



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SIÇAN BEYNİNDEN VE AKCİĞERİNDEN İZOLE EDİLEN DOKU
FAKTÖRÜNÜN K VİTAMİNİ İNHİBİTÖRLERİ İLE İLİŞKİSİNİN
İNCELENMESİ**

MERVE TAYLAN

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

PROF. DR. NESLİN EMEKLİ

İSTANBUL - 2020

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren, bu konuda araştırma yapmamı sağlayan, beraber çalışmaktan onur duyduğum ve yolumu aydınlatan çok değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Neslin Emekli'ye, derslerinden fayda gördüğüm hocam Sayın Prof. Dr. Türkan Yiğitbaşı'na, tez deneyimde bana yardımcı olan Ar.Gör. Ünsal Veli Üstündağ'a, deney hayvanlarını temin etme konusunda desteğini esirgemeyen Sadık Bay'a,

Yüksek Lisans yapmama vesile olan, hayatta beni hep destekleyen hem meslektaşım hem de kadim dostum Hatice Özer'e,

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca tüm laboratuvar çalışmalarında bana destek olan iyi sonuçlara da kötü sonuçlara da beraber sevindiğim beraber üzüldüğüm arkadaşım Musa Harun Göçmen'e,

Hayatım boyunca destek ve sevgilerini esirgemeyen sadece tek bir gün değil her gün yanımda olan ve bana olan inançlarını hiçbir zaman yitirmeyen başta babam, annem, teyzem ve kardeşim olmak üzere ailemin tüm bireyelerine,

Bütün kalbimle sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

KISALTMALAR

ADP:	Adenozin Difosfat
APTT:	Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı
DIC:	Yaygın Damariçi Pıhtılaşması
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
DS:	Distile Su
EDTA:	Etilen Diamin Tetra Asetik Asid
FDA:	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FI:	Fibrinojen
FII:	Protrombin
FIII, DF:	Doku Faktörü, Tromboplastin
FIV:	Kalsiyum, Faktör IV
FV:	Faktör V
FVII:	Faktör VII
FVIII:	Faktör VIII
FIX:	Faktör IX
FX:	Faktör X
FXII:	Faktör XII
FXIII:	Faktör XIII
HCl:	Hidroklorik Asit
HMWK:	Yüksek Mol Ağırlıklı Kininojen
INR:	International Normalization Ratio (Uluslararası Normalleştirilmiş Oran)
KCCT:	Kaolin Sefalin Pıhtılaşma Zamanı

mg:	Miligram
MI:	Miyokart İnfarktüsü
mL:	Mililitre
NADH:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
PAI:	Plazmin Aktivatör İnhibitörü
PTZ:	Protrombin Zamanı
RDA:	Diyet Referans Alımı
SARS-CoV-2, COVID-19:	Yeni Koronavirüs Hastalığı
SD:	Serbestlik Derecesi
SF:	Serum Fizyolojik
tPA:	Doku Plazminojen Aktivatörü
TrF3:	Trombosit Faktör 3
TT:	Trombin Zamanı
VKA:	K vitamini inhibitörü
vWF:	von Willebrand Faktör vWF
µL:	Mikrolitre

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.3.2. Pıhtılaşma faktörlerinin bazı özellikleri.....	14
Tablo 4.4.1. Çeşitli dokularda doku faktörü ekspresyonu.....	19
Tablo 4.5.1. Protrombin zamanlarının farklı şekillerde ifadesi.....	23
Tablo 4.6. Bazı besinlerin K vitamini değerleri.....	28
Tablo 5.1. Çalışmada kullanılan maddeler.....	31
Tablo 5.2. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	31
Tablo 6.1.1. Sıçan akciğerinden izole ettiğimiz tromboplastinin normal sınırlar içinde kalan otomasyon sonuçları ile karşılaştırılması.....	37
Tablo 6.1.2. Sıçan beyninden izole ettiğimiz tromboplastinin normal sınırlar içinde kalan otomasyon sonuçları ile karşılaştırılması.....	38
Tablo 6.1.3. Sıçan akciğerinden izole ettiğimiz tromboplastinin uzamış PTZ otomasyon sonuçları ile karşılaştırılması.....	39
Tablo 6.1.4. Sıçan beyninden izole ettiğimiz tromboplastinin uzamış PTZ otomasyon sonuçları ile karşılaştırılması.....	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.2. Damar duvar yapısı.....	7
Şekil 4.3.1. Trombositlerin aktivasyonunun şematik görünümü.	8
Şekil 4.4.1. İnstrensek ve ekstrensek pıhtılaşma sistemi.....	12
Şekil 4.4.2. Fibrin polimerizasyonu	15
Şekil 4.4.3. Fibrinolitik sistemin aktivatörleri ve inhibitörleri.....	16
Şekil 4.5.1. Protrombin zamanı testinde ekstrensek sistemde gerçekleşen reaksiyonlar..	21
Şekil 4.5.2. Kaolinle yapılan APTT testinde meydana gelen reaksiyonlar.....	24
Şekil 4.6.1. K vitamini formları (K ₁ , K ₂ , K ₃).....	26
Şekil 4.6.2. K vitamini karboksilasyonun kimyasal yapısı.....	27
Şekil 4.7.1. K vitamini ve Varfarin yapısı.....	29
Şekil 5.3. Sıçan beyni ve akciğeri.....	32
Şekil 5.4. Homojenize edilen sıçan beyninin gazlı bezden geçirilmesi.....	33
Şekil 5.5.3.1. Fibrin ipliklerinin oluşumu.....	34
Şekil 5.5.3.2. Sıçan beyninden ve sıçan akciğerinden elde edilen doku faktörü ile yapılan PTZ testi sonrası plazmalar.....	34

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4.1. Hemostatik Sistem.....	5
4.2. Vasküler Sistem.....	5
4.3. Trombositler sistemi.....	8
4.4. Pıhtılaşma Sistemi	9
4.4.1. Pıhtılaşma Sisteminde Doku Faktörü	17
4.5. Pıhtılaşma Testleri	20
4.5.1. Protrombin Zamanı	20
4.5.2. Aktif Parsiyel Tromboplastin Zamanı.....	24
4.5.3. Trombin Zamanı Testi.....	25
4.6. K Vitamini	25
4.7. K Vitamini İnhibitörleri	28
4.7.1. Kumarin Türevleri.....	29
4.8. Metot Karşılaştırma.....	29
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
5.1. Kullanılan Maddeler	31
5.2. Kullanılan Cihazlar.....	31
5.3. Sıçandan Beyin ve Akciğer Eldesi	32
5.4. Sıçan Beyni ve Akciğerinden Doku Faktörü Eldesi.....	32
5.5. Protrombin Zamanı Testinin Yapılışı.....	32
5.5.1. Protrombin Zamanı Testi İçin Kan Örneklerinin Alınması.....	32
5.5.2. Kalsiyum Klorür (CaCl ₂) Çözeltisinin Hazırlanması	33
5.5.3. Protrombin Zamanı Testinin Yapılışı.....	33
5.6. Verilerin Değerlendirilmesi.....	35

6. BULGULAR	36
6.1. Quick Yöntemine Göre Manuel Olarak Yaptığımız PTZ Testinin Sonuçları	37
7. TARTIŞMA	42
8. SONUÇ	47
9. KAYNAKLAR	48
10. ETİK KURUL ONAYI	54
11. ÖZGEÇMİŞ	56



1. ÖZET

SIÇAN BEYNİNDEN VE AKCİĞERİNDEN İZOLE EDİLEN DOKU FAKTÖRÜNÜN K VİTAMİNİ İNHİBİTÖRLERİ İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

Ekstresek pıhtılaşma sisteminde bazı proteinlere postranslasyonel modifikasyonla karboksil grubu bağlanır. Bu reaksiyon için K vitamini gereklidir. Çünkü karboksilazların koenzimi, K vitamindir. 1990'lü yılların başından beri bilinen bu mekanizma tromboza bağlı MI, serebrovasküler, periferel damar hastalığı olan kişilerin tedavisinde kullanılmaktadır. Bu tedavinin amacı K vitaminini baskılayarak pıhtı oluşumunu, kanamaya sebebiyet vermeden engellemektir. Protrombin zamanı testi (PTZ), koagülasyon kaskadında ekstresek yolun göstergesi kabul edilir. Oral antikoagulan kullanan hastaların kullandıkları ilacın dozlarının tespitinde sıklıkla kullanılan bir biyokimyasal analizdir. Bu çalışmada; sıçan akciğeri ve beyninden izole ettiğimiz doku faktörü ile PTZ yapıp hastaların sonuçları ile uyumluluğunu incelemeyi ve alternatif geliştirmeyi amaçladık. İstanbul Medipol Üniversitesi Mega Hastanesi Biyokimya laboratuvarına PTZ ölçümü için gelen 27 olgu çalışmaya dahil edildi. Bu olguların 14 tanesinin otomasyon PTZ değerleri referans değerleri arasında, 13 tanesinin otomasyon PTZ değerleri saniye olarak diğerlerinden uzamış durumdaydı. PTZ için gerekli olan doku faktörü sıçan beyni ve akciğeri elde edildi. Quick metodu ile ölçülen PTZ testi ile değerlendirildi. Hastane laboratuvarında otomasyonla yapılan PTZ sonuçları ile bizim araştırma amacıyla yaptığımız test sonuçları birbirine yakın değerler olduğu için sonuçlar istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$). Yapılan analizlerin sonucuna göre iki yöntem arasında bir uyum olduğu ve birbirinin alternatifi olduğu söylenebilir. Sonuçlar; kendi ürettiğimiz doku faktörünün standardize edilerek protrombin zamanı testinde kullanılabileceğini göstermiştir ve bulgularımız tromboplastin üretiminde literatüre katkı sağlayacaktır, PTZ testinde alternatif oluşturacaktır.

Anahtar Kelimeler: Antikoagulan, doku faktörü, K vitamini, protrombin zamanı (PTZ)

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP OF TISSUE FACTOR ISOLATED FROM THE RAT LUNG AND BRAIN WITH VITAMIN K INHIBITORS

In the extrinsic coagulation system, the carboxyl group is attached to some proteins by posttranslational modification. Vitamin K is required for this reaction. Because the coenzyme of carboxylase is vitamin K. This mechanism, known since the early 1990s, has been used in the treatment of people with MI, cerebrovascular and peripheral vascular disease due to thrombosis. The main purpose of this treatment is to prevent clot formation by suppressing vitamin K. Prothrombin time test (PT) is considered to be an indicator of the extrinsic pathway in the coagulation cascade. It is a biochemical analysis that is frequently used in determining the doses of drugs used by patients using oral anticoagulants. In this study, we performed PT with tissue factor isolated from rat lung and brain. We aimed to examine the compatibility of patients with their results and to develop an alternative to the test. 27 cases who came to Istanbul Medipol University Mega Hospital Biochemistry Laboratory for PT measurement were included in the study. The automation PT values of 14 of these cases were among the reference values, while the automation PT values of 13 of them were longer than the others in seconds. Tissue factor required for PT was obtained from rat brain and lung. It was evaluated with PTZ test measured by Quick method. The results of the PTZ tests made in the hospital laboratory with automation and the test results we made for research purposes were close to each other. Therefore, the results were found to be statistically insignificant ($p>0,05$). According to the results of the analysis, it can be said that there is a harmony between the two methods and there is an alternative to each other. As a result; showed that the tissue factor we produced can be standardized and used in prothrombin time testing. Our findings will contribute to the literature on thromboplastin production and will be an alternative to in PT test.

Keywords: Anticoagulant, prothrombin time (PT), tissue factor, vitamin K

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Hemostatik sistem (hemostaz), kanama ve pıhtılaşmayı içine alan fizyolojik bir olaydır. Damarlarda ve dokularda oluşan bir yara veya kanama hemostatik sistemde bazı reaksiyonların tetiklenmesine neden olur. Böylece homeostaz yani vücudun iç dengesi korunur (1).

Yolaklardaki kimyasal reaksiyonların ürünleri, biyokimyasal olarak ölçülebildiği için kanama ve pıhtılaşmayla seyreden hastalıkların tanısında ve tedavinin yönlendirilmesinde iyi bir araçtır. Hemostatik sistem ile ilgili reaksiyonların inhibisyonu geçmişten günümüze klinikteki tedavi protokollerinin içinde yer almaya devam etmektedir. Koroner ya da serebral arterlerde görülen pıhtı günümüzde ülkemizin ve dünyanın en önde gelen sağlık problemlerinden biridir (2).

Hemostazın bütünlüğünü sağlayan önemli yolaklardan biri sekonder hemostaz aşaması yani pıhtı oluşum aşamasıdır. Bu aşama negatif ve pozitif feedback reaksiyonları, multienzim sistemleri, humoral ve hüresel prokoagulan ve antikoagulanları içinde barındırır. Bu fizyolojik olayın amacı bir taraftan kanın dışarıya akmasını diğer taraftan da pıhtı oluşumunu önlemektir. Çeşitli moleküllerin bu sistemdeki olumlu ve olumsuz etkileri geçmişten günümüze yoğun bir çalışma konusudur (3).

Pıhtılaşma faktörlerinin aktivasyonu intrinsek ve ekstrinsek aktivasyon olmak üzere iki şekilde tanımlanır ve laboratuvar çalışmasında da aynı şekilde ifade edilir. İntrensek sistemi başlatan etken, kanda dolaşan FXII'nin endotel dışında yabancı bir yüzeyle karşılaşmasıdır.

Ekstrinsek sistemi başlatan tromboplastin, pıhtılaşma sisteminin üçüncü faktörü olan doku faktörüdür. Ekstrinsek pıhtılaşma sisteminin aktivasyonunu belirlemede kullanılan oral antikoagulan tedavisinin etkinliği protrombin zamanı testi yapılarak kontrol altında tutulur.

Bazı pıhtılaşma proteinleri karaciğerde sentezlendikten sonra posttranslasyonel modifikasyonla ilave bir karboksil grubu alarak pıhtılaşma sisteminde etkin hale gelir. Uzun zamandan beri bilinen bu bilgi tromboza meyilli olan kişilerin tedavisi için kullanılmaktadır. Çünkü söz konusu pıhtılaşma proteinlerine karboksil grubunun

bağlanması K vitamini gerektirir. Sentezi bağırsak bakterileri tarafından da yapılan K vitamini eksikliği, henüz bağırsakları steril olan yeni doğanda bazen kanama olarak kendini gösterir. K vitamini enjeksiyonundan sonra ilgili pıhtılaşma proteinlerinin karboksilasyonu gerçekleşeceği için kanama durur. Miyokard infarktüsü, serebrovasküler hastalık, periferel damar hastalığı gibi tromboza meyilli olan kişilerdeki tedavinin hekim tarafından hedeflenen idame dozu protrombin zamanı testinin sonuçlarına göre yapılır.

Pıhtılaşma proteinleri yapısal homoloji gösterirken sadece doku faktörü Tip 2 sitokin reseptörleri ile homoloji gösterir. Bu nedenle doku faktörü “CD142” olarak da isimlendirilmiştir (4). Bir transmembran protein olan doku faktörü en fazla beyin, akciğer ve uterus olmak üzere tüm dokularda çeşitli oranlarda bulunur. Doku faktörü elde edildiği dokuya göre değişik oranlarda protein, fosfolipit ve karbonhidrat içerir (5).

Doku faktörünün hemostaz üzerine etkisi; FVII ile kompleks yaparak ekstrinsek sistemi başlatmak, FXa’yı meydana getirmek ve pıhtı oluşumunu sağlayarak kanayan bölgeyi kurtarmaktır. Doku faktörü tromboz ve enflamasyon üzerine de etki ederek sepsis, yaygın damar içi pıhtılaşması (DIC), arteryal veya venoz tromboz oluşumuna aracılık edebilmektedir. Doku faktörünün bunların dışında ayrıca yeni damar oluşumu (anjiojenez), mitojenez, düz kas hücrelerinde proliferasyon, malign hücrelerde çoğalma, metastaz oluşumu gibi hemostatik olmayan işlevleri de bulunmaktadır (1).

Bu tez çalışmasının amacı; sıçan akciğeri ve beyninden izole ettiğimiz doku faktörü ve ticari olarak ithal edilen doku faktörü ile yapılan protrombin zamanı testinin çeşitli boyutları ile mukayese edilerek incelenmesidir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Hemostatik Sistem

Kan, endotel hücreleri ile kaplı damarlarda pıhtılaşmadan dolunır. Çünkü damarların iç yüzünü kaplayan endotel hücrelerinden salınan pek çok kimyasal ve bu kimyasallar arasında meydana gelen çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar dolaşan kanın pıhtılaşmasına engel olur. Kan, endotel dışında yabancı bir yüzeyle karşılaştığında (Örneğin, enjektörle alınan kanın tüpe konulması) hemen pıhtılaşır. Dolaşan kanda mikro düzeylerde dahi bir pıhtı olması, kılcal damarları tıkayarak ilgili organın oksijenlenmesini ve beslenmesini engelleyeceği için hayati tehlike oluşturur. Dolaşan kanda pıhtının meydana gelmemesi, “hemostaz” adı verilen sistemin çeşitli bölümleri arasındaki biyokimyasal dengenin iyi işlemesine bağlıdır. Hemostaz birbirini takip eden dört farklı yolakla, kanayan bölgede pıhtı oluşarak kanamanın durması ve fibrinolitik sistemle pıhtının eritilerek o bölgedeki kan akışının normale dönmesidir. Kanama ve pıhtılaşmayı içine alan bir kavram olan hemostaz fizyolojik olarak gerçekleşir. Yolaklardaki kimyasal reaksiyonların ürünleri biyokimyasal olarak ölçülebildiği için kanama ve pıhtılaşmayla seyreden hastalıkların tanısında ve tedavinin yönlendirilmesinde iyi bir araçtır (1, 6-8).

Kanama ve pıhtılaşma tıbbın acil tedavi gerektiren durumları arasında yer alır. Çeşitli nedenlerle kanayan bir hasta ne kadar acil ise, çeşitli nedenlerle damarda pıhtı oluşması da aynı hayati tehlike ile karşı karşıyadır. Pıhtılaşma sistemi ile ilgili reaksiyonların inhibisyonu geçmişten günümüze klinikteki tedavi protokollerinin içinde yer almaya devam etmektedir. Koroner ya da serebral arterlerin pıhtı nedeniyle tıkanması geçmişte olduğu gibi günümüzde de dünyanın en önde gelen sağlık problemidir (9).

4.2. Vasküler Sistem

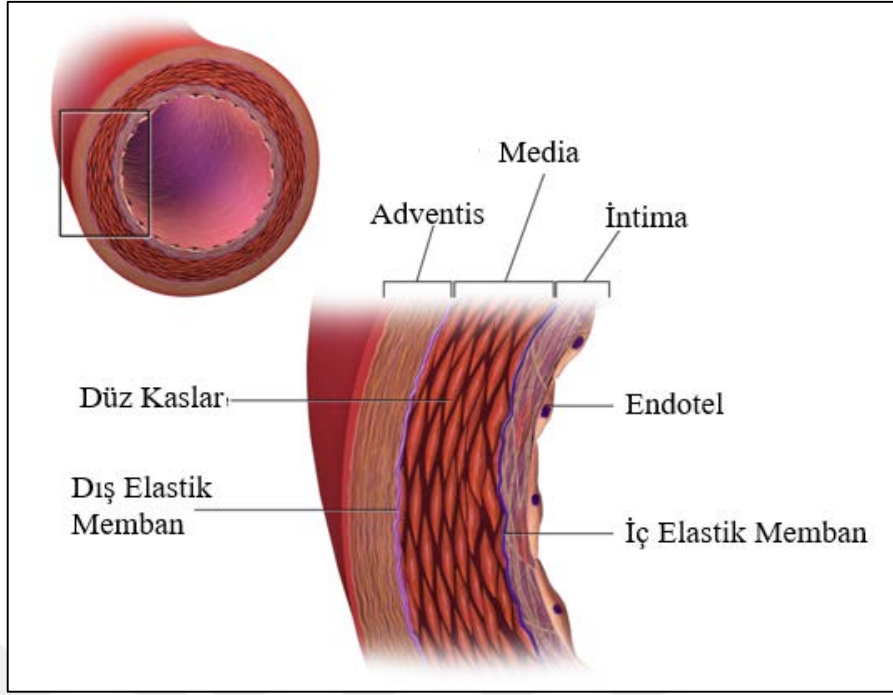
Hemostazın ilk kademesi kanın dışarı akmaması için, hasar gören damarın endotelden salınan kimyasallarla daralmasıdır. Endotel hücreleri kan ile damar duvarı arasında dinamik bir yüzey olarak görev alır. Bu dinamizm bozulduğunda tromboza meyil artar. Endotel hücreleri parke taşı gibi tek tabaka halinde damarları kaplayan ve

subendotel üzerine yerleşen, non trombojenik olan çok özel hücrelerdir. Non trombojenik olduğu için normal endotelde dolaşan kan pıhtılaşmaz, yani hemostatik sistem aktifleşmez. Kanın pıhtılaşması için subendotel, kollagen, doku faktörü gibi endotel dışı moleküllerle temas etmesi gerekir (10-11).

Endotel hücreleri pek çok aktivatör ve inhibitör etki gösteren maddeleri sentezler ve bunlar arasında denge oluşturur. Endotel hücrelerinin permeabilitesi histamin, serotonin, bradikinin gibi maddelere bağımlıdır. Serotonin vasküler geçirgenliği azaltırken, histamin ve bradikinin vasküler geçirgenliği artırır. Endotel hücrelerinin luminal yüzeyinde serotonin, histamin, kininler, anjiotensin, adrenalin, noradrenalin, asetilkolin ve trombin gibi birçok protein için reseptör tespit edilmiştir. Prostaglandin güçlü bir trombosit agregasyon inhibitörüdür ve endotelde sentez edilir. Çeşitli fibrinolitik inhibitörler ve aktivatörler yine endotel hücrelerinden sentez edilir. Trombositleri subendotele bağlayan von Willebrand Faktör (vWF) endotelde sentez edilir. Vasküler hücre adezyon molekülü, interselüler adezyon molekülü, çeşitli sitokinler, makrofaj kemotaktik proteinler ve inhibitörleri endotel ile direkt ilgili proteinlerdir. Çok önemli bir vazodilatör olan nitrik oksidin sentezini yapan nitrik oksit sentaz da endotel kaynaklıdır. Endotel hücreleri aynı organın farklı dokularında bile farklı yüzey molekülleri sentezleyebilmektedir (1,12).

Hemostaz fizyolojik şartlarda vücudun bir savunma sistemidir. Buradaki savunma kesilen ya da travmaya maruz kalan bölgedeki kanın dışarıya akmasını önlemek şeklinde gerçekleşmektedir. Hemostazdaki ilk savunma kan damarlarının vazokonstriksiyonu yani kasılması ile gerçekleşir. Yani damarlar kasılarak kanı içerde tutmaya çalışırlar. Vazokonstriksiyon işlemi, hem damar içinde bulunan serotonin yani 5-hidroksi triptamin hem de trombositlerin içinde bulunan serotonin yardımıyla olur.

Damar duvarı intima, media ve adventis olmak üzere 3 tabakadan oluşmuştur (Şekil 4.2). Endotel ve subendotelden ibaret olan intima, mediadan elastik lamine interna ile ayrılmıştır. Endotel hücreleri tek bir tabaka halinde damarın içini kaplayan çok özellikli hücrelerdir. Endotel hücreleri, non trombojeniktir, plazma ve kanın hücresel elementleri ile reaksiyona girmez (13).



Şekil 4.2. Damar duvar yapısı

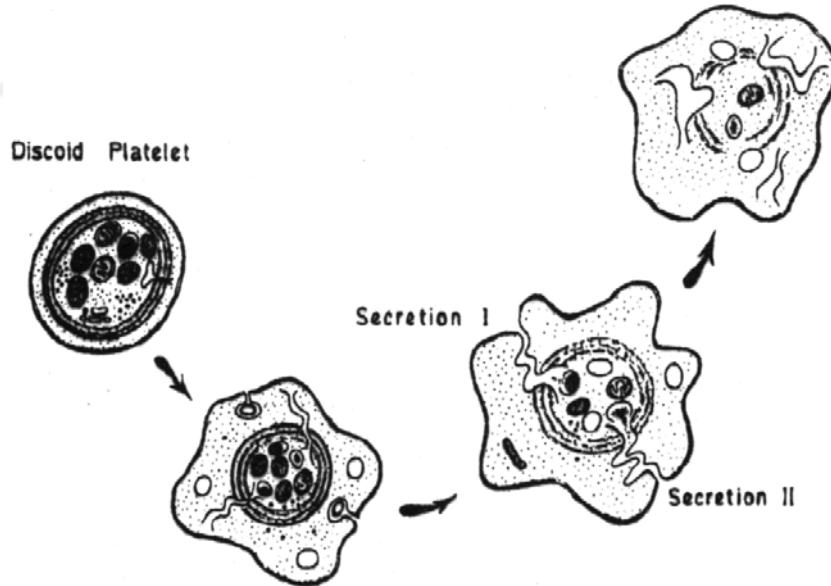
Endotelde meydana gelebilecek bir hasar ya da kesilme hemostatik sistemi harekete geçirir. Yaralanmayı takiben trombositler endotele ya da endotelin altında bulunan subendotel tabakaya adhere olur. Adezyon trombositlerin özel bir fonksiyonudur. Bu esnada kanda dolaşan pıhtılaşma faktörleri de subendotele temas ettiği için aktifleşir ve koagülasyon sistemindeki “kontakt faz” başlar. Bu koagülasyonun intrensek sistemidir. Bu esnada subendotelde ve makrofajlarda bulunan tromboplastin de (doku faktörü, TF, FIII) ekstrensek sistemi başlatır. Yine aynı anda subendotelde bulunan kollajen açığa çıkmıştır. Kollajen hem trombositler için hem de kanda bulunan FXII için uyarıcıdır. Kollajen trombositlerde membran glukoproteinleri ile temas edince trombosit agregasyonu için hücre içinde değişimler başlar. Hücre içi değişimleri ile aynı anda gerçekleşen olay membran fosfolipidlerinden araşidonik asid salınması ve bunu trombaksan A₂'nin takip etmesidir. Bu etkiler ile hücre içi kalsiyum serbestleşir ve trombosit granüllerinden agregasyonu başlatıcı ajanlar salgılanmaya başlar. Hageman Faktör yani FXII'nin de aktivasyonu ile bir taraftan da koagülasyon kaskadı işlemektedir. FXIII ile fibrinolizise resistans fibrin polimerler meydana gelir. Plazminojen yine endotelden salınan

aktivatörlerle plazmine dönüşür. Bir taraftan yara iyileşirken diğer taraftan da pıhtı eritilerek o bölgedeki kan akımı fibrinolisis sayesinde normale döner (14,15).

4.3. Trombositler sistem (Primer Hemostaz)

Trombositler primer hemostaz yani pıhtılaşmanın ilk safhasını başlatan kan proteinleridir. Bu görevlerini adezyon (yapışma), sekresyon (salgılama) ve agregasyon (kümeleşme) fonksiyonları ile yaparlar. Amaçları pıhtı oluşturarak kanayan bölgeyi tıkamaktır.

Trombositler normal damar endoteline yapışmazlar. Endotel hasarı olduğunda, kanda dolanan trombositler ve pıhtılaşma faktörleri yukardaki subendotelyal komponentleri ile karşı karşıya gelir. Trombositlerin adezyonunda, trombosit membranına yerleşmiş spesifik glikoproteinlerin hem fonksiyonel hem de düzenleyici rolleri vardır. vWF ve kanın akış hızı trombosit adezyonunda rol oynayan diğer etkenlerdir. Kollagen fibrillerinin özel yapısı trombositlerin adezyonunda rol oynar (11,16).



Şekil 4.3.1. Trombositlerin aktivasyonunun şematik görünümü (14)

Trombositler endotel dışı bir yüzeyle temas edip bir kere aktif hale geldikten sonra, hemen şekil değişimi başlar. Disk şeklinden oval şekle döner ve psödopotlarını çıkarır. Şekil 4.3.1’de görüldüğü gibi aktifleşen trombositler kademeli olarak sekresyona uğrayarak agregasyon görevini yerine getirmiş olurlar. Adezyonda

trombositler yabancı yüzeye, agregasyonda ise birbirine yapışır. Fibrinojen ve fibronektin trombositlerin birbirine yapışması ve agregat meydana getirmesi için gereklidir. Bazı maddeler (agonistler) trombositlerin membranında bulunan glukoproteinlere yani reseptörlere bağlanarak agregasyonu ve trombositlerin daha ileri aktivasyonunu gerçekleştirirler (11,14).

Trombositler adezyon, sekresyon ve agregasyon fonksiyonları ile hemostazda görev alan, megakaryositlerden kana salınan, kanın en küçük çekirdeksiz hücreleridir. Normalde kanda inaktif şekilde dolaşan trombositler endotel hasarı ile uyarıldığında aktifleşir ve hasarlı bölgeye yapışır (17).

Endotel hasarı dışında trombositlerin uyarılmasına neden olan çeşitli moleküller vardır. Endotelin altındaki bağ dokusunda bulunan kollagen trombositlerin çok güçlü bir uyarıcısıdır. Hasarlı bölgede açığa çıkan kollajene yapışan trombositlerden adenosin difosfat (ADP), serotonin, tromboksan A₂, trombosit faktör 4 ve trombositten türeyen büyüme faktörü (PDGF) salınarak daha çok trombositleri hasarlı bölgeye çeker ve trombosit kümesi oluşur (18,19).

4.4. Pıhtılaşma Sistemi (Sekonder Hemostaz)

Hemostazın bütünlüğünü sağlayan önemli yollardan biri sekonder hemostaz aşaması yani pıhtı oluşum aşamasıdır. Bu aşama negatif ve pozitif feedback reaksiyonları, multienzim sistemleri, humoral ve hücrel prokoagülan ve antikoagülanları içinde barındırır. Hemostaz; damar endoteli, trombositler, kanda bulunan pıhtılaşma proteinleri ve fibrinolitik sistemin katılımı ile gerçekleşen bir savunma sistemidir. Buradaki savunma, olası bir damar hasarında kanın dışarıya akmasını önlemek veya damarda akan kanın pıhtılaşmamasını sağlamak içindir. Uzun zincirli yağ asitlerinin, trombositleri ve Faktör XII'yi aktifleştirdiği uzun zamandan beri bilinmektedir (11).

Pıhtılaşma mekanizmasının temelleri 1892 yılında Schmidt, 1904 yılında Morawitz tarafından atılmıştır. O tarihlerde pıhtılaşma ile ilgili bilgiler ekstrinsek sistemin baş aktörü doku faktörünün kalsiyum iyonu varlığında protrombini trombine

dönüştürmesi, trombinin de fibrinojeni fibrine dönüştürmesi şeklindeydi. Bu bilgiler günümüz için de geçerli olan bilgilerdir (1).

1900'lü yılları takip eden uzun bir süre pıhtılaşma mekanizmasındaki gelişmeler doku faktörü yani ekstrinsek sistem merkezli olmuştur. Çünkü 1892 yılında Schmidt damarda dolaşan kanın pıhtılaşmadığını fakat doku ile temas eden kanın pıhtılaştığına dikkat çekerek kanda olmayan bir şeyin dokuda olduğunu bildirmiş ve buna doku trombokinazı (Doku faktörü, tromboplastin, FIII) adını vermiştir. Bu düşüncelerin öncülüğünde intrinsek ve ekstrinsek pıhtılaşma kavramları gelişmiştir. 1904 yılındaki düşünce ve bulgular günümüzde halen geçerliliğini korumakta, teşhis ve tedavide altın standart olarak kabul edilen protrombin zamanı testinin mekanizmasını oluşturmaktadır. 1947 yılında Owren pıhtının oluşması için Faktör V'in gerekli olduğunu bildirmiş bu buluşu diğer pıhtılaşma proteinleri takip etmiştir. Protrombinin trombine dönüşümü ile ilgili yoğun çalışmalar 1905-1950 yılları arasında pıhtılaşma mekanizmasında önemli gelişmeler sağlamıştır. Bugünkü pıhtılaşma yolağının oluşturulması 1964 yılında Davie ve Ratnoff tarafından gerçekleştirilmiştir (1).

Şekil 4.4.1'de kaskad veya şelale adı verilen pıhtılaşma sisteminde görev alan pıhtılaşma proteinleri reaksiyon sırasına göre verilmiştir. Pıhtılaşma proteinleri, faktör (F) olarak isimlendirilir. Pıhtılaşma faktörlerinin numaralandırılması bulunuş sırasına göre olmuştur ve Romen rakamı ile gösterilir. Romen rakamı ile gösterilen pıhtılaşma proteinlerinin ayrıca özel isimleri de vardır. Bu isimler genellikle kendisini kanama diyatezi ile belli eden ilk hastaların isimleridir. Faktör I (F I, fibrinojen) ilk bulunan pıhtılaşma proteindir. Fibrinojenin keşfini protrombin (FII) adıyla takip etmiştir. Trombositlerde bulunan faktör 3 (Tr F3) de pıhtılaşma sisteminde görev alır. Trombosit içindeki proteinler Romen rakamı ile değil normal rakamlarla gösterilmektedir.

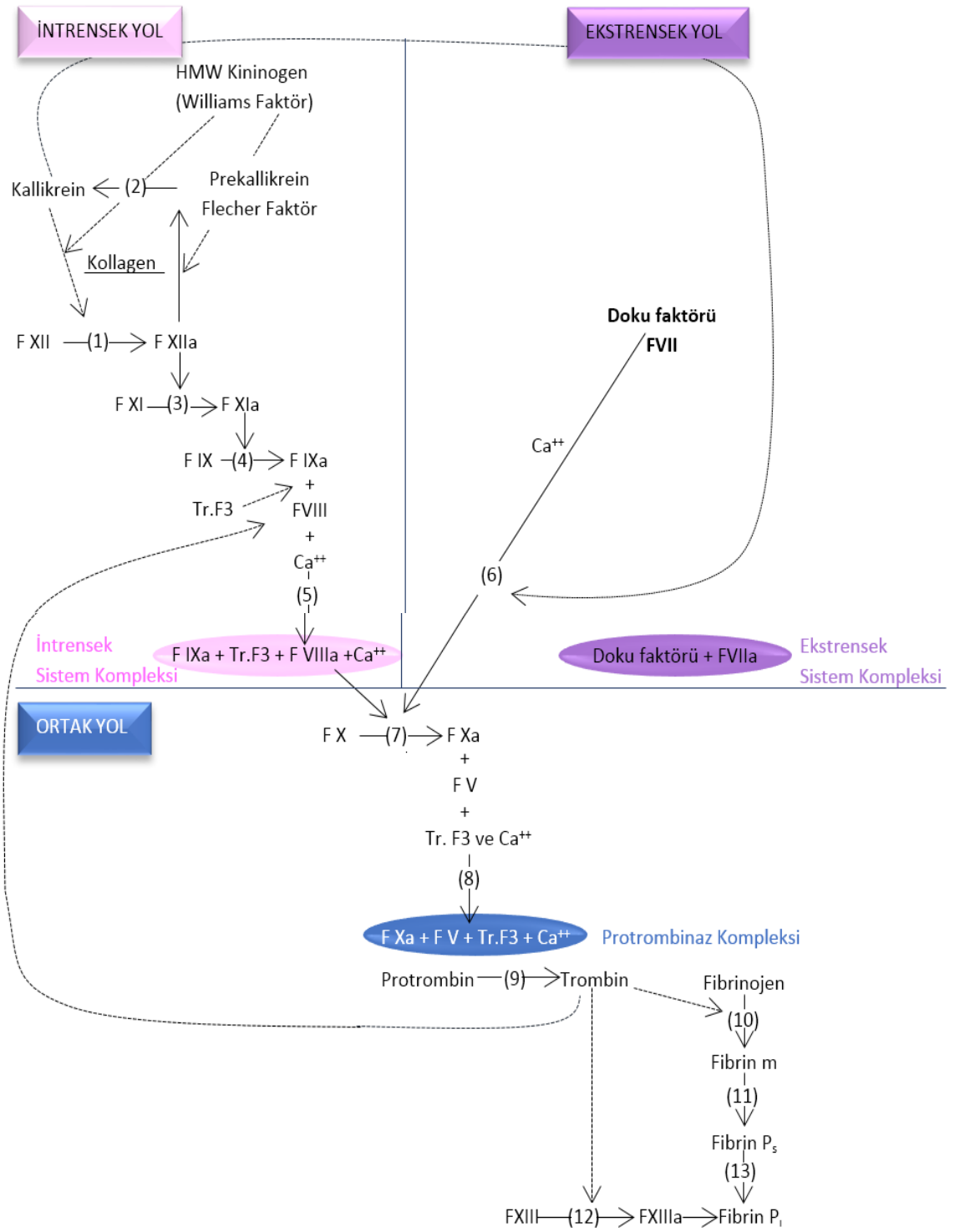
Pıhtılaşma faktörlerinin aktivasyonu intrinsek ve ekstrinsek aktivasyon olmak üzere iki şekilde ifade edilir. İntrensek sistemin başlangıcında görev alan pıhtılaşma proteinleri yüzey aktivasyon faktörleridir. İntrensek sistemi başlatan etken, kanda dolaşan FXII'nin endotel dışında yabancı bir yüzeye karşılaşmasıdır. Bir damar hasarında bu yabancı yüzey, subendotel veya daha derin tabakalarda bulunan

kollagendir. Kollagen hem FXII hem de trombositler için güçlü bir uyarıcıdır. Bu şekilde uyarılan FXII pıhtılaşma sisteminin başlaması için tetiği çeker. FXII, endotelde bulunan yüksek molekül ağırlıklı kininojen ve prekallikrein ile reaksiyona girer. Aktifleşen faktör bir sonrakini aktifleştirir (20,21).

Şekil 4.4.1'deki pıhtılaşma mekanizmasında yer alan reaksiyonlar akış şeması sırası ile numaralandırılarak gösterilmiştir. Hageman faktör (FXII), Williams Faktör, FXI, FIX, Faktör FVIII'in sisteme katılması ile intrinsek sistem kompleksi oluşur. Bu yolda pıhtı oluşumunu kontrol altında tutmak için uygulanan heparin tedavisi biyokimya laboratuvarlarında aktive edilmiş kısmı tromboplastin (APTT) testi ile takip edilir (7).

Doku faktörü; endotel hasarının olduğu bölgedeki dokudan sızarak pıhtılaşma sistemindeki ekstrinsek yolu başlatır ve ekstrinsek kompleksi meydana gelir. Burada doku faktörü (FIII), FVII ile ekstrinsek sistem kompleksini oluşturur. Ekstrinsek pıhtılaşma sisteminin aktivasyonu oral antikoagulan tedavi ile kontrol altında tutulur. Bu tedavinin etkinliği ise protrombin zamanı testi ile takip edilmektedir (2).

Pıhtılaşma mekanizmasında; FX intrinsek ve ekstrinsek sistem kompleksleri ile ortak yolda aktifleşir. Oluşan FXa, FV ve TrF3 ile birlikte protrombinaz kompleksini oluşturur. Oluşan protrombinaz kompleksi protrombinden küçük bir peptidi kopararak trombin oluşumunu sağlar. Bundan sonraki yol, fibrin monomerin (Fibrin_m) olduğu reaksiyondur. Bu fibrin çözünebilir fibrindir. Çözünmemesi için fibrini stabilize eden faktörün (FSF) trombinle aktifleşmesi (FXIIIa) ve polimerizasyon reaksiyonu ile çözünmeyen fibrin (fibrin_i) oluşması gerekir. Bu fibrin yara iyileşinceye kadar çözünmemektedir (22).



Şekil 4.4.1. İntrensek ve Ekstrensek Pıhtılaşma Sistemi (21)

Pıhtılaşma sisteminde trombinin önemli görevleri vardır. Şekil 4.4.1’de görüldüğü gibi trombin, hem intrensek sistem kompleksindeki kofaktör FVIII’i, hem ortak yoldaki kofaktör FV’i hem de FXIII’ü aktifleştirirken, aktifleşen FVIIIa ve FVa’yı da inaktif hale getirmek için protein C yolağını aktifleştirebilmektedir (23, 24).

Pıhtılaşma yolağında görev alan proteinlerin özellikleri farklıdır. Bu özellikler kanama diyatezi olan hastaların teşhisi ve tedavilerinin takibi için yapılan laboratuvar analizlerinde önem taşır. Tablo 4.3.2’de pıhtılaşma proteinlerinin bazı özellikleri gösterilmiştir.

Pıhtılaşma sisteminin her reaksiyonunda bir önceki molekülden küçük bir peptid ayrılmaktadır. Reaksiyonda rol alan bir önceki pıhtılaşma proteini kalsiyuma bağlı bir enzim görevini yapar. Kalsiyum iyonu (Ca^{2+}) pıhtılaşma kaskadının ya da şelalesinin her kademesinde gereklidir. Kanda Ca^{2+} ; sitrat, oksalat ve EDTA ile bağlandığında kan hiçbir zaman pıhtılaşmaz. Bu nedenle laboratuvar analizlerinde kullanılan kalsiyum bağlayıcılar etkinlik derecelerine göre değişmektedir (25).

Prokoagulant pozisyondan aktif koagulant şekle gelen faktörler küçük a ile belirlenir. Yüzey aktivasyon sistemi denilen yukardaki reaksiyonlar sonunda aktif hale gelen FXII, F XIIa şeklinde gösterilir.

Faktör XIIa, FXIa oluşumunu sağlar (Şekil 4.4.1). Bu aktif koagulant madde FIXa’nın meydana gelmesini sağlar. FVIII’ün de iştiraki ile intrensek sistem kompleksi meydana gelmiştir. Bu reaksiyon da fosfolipid ve kalsiyum iyonları gereklidir. Reaksiyona FVIII ilave olması reaksiyon hızını 1000 kere arttırmaktadır. Yani hemofili A hastalarında eksik olan FVIII, intrensek sistem kompleksinin önemli bir komponentidir (7, 26).

Tablo 4.3.2. Pıhtılaşma faktörlerinin bazı özellikleri (1)

Faktörler	Mol Ağ.	Yarılanma Ömrü	Miktar (mg/dl)	BaSO ₄ 'a Absorpsiyon	Sentez Yeri	Pıhtı Esnasında Harcanması	Spesifik Özellikleri
Fibrinojen	340.000	77-108	150-400	Yok	K.C.	Var	TS.
Faktör V	330.000	12-36	0.5-1.0	Yok	K.C.	Var	TS.
Faktör VIII:C	200.000	12	<0.01	Yok	K.C.	Var	TS.
vWF	800.000	24	0.51	Yok	Endotel	Var	–
Faktör XIII	320.000	108-168	2.5	Yok	K.C.?	Yok	TS.
Protrombin	68.000	60-68	10-15	Var	K.C.	Var	TS.
Faktör VII	48.000	4-6	0.1	Var	K.C.	Var	Vit. K
Faktör IX	57.000	12	0.01	Var	K.C.	Yok	Vit. K
Faktör X	58.000	24-48	0.75	Var	K.C.	Yok	Vit. K
Protein C	62.000	6	0.5	Var	K.C.	Yok	Vit. K
Protein S	69.000		0.01	Var	K.C.	Yok	Vit. K
Faktör XII	80.000	52-60	0.4	Yok		Yok	Temas
Faktör XI	160.000	48-84	12	Yok	K.C.?	Yok	Temas
Prekalligrenin	85.000	48-52	0.3	Yok	?	Yok	Temas
HMWK	200.000	156	2.5	Yok	?	Yok	–

TS : Trombine hassas olanlar; K.C.:Karaciğer

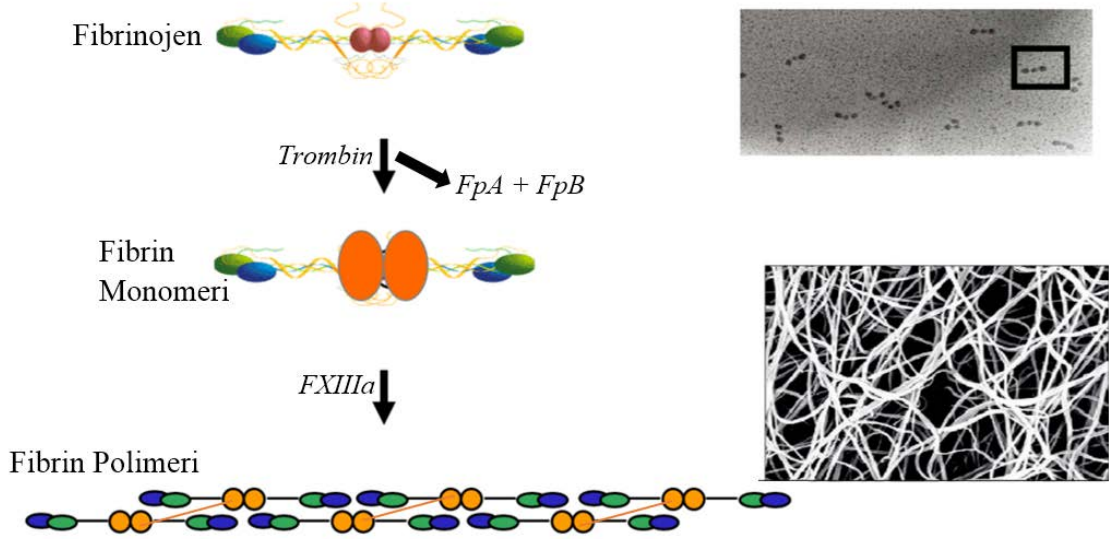
Şekil 4.4.1'de ekstrinsek sistem görülmektedir. Burada doku faktörü FVII'yi aktif hale getirmiştir. Burada kallikreinin hızlandırıcı etkisi olduğu düşünülmektedir. Çünkü bu yol aktifleşen FXII'nin etkisi altındadır. Ortak yolda; inaktif durumdaki FX, ekstrinsek ya da intrinsek yol ile FXa haline getirilmiştir. Faktör Xa güçlü bir serin proteazdır. FV, Tr.F3 ile kalsiyum iyonu varlığında reversibl bir kompleks yapar. Bu komplekse protrombinaz kompleksi denir. Bundan sonraki hedef protrombinaz

kompleksi meydana getirip protrombini, trombine çevirmektedir. Protrombinin trombine aktivasyonu birçok reaksiyon kademesini içine alan bir olaydır (2, 27).

Trombin, 3 etkiyi aynı anda meydana getirebilmektedir. Bunlar şöyle sıralanabilir:

- 1) Fibrinojenden fibrin oluşturması,
- 2) FXIII üzerinden fibrin polimerizasyonu meydana getirmesi,
- 3) Faktör V ve Faktör VIII aktivasyonu (bu etkiyi protein C üzerinden yapmaktadır).

Trombin, fibrinojeni fibropeptid A ve B olmak üzere 2 tane küçük molekülü parçaya ayırarak fibrin monomeri meydana getirir (Şekil 4.4.2). Fibrin monomer meydana geldikten sonra yan yana birleşerek FXIII etkisi ile polimerizasyon işlemleri başlar. Fibrin monomer 5M ürede kolayca çözünür, çözünür pıhtı (Fibrin, Ps) adıyla bilinir. Yaygın damar içi pıhtılaşmasının olduğu durumlarda fibrin monomerin fibrinojen bağlanarak çözünür fibrin kompleksleri meydana getirdiği gösterilmiştir.

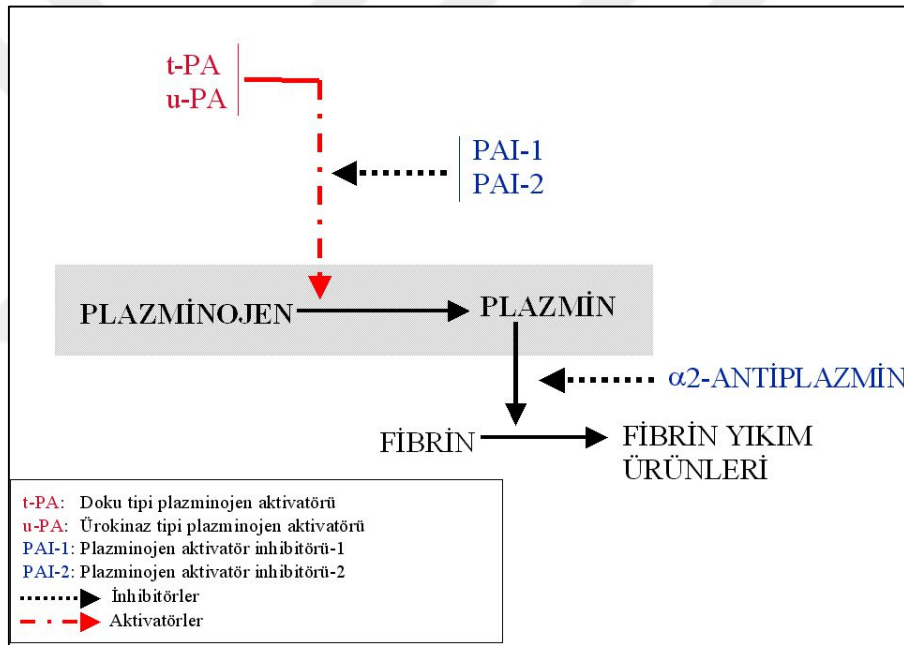


Şekil 4.4.2. Fibrin polimerizasyonu (Kaynak 28’den modifiye edilmiştir)

Fibrin yaralanan damar duvarının iyileşmesinde matriks görevi yapar. Şekil 4.4.2’de fibrin polimerin meydana gelişi görülmektedir. Bu reaksiyonu FXIII, kalsiyum iyonu ve trombin katalizler. Fibrin polimerde çapraz kovalent bağlar

oluşturmuştur. 5M ürede çözünmeyecek kadar sağlam bir fibrindir, yani oluşan pıhtı hemen erimez kanayan bölgede sağlam pıhtı, çözünmez pıhtı (Fibrin-Pi) oluşur. Fibrin-Pi pıhtılaşıma şelalesinin ya da kaskadının son ürünüdür.

Fibrinin görevi bitince fibrinolitik sistem ile pıhtı çözünen parçalara ayrılarak uzaklaştırılır. Damar içinde bulunan olası fibrini eritecek plazminin meydana gelmesi, kanda proenzim olarak dolanan plazminojenin uyarılarak plazmine dönüşmesi sağlanarak yapılır (Şekil 4.4.3) Bu mekanizma aynı zamanda hemostatik sistemin geri kontrolü anlamına da gelir. Enflamasyonun önemli bir noktası olan kallikrein bradikinin sistemi uyarılır.



Şekil 4.4.3. Fibrinolitik sistemin aktivatörleri ve inhibitörleri (21)

Konjenital veya edinsel nedenlerle fibrinolitik aktivitesinde yani plazminin meydana gelişinde azalma olan olgularda trombusa meyil görülür. Çünkü pıhtının meydana gelişininin kontrollü olması gibi pıhtının da gerekli zamanlarda eritilmesi gerekir. Fibrinolitik sistemde dengeyi sağlayan aktivatör ve inhibitörler gelişen yöntemlerle izole edilebilmektedir. Rekombinant DNA teknolojisi ile doku plazminojen aktivatörü (tPA), ürokinaz ve streptokinaz kolayca elde edilebilmektedir.

Bu maddeler trombolitik ajan olarak tedavi amacıyla pulmonal embolilerde, miyokard infarktüsünde, trombüs nedeniyle diğer arter tıkanmalarında kullanılmaktadır. Bunların dışında in vivo olarak plasminojeni plazmine çeviren çeşitli aktivatörler de üretilmekte ve kullanılmaktadır (29-30).

4.4.1. Pıhtılaşma Sisteminde Doku Faktörü

Pıhtılaşma proteinleri yapısal homoloji gösterirken sadece doku faktörü Tip 2 sitokin reseptörleri ile homoloji gösterir. Bu nedenle doku faktörü CD142 olarak da isimlendirilmiştir. Bir transmembran protein olan doku faktörü en fazla beyin, akciğer ve uterus olmak üzere tüm dokularda çeşitli oranlarda bulunur (Şekil 4.4.1). Doku faktörü elde edildiği dokuya göre değişik oranlarda protein, fosfolipid ve karbonhidrat içerir. Ekstresek pıhtılaşma sisteminin aktivasyonunu sağlayan doku faktörü tromboplastin, "FIII" adı ile de bilinir. Doku faktörü hemen hemen tüm dokularda mevcuttur. İmmünohistokimyasal ve kantitatif analizler ile farklı dokuların doku faktörü içeriğinin de farklı olduğu gösterilmiştir. En çok beyin ve akciğerde bulunduğu için protrombin zamanı testi için gerekli DF bu organlardan izole edilerek kullanılır (31-33).

Doku faktörünün hemostaz üzerine etkisi:

-FVII ile kompleks yaparak ekstresek sistemi başlatmak

-FXa'yı meydana getirmek ve pıhtı oluşumunu sağlayarak kanayan bölgeyi kurtarmaktır.

-Doku faktörü tromboz ve inflamasyon üzerine de etki ederek sepsis, yaygın damar içi pıhtılaşması (DIC), arteryal veya venoz trombus oluşumuna aracılık edebilmektedir.

-Doku faktörünün bunların dışında ayrıca yeni damar oluşumu (angiogenesis), mitojenez, düz kas hücrelerinde proliferasyon, malign hücrelerde çoğalma, metastaz oluşumu gibi hemostatik olmayan işlevleri de bulunmaktadır.

1935 yılında Quick tarafından uygulamaya konulan protrombin zamanı testi pıhtılaşma sisteminin kontrolünde günümüzün altın standartları arasında yerini koruyarak kullanılmaktadır. Kanda doku faktörü taşıyan mikropartiküller

bulunmaktadır. Arteriyel trombus oluşumunda bu mikropartiküllerin yer aldığı tespit edildiğinden doku faktörünün bu alanda bir biyobelirteç olabileceği öngörülmektedir (34).

Koagülasyon ve inflamasyon arasında ortak rol oynayan endotel hücrelerinde doku faktörünün proinflamatuvar bir ajan olarak görev yaptığını bildiren çalışmalar da vardır. Doku faktörü proinflamatuvar bir ajan olup olmadığı ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (35, 36).

Kanserli hastaların tromboza eğilimi fazladır. Tromboz ve kanser ilişkisi ilk kez 1865 yılında Armand Trousseau'nun gözlemleri ile başlamıştır. Çeşitli çalışmalar doku faktörü ekspresyonunun kanserli hücrelerde arttığını göstermiştir. Günümüzde bu konuda doku faktörü ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (37, 38).

Endopeptidaz ve ekzopeptidaz aktivitesi olan doku faktörü organizmadaki tüm dokulardan elde edilebilen bir lipoproteindir. Pıhtılaşma mekanizmasında FVII'ye bağlanarak onu aktif şekli olan FVIIa'ya dönüştürür. Moleküler yapısının dokudan dokuya farklılık gösterdiği düşünülmektedir. Beyin, akciğer ve plasenta doku faktörü açısından zengin olan organlar arasındadır. Tükürükteki doku faktörü ağızdaki yaraların ve kanamaların çabuk geçmesi için önemlidir. Quick ve iki safhalı protrombin zamanı ölçüm yönteminde beyin ve akciğerden elde edilen tromboplastinler kullanılır. Faktör IX'u da aktif hale getiren doku faktörü, kanser ve enflamasyon gibi çeşitli hastalıklarda da etkilidir (31, 39-40).

Tablo 4.4.1. Çeşitli dokularda doku faktörü ekspresyonu (31)

Deri	Epidermis	(+++)
	Dermis	(-)
Barsak	Mukoza	(+++)
	Submukoza	(-)
	Muscularis	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	(+++)
	Tubuller	(-)
	İnterstitiyum	(-)
Dalak	Kapsul	(++)
	Trabekul	(+++)
	Splenic cord	(-)
	Limhoid yüzeyler	(-)
Karaciğer	Hepatositler	(+)
	Kupfer hücreleri	(-)
	Safra yolu epiteli	(-)
Adrenal glands	Korteks	(-)
	Medulla	(+)
Periferal sinir	Schwan hücreleri	(++)
	Aksonlar	(-)
İskelet kası	Miyosit	(-)
	Perimisyum	(-)

(-) yok, (+) zayıf aktivite, (++) orta aktivite, (+++) güçlü aktivite, (D) değişebilen aktiviteyi gösterir

4.5. Pıhtılaşma Testleri

Pıhtılaşma sisteminin entrensek ve ekstrensek sisteminde laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan iki test vardır. Bunlar partial tromboplastin zamanı ve protrombin zamanıdır. Pıhtılaşma proteinlerinin biyokimyasal incelenmesinde aşağıdaki 3 şekilde gruplanma esas alınır:

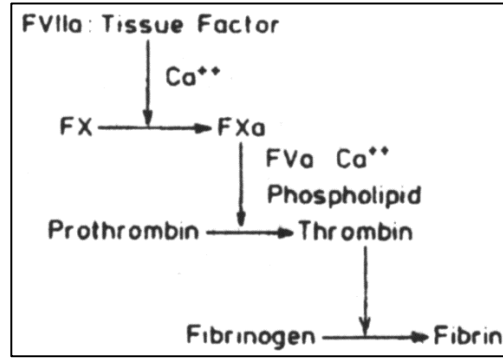
- Vitamin K'ya bağımlı proteinler
- Kontak aktivasyon (temasla ilgili) proteinler
- Trombine duyarlı proteinler

Kalsiyum pıhtılaşma sisteminin her kademesinde olması gereken bir iyonudur. Kalsiyum olmadığı zaman kan hiçbir şekilde pıhtılaşmaz. Bu nedenle laboratuvarında çalışılmak için alınan kanların pıhtılaşması istenmiyor ise sodyum sitrat, etilen diamin tetra asetik asid (EDTA) gibi, kanda kalsiyumu bağlayan ajanlar kullanılır. Bu nedenle belirli konsantrasyonda sodyum sitrat ve EDTA'lı çözeltiler laboratuvarında antikoagulant olarak kullanılır. Çünkü laboratuvar analizi için alınacak kanlar ya düz kan yani antikoagulantsız alınan kanlar ya da plazma denilen ve antikoagulanla alınan kanlardır (25, 41).

Pıhtılaşma sisteminde 1.kadame testleri; aktif partial tromboplastin zamanı (APTT), bir safhalı protrombin zamanı (PTZ), trombosit sayısı, parmak ucundan ya da koldan kanama zamanı ve yine parmak ucundan fibrinin 6-10 dakika içinde teşekkül edip etmediğinin görülmesidir. Von Willebrand hastalığından (VWD) şüphelenince kanama zamanının önemi büyüktür.

4.5.1. Protrombin Zamanı (PTZ)

Protrombin zamanı, ekstrensek sistemin göstergesidir ve tromboplastin kullanılarak yapılır. İn vivo şartlarda bir yaralanma durumunda, bütün dokularda mevcut olan tromboplastinin ilgili bölgeye sızması ile ekstrensek koagülasyon sistemi başlatılır ve fibrin meydana gelerek yaralanan bölgedeki kanama durur.



Şekil 4.5.1. Protrombin zamanı testinde ekstrinsek sistemde gerçekleşen reaksiyonlar

İn vitro şartlarda sisteme doku tromboplastini ve kalsiyum ilave edilerek ekstrinsek sistem ile pıhtının meydana gelmesi ölçülür. Şekil 4.5.1’de protrombin zamanı ile ölçülen pıhtılaşma faktörlerinin akış şeması yani ekstrinsek sistem görülmektedir.

Quick’in 1950’li yıllarda tarif ettiği bu yöntem bugün hala geçerli bir yöntemdir. Çoğu biyokimya laboratuvarında kullanılır. Çünkü oral antikoagulanla tedavi edilen hastanın yegane takip testidir. PTZ aynı zamanda pıhtılaşma sisteminde görevli faktörlerin genetik eksikliğinde ya da moleküler bozukluğunda da normalden farklılık gösterir. K vitamini eksikliğinde de aynı bozukluk geçerlidir. Bu durumlarda protrombin zamanı uzar.

PTZ tayininde referans aralığı laboratuvar şartlarına göre değişim gösterir. PTZ değerleri laboratuvarlarda manuel olarak yapıldığı gibi, foto optik yöntemlerle de yapılır. Foto optik yöntemde referans aralığı 10-12 saniye, manuel yöntemle 12-14 saniyedir. PTZ testi sonuçları hastanın ve normal kontrolün protrombin zamanları saniye olarak, hastanın protrombin zamanı ve laboratuvar referans aralığı yine saniye olarak hastanın protrombin zamanının referans aralığının ortalamasına bölünüp sonucun 100 ile çarpılması ile elde edilen protrombin oranı olarak normalin protrombin zamanının %100 olarak alınması ve hastanın protrombin zamanının buna oranlanması ile elde edilen yüzde aktivite olarak veya INR sistemi ile olmak üzere çeşitli şekillerde bildirilir (25).

Normal protrombin zamanı 11-16 saniye arasında değişir. Burada kullanılan tromboplastinin etkisi vardır. Kimi tromboplastinler çok aktif kimileri daha az aktiftir. Tromboplastin, çeşitli kaynaklardan elde edilebilir. En çok kullanılan tromboplastin tavşan beyni ve sığır akciğerinden elde edilen tromboplastinlerdir. İnsandan elde edilen tromboplastinler kullanılmaz çünkü retrovirüs transmisyonu tehlikesi vardır. Tablo 4.5.1'de protrombin zamanları ve INR değerleri görölmektedir.

Normal kontrol, günlük seçilebildiği gibi 10 ya da 20 olgunun karışımından hazırlanmış ve alikotlara ayrılmış havuzdan da seçilebilir. Normallerin seçiminde oral kontraseptif kullanmayan, kanama diyatezi bildirisi olmayan, ilaç kullanmayan, hamile olmayan gibi bazı durumlara dikkat edilmelidir.

Quick'in bir safhalı protrombin zamanı çok kullanışlı testtir fakat kullanılan tromboplastinlere göre farklılık gösterdiği için standardizasyona gidilmiştir. Ayrıca oral antikoagulan tedavide belirli standartları sağlayabilmek amacı ile son yıllarda Avrupada yaygın olarak INR (uluslararası normalleştirme oranı) sistemi kullanılmaya başlanmıştır.

INR, hasta protrombin zamanının normal kontrolün protrombin zamanı ile kıyaslanması ve bu değerin ISI (uluslararası duyarlılık indeksi) üssünün alınması ile hesaplanır. ISI ise laboratuvarın tromboplastininin standart tromboplastine oranlanması ile elde edilir:

$$\text{INR} = (\text{Hasta PTZ} / \text{Normal PTZ})^{1.51}$$

Hesaplanması karmaşık matematiksel işlemler ve geniş mukayeseli çalışmalar gerektirdiğinden bu değer tromboplastin ayırıcını hazırlayan ticari firmalar tarafından bildirilir.

INR hesaplanmasındaki amaç oral antikoagulan tedavi altında olan hastaların monitorizasyonunun sağlıklı bir şekilde yürütölebilmesidir. PTZ'nin saniye ya da yüzde oranı olarak bildirilmesine kıyasla bütün laboraturalar arasında bir bütönlük sağlar. Dolayısıyla hastalara standart ve daha iyi bir antikoagulan tedavi yapılabilme olanağını tanır. INR hemostatik sistemin veya trombotik durumların başlangıç değerlendirilmesi için kullanılmamalıdır. INR, faktörlerin plazma yarılanma

sürelerindeki farklılıklar nedeni ile oral antikoagulan tedavisinin erken evrelerinde sadece FVII üzerindeki etkiyi aksettirebildiğinden yanıltıcı olabilir. Hasta stabil bir evreye geçtiğinde INR'ye dayalı sağlatımlar daha güvenilir olur (42, 43).

Tablo 4.5.1. Protrombin zamanlarının farklı şekillerde ifadesi

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

PTZ : Protrombin zamanı,

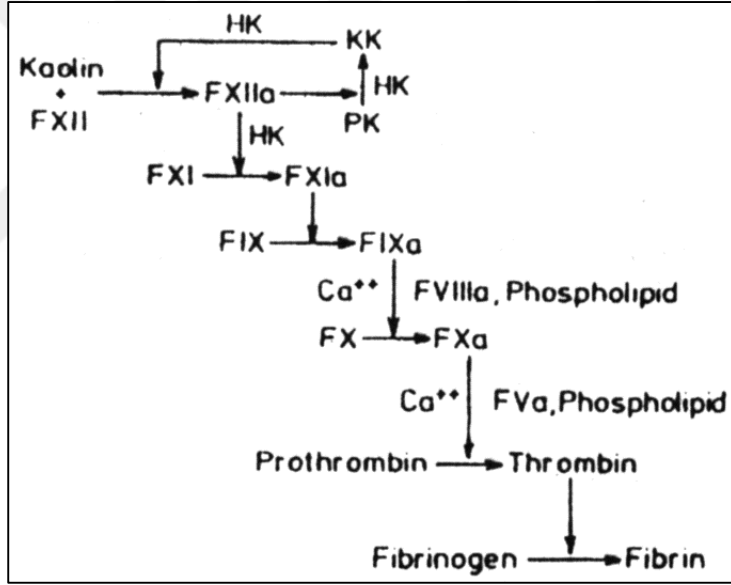
INR : Uluslararası normalleştirilmiş oran (International Normalized Ratio)

PTZ testinde hata her koagulasyon testinde olduğu gibi örnek toplama, ayırıcılar ve araçlardan kaynaklanır. ISI değerinin yapımcı firma tarafından doğru bildirilmemesi, INR değerlerinin doğru hesaplanmaması diğer hata nedenlerini oluşturur.

4.5.2. Aktif Parsiyel Tromboplastin Zamanı (APTT)

Entrensek sistemi gösteren bu testte in vitro olarak yüzey aktivasyonunu yapan ajan olarak kaolin kullanılmıştır yani in vitro şartlarda FXII'nin uyarıcı sistemi, kollagen yerine kaolin olmuştur. Bu nedenle aktifleştirilmiş parsiyel tromboplastin zamanı (APTT) adıyla da anılır. Bu testin diğer bir adı da kaolin sefalin pıhtılaşma zamanı (KCCT)'dir.

Bu testte intrinsek sistem faktörleri aktifleştirilmiş ve pıhtılaşma şelalesi başlatılmıştır. Doku faktörü yani tromboplastin kullanılmamıştır. Temas ya da yüzey faktörleri olarak bilinen kontakt faktörlerin aktivasyonu için plazma kaolin ile bir süre enkübe edilir. Trombositten fakir plazma ile yapılan testte Şekil 4.5.2'de görülen ve intrinsek sisteme ait bütün faktörler hakkında bilgi edinilir.



Şekil 4.5.2. Kaolinle yapılan APTT testinde meydana gelen reaksiyonlar.

APTT için normal değerler 30-40 saniyedir. Bu test yukardaki şekilde görülen pıhtılaşma faktörlerine olduğu kadar plazmada dolaşan inhibitörlere ve heparine karşı da duyarlıdır. Dolayısıyla pıhtılaşma faktörleri normal olduğu halde inhibitör ya da heparin fazlalığı var ise APTT normalden sapma gösterir. Normal ile hasta plazması arasındaki saniye farkı 6'yı geçmemelidir. Fark 10 saniye olursa hastada ciddi bir kanama diyatezi varlığını düşünülür (1).

4.5.3. Trombin Zamanı Testi (TT)

Fibrinojenin fibrine dönüşüm zamanını ölçer. Ortamda heparin varlığında, fibrinojendeki kantitatif veya kalitatif defektlerde (hipo, afibrinojenemi, disfibrinojenemi) ve ortamda fibrin yıkım ürünlerinin varlığında TT uzar.

Testin prensibi sitratlı kandan elde edilen trombositten fakir plazmaya standart bir trombin solüsyonunun eklenmesi ile pıhtı oluşumu arasında geçen sürenin dolayısıyla fibrinojeninin fibrine dönüşüm zamanının saptanmasıdır.

Referans aralığı kullanılan trombinin konsantrasyonuna göre 8-9, 15-20, 20-25 saniye olabilir. Mutlaka normal kontrol ile birlikte yapılmalı, kontrol ve hasta plazmaları çift çalışılmalı, tüpler arasındaki uyum 1.5-2 saniye aralığında olmalıdır.

Hata genel prensipler dışında plazmanın trombositten temizlenmemesi, dondurulmuş heparinli örneklerde çalışılması, trombininin stabilliğinin bozulması nedeniyle olabilir (44).

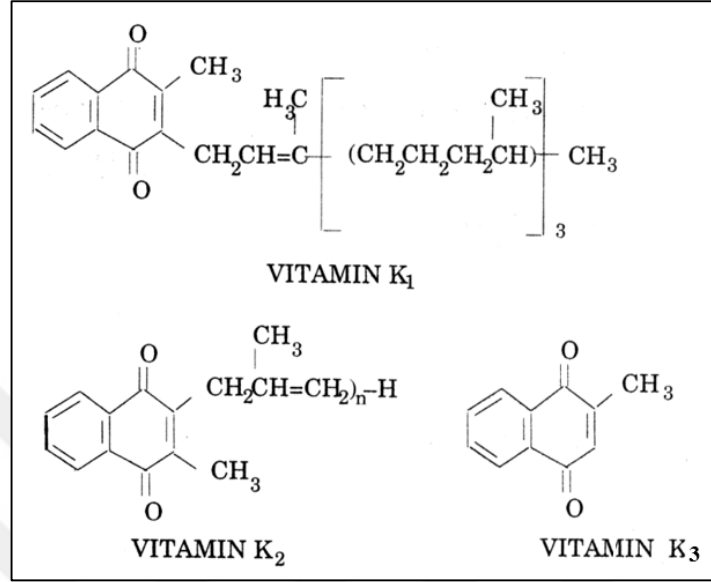
4.6. K Vitamini

K vitamini, 1935 yılında Dam tarafından kanın pıhtılaşma etmeni olarak bulunmuştur. Bu etmene Almanca “Koagulation vitamin” adı verilmiştir. Böylece koagülasyon sözcüğünün baş harfi alınarak vitamin adlandırılmıştır (45).

Yeşil bitkilerden elde edilene filloquinon (Vitamin K₁), balıktan elde edilene menaquinon-6 (Vitamin K₂) denmiştir. Kinon halkası içeren bu vitaminlerin kimileri bitkilerde bulunur kimileri bakteriyel kökenlidir. Sentetik olarak da pek çok K vitamini üretilmiştir. Sentetik olarak üretilen menadionda (K₃) 3. pozisyondaki karbon atomuna bağlı bir yan zincir yoktur. Diğer K vitamini türevlerinde ya 2 ya da 3. pozisyonda ek gruplar vardır. Yapay olarak elde edilen menadion, parenteral olarak kullanılabilmedir. K vitaminleri K₁, K₂ ve K₃ olarak Şekil 4.6.1’de görüldüğü gibidir. Her üç molekülde K vitamini etkinliği göstermektedir (46, 47).

K vitaminin hücrede görevi karboksilaz enzimlerine koenzim olarak iştirak etmektir. K vitaminine bağımlı karboksilaz reaksiyonları birçok dokunun endoplazmik retikulumunda gerçekleşir. CO₂, O₂ ve glutamik asid gereklidir. K vitamini döngüsü, karaciğerin endoplazmik retükülümünde gerçekleşir. Çünkü burada K vitamini kinon

formundan NADH'a bağlı dehidrojenaz ile hidrokinon şekline dđnüşmektedir. K vitamininin rejenerasyonu yapılır (11, 48).



şekil 4.6.1. K vitamini formları (K₁, K₂, K₃)

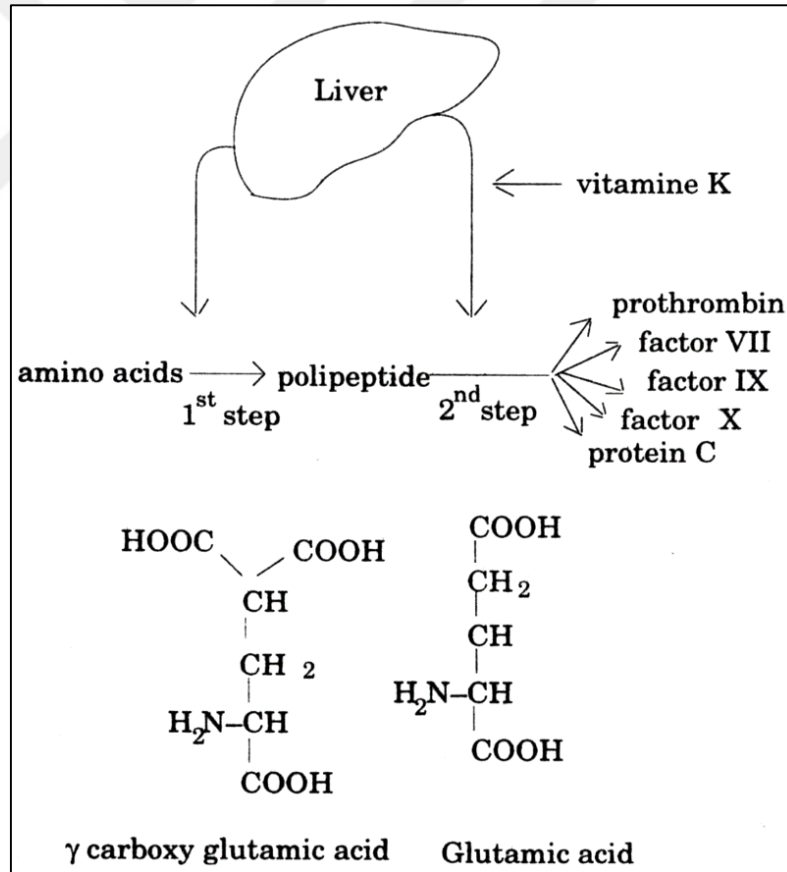
K vitamini, molekülde Gama karboksi glutamat meydana getirmek için karboksilazların koenzimi olarak görev yapar. Sonuçta Gla proteinler oluşur (şekil 4.6.2). Gla proteinler ise koagulyasyonda, kemik mineralizasyonunda gereklidir. Posttransiyonal olarak uygulanan bu reaksiyondan sonra protrombin (Faktör II), Faktör VII, Faktör IX, Faktör X ve bir antikoagulan olan Protein C, koagulyasyonda aktif görevini yapabilmektedir (49, 50).

Doğal besin maddelerinde bulunan K vitaminlerin barsaktan emilimini safra tuzları ve yağlar kolaylaştırır. Barsak hücrelerine geçen K vitaminleri şilomikronlar aracılığı ile lenf sistemine oradan da kana geçer. Menadion suda çözünen bir K vitamini olduğu için emilimi safra ve yağlara bağımlı değildir (40).

Yeşil yapraklı sebzeler, yumurta sarısı ve et K vitamini kaynaklarıdır (Tablo 4.6). Barsak bakterileri de K vitamini sentezi yaptığı için spesifik bir K vitamini RDA'sı yoktur. Barsak bakterilerinin sentezlediği K vitaminleri de barsaktan emilir. Karışık

bir diyetle günde alınan 70-140mcg K vitamini ihtiyacı karşılayacak bir miktar olarak kabul edilmektedir (47).

K vitamini yetersizliğine insanlarda pek rastlanmaz. Ancak aşırı kanamalarda (ameliyat, doğum, yaralanmalar), fazla antibiyotik ve sulfamidli ilaçlar kullanıldığı zaman (barsak florasını değiştireceği için) gereksinim artabilir. Yeni doğan bebeklerin ise henüz bağırsak florası gelişmediğinden ve kanda pıhtılaşma etmenlerinin henüz yetersiz düzeyde oluşundan ötürü gereksiniminin karşılanması önemlidir. Doğumda bebeğe 0.5-1 mg, erken doğana 1mg damardan K vitamini formu verilmesi önerilir. Anne sütünün litresi 2.5mcg vitamin K sağlar. K vitamini yetersizliği olabilecek durumlarda K vitamini dikkatli verilmelidir. Menadion toksik etki gösterebilir. Antikoagulant ilaç kullananların protrombin düzeylerine dikkat edilmelidir. Plazma normal protrombin düzeyi 80-120mcg/dl'dir (47, 51).



Şekil 4.6.2. K vitamini karboksilasyonun kimyasal yapısı

Tablo 4.6. Bazı besinlerin K vitamini değerleri (100gda µg)

Tereyağ	30	Peynir	35
İnek sütü	1	İnsan sütü	0.3
Yumurta	11	Dana Karaciğeri	92
Tavuk Karaciğeri	7	Ayçiçeği Yağı	3
Mısır Yağı	3	Ekmek	4
Soya Fasulyesi Yağı	193	Pirinç	3
Yulaf	10	Kepekli Un	17
Beyaz Un	4	Brokoli	175
Yeşil Fasulye	40	Lahana	729
Marul	129	Bezelye	29
Patates	1	Ispanak	415
Domates	10	Şalgam	650
Muz	2	Portakal	1
Şeftali	8	Çilek	10
Kahve	38	Yeşil Çay	712
Tütün	5000	Kola	2

4.7. K Vitamini İnhibitörleri

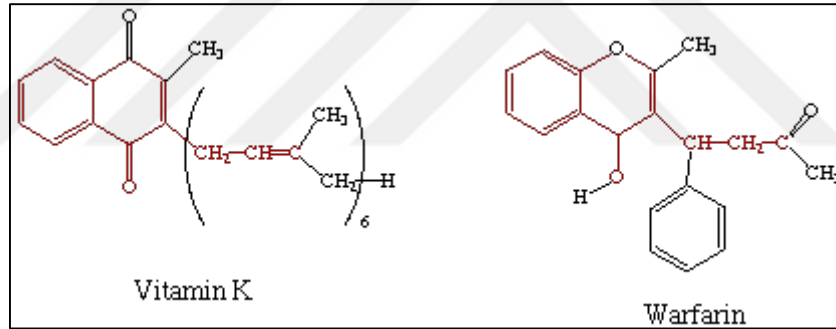
K vitamini antagonisti olarak sentez edilen kumarin türevleri (Varfarin, dikumarol gibi) koagulasyon proteinlerinin karboksilasyonuna yani Gla proteinlerin oluşumuna engel olmaktadır. Oral antikoagulanlar kanda pıhtılaşmayı önlemek için trombus riski olan hastalarda daha çok tedavi amaçlı kullanılır. Koagulasyon faktörlerinin etkisini azaltarak pıhtılaşmaya meyili olan hastalarda trombus oluşumunu azaltmaktadır. Bu hastalarda protrombin sürekli olarak kontrol edilir. Protrombin zamanı, ekstresek pıhtılaşma sisteminin göstergesidir ve saniye olarak ölçülür. Burada hastanın ekstresek pıhtılaşma süresinin normalin altında olması istenir. Anormal bir durum olduğunda ilaçların dozu ayarlanır (52, 53).

4.7.1. Kumarin Türevleri

Kumarinler en yaygın kullanılan K vitamini inhibitörleridir (VKA). Kumarinler piron halkasının benzen halkası ile kondensasyonu sonucu benzopiron olarak bilinen heterosiklik bileşiklerdir. Serbest halde ilk defa 1820 yılında vogel tarafından tonka baklasının tohumlarından izole edilmiştir. Kumarinler anti bakteriyel, anti HIV, anti karsinojen, antikoagulan (kanın pıhtılaşmasını engeller), ateş düşürücü, vazodilatör (damar genişletici) gibi birçok biyolojik aktiviteye sahiptir (54).

Kumarinler yapılarına göre dörde ayrılırlar. Bunlar:

- ❖ **Basit kumarinler** (Ubelliferon, Eskuletin, Herniarin, Skopoletin, Fraksetin)
- ❖ **Furanokumarinler** (Psoralen, Bergapten, Ksantotoksin, Angelisin)
- ❖ **Piranokumarinler** (Visnadin)
- ❖ **Biskumarinler** (Dikumarol, Varfarin)



Şekil 4.7.1. K vitamini ve Varfarin yapısı

Varfarin en fazla tercih edilen VKA'lardandır. Varfarinin molekül yapısı K vitaminine çok benzediğinden dolayı vücuda girdiğinde bu vitaminin yerini alır (Şekil 4.7.1). K vitamini, koagülasyon için gerekli olan faktör II-VII-IX-X'un yapımında önemli rol oynar. Varfarin, K vitamininin yerini aldığı için bu faktörlerin yapımını sekteye uğratar. Varfarinin antikoagulan etkisi INR ile izlenir. INR ayrıca oluşabilecek kanama riski hakkında da bilgi verir (55).

4.8. Metot Karşılaştırma

Metot karşılaştırma, bir parametreyi ölçmeye yarayan yeni bir yöntem bulunduğunda, bu yöntemin yaygın olarak kullanılan referans yöntemle

karşılaştırılarak bulunan yöntemin ne derece uyumlu sonuçlar verdiğinin araştırılmasıdır. Burada uyum ile kastedilen, iki yöntemden elde edilen ölçüm değerlerinin eşit olması değildir. Aynı parametreyi ölçmek için kullanılan iki farklı yöntemin tüm denekler için tamamen aynı sonuçları vermesi pek olanaklı değildir. Fakat yeni yöntemin referans yöntemden ne kadar farklı sonuçlar verdiğini bulmak mümkündür. Eğer bu fark klinik yorumu etkileyebilecek düzeyde değil ise referans yöntem yerine yenisi ya da yöntemler değişimli olarak kullanılabilir (56, 57).

Metot karşılaştırma çalışmalarının temel amacı, iki yöntem arasındaki hatanın derecesini değerlendirmektir. Hatalı test sonuçlarının sebepleri geleneksel olarak 3 kategoriye ayrılır:

- 1- Preanalitik hatalar: uygun olmayan hasta, yanlış örnekleme tekniği veya yanlış numune taşıma sonucu ortaya çıkan hatalardır.
- 2- Toplam analitik hatalar: yöntem karşılaştırma çalışmaları kullanılarak incelenen yeni yöntemin analitik performansından kaynaklanan hatalardır.
- 3- Postanalitik hatalar: yazım hataları, dönüştürme hataları veya yanlış birim kullanılmasından kaynaklanabilecek hatalardır.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır. Tablo 5.1’de gösterilmiştir.

5.1. Kullanılan Maddeler

Tablo 5.1. Çalışmada kullanılan maddeler

Maddeler	Markası
İnsan plazması	
Sıçan beyni ve akciğer dokusu	
Serum fizyoloji (SF) izotonik (%0,9)	Polifarma
Distile su (dh20)	
Kalsiyum klorür (CaCl ₂)	Sigma Aldrich
Etil alkol (%96)	Sigma Aldrich
Doku Faktörü (Tromboplastin/DF)	Kendi hazırladığımız
Aseton	Sigma Aldrich
Etanol	Sigma Aldrich

5.2. Kullanılan Cihazlar

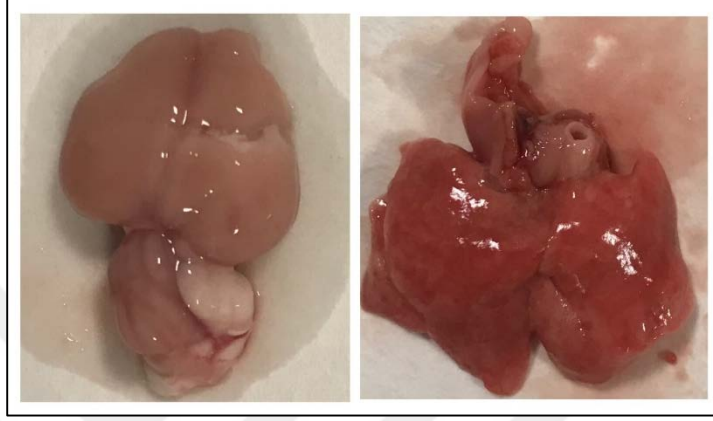
Çalışmada kullanılan cihazlar, Tablo 5.2’de gösterilmiştir.

Tablo 5.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihazlar	Markası
Hassas terazi	Shimadzu ATX224
TissueLyser LT	QIAGEN
Makas-ustura	
Gazlı bez (steril)	
Sıcak su banyosu	Nüve NB5
Vortex karıştırıcı	Velp Classic
Manyetik ısıtıcı-karıştırıcı	Scilogex MS-H280-Pro
Buzdolabı/derin dondurucu -20°C ve -80°C	
Mikropipet (10µL, 100µL ve 1000µL)	Eppendorf
Eppendorf	ISO-LAB
Deney tüpü	ISO-LAB
Falkon tüpü	ISO-LAB
Beher	ISO-LAB
Cam şişe	ISO-LAB
Mezura	ISO-LAB
Balon jöje	ISO-LAB
Manyetik balık	ISO-LAB
Santrifüj	Nüve- NF 800
Spektrofotometre	Shimadzu UV-1800/06431
PH metre	Nüve
Kronometre	ISO-LAB
Distile Su Cihazı	

5.3. Sıçandan Beyin ve Akciğer Eldesi

4 dişi ve 4 erkek olmak üzere 8 adet wistar albino cinsi sıçana herhangi bir kimyasal madde, cerrahi girişim gibi uygulamalar yapılmadı. Sağlıklı deney hayvanları, giyotin vasıtasıyla sakrifiye edildi. Hayvanların beyni ve akciğeri çıkartılarak doku faktörünün eldesinde kullanılmak üzere kuru buzda, -80 °C’de muhafaza edildi (Şekil 5.3).



Şekil 5.3. Sıçan beyni ve akciğeri

5.4. Sıçan Beyni ve Akciğerinden Doku Faktörü Eldesi

Beyin ve akciğer dokuları makas ve ustura yardımıyla küçük parçalara bölündü. Beyin ve akciğer terazide tartılarak miktarları kaydedildi. Akciğer için tartılan miktarın 10 katı; beyin için tartılan miktarın 20 katı kadar serum fizyolojik (SF) ilave edilip TissueLysier LT vasıtasıyla homojenize edildi. Homojenat uygun büyüklükte bir behere alındı. 8 katlı gazlı bezden geçirilerek süzdürüldü (Şekil 5.4). Süzülen homojenat buzdolabında her yarım saatte bir cam baget ile karıştırılmak üzere toplam 8 saat muhafaza edildi. 1,5mL alikvatlanarak eppendorf tüplere alındı, -80 °C’de saklandı.

5.5. Protrombin Zamanı Testinin Yapılışı

5.5.1. Protrombin Zamanı Testi İçin Kan Örneklerinin Alınması

İstanbul Medipol Üniversitesi Mega Hastanesine başvuran antikoagulan kullanan ve kullanmayan 27 kişiden alınan kan örnekleri trombositten fakir plazmaya (sitrathlı plazma : 9ml kan + 1 ml % 3,8’lik sitrat) konuldu. Numuneler 1500 devirde 15

1 dakika oda ısısında santrifüj edildi. Plazma kısmı ayrı bir tüpe alınarak deneyde kullanılmak üzere -80°C 'de muhafaza edildi



Şekil 5.4. Homojenize edilen sıçan beyninin gazlı bezden geçirilmesi

5.5.2. Kalsiyum Klorür (CaCl_2) Çözeltisinin Hazırlanması

0,2 M 100 mL stok CaCl_2 çözeltisi için:

2,22 g CaCl_2 tartıldı, 100 mL distile su eklenerek balon jode karıştırıldı. Kullanılmak üzere 4°C 'de muhafaza edildi.

0,02 M seyreltik CaCl_2 çözeltisi için:

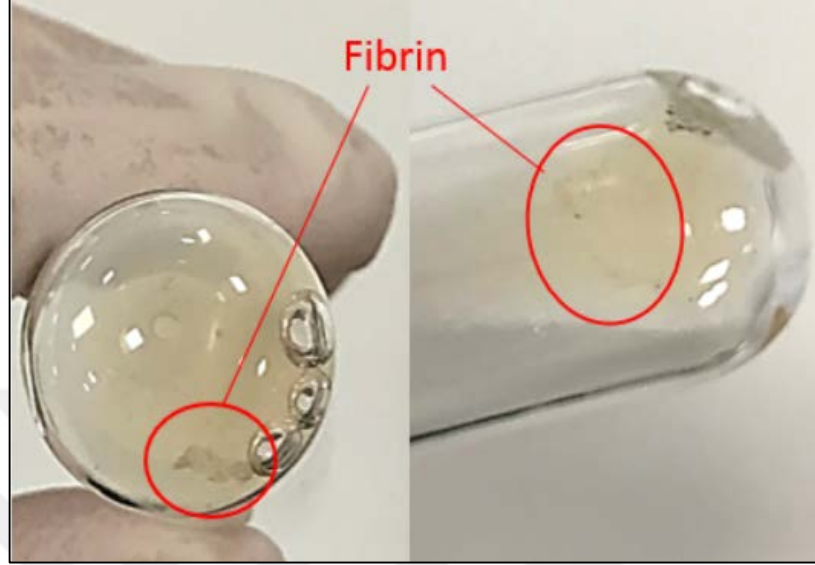
1 mL stok CaCl_2 çözeltisi üzerine 9 mL distile su (DS) eklenerek karıştırıldı. Protrombin zamanı testi yapılacağı zaman taze hazırlandı.

5.5.3. Protrombin Zamanı (PTZ) Testinin Yapılışı

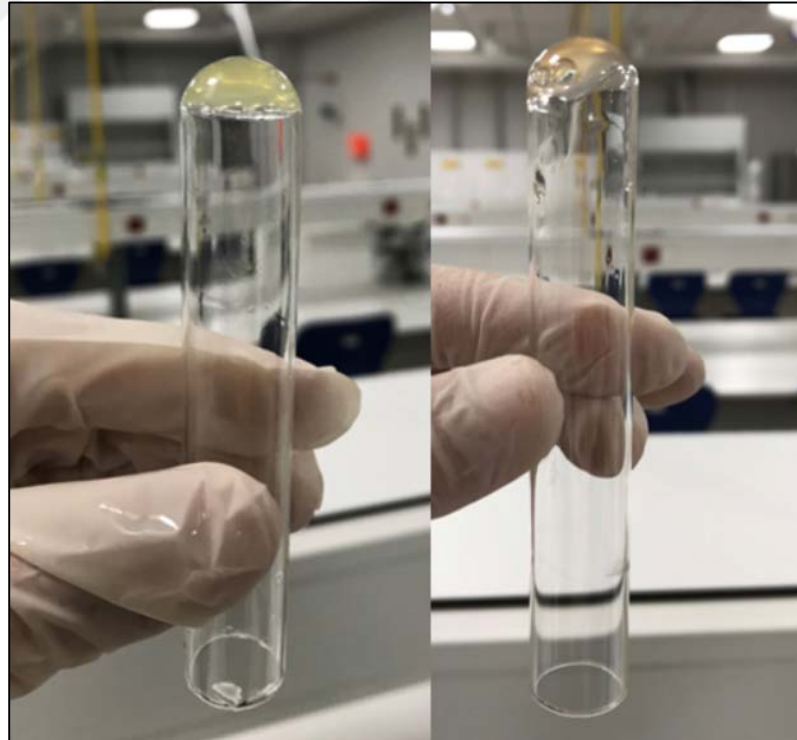
PTZ aşağıda yer alan tablodaki protokole göre sırasıyla yapılmıştır (25) .

Tromboplastin (doku faktörü)	0,1 ml
2 dakika inkübe edilir.	
Plazma	0,1 ml
Vorteksle 1 dakika inkübe edilir.	
0,02 M'lık CaCl_2 Çözeltisi	0,1 ml
Pıhtı oluşumu için geçen süre kronometre ile tayin edilir.	

Tüm çalışma 37°C'lik su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Fibrin iplikleri görüldüğünde geçen süre kronometre ile tayin edildi (Şekil 6.1.1), veriler kaydedildi. Pıhtılaşan kan tüp ters çevrildiğinde dahi tüpten ayrılmadı (Şekil 6.1.2).



Şekil 5.5.3.1. Fibrin ipliklerinin oluşumu



Şekil 5.5.3.2. Sıçan beyninden (sol) ve sıçan akciğerinden (sağ) elde edilen doku faktörü ile yapılan PTZ testi sonrası plazmalar

5.6. Verilerin Değerlendirilmesi

Verilerin analizinde SPSS (Sosyal Bilimler için İstatistik Programı) 23.0 ve MedCalc 19.5.1 programları kullanılmıştır. Bu amaçla; aritmetik ortalama, standart sapma, anlamlılık gibi parametreler incelenmiştir. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.



6. BULGULAR

Protrombin zamanı testi, koagulasyon kaskadında ekstresek yolun göstergesi kabul edilir. Oral antikoagulan kullanan hastaların kullandıkları ilacın dozlarının tespitinde sıklıkla kullanılan bir biyokimyasal analizdir. Bu çalışmada; İstanbul Medipol Üniversitesi Mega Hastanesi Biyokimya laboratuvarına PTZ ölçümü için gelen hastaların artan sitratlı plazmalarında, sıçan beyni ve akciğerinden izole ettiğimiz doku faktörü ile PTZ yapılmış, hastaların sonuçları ile uyumluluğu incelenmiştir.

Çalışmada kullanılan toplam örnek sayısı 27 tanedir. Bu olguların 14 tanesinin PTZ değerleri referans değerleri arasında, 13 tanesinin PTZ değerleri saniye olarak diğerlerinden uzamış durumdaydı. Tablolarda (Tablo 6.1.1-4) bu değerler görülmektedir. Hastane laboratuvarında otomasyonla yapılan PTZ sonuçları ile bizim araştırma amacıyla yaptığımız test sonuçları birbirine yakın değerler olduğu için sonuçlar istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

6.1. Quick Yöntemine Göre Manuel Olarak Yaptığımız PTZ Testinin Sonuçları

Tablo 6.1.1. Sıçan akciğerinden izole ettiğimiz tromboplastinin normal sınırlar içinde kalan otomasyon sonuçları ile karşılaştırılması

	Otomasyon sonuçları (saniye)	Sıçan akciğeri manuel-1 (saniye)	Sıçan akciğeri manuel-2 (saniye)	Sıçan akciğeri manuel-3 (saniye)	Sıçan akciğeri 1,2,3 değerlerinin ortalaması (saniye)
Olgu 1	13,1	13,0	14,0	13,0	13,3 ± 0,6
Olgu 2	12,7	12,0	13,0	12,0	12,3 ± 0,6
Olgu 3	13,4	13,0	13,0	14,0	13,3 ± 0,6
Olgu 4	12,3	13,0	12,0	14,0	13,0 ± 1,0
Olgu 5	12,4	13,0	12,0	12,0	12,3 ± 0,6
Olgu 6	13,0	14,0	15,0	15,0	14,7 ± 0,6
Olgu 7	12,2	12,0	13,0	13,0	12,7 ± 0,6
Olgu 8	12,9	13,0	13,0	14,0	13,3 ± 0,6
Olgu 9	12,2	12,0	12,0	13,0	12,3 ± 0,6
Olgu 10	13,4	13,0	15,0	13,0	13,7 ± 1,2
Olgu 11	12,9	14,0	14,0	13,0	13,7 ± 0,6
Olgu 12	12,0	12,0	13,0	13,0	12,7 ± 0,6
Olgu 13	14,0	15,0	15,0	16,0	15,3 ± 0,6
Olgu 14	12,6	13,0	13,0	13,0	13,0 ± 0,0
P değeri	12,8 ± 0,6		p = 0,0956		13,3 ± 0,9

Tablo 6.1.1’de görüldüğü gibi 14 hastanın PTZ değerleri ile bizim izole ettiğimiz sıçan akciğeri tromboplastini kullanarak yaptığımız PTZ birbirine çok yakın değerlerdir, aradaki fark anlamsızdır ($p>0,05$).

Tablo 6.1.2. Sıçan beyninden izole ettiğimiz tromboplastinin normal sınırlar içinde kalan otomasyon sonuçları ile karşılaştırılması

	Otomasyon sonuçları (saniye)	Sıçan beyni manuel-1 (saniye)	Sıçan beyni manuel-2 (saniye)	Sıçan beyni manuel-3 (saniye)	Sıçan beyni 1,2,3 değerlerinin ortalaması (saniye)
Olgu 1	13,1	14,0	15,0	13,0	14,0 ± 1,0
Olgu 2	12,7	12,0	13,0	13,0	12,7 ± 0,6
Olgu 3	13,4	14,0	14,0	13,0	13,7 ± 0,6
Olgu 4	12,3	14,0	14,0	15,0	14,3 ± 0,6
Olgu 5	12,4	12,0	12,0	12,0	12,0 ± 0,0
Olgu 6	13,0	13,0	14,0	13,0	13,3 ± 0,6
Olgu 7	12,2	13,0	12,0	13,0	12,7 ± 0,6
Olgu 8	12,9	12,0	16,0	12,0	13,3 ± 2,3
Olgu 9	12,2	13,0	13,0	14,0	13,3 ± 0,6
Olgu 10	13,4	14,0	13,0	14,0	13,7 ± 0,6
Olgu 11	12,9	15,0	13,0	13,0	13,7 ± 1,2
Olgu 12	12,0	13,0	12,0	13,0	12,7 ± 0,6
Olgu 13	14,0	14,0	14,0	15,0	14,3 ± 0,6
Olgu 14	12,6	13,0	12,0	13,0	12,7 ± 0,6
P değeri	12,8 ± 0,6	$p = 0,0528$			13,3 ± 0,7

Tablo 6.1.2’de görüldüğü gibi 14 hastanın PTZ değerleri ile bizim izole ettiğimiz sıçan beyin tromboplastini kullanarak yaptığımız PTZ birbirine çok yakın değerlerdir, aradaki fark anlamsızdır ($p>0,05$).

Tablo 6.1.3. Sıçan akciğerinden izole ettiğimiz tromboplastinin uzamış PTZ otomasyon sonuçları ile karşılaştırılması

	Otomasyon sonuçları (saniye)	Sıçan akciğeri manuel-1 (saniye)	Sıçan akciğeri manuel-2 (saniye)	Sıçan akciğeri manuel-3 (saniye)	Sıçan akciğeri 1,2,3 değerlerin ortalaması (saniye)
Olgu 15	44,9	47,0	45,0	44,0	45,3 ± 1,5
Olgu 16	28,6	29,0	30,0	30,0	29,7 ± 0,6
Olgu 17	32,0	34,0	34,0	33,0	33,7 ± 0,6
Olgu 18	31,4	32,0	32,0	33,0	32,3 ± 0,6
Olgu 19	25,1	25,0	25,0	26,0	25,3 ± 0,6
Olgu 20	29,0	29,0	30,0	29,0	29,3 ± 0,6
Olgu 21	56,2	55,0	55,0	57,0	55,7 ± 1,2
Olgu 22	35,1	38,0	36,0	36,0	36,7 ± 1,2
Olgu 23	32,3	32,0	32,0	34,0	32,7 ± 1,2
Olgu 24	35,0	36,0	35,0	35,0	35,3 ± 0,6
Olgu 25	32,3	32,0	33,0	32,0	32,3 ± 0,6
Olgu 26	29,4	29,0	30,0	31,0	30,0 ± 1,0
Olgu 27	25,3	25,0	25,0	25,0	25,0 ± 0,0
P değeri	33,6 ± 8,4		p = 0,8799		34,1 ± 8,3

Tablo 6.1.3'te görüldüğü gibi 13 hasta üzerinde yapılan uzamış PTZ testi sonuçları bizim izole ettiğimiz sıçan beyin tromboplastini kullanarak yaptığımız PTZ birbirine çok yakın değerlerdir, aradaki fark anlamsızdır ($p>0.05$).

Tablo 6.1.4. Sıçan beyninden izole ettiğimiz tromboplastinin uzamış PTZ otomasyon sonuçları ile karşılaştırılması

	Otomasyon sonuçları (sn)	Sıçan beyni manuel-1 (sn)	Sıçan beyni manuel-2 (sn)	Sıçan beyni manuel-3 (sn)	Sıçan beyni 1,2,3 değerlerinin ortalaması (saniye)
Olgu 15	44,9	46,0	45,0	45,0	45,3 ± 0,6
Olgu 16	28,6	30,0	29,0	28,0	29,0 ± 1,0
Olgu 17	32,0	31,0	32,0	31,0	31,3 ± 0,6
Olgu 18	31,4	33,0	33,0	33,0	33,0 ± 0,0
Olgu 19	25,1	27,0	25,0	25,0	25,7 ± 1,2
Olgu 20	29,0	29,0	33,0	30,0	30,7 ± 2,1
Olgu 21	56,2	55,0	60,0	65,0	60,0 ± 5,0
Olgu 22	35,1	38,0	36,0	35,0	36,3 ± 1,5
Olgu 23	32,3	34,0	32,0	34,0	33,3 ± 1,2
Olgu 24	35,0	35,0	35,0	37,0	35,7 ± 1,2
Olgu 25	32,3	33,0	34,0	32,0	33,0 ± 1,0
Olgu 26	29,4	29,0	30,0	30,0	29,7 ± 0,6
Olgu 27	25,3	25,0	26,0	26,0	25,7 ± 0,6
P değeri	33,6 ± 8,4	$p = 0,7967$			34,5 ± 9,2

Tablo 6.1.4'te görüldüğü gibi 13 hasta üzerinde yapılan uzamış PTZ otomasyon sonuçları izole ettiğimiz sıçan beyni tromboplastini kullanarak yaptığımız PTZ sonuçları birbirine çok yakın değerlerdir, aradaki fark anlamsızdır ($p>0.05$).



7. TARTIŞMA

Pıhtılaşma sistemi ile ilgili reaksiyonların inhibisyonu geçmişten günümüze klinikteki tedavi protokollerinin içinde yer almaya devam etmektedir. Koroner ya da serebral arterlerin pıhtı nedeniyle tıkanması geçmişte olduğu gibi günümüzde de dünyanın en önde gelen sağlık problemlerinden biridir.

Doku faktörü, hemostatik sistemi başlatmaktan sorumlu bir membran glikoproteinidir. Bir apoprotein kısmı ve parsiyal tromboplastin aktivitesinin ekspresyonu için gerekli olan fosfolipid kısmından oluşur. DF ile ilgili çalışmalar 1800'lü yıllarda başlamış ve günümüzde artan yoğunlukla devam etmektedir. Çünkü pıhtının ön planda olduğu kalp damar hastalıkları günümüzde de sağlıklı yaşamı tehdit etmekte hatta ölüme neden olmaktadır.

İlk defa Wooldridge, 1886'da kanda bulunmayan fakat dokuda bulunan bir maddenin pıhtılaşmayı hızlandığını bildirmiştir. Günümüzde doku faktörü olarak bilinen bu madde, ektrensek sistemin göstergesi kabul edilmiştir. Subendotelde yer alan doku faktörü damar hasarı olduğunda kana karışır ve plazma proteinleri ile karşılaşınca hemostaz ve trombusu başlatır.

1935 yılında Quick, DF'yi kullanarak kendi adı ile anılan ve günümüzde hala çok kullanılan, PTZ'yi bulmuştur. Bu testin aktif maddesi doku faktörüdür. Tromboplastin reaktifleri beyin, akciğer veya plasenta ekstraterinden saflaştırılan kompleks karışımlardır. Orijinal olarak hayvan ya da insan kaynaklı ekstraktlar ham dokudan elde edilir. Bir transmembran protein olan doku faktörü beyin, akciğer ve uterus başta olmak üzere tüm dokularda çeşitli oranlarda bulunur. Doku faktörü elde edildiği dokuya göre değişik oranlarda protein, fosfolipit ve karbonhidrat içerir. Protrombin zamanı testi için kullanılan doku faktörü genellikle 3 farklı türün kullanımına dayanır. Bunlar insan, tavşan ve sığırdır. Dokulardan ekstre ya da rekombinant DNA teknolojisi ile hazırlanırlar. PTZ testinin sonucu tromboplastinin çeşidi ve kullanılan yöntem doğrudan ilişkilidir (1,5,58). PTZ testinde dikkat edilmesi gereken diğer husus preanalitik hatalarıdır. Bir çalışmada, 129mmol/L (%3,8) sitrat içeren tüplere alınan

örneklerin yetersiz doldurulması PTZ ve APTT süresi değerlerini uzattığı görülmüştür (59).

Bugün dünyada her yıl yapılan 800 milyondan fazla PTZ testi ile en çok başvuru alan laboratuvar koagülasyon testidir. Bu testte, bir hastadan alınan trombosit açısından fakir plazma (sodyum sitrat içeren bir kan toplama tüpünde), DF ve kalsiyum ile karıştırılır. Ardından 37°C'de fotooptik ve elektromekanik gibi çeşitli yöntemler kullanılarak pıhtılaşma süresi belirlenir. Otomatik koagülasyon analizörleri, diğer koagülasyon parametreleriyle birlikte PTZ'yi ölçmek için ticari olarak mevcuttur. PTZ, ekstresek ve ortak yolun fonksiyonel bir ölçüsüdür. Bu nedenle, ekstresek yolla ilgili pıhtılaşmada kalıtsal veya edinilmiş kusurları tespit etmek için yararlı bir testtir. Genellikle PTZ, uluslararası normalleştirilmiş oran (INR) olarak ifade edilir. Çünkü, INR olarak sonuçların raporlanması, sonuçların farklı laboratuvarlar arasında karşılaştırılabilir olmasını sağlar (60, 61).

Uzamış PTZ nedenleri şunlardır:

- Kumarin, warfarin gibi bazı antikoagulanlar (K vitamini inhibitörleri)
- K vitamini eksikliği (beslenme yetersizliği veya emilim bozukluğu)
- Faktör eksikliği (kalıtsal veya edinilmiş, örneğin karaciğer hastalığı)

Rutin laboratuvarlarda ekstresek pıhtılaşma sistemini değerlendirmede kullanılan doku faktörünün kan ve hücrelerdeki etki mekanizması ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Bu çalışmada sıçan akciğeri ve beyninden izole edilen doku faktörü ile yapılan PTZ, hasta sonuçları ile mukayese edilmiştir. Bu amaçla sağlıklı, Wistar Albino cinsi sıçanlar sakrifiye edilerek akciğer ve beyin dokuları, kuru buza konularak -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

Sıçan akciğer ve beyninden doku faktörü izole edilmiştir: Dokular minik parçalara bölünerek tartılmış, akciğer için tartılan miktarın 10 katı; beyin için tartılan miktarın 20 katı kadar serum fizyolojik (SF) ilave edilip TissueLysier LT vasıtasıyla homojenize edilmiştir. Homojenat 8 katlı gazlı bezden geçirilerek süzdürülmüştür.

Süzülen homojenat buzdolabında her yarım saatte bir cam baget ile karıştırılmak üzere toplam 8 saat muhafaza edildikten sonra 1,5mL alikvatlanarak eppendorf tüplere alınıp, -80 °C’de saklanmıştır.

Medipol Hastanesinden alınan plazmalara, Quick (1935) yöntemi ile protrombin zamanı testi uygulanmıştır. Bu plazmaların 14 tanesinin PTZ değerleri referans değerleri arasında, 13 tanesinin PTZ değerleri saniye olarak uzamış durumdaydı. Hastane laboratuvarında otomasyonla yapılan PTZ sonuçları ile bizim araştırma amacıyla yaptığımız test sonuçları birbirine yakın değerler olduğu için sonuçlar istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$).

Antikoagulan ilaçlar, pıhtılaşma faktörlerini doğrudan veya dolaylı olarak etkiler ve böylece kanın pıhtılaşmasını önler. K vitamini antagonistleri (çoğunlukla varfarin) en yaygın olarak neredeyse bir yüzyıl boyunca kullanıldı. Son yıllarda ise doğrudan faktör IIa veya faktör Xa'yı hedefleyen yeni oral antikoagulan ilaçlar kullanıma sunulmuştur (62). Uzun dönem antikoagulasyonda her gün parenteral ilaç kullanımı yerine, gelecekte haftada tek bir enjeksiyonla yeterli antitrombotik etki oluşturabilecek alternatifler de sıradadır. Bir pentasakkarit türevidir olan idraparinux, antitrombine bağımlı yarılanma ömrü yaklaşık 80 saat olan ve haftada bir kullanım seçeneği veren bir FXa inhibitörüdür. Yine FXa inhibisyonu yapan ancak oral olarak kullanılabilen bir ajan olan rivaroxaban (Xirelto®) FDA gibi bazı kuruluşlardan onay almıştır. Fakat bu ilaçların uzun dönem antikoagulasyonda etkililikleri hala tartışmalı olup, çalışmaların sonuçları beklenmektedir (63). Antikoagulan ilaç kullanımının en önemli sakıncaları kanamaya yol açmaları (güvenlik sorunu) ve laboratuvar izleminin (etkililik sorunu) gerekliliğidir. Bu nedenle hastalarda protrombin zamanı sürekli olarak kontrol edilir. Protrombin zamanı, ekstresek pıhtılaşma sisteminin göstergesidir ve saniye olarak ölçülür. Burada hastanın ekstresek pıhtılaşma süresinin normalin altında olması istenir. Anormal bir durum olduğunda ilaçların dozu ayarlanır (53).

İnsanlarda aterosklerotik plak üzerine yapılan ex vivo çalışmaları, tromboza neden olan önemli bir etmenin doku faktörü olduğunu gösterdi (64-66). Benzer şekilde, düşük DF'li farelerde lazerle indüklenen kremaster arteriyol hasarını içeren bir

mikrovasküler tromboz modelinde trombosit ve fibrin birikimi azaldığı görülmüştür (67, 68)

2017 yılında Tripathi ve arkadaşları, antikoagulan kullanan hastaların PTZ/INR değerlerini kendileri ölçebilmelerini sağlayan bir optik sensör geliştirmiştir. Çalışmada 60 hastanın sensördeki sonuçları ve PTZ/INR değerleri mukayese edilmiş, Bland-Altman analizine göre her iki test ölçümü arasında yüksek uyum görülmüştür (69).

Koronavirüsler (CoV) zarflı, tek zincirli pozitif RNA virüsleri olup, oldukça geniş bir aile oluştururlar. İnsanlarda yaygın hastalık yaptığı bilinen 229E, OC43, NL63 ve HKU1 türleri genellikle hafif orta şiddette solunum yolu infeksiyonlarına sebep olurken 2002 yılında “şiddetli akut solunum sendromu (SARS)”, 2012 yılında “Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS)” etkeni olmak üzere iki yeni koronavirüs ortaya çıkmıştır. Son olarak 2019 yılında COVID-19 hastalığına neden olan SARS-CoV-2 tanımlanmıştır. Her yaşta insan COVID-19 infeksiyonuna duyarlıdır. Ancak yaşlılar ve altta yatan kronik hastalıkları olanlarda COVID-19 infeksiyonuna duyarlılık artmıştır. COVID-19 infeksiyonunun tedavisinde spesifik antiviral ilaç yoktur. Bu nedenle tedavi stratejisi daha çok destek tedavi ve komplikasyonların önlenmesine yöneliktir (70). Dünya genelinde morbidite ve mortalite artışına neden olan COVID-19 üzerine yapılan çalışmalarda, virüsün tromboembolik komplikasyonlara neden olduğu bildirilmiştir. Hottz ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı çalışmaya göre, şiddetli COVID-19 hastalarında artmış trombosit aktivasyonu ve trombosit-monosit agregat oluşumunun gözlemlendiğini, ancak hafif dereceli hastalarda gözlenmediği görülmüştür. Bu durumun monositler tarafından salgılanan doku faktörü ile ilişki olduğu bildirilmiştir. Çalışmada, şiddetli COVID-19 hastalarından alınan trombositler, sağlıklı gönüllülerdeki monositlerde ex vivo şartlarda TF ekspresyonunu indüklemiştir (71). Çalışmalar, şiddetli COVID-19 geçiren hastaların uzamış APTT ve PTZ, yüksek D-dimer ve fibrin bozunma ürünleri (FDP) seviyeleri, artmış trombin-antitrombin (TAT) kompleksi ve azalmış antitrombin (AT) olduğunu göstermektedir (72). Trombosit agregasyonunu önleyen ajanların kullanılması şu an tartışılan bir konudur. Aspirinin (asetil salisilik asit) tromboksanının bir inhibitörü olarak terapötik rolü belirsizliğini korumaktadır. Aspirin, doku faktörü sentezini inhibe ederek ve/veya bir DF yolu inhibitörünün üretimini kolaylaştırarak DF'nin ekspresyonunu sınırlayabilir

(73). Doku faktörü ve COVID-19 ilişkisi, gelecekte ele alınması gereken önemli konulardan biridir.



8. SONUÇ

Doku faktörü insan vücudunda çok önemli bir yere sahiptir. Günümüzde dünyayı kasıp kavuran COVID-19 dahil olmak üzere birçok hastalığın morbidite ve mortalite nedeninde altta yatan etmenin doku faktörü olduğu düşünülmektedir. Doku faktörü, sağlıklı insanlarda yaralanma ve kanamaya karşı insan vücudunun verdiği doğal bir yanıt sonucu oluşurken hastalıklarda bozulmuş düzen nedeniyle sürekli takip edilmeye ihtiyaç duyulur. Antikoagulan ilaç kullanan hastalarda bu takip PTZ ile yapılır. Bu testin sonucuna göre ilacın dozu ayarlanır, hasta takibi sağlanır, olası olumsuz durumların önüne geçilir. Bu nedenle PTZ oldukça mühim bir testtir ve testin çeşitli varyansları geliştirilmiştir. Çalışmamızda, sıçan akciğeri ve beyninden izole ettiğimiz doku faktörünü Quick metodu ile uyguladığımızda, hastane sonuçları ile paralellik gözlemledik, bu nedenle aradaki farkı anlamsız bulduk ($p>0,05$). Bu çalışma insan organizmasında bu kadar etkin rolleri olan doku faktörünün birtakım deneylerle elde edilebileceğini ve standardize edilerek protrombin zamanı testinde kullanılabileceğini göstermiştir. Bulgularımız tromboplastin üretiminde literatüre katkı sağlayacaktır.

9. KAYNAKLAR

1. Emekli N. Temel ve Uygulamalı Biyokimya, Cem Ofset Matbaacılık San.A.Ş. 378-458. 2004.
2. Taylan M, Polat H, Özer H, Kilit B, Emekli N. Amino Asitlerden Proteinlere Uzun İnce Bir Yol. İstanbul Medipol Üniversitesi Yayınları. 174-176. 2019.
3. Emekli N. Basic and Applied Biochemistry. Marmara Üniversitesi Yayınları. 402. 2005.
4. Chu AJ. Tissue Factor, Blood Coagulation, and Beyond: An Overview. Int J Inflamm. 2011.
5. Unruh D, Horbinski C. Beyond thrombosis: the impact of tissue factor signaling in cancer. Journal of Hematology & Oncology. 13,93. 2020.
6. Whitby, L.G., Smith, A.F., Becket, G.J. : Lecture notes on Clinical Chemistry, Blackwell Scientific Publication, 1988.
7. Demir M. Geleneksel Pıhtılaşma Testleri ve Klinik Uygulamalardaki Yeri. İçinde: Klinik Biyokimya Editörleri: Emekli ve Yiğitbaşı. 323-331. 2015.
8. Tenekeciğil A. Koyun ve kuzu akciğerinden izole edilen doku faktörü aktivitesinde lipitlerin etkisi. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans tezi. 2016.
9. Mensah AG, Wei GS, Sorlie PD, Fine LJ, Rosenberg Y ve ark. Circ Res. 120 (2), 366–380. 2017.
10. Mann, K. Biochemistry and physiology of blood coagulation. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 82:165-174, 1999.
11. Nelson LD, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 6.Baskı, CBS Publishers and Distributors. 2016.
12. Demir M ve Vural Ö. Doku faktörü yolu inhibitörü (DFYİ): Normal hemostatik mekanizmada ve patolojik durumlardaki rolü. Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji. Kongre Kitabı, 20-32. 2001.
13. Milutinović A, Šuput D, Zorc-Pleskovič R. Pathogenesis of atherosclerosis in the tunica intima, media, and adventitia of coronary arteries: An updated review. Bosn J Basic Med Sci. 20 (1), 21–30. 2020.
14. Ulutin, ON. The platelets : Fundamentals and Clinical Applications Kağıt ve Basım İşleri, A.Ş., İstanbul. 1976.

15. Aiolfi R, Sitia G, Iannacone M, Guidotti L, Ruggeri ZM. Defective Platelet Thromboxane A2 Signaling and Serotonin Release in the Pathogenesis of Bleeding during Viral Infection. *Blood*. 2019.
16. Chen Z, Lu J, Zhang C, Hsia I, Yu X, Marecki L ve ark. Microclot array elastometry for integrated measurement of thrombus formation and clot biomechanics under fluid shear. *Nature*. 2019.
17. Sangkuhl K, Shuldiner AR, Klein TE, Altman RB. Platelet aggregation pathway. *Pharmacogenet Genomics*. 2011.
18. Harvey RA. Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry. 30.Baskı. Philadelphia: Wolters Kluwer Health. 2015.
19. Flaumenhaft R. Chapter 18 - Platelet Secretion. *Platelets*. 3.Baskı. Academic Press. 343-366. 2013.
20. Lieberman M, Marks AD. Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach. 3.Baskı, Lippincott Williams and Wilkins. 2009.
21. Emekli N. Hemostatik sistem biyokimyası. içinde: *Biyokimyada Temel ve Özel Konular*, Editörler:Yarat A, Akbay T.T, Alturfan EI. Akademisyen Kitabevi. Ankara. 581-591. 2019.
22. Weisel JW, Litvinov RI. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood*. 2013.
23. Esmon CT. Protein C : Biochemistry, physiology and clinical implications. *Blood*. 62, 1155. 1983.
24. Grower SP, Mackman N. Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biolog*. 39, 3. 2019.
25. Yiğitbaşı T & Emekli N. Öğrenciler için *Biyokimya Laboratuvarı*. İstanbul Medipol Üniversitesi Yayınları, 3. Baskı, Ravza Nur Form Matbacılık Kırtasiye San. ve Tic. Ltd Şti. 2019.
26. Hoyer LW. The factor VIII complex: Structure and Function. *Blood*. 58, 13. 1981.
27. Latner AL. *Clinical Biochemistry* W.B. Saunders Company. 1975.
28. Zabczyk M, Blombäck M, Majewski J, Karkowski G, Wallen HN ve ark. Assays of fibrin network properties altered by VKAs in atrial fibrillation – Importance of using an appropriate coagulation trigger. *Thrombosis and Haemostasis*. 2014.
29. Dahlbäck B. Blood coagulation. *The Lancet*. 355(9215).1627-1632, 2000.

30. Ten Cate H, Hemker HC. Thrombin generation and atherothrombosis: What does the evidence indicate? *Journal of the American Heart Association*. 5(8), e003553, 2016.
31. 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(5):1087-1097, 1989.
32. Hooper N, Hames D. *Biochemistry*. 3.Baskı. Taylor & Francis Group. 2005.
33. Witkowski M, Landmesser U, Rauch U. Tissue factor as a link between inflammation and coagulation. *Trends in cardiovascular medicine*. 26(4), 297- 303. 2016.
34. Quick, A.J. The prothrombin in hemophilia and in obstructive jaundice. *Journal of Biological Chemistry*. 109. 1935.
35. Bokarewa MI, Morrissey JH, Tarkowski A. Tissue factor as a proinflammatory agent. *Arthritis Res*. 4 (3), 190–195. 2002.
36. Jose RJ, Manuel A. COVID-19 cytokine storm: the interplay between inflammation and coagulation. *The Lancet*. 2020.
37. Yarat A. Doku faktörü ve kanser. 5. Ulusal Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji Kongre Kitabı. Ed.Ulutin ON. 197-203. 2004.
38. Versteeg HH. Tissue factor old and new links with cancer biology. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. Thieme Medical Publishers. 41 (7), 747-55. 2015.
39. Tria, E. And Scanu, A.M. : Structural and functional aspects of Lipoproteins in Living Systems. *Lipoproteins of Blood Coagulation Academic Press*, 1969.
40. Styer L, Berg MJ, Tymoczko JL, Gatto JG. *Biochemistry*. 9.Baskı. W.H. Freeman. 2019.
41. Tietz, W.N. : *Clinical Guide to Laboratory Tests*. W.B. Saunders Company, 1990
42. McKenzie SE. Hematology. *Pediatric Secrets*. 5.Baskı. Mosby. 302-336. 2011.
43. Suwanawiboon B, Ortel TL. Anticoagulation in the Perioperative Period. *Consultative Hemostasis and Thrombosis*. 3.Baskı. 673-687. 2013.
44. Aktuğlu G. Kanama diyatezli hastanın anamnez özellikleri, muayene bulguları, rutin kanama diyatez testleri ve yorumlanmaları. T.İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi No.36, 28. 2003.

45. Vermeer C. Vitamin K: the effect on health beyond coagulation – an overview. *Food Nutr Res.* 2012.
46. Schwalfenberg GK. Vitamins K1 and K2: The Emerging Group of Vitamins Required for Human Health. *Journal of Nutrition and Metabolism.* 2017.
47. Baysal A. Beslenme. 16. Baskı. Hatiboğlu Yayınları. 2015.
48. Cranenburg ECM, Schurgers LJ, Vermeer C. Vitamin K: the coagulation vitamin that became omnipotent. *Thromb Haemost.* (1), 120-5. 2007.
49. Hamidi MS, Gajic-Veljanoski O, Cheung MA. Vitamin K and Bone Health. *Journal of Clinical Densitometry.* 16 (4), 409–413. 2013.
50. Wei FF, Trenson S, Verhamme P, Vermeer C, Staessen JA. Vitamin K–Dependent Matrix Gla Protein as Multifaceted Protector of Vascular and Tissue Integrity. *Hypertension.* 73 (6), 1160-1169. 2019.
51. Clarke P, Mitchell SJ, Sundaram S, Sharma V, Wynn R, Shearer MJ. Vitamin K status of preterm infants with a prolonged prothrombin time. *Acta Pædiatrica.* 2005.
52. Jackson MC, Esnouf MP, Lindahl LT. A critical evaluation of the prothrombin time for monitoring oral anticoagulant therapy. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 33 (1), 43-51. 2003.
53. Winkler MA. Chapter 142 - Laboratory Support for Warfarin Monitoring. *Transfusion Medicine and Hemostasis.* Academic Press. 2009.
54. Saraç K. 4-Metilkumarinlerin Sentezi ve Karakterizasyonu. *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi.* 4(1), 21-25. 2015.
55. Saygılı G, Ertaş H, Arslan H, Kaplan YC, Tarım-Ertaş E, Çapar İD. Kardiyovasküler Sistem Hastalıklarında Kullanılan İlaçlar ile Endodontide Sistemik Olarak Kullanılan İlaçlar Arasındaki İlaç Etkileşimleri. *Sağlık Bilimleri Dergisi.* 23, 38-46. 2014.
56. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet.* 307-310. 1986.
57. Jensen AL, Kjelgaard-Hansen M. Method comparison in the clinical laboratory. *Veterinary Clinical Pathology.* 35(3), 276-286. 2006.
58. Rao VM, Hoang D. Purification And Characterization Of Rabbit Tissue Factor. *Thrombosis.* 56, 109-118. 1989.

59. Reneke J, Etzell J, Leslie S, Gottfried EL. Prolonged Prothrombin Time and Activated Partial Thromboplastin Time Due to Underfilled Specimen Tubes With 109 mmol/L (3.2%) Citrate Anticoagulant. *Coagulation and Transfusion Medicine*. 2016.
60. Nguyen A, Dasgupta A, Wahed A. Coagulation-Based Tests and Their Interpretation. *Management of Hemostasis and Coagulopathies for Surgical and Critically Ill Patients An Evidence-Based Approach*. 1-16. 2016.
61. Roshal M, Gil RM. Prothrombin Time. *Transfusion Medicine and Hemostasis*. 3.Baskı. Clinical and Laboratory Aspects. 773-777. 2019.
62. Mijovski MB. Advances in monitoring anticoagulant therapy. *Advances in Clinical Chemistry*. 2019.
63. Demir M, Tekgündüz E. Antitrombotik ve Antikoagulan Kullanım İlkeleri. *Trakya Univ Tip Fak Derg*. 1, 69-73. 2010.
64. Toschi V, Gallo R, Lettino M. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 95, 594–599. 1997.
65. Badimon JJ, Lettino M, Toschi V. Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation*. 99, 1780–1787. 1999.
66. Reininger AJ, Bernlochner I, Penz SM. A 2-step mechanism of arterial thrombus formation induced by human atherosclerotic plaques. *J. Am. Coll. Cardiol*. 55, 1147–1158. 2010.
67. Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G. Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood*. 104, 3190–3197. 2004.
68. Gross PL, Furie BC, Merrill-Skoloff G. Leukocyte-versus microparticlemediated tissue factor transfer during arteriolar thrombus development. *J. Leukoc. Biol*. 78, 1318–1326. 2005.
69. Tripathi MM, Egawa S, Wirth AG, Tshikudi DM, Van Cott E, Nadkarni SM. Clinical evaluation of whole blood prothrombin time (PT) and international normalized ratio (INR) using a Laser Speckle Rheology sensor. *Scientific Reports*. 2017.

- 70.** Çiftçi E, Çoksüer F. Yeni Koronavirüs İnfeksiyonu: COVID-19. *Flora*. 25 (1), 9-18. 2020.
- 71.** Hottz ED, Azevedo-Quintanilha IG, Palhinha L, Teixeira L, Barreto EA, Pão CR, Righy C, Franco S. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19. *Platelets and Thrombopoiesis*. 136, 11. 2020.
- 72.** Bisvas I, Khan GA. Coagulation Disorders in COVID-19: Role of Toll-like Receptors. *Journal of Inflammation Research*. 13, 823–828. 2020.
- 73.** Vargas MB, Abadia FB, Cañas CA. Potential role for tissue factor in the pathogenesis of hypercoagulability associated with in COVID-19. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 50, 479–483. 2020.

10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-772.02-E.49015
Konu : Etik Kurulu Kararı

22/09/2020

Sayın Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Sığan Beyninden ve Akciğerinden İzole Edilen Doku Faktörünün K Vitamini İnhibitörleri İle İlişkisinin İncelenmesi" isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Ek:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 22.09.2020 tarihinde e-İmzalanmıştır. Evrağınızı <https://cbys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden D8B37FD6XF kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavaeik Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavacık Kavşağı - Beykoz
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
17/09/2020	52		Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ

"Sıçan Beyninden ve Akciğerinden İzole Edilen Doku Faktörünün K Vitamini İnhibitörleri İle İlişkisinin İncelenmesi" başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna "Oybirliği" ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 5 yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Haneî ÖZBEK	
Üye	Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Burak ÇAĞLAYAN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Çağlar BEKER	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Neriman İpek KIRMIZI	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Cem GÜNEŞ	
Üye	Burak Sefa DERİBAŞ	

11. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Merve	Soyadı	Taylan
Doğum Yeri	İstanbul	Doğum Tarihi	11.01.1998
Uyruğu	T.C.	T.C. Kimlik	
E-mail	mervetaylanm@gmail.com	Tel	05385807735

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Biyokimya	2018-2020
Lisans	İstanbul Medipol Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik (Bölüm 3.sü)	2015-2019
Lise	Cumhuriyet Anadolu Lisesi	2011-2015

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (G/A/Y)
Muhasebeci	Yusuf Medikal	25.05.2020- Devam ediyor
Araştırmacı	İstanbul Medipol Üniversitesi/ Biyokimya ABD / REMER	19.11.2018- 31.12.2019
Stajyer Diyetisyen	Medipol Mega Hastanesi	05.11.2018- 22.11.2018
Stajyer Diyetisyen	Medipol Esenler Hastanesi	08.10.2018- 01.11.2018
Stajyer Diyetisyen	Medipol Mega Hastanesi	27.08.2018- 28.09.2018
Stajyer Diyetisyen	Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi	04.07.2018- 07.08.2018

Stajyer Diyetisyen	Özel Medigold Hastanesi	09.10.2017- 22.05.2018
--------------------	-------------------------	---------------------------

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi
SPSS (Sosyal Bilimler İçin İstatistik Programı)	İyi
Bebis (Beslenme Bilgi Sistemi)	İyi

ALES Puanı (Sayısal)	94,1
YÖK-DİL Puanı	61,2

Yayınlar ve Bildiriler

Yazılan ulusal/uluslararası kitaplar:

Taylan M, Polat H, Özer H, Kilit B, Emekli N. Amino Asidlerden Proteinlere Uzun İnce Bir Yol. Medipol Üniversitesi Yayınları. 2019.

Sözel Sunum:

Taylan M, Dağlı M, Öztürk Rİ. Üniversite Öğrencilerinde Renklerin Tatlı Tüketimine Etkisi. 2. Uluslararası Beslenme, Obezite ve Toplum Sağlığı Kongresi. 2019.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

Dağlı B, Taylan M, Öztürk Rİ. Üniversite Öğrencilerinde Renklerin Tatlı Tüketimine Etkisi. 2. Uluslararası Beslenme, Obezite ve Toplum Sağlığı Kongresi. 2019.