tissue factor: past, present and future. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*29:1986-88, 2009.
- 87-** Tatsumi K, Antoniak S, Monroe DM, Khorana AA, Mackman N. Evaluation of a new commercial assay to measure microparticle tissue factor activity in plasma: communication from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 12.11: 1932-1934, 2014.
- 88-** Rautou PE, Vion AC, Luyendyk JP, Mackman N. Circulating microparticle tissue factor activity is increased in patients with cirrhosis. *Hepatology.* 60(5).1793-1795, 2014.
- 89-** Kurz DJ, Payeli S, Greutert H, Schumacher SB, Lüscher TF, Tanner FC. Epigenetic regulation of tissue factor inducibility in endothelial cell senescence. *Mechanisms of ageing and development* 140: 1-9, 2014.
- 90-** Thaler J, Koppensteiner R, Pabinger I, Ay C, Gremmel T. Microparticle-associated tissue factor activity in patients with acute unprovoked deep vein thrombosis and during the course of one year. *Thrombosis research.* 134(5).1093-1096, 2014.
- 91-** Iacoviello L, Di Castelnuovo A, De Curtis A, Agnoli C, Frasca G, Mattiello A, Tumino R. Circulating Tissue Factor Levels and Risk of Stroke Findings From the EPICOR Study. *Stroke* 46.6:1501-1507, 2015.

- 92-** Krudysz-Amblo J, Jennings ME, Knight T, Matthews DE, Mann KG, Butenas S. Disulfide reduction abolishes tissue factor cofactor function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1830.6:3489-3496, 2013.
- 93-** Chen L, Lu Y, Chu Y, Xie J, Wang F. Tissue factor expression in rheumatoid synovium: a potential role in pannus invasion of rheumatoid arthritis. *Acta histochemica* 115.7: 692-697, 2013.
- 94-** Landsem A, Fure H, Christiansen D, Nielsen EW, Østerud B, Mollnes TE, Brekke OL. The key roles of complement and tissue factor in *Escherichia coli*-induced coagulation in human whole blood. *Clinical & Experimental Immunology*. 182.1: 81-89, 2015.
- 95-** Reichman-Warmusz E, Reichman-Warmusz E, Domal-Kwiatkowska D, Matysiak N, Kurek J, Spinczyk D, Dudek D, Wojnicz R. Tissue factor is unregulated in microvascular endothelial cells of patients with heart failure *Journal of clinical pathology*.69.3: 221-225, 2016.
- 96-** Rao LVM, Esmon CT, Pendurthi UR. Endothelial cell protein C receptor: a multiliganded and multifunctional receptor. *Blood* 124.10:1553-1562, 2014.
- 97-** Unruh D, Sagin F, Adam M, Van Dreden P, Woodhams BJ, Hart K, Bogdanov VY. Levels of alternatively spliced tissue factor in the plasma of patients with pancreatic cancer may help predict aggressive tumor phenotype. *Annals of surgical oncology* 22.3:1206-1211, 2015.
- 98-** Falanga A, Schieppati F, Russo D. Cancer tissue procoagulant mechanisms and the hypercoagulable state of patients with cancer. In *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. Thieme Medical Publishers. 41.07.756-764, 2015.
- 99-** Versteeg H.H. Tissue factor: old and new links with cancer biology. In *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. Thieme Medical Publishers. 41.07:747-755, 2015.
- 100-** Motoori M, Yano M, Tomita Y, Takahashi H, Tanaka K, Sugimura K, Goto K. Tissue factor predicts response to chemotherapy in esophageal cancer. *Journal of surgical research*. 191(1). 99-105, 2014.
- 101-** Ke K, Yuan J, Morrissey JH. Tissue factor residues that putatively interact with membrane phospholipids. *PloS one*, 9(2), e88675, 2014.

- 102-** Daleke DL. Phospholipid flippases. *Journal of Biological Chemistry*. 282.2: 821-825, 2007.
- 103-** Keshavan MS, Mallinger AG, Pettegrew JW, Dippold C. Erythrocyte Membrane Phospholipids in Psychotic Patients. *Psychiatry Res*. Volume 49, Issue 1, Pages 89-95, 1993.
- 104-** Redecha P, Franzke CW, Ruf W, Mackman N, Girardi G. Neutrophil activation by the tissue factor/Factor VIIa/PAR2 axis mediates fetal death in a mouse model of antiphospholipid syndrome. *The Journal of clinical investigation* 118.10: 3453-3461, 2008.
- 105-** Uran S, Larsen A, Jacobsen PB, Skotland T. Analysis of phospholipid species in human blood using normal-phase liquid chromatography coupled with electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*.758;265-275, 2001.
- 106-** Nielsen CH, M Erlandsson M, TE Jeppesen TE, Jensen MM, Kristensen LK, Madsen J, Kjaer A. Quantitative PET imaging of tissue factor expression using 18F-labeled active site-inhibited factor VII. *Journal of Nuclear Medicine* 57.1:89-95, 2016.
- 107-** Emoto K, Toyamasorimachi N, Karasuyama H, Inoue K, Umeda M. Exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of apoptotic cells. *Exp. Cell Res*. 232;430-434, 1997.
- 108-** Madsen JJ, Persson E, Olsen OH. Tissue factor activates allosteric networks in factor VIIa through structural and dynamic changes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 13.2:262-267, 2015.
- 109-** Zhu S, Travers RJ, Morrissey JH, Diamond SL. FXIa and platelet polyphosphate as therapeutic targets during human blood clotting on collagen/tissue factor surfaces under flow. *Blood* 126.12:1494-1502, 2015.
- 110-** Ersöz G. Trombosit Aktivasyonu. *A.Ü. Tıp Fak. Mecmuası*. 50(3);163-172, 1997.
- 111-** Brook JG, Linn S, Aviram M. Phosphatidylinositol raises HDL cholesterol levels in humans. *Biochem Med Metabol Biol* (35):31-39, 1986.
- 112-** Dedebaş T, Öner Z. Süt Sfingolipidlerinin Sağlık Üzerine Etkisi. *Akademik Gıda* 8.1;39-43, 2010.

- 113-** Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian journal of biochemistry and physiology.37(8). 911-917, 1959.
- 114-** Karışımları Ayırma. T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Kimya Teknolojisi. s:25-30. Ankara, 2011.
- 115-** Odabaş Z, Altun S. İnce Tabaka Kromatografisi.in: Organik Kimya Laboratuvarı.M.Ü Fen Edebiyat FAK. Yayınları, İstanbul, s.29-32, 2014.
- 116-** Jaekson ML. Nitirk asit sisteminde vanadomolibdofosforik asit sırası metodu. Orman Fak. Dergisi. B.27:1.s.254-256, 1977.
- 117-** Erciyes Üniv. Çevre Mühendisliği Bölümü. Fosfat Tayini. Çevre Kimyası.s.5-6, 2013.
- 118-** Cohen S, Chargaff E. Studies on the chemistry of blood coagulation IX. The thromboplastic protein from lungs. Journal of Biological Chemistry. 136(1).243-256, 1940.
- 119-** Cohen S, Chargaff E. Studies on the chemistry of blood coagulation XIII. The phosphatide constituents of the thromboplastic protein from lungs. Journal of Biological Chemistry.139(2).741-752, 1941.
- 120-** Chargaff E, Bendich A, Cohen SS. The thromboplastic protein: structure, properties, disintegration. Journal of Biological Chemistry 156.1:161-178, 1944.
- 121-** Ekin İ, Başhan M, Şeşen R, Kızmaz V. Determination of fatty acids from phospholipid subclasses in the total body and cephalopedal tissues from edible snail *Helix lucorum*. Turkish Journal of Biochemistry, 40(2), 132-139, 2015.
- 122-** Tunalı T, Yarat A, Bulut M, Emekli N. 6,7-Dihydroxy-3-phenylcoumarin inhibits thromboplastin induced disseminated intravascular coagulation. Br J Haematol.126(2): 226-30, 2004.
- 123-** Van den Besselaar AMHP, Chantarangkul V, A. Tripodi A.Thromboplastin standards. Biologicals 38.4: 430-436, 2010.
- 124-** Funk C, Gmür J, Herold R, Straub PW. Reptilase®-R—A New Reagent in Blood Coagulation. British journal of haematology.21(1).43-52, 1971.
- 125-** Bogdanov VY, Versteeg HH. Soluble tissue factor” in the 21st century: definitions, biochemistry, and pathophysiological role in thrombus formation.

In Seminars in thrombosis and hemostasis. Thieme Medical Publishers. Vol. 41, No. 07. pp. 700-707, 2015.

126- Ansari SA, Pendurthi UR, Sen P, Rao LVM. The Role of Putative Phosphatidylserine-Interactive Residues of Tissue Factor on Its Coagulant Activity at the Cell Surface. PloS one.11.6: e0158377, 2016.



9.ETİK KURUL ONAYI

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Koyun ve kuzu akciğerinden izole edilen doku faktörü aktivitesinde lipitlerin etkisi			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyokimya			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	15.12.2015		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	15.12.2015		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
Karar Bilgileri	Karar No: 660		Tarih: 23/12/2015	
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna “ oybirliği ” ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Tangül MÜDOK	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	8
Yrd. Doç. Dr. Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	98
Yrd. Doç. Dr. Devrim TARAKCI	Ergoterapi	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Du8
Yrd. Doç. Dr. İlknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	9
Öğr. Gör. Dr. Mehmet Hikmet ÜÇİŞİK	Biyomedikal	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	9

* :Toplantıda Bulunma



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ,
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)
ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
13/01/2016	06		Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ

“Koyun ve Kuzu Akciğerinden İzole Edilen Doku Faktörü Aktivitesinde Lipidlerin Etkisi” başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 6 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Ülkan KILIÇ	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. H. Emir YÜZBAŞIOĞLU	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sine Özmen TOĞAY	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet Yalçın GÜNAL	
Üye	Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

10.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Aslıhan	Soyadı	Tenekeçigil
E-mail	aslihantnkcgl@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı
Yüksek Lisans	Medipol Üniversitesi / Tıp Fakültesi / Tıbbi Biyokimya
Lisans	Sakarya Üniversitesi / Fen Fakültesi / Biyoloji
Önlisans	Trakya Üniversitesi / S.H.M.Y.O. / Tıbbi Laboratuvar
Lise	İstanbul Güngören İzzet Ünver Lisesi

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
Biyokimya Laboratuvarı	Sağlık Bilimleri Üniversitesi İstanbul Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi	03.2009- Halen
Biyokimya Laboratuvarı	Bezm-i Alem Vakıf Gureba Hastanesi	03.2002-03.2009

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	Orta	Orta

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi

Sertifikalar

Kurum	Sertifika
Sağlık Bilimleri Üniversitesi İstanbul Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi	Biyokimya Laboratuvarında Kullanılan Tüm Cihazların Sertifikaları
İş Güvenliği Mühendislik Eğitim Tic.Ltd.şti. İş Güvenliği Uzmanlığı Eğitim Kurumu	İş Güvenliği Uzmanlığı Sertifikası

