

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**ENFEKTİF ENDOKARDİT VE YAPAY KAPAK TROMBOZLARININ GENETİK
POLİMORFİZMLERLE İLİŞKİSİ**

Proje No: TSA-09-1116

Proje Türü

Bilimsel Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Prof.Dr. Hüsnü Cemal Kahraman
Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ömer Naci Emiroğulları
Kalp ve Damar Cerrahisi AD./Cerrahi Tıp Bilimleri Böl.

Prof. Dr. Yusuf Özkul
Tıbbi Genetik AD./Dahili Tıp Bilimleri Böl.

Doç.Dr. Mehmet Güngör Kaya
Kardiyoloji AD./Dahili Tıp Bilimleri Böl.

Öğr. Gör. Dr. Elif Funda Şener
Tıbbi Biyoloji AD./Temel Tıp Bilimleri Böl.

Öğr. Gör. Dr. Aydın Tunçay
Kalp ve Damar Cerrahisi AD./Cerrahi Tıp Bilimleri Böl.

Ekim 2013

KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
	No
ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
1. GİRİŞ/AMAÇ VE KAPSAM.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Protez Kapak Trombozu	2
2.2. Endokardit.....	3
2.3. Tromboz.....	5
2.3.1. Kalıtsal Tromboz Nedenleri	6
2.4. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (<i>MTHFR</i>) Geni	6
2.5. Faktör -V Geni	7
2.6. Protrombin (Faktör-II) Geni	8
2.7. Plazminojen Aktivatör İnhibitör Tip 1 Geni	8
2.8. Tümör Nekrozis Faktör Alfa Geni	9
2.9. Polimorfizm	10
2.9.1. Tıbbi Genetikte Polimorfizmlerin Kullanımı	10
2.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	11
2.11. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP).....	11
3. GEREÇ-YÖNTEM	
3.1. Hasta Seçimi.....	13
3.2. Hastalardan Kan Örneklerinin Toplanması	13
3.3. DNA İzolasyonunun Yapılması	13
3.4. Moleküler Çalışma Basamakları	13
3.4.1. Faktör V Leiden G1691A Polimorfizminin Belirlenmesi	14
3.4.2. <i>MTHFR</i> C677T Polimorfizminin Belirlenmesi	15
3.4.3. Faktör II (Protrombin) G20210A Polimorfizminin Belirlenmesi	15
3.4.4. Plazminojen Aktivatör İnhibitör (<i>PAI-I</i>) 4G/5G Polimorfizminin Belirlenmesi	15

3.4.5. Tumor Nekrozis Faktör alfa ($TNF-\alpha$) -308 G>A Polimorfizminin Belirlenmesi	16
3.5. RFLP Yöntemi	16
3.5.1. Genotiplerin Belirlenmesi	18
3.6. İstatistiksel Analizler	19
4. BULGULAR	20
4.1. Faktör V Leiden G1691A Polimorfizm Bulguları	20
4.2. MTHFR C677T Polimorfim Bulguları	21
4.3. Protrombin G20210A Polimorfizm Bulguları	22
4.4. Plazminojen Aktivatör İnhibitör (PAI-1) 4G/5G Polimorfizm Bulguları	23
4.5. Tumor Nekrozis Faktör Alfa ($TNF-\alpha$) -308G>A Polimorfizm Bulguları	23
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	25
6. KAYNAKLAR	26

ÖZET

ENFEKTİF ENDOKARDİT VE YAPAY KAPAK TROMBOZLARININ GENETİK POLİMORFİZMLERLE İLİŞKİSİ

Giriş:

Kapak hastalıklarında hasta ölüm sebeplerinin başında endokardit ve kapak trombozu gelmektedir. Kapak trombozunu önlemek için oral antikoagülan ilaçlar kullanılmaktadır. Kapak trombozunun gelişmesinde en önemli sebep ilacın yetersiz dozda alınması veya hiç alınmaması olmakla birlikte etkili dozlarda ilaç kullanan hastalarda da ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca enfektif endokardit gelişen hastalarda gerek tıbbi gerekse cerrahi tedavi yüksek mortaliteye sahiptir.

Bu çalışmada enfektif endokarditli ve kapak trombozlu hasta gruplarında *MTHFR* C677T, Protrombin G20210A, Faktör-V Leiden G1631A, *PAI-1* 4G/5G ve *TNF- α* -308 G>A polimorfizmleri arasındaki ilişki araştırıldı.

Metod:

Bu çalışmaya enfektif endokarditli 18 hasta, kapak trombozlu 12 hasta ve 37 sağlıklı birey dahil edildi. İlgili polimorfizmlerin saptanması için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemleri kullanıldı. Grupların karşılaştırılması ki-kare analizi ile yapıldı.

Sonuç:

MTHFR C677T, Protrombin G20210A, Faktör-V Leiden G1631, *PAI-1* 4G/5G polimorfizmleri için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. *TNF- α* -308 G>A polimorfizmi anlamlı olarak tespit edildi.

Tartışma:

Çalışmamızda ise *TNF- α* -308 G>A polimorfizmi sonuçları endokardit ve kapak trombozlu hastalarda kontrol grubu ile ki-kare testine göre karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Ancak kapak trombozunun genetik faktörlerle ilgisi hakkında literatürde yeterli yayın bulunmamaktadır. Bu konuda daha geniş ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Tromboz, enfektif endokardit, polimorfizm

ABSTRACT

INVESTIGATION OF GENETIC POLYMORPHISMS IN INFECTIVE ENDOCARDITIS AND ARTIFICIAL VALVE THROMBOSIS

Introduction

Major causes of the mortality in patients with valve disease are endocarditis and valve thrombosis. Oral anticoagulant drugs are used to prevent valve thrombosis. Uses of inadequate doses of medication or not use medications are the main reason for the development of valve thrombosis. In addition to medical treatment or surgical treatment of patients with infective endocarditis has a high mortality rate. In this study, *MTHFR* C677T, Prothrombin G20210A, Factor-V Leiden G1631, *PAI-1* 4G/5G and *TNF- α* -308 G>A were determined the patients with infective endocarditis and valve thrombosis group.

Method

18 patients with infective endocarditis, 12 patients with valve thrombosis and 37 healthy volunteers were involved these study. Polymerase chain reactions (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) were used to detection the related polymorphism. Chi-square was used to compare groups.

Results

There was no significant difference between the groups regarding *MTHFR* C677T, Prothrombin G20210A, Factor-V Leiden G1631, *PAI-1* 4G/5G polymorphism. In contrast *TNF- α* -308 G>A polymorphism was detected significant.

Discussion

In our study, *TNF- α* -308 G>A results were higher endocarditis and valve thrombosis than control groups in chi-squares test and there were significant different in two groups. There is not enough data in literature about the involvement genetic factors withvalve thrombosis. In these reason, broader and more comprehensive studies are needed in these regard.

Key words:

Thrombosis, infective endocarditis, polimorphism

1.GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Kapak hastalıklarında hasta ölüm sebeplerinin başında endokardit ve kapak trombozu gelmektedir. Kapak trombozunu önlemek için oral antikoagülan ilaçlar kullanılmaktadır. Kapak trombozunun gelişmesinde en önemli sebep ilacın yetersiz dozda alınması veya hiç alınmaması olmakla birlikte etkili dozlarda ilaç kullanan hastalarda da ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca enfektif endokardit gelişen hastalarda gerek tıbbi gerekse cerrahi tedavi yüksek mortaliteye sahiptir (1,2).

Literatür araştırmalarında enfektif endokardit ve kapak trombozu ile ilgili az sayıda araştırma ve yayına rastlanmaktadır. Bu çalışmanın amacı kapak endokarditi ve trombozu ile ilişki olabilecek 5 genetik polimorfizmin (*MTHFR* C677T, Protrombin G20210A, Faktör-V Leiden G1631, *PAI-1* 4G/5G ve *TNF- α* -308 G>A) hasta grubumuzda ortaya konulmasıdır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Protez Kapak Trombozu

Mekanik kapağın trombozu fonksiyonel stenoza ya da regurjitasyona neden olur. Semptom ve bulguların hızı yavaş büyüyen bir tromboza ya da akut gelişen disk hareketlerinin kısıtlanmasına bağlı olarak değişkendir. Kapak trombozu en fazla triküspit pozisyonunda izlenir, bu oran 20% lere varabilir. Sol taraflı mekanik kapaklarda tromboz ihtimali daha azdır, ancak antikoagulan tedaviye uyumsuzluk söz konusu olduğunda neredeyse her zaman trombotik oklüzyon oluşur. Kapak trombozundan şüphelenildiğinde ekokardiyografik inceleme ile tanı doğruluğu sorgulanır, mitral pozisyonundaki kapaklar için ise mutlaka TEE incelemesi gerekir, çünkü bu bölgedeki trombotik oluşumlar sıklıkla kapak dikiş halkasının atriyal tarafını etkiler. Protez kapak hastası olup iskemik nörolojik olay gelişen hastalarda diğer bir kaynak varlığı ispatlanana kadar emboli kaynağının protez kapak olduğu düşünülmelidir. Kapak trombozu varlığı dokümantasyonunda ekokardiyografi yardımcı olsa da, ekokardiyografik delillerin olmaması kapak trombozu tanısını ekarte ettirmez.

Ekokardiyografinin hassaslığı kapak protezinin gölgelendirmesi ve kapak yapılarının reverberasyonları nedeni ile kısıtlanmaktadır. Ek olarak küçük trombuslar gözden kaçabilir ve emboliye neden olan trombus artık izlenmeyebilir. Bu nedenlerden dolayı dikkatli bir yaklaşım uygulamak gerekir, öncelikle antikoagulasyonun yeterliliği ölçülmelidir. Yetersiz olduğu saptanırsa düzeyi yükseltilmeli ve gerekli ayarlar yapılmalıdır. Eğer antikoagulasyonun yetersiz olduğuna kanaat getirilirse aspirin de tedaviye eklenmelidir. Tromboembolik nedenlerden dolayı kapak reimplantasyonuna gitmek problemleri de beraberinde getirecektir, çünkü bu işlem de benzer tromboembolik risk taşımaktadır. Takılı olan kapak ancak üzerinde kesin trombus varlığı tanısı konursa ve daha düşük tromboemboli insidansı olan bir kapak ile değiştirilecekse reimplantasyona gidilebilir.

Kapak trombozunun tedavisi eşlik eden hemodinamik parametrelere ve hastanın genel durumuna dayanılarak karar verilen bir durumdur. Eğer hemodinami stabilse ya da medikal tedaviye iyi yanıt veriyorsa uygun antikoagülasyonun sağlanması gibi konservatif bir yaklaşım düşünülebilir. Akut hemodinamik bozulma var ise cerrahi girişim ile kapağın değiştirilmesi gündeme gelebilir ancak operatif mortalite 17-40% arasında değişir (1). Trombusun debride edilmesi, kapağın değiştirilmesine oranla daha yüksek retromboz riski taşır. Yüksek operatif mortalite için risk faktörleri arasında eşlik eden sol ventrikül disfonksiyonu, koroner arter hastalığı, acil cerrahi girişim gereksinimi ve genel fonksiyonel durum bulunmaktadır. Alternatif olarak trombolitik tedavi de önerilmektedir ve başarı oranı 70-90% arasında değişmektedir (2). Çeşitli serilerde trombolitik tedavinin de riskleri hesaplanmış ve mortalitenin 20%, sistemik emboli riskinin 16% ve acil cerrahi gereksiniminin 22% olduğu ortaya çıkmıştır. 127 vakayı içeren bir çalışmada trombolitik tedavi uygulanan kapak trombozu vakalarının 71% inde hemodinamik rezolüsyon sağlanmış ancak hastaların üçte birinde birden fazla trombolitik seans uygulanmıştır (3). Bu seride embolik olay 15% vakada, hemorajik komplikasyonlar 5% vakada ve mortalite oranı da 12% vakada izlenmiştir (3,4). Bu nedenle tromboze protez kapaklı bir hastada günümüze kadar cerrahi yada trombolitik tedavi arasında karar vermek oldukça zor olmuştur.

2.2. Endokardit

İnfektif endokardit (İE), kalbin endotel yüzeyinin mikrobiyal enfeksiyonudur. Enfeksiyonun karakteristik bölgesi genellikle kapaklar ve karakteristik lezyonu trombositler, fibrin, inflamatuvar hücreler ve mikroorganizmaları içeren vejetasyonudur. Hastalık eğer akut ise, günler veya haftalar içerisinde progresyon gösterir ve kapak destrüksiyonuna, metastatik enfeksiyona neden olabilir. Diğer yandan subakut İE haftalar ve aylar içerisinde progresyon gösterir, sadece hafif toksisiteye neden olur, genel olarak metastatik enfeksiyona neden olmaz. Sol kalp daha sık etkilenmekle birlikte intravenöz ilaç kullanımında sağ kalp etkilenir.

Protez kapak endokarditi eğer post-operatif ilk 60 gün içerisinde meydana gelmişse "erken", 60 günden sonra meydana gelmişse "geç" olarak isimlendirilir. Protez kapak endokarditinin (PKE) fizyopatolojisi doğal kapak endokarditinden şöyle ayrılmaktadır: PKE'nde infeksiyon, kapak halkasının distaline ve kapak annulusuna kadar yayılabilir, ayrıca periannüler dokuyu da etkileyerek halka apsesine, septal apselere ve en sonunda protez kapağın ayrışmasına neden olabilir. Endokarditi olan hastanın başvuru semptomları arasında ateş, döküntü, terleme, kilo kaybı, anoreksi, kırgınlık ve halsizlik hissi olup bulgular arasında yükselmiş vücut sıcaklığı, yeni veya değişen üfürüm, splenomegali, embolik olaylar, nörolojik bulgular, endokarditin periferik bulguları vardır. Tanı, modifiye Duke kriterlerindeki majör ve minör kriterlerin kullanılması sayesinde konulur (5). İE çok sinsi olarak başlayabilir, dolayısı ile mutlaka bu tanıdan şüphelenilmesi gerekir, böylece bu tanı atlanmamış olur. Ekokardiyografi kapak lezyonlarını ve valvüler veya paravalvüler tutulumun derecesini saptayabilir. Ek olarak, eş zamanlı SV fonksiyonları da değerlendirilebilir. İlişkili kalp-içi santiar saptanabilir. PKE ve ciddiyetinin belirlenmesi için TÖE daha uygun olup endokardit ile ilişkili olabilecek diğer bozuklukların saptanmasında ve değerlendirilmesinde de yararlı olabilir.

İE vakalarının %80'inin nedeni streptokok ve stafilokoklardır. Erken PKE'ne neden olan alışlagelmiş mikroorganizmalar stafilokoklardır. Geç PKE örneği doğal kapak endokarditi ile benzerdir. Endokarditte antibiyotik tedavisi kan kültüründe üretilen mikroorganizmaya yöneliktir. En sık kullanılan antibiyotikler kan kültürlerinden en sık üretilen mikroorganizmalara yöneliktir (6). Tedavi genellikle 6 hafta uygulanır. Ampirik antibiyotik tedavisine başlamadan önce yeterli miktarda kan kültürü gönderildiğinden emin olunmalıdır. Endokardit komplikasyonlarının ortaya çıktığı hastalar, hem cerrahi hem de medikal tedavi kombinasyonunun uygulanması halinde daha iyi prognoza ve daha uzun süreli sağ kalım oranlarına sahip olmaktadır. PKE olan hastalarda cerrahi şu durumlarda endikedir:

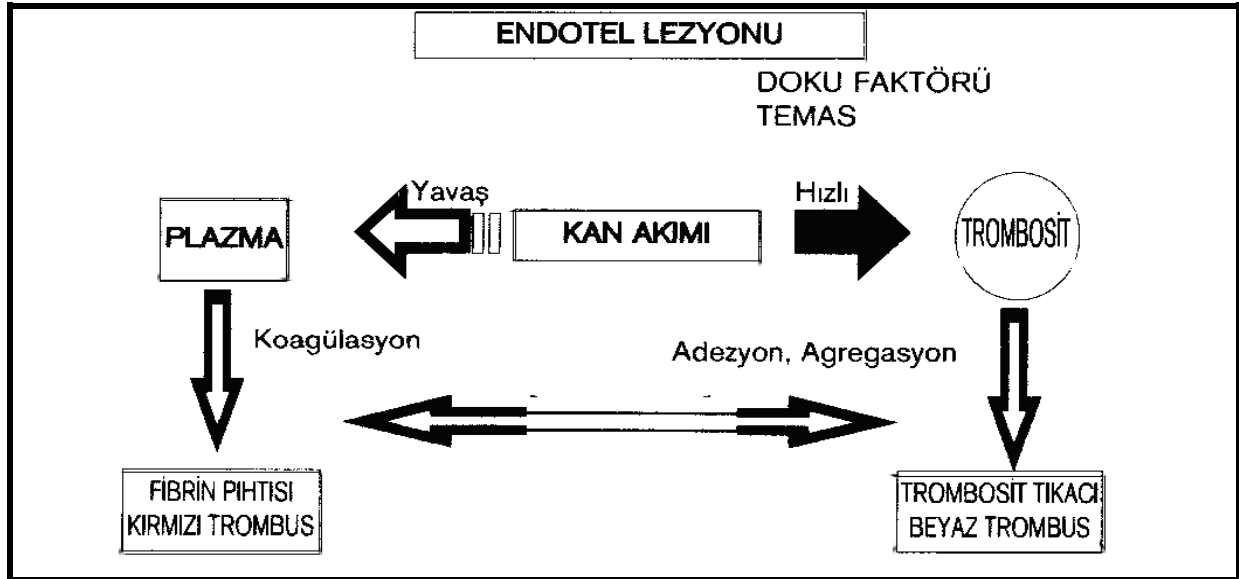
- Erken protez kapak endokarditi,
- Hemodinamisi bozulan ve kapakta cerrahi olarak düzeltilebilecek bir patolojisi olan hastalar, akut AY, MY veya kalp yetersizliği oluşan hastalar,
- Kapak disfonksiyonu kalp yetersizliğine yol açıyor ise,
- Fungal endokardit,
- Paravalvüler kaçak, fistül oluşumu, kök apsesi,
- Antibiyotik tedavisine rağmen devam eden ve kapak disonksiyonuna yol açan endokardit,
- Medikal tedaviye yanıtızsızlık,
- Rekürren emboli olması veya 10 mm'den büyük vejetasyonlar.

Cerrahi sonrasında antibiyotik tedavisi önceki tedavinin uzunluğuna, neden olan mikroorganizmanın direncine, vejetasyonun üzerinde mikroorganizmanın varlığına bağlıdır. Eğer cerrahi operasyon sırasında doğal kapaktan elde edilen kültür örneği negatif ise, cerrahi öncesi ve sonrasında medikal tedavi tek doz olarak verilir. Pozitif ise, cerrahi sonrasında ek doz antibiyotik tedavisi uygulanır. Eğer PKE varsa, kültür ister pozitif ister negatif olsun, cerrahi sonrasında ek doz antibiyotik tedavisi gerekir.

2.3.Tromboz

Tromboz damar içinde kan elemanlarından oluşan anormal bir kitledir. Prokoagülan, antikoagülan ve fibrinolitik faktörler arasındaki hassas dengelerdeki bozukluk sonucunda oluşur (7). Tromboz oluşumunda 3 değişiklik söz konusudur (Şekil 2.1):

1. Kan akımındaki değişiklikler (Reoloji, staz)
2. Damar duvar değişiklikleri
3. Pıhtılaşma faktör ve bunların inhibitörlerinin kan düzeylerindeki değişiklikler



Şekil 2.1. Tromboz oluşum mekanizması

2.3.1. Kalıtsal Tromboz Nedenleri

1. Protein C yolu bozuklukları (APCR-FVL, Protein C, Protein S, Protrombin 20210 mutasyonu, artmış Fak VIII ve diğer faktörler)
2. AntiTrombin III azalması
3. Hiperhomosisteinemi (Sistasyon β -sentaz azalması, Metiyonin sentetaz eksikliği, Termolabil metilen tetra hidro folat redüktaz (MTHFR))
4. Fibrinolitik aktivitede bozukluk (PAI 1 aktivite artışı (4G/5G polimorfizmi), Plazminogenemi)
5. Disfibrinogenemi
6. Hemoglobinopati
7. Trombosit bozuklukları (8)

2.4. METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ (MTHFR) GENİ

Metilentetrahidrofolat redüktaz (*MTHFR*), folat metabolizmasında önemli bir enzimdir. İnsan *MTHFR* geni, kromozom 1p36.3'de lokalize olmuştur ve 656 aminoasitten oluşan *MTHFR* enzimini kodlar (9). *MTHFR*, 5,10 metilentetrahidrofolatı (5,10-metilen THF) geri dönüşümsüz olarak 5-metil tetrahidrofolata (5-metil THF) dönüştürür. 5-metil THF; DNA metilasyonu ve metiyonin sentezi için metil grubu sağlar. 5,10-metilen THF ise deoksiüridilatın timidilata dönüşümünde kullanılırken bir taraftan da pürin sentezi için 10-

formil THF'a okside olmaktadır (10). MTHFR geninde görülen bazı mutasyonlar, enzimin inaktivasyona neden olarak, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörü olan hiperhomosisteinemi ve homosisteinüri oluşmasına neden olur (11). MTHFR enziminin eksikliği durumunda klinik semptomların geniş bir dağılım gösterdiği açıklanmıştır. Hiperhomosisteinemi ve homosisteinürinin ortaya çıktığı ciddi MTHFR eksikliğinde, periferik nöropati, gelişme geriliği, hipotonia, strok, tromboz gibi klinik özellikler görülür. MTHFR eksikliğinin hafif olduğu durumlara populasyon genelinde oldukça sık rastlanmakta olup, özellikle arteriyel hastalıkların oluşumunda bir risk faktörü olduğu ileri sürülmektedir (12).

C677T polimorfizmi MTHFR proteinin N terminal katalitik bölgesini etkileyen 4. ekzonda meydana gelir. *MTHFR* C677T polimorfizminde, MTHFR enzimini kodlayan gende 677. nükleotid olan C (Sitozin)'in →T (Timin)'e dönüşmesi sonucu ortaya çıkan bir nokta mutasyonu vardır. Bu mutasyon, genin ürünü olan proteinin 226. pozisyonunda Alanin aminoasitinin yerine Valin aminoasitinin geçmesine neden olur. Bunun sonucu olarak MTHFR aktivitesi azalır. Azalan MTHFR aktivitesi, 5-metil tetrahidrofolat seviyesinde azalmaya ve homosisteinin metiyonine dönüşmemesi nedeniyle plazma homosistein seviyesinde artmaya neden olur (13). *MTHFR* C677T sıklığının etnik ve coğrafi değişimi oldukça fazladır. *MTHFR* C677T mutasyonunun toplumda görülme sıklığı % 12 olarak bildirilmektedir. T677T oranı Amerika'daki siyah populasyonda ve Güney Amerika'da %1 iken Avrupa'daki beyaz toplumda, Kuzey Amerika'da ve Avustralya'da %6-20'dir. Avrupa'da kuzeyden güneye doğru görülme sıklığı artmaya meyillidir. Japonların ise %12'si homozigot (T677T)'tur (14). Türkiye'de yapılan çalışmalarda sağlıklı bireylerde homozigot mutant oranı % 5, heterozigot mutasyon oranı ise % 35 olarak bildirilmiştir (15).

2.5. FAKTÖR-V GENİ

Faktör V, protrombinin trombine dönüşmesini sağlayan ve böylece hemostazda yer alan önemli bir kofaktördür. Aktive protein C (APC) ise, Faktör V'i inaktive edip antikoagülant etki göstererek bu süreçte rol oynar. Aktive protein C rezistansı (APCR) bir plazma örneğinin APC'ye azalmış antikoagülasyon cevap göstermesiyle tanımlanır ve protein C yolundaki pek çok anomaliye bağlı olabilir. Bu anomaliler defektif APC kofaktörleri, defektif APC substratları veya normal bir protein C yoluna karşı oluşmuş antikor veya diğer ajanlardan kaynaklanabilir. APC'ye karşı dirençle ilgili kalıtımın otozomal dominant olduğu belirtilmiştir. Faktör V geni, kromozom 1q21-q25'te olup, 70 kb uzunluğunda ve 25 ekzon

içermektedir. Bu gen lökosit adhezyon moleküllerinden selektin genlerine oldukça yakındır. Faktör V geninde var olan 1691 G→A pozisyonundaki nokta mutasyonu (Faktör V Leiden mutasyonu) neticesinde 506. pozisyonundaki arjinin aminoasidi yerine glutamin aminoasidi gelmektedir. Mutant faktör V, normaline göre on kat daha yavaş inaktive olmakta, dolaşımında daha uzun süre kalmaktadır. Bu da daha fazla trombin üretilmesine ve protrombin fragmanlarından faktör XII nin ve aktive olmuş koagülasyon faktörlerinin artışı yansıtan hafif hiperkoagülasyona neden olmaktadır. Bu durum, faktör V molekülüne, APC'nin proteolitik inaktivasyonuna karşı direnç kazandırmakta ve bunun neticesinde bu mutasyonu taşıyan bireyler venöz tromboza eğilimli hale gelmektedir (16).

Faktör V Leiden mutasyonu insidansı toplumlar ve ırklar arasında farklılık göstermektedir. Avrupa popülasyonunda % 4-5 oranında mutasyon saptanmaktadır. Ülkemiz ise mutasyonun sık görüldüğü yerler arasındadır ve insidans % 9.1 civarındadır (17).

2.6. PROTROMBİN (FAKTÖR-II) GENİ

Protrombin veya faktör II karaciğer tarafından üretilen ve fibrinojenin fibrine dönüşümünde aktive formu kilit görevi yapan vitamin K bağımlı bir faktördür. Protrombin geni 11. kromozomun sentromere yakın kısmında, 21 kb uzunluğunda, 14 ekzon ve 13 introndan oluşmaktadır. Protrombin geninde 3'-untranslated bölgesinin 20210. nükleotidindeki guaninin adenine değişimi söz konusu mutasyonu oluşturur. Protrombin G20210A mutasyonu 1996 yılında bulunmuştur. Bu mutasyonu taşıyanlarda plazma protrombin düzeyi taşımayanlara göre fazladır. Bu artış da tromboz oluşum riskinin artmasına neden olur (18). 20210. nükleotidde görülen mutasyon koagülasyon sisteminde trombin oluşumunun artmasına neden olur. Faktör V Leiden'e benzer şekilde beyaz ırk dışında G20210A mutasyonunun prevalansı çok düşük bulunmuştur. Genel olarak faktör V Leiden Kuzey Avrupa'da daha yaygınken, protrombin mutasyonu Güney Avrupa'da özellikle Akdeniz bölgesinde daha yaygındır. Özellikle Akdeniz bölgesinde (Fransa hariç) İspanya (%6.5), İtalya (%4.6), Türkiye (%6.2), Yunanistan (%4) gibi Akdeniz ülkelerinde prevalans rölatif olarak yüksektir (19). Mutasyon beyaz popülasyonda %1-5 oranında bulunmaktadır. Mutasyon sıklığı Kuzey Avrupa'dan güneye inildikçe artar. Kuzey Avrupa'da %1.7 olan insidans güney Avrupa ve Akdeniz'de %3-5'tir (20).

2.7. PLAZMİNOJEN AKTİVATÖR İNHİBİTÖR TİP 1 GENİ

Fibrinolitik sistemde homeostazın düzenlenmesinde iki enzim sistemi önemli rol oynamaktadır. Bu enzim sistemlerinden birincisinde, plazminojen aktivatörleri, ikincisinde ise

plazminojen aktivatör inhibitörleri yer almaktadır. Plazminojen aktivatörleri arasında doku plazminojen aktivatörü (t-PA) ve plazminojen aktivatör inhibitörleri arasında ise plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) vardır. Fibrinolitik sistemde PAI-1 aktivasyonu fibrin tarafından gerçekleştirilmekte ve aktive olan PAI-1 ise t-PA'yı bağlayarak onun litik etkisini inhibe etmektedir. PAI-1 379 aminoasitten oluşan ve 48.000 D moleküler ağırlıkta olan lineer bir glikoproteindir. Asıl görevi fibrinolizisi azaltmaktır. İnsan *PAI-1* geni 7. kromozomun uzun kolunda (7q21.3-q22) lokalize olmuştur, 9 ekzon ve 8 intron içerir. Birçok polimorfizmin tanımlanmış olmasının yanında, tek bir baz değişimini içeren 4G/5G polimorfizmi promotör bölgesinde yer alır (21). PAI-1; TNF, IL-1, Transforming Growth Faktör b, Lipopolisakkaritler, Forbol Esterleri, Glukokortikoid hormonlar, VLDL, İnsülin gibi bazı ajanlar tarafından regüle edilir. Bu regülatör genlerin çoğu post-transkripsiyonel düzeyde etki etmektedirler. 4G/4G genotipli bireylerdeki plazma PAI-1 seviyesi 5G/5G genotipli bireylerdekenden yaklaşık olarak %25 daha fazladır. Yapılan in vitro çalışmalar ile bu bölgede transkripsiyon regülatör proteinlerinin farklı bağlanma özellikleri belirlenmiştir. Artan gen transkripsiyonu 4G alleli ile ilişkilidir ve yalnızca transkripsiyon aktivatörün bağlanması ile sonuçlanır. 5G alleli ise, represör proteine bağlanarak aktivatörün bağlanma özelliğini azaltır (22). 4G alleli yüksek plazma PAI-1 seviyesinden sorumludur.

2.8. TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR ALFA GENİ

Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), kaşektin olarak da adlandırılan ve 17-70kDa ağırlığında bir sitokindir. Homotrimer bir yapıya sahip olan TNF- α , özellikle makrofajlar ve monositler olmak üzere fibroblast, endotel hücreler, adipositler, B hücreleri gibi birçok hücre tarafından üretilmektedir. 6p21.3 kromozomu üzerinde bulunan gen tarafından üretilen TNF- α , ileri derecede pleiotropik (tek bir sitokin birden çok hücre tipi üzerine etkili olabilir) bir sitokindir. TNF- α özellikle lipid metabolizması, koagülasyon, insülin rezistansı ve endotel üzerine etki etmektedir. IL-1 ve IL-6 ile birlikte inflamatuvar olaylarda sitokin kaskadını harekete geçirmede rol oynar. TNF- α inflamatuvar cevabın aktivasyonunda ve regülasyonunda ana rol oynamaktadır. TNF- α ; IL-1, IL-6, IL-8 ve IL-10'nun sentezini artırır. Ayrıca endotoksin, IL-1, TNF- α ve IL-6 da TNF- α sekresyonunu arttırmaktadır (23). Tümör nekrozis faktör alfa multifaktoriyal bir proinflamatuvar sitokin olarak lipid metabolizması üzerine, koagülasyona, insülin rezistansı ve endotel fonksiyonuna etkilidir. Genel olarak antitümör etkisi ile bilinen TNF- α , kardiovasküler hastalıklarda da koagülasyondaki etkilerinden dolayı önemlidir (24).

2.9. POLİMORFİZM

Bireylerin kromozomlarında aynı yerde bulunan DNA dizileri birbirine benzerlik gösterir. Popülasyonda iki farklı birey arasında DNA'nın yaklaşık 1000 baz çifti uzunluğundaki herhangi bir kısmı ortalama sadece bir baz çifti değişimi içerir. Bir genin belli bir lokusta yer alan alternatif kopyalarından her birine "allel" adı verilir. Alleller, yaygın olduğu zaman genel popülasyonda kromozomlarda %1'den daha fazla bulunur; bunlar da "Genetik Polimorfizm" olarak bilinirler. Aksine, alleller %1'den daha az sıklıkta ise, nadir değişimler (rare variants) olarak isimlendirilirler. İntronlarda ve genler arasında lokalize olmuş DNA dizilerinde değişim gösteren bazı alleller vardır. Bunlar, herhangi bir genin fonksiyonu için önemsizdir ve sadece direkt DNA analizleri ile belirlenir. Genlerin kodlanan dizi değişimleri farklı protein çeşitliliğine, bu durum da farklı fenotiplerin ortaya çıkmalarına sebep olur. Genetik hastalığa neden olan zararlı mutasyonların birçoğu nadir değişimlerdir. Ağır genetik hastalığa neden olan mutant alleller genetik çeşitliliğin bir sonucudur. Birçok proteinin, farklı popülasyonlarda nispeten yaygın ve ayrılabilen şekillerde olduğu tespit edilmiştir. Bu tip polimorfizmler, DNA dizilerindeki farklılıkların bir sonucu olmasına rağmen DNA dizilerinin incelenmesinden ziyade, alleller tarafından kodlanan proteinlerdeki çeşitlilik de, bazı polimorfik lokuslar çalışılabilir. DNA dizilerinden çok, değişik proteinler üzerindeki çalışmalar, daha fazla bilgi verici olmaktadır. DNA dizilerinin değişimlerinden daha çok polimorfik allellerin ürünü olan bu proteinler, farklı fenotiplerden sorumludur. Bu nedenle, çevre ile birey arasındaki ilişkiyi, genetik çeşitliliğin nasıl etkilediğini bize açıklayan bu değişik proteinlerdir. Regülatör bölgede polimorfik alleller, genlerin transkripsiyonel regülasyonunu etkileyerek fenotiplerin belirlenmesinde önemli rol oynayabilir (25).

2.9.1. Tıbbi Genetikte Polimorfizmlerin Kullanımı

Polimorfizmler, tüm insan genetik araştırmalarında anahtar niteliğindeki elementlerdir. Polimorfizmler genin farklı kalıtsal formlarını veya genomun farklı bölgelerini ayırt edebilmek için kullanılmaktadır. Genetik belirleyiciler tıbbi genetikte kullanım için pratiklik sunar. Bağlantı analiz yolu ile kromozomların belirli bölgelerindeki genlerinin haritalanması, genetik hastalıkta doğum öncesi tanı, genetik hastalıklarda heterozigot taşıyıcıların belirlenmesi, koroner kalp hastalığı, kanser ve diyabet gibi yaygın yetişkin hastalıklara yatkın kişilerin yüksek ve düşük risklerin değerlendirilmesi adli tıpta ve babalık testinde kullanım ve organ transplantasyonu için doku tiplmesi tıbbi genetik kapsamı içindedir (25).

2.10. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), DNA'nın bir bölgesinin iki oligonükleotid primeri kullanılarak gerçekleştirilen enzimatik sentezidir. İlk kez 1985'de uygulanmaya başlanan bu yöntem bir çeşit in vitro klonlamadır. 1 µg'dan daha az DNA örneğini istenilen miktarda çoğaltarak DNA analizinin saatlerle ifade edilen bir sürede yapılmasına olanak sağlar. Her PCR reaksiyonu için çoğaltılmasını istediğimiz genin iki ucuna özgü ve buradaki baz sıralarının tamamlayıcısı olan iki oligonükleotid primer (genellikle 18-20 baz uzunluğunda sentetik olarak hazırlanmış DNA yapısında parçacık) gerekir. Bu primerler sayesinde lokalize edilen gen ya da DNA parçasının tekrar tekrar replikasyonu yapılarak büyük miktarlarda elde edilmeleri mümkün olur (26). PCR için ortamda genomik DNA (kalıp DNA), çoğaltılacak bölgeyi 5' ve 3' uçlarından çevreleyen bir çift oligonükleotid primer, deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP), DNA polimerazlar ve uygun pH ve iyon (Mg^{+2}) koşullarını sağlayan tampon karışımın olması gerekir. Isıya dayanıklı bir DNA polimeraz (Taq polimeraz olarak adlandırılır) çalışılan DNA'daki hedef bölgenin sentezini sağlar. Taq polimeraz sıcak su kaynaklarında yaşayan bir bakteriden elde edilir (27). Reaksiyon ortam ısısı yükseltılarak DNA'nın tek zincirli yapıya geçmesini sağlayan "denatürasyon", ısının tekrar düşürülerek primerlerin hedef DNA'ya hibridizasyonunu sağlayan "annealing" ve polimerizasyonun gerçekleştiği "extension" olmak üzere üç evrenin döngü halinde arka arkaya tekrarlanmasıyla gerçekleşir. Bu üç evrenin arka arkaya uygulanması ile bir döngü elde edilir. Her bir döngüde hedef DNA bölgesinin miktarı iki katına çıkmaktadır. PCR'da genellikle kullanılan 30 döngüdür. PCR reaksiyonu çok hassastır ve çok küçük miktarlardaki DNA örneği, örneğin tek bir hücrenin içindeki DNA, reaksiyonda kullanılabilir. PCR çok geniş kullanım alanı olan ve modern genetikte çok yönlü kullanılabilen tekniklerden biridir (27). PCR, DNA ve RNA örneklerinin analizi için, araştırma laboratuvarlarında, klinik moleküler tanı laboratuvarlarında, adli tıp ve kriminoloji laboratuvarlarında çok hızlı bir şekilde kullanılan standart bir metot haline gelmiştir. PCR, diğer nükleik asit analiz metotlarından daha hızlı, daha az masraflı, daha duyarlı ve daha az hasta materyali gerektiren bir metottur (25).

2.11. RESTRİKSİYON FRAGMENT UZUNLUK POLİMORFİZMLERİ (RFLP)

İnsan genomu boyunca (özellikle kodlayıcı olmayan bölgelerde) her 200 nükleotitte 1 dizi farklılığı görülür. Bu özel bölgelerdeki nükleotit değişiklikleri, tek bir nükleotit çiftindeki değişiklik veya bir ya da birden fazla nükleotit çiftinin çıkarılması (delesyonu) veya araya sokulması (insersiyonu) şeklinde görülür ve bir restriksiyon enziminin kesim noktasını

ortadan kaldırabilir ya da yeni bir kesim noktası yaratabilir. Bu şekilde yaratılan bir restriksiyon bölgesi, bir kromozomda bulunur fakat diğer homolog kromozomda bulunmazsa, bu iki kromozom, restriksiyon parçalarının membrana aktarılan (blotlanan) profillerinin analizi ile ayırt edilebilir (27). Restriksiyon enzimler, DNA'daki dizileri özgül olarak tanır ve sonuç olarak genomik DNA da dizi değişiklikleri belirli bir kesim bölgeleri yaratır veya onları yok eder. Bu nedenden dolayı boyutları değişen bir veya birden fazla DNA fragment Southern blot ve klonlanmış DNA probu ile hibridizasyondan sonra görünür hale gelir. Restriksiyon enzim kesimleri ile oluşturulan bu parça uzunluklarındaki farklılıklar, restriksiyon parça uzunluk polimorfizmleri olarak adlandırılır. Bundan dolayı RFLP, Southern blot ile kolayca araştırılabilir ve farklı fragment uzunlukları genotipin doğrudan yansıması olarak yorumlanabilir. RFLP'ler, oldukça yaygındır. İnsan genomunda binlercesi tanımlanmıştır ve bunların birçoğu her bir kromozoma özgül olarak bulunmuştur. Bu çeşitlilikler kodominant alleller olarak kalıtılır. Her bir kromozoma özgül bölgelerde haritalandıkları için, genetik hastalıkların bir ailede nesilden nesile geçişini takip etmek amacıyla belirleyici (marker) olarak kullanılır (27).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi

Çalışma için Erciye Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu Onayı alındı. Çalışmaya 12 yapay kapak trombozlu hasta (4 erkek, 8 kadın, yaş aralığı: 28-81, yaş: $53,33 \pm 17,20$), 18 infektif endokarditli hasta (10 erkek, 8 kadın, yaş aralığı: 16-72, yaş: $47,59 \pm 17,07$) ve 37 sağlıklı kontrol (19 erkek, 18 kadın, yaş aralığı: 16-80, yaş: $29,0 \pm 8,8$) alındı. Hasta ve kontroller Erciyes Üniversitesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'na başvuran kişilerden seçildi.

3.2. Hastalardan Kan Örneklerinin Toplanması

Gruplara uygun hastaların belirlenmesiyle herbirinden 2 ml EDTA'lı tüplere kan örnekleri alınarak Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na ulaştırıldı.

3.3. DNA İzolasyonunun Yapılması

Kan örneklerinden DNA izolasyonu için Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda kurulu bulunan Roche Magna Pure LC otomatik cihazı kullanıldı. İzolasyon için firmanın protokolü uygulandı. Elde edilen her bir DNA örneğinin nanodrop spektrofotometre ile miktarları ölçülerek kaliteleri kontrol edildi.

3.4. Moleküler Çalışma Basamakları

DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonları (PCR)'nda çoğaltılması için her bir polimorfizm ile ilgili PCR programı ve protokolleri hazırlandı.

Tablo 1. *MTHFR* C677T, Protrombin G20210A, Faktör-V Leiden G1631, *PAI-1* 4G/5G ve *TNF- α* primerlerinin listesi.

C677T forward	5'- TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'
C677T reverse	5'- AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'
G20210A forward	5'- TCTAGAAACAGTTGCCTGGC-3'
G20210A reverse	5'- ATAGCACTGGGAGCATTGAAGC-3'
G1631A forward	5'- ACCCACAGAAAATGATGCCCA-3'
G1631A reverse	5'- TGCCCCATTATTTAGCCAGGA-3'
4G/5G forward	5'- CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT-3'
4G/5G reverse	5'- CCAACAGAGGACTCTTGGTCT-3'
<i>TNF-α</i> forward	5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3'
<i>TNF-α</i> reverse	5'- TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'

3.4.1. Faktör V Leiden G1691A Polimorfizminin Belirlenmesi

PCR işlemi için aşağıda miktarları belirtilen malzemeler kullanıldı ve son hacim 50 μ l olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

- DNA \rightarrow 5 μ l
- Primer forward (10pm) \rightarrow 5 μ l
- Primer reverse (10pm) \rightarrow 5 μ l
- 10xPCR tamponu \rightarrow 5 μ l
- dNTP (2,5mM) \rightarrow 3 μ l
- MgCl₂ (1,5mM) \rightarrow 3 μ l
- Taq DNA polimeraz (1U/ml) \rightarrow 0,5 μ l

94°C'de 5 dk denatürasyon periyodu, 94°C'de 1 dk, 56°C'de 1 dk ve 72°C'de 1 dk 35 devir ve 72°C'de 1 dk olmak üzere PCR programına konuldu. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülenerek örneklerin çalışıp çalışmadığı kontrol edildi.

3.4.2. *MTHFR C677T* Polimorfizminin Belirlenmesi

PCR işlemi için aşağıda miktarları belirtilen malzemeler kullanıldı ve son hacim 50 µl olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

- DNA → 5 µl
- Primer forward (10pm) → 3 µl
- Primer reverse (10pm) → 3 µl
- 10xPCR tamponu → 5 µl
- dNTP (2,5mM) → 3 µl
- MgCl₂ (1,5mM) → 3 µl
- Taq DNA polimeraz (1U/ml) → 0,5 µl

94°C'de 2dk denatürasyon periyodu, 94°C'de 30 sn, 62°C'de 30 sn ve 72°C'de 30 sn 40 devir ve 72°C'de 7 dk olmak üzere PCR programına konuldu. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülenerek örneklerin çalışıp çalışmadığı kontrol edildi.

3.4.3. Faktör II (Protrombin) *G20210A* Polimorfizminin Belirlenmesi

PCR işlemi için aşağıda miktarları belirtilen malzemeler kullanıldı ve son hacim 50 µl olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

- DNA → 5 µl
- Primer forward (10pm) → 5 µl
- Primer reverse (10pm) → 5 µl
- 10xPCR tamponu → 5 µl
- dNTP (2,5mM) → 3 µl
- MgCl₂ (1,5mM) → 3 µl
- Taq DNA polimeraz (1U/ml) → 0,5 µl

94°C'de 5 dk denatürasyon periyodu, 94°C'de 1 dk, 56°C'de 1 dk ve 72°C'de 1 dk 35 devir ve 72°C'de 1 dk olmak üzere PCR programına konuldu. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülenerek örneklerin çalışıp çalışmadığı kontrol edildi.

3.4.4. Plazminojen Aktivatör İnhibitör (*PAI-1*) *4G/5G* Polimorfizminin Belirlenmesi

PCR işlemi için aşağıda miktarları belirtilen malzemeler kullanıldı ve son hacim 50 µl olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

- DNA → 5 µl
- Primer forward (10pm) → 3 µl
- Primer reverse (10pm) → 3 µl
- 10xPCR tamponu → 5 µl
- dNTP (2,5mM) → 3 µl
- MgCl₂ (1,5mM) → 3 µl
- Taq DNA polimeraz (1U/ml) → 0,5 µl

94°C'de 3 dk denatürasyon periyodu, 94°C'de 30 sn, 60°C'de 30 sn ve 72°C'de 30 sn 30 devir ve 72°C'de 1 dk olmak üzere PCR programına konuldu. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülenerek örneklerin çalışıp çalışmadığı kontrol edildi.

3.4.5. Tümör Nekrozis Faktör alfa (*TNF-α*) -308 G>A Polimorfizminin Belirlenmesi

PCR işlemi için aşağıda miktarları belirtilen malzemeler kullanıldı ve son hacim 50 µl olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

- DNA → 5 µl
- Primer forward (10pm) → 3 µl
- Primer reverse (10pm) → 3 µl
- 10xPCR tamponu → 5 µl
- dNTP (2,5mM) → 3 µl
- MgCl₂ (1,5mM) → 3 µl
- Taq DNA polimeraz (1U/ml) → 0,5 µl

95°C'de 5 dk denatürasyon periyodu, 95°C'de 1 dk, 60°C'de 1 dk ve 72°C'de 1 dk 30 devir ve 72°C'de 5 dk olmak üzere PCR programına konuldu. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülenerek örneklerin çalışıp çalışmadığı kontrol edildi.

3.5. RFLP Yöntemi

Her bir polimorfizm için kullanılan yöntemler aşağıda açıklanmıştır.

Faktör-V Leiden G1631A Polimorfizm Analizi Enzimle Muamelesi: G1631A polimorfizm analizinde G→A baz çiftinin değişimi *Mnl I* enzimi ile belirlenir. 0.5 ml ependorf tüplere;

- 15 µl PCR ürünü
- 2,5 µl Buffer

- 0,5 µl (2,5U) *Mnl I* enzimi eklenir ve 25 µl'ye distile su ile tamamlanır.

37°C'de 1 gece inkübe edilir.

MTHFR C677T Polimorfizm Analizi Enzimle Muamelesi: PCR ürünlerinden C677T polimorfizmini saptamak için *Hinf I* enzimi kullanıldı. Bu enzim G↓ANTC restriksiyon bölgesi oluşturur. 0.5 ml ependorf tüplere;

- 15 µl PCR ürünü
- 2,5 µl Buffer
- 0,5 µl (2,5U) *Hinf I* enzimi eklenir ve 25 µl'ye distile su ile tamamlanır.

37°C'de 1 gece inkübe edilir.

Protrombin G20210A Polimorfizm Analizi Enzimle Muamelesi: G20210A polimorfizm analizinde G→A baz çiftinin değişimi *Hind III* enzimi ile belirlenir. 0.5 ml ependorf tüplere;

- 15 µl PCR ürünü
- 2,5 µl Buffer
- 0,5 µl (2,5U) *Hind III* enzimi eklenir ve 25 µl'ye distile su ile tamamlanır.

37°C'de 1 gece inkübe edilir.

PAI-1 4G/5G Polimorfizm Analizi Enzimle Muamelesi: 4G/5G polimorfizmi *Bsl I* enzimi ile belirlenir. 0.5 ml ependorf tüplere;

- 15 µl PCR ürünü
- 2 µl Buffer
- 0,5 µl *Bsl I* enzimi eklenir ve 25 µl'ye distile su ile tamamlanır.

56°C'de 1 gece inkübe edilir.

TNF-α -308 G>A Polimorfizm Analizi Enzimle Muamelesi: *Nco I* enzimi kullanılır.

- 15 µl PCR ürünü
- 2,5 µl Buffer
- 0,5 µl (2,5U) *Nco I* enzimi eklenir ve 25 µl'ye distile su ile tamamlanır.

37°C'de 1 gece inkübe edilir.

3.5.1. Genotiplerin Belirlenmesi

Faktör-V Leiden G1691A Polimorfizm Analizi İçin Elektroforez: Enzimle kesilen PCR ürünleri %3'lük agaroz jelde koşturulur. Yabani tip (G1691G) 104 ve 82 bç'de iki bant, heterozigotlar (G1691A) 141, 104 ve 82 bç'de üç bant ve homozigot mutantlar (A1691A) 141 ve 82 bç'de iki bant gösterir.

MTHFR C677T Polimorfizm Genotipleri İçin Elektroforez: Enzimle kesilen PCR ürünleri %3'lük agaroz jelde koşturulur. Yabani tip (C677C) 198 bç'de tek bant, heterozigotlar (C677T) 198, 175 ve 23 bç'de üç bant ve homozigot mutantlar (T677T) 175 ve 23 bç iki bant gösterir (Şekil).

Protrombin G20210A Polimorfizm Analizi İçin Elektroforez: Enzimle kesilen PCR ürünleri %3'lük agaroz jelde koşturulur. Yabani tip (A20210A), 345 bç'de tek bant, heterozigotlar (G20210A) 345 ve 322 bç'de iki bant ve homozigot mutantlar (G20210G) 322 bç'de tek bant gösterirler.

PAI-1 4G/5G Polimorfizm Analizi İçin Elektroforez: Enzimle kesilen PCR ürünleri %4'lük agaroz jelde koşturulur. Yabani tip 98 bç'de tek bant, heterozigotlar (4G/5G) 98, 77 ve 22 bç'de üç bant ve homozigot mutantlar 77 ve 22 bç'de iki bant gösterir.

TNF- α -308 G>A Polimorfizm Analizi İçin Elektroforez: Enzimle kesilen PCR ürünleri %3'lük agaroz jelde koşturulur. Yabani tip 87 ve 20 bç'de iki bant, heterozigotlar 107, 87 ve 20 bç'de üç bant ve homozigot mutantlar (G20210G) 107 bç'de tek bant gösterirler.

Tablo 2. Polimorfizmlerin enzim ile kesim ürünlerinin gösterimi.

Çalışılan Polimorfizm	Kullanılan Restriksiyon Enzimi	PCR Ürünü	Normal Genotip Enzim Kesim Ürünleri	Heterozigot Genotip Enzim Kesim Ürünleri	Homozigot Genotip Enzim Kesim Ürünleri
Faktör V G1691A	<i>Mnl I</i>	223 bç	104 bç 82 bç	141 bç 104 bç 82 bç	141 bç 82 bç
<i>MTHFR</i> C677T	<i>Hinf I</i>	198 bç	198 bç	198 bç 175 bç 23 bç	175 bç 23 bç
Protrombin G20210A	<i>Hind III</i>	345 bç	345 bç	345 bç 322 bç	322 bç
<i>PAI-1</i> 4G/5G	<i>Bsl I</i>	98 bç	98 bç	98 bç 77 bç 22 bç	77 bç 22 bç
<i>TNF-α</i>	<i>Nco I</i>	107	87 bç 20 bç	107 bç 87 bç 20 bç	107 bç

3.6. İstatistiksel Analizler

İstatistik analizleri SPSS 15.0 programı kullanılarak yapıldı ve sonuçlar “ ortalama \pm standart hata” (mean \pm SEM) şeklinde verildi. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Kategorik değişkenler yüzde olarak gösterildi ve polimorfizm analizleri ki-kare testi ile yapıldı. Yaş değişkeninin karşılaştırılmasında Anova testi kullanıldı.

4. BULGULAR

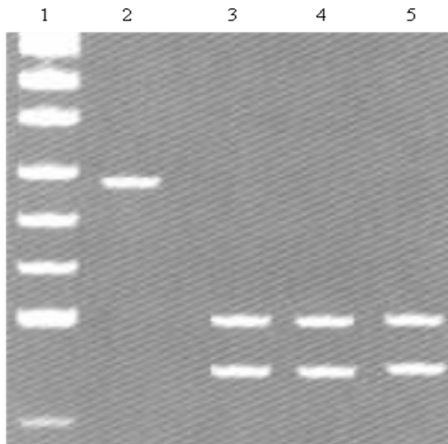
Endokarditli 18 hasta, trombozlu 12 hasta ve kontrol grubunda 37 hasta olmak üzere toplamda 67 hasta üzerinde polimorfizm çalışmaları yapıldı. Her bir polimorfizmin sonuçları ayrı ayrı tablolarda sunulmuştur.

4.1. Faktör V Leiden G1691A Polimorfizm Bulguları

Faktör V yabanıl tip (G1691G), heterozigot (G1691A) ve homozigot mutant (A1691A) genotipleri tespit edebilmek için öncelikle örnekler PCR ile amplifiye edildi, %2'lik agaroz jelde 223 bp görüntülendi. Sonuçlar tablo 3'de gösterilmektedir. Amplifiye edilen ürünler *Mnl I* restriksiyon endonükleaz enzimi ile muamele edilerek %3'lük agaroz jelde değerlendirildi (Şekil 2).

Tablo 3. Faktör V G1691A genotiplerinin dağılımı.

Faktör V G1691A Polimorfizmi	G1691G	G1691A	A1691A
Endokardit (n: 18)	14	3	1
Kapak Trombozu (n:12)	9	1	2
Kontrol (n: 37)	33	4	-



Şekil 2. *Mnl I* enzimi ile kesilen G1691A PCR ürünlerinin %3'lük agaroz jel görüntüleri. 1: boyut markırı 2: PCR ürünü 3,4,5: normal genotip

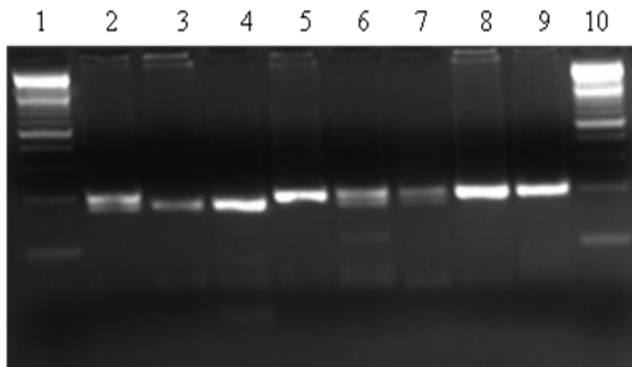
Faktör V G1691A polimorfizmi sonuçları endokardit ve kapak trombozlu hastalarda kontrol grubu ile ki-kare testine göre karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0.05$).

4.2. *MTHFR* C677T Polimorfizm bulguları

MTHFR yabancıl tip (C677C), heterozigot (C677T) ve homozigot mutant (T677T) genotipleri tespit edebilmek için öncelikle örnekler PCR ile amplifiye edildi, %2'lik agaroz jelde 198 bp görüntülendi. Sonuçlar tablo 4'de gösterilmektedir. Amplifiye edilen ürünler *Hinf I* restriksiyon endonükleaz enzimi ile muamele edilerek %3'lük agaroz jelde değerlendirildi (Şekil 3).

Tablo 4. *MTHFR* C677T genotiplerinin dağılımı.

<i>MTHFR</i> C677T Polimorfizmi	C677C	C677T	T677T
Endokardit (n: 18)	10	6	2
Yapay Kapak Trombozu (n:12)	7	5	-
Kontrol (n: 37)	22	10	5



Şekil 3. *Hinf I* enzimi ile kesilen PCR ürünlerinin %3'lük agaroz jel görüntüleri. 1: 100 baz çiftlik boyut markırı 5,8,9: normal genotip 2,6,7: heterozigot genotip 3,4: homozigot genotip

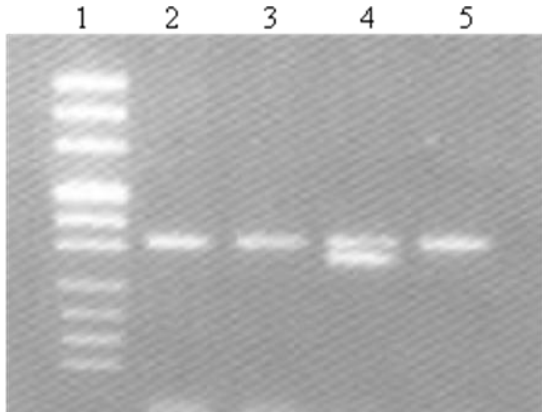
MTHFR C677T polimorfizmi sonuçları endokardit ve kapak trombozlu hastalarda kontrol grubu ile ki-kare testine göre karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0.05$).

4.3. Protrombin G20210A Polimorfizm bulguları

Protrombin yabancıl tip (G20210G), heterozigot (G20210A) ve homozigor mutant (A20210A) genotipleri tespit edebilmek için öncelikle örnekler PCR ile amplifiye edildi, %2'lik agaroz jelde 345 bp görüntülendi. Sonuçlar tablo 5'de gösterilmektedir. Amplifiye edilen ürünler *Hind III* restriksiyon endonükleaz enzimi ile muamele edilerek %3'lük agaroz jelde değerlendirildi (Şekil 4).

Tablo 5. Protrombin G20210A genotiplerinin dağılımı.

Protrombin G20210A Polimorfizmi	G20210G	G20210A	A20210A
Endokardit (n: 18)	17	1	-
Yapay Kapak Trombozu (n:12)	11	1	-
Kontrol (n: 37)	37	-	-



Şekil 4. *Hind III* enzimi ile kesilen PCR ürünlerinin %3'lük agaroz jel görüntüleri.

1: Boyut markırını 2, 3, 5: normal genotip (GG) 4: heterozigot (GA)

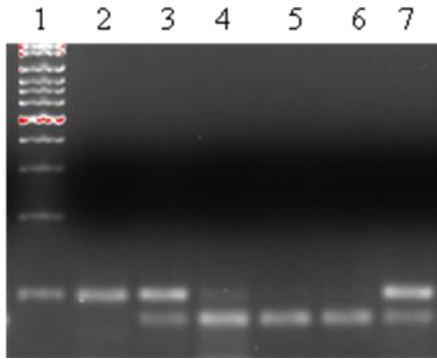
Protrombin G20210A polimorfizmi sonuçları endokardit ve kapak trombozlu hastalarda kontrol grubu ile ki-kare testine göre karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0.05$).

4.4. Plazminojen Aktivatör İnhibitör (*PAI-1*) 4G/5G Polimorfizm bulguları

PAI-1 yabanıl tip, heterozigot (4G/5G) ve homozigot mutant genotipleri tespit edebilmek için öncelikle örnekler PCR ile amplifiye edildi, %2'lik agaroz jelde 98 bp görüntülendi. Sonuçlar tablo 6'da gösterilmektedir. Amplifiye edilen ürünler *Bsl I* restriksiyon endonükleaz enzimi ile muamele edilerek %4'lük agaroz jelde değerlendirildi (Şekil 5).

Tablo 6. *PAI-1* 4G/5G genotiplerinin dağılımı.

<i>PAI-1</i> 4G/5G Polimorfizmi	5G/5G	4G/5G	4G/4G
Endokardit (n: 18)	6	10	2
Yapay Kapak Trombozu (n:12)	6	5	1
Kontrol (n: 37)	11	16	10



Şekil 5. *Bsl I* enzimi ile kesilen 4G/5G PCR ürünlerinin %4'lük agaroz jel görüntüleri. 1: 100 baz çiftlik boyut markırı 2: normal genotip 3,4,7: heterozigot genotip 5: homozigot mutant genotip

PAI-1 4G/5G polimorfizmi sonuçları endokardit ve kapak trombozlu hastalarda kontrol grubu ile ki-kare testine göre karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0.05$).

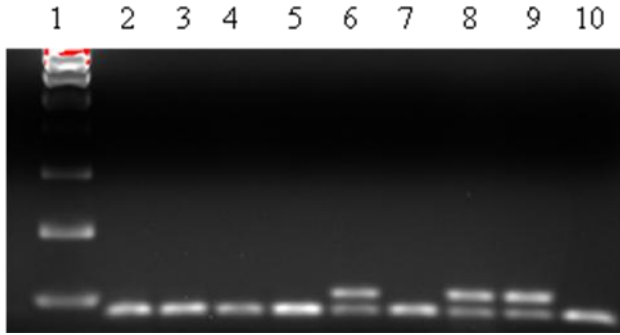
4.5. Tümör Nekrozis Faktör alfa (*TNF- α*) -308 G>A Polimorfizm Bulguları

TNF- α -308 G>A yabanıl tip, heterozigot ve homozigot mutant genotipleri tespit edebilmek için öncelikle örnekler PCR ile amplifiye edildi, %2'lik agaroz jelde 108 bp görüntülendi.

Sonuçlar tablo 7’de gösterilmektedir. Amplifiye edilen ürünler *NcoI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile muamele edilerek %3’lük agaroz jelde değerlendirildi (Şekil 6).

Tablo 7. *TNF- α* -308 G>A genotiplerinin dağılımı.

<i>TNF-α</i> -308 G>A Polimorfizmi	GG	GA	AA
Endokardit (n: 18)	5	4	7
Yapay Kapak Trombozu (n:12)	8	1	3
Kontrol (n: 37)	26	11	-



Şekil 6. *Nco I* enzimi ile kesilen PCR ürünlerinin %3’lük agaroz jel görüntüleri. 1: 100 baz çiftlik boyut markırı 2,3,4,5: normal genotip 6,8,9: heterozigot genotip

TNF- α -308 G>A polimorfizmi sonuçları endokardit ve kapak trombozlu hastalarda kontrol grubu ile ki-kare testine göre karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p<0.05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnfektif endokardit immunolojik, böbrek patolojileri, arterit, vaskülit ve cilt lezyonları gibi pek çok tablo ile karşımıza çıkabilir. Rawczynska-Elart ve arkadaşları 40 hastalık bir çalışmada kazanılmış romatizmal kapak hastalığı sonrası gelişen infektif endokardit hastalarında IL-6 seviyelerinin yüksek olduğunu, IL-1 ve TNF alfa değerlerinde kontrol grubuna göre artış olmadığını saptamışlardır (28). Alter ve arkadaşları 47 enfektif endokarditli hastada yapmış olduğu bir çalışmada IL 2R ve IL 6 seviyelerinin artış gösterdiğini, antibiyoterapi sonrasında düştüğünü saptamışlardır. Ayrıca yine aynı çalışmada Q ateşi olan İE'li hastalardan alınan monositlerde TNF alfa, IL1, IL6 transkripsiyon ve sekresyonun yüksek olduğu saptanmıştır (28). Bizim çalışmamızda ise *TNF- α* -308 G>A polimorfizmi sonuçları endokardit ve kapak trombozlu hastalarda kontrol grubu ile ki-kare testine göre karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Rawczynska-Elart ve arkadaşları ile Kern ve arkadaşlarını yapmış olduğu iki farklı çalışmada İE'li hastalarda TNF alfa değerinde beklenen artış gösterilememiştir. Bunun da immün hücrelerde down regülasyona ya da sitokin salınımının zayıf uyarılmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Musher ve arkadaşlarının bakterial kolonizasyonu intravenöz kateterli endokarditli hastalarda yapmış oldukları çalışmada FV Leiden R506G ve Faktör II G20210A polimorfizminin kontrol ve çalışma gruplarında benzer olduğu, *MTHFR* C677T polimorfizminin enfekte kateterli grupta kontrol grubuna göre düşük olduğu saptanmıştır. Ayrıca aynı çalışmada platelet yüzey antijen polimorfizmi yönünden PLA2, GP1b alfa polimorfizmi varlığının hiperkoagulibiteyle ilişkili olduğu bulunmuştur (29). Watkin ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada İE'li hastalarda IL 6, IL1 beta ve CRP düzeylerinde artış olduğunu saptamışlardır. Kern ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada malaryalı hastalarla kıyaslandığında İE'li hastalarda TNF reseptörlerinin TNF ye olan immünoreaktivitesinin yüksek olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda ise *TNF- α* -308 G>A polimorfizmi sonuçları endokardit ve kapak trombozlu hastalarda kontrol grubu ile ki-kare testine göre karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Ancak kapak trombozunun genetik faktörlerle ilgisi hakkında literatürde yeterli yayın bulunmamaktadır. Bu konuda daha geniş ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

1. Bonow RO, Carabello B, deLeon AC, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with valvular heart disease: A report of the American College of Cardiology / American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:1486-1588.
2. Bortolotti U, Milano A, Mossuto E, et al. Early and late outcome after reoperation for prosthetic valve dysfunction: Analysis of 549 patients during a 26- year period. *J Heart Valve Dis* 1994;3:81-87.
3. Lengyel M, Vándor L. Thrombolysis is the optimal treatment of mitral prosthetic valve thrombosis. *Eur Heart J* 2000;21 (Suppl.):266 (abstract)
4. Alpert JS. The thrombosed prosthetic valve. *J Am Coll Cardiol* 2003;41 :659-660.
5. Li JS, Sexton DJ, Mick N et al. 2000 Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Clin Infect Dis* 30: 633-638.
6. Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy 1998 Antibiotic treatment of streptococcal, enterococcal and staphylococcal endocarditis. *Heart* 79: 207-210.
7. Lanzkowsky P. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. 3th ed. San Diego: Academic Press 2000: 233-287.
8. Özdemir AÖ, Özdemir G. Homeostaz bozukluklarında nörolojik etkilenim. *Türk Serebrovasküler Hastalıklar Dergisi* 2006; 12 (2): 33-40.
9. Homberger G, Linnebank M, Winter C, et al. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Gen* 2000; 8: 725-729.
10. Bailey LB, Duhaney RL, Maneval DR, et al. Vitamin B-12 status is inversely associated with plasma homocysteine in young women with C677T and/or A1298C methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. *J Nutr* 2002; 132: 24665-24709.
11. Stern LL, Bagley PJ, Rosenberg IH, et al. Conversion of 5-formyltetrahydrofolic acid is unimpaired in folate-adequate persons homozygous for the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *J Nutr* 2000; 130: 2238-2242.
12. Goyette P, Pai A, Milos R, et al. Gene structure of human Mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian Genome* 1998; 9: 652-656.
13. Sell SM, Lugemwa PR. Development of a highly accurate, rapid PCR-RFLP genotyping assay for the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Genet Test* 1999; 3: 287-289.

14. Sharp L, Little J. Polymorphism in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: A HuGE Review Am J Epidemiol 2004; 159: 423-443.
15. Güleç S, Aras O, Akar E, Tutar E, Omurlu K, Avcı F, Dinçer I, Akar N, Oral D. MTHFR gene polymorphism and risk of premature myocardial infarction. Clinical Cardiology 2001; 24 (4): 281-4.
16. Beauchamp NJ, Daly ME, Hampton KK, Cooper PC, Preston FE, Peake IR. High prevalence of mutation in the factor V gene within the U.K. population: relationship to activated protein C resistance and familial thrombosis. British Journal of Hematology 1994; 88: 219-22.
17. Özbek U, Tangün Y. Frequency of factor V Leiden (Arg506Gln) in Turkey. Br J Haematol 1997; 97: 504-5.
18. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood 1996; 88: 3698-703.
19. Nguyen A. Prothrombin G20210A polymorphism and thrombophilia. Mayo Clin Proc 2000; 75: 595-604.
20. Lin J J, Patron L, Wadhwa NK: Plasminogen activator inhibitor in diabetic and non diabetic peritoneal dialysis patients. Clin Nephrol 1995; 5: 310-315.
21. Kohler HP, Grant PJ. Mechanisms of disease: plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. N Engl J Med 2000; 342: 1801-1972.
22. Sartori MT, Wiman B, Vettore S, et al. 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene promoter and fibrinolytic capacity in patients with deep vein thrombosis. Thromb Haemost 1998; 80: 956-960.
23. Taheri S, Borlu M, Taşdemir Ş, Evereklioglu C, Saatçi Ç, Özkul Y. Tümör Nekrosis Faktör- α -308(A/G) Gen Polimorfizminin Behçet Hastalığının Aktif Ve İnaktif Fazlarında Araştırılması. Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences). 2012;21(2):75-81.
24. Thirunavukkarasu C, Watkins SC et al. (2006). Mechanisms of endotoxin induced NO, IL-6, and TNF-alpha production in activated rat hepatic stellate cells: role of p38 MAPK. Hepatology 44(2): 389-98.
25. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Boerkoel III CF. Thomson and Thomson Tıbbi Genetik. Güneş Kitabevi 2005 (6. baskı) 87-93, 46, 33-35.
26. Başaran N. Tıbbi Genetik Ders Kitabı. Güneş&Nobel Tıp Kitapevi. 1999 (7. baskı) 300, 292-296.

27. Klug WS, Cummings MR. Genetik Kavramlar. Palme Yayıncılık 2003 (6. baskıdan çeviri) 515-517, 500-502, 578-579.
28. R.W. Watkin, L.V. Harper, A.B. Vernallis , S. Lang , P.A. Lambert , A.M. Ranasinghe , T.S.J. Elliott. Pro-inflammatory cytokines IL6, TNF-a, IL1b, procalcitonin, lipopolysaccharide binding protein and C-reactive protein in infective endocarditis. *Journal of Infection* 2007; 55: 220-225.
29. Musher D, Goldsmith E, Sherry D, Tilney G, Darouiche R, Yu Q, Lopez J.A. Association of Hypercoagulable states and increased platelet adhesion and aggregation with bacterial colonization of intravenous catheters. *Journal of Infection diseases* 2002; 186:769-73.