

136072

T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİDROKSİ KUMARİN VE AMİNOKUMARİN  
TÜREVLERİNİN PIHTILAŞMA SİSTEMİ ÜZERİNE  
ETKİSİ**

**Özkan DANIŞ**  
(141100520000033)

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN**  
**Doç.Dr. Ayşe OGAN**

**İstanbul 2003**

**T.C. YÜKSEK ÖĞRETİM KURULU  
BURSA İLİ ANKARA MERKEZİ**

136072

T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KABUL VE ONAY BELGESİ

HİDROKSİKUMARİN VE AMİNOKUMARİN TÜREVLERİNİN  
PIHTILAŞMA SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Özkan DANIŞ'ın Hidroksi kumarin ve Aminokumarin Türevlerinin Pihtılaşma Sistemi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi isimli Lisansüstü tez çalışması, M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 12.06.2003 tarih ve ...1621... sayılı kararı ile oluşturulan jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak Kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ayşe OGAN

(Marmara Üniversitesi)

Üye : Prof. Dr. Turay YARDIMCI

(Marmara Üniversitesi)

Üye : Prof. Dr. Fikriye URAS

(Marmara Üniversitesi)

Tezin Savunulduğu Tarih :02/07/2003

**ONAY**

M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 28.7.2003.. tarih ve 2003/15-2... sayılı kararı ile Özkan DANIŞ'ın Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında Y.Lisans (MSc.) derecesi alması onanmıştır.

Marmara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü  
Prof. Dr. Adnan AYDIN

## ÖNSÖZ

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim sırasında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, tezimin oluşmasında her türlü maddi ve manevi desteği veren, Biyokimyayı bana sevdiren ve hedefim kılan değerli hocam Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Doç.Dr. Ayşe OGAN'a,

Yüksek Lisans çalışmam için gerekli olan 3-Amino-4-Hidroksikumarin maddesini sentezlememde ve diğer bileşikleri temin etmemde bana her türlü yardımı sağlayan Organik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mustafa Bulut'a,

Hayvan deneyleri yaparken bu konudaki bilgi ve tecrübeleri ile benim için yol gösterici olan M.Ü. Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Göksel ŞENER'e,

Çalışmalarım sırasında kolaylıklar sağlayan Kimya Bölüm Başkanı Prof. Dr. Atilla GÜNGÖR'e,

Lisans sonrası eğitimim sırasında ilgi ve desteğini gördüğüm değerli hocam Anabilim Dalımızın emekli başkanı Prof. Dr. Mine ENGİNÜN'e ve Yrd. Doç. Dr. Parvaneh ASSA'ya,

Çalışkanlığı ve azmi ile kendime örnek aldığım, değerli hocam Arş. Gör. Dr. Özlem Önder Gencer'e, tezimde bana her zaman yardımcı olan Arş. Gör. Serap DEMİR'e,

Çalışmalarım sırasında her zaman ilgi ve desteklerini gördüğüm değerli çalışma arkadaşlarım başta Arş. Gör. Soner ÇUBUK, Arş. Gör. Sabahattin DENİZ, Arş. Gör. Cihan GÜNDÜZ, Arş. Gör. İlhan PEKGÖZLÜ, Arş. Gör. Ali S. BAŞAK olmak üzere diğer bütün çalışma arkadaşlarıma,

Hayatımda maddi ve manevi desteklerini hep hissettiğim, ANNE, BABA ve ABLAMA içten teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2003

Özkan DANIŞ

# İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA NO</u>
ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VIII
SEMBOL LİSTESİ.....	IX
KISALTMALAR.....	X
ŞEKİL LİSTESİ.....	XI
TABLO LİSTESİ.....	XII
BÖLÜM I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
BÖLÜM II. GENEL BÖLÜM.....	3
II.1 KAN PIHTILAŞMA SİSTEMİ.....	3
II.1.1 Pıhtı Türleri.....	3
II.1.2 Kan Pıhtılaşması.....	5
II.1.2.1 Kan Pıhtılaşmasının Yolları.....	5
II.1.2.2 Entrensek Yol.....	8
II.1.2.3 Ekstrensek Yol.....	10
II.1.2.4 Ortak Yol.....	10
II.1.2.5. Dolanımdaki Trombinin Denetlenmesi.....	12
II.1.2.6 Fibrin Pıhtılarının Çözülmesi.....	12
II.1.2.7 Trombositlerin Aktivasyonu.....	13
II.1.2.8 K Vitamini Döngüsü ve K Vitamini Bağımlı Pıhtılaşma Faktörleri.....	15
II.1.3 Trombozun Klinik Sonuçları ve Antikoagulanlara olan İhtiyaç.....	18

II.1.4 Pıhtılaşma Sistemini Ölçen Laboratuvar testleri.....	19
<b>II.2 ANTİKOAGULANLAR .....</b>	<b>20</b>
<b>II.2.1 Oral Antikoagulanlar.....</b>	<b>20</b>
II.2.1.1 Kumarin Türevi Antikoagulanların Keşfi ve Tarihçeleri.....	21
II.2.1.2 Kumarin ve İndandion Türevi Antikoagulanların Etki Mekanizmaları.....	24
II.2.1.3 Oral Antikoagulanların Yan Etkileri.....	25
II.2.1.4 Oral Antikoagulanların Kullanım Alanları.....	25
<b>II.3 LİGAND BAĞLANMA DENEMELERİ.....</b>	<b>26</b>
<b>II.3.1 Ligand Bağlanması İncelenmesi.....</b>	<b>27</b>
II.3.1.1 Denge Diyalizi.....	27
<b>BÖLÜM III. TEZ ÇALIŞMASI.....</b>	<b>30</b>
<b>III.1 ARAŞTIRMA YÖNTEMİ.....</b>	<b>30</b>
<b>III.2 ARAŞTIRMA ARAÇLARI.....</b>	<b>31</b>
III.2.1 Araştırmada Kullanılan Cihazlar.....	31
III.2.2 Araştırmada kullanılan Kimyasallar.....	32
III.2.3 Hazırlanan Çözeltiler.....	32
III.2.4 Deney Hayvanlarının Özellikleri ve Beslenmeleri .....	33
III.2.5 Deney Hayvanları İle Oluşturulan Gruplar.....	34
<b>III.3 GENEL METODLAR.....</b>	<b>34</b>
<b>III.3.1 3-Amino-4-hidroksikumarin Sentezi.....</b>	<b>34</b>
III.3.1.1 3-Fenilazo-4-hidroksikumarin Sentezi.....	34
III.3.1.2 3-asetamido-4-hidroksikumarin Sentezi.....	35
III.3.1.3 3-Amino-4-Hidroksikumarin Bileşiğinin Sentezi.....	35
III.3.1.3 3-5,7-dihidroksi-4-fenilkumarin Sentezi.....	35
III.3.1.3 3-7,8-dihidroksi-3-(4-metilfenil)kumarin sentezi .....	35
III.3.2 Deney Hayvanlarına Drogların Uygulanması.....	36
III.3.3 Deney Hayvanlarından Kan Örneklerinin Alınması.....	36
III.3.4 Protrombin Zamanı Tayini.....	37
III.3.5 Denge Diyaliz Yöntemi.....	37
III.3.5.1 Diyaliz Membranlarının Hazırlanması.....	37
III.3.5.2 DHMK Bileşiğinin maksimum Absorbans Verdiği Dalga Boyunun Tayini.....	38
III.3.5.3 DHMK Bileşiği için Ekstinksiyon Katsayısının Bulunması.....	38
III.3.5.4 Denge Diyalizi.....	38

<b>BÖLÜM IV. SONUÇLAR.....</b>	<b>39</b>
<b>IV.1. Droğların Erime Noktası Tayini.....</b>	<b>39</b>
<b>IV.2 Protrombin Zamanı Testi Sonuçları.....</b>	<b>39</b>
<b>IV.3 Denge Diyalizi Sonuçları.....</b>	<b>41</b>
<b>IV.3.1 DHMK Bileşğinin maksimum Absorbans</b>	
<b>Verdiği Dalga Boyu.....</b>	<b>41</b>
<b>IV.3.2 DHMK Bileşğii için Ekstinksiyon Katsayısı.....</b>	<b>43</b>
<b>IV.3.3 DHMK Bileşğinin BSA ile Bağlanmasıdaki</b>	
<b>Bazı Parametreler.....</b>	<b>44</b>
<b>BÖLÜM V. TARTIŞMA VE DEĞERLENDİRME.....</b>	<b>45</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>47</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	

## ÖZET

### HİDROKSİ KUMARİN VE AMİNOKUMARİN TÜREVLERİNİN PIHTILAŞMA SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Bu çalışmada Anabilim dalımızca sentezlenen 3-amino-4-hidroksikumarin ve Organik Kimya Anabilim Dalından temin edilen 5,7-dihidroksi-4-fenilkumarin ve 7,8-dihidroksi-3-(4-metilfenil)kumarin bileşiklerinin farklı dozları oral yolla Sprague-Dawley sıçanlarına uygulandı. 24 ve 48 saat sonra drogların uygulandığı gruplardan ve sağlıklı kontrol grubundaki sıçanların kalplerinden kan örnekleri alındı. Pıhtılaşma süresi, kan örneklerinden elde edilen plazmaya uygulanan Protrombin Zamanı testi ile ölçüldü. Grupların Protrombin zamanı, R ve INR değerleri hesaplandı ve hem kendi aralarında hem de kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Test edilen kumarin türevleri arasında en yüksek antikoagulan etkiyi 7,8-dihidroksi-3-(4-metilfenil)kumarin bileşiği göstermiştir. Bileşiğin INR değeri 20mg/kg dozda, 24 saat sonra 1.17, 50mg/kg dozda 48 saat sonra 1.22 olarak bulundu.

Diğer bileşikler içinse INR değerleri şöyledir: 3-amino-4-hidroksikumarin, 10mg/kg dozda 24 saat sonra 1.08; 3-amino-4-hidroksikumarin 20mg/kg dozda 24 saat sonra 1.10; 3-amino-4-hidroksikumarin 20mg/kg dozda 48 saat sonra 1.11; 5,7-dihidroksi-4-fenilkumarin 20mg/kg dozda 48 saat sonra 1.08 ve 5,7-dihidroksi-4-fenilkumarin 1.19 50mg/kg dozda 48 saat sonra 1.19.

En yüksek etki gösteren 7,8-dihidroksi-3-(4-metilfenil)kumarin bileşiğinin Sığır Serum Albumin proteinine bağlanma özellikleri "Denge Diyalizi Metodu" ile araştırıldı. Protein molü başına bağlanan ligandın oranının veren r değeri 0.75 olarak bulundu, bağlanma sabiti ise  $1.81 \cdot 10^5$  M olarak hesaplandı.

Bu çalışmanın sonuçları göstermektedir ki, düşük INR değerleri nedeni ile test edilen bileşiklerden hiç biri antikoagulan ajan olarak kullanılamaz. Fakat, 7,8-dihidroksi-3-(4-metilfenil)kumarin bileşiğinin INR değeri ilerisi için umut vericidir

ve kumarin halkasının dördüncü pozisyonuna bir hidroksil grubu eklenmesi ile yüksek INR değerlerinin sağlanması muhtemeldir.

**Haziran, 2003**

**Özkan DANIŞ**



## ABSTRACT

### EFFECTS OF THE HYDROXY COUMARIN AND AMINOCOUMARIN DERIVATIVES TO THE COAGULATION PATHWAY

In this study, various dosages of 3-amino-4-hydroxycoumarin, which synthesized by our division and 5,7-dihydroxy-4-phenylcoumarin and 7,8-dihydroxy-3-(4-methylphenyl)coumarin, synthesized by Organic Chemistry division of our department were administrated orally to the Sprague-Dawley rats. After 24 and 48 hours blood samples were taken from the hearts of the experimental and healthy control groups. Coagulation time was measured by the Prothrombin Time test on the plasma from the blood samples. Prothrombin time, R and INR values of the groups were calculated and compared to the each other and the healthy controls. Among the coumarin derivatives tested 7,8-dihydroxy-3-(4-methylphenyl)coumarin showed the highest anticoagulant effect. The INR values of 7,8-dihydroxy-3-(4-methylphenyl)coumarin 20mg/kg after 48 hours was 1.17 and 50mg/kg after 48 hours was 1.22.

The INR values of the other compounds were as; 3-amino-4-hydroxycoumarin 10mg/kg after 24 hours 1.08, 3-amino-4-hydroxycoumarin 10 mg/kg 48 hours 1.10, 3-amino-4-hydroxycoumarin 20 mg/kg after 48 hours 1.11, 5,7-dihydroxy-4-phenylcoumarin 20mg/kg after 48 hours 1.08 and 5,7-dihydroxy-4-phenylcoumarin 50mg/kg after 48 hours 1.19.

The binding of 7,8-dihydroxy-3-(4-methylphenyl)coumarin, which is the most potent anticoagulant among the tested derivatives to Bovine Serum Albumin was determined by the "Equilibrium Dialysis Method". The r values calculated as the amount of bounded ligand per mole of protein was 0.754 and the binding constant was found as  $1.81 \times 10^5 M$ .

The result of this study showed that none of the tested derivatives can be use as anticoagulant agents due to their low INR values. But we think that INR values of

the 7,8-dihydroxy-3-(4-methylphenyl)coumarin is promising and with hydroxylation of the fourth position of compound high INR values can be obtained.

**June, 2003**

**Özkan DANIŞ**



## SEMBOL LİSTESİ

<b>R</b>	: Hastanın PT değerinin, kontrol PT değerine oranı
<b>P</b>	: Makromolekül
<b>A</b>	: Ligand
<b>PA</b>	: Makromolekül ile Ligandın Oluşturduğu Kompleks
<b>[P]</b>	: Toplam Makromolekül Konsantrasyonu (M)
<b>[A]</b>	: Bağlı Olmayan Ligandın Konsantrasyonu (M)
<b>[PA]</b>	: Molekül Ligand Kompleksinin Konsantrasyonu (M)
<b>r</b>	: Molekül Başına Bağlanan Ligandın Mol Sayısı
<b>Kd</b>	: Dissosiyasyon Sabiti ( $M^{-1}$ )
<b><math>\epsilon</math></b>	: Ekstinksiyon Katsayısı
<b>m</b>	: Doğrunun Eğimi
<b>Abs</b>	: Absorbans
<b>C</b>	: Konsantrasyon
<b>l</b>	: Işın Yolunun Uzunluğu (cm)

## KISALTMA LİSTESİ

<b>PT</b>	: Protrombin Zamanı
<b>BSA</b>	: Sığır Serum Albumini
<b>ADP</b>	: Adenozin Difosfat
<b>PK</b>	: Prekallikrein
<b>HK</b>	: Yüksek Molekül Ağırlıklı Kininojen
<b>PL</b>	: Fosfolipidler
<b>SPCA</b>	: Serum Protrombin Çevirim Hızlandırıcı
<b>AHG</b>	: Antihemofilik Globulin
<b>PTA</b>	: Plazma Trombin Antesedanı
<b>FSF</b>	: Fibrin Kararlı Hale Getirici Faktör
<b>Gla</b>	: $\gamma$ -karboksiglutamik Asit
<b>KDa</b>	: Kilodalton
<b>FBA</b>	: Fibrinopeptid A
<b>FBB</b>	: Fibrinopeptid B
<b>t-PA</b>	: Doku Plazminojen Aktivatörü
<b>KH<sub>2</sub></b>	: K vitamininin İndirgen Formu
<b>PTT</b>	: Kısmi Tromboplastin Zamanı
<b>APTT</b>	: Aktif Kısmi Tromboplastin Zamanı
<b>ISI</b>	: Internatioanal Sensitivity Index
<b>INR</b>	: International Normalized Ratio
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>AHK</b>	: 3-Amino-4-hidroksikumarin
<b>DHMK</b>	: 7,8-dihidroksi-3(4-metilfenil)kumarin
<b>DHFK</b>	: 5,7-dihidroksi-4-fenilkumarin

## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>SAYFA NO</u>
Şekil II.1	Kan pıhtılaşması yolları. ....6
Şekil II.1	Karaciğerdeki K vitamini Döngüsü.....7
Şekil II.3	Dikumarolün Yapısı.....21
Şekil II.4	Warfarinin Yapısı.....22
Şekil II.5	Etilbis kumasetatın (thromexane) yapısı.....23
Şekil II.6	Phenprocoumon'un (mercumar) Yapısı.....23
Şekil II.7	Acenocoumarol (Nicoumane, Sinthrome).....23
Şekil II.8	Coumetarol ve Coumachlorun yapıları.....23
Şekil II.9	Denge Diyalizi.....27
Şekil III.1	Tez Çalışmasında İzlenen Yöntemler.....30
Şekil III.2	AHK ve DHFK Bileşiklerinin Yapıları.....35
Şekil IV.1	Gruplarda PT Testi Sonuçları.....40
Şekil IV.4.	Grupların INR Değerleri.....41
Şekil IV.3	2. 10 <sup>-5</sup> M DHMK bileşiğinin değişen dalga boylarına karşı absorbansındaki değişikliği gösteren grafik.....42
Şekil IV.4	DHMK bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.....43

## TABLO LİSTESİ

	<u>SAYFA NO</u>
<b>Tablo II.1</b> Kan pıhtılaşma faktörlerinin adlandırılmasında numaralama sistemi.....	7
<b>Tablo II.2</b> Kan pıhtılaşmasına katılan proteinlerin işlevleri.....	7
<b>Tablo II.3</b> Uluslar arası standardizasyon komitesi ve İngiltere Hematoloji Derneği Tarafından önerilen tedavi aralıkları .....	20
<b>Tablo III.1</b> Deney hayvanlarına uygulanan droglar ve miktarları.....	36
<b>Tablo IV.1</b> AHK için Protrombin Zamanı Testi Sonuçları.....	39
<b>Tablo IV.2</b> DHMK için Protrombin Zamanı Testi Sonuçları.....	40
<b>Tablo IV.3</b> DHFK için Protrombin Zamanı Testi Sonuçları.....	41
<b>Tablo IV.4</b> AHK, DHMK ve DHFK için R ve INR değerleri.....	42
<b>Tablo IV.5</b> $2 \cdot 10^{-5}$ M DHMK bileşiğinin dalga boyu (nm) ile absorban değerlerinin değişimi.....	43
<b>Tablo IV.6</b> DHMK bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının 390nm dalga boyunda verdikleri absorban değerleri.....	43
<b>Tablo IV.7</b> Diyaliz Kabındaki çözeltilerin konsantrasyonu.....	44

# BÖLÜM I

## GİRİŞ VE AMAÇ

Kan pıhtılaşma sistemi, yüksek yapılı organizmaların varlıklarını sürdürebilmeleri için çok önemlidir. Kan kaybı belli bir seviyeyi aştığında ölümcül olabildiği gibi aynı zamanda her hangi bir yaralanma durumunda, dış ortamın saldırısına açık kalan organizmanın hızlı bir şekilde izolasyonunu yeniden sağlayarak hayatta kalmasında belirleyici olabilir. Bunun yanı sıra kan pıhtılaşma sistemindeki normalden sapmalar, kanın pıhtılaşmaya az veya çok meyilli olması da büyük sorunlara yol açar.

Pek çok yaygın kardiyovasküler rahatsızlıklar (özellikle yaşlılarda) tromboz ile bağlantılıdır ve antitrombotik tedavi gerektirir (Fitzmaurice ve diğ. 2002). Warfarin ve Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin gibi antikoagulanların tromboembolik rahatsızlıkların tedavisi ve engellenmesindeki klinik yararlılıkları yeni antikoagulanların geliştirilmesi için yapılan çalışmalara büyük ilgi uyandırmıştır (Pancras ve diğ. 2000).

Hidroksikumarin türevleri şu anda dünyada en yaygın olarak kullanılan oral antikoagulanlardır ve etkilerini K vitamini döngüsünü etkileyerek gösterirler. Oral antikoagulanların etkileri Protrombin Zamanı (PT) Testi ile ölçülebilir.

Plazmada yüksek miktarda bulunan bir protein olan Serum Albumin pek çok hidrofobik drogun fizyolojik taşıyıcısı durumundadır. Bir drogun etkisinin araştırılmasında albumine ne kuvvetle ve hangi oranda bağlandığının bilinmesi önemlidir.

Bu çalışmada farklı hidroksikumarin türevleri oral yolla deney hayvanlarına verildi. Alınan kan örneklerinden elde edilen plazmada Protrombin Zamanı Testi ile kanama pıhtılaşma zamanı üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca en

yüksek etkiyi gösteren drogun Sığır Serum Albumin (BSA) proteinine bağlanması araştırılmıştır.



# BÖLÜM II

## GENEL BİLGİLER

### II. 1. KAN PIHTILAŞMA SİSTEMİ

Hemostaz bir damarın kesilmesi veya zedelenmesinden sonra kanamanın durmasıdır. Kan damarlarını örten endotelin tahrip veya yok olması halinde ise tromboz görülür (Murray ve diğ. 1990).

Hemostaz ve trombozda dört evre vardır:

- 1- Hasarlı noktadan öteye kan akışını azaltmak için hasarlı damarın büzülmesi.
- 2- Hasarın olduğu noktada gevşek ve geçici bir trombosit kümesinin oluşması. Trombositler damar duvarının hasarlı noktasında kollajene bağlanır ve bu noktada pıhtılaşma sistemi tarafından üretilen trombin veya aktive edilmiş diğer trombositlerden salınan adenozin difosfat (ADP) tarafından aktif hale getirilir. Trombositler aktive olduklarında şekilleri değişir ve fibrinojen varlığında hemostatik tıkaç (hemostazda) veya trombüs (trombozda) yapmak üzere kümelenirler.
- 3- Daha kararlı bir hemostatik tıkaç veya trombüs yapmak üzere trombosit kümesine bağlanan bir fibrin ağı oluşması.
- 4- Plazmin tarafından hemostatik tıkaç veya trombüsün kısmi eritilmesi.

#### II.1.1 Pıhtı Türleri

Pıhtı, fibrin ve kan hücrelerinden oluşmuştur ve kardiyovasküler sistemin herhangi bir kısmında; damarlarda, arterlerde, kalpte ve kılcal dolaşımında oluşabilir.

Arteryal pıhtı, yüksek akış şartlarında oluşur ve ince fibrin iplikçikleri ile birbirine bağlanmış trombosit agregatlarından meydana gelmiştir. Buna karşı venöz pıhtı, staz bölgelerinde meydana gelir. Bu pıhtı başlıca alyuvarlardan oluşmuştur. Alyuvarların aralarında yüksek miktarda fibrin molekülleri yerleşmiştir ve göreceli olarak az sayıda trombosit içerir. Orta derecedeki akış hızını yavaşlatmak için oluşan pıhtı, alyuvarların, trombositlerin ve fibrinin bir karışımıdır. Buna “karışık trombosit-fibrin pıhtısı” adı verilir. Bir trombositçe zengin arteryal pıhtı tıkaçıcı hale geldiğinde, staz oluşur ve pıhtı kırmızı staz pıhtısı olarak adlandırılabilir (Hirsch ve Anand 2001).

Pıhtı bir süre sonra bir takım yapısal değişikliklere uğrar. Lökositler, trombosit agregatlarından veya plazma proteinlerinin proteolitik kısımlarından salınan kemotaktik faktörlerce çekilir ve bunlar da pıhtıya dahil olurlar. Trombositler şişerek parçalanırlar ve adım adım fibrin ile yer değiştirirler. Sonuçta fibrin pıhtısı endotel hücrelerden ve lökositlerden salınan fibrinolitik enzimlerce parçalanırlar.

Trombozun komplikasyonları damarın lokal olarak engellenmesi, trombotik materyalin daha ileri embolizasyonu veya daha az yaygın olarak, hemostatik elemanların harcanması etkilerinden kaynaklanır.

Arteryal pıhtı genellikle engellenmiş akış bölgelerinde veya aterosklerotik plakların kırılma bölgelerinde oluşur. Arteryal pıhtı kısmen engelleyici olarak kalabileceği gibi tıkanıklık da oluşturabilir. Akış yavaş olduğunda stenoz (daralma) derecesi artar ve pıhtı tamamen engelleyici hale gelebilir. Trombosit aktivasyonu kadar kan pıhtılaşmasının da aktivasyonu arteryal trombozun patojenezi için önemlidir. Bu nedenle hem antikoagulanlar hem de trombosit fonksiyonunu baskılayan droglar arteryal trombozun önlenmesi ve tedavisinde etkilidirler.

Venöz pıhtı genellikle kol ve bacakların aşağı kesimlerinde oluşur ve sıklıkla asemptomatiktir. Bununla birlikte eğer damar duvarının enflamasyonuna, akışın engellenmesine veya pulmoner dolaşımın tıkanmasına neden olurlarsa akut semptomlar üretebilirler. Eğer venöz kapakçıklara zarar verirlerse venöz hipertansiyon nedeniyle uzun süreli komplikasyonlara neden olabilirler. Antikoagulanlar venöz trombozun önlenmesi ve tedavisinde son derece etkilidir.

İntrakardiyak trombi genellikle iltihaplanmış veya hasar görmüş kapakçıklarda, bir miyokardiyal enfarkt bölgesine komşu endokardiyumda, büyümüş veya hareketi zorlaşmış kardiyak çemberinde veya yapay kapakçıklar üzerinde oluşabilir. Kalpte kaldıklarında genellikle asemptomatiktirler ancak beyin veya

sistemik dolaşımında tıkanıklığa yol açtıklarında ciddi komplikasyonlar üretirler. İntrakardiyak pıhtının önlenmesi ve tedavisinde antikoagulanlar etkilidir ve yapay kalp kapakçığına sahip hastalarda antikoagulanların faydasının trombosit aktivasyonunu baskılayıcı droglarla arttığı gözlemlenmiştir.

Kılcal damarlara ait tromboz yayılmış damar içi pıhtılaşmanın veya yaygın trombosit agregasyonunun bir komplikasyonudur. Kanın dokulara akışının bloklanması ile mikropıhtı iskemik hasarlara neden olabilir. Antikoagulanlar yaygın damar içi pıhtılaşma üzerinde de etkilidirler (Hirsch ve diğ. 2001, Hirsch ve Fuster 1994).

## **II.1.2 Kan Pıhtılaşması**

Kan pıhtılaşması deneysel olarak çalışılan ilk biyolojik proseslerden biridir. Fibrin meydana gelmesiyle gözle görülebilir pıhtının oluşumu, çok sayıda faktörün katıldığı bir seri reaksiyonun bir sonucudur. Son 40 yıldaki hızlı gelişmeye karşın kan pıhtılaşması olayının pek çok safhası hala tam olarak anlaşılamamıştır ve bu alan hematolojik araştırmaların en hızlı gelişen dallarından biridir (Lee ve diğ. 1993).

### **II.1.2.1 Kan Pıhtılaşmasının Yolları**

Kan pıhtılaşması fenomenini açıklamak için ileri sürülen teoriler farklılıklar gösterebilir. Aşağıda yer alan tartışmalar 1964 yılında bağımsız olarak MacFarlane ve Davie ve Ratnoff tarafından ileri sürülen şelale (cascade) hipotezine dayanmaktadır.

Şelale hipotezinde pıhtılaşma, proenzim-enzim dönüşümlerinin birbirine bağlı olarak gerçekleşmesi temeline dayanır. Normal halde plazmada inert öncül moleküller olarak bulunan pıhtılaşma faktörleri, aktive olduklarında enzimlere dönüşürler. Bu enzimler daha sonra sıradaki öncül molekülü aktif enzim formuna dönüştürür. Her ne kadar tek tek basamakların nasıl gerçekleştiği konusunda tartışmalar sürse de temel yapı çoğunluk tarafından kabul görmüştür.

Pıhtılaşma en az iki temel olarak farklı mekanizma ile başlar; yabancı yüzey ile temas ve doku faktörünün etkisi. Bu, sonuçta fibrin oluşumuna götürecek ortak bir yolu aktive edecek iki farklı yolun işlemeye başlamasını sağlar.

Kan akışının kısıtlandığı bir alanda veya doku hasarı olmaksızın bir damar duvarında görülen anormalliğe yanıt olarak kırmızı pıhtının oluşmaya başlaması



Tablo II.1 Kan pıhtılaşma faktörlerinin adlandırılmasında numaralama sistemi. Rakamlar bu faktörlerin keşfedilme sırasını göstermekte olup bunlar etki sırası ile ilişkili değildir.

FAKTÖR	SIK KULLANILAN ADI
I	Fibrinojen
II	Protrombin
III	Doku Faktörü Genel olarak pıhtılaşma faktörleri
IV	Ca <sup>2+</sup> olarak anılırlar
V	Proakselerin, dayanıksız faktör, akselatör (Ac-) globülin
VII	Prokonvertin, serum protrombin çevirim hızlandırıcı (SPCA) kotromboplastini
VIII	Antihemofilik faktör A, antihemofilik globülin (AHG)
IX	Antihemofilik faktör B, Christmas faktörü
X	Stuart- Prower faktörü
XI	Plazma tromboplastin antesedanı (PTA)
XII	Hageman faktörü
XIII	Fibrini kararlı hale getirici faktör (FSF), fibrinolitikaz

Tablo II.2 Kan pıhtılaşmasına katılan proteinlerin işlevleri.

Serin proteazlar olan zimojenler	
Faktör XII	Damar duvarı örsenti noktasında açığa çıkan kollajene yapışır;HMW kinninojen ve kallikrein ile etkinleştirilir.
Faktör XI	Faktör XIa
Faktör IX	Ca <sup>2+</sup> varlığında faktör XIa tarafından etkinleştirilir.
Faktör VII	Ca <sup>2+</sup> varlığında trombin tarafından etkinleştirilir.
Faktör X	Protrombinaz kompleksleri (Ca <sup>2+</sup> faktör VIIa ve IXa) ve doku faktörü ve Ca <sup>2+</sup> varlığında faktör VIIa tarafından aktifleştirilmiş trombositlerin yüzeyinde etkinleştirilir.
Faktör II	Protrombinaz kompleksleri (Ca <sup>2+</sup> faktör Va ve Xa) tarafından aktifleştirilmiş trombositlerin yüzeyinde etkinleştirilir. (Faktör II, VII, IX ve X Gla içeren zimojenlerdir)
Kofaktörler	
Faktör VIII	Trombin tarafından etkinleştirilir; Faktör VIIa, faktör X'un faktör IXa tarafından etkinleştirilmesinde bir kofaktördür.
Faktör V	Trombin tarafından etkinleştirilir; faktör Va, protrombinin faktör Xa tarafından etkinleştirilmesinde bir kofaktördür.
Doku faktörü (faktör III)	Faktör VII için bir kofaktör olarak davranabilmesi için fosfolipid gereksinen uyarılmış endotel hücrelerinin yüzeyinde açığa çıkan bir proteindir.
Fibrinojen	
Faktör I	Fibrin pıhtısı oluşturmak için trombin tarafından kesilir:

Tablo II.2 Kan pıhtılaşmasına katılan proteinlerin işlevleri. (Devam)

Tiyole bağlı transglutaminaz	
Faktör XIII	Ca <sup>2+</sup> varlığında trombin tarafından etkinleştirilir; Kovalent çapraz bağlanarak fibrin pıhtısını kararlı hale getirir.
Düzenleyici ve diğer proteinler	
Protein C	Trombomodüline bağlı trombin tarafından etkinleştirilir; aktif halde faktör VIIIa ve Va'yı yıkıma uğratar. Gla kalıntıları içerir.
Protein S	Protein C'nin kofaktörü olarak davranır Gla kalıntıları içerir.
Trombomodülin	Endotel hücrelerin yüzeyindeki proteindir, trombine bağlanır ve daha sonra protein C'yi etkinleştirir.

### II.1.2.2 Entrensek Yol

Temas aktivasyonu, faktör XII, XI, IX, VIII, Yüksek Molekül Ağırlıklı Kinninojen ve prekallikreini içeren bir seri reaksiyonu başlatır. Bu reaksiyonlar faktör X' u aktive edecek enzimin oluşmasını sağlar ve entrensek yol olarak adlandırılmıştır (Murray ve diğ. 1990).

Bu yol prekallikrein, HK, Faktör XII ve XI'in negatif yüklü aktifleştirici bir yüzeyle karşılaştığı 'temas evresi' ile başlar. Temas evresi ile ilgili kanıtların güvenilirliği şüphelidir, çünkü faktör XIa' nın oluşumuna kadar olan basamaklar hakkındaki bilginiz *in vitro* deney sonuçlarına dayanmaktadır ve canlı vücudunda gerçekleşen olaylarla çok az benzerlik taşıyabilir. *In vivo* koşullarda olasılıkla bir kan duvarının açığa çıkan yüzeyinde bulunan kollajen bu noktayı sağlarken, entrensek yolun *in vitro* testlerinde bu amaçla cam veya kaolen kullanılabilir. Temas aktivasyonunu sağlayan biyolojik yüzeyler deri, eklem kıkırdağı, uzun zincirli yağ asitleri, ürik asid, homosistein, bakteri lipopolisakkaridleri, karageenan ve muhtemelen fibrin ve elastindir.

Temas evresinin komponentleri aktifleştirici yüzey üzerinde bir araya geldiğinde faktör XII, kallikreinin yaptığı proteolizle faktör XIIa' ya etkinleştirilir. Bu aşamada faktör XII konformasyonel değişiklikler sonucu daha hidrofobik hale gelir ve enzimatik aktivite kazanır. Kallikrein tarafından üretilen bu faktör XIIa daha fazla kallikrein üretmek üzere prekallikreine saldırır ve karşılıklı bir aktifleşme kurgular. Son elde edilen deney sonuçları eser miktarlarda faktör XIIa' nın faktör XII' yi aktive edebildiğini göstermiştir.

Kanıtlar entrensek yolun optimal aktivasyonunun kinin sisteminin katılımı ile olduğunu göstermektedir. Prekallikrein aktivasyonu faktör XIIa, plazmin ve muhtemelen diğer plazma proteinlerinin proteolitik aktivasyonunu gerektirir. Bu reaksiyon prekallikreinin kallikreine dönüşümü ile sonuçlanır. Kallikrein *in vitro* olarak faktör XII' nin faktör XIIa' ya aktivasyonunu ve faktör XII' nin fragmentasyonunu hızlandırır. Ayrıca direkt olarak faktör IX ve plazminojeni de aktif hale getirebilir (Lee ve diğ. 1993).

HK faktör XIIa' nın doğal substratlarına karşı olan etkinliğini attırarak görev yapar. Ek olarak HK, fibrinojenin yüzeyler tarafından adsorbsiyonunu kolaylaştırır ve sistein proteaz aktivatörü olarak davranabilir.

Faktör XIIa oluştuğunda iyonik kalsiyumun katılımı olmaksızın faktör XI'i XIIa'ya aktifleştirir ve HK' den bradykinin ( güçlü bir vazodilatör etkiye sahip bir nonapeptid) serbestler. Reaksiyon fosfolipidler tarafından hızlandırılır ve oluşan faktör XIa bir serin proteaz olarak davranır. Bradykininin pek çok biyolojik ve muhtemel etkilerine karşın pıhtılaşma üzerinde görünen bir etkisi yoktur. Bununla birlikte kininojen aktivasyonundan sonra oluşan histidince zengin peptidler faktör XII' nin aktivasyonunu inhibe edebilirler. Yüksek derecede saflaştırılmış sistemlerde HK noksanlığında faktör XIIa tarafından faktör XI aktivasyonu gerçekleşmez (Lee ve diğ. 1993)

$Ca^{2+}$  varlığında faktör XIa, faktör IX' u faktör IXa denilen serin proteaza aktifleştirir. Bu ise iki zincirli serin proteaz olan faktör Xa 'yı vermek üzere faktör X' daki (56 kDa) bir arjinin-izolösin bağınyı koparır. Bu son tepkime aktifleştirilmiş trombositlerin yüzeyinde tenaz kompleksi adı verilen komponentlerin bir araya gelmesini gerektirir. Bunlar:  $Ca^{2+}$  ve faktör VIIIa ve faktör IXa ile faktör X'dur.  $\gamma$ -karboksiglutamik asid (Gla) içeren zimojenlerin (faktör II, VII, IX, X) katıldığı bütün tepkimelerde amino uç bölgesindeki Gla kalıntılarının,  $Ca^{2+}$  için yüksek afiniteli bir bağlama noktası olarak hizmet ettiğine dikkat etmek gerekir. Bu tenaz kompleksinin bir araya getirilmesi için trombositlerin, normal dinlenim halindeki aktifleştirilmemiş trombositlerin plazma zarlarının iç yüzünde yer alan asidik (anyonik ) fosfolipidler, fosfatidil serin ve fosfatidil inositolü ortaya çıkarmak üzere önce aktifleştirilmeleri zorunludur. Bir glikoprotein olan faktör VIII (330 kDa) bir proteaz öncülü olmayıp trombosit yüzeyindeki faktör IXa ve X'a ait bir reseptör olarak hizmet eden bir kofaktördür (Marquette ve diğ. 1995). Faktör VIII, çok küçük miktarda trombinle

faktör VIIa vermek üzere etkinleştirilir ve bu ise trombin ile daha da kesilerek etkinsizleştirilir.

### II.1.2. 3. Ekstresek Yol

Pıhtılaşma doku faktörü ile başlatıldığında bu molekül ile faktör VII arasındaki ilişki faktör X' u aktive eden bir enzimin sentezi ile sonuçlanır ve ekstresek yol olarak adlandırılmıştır (Murray ve diğ. 1990).

Faktör Xa entresek ve ekstresek yolların kesiştiği noktada görülür ve kan pıhtılaşmasının son ortak yoluna yol açar. Ekstresek yol doku faktörü, faktör X, VII ve  $Ca^{2+}$  yı kapsar ve faktör Xa üretimi ile sonlanır. Bu yol, faktör X'un faktör VIIa ile katalizlenen aktivasyonunda bir kofaktör olarak davranan doku faktörünün ifade edildiği doku hasar noktasında başlar. Faktör VIIa entresek yolda tenaz kompleksi tarafından kırılan faktör X'daki aynı arjinin- izölösün bağı kırılır. Faktör VII bir zimojen ise de görece yüksek bir endojen etkinliğe sahiptir; bu etkinlik trombin veya faktör Xa tarafından etkin serin proteaz VIIa' ya çevrilmekle artar. Faktör X' un aktivasyonu entresek ve ekstresek yollar arasında önemli bir bağlantıdır. Ekstresek ve entresek yollar arasında önemli bir etkileşim doku faktörü ve faktör VIIa komplekslerinin entresek yoldaki faktör IX' u da aktifleştirmesidir. Gerçekten de, doku faktörü ile faktör VIIa arasında kompleks oluşması kan pıhtılaşmasının *in vivo* başlatılmasına katılan kilit olay olabilir. Entresek yolun, faktör XII, prekallikrein ve Yüksek Molekül Ağırlıklı Kininojenin katıldığı bu başlangıç basamaklarının fizyolojik önemi, bu komponentlerinde kalıtsal bozukluklar bulunan olgularda kanama sorununun olmayışından ötürü pek çok soru işareti doğmuştur. Aynı şekilde, faktör XI' de eksiklik bulunan olgularda da kanama sorunları gözlemlenmeyebilir (Tunalı, 2002, Lee ve diğ. 1993).

### II.1.2.4 Ortak Yol

İntresek ya da ekstresek yolda üretilen faktör Xa son ortak yolda protrombini (faktör II ), trombine (faktör IIa ) çevirir. Bu da daha sonra fibrinojeni fibrine döndürür. Bu mekanizma ortak yol olarak adlandırılmıştır (Murray ve diğ. 1990).

Protrombonin aktivasyonu tıpkı faktör X gibi aktifleştirilmiş trombositlerin yüzeyinde görülür ve trombosit anyonik fosfolipidleri,  $Ca^{2+}$ , faktör Va, Xa ve protrombinden oluşan bir protrombinaz kompleksinin bir araya gelmesini gerektirir.

Faktör VII ve serüloplazmin ile benzerlik gösteren bir glikoprotein olan faktör V (330 kDa) karaciğer, dalak, ve böbrekte sentezlenir ve trombositlerde ve plazmada bulunur (Rand ve diğ. 1995). Tenaz kompleksinde faktör VIII' e benzer şekilde bir kofaktör olarak etki yapar. Eser miktarda trombinle faktör Va' ya aktifleştirildiğinde trombosit zarı üzerindeki özgül reseptörlere bağlanır ve faktör Xa ve protrombinle bir kompleks oluşturur. Trombinin daha ileri etkisiyle daha sonra inaktif hale getirir ve bu olay protrombinin trombine aktivasyonunu sınırlayan bir yol sağlar. Protrombin trombosit zarı üzerinde faktör Xa ve Va kompleksine bağlanınca, etkin, iki zincirli trombin molekülü vermek üzere iki noktadan faktör Xa tarafından kesilir ve daha sonra bu trombin trombosit yüzeyinden salınır. Trombinin A ve B zincirleri bir disülfid bağı ile bir arada tutulur.

Fibrinojen ( faktör I 340 kDa) suda çözünen bir plazma glikoproteinidir, 47.5 nm boyundadır, disülfid köprüleri ile kovalent olarak bağlanmış, birbirinin aynı olmayan üç çift polipeptid zincirinden ( $A\alpha, B\beta, \gamma$ ) oluşur (Veklich ve diğ. 1992). Zincirlerin amino uç sonlanmalarında yer alan ve sırasıyla fibrinopeptid A (FPA) ve B (FBP) adı verilen  $A\alpha$  ve  $B\beta$  zincirlerinin A ve B bölümleri, aspartat ve glutamat kalıntılarının varlığı ve FBP'de alışılmadık bir tirozin o-sülfatın bulunmasından ötürü fazladan eksi yükler taşır. Bu eksi yükler fibrinojenin plazmada çözünürlüğüne katkıda bulunur ve fibrinojen molekülleri arasında elektrostatik itme yaparak bunların kümelenmesinin önlenmesine de yardım eder.

Hemostazdaki rolünün yanı sıra fibrinojen ayrıca enflamasyon, yara iyileşmesi, ve hücre farklılaşması gibi olaylara da çeşitli etkileşimler yolu ile katılır. Bu etkileşimler fibrinojenin endotelial hücrelere, lökositlere ve ekstraselüler matriksin komponentlerine bağlanmasını içerir (Cote ve diğ. 1998).

Trombin (34 kDa) plazmada bulunan bir serin proteaz olup fibrinopeptidler ile fibrinojenin  $A\alpha$  ve  $B\beta$  zincirlerinin  $\alpha$  ve  $\beta$  kısımları arasındaki dört tane arjinin-glisin bağlarını hidroliz eder. Trombin tarafından fibrinopeptidlerin salınması alt birim yapısına sahip  $(\alpha, \beta, \gamma)_2$  fibrin monomeri üretir. FBA ve FBP sırasıyla 16 ve 14 kalıntı içerdiğinden fibrin molekülü fibrinojende bulunan kalıntıların %98' ini korur. Fibrinopeptidlerin uzaklaştırılması bağlantı noktalarını açığa çıkarmakta olup bu da fibrin monomerleri moleküllerinin, suda çözünmeyen bir fibrin pıhtısı oluşturmak üzere düzenli bir tabakalaşma yapmak için kendiliğinden kümelenmesine izin verir. Beyaz ve kırmızı pıhtıları işte bu trombosit, alyuvar ve diğer yapıtaşlarını içine

hapseden, suda çözünmeyen fibrin monomerinin oluşması sağlar. Bu ilk fibrin pıhtısı göreceli olarak zayıftır, sadece fibrin monomerlerinin kovalent olmayan birlikteliği ile bir arada tutulur.

Trombin, fibrinojeni fibrine çevirmesine ek olarak faktör XIII'ü faktör XIIIa ya da çevirir. Bu faktör, proteolize direnci arttırılmış çok daha kararlı bir fibrin pıhtısı vermek üzere glutaminin amid grupları ile lizin kalıntılarının  $\epsilon$ -amino grupları arasında peptid bağları yaparak fibrin moleküllerini kovalent çapraz bağlarla birbirine bağlayan özgül bir transglutaminazdır (Tunalı, 2002, Lee ve diğ. 1993).

### **II.1.2.5. Dolaşımdaki Trombin Miktarının Denetlenmesi**

Hemostaz veya trombozun seyri sırasında bir kez etkin trombin oluştuğunda daha fazla fibrin oluşumu veya trombosit aktivasyonunun engellenmesi için bunun derişiminin dikkatle denetlenmesi zorunludur. Bu ise iki şekilde başarılır. Trombin, dolaşımda etkin olmayan öncülü olan protrombin halinde bulunur ve protrombin bir enzimatik tepkimeler şelalesi tarafından aktive edilir. Şelalenin her basamağında, geribildirim mekanizmaları, etkinleştirme ve inhibisyon arasında ince bir denge oluşturur. Faktör XII' nin plazmadaki derişimi yaklaşık 0.03 mg/mL iken, fibrinojenin ki 3 mg/mL olup arada yer alan pıhtılaşma faktörlerinin derişimi şelale üzerinde her bir alt basamakta artar ve bu da pıhtılaşma şelalesinin bir büyütme sağladığını gösterir. Trombin etkinliğinin denetlenmesinde ikinci yol, oluşan her hangi bir trombinin dolaşımdaki inhibitörler tarafından inaktif hale getirilmesidir.

Normal plazmada dört adet doğal trombin inhibitörü bulunur. Bunların en önemlisi, antitrombin etkinliğinin yaklaşık %75' ini sağlayan antitrombin III' tür. Antitrombin III; faktör IXa, Xa, XIa, ve XIIa' nın etkinliklerini de inhibe edebilir.  $\alpha_2$ -Makroglobülin antitrombin etkinliğinin geri kalanının büyük bölümünü sağlamakta olup fizyolojik koşullarda heparinkofaktör II ve  $\alpha_1$ -antitripsin küçük inhibitörler olarak etki yapar. Antitrombin III' ün iç kaynaklı etkinliği heparin gibi asidik proteoglikanların varlığı halinde büyük ölçüde artar (Murray ve diğ. 1990).

### **II.1.2.6 Fibrin Pıhtılarının Çözülmesi**

Pıhtılaşma sistemi normalde fibrin pıhtılarının sürekli oluşup çözündüğü dinamik bir denge halindedir. Fibrin ve fibrinojenin yıkılmasından esas olarak sorumlu serin proteaz olan plazmin dolaşımda etkin olmayan zimojeni olan

plazminojen (90kDa) halinde bulunur. Fizyolojik koşullarda sıvı fazda oluşan herhangi bir küçük miktarda plazmin hızlı etki yapan plazmin inhibitörü olan  $\alpha_2$ -antiplazmin tarafından hızla inaktive edilir. Plazminojen hem fibrinojen hem fibrine bağlanır ve böylece oluşmaları sırasında pıhtıların içine yerleşir. Fibrine bağlı iken oluşan plazmin  $\alpha_2$ -antiplazminden korunmuş olduğundan etkin halde kalır. Çeşitli tipte plazminojen aktivatörleri vücut dokularının çoğunda bulunur ve bunların tümü iki zincirli serin proteaz olan plazmin vermek üzere plazminojendeki arjinin-valin bağını koparırlar.

Doku plazminojen aktivatörü (t-PA) hasar veya stres koşullarında damar endotelinden dolaşıma salınan ve fibrine bağlanıncaya kadar etkisiz olan bir serin proteazdır. Fibrine bağlandığında t-PA plazmin vermek üzere pıhtı içinde plazminojeni kırpar ve bu plazmin daha sonra suda çözünen yıkım ürünleri vermek ve dolayısı ile pıhtıyı çözmek üzere pıhtıyı sindirime uğratar (Fay ve diğ. 1994). Ne plazmin ne de plazminojen aktivatörü bu yıkım ürünlerine bağlı kalmayı sürdüremediğinden bunlar sıvı faza salınır ve burada kendi doğal inhibitörleri tarafından inaktive edilirler. Proürokinaz, fibrin için aynı derecede yüksek seçicilik göstermeyen plazminojenin ikinci bir aktivatörü olan ürokinazın öncülüdür. Dış salgı kanallarını örten bazı epitel hücreleri tarafından salgılanan ürokinazın bu gibi kanallara biriken herhangi bir fibrinin eritilmesine katıldığı düşünülmektedir (Tunalı, 2002, Murray ve diğ. 1990).

### **II.1.2.7 Trombositlerin Aktivasyonu**

Hemostatik tıkaç veya pıhtı oluşurken hemostazın görülebilmesi için trombositlerin kan damarlarının açığa çıkan kollajenine yapışması, taneciklerinin içeriğini boşaltması ve agregasyonu işlemlerinin sırasıyla gerçekleşmesi zorunludur.

Trombositler kollajene von Willebrand faktörünün katıldığı bir tepkime ile, trombosit yüzeyinde yer alan glikoprotein kompleksi GPIa-IIa ( $\alpha_2\beta_1$  integrin) dahil özgül resptörler yolu ile yapışır. Bu madde endotel hücreleri tarafından plazmaya salgılanan bir glikoprotein olup faktör VIII' i kararlı hale getirir ve kollajen ile subendotele bağlanır. Trombositler, trombosit yüzeyindeki bir glikoprotein kompleksi (GPIb-V-IX) yolu ile von Willebrand faktörüne bağlanır; bu etkileşim ince damarlar ve daralmış arterlerde görülen yüksek stres koşullarında trombositlerin subendotele yapışması için önemlidir. (Saenko ve Scandella 1995)

Normalde dolaşımdaki trombositler uyarılmamış haldedir. Öte yandan hemostaz ve tromboz sırasında olaya katılan trombositler aktive edilir. Trombosit aktivasyonu trombosit şeklinde değişiklikler, tanecikler içindeki maddelerin salgılanması ve agregasyonunu içeren karmaşık bir süreçtir.

Pıhtılaşma şelalesinde oluşan ve trombositlerin en güçlü etkinleştiricisi olan trombin plazma zarı üzerindeki reseptörü ile etkileşerek *in vivo* koşullarda trombosit aktivasyonunu başlatır. Trombinin reseptörü ile etkileşmesi plazma zarındaki bir fosfolipaz C' nin aktive olmasını sağlar. Bu enzim fosfatidil inositol 4,5-bifosfat'ı hidroliz ederek 1,2- diaçilgliserol ve 1,4,5- inositoltrifosfat gibi iki iç efektör molekül oluşturur.

Diaçil gliserol, bir trombosit proteini olan plekstrin'i (47 kDa) fosforile eden protein kinaz C' yi uyarır. Bu proteinin fosforilasyonu çeşitli tipte trombosit taneciklerinin agregasyon ve içeriklerini serbest bırakmasına neden olur. Kesif taneciklerden serbest kalan ADP de trombositleri aktive edebilir ve bir grup trombositin daha ek olarak etkinleştirilmesine neden olur. 1,4,5-inositoltrifosfat, esas olarak kesif tübüler sistemden sitoplazma içine  $Ca^{2+}$  salınmasına neden olmakta, bu ise daha sonra miyozinin hafif zincirlerinin fosforilasyonuna yol açmak üzere kalmomodülün ve miyozin hafif zincir kinazı ile etkileşmektedir. Bu zincirler daha sonra aktin ile etkileşerek trombositin şeklinde değişikliklere neden olur.

Artmış sitozolik  $Ca^{2+}$  düzeyleri tarafından trombosit fosfolipaz  $A_2$ ' sinin kollajenle kamçılanan aktivasyonu tromboksan  $A_2$  oluşumuna yol açmak üzere trombosit fosfolipidlerinden araşidonik asid serbestlenmesine neden olur. Tromboksan  $A_2$  ise fosfolipaz C' yi daha da aktive ederek trombosit agregasyonunu teşvik eder. Aktive olmuş trombositler bir trombosit kümesi oluşturmanın yanı sıra pıhtılaşma şelalesinde yeni ifade edilen anyonik fosfolipidler yolu ile faktör X ve II' nin aktivasyonunu hızlandırmak için de gereklidir. Trombin, kollajen ADP ve trombosit aktive edici faktör gibi diğerleri dahil agregasyon yapan tüm ajanlar, fibrinojenin aktive edilmiş trombosit yüzeyindeki bir glikoprotein kompleksi olan GPIIb-IIIa' ya ( $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin) bağlanacağı şekilde trombosit yüzeyini değişikliğe uğratar. Fibrinojen molekülleri daha sonra birbirine bitişik aktif trombositleri bir diğerine bağlayarak bir trombosit kümesi yapar. Adrenalin, serotonin ve vazopressin dahil bazı ajanlar diğer agregasyon yapan ajanlarla arttırılmış etkiler gösterir (Murray ve diğ. 1990).

## II.1.2.8 K Vitamini Döngüsü ve K Vitamini Bağımlı Pıhtılaşma Faktörleri

Doğada K vitamini iki formda bulunur. K<sub>1</sub> vitamini (filokinon), çeşitli bitkisel yağlarda ve lifli bitkilerde bulunur. K<sub>2</sub> vitaminleri çeşitli bakteriler tarafından sentezlenirler. Bu vitamene olan günlük ihtiyacın 0.03- 2 µg/kg gün olduğu ileri sürülmüştür. Hem K<sub>1</sub> hem de K<sub>2</sub> vitaminleri yağda çözünür ve yalnızca safra tuzlarının varlığında emilirler (Lee ve diğ. 1993).

K vitamini pıhtılaşmada görevli protrombin, faktör VII, IX, ve X ile protein C ve S' nin biyosentezi için gereklidir (Fasco ve Principe 1982, Morris ve diğ. 1993)

Trombinin öncülü olan protrombin pıhtılaşmanın ortak yolunda görev yapan bir proenzimdir. Sentezi karaciğerde gerçekleşir. İnsan protrombini 69.000 molekül ağırlığına sahiptir ve %2-10 karbohidrat içerir. Bir disülfid köprüsü içeren tek bir polipeptidten oluşmuştur. Protrombinin amino terminal bölgesi yaklaşık olarak 10 adet Gla kalıntısı içerir. İçerdiği kalsiyum bağlanma bölgeleri protrombinin protrombinaza bağlanması için gereklidir. Molekül karboksi terminal bölgesinde serin proteaz etkisi gösterir (Bristol ve diğ. 1996).

Bu proenzim insan plazmasında yaklaşık olarak 10-15mg/ dL konsantrasyonunda bulunur. Vücudun toplam protrombin havuzunun büyük bir kısmı lenf sıvısındadır. Çevrim hızı 2.4 mg/kg gündür.

Faktör VII pıhtılaşmanın ekstrinsek yolunda doku faktörü ile birlikte görev yapan bir proenzimdir. İnsan faktör VII proteini ile yapılan saflaştırma çalışmaları, kaynağa ve uygulanan metoda bağlı olarak 48.000 ila 100.000 arasında bir molekül ağırlığına sahip olduğunu açığa çıkarmıştır. Molekül başına 8.8 Gla kalıntısına sahiptir. İnsan plazmasındaki konsantrasyonu 3 mg/dL olarak tahmin edilmektedir. Plazma proteinleri arasında faktör VII 4- 6 saatlik yarı ömür ile en yüksek çevrim hızına sahip olanıdır.

Faktör IX pıhtılaşmanın ekstrinsek yolunda görev alan bir proenzimdir. Sığır faktör IX' u 55.000 molekül ağırlığına sahiptir ve tek bir polipeptid zincirinden oluşmuştur. Yaklaşık %26 oranında karbohidrat içerir ve sialik asitlerin uzaklaştırılması ile inaktif hale gelir. 12 Ca<sup>2+</sup> bağlanma bölgesi içerir. İnsan faktör IX' u 54.000 molekül ağırlığına sahiptir ve X kromozomunun uzun kolunun ucuna yakın yerleşmiştir. Vücut faktör IX havuzunun %60' ı ekstravaskülerdir. Faktör IX sentezlenirken sinyal peptidinin uzaklaştırılması, N- ve O- bağlı glikozilasyon,

Asp<sup>84</sup>, ün β-hidroksilasyonu, amino terminalinden ilk 12 glutamik asit kalıntısının karboksilasyonu ve 18 amino asidik propeptidin kesilmesi gibi modifikasyonlara uğrar. Plazmada yalnızca eser miktarlarda bulunur (3µg/ mL), yarı ömrü yaklaşık 24 saattir (Bristol ve diğ. 1993).

Faktör X pıhtılaşmanın ortak yolunda protrombinaz oluşumu için gerekli olan bir proenzimdir. Hem entrensek hem de ekstrensek yolun ürünleri ile aktive olur. İnsan faktör X' unun molekül ağırlığı 59.000 dir. Sığır faktör X'u %10 karbonhidrat içerir ve molekül başına yaklaşık 14 γ-karboksiglutamik asit kalıntısına sahiptir. Sırasıyla 38.000 ve 17.000 molekül ağırlığına sahip iki polipeptid zincirinden oluşmuştur. Tüm karbonhidratlar ağır zincirde bulunurken, hafif zincir faktör X'un fosfolipidlere bağlanması için gerekli olan Ca<sup>2+</sup> bağlanma bölgelerini içerir. Faktör X'un plazmadaki konsantrasyonu 1.2 mg/ dL dir.

Faktör Xa' nın inhibisyonunun normal hemostazın sağlanması için gerekli bazal trombin aktivitesi seviyelerini etkilemeden, hem ekstrensek hem de intrensek yolla üretilmiş trombin miktarını azaltabileceği düşünülmektedir (Pancras ve diğ. 2000).

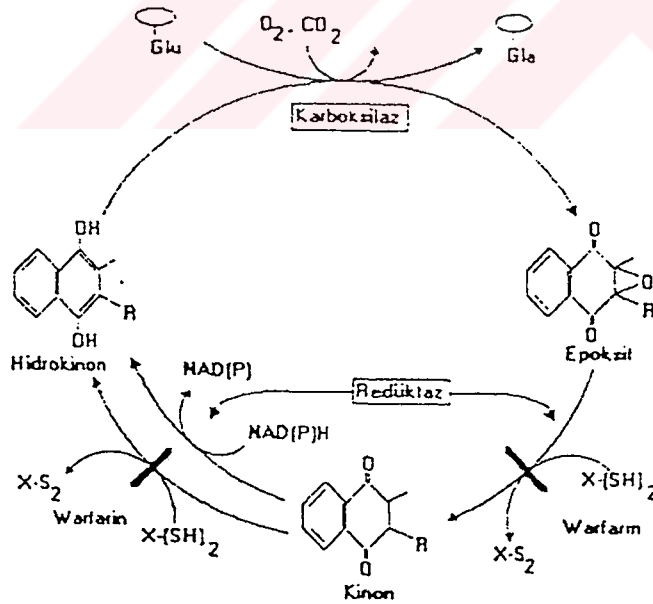
Protein C ilk olarak 1966 yılında Seegers tarafından tanımlanmıştır. Kofaktörleri ve inhibitörleri ile birlikte pıhtılaşma sisteminin önemli bir modülatörüdür. Kandaki önemli fizyolojik antikoagulanlardan biridir. Protein C faktör VIIIa ve faktör Va' yı proteolitik olarak parçalar. Hem protein C hem de protein S'nin eksikliği ciddi tromboembolik sorunlara yol açar. İnsan protein C molekülü 62.000 molekül ağırlığına sahiptir. Eşit olmayan uzunluklarda iki polipeptid zincirinden oluşmuştur. Hafif zincir 10 Gla kalıntısına sahipken ağır zincir aktif serin kalıntısına sahiptir ve trombin kesme bölgesine sahiptir. Plazmadaki konsantrasyonu 2-6 mg/L civarındadır. (Gresele ve diğ. 1998)

Trombomodülin protein C' nin bir kofaktörüdür. Trombinle hızla 1:1 oranında kompleks oluşturur ve eser miktarda trombinin mikrodolaşımdan uzaklaştırılmasını sağlar. Trombomodülin protein C yolu protrombinin aktivitesini ve aşırı sentezlenmesini inhibe eden doğal bir antikoagulan mekanizmadır (Isermann ve diğ. 2001).

Protein S 71.000 molekül ağırlığa sahip tek zincirli bir polipeptiddir ve 10 Gla kalıntısı içerir. Karaciğerde sentezlenir. Görüldüğü kadarıyla protein C' nin etkisi için gerekli bir kofaktördür. (Benzakour ve Kanthou 2000)

K vitamini bağımlı proteinlerin biyosentezi bir seri kompleks post-translasyonel modifikasyonu gerektirir. Bunların arasında, sinyal peptid dizisinin çıkarılması, N- ve O- bağılı glikozilasyon, bazı durumlarda bir aspartat kalıntısının hidroksilasyonu ve internal bazik kalıntıların uzaklaştırılması diğer salgılanan proteinlerle paylaştıkları ortak reaksiyonlardır, bununla birlikte  $\gamma$ - karboksilasyon farklı bir translasyon sonrası modifikasyondur (Chu ve diğ. 1996).

K vitamini, K vitamini bağımlı proteinlerin N-terminal bölgelerindeki glutamat kalıntılarının karboksilglutamata post-translasyonel karboksilasyonu için gerekli bir kofaktördür. Karboksilasyon K vitamini bağımlı proteinlerin hem fosfolipid yüzeylerdeki kofaktörleri ile kalsiyum bağımlı kompleksleşmesi hem de biyolojik aktivitesi için gerekli olan konformasyonel değişiklikleri geçirmesine izin verir. K vitamini bağımlı koagülasyon faktörlerinin karboksilasyonu K vitamini'nin indirgen formu (KH<sub>2</sub>) moleküler oksijen ve karbondioksit gerektiren bir karboksilaz tarafından katalizlenir. (Morris ve diğ. 1993) Vitamin K bağımlı karboksilaz endoplazmik retikulum membranında yerleşmiştir (Sugiura ve diğ. 1996) ve reaksiyon endoplazmik retikulumda gerçekleşir (Huber ve diğ. 1990)



Şekil II.2 Karaciğerdeki K vitamini Döngüsü

Reaksiyon süresince vitamin  $KH_2$  vitamin K redüktaz tarafından K vitaminine çevrilen vitamin K epoksida okside olur. K vitamini daha sonra vitamin K redüktaz tarafından vitamin  $KH_2$ 'ye indirgenir. K vitamini antagonistleri antikoagulan etkilerini vitamin K epoksid redüktaz ve muhtemelen vitamin K redüktazı inhibe ederek gösterir. Bu proses sonucu K vitamini eksikliği oluşur ve K vitamini bağımlı pıhtılaşma faktörlerinin karboksilasyonunu sınırlar. Ek olarak K vitamininin antagonistleri düzenleyici görev yapan proteinlerin (protein C, protein S) karboksilasyonunu da sınırlar ve böylece bu antikoagulant proteinlerin fonksiyonunu bozar. K vitaminin çevrimini inhibe ederek oral antikogulantlar, kısmi karboksilasyon ve dekarboksilasyona yol açarlar ve bu nedenle fonksiyonsuz proteinlerin hepatik üretimine ve salgılanmasına sebep olurlar (Fasco ve Principe 1982, Cain ve diğ. 1997, Furie ve diğ. 1999, Murray ve diğ. 1990, Lee ve diğ. 1993).

K vitamini bağımlı proteinlerin  $\gamma$ -glutamil karboksilaz tarafından tanınmasından kısa bir peptid dizisi sorumludur (Wu ve diğ. 1997). Bu bölge  $\gamma$ -karboksilasyon tanımlama bölgesi olarak adlandırılmıştır.

### **II.1.3 Trombozun Klinik Sonuçları Ve Antikoagulanlara Olan İhtiyaç**

1991 yılı itibarı ile venöz tromboembolizma Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık olarak 300.000 hastane kaydından sorumludur. Pulmoner embolizma hastaların %12'sinin ölümüne neden olur veya yardımcı etkidir. Amerika Birleşik Devletleri'nde de her yıl 50.000 ila 250.000 ölümden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Tromboz, aterosklerozun pek çok akut komplikasyonlarından sorumludur ve ilerlemesine yardımcı olur (Khrenov ve diğ. 2002). Aterosklerozun etkileri çok büyüktür. Genel bir patolojik proses olarak ateroskleroz kalp, beyin, abdomen ve bacak arterlerine etki ederek, akut ve kronik iskemi, ani ölüm, miyokardiyal enfarkt, kararlı veya kararsız anjina, iskemik kardiyomiopati, kronik aritmi, inme ve bunamayı içeren iskemik serebrovaskular rahatsızlıklar ve renal hipertansiyon gibi hastalıklara neden olur. Ateroskleroz ve onun trombotik komplikasyonları ayrıca bağırsak iskemisine neden olabilir ve diyabet ve hipertansiyonun komplikasyonlarına katkıda bulunabilir. Kalpte meydana gelen tromboembolizma atrial fibrilleşme, akut miyokardiyal enfarkt, valvular kalp

rahatsızlıklarına ve kardiyomyopatlere sahip hastalarda embolik inme ve periferel embolizmaya sebep olabilir (Hirsch ve diğ. 2001, Hirsch ve Fuster a 1994).

## II.1.4 Pıhtılaşma Sistemini Ölçen Laboratuar Testleri

Hemostazın dört evresini ölçebilmek için bir grup laboratuar testi vardır. Bu testler trombosit sayımı, kanama zamanı, kısmi tromboplastin zamanı (PTT), aktif kısmi tromboplastin zamanı (APTT), protrombin zamanı (PT), trombin zamanı, fibrinojen derişimi, fibrin pıhtı kararlılığı ve fibrin yıkım ürünlerinin ölçümünü kapsar. Trombosit sayımı trombosit sayısını belirlerken, kanama zamanı trombosit işlevinin tümünü ölçer. PTT entrensek, PT ekstrensek yolu ölçer. Warfarin gib antikoagulanların etkinliğini ölçmede PT kullanılırken, heparin tedavisinin izlenmesi için APTT kullanılır.

Protrombin zamanı testi ekstrensek pıhtılaşma sistemini inceleyen, bu sistemdeki kalıtsal veya sonradan kazanılmış bozuklukları teşhis etmek ve özellikle antikoagulan tedaviyi izlemek üzere kullanılan çok önemli bir testtir. İlk olarak 1935 yılında Quick ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır.

PT testinde plazmaya  $Ca^{2+}$  iyonları ve tromboplastin (doku faktörü) ilave edilerek fibrin oluşumu için geçen süre tespit edilmektedir. Faktör VII, X ve V protrombin ve fibrinojene duyarlıdır (Brummel ve diğ. 2001).

PT testinde kullanılan doku ekstraktının hazırlanma aşamasındaki farklılıklar, tromboplastin ve kalsiyum klorür konsantrasyonu test sonuçlarında farklılıklar oluşturmaktadır. Bunun üzerine 1977 yılında Dünya Sağlık Örgütü, standart olarak insan beyni tromboplastini (Kod No 67/40) ile kalibre edilmiş sığır, tavşan ve insan kaynaklı tromboplastinlerini uluslar arası referans maddesi olarak kabul etmiştir. 67/40' ın kalibrasyon sabiti 1 olarak belirtilmiştir. Daha sonra kalibrasyon sabiti terimi ISI (International Sensitivity Index) olarak değiştirilmesine karar verilmiş ve Uluslararası Tromboz ve Hemostaz komitesi tüm sonuçların her zaman INR (International Normalized Ratio) olarak sunulması gerektiğini açıklamıştır (Tunalı, 2002). INR değeri şu şekilde verilir (Fitzmaurice ve diğ. 2002).

$$\text{INR} = \frac{\text{Hastanın PT değeri (saniye)}}{\text{Sağlıklı kişilerin PT değeri ortalaması (saniye)}} \times \text{ISI} \quad (\text{II.1})$$

ISI: International Sensitivity Index, INR: International Normalized Ratio

Hastanın PT değerinin, sağlıklı kişilerin PT değerine bölünmesi ile elde edilen değer R ile ifade edilir.

**Tablo II.3 Uluslararası standardizasyon komitesi ve İngiltere Hematoloji Derneği tarafından önerilen tedavi aralıkları**

Antikoagulan tedavide olması gereken INR aralıkları	Klinik Durum
2.0 - 2.5	Derin venöz trombozda, yüksek riskli cerrahide
2.0 - 3.0	Kırık femor operasyonları
2.0 - 3.0	Derin venöz tromboz tedavisi, pulmoner embolizm Geçici iskemik ataklar
3.0 - 4.5	Tekrarlayan derin venöz tromboz, pulmoner embolizm, miyokard enfarktüs, arteryal graflar, kardiyak prostetik graflar ve kapakçıklarda

## II. 2 ANTİKOAGULANLAR

Pıhtılaşma faktörlerinin etkinliğini veya sentezini bozarak pıhtılaşma olayını inhibe eden ve böylece kanın koagülasyon yeteneğini azaltan maddelere antikoagulan denir. Antikoagulan ilaçlar etki mekanizmalarındaki farka göre ikiye ayrılırlar.

- 1- Kanda bazı pıhtılaşma faktörlerini inhibe ederek direkt etki edenler (heparin vb.).
- 2- K vitamini bağımlı pıhtılaşma faktörlerinin (protrombin, faktör VII, IX, ve X ile protein C ve S) post-translasyonel modifikasyonlarını engelleyerek indirekt etki edenler (kumarin vb.).

Güntümüzde tedavi amaçlı *in vivo* etkili olarak kullanılan antikoagulanlar kumarin ve indandion türevleri ve düşük molekül ağırlıklı veya normal heparindir (Lee ve diğ. 1993).

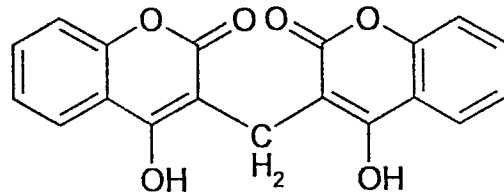
## II. 2. 1. Oral Antikoagulanlar

Bu tür ilaçların hastaya uygulaması daha çok oral yolla olduğu için bu gibi ilaçlara oral antikoagulanlar denmektedir. Oral antikoagulanlar kimyasal yapılarına göre kumarin türevleri ve indandion türevleri olmak üzere ikiye ayrılırlar (Hirsch ve Fuster 1994).

### II. 2. 1. 1. Kumarin Türevi Antikoagulanların Keşfi ve Tarihçeleri

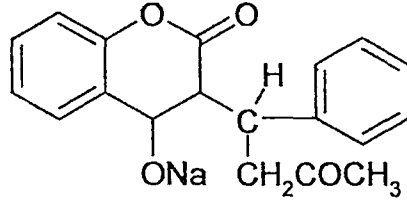
Geçen yüzyılın başlarında Dakota ve Kanada'da tatlı, hoş kokulu yoncalar ekildi, çünkü zayıf toprağın verimli olmasını sağlıyor ve hayvan yemi olarak kullanılıyordu. 1924'de Schofield, sığırlarda bozulmuş tatlı yoncaların yenmesinden dolayı oluşan, daha önceden tanımlanmamış kanamaya ait bozuklukları rapor etti. Roderick'in sebebin plazma protrombininin toksik düşüşü olduğunu bulmasından sonra Campbell ve Link 1939'da kanamaya yol açan ajanı 3-3'-metilen-bis-(4-hidroksikumarin) (dikumarol) olarak tanımlamıştır (Link, 1959, Goodman ve Limbrid 1990)

Dikumarol ilk olarak izole edilen ve klinik olarak kullanılan oral antikoagulandır. Fakat şimdi nadiren kullanılmaktadır çünkü yavaş ve düzensiz bir şekilde emilir ve sıklıkla gastrointestinal yan etkilere neden olur 25-50 mg'lık tabletler halinde vardır ve genelde günlük 25-200 mg'lık devam edilen dozaj verilir.



Şekil II.3 Dikumarolün Yapısı

1948'de yapı bakımından benzer ancak daha etkili bir sentetik ajan sentezlenmiştir. Bu bileşik warfarin olarak isimlendirilmiştir. İsim patentini elinde tutan Wisconsin Alumni Research Foundation kuruluşunun baş harfleri ve kumarin kökenli bir son ekten türemiştir.



Şekil II.4 Warfarinin Yapısı

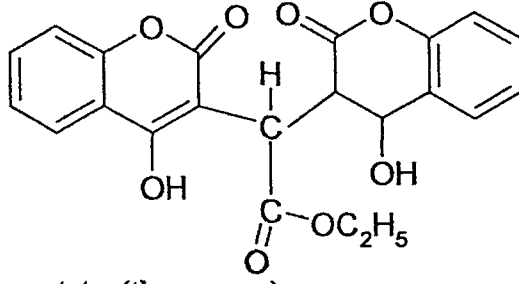
Warfarinin, tromboembolik hastalıklar için bir terapötik ajan olarak kullanımı gerçekleşmiş ancak geniş ölçüde kabul görmemişti. Bunun nedeni toksisite korkusuydu.

Ancak 1951'de bir askerin kemirici hayvanların kontrolü için yüksek dozda hazırlanan warfarinle intihara teşebbüs etmesi ve hayatta kalmasından sonra bu antikoagulanlar tromboembolik hastalıkların önlenmesi için başlıca dayanak olmuştur ve her yıl yüzbinlerce hastaya uygulanmaktadırlar (Link, 1959).

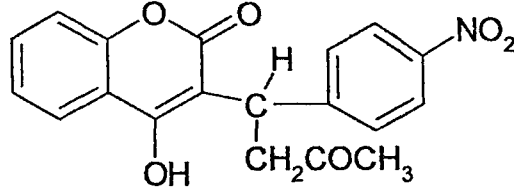
Warfarin oral antikoagulan prototipidir ve en fazla tavsiye edilendir Bununla birlikte bu sınıftaki bütün drogların antikoagulan etkileri benzerdir, farklılık genellikle kuvvetinde ve hareketin süresindedir.

Warfarin hemen hemen her zaman oral yoldan uygulanır. Gerçekte rodentisit olarak kullanılan warfarin çözeltisinin deri ile devamlı temasında kanama oluşur Bununla birlikte warfarin tabletlerinin farklı ticari preparasyonları farklı çözünme oranına sahiptir ve bu da absorpsiyon miktarı ve oranında bazı çeşitliliklere neden olur. Warfarin genellikle ağız yolu ile uygulanmasından sonra bir saat içinde plazmada tanımlanabilir ve sağlıklı gönüllülerde 90 dakikada maksimum kan düzeyine ulaşır. Warfarin hemen hemen tamamen plazma proteinlerine özellikle albumine bağlanır. Warfarin karaciğer ve böbreklerde inaktif metabolitlere çevrilir ve bunlar da idrar ve dışkı yoluyla vücuttan atılır. Yarı ömrü 36-42 saat arasındadır. Warfarin dikumarolden en az 10 ve muhtemelen 25 kat daha fazla etkilidir. Kuzey Amerika'da en yaygın olarak kullanılan oral antikoagulandır (Brummel ve diğ. 2001). Bununla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalar gerek sıçanlarda gerekse insanlarda warfarine kalıtsal olarak direnç gösteren örneklerin varlığını göstermektedir (Kohn ve Pelz 2000).

1948 ve 1952 yılları arasında özellikle Avrupadaki dikumarol'e benzer bir çok bileşik sentezlendi ve antikoagulan etkileri araştırıldı. Bunlardan biri Etilbis kumasetat (thromexane) dikumarolden daha hızlıdır ancak çok kısa yarı ömründen dolayı (2 saat) bölünmüş dozlar verilse dahi sabit bir antikoagülasyon etkisi elde etmek zor olduğundan nadiren kullanılır.



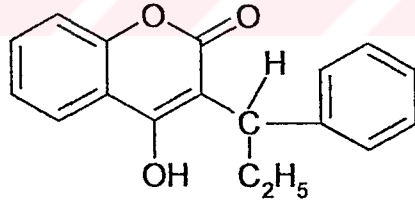
Şekil II.5 Etilbis kumasetatin (thromexane) yapısı.



Şekil II.6 Phenprocoumon'un (mercumar) Yapısı

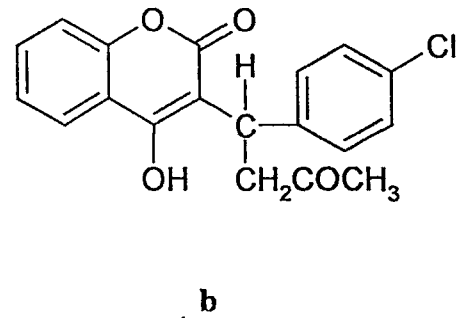
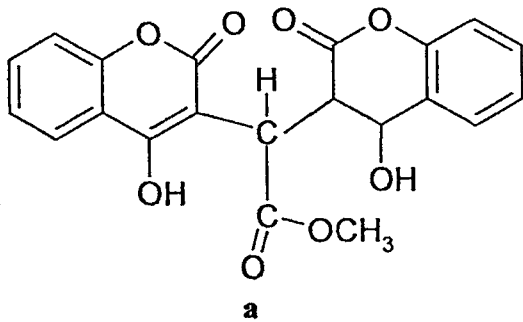
İkincisi phenprocoumon (mercumar) warfarinden daha uzun bir yarı ömre (5 gün) aynı zamanda daha uzun etki süresine sahiptir. (7-14 gün) Uygulanan günlük dozaj 0.75-6 mg'dir. Bununla beraber suda çözünebilen sodyum tuzu warfarine göre daha kararsızdır.

Acenocoumarol (Nicoumane, Sinthrome) daha kısa bir yarı ömre (10-24 saat) PT'de daha hızlı bir etkiye ve daha kısa bir etki süresine sahiptir (2 gün) Günlük devam edilen dozaj 1-8 mg'dır Bu ajanlar genel olarak ABD'de mevcut değildir ancak Avrupa'da ve diğer yerlerde doktorlar tarafından tavsiye edilebilirler.



Şekil II.7 Acenocoumarol (Nicoumane, Sinthrome)

Daha zayıf antikoagulant etki gösteren iki bileşik Coumetarol ve Coumachlor'dur.



Şekil II.8. a) Coumetarol ve b) Coumachlorun yapıları

## II.2.1.2. Kumarin ve İndandion Türevi Antikoagulanların Etki Mekanizması

Çok sayıdaki antikoagulan 4-hidroksikumarin ve akraba (bağlantılı) bileşik indan-1,3-dion türevleri olarak sentezlenmiştir. Kumarinler daha düşük kanama riski oluştururlar ve yalnızca kumarin türevleri yaygın olarak kullanılır. Kumarin türevleri için 3 pozisyonunda bir nonpolar karbon sübstitüenti ile 4-hidroksi kumarin kalıntısı aktivite için asgari yapısal gereksinimdir. Bu karbon Warfarinde (phenprocoumon ve acenocoumarol'de) asimetriktir. 3-sübstitüe-4-hidroksikumarin ve 2-sübstitüe-1,3-indandion vitamin K' ya çok benzer yapıdadır. Çalışmalar antikoagulan etkinin 3-pozisyonundaki substituent ile çok yakından ilgili olduğunu ortaya koymuştur. (Silverman, 1981). R formunun S formundan daha aktif olduğu gösterilmiştir.

Oral antikoagulanlar K vitamini antagonistleridir. Belirli glutamik asit kalıntıları (sayıca 9-12 arasında) indirgenmiş K vitaminini bir kofaktör olarak kullanan mikrozomal bir enzim sistemince karboksile edilmezse koagulasyon faktörleri II, VII, IX, ve X ve antikoagulan proteinler protein C ve protein S inaktiftir (Brummel ve diğ. 2001). Modifiye  $\gamma$ -karboksilglutamil kalıntıları, bu proteinlerin etkili bir katalitik kompleks olarak toplanabilmeleri için şart olan  $Ca^{2+}$ ya bağlanma özelliğini sağlar. Faktör II, VII, IX ve X ve protein C ve muhtemelen protein S başlıca karaciğerde sentezlenir. Gluktamikasitkarboksilaz muhtemelen kotranslasyonel olarak hareket eder ve K vitamini yetersizliği veya antagonist etki proteinlerin sentez hızını düşürür (Hampton ve Preston 1997).

Bir vitamin K epoksidaz, indirgenmiş vitamin K'yı yükseltger ve bu reaksiyon bir şekilde karboksilaz reaksiyonuna bağlıdır. Bazı farklı enzimlerde daha sonraki karboksilasyon reaksiyonlarını uygun hale getirecek şekilde *in vitro* vitamin K'yı indirgerler (Goodman ve Limbrid, 1990, Hirsch ve Fuster 1994).

Oral antikoagulanlar indirgenmiş K vitamini rejenerasyonunu engeller böylece fonksiyonel bir K vitamini eksikliği durumuna sebep olurlar.

Oral antikoagulanların dolaşımdaki tamamıyla karboksillenmiş moleküllerin aktivitesine bir etkisi yoktur. Böylece plazmada her bir faktörün aktivitesi için gerekli zaman terapi başladıktan sonra yeni bir kararlı hale ulaşır ki, bu da kendi klirens hızına bağlıdır. Warfarinin herhangi bir vitamin K bağımlı koagulasyon faktörü üzerinde ya da terapinin antitrombotik yararında ya da kanama riski için seçimli bir etkisi yoktur. Vitamin K bağımlı karboksilaz aktivitesi bir çok dokuda ve

Gla kalıntılarına sahip diğer proteinlerde meydana gelir. Kemikler bir grup düşük moleküler ağırlıklı vitamin K bağımlı proteinler içerir (osteokalsin kemik Gla protein, matriks Gla protein) Bu proteinlerin mineralizasyonda bir rol oynadıklarına inanılmaktadır. Gla kalıntıları içeren sürfaktan proteinler ayrıca tanımlanmışlardır ve bunların konsantrasyonları gelişmekte olan fetal akciğerdeki bir vitamin K bağımlı karboksilaz aktivitesi ile ilişkilidir (Berkner, 2000).

### **II.2.1.3. Oral Antikoagulanların Yan Etkileri**

Kanama oral antikoagulan ilaçlarının en önemli toksitesidir (Fondevila ve diğ. 2001, Fitzmaurice ve diğ. 2002, Ginsberg ve diğ. 2001). Özellikle ciddi vakalarda canlı yapıların baskılanması sonucu geri dönüşümü olmayan hasarlar sahip kısımlar oluşabilir veya hızlı bir şekilde teşhis edilemeyen aşırı iç kanamaların olduğu durumlar gözlenebilir. 50 yaşın üzerindeki ve uzun süreli oral antikoagulant alan hastalarda intraserebral veya subdural hematoma riski 10 kat artabilir (Hirsch ve Fuster 1994).

Sürekli veya ciddi kanamalar için Vitamin K<sub>1</sub> etkili bir antidottur (Fondevila ve diğ. 2001). Vitamin K'nın diğer sentetik türevleri oral antikoagulanların etkilerini tersine çevirmede daha az uygun bulunmuştur ve kullanılmamalıdır. Eğer derhal hemostatik güç gerekiyorsa Vitamin K bağımlı koagulasyon faktörlerinin uygun konsantrasyonu taze donmuş plazma nakli ile yeniden sağlanabilir (10-20ml/kg) Çoğu durumlarda vitamin K<sub>1</sub>'de plazmayla aynı zamanda verilmelidir (Wentzien ve diğ. 1998).

Hamilelik esnasında yapılan warfarin uygulaması düşüklere sebep verebilir. Oral antikoagulanlar gebelik esnasında kullanılmamalıdır (Ginsberg ve diğ. 2001).

Kumarinin başlattığı deri nekrozu, oral antikoagulant terapinin az rastlanan bir komplikasyonudur. İlk olarak 1943 yılında not edilmiştir. Bu sendrom tedavi başladıktan 3-10 gün sonra deri lezyonlarının görülmesiyle karakterize edilir. Deri lezyonlarının en yaygın olduğu bölge eller ve ayaklardır. Lezyonlar kılcal damarların yaygın trombozisi ile karakterize edilir ve hızlı bir şekilde yayılabilir, bazen nekrotik olur ve organ kesimini gerektirebilir.

Geri çevrilebilir, bazen acı verici; plantar yüzeyle ve ayak parmağı kenarlarının basınçla beyazlayan ve ayağın çekilmesiyle solan mavi izli renklenme kumarin antikoagulantları ile yapılan tedaviden 3-8 hafta sonra oluşabilir. Diğer

nadir reaksiyonlar alopesi, ürtiker, dermatit, ateş, bulantı, ishal, abdominal kramplar ve anoreksi'dir (Goodman ve Limbrid, 1990).

#### **II.2.1.4 Oral Antikoagulanların Kullanım Alanları**

Oral antikoagulanlar venöz tromboembolizm tedavisinde heparin ile birlikte kullanılırlar. Akut myokardial enfarktın antitrombotik tedavisinde warfarin ile birlikte trombolitik ajanların kalp fonksiyonlarının korunmasında ve ölüm oranının azaltılmasında faydalı olduğu yakın zamanlarda gösterilmiştir.

Her ne kadar bir kalp pıhtısının sistematik embolizasyonu klinik olarak sessizse de beyin damarlarında oluşan bir tıkanıklık sıklıkla harab edicidir. Bütün iskemik inmelerin %10-20'sinin emboli nedeniyle olduğuna inanılmaktadır. Her ne kadar embolik inmelerin klinik teşhisi güçse de tedavide heparin ve warfarin kullanılmalıdır (Hirsch ve Fuster 1994b).

Serebral embolizmlili hastaların %50'den fazlasında atrial fibrilleşme bulunur. Her ne kadar klinik yayınlar henüz bulunmasa da tirotoksik hastalara (atrial fibrilleşmeli) antikoagulan terapisi uygulanmalıdır (Hirsch ve diğ. 2001, Hirsch ve Fuster 1994a, Kalafut ve diğ. 2000).

Primer ve anoretik drog ile başlatılmış pulmoner hipertansiyon durumlarında da antikoagulan tedavinin uzun vadede faydalı olduğu gözlemlenmiştir (Frank ve diğ 1997)

Mekanik kalp kapakçıkları yerleştirilmiş hastalar ve valvular kalp rakatsızlıklarına sahip hastalarda da embolizmin önüne geçebilmek için antikoagulan tedavi gereklidir (Hardman ve Cowie 1999).

Ayrıca çeşitli kanser vakalarında antikoagulanların tedavi amaçlı kullanımları bildirilmiştir (Zacharski, 2002, Keller ve diğ. 2001). Kemoterapi tromboembolik rahatsızlık riskini arttırabilir ve antikoagulan tedavi bu gibi durumlara uygulanabilir (Letal ve Kuter, 1999)

### **II.3 LİGAND BAĞLANMA DENEMELERİ**

Canlı sistemlerde sıklıkla gerçekleşen olaylardan biri tek bir makromoleküle bir veya daha fazla molekülün kovalent olmayan bağlanmasıdır. Makromoleküle bağlanan molekül ligand olarak adlandırılır. Ligand genellikle küçük bir moleküldür

ancak düzenleyici bir proteinin DNA' ya bağlanmasında olduğu gibi ligand da büyük bir molekül olabilir.

Pek çok drogun serum albumin gibi proteinlerle bağlandığı bilinmektedir. Drog- protein bağlanması drogun farmokolojik etkisini, dağılımını, metabolizmasını ve atılımını etkiler. Bu bağlanmanın gerçekleştiği bölgeleri ve özelliklerini açığa çıkarmak önemlidir ( Tanaka ve diğ. 1988).

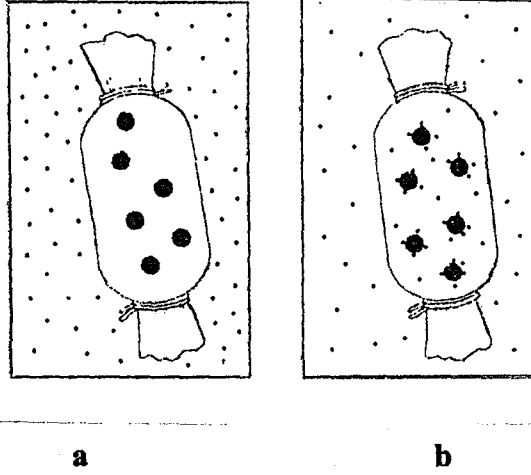
Kumarin türevi drogların (özellikle warfarinin) insan serum albuminine bağlanma bölgeleri ve bağlanmanın nitelikleri yayımlanmıştır (Maruyama ve diğ. 1984, Maruyama ve diğ. 1986, Larsen ve diğ. 1984).

### **II.3.1. Ligand Bağlanmasının İncelenmesi**

Ligand bağlanmasının incelenmesi için denge diyalizi ( Tanaka ve diğ. 1988, Diana ve diğ. 1989), ultrafiltrasyon (Fitos ve diğ. 1993), ultrasantrifügasyon (Matsushita ve diğ. 1987), spektral değişiklikler (Maruyama ve diğ. 1984), sedimentasyon değişimi gibi metodlar kullanılabilir. Metodun seçiminde bağlanmanın tek bir bölgeden olup olmadığı, bağlanmanın şiddeti, ligandın tayini için mevcut olan yöntemin niteliği önemlidir (Freifelder, 1982).

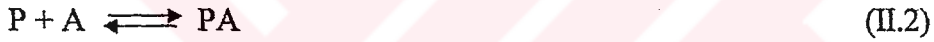
#### **II. 3. 1. 1. Denge diyalizi**

Denge diyalizi, diyaliz olabilir küçük bir molekül durumunda ve küçük molekülün tayini için bir deney yöntemi mevcut olduğunda küçük bir molekülün bir makromoleküle bağlanmasının araştırılmasında kullanılabilir. Denge diyalizinde makromolekülün bir çözeltisi diyaliz torbasının içine yerleştirilir. Diyaliz torbası daha sonra makromoleküle bağlanacak küçük molekülün bilinen konsantrasyonundaki bir çözeltisini içeren bir ortama konur. Küçük molekül daha sonra torbanın içine difüzyonlanır. Eğer hiçbir makromolekül mevcut olmasaydı torbanın içinde ve dışındaki konsantrasyon eşit olacaktı. Ancak makromolekül mevcut olduğundan torbanın içindeki konsantrasyon, dışındaki konsantrasyondan daha fazla olacaktır. Çünkü torbanın içindeki ve dışındaki bağlı olmayan moleküllerin konsantrasyonu denge halinde daima birbirine eşittir.



Şekil II.9 Denge Diyalizi a) Başlangıç anında, b) Denge halinde

P makromolekülünün A ligandı için tek bir bağlanma bölgesi olduğunu düşünelim. Dogunluğa erişildiğinde bir mol P bir mola A ile birleşip PA kompleksini oluşturacaktır.



P: Makromolekül, A: Ligand, PA: Makromolekül ile Ligandın oluşturduğu kompleks Bu durumda dissosiyasyon sabiti  $K_d$  şu şekilde tanımlanır;

$$K_d = \frac{[P] [A]}{[PA]} \quad (II.3)$$

[P]: toplam makromolekül konsantrasyonu, [A]: bağlı olmayan ligandın konsantrasyonu, [PA] oluşan kompleksin konsantrasyonu

Bir makromoleküle bağlanan ligandın mol sayısı r ile gösterilir ve şu şekilde tanımlanır.

$$r = \frac{[A]_{Bağlı}}{[P]_{Toplam}} = \frac{[PA]}{[P] + [PA]} \quad (II.4)$$

r: Makromolekül başına bağlanan ligandın oranı,  $[A]_{Bağlı}$ : Makromoleküle bağlı olan Ligand konsantrasyonu,  $[P]_{Toplam}$ : Toplan Makromolekül konsantrasyonu

Bağlı olmayan moleküllerin konsantrasyonu ( $[A]$ ) bu durumda diyaliz torbasının dışındaki ligandın konsantrasyonuyla ( $[A]_{dış}$ ) eşit olacaktır. Kompleksin konsantrasyonu ise ( $[PA]$ ) diyaliz torbasının içindeki ve dışındaki ligand konsantrasyonlarının farkına eşit olur; ( $[A]_{iç} - [A]_{dış}$ ). Eğer bağlanmamış makromolekülün konsantrasyonu ( $[P]$ ),  $[P]_{başlangıç} - [PA]$  şeklinde alınacak olursa r değeri şu şekilde ifade edilebilir (Freifelder, 1982).

$$r = \frac{[PA]}{[P]_{\text{başlangıç}}} = \frac{[A]}{K_d + [A]} \quad (\text{II.5})$$

$[P]_{\text{başlangıç}}$ : Başlangıçtaki makromolekül konsantrasyonu,  $K_d$ : Dissosiyasyon

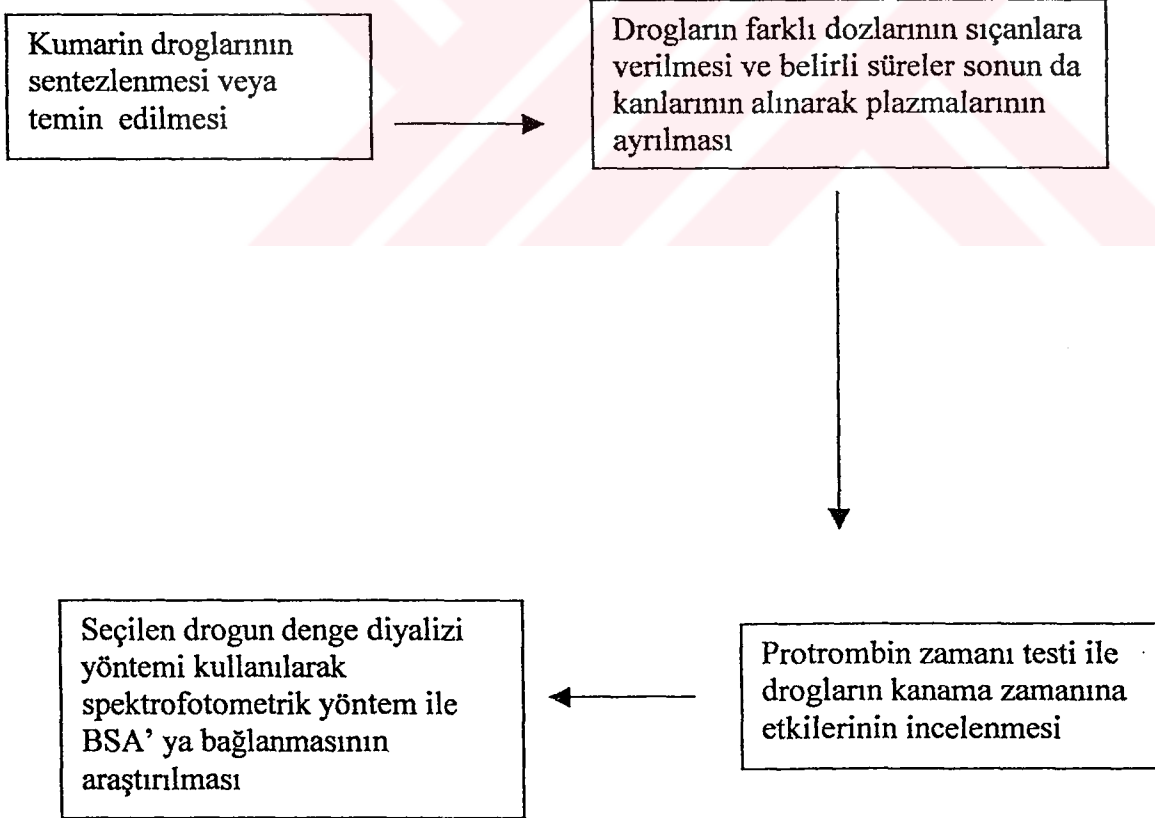
Sabiti



## BÖLÜM III

### TEZ ÇALIŞMASI

#### III.1. ARAŞTIRMA YÖNTEMİ



Şekil III.1 Tez Çalışmasında İzlenen Yöntemler

## III.2. ARAŞTIRMA ARAÇLARI

### III.2.1. Araştırmada Kullanılan Cihazlar

SPEKTROFOTOMETRE:	Shimadzu UV 1601 (Japonya)
SPEKTROFOTOMETRE KÜVETLERİ:	Helma (quartz, 1 ve 3 mL) (Japonya)
SANTRİFÜJ	Denley BS 400 Masaüstü (İngiltere)
SANTRİFÜJ ROTORLARI:	Sigma 12131H (20000 RPM) (A.B.D.) Sigma 12111 H (26000 RPM) (A.B.D.)
ÇALKALAYICILI SU BANYOSU:	Clifton Digital Shaker, 0-+100 °C (İngiltere)
TERMOSTATLI SU BANYOSU:	Heizbad 0-100 °C (İngiltere)
HASSAS TERAZİ:	Sartorius ± 0,0001 Dijital Analitik terazi (Almanya)
BUZ DOLABI:	Aygaz (Türkiye) Apelex PS 9009 TX (Fransa)
VORTEX KARIŞTIRICI:	Fisons Whirlimixer (İngiltere)
DİSTİLE SU CİHAZI:	Fistrem Cyclon (İngiltere)
MANYETİK KARIŞTIRICI:	Chiltren Isıtıcı HS 31 (İngiltere)
ETÜV	Genlab Midi/2/AL (0-100) (İngiltere)
OTOMATİK PİPET:	Volac Digital Micropipeter (İngiltere)
ERİME NOKTASI TAYİN CİHAZI	Gallenham (İngiltere)
VAKUM EVAPORATÖR	Buchi Waterbath B480 (Almanya)

### III.2.2. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar

**Sigma Firmasından Alınan Kimyasallar:** Sığır Serum Albumini (BSA), Diyaliz Membranları

**Merck Firmasından Alınan Kimyasallar:** Sodyum asetat, anilin, sodyum nitrit, benzen, metanol, asetik asid, asetik anhidrid, çinko, aseton, trisodyumsitrat, sodyum sülfit, sülfürik asid, TLC Aluminum sheets silika gel 60 F<sub>254</sub> , disodyum hidrojenfosfat, Potasyum dihidrojenfosfat

**Fluka Firmasından Alınan Kimyasallar:** 4-Hidroksikumarin

**Lachema Firmasından Alınan Kimyasallar:** Hidroklorik asid, petrol eteri

**Diagnostica-Stago Firmasından Alınan Kimyasallar:** Neoplastin CI Plus Protrombin zamanı tayin kiti: Reaktif 1; Taze tavşan serebral dokularından hazırlanmış liyofilize tromboplastin, Reaktif 2; Koruyucu olarak sodyum azid içeren kalsiyumlu solvent

**Riedel-de-Haen Firmasından Alınan Kimyasallar:** Etanol

### III.2.3. Hazırlanan özeltiler

**%10' luk HCl özeltisi:** %35'lik HCl çözeltisinden 69.44mL alınarak 250mL' lik bir balonjojeye kondu ve daha sonra damıtık su ile hacim 250mL' ye tamamlandı.

**pH7.4 Fosfat tamponu:** 1/15M (23.87g/L) Disodyum hidrojenfosfat ve 1/15M (9.072g/L) potasyum dihidrojenfosfat çözeltileri hazırlandı. Daha sonra 197mL potasyum dihidrojenfosfat özeltisi 1 Litrelik bir balonjojeye kondu ve disodyum hidrojen fosfat çözeltisi ile hacim tamamlandı.

**%10 Metanol içeren pH7.4 Fosfat tamponu:** 100mL metanol 1Litrelik bir balonjojeye kondu ve pH7.4 fosfat tamponu ile hacim tamamlandı.

**%3.8'lik Trisodyumsitrat özeltisi:** 3.8g trisodyumsitrat tartıldı ve 100 mL'lik bir balonjojeye konuldu saf su ile hacim tamamlandı.

**7.5 10<sup>-5</sup> M BSA özeltisi:** 0.0498g BSA tartıldı ve 10mL' lik bir balonjojede %10 metanol içeren pH7.4 fosfat tamponu ile hacim tamamlandı.

**4. 10<sup>-5</sup>M DHMK özeltisi:** 0.01072g DHMK tartıldı ve 1 Litrelik bir balojojeye konuldu. Daha sonra 100mL metanol eklendi ve bileşigin tamamen çözünmesini sağlamak için hızla karıştırıldı. Daha sonra hacim pH7.4 fosfat tamponu ile tamamlandı.

### III.2.4. Deneş Hayvanlarının Özellikleri ve Beslenmeleri

Çalışmamızda Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan laboratuvarları ve İstanbul Üniversitesi Deneşsel Tıp Araştırma Merkezi DETAM' dan temin edilen 34 adet 4-5 aylık dişi Sprague Dawley türü sıçan kullanıldı. Deneş Hayvanlarının beslenme ve su (musluk suyu) ihtiyaçlarının günlük olarak sağlandığı kontrollü laboratuvar şartlarında muhafaza edildi. Beslenmeleri için TURİNA yem fabrikasında (Lüleburgaz) üretilen içeriğı aşağıda belirtilen pellet tipi sıçan yemi kullanıldı.

Ham protein	(en az)	%17
Ham selüloz	(en çok)	%12
HCl' de Çözünmeyen kül	(en çok)	%10
Kalsiyum	(en az- en çok)	%1.0- 2.0
Fosfor	(en az)	%0.5
Sodyum	(en az- en çok)	%0.1-0.4
Sodyum Klorür	(en çok)	%0.6
Vitamin A	(en az)	7000IU/kg
Vitamin D <sub>3</sub>	(en az)	2000IU/kg
Vitamin B <sub>1</sub>	(en az)	5mg/kg
Vitamin B <sub>2</sub>	(en az)	3mg/kg
Vitamin B <sub>12</sub>	(en az)	15mg/kg
Niasin	(en az)	15mg/kg
Vitamin E	(en az)	55mg/kg
Sağladığı enerji		2600 kalori/kg

### III.2.5. Deneş Hayvanları İle Oluşturulan Gruplar

Sıçanlar sekiz gruba ayrıldı

Kontrol Grubu Drog uygulanmadı: 5 sıçan

Grup 1-) 3-amino-4-hidroksi kumarin (AHK) grubu 10mg/kg drog uygulandı 24 saat sonra kan alındı: 5 sıçan

Grup 2-) 3-amino-4-hidroksi kumarin grubu 20mg/kg drog uygulandı 24 saat sonra kan alındı: 5 sıçan

Grup 3-) 3-amino-4-hidroksi kumarin grubu 20mg/kg drog uygulandı 48 saat sonra kan alındı: 5 sıçan

Grup 4-) 7,8-dihidroksi-3(4-metilfenil)kumarin (DHMK) grubu 20mg/kg drog uygulandı 48 saat sonra kan alındı: 5 sıçan

Grup 5-) 7,8-dihidroksi-3(4-metilfenil)kumarin grubu 50mg/kg drog uygulandı 48 saat sonra kan alındı: 5 sıçan

Grup 6-) 5,7-dihidroksi-4-fenilkumarin (DHFk) grubu 20mg/kg drog uygulandı 48 saat sonra kan alındı: 5 sıçan

Grup 7-) 5,7-dihidroksi-4-fenilkumarin grubu 50mg/kg drog uygulandı 48 saat sonra kan alındı: 5 sıçan

### III.3. GENEL METODLAR

#### III.3.1. 3-Amino-4-Hidroksikumarinin Sentezi

##### III.3.1.1. 3-Fenilazo-4-Hidroksikumarin Sentezi

1.3575g (8.7719 mmol) 4-hidroksikumarin, 45mL etanolde çözüldü. Üzerine 7.5g sodyum asetat ve 5mL damıtık su eklendi. Karışım buz banyosunda tutuldu. Daha sonra 0.9g anilin (9.6639mmol), 10mL, buz banyosunda bekletilmiş soğuk su ve 4.2mL %35' lik HCl' de çözüldü. Bunun üzerine 0.66g sodyum nitritin 3,3mL damıtık sudaki çözeltisi yavaş yavaş, sıcaklık 0-5 °C arasında kalacak şekilde eklendi. Oluşan diazonyum tuzu 20 dakika boyunca, buz banyosunda bekletilen 4-hidroksikumarin çözeltisine damla damla eklendi. Dökme işlemi tamamlandığında 30 dakika boyunca buz banyosunda karıştırıldı. 50mL su eklendi ve adi süzgeç

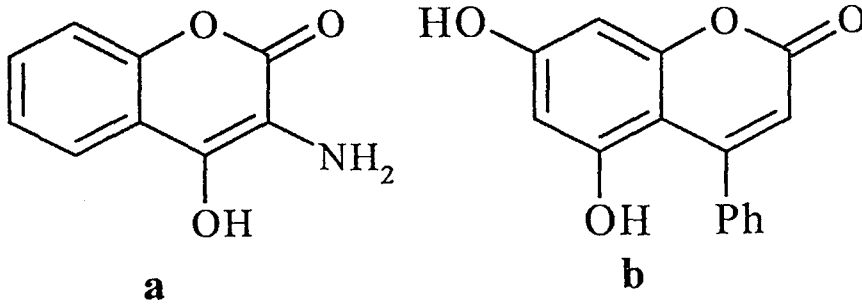
kağıdından süzüldü. Daha sonra çökelti bir kaç kez damıtık su ile yıkandı ve kurutulmaya bırakıldı. Daha sonra kurutulmuş üründen ve 4-hidroksikumarin bileşiğinden alınan örnekler metanolde çözüldü ve silika jel ile kaplanmış alüminyum tabakalar üzerine uygulandı ve durağan faz olarak 9:1 oranında benzen: metanol çözücü sisteminde yürütüldü. Oluşan lekeler UV 254nm'de incelendi ve sonuç tatmin edici olduğundan ikinci aşamaya geçildi.

### III.3.1.2. 3-Asetamido-4-Hidroksikumarin Sentezi

100mL' lik dibi yuvarlak bir reaksiyon balonuna 1.4155g 3-Fenilazo-4-hidroksikumarin konuldu ve üzerine 20mL asetik asid ve 2mL asetik anhidrid ilave edildi. Daha sonra 3g toz halinde Çinko kısımlar halinde eklendi ve bu esnada balon sürekli olarak su ile dışarıdan soğutuldu. Reaksiyon balonu 4 saat boyunca bir manyetik karıştırıcı ve magnet yardımı ile karıştırıldı ve belli sürelerle reaksiyon kabından örnek alınarak İnce Tabaka Kromatografisi yöntemi ile reaksiyonun gidişi incelendi. Madde süzgeç kağıdından süzüldü. Çökelti aseton ile tamamen çözüldü ve yine süzgeç kağıdından süzülerek çinko uzaklaştırıldı. Daha sonra vakum evaporatörde aseton uçuruldu. Elde edilen madde vakum desikatörde kurutuldu.

### III.3.1.3. 3-Amino-4-Hidroksikumarin Bileşiğinin Sentezi

Reaksiyon balonuna 20mL %10'luk HCl çözeltisi eklenerek 4-5 saat boyunca bir manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılarak ısıtıldı. Daha sonra oluşan madde süzgeç kağıdından süzüldü ve kurutuldu. Maddenin erime noktası tayin edildi. (Okumura, 1962)



Şekil III.2 a) 3-Amino-4-Hidroksikumarin ve b) 5,7-Dihidroksi-4-Fenilkumarin bileşiklerinin yapısı

### III.3.1.4. 5,7-Dihidroksi-4-Fenilkumarin Bileşiminin Sentezi

12.6g (0.1 mol) Floroglusinol ve 19.2g (0.1 mol) etil benzoil asetat karışımı 25 mL trifloroasetik asid ile birlikte 3 saat geri soğutucu altında 120°C' de karıştırılarak ısıtıldı. Reaksiyon sonunda karışım 30mL su içine döküldü. Çöken kütle filtre edildi. Elde edilen katı, su ile yıkandıktan sonra açık havada kurutuldu. Ham ürün metanolden kristallendirilip saflaştırıldı. Maddenin erime noktası tayin edildi. Bileşimin sentezi, bölümümüz Organik Anabilim dalında gerçekleştirilmiştir (Bozdağ, 2002).

### III.3.3.4 7,8-Dihidroksi-3-(4-metilfenil)kumarin Bileşiminin Sentezi

2,3,4-trimetoksibenzaldehid ile 4-metilfenilasetonitril, etanol ve %20 NaOH ortamında reaksiyona sokularak akrilonitril türevi elde edildi. Aha sonra elde edilen türev piridinhidroklorür ortamında 190°C' ye kadar ısıtıldı. Elde edilen 7,8-dihidroksi-3-(4-metilfenil)kumarin kristallendirilerek saflaştırılır. Bileşimin sentezi, bölümümüz Organik Anabilim dalında gerçekleştirilmiştir (Arslan, 1999).

## III.3.2. Deney Hayvanlarına Drogların Uygulanması

Deney hayvanları drogların uygulanmasında önce eter kullanılarak bayıltıldı daha sonra her bir sıçan tartılarak ağırlıklarına göre uygun dozda drog gavaj ile oral yolla uygulandı.

Tablo III.1 Deney hayvanlarına uygulanan droglar ve miktarları

DROG	Uygulanan Doz
3- amino-4- hidroksi kumarin	10mg/kg
	20 mg/kg
5,7-dihidroksi-3(4-metilfenil)kumarin	20mg/kg
	50mg/kg
7,8-dihidroksi-3-fenilkumarin	20mg/kg
	50 mg/kg
Kontrol	Uygulanmadı

## III.3.3 Deney Hayvanlarından Kan Örneklerinin Alınması

AHK uygulanan grupta uygulamadan 24 saat sonra sıçanlar eter ile bayıltılarak bir şırınga vasıtası ile kalpten 2mL kan alındı ve içinde ağırlıkça %3.8' lik trisodyum sitrat bulunan tüplere 9:1oranı sağlanacak şekilde eklendi. 2500 rpm'

de 10 dakika santrifüj edildikten sonra plazma bir otomatik pipet yardımıyla temiz bir cam tübe alındı ve beklemeksizin protrombin zamanı testi uygulandı.

Aynı hayvanlar 24 saat daha bekletildi ve bu sürenin sonunda yine eter ile bayıltılarak bir şırınga vasıtası ile kalpten 2mL kan alındı ve yukarıdaki işlemler tekrarlandı

DHMK ve DHFK uygulanan sıçanlardan uygulamadan 48 saat sonra eter ile bayıltılarak bir şırınga vasıtası ile kalpten 1mL kan alındı ve yukarıdaki işlemler tekrarlandı (Fasco ve Principe 1982).

### **III.3.4. Protrombin Zamanı Tayini**

Protrombin zamanı tayini Neoplastine CI Plus Protrombin zamanı tayin kiti kullanım kılavuzuna göre yapıldı.

Deney başlamadan 30 dakika önce Reaktif 1 ve Reaktif 2 şişeleri buzdolabından çıkarıldı ve oda sıcaklığına gelmeleri beklendi. Daha sonra bir şırınga yardımı ile reaktif 2 şişesi içindeki solvent reaktif 1 şişesine boşaltıldı ve hafifçe çalkalanarak homojen hale gelmesi sağlandı. Daha sonra reaktif bir cam tübe konarak deney süresince 37<sup>0</sup>C sıcaklığa ayarlanmış su banyosunda tutuldu. Kontrol grubu ve drog uygulanmış deney hayvanlarından alına plazma örneklerinden 0.1mL eşit ölçülerdeki cam tüplere konarak deney süresince 37<sup>0</sup>C sıcaklığa ayarlanmış su banyosunda tutuldu. Her bir hayvan için üç plazma örneği alındı. Daha sonra bir otomatik pipet yardımı ile içinde 0.1mL plazma bulunan tübe 0.2mL Reaktif 1 eklendi ve kronometre başlatıldı. Pıhtılaşma zamanı her bir plazma örneği için tayin edildi.

PT testi sonuçları ile ilgili istatistiksel çalışmalar Graph pad programı ile ve Tukey's çoklu kıyaslama yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi.

### **III.3.5. Denge Diyalizi Yöntemi**

#### **III.3.5.1 Diyaliz Membranlarının Hazırlanması**

Diyaliz membranlarını kullanıma hazır hale getirmek için membranlar 4 saat boyunca musluk suyu ile yıkandı. Daha sonra 80<sup>0</sup>C sıcaklıktaki %0.3' lük Sodyum sülfid çözeltisinde bir dakika bekletildi ve 60<sup>0</sup>C sıcaklıktaki saf suda 2 dakika bekletildikten sonra %0.2' lik Sülfirik asid çözeltisine daldırıldı. Tekrar 60<sup>0</sup>C

sıcaklıktaki su ile yıkandıktan sonra içinde saf su bulunan büyük bir behere konuldu ve buzdolabında saklandı.

### **III.3.5.2 DHMK Bileşiğinin Maksimum Absorbans Verdiği Dalga Boyunun Tayini**

2  $10^{-5}$ M DHMK çözeltisinin 190nm ve 445nm dalga boyu aralığında verdiği absorbans değerleri şahit olarak %10 metanol içeren pH7.4 fosfat tamponu kullanılarak ölçüldü. Değerler grafiğe geçirildi ve bileşiğin maksimum absorbans verdiği dalga boyu belirlendi.

### **III.3.5.3 DHMK Bileşiği İçin Ekstinksiyon Katsayısının Bulunması**

4  $10^{-5}$ M DHMK bileşiğinden seyreltme yolu ile 3  $10^{-5}$ M, 2  $10^{-5}$ M, 1  $10^{-5}$ M, 0.4  $10^{-5}$ M ve 0.2  $10^{-5}$ M konsantrasyonlarında DHMK çözeltileri hazırlandı ve spektrofotometrede bileşiğin maksimum absorbans verdiği 390nm dalga boyunda, şahit olarak %10 metanol içeren pH7.4 fosfat tamponu kullanılarak absorbans değerleri ölçüldü ve konsantrasyona karşı absorbans değerleri grafik ile gösterildi. Daha sonra grafiğin eğiminde ekstinksiyon katsayısı belirlendi.

### **III.3.5.4 Denge Diyalizi**

Hazırlanan diyaliz membranından 5cm boyunda iki adet diyaliz torbası kesildi. İki adet 40mL' lik beher diyaliz kabı olarak seçildi ve içlerine 30 mL 2.  $10^{-5}$  M DHMK çözeltisi konuldu. Diyaliz torbalarından birinin içine 7.5  $10^{-5}$ M BSA çözeltisinden 2mL eklendi ve her iki ucu da kapatılarak birinci diyaliz kabına konuldu. İkinci diyaliz membranının iç kısmına 2mL %10 metanollü pH7.4 tampon çözeltisi konuldu ve her iki ucu da kapatılarak ikinci diyaliz kabına yerleştirildi. Bu ikinci denemenin amacı diyaliz membranına spesifik olmayan bağlanma olup olmadığının bulunmasıdır. Daha sonra her iki diyaliz kabı da birer manyetik karıştırıcı yardımı ile oda sıcaklığında devamlı olarak karıştırıldı. 24 saat sonra her iki diyaliz membranının içindeki ve dışındaki çözeltilerin 390nm dalga boyunda verdiği absorbans değerleri bir spektrofotometre yardımı ile ölçüldü. Elde edilen değerlerden ekstinksiyon katsayısı kullanılarak her bir çözeltinin içerdiği DHMK konsantrasyonları hesaplanarak bağlanma oranı  $r$ , ve bağlanma sabiti değerleri hesaplandı.

# BÖLÜM IV

## SONUÇLAR

### IV.1. DROGLARIN ERİME NOKTASI TAYİNİ

Sentezlenen 3-amino-4-hidroksikumarin bileşiğinin erime noktası 226-228<sup>0</sup>C olarak belirlendi.

Bölümümüz Organik Anabilim dalında sentezlenen 7,8-dihidroksi-3-(4-metilfenil)kumarin ve 5,7-dihidroksi-4-fenil kumarin bileşiklerinin erime noktaları sırasıyla 255 <sup>0</sup>C ve 246<sup>0</sup>C' dir. (Bozdağ, 2002)

### IV.2 PROTROMBİN ZAMANI TESTİ SONUÇLARI

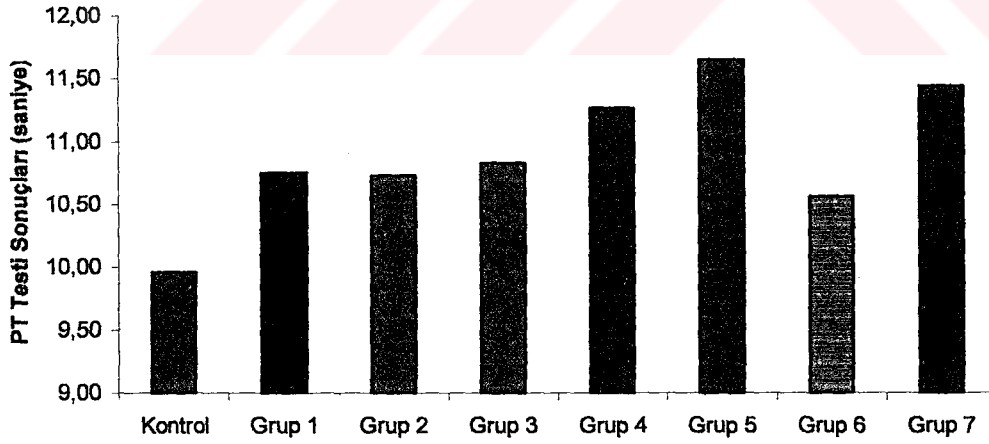
Tablo IV.1 Grup 1, grup 2, grup 3, grup 4, grup 5, grup 6, grup 7 ve kontrol grugrubunda protrombin zamanı testi sonuçlarının ortalama değerleri, Standart Sapma SD, Standart Hataları SE ve kontrol grubu ile karşılaştırılmaları (\*, Anlamlı )

Grup No	PT sonucu (saniye)	Standart Sapma SD	Standart Hata SE	P Değeri
Grup 1 n=5	10.58	0.13	0.06	P>0.05
Grup 2 n=4	10.73	0.67	0.33	P>0.05
Grup 3 n=4	10.83	0.51	0.25	P>0.05
Grup 4 n=5	11.27	0.25	0.11	P<0.01*
Grup 5 n=5	11.65	0.36	0.16	P<0.001*
Grup 6 n=5	10.56	0.15	0.07	P>0.05
Grup 7 n=5	11.44	0.70	0.32	P<0.001*
Kontrol n=5	09.96	0.33	0.17	-

**Tablo IV.2 Grupların PT sonuçlarının kendi aralarında karşılaştırılmaları**

Karşılaştırılan gruplar	P değeri	Karşılaştırılan gruplar	P değeri	Karşılaştırılan gruplar	P Değeri
Grup 1- Grup 2	P>0.05	Grup 2- Grup 6	P>0.05	Grup 5- Grup 6	P<0.01*
Grup 1- Grup 3	P>0.05	Grup 2- Grup 7	P>0.05	Grup 5- Grup 7	P>0.05
Grup 1- Grup 4	P>0.05	Grup 3- Grup 4	P>0.05	Grup 6- Grup 7	P>0.05
Grup 1- Grup 5	P<0.01*	Grup 3- Grup 5	P>0.05		
Grup 1- Grup 6	P>0.05	Grup 3- Grup 6	P>0.05		
Grup 1- Grup 7	P>0.05	Grup 3- Grup 7	P>0.05		
Grup 2- Grup 3	P>0.05	Grup 4- Grup 5	P>0.05		
Grup 2 - Grup 4	P>0.05	Grup 4- Grup 6	P>0.05		
Grup 2- Grup 5	P>0.05	Grup 4- Grup7	P>0.05		

Tablo IV. 1' e göre Protrombin Testi sonuçları şekil IV.1' de verilmiştir.

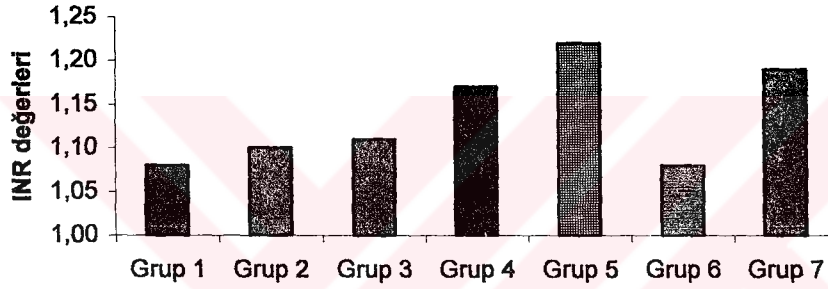


**Şekil IV.1 Grupların PT testi sonuçları**

Tablo IV.1' de gösterilen sonuçlardan elde edilen R ve INR değerleri aşağıda verilmiştir. Kullanılan Protrombin Zamanı kitini ISI değeri 1.26' dır.

**TabloIV.3 Grupların R ve INR değerleri.**

<b>Grup No</b>	<b>R Değeri</b>	<b>INR Değeri</b>
<b>Grup 1 n=5</b>	<b>1.06</b>	<b>1.08</b>
<b>Grup 2 n=4</b>	<b>1.08</b>	<b>1.10</b>
<b>Grup 3 n=4</b>	<b>1.09</b>	<b>1.11</b>
<b>Grup 4 n=5</b>	<b>1.13</b>	<b>1.17</b>
<b>Grup 5 n=5</b>	<b>1.17</b>	<b>1.22</b>
<b>Grup 6 n=5</b>	<b>1.06</b>	<b>1.08</b>
<b>Grup 7 n=5</b>	<b>1.15</b>	<b>1.19</b>



**Şekil IV. 2 Grupların INR değerleri**

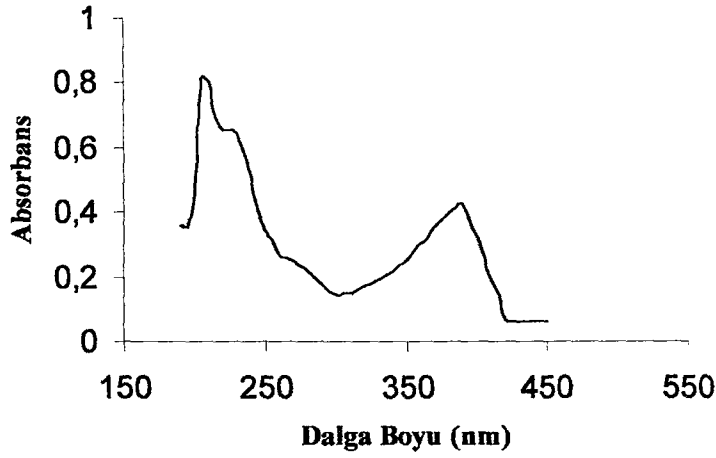
### **IV. 3. DENGE DİYALİZİ SONUÇLARI**

#### **IV. 3. 1 DHMK Bileşiğinin Maksimum Absorbans Verdiği Dalga Boyu**

2  $10^{-5}$  M DHMK çözeltisinin 190-450nm dalga boyları arasında yaptığı absorbans değerleri spektrofotometre ile ve şahit olarak %10 metanol içeren pH7.4 fosfat tamponu kullanılarak Tablo IV.4. 'de verilmiştir. Dalga boyuna karşı absorbans değerleri grafiği çizilerek grafikten maksimum absorbans yaptığı dalga boyu 390nm olarak bulunmuştur.

**Tablo IV.4 2.  $10^{-5}$ M DHMK bileşiminin dalga boyu (nm) ile absorbans değerlerinin değişimi**

Dalga Boyu	Absorbans	Dalga Boyu	Absorbans	Dalga Boyu	Absorbans	Dalga Boyu	Absorbans
190	0.360	255	0.312	320	0.171	385	0.414
195	0.350	260	0.267	325	0.179	390	0.425
200	0.470	265	0.259	330	0.189	395	0.370
205	0.813	270	0.248	335	0.201	400	0.329
210	0.803	275	0.235	340	0.215	405	0.259
215	0.692	280	0.219	345	0.232	410	0.193
220	0.656	285	0.197	350	0.252	415	0.139
225	0.656	290	0.173	355	0.275	420	0.067
230	0.639	295	0.153	360	0.300	425	0.061
235	0.589	300	0.144	365	0.324	430	0.061
240	0.507	305	0.146	370	0.350	435	0.060
245	0.407	310	0.151	375	0.375	440	0.061
250	0.340	315	0.161	380	0.396	445	0.061



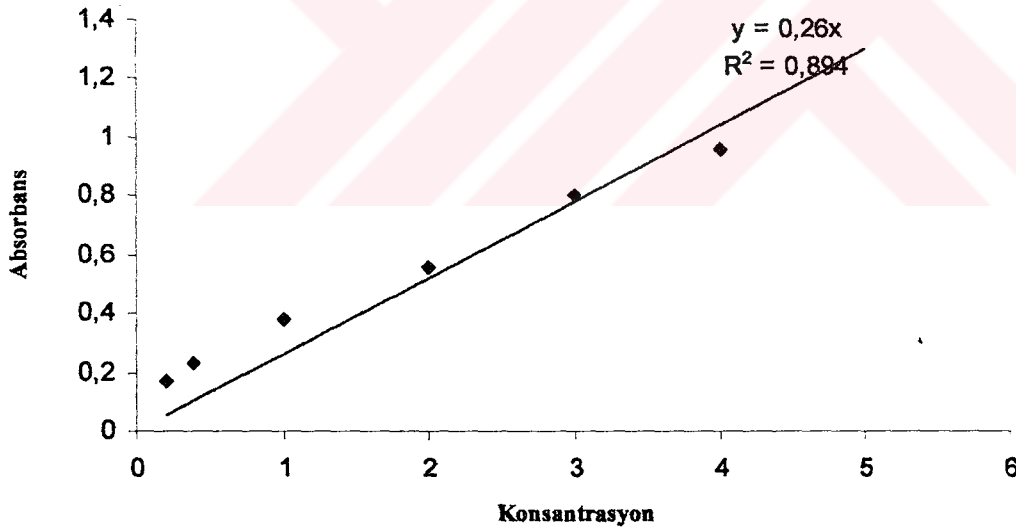
**Şekil IV.3 2.  $10^{-5}$ M DHMK bileşiminin değişen dalga boylarına karşı absorbansındaki değişikliği gösteren grafik.**

### IV.3.2 DHMK Bileşiminin Ekstinksiyon Katsayısı

4.10<sup>-5</sup>M DHMK bileşiminden seyreltme yolu ile hazırlanan 3.10<sup>-5</sup>M, 2.10<sup>-5</sup>M, 1.10<sup>-5</sup>M, 4.10<sup>-6</sup>M ve 2.10<sup>-6</sup>M konsantrasyonlarında DHMK çözeltilerinin spektrofotometrede bileşimin maksimum absorpsiyon verdiği 390nm dalga boyunda, şahit olarak %10 metanol içeren pH7.4 fosfat tamponu kullanılarak ölçülen absorpsiyon değerleri aşağıda TabloIV.5.' de verilmiştir.

Tablo IV.5 DHMK bileşiminin farklı konsantrasyonlarının 390nm dalga boyunda verdikleri absorpsiyon değerleri.

Konsantrasyon	390nm' de verdiği Absorpsiyon			Ortalama
4	0.960	0.939	0.968	0.956
3	0.803	0.812	0.800	0.805
2	0.546	0.577	0.539	0.554
1	0.388	0.368	0.377	0.378
0.4	0.229	0.242	0.230	0.234
0.2	0.168	0.179	0.155	0.167



Şekil IV.4 DHMK bileşiminin kalibrasyon eğrisi.

Doğrunun eğimi ekstinksiyon katsayısını ( $\epsilon$ ) verir. Eğer doğru denklemi;

$$y=mx+c \quad (IV.1)$$

m: Doğrunun eğimi, c:Doğrunun y eksenini kestiği nokta

şeklinde verilecek olursa, Şekil IV.2.' deki doğrunun denklemi

$$y=26000x \quad (IV.2)$$

olduğundan doğrunun eğimi 26000 olur bu da ekstinksiyon katsayısına eşittir. Lambert-Beer kanununda

$$\text{Abs} = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (\text{IV.3})$$

Abs: Absorbans,  $\epsilon$ : Ekstinksiyon katsayısı, c: Konsantrasyon, l: Işın yolunun uzunluğu (1cm)

Olduğuna göre ekstinksiyon katsayısı ve absorbans değerlerinden konsantrasyon değerleri bulunabilir.

**Tablo IV.8 Diyaliz Kabındaki çözeltilerin konsantrasyonu**

	Absorbans	Konsantrasyon
I. Diyaliz Kabı İç	1.875	$7.21 \cdot 10^{-5} \text{M}$
I. Diyaliz Kabı Dış	0.402	$1.55 \cdot 10^{-5} \text{M}$
II. Diyaliz Kabı İç	0.522	$2.01 \cdot 10^{-5} \text{M}$
II. Diyaliz Kabı Dış	0.478	$1.84 \cdot 10^{-5} \text{M}$

### **IV.3.3 DHMK Bileşiğinin BSA ile Bağlanmasındaki bazı Parametreler**

Eğer  $[P]_{\text{iç}} = 7.21 \cdot 10^{-5} \text{M}$  ve  $[P]_{\text{dış}} = 1.55 \cdot 10^{-5} \text{M}$  ve başlangıç makromolekül konsantrasyonu  $[P]_{\text{başlangıç}} = 7.5 \cdot 10^{-5} \text{M}$  alınacak olursa BSA molekülü başına bağlanan DHMK bileşiğinin oranı, (r) denklem II.5' den 0.754 olarak bulunur.

Yine  $[A] = [P]_{\text{dış}} = 1.55 \cdot 10^{-5} \text{M}$  olarak alınacak olursa dissosiyasyon sabiti denklem II.5' den  $5.05 \cdot 10^{-6} \text{M}^{-1}$  olarak bulunur. Denge sabiti veya bağlanma sabiti ise  $1.81 \cdot 10^5$  olur.

## BÖLÜM V

### TARTIŞMA VE DEĞERLENDİRME

Kumarin türevi oral antikoagulanlar tüm dünyada elli yılı aşkın bir süredir tromboembolik rahatsızlıkların önlenmesinde ve tedavisinde kullanılmaktadırlar. Günümüzde etkili ve kontrollü bir antikoagulasyon sağlayan bir bileşiğe ihtiyaç halen sürmektedir (Pancras ve diğ. 2000).

Bu çalışmada çeşitli hidroksi kumarin türevlerinin pıhtılaşma zamanı üzerine etkileri *in vivo* olarak incelenmiştir. Kumarinler etkilerini K vitamini çevrimini inhibe ederek gösterirler. Bu engelleme sonucu K vitamini bağımlı pıhtılaşma faktörlerinin (protrombin, faktör VII, IX, ve X ile protein C ve S) translasyon sonrası karboksilasyonları gerçekleşmez ve inaktif moleküller oluşur. Faktör VII, X ve V protrombin ve fibrinojene duyarlı olduğundan kumarin türevi antikoagulanların takibinde PT testi kullanılır (Brummel ve diğ. 2001).

Çalışmamızda, 3-amino-4-hidroksi kumarin bileşiği sentezlenmiştir ve erime noktası 226-228 °C olarak bulunmuştur. Bu değer literatür ile uyum içindedir (Okumura, 1962). 5,7-dihidroksi-4-fenilkumarin ve 7,8-dihidroksi-3-(4-metilfenil) kumarin bileşikleri Bölümümüzde Organik Kimya Anabilim Dalında sentezlenmiştir.

Her üç bileşiğin belirli dozları (deney hayvanının ağırlığının kilogramı başına 10mg, 20mg ve 50mg) oral yolla ve gavaj ile uygulanmıştır. Daha sonra 24 ve 48 saat sonra ilaç uygulanan ve sağlıklı kontrol grubundaki sıçanlarının kalbinden bir şırınga vasıtası ile kan alınmış ve bu kandan ayrılan plazmada PT testi uygulanmıştır. PT testinin sonuçları saniye olarak ölçülmüştür. Tukey's çoklu kıyaslama testi kullanılarak yapılan istatistiklerde DHMK bileşiğinin PT değerinde en yüksek, anlamlı artışın bulunduğu gözlemlenmiştir. Ancak tüm dünyada standardizasyonu sağlamak amacı ile Uluslararası Tromboz ve Hemostaz komitesi

PT testi sonuçlarının INR değeri olarak belirtilmesini istediğinden sonuçlar kullandığımız deney kitine ait ISI değeri kullanılarak, INR değeri şeklinde hesaplanmıştır. Bileşiğin INR değeri 20mg/kg dozda, 24 saat sonra 1.17, 50mg/kg dozda 48 saat sonra 1.22 olarak bulunmuştur. Diğer bileşikler içinse INR değerleri AHK, 10mg/kg dozda 24 saat sonra 1.08; AHK 20mg/kg dozda 24 saat sonra 1.10; AHK 20mg/kg dozda 48 saat sonra 1.11; DHMK 20mg/kg dozda 48 saat sonra 1.17; DHMK 50mg/kg dozda 48 saat sonra 1.22; DHFK 20mg/kg dozda 48 saat sonra 1.08 ve DHFK 50mg/kg dozda 48 saat sonra 1.19 olarak bulunmuştur. 0.8 ile 1.2 arasındaki değerler normal olarak kabul edildiğinden (Tunalı, 2002) bu bileşiklerin hiçbiri şu anda kullanılmakta olan warfarin gibi bileşiklerinin yerini alacak etkiye sahip değildir. Ancak DHMK bileşiği sınırın biraz üstünde bir etki göstermektedir, bu nedenle kumarin halkasında yapılacak bazı modifikasyonlarla örneğin 4 pozisyonuna takılacak bir hidroksil grubu ile yüksek INR değerleri elde edilebilir.

Pek çok drog serum albumin gibi proteinlere bağlanır. Drog- protein bağlanması drogun farmokolojik etkisini, dağılımını, metabolizmasını ve atılımını etkiler. Bu bağlanmanın gerçekleştiği bölgeleri ve özelliklerini açığa çıkarmak önemlidir (Tanaka ve diğ. 1988). Çalışmamızda en yüksek INR değerini elde ettiğimiz DHMK bileşiğinin Sığır Serum Albuminine bağlanma oranı Denge Diyalizi yöntemi ile araştırılmıştır. Denge diyalizi yöntemi eğer küçük molekül (burada DHMK) diyaliz olabilir boyutta ise ve küçük molekül için bir analiz yöntemi mevcut ise kullanışlı bir yöntemdir. Kumarinin BSA'ya bağlanma oranı,  $r$ , 0.75 olarak bulunmuştur. Bu da bileşiğin yaklaşık olarak bire bir oranda BSA'ya bağlandığını göstermektedir. Bağlanmanın denge sabiti  $1.81 \cdot 10^5$  M olarak hesaplanmıştır. Kumarin türevi antikoagulanların Serum Albumine bağlanma sabitleri genellikle  $10^4$ - $10^6$  M mertebesinde olduğundan sınırlar içinde kalmaktadır (Diana ve diğ. 1989)

## KAYNAKLAR

- [1] Arslan, A: "Bazı Kumarin Türevlerinin Sentezi ve Elektrokimyasal Davranışı", Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, (1999) 30-31.
- [2] Benzakour, O.; Kanthou C.: "The Anticoagulant Factor, Protein S is Produced by Cultured Human Vascular Smooth Muscle Cells and Its Expression is Up-regulated by thrombin", *Blood*, 95, 6 (2000) 2008-2013.
- [3] Berkner, K. L.: "The Vitamin K Dependent Carboxylase", *Journal of Nutrition*, 130 (2000) 1877-1880.
- [4] Bozdağ, M.: "Kumarin Türevi Polieter Sülfon Sentezi", Yüksek Lisans Tezi Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye (2002) 51
- [5] Bristol J. A.; Furie, B. C.; Furie, B.: "Propeptide Processing during Factor IX Biosynthesis", *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 10 (1992) 7577-7584.
- [6] Bristol, J. A.; Ratcliff, J. V., Roth, D. A.; Jacobs, M. A.; Furie, B. C.; Furie, B.: "Biosynthesis of Prothrombin: Intracellular Localization of the Vitamin K-Dependent Carboxylase and the Sites of  $\gamma$ - Carboxylation", *Blood*, 88, 7 (1996) 2585-2593.
- [7] Brummel, K. E.; Paradis, S. G.; Branda, R. F.; Mann, K. G.: "Oral Anticoagulation Thresholds", *Circulation*, 104 (2001) 2311-2317.
- [8] Cain, D.; Hutson, S. M.; Wallin, R.: "Assembly of the Warfarin-sensitive Vitamin K 2,3-Epoxy Reductase Enzyme Complex in the Endoplasmic Retikulum Membrane", *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 46 (1997) 29068-29075.
- [9] Chu, K.; Wu, S.; Stanley, T., Stafford, D. W.; High, K. A.: "A Mutation in the Propeptide of Factor IX Leads to Warfarin Sensitivity by A Novel Mechanism", *Journal of Clinical Investigations*, 98, 7 (1996) 1619-1625.
- [10] Cote, H. C. F.; Lord, S. T.; Pratt, K. P.: " $\gamma$ -Chain Dysfibrinogenemias: Molecular structure-Function Relationships of Naturally Occuring Mutations in the  $\gamma$  Chain of Human Fibrinogen", *Blood*, 92, 7 (1998) 2195-2212.
- [11] Fasco, M. J.; Principe, L. M.: "R- and S- Warfarin Inhibition of Vitamin K and Vitamin K 2,3- Epoxy Reductase Activities in the Rat" 257, 9 (1982) 4894- 4901.
- [12] Fay, W. P.; Eitzman, D. T.; Shapiro, A. D.; Madisson, E. L.; Ginsburg, D.: "Platelets Inhibit Fibrinolysis In Vitro by Both Plasminogen Activator Inhibitor I Dependent and Independent Mechanism", *Blood*, 83, 2 (1994) 351-356.
- [13] Fitzmaurice, D. A.; Blann, D. A.; Lip, G. Y. H.: "Bleeding Risks of Antithrombotic Therapy", *BMJ*, 325 (2002) 828-831.

- [14] Fondevila C. G.; Grosso, S. H.; Santarelli M. T.; de Tezanos Pinto M.: "Reversal of Excessive Oral Anticoagulation with a Low Oral Dose of Vitamin K<sub>1</sub> Compared with Acenocoumarine Discountation. A Prospective Randomized Open Study", *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 12 (2001) 9-16.
- [15] Frank, H.; Mlczoch, J.; Huber, K., Schuster, E.; Gurtner, H. P.; Kneusll, M.: "The Effect of Anticoagulant Therapy in Primary and Anorectic Drug-Induced Pulmonary Hypertension", *Chest*, 112 (1997) 714-721.
- [16] Furie, B.; Bouchard, B. A.; Furie, B. C.: "Vitamin K dependent Biosynthesis of  $\gamma$ -Carboxyglutamic Acid", *Blood*, 93, 6 (1999) 1798-1808.
- [17] Ginsberg, A. J.; Crowther, M. A.; White R. H. Ortel, T. L.: "Anticoagulation Therapy", *Hematology*, (2001) 339-357
- [18] Goddman, L. S.; Limbrid, E. L.: *Pharmacological Basis of the Theurapeutics*, Mc Graw-Hill Prof. Publishing, (1990) 1317-1331.
- [19] Silverman, R. B.: "Model Studies for a Molecular Mechanism of Action of oral Anticoagulants", *Journal of American Chemical Society*, 103 (1981) 3910-3915
- [20] Manolov, I.; Danchev, N. D.: "Synthesis, Toxicological and Pharmacological Assesment of Some 4-Hydroxycoumarin derivatives", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 30 (1995) 531-535
- [21] Tanaka, M.; Asahi, Y.; Masuda, S.; Ota, T.: "Interaction Between Drugs and Water Soluble Polymers I ", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36, 12 (1988) 4645-4651.
- [22] Herve, F.; Rajkowski, K. M.; Martin, M. T.; Dessen, P.; Cittanova, N.; "Drug Binding Properties of Rat  $\alpha$ -foetoprotein", *Biochem. J.* 239 (1986) 451-458
- [23] Maruyama, K.; Harada, S.; Nishigori, H.; Iwatsuru, H.: "Classification of Drugs on the Basis of Bilurubin-Displacing Effect on HSA", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 32 (1984) 2414-2420.
- [24] Maruyama, K.; Awazu, S.; Nishigori, H.; Iwatsuru, M.: "Effects of Fatty Acid on the Spesifik Drug Binding Sites of HSA", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 34 (1986) 3394-3402.
- [25] Fitos, I., Vısy, J.; Simoncsitst, A.: "Binding Studies with Recombinant HSA obtained by Expression of a Synthetic Gene in Yeast", *Biochemical Pharmacology*, 46, 7 (1993) 1159- 1163.
- [26] Diana, F. J., Veronich, K.; Kapoor, A. L.: "Binding of Non-steroidal Anti-inflammatory Agents and Their Effect on Binding of Rasemic Warfarin and Its Enantiomers to HSA", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78, 3 (1989) 195-199.
- [27] Matsushita, Y.; Kijima, Y., Morıguchi, I.: "Comparasion of Binding Characteristics of Human and Bovine Serum Albumins with Benzoats over a Wide Range of Concentration", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 35, 6 (1987) 2589-2593.
- [28] Larsen, F. G.; Larsen, C. G.; Jakobsen, P.; Brodersen, R.; "Interaction of Warfarin with HSA", *Molecular Pharmacology*, 27 (1984) 263-270
- [29] Freifelder, D.: "Physical Biochemistry", W. H. Freeman and Company, New York, U.S.A., ( 1982) 655-681.
- [30] Hirsch, J.; Fuster, V.; "Guide to Anticoagulant Therapy Part II: Oral Anticoagulants", *Circulation*, 89 (1994)b 1469-1480.

- [31] Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W.: "Plasma Proteins, Immunoglobulins and Blood Coagulation", In *Harper's Biochemistry*, Appleton and Lange New Jersey U.S.A (1990) 665-680
- [32] Lee, G. R.; Bithel, T. C.; Foerster, J.; Athens, J. W.; Lukens, J. N.: "Platelets, Haemostasis and Blood Coagulation", In *Wintrobe's Clinical Haematology*", Lea and Febiger press. London U. K. (1993) 511-566
- [33] Gresele, P.; Momi, S.; Berettini, M.; Nenci, G. G.; Schwarz, H. P.; Semeraro, R.; Colucci, M.: "Activated Human Protein C Prevents Thrombin- Induced Thromboembolism in Mice", *Journal of Clinical Investigations* 101, 3 (1998) 667-676.
- [34] Hampton, K. K.; Preston, F. E.: "ABC of Clinical Haematology: Bleeding Disorders Thrombosis and Anticoagulation", *BMJ*, 314 (1997) 1026-1030.
- [35] Hartman, M. C.; Cowie, M. R.: "Anticoagulation in Heart Disease", *BMJ*, 318 (1999) 238-244.
- [36] Hirsch, J.; Anand, S. S.; Halperin, J. L.; Fuster, V.: "Guide to Anticoagulant Therapy: Heparin", *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 21 (2001) 9-33.
- [37] Hirsch, J.; Fuster, V.: "Guide to Anticoagulant Therapy: Part I Heparin", *Circulation*, 89 (1994)a 1449-1468.
- [38] Huber, P.; Schmitz, T.; Griffin, J.; Jacobs, M.; Walsch, C.; Furie, B; Furie, B. C.: "Identification of Amino Acids in the  $\gamma$ -Carboxylation Recognition Site on the Propeptide of Prothrombin", *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 21 (1990) 12467-12473.
- [39] Isermann, B.; Hendrickson, S. B.; Zogg, M.; Wing, M.; Cumiskey M.; Kisanuki Y. Y.; Yanagisawa, M.; Weiler, H.: "Endothelium Specific Loss of Murine Thrombomodulin Disrupts thr Protein C Anticoagulan Pathway and Causes Juvenile-onset Thrombosis", *Journal of Clinical Investigations*, 108 (2001) 537-546.
- [40] Kalafut, M. A.; Gandhi, R.; Kidwell, C. S.; Saver, C. L.: "Safety and Cost of LMWH as Bridging Anticoagulant Therapy in Subacute Cerebral Ischemia" *Stroke*, Nov. (2000) 2563-2568.
- [41] Keller, T.; Salge, U.; Konig, H; Dodt, J.; Heiden, M.; Seitz, R.: "Tissue Factor is the Only Activator of coagulation in Cuktered Human Lung Cancer Cells", *Lung Cancer*, 31 (2001) 171-179.
- [42] Khrenov, A. V.; Ananyeva, N. M.; Griffin, J. H.; Saenko, E. L.: "Coagulation Pathways in Atherothrombosis", *Trends in Cardiovascular Medicine*, 12 (2002) 317-324.
- [43] Kohn, M. H.; Pelz, H.: "A Gene Anchored Map Position of the Rat Warfarin Resistance Locus, *Rw*, and Its Orthologs in Mice and Humans", *Blood*, 96 (2000) 1996-1998.
- [44] Letal, A.; Kuter, D. J.: "Cancer, Coagulation and Anticoagulation", *The Oncologist*, 4 (1999) 443-449.
- [45] Link, K. P.: "The Discovery of Dicumarol and Its Sequels", *Circulation*, 19 (1957) 97-107.
- [46] Marquette, A. K.; Pittman D. D.; Kaufmann, R. J.: "A 110-Amino Acid within the A1-domain of Coagulation Factor VIII Inhibits Secretion from Mammalian Cells", *The Journal of Biochemistry*, 270, 17 (1995) 10297-10303.
- [47] Morris, P. D.; Soute, B. A. M.; Vermeer C.; Stafford, D. W.: "Characterization of the Purified Vitamin K-Dependent  $\gamma$ - Glutamyl

- Carboxylase”, *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 12 (1993) 8735-8742
- [48] Okumura K.: *Chemical Abstracts Japan P.* 59 (1962) 4874
- [49] Pancras, C. W.; Quan, M. L.; Earl, J.; Watson, A. J.; Wexler, R. R.; Knabb, R. M.: “Nonpeptide Factor Xa Inhibitors: I. Studies with SF303 and SK549, a New Class of Potent Antithrombotics”, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292 (2000) 351-357.
- [50] Rand, M. D.; Hanson, S. R., Mann, K. G.: “Factor V Turnover in a Primate Model”, *Blood*, 86, 7 (1995) 2615-2623.
- [51] Saenko, E. L.; Scandella, D.: “A Mechanism for Inhibition of Factor VIII Binding to Phospholipid by von Willebrand Factor”, *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 23 (1995) 13826-13833.
- [52] Sugiura, I.; Furie, B.; Walsh, C. T.; Furie, B. C.: “Profactor IX Propeptide and Glutamate Substrate Binding Sites on the Vitamin K-Dependent Carboxylase Identified by Site-directed Mutagenesis”, *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 30 (1996) 17837-17844.
- [53] Tunalı, T.: “Çeşitli Dokulardan Elde Edilen Tromboplastin İle Oluşturulan Yaygın Damar İçi Pıhtılaşmasında Koagülasyon Testlerinin İncelenmesi ve Bazı İlaçların Bu Klinik Tabloya Etkisinin Değerlendirilmesi”, *Doktora Tezi*, Marmara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, (2002) 9-23.
- [54] Veklich, Y. I.; Gorkun, O. V.; Medved, L. V.; Nieuwenhuzien, W.; Weisel, J. W.: “Carboxyl-terminal Portions of the  $\alpha$  Chains of Fibrinogen and Fibrin”, *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 18 (1993) 13577-13585.
- [55] Wentzien, T. H.; O’Reilly, R. A.; Kearns, P. J.: “Prospective Evaluation of Anticoagulant Reversal with Oral Vitamin K<sub>1</sub> While Continuing warfarin Therapy Unchanged”, *Chest*, 114 (1998) 1546-1550.
- [56] Wu, S.; Stafford, D. W.; Frazier, D.; Fu, Y.; High, K. A.; Chu, K.; Sanchez-Vega, B.; Solera, J.: “Genomic Sequence and Transcription Start site for the Human  $\gamma$ -Glutamyl Carboxylase”, *Blood*, 89, 11 (1997) 4058-4062.
- [57] Zacharski L. R.: “Aticoagulants in Cancer Treatment: Malignancy as a Solid Phase Coagulopathy”, *Cancer Letters*, 186 (2002) 1-9.

## **ÖZGEÇMİŞ**

04/ 01/ 1977' de İstanbul'da doğdum. Orta öğrenimimi 1994 yılında Vefa Lisesi'nde, lisans eğitimimi 2000 yılında Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde tamamladım. 2000-2003 yıllar arasında Yüksek Lisans eğitimimi de Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yaptım. 2000 yılı aralık ayından bu yana Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktayım.

**Özkan DANIŞ**

