

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ÇOCUK HEMATOLOJİSİ BİLİM DALI

SİYANOTİK KALP HASTALIKLI ÇOCUKLARDA
TROMBİN TARAFINDAN AKTİVE EDİLEBİLEN
FİBRİNOLİZ İNHİBİTÖRÜ (TAFİ) DÜZEYİ

Çocuk Hematolojisi Yan Dal Uzmanlık Tezi

Dr. Şebnem Yılmaz

İZMİR – 2010

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ÇOCUK HEMATOLOJİSİ BİLİM DALI

SİYANOTİK KALP HASTALIKLI ÇOCUKLARDA
TROMBİN TARAFINDAN AKTİVE EDİLEBİLEN
FİBRİNOLİZ İNHİBİTÖRÜ (TAFİ) DÜZEYİ

Çocuk Hematolojisi Yan Dal Uzmanlık Tezi

Dr. Şebnem Yılmaz

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

Prof. Dr. Gülersu İrken

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 2004.KB.SAĞ.001 sayı

ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Çocuk Hematolojisi yan dal uzmanlık eğitimimde bilgi ve deneyimlerinden çok faydalandığım, hematolojiyi çok sevmeme neden olan Çocuk Hematolojisi Bilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Gülersu İrken, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hale Ören başta olmak üzere tüm hocalarıma, Çocuk Hematolojisi Yan Dal Eğitimim boyunca birlikte çalıştığım sevgili arkadaşlarıma, Dr. Behçet Uz Çocuk Hastanesi'nden tez olgularının bulunmasına ve kan örneklerinin alınmasına yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Vedide Tavlı ve Sayın Uzm. Dr. Türkay Sarıtaş'a, Çocuk Kardiyolojisi Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gül Sağın Saylam'a, plazma örneklerinin ayrılmasında yardımcı olan ve TAFİ düzeylerini titizlikle çalışan Sayın Tıbbi Biyolog Faize Yüksel ve diğer hematoloji laboratuvarı çalışanlarına sonuz teşekkür ederim.

Dr. Şebnem YILMAZ

Mart 2010

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER.....	I
TABLO LİSTESİ.....	III
ŞEKİL LİSTESİ.....	IV
KISALTMALAR.....	V
TÜRKÇE VE İNGİLİZCE ÖZET.....	VII
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. KONJENİTAL SİYANOTİK KALP HASTALIĞINDA GÖRÜLEN KOAGÜLASYON BOZUKLUKLARI.....	2
2.1.1. Polistemi.....	2
2.1.2. Trombositopeni.....	4
2.1.3. Yaygın Damar İçi Pıhtılaşması.....	4
2.1.4. Primer Fibrinoliz.....	5
2.1.5. Koagülasyon Faktörlerinin Yapım Bozukluğu.....	5
2.1.6. Konjenital Siyanotik Kalp Hastalıklı Olgularda Hemostatik Bozukluklar için Laboratuvar Testleri.....	6
2.2. KOAGÜLASYON SİSTEMİ.....	7
2.3. FİBRİNOLİTİK SİSTEM.....	9
2.3.1. Temel Komponentlerin Protein Yapıları.....	11
2.3.2. Plazminin Alfa2-antiplazmin Tarafından İnhibisyon Mekanizması.....	12
2.3.3. Doku Plazminojen Aktivatörünün Etki Mekanizması.....	13

2.3.3.1.	Fibrin Varlığında.....	13
2.3.3.2.	Hücre Yüzeyinde.....	13
2.3.4.	Ürokinaz Plazminojen Aktivatörünün Etki Mekanizması.....	14
2.3.4.1.	Fibrin Varlığında.....	14
2.3.4.2.	Hücre Yüzeyinde.....	14
2.3.5.	Plazminojen Aktivatörlerinin İnhibisyon Mekanizması.....	15
2.3.6.	Matriks Metalloproteazlar Tarafından Hücre İlişkili Proteolitik Aktivitenin Düzenlenmesi.....	15
2.4.	DOĞAL ANTİKOAGÜLAN SİSTEM.....	16
2.5.	TROMBİN İLE AKTİVE EDİLEBİLEN FİBRİNOLİZ AKTİVATÖRÜ (TAFİ).....	17
2.5.1.	Özellikleri.....	18
2.5.2.	Moleküler Genetiği.....	22
2.5.3.	Hastalıklardaki Rolü.....	24
3.	OLGULAR ve YÖNTEM.....	26
3.1.	Kan Örneklerinin Toplanması.....	26
3.2.	Plazma TAFİ Düzeyinin Ölçülmesi.....	27
3.2.1.	Testin Prensibi.....	27
3.2.2.	Kullanılan Reaktif Araç ve Materyaller.....	27
3.2.3.	Plazma TAFİ Düzeyi Çalışma Yöntemi.....	28
3.3.	İstatistiksel Değerlendirme.....	29
4.	BULGULAR.....	30
5.	TARTIŞMA.....	35
6.	SONUÇLAR.....	38
7.	KAYNAKLAR.....	39

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo I: Fibrinolitik Sistemin Temel Yapıtaşlarının Özellikleri.....	16
Tablo II: Protrombin Zamanı ve Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı için Yaşa Göre Normal Değerler.....	26
Tablo III: Çalışma Gruplarının Yaş ve Cinsine Göre Dağılımları.....	31
Tablo VI: Çalışma Gruplarının Laboratuvar Bulgularının Karşılaştırılması.....	32
Tablo V: Şanlı ve Şantsız Siyanotik Kalp Hastalıklı Olguların Laboratuvar Bulgularının Karşılaştırılması.....	32

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1: Kan koagülasyon kaskadı.....	9
Şekil 2: Fibrinolitik sistem.....	10
Şekil 3: TAFİ'nin kristal yapısı.....	19
Şekil 4: Kan koagülasyon modeli.....	21
Şekil 5: Siyanotik kalp hastalıklı olgular ve sağlıklı kontrol olgularında plazma TAFİ düzeyi.....	33
Şekil 6: Eritrositozu olan ve olmayan siyanotik kalp hastalıklı olgularda plazma TAFİ Düzeyi.	34

KISALTMALAR

TAFİ: Trombin tarafından aktive edilebilen fibrinoliz inhibitörü

KSKH: Konjenital siyanotik kalp hastalığı

vWF: von Willebrand faktör

HMWK: Yüksek molekül ağırlıklı kininojen

TFPI: Doku faktörü yolu inhibitörü

t-PA: Doku plazminojen aktivatörü

uPA: Ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü

PAI-1 ve PAI-2: Plazminojen aktivatör inhibitörleri 1 ve 2

MMP: Matriks metalloproteazlar

TF: Doku faktörü

AT: Antitrombin

APC: Aktive protein C

CPN: Karboksipeptidaz N

YDİP: Yaygın damar içi pıhtılaşması

KSKH: Konjenital siyanotik kalp hastalığı

EACA: ε-aminokaproik asit

PZ: Protrombin zamanı

PTZ: Parsiyel tromboplastin zamanı

aPTZ: Aktive parsiyel tromboplastin zamanı

TMB: Tetrametil benzidin

BTŞ: Blalock-Taussig şant

TA: Triküspit atrezisi

PS: Pulmoner stenoz

PDA: Patent duktus arteriozus

MAPKA: Majör aortikopulmoner kollateral arter

PA: Pulmoner atrezi

BAT: Büyük arter transpozisyonu

VSD: Ventriküler septal defekt

ÖZET

SİYANOTİK KALP HASTALIKLI ÇOCUKLARDA TROMBİN TARAFINDAN AKTİVE EDİLEBİLEN FİBRİNOLİZ İNHİBİTÖRÜ (TAFİ) DÜZEYİ

Giriş: Trombin tarafından aktive edilebilen fibrinoliz inhibitörü (TAFİ) karboksipeptidaz benzeri bir proenzimdir. Aktive TAFİ, fibrin yüzeyinden lizin artıklarını ortadan kaldırarak doku plazminojen aktivatörüne bağımlı fibrinolizi inhibe eder. Konjenital kalp hastalıklı çocuklarda, özellikle siyanotik kalp hastalığı olanlarda tromboz veya kanamaya eğilim şeklinde çeşitli koagülasyon bozuklukları görülmektedir. Daha önceki çalışmalarda bunların nedenine yönelik çok sayıda araştırma yapılmış ve farklı mekanizmaların rol oynadığı bildirilmiştir.

Amaç: TAFİ'nin fibrinolizi durdurmadaki rolü nedeniyle siyanotik kalp hastalıklı çocuklarda hemostaza olan etkisinin araştırılmasıdır.

Hastalar ve Yöntem: Çalışmaya Şubat 2005 - Haziran 2006 arasında Dr. Behçet Uz Çocuk Hastanesi Kardiyoloji Bölümü ve Dokuz Eylül Üniversitesi Pediyatrik Kardiyoloji Bilim Dalına başvuran 58 siyanotik kalp hastalıklı çocuk (ortanca yaş 2 yıl, ortalama yaş $3,1\pm 3,41$, 0-16 yaş) ve Dokuz Eylül Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları polikliniklerine başvuran 51 sağlıklı çocuk (ortanca yaş 2 yıl, ortalama yaş $2,39\pm 2,24$, 0-12 yaş) alındı. Olguların tümünde TAFİ antijen düzeyi ELISA ile ölçüldü.

Sonuç: Yaş ve cins açısından iki grup arasında anlamlı fark yoktu. Siyanotik kalp hastalıklı grupta kontrol grubuna göre hemoglobin, hematokrit ve eritrosit sayısı anlamlı olarak yüksek bulundu. TAFİ antijen düzeyi siyanotik kalp hastalıklı çocuklarda $6,54\pm 1,24$ µg/mL, kontrol grubunda ise $6,03\pm 1,54$ µg/mL idi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,06$). Siyanotik kalp hastalıklı gruptaki olguların 22'sinde (%37,9) eritrositoz vardı (hematokrit >45). Siyanotik kalp hastalıklı grubu eritrositozun olup olmamasına göre iki gruba ayırdığımızda TAFİ antijen düzeyi eritrositozu olan grupta olmayan gruba göre anlamlı olarak düşük bulundu, sırasıyla $6,03\pm 1,31$ µg/mL (3,69-7,82) ve $6,86\pm 1,09$ µg/mL (5,04-9,48) ($p=0,031$).

Tartışma: Bu çalışmada, fibrinolitik sistemin yetersiz inhibisyonunun kanamaya eğilime olan katkısı TAFİ antijen düzeyi ölçümü ile araştırıldı. Ancak sadece polistemisi olan olgularda TAFİ antijen düzeyi düşük saptandı. Siyanotik konjenital kalp hastalıklı olguların polistemik olanlarının özellikle cerrahi girişimler sırasında ve sonrasında daha çok kanadığı

bilinmektedir. Bu nedenle TAFİ düzeyindeki düşüklüğün bu hastalarda klinik olarak gözlenebilen kanamaya eğilimin bir nedeni olabileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Konjenital siyanotik kalp hastalığı, trombin tarafından aktive edilebilen fibrinoliz inhibitörü, fibrinoliz, polistemi.

SUMMARY

THROMBIN ACTIVATABLE FIBRINOLYSIS INHIBITOR (TAFI) IN PEDIATRIC CYANOTIC HEART DISEASE

Introduction: Thrombin activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) is a proenzyme that is similar to the thrombin activable carboxypeptidase. The activated TAFI inhibits plasminogen activator dependent fibrinolysis through elimination of the lysine residues from the fibrin surface. Predisposition to diverse coagulation disorders including thrombosis and bleeding occurs in children with congenital heart diseases, particularly cases with cyanotic congenital heart diseases. Many investigations have been done about the reasons of this circumstance, and different mechanisms have been reported that to play a role.

Aim: Considering the role of TAFI in down-regulation of fibrinolysis, we have investigated whether TAFI contributes to impaired fibrinolysis in patients with cyanotic heart disease.

Patients and Methods: Between February 2005 and June 2006, fifty-eight patients with CCHD followed by the Departments of Pediatric Cardiology at Dr. Behçet Uz Children Hospital and Dokuz Eylul University Hospital and 51 healthy children from Dokuz Eylul University Hospital were included in this study. The median age was 2 years, and the mean age was 3.1 ± 3.41 (range 0-16 years) in the group of CCHD patients; median age was 2 years, and mean age was 2.39 ± 2.24 (range 0-12 years) in the control group. TAFI antigen was determined using an ELISA kit.

Results: There were no differences in age and sex between CCHD group and control group. Hemoglobin, hematocrit, red blood cell count was higher in the CCHD group. TAFI antigen level was found as 6.54 ± 1.24 $\mu\text{g/mL}$ in the CCHD group, and 6.03 ± 1.54 $\mu\text{g/mL}$ in the control group. A statistically significant difference was not found between TAFI antigen levels of two groups ($p>0.05$). Among the patients with CCHD 22 patients (37.9%) has erythrocytosis (hematocrit $>45\%$), and when the CCHD group was divided according to the presence of erythrocytosis, TAFI antigen level was found to be lower than the group without erythrocytosis, 6.03 ± 1.31 $\mu\text{g/mL}$ (range 3.69-7.82) and 6.86 ± 1.09 $\mu\text{g/mL}$, (range 5.04-9.48) respectively ($p=0.031$).

Discussion: In this study we investigated the relationship of the TAFI antigen level and the contribution of the insufficient inhibition of the fibrinolytic system to the bleeding tendency. However we detected low TAFI antigen levels only in polycythemic cases. It is known that

patients with congenital cyanotic heart diseases and polycythemia have more hemorrhage especially during and/or after surgical procedure. For this reason we thought that low levels of the TAFI may be one of the reasons of the tendency to bleeding in such cases.

Key Words: Congenital cyanotic heart disease, thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, fibrinolysis, polycythemia.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Konjenital siyanotik kalp hastalıklı ve buna ikincil polistemisi olan hastalarda koagülasyon bozuklukları sık görülür. Bu bozukluklar özellikle cerrahi girişimler sırasında ve sonrasında yaşamı tehdit edebilir. Koagülopatilerin kesin mekanizması tam açık değildir. Ancak polisteminin derecesinin koagülopatinin ağırlığıyla ilişkili olduğu bilinmektedir (1).

Bu hasta grubunda koagülopatide primer fibrinolizin rol oynayabileceği düşünülmüş ve öglobulin lizis zamanında kısalma ve ϵ -aminokaproik asit (EACA) ile düzeltilebilen bozukluk saptanmıştır (2). Ancak günümüze kadar fibrinolizin bu hastalardaki koagülopatiyeye katkısı çok iyi araştırılmamıştır.

TAFİ karaciğerde sentezlenen bir karboksipeptidaz benzeri bir proenzimdir. Trombin veya plazmin ile aktive olan TAFİ fibrinolizi baskılar. Trombin-trombomodulin kompleksi TAFİ'nin fizyolojik aktivatörüdür (3).

Erişkinlerde çok çeşitli hastalıklarda TAFİ'deki değişikliklerin araştırılmasına rağmen çocukluk çağında bu konuda yapılmış araştırmalar sınırlıdır.

Bu çalışmada siyanotik konjenital kalp hastalığında fibrinolizdeki değişiklikler ve fibrinoliz inhibitörü olan TAFİ antijeninin rolünün araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KONJENİTAL SİYANOTİK KALP HASTALIĞINDA GÖRÜLEN KOAGÜLASYON BOZUKLUKLARI

Konjenital siyanotik kalp hastalıklı (KSKH) ve buna sekonder polistemisi olan hastalar koagülasyon bozuklukları geliştirme açısından risk altındadırlar. Bu hastalarda çeşitli koagülasyon bozuklukları bildirilmiştir (2,4-12). Yenidoğan dönemi veya daha sonraki dönemlerde kalpteki konjenital lezyonların cerrahi olarak tam düzeltilmesi uzun süreli kardiyopulmoner bypass ve çok sayıda ekstrakardiyak sutürün uygulandığı karmaşık tamirler gerektirir. Koagülopatiler de hastaların kanamasına ve perioperatif transfüzyon gereksiniminin artmasına neden olabilir (13). Palyatif veya ilk düzeltici cerrahi girişimden sonra tekrarlayan cerrahi girişimler gerekebilir. Bazen primer cerrahi erişkin döneminde de yapılabilir. Kardiyopulmoner bypass'ın uygulandığı, kardiyak cerrahiden sonra aşırı kanamanın önlenmesi cerrahi sonrası prognozu iyileştirmek için çok önemlidir.

KSKH'lı hastalarda görülen kanama diyatezi 50 yıldan fazla bir süredir bilinmektedir (14,15). Kanama diyatezinin polisteminin yol açtığı hiperviskozite, trombositopeni, trombosit fonksiyon bozuklukları, yaygın damar içi pıhtılaşması (YDİP), koagülasyon faktörlerinin yapımının azalması, karaciğer fonksiyon bozukluğu, K vitamini eksikliği, primer fibrinolyze bağlı olabileceği bildirilmektedir (16). Hemostatik bozuklukların ağırlığının polisteminin derecesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (17).

2.1.1. Polistemi

KSKH'de gözlenen eritrosit kitlesi artışı Fallot tetralojisi, pulmoner atrezi, büyük arter transpozisyonu ve triküspit atrezisi gibi sağdan sola şantın olduğu çeşitli konjenital lezyonlarda sistemik arteriyel oksijen saturasyonundaki oluşan düşüklük nedeniyle gelişen iyi bilinen fizyolojik bir yanittir. Doku oksijenasyonu kardiyak output, eritrositler akciğerlerden geçerken oksijenin ulaşılabilirliği, oksijenin hemoglobin molekülüne affinitesi (hemoglobinin yapısı, pH ve 2.3-difosfogliserat düzeylerinden etkilenir) ve arteriyel oksijen basıncı gibi birçok fizyolojik değişkene bağlıdır, ancak hemoglobin miktarı kritik öneme sahiptir. Eritrositoz yetersiz doku oksijenasyonunu kompanse etmeye yönelik bir uyum yanıtıdır. Uygunsuz veya aşırı eritrositik yanıt zararlı olabilir, ancak klinisyenler arasında uygun eritrositik yanıt için genel olarak kabul edilen bir tanımlama bulunmamaktadır. Hipoksemi derecesine göre beklenen hemoglobin değeri iyi bilinmemektedir (18).

Azalmış doku oksijenasyonu (arteryel hipoksemi) böbrekten eritropoetin salınımını uyarır ve bunun sonucunda eritrosit kitlesinde izole bir artış meydana gelir. Eritrosit kitlesinde ve hemoglobin konsantrasyonunda yeterli artış olduğunda serum eritropoetin düzeyleri normale dönüyorsa eritrositoz denkleştirici olarak değerlendirilir. Ancak bazen artmış bir yanıt gözlenebilir. Bu şekildeki bir yanıt doku oksijenasyonunun ancak bir yere kadar iyileşebildiği, büyük sağdan sola şant nedeniyle böbrekten eritropoetin salınımının devam ettiği ve hematokritin daha da yükseldiği durumlarda, kan viskozitesinin giderek artması ile dokuya oksijen salınımının daha da azalmasıyla ortaya çıkar (19). Dengeye ulaşamadığı için, eritropoetin sekresyonundaki ve eritrosit kitlesindeki artış olası zararlı etkilerine rağmen devam edebilir (20). Bu durum dekompanse eritrositoz olarak tanımlanır. Aortik oksijen saturasyonunun <%75 olması sıklıkla eritropoetin yüksekliği ile ilişkilidir. Bu kritik saturasyon düzeyinin altında birçok hastanın yeterli eritrositik yanıtı oluşturamadığı düşünülmektedir (21,22).

Normal bikonkav eritrosit esnektir, membranın belirgin şekil değiştirebilme yeteneği (deformability) vardır. Demir eksikliği eritrositlerin bikonkav disklerden mikrosferositlere dönüşmesine neden olur, ki bunlar göreceli olarak şekil değiştirebilme özelliklerini kaybetmiştir. Mikrodolaşımda kapiller çap eritrosit çapından (8 µm) daha küçüktür, bu durum kapillerler düzeyinde viskozitenin daha büyük damarlardakinden daha düşük olmasına neden olur (23). Eritrositlerin fizyolojik şekil değiştirebilme yeteneği kan akımının düzenli olabilmesi için şarttır. Mikrositik hipokromik demir eksikliği eritrositlerinde ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonundaki azalmaya bağlı olarak oksijen taşıma kapasitesi daha düşüktür ve deformabiliteleri de azdır. Eritrositler şekil değiştirme özelliğini kaybetmişse hematokriti %70 olan bir tam kanın viskozitesinin şekil değiştirebilen eritrositlere göre 10 ila 100 kat daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir (24).

Demir eksikliği anemisi KSKH'lı çocuklarda sıktır. Baş ağrısı, halsizlik, baş dönmesi, görme bozuklukları, parestezi, irritabilite, miyalji, mental işlevde azalma ve anoreksi gibi hiperviskozite belirtileri demir eksikliği olanlarda daha düşük hematokrit düzeyinde ortaya çıkar (25). Artmış viskozite nedeniyle demir eksikliği ve polistemi doku perfüzyonunu ciddi olarak etkileyebilir. Siyanotik çocuklarda demir eksikliği genellikle diyetdeki demirin eksikliğine, erişkinlerde ise sık flebotomi, tekrarlayan hemoptizi, epistaksis ve kadınlarda menoraji gibi nedenlere bağlıdır.

Yaşla birlikte hemoglobin konsantrasyonundaki artışın kronik hipoksemi varlığından etkilenmediği gösterilmiştir. KSKH'lı olgularda yaş hemoglobin konsantrasyonunu doğrudan

etkiler (18). Hastanın yaşı arttıkça, kan viskozitesi artar, bu da sistemik oksijen transportunun daha da azalmasına neden olur.

2.1.2. Trombositopeni

Trombosit sayısı ve hematokrit düzeyleri ters orantılı görünmektedir. Polistemi ile ilişkili olarak trombosit sayılarında hafif ($100.000-150.000/\text{mm}^3$), bazen de $50.000/\text{mm}^3$ gibi ağır azalma bildirilmiştir (4-8,19). Onyedinci siyanotik kalp hastalıklı çocuk ile yapılan bir çalışmada 13'ünde trombositopeni ($150.000/\text{mm}^3$ 'ün altında trombosit sayısı) saptandığı bildirilmiştir. Ancak bu çalışmada trombosit sayısı ve kanama zamanı arasında ilişki saptanmamıştır ve bu nedenle hastalarda trombosit fonksiyon bozukluğunun olabileceği düşünülmüştür (22). KSKH'lı çocuklarda trombosit fonksiyon bozukluğunun görüldüğü ve konjenital kalp defekti için yapılan düzeltici cerrahiden sonra düzeldiği bazı çalışmalarda bildirilmiştir (26-28). Bu çalışmalarda trombosit salınım bozukluğunun (anormal epinefrin konsantrasyonu, adenozin 5' difosfat veya azalmış kollajen agregasyonu) ve düşük protrombin düzeylerinin temel hemostatik defektler olduğu ve polisteminin ağırlığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (29).

2.1.3. Yaygın Damar İçi Pıhtılaşması

KSKH'ndaki polistemi artmış eritrosit kitlesi ve dolaşımdaki tam kan hacminin normal olması ile karakterizedir. Artmış eritrosit kitlesi viskoziteyi yükseltir, bu da kan akımını ve doku perfüzyonunu etkiler (30). Oluşan vasküler staz bu hastalarda fibrin ve trombosit trombüslerinin damar içinde yaygın depozisyonuna eğilim yaratır. Bu durumda da trombositler ve fibrin oluşumunda yer alan koagülasyon faktörleri (fibrinojen, faktör V ve VIII) dolaşımdan tüketilip ve hemostatik zayıflık ortaya çıkabilir. Bu olaya yaygın damar içi pıhtılaşması (YDİP) denir. Dolaşan kan hipokoagüabl hale gelir ve hastada kanama riski artar. Eritrositozu olan KSKH'lı olgularda belirgin trombositopeni, fibrinojen ve protrombin düzeyinde azalma Hartmann tarafından bildirilmiştir (15). Sonraki çalışmalarda KSKH'lı olgularda trombositopeni ve düşük faktör düzeyleri ile YDİP olduğu düşünülmüştür (11,12,31). Bu bildirilerdeki anormallikler ağır YDİP'den çok hafif dereceli veya lokalize bir YDİP'yi düşündürmektedir. Pulmoner mikrodolaşımın lokalize YDİP'nin başlıca alanı olduğu düşünülmektedir. Bazı çalışmalarda heparin uygulanmasından sonra faktör düzeylerinde görülen artış bu olgulardaki damar içi tüketimi desteklemektedir (11,12).

KSKH'lı olgulardaki kanamalar koagülasyon faktörlerinin tüketimi ile açıklanabilir. Trombozun sık görülmesi eritrositlerin stazı ve artmış intravasküler koagülasyonun

etkileşimine bağlıdır. Sonuçta ortaya çıkan YDİP bu hastalarda tromboz ve kanamanın sık görülmesini açıklar.

Bazı çalışmalar bu hasta grubunda YDİP varlığını kanıtlayamamıştır (32,33).

Polistemi plazma miktarını azaltır, bu nedenle tüpteki antikoagülan uygun miktara indirilmelidir (17). Kan örnekleri normal olarak 1 kısım antikoagülan, 9 kısım tam kan olacak şekilde alınır. Koagülasyon testleri için 0,25 mL 3,8'lik trisodyum sitrata eklenmesi gereken kan hacmi şu formülle hesaplanabilir: mL olarak hacim= $2,25 \times (100 - \text{normal hematokrit} / 100 - \text{hastanın hematokriti})$ (11).

2.1.4. Primer Fibrinoliz

KSKH'lı olgularda koagülasyon anormalliklerinin primer fibrinoliz ile açıklanabileceği düşünülmüştür. Brodsky ve ark. 1969'da 6 hastada kısa öglobulin lizis zamanına dayanarak bir antifibrinolitik olarak ϵ -aminokaproik asit verilerek düzeltilebilen primer fibrinoliz göstermişlerdir (2). Bir başka çalışmada da KSKH'deki primer fibrinolizin EACA ile tedavisinin önemi gösterilmiştir (34).

2.1.5. Koagülasyon Faktörlerini Yapım Bozukluğu

Koagülasyon faktörlerinin çoğu karaciğerde yapılmaktadır. Birçok faktör (II, VII, IX, X) karaciğerde sentez edilir, önce inaktif formlarda bulunur, aktif forma dönüşmek için K vitaminine gereksinim duyar (35). K vitamini intestinal flora tarafından yeterli miktarda üretilir ve normal safra salınımı varsa emilir. Azalmış yapım veya emilime bağlı K vitamini eksikliği faktör II, VII, IX ve X aktivitesinin bozulmasına neden olabilir. Karaciğer fonksiyonu bozulduğunda karaciğerde yapılan tüm koagülasyon faktörlerinin aktivitesi zayıflar ve oluşan koagülasyon defekti büyük ihtimalle K vitamini tedavisine yanıt vermez. Karaciğer fonksiyonlarının normal olduğu durumda faktör V, VIII ve XIII aktiviteleri normaldir ve K vitamini tedavisi kan koagülasyonunu düzeltebilir. Onbeş çocuğun değerlendirildiği bir çalışmada çoğu olguda koagülasyon faktörlerinin aktivitesinin intramüsküler K vitamini ile arttığı, ama oral K vitamini ile artmadığı gösterilmiştir, bu da ince barsaklardan emilimin bozukluğuna işaret etmiştir (9). Bu çalışmada bazı olgularda intramüsküler K vitamininin de etkisinin olmaması bu hastalarda karaciğer fonksiyonlarının bozukluğunun da koagülopatiye neden olduğunu düşündürmüştür.

Çeşitli konjenital hematolojik hastalıklar da KSKH ile birlikte olabilir. Bu anomaliler bu hastalardaki diğer kanama sorunları ile birlikte bulunabilir.

Yenidoğanlarda faktör II, V, VII, X, XI, XII ve XII yaklaşık 6 aylık olana dek düşüktür ve kardiyak cerrahi geçiren yenidoğanlarda (çoğu siyanotik olan olgular) aynı yaş grubundaki normal değerlere göre koagülasyon faktörleri anlamlı olarak düşüktür (36).

2.1.6. Konjenital Siyanotik Kalp Hastalıklı Olgularda Hemostatik Bozukluklar için Laboratuvar Testleri

Konjenital kalp hastalıklı 235 olguda 1987'de hemostatik testler çalışılmıştır (4). Olguların 45'inde (%19) anormal sonuçlar elde edilmiştir; 29 hastada (%12) sadece bir testte, ve 16 hastada (%7) ≥ 2 testte anormallik saptanmıştır. Anormal testler arasında protrombin zamanı (PZ), parsiyel tromboplastin zamanı (PTZ), aktive parsiyel tromboplastin zamanı (APTZ), trombin zamanı, trombosit sayısı, kanama zamanı ve öglobulin lizis bulunmaktadır. Bunlar arasında en sık PZ, PTZ ve aPTZ'de uzama görülmüştür. Çalışmacılar en yüksek oranda anormalliği kalp işlevleri kötü olan, yüksek hematokrit değerleri olan ve klinik olarak belirgin siyanozu olan hastalarda saptamışlardır. Hematokrit değeri $>60\%$ olan hastalarda PZ ve aPTZ anlamlı olarak daha uzun, ve trombosit sayıları anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Arteriyel oksijen saturasyonu ve trombosit sayısı arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Bu çalışma trombosit sayısı ve PZ anormalliğinin hipoksinin sonucu olduğuna dair kanıt getirmiştir. YDİP'nin de en azından bazı hastalarda trombositopeniye katkısının olduğu düşünülmektedir. Faktör VII veya IX düzeylerindeki azalma ile birlikte PZ, PTZ, aPTZ'deki anormallikler bozulmuş K vitaminine bağımlı karboksilasyonun önemli bir neden olduğunu düşündürmektedir.

Goel ve ark. da hemostatik bozuklukların KSKH'lı olgularda sık görüldüğünü doğrulamışlardır (37). Yazarlar trombosit sayısı, kanama zamanı, PZ, aPTZ, fibrinojen düzeyi, D-dimer, faktör VII ve VIII ve antitrombini değerlendirmişlerdir. Birden fazla testte bozukluk görülmesi siyanotik çocuklarda anlamlı olarak daha fazla izlenmiştir. Siyanotik çocukların büyük kısmında yüksek D-dimer düzeylerinin bulunması YDİP'yi göstermektedir. Diğer koagülasyon testlerinde bozukluk ve trombositopeni de bu hastaların çoğunda saptanmıştır. Yazarlara göre kronik subklinik kompanse YDİP, koagülasyon faktörlerinin yapımının azalması, trombosit agregasyon bozuklukları KSKH'deki hemostatik anormalliklerden sorumludur.

Bir başka çalışmada konjenital kalp hastalıklı olgularda trombosit aktivasyonu ve koagülasyon veya fibrinolitik sistem aktivasyonu çalışılmıştır (38). Yazarlar trombosit aktivasyon testlerini çalışmışlar ve trombin-antitrombin kompleksi, protrombin fragman F1.2, doku plazminojen aktivatörü, PAI-1, plazminojen ve fibrin D-dimerlerini değerlendirmişler.

KSKH'lı olgularda fibrin D-dimerlerinin ve PAI-1 düzeylerinin arttığını ve bunun fibrinolizin arttığına işaret ettiğini bildirmişlerdir. Derin hipotermik dolaşım arrestinin kullanılmasının kardiyopulmoner bypass'tan sonra fibrinoliz insidansında artış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (39).

2.2. KOAGÜLASYON SİSTEMİ

Damar duvarında zedelenme olduğunda vazokonstriksiyon, trombosit adezyonu, agregasyonu ve fibrin oluşumu ile pıhtılaşma olayı gerçekleşir. Damar zedelenmesine ilk yanıt olarak vazokonstriksiyon gelişir. Endotel hasarlanması trombositlerin yapışmasını kolaylaştırdığı gibi subendotelyal dokuda ortaya çıkan ve pıhtı oluşmasını başlatan doku faktörünün ortaya çıkmasını sağlar. Trombositlerin subendotelyal alana adezyonunu sağlayan subendotelyal dokudaki kollajendir. Trombositlerin subendotelyaldeki kollajen fibrillerine yapışması ya doğrudan ya da bir plazma proteini olan von Willebrand faktör (vWF) ile trombosit yüzeyindeki glikoprotein 1b reseptörünün arasındaki etkileşim sonucu olur. Adezyon olayını diğer trombositlerin yapışarak agregasyonu izler. Bu olay, fibrinojenin trombosit yüzeyindeki glikoprotein IIb-IIIa ile kompleks oluşturmasını gerektirir. Öte yandan aktive olan trombositlerin granüllerinden salınan adenosin difosfat, serotonin, tromboksan A₂ ve zedelenme sırasında açığa çıkan doku faktörü ile başlayan ekstrinsik yol sonucu oluşan trombin diğer trombositlerin yapışmasını sağlar. Gittikçe büyüyen trombosit agregasyonu öte yandan aktive olan koagülasyon kaskadı sonucu oluşan fibrin ile stabilize olur.

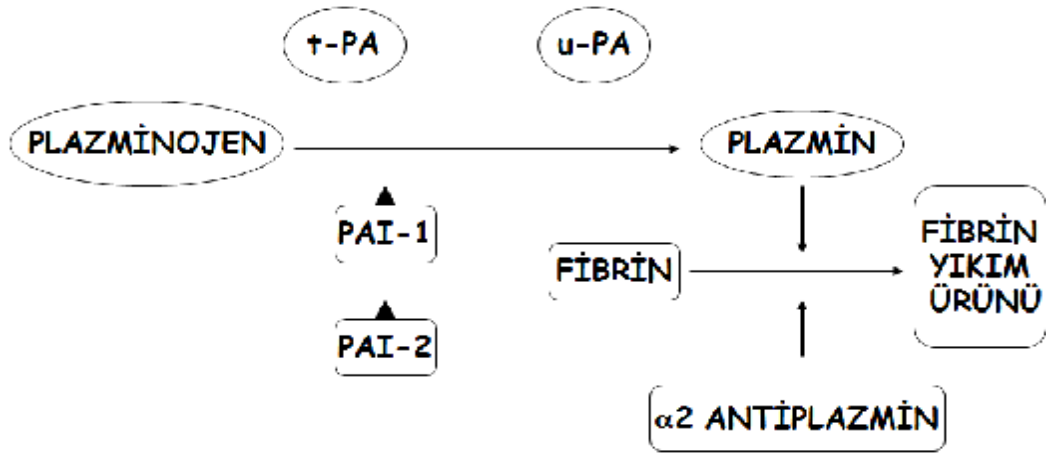
Trombin ve fibrin pıhtısı oluşumu ekstrensek ve intrensek yol olmak üzere iki farklı yol sonucunda olmaktadır. Kan koagülasyonunun intrensek yolunda enzimler ve protein faktörleri rol oynamaktadır. Bu yol kallikrein tarafından faktör XII (FXII)'nin aktivasyonu ile başlar. Yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HMWK) bu aktivasyonu uyarır. FXII'nin enzim formu olan FXIIa, bir proenzim olan faktör XI'i (FXI) aktif enzim olan FXIa'ya dönüştürür. Kalsiyumun varlığında FXIa faktör IX'u (FIX) FIXa'ya dönüştürür. FIXa yine kalsiyum varlığında membran yüzeyinde bağlı olan kofaktör faktör VIIIa'ya bağlanarak tenaz kompleksini oluşturur. Bu tenaz kompleksi proenzim faktör X'u (FX) enzim formu olan FXa'ya dönüştürür. FXa yine kalsiyum varlığında membran yüzeylerinde bağlı olan kofaktör faktör Va'ya bağlanarak protrombinaz kompleksini oluşturur. Bu kompleks protrombini aktif enzim formu olan trombine dönüştürür. Trombin fibrinojenin hızla polimerize olabilen fibrin

monomerlerine dönüşümünü sağlar. Laboratuvar koşullarında kan koagülasyonunun bu intrinsek yolu aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTZ) ile değerlendirilir.

Ekstrensek yol da protein kofaktörleri ve enzimleri içerir. Bu yol hücre yüzeylerindeki doku faktörü ile faktör VIIa (FVIIa) arasında kompleks oluşması ile başlar. Zedelenme sonrasında açığa çıkan doku faktörü plazma ile karşılaşınca plazmada bulunan FVIIa ile enzim kompleksi oluşturur. Bu kompleks faktör X'ü FXa'ya dönüştürür. Sırayla FX da feedback mekanizması ile daha fazla FVII'yi FVIIa'ya dönüştürür. Böylece ekstrensek yol aktivasyonunu hızlandırır. FVIIa/TF kompleksi tenaz kompleksi gibi FX'ü FXa'ya dönüştürür. Bundan sonraki yol fibrin oluşumuna kadar intrinsek yol ile ortak yürür (40) (**Şekil 1**). Laboratuvar analizinde ekstrensek yol protrombin zamanı (PZ) ile değerlendirilir. Buraya kadar anlatılan tüm mekanizmalar *in vitro* modellere dayandırılmıştır. *İn vivo* mekanizmalar farklılıklar göstermektedir (41). *İn vivo* koagülasyon sistemi bu şekilde basit iki yol modelini izlemez. Fakat her iki kolda yeterli aktivitenin varlığına duyulan ihtiyaç doku faktörü (TF) ve FVII üzerinden küçük miktarda trombin oluşumu ile koagülasyonun başlatılması modeli ile açıklanır. Bu küçük miktardaki trombin sonradan FVIII, FVII, FIX'ü aktive eder. İntrensek yol yeteri kadar fibrin pıhtısı oluşturmak için gerekli olan trombin oluşumunu sağlar. Normal koagülasyonda intrinsek yol doku faktörü yolu inhibitörü (TFPI) aktivitesi nedeniyle yeteri kadar trombin sağlayamaz. Trombin oluşumunun maksimum oranı fibrin oluşuktan sonra olur ve ek trombin, ek fibrin oluşumu, FXIII aktivasyonu ve TAFİ için gereklidir. FXIIIa bir transglutaminaz olup fibrin bağlarının çapraz kovalent olarak bağlanmasını sağlar. TAFİ fibrinden lizinleri ayırır ve açığa çıkan lizinler kompetatif olarak fibrinolitik enzimlerin fibrine bağlanmasını önler.

aktivatörü (tPA) ve ürokinaz plazminojen aktivatörü (uPA). Fibrinolitik sistemin baskılanması plazminojen aktivatörleri düzeyinde veya plazmin düzeyinde olabilir. Plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) ve plazminojen aktivatör inhibitörü-2 (PAI-2) plazminojen aktivatör düzeyinde, α 2-antiplazmin ise plazmin düzeyinde fibrinolitik sistemin baskılanmasını sağlar. TPA aracılı plazminojen aktivasyonu dolaşımdaki fibrinin çözünmesinde görev alır. UPA ürokinaz plazminojen aktivatörüne özgü hücre reseptörüne (uPAR) bağlanır (Şekil 2). UPA'nın temel görevi dokunun yeniden şekillenmesinde ve tamirinde, makrofaj işlevinde, ovulasyonda, embriyo implantasyonunda ve tümör invazyonunda hücre çevresindeki proteolizi sağlamaktır.

Fibrinolitik sistemin kontrolü temel yapıtaşları arasındaki özgül moleküler etkileşimler aracılığı ile olur ve temel olarak endotelial hücrelerde sentezlenen plazminojen aktivatörleri ve plazminojen aktivatör inhibitörleri tarafından sağlanır. Fibrinolitik sistemdeki bozukluklar ya azalmış aktivasyon (örn: trombotik komplikasyonlar) ya da artmış aktivasyon (kanama eğilimi) şeklinde olur.



Şekil 2: Fibrinolitik sistem

2.3.1. Temel Yapıtaşlarının Protein Yapıları

Fibrinolitik sistemin enzimleri serin proteazlardır. Aktif kısımları serin, aspartik asit ve histidinden oluşan bir katalitik bir üçlüden oluşur. Bu aktif bölge C-terminal serin proteaz bölgesinde yer alır. N-terminal bölgeleri parmak şeklindeki bölge (finger domain, fibronektindeki fingerlere homolog), epidermal büyüme faktörü benzeri bölge ve katlanmış spiral bölge (kringle domain) gibi bir veya daha fazla işlevsel bölge içerir. Fibrinolitik sistem inhibitörleri serpin (serin proteinaz inhibitörü) üst ailesi içinde yer alır. Serpinler C-terminal bölgelerinde peptid bağlı spesifik reaktif bölgeye sahiptirler. Bu bölge hedef enzimleri ile yarılarak inhibitörden peptid salınımına ve inaktif enzim inhibitör kompleksinin oluşmasına yol açar.

İnsan plazminojeni 791 aminoasitten oluşan 92 kd'luk tek zincirli bir glikoproteindir. Yirmidört disülfid bağı ve homolog katlanmış spiral içerir. Tüm plazminojen aktivatörleri Arg 561 – Val 562 peptid bağı kırarak plazminojeni plazmine çevirirler. Çift zincir plazmin molekülü 5 katlanmış spiral (plazminojenin N-terminal kısmı) içeren ağır zincir ve His 63, Asp 646 ve Ser 741'den oluşan katalitik üçlü içeren hafif zincirden meydana gelir. Plazminojenin N-terminal glutamik asidi vardır. Bu "Lys-plazminojen" olarak belirtilen değişik formlarına kolayca çevrilebilir. Plazminojenin katlanmış spiralleri plazminojenin fibrine spesifik bağlanmasını, plazmin ve $\alpha 2$ -antiplazminin karşılıklı etkileşimini sağlayan lizine bağlayan bölgeler içerir. Bunlar fibrinolizin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar.

TPA 527 aminoasitten ve tek polipeptid zincirinden oluşan 70 kd'luk bir serin proteazdır. TPA plazmin tarafından Arg 275- ile 276 peptid bağı'nın hidroliziyle plazmin tarafından çift zincirli şekle dönüştürülür. Çoğu serin proteazın tek zincir prekürsörlerinden farklı olarak çift zincirli tPA enzimatik olarak aktiftir. TPA'nın N-terminal proteazı diğer proteinlerinkine benzer şekilde birçok farklı bölgeden oluşur: Parmak şeklindeki bölge, epidermal büyüme faktörü bölgesi ve iki katlanmış spiral bölgesi. TPA'daki bu bölgeler fibrine bağlanma, fibrine özgü plazminojen aktivasyonu, in vivo klirensi ve endotel hücre reseptörlerine bağlanma gibi enzimin birçok işlevinde rol oynar. TPA'nın fibrine bağlanması parmak şeklindeki ve ikinci katlanmış spiral bölgesi sayesinde olur. TPA molekülü Asn 117, Asn 184 ve Asn 448 'deki üç potansiyel N-glikozilasyon bölgesini içerir.

Tek zincir uPA 411 aminoasitten oluşan 54 kd'luk bir glikoproteindir. Lys 158-ile 159 peptid bağı'nın proteolitik yıkımı ile molekül çift zincir ürokinaz aktivatörüne (two chain uPA, tc uPA) dönüşür. Katalitik üçlü C-terminal polipeptid zinciri üzerine yerleşir ve Asp 255, His 204 ve Ser 356'dan meydana gelir. N-terminal zincir epidermal büyüme faktörü bölgesini ve

bir katlanmış spiral bölgeyi içerir. Düşük moleküler ağırlıklı tc UPA (33kd) Lys 135-Lys136 ve Lys 158-Ile 159 peptid bağının kırılmasından sonra hidroliz sonucu plazminle üretilebilir.

UPAR 313 aminoasit polipeptidden oluşan ve 50-60 kd'luk glikolize heterojen bir proteindir. Plazma membranına glikozil fosfatidilinositol (GPI) ile gömülmüştür. Birbiriyle ilişkili üç yapısal bölgeden oluşur. N-terminal bölge uPA'ya bağlamada görev alır. İntakt büyüme faktörü bölgesi içeren her form uPA'yı bağlar.

α 2-antiplazmin 70 kd'luk, yaklaşık %13 karbonhidrat içeren tek zincirli bir glikoproteindir ve 464 aminoasitten oluşur. İki disülfid bağı vardır. Arg376 - Met 377 reaktif bölgesi olan bir serpindir. İnsan plazmasında konsantrasyonu 70 ug/ml (yaklaşık 1 uM) dir. C-terminal uçtan 26 artık peptid kaybeden inaktif forma dolaşımında parsiyel dönüşen plazminojen bağlayan formundan sentez edilir. İnhibitör pıhtılaşma olduğunda (kalsiyum iyonu ve faktör XIIIa varlığında) fibrin alfa zincirine çapraz bağlıdır. Gln14 bu çapraz bağlanmada görev alır.

PAI-1 379 aminoasitten oluşan tek zincirli 52 kd'luk bir glikoproteindir. Arg346 - Met 347 peptid bağı reaktif bölgesi olan bir serpindir. S proteinine veya vitronektine bağlanarak dayanıklı hale gelir.

PAI-2 iki farklı şekilde bulunur, 47 kd'luk hücre içi glikolize olmayan ve 60 kd'luk sekrete edilen glikolize şekil. PAI-2 Arg 358 - Thr 359 reaktif bölgesi olan 393 aminoasit içeren bir serpindir. Hücre içi PAI-2'nin işlevi belirsizdir. Çünkü ana enzimi (uPA) hücre dışında bulunur.

TAFİ temel olarak karaciğer tarafından yapılan ve 75 nM konsantrasyonunda dolaşan karboksipeptidaz B benzeri 60 kd'luk bir enzimdir. Ancak konsantrasyon dağılımı geniştir. Dolaşan aktif enzimin yarı ömrü çok kısadır ve normal işlevi için proteinin çok az bir kısmının aktive olması yeterlidir. Etkili aktivasyon trombin-trombomodulin kompleksiyle sağlanır (**Tablo I**).

2.3.2. Plazminin Alfa 2 Antiplazmin Tarafından İnhibisyon Mekanizması

Alpha2-antiplazmin plazminle inaktif 1:1 kompleks yapar. İnhibisyon ardışık olarak oluşan iki reaksiyondan oluşur. Geriye dönüşümlü inaktif kompleks oluşturan ikinci sıra, hızlı reaksiyon ve geriye dönüşümsüz inaktif kompleks oluşumuyla sonuçlanan birinci sıra, yavaş reaksiyon. İnhibisyonun ikinci sıra hız sabiti çok yüksektir ($2-4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), fakat bu büyük inhibisyon hızı serbest lizin bağlanma bölgelerinin bulunmasına, plazmin molekülündeki serbest aktif bölgelere, lizin bağlanma bölgesinde tamamlayıcı bölgenin elde edilebilirliğine (plazminojen bağlanma bölgesi) ve inhibitördeki reaktif peptid bağı bölgesine

bağlıdır. Fibrin yüzeyinde oluşan plazmin moleküllerinin yarı ömrü, serbest plazmadakinden 2 ila 3 kat fazladır.

2.3.3. Doku Plazminojen Aktivatörünün Etki Mekanizması

2.3.3.1.Fibrin Varlığında

TPA fibrin yokluğunda zayıf bir enzimdir, fakat fibrinin varlığı plazminojenin aktivasyon hızını belirgin olarak artırır. Optimal uyarılması yalnızca fragment X polimerlerini meydana getiren fibrinin erken C-terminal $A\alpha$ zinciri ve N-terminal $B\beta$ zincirinde plazmini yıkmasıyla elde edilir. Kinetik bilgiler fibrinin yüzey sağladığı sıklıkla üç bölümden oluşan kompleksin meydana geldiği bir mekanizmayı desteklemektedir. Fibrin X polimerlerinin oluşumundan sonra fibrin uyarılmasındaki artış plazmin yıkımı ile oluşan C-terminal lizin artıklarının aracılığıyla kuvvetlenen tPA ve plazminojen bağlanmasıyla ilişkilidir. TPA ve plazminojen üzerindeki lizin bağlanma bölgelerinin C-terminal lizinlerle karşılıklı etkileşimi, tPA ve plazminojende plazminojen aktivasyonunu güçlendiren allosterik değişikliklere yol açabilir.

Lipoprotein (a) fibrine bağlanmada plazminojen ile yarışır. Artmış lipoprotein (a) düzeyleri fizyolojik fibrinolizisi bozar.

TAFİ kısmen yıkılmış fibrinin kofaktör işlevlerini down regüle ederek fibrinolizisi baskılar. Bu etki, fibrinin plazmin yıkımı ile oluşan C-terminal lizin artıklarının uzaklaştırılmasıyla olur.

2.3.3.1. Hücre Yüzeyinde

Birçok hücre tipi plazminojen aktivatörlerini ve plazminojeni bağlar. Bu plazminojen aktivasyonu ve plazminin α 2-antiplazmin tarafından baskılanmaktan korunmasıyla sonuçlanır.

Birçok hücre plazminojeni lizin bağlanma bölgesinde yüksek kapasiteli fakat görece düşük affinite ile bağlar. Gangliosidler plazminojenin hücrelere bağlanmasında önemli rol oynar. Hücreye bağlı plazminojenin tPA ile aktivasyonunun katalitik etkinliği solüsyondan yaklaşık 10 kat yüksektir. Olasılıkla bunun sebebi plazminojen biçimlenmesini daha hızlı aktive edip 'Lys-plazminojen' benzeri yapıya çevirmesiyle ilgili olabilir. Damarsal hücreler plazminojen reseptörlerini eksprese etme yoluyla hücre çevresinde fibrinolizisi düzenleme yeteneğine sahiptirler. Anneksin II'ye bağlı olan 40 kd'luk membran proteini tPA reseptörünün insan umbilikal ven endotel hücrelerinin işlevsel kısmı olarak düşünülmektedir.

Hücre yüzeyine bağlı tPA enzimatif aktivitesini korur ve PAI-1 ile inhibisyondan korunur. Endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan plazminojen ve plazminojen aktivatörleri

plazmin üretimi için yerel nokta sağlamakta ve kanın akışkanlığının sağlanmasında ve trombus oluşumunun önlenmesinde önemli rol oynayabilir.

Hücresele reseptörler ayrıca tPA'nın dolaşımından hızla uzaklaştırılmasında da rol oynayabilir. Dolaşan tPA (yarı ömrü 5-6 dakika) karaciğerdeki birçok reseptör sistemi ile ilişkili olabilir. Karaciğer endotel hücreleri yüksek mannoz tip karbonhidrat anteni (katlanmış spiral 1'de) tanıyan mannoz reseptörlerine sahiptir. Karaciğer parankim hücreleri tPA'nın parmak şeklindeki ve epidermal büyüme faktör bölgesi ile etkileşen kalsiyum bağımlı reseptörleri içerir. Ayrıca, parankimal hücreler tPA-PAI-1 kompleksinin alımını ve yıkımını sağlayan yüksek affinite reseptörler de içerir. Bunlar ayrıca tPA'yı düşük affiniteyle bağlar ve düşük dansitede lipoprotein reseptör ilişkili protein adını alır. Bu reseptör α 2-makraglobulin reseptörü ile benzerlik taşır.

2.3.4. Ürokinaz Plazminojen Aktivatörünün Etki Mekanizması

2.3.4.1. Fibrin Varlığında

Tc uPA'ya zıt olarak sc uPA'nın (single chain uPA) düşük moleküler ağırlıklı kromojenik substratlara daha az etkisi vardır. Sc uPA'nın intrinsek olarak plazminojeni aktive etme yeteneğinin olduğu görülmektedir. Bu tc UPA'nın katalitik etkinliğinin % 0,5'inden daha azdır. Plazmada fibrin yokluğunda sc uPA stabildir ve plazminojeni aktive etmez. Fibrin pıhtı varlığında sc uPA (fakat tc UPA değil) fibrin spesifik pıhtı yıkımını artırır, sc uPA intakt fibrindeki internal lizin artıklarına bağlı plazminojenin etkisiz aktivatörüdür. Fakat, kısmen yıkılmış fibrindeki yeni oluşmuş C-terminal lizin artıklarına bağlı plazminojen üzerinde etkinliği daha fazladır. Sc uPA'nın fibrin özgülüğü onun tc uPA'ya dönüşümünü gerektirmez, fakat fibrin özgülüğü kısmen yıkılan fibrine plazminojenin bağlanmasının artışı ile olur.

2.3.4.2. Hücre Yüzeyinde

Fizyolojik koşullar altında sc uPA'nın hücre yüzeyinde uPAR'a bağlanması etkinliği için gereklidir. Bağlanma artmış plazmin üretimine yol açar. Bu artmış üretim plazminojenin aktivasyonuna etkileri ve üretilen plazmin ile sc UPA'nın tc uPA'ya doğru geri bildirim aktivasyonu nedeniyle. Her iki etki plazminojenin hücresele bağlanmasına dayanır. Hücre ilişkili plazmin α 2-antiplazmin tarafından hızlı inhibisyonla korunur. Bu etki daha sonra reseptöre bağlı sc uPA aktivasyonunu da tetikler. Bu sistem etkin olarak PAI-1 ve PAI-2 tarafından inhibe edilebilir. UPA'nın hücre yüzeyine yapışması plazmin üretimine yol açar. Aynı şekilde bu durumun uPAR'ın varlığında da benzer şekilde görülmesi bize uPAR'ın lokalize uPA olarak yalnızca hücre yüzeyinde işlev gördüğünü gösterir. Geni değiştirilmiş

farelerde fibrin temizlenmesinde ve yeni arteriyel intima oluşumunda uPAR'dan bağımsız olarak uPA'nın işlevsel olduğu gösterilmiştir.

2.3.5. Plazminojen Aktivatörlerinin İnhibisyon Mekanizması

Tpa'nın hızlı baskılanmasında birçok mekanizma rol oynar. PAI-1 tPA'nın özgül, hızlı etki eden inhibitörüdür. Normalde plazmada düşük konsantrasyonda bulunur fakat bazı klinik durumlarda artar.

TPA yavaş olarak da α 2-antiplazmin, α 2-antitripsin ve C1 inhibitörü ile baskılanır. Kanda tPA'nın uzaklaştırılmasında altta yatan temel mekanizma karaciğer tarafından temizlenmesidir. TPA'nın yarılanma ömrü 4-6 dakikadır.

Tc uPA α 2-makroglobulin, α 1-antitripsin, antitrombin III, α 2-antiplazmin ve plazminojen aktivatör inhibitörü 3 (PAI-3, aktive protein C inhibitörüne benzer) tarafından yavaşça baskılanır. Daha özgül ve hızlı inhibisyon ise PAI-1 ve PAI-2 ile olur. Tcu PA'nın aksine sc uPA plazma proteaz inhibitörleriyle baskılanmaz. UPA'nın kandan uzaklaştırılmasında temel mekanizma hepatik klirenstir. Sc uPA bifazik klirenans hızı gösterir (yarılanma ömrü yaklaşık 5 dakikadır).

PAI-1 tek zincir ve çift zincir tPA ve tc uPA ile reaksiyona girerken sc uPA ile girmez. PAI-1 hedef proteinazları 1:1 geri dönüşümlü kompleksler oluşturarak inhibe eder. Bunu proteinazların serin artıklarındaki aktif bölgede hidroksil grupları ile serinin reaktif merkezindeki P1 artıklarındaki karboksil gruplarının kovalant bağlanması izler.

İnhibitör PAI-1, reaktif olabilen PAI-1, tPa, uPA, trombin gibi hedef proteazlarca geri dönüşümsüz yıkılan substrat PAI-1'e dönüştürülebilir.

PAI-1 aktivitesi karaciğer tarafından hızlı bir şekilde temizlenir. Yarılanma ömrü tavşanda yaklaşık 7 dakikadır.

PAI-2 tc uPA'yı, PAI-1'den 10 kat daha yavaş inhibe eder. PAI-2 etkin olarak çift zincir tPA'yı ve daha az etkin olarak tek zincir tPA'yı inhibe ederken sc uPA'yı inhibe etmez.

2.3.6. Matriks Metalloproteazlar (MMP) Tarafından Hücre İlişkili Proteolitik Aktivitenin Düzenlenmesi

Fibrinolitik ve MMP sistemi arasında çok sayıda düzenleyici moleküler etkileşimlerin olduğu görülmektedir. Ancak bunların tam (patofizyolojik rolleri halen bilinmemektedir. MMP3 (stromelysin) uPA'yı yıkar ve hücre ilişkili uPA aktivitesini down regüle eder. MMP3, MMP7, MMP9 ve MMP12 plazminojeni yıkar. Bu MMP'ler hücreli fibrinolizisi, aktive edebilir hücreye bağlı plazminojen düzeyini azaltarak down regüle edebilir. MMP3 ve

MMP 7 ayrıca fibrinojen ve çapraz bağlı fibrini yıkar. MMP 16 fibrinojeni keserken fibrine bir etkisi yoktur. α 2-antiplazmin ve PAI-2 MMP3 tarafından yıkılır ve nötralize olur. PAI-1 antiproteolitik aktivitesi dışında hücre adezyonu ve göçünde de rol alır. MMP3 tarafından yıkılması bu özelliklerinin de azalmasına yol açar. Plazmin MMP'lerin aktivasyonuna katkıda bulunduğundan hücre dışı proteolizin gerektiği birçok olayda (örn: ateroskleroz, vasküler hasarlanma sonrası restenoz, anevrizma formasyonu ve myokardiyal iskemi) rol oynamaktadır (42).

Tablo I: Fibrinolitik Sistemin Temel Yapıtaşlarının Özellikleri

	M	Aminoasit	Gen (8kb)	Kromozom	Reaktif Bölge
Plazminojen	92,000	791	52,5	6q26-q27	-
Plazmin	85,000	\pm 715			-
tPA	68,000	530(527)	32,7	8p12-p11	-
uPA	54,000	411	6,4	10q24	-
uPAR	55,000 60,000	313	23	19q13.1-q13.2	-
α2-antiplazmin	70,000	464	16	17p13	70
PAI-1	52,000	379	12,2	7q21.3-q22	Arg346-Met347
PAI-2	47,000	393	16,5	18q22.1	Arg358-Thr359
TAFİ	60,000	401	48	13q14.11	-

2.4. DOĞAL ANTİKOAGÜLAN SİSTEM

Pıhtıların sınırlandırılması sağlam endotel yüzeyine bağlı olan üç sistem tarafından gerçekleştirilir: Antitrombin (AT), TFPI ve protein C sistemi.

Antitrombin sistemi endotel yüzeyinde endojen heparinlerin varlığını gerektirir. Koagülasyonu, aktive proteazlara 1/1 oranda bağlanarak inhibe eder. Serbest enzimler daha etkin inhibe edilirken, protrombinaz ya da tenaz komplekslerindeki gibi faktörler inhibisyonundan korunur.

Protein C sistemi koagülasyonu büyük koenzim proteinleri olan FV ve FVIII'i yıkarak inhibe eder. Bu proteinlerin yıkılması trombin aktivasyon oranının azaltarak yolu sonlandırır. Sistem trombomodulin reseptörüne sahip sağlam endotel hücrelerinin varlığını gerektirir.

Sırayla trombomodulin trombine bağlanır ve onun şeklini değiştirerek fibrinojene spesifitesini azaltarak, protein C'ye affinitesini artırır. Aktive protein C [sağlam endotel hücrelerinin plazma membranında protein S ile kompleks oluşturmuş protein C (APC)] FV ve FVIII'i yıkabilir. APC inaktif FVIII'i vWF'ye bağlı olduğu için yıkamaz. Fakat membran yüzeyinde bağlı olan FV'i yıkabilir (FV, protein S aracılığı ile APC aktivitesini hızlandırabilir). Bu nedenle FV'in gerçekte iki aktif formu vardır: Tenaz kompleksini oluşturan FVa, APC tarafından yıkıldıktan sonra aynı enzimin antikoagülan aktivitesini hızlandıran aktif formu.

AT/heparin kompleksi FVIIa hariç tüm vitamin K bağımlı proteazları inhibe eder. TFPI ekstrinsek yolun bir inhibitörüdür. FXa ile kompleks oluşturarak FXa aktivitesini inhibe eder (43). FXa/TFPI kompleksi membran ile etkileşerek TFPI konsantrasyonunu artırır ve FVIIa/TF kompleksi inhibisyonunu sağlar (40).

Antikoagülasyon sisteminin amacı, yeni pıhtı oluşmaması için koagülasyonu yavaşlatmak ve kanın akışkanlığının sürekliliğini sağlamaktır.

2.5. TROMBİN İLE AKTİVE EDİLEBİLEN FİBRİROLİZ İNHİBİTÖRÜ (TAFİ)

Çok hücreli canlılar için damarsal yapıların bütünlüğünün idamesi çok önemlidir. Koagülasyon sistemi damarsal hasardan sonra oluşabilecek katastrofik kan kaybını önlemek için gelişmiştir. Fibrinolitik sistem ise koagülasyon sisteminin son ürünü olan fibrin pıhtısının, hasarlanmış dokunun tamirinden sonra ortadan kaldırılması için gelişmiştir. Koagülasyon ve fibrinolitik sistemlerinin aktivitelerinin dengesi hasar bölgelerinde hemostatik yanıtın gelişmesine izin verdiği gibi, hasardan uzak alanlarda da kanın akışkanlığının devamını sağlar. Bu aktiviteler arasındaki denge sistemlere ait kontrol mekanizmaları ve giderek daha iyi anlaşıldığı üzere bu sistemler arasındaki etkileşim ile oluşur. Dengesizlikler myokard infarktı ve inmelerdeki gibi tromboza, veya hemofilideki gibi kanamaya eğilim yaratabilir.

Son on yıldaki çalışmalar koagülasyon ve fibrinolitik sistem arasında açık moleküler bağlantıyı sağlayan ve trombin tarafından aktive edilebilen fibrinoliz inhibitörü (TAFİ) olarak bilinen yeni bir plazma zimojenini ortaya çıkarmıştır (44-47). TAFİ yolunun farmakolojik inhibisyonu trombozu önlemek veya trombolitik tedavinin etkinliğini artırmak için yeni bir strateji oluşturabilir. Tersine, TAFİ yolunun uyarılması hemofilinin kanama komplikasyonlarını azaltabilir. Ek olarak TAFİ yolu fibrinolitik sistemde yer alan ancak

hemostatik özellikte olmayan yara iyileşmesi gibi fizyolojik süreçlerde ve koagülasyon sisteminin aktivitesinin enflamasyon ile bağlantısında rol oynar. İnsan popülasyonunda TAFİ antijen konsantrasyonu ve işlevsel TAFİ'nin belirgin değişkenliği olduğu ve bunların değişkenliğinin damarsal hastalık gelişimi için risk faktörü olabileceği konusunda veriler mevcuttur (48).

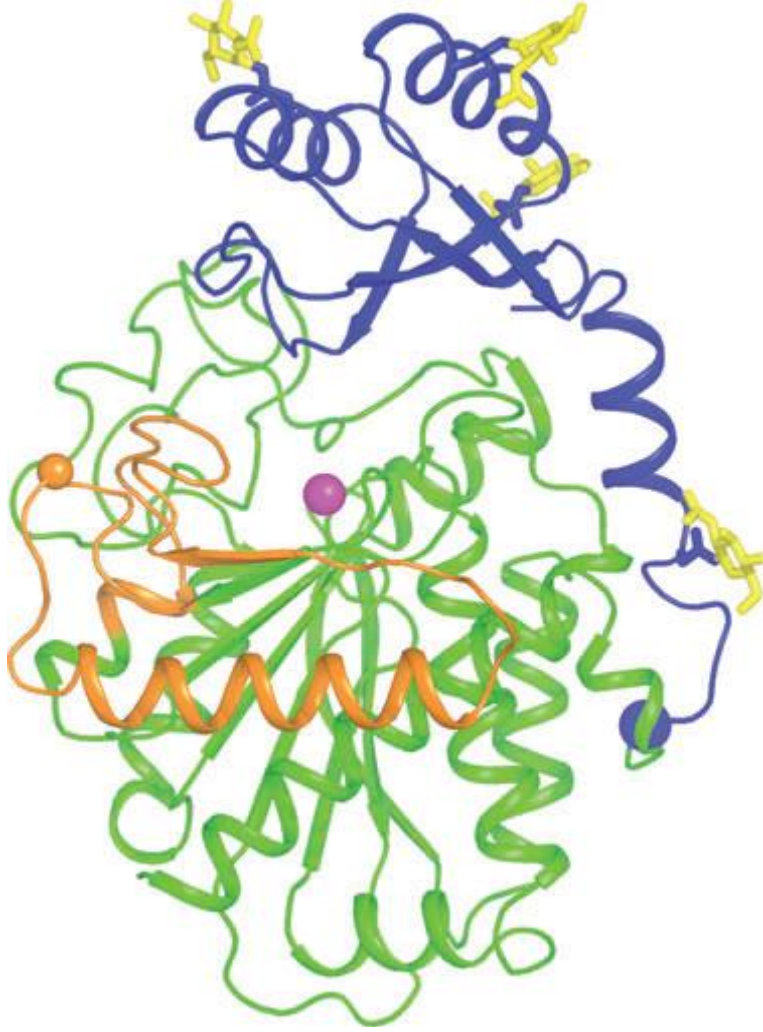
2.5.1. Özellikleri

İnsan TAFİ'si fibrinolizdeki işlevsel rolü ilk kez Bajzar ve Nesheim tarafından 1995'te tarif edilen bir bazik karboksipeptidaz zimojen şeklidir (49). Ancak bu antite daha öncesinde de farklı gruplar tarafından tanımlanmıştır ve bu nedenle TAFİ literatürde birkaç farklı isim altında refere edilmiştir. 1998'de Hendriks ve ark. plazmadan serum elde edildiğinde plazma bazik karboksipeptidaz N (CPN) ile ilişkisiz olan bir bazik karboksipeptidaz aktivitesinin belirlediğini bildirmişlerdir. Bu aktivite stabil değildi, serumun 37⁰'de 2 saat enkübe edilmesinden sonra kayboluyordu, bu nedenle dayanıksız (unstable) karboksipeptidaz veya CPU olarak isimlendirildi (50). Bağımsız çalışmalarda Campbell ve Okada taze serumda labil bir karboksipeptidaz tanımladılar, ve arjinin içeren substratları lizin içeren substratlara tercih ettiği için arjinin karboksipeptidaz (CPR) ismini verdiler (51).

Eaton ve ark. 1991'de plazmadan plazma karboksipeptidaz B olarak isimlendirdikleri bir plazminojen bağlayıcı protein izole ettiler. Aynı çalışma grubu insan karaciğer cDNA kütüphanesinden plazma prokarboksipeptidaz B'yi kodlayan bir cDNA klonunu izole etti ve dizi analizi bu proteinin iyi bilinen pankreatik karboksipeptidaz B ile homolog olduğunu gösterdi (52). Bajzar ve Nesheim'in sonraki çalışmaları aktive protein C (APC)'nin sadece antikoagulan aktiviteye sahip olmadığı, aynı zamanda belirgin profibrinolitik aktiviteye sahip olduğu gözlemi ile başlamıştır (53). Gerçekte APC intrinsik olarak profibrinolitik değildir, daha çok koagülasyon kaskadını down regüle ederek bir trombin ile aktive edilebilen antifibrinolitik faktörün oluşumunu önler. TAFİ ve TAFİ'nin trombin yıkım ürünlerinin amino-terminal protein dizi analizi bu proteinin 1991'de Eaton ve ark.'nın tarif ettiği plazma prokarboksipeptidaz B ile identik olduğunu gösterdi (52). Saflaştırılmış proCPU ve proCPR'nin aminoasit dizi analizi bu proteinlerin de TAFİ/plazma prokarboksipeptidaz B ile özdeş olduğunu gösterdi (54,55).

Matür TAFİ proteininde 401 aminoasit vardır ve bu 45.999 Da'luk bir moleküler peptid kitlesine denk gelmektedir (52). Aktivasyon peptidindeki 4 bölgenin (Asn22, Asn51, Asn63, Asn86) ve enzimatik alandaki bir bölgenin (Asn219) N-glikolizasyonu TAFİ'nin

sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) M_r ~60.000'e göçü ile sonuçlanır (Şekil 3).



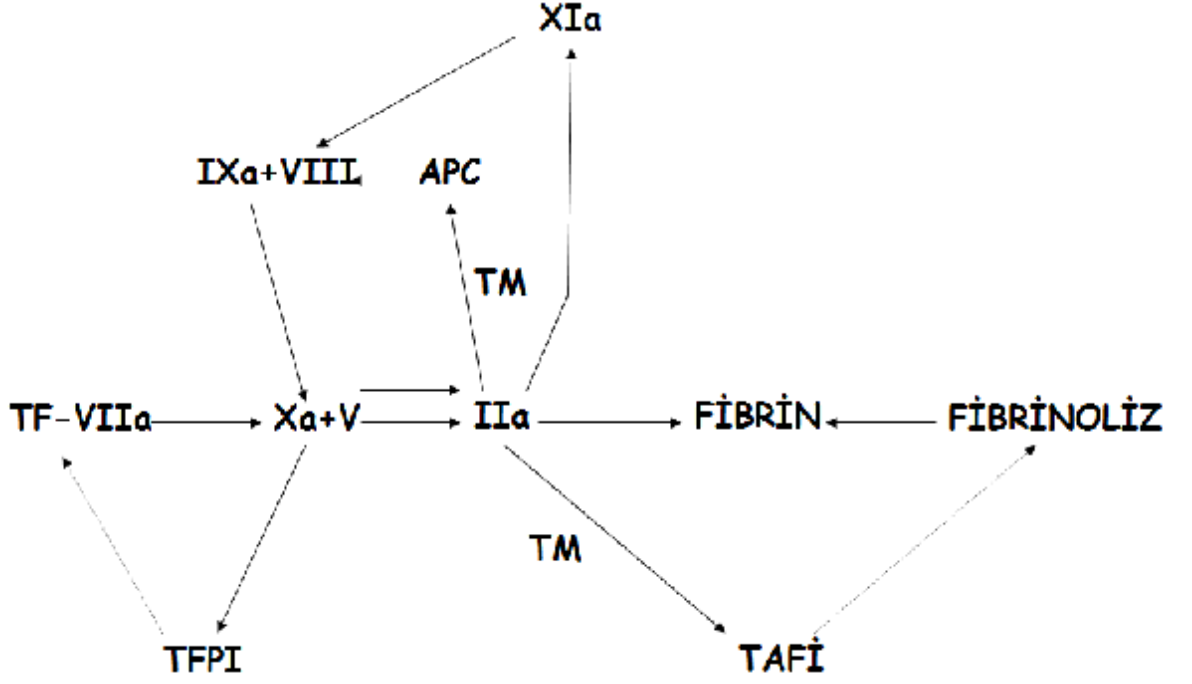
Şekil 3: Trombin tarafından aktive edilebilen fibrinoliz inhibitörünün (TAFİ) kristal yapısı. Aktivasyon peptidi mavi, katalitik kısım yeşil ve dinamik 296-350 artıklar portakal rengi. Katalitik çinko iyonu mor renkli bir küre olarak ve dört N-bağlantılı glikan sarı çubuk şeklinde gösterilmiştir (60).

Trombin TAFİ'de Arg92'den sonra ayrılmaya neden olur ve bu bir amino-terminal peptidin salınması ile sonuçlanır. SDS-PAGE'de aktif TAFİ enzime karşılık gelen M_r ~35.000 bandı belirir (aktive TAFİ veya TAFİa) (56,57). Pankreatik karboksipeptidaz B gibi, TAFİa'nın da bazik karboksipeptidaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bazik

karboksipeptidaz aktivitesi protein ve peptid substratlarından karboksil-terminal bazik artıklarını (lizin ve arjinin) ayırabilme yeteneğidir (55,58,59).

TAFİ'nin in vitro aktivasyonu trombin ve plazmin tarafından gerçekleştirilebilir, ancak her iki enzim de TAFİ'nin göreceli zayıf aktivatörleridir (52,53). Anlamlı TAFİa oluşumu için bu enzimlerin yüksek konsantrasyonları ve uzun enkübasyonlar gerekir. Daha sonraki bir çalışmada trombin kofaktörü olan trombomodulinin TAFİ aktivasyonunu belirgin hızlandırdığı (1000 kattan daha fazla) gösterilmiştir. Bu nedenle trombin-trombomodulin protein C aktivasyonu yolu ile sadece koagülasyonu down regüle etmez, aynı zamanda TAFİ aktivasyonu ile fibrinolizi de down regüle eder (61).

Trombomodulin varlığında trombinin TAFİ aktivasyonunu 1250 kat katalize etme etkinliğine dayanarak, trombin-trombomodulin kompleksinin TAFİ'nin fizyolojik bir aktivatörü olduğu varsayılmıştır. Diğer yandan, aynı çalışmada yaklaşık 1 nM'lik TAFİa konsantrasyonunda pıhtı erime zamanında yarı-maksimum inhibisyonun sağlandığı; bunun plazma TAFİ konsantrasyonunun %2'sinden az olduğu, ve az miktardaki TAFİ aktivasyonunun bile fibrinoliz üzerinde belirgin etki etmesi için yeterli olduğu gösterilmiştir (61). TAFİa-bağımlı pıhtı erimesinde uzama in vitro olarak trombomodulinin yokluğunda eğer intakt intrinsek koagülasyon yolu varsa gözlenebilir (62,63). Ayrıca, TAFİa'nın tromboliz üzerine in vivo etkisi faktör XI'in aktivasyonunu önleyen bir antikor tarafından zayıflatılabilir (61). Son koagülasyon modeli bu sürecin damarsal hasar alanlarında akan kanın doku faktörüne maruz kalması ile başlatıldığını kabul etmektedir: ekstrinsek yolda oluşan küçük miktardaki trombin fibrin oluşumu ve aynı zamanda intrinsek, veya faktör XI-bağımlı yolu başlatmak için yeterli faktör XI'u aktive edilmesine yeterlidir (62). Daha sonra faktör XI-bağımlı yolda büyük miktarda trombin ve fibrin oluşturur ve daha önce belirtilen çalışmalar trombin yokluğunda bile, bu yolun işlevsel bir TAFİa konsantrasyonu oluşturması için yeterli trombin oluşturma kapasitesine sahip olduğuna işaret etmektedir (**Şekil 4**).



Şekil 4: Kan koagülasyon modeli (TF-VIIa: doku faktörü-faktör VIIa kompleksi, TFPI: doku faktörü yolu inhibitörü, TM: trombomodulin, APC: aktive protein C)

Arteriyel hasardan sonra subendotelial matrikste bulunan glikozaminoglikanların TAFİ'nin plazmin tarafından aktivasyonunu 20 kata kadar artırabildiği gösterilmiştir. Plazmin tarafından TAFİ'nin aktivasyonu için K_m değerinin TAFİ'nin trombin-trombomodulin tarafından aktivasyonu için olandan 10 kat daha düşük olmasına rağmen, plazmin aktivasyonunun katalitik etkinliği trombin-trombomoduline göre 10 kat daha düşüktür (64). *In vivo* olarak, TAFİ aktivasyonu plazmin, trombin ve trombin-trombomodulin tarafından gerçekleştirilebilir. Ancak, bu yolların TAFİ aktivasyonuna kantitatif katkısı *in vivo* farklı fizyolojik ve patofizyolojik durumlarda belirlenmelidir.

TAFİa'nın bazik karboksipeptidaz aktivitesi fibrinolitik kaskattaki pozitif feedback gelişimi için önemli olan kısmen yıkılmış fibrinden karboksil-terminal lizin artıklarını ayırarak antifibrinolitik etkiye yol açmaktadır. Lizise uğrayan bir pıhtıda TAFİ'nin enkübasyonunun serbest lizin ve arjinin oluşmasına neden olduğu ve TAFİa'nın kısmen yıkılmış fibrinin doku tipi plazminojen aktivatör (tPA) kofaktör aktivitesini Glu-plazminojene göre azalttığı, Glu-plazminojenin Liz-plazminojene dönüşümünü azalttığı, plazminojenin fibrin pıhtısına bağlanmasını azalttığı, kısmen yıkılmış fibrinin plazmini α_2 -antiplazmin etkisinden koruma yeteneğini zayıflattığı gösterilmiştir (65-68).

TAFİa'nın özelliği intrinsek ısıya dayanıksızlığıdır. İnaktivasyonu spontan, ısı bağımlı yolla ve proteolitik yıkım ile olmaktadır (61,57). TAFİ'nin tripsin ile enkübasyonunda TAFİa aktivitesi önce artar, sonra azalır. TAFİa ısıya oldukça duyarlıdır. Yarılanma ömrü 37⁰C'de 10 dakika, 30⁰C'de 45 dakika, 22⁰C'de birkaç saattir. 0⁰C'de enzim stabildir. TAFİa yalnızca ısının düşürülmesi ile stabilize edilmez. Heparin ve ε-aminokaproik asit de TAFİa'nın ısı ile azalmasını önler. TAFİa kısmen yıkılmış fibrinin bulunduğu durumlarda daha etkindir, çünkü fibrine bağlı TAFİa spontan aktivite kaybına dirençlidir.

2.5.2. Moleküler Genetiği

TAFİ'yi kodlayan genin [İnsan Genom Organizasyonu (HUGO) tarafından CPB2 olarak adlandırılmıştır] kromozomal lokalizasyonu, metafaz kromozomlarında floresan in situ hibridizasyon yolu ile 13q14.11 olarak belirlenmiştir. Ancak bu bölgede TAFİ'nin aday olabileceği herhangi bir genetik hastalık henüz haritalandırılmamıştır. TAFİ'yi kodlayan gen yaklaşık olarak 48 kb çift DNA genomunda dağılmış olan 11 ekzondan oluşur. Karaciğerde CPB2 kopyalanması 5'-komşu bölgesindeki birçok (~11) yerden başlatılır. Yazılım başlatma yerleri ile ilişkili olarak, 9-46 baz çifti uzunluklarında proteine çevrilmemiş kısımlar içeren çok sayıda CPB2 kopyası bulunur. CPB2 5'-komşu bölgesindeki yazılım başlatma yerlerinin DNA dizi analizi konsensus TATA dizisinin yokluğunu göstermiştir; vitamin-K bağımlı koagülasyon faktörlerini kodlayan ve tümü karaciğerde eksprese edilen genlerin de birçok yerden yazılımı yapılır ve promotor bölgelerde konsensus TATA dizileri yoktur.

İnsan CPB2 geni 5'-komşu bölgesinin analizleri karaciğere özgü gen ifade mekanizmaları ve olası düzenleyici elementleri göstermeye başlamıştır. İnsan CPB2 başlatıcı kısmı, TAFİ'nin karaciğerde sınırlı ifadesinde rolü olabilecek yazılım faktörü C/EBP (CCAAT/ enhancer bağlanma proteini) için bağlanma yeri bulundurur. Ayrıca sentetik glukokortikoid deksametazona yanıt olarak CPB2 yazılım indüksiyonunun iki katı kadar artıran glukokortikoid element de bulunmaktadır.

İnsan CPB2 mRNA kopyasının 3'- ucunun analizi CPB2 mRNA oluşturulması sırasında üç farklı poliadenilasyon kısmının kullanıldığını göstermiştir. Bunun sonucunda proteine çevrilmemiş 390, 423 ve 549 kb uzunluğunda baz çiftleri meydana gelir. Bunun yanında her bir kopyanın dayanıklılığı ve üç poliadenilasyon kısımlarının kullanım sıklığı sitokinler tarafından değiştirilebilir.

CPB2 boyunca çok sayıda tek nükleotid polimorfizmi (single nucleotide polymorphism-SNP) tanımlanmış, polimorfizm ve TAFİ'nin plazma konsantrasyonları

arasında güçlü ilişkiler bildirilmiştir. Bununla ilgili olarak toplamda literatürde 19 SNP bildirilmiş olup; 10 tanesi 5'-komşu bölgesinde, 6 tanesi kodlayan bölgelerde, 3 tanesi de 3'-komşu bölgede (CPB2 mRNA kopyasının 3' "untranslated region" kısmına karşılık gelen bölge) bildirilmiştir. Kodlayan bölgelerdeki polimorfizmlerden ikisi aminoasit yer değişiklikleri ile sonuçlanırken, geri kalanları sessiz mutasyonlara neden olmaktadır. Birçok polimorfizmin birbirleri ile güçlü linkage disequilibriumda buldukları gösterilmiştir. Henry ve ark. tarafından belirlenen yedi SNP'de tüm haplotiplerin %80'den fazlasını oluşturan dört major haplotip tanımlanmıştır. Franco ve ark. tarafından tanımlanan üç SNP ise komplet linkage disequilibrium özelliklerini göstermiş ve iki haplotip gözlenmiştir. HapMap proje veritabanında (HapMap projecty database-<http://www.hapman.org>) yapılan araştırma bu gen içinde 72 SBP, 5'-komşu bölgede de 5 SNP varlığını göstermektedir. Her bir SNP için ayrıntılı haplotip bilgisi bu veritabanında bulunmaktadır. CPB2 için dbSNP veri tabanında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) yapılan araştırma bu bölgede 339 ayrı SNP varlığını göstermiştir.

CPB2 genotipiyle plazma TAFİ seviyeleri arasındaki ilişkiler CPB2 dizi varyasyonunun TAFİ gen ifadesinde kalıtsal farklılıklarla sonuçlandığını açıkça ortaya koymaktadır. 5'-komşu bölgesindeki polimorfizmler özgül yazılım faktörlerinin bağlanmasını etkileyerek ya da CPB2 loküsünün kromatin yapısını değiştirerek CPB2 promotör aktivitesini farklılaştırabilir. 3'-proteine çevrilmemiş bölgedeki polimorfizmler mRNA yapımını ya da dayanıklılığını etkileyerek CPB2 mRNA sayısını değiştirebilir. TAFİ proteinindeki aminoasit yer değişiklikleri TAFİ yapımını ve sekresyonunu ya da proteinin plazmadaki bulunma süresini etkileyerek TAFİ plazma seviyesinin belirlenmesinde rol alabilir. Alternatif olarak; tanımlanmış SNP'ler diğer polimorfizmlerle linkage disequilibriumda bulunabilir ve CPB2 gen ifadesini doğrudan etkileyebilirler. CPB2 gen ifadesini etkileyen SNP'lerin her birinin rolü bilinmemektedir. Bir çalışmacı grubu, plazma TAFİ konsantrasyonlarını etkileyen iki nicesel özellik loküsün (quantitative trait loci, OTL) varlığını öne sürmüştür; bilinen herhangi bir SNP ile bu QTL'lerin allel sıklığı arasında tutarlılık bulunmamıştır. Ancak CPB2 genotiplemesinde kullanılan TAFİ immunoassay'in duyarlılığı hakkındaki soru işaretleri bu veriler konusunda şüphe uyandırmaktadır. Yayınlanmamış veriler 5'-komşu bölgedeki SNP'lerden hiçbirinin CPB2'nin başlatıcı aktivitesini etkilemediğini, bunun yanında 3'-UTR kısımdaki SNP'lerin mRNA stabilitesi, genotip ve plazma TAFİ antijen konsantrasyonları arasındaki bilinen ilişki ile kısmen uyumlu olarak etkilediğini göstermiştir.

CPB2'nin kodlama bölgesindeki SNP'ler iki aminoasit yer değişikliği ile sonuçlanır: 147. pozisyonda Ala ile Thr değişimi ve 325. pozisyonda Ile ile Thr değişimi. Değişik

aminoasit dizilerinin olduğu rekombinan TAFİ proteinlerinin analizi, Thr/Ala 147 polimorfizminin trombin-trombomodulin yolu ile TAFİ aktivasyonunu, TAFİa'nin intrinsik stabilitesini ya da antifibrinolitik yeteneğini etkilemediğini göstermiştir. Ancak 325. pozisyonda Thr yerine Ile bulunması, 37 °C'de iki katı kadar dayanıklı olan ve dolayısı ile daha yüksek antifibrinolitik aktiviteye sahip olan TAFİa şekli ile sonuçlanır. Bu veriler 325. pozisyonla ilişkili olarak CPB2 genotipinin trombotik hastalıklar için genetik risk faktörü olabileceğini öne sürmektedir. İlginç olarak daha dayanıklı TAFİa varyanta karşılık gelen genotip daha düşük plazma TAFİ seviyeleri ile ilişkili görünmektedir, bu da bu aminoasit varyantının trombotik risk üzerindeki etkisini azaltabilir.

Daha önce ELISA kullanılarak yapılan çalışmalar tüm CPB2'deki tüm SNP'lerle plazma TAFİ antijen konsantrasyonları arasında güçlü ilişkiler olduğunu göstermiştir, bu da plazma TAFİ antijen konsantrasyonlarındaki değişkenliğin çok büyük kısmının CPB2'nin kendisinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Ancak bu çalışmalarda kullanılan TAFİ ELISA testlerinde genotiple ilişkili olarak artefakt olabileceği fark edildiğinde bu sonuçlar yeniden değerlendirilmiştir. şu anki durum itibarı ile plazma TAFİ antijen konsantrasyonlarındaki değişkenliğin yaklaşık olarak dörtte birinin CPB2 SNP'lerle açıklanabileceği söylenebilir; haplotip çalışmaları bu etkinin G-1102T (5'-komşu bölgesi) ve T+1583A (3'-proteine çevrilmemiş bölge) SNP'lerin birlikte işleviyle açıklanabileceğini göstermiştir. Son zamanlarda CPB2'deki başlıca "quantitative trait nucleotides" (QTN) tanımlanmasına yönelik yapılan bir trans-etnik haplotip analiz çalışmasında benzer şekilde, T+1583A SNP'nin plazma TAFİ antijen konsantrasyonları üzerinde bağımsız olarak etkisi olduğu gösterilmiştir. Analiz aynı zamanda 5'-komşu bölgesindeki iki SNP'nin bağımsız etkileri olduğunu (olası C-2599C ve-2345 1G/2G) daha az belirgin olmakla beraber ortaya koymuştur (48).

2.5.3. Hastalıklardaki Rolü

TAFİ düzeyi çeşitli çalışmalarda normal bireylerde belirlenmiştir. Sağlıklı bireylerde popülasyonda TAFİ düzeyinin çok geniş bir dağılım aralığı olduğu gösterilmiştir. Çocuklarda yapılan ve çeşitli yaş gruplarını da içeren bir çalışmada TAFİ düzeyinin erişkinlerden anlamlı farklılık göstermediği gözlenmiştir (69).

TAFİ genindeki tek nükleotid polimorfizminin TAFİ antijeni düzeyine etkisine sağlıklı çocuklar ve pediatrik onkoloji hastalarında yapılan bir çalışmada 505GG (wild type) polimorfizmine göre 505AA polimorfizmi ve heterozigot 505GA polimorfizminde TAFİ antijen konsantrasyonunun anlamlı olarak daha yüksek saptandığı, en düşük TAFİ düzeyinin

homozigot +1542GG polimorfizminde olduğu, TAFİ düzeylerinin yaş ve cinsten etkilenmediği bildirilmiştir (70).

Dengue hemorajik ateşi olan 50 hastada yapılan bir çalışmada hem TAFİ antijeni hem aktivite düzeylerinin tüm hastalarda azaldığı saptanmış ve bunun bozulmuş koagülasyon nedeniyle fibrin pıhtısının fibrinolizden korunamaması ile Dengue hemorajik ateşindeki kanama komplikasyonlarının ağırlığına katkıda bulunabileceği düşünülmüştür (71).

Tip 2 diyabetli hastalarda hipofibrinolitik durumunun sık gözlenmekte olduğu ve bunun olasılıkla obesite ve insülin direncine bağlı olduğunun düşünülmesi nedeniyle tip 1 diyabetli hastalarda yapılan çalışmada tip 1 diyabette fibrinolitik aktivitenin etkilenmediği ve metabolik kontrol derecesi ile de ilişkili olmadığı, hasta ve kontrol grubunda TAFİ aktivitesinde fark bulunmadığı belirtilmiştir (72).

B-Talasemi/Hemoglobin E hastalığı olan splenektomili ve splenektomisiz hastalarda yapılan hemostatik çalışmalarda ağır kliniğe sahip splenektomili grupta ağır klinikli ancak splenektomi yapılmamış hastalara göre TAFİ düzeyinde anlamlı azalma ve D-dimerde yükseklik bulunmuştur. Çalışmacılar TAFİ'nin düşüklüğünün fibrinolizi inhibe etmek için kullanılmasına bağlı olduğunu, transfüzyon alan splenektomili hastalarda düşük dereceli tüketim koagülopatisinin olduğunu bildirilmiştir (73).

Kırım Kongo kanamalı ateşinde TAFİ aktivitesi kontrol olgularına göre belirgin düşük bulunmuş ve ortaya çıkan fibrinoliz imbalansının kanama komplikasyonlarına yol açtığı düşünülmüştür (74).

Çocuklarda ağır meningokokkal enfeksiyonda hastanın ilk gelişinde TAFİ düzeyinin iyileşme dönemine göre daha düşük olduğu, septik şok gelişen hastalarda şok gelişmeyenlere göre de daha düşük olduğu bulunmuştur (75).

Akut lösemili 117 hastanın değerlendirildiği bir çalışmada TAFİ, plazminojen aktivatör inhibitörü ve α 2-plazmin inhibitörü çalışılmış, kanaması olan hastalarda TAFİ aktivitesi normal kontrol grubuna göre ve kanaması olmayan hastalara göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Akut promiyelositik lösemili olgularda diğer lösemi tiplerine göre TAFİ'nin daha düşük ve kanama şiddetinin TAFİ aktivitesi ile ters orantılı olduğu saptanmış, akut lösemideki kanamanın patogeneğinde TAFİ aktivitesindeki ve α 2-plazmin inhibitöründeki azalmayla ortaya çıkan hiperfibrinolizin kısmen rol oynadığı bildirilmiştir (76).

3. OLGULAR VE YÖNTEM

Bu araştırmanın hasta grubunu Şubat 2005 - Haziran 2006 arasında Dr. Behçet Uz Çocuk Hastanesi Kardiyoloji Bölümü ve Dokuz Eylül Üniversitesi Pediyatrik Kardiyoloji Bilim Dalına başvuran konjenital siyanotik kalp hastalıklı çocuklar oluşturdu.

Kontrol grubuna yine Şubat 2005 - Haziran 2006 arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları polikliniklerine başvuran ve enfeksiyonu, kronik hastalığı olmayan, ilaç kullanmayan ve karaciğer fonksiyon testleri normal olan sağlıklı çocuklar alındı.

Tüm hasta ve kontrol grubu olgularının ebeveynlerinden Helsinki bildirgesine göre yazılı aydınlatılmış onam alındı.

3.1. Kan Örneklerinin Toplanması

Kan örnekleri venöz ponksiyon ile antekubital veya el sırtından sitratlı tüplere (0,2 mL sitrat %3,2, 1,8 mL kan örneği olacak şekilde) alındı ve beklemeden 2000 devirde 15 dakika santrifuje edildi. Ardından ayrılan tüm plazma örnekleri çalışma anına kadar -70°C 'de saklandı. Eş zamanlı olarak hasta ve kontrol grubunun tam kan sayımları çalışıldı. Hasta grubundaki çocuklardan protrombin zamanı, aktive parsiyel tromboplastin zamanı, D-dimer, fibrin yıkım ürünleri, fibrinojen düzeyi istendi. Veriler araştırmacı tarafından geliştirilen bilgi formuna kaydedildi. PZ ve aPTZ'nin değerlendirilmesinde yaşa göre belirlenmiş normal referans değerleri kullanıldı (77) (**Tablo II**).

Tablo II. Protrombin Zamanı ve Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı için Yaşa Göre Normal Değerler

Yaş	Yaşa uygun normal değerler ortalama (alt - üst sınır)	
	PZ (sn)	aPTZ (sn)
Yenidoğan	13 (10,1-15,9)	42,9 (31,3-54,5)
1 aylık	11,8 (10-14,3)	40,4 (32-55,2)
3 aylık	11,9 (10-14,2)	37,1 (29-50,1)
6 aylık	12,3 (10,7-13,9)	35,5 (28,1-42,9)
6 ayın üzerinde	12,4 (10,8-13,9)	33,5 (26,6-40,3)

3.2. Plazma TAFİ Düzeyinin Ölçülmesi

Plazma TAFİ düzeyleri tüm olgularda aynı gün “quantitative sandwich enzyme immunoassay” yöntemi ile çalışıldı. Bunun için Visulize TAFİ antijen kiti (Affinity Biologicals inc. Canada) kullanıldı.

3.2.1. Testin Prensibi

Bu yöntemde, ilk basamakta kuyucuklarda kaplı olarak bulunan TAFİ'ye karşı poliklonal antikörlerle, çalışma plazmasında bulunan TAFİ bağlanır. İkinci basamakta bu kompleks üzerine enzim bağlı anti-TAFİ poliklonal antikör (peroksidaz işaretli saptama antikoru) ilave edilir. Son basamakta enzim substratı (TMB: tetrametil benzidin) ilave edilerek ilk basamakta bağlanmış olan TAFİ oranına göre oluşacak renk yoğunluğu 450 nm dalga boyunda “microplate reader” ile ölçülür.

3.2.2. Kullanılan Reaktif Araç ve Materyaller

- 1) Visulize TAFİ antijen kiti içinde bulunan reaktifler ve materyaller:
 - a) TAFİ microplate: İnsan TAFİ'sine karşı oluşturulmuş koyun antikörleri ile kaplı 96 kuyucuk.
 - b) Standart referans plazma: İki vial liyofilize, bir mL plazma (6,1 µ/mL TAFİ içermektedir).
 - c) Kontrol plazma A: İki vial liyofilize, bir mL plazma.
 - d) Kontrol plazma B: İki vial liyofilize, bir mL plazma.
 - e) TAFİ'den yoksun plazma: İki vial liyofilize, bir mL yoksun plazma.
 - f) Konsantre yıkama tamponu: 30 mL, 10 kat konsantre solüsyon.
 - g) Örnek dilüenti: 3 vial, 20 mL, tamponlanmış örnek dilüenti.
 - h) Saptama antikoru: Bir vial, 12 mL, peroksidaz işaretli saptama antikoru.
 - i) Substrat: Bir vial, 12 mL, TMB.
 - j) Stop solüsyonu: Bir vial, 12 mL, 0,2 Molar sülfürik asit
- 2) Kullanılan diğer malzemeler:
 - a) BioRAD monopath microplate reader (450 absorbans ölçebilen okuyucu)
 - b) BioRAD model 1575 immunowash, otomatik yıkama cihazı
 - c) Pipetler ve pipet voları
 - d) Multikanal pipet
 - e) Deiyonize ya da distile su
 - f) Santrifuj cihazı

- g) Polipropilen tüpler
- h) Bilgisayar sistemi

3.2.3. Plazma TAFİ Düzeyi Çalışma Yöntemi

- a) Tüm reaktifler ve plazma örnekleri işlem öncesi oda ısısına getirildi.
- b) Standart eğriyi oluşturmak için, en yüksek TAFİ değeri 6,1 µg/mL olacak şekilde seri dilüsyonlar hazırlandı. Standart referans plazmalar önce TAFİ'den yoksun plazma ile dilüe edilip sonra örnek dilüenti ile daha ileri dilüsyonlar hazırlandı. Standart referans plazmanın 1/100 dilüsyonda elde edilen TAFİ değeri 6,1 µg/mL'dir. Örnek dilüenti kör olarak kullanıldı.
- c) Çalışma örnekleri ve kontrol plazmalar ilk olarak TAFİ'den yoksun plazma ile ½ dilüe edildi. Daha sonra örnek dilüenti ile son dilüsyon 1/200 olacak şekilde dilüe edildi.
- d) Microplate'in tüm kuyucukları 300 µL yıkama tamponu ile üç kez yıkandı.
- e) Microplate'in her kuyucuğuna 100 µL standart ya da kontrol plazma veya örnek plazmalarından kondu. Üzeri strip ile kapatılarak oda ısısında bir saat enkübe edildi.
- f) Her kuyucuk 300 µL yıkama tamponu ile üç kez yıkandı.
- g) Her kuyucuğa 100 µL substrat (TMB) solüsyonu ilave edilip, oda ısısında 10 dakika ışıktan korunarak enkübe edildi.
- h) Tekrar her kuyucuk 300 µL yıkama tamponu ile üç kez yıkandı.
- i) Her kuyucuğa 100 µL substrat (TMB) solüsyonu ilave edilip, oda ısısında 10 dakika ışıktan korunarak enkübe edildi.
- j) Her kuyucuğa 100 µL stop solüsyonu ilave edilip, 30 dakika içinde 450 nm dalga boyunda "microplate reader" ile okuma yapıldı.
- k) Bilgisayarda log-log grafik kullanılarak x eksenine kalibratör değerleri (µg/mL), y eksenine de karşılık gelen absorbans değerleri işaretlenerek kalibrasyon eğrileri çizildi. Hastalar için bulunan absorbans değerleri kalibrasyon eğrisi üzerinde işaretlenerek karşılıklarına denk gelen TAFİ düzeyleri belirlendi. Sonuçlar µg/mL olarak verildi.

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme “Scientific Package for Social Sciences (SPSS 11.0) for Windows programı ile yapıldı. Grupların karşılaştırılmasında iki grup arasındaki farkın anlamlılığının değerlendirilmesinde dağılımı uygun olanlarda student T testi, dağılımın uygun olmadığı durumda da Mann-Whitney U-testi kullanıldı, değerlendirmelerde $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Dr. Behçet Uz Çocuk Hastanesi Kardiyoloji Bölümüne başvuran 54 ve Dokuz Eylül Üniversitesi Pediatrik Kardiyoloji Bilim Dalına başvuran 4, toplam 58 konjenital siyanotik kalp hastalıklı çocuk hasta grubunu oluşturdu. Siyanotik kalp hastalıklı çocukların ortanca yaşı 2 yıl, ortalama yaşları ise $3,1\pm 3,41$ (0-16 yaş) idi. Otuzaltısı (%62) erkek, 22'si (%38) kızdı.

Konjenital siyanotik kalp hastalıklı çocukların 27'sinde (%46,6) şantsız Fallot tetralojisi, 10'unda (%17,2) patent Blalock-Taussig şanlı (BTŞ) Fallot tetralojisi, 2'sinde (%3,4) pulmoner atrezili Fallot tetralojisi, 2'sinde (%3,4) total anormal pulmoner venöz dönüş anomalisi, 2'sinde (%3,4) Taussig-Bing anomalisi, birer hastada da (%1,7) triküspit atrezisi (TA)+ BTŞ, çift çıkımlı sağ ventrikül+pulmoner stenoz (PS)+patent duktus arteriozus (PDA)+majör aortikopulmoner kollateral arter (MAPKA), tek ventrikül+pulmoner atrezi (PA)+Glenn şant, çift çıkımlı sol ventrikül+büyük arter transpozisyonu (BAT), PA+ventriküler septal defekt (VSD)+MAPKA, PA+VSD+BAT+BTŞ, BAT+PDA+BTŞ, çift çıkımlı sağ ventrikül+BAT+PS+atriyoventriküler septal defekt, TA+PS+atriyal septal defekt+Glenn şantı, çift çıkımlı sağ ventrikül+BAT, BAT+VSD+Eisenmenger sendromu, ağır PS+patent foramen ovale vardı. Ellisekiz hastanın 15'inde (%25,9) patent şant mevcuttu, 13'ünde (%22,4) Blalock-Taussig şant, ikisinde (%3,4) Glenn şant vardı.

Kontrol grubunu ise Şubat 2005 - Haziran 2006 arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları polikliniklerine başvuran 51 çocuk oluşturdu. Kontrol grubu olgularının ortanca yaşı 2 yıl ve ortalama yaşları $2,39\pm 2,24$ (0-12 yaş) idi. Yirmidokuzu (%57) erkek, 22'si (%43) kızdı.

KSKH'li olguların ve kontrol grubu olgularının yaş, cins dağılımlarında farklılık saptanmadı (**Tablo III**).

Tablo III: Çalışma Gruplarının Yaş ve Cinsine Göre Dağılımları

	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	p
N	58	51	
Ortanca yaş	2 yıl	2 yıl	>0,05
Ortalama yaş	3,1 ± 3,41 yıl (0-16 yaş)	2,39 ± 2,24 yıl (0-12 yaş)	
Cins (E/K)	36/22	29/22	>0,05

Siyanotik kalp hastalıklı grupta ortalama hemoglobin 14,81±2,83 g/dL (8,3-21,3 g/dL), hematokrit %44,83±8,72 (%29,9-66), eritrosit sayısı 5,91±1,36x10⁶/mm³ (3,63-10 x10⁶/mm³), ortalama eritrosit hacmi 77,7±10,6 fL (55,8-112 fL), trombosit sayısı 290.741±88.736/mm³ (82.000-482.000/mm³) bulundu.

Kontrol grubunda ise ortalama hemoglobin 12,31±1,32 g/dL (10,8-17,1 g/dL), hematokrit %36,5±4,54 (%31,8-54), eritrosit sayısı 4,63±0,42x10⁶/mm³ (3,87-6,01/mm³), ortalama eritrosit hacmi 78,7±5,9 fL (68,2-98 fL), trombosit sayısı 294.492±96081/mm³ (161.000-435.000/mm³) bulundu.

İki grubun tam kan sayımı sonuçlarının karşılaştırılmasında KSKH'lı olgu grubunda hemoglobin, hematokrit, eritrosit sayısında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yükseklik ve trombosit sayısında anlamlı düşüklük saptandı (**Tablo IV**). Siyanotik kalp hastalıklı grubun içinde trombosit sayısı tek bir olguda (%1,7) 82.000/mm³ ile 150.000/mm³'in altındaydı.

Şantı olan ve şantı olmayan hastalar karşılaştırıldığında hemoglobin, hematokrit, eritrosit sayısı ve trombosit sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (**Tablo V**).

Siyanotik kalp hastalıklı grupta olguların 22'sinde (%37,9) hematokrit %45'in üzerindeydi. Bu grupta olguların 5'inde hematokrit %60'in (%8,6) üzerindeydi. Hematokriti %45'in üzerinde olan hastaların 9'unda Fallot tetralojisi, 2'sinde Blalock-Taussig şantı olan Fallot tetralojisi vardı, 11'inde ise karmaşık konjenital siyanotik kalp hastalığı vardı.

Tablo IV: Çalışma Gruplarının Laboratuvar Bulgularının Karşılaştırılması

	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	p
Hemoglobin (g/dL)	14,81 ± 2,83 (8,3-21,3)	12,31 ± 1,32 (10,8-17,1)	<0.05
Hematokrit (%)	44,83 ± 8,72 (29,9-66)	36,5 ± 4,54 (31,8-54)	<0.05
Eritrosit sayısı (x10⁶/mm³)	5,91 ± 1,36 (3,63-10)	4,63 ± 0,42 (3,87-6,01)	<0.05
Ortalama eritrosit hacmi (fL)	77,7 ± 10,6 (55,8-112)	78,7 ± 5,9 (68,2-98)	>0.05
Trombosit sayısı (/mm³)	290.741 ± 88736 (82.000-482.000)	294.492 ± 96081 (161.000-435.000)	<0.05

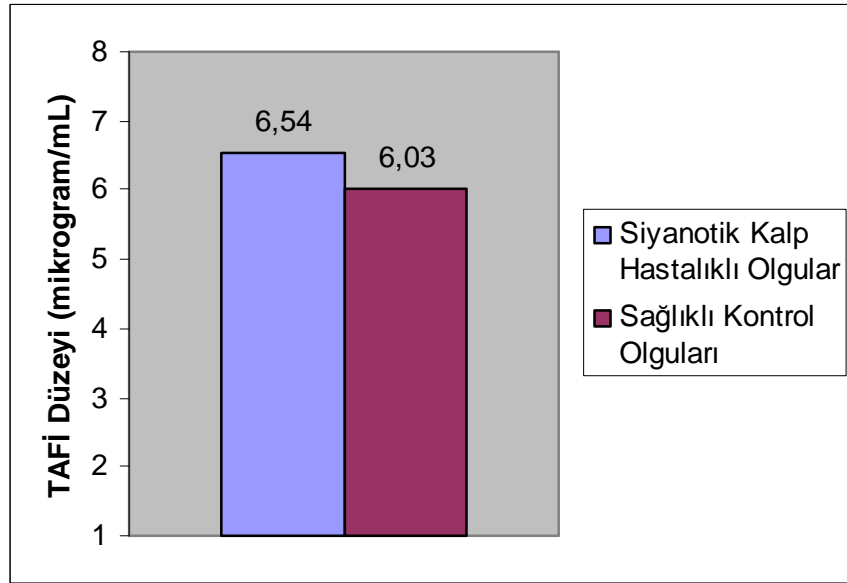
Tablo V: Şanlı ve Şantsız Siyanotik Kalp Hastalığı Olanların Laboratuvar Bulgularının Karşılaştırılması

	Şanlı Siyanotik Kalp Hastalığı Olanlar	Şantsız Siyanotik Kalp Hastalığı Olanlar	p
n (%)	15 (25,9)	43 (74,1)	
Hemoglobin (g/dL)	14,69 ± 1,84 (11,1-18,2)	14,85 ± 3,13 (8,3-21,3)	>0.05
Hematokrit (%)	44,73 ± 5,36 (38,7-60,6)	44,88 ± 9,67 (29,9-66)	>0.05
Eritrosit sayısı (x10⁶/mm³)	5,73 ± 0,86 (4,43-7,6)	5,99 ± 1,50 (3,63-10)	>0.05
Trombosit sayısı (/mm³)	287.733 ± 92.234 (178.000-492.000)	294.492 ± 96081 (161.000-435.000)	<0.05

Siyanotik kalp hastalıklı olgu grubunda tek bir hastada hem PZ, hem aPTZ uzun bulundu, bu hasta şantsız Fallot tetralojisi olan 10 yaşında bir olguydu, PZ'si 17,3 sn ve aPTZ'si 46,3 sn idi. Aynı olgunun hematokriti %59 idi. Büyük arter transpozisyonu + ventriküler septal defekt + Eisenmenger sendromu olan 10 yaşındaki bir hastada ise PZ 16,3 sn, aPTZ 40,2 sn bulundu, aynı hastanın trombosit sayısı da $82.000/mm^3$ idi. Altı (%10,3) olguda ise tek başına PZ'de hafif uzama saptandı.

Planlanmasına rağmen hastaların büyük bir kısmında D-dimer, fibrin yıkım ürünleri, fibrinojen düzeyi çalışılmadığı için bu parametrelerle ilgili değerlendirme yapılamadı.

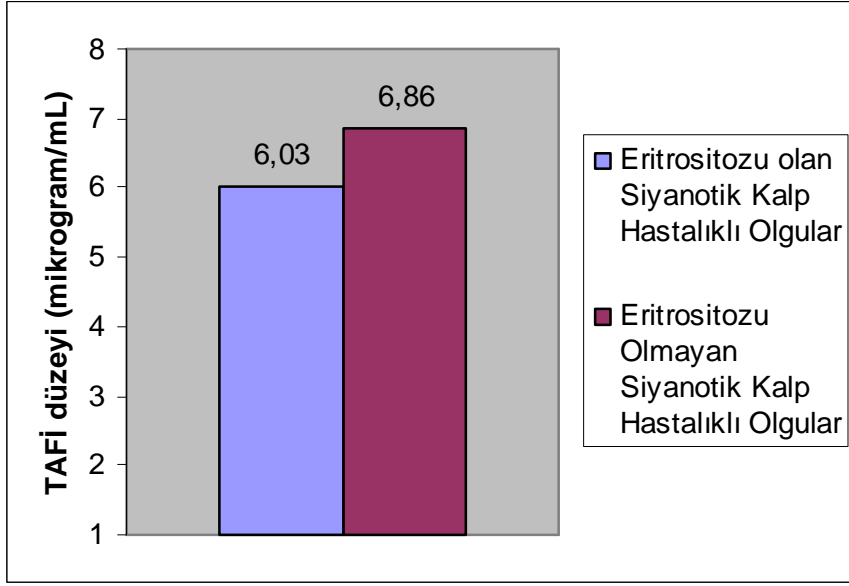
TAFİ antijen düzeyi siyanotik kalp hastalıklı çocuklarda $6.54 \pm 1.24 \mu g/mL$, kontrol grubunda ise $6,03 \pm 1,54 \mu g/mL$ bulundu. İki grup arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0,06$) (Şekil 5).



$p=0,06$

Şekil 5: Siyanotik kalp hastalıklı olgular ve sağlıklı kontrol olgularında plazma TAFİ düzeyi

Siyanotik kalp hastalıklı grubu eritrositozun (hematokrit $> \%45$) olup olmamasına göre iki gruba ayırdığımızda TAFİ antijen düzeyi eritrositozu olan grupta olmayan gruba göre anlamlı olarak düşük bulundu, sırasıyla $6,03 \pm 1,31 \mu g/mL$ (3,69-7,82) ve $6,86 \pm 1,09 \mu g/mL$ (5,04-9,48) ($p=0,031$) (Şekil 5).



p=0,031

Şekil 6: Eritrositozu olan ve olmayan siyanotik kalp hastalıklı olgularda plazma TAFİ düzeyi

5. TARTIŞMA

Konjenital siyanotik kalp hastalıklı hastalarda hemostazdaki değişiklikler 50 yıldan fazladır bilinmektedir. Hemostazdaki değişiklikler hem kanama hem tromboz şeklinde ortaya çıkabilir. Kanama diyatezinin polistemi, trombositopeni, trombosit işlev bozuklukları, yaygın damar içi pıhtılaşması, koagülasyon faktörlerinin yapımının azalması, karaciğer işlev bozukluğu, K vitamini eksikliği, primer fibrinolize bağlı olduğu bildirilmektedir (2,4-9, 14,15).

KSKH'lı olgularda koagülasyon anormalliklerinin primer fibrinoliz ile açıklanabileceği düşünölmüştür ve ilk kez Brodsky ve ark. 1969'da 6 hastada kısa öglobulin lizis zamanına dayanarak antifibrinolitik olarak EACA verilmesiyle düzeltilebilen primer fibrinoliz göstermişlerdir. Bir başka çalışmada da KSKH'deki primer fibrinolizin benzer şekilde EACA ile tedavi edilebileceği gösterilmiştir. Ancak yapılan bu araştırmaların çoğu oldukça eski yıllara aittir (2,34).

Fibrinolizi değerlendirmede PZ, aPTZ, fibrin yıkım ürünleri, fibrinojen, D-dimer, tPA, PAİ-1, uPA, TAFİ, TF ve plazmin-antiplazmin kompleksi çalışılabilir. Biz araştırmamızda bunlardan PZ, aPTZ ve oldukça yeni, ve bu hasta grubunda yeri çok iyi bilinmeyen bir fibrinoliz inhibitörü olan TAFİ'yi çalıştık.

PZ ve aPTZ sonuçlarında tek bir hastada yaşına göre hem PZ, hem aPTZ uzun idi, bu hasta şantsız Fallot tetralojisi olan, hematokriti de yüksek olan bir olguydu. Hafif trombositopenisi olan büyük arter transpozisyonu + ventriküler septal defekt + Eisenmenger sendromu olan bir hastada ise tek başına PZ uzunluğu vardı. Hastaların %10,3'ünde ise tek başına hafif PZ uzunluğu vardı. Bu hastalarda karaciğer fonksiyon testlerinin normal olması nedeniyle D-dimer bakılamasa da kronik subklinik YDİP'ye veya K vitamininin barsaklardan emilim bozukluğuna bağlı koagülasyon faktörlerinin yetersiz yapımına bağlı PZ, aPTZ uzaması olabileceği düşünöldü. Literatürde konjenital kalp hastalıklı 235 olguda 1987'de hemostaz testleri çalışılmıştır (4). Olguların 45'inde (%19) anormal sonuçlar elde edilmiştir; 29 hastada (%12) sadece bir testte, ve 16 hastada (%7) ≥ 2 testte anormallik saptanmıştır. Goel ve ark. da hemostatik bozuklukların KSKH'lı olgularda sık göröldüğünü doğrulamışlardır (37). Yazarlar trombosit sayısı, kanama zamanı, PZ, aPTZ, fibrinojen düzeyi, D-dimer, faktör VII ve VIII ve antitrombini değerlendirmişlerdir. Birden fazla testte bozukluk görölmeleri siyanotik çocuklarda anlamlı olarak daha fazla izlenmiştir. Siyanotik çocukların büyük kısmında yüksek D-dimer düzeylerinin bulunması YDİP'yi desteklemektedir.

Trombosit sayısı çalışmamızda KSKH'lı çocuklarda anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Ancak siyanotik kalp hastalıklı grubun içinde trombosit sayısı tek bir olguda (%1,7) $82.000/mm^3$ ile $150.000/mm^3$ 'in altındaydı. Trombosit sayısı ve hematokrit düzeyleri ters orantılı görülmektedir. Literatürde polistemi ile ilişkili olarak trombosit sayılarında hafif ($100.000-150.000/mm^3$), bazen de $50.000/mm^3$ gibi ağır azalma bildirilmiştir (4-8,19). Onyedisi siyanotik kalp hastalıklı çocuk ile yapılan bir çalışmada 13 olguda trombositopeni ($150.000/mm^3$ 'ün altında trombosit sayısı) saptandığı bildirilmiştir. Ancak bu çalışmada trombosit sayısı ve kanama zamanı arasında korelasyon saptanmamış, bu nedenle hastalarda trombosit fonksiyon bozukluğunun olabileceği düşünülmüştür (22). KSKH'lı çocuklarda trombosit fonksiyon bozukluğunun görüldüğü ve konjenital kalp defekti için yapılan düzeltici cerrahiden sonra düzeldiği birçok yazar tarafından bildirilmiştir (26-28). Bu yazarların çalışmalarında trombosit salınım anormalliklerinin (anormal epinefrin konsantrasyonu, adenozin 5' difosfat veya azalmış kollajen agregasyonu) ve düşük protrombin düzeylerinin temel hemostaz bozuklukları olduğu ve polisteminin ağırlığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (29).

Koagülasyon ve fibrinolitik sistem arasındaki bağlantıyı sağlayan ve trombin tarafından aktive edilebilen fibrinoliz inhibitörü olan TAFİ'nin konjenital siyanotik kalp hastalarındaki hemostaza olan etkisini incelemek için TAFİ antijeninin plazma düzeylerine baktığımızda hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir farklılık olmadığını gördük ($p<0,05$). Ancak hasta grubunda eritrositozu olan (hematokrit >45) olgular ayrıca incelendiğinde bu grubu oluşturan 22 hastada (%37,9) TAFi Ag düzeyi eritrositozu olmayan hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu, sırasıyla $6,03\pm 1,31\mu g/mL$ ($3,69-7,82$) ve $6,86\pm 1,09\mu g/mL$ ($5,04-9,48$) ($p=0,031$).

Bu konuda bizim yaptığımız bu çalışma dışında literatürde siyanotik konjenital kalp hastalığında fibrinolizin TAFİ ile değerlendirildiği tek bir çalışma bulunmuştur. Yumoto ve ark. tarafından yapılan bu çalışmada bir yaşın üzerinde, kardiyovasküler cerrahi geçiren 28 konjenital kalp hastalıklı çocukta TAFİ aktivitesi çalışılmıştır. Yirmisekiz hastanın 10'u siyanotik kalp hastalığı, 18'i asiyanotik konjenital kalp hastalığı imiş. Bu hastalardan anestezi verilirken kan örnekleri toplanmış ve TAFİ aktivitesine %3,8'lik sitratlı plazmada, taze serumda ve trombin-trombomodulin kompleksi ile aktive edilmiş plazmada bakılmış, TAFİ aktivitesi hippuril-L-arjinin sentetik substrat kullanılarak kolorimetrik ölçüm tekniği ile belirlenmiştir. Hematokriti %60'ın üzerinde olan siyanotik konjenital kalp hastalığı olanlarda serum TAFİ aktivitesi ve serum trombin-trombomodulin TAFİ aktivitesi asiyanotiklere göre

6. SONUÇLAR

1. Konjenital siyanotik kalp hastalığı olan olgularda hemoglobin, hematokrit, eritrosit sayısı sağlıklı kontrol grubu olgularına göre anlamlı olarak yüksek bulundu.
2. Bir olguda hem PZ hem aPTZ uzun bulundu, diğer bir olguda ise PZ uzunluğu ile birlikte hafif trombositopeni saptandı. Hastaların %10,3'ünde ise tek başına hafif PZ uzunluğu vardı.
3. TAFİ antijen düzeyi siyanotik kalp hastalıklı çocuklarda 6.54 ± 1.24 $\mu\text{g/mL}$, kontrol grubunda ise $6,03 \pm 1,54$ $\mu\text{g/mL}$ bulundu. İki grup arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0,06$).
4. Siyanotik kalp hastalıklı grubu eritrositozun (hematokrit >45) olup olmamasına göre iki gruba ayırdığımızda TAFİ antijen düzeyi eritrositozu olan grupta olmayan gruba göre anlamlı olarak düşük bulundu, sırasıyla $6,03 \pm 1,31$ $\mu\text{g/mL}$ (3,69-7,82) ve $6,86 \pm 1,09$ $\mu\text{g/mL}$ (5,04-9,48) ($p=0,031$).
5. Hematokriti $\%45$ 'in üzerinde olan konjenital siyanotik kalp hastalıklı olgularda fibrinoliz inhibisyonunun azalmış olabileceği ve bunun sonucunda bu hastalarda kanamaya eğilim olabileceği düşünüldü.

7. KAYNAKLAR

1. Ezakowitz RAB. Hematologic manifestations of systemic diseases. In: Orkin SH, Nathan DG, Ginsburg D, Look AT, Fisher DE, Lux SE (eds). Nathan and Oskis hematology of infancy and childhood, 7th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier;2009:1679-1739.
2. Brodsky I, Gill DN, Lusch CJ. Fibrinolysis in congenital heart disease: Preoperative treatment with ϵ -aminocaproic acid. *Am J Clin Pathol* 1969;51:51-7.
3. Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin –activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1995;270:14477-84.
4. Colon-Otero G, Gilchrist GS, Holcomb GR, et al. Preoperative evaluation of hemostasis in patients with congenital heart disease. *Mayo Clin Proc* 1987;62:379-85.
5. Maurer HM, McCue CM, Robertson LW, Haggins JC. Correction of platelet dysfunction and bleeding in cyanotic congenital heart disease by simple red cell volume reduction. *Am J Cardiol* 1975;35:831-3.
6. Henriksson P, Varendh G, Lundstrom NR. Haemostatic defects in cyanotic congenital heart disease. *Br Heart J* 1979;41:23-7.
7. Gross S, Keefer V, Liebman J. The platelets in cyanotic congenital heart disease. *Pediatrics* 1968;42:651-8.
8. Waldman JD, Czapek EE, Paul M, et al. Shortened platelet survival in cyanotic heart disease. *J Pediatr* 1975;87:77-9.
9. Goldschmidt B. Effect of vitamin K on clotting factors in children with congenital cyanotic heart disease. *Acta Pediatr Acad Sci Hung* 1970;11:135-9.
10. Dennis LH, Stewart JL, Conrad ME. Heparin treatment of haemorrhagic diathesis in cyanotic congenital heart disease. *Lancet* 1967;1:1088-9.
11. Ihenacho HN, Breeze GR, Fletcher DJ, Stuart J: Consumption coagulopathy in congenital heart disease. *Lancet* 1973;1:231-4.
12. Komp DM, Sparrow AW. Polycythemia in cyanotic heart disease: A study of altered coagulation. *J Pediatr* 1970;76:231-6.
13. Guay J, Rivard GE. Mediastinal bleeding after cardiopulmonary bypass in pediatric patients. *Ann Thorac Surg* 1996;62:1955-60.

14. Bahnson HT, Ziegler RF. A consideration of the causes of death following operation for congenital heart disease of the cyanotic type. *Surg Gynecol Obstet* 1950;90:60.
15. Hartmann RC. A haemorrhagic disorder occurring in patients with cyanotic congenital heart disease. *Bull John Hopkins Hosp* 1955;91:49.
16. Tempe Dk, Virmani S. Coagulation abnormalities in patients with cyanotic congenital heart disease. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2002;16:752-65.
17. Naiman JL. Clotting and bleeding in cyanotic congenital heart disease. *J Pediatr* 1970;76:333-5.
18. Gidding SS, Bessel M, Liao YL. Determinants of hemoglobin concentration in cyanotic heart disease. *Pediatr Cardiol* 1990;11:121-5.
19. Perloff JK, Rosove MH, Sietsema KE, Territo MC. Cyanotic congenital heart disease: A multisystem disorder. In Perloff JK, Chil JS (eds): *Congenital Heart Diseases in Adults* (ed 2). Philadelphia, PA, WB Saunders, 1998, pp 199-226.
20. Golde DW, Hocking WG, Koeffler HP, Adamson JW. Polycythemia: Mechanisms and management. *Ann Intern Med* 1981;95:71-87.
21. Gidding SS, Stockman JA III, Goldwasser E. Erythropoietin in cyanotic heart disease. *Am Heart J* 1988;116:128-32.
22. Tyndall MR, Teitel DF, Lutin WA, et al. Serum erythropoietin levels in patients with congenital heart disease. *J Pediatr* 1987;110:538-544.
23. Grotta JC, Manner C, Pettigrew LC, Yatsu FM. Red blood cell disorders and stroke. *Stroke* 1986;17:811-7.
24. Wells R. Syndromes of hyperviscosity. *N Engl J Med* 1970;283:183-6.
25. Gaiha M, Sethi HP, Sudha R, et al. A clinicohematological study with hyperviscosity symptoms in cyanotic congenital heart disease. *Ind Heart J* 1993;45:53-5.
26. Maurer Hm, McCue CM, Caul J, Still WJS. Impairment in platelet aggregation in congenital heart disease. *Blood* 1972;40:207-16.
27. Bhargava M, sanyal SK, Thapar MK, et al. Impairment of platelet adhesiveness and platelet factor 3 activity in cyanotic congenital heart disease. *Acta Hematol* 1976;55:216-23.
28. Ekert H, Sheers M. Preoperative and postoperative platelet function in cyanotic congenital heart disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1974;67:184-90.
29. Ekert H, Dowling SV. Platelet release abnormality and reduced prothrombin levels in children with cyanotic congenital heart disease. *Scand J Haematol* 1974;13:110-5.

30. Replogle RL, Meiselman HJ, Merrill EW. Clinical implications of blood rheology studies. *Circulation* 1967;36:148-60.
31. Dennis LH, Stewart JL, Conrad ME. A consumption coagulation defect in congenital cyanotic heart disease and its treatment with heparin. *J Pediatr* 1967;71:407-10.
32. Ekert H, Gilchrist GS. Coagulation studies in congenital heart disease. *Lancet* 1968;2:280.
33. Johnson CA, Abildgaard CF, Schulman I. Absence of coagulation abnormalities in children with cyanotic congenital heart disease. *Lancet* 1968;2:660-662.
34. Galnack HR. ϵ -Aminocaproic acid in preoperative correction of hemostatic defect in cyanotic congenital heart disease. *Lancet* 1970;1:1204-5.
35. McLoughlin TM Jr, Greilich PE. Preexisting hemostatic defects and bleeding disorders. In Lake CL, Moore RA (eds): *Blood: Hemostasis, Transfusion and Alternatives in the Perioperative Period*. New York, NY: Raven Press, 1995, pp 25-70.
36. Kern FH, Morana NJ, Sears JJ, Hickey PR. Coagulation defects in neonates during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1992;54:541-6.
37. Goel M, Shome DK, Singh ZN, et al. Haemostatic changes in children with cyanotic and acyanotic congenital heart disease. *Ind Heart J* 2000;52:559-63.
38. Levin E, Wu J, Devine DV, et al. Hemostatic parameters and platelet activation marker expression in cyanotic and acyanotic pediatric patients undergoing cardiac surgery in the presence of tranexamic acid. *Thromb Haemost* 2000;83:54-9.
39. Dietrich W, Mossinger H, Spannagl M, et al. Hemostatic activation during cardiopulmonary bypass with different aprotinin dosages in pediatric patients having cardiac operations. *J Thrac Cardiovasc Surg* 1993;105:712-20.
40. Furie B, Furie BC. Molecular Basis of Blood Coagulation. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Silberstein LE, McGlave P, Heslop HE (eds). *Hematology: Basic Principles and Practice*, 4th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone;2009:1819-1836.
41. Mazza JJ. *Manual of Clinical Hematology*. Third edition. Lippincott Williams & Wilkins 2002.
42. Lijnen HR, Collen D. Molecular and cellular basis of fibrinolysis. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Silberstein LE, McGlave P, Heslop H. (eds). *Hematology: Basic Principles and Practice*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier;2009:1837-1841.

43. Brose GJ, Warren LA, Novotny WF, et al. The lipoprotein associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: insight into its possible mechanism of action. *Blood* 1988;71:335-43.
44. Willemse JL, Hendriks DF. Measurement of procarboxypeptidase U (TAFI) in human plasma: a laboratory challenge. *Clin Chem* 2006;52:30-6.
45. Bouma BN, Mosnier LO. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) at the interface between coagulation and fibrinolysis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33:375-81.
46. Nesheim M. Thrombin and fibrinolysis. *Chest* 2003;124:33S-9S.
47. Boffa MB, Nesheim ME, Koschinsky ML. Thrombin activable fibrinolysis inhibitor (TAFI): molecular genetics of an emerging potential risk factor for thrombotic disorders. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2001;1:59-74.
48. Boffa MB, Koschinsky ML. Curiouser and curiouser: recent advances in measurement of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and in understanding its molecular genetics, gene regulation, and biologic roles. *Clin Biochem* 2007;40:431-42.
49. Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin –activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1995;270:14477-84.
50. Hendriks D, Scharpe S, van Sande M, Lommaert MP. Characterization of a carboxypeptidase in human serum distinct from carboxypeptidase. *N J Clin Chem Clin Biochem* 1989;27:277-85.
51. Campbell W, Okada H. An arginine specific carboxypeptidase generated in blood during coagulation or inflammation which is unrelated to carboxypeptidase N or its subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;162:933-9.
52. Eaton DL, Malloy BE, Tsai SP, Henzel W, Drayna D. Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma. *J Biol Chem* 1991;266:21833-8.
53. Bajzar L, Nesheim M. The effect of activated protein C on fibrinolysis in cell-free plasma can be attributed specifically to attenuation of prothrombin activation. *J Biol Chem* 1993;268:8608-16.
54. Vanhoof G, Wauters J, Schatteman K, et al. The gene for human carboxypeptidase U (CPU) – A proposed novel regulator of plasminogen activation-maps to 13q14.11. *Genomics* 1996;38:454-5.
55. Shinohara T, Sakurada C, Suzuki T, et al. Pro-carboxypeptidase R cleaves bradykinin following activation. *Int Arch Allergy Immunol* 1994;103:400-4.

56. Boffa MB, Wang W, Bajzar L, Nesheim ME. Plasma and recombinant thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and activated TAFI compared with respect to glycosylation, thrombin/thrombomodulin-dependent activation, thermal stability, and enzymatic properties. *J Biol Chem* 1998;273:2127-35.
57. Valnickova Z, Christensen T, Skottrup P, Thogersen IB, Hojrup P, Enghild JJ. Post-translational modifications of human thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI): evidence for a large shift in the isoelectric point and reduced solubility upon activation. *Biochemistry* 2006;45:1525-35.
58. Hendriks D, Wang W, Scharpe S, Lommaert MP, van Sande M. Purification and characterization of a new arginine carboxypeptidase in human serum. *Biochim Biophys Acta* 1990;1034:86-92.
59. Tan AK, Eaton DL. Activation and characterisation of procarboxypeptidase B from human plasma. *Biochemistry* 1995;34:5811-6.
60. Marx PF, Harma T, Brondijk C, Plug T, Romijn RA, Hemrika W, Meijers JCM, Huizinga EG. Crystal structures of TAFI elucidate the inactivation mechanism of activated TAFI. *Blood* 2008;112:2803-9.
61. Bajzar L, Morser J, Nesheim M. TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem* 1996;271:16603-8.
62. Broze Jr GJ, Higuchi DA. Coagulation-dependent inhibition of fibrinolysis: role of carboxypeptidase-U and the premature lysis of clots from hemophilic plasma. *Blood* 1996;88:3815-23.
63. Vondem PA, Borne L, Bajzar JC, Meijers ME, Nesheim BN. Thrombin-mediated activation of factor XI results in a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-dependent inhibition of fibrinolysis. *J Clin Invest* 1997;99:2323-7.
64. Mao SS, Cooper CM, Wood T, Shafer JA, Gardell SJ. Characterization of plasmin-mediated activation of plasma procarboxypeptidase B. Modulation by glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 1999;274:35046-52.
65. Wang W, Boffa MB, Bajzar L, Walker JB, Nesheim ME. A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1998;273:27176-81.
66. Walker JB, Nesheim ME. A kinetic analysis of the tissue plasminogen activator and DSPAalpha1 cofactor activities of untreated and TAFIa treated soluble fibrin degradation products of varying size. *J Biol Chem* 2001;276:3138-48.

67. Sakharov DV, Plow EF, Rijken DC. On the mechanism of the antifibrinolytic activity of plasma carboxypeptidase B. *J Biol Chem* 1997;272:14477-82.
68. Schneider M, Brufatto N, Neill E, Nesheim M. Activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor reduces the ability of high molecular weight fibrin degradation products to protect plasmin from antiplasmin. *J Biol Chem* 2004;279:13340-5.
69. Sosothikul D, Seksarn P, Pongsewalak S, Thisyakorn U, Lusher J. Activation of endothelial cells, coagulation and fibrinolysis in children with Dengue virus infection. *Thromb Haemost.* 2007;97:627-34.
70. Knoefler R, Ludwig K, Kostka H, Kuhlisch E, Siegert G, Suttrop M. The impact of single nucleotide polymorphisms of the thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene on TAFI antigen levels in healthy children and pediatric oncology patients. *Semin Thromb Hemost.* 2003;29:575-83.
71. van Gorp EC, Minnema MC, Suharti C, Mairuhu AT, Brandjes DP, ten Cate H, Hack CE, Meijers JC. Activation of coagulation factor XI, without detectable contact activation in Dengue haemorrhagic fever. *Br J Haematol.* 2001;113:94-9.
72. Harmanci A, Kandemir N, Dagdelen S, Gonc N, Buyukasik Y, Alikasifoglu A, Kirazli S, Ozon A, Gurlek A. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor activity and global fibrinolytic capacity in Type 1 diabetes: evidence for normal fibrinolytic state. *J Diabetes Complications* 2006;20:40-4.
73. Tripatara A, Jetsrisuparb A, Teeratakulpisarn J, Kuaha K. Hemostatic alterations in splenectomized and non-splenectomized patients with beta-thalassemia/hemoglobin E disease. *Thromb Res.* 2007;120:805-10.
74. Sonmez M, Aydin K, Durmus A, Sucu N, Yilmaz M, Akdogan E, Koksall I, Ovali E, Omay SB. Plasma activity of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Infect.* 2007;55:184-7.
75. Emonts M, de Bruijne EL, Guimarães AH, Declerck PJ, Leebeek FW, de Maat MP, Rijken DC, Hazelzet JA, Gils A. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor is associated with severity and outcome of severe meningococcal infection in children. *J Thromb Haemost.* 2008;6:268-76.
76. Wang W, Ji CY, Ye JJ, Zhu YY, Guo DM, Ji M. Study of fibrinolysis inhibitors in 117 acute leukemia patients. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2008;29:183-6.
77. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology.* Lanzkowsky P (ed) 4th ed. Philadelphia:Elsevier;2005:788.

78. Yumoto M, Komura H, Katsuya H, Okada N, Okada H. Fibrinolysis inhibitors in pediatric heart surgery carboxypeptidase R and Cyanotic congenital heart disease. *Anesthesiology* 2002;96:A1225.
79. Wada H, Nobori T, Watanabe R, Shiku H, Sakuragawa N. Plasma levels of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in patients with disseminated intravascular coagulation (DIC). *Turk J Haematol* 2002;19:235-7.
80. Ermantas N, Guldiken S, Demir M, Tugrul A. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) antigen and activity assay in patients with primary hypothyroidism. *Clin Appl Thromb Hemost* 2009 (Epub).
81. Ceresa E, Brouwers E, Peeters M, Jern C, Declerck PJ, Gils A. Development of ELISAs measuring the extent of TAFI activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 ;26:423-8.