ÖZNUR GÜREL

TIP-FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

2024

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI

MONONÜKLEER LÖKOSİTLERİN TROMBOSİT FONKSİYONLARI VE HEMOSTAZ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZNUR GÜREL

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2024

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI

MONONÜKLEER LÖKOSİTLERİN TROMBOSİT FONKSİYONLARI VE HEMOSTAZ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Öznur GÜREL

ORCID 0009-0008-9427-311X

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN

Doç. Dr. Engin SAĞDİLEK

EŞ DANIŞMAN

Doç. Dr. Diğdem YÖYEN ERMİŞ

BURSA-2024

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Fizyoloji Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum "**Mononükleer Lökositlerin Trombosit Fonksiyonları ve Hemostaz Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallara uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

ÖZNUR GÜREL
Tarih ve İmza

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Fizyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Öznur GÜREL tarafından hazırlanan "**Mononükleer Lökositlerin Trombosit Fonksiyonları Ve Hemostaz Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**" konulu Yüksek Lisans tezi ……/……/……günü, ……-…… saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	**İmza**
Tez Danışmanı **ORCID Numarası**	Doç. Dr. Engin SAĞDİLEK 0000-0001-8696-4035	
Üye **ORCID Numarası**	Prof. Dr. Naciye İŞBİL 0000-0002-8792-2555	
Üye **ORCID Numarası**	Doç. Dr. Evren KILINÇ 0000-0002-1697-6580	

Bu Tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun ……. tarih ve ……. sayılı toplantısında alınan …… numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

...../...../.....

Adı Soyadı: Öznur GÜREL

Anabilim Dalı: FİZYOLOJİ

Tez Konusu: Mononükleer Lökositlerin Trombosit Fonksiyonları ve Hemostaz Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

ÖZELLİKLER	**UYGUNDUR**	**UYGUN DEĞİLDİR**	**AÇIKLAMA**
Tezin Boyutları	■	❑	
Dış Kapak Sayfası	■	❑	
İç Kapak Sayfası	■	❑	
Kabul Onay Sayfası	■	❑	
Sayfa Düzeni	■	❑	
İçindekiler Sayfası	■	❑	
Yazı Karakteri	■	❑	
Satır Aralıkları	■	❑	
Başlıklar	■	❑	
Sayfa Numaraları	■	❑	
Eklerin Yerleştirilmesi	■	❑	
Tabloların Yerleştirilmesi	■	❑	
Kaynaklar	■	❑	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Doç. Dr. Engin SAĞDİLEK

İmza:

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN……II
KABUL ONAY……III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU……IV
İÇİNDEKİLER……V
TÜRKÇE ÖZET……VII
İNGİLİZCE ÖZET……VIII
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ……IX
1. GİRİŞ……1
2. GENEL BİLGİLER……4
2.1. Hemostaz……4
2.1.1. Vazokonstriksiyon……4
2.1.2. Birincil Hemostaz……4
2.1.3. Sekonder Hemostaz……5
2.1.4. Fibrinolizis……7
2.2. Trombositlerin Morfolojisi ve Fonksiyonları……9
2.3. Monositler……12
2.3.1. Monosit çeşitleri……13
2.4. Trombosit-Monosit Etkileşimi……20
2.5. Lenfositler……22
2.5.1. T Hücreleri……22
2.5.2. B Hücreleri……23
2.5.3. Doğal Öldürücü Hücreler (Natural Killer [NK] Cells)……23
2.6. Trombosit-Lenfosit Etkileşimi……25
3. GEREÇ ve YÖNTEM……27
3.1. Gönüllüler……27
3.2. Kan Örneklerinin Alınması……27
3.3. Mononükleer Hücre Miktarının Belirlenmesi……28
3.4. Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu……28
3.5. Optik Agregometre Deneyleri……30
3.6. Tromboelastogram Deneyleri……31
3.7. 0. Saat Deney Prosedürü……34
3.8. 22. Saat Deney Prosedürü……35
3.9. İstatistiksel Analiz……36
4. BULGULAR……37

4.1. Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu ve Monositlerin Uyarılması 37
4.2. Tromboelastogram Sonuçları 38
4.3. Agregometre Sonuçları 50
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 55
6. KAYNAKLAR 60
7. SİMGELER ve KISALTMALAR 68
8. EKLER 70
9. TEŞEKKÜR 76
10. ÖZGEÇMİŞ 77

TÜRKÇE ÖZET

Hemostaz, dokuda meydana gelen hasarı onarma sürecinde meydana gelen ilk tepki olmakla beraber öncelikle trombositlerin, ardından diğer hücre gruplarının etkileşimiyle ve çeşitli moleküllerin aracılığıyla ilerleyen kompleks bir olaydır. Bu süreçte trombositler, birçok görev üstlenir. Trombositlerin, dolaşımdan zedelenen doku alanına adezyonu, granül içeriklerinin salınımı, agregasyonu, fibrin ağının ve hemostatik tıkacın oluşumu, yara iyileşmesi ve immün hücrelerin zedelenen dokuya göçünü sağlamak gibi önemli görevleri vardır.

Trombositler hemostaz sürecinde mononükleer hücreler ile heterotipik etkileşimler kurmaktadır. Çalışmamızda mononükleer hücrelerin hemostaz sürecine etkisini değerlendirmek amacıyla, tüm hemostaz sisteminin gözlemlendiği tromboelastogram ve trombosit agregasyonunun hücre düzeyinde izlendiği optik agregometre cihazları kullanılmıştır. Mononükleer hücrelerin kandan ayrıştırıldıktan hemen sonra (0. saat) ve LPS ile uyarılmadan ve uyarılarak bekletildiği 22 saat sonrası değerlendirmeler yapılmıştır. Trombositten zengin plazma (TZP) üzerine eklenen mononükleer hücre gruplarının ADP ve kolajen ile uyarılan trombosit agregasyonuna etkisi ve kalsiyum eklenerek normal koagülan durumun yeniden sağlandığı tromboelastogram parametrelerine etkisi araştırılmıştır.

Tromboelastogram deneyleri, LPS ile uyarılarak ve uyarılmadan, 22 saat inkübe edilen mononükleer hücre gruplarının hiperkoagülan etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Trombosit agregasyonunun hücre düzeyinde değerlendirildiği optik agregometrede, LPS ile uyarılarak ve uyarılmadan, 22 saat inkübe edilen mononükleer hücre gruplarının agregasyonu inhibe ettiği gözlemlenmiştir.

Agregometre de trombositlerin inhibe olması, tromboelastogramda ise hemostazın aktive olması birbirine tezat sonuçlar olarak görünmektedir. Bu etkinin agregasyon çalışmalarındaki antikoagülan ortamdan kaynaklanabileceği, tromboelastogramda ise ortama kalsiyum eklenmesinin normal fizyolojik koşulları daha iyi yansıttığı düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: Hemostaz, trombositler, mononükleer hücreler, agregometre, tromboelastogram. trombosit-monosit agregasyonu.

İNGİLİZCE ÖZET

Investigation of the Effects of Mononuclear Leukocytes on Platelet Functions and Hemostasis

Although hemostasis is the first response in the process of repairing damage to the tissue, it is a complex event that progresses primarily through the interaction of platelets, then other cell groups, and through various molecules. In this process, platelets undertake many tasks. Platelets have important functions such as adhesion from the circulation to the injured tissue area, release of granule contents, aggregation, formation of the fibrin network and hemostatic plug, wound healing and migration of immune cells to the injured tissue.

Platelets establish heterotypic interactions with mononuclear cells during the hemostasis process. In our study, in order to evaluate the effect of mononuclear cells on the hemostasis process, thromboelastogram, in which the entire hemostasis system is observed, and optical aggregometer devices, in which platelet aggregation is monitored at the cell level, were used. Evaluations were made immediately after mononuclear cells were separated from the blood (0th hour) and after 22 hours, when they were kept without stimulation with LPS or with stimulation. The effect of mononuclear cell groups added to platelet-rich plasma (PRP) on ADP and collagen-stimulated platelet aggregation and the effect of calcium addition on thromboelastogram parameters, where the normal coagulant state is restored, was investigated.

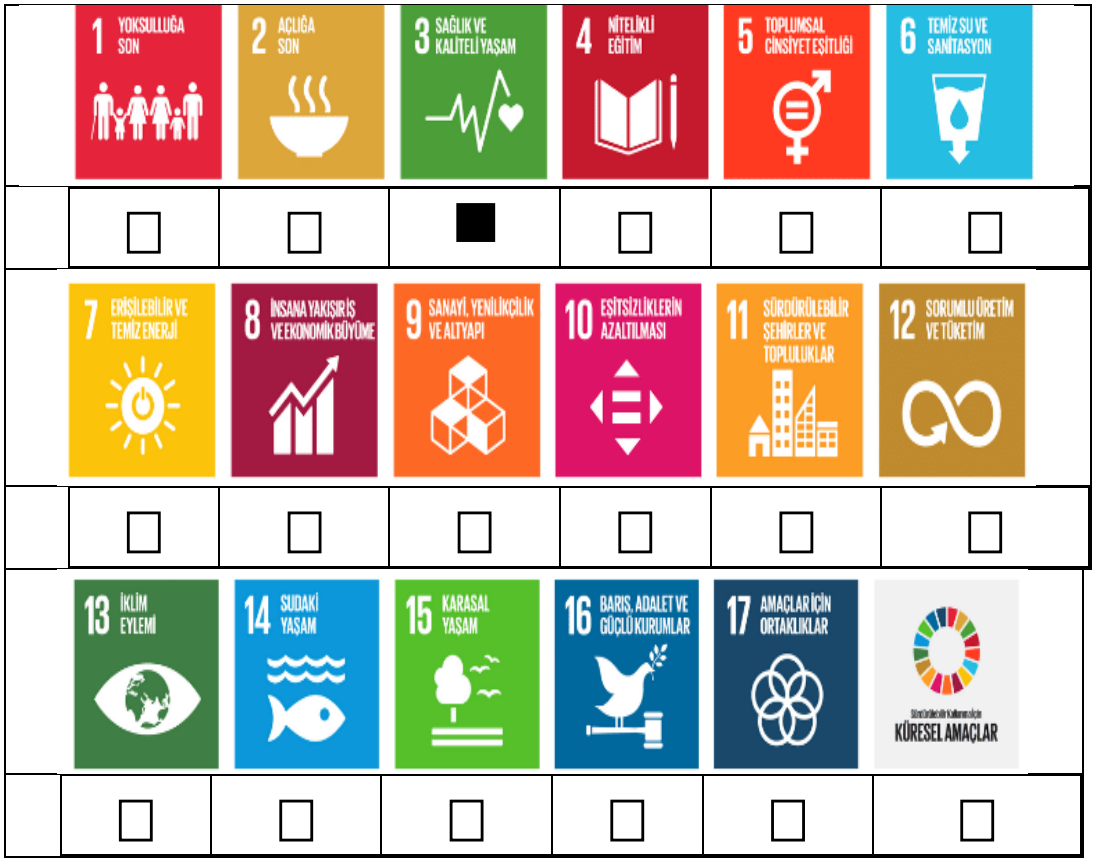
Thromboelastogram experiments revealed that mononuclear cell groups incubated for 22 hours, with and without stimulation with LPS, showed a hypercoagulant effect. In the optical aggregometer, where platelet aggregation was evaluated at the cell level, it was observed that mononuclear cell groups incubated for 22 hours, with or without stimulation with LPS, inhibited aggregation.

The inhibition of platelets in the aggregometer and the activation of hemostasis in the thromboelastogram appear to be contradictory results. It can be thought that this effect may be due to the anticoagulant environment in aggregation studies, and the addition of calcium to the medium in the thromboelastogram better reflects normal physiological conditions.

Keywwords: Hemostasis, platelets, mononuclear cells, aggregometer, thromboelastogram. platelet-monocyte aggregation.

BUÜ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ



Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum **"Mononükleer Lökositlerin Trombosit Fonksiyonları ve Hemostaz Üzerine Etkilerinin İncelenmesi"** başlıklı tez **3.** Küresel Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri ile ilişkilidir.

Anahtar kelimeler aşağıdaki bağlantı üzerinden https://incites.help.clarivate.com/Content/Resources/Docs/SDG2023.xlsx seçilmelidir.

1. GİRİŞ

Trombositler hemostazda kilit oyunculardır ve yaralanma anında aşırı kanamayı önlerler. Damar hasarına yanıt olarak, trombositler yara bölgelerine yapışır ve aktive olur, bu da daha fazla trombosit toplanmasına ve trombüs oluşumuna yol açar. Yaralanma enfeksiyon için bir risk oluşturduğundan, trombositler doğrudan hücre-hücre temasları yoluyla ve dolaylı olarak sitokinler ve trombosit kaynaklı mikroveziküller yoluyla lökositleri toplar ve aktive eder. Aktive edilmiş trombositlerdeki P-selektin Glikoprotein Ligand-1 (PSGL-1), lökositlerdeki P-selektin (CD62P) ile doğrudan etkileşime girer. Bu ilk bağlanma, lökosit alt tipine bağlı olarak çeşitli diğer reseptörlerin etkileşimi ile güçlendirilir ve karşılıklı aktivasyona ve bağışıklık tepkilerini modüle eden lokal sitokin salınımına yol açar (Kral, Schrottmaier, Salzmann, & Assinger, 2016; Schrottmaier, Kral, Badrnya, & Assinger, 2015).

Salgılanan faktörler yoluyla dolaylı iletişime ek olarak, trombositlerin heterojen kompleksler oluşturmak için diğer bağışıklık hücreleriyle, başta monositler, ardından nötrofiller ve daha az ölçüde lenfositler ile kümelendiği bildirilmiştir (Fu, Deng, Neal, Billiar, & Scott, 2021; Pluta ve ark, 2022).

Trombositler, doğrudan monositlerle etkileşime girerek monosit yüzeyinde CD40, PSGL-1, CD11b ve CCR2'nin ekspresyonunun artmasına yol açar. Bu da, trombosit-monosit agregat oluşumunu ve endotele daha fazla monosit alımını arttırır (Singh ve ark, 2014).

Trombüs oluşurken trombositler ile polimorfonükleer lökositler (PML) temas halinde bulunurlar. PML'ler metabolik fonksiyonları sırasında ürettikleri bir takım maddeleri ortama salarlar. Bu maddeler arasında hidrojen peroksitte (H_2O_2) yer alır. H_2O_2 trombosit fonksiyonlarını etkiler. Fagositoz işlevini gören PML'lerin çevresine saldığı H_2O_2, çevresindeki eritrositleri hasara uğratırken trombositler üzerine de etkilidir. Canoso, Rodvien, Scoon, & Levine, (1974) tarafından yapılan çalışmada, H_2O_2'nin tek başına agregasyona sebep olmadığını ama ADP, kolajen, trombin ve epinefrin ile indüklenen agregasyonlarda primer agregasyonu ve disagregasyonu etkilediği gösterilmiştir. H_2O_2; PF3 (Trombosit Faktör 3) ve serotonin salınımında ve diğer koagülasyon testlerinde etkili olmamıştır. Katalaz ile H_2O_2'nin etkisi bertaraf

edilmiştir.

Granülositlerin ürettiği H_2O_2'nin aktive olmalarıyla birlikte arttığı, bariz şekilde ADP ile indüklenen agregasyonu inhibe ettiği başka çalışmalarla da gösterilmiştir. Lenfositlerden salınan maddelerin ise trombositler üzerinde inhibe edici bir etkisi gözlenmemiştir (Levine, Weinger, Simon, Scoon, & Krinsky, 1976).

H_2O_2'nin trombosit agregasyonunu inhibe ettiğini gösteren çalışmaların yanı sıra aktive ettiğini gösteren çalışmalarda bulunmaktadır (Clark, & Klebanoff, 1980). Dahası çeşitli antioksidanlar ve H_2O_2'yi ortamdan uzaklaştıran maddeler ile de agregasyonun inhibe edildiği de gösterilmiştir (Finazzi-Agro ve ark, 1984; Steiner, & Anastasi, 1976; Vargaftig, Trainer, & Chignard, 1975; Yoshikawa, Furukawa, Murakami, Watanabe, & Kondo, 1982). Del Principe ve arkadaşlarının (1985), yapmış olduğu çalışmada da katalaz tek başına agregasyonu inhibe ederken, H_2O_2'nin arttırdığı gösterilmiştir.

Aktive lökositler süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksi asitler gibi çeşitli maddeler salarlar ve bu maddelerin farklı uyarıcı ajanlar tarafından indüklenen trombosit agregasyonunu inhibe veya agrege ettiğini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Nötrofillerin trombosit agregasyonunu trombositten zengin plazmada inhibe ettiği gösterilmiştir. Salvemini, De Nucci, Gryglewski, & Vane (1989), yaptıkları çalışmada nötrofiller ve makrofajlar, eklenen hücre sayısıyla doğru orantılı olarak trombinle uyarılan agregasyonu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bu etkinin nötrofillerde cGMP artışı ile, mononükleer hücrelerde ise hem cGMP hem de cAMP artışı üzerinden kaynaklandığını ve bu inhibisyonların SOD (Süperoksit Dismutaz) ile güçlendirildiğini bulmuşlardır

Lökositlerin agregometrede, trombosit agregasyonu üzerine etkilerine dair çalışmalar 1970'lerden 2000'lerin başlarına kadar sürmüştür. Birbirini teyit eden çalışmaların yanısıra, birbirine tamamen zıt sonuçlar veren çalışmalarda bulunmaktadır. Sonrasında agregometre çalışmalarına çok seyrek rastlanmaktadır. Trombosit-lökosit etkileşimleri esas olarak akış sitometrisinde çalışılmaya başlanmıştır. Dolaylı olarak trombosit veya lökosit membranındaki aktif reseptörlerin, moleküllerin saptanması üzerinden yorumlar yapılmaktadır.

Bizim bu tez çalışmasındaki amacımız, lökositlerin temel alt hücre gruplarından biri olan mononükleer hücrelerin (monosit, makrofaj ve lenfositler) trombositler ve

hemostaz ile etkileşimini çalışmaktır. Trombosit agregasyonu üzerine etkiler optik agregometrede, topluca hemostaz üzerine etkiler ise tromboelastogram ile çalışılmıştır. Mononükleer hücrelerin uyarılmış ve uyarılmamış halleri ile mononükleer hücrelerin çevre ortamlarıyla birlikte ve çevre ortamlarından ayrıştırılmış halleri ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Trombositten zengin plazma üzerine eklenen farklı durumdaki mononükleer hücrelerin trombosit agregasyonu (optik agregometre ile) ve pıhtı oluşum dinamikleri (tromboelastogram ile) üzerine etkileri ayrıntılı olarak incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hemostaz

Hemostaz, vasküler dokunun yaralanmasının ardından kanamanın durmasını sağlayarak ve iyileşmenin gerçekleşmesini destekleyerek dört aşamada gerçekleşen bir süreçtir. Vazokonstriksiyon, birincil hemostaz, ikincil hemostaz ve fibrinolizis basamaklarından oluşur.

2.1.1. Vazokonstriksiyon

Vazokonstriksiyon, kanamanın durdurulması amacıyla düz kasların kasılarak daralması sürecidir. Bu süreç, vasküler düz kasların refleks kontraksiyonuyla gerçekleşir ve hasarlı endotelyumdan salınan endotelin gibi vazokonstriktörler kasılmayı tetikler. Bu daralma, kan akışının azaltılmasına ve kanamanın kontrol altına alınmasına yardımcı olur (Godo, & Shimokawa, 2017).

Aynı zamanda trombositler, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi faktörler salgılayarak damar duvarlarındaki düz kas hücrelerinin aktivasyonunu ve çoğalmasını teşvik ederek doku onarım sürecine katkıda bulunurlar (Berk, Alexander, Brock, Gimbrone, & Webb, 1986).

Damarda meydana gelen bu daralma kanamayı azaltır. Zedelenen dokuda asidoz ve hipoksi koşullarının oluşmasıyla kas bir miktar gevşeyerek kanamanın devam etmesine neden olur. Kanamanın durdurulması için zedelenen doku bölgesinde bir tıkaç oluşturulması gerekir. Bu tıkacın oluşturulması için, pıhtılaşma süreci etkisini göstermeye başlar.

2.1.2. Birincil Hemostaz

Dokudaki zedelenme ile ortaya çıkan subendotelyal matriks kan ile temasa geçer. Subendotelyal matrikste bulunan kolajen trombosit reseptörlerinden GPVI ve α2β1 ile, fibronektin integrin aracılığıyla αIIbβ3, αVβ3, α5β1 reseptörleri ile ve laminin α6β1 reseptörü ile etkileşime girer (Houdijk, de Groot, Nievelstein, Sakariassen, & Sixma, 1986).

Subendotelyal matrikste açığa çıkan kolajen, kan dolaşımında bulunan von Willebrand faktörünü (vWF) tutar ve daha sonra bu faktör trombosit yüzeyindeki GPIb-IX-V reseptör kompleksine bağlanarak trombositlerin toplanmasını sağlar (Sang, Roest, de Laat, de Groot, & Huskens, 2021). Kolajenin GPVI ile kurduğu etkileşim trombosit-endotel bağlantısını kuvvetlendirir ve trombosit aktivasyonunu arttırır (Arthur ve ark, 2005). Bu etkileşim ile birlikte hücre sinyalizasyonu gerçekleşir ve fosfolipaz Cγ (PLCγ) aktifleştirilir. Aktifleşen PLCγ, hücre zarında bulunan fosfatidilinositol-4,5-bisfosfatı (PIP2) inositol trisfosfat (IP3) ve 1,2-diasilgliserol (DAG) olarak hidroliz eder. Hidroliz sonucu oluşan IP3, trombositte bulunan yoğun tübüler sistemdeki (DTS) reseptörüne bağlanarak kalsiyumun tübüler sistemden sitoplazmaya geçmesini sağlar. Diğer yandan membrana bağlı DAG, kalsiyum ile birlikte protein kinaz C'yi (PKC) uyarır. PKC hücresel fonksiyonları aktive ederek trombositlerin şekil değiştirmesini ve granüllerin salınmasını sağlar (Li, Delaney, O'Brien, & Du, 2010).

Trombositlerin delta granüllerinden ADP, serotonin, epinefrin ve kalsiyum gibi trombosit agregasyonunu arttırıcı moleküller salgılanır. Trombosit içinde oluşan biyoaktif lipitler, ilk aktivasyon sonrasında trombin ve kolajen aracılığıyla başlatılan birincil sinyalin güçlendirilmesinde yardımcı olurlar. Trombositte bulunan purinerjik reseptör 1 ve 12 (P2Y1 ve P2Y12) ADP ile aktive olarak trombosit aktivasyonunda görev alırlar (Holinstat, 2017).

Trombositlerde araşidonik asidin siklooksijenaz-1 (COX-1) ve 12-lipoksijenaz (12-LOX) enzimleri aracılığıyla ürettiği PGE2 ve TxA2 trombosit aktivasyonunun güçlendirilmesinde rol oynar (Yeung, Hawley, & Holinstat, 2017).

2.1.3. Sekonder Hemostaz

Koagülasyon faktörlerinin aktivasyonu, pıhtılaşma sürecinde kritik bir adımdır. Bu süreçte, dolaşımda bulunan inaktif proenzimler, aktif enzimlere dönüşerek pıhtılaşma kaskadının başlatılmasını sağlar. Faktör IV (Ca^{2+}) dışındakiler proteindir ve çoğunlukla inaktif proenzim formunda bulunurlar. Faktör V ve VIII enzim yapılarında değildir, bunun yerine kemik iliğinde megakaryositler tarafından üretilirler. Trombositlerde depolanır ve trombosit aktivasyonuyla salınır. Faktör V ve

VIII, trombinin yapısını güçlendirerek pıhtı oluşumunu desteklerler (Szántó, Joutsi-Korhonen, Deckmyn, & Lassila, 2012).

Faktör III veya doku tromboplastini olarak bilinen doku faktörü (TF), subendotelyal alanda bulunur, dolaşıma katılmaz (Atalan, 2013).

Koagülasyon sistemi iki yolak üzerinden ilerler. Hageman faktörünün (Faktör XII) aktive olmasıyla intrinsik yolak başlarken doku zedelenmesini takiben salınan doku faktörü ile ekstrinsik yolak başlar (Şekil 1).

Doku faktörü, Faktör VII ile etkileşime girerek Faktör VIIa'yı oluşturur. Bu kompleks daha sonra Faktör IX ve X'u aktive eder. Ekstrinsik yolak böylece gerçekleşmiş olur.

İntrinsik yolakta FXII'nin FXIIa'ya dönüşmesinde yüksek moleküler ağırlıklı kininojen (HMWK) ve prekallikrein önemli rol oynar. FXIIa FXI'i aktifleştirir ve sırasıyla FIX, FVIII aktifleştirilir. Hem içsel (intrinsik) hem de dışsal (ekstrinsik) pıhtılaşma yolları, ortak bir noktada, yüksek aktiviteye sahip Faktör X'un (aktif Faktör X) oluşturulmasıyla birleşir (Sang ve ark, 2021).

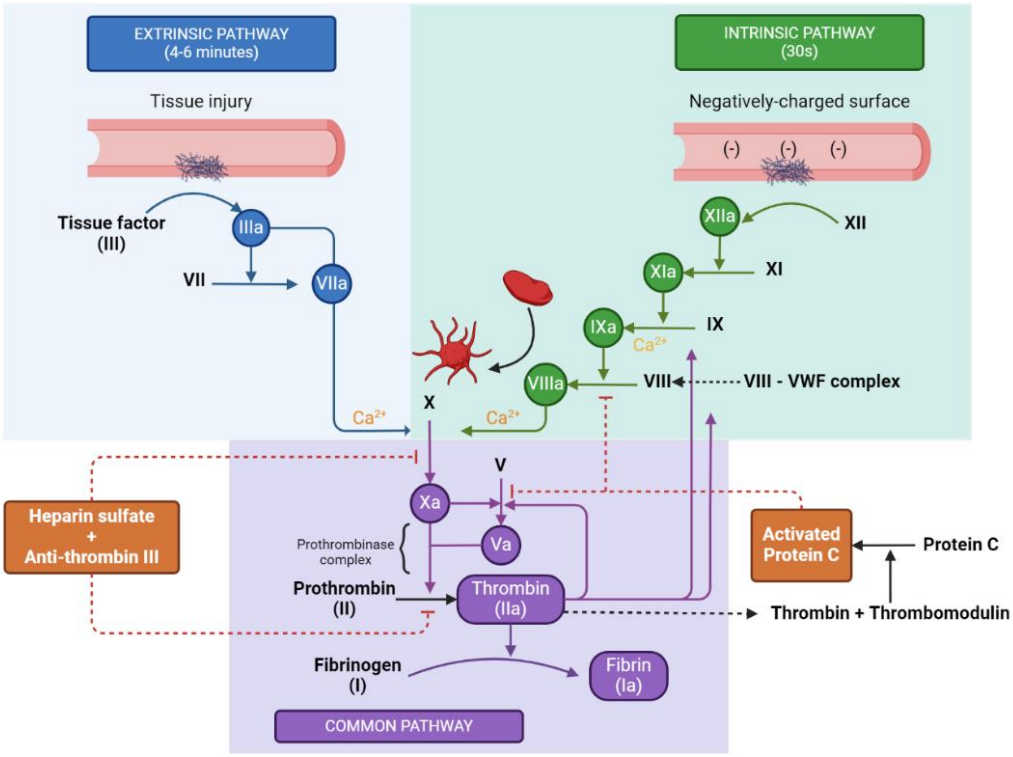
Koagülasyon kaskadının son aşamalarından biri, Faktör Xa' nın (aktif Faktör X) Faktör Va ile birleşerek protrombinaz kompleksini oluşturmasıdır. Bu kompleks, protrombini trombine dönüştürür. Trombin, fibrinojeni fibrine dönüştürerek fibrin adı verilen bir ağ oluşturur. Sonuç olarak, trombin hem pıhtı oluşumunu başlatır hem de trombositleri aktive ederek hemostatik tıkaç oluşumunu sağlar (Ott, 2011).

Koagülasyon kaskadının aktivitesinin durdurulması gerekir ve bu aktiviteyi durdurmak için antitrombin III (ATIII), protein C, protein S ve doku faktörü yolağı inhibitörü (TFPI) gibi inhibitörler devreye girer (Clemetson, 2012).

Pıhtı oluşumu sırasında, pıhtının sağlam endotelyal yüzeye ulaşması durumunda, endotel yüzeyine çıkan heparan benzeri moleküller antitrombin III'ü (ATIII) aktive eder. Antitrombin III (ATIII), Faktör Xa, XIa, XIIa, IXa, trombin ve TF-VIIa kompleksini etkisiz hale getirerek pıhtı oluşumunu kontrol eder. Protein C, Faktör Va ve VIIIa'yı inaktive ederek pıhtı oluşumunu düzenler. Protein S, protein C'nin aktivitesini artırır (Adams, Manson, Turner, Sindram, & Lawson, 2007).

TFPI, doku faktörü ve FVIIa kompleksinin Faktör Xa'yı oluşturmak için birlikte çalıştığı kısmı inhibe ederek pıhtı oluşumunu kontrol eder. Bu, dışsal pıhtılaşma yolu üzerinde etkilidir ve pıhtı oluşumunun başlangıcını düzenler. Sonuç olarak, TFPI'nin

antikoagülan etkisi, pıhtı oluşumunu kontrol ederek aşırı pıhtılaşmayı önler ve kanın normal akışkanlığını sağlar (Ott, 2011).



Şekil 1. Koagülasyon kaskadı, aktivatör ve inhibitör yolaklar (Brown, 2024).

2.1.4. Fibrinolizis

Doku hasarı giderildikten sonra, fibrin ağının plazmin enzimi aracılığıyla çözülmesi aşamasına geçilir. Fibrinolizis, kan pıhtılarının çözülmesi sürecidir ve bu süreçte plazminojen, plazmin adı verilen bir enzime dönüşür. Plazmin, fibrin adı verilen pıhtılaşma proteinini parçalayarak pıhtıyı çözer. Fibrinolizisde plazminojenin plazmine dönüşümü genellikle iki ana mekanizma ile gerçekleşir: doku plazminojen aktivatörü (tPA) ve ürokinaz plazminojen aktivatörü (uPA). tPA; aktif hücreler, özellikle endotel hücreleri tarafından salgılanır. tPA, fibrin üzerinde bulunur ve plazminojeni plazmine dönüştürerek fibrinolizin başlamasını sağlar. uPA; özellikle makrofajlar ve monositler tarafından üretilir. Bu enzim, plazminojeni plazmine dönüştürerek fibrinolizisi başlatır. Her iki aktivatör de plazminojenin plazmine dönüşümünü katalize ederek fibrinolizisin gerçekleşmesini sağlar ve bu da kan

pıhtılarının doğal olarak çözülmesine ve kan akışının normalleşmesine yardımcı olur (Şekil 2) (Chapina, & Hajjara, 2015).

Plazminin trombositler üzerindeki etkisi, trombositlerin yüzeyinde bulunan ve trombosit aktivasyonunda rol oynayan GPIb-V-IX kompleksini parçalamasıyla ilgilidir. Plazminin bu kompleksi parçalaması, trombositlerin hasarlı bölgeye yapışmasını ve pıhtı oluşumunu zorlaştırabilir. Ayrıca plazmin, pıhtı oluşumunda rol oynayan diğer faktörlerden bazılarını da etkileyebilir. Örneğin, Faktör V ve Faktör VIII gibi pıhtılaşma faktörlerini parçalayarak pıhtı oluşumunu önleyebilir (Podestà, Galbusera, & Remuzzi, 2019).

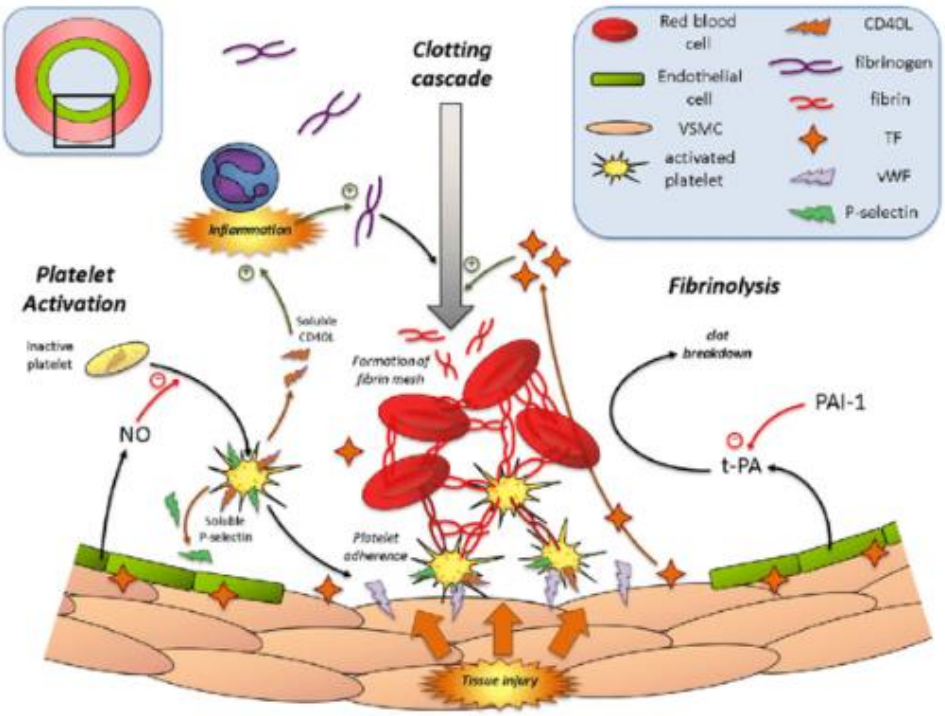
Plazminojen aktivatörlerinin ve plazminin yüksek aktivitesinin yaratacağı sorunları önlemek amacıyla birtakım inhibitörler devreye girer. Bu fibrinolizis inhibitörlerine plazminojen aktivatör inhibitörleri 1 ve 2 (PAI-1 ve PAI-2) ve α2-antiplazmin (A2AP), α2-makroglobulin, C1-esteraz inhibitörü ve trombinle aktive olan fibrinoliz inhibitörü (TAFI) örnek verilebilir (Podestà ve ark, 2019).

Endotel hücrelerinden, trombositlerden ve diğer hücrelerden dolaşıma salınan PAI-1, serin proteaz mekanizması yoluyla tPA ve uPA'yı etkisiz hale getirerek plazminojenin plazmine dönüşümünü engeller (Nicklas, Gordon, & Henke, 2020).

α2-antiplazmin, plazmine hızla bağlanarak onun aktivitesini inhibe eder. Bu, fibrinolizin kontrol altında tutulmasını sağlar (Reed, Houng, Singh, & Wang, 2017).

SerpinB2 olarak da bilinen PAI-2'nin bilinen işlevi, uPA ve daha az ölçüde tPA gibi plazminojen aktivatörlerini inhibe etmesidir (Lee ve ark, 2015).

Trombinle aktive edilen fibrinoliz inhibitörünün (TAFI) etkisiyle fibrin üzerindeki C-terminal lisin ve arginin kalıntıları uzaklaştırılır. Bu, plazminin fibrine bağlanma kapasitesini azaltır, dolayısıyla plazmin oluşumunu yavaşlatır ve fibrinolizi kısmen inhibe eder (Plug, & Meijers, 2016).



Şekil 2. Hemostaz bileşenleri (Robertson & Miller, 2018).

2.2. Trombositlerin Morfolojisi ve Fonksiyonları

Kemik iliğindeki ve akciğerlerdeki megakaryositlerden üretilen trombositler, bir diğer adıyla plateletler, çekirdeksiz hücre yapısına sahiptir (Brass, Diamond, & Stalker, 2016).

Hücre boyutları 2–5 μm arasında değişen trombositler dolaşımda eritrositlerden sonra en yaygın bulunan ikinci kan bileşenidir. Kemik iliğinde megakaryositik öncüller tarafından oluşturulan trombositler daha sonra kan dolaşımına girer ve dolaşımda 7-10 günlük bir yaşam süresine sahip olurlar (Ghoshal, & Bhattacharyya, 2014).

Kemik iliğinde gerçekleşen trombosit üretim süreci trombopoez, karaciğerde bulunan parankim hücreleri ve böbrek hücrelerinde üretimi gerçekleşen glikoprotein yapısındaki trombopoietin tarafından stimüle edilir (Kaushansky, 2006).

Trombositler, birincil hemostaz ve inflamasyon gibi olaylarda işlevlerini yerine getirebilmeleri için aktifleşmeleri gerekmektedir. Bu trombosit aktivasyonunun sağlanabilmesinde trombosit yüzeyinde bulunan birçok reseptör ve trombosit içinde farklı biyoaktif moleküllerin sentezlenip depolandıkları çeşitli granüllerden

salgılanmaları gerekmektedir (Shevchuk ve ark, 2021).

Trombositler, alfa granüller, yoğun veya delta granüller ve lizozomlar olmak üzere üç farklı tipte granül içermektedir (Şekil 3). Megakaryositler tarafından trombositlerde oluşturulan çeşitli granüllerden biri olan alfa granülleri normal trombosit fonksiyonlarının yerine getirilmesinde gerekli olan proteinleri, kemokinleri, sitokinleri ve büyüme faktörlerini içerir (Koupenova, Kehrel, Corkrey, & Freedman, 2017).

Alfa granüller, CXCL1 (GRO-α), CXCL4, CXCL5 (ENA-78), CXCL7 (PBP, β-TG, CTAP-III, NAP-2), CXCL8 (IL-8), CXCL12 (SDF-la), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-la) ve CCL5 (RANTES) gibi hücresel sinyal molekülleri olan çeşitli kemokinleri içerir (Gleissner, von Hundelshausen, & Ley, 2008).

Trombosit işlevselliği için gerekli ve bilinen önemli moleküllerden olan adeziv özellikteki fibrinojen ve von Willebrand faktörü (vWf) alfa granüllerden salgılanır. Salgılanan bu faktörler, trombosit-trombosit ve trombosit-endotel etkileşimlerinin gerçekleşmesine aracılık eder (Blair, & Flaumenhaft, 2009).

Trombosit adezyonundan sorumlu olan adeziv reseptörler de alga granüllerinde bulunur. Bu adeziv reseptörlere örnek olarak von Willebrand faktör reseptör kompleksinin bileşenleri, fibrinojen için ana reseptör olan GPIbα-IX-V, integrin αIIbβ3 ve kolajen reseptörü GPVI verilebilir (Berger, Masse, & Cramer, 1996).

Bu reseptörler temel olarak trombosit plazma membranında bulunmasına rağmen, αIIbβ3'ün tahmini olarak yarısı ile üçte ikisi ve GPVI'nin üçte biri veya daha fazlası, istirahat halindeki trombositlerdeki alfa granüllerinde depo halinde bulunur (Suzuki, Murasaki, Kodama, & Takayama, 2003).

Ayrıca trombosit alfa granülleri, birçok pıhtılaşma faktörünü ve sekonder hemostazda görev alan kofaktörleri içerir. Pıhtılaşma faktörlerinden Faktör V, XI ve XIII alfa granüllerinde depo edilir ve trombositlerin aktifleşmesi üzerine granüllerden hücre dışına salgılanır (Rendu, & Brohard-Bohn, 2001). Bunların yanı sıra alfa granüllerde; protrombin, kininojenler, aktif pıhtılaşma faktörlerini parçalayan antitrombin, plazma kallikrein, plazminojen ve Faktör XIa ve Faktör XIIa'yı parçalayan C1-inhibitörü gibi çeşitli durumlarda görev alan moleküller depo edilir (Maynard ve ark, 2007).

Alfa granüller yüksek konsantrasyonlarda proinflamatuar ve immün modülatör

faktörler salgılayarak enflamasyonu etkiler (Blair, & Flaumenhaft, 2009).

Açık kanal sistemi (OCS), trombositlerin yüzeyine bağlı olan ve granül içeriğinin dışarıya boşaltılmasını sağlayan bir sistemdir. Bu sistem sayesinde, alfa granüllerde bulunan çeşitli faktörler ve moleküller trombositlerin çevresine salınarak dış ortama etki ederler. Bu da trombositlerin işlevselliğini etkileyen faktörlerin hızla serbest bırakılmasını sağlar (Shevchuk ve ark, 2021).

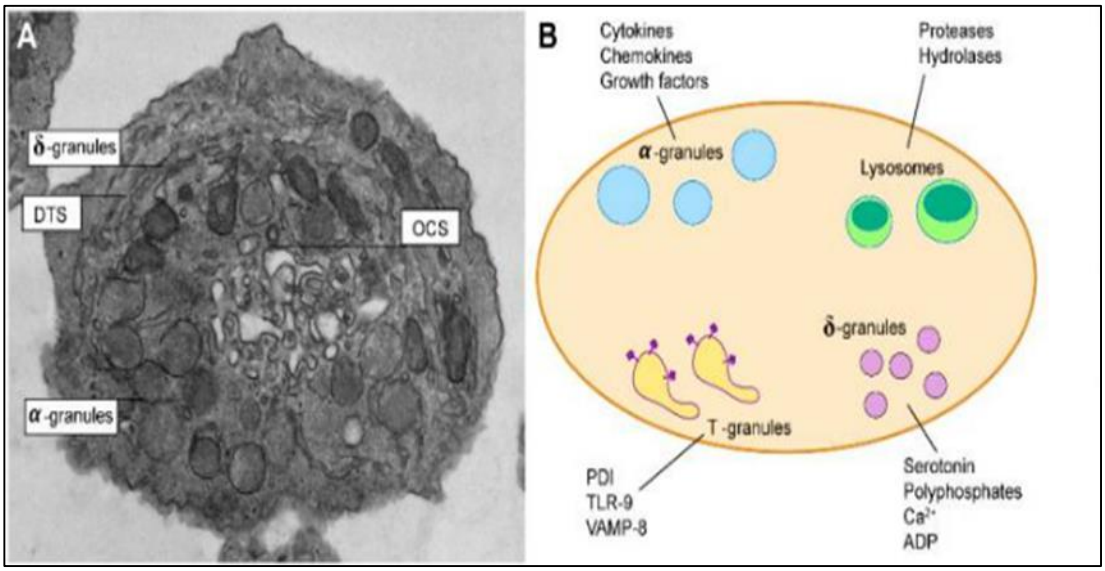
Yoğun tübüler sistem (DTS), trombosit aktivasyonunun başlatılması ve düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar. Trombositlerin içinde, prostaglandin ve tromboksan sentezi gibi işlevler için önemli olan birçok süreç bu sistemde gerçekleşir. Ayrıca, trombosit aktivasyonu için kritik olan bir iç kalsiyum deposu da DTS içerisinde bulunur. Bu, trombositlerin hızlı bir şekilde aktivasyonunu ve gerektiğinde pıhtı oluşumunu sağlayan önemli bir mekanizmadır (Gerrard, White, & Peterson, 1978).

Delta granüller, hemostaz için gereken ADP, serotonin, polifosfatlar, glutamat, histamin ve kalsiyum gibi küçük molekülleri içerir. Bu moleküller, trombositlerin pıhtı oluşturma ve damar içi kan pıhtılaşması süreçlerinde önemli rol oynar (Koupenova ve ark, 2017).

Lizozomlar, hücre içinde sindirim ve atık ürünlerin parçalanması gibi işlevlerde önemli olan enzimleri içerir. Trombosit lizozomları da benzer şekilde, glikohidrolazlar gibi sindirim enzimleri ile glikoproteinleri, glikolipidleri ve glikozaminoglikanları parçalayan enzimler içerirler. Bu enzimler, trombositlerin hücresel işlevlerini düzenlerken, aynı zamanda doku zararlarının onarılması ve trombositlerin atık ürünlerini parçalaması gibi süreçlere de katkıda bulunur (Ciferri ve ark, 2000).

Trombositlerde T granülleri adı verilen bir granül çeşidi daha tanımlanmıştır. Trombositlerin ince dondurulmuş kesitlerinden elde edilen görüntülerde yoğun tübüler sistem (DTS) membranları, küçük veziküler yapılar olarak adlandırılan T granülleri olarak gösterilmiştir (Heijnen, & Korporaal, 2017).

T granüllerinde toll benzeri reseptör 9 (TLR9), protein disülfit izomeraz (PDI) ve vezikül ilişkili membrane protein (VAMP-8) gibi faktörler bulunur. Bu faktörlerin, trombositlerin yüzeyinde toplandığı ve salınım sürecine katkıda bulunduğu öne sürülmektedir (Thon ve ark, 2012).



Şekil 3. Dinlenme halindeki trombositinin elektron mikrografı (Shevchuk ve ark, 2021).

2.3. Monositler

Monositler ve makrofajlar, vücudun doğal savunma sistemine ait merkezi hücrelerdir ve çeşitli patojenlere karşı savunmanın birinci basamağında yer alırlar (Parihar, Eubank, & Doseff, 2010). 1969 yılında "mononükleer fagosit sistemi" olarak sınıflandırılan sistem, kemik iliğindeki promonositleri ve öncüllerini, periferik kandaki monositleri ve dokulardaki makrofajları içermektedir. Yeni bilgiler doğrultusunda bu sisteme yeni hücreler eklenmiştir (van Furth ve ark, 1972).

İnsanlarda kan dolaşımında bulunan lökosit popülasyonunun %10'unu monositler oluşturmaktadır. İnsan kemik iliği günde yaklaşık 5.10^9 monosit üretir. Bu hücreler, nötrofillerle birlikte, ortak bir miyeloid öncü hücreden türetilirler.

Öncelikle, Granülosit-makrofaj koloni (GM koloni) oluşumu sırasında, kök hücrelerden başlayarak bir dizi farklılaşma ve olgunlaşma adımı gerçekleşir. Bu süreçte, monoblastlar monositlerin öncül hücreleridir. Monoblastlar, granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktöre (GM-CSF) yanıt vererek gelişirler. Daha sonra, bu monoblastlar makrofaj koloni uyarıcı faktöre (M-CSF) yanıt veren promonositlere dönüşürler. Son olarak, promonositler olgunlaşarak monositlere dönüşürler. Bu olgun monositler dolaşımdaki kanın bir parçası haline gelir ve bağışıklık sisteminin çeşitli görevlerini yerine getirirler.

Periferik kandaki monositler, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin denetleyici

hücreleri olarak dolaşırlar. Kemokin salgılanması, doku yaralanması veya patojen sinyali gibi etkenlerin varlığında, monositler etkilenen bölgeye yönlendirilir ve kan damarı boyunca iltihaplı dokuya diapedez (hücre geçişi) yoluyla girerler. Doku içinde bulunduklarında, monositler çeşitli sitokinler, matris proteinleri ve büyüme faktörleri gibi moleküllerle etkileşime girerler. Bu moleküller monositlerin farklılaşmasını etkileyerek makrofajlara dönüşmesini sağlar. Bu makrofajlar gelen uyarana ve immün yanıt yönüne göre farklı alt tiplere dönüşür.

Son araştırmalar, dolaşımdaki monosit popülasyonları arasında heterojenlik olduğunu ve bu hücrelerin farklı inflamatuar koşullara seçici olarak yanıt verdiğini göstermektedir. İnflamasyonun olmadığı durumlarda, monositler kısa bir süre (24-48 saat) dolaşımda bulunur. Bu süre içinde bir dokuya geçip makrofaja dönüşebilir ya da apoptotik olarak ölebilirler.

Ateroskleroz gelişiminde önemli bir etkiye sahip olan monositler, erken ateroskleroz plaklarında tespit edilen birincil inflamatuar hücre olmuştur (Swirski, & Nahrendorf, 2013). Combadière ve arkadaşlarının (2008), yaptığı bir çalışmada hiperkolesterolemik farelerde gerçekleştirilen monosit birikimini teşvik eden CCL2, CX3CR1 ve CCR5 faktörlerinin kombine inhibisyonu aterosklerotik gelişimi %90 oranında azaltmıştır.

2.3.1. Monosit çeşitleri

Kan dolaşımında bulunan monositlerin farklı alt gruplara ayrıldıkları gözlemlenmiştir. Tanınan monositlerin üç ana alt kümesi vardır: klasik (%85), ara düzey (%5) ve klasik olmayan (~%10) monositler (Şekil 4). Bu alt grupların, karakterizasyonu CD14 ve CD16 yüzey belirteçlerini farklı düzeyde taşıması ile karakterize olmaktadır. Ara düzey monositler, CD14 belirtecini daha yüksek ifade etmesinin yanı sıra CD16 belirteçlerini de taşıyan bir alt gruptur. Klasik olmayan monositler ise CD14 düşük seviyelerde, CD16 ise yüksek seviyelerde ifade edilir. Klasik monositler ise sadece CD14 belirtecini taşıyan ve CD16 belirtecini taşımayan alt gruptur (Ziegler-Heitbrock ve ark, 2010).

Monosit alt grupları CD14 ve CD16 belirtecine göre alt gruplara ayrılırken aslında daha fazla monosit alt grubu olduğu bilinmektedir. Çalışmalar, inflamasyon durumuna göre şekillenen monositlerin transkripsiyonel olarak farklılıklar gösterebildiğini ve

farklı alt gruplara ayrılabileceğini göstermektedir. Bağışıklık sistemi üzerindeki belirli koşullara veya uyarıcılara yanıt olarak, farklı transkripsiyonel programlar devreye girebilir ve monositler farklı işlevsel özelliklere sahip alt gruplara dönüşebilirler. Bu, bağışıklık sisteminin dinamik ve esnek doğasını vurgular Bu veriler ışığında monositlerin alt grupları tanımlanırken fenotipik ve fonksiyonel olarak daha detaylı bir gruplamanın yapılması gerekmektedir (Gren ve ark, 2015).

Çalışmalar, monosit alt gruplarının farklı metilasyon profillerine sahip olduğunu ve bu metilasyon profillerinin belirli genlerin ifadesini etkilediğini göstermektedir. Dolayısıyla, farklı metilasyon profilleri, monosit alt gruplarının farklı işlevsel özellikler sergilemesine yol açabilir (Zawada ve ark, 2016). Bu durum, monositlerin çeşitli bağışıklık yanıtlarına uyum sağlama yeteneğini ve spesifik koşullara yanıt verme esnekliğini sağlar. Bu bilgi, bağışıklık sisteminin karmaşıklığını anlamamıza ve hastalıkların mekanizmalarını araştırmamıza yardımcı olabilir (Zawada ve ark, 2016).

Monositlerin farklı alt tipleri arasında çeşitli fonksiyon farkları bulunmaktadır. Klasik monositler, genellikle ilk savunma hattında yer alır ve fagositoz, doğuştan gelen algılama ve immün yanıtların başlatılmasında önemli rol oynarlar. Ara düzey monositler ise özellikle CCR5 eksprese eden bir alt küme olarak bilinirler ve antijen sunumu, sitokin salınımı, apoptoz regülasyonu ve farklılaşma gibi işlevler için daha uygun bir ortam sunarlar.

Klasik olmayan monositler ise kompleman ve Fc gama aracılı fagositoz gibi daha özelleşmiş işlevlerde rol alırlar, ayrıca adezyon süreçlerine katkıda bulunurlar. Bu farklı monosit alt tiplerinin varlığı, bağışıklık sisteminin çeşitli işlevlerini etkili bir şekilde yerine getirmesine yardımcı olur (Gren ve ark, 2015).

Monositler, insanlarda HLA-DR ve CD11b gibi belirli proteinlerin ifadesiyle karakterize edilir. Ayrıca, insanlarda CD14 ve CD16'nın farklı seviyelerde ifade edilmesiyle ayırt edilirler. Farelerde ise, monositler belirli proteinlerin, CD115 ve CD11b'nin ifadesiyle tanımlanır ve Ly6C ve CD43'ün farklı seviyelerde ifade edilmesine göre sınıflandırılır. Klasik monositler, insanlarda $CD14^{yüksek}CD16$- ve farelerde $Ly6C^{yüksek}CD43^{düşük}$ ifadesine sahiptir. Bu monosit alt grubu, yaralanma veya enfeksiyon bölgelerine göç edebilen ve burada inflamatuar makrofajlara dönüşebilen CCR2 adı verilen bir kemokin reseptörünü yüksek seviyede ifade eder. Öte yandan, klasik olmayan monositler, insanlarda $CD14^{düşük}$ seviyelerde, $CD16^{yüksek}$

fenotipe sahip olup, farelerde $Ly6C^{düşük}CD43^{yüksek}$ fenotipine karşılık gelmektedir. Bu monosit alt grubu, yapışmayla ilişkili CX3CR1 adı verilen bir reseptöre yüksek seviyede sahiptir. Dinlenme halindeki damar sisteminde dolaşarak damardaki kalıntıların temizliği gibi görevlerde bulunabilirler. İnsanlardaki ara düzey monositlerin fare karşılığı ise $Ly6C^{yüksek}CD43^{yüksek}$ şeklindedir. Bu yüzey belirteçlerine sahip monositlerin birçok immün süreçte rol aldığı gösterilmiş olup farklı alt grupların aydınlatılması ile ilgili çalışmalar halen devam etmektedir (Carlin ve ark, 2013).

Klasik monositler ve ara düzey monositler arasında işlevsel farklılıklar bulunmaktadır. Klasik monositler genellikle CCL2 ve CCL3 gibi kemokin gradientlerine göç edebilirler. Bu kemokinler, inflamatuar yanıtların düzenlenmesinde önemli rol oynar ve klasik monositlerin enfeksiyon odaklarına doğru yönlendirilmesine katkıda bulunabilir. Ayrıca, klasik monositler arasında ROS (Reaktif Oksijen Türleri) üretimi açısından daha etkili oldukları bilinmektedir. Bu, klasik monositlerin enfeksiyonla mücadelede daha aktif bir rol oynayabileceği anlamına gelir. Özellikle mantar enfeksiyonları gibi durumlarda, klasik monositlerin ROS üretimi, mantarların sınırlanmasında daha etkili olabilir (Ancuta ve ark, 2003).

CD14+ insan monositleri, kemokin reseptörlerini yüksek seviyelerde ifade etmektedir. Bu kemokin reseptörleri arasında CCR1, CCR2, CCR5, CXCR1 ve CXCR2 gibi önemli olanlar bulunur. Bu reseptörler, çeşitli kemokinlerin (küçük sinyal proteinleri) hücre yüzeyine bağlanmasını sağlar ve bu da monositlerin çeşitli doku ve organlardan kaynaklanan sinyallere yanıt verme yeteneklerini belirler.

Özellikle CCR1, CCR2 ve CCR5, inflamasyon süreçlerinde önemli rol oynayan kemokinlerin reseptörleridir. Bu reseptörlerin yüksek düzeyde ifadesi, monositlerin iltihaplı dokulardan gelen sinyallere doğru göç etme potansiyellerini vurgular. Benzer şekilde, CXCR1 ve CXCR2, iltihaplanma ve doku hasarı durumlarında rol oynayan kemokinlerin reseptörleridir ve monositlerin bu tür dokulardan gelen sinyallere yanıt vermesini sağlar. Bu kemokin reseptörlerinin yüksek seviyede ifadesi, monositlerin inflamasyon, doku hasarı veya enfeksiyon gibi durumlarda etkili bir şekilde dolaşımdan çıkarak etkilenmiş bölgelere doğru göç etmelerini sağlar. Bu, bağışıklık sisteminin yanıt verme mekanizmalarının ve doku onarımının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Weber ve ark, 2000).

CD14+ insan monositleri, pro-inflamatuar molekülleri salgılama yetenekleriyle de karakterize edilirler. Bu moleküller arasında IL-6, IL-8, CCL2, CCL3 ve CCL5 gibi önemli olanlar bulunur. Bu moleküllerin salgılanması, inflamatuar yanıtların başlatılması ve düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. IL-6 ve IL-8 gibi sitokinler, inflamasyon sırasında immün hücreler arasında iletişimi sağlar ve iltihaplanmaya katkıda bulunur. CCL2, CCL3 ve CCL5 ise kemokinlerdir ve lökositlerin çeşitli hedef dokulara migrasyonunu düzenler. Bu kemokinler, iltihaplı dokulara göç eden monositlerin yanı sıra diğer immün hücrelerin de hareketini düzenleyerek inflamasyon sürecinin yönetilmesine yardımcı olur (Cros ve ark, 2010).

CD14++CD16+ monositler, ara düzey monositler olarak da adlandırılan bir alt grup oluştururlar ve özellikle inflamatuar koşullar altında aktivasyon ve artış gösterebilirler. Ara monositler, diğer monosit alt gruplarına göre daha hızlı ve etkili bir şekilde enfeksiyon odaklarına doğru göç edebilirler. Ayrıca, pro-inflamatuar sitokinlerin salgılanması yoluyla enfeksiyona karşı hızlı bir immün yanıtın tetiklenmesine katkıda bulunabilirler (Nockher, & Scherberich, 1998).

Bu monosit alt grubu, önceki araştırmalarda, CD16+ ara düzey monositlerinin CD14 düşük seviyelerde, CD16+ ise yüksek seviyelerde ifade edilen klasik olmayan monositlerle aynı olduğu düşünülüyordu. Ancak, son çalışmalar ara monositlerin farklı bir alt küme olduğunu ve dolaşımda aktif olarak bulunmadıklarını göstermektedir (Cros ve ark, 2010).

Ara monositler, antijen sunumuyla ilgili molekülleri (örneğin, MHC-II kompleksi gibi) daha yüksek düzeyde ifade ederek bu sürecin önemli bir parçasını oluştururlar. Ayrıca, ara monositler TLR uyarımı sonucunda TNF-α, IL-1β, IL-6 ve CCL3 gibi pro-inflamatuar sitokinleri salgılayarak inflamatuar yanıtlara katkıda bulunurlar. Bu moleküller, enfeksiyonlarla mücadelede ve doku hasarı durumlarında önemli rol oynarlar (Lee ve ark, 2017).

Kemokin reseptörleriyle ilgili olarak, ara monositlerin klasik monositlere göre daha yüksek düzeyde CCR5 ifadesine sahip olduğu belirtilmiştir. Bu durum, ara monositlerin HIV-1 enfeksiyonuna karşı daha yüksek duyarlılık gösterebileceğini düşündürmektedir. CCR5, HIV virüsünün hücrelere girişinde rol oynayan bir reseptördür ve bu nedenle ara monositlerdeki yüksek CCR5 ifadesi, HIV enfeksiyonu için potansiyel bir risk faktörü olabilir (Zawada ve ark, 2011).

CD14++CD16+ monositlerin, klasik monositlerden farklı olarak pro-inflamatuar sitokinlerin üretim seviyelerine ulaşmadığı bilinmektedir. Bu durum, CD14++CD16+ monositlerin daha düşük seviyede pro-inflamatuar sitokinler salgılamasıyla karakterize olduğunu gösterir. Özellikle, TNF-α gibi pro-inflamatuar sitokinlerin salgılanması yoluyla, CD14++CD16+ monositler endotel arayüzünde nötrofil yapışmasını teşvik edebilirler. Bu, inflamasyon sırasında dolaşımdaki nötrofillerin enfeksiyon odaklarına göç etmesini sağlayarak immün yanıtı artırabilir (Chimen ve ark, 2017).

Klasik olmayan monositler, hem stabil durumda hem de inflamasyon sırasında vasküler endotelin iç kısmında aktif olarak dolaşırlar. Küçük kan damarları ve arterlerde, özellikle dermis, mezenter, akciğer ve beyin gibi bölgelerde monosit denetlemesi gözlemlenmiştir (Cros ve ark, 2010).

Ancak, klasik olmayan monositler sadece vasküler endotelin içinde aktif değildirler. Ayrıca diapedez (geçiş) sürecine maruz kaldıklarından ve aterosklerotik plaklar gibi birçok farklı doku parankiminde bulunabildiklerinden, bu hücreler sadece damar sistemiyle sınırlı değildirler. Bu nedenle, klasik olmayan monositlerin vücutta çeşitli dokularda aktif olarak bulunabileceği ve farklı inflamatuar koşullara yanıt verebileceği düşünülmektedir (Tacke ve ark, 2007).

Monositler, ortak bir progenitör hücreden türeyen ve yaşam boyu sürekli olarak yenilenen kısa ömürlü mononükleer fagosit hücreleridir. Farelerde, monositler inflamasyon olmadığında, çoğu genellikle sadece iki gün yaşarlar. Ancak, küçük bir kısmı yedi gün veya daha fazla yaşayabilir (van Furth, & Chon, 1968).

NR4A1 geni tarafından kodlanan Nur77 transkripsiyon faktörünün Ly6C– monosit gelişimi için kesinlikle gerekliliğinin keşfedilmiştir. Nur77, yüksek oranda klasik olmayan monositlerde ifade edilir ve bu tür monositler, özellikle Nur77'nin yokluğunda, yani Nur77 nakavt farelerin kanında, dalağında ve kemik iliğinde eksiklik gösterirler. Bu bulgular, Nur77 transkripsiyon faktörünün klasik olmayan monositlerin gelişimi ve denetleyici özelliği üzerinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Hanna ve ark, 2011).

Nur77 eksikliği olan farelerde, hem kemik iliğinde hem de çevrede Ly6C monositlerinin yokluğu gözlemlenir. Denetleyici olarak dolaşımda bulunan monositlerin insanlardaki homologu olan CD14+CD16++ popülasyonunda da yüksek

Nur77 ekspresyonu bulunur ve muhtemelen benzer fonksiyonları paylaşır. Bu bulgular, Nur77 transkripsiyon faktörünün klasik olmayan monositlerin gelişiminde ve dolaşımda denetleyici olarak kritik bir rol oynadığını ve insanlarda benzer biyolojik süreçlerin meydana geldiğini göstermektedir (Hanna ve ark, 2012).

Klasik olmayan monositler, istirahat halindeyken kan akışından bağımsız bir şekilde yaklaşık olarak 12 mikrometre/dakika hızla vasküler sistemde aktif olarak dolaşırlar. Bu denetleyici dolaşım süreci, vasküler endotelyal hücreler üzerinde ICAM1 ile LFA1 arasındaki bağlanmayı gerektirir. Ayrıca, klasik olmayan monositlerin denetlemesi ve aktivasyonu, kısmen CD11b adı verilen bir proteine bağlıdır.

İnflamasyonda, vasküler hasar veya enfeksiyona yanıt olarak, çeşitli kaynaklardan çeşitli kemoatraktan faktörlerin salınımı söz konusudur. Bu faktörler arasında CX3CL1, TLR7 agonistleri, CCL5 ve S1P bulunmaktadır. Monositler, bu faktörlere CX3CR1, TLR7 ve muhtemelen CCR5 veya S1PR reseptörlerinin hücrede ifade edilmesi yoluyla yanıt verirler. Dolaşımdaki denetleyici monositler, bu kemoatraktan faktörlerin etkisiyle ya lokal olarak vasküler hasar bölgelerine toplanır ya da inflamasyon alanlarına doğru hareket ederler. Bu inflamasyon bölgeleri, örneğin aterosklerotik plaklar, nefritik böbrekler veya artritik eklemler gibi çeşitli doku bölgelerini içerebilir. Bu süreç, monositlerin dolaşımdan hedef bölgelere çekilmesinin ve inflamasyonun düzenlenmesinin önemli bir parçasını oluşturur (Thomas, Tacke, Hedrick, & Hanna, 2015).

Klasik monositler, kan dolaşımında dolaşırken, vücutta meydana gelen enfeksiyonlar veya hasarlar gibi durumlarda ortaya çıkan inflamatuar sinyallere yanıt verirler. Bu sinyaller, mikropların varlığını veya hasarın boyutunu gösteren moleküllerdir. Klasik monositler, bu sinyallere yanıt olarak bağışıklık sistemini harekete geçirir ve enfeksiyonlarla mücadele eder veya hasarlı dokuyu onarmak için gerekli olan hücresel ve moleküler süreçleri başlatır. Diğer yandan, klasik olmayan monositler, bakteri kaynaklı uyaranlara yanıt olarak düşük seviyelerde pro-inflamatuar sitokinler üretirler. Ancak, insanlarda yapılan çalışmalar, CD14+CD16++ monositlerin, anti-inflamatuar ve yara iyileşmesini destekleyen faktörlerin yüksek seviyelerini ürettiğini göstermektedir. Bu nedenle, klasik olmayan monositler, inflamasyonun düzenlenmesinde ve yara iyileşmesinde önemli bir rol oynarlar (Cros

ve ark, 2010).

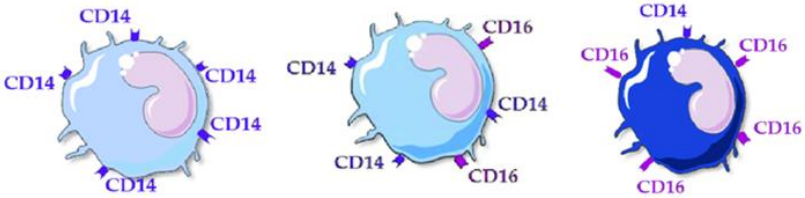
Klasik olmayan monositler, klasik monositlere kıyasla daha düşük seviyelerde CD14 adı verilen bir reseptörü ifade ederler. CD14, lipopolisakkarit (LPS) gibi bakteriyel hücre duvarı bileşenlerini tanıyan bir reseptördür ve bağışıklık sisteminin bu tür mikroplara yanıt vermesine yardımcı olur. Dolayısıyla, klasik olmayan monositlerin daha düşük CD14 seviyeleri, LPS gibi uyaranlara karşı daha zayıf bir yanıt verme eğiliminde olduklarını gösterir (Ingersoll ve ark, 2010).

İnflamatuar belirtilerin olmadığı durumlarda, klasik olmayan monositler, damar sistemini tarayarak endotel boyunca mikropartikülleri toplarlar. Bu nedenle, bu hücreler, damar içinde temizlik yaparak mikropartikülleri uzaklaştıran ve hücresel kalıntıları ortadan kaldıran önemli bir rol oynarlar.

Bu durum, klasik olmayan monositlerin, hücre hasarı veya enfeksiyon gibi durumlarda güçlü bir yanıt verebilen "damar içi temizlikçiler" olarak işlev gördüğünü gösterir. Ayrıca, gözlem çalışmaları, farelerde hem klasik hem de klasik olmayan monosit alt gruplarının aterosklerotik plaklara girebildiğini ortaya koymuştur. Bu da, hem klasik hem de klasik olmayan monositlerin, aterosklerotik plakların oluşumunda ve ilerlemesinde etkili olabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, klasik olmayan monositlerin vasküler sağlık üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceği ve kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (Tacke ve ark, 2007).

Klasik olmayan monositlerin birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Özellikle, otoimmün eklem iltihabı gibi durumlarla ilişkilendirilmişlerdir. Bu tür hastalıklarda, klasik olmayan monositlerin immünolojik aktivitesi, inflamatuar süreçlerin başlatılmasına ve çözülmesine katkıda bulunabilir (Misharin ve ark, 2014). Genel alt grupları tanımlanmış ve farklı alt grupların araştırıldığı monositlerin özellikle fonksiyonel farklılıkları ve patogenezdeki rollerini aydınlatmak için CD80 ve CD86 belirteci büyük önem taşımaktadır. Monositler fagositer hücre alt grubu olmasına rağmen, antijen sunma yetenekleri güçlü hücrelerdir. Üzerinde taşıdıkları bu belirteçler naif T hücreler üzerindeki CD28 reseptörü ile bağlanarak T hücreye “ikincil sinyal” yani ko-stimülasyon sinyalini iletir. Aktive olan T hücre üzerinde CTLA-4 (Sitotoksik T-lenfosit ilişkili protein 4) belirteci ifade etmesi ile inhibisyon sürecini de başlatmış olur. CTLA-4’ün CD80 ve CD86’ya

afinitesi CD28 göre daha yüksek olması sayesinde de aktive olan T hücre inhibe de edilmeye başlar ve hemostatik faza dönüş de başlar. İnflamasyonun başlaması ve çözünmesi için CD80 ve CD86 üzerinden T hücreye iletilecek sinyal bu sebeple büyük öneme sahiptir.

Monocyte Subsets	Classical Monocytes	Intermediate MONOCYTES	Non-Classical Monocytes
Schematic representation			
Surface receptors	CD14++ CD16−	CD14++ CD16+	CD14+ CD16++
ortion of total monocytes	85–90%	5–10%	5–10%
Main functions	Phagocytosis, tissue repair, inflammation, reactive oxygen species production	Antigen presentation, T-cell proliferation and stimulation, reactive oxygen species production, phagocytosis	Patrolling of endothelial cell integrity, clearance of dying endothelial cells, wound healing
Cytokine production	IL-10, IL-6	TNFα, IL-1β, IL-6	TNFα, IL-1β, IL-6

Şekil 4. Monosit alt tipleri (Lassalle ve ark, 2022).

2.4. Trombosit-Monosit Etkileşimi

Trombositler, damar hasarı ve enfeksiyon gibi durumlarda aktive olarak ortama lökositleri toplayabilir. Trombositler ortama topladığı bu lökositlerle etkileşime girebilir ayrıca bu hücrelerden sitokin salınımını uyarabilirler (Şekil 5).

Lökositlerin bir çeşidi olan monositler barındırdığı PSGL1 ile trombosit yüzeyinde bulunan P-selektin (CD62P) aracılığıyla trombositlerle etkileşime girip trombosit-monosit agregatını oluştururlar (Moore ve ark, 1992). PSGL1 ve P-selektin (CD62P) etkileşiminden sonra Membran tarafından aktive edilen kompleks (Mac-1: CD11b/CD18) ekspresyonu monosit yüzeyinde artış gösterir (Neumann ve ark, 1999).

Monosit ve trombosit arasındaki etkileşimler, miyeloid hücrede eksprese edilen monosit tetikleyici reseptör 1 (TREM-1) ve trombositlerde eksprese edilen TLT-1 arasında gerçekleşmektedir. Bir diğer trombosit-monosit etkileşimi CD40L-CD40 arasında gerçekleşmektedir (Bouchon, Dietrich, & Colonna, 2000). CD40L-CD40 aracılı trombosit-monosit etkileşimleri, iltihaplı endotel yüzeyinde monositlerin

kalmasını sağladığı için ateroskleroz oluşumunu hızlandırabilir (Lievens ve ark, 2010).

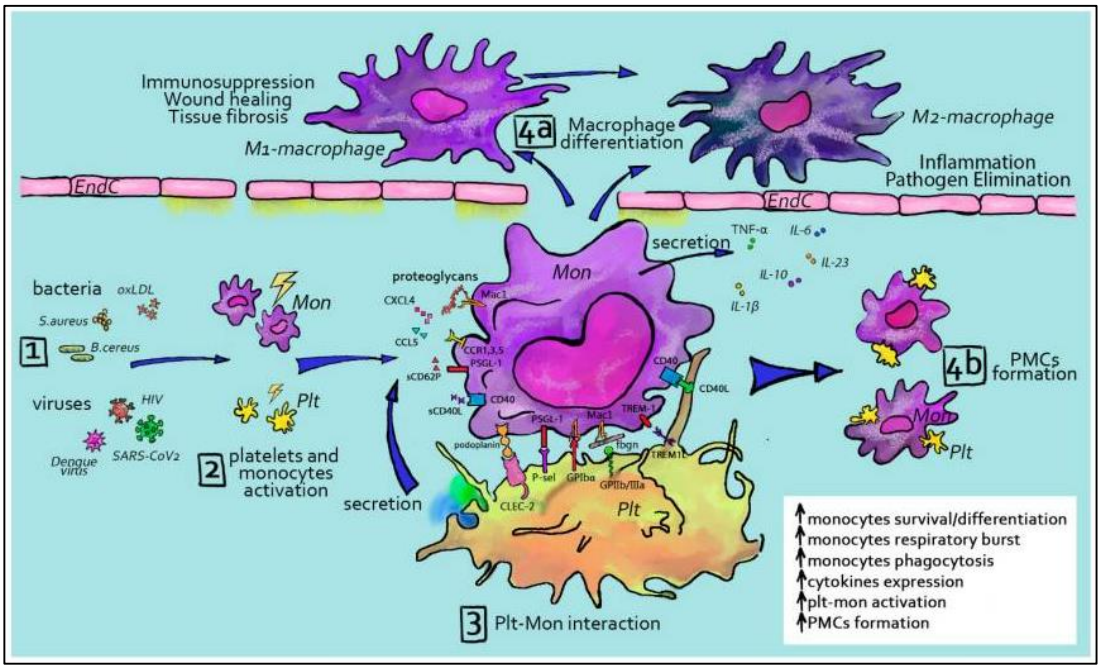
Silverstein, Asch & Nachman, (1989) trombosit-monosit etkileşiminin trombositten kaynaklı bir yapı tarafından gerçekleştiği bir glikoprotein keşfetmiştir. Trombospondin (TSP) denilen bu glikoprotein mononükleer fagositlere spesifik olarak ve yüksek afinite ile bağlanmaktadır. CD36; makrofajlar, monositler, lenfositler, trombositler ve adipositler gibi birçok hücre çeşidinde yer edinmiş bir reseptördür (Chen, Zhang, Cui, & Silverstein, (2022) CD36, Trombospondin-1 (TSP1) ve -2'ye (TSP2) bağlanarak vasküler endotelyal hücrelerde anti-anjiyojenik sinyallemeye ve trombositlerde pro-trombotik sinyallemeye aracılık etmektedir (Chu, Ramakrishnan, & Silverstein, 2013).

Fibrinojen, monositlerin yüzeyinde bulunan Mac-1 adlı yapıya ve trombositlerin yüzeyindeki integrin αIIbβ3 adlı yapıya bağlanarak bir kompleks oluşturur. Bu kompleks oluşumu, kan pıhtılaşma sürecinde önemli bir rol oynar (Gawaz ve ark, 1991).

Deneysel çalışmalar, trombositlerin büyük miktarlarda CXCL4 (PF4) adlı bir madde salgıladığını göstermektedir. PF4, lökosit göçünü, aktivasyonunu ve degranülasyonunu indükler ve bakterilerin fagositozunu teşvik eder (Walz, Dewald, von Tscharner, & Baggiolini, 1989). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, Mac-1 ve proteoglikanların PF4'ün lökositlere bağlanmasına aracılık ettiğini tespit etmiştir (Lishko, Yakubenko, Ugarova, & Podolnikova, (2018).

Aktive edilmiş trombositler, NF-κB yolunu aktive ederek endotel hücrelerinden monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) salgılanmasını teşvik eder ve aynı zamanda hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1)'in yüzey ekspresyonunu uyarır. Bu durum, dolaylı olarak monosit toplanmasına neden olur (Gawaz ve ark, 1998).

Endotele trombosit yapışması, lökosit toplanmasından önce gerçekleşir ve trombosit yapışmasının anti-GPIb antikorlarıyla veya P-selektinin genetik olarak silinmesi yoluyla engellenmesi, aterosklerotik lezyonlarda lökosit toplanmasını ve plak gelişimini azaltır (Massberg ve ark, 2002).



Şekil 5. Trombosit-monosit etkileşimleri ve trombosit-monosit kompleksi (PMC) oluşumu (Mandel ve ark, 2022).

2.5. Lenfositler

Lenfositler, lökositlerin alt gruplarından oluşan önemli bir hücre tipleridir. Görünümleri mikroskop altında benzer olsa da, farklı işlevlere sahiptirler (Şekil 6). T, B ve doğal öldürücü (NK) hücreleri olmak üzere üç ana alt gruba ayrılırlar.

2.5.1. T Hücreleri

T hücreleri, hücre çeşidi ve görevleri bakımından farklı alt gruplara ayrılmaktadır. Kemik iliği kaynaklı timosit progenitörlerinden gelişen T hücreleri, genel olarak αβ T hücreleri, γδ T hücreleri ve doğal öldürücü T (NKT) hücreleri şeklinde sınıflandırılır. αβ T hücreleri, CD4+ ve CD8+ olarak gruplandırılır. αβ T hücreleri, antijen sunan hücreler (APC'ler) üzerindeki majör histokompatibilite kompleksi (MHC) molekülleri tarafından sunulan antijenleri tanır. Sitokin sinyalleri, CD4+ Th hücrelerinin farklılaşmasını düzenler. T hücre reseptörü (TCR) stimülasyonu sonrasında, saf CD4+ T hücreleri, çeşitli sitokinler ve kostimülatör etkiler altında farklı efektör Th alt gruplarına farklılaştırılabilir (Sun, Su, Jiao, Wang, & Zhang, 2023).

T yardımcı lenfositler aktivasyon sonrasında, salgılanan sitokinlerin farklı

profilleriyle karakterize edilen Th1 ve Th2 alt gruplarına polarize olurlar. Th1 hücreleri, hücre aracılı inflamatuar reaksiyonlarda rol oynar; sitokinleri, sitotoksik ve inflamatuar fonksiyonları aktive eder ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık (DTH) reaksiyonlarını indükler. Öte yandan, Th2 sitokinleri antikor üretimini destekler, özellikle de IgE tepkilerini, eozinofil proliferasyonunu ve fonksiyonunu arttırarak alerjik tepkileri güçlendirirler. Th2 sitokinleri, genellikle güçlü antikor ve alerjik tepkilerle ilişkilendirilir (Borges ve ark, 1997).

Th9 hücreleri, yeni tanımlanmış bir CD4+ T hücresi alt kümesidir ve bulaşıcı hastalıklar, alerji, kanser ve otoimmün bağışıklık gibi çeşitli durumlarda kritik roller üstlenirler (Li ve ark, 2016).

2.5.2. B Hücreleri

B hücreleri, bağışıklık sisteminin önemli bir hücre türüdür ve humoral bağışıklık yanıtının anahtar oyuncularıdır. Bunlar, antijen tanıma, antikor üretimi ve hafıza hücrelerinin oluşumu gibi işlevlere sahiptirler.

B hücreleri, hücre dışı patojenlere karşı humoral bağışıklık sağlayarak antikor üretimi gerçekleştirirler. Antikorlar, patojenlerin veya toksinlerin aktivitesini nötralize eder, opsonizasyonu kolaylaştırır ve kompleman sistemini aktive eder. Germinal merkez reaksiyonundan çıkan B hücreleri, afiniteyle olgunlaşmış hafıza B hücreleri ve uzun ömürlü plazma hücrelerinin oluşturduğu hafıza hücrelerine evrilir. Afiniteyle olgunlaşmış hafıza B hücreleri, yüzeylerinde immünoglobulin bulunduran ancak antikor salgılamayan, uzun ömürlü CD27+ hücreleridir. Bu hücreler, antijenle yeniden karşılaştıklarında hızla çoğalır veya antikor salgılayan plazma hücrelerine dönüşebilirler. Uzun ömürlü plazma hücreleri ise CD138+ yüzey işaretleyicisine sahiptir ve artık bölünme yeteneğine sahip olmayan, farklılaşmış B hücreleridir (LaRosa, & Orange, 2008).

2.5.3. Doğal Öldürücü Hücreler (Natural Killer [NK] Cells)

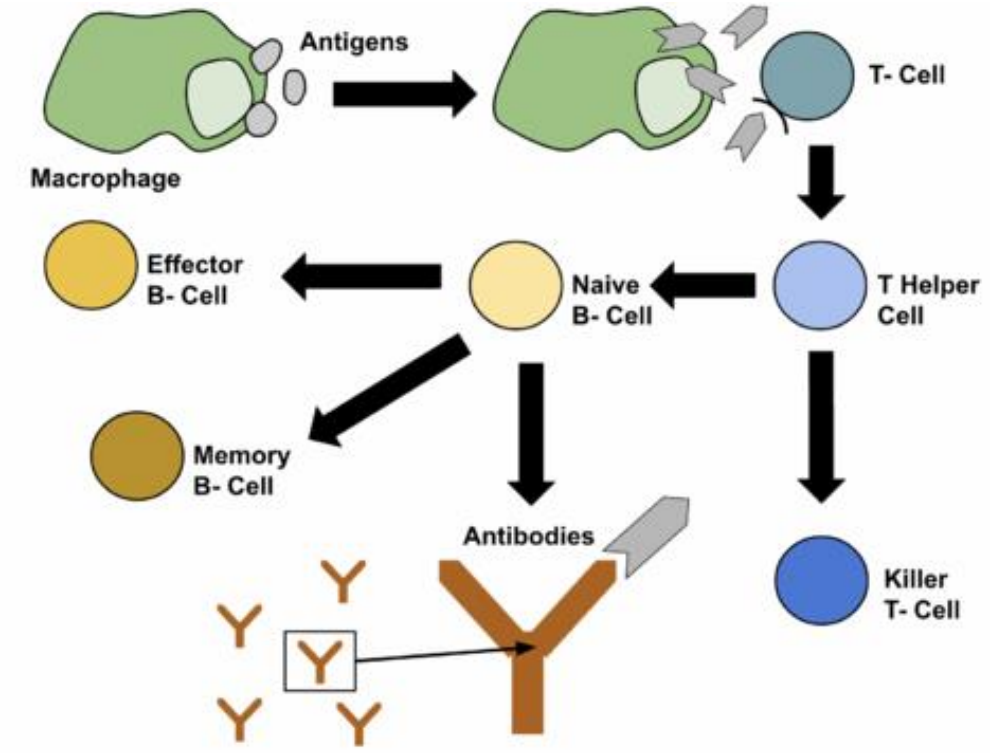
NK hücrelerinin gelişimi, kemik iliğinde ortak lenfoid progenitörler ve NK hücre öncülleri aracılığıyla hematopoietik kök hücrelerden türetilir. Daha sonra, olgunlaşan NK hücreleri periferik kana (dolaşımdaki NK hücreleri olarak bilinir) veya dokulara

(doku NK hücreleri olarak bilinir) göç eder (Wu, Fu, Jiang, & Shao, 2020).

NK hücreleri, edinsel bağışıklıkta işlev gören CD8+ T hücrelerine benzer sitotoksik yeteneklere sahiptir, ancak CD3 ve T hücresi reseptörlerinden (TCR'ler) yoksundur. Genellikle kanda dolaşan ve periferik kan mononükleer hücrelerinin (PBMC'ler) yaklaşık %5-10'unu oluşturan NK hücreleri, kemik iliğinde ve dalak gibi lenfoid dokularda bulunur (Zhang ve ark, 2007).

Farklı doku tiplerinin yanı sıra, NK hücreleri aynı organ ve aynı dokuda bile oldukça heterojendir (Simoni ve ark, 2017).

NK hücresini aktive edici reseptörlerin ligasyonu ile NK hücrelerinin hedef hücrelere yapışması ve onları öldürmek için sitotoksik maddeler salgılaması (örneğin, perforin ve granzim gibi) gözlenebilir. NK hücrelerinin sitokin üretimi arttırılabilir. Özellikle, IFN-gamma, IL-5 ve IL-13 gibi sitokinler, bağışıklık sisteminin diğer hücrelerini ve süreçlerini etkileyerek bağışıklık yanıtlarını düzenler (LaRosa, & Orange, 2008).



Şekil 6. Lenfosit hücreleri (https://www.physio-pedia.com/T_Cells)

2.6. Trombosit-Lenfosit Etkileşimi

Trombosit-lökosit agregatları (PLA), trombositlerin ve lökositlerin bir araya gelerek agregat oluşturmasıdır. Trombositlerin lökositlere bağlanarak heterotipik PLA oluşturabildikleri bilinmektedir (Şekil 7). PLA'lar artan tromboz riski ile ilişkilidir.

Araştırmalar, trombositlerin kanserin ilerlemesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Tümör mikroçevresindeki faktörler, trombosit aktivasyonunu kolaylaştırabilir ve kanser hücrelerinin yayılmasını teşvik edebilir. Trombositler, kanser hücrelerinin metastaz yapmasını kolaylaştıran birçok yolla etkileyebilirler. Örneğin, tümör hücreleri trombositlerle etkileşime geçerek dolaşım sistemine girebilirler. Trombositler, kanser hücrelerinin dolaşım sistemi boyunca seyahat etmelerini kolaylaştırabilir ve hedef organlara yerleşmelerini destekleyebilirler (Meikle ve ark, 2017).

Tümör hücreleri trombositleri aktive edebilir ve bu şekilde trombozu teşvik edebilirler. Aktive edilmiş trombositler, doku faktörü ve doku faktörü eksprese eden mikropartiküller gibi protrombotik faktörlerin salınımını arttırabilirler. Ayrıca, matriks metaloproteinazlar ve trombin gibi diğer protrombotik uyarıcılarla birlikte çalışarak trombozu teşvik edebilirler (Mackman, 2008).

Trombosit aktivasyonu sonucu, trombosit şekil değişikliğine giderek trombositlerin endotele, fibrinojene, lökositlere ve diğer trombositlere bağlanmasını kolaylaştırır, ayrıca degranülasyon ve trombosit yüzey reseptör ekspresyonları artar. P-selektin, aktive edilmiş trombositlerin yüzeyinde eksprese edilen bir protein reseptörüdür. P-selektin, trombositlerin lökositlere ve tümör hücrelerine yapışmasında aracılık eder (Chen, & Geng, 2006).

Yüksek trombosit-lenfosit oranı, birçok kanser türünde prognostik bir gösterge olarak kullanılabilir. Bu oranın yüksek olması, vücudun inflamatuar yanıtının arttığını ve tümör mikroçevresindeki değişiklikleri yansıtabilir (Miglani, Bhateja, Bhat & Kumar, 2013).

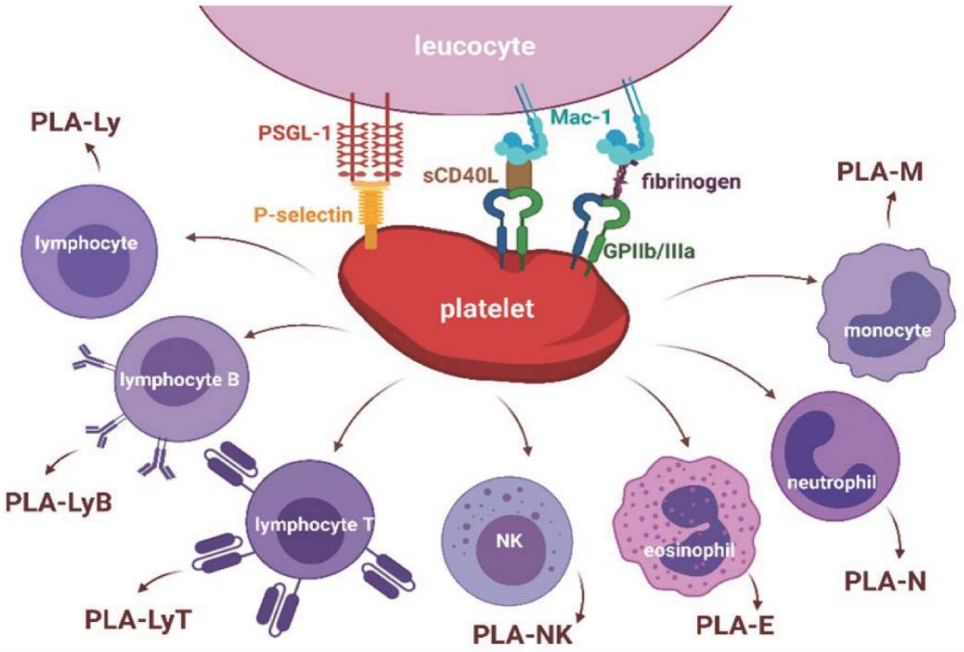
Trombositlerin inflamasyon bağlamında T hücrelerine bağlandığı ve T hücrelerinin trombositlere bağlandığı gösterilmiştir. İskemik felç gibi durumlarda, T hücrelerinin trombositlere bağlanması, hemorajik dönüşümü önleyebilir.

Hemorajik dönüşüm, felcin etkilediği bölgedeki kan damarlarının zayıflaması veya hasar görmesi sonucunda ortaya çıkan kanama riskidir. T hücrelerinin

trombositlere bağlanması, bu kanama riskini azaltarak felcin etkilerini yönetmede önemli bir mekanizma olabilir. Yapılan akciğer kanseri araştırmasında CD8+ T hücreleri CD4+ T hücrelerine göre daha fazla trombosit bağladığı gösterilmiştir. Oluşan bu trombosit-lenfosit agregatlarında P-selektin ekspresyonları yüksek bulunmuştur (Meikle ve ark, 2020).

Lenfositlerin heterotipik agregatlar oluşturma yetenekleri, özellikle monositler ve granülositlerle karşılaştırıldığında, genellikle daha düşüktür (Rinder, Bonan, Rinder, Ault, & Smith, 1991).

Lenfositlerin üç alt popülasyonunda (T, B ve NK hücreleri) yapılan trombosit agregasyon deneyinde dolaşımdaki lenfositlerin yaklaşık olarak %3'ünün trombositlerle agregat oluşturduğu görülmüştür. T lenfosit hücrelerinin aktivasyonu trombosit-T hücre agregasyonunu arttırır. Trombosit aktivasyonu ise trombosit-T hücre agregasyonunu hafif, trombosit-NK hücre agregasyonunu ise belirgin şekilde arttırır. Bu etkilerin tersine trombosit ve lipopolisakkarit kaynaklı B hücre aktivasyonları trombosit-B hücresi agregasyonunu arttırmamaktadır. Bu heterotipik etkileşimlerin gerçekleşmesinde P-selektin ligasyonu önemlidir ve bunun yanında integrin ligasyonları da katkı sağlamaktadır (Li, N, & Hjemdahl, (2006).



Şekil 7. Trombositlerin lökositlerle oluşturduğu etkileşimler (Pluta ve ark, 2022).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışması, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 20 Aralık 2022 tarih ve 2022-20/20 sayılı kararı ve Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Araştırmaları Etik Kurulunun 8 Mayıs 2024 tarih ve 2024-7/15 sayılı kararı ile, Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi'nde yer alan, "İnsanlar Üzerinde Yapılan Tıbbi Araştırmalarla İlgili Etik İlkeler" dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışması sağlıklı gönüllülerden alınan kan örnekleri üzerinde yapılan ex vivo deneysel bir çalışmadır. Deneyler 2024 Ocak ve Nisan ayları arasında Biyofizik Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirildi. Mononükleer hücrelerin izolasyonu ve aktivasyon ölçümleri DENHAB İmmünoloji Laboratuvarında yapıldı.

3.1. Gönüllüler

Deneyler, yaşları 22-26 yıl arasında değişen, 2'si kadın ve 6'sı erkek toplamda 8 sağlıklı bireyden alınan kan örnekleri üzerinde yapıldı. Gönüllüler, Bursa Uludağ Üniversitesi öğrencisi ve yakınları olup araştırma hakkında bilgilendirildikten sonra onam formları imzalatılarak çalışmaya dâhil edildi. Çalışmaya kişisel anamnezinde ve aile öyküsünde herhangi bir kanamalı durum veya hastalığa sahip olmayanlar, son 7 gün içinde trombositleri etkilediği bilinen herhangi bir ilaç (aspirin, antibiyotik, antidepresan, antihistaminik, non-steroid antiinflamatuar ilaç vb.) almayanlar, aktif sigara kullanmayanlar ve akut enfeksiyon geçirmeyenler dahil edildi.

3.2. Kan Örneklerinin Alınması

Deneylerde mononükleer hücrelerin kan alımından ve ayrıştırıldıktan hemen sonraki etkileri **(M-0)** ile mononükleer hücrelerin uyarıldıktan sonraki (LPS eklenip 22 saat boyunca bekletilmeleri sonrasındaki) etkileri **(M-22)** çalışılmıştır. Bu amaçla 0. saat kan alımı ve 22. saat kan alımı olmak üzere gönüllülerden iki kez kan alınmıştır. Kan alma işlemi Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı İmmünoloji Laboratuvarında, kan almada görevli teknikerler tarafından, daha önce hazırlanmış olan sitratlı tüpler kullanılarak gerçekleştirildi. Kan 21 G iğne kullanılarak, üst kola hafif venostaz uygulanarak alındı. Gönüllülerin aç olmalarına

dikkat edildi. 0. saat için 3 tüp, 22. saat için 3 tüp kan alındı.

Sitratlı tüpler laboratuvarda hazırlandı. Molekül ağırlığı 294,10 g/mol olan (MERCK KGaA Darmstadt, Germany) tri-sodium citrate dihydrate bileşiği 500 ml saf suda çözündürülerek, 0,106 M'lık sitrat stok çözeltisi hazırlandı. 8 ml'lik vakumlu tüplere, sitrat çözeltisinden 0,8 ml eklenerek tüpler hazırlandı. Tüplere kanın alınmasıyla birlikte sitrat/kan oranı 1/9 olmuştur ve böylece sitratla antikoagüle edilmiş tam kan örnekleri elde edilmiştir.

0. saatte ve 22. saatte alınan 3'er tüp kan örnekleri yapılacağı deney zamanında tek bir büyük tüpte birleştirilerek homojen olması sağlandı. Tam kan sayımı için 1'er ml ayrıldı. 0. saat için alınan kandan 20 ml mononükleer hücre ayrımı için İmmünoloji Laboratuvarına gönderildi.

Geriye kalan kan 200 g'de 15 dk santrifüj edilerek trombositten zengin plazma (TZP) elde edildi. TZP alındıktan sonar geriye kalan kan 2000 g'de 15 dk daha santrifüj edilerek trombositten fakir plazma (TFP) elde edildi.

3.3. Mononükleer Hücre Miktarının Belirlenmesi

Gönüllüden alınan tam kanın ve TZP'nin hemogram ölçümleri kan merkezindeki hemogram cihazında yapıldı. Tam kandaki mononükleer hücrelerin toplamının (monosit+lenfosit) trombosit sayısına oranı bulunarak, TZP içinde de aynı oran olacak şekilde mikrolitredeki mononükleer hücre miktarı hesaplandı. Agregometre ve thromboelastogram cihazlarına konulabilecek örnek miktarları göz önüne alınarak mikrolitredeki hücre sayısı deriştirildi (33 kat kadar; agregometre için 475 µl TZP üzerine 15 µl monoükleer hücre; tromboelastogram için 330 µl TZP üzerine 10 µl mononükleer hücre). Bu işlem her gönüllüden alınan kan için uygulandı. Böylece kişilerin tam kanlarındaki oranlar korunmuş oldu.

3.4. Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu

Gönüllüden alınan kanın 20 ml'si mononükleer hücre izolasyonu için kullanıldı. İzolasyon steril bir ortamda gerçekleştirildi. 20 ml tam kan, 20 ml serumsuz RPMI (SARTORIUS RPMI 1640 240501312) ile dilüe edilerek bir karışım oluşturuldu. Ardından 2 tüpe 7'şer ml Ficoll 1077 (CAPRICORN SCIENTIFIC CP22-5404)

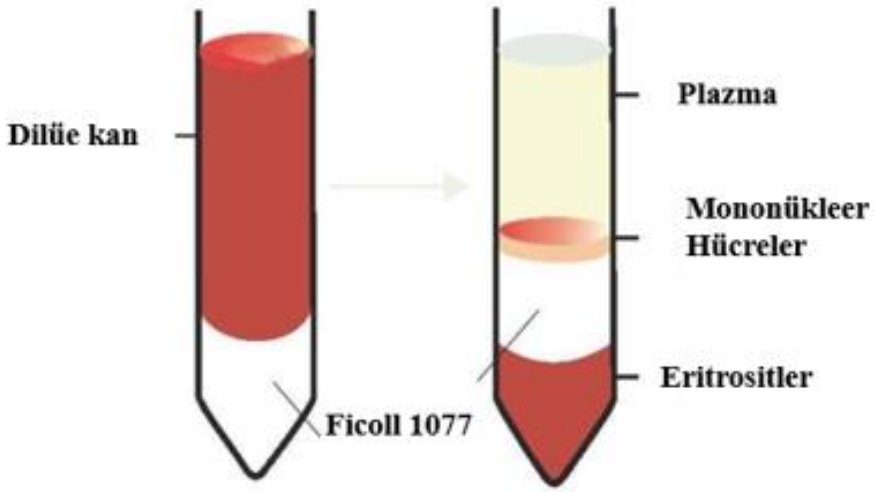
solüsyonu koyuldu. Dilüe edilmiş kan bu iki tüpe eşit olarak yayıldı. Daha sonra bu iki tüp 2500 rpm-25 dk (oda sıcaklığında) santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüplerde yoğunluk farkına göre tabakalaşma görüldü (Şekil 8). Tüpün en altına eritrositler çöker. Eritrosit tabakasının üzerinde sırasıyla Ficoll 1077, mononükleer hücre (monosit+lenfosit) ve serum tabakaları bulunur. Damlalık yardımıyla serum atıldı, mononükleer hücre tabakası toplanarak ayrı bir tüpe aktarıldı. Mononükleer hücrelerin bulunduğu tüpe PBS eklenerek 2000 rpm-5 dk santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi 2 kez yapıldı. Santrifüj sonrası kalan pellet, 3 ml tam RPMI ile sulandırıldı. Bu süspansiyondan alınan örnek ile mikroskopta hücre sayımı gerçekleştirildi. 0. saat hücre örneği **(M-0)** istenilen miktarda hemostaz deneyleri için ayrıldı. 0. saat akış sitometri çalışması için 100 mikrolitre (yaklaşık 200.000 hücre) ayrıldı.

22 saat inkübasyon için 96 kuyucuklu plaka kullanıldı. 5 kuyucukta (4 kuyucuk deney için, 1 kuyucuk akış sitometri çalışması için) LPS negatif için hücre ekimi oldu. Her kuyucuk için 5.10^6 hücre, 200 mikrolitre tam RPMI (%10 FBS+%1 Penisilin-Streptomisin) konuldu. 5 kuyucukta (4 kuyucuk deney için, 1 kuyucuk akış sitometri çalışması için) LPS pozitif için hücre ekimi oldu. Her kuyucuk için 5.10^6 hücre, 160 mikrolitre tam RPMI, 40 mikrolitre LPS (stok LPS=5 ng/ µl, istenen miktar=1 µg/ml) konuldu. Hazırlanan kuyucuklar 22 saat 37°C inkübatörde bekletildi. 22 saat sonra hücreler toplandı, LPS negatif **(M-22)**, LPS negatif ortam **(M/O-22)**, LPS pozitif **[M(+)-22]** ve LPS pozitif ortam **[M(+)/O-22]** olarak gruplandırıldı. 2000 rpm-5 dk santrifüj sonrası LPS negatif ve LPS pozitif RPMI ile sulandırılırken LPS negatif ortam ve LPS pozitif ortam 22 saat boyunca bulundukları RPMI ortamı ile sulandırıldı. İstenilen hücre sayısında hemostaz deneyleri için hazırlandı.

İzolasyondan sonra elde edilen hücrelerin karakterizasyonunu yapmak ve aktifliğini ölçmek amacıyla akış sitometrisi çalışıldı. 0. saat ve 22. saatte akış sitometri çalışması için daha önceden örnekler ayrıldı. 0. saat akış sitometrisi için 2 tüp, 22. saat LPS negatif için 2 tüp ve LPS pozitif için 2 tüp olacak şekilde hazırlandı. Tüplere 100 mikrolitre mononükleer hücre süspansiyonu ve ilgili yüzey belirteçlerine uygun boyalar konuldu. Hazırlanan tüp 40 dk ve 4°C'de karanlık ortamda bekletildi. Sonrasında tüpe 1 ml PBS eklenerek 2000 rpm-5 dk santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası tüpteki PBS döküldükten sonra tüpe bu kez 100 mikrolitre PBS koyuldu ve sulandırıldı. Böylece hazırlanan örnek akış sitometrisinde (BD

FACSymphony A1) çalışılacak duruma geldi. Birinci tüpte CD11B-FITC–5 µl (Beckman), CD14–APC-5 µl, CD16–PE–2,5 µl (Beckman), CD86–PE dozzle-2 µl (Sony Clone IT2.2) ve HLADR–PERCP-5 µl (BD CLONE L243) boyaları monosit karakterizasyonunu ve aktivasyonunu ölçmek için kullanıldı. İkinci tüpte CD11B–FITC-5 µl, CD14–APC-5 µl, CD86–PE dozzle-2 µl ve CD80–PE-5 µl monosit karakterizasyonunu ve aktivasyonunu ölçmek için kullanıldı.



Şekil 8. Mononükleer hücrelerin izolasyonu (Zibandeh, 2017).

3.5. Optik Agregometre Deneyleri

Optik agregometrelerin temeli, trombosit bakımından zengin plazmanın belirli bir trombosit agonisti ile uyarılması ve ardından ışık iletimindeki değişikliklerin fotometre ile ölçülmesine dayanır. Bu değişiklikler, trombositlerin bir araya gelmesi ve agregasyon oluşturmasıyla ilişkilidir. TZP örneklerinin ışık iletim yoğunluğundaki değişiklikler, agregasyon eğrisi olarak adlandırılan bir grafikte gösterilir. Bu eğri, trombositlerin agoniste yanıt verme sürecini ve agregasyonunun derecesini görselleştirir (Koltai, Kesmarky, Feher, Tibold, & Toth, 2017).

Trombositleri aktive etmek ve farklı trombosit agregasyon yollarını incelemek için kalsiyum, araşidonik asit, trombin, tromboksan A2, ristosetin, adenozin difosfat (ADP), kolajen, von Willebrand Faktörü (vWF), trombin reseptörü aktive edici peptid-

6 (TR1AP) ve epinefrin gibi çeşitli agregasyon uyarıcıları kullanılabilir (Koltai ve ark, 2017).

Agregasyon ölçümlerinin gerçekleştirilmesinde Platelet Aggregation Profiler® PAP-4CD (BIO/DATA CORPORATION, USA) optik agregometre cihazı kullanıldı. 4 kanallı cihazda; kontrol ve uyarılmış/uyarılmamış mononükleer hücreler [Kontrol / M-22 / M(+)-22] ile kontrol ve ortamlı-uyarılmış/ortamlı-uyarılmamış mononükleer hücreler [Kontrol / M/O-22 / M(+)/O-22] aynı anda çalışıldı. Trombositleri uyarmak amacıyla ADP ve kolajen (Helena Biosciences Europe, UK) kullanıldı. Uyarıcı ajanların test son konsantrasyonları ADP için 4 µM, kolajen için 38 µg/ml olacak şekilde uygulandı.

Tam kanın 200 g-15 dk santrifüj edilmesi sonrası sarı ve bulanık plazma elde edilir. Elde edilen bu plazmaya trombositten zengin plazma (TZP) denir. TZP alındıktan sonra kalan kan tekrardan 2000 g–15 dk daha santrifüj edilir. Bu santrifüj sonrası berrak sarı bir plazma elde edilir. Bu plazmaya trombositten fakir plazma (TFP) adı verilir. TFP'nin ışık geçirgenliği %100 olarak referans alınır, Başlangıçta TZP'nin ışık geçirgenliği cihaz tarafından %0 olarak ayarlanır. Bir uyarıcı ajanın eklenip trombositlerin bir araya toplanması/agrege olmasıyla plazma ışık geçirgenliği artar. Işık geçirgenliğindeki değişim trombositin agregasyon fonksiyonunun ölçüsü olarak kullanılır.

Agregometre cihaz verileri bilgisayar bağlantısı ile elektronik ortama aktarılır. Trombositlerin aktive olup agregasyon gerçekleştirmeleri ve böylece tüp içeriğinin ışık geçirgenliğinin artmasıyla elektronik ortamda grafik çizilir. Bu grafiklerde temel değerlendirilen parametre maksimum agregasyon (MA) verisidir. Uyarıcı ajana göre elde edilen % maksimimum agregasyon değerleri gruplar arası karşılaştırmak amacıyla kullanılmıştır (ADP-MA, Kolajen-MA)

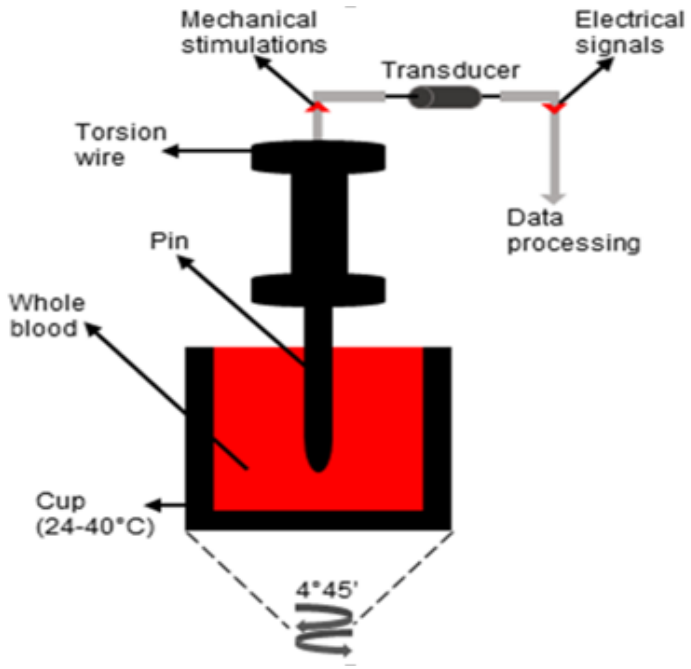
3.6. Tromboelastogram Deneyleri

Tromboelastogram (TEG) pıhtılaşan kanın viskoelastik özelliklerinin analizine dayanan ve tüm pıhtılaşma süreci hakkında bilgi veren bir yöntemdir. Kanın gerçek zamanlı pıhtılaşma sürecini değerlendirir. Pıhtının oluşmaya başlaması, pıhtı oluşumunun hızı, oluşan pıhtının gücü ve pıhtının çözünmesi gibi hemostaz ile ilgili tüm süreçlar tromboelastogram ile değerlendirilebilir. Geleneksel pıhtılaşma

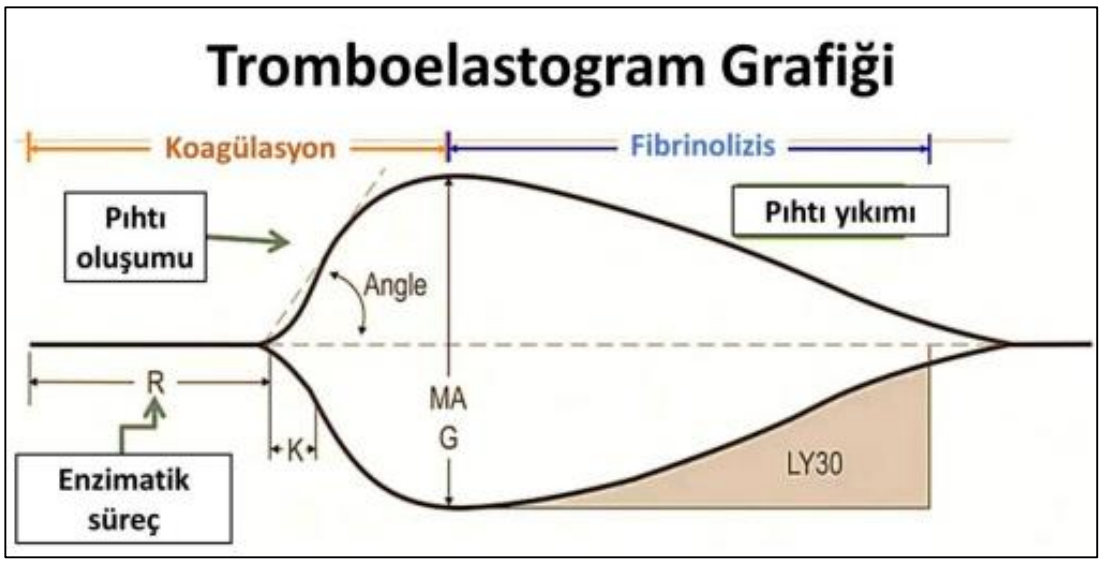
testlerinden daha hızlı sonuçlar verir.

Tromboelastogramda kullanılan küçük kaplar ve kapların içine giren pinler bulunur. Kaplar cihazdaki kuyucuklara oturtularak sabitlenir. Kuyucuklar 37°C'de deneyin sürdürülmesini sağlar. Kuyucuklar ve içine yerleştirilen kaplar kendi ekseni etrafında 10 saniyede 4 derece saat yönünde, sonra aynı hızda ters yönde dönme hareketi yapar. Kabın içine sitratın antikoagülan etkisini nötrlemek amacıyla 20 µl 0,2 M $CaCl_2$ ve antikoagüle TZP'den 340 µl konur.

Kap hareketli kuyucuğa yerleştirildikten sonra, pin kuyucuğun karşısındaki mekanik-elektrik dönüştürücüye bağlı bir burulma teli ile sıkı sıkıya kenetlenecek şekilde yuvasına yerleştirilir. Sonra pin, kabın içindeki kanın içinde asılı kalacak şekilde kabın içine girer ve cihaz çalışma moduna geçer. Kabın 4'er derecelik hareketi kan akışkan haldeyden içindeki pine yansımaz. Kan pıhtılaşmaya başlayıp, kan akışkandan viskoelastik bir maddeye, yani pıhtıya dönmeye başladıkça kabın hareketi pıhtı vasıtası ile pine iletilir (Şekil 9). Pıhtının oluşum özelliklerine bağlı olarak pin kabın hareketi ile hareket eder. Pıhtılaşma süreci ilerledikçe, oluşan pıhtının elastikiyeti, dayanıklılığı ve diğer fiziksel özellikleri değişir. Bu değişimler, burulma teline bağlı olan pinin hareketini etkiler. Pinin hareketi, mekanik-elektrik dönüştürücü tarafından algılanır ve elektrik sinyallerine dönüştürülür. Bu sinyaller bilgisayar tarafından işlenir, grafiksel (Şekil 10) ve sayısal bir çıktı oluşturulur (Mukhopadhyaya, & Subramanian, 2020).



Şekil 9. Tromboelastogramın çalışma prensibi (Isidan ve ark, 2021).



Şekil 10. Tromboelastogram grafiği (Arı, 2019).

R (Reaksiyon zamanı) (dk): Antikoagüle tam kanın kalsiyum ile karışıp deneyin başlatılmasının ardından, grafiğin birbirinden ayrılmaya başladığı ana kadar olan zamandır. İlk belirgin fibrin oluşumunu gösterir. Normal değeri 5-10 dk'dır.

K (Koagülasyon zamanı) (dk): R zamanından itibaren grafiğin genliğinin 20 mm açıldığı ana kadar olan zamandır. Fibrinojenin fibrine dönüşme (pıhtı oluşumu) süresini ölçer. Normal aralığı 1-3 dk'dır.

Alfa açısı (Angle) (derece): R zamanı ile K zamanı arasında çizilen doğrunun yatay eksen ile yaptığı açıdır. Fibrin oluşumunun hızını, çapraz bağlanmayı ve trombosit fonksiyonlarını yansıtan bir parametredir. Bu açı, pıhtının maksimum güce ulaşma hızını gösterir. Normal aralığı 53-72 derecedir.

MA (Maximal Amplitude) (mm): Pıhtının maksimum genliğini veya maksimum elastikiyetini yansıtır. Daha çok trombosit sayısı, trombosit fonksiyonları ve fibrinojen seviyesi ile ilgilidir. Normal aralığı 50-70 mm'dir.

G değeri (dyn/s): MA'dan hesaplanan bir parametredir ve pıhtının gücünü ifade eder.

Coagulation Index (CI): R zamanı, K zamanı, alfa açısı ve MA değerlerinin lineer indekslerini alarak hesaplanan bir değerdir.

LY30 (%): Pıhtının fibrinolitik yıkımını ölçer. MA'dan 30 dakika sonra amplitüd değerinin MA'ya göre yüzde değişimidir. Normal aralığı %0-8'dir.

Tromboelastogram deneyleri agregometre deneyleri ile parallel yürütülmüştür. TEG®5000 Thrombelastograph® (HAEMONETICS CORPORATION, MA, USA) cihazı kullanılmıştır. İki kanallı olan bu cihazda kontrol ve deney grubu aynı zamanda çalışılmıştır. R ve K zamanları, Angle (Açı), MA (Maksimum Amplitüd), G, CI ve LY30 değerleri kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırılmak üzere kaydedilmiştir.

3.7. 0. Saat Deney Prosedürü

Sağlıklı, gönüllüden alınan 3 tüp kan tek bir büyük tüpte birleştirilerek homojenleştirildi. 20 ml kan mononükleer hücrelerin izolasyonu için İmmünolji laboratuvarına gönderildi. Geriye kalan kandan 1 ml hemogram ölçümü için ayrıldı. Kalan kandan TZP ve TFP elde edildi. Tam kanın ve TZP'nin hücre sayımları yapıldı. Mononükleer hücrelerin trombositlere oranı bulunarak, TZP içinde olması gereken mononükleer hücre sayısı hesaplandı.

İmmünoloji laboratuvarından gelen mononükleer hücreler ile agregometre ve tromboelastogram deneyleri gerçekleştirildi.

Agregometrenin birinci kanalında agregasyon tüpüne 475 mikrolitre TZP+15 mikrolitre RPMI koyularak kontrol grubu oluşturuldu **(Kontrol)**. İkinci kanala 475 mikrolitre TZP+15 mikrolitre mononükleer hücreler konularak deney grubu oluşturuldu **(M-0)**. ADP son konsantrasyonu 4 µM olacak şekilde 10 µl eklenerek

agregasyon başlatıldı. Üçüncü ve dördüncü kanallarda aynı işlem son konsantrasyonu 38 µg/ml olacak şekilde 10 µl eklenerek kolajen için gerçekleştirildi.

Agregasyon deneylerinin paralelinde tromboelastogram deneyleride yürütüldü. Bunun için 2 kanaldan biri deney diğeri kontrol olarak ayarlandı. Kontrol grubunda kap içine 330 mikrolitre TZP+10 mikrolitre RPMI+20 Ca^{2+} koyuldu **(Kontrol)**. Deney grubunda kap içine 330 mikrolitre TZP+10 mikrolitre mononükleer hücre+20 Ca^{2+} mikrolitre eklendi **(M-0)** ve deney başlatıldı. Yaklaşık 1 saat içinde tromboelastogram parametrelerinin tümünün belirmesi ile birlikte deney sonlandırıldı ve deney grafikleri elde edildi.

3.8. 22. Saat Deney Prosedürü

Mononükleer hücreler 22. saatin sonunda inkübasyonda beklediği kuyucuklardan toplanarak deney tüplerine alındı. Mononükleer hücreler inkübasyona alınmadan önce 4 gruba ayrılmışlardı. Birincisi LPS negatif mononükleer hücreler **(M-22)**, ikincisi LPS pozitif mononükleer hücreler **[M(+)-22]**, üçüncüsü LPS negatif ortamlı mononükleer hücreler **(M/O-22)**, dördüncüsü LPS pozitif ortamlı mononükleer hücreler **[M(+)/O-22]** olarak gruplandırıldı.

1. grup **(M-22):** LPS ile uyarılmadan 22 saat inkübe edilen mononükleer hücreler 2000 rpm-5 dk santrifüj sonrası çöktürüldükten sonra yeni bir RPMI solüsyonu ile seyreltildi.

2. grup **[M(+)-22]:** LPS ile uyarılmış hücreler 22 saat sonunda 2000 rpm-5 dk santrifüj sonrası çöktürüldükten sonra yeni bir RPMI solüsyonu ile seyreltildi.

3. grup **(M/O-22):** LPS ile uyarılmadan 22 saat inkübe edilen mononükleer hücreler 2000 rpm-5 dk santrifüj sonrası çöktürüldükten sonra 22 saat boyunca bulundukları RPMI ortamı ile tekrardan istenilen oranda seyreltildi.

4. grup **[M(+)/O-22]:** LPS ile uyarılmış hücreler 22 saat sonunda 2000 rpm-5 dk santrifüj sonrası çöktürüldükten sonra 22 saat boyunca bulundukları RPMI ortamı ile tekrardan istenilen oranda seyreltildi.

0. saatte kan alınan gönüllüden 22. saat denemeleri için tekrardan 3 tüp kan alındı. Bu kanın tamamından TZP elde edildi.

Agregometrede yapılan 22. saat trombosit agregasyon ilk deneyi için 3 agregometre tüpünün her birine 475'er mikrolitre TZP koyuldu. Ardından birinci tüpe

RPMI, ikinci tüpe uyarılmamış mononükleer hücre, üçüncü tüpe uyarılmış mononükleer hücre süspansiyonu her tüp için 15 mikrolitre olacak şekilde koyuldu. ADP eklenerek agregasyon değerleri elde edildi. Aynı işlem kolajen için de gerçekleştirildi. Aynı işlemler ortamlı uyarılmış ve uyarılmamış mononükleer hücreler içinde tekrarlandı. Agregometrede 4 tur çalışıldı.

Kontrol / M-22 / M(+)-22 [ADP ve kolajen]

Kontrol / M/O-22 / M(+)/O-22 [ADP ve kolajen]

Tromboelastogram deneylerinde birinci kanalda kontrol grubu, ikinci kanalda deney grubu çalışıldı. Kontrol grubu için kaba 20 mikrolitre Ca^{2+}, 10 mikrolitre RPMI ve 330 mikrolitre TZP konuldu. İkinci kanaldaki deney grubu kabına 20 mikrolitre Ca^{2+} ve 330 mikrolitre TZP konulduktan sonra birinci tur için 10 mikrolitre LPS negatif mononükleer hücre süspansiyonu (M-22), ikinci tur için 10 mikrolitre LPS pozitif mononükleer hücre süspansiyonu [M(+)-22], üçüncü tur için 10 mikrolitre LPS negatif ortamlı mononükleer hücre süspansiyonu (M/O-22) ve dördüncü tur için 10 mikrolitre LPS pozitif ortamlı mononükleer hücre süspansiyonu [M(+)/O-22]eklendi. Tüm veriler elde edilerek deneyler sonlandırıldı.

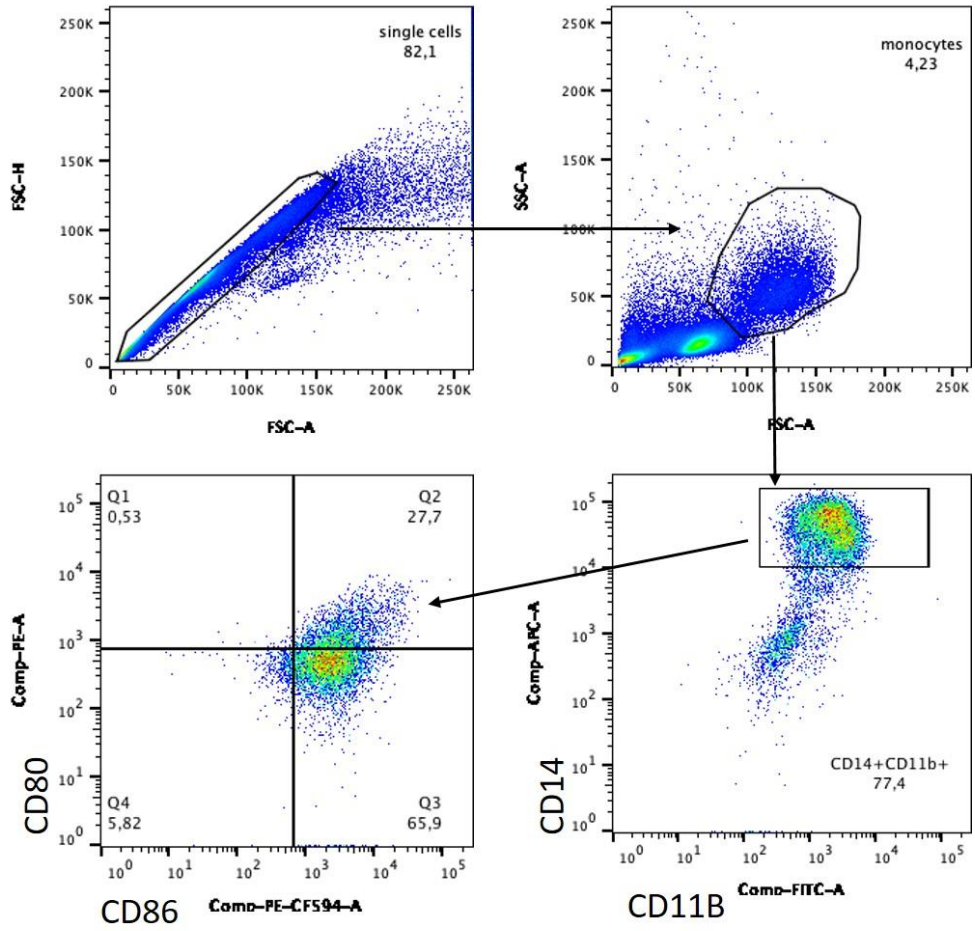
3.9. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS28.0 istatistik paket programında yapıldı. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (minimum-maksimum) değerler şeklinde gösterildi. Grup içi bağımlı örneklemlerin karşılaştırmasında eşleştirilmiş t-testi kullanıldı. Zamana ve gruplara bağımlı yüzde değişimlerin karşılaştırılması, tekrarlı ölçümler için varyans analizi ile yapıldı. Anlamlılık bulunması durumunda gruplar arası ikili karşılaştırmalar için çoklu karşılaştırma testlerinden Bonferroni Testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi α=0,05 olarak belirlendi.

4.BULGULAR

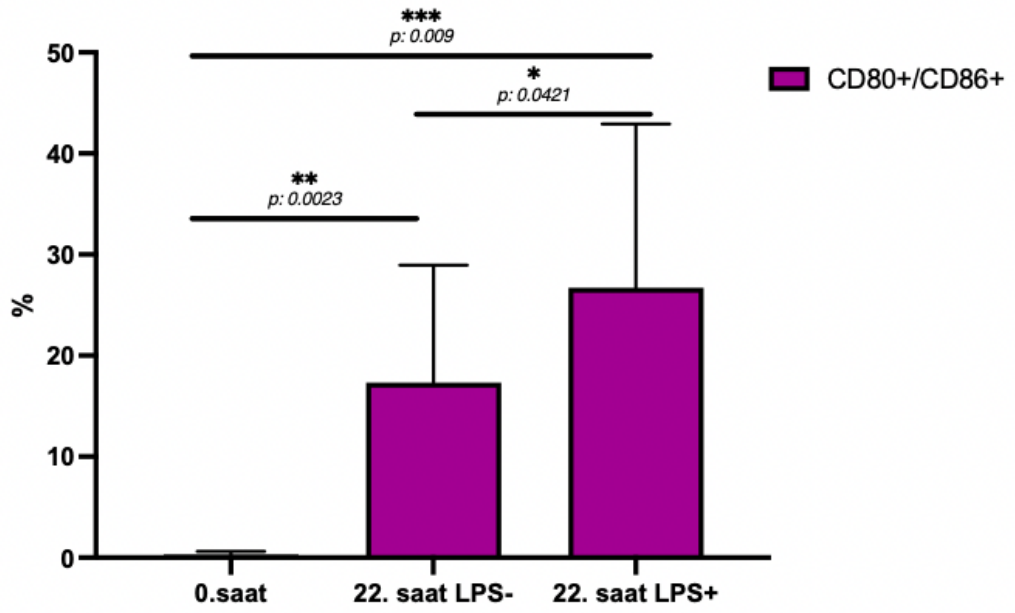
4.1. Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu ve Monositlerin Uyarılması

Tam kandan ayrıştırılan mononükleer hücrelerin akış sitometrisi ile karakterizasyonunun yapılması ve mononükleer hücrelerden biri olan monositlerin 0. saat ve 22. saat uyarılma düzeyleri Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11. Ayrıştırılan monositlerin karakterizasyonu ve aktivasyonuna örnek akış sitometri görüntüsü

Monositlerde CD80+/CD86+ düzeyinin artması, monositlerin aktive olduğunun bir göstergesidir (Grafik 1). Monositlerin aktive olduğunun gösterilmesi dolaylı olarak lenfositlerin ve tüm mononükleer hücrelerin aktive olduğunu göstermektedir.



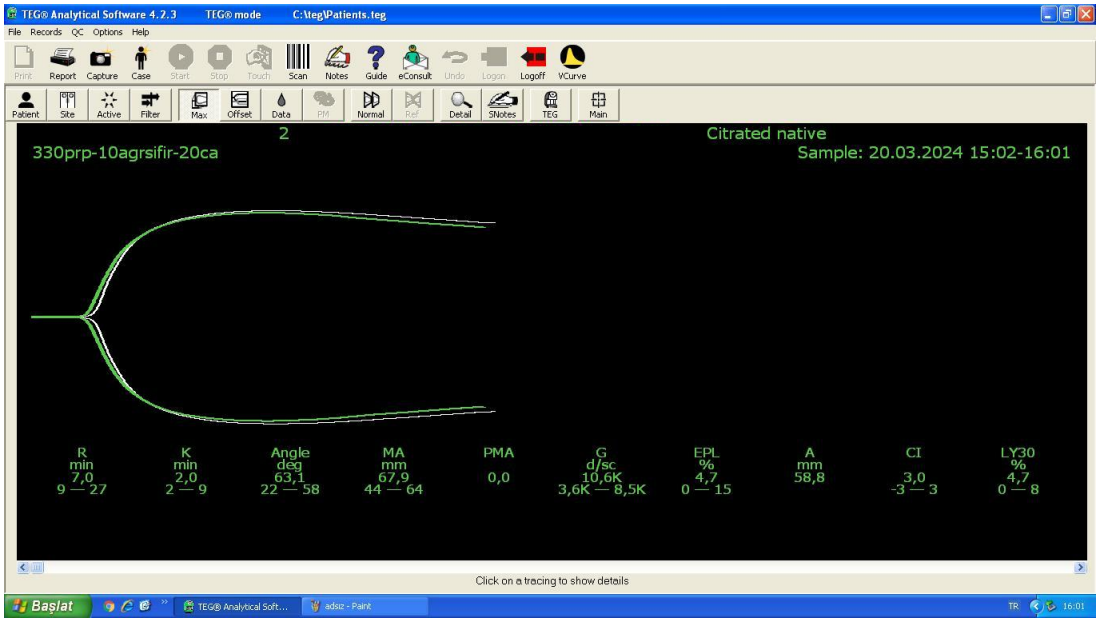
Grafik 1. Monositlerin 0. saat, 22. saat LPS (-) ve 22. saat LPS(+) aktivasyon düzeyleri.

4.2. Tromboelastogram Sonuçları

Mononükleer hücreler ve trombositler tam kandan ayrıştırıldıktan hemen sonra (çalışma protokolünde 0. saat) trombositten zengin plazmaya (TZP) eklenen mononükleer hücrelerin (M-0) kontrol grubuna göre tromboelastogram parametreleri üzerine etkileri çalışılmıştır. Mononükleer hücrelerin, ayrıştırıldıktan hemen sonra TZP üzerine eklenmesi, tromboelastogram parametrelerinin hiçbiri üzerinde (LY30 hariç) anlamlı bir etki oluşturmamıştır. Aşağıda Şekil 12'de de görüldüğü gibi birçok parametre birbirine yakın sonuçlar vermiştir. Sadece, ortalamada, kontrol grubuna göre (%2,1) deney grubunda (M-0) daha fazla bir lizis yüzdesi (%3,1) anlamlı olarak gözlenmiştir (p=0,020). Pıhtının lizisi (çözünmesi) kontrol grubuna göre ortalama %70 artmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Mononükleer hücrelerin 0. saat tromboelastogram parametreleri üzerine etkileri.

	M-0	Kontrol	%fark	p
R	7,9 ± 3,1 (3,8 - 14)	8,9 ± 5,3 (5,8 - 20,8)	-5,5 ± 22,1 (-36,7 - 19)	0,367
K	1,8 ± 0,3 (1,1 - 2,1)	2,4 ± 1,1 (1,6 - 4,8)	-17,9 ± 27,8 (-56,3 - 12,5)	0,147
Angle	65,1 ± 5 (59,9 - 75,2)	60,1 ± 9,4 (41,3 - 68,9)	10,8 ± 21,1 (-5,1 - 56,2)	0,197
MA	65,8 ± 5,6 (58,6 - 74,9)	66,1 ± 4,2 (60 - 72,4)	-0,4 ± 8 (-7,1 - 16)	0,861
G	10 ± 2,6 (7,1 - 14,9)	10 ± 1,9 (7,5 - 13,1)	1,1 ± 24,8 (-18,3 - 52)	0,986
CI	2,4 ± 0,8 (1,3 - 3,8)	2,4 ± 0,8 (1 - 3,2)	18,1 ± 71,6 (-40,7 - 140)	0,899
LY30	3,1 ± 1,9 (0,3 - 5,5)	2,1 ± 1,4 (0,2 - 3,5)	70 ± 75,2 (11,1 - 220)	**0,020**



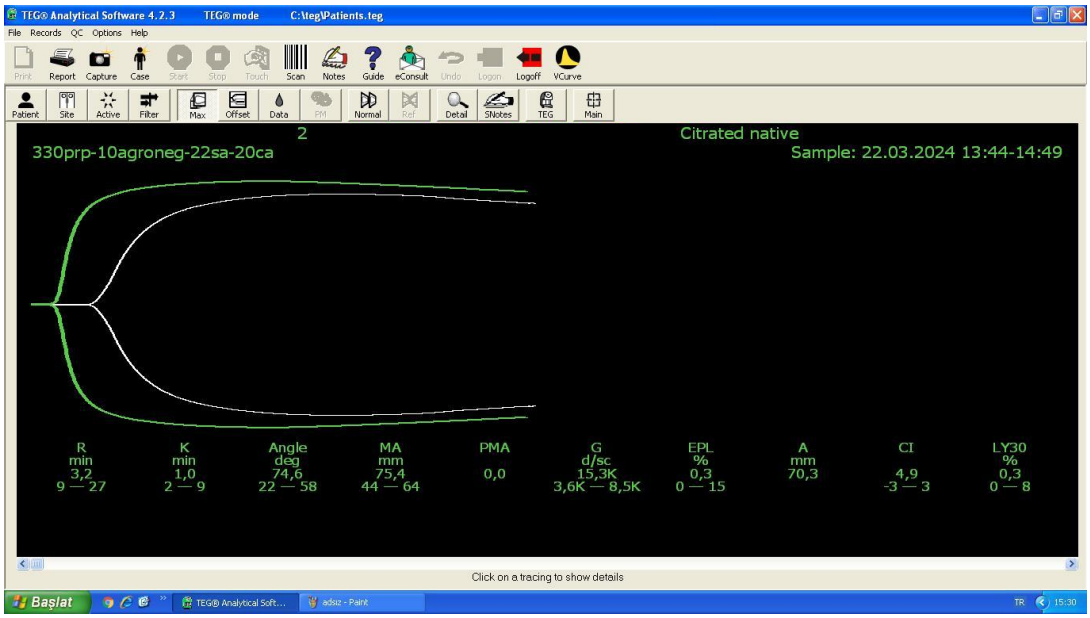
Şekil 12. 0. saat (M-0) tromboelastogram deneylerinden bir örnek.

Mononükleer hücreler tam kandan ayrıştırıldıktan sonra, LPS ile uyarılmadan 22 saat boyunca bekletildikten sonra (çalışma protokolünde 22. saat) trombositten zengin plazmaya (TZP) eklenen mononükleer hücrelerin (M-22) kontrol grubuna göre tromboelastogram parametreleri üzerine etkileri çalışılmıştır. Mononükleer hücrelerin, ayrıştırılıp yaklaşık bir gün bekletildikten sonra TZP üzerine eklenmesi, tromboelastogram parametrelerinin hemen hemen hepsi üzerinde (LY30 hariç) anlamlı etkiler oluşturmuştur. R ve K parametrelerini anlamlı olarak ortalama %38,6 ve %34,8 kısaltmış, Angle, MA, G ve CI parametrelerini ortalama %12,9; %6,1; %26,3 ve %45,5 arttırmıştır. 22 saat boyunca bekleyen mononükleer hücreler,

tromboelastogram üzerinde hemostazı arttırıcı etkiler göstermiştir. Aşağıda Şekil 13'te de görüldüğü gibi kontrol grubuna göre daha hiperkoagülan bir etki gözlenmektedir (Tablo 2).

Tablo 2. Mononükleer hücrelerin 22. saat tromboelastogram parametreleri üzerine etkileri.

	M-22	Kontrol	%fark	p
R	5,6 ± 2,7 (2,8 - 10,3)	8,9 ± 1,7 (7,8 - 12,8)	-38,6 ± 22,7 (-65,9 - -5,1)	**0,002**
K	1,4 ± 0,4 (0,9 - 2,1)	2,2 ± 0,6 (1,6 - 3,1)	-34,8 ± 21,8 (-60 - 6,2)	**0,007**
Angle	68,8 ± 8,7 (52,9 - 76,8)	61 ± 7,6 (48,7 - 68,4)	12,9 ± 8,3 (0,3 - 25,4)	**0,006**
MA	75,6 ± 4 (69,9 - 81,3)	71,4 ± 4 (65,8 - 76,9)	6,1 ± 3,8 (1,6 - 10,2)	**0,005**
G	16 ± 3,4 (11,6 - 21,7)	12,7 ± 2,5 (9,6 - 16,7)	26,3 ± 18 (6,1 - 47,6)	**0,010**
CI	4,5 ± 0,8 (3,3 - 5,7)	3,1 ± 0,4 (2,7 - 3,7)	45,5 ± 20,9 (22,2 - 73,3)	**0,001**
LY30	0,9 ± 0,8 (0,1 - 2,3)	1,2 ± 1,2 (0,1 - 3,3)	24,2 ± 93 (-85 - 200)	0,282



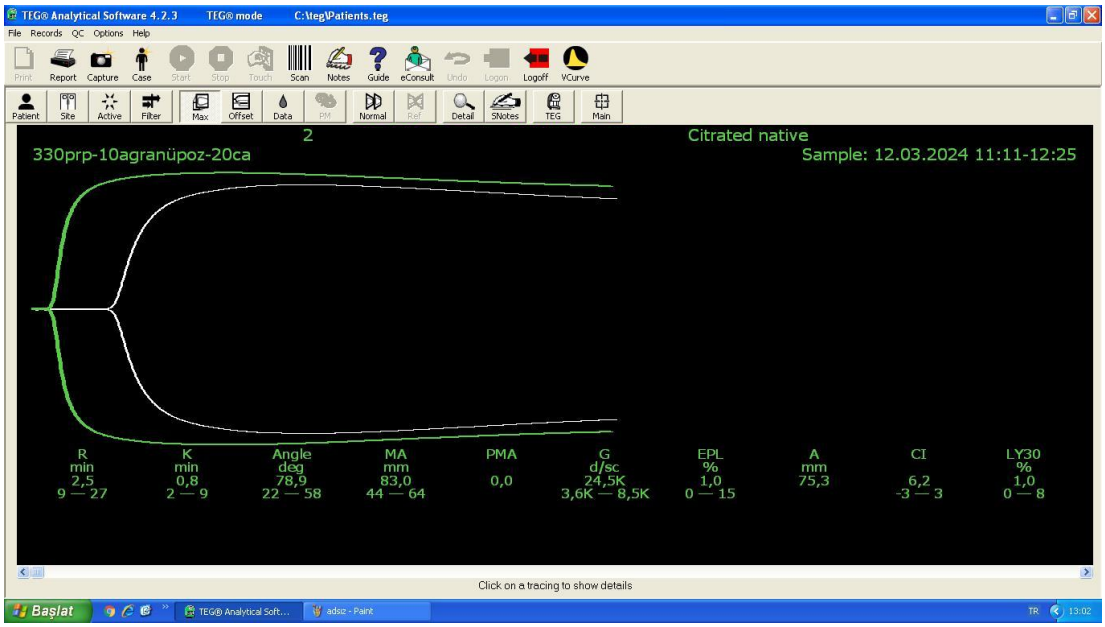
Şekil 13. 22. Saat (M-22) tromboelastogram deneylerinden bir örnek.

Mononükleer hücreler tam kandan ayrıştırılıp, 22 saat boyunca LPS ile muamele edildikten sonra (uyarılma protokolü) trombositten zengin plazmaya (TZP) eklenen mononükleer hücrelerin [M(+)-22] kontrol grubuna göre tromboelastogram parametreleri üzerine etkileri çalışılmıştır. Mononükleer hücrelerin, uyarıldıktan sonra TZP üzerine eklenmesi, tromboelastogram parametrelerinin hemen hemen hepsi

üzerinde (LY30 hariç) anlamlı etkiler oluşturmuştur. R ve K parametrelerini anlamlı olarak ortalama %73,1 ve %50,6 kısaltmış, Angle, MA, G ve CI parametrelerini ortalama %31,9; %12,8; %63 ve %88,4 arttırmıştır. 22 saat boyunca uyarılarak bekleyen mononükleer hücreler, uyarılmadan bekleyen mononükleer hücrelere göre, tromboelastogram üzerinde hemostazı daha da arttırıcı etkiler göstermiştir. Aşağıda Şekil 14'te de görüldüğü gibi kontrol grubuna göre daha da hiperkoagülan bir etki gözlenmektedir (Tablo 3).

Tablo 3. Aktive edilmiş mononükleer hücrelerin tromboelastogram parametreleri üzerine etkileri.

	M(+)-22	Kontrol	%fark	p
R	2,2 ± 0,5 (1,5 - 2,8)	8,2 ± 1,7 (6,2 - 10,5)	-73,1 ± 3,9 (-76 - -65,4)	**<0,001**
K	0,9 ± 0,2 (0,8 - 1,4)	1,9 ± 0,4 (1,5 - 2,4)	-50,6 ± 16,1 (-62,5 - -17,6)	**<0,001**
Angle	77,7 ± 2,4 (74,8 - 81,8)	60,3 ± 9 (43,4 - 69,3)	31,9 ± 23,7 (9,2 - 81,8)	**0,002**
MA	79,1 ± 3,6 (72,1 - 83)	70,2 ± 4 (64,7 - 75,9)	12,8 ± 5 (5,9 - 19,2)	**<0,001**
G	19,5 ± 3,8 (13 - 24,5)	12,1 ± 2,3 (9,2 - 15,7)	63 ± 23,7 (21,5 - 91,3)	**<0,001**
CI	5,7 ± 0,6 (4,6 - 6,2)	3,2 ± 0,8 (1,7 - 4)	88,4 ± 54 (55 - 205,9)	**<0,001**
LY30	1,3 ± 1 (0,1 - 2,6)	1,3 ± 0,6 (0,4 - 2)	8,1 ± 78,1 (-88,9 - 130)	0,963

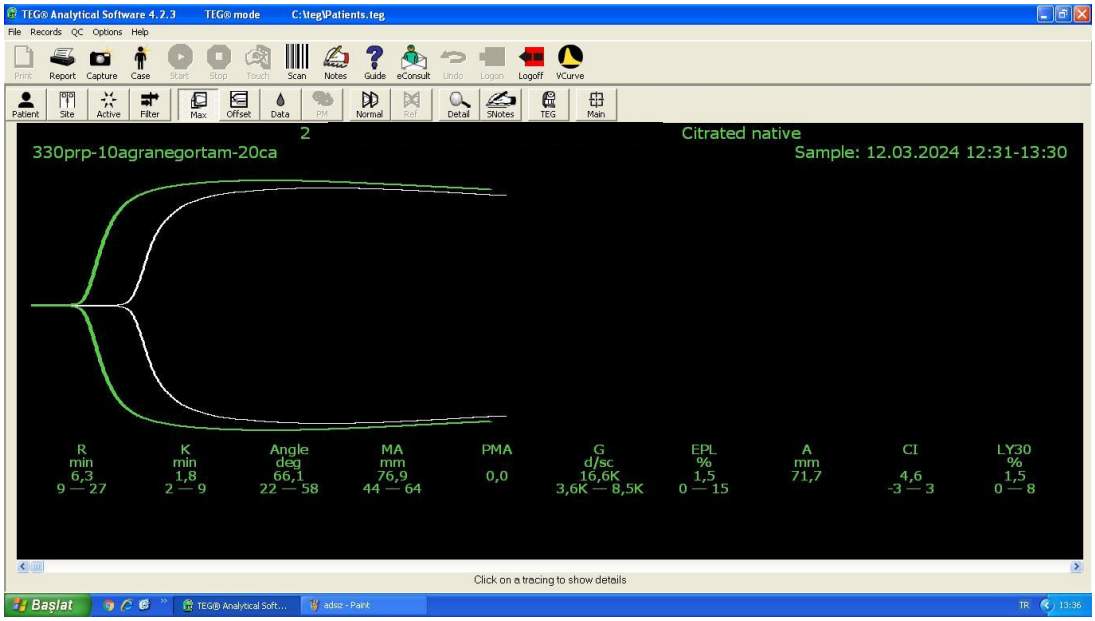


Şekil 14. Uyarılarak bekletilen mononükler hücrelerle [M(+)-22] yapılan tromboelastogram deneylerinden bir örnek.

Mononükleer hücreler tam kandan ayrıştırıldıktan sonra, LPS ile uyarılmadan 22 saat boyunca bekletildikten sonra, çevresinde bulunduğu sıvı ortamıyla birlikte (çalışma protokolünde 22. saat ortamlı) trombositten zengin plazmaya (TZP) eklenen mononükleer hücrelerin (M/O-22) kontrol grubuna göre tromboelastogram parametreleri üzerine etkileri çalışılmıştır. Mononükleer hücrelerin, ayrıştırıldıktan sonra 22 saat bekletildiği ortam ile birlikte TZP üzerine eklenmesi, tromboelastogram parametrelerinin hemen hemen hepsi üzerinde (LY30 hariç) anlamlı etkiler oluşturmuştur. R ve K parametrelerini anlamlı olarak ortalama %40,7 ve %43,3 kısaltmış, Angle, MA, G ve CI parametrelerini ortalama %30; %11,9; %54,9 ve %61,7 arttırmıştır. 22 saat boyunca bekleyen mononükleer hücreler çevre ortamlarıyla birlikte tromboelastogram üzerinde hemostazı daha da arttırıcı etkiler göstermiştir. Aşağıda Şekil 15'te de görüldüğü gibi kontrol grubuna göre daha hiperkoagülan bir etki gözlenmektedir (Tablo 4).

Tablo 4. Uyarılmadan 22 saat boyunca bekleyen mononükleer hücrelerin çevre ortamıyla birlikte (M/O-22) tromboelastogram parametreleri üzerine etkileri.

	M/O-22	**Kontrol**	**%fark**	**p**
R	4,4 ± 1,1 (2,8 - 6,3)	7,8 ± 2,4 (5,2 - 12,4)	-40,7 ± 14,6 (-61,1 - -19,2)	**0,003**
K	1,1 ± 0,4 (0,8 - 1,8)	2,2 ± 0,7 (1,6 - 3,4)	-43,3 ± 24,8 (-67,9 - -5,3)	**0,014**
Angle	73,3 ± 6,4 (63,5 - 79,5)	58,3 ± 10,1 (43,3 - 67,3)	30 ± 30,7 (2,8 - 80,4)	**0,021**
MA	76,7 ± 3,5 (70 - 81,3)	68,7 ± 3 (64,6 - 72,2)	11,9 ± 6,9 (5,3 - 20,6)	**0,003**
G	16,9 ± 3 (11,7 - 21,8)	11,1 ± 1,6 (9,1 - 13)	54,9 ± 36,3 (18,2 - 96,4)	**0,004**
CI	4,8 ± 0,6 (3,8 - 5,7)	3,1 ± 0,5 (2,4 - 3,7)	61,7 ± 39,8 (2,7 - 111,1)	**0,003**
LY30	1,5 ± 1,5 (0 - 4,6)	1,5 ± 1,1 (0,3 - 3,4)	-3 ± 73,8 (-100 - 133,3)	0,836

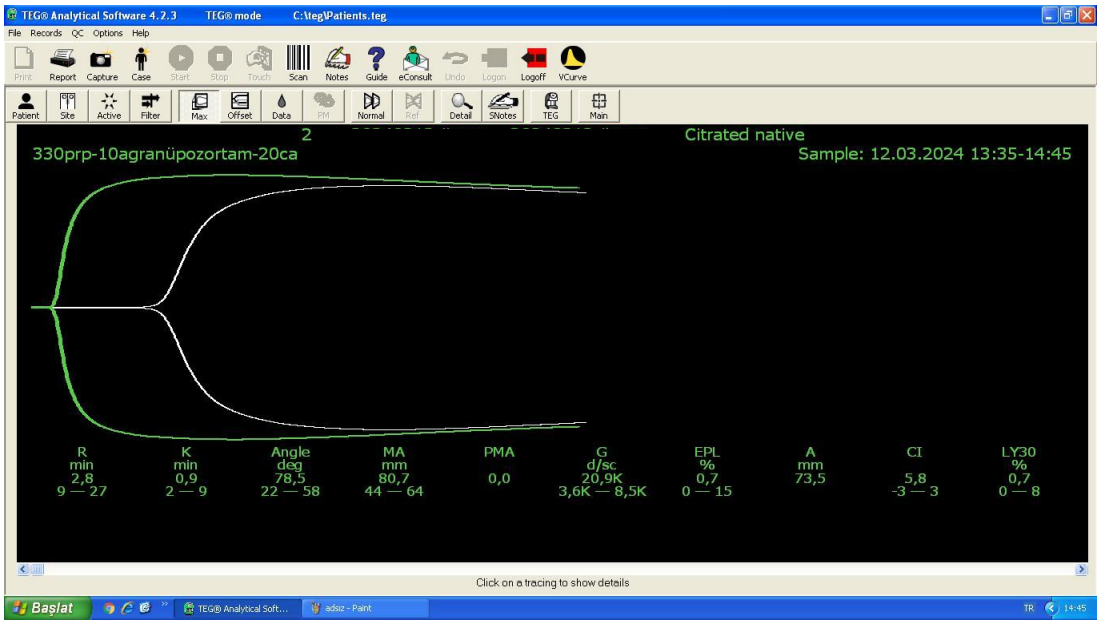


Şekil 15. Uyarılmadan bekletilen mononükleer hücreler ve çevre ortamları ile [M/O-22] yapılan tromboelastogram deneylerinden bir örnek.

Mononükleer hücreler tam kandan ayrıştırıldıktan sonra, LPS ile uyarılarak 22 saat boyunca bekletildikten sonra, çevresinde bulunduğu sıvı ortamıyla birlikte (çalışma protokolünde 22. saat uyarılmış ortamlı) trombositten zengin plazmaya (TZP) eklenen mononükleer hücrelerin [M(+)/O-22] kontrol grubuna göre tromboelastogram parametreleri üzerine etkileri çalışılmıştır. Mononükleer hücrelerin, uyarılarak bekletildiği süre boyunca çevre ortamıyla birlikte TZP üzerine eklenmesi, tromboelastogram parametrelerinin hemen hemen hepsi üzerinde (LY30 hariç) anlamlı etkiler oluşturmuştur. R ve K parametrelerini anlamlı olarak ortalama %66,3 ve %54,7 kısaltmış, Angle, MA, G ve CI parametrelerini ortalama %31,2; %13,8; %59,4 ve %148,6 arttırmıştır. 22 saat boyunca uyarılarak bekleyen mononükleer hücreler çevre ortamlarıyla birlikte tromboelastogram üzerinde hemostazı daha da arttırıcı etkiler göstermiştir. Aşağıda Şekil 16'da da görüldüğü gibi kontrol grubuna göre daha hiperkoagülan bir etki gözlenmektedir (Tablo 5).

Tablo 5. Aktive edilmiş mononükleer hücreler ve çevre ortamlarının tromboelastogram parametreleri üzerine etkileri.

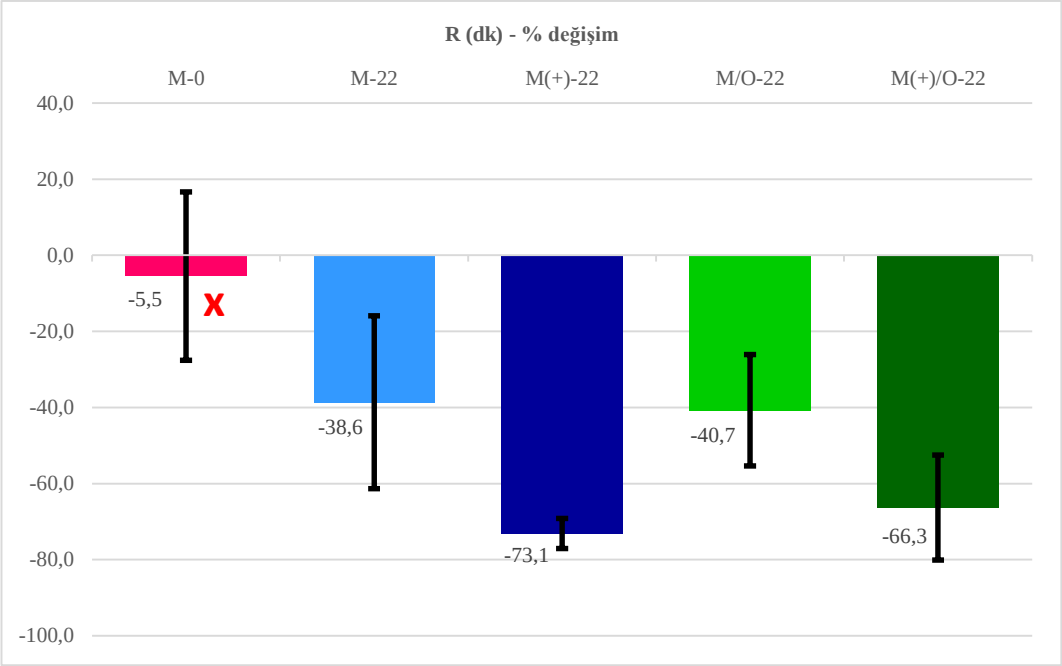
	M(+)/O-22	Kontrol	%fark	p
R	2,6 ± 0,7 (1,6 - 3,8)	8,5 ± 3,5 (6,3 - 16,2)	-66,3 ± 13,8 (-82,7 - -39,7)	**0,004**
K	1 ± 0,3 (0,8 - 1,6)	2,2 ± 0,9 (1,2 - 4)	-54,7 ± 11 (-65,4 - -33,3)	**0,002**
Angle	78,3 ± 2,2 (74,7 - 80,8)	60,8 ± 8,8 (44,8 - 70,9)	31,2 ± 19,5 (12,3 - 66,7)	**0,001**
MA	77,4 ± 4,9 (68,7 - 81,3)	68,4 ± 7,4 (53,2 - 74,8)	13,8 ± 7 (7,9 - 29,1)	**<0,001**
G	17,9 ± 4,3 (11 - 21,8)	11,4 ± 3,1 (5,7 - 14,9)	59,4 ± 18 (40,3 - 93)	**<0,001**
CI	5,3 ± 0,8 (3,8 - 6,1)	2,8 ± 1,2 (0,6 - 3,9)	148,6 ± 176,5 (48,6 - 533,3)	**<0,001**
LY30	1,6 ± 1,7 (0,4 - 5,3)	1,6 ± 1,6 (0,1 - 4,5)	170,5 ± 360,2 (-77,8 - 900)	1,000



Şekil 16. Uyarılarak bekletilen mononükleer hücreler ve çevre ortamları ile [M(+)/O-22] yapılan tromboelastogram deneylerinden bir örnek.

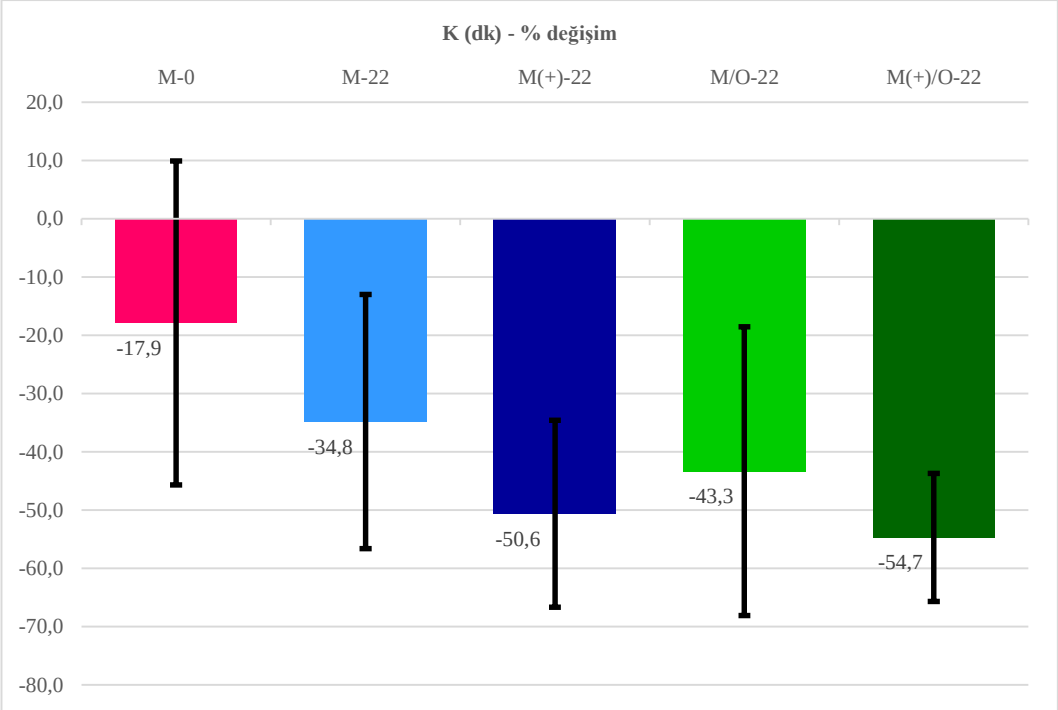
Kontrol grubuna göre 0. saat mononükleer hücre deneyleri dışında diğer tüm gruplar anlamlı olarak hemostazı arttırmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalar her bir grubun yüzde değişimleri üzerinden yapılmıştır.

M-0 grubu dışında tüm gruplarda anlamlı olarak R zamanı kısalmıştır. M-0 grubuna göre diğer tüm gruplar R parametresinde azalma yönünde anlamlı farklılık göstermiştir. Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Grafik 2).



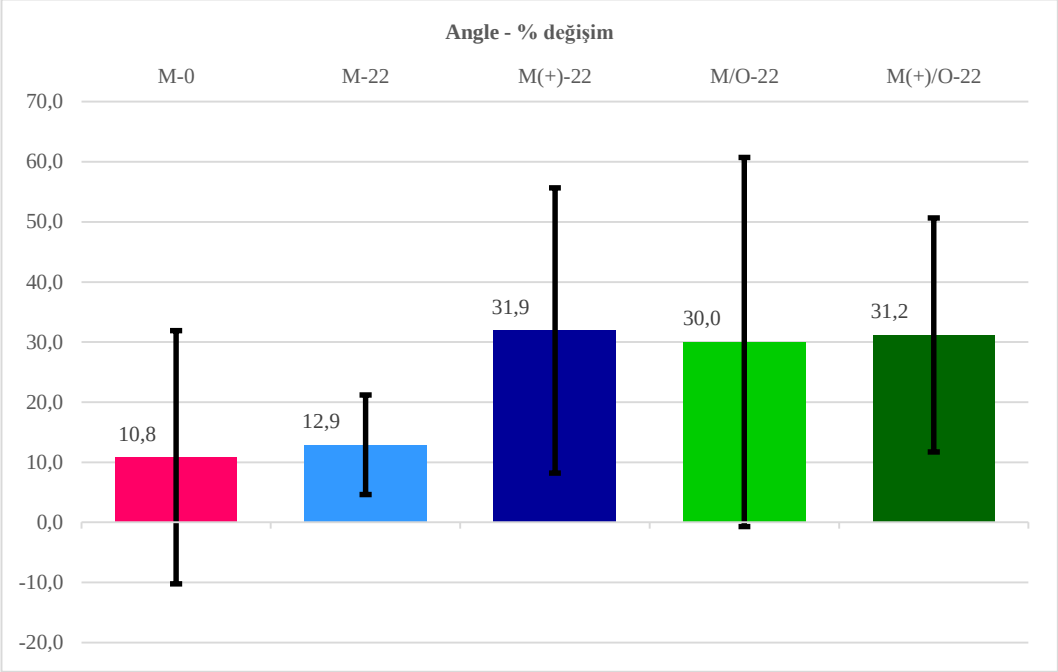
Grafik 2. R parametresinin gruplar arası karşılaştırılması.
[**X**: M-0 grubu diğer gruplardan anlamlı olarak farklı (p<0,001)].

M-0 grubu dışında tüm gruplarda anlamlı olarak K zamanı kısalmasına rağmen gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Grafik 3).



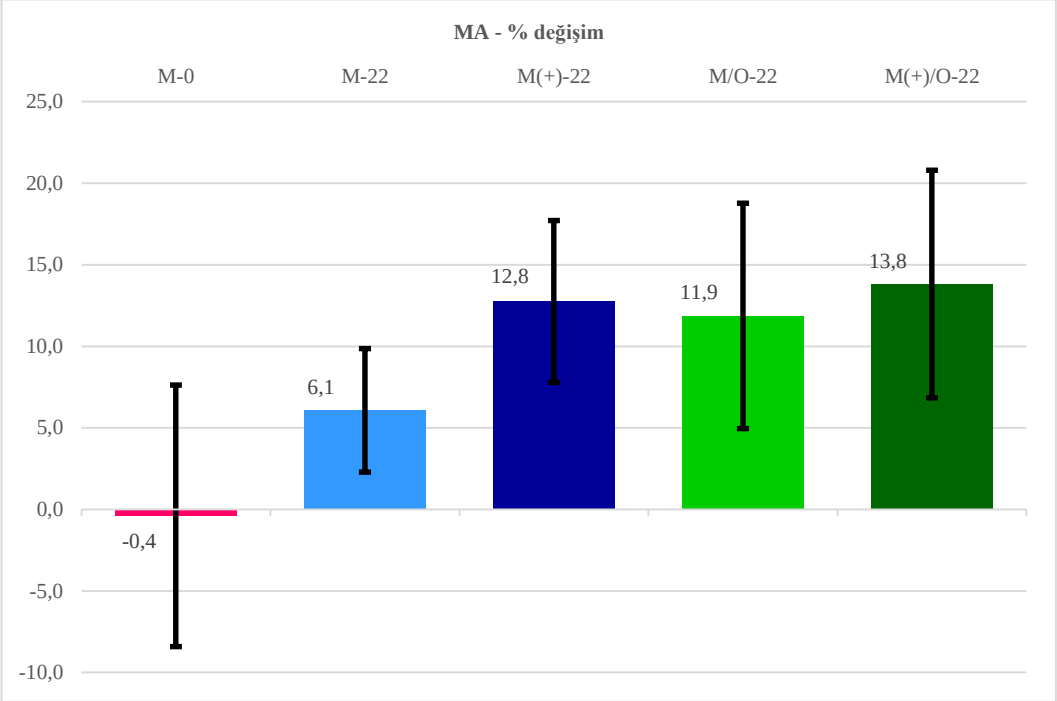
Grafik 3. K parametresinin gruplar arası karşılaştırılması.
[Gruplar arası fark yok (p=0,088)].

M-0 grubu dışında tüm gruplarda anlamlı olarak Angle parametresi artmasına rağmen gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Grafik 4).



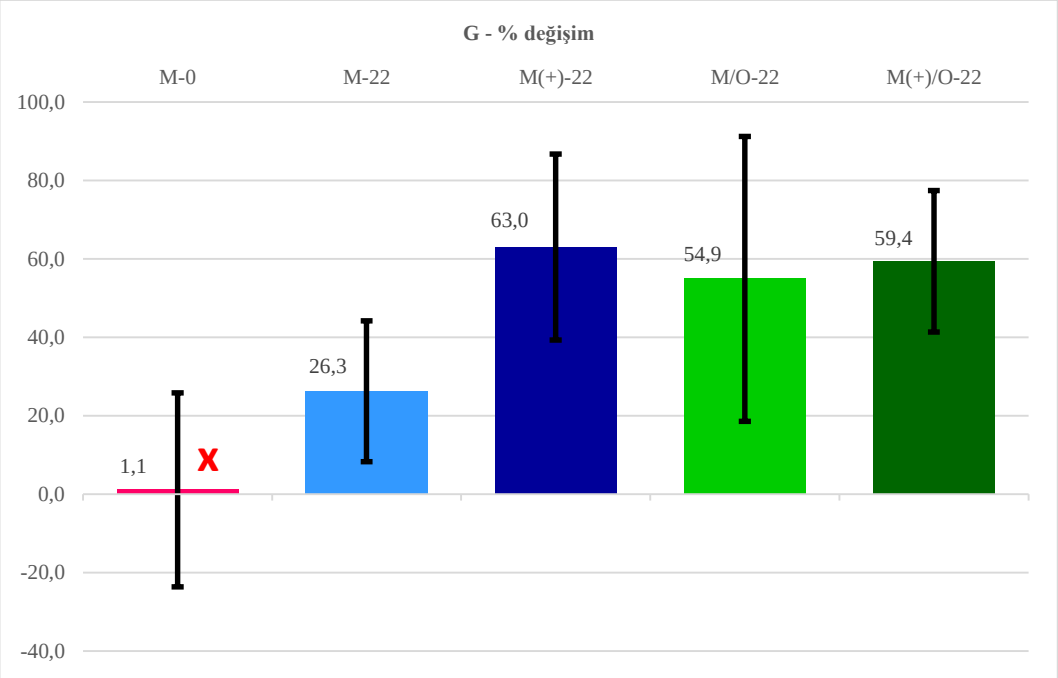
Grafik 4. Angle parametresinin gruplar arası karşılaştırılması.
[Gruplar arası fark yok (p=0,180)].

M-0 grubu dışında tüm gruplarda anlamlı olarak MA parametresi artmasına rağmen gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Grafik 5).



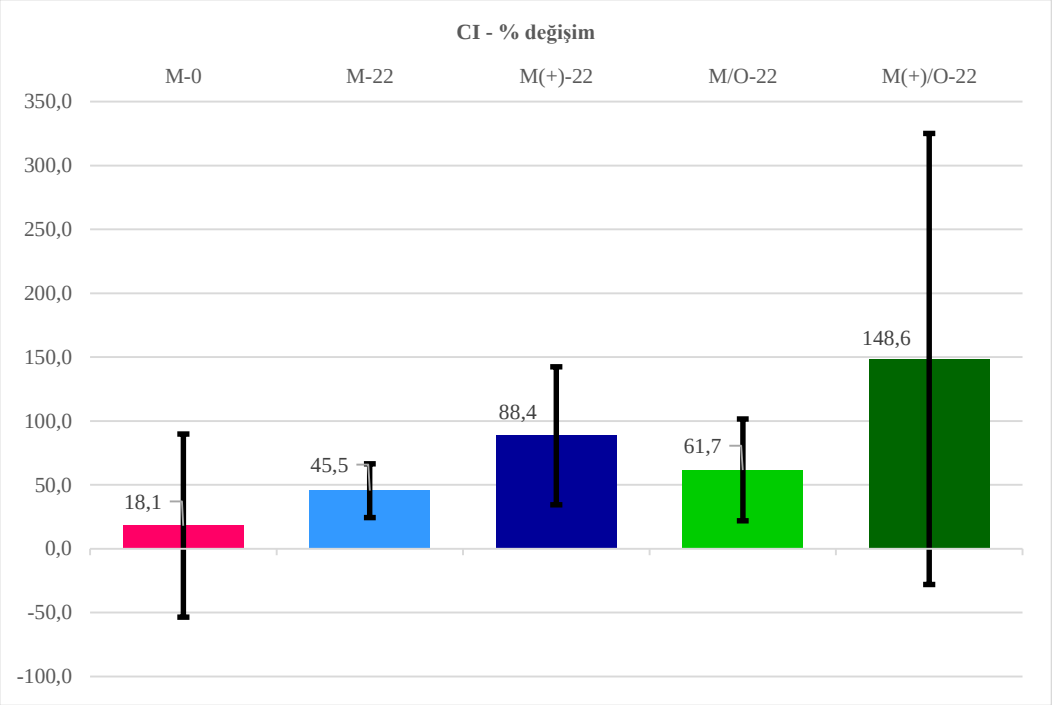
Grafik 5. MA parametresinin gruplar arası karşılaştırılması.
[Gruplar arası fark yok (p=0,074)].

M-0 grubu dışında tüm gruplarda anlamlı olarak G parametresi artmıştır. M-0 grubuna göre M(+)-22 ve M(+)/O-22 gruplarında G parametresi artma yönünde anlamlı farklılık göstermiştir. Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Grafik 6).



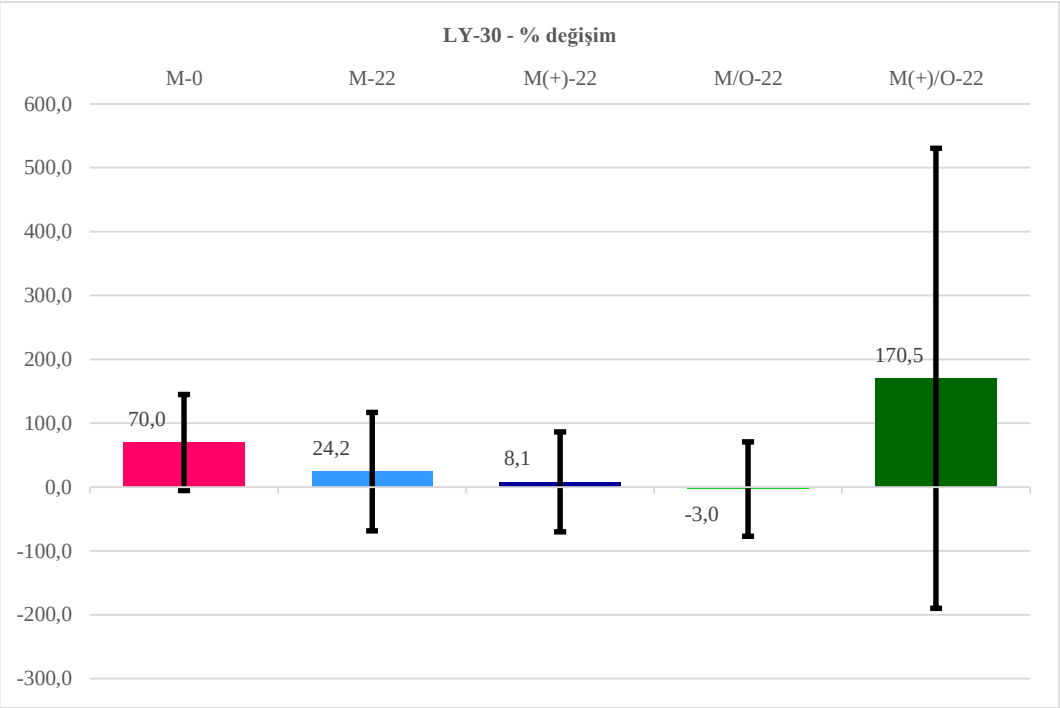
Grafik 6. G parametresinin gruplar arası karşılaştırılması.
[X: M-0 grubu, M(+)-22 ve M(+)/O-22 gruplarından anlamlı olarak farklı ($p<0,001$).]

M-0 grubu dışında tüm gruplarda anlamlı olarak CI parametresi artmasına rağmen gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Grafik 7).



Grafik 7. CI parametresinin gruplar arası karşılaştırılması.
[Gruplar arası fark yok (p=0,202)].

M-0 grubunda LY30 parametresi anlamlı olarak artmasına rağmen diğer gruplarda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Gruplar arasında da anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Grafik 8).



Grafik 8. LY30 parametresinin gruplar arası karşılaştırılması.
[Gruplar arası fark yok (p=0,491)].

4.3. Agregometre Sonuçları

Mononükleer hücreler ve trombositler tam kandan ayrıştırıldıktan hemen sonra trombositten zengin plazmaya (TZP) eklenen mononükleer hücreler (M-0) kontrol grubuna göre kolajen ile uyarılan agregasyonu maksimum agregasyon değerinde anlamlı olarak (p=0,023), ortalama %20,1 azaltmıştır.

Mononükleer hücreler tam kandan ayrıştırıldıktan sonra, LPS ile uyarılmadan 22 saat boyunca bekletildikten sonra trombositten zengin plazmaya (TZP) eklendiklerinde (M-22) kontrol grubuna göre ADP ile uyarılan agregasyonu maksimum agregasyon değerinde anlamlı olarak (p<0,001), ortalama %12,8 azaltmıştır.

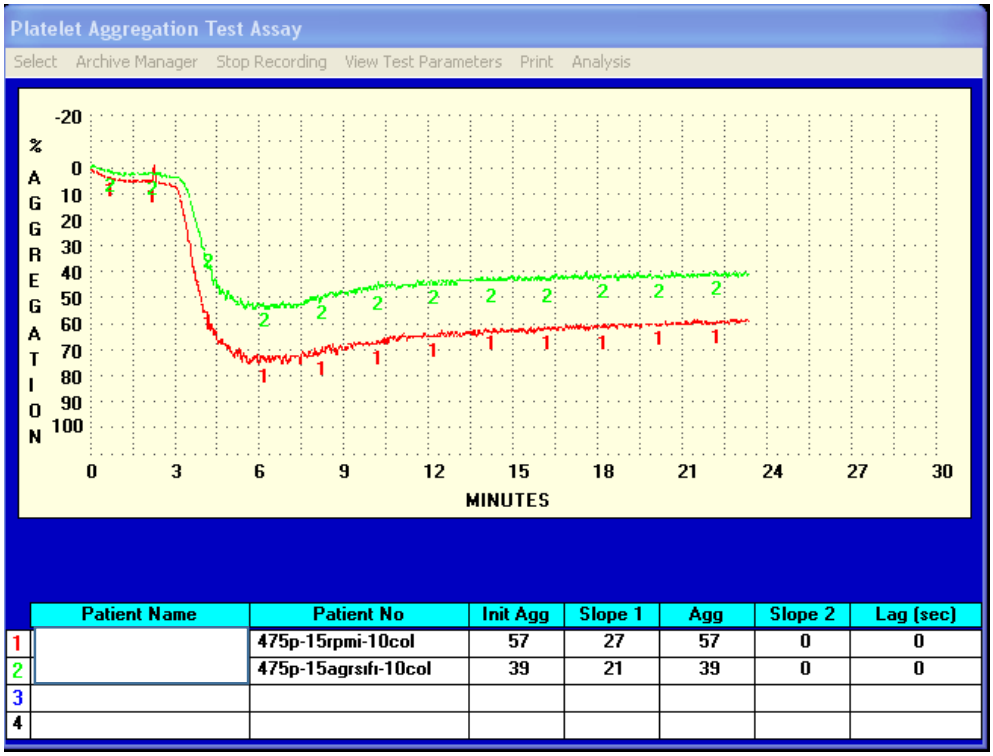
Mononükleer hücreler tam kandan ayrıştırılıp, 22 saat boyunca LPS ile muamele edildikten sonra trombositten zengin plazmaya (TZP) eklendiklerinde [M(+)-22]

kontrol grubuna göre kolajen ile uyarılan agregasyonu maksimum agregasyon değerinde anlamlı olarak (p=0,049), ortalama %8,4 azaltmıştır.

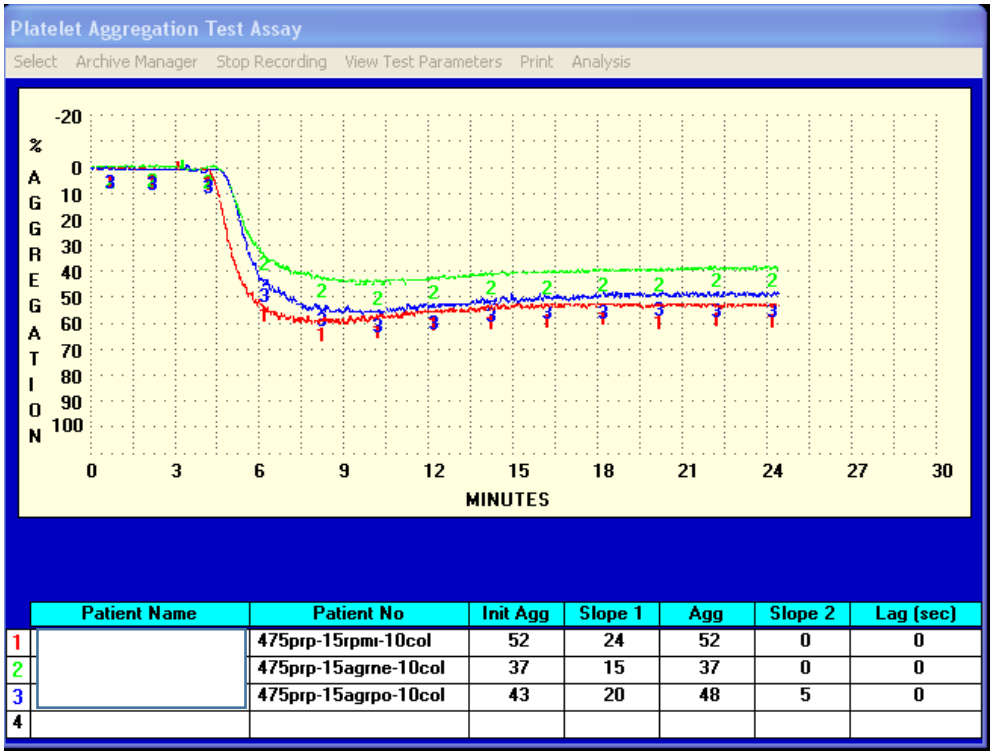
Mononükleer hücreler tam kandan ayrıştırılıp LPS ile uyarılmadan 22 saat boyunca bekletildikten sonra, çevresinde bulunduğu sıvı ortamıyla birlikte trombositten zengin plazmaya (TZP) eklendiğinde (M/O-22), kontrol grubuna göre hem ADP hem de kolajen ile uyarılan agregasyonları, maksimum agregasyon değerlerinde anlamlı olarak (p=0,009: p=0,001), ortalama %6,7 ve %9,6 azaltmıştır. Mononükleer hücreler tam kandan ayrıştırılıp, LPS ile uyarılarak 22 saat boyunca bekledikten sonra, çevresinde bulunduğu sıvı ortamıyla birlikte trombositten zengin plazmaya (TZP) eklendiğinde [M(+)/O-22], kontrol grubuna göre ne ADP ne de kolajen ile uyarılan agregasyonlarda anlamlı bir etki yaratmamıştır (Tablo 6). Örnek agregasyon grafikleri Şekil 17-18-19'da verilmiştir.

Tablo 6. Mononükleer hücrelerin 0. saat (M-0), 22. saat uyarılmamış (M-22) ve uyarılmış [M(+)-22], ve ortamlarıyla birlikte [M/O-22, M(+)/O-22] agregasyon parametreleri üzerine etkileri.

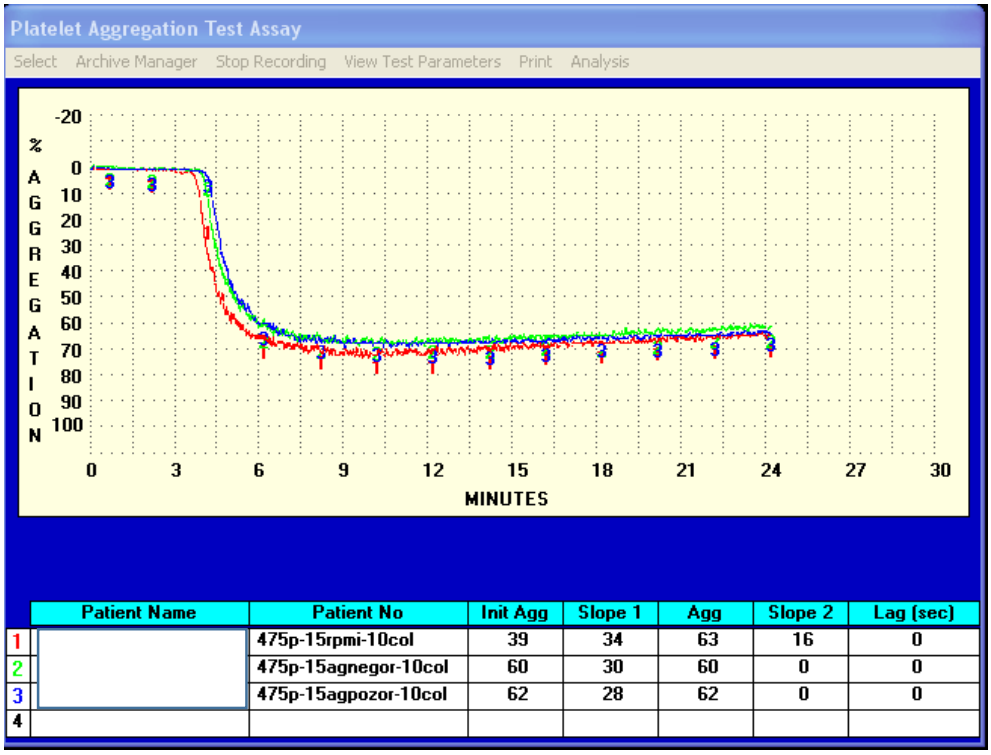
	M-0	**Kontrol**	**%fark**	**p**
ADP-MA	46,1 ± 21 (25 - 75)	74,9 ± 20,2 (48,2 - 94,8)	-34,3 ± 31,1 (-73,6 - -7,1)	0,150
Col-MA	38,4 ± 17,4 (14 - 51,2)	47,5 ± 20,5 (20 - 69)	-20,1 ± 8,4 (-30 - -12)	**0,023**
	M-22	**Kontrol**	**%fark**	**p**
ADP-MA	59,8 ± 17,5 (31 - 85,6)	67,9 ± 16,8 (40 - 91)	-12,8 ± 5,5 (-22,5 - -5,9)	**<0,001**
Col-MA	58,7 ± 14,1 (44 - 78)	63,3 ± 13 (41 - 78)	-7,1 ± 12,3 (-25 - 7,3)	0,143
	M(+)-22	**Kontrol**	**%fark**	**p**
ADP-MA	65,4 ± 9,5 (51 - 79,8)	67,9 ± 16,8 (40 - 91)	0,6 ± 24,6 (-20,9 - 52,5)	0,630
Col-MA	58,2 ± 14,5 (38 - 75)	63,3 ± 13 (41 - 78)	-8,4 ± 10 (-29,6 - -0,9)	**0,049**
	M/O-22	**Kontrol**	**%fark**	**p**
ADP-MA	59,2 ± 10,6 (43 - 72,2)	63,8 ± 12,8 (44 - 81)	-6,7 ± 4,3 (-10,9 - 0)	**0,009**
Col-MA	51,5 ± 17,7 (16 - 71)	55,9 ± 17,4 (24 - 78)	-9,6 ± 9,9 (-33,3 - -2,4)	**0,001**
	M(+)/O-22	**Kontrol**	**%fark**	**p**
ADP-MA	60,3 ± 14,2 (34 - 75,6)	63,8 ± 12,8 (44 - 81)	-5,6 ± 14,1 (-22,7 - 23,5)	0,287
Col-MA	53,8 ± 15,5 (36 - 76,8)	55,9 ± 17,4 (24 - 78)	-0,6 ± 21,2 (-16,9 - 50)	0,365



Şekil 17. 0. saat kolajen ile uyarılan agregasyon deneylerinden bir örnek.

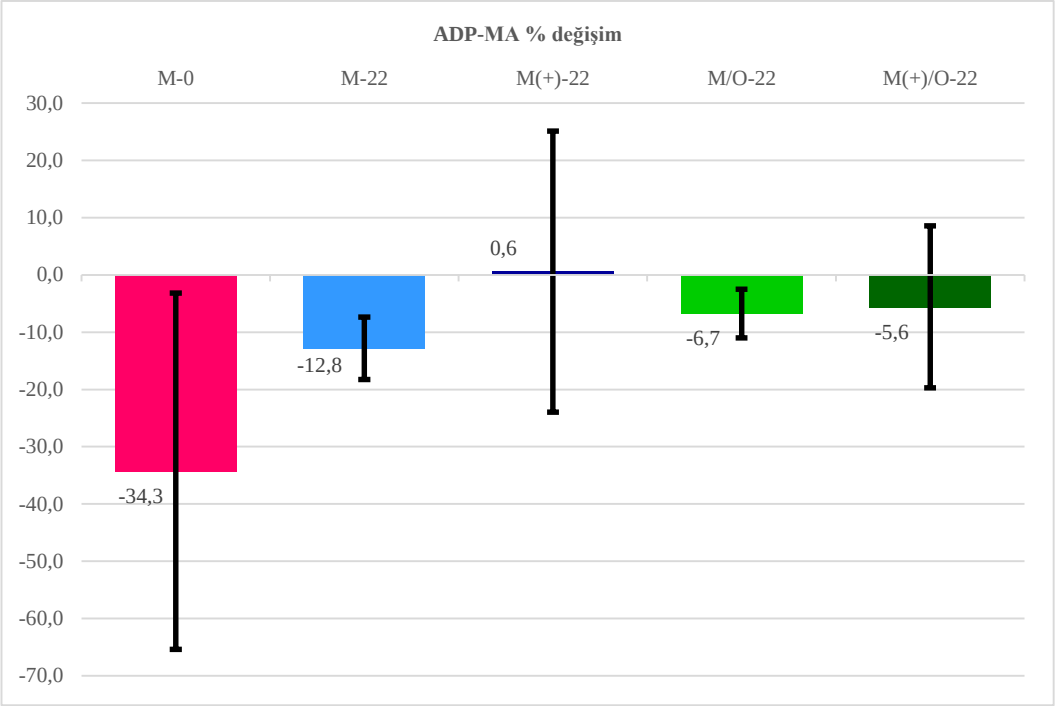


Şekil 18. Uyarılmadan bekletilen mononükleer hücreler (M-22) ile yapılan agregasyon deneylerinden bir örnek.

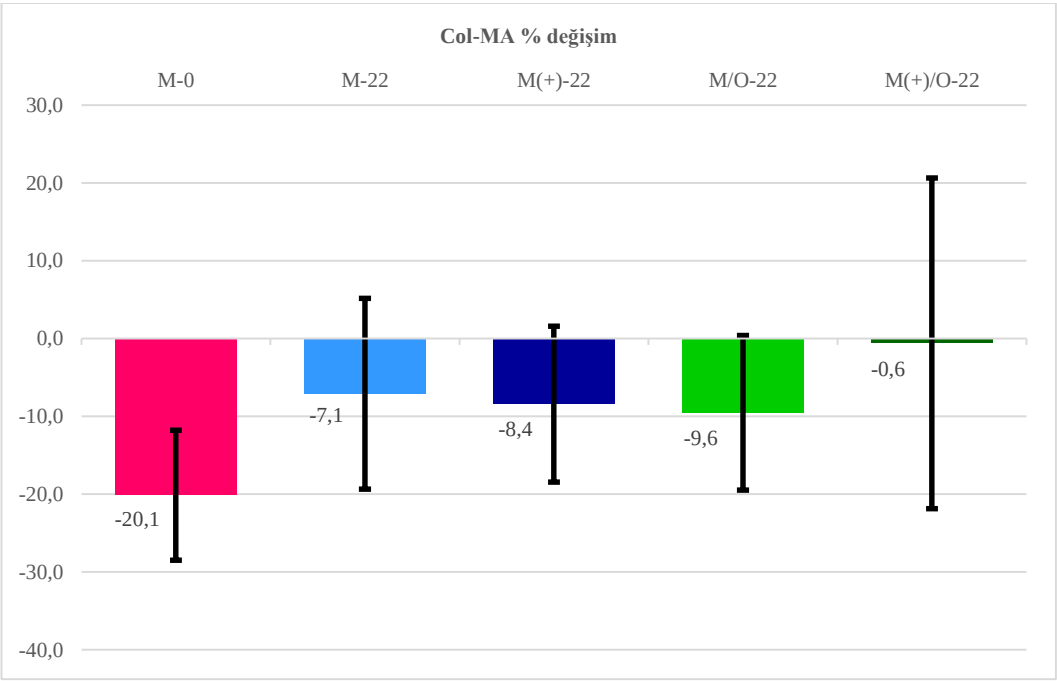


Şekil 19. Uyarılan ve uyarılmayan mononükleer hücrelerin çevre ortamları ile birlikte yapılan agregasyon deneylerinden bir örnek.

Gruplar arası karşılaştırmalar her bir grubun yüzde değişimleri üzerinden yapılmıştır. Gruplar arası anlamlı fark bulunmamıştır (Grafik 9-10).



Grafik 9. Agregometrede ADP ile uyarılan agregasyonun MA parametresinin gruplar arası karşılaştırılması.
[Gruplar arası fark yok (p=0,231)].



Grafik 10. Agregometrede kolajen ile uyarılan agregasyonun MA parametresinin gruplar arası karşılaştırılması.
[Gruplar arası fark yok (p=0,347)].

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında, lökositlerin temel alt hücre gruplarından biri olan mononükleer hücrelerin (monosit, makrofaj ve lenfositler) trombositler ve hemostaz ile etkileşimi araştırılmıştır. Trombosit agregasyonu üzerine etkiler optik agregometrede, topluca hemostaz üzerine etkiler ise tromboelastogram ile çalışılmıştır. Mononükleer hücrelerin uyarılmış ve uyarılmamış halleri ile mononükleer hücrelerin çevre ortamlarıyla birlikte ve çevre ortamlarından ayrıştırılmış halleri ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Trombositten zengin plazma üzerine eklenen farklı durumdaki mononükleer hücrelerin trombosit agregasyonu üzerine etkileri, iki farklı uyarıcı ajanın varlığında (ADP ve kolajen) optik agregometre ile ve pıhtı oluşum dinamikleri üzerine etkileri tromboelastogram ile ayrıntılı olarak incelenmiştir.

Tam kandan mononükleer hücreler ayrıştırılıp, hemen sonrasında TZP üzerine eklenerek 0. saat deneyleri yapılmıştır. Tromboelastogram parametrelerinden LY30 haricinde hiçbiri üzerinde mononükleer hücreler anlamlı bir etki göstermemişlerdir. LY30 üzerindeki değişim, ortamda bir uyarılmaya maruz kalmadan bulunan mononükleer hücrelerin, pıhtının çözünmesini arttırması olarak yorumlanabilir.

Mononükleer hücrelerin tam kandan ayrıştırıldıktan sonra, LPS ile uyarılmadan ve uyarılarak 22 saat boyunca bekletildikleri ve çevre ortamlarıyla birlikte ve çevre ortamsız elde edildikleri protokolde 22. saat deneyleri yapılmıştır. Uyarılmış-uyarılmamış, ortamlı-ortamsız fark etmeden tromboelastogram parametrelerinin hepsi (LY30 hariç) mononükleer hücrelerden etkilenmiştir. Mononükleer hücreler tromboelastogramda hemostazı aktive eden, hiperkoagülan bir durum yaratmıştır.

Pıhtının oluşmaya başladığı zamanı gösteren R parametresi, 0. saate göre 22. saat tüm gruplarında anlamlı olarak daha kısadır. Mononükleer hücrelerin ister uyarılsın ister uyarılmasın, ister ortamlı ister ortamsız olsun, sadece beklemesi trombositten zengin plazmada fibrin oluşma sürecini anlamlı olarak kısaltmaya yetmiştir.

Pıhtının gücünü gösteren G parametresi, 0. saate göre 22. saat uyarılmış ve uyarılmış/ortamlı gruplarda anlamlı olarak daha büyüktür. Oluşan pıhtı uyarılan mononükleer hücrelerin etkisi ile daha güçlü ve sıkı oluşmaktadır.

Agregometre deneyleri tromboelastogram deneyleri kadar tutarlı görünmemektedir. 0 ve 22. saat farklı gruplarda ya ADP, ya kolajen ya da her ikisi birden anlamlı olarak maksimum agregasyon değerinde azalma göstermişlerdir. Mononükleer hücrelerin varlığı trombosit agregasyonunu inhibe etmektedir.

Tromboelastogramdaki etkiler topluca mononükleer hücrelerin hemostazı aktive ettiği, trombositleri uyardığı, koagülasyonu hızlandırdığı, daha hiperkoagülan bir durum yarattığı şekilde yorumlanmasına rağmen, agregometredeki etkiler topluca mononükleer hücrelerin trombositleri inhibe ettiği şekilde yorumlanabilir. İki yöntem arasındaki bu zıt etki bazı durumlardan kaynaklanabilir. En önemli fark agregometrede koagülasyonun tamamen bloke edilmesidir. Agregometrede antikoagüle TZP sadece ya ADP ya da kolajen ile sadece trombositler üzerinden uyarılmaktadır. Oysa tromboelastogramda antikoagüle TZP başlangıçta kalsiyum klorür ile muamele edilerek tamamen hemostazın koagülasyonun normal duruma getirilmesi sağlanmaktadır. Agregometredeki TZP de uyarılan trombositlerin granüllerinden salınan kalsiyum muhtemelen küçük çapta fibrin oluşumunu sağlamakta, bu da ancak agregatların oluşumuna sebep olmaktadır.

22 saatlik inkübasyonun monositleri aktive ettiği, LPS'li inkübasyonun monositleri daha da aktive ettiği çalışmamızda gösterilmiştir. 22. saat grupları arasında anlamlı fark olmasa da R, K, Angle, MA, G ve CI parametrelerinin LPS(+) gruplarda [M(+)-22; M(+)/O-22], LPS(-) gruplara göre [M-22; M/O-22] daha fazla fark yönünde sonuçlar vermesi, LPS ile uyarmanın monositleri, hemostazı daha da aktive edecek yönde değiştirdiğini göstermektedir. Sadece inkübasyona göre LPS ile inkübasyonun monositlerde neleri değiştirdiği, bu değişimlerin hemostazı daha da aktive etmesinin altında yatan nedenler ileri araştırmalarla çalışılmalıdır.

Çalışmanın optik agregometre cihazında gerçekleştirilen deneylerinde mononükleer hücrelerin izole edildikten hemen sonra (0.saat) trombositlerle olan etkileşimi değerlendirilmiştir. Buna ek olarak LPS uyarıcısı varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilen 22 saatlik inkübasyon sonrası mononükleer hücrelerin trombositlerle olan etkileşimi değerlendirilmiştir. Singh, Davidson, Kiebala, & Maggirwar (2012), yaptığı çalışmada trombosit-monosit etkileşimini gözlemlemek amacıyla bu hücreleri aktive edici LPS ve kolajen reaktifleri kullanılmıştır. Bunun sonucunda trombosit-monosit etkileşiminde trombositlerin monositlere oranla daha fazla aktif olduğu

görülmüştür ve trombosit aktivasyonunun, trombosit-monosit agregatlarının ana başlatıcısı olduğu öne sürülmüştür. Singh ve arkadaşlarının (2012), bu çalışması agregometre sonuçlarımızla ters düşmektedir. Çalışmamızda mononükleer hücrelerin varlığı agregasyonu inhibe edici yönde bir etkisi vardır.

Lin, Chen, McVey, Cooper, & Dorling (2008), yaptıkları çalışmada domuzdan babuna böbrek ksenotransplantasyonu ve domuz aort endotel hücrelerinin insan plazmasıyla muamele edilmesi ile gerçekleştirdiği çalışmalarda, monosit- trombosit hücre agregasyonuna rastlanılmıştır. Bu çalışmalarda endotel hücrelerinden ve monositlerden salınan doku faktörünün trombositleri aktive ettiğini göstermişlerdir. Aktifleşen trombositlerin koagülasyon sistemini çalıştırması ve aynı zamanda inflamatuar yanıtın artması monosit aktivasyonunu sağlamaktadır. Trombin tarafından aktive edilen lökositlerden biri olan monositlerin inflamatuar özelliğinin yanı sıra damar içi pıhtılaşma sürecinde de yer aldıkları bilinmektedir (Niessen ve ark, 2008). Monositlerin trombositlerle etkileşimi sonucu pıhtı oluşturabildiği hakkında bilgiler sunan bu araştırmalar, çalışmamıza destek sağlamaktadır.

Trombüs oluşurken lökositlerden salınan maddelerin, özellikle H_2O_2'nin agregasyon üzerine etkilerine dair çalışmalarda çelişkili sonuçlar alınmıştır. H_2O_2'nin ADP, kolajen, trombin ve epinefrin ile yapılan agregasyonları inhibe ettiğini gösteren çalışmaların yanı sıra, aktive ettiğini gösteren çalışmalar, antioksidan ve H_2O_2'yi ortamdan uzaklaştıran maddelerin tek başlarına agregasyonu inhibe ettiği de gösterilmiştir (Canoso ve ark, 1974; Clark, & Klebanoff, 1980; Finazzi-Agro ve ark, 1984; Levine ve ark, 1976; Steiner, & Anastasi, 1976; Vargaftig ve ark, 1975; Yoshikawa ve ark, 1982). Del Principe ve arkadaşlarının (1985), yapmış olduğu çalışmada da bizim çalışmamızda agregometrede inhibisyon dikkati çekmektedir. Bu sonuç, geçmiş çalışmalardaki inhibisyon sonuçlarıyla uyumludur. Sitratın etkisinin devam ettiği, antikoagülasyonun devam ettiği ortamda, mononükleer hücrelerin etkileri trombosit agregasyonunu inhibe etmek yönündedir. 0. saat etkisi daha fazladır. 22 saat LPS'li veya LPS'siz, ortamlı veya ortamsız inkübasyonun etkileri daha azdır. Bu sonuç aktive olan mononükleer hücrelerden salınan, ortamda bozulmaksızın biriken, trombositler üzerinde agregasyonu inhibe edici yönde maddeler salınımı yönündeki yorumlar ile uyuşmamaktadır. Aktive olan mononükleer hücrelerin ve trombositlerin agregat oluşumlarının baskılandığı yönündeki bu bulguların,

kardiyovasküler veya inflamatuar hastalıklardaki artan trombosit-monosit agregalarıyla uyuşmadığı da görülmektedir.

Fu ve arkadaşları (2021) tarafından gerçekleştirilen çalışmanın verileri akut miyokard enfarktüsü olan hastalarda sağlıklı gönüllülere oranla daha fazla trombosit-monosit agregasyonunun olduğunu göstermektedir. Sağlıklı gönüllülerde klasik monositlerden oluşan trombosit-monosit agregatlarının bulunmasından ziyade ara monositlerden oluşan trombosit-monosit agregatları oranı daha fazladır. Bu bilgiler doğrultusunda yaptığımız çalışmanın geliştirilmesi düşünülen yönü, tek çeşit hücre popülasyonunun trombositler üzerine etkisinin ne olduğuna bakılmasıdır. Örnek verilmesi gerekirse klasik, ara ve klasik olmayan monosit alt grupları ile T ve B lenfosit alt grupları ayrı ayrı izole edilip trombositler ile etkileşimleri incelenebilir.

Literatür taramasında daha önce tromboelastogramda uyarılmış ve uyarılmamış mononükleer hücre popülasyonunun hemostaza etkisi üzerine yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamaktadır. Çalışmamızda uyarılmış ve uyarılmamış mononükleer hücrelerin etkilerinden bahsedilerek yeni bulgular ortaya konmuştur.

Sunduğumuz verilerden mononükleer hücrelerin hemostaz ve trombosit agregasyonuna etkileri göz önüne alındığında patofizyolojik durumlar için tasarlanacak tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde ön bilgi niteliği taşımaktadır.

Çalışmamızda sonuçların, tüm deney gruplarında 8 örneklem üzerinden elde edilmesi sınırlılıklarımızın başında gelmektedir. Gönüllülerden iki kez kan alınması, TZP eldesi için biraz fazla miktarda kan gerekmesi örneklem sayımızı arttıramamızdaki önemli sebeplerdir. Tromboelastogram ve agregometre dışında, hemostazın değerlendirildiği farklı yöntemlerin de olması, çalışmamıza daha çok bulgu katabilirdi.

Lökosit-trombosit etkileşimine dair agregometre çalışmaları 1970-2000'ler arası çok çalışılmış, değerli bilgiler ortaya koymasına rağmen çelişkili sonuçlarda üretmiştir. Agregometrenin trombositleri değerlendirmek için altın standart yöntemlerden biri olduğu, hâlâ yerini koruduğu bilinmektedir. Fakat antikoagülan etkinin bir şekilde bertaraf edimesi gerekliliği gözlenmektedir. Bu açıdan tromboelastogramda tam kan yerine TZP ile çalışmak hemostazın tüm yönleri hakkında daha geniş bilgi verebilmektedir. Çalışmamızın en önemli farklılığı,

literatüre kattığı en önemli sonuç, tromboelastogram ile trombosit-mononükleer hücre etkileşiminin değerlendirilmesidir.

Lökositlerin tamamı yerine mononükleer hücrelerin değerlendirilmesi, mononükleer hücrelerin de aktive edilerek değerlendirilmesi yine çalışmamızın farklılıkları arasındadır.

Sonuç olarak, trombosit-mononükleer hücre etkileşimlerinin araştırıldığı çalışmamızda, mononükleer hücrelerin trombosit agregasyonunu inhibe etmesine rağmen, tromboelastogramda mononükleer hücrelerin hemostazı aktive ettiği ve daha hiperkoagülan bir durum yarattığı bulunmuştur. Bu etkinin agregasyon çalışmalarındaki antikoagülan ortamdan kaynaklanabileceği, tromboelastogramda ise ortama kalsiyum eklenmesinin normal fizyolojik koşulları daha iyi yansıttığı düşünülebilir. Tromboelastogram sonuçları trombosit-monosit agregatlarının arttığı gösterilen inflamatuar hastalıklardaki sonuçlar ile daha uyumludur.

6. KAYNAKLAR

Adams, G. L., Manson, R. J., Turner, I., Sindram, D., & Lawson, J. H. (2007). The balance of thrombosis and hemorrhage in surgery. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 21(1), 13-24. http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2006.11.013

Ancuta, P., Rao, R., Moses, A., Mehle, A., Shaw, S. K., Luscinskas, F. W., & Gabuzda, D. (2003). Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 197(12), 1701-1707. https://doi.org/10.1084/jem.20022156

Arı, M. (2019). *Üridin ve nükleotidlerinin hemostaz parametreleri üzerine etkileri*. [Yayınlanmamış yüksek lisans tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: https://uu245-211.uludag.edu.tr/bitstream/11452/15055/1/Merve%20ARI%20-TEZ.pdf

Arthur, J. F., Gardiner, E. E., Matzaris, M., Taylor, S. G., Wijeyewickrema, L., Ozaki, Y., ... Andrews, R. K. (2005). Glycoprotein VI is associated with GPIb-IX-V on the membrane of resting and activated platelets. Thrombosis and Haemostasis, 93, 716–723.

Atalan, N. (2013). Hemostaz. *GKDA Derg*, 19(3), 109–112. https://doi.org/10.5222/GKDAD.2013.109

Berger, G., Masse, J. M., & Cramer, E. M. (1996). Alpha-granule membrane mirrors the platelet plasma membrane and contains the glycoproteins Ib, IX, and V. *Blood*, 87(4), 1385–1395.

Berk, B. C., Alexander, R. W., Brock, T. A., Gimbrone Jr, M. A., & Webb, R. C. (1986). Vasoconstriction: A new activity for platelet-derived growth factor. *Science*, 232(4746), 87–90. https://doi.org/10.1126/science.3485309

Borges, E., Tietz, W., Steegmaier, M., Moll, T., Hallmann, R., Hamann, A., & Vestweber, D. (1997). P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) on T helper 1 but not on T helper 2 cells binds to P-selectin and supports migration into inflamed skin. *Journal of Experimental Medicine*, 185(3), 573–578.

Bouchon, A., Dietrich, J., & Colonna, M. (2000). Cutting Edge: Inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *Journal of Immunology*, 164(10), 4991–4995. https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.10.4991

Brass, L. F., Diamond, S. L., & Stalker, T. J. (2016). Platelets and hemostasis: a new perspective on an old subject. *Blood Advances*, 1, 5–9. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2016000059

Brown, L. (2024). Coagulation cascade part 3: Secondary haemostasis: Coagulation. Erişim adresi: https://app.biorender.com/profile/liz_brown/templates/65baffb450fd09266e8c8d29

Canoso, R. T., Rodvien, R., Scoon, K., & Levine, P. H. (1974). Hydrogen peroxide and platelet function. *Blood*, 43(5), 645-656.

Carlin, L. M., Stamatiades, E. G., Auffray, C., Hanna, R. N., Glover, L., Vizcay-Barrena, G., … Geissmann, F. (2013). Nr4a1-dependent ly6c(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell*, 153, 362–375.

Chapina, J. C., & Hajjara, K. A. (2015). Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Reviews*, 29(1), 17–24.

Chen, M., & Geng, J.-G. (2006). P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets,

and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis. *Archives of Immunology and Therapy Experimental* (Warsz), 54(2), 75–84.

Chen, Y., Zhang, J., Cui, W., & Silverstein, R. L. (2022). CD36, a signaling receptor and fatty acid transporter that regulates immune cell metabolism and fate. *Journal of Experimental Medicine*, 219(6), e20211314.

Chimen, M., Yates, C. M., McGettrick, H. M., Ward, L. S. C., Harrison, M. J., Apta, B., … Rainger, G. E. (2017). Monocyte subsets coregulate inflammatory responses by integrated signaling through TNF and IL-6 at the endothelial cell interface. *Journal of Immunology*, 198(7), 2834-2843. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601281

Chu, L.-Y., Ramakrishnan, D. P., & Silverstein, R. L. (2013). Thrombospondin-1 modulates VEGF signaling via CD36 by recruiting SHP-1 to VEGFR2 complex in microvascular endothelial cells. *Blood*, 122(10), 1822–1832.

Ciferri, S., Emiliani, C., Guglielmini, G., Orlacchio, A., Nenci, G. G., & Gresele, P. (2000). Platelets release their lysosomal content in vivo in humans upon activation. *Thrombosis and Haemostasis*, 83, 157–164.

Clark, R. A. & Klebanoff, S. J. (1980). Neutrophil-platelet interaction mediated by myeloperoxidase and hydrogen peroxide. *Journal of Immunology,* 125(5), 2020-2024.

Clemetson, K. J. (2012). Platelets and primary haemostasis. *Thrombosis Research*, 129, 220-224. http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2011.11.036

Combadière, C., Potteaux, S., Rodero, M., Simon, T., Pezard, A., Esposito, B. & Mallat, Z. (2008). Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*, 117(13), 1649–1657.

Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.-Y., Senechal, B., … Geissmann, F. (2010). Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*, 33(3), 375-386. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.012

Del Principe, D., Menichelli, A., De Matteis, W., Di Corpo, M. L., Di Giulio, S. & Finazzi-Agro, A. (1985). Hydrogen peroxide has a role in the aggregation of human platelets. *FEBS Letters*, 185(1), 142-146.

Finazzi-Agro, A., Meni~helli, A., Di Giulio, S., Di Corpo, M. L., Cerrone, F., Todaro, D., & Del Principe, D. In G. Rotilio & J. V. Bannister (Eds.), (1984). Oxidative damage and related enzymes. *Life Chemistry Reports, Suppl. Ser*. (pp. 204-215).

Fu, G., Deng, M., Neal, M. D., Billiar, T. R., & Scott, M. J. (2021). Platelet-monocyte aggregates: Understanding mechanisms and functions in sepsis. *Shock*, 55(2), 156–166.

Gawaz, M. P., Loftus, J. C., Bajt, M. L., Frojmovic, M. M., Plow, E. F., & Ginsberg, M. H. (1991). Ligand bridging mediates integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIB-IIIA) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *Journal of Clinical Investigation*, 88, 1128–1134. https://doi.org/10.1172/JCI115412

Gawaz, M., Neumann, F. -J., Dickfeld, T., Koch, W., Laugwitz, K. -L., Adelsberger, H., ... SchöMig, A. (1998). Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation*, 98, 1164–1171. https://doi.org/10.1161/01.CIR.98.12.1164

Gerrard, J. M., White, J. G., & Peterson, D. A. (1978). The platelet dense tubular

system: Its relationship to prostaglandin synthesis and calcium flux. *Thrombosis and Haemostasis*, 40, 224–231. https://doi.org/10.1055/s-0038-1648656

Ghoshal, K., & Bhattacharyya, M. (2014). Overview of platelet physiology: Its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *The Scientific World Journal*, 2014, 781857.

Gleissner, C. A., von Hundelshausen, P., & Ley, K. (2008). Platelet chemokines in vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28, 1920–1927.

Godo, S., & Shimokawa, H. (2017). Endothelial functions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37, e108–e114. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309813

Gren, S. T., Rasmussen, T. B., Janciauskiene, S., Håkansson, K., Gerwien, J. G., & Grip, O. (2015). A single-cell gene-expression profile reveals inter-cellular heterogeneity within human monocyte subsets. *PLoS ONE*, 10, e0144351. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144351

Hanna, R. N., Carlin, L. M., Hubbeling, H. G., Nackiewicz, D., Green, A. M., Punt, J. A., ... & Hedrick, C. C. (2011). The transcription factor nr4a1 (nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of ly6c-monocytes. *Nature Immunology*, 12, 778–785.

Hanna, R. N., Shaked, I., Hubbeling, H. G., Punt, J. A., Wu, R., Herrley, E., ... & Hedrick, C. C. (2012). Nr4a1 (nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis. *Circulation Research*, 110, 416–427.

Heijnen, H. F. G., & Korporaal, S. J. A. (2017). *Platelet morphology and ultrastructure*. Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: (pp. 21–37). Springer International Publishing.

Holinstat, M. (2017). Normal platelet function. *Cancer and Metastasis Reviews*, 36(2), 195–198.

Houdijk, W. P., de Groot, P. G., Nievelstein, P. F., Sakariassen, K. S., & Sixma, J. J. (1986). Subendothelial proteins and platelet adhesion: von Willebrand factor and fibronectin, not thrombospondin, are involved in platelet adhesion to extracellular matrix of human vascular endothelial cells. *Arteriosclerosis*, 6, 24–33.

Ingersoll, M. A., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E. L., Frankenberger, M., Misharin, A. V., Cuda, C. M., Saber, R., Turner, J. D., Gierut, A. K., Haines, G. K., ... & Perlman, H. (2014). Nonclassical ly6c(−) monocytes drive the development of inflammatory arthritis in mice. *Cell Reports*, 9, 591–604.

Isidan, A., Chen, A. M., Saglam, K., Yilmaz, S., Zhang, W., Li, P., & Ekser, B. (2021). Differences in platelet aggregometers to study platelet function and coagulation dysregulation in xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 28(1), e12645.

Kaushansky, K. (2006). Lineage-specific hematopoietic growth factors. *The New England Journal of Medicine*, 354, 2034–2045. https://doi.org/10.1056/NEJMra052706

Koltai, K., Kesmarky, G., Feher, G., Tibold, A., & Toth, K. (2017). Platelet aggregometry testing: molecular mechanisms, techniques and clinical implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1803.

Koupenova, M., Kehrel, B. E., Corkrey, H. A., & Freedman, J. E. (2017). Thrombosis and platelets: An update. *European Heart Journal*, 38, 785–791.

Kral, J. B., Schrottmaier, W. C., Salzmann, M., & Assinger, A. (2016). Platelet

interaction with innate immune cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 43(2), 78–88.

LaRosa, D. F., & Orange, J. S. (2008). Lymphocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(2), S364-S369.

Lassalle, F., Rosa, M., Staels, B., Van Belle, E., Susen, S., & Dupont, A. (2022, May). Circulating monocyte subsets and transcatheter aortic valve replacement. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5303.

Lee, J. A., Yerbury, J. J., Farrawell, N., Shearer, R. F., Constantinescu, P., Hatters, D. M., … Saunders, D. N. (2015). SerpinB2 (PAI-2) modulates proteostasis via binding misfolded proteins and promotion of cytoprotective inclusion formation. *PLoS ONE*, 10, e0130136. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130136

Lee, J., Tam, H., Adler, L., Ilstad-Minnihan, A., Macaubas, C., & Mellins, E. D. (2017). The MHC class II antigen presentation pathway in human monocytes differs by subset and is regulated by cytokines. *PLOS ONE*, 12(8), e0183594. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183594

Levine, P. H., Weinger, R. S., Simon, J., Scoon, K. L. & Krinsky, N. I. (1976). Leukocyte-platelet interaction: Release of hydrogen peroxide by granulocytes as a modulator of platelet reactions. *The Journal of Clinical Investigation*, 57, 955-963.

Li, N., Ji, Q., & Hjemdahl, P. (2006). Platelet-lymphocyte conjugation differs between lymphocyte subpopulations. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(4), 874–881.

Li, Y., Yu, Q., Zhang, Z., Wang, J., Li, S., Zhang, J., & Liu, G. (2016). TH9 cell differentiation, transcriptional control and function in inflammation, autoimmune diseases and cancer. *Oncotarget*, 7(43), 71001-71012. doi:10.18632/oncotarget.11681.

Li, Z., Delaney, M. K., O'Brien, K. A., & Du, X. (2010). Signaling during platelet adhesion and activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30, 2341–2349.

Lievens, D., Zernecke, A., Seijkens, T., Soehnlein, O., Beckers, L., Munnix, I. C. A., ... Thevissen, L. (2010). Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood*, 116, 4317–4327. https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-261206

Lin, C. C., Chen, D., McVey, J. H., Cooper, D. K. & Dorling, A. (2008). Expression of tissue factor and initiation of clotting by human platelets and monocytes after incubation with porcine endothelial cells. *Transplantation*, 86(5), 702–709.

Lishko, V. K., Yakubenko, V. P., Ugarova, T. P., & Podolnikova, N. P. (2018). Leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18, αMβ2, CR3) acts as a functional receptor for platelet factor 4. *Journal of Biological Chemistry*, 293, 6869–6882. https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000515

Mackman, N. (2008). Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*, 451(7181), 914–918.

Mandel, J., Casari, M., Stepanyan, M., Martyanov, A. & Deppermann, C. (2022). Beyond hemostasis: Platelet innate immune interactions and thromboinflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3868. https://doi.org/10.3390/ijms23073868

Massberg, S., Brand, K., Grüner, S., Page, S., Müller, E., Müller, I., ... Lorenz, M. (2002). A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion

formation. *Journal of Experimental Medicine,* 196, 887–896. https://doi.org/10.1084/jem.20012044

Maynard, D. M., Heijnen, H. F., Horne, M. K., White, J. G., & Gahl, W. A. (2007). Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5, 1945–1955.

Meikle, C. K., Meisler, A. J., Bird, C. M., Jeffries, J. A., Azeem, N., Garg, P., ... Worth, R. G. (2020). Platelet-T cell aggregates in lung cancer patients: Implications for thrombosis. *PLOS ONE,* 15(8), e0236966.

Meikle, C. K. S., Kelly, C. A., Garg, P., Wuescher, L. M., Ali, R. A., & Worth, R. G. (2017). Cancer and thrombosis: The platelet perspective. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4:147.

Miglani, R. K., Bhateja, N., Bhat, R. S., & Kumar, K. V. A. (2013). Diagnostic role of platelet lymphocyte ratio (plr) in pancreatic head masses. *Indian Journal of Surgery*, 75(1), 4–9.

Misharin, A. V., Cuda, C. M., Saber, R., Turner, J. D., Gierut, A. K., Haines, G. K., ... Perlman, H. (2014). Nonclassical ly6c(−) monocytes drive the development of inflammatory arthritis in mice. *Cell Reports*, 9, 591–604.

Moore, K. L., Stults, N. L., Diaz, S., Smith, D. F., Cummings, R. D., Varki, A., & McEver, R. P. (1992). Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *The Journal of Cell Biology*, 118, 445–456.

Mukhopadhyaya, T., & Subramanian, A. (2020). An overview of the potential sources of diagnostic errors in (classic) thromboelastography curve interpretation and preventive measures. *Practical Laboratory Medicine*, 22, e00193.

Neumann, F. J., Zohlnhofer, D., Fakhoury, L., Ott, I., Gawaz, M., & Schomig, A. (1999). Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on platelet, *J Am Coll Cardiol*, 1; 34 (5):1420-6.

Nicklas, J. M., Gordon, A. E., & Henke, P. K. (2020). Resolution of deep venous thrombosis: proposed immune paradigms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2080.

Niessen, F., Schaffner, F., Furlan-Freguia, C., Pawlinski, R., Bhattacharjee, G., Chun, J., … Ruf, W. (2008). Dendritic cell PAR1-S1P3 signalling couples coagulation and inflammation. *Nature*, 452(7187), 654-658. https://doi.org/10.1038/nature06663

Nockher, W. A., & Scherberich, J. E. (1998). Expanded CD14+CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infection and Immunity*, 66, 2782–2790.

Ott, I. (2011). Inhibitors of the initiation of coagulation. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 72(4), 547–552.

Parihar, A., Eubank, T. D., & Doseff, A. I. (2010). Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death. *Journal of Innate Immunity*, 2(3), 204–215.

Plug, T., & Meijers, J. C. M. (2016). Structure-function relationships in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 14, 633–644. https://doi.org/10.1111/jth.13261

Pluta, K., Porębska, K., Urbanowicz, T., Gąsecka, A., Olasińska-Wiśniewska, A., Targoński, R., … Krasiński, Z. (2022). Platelet-leucocyte aggregates as novel biomarkers in cardiovascular diseases. *Biology (Basel)*, 11(2), 224.

Podestà, M. A., Galbusera, M., & Remuzzi, G. (2019). *Bleeding and hemostasis in*

acute renal failure. In Critical Care Nephrology (3rd ed., pp. 630-635.e2). https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44942-7.00102-3

Reed, G. L., Houng, A. K., Singh, S., & Wang, D. (2017). α2-antiplasmin: New insights and opportunities for ischemic stroke. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 43, 191–199.

Rendu, F., & Brohard-Bohn, B. (2001). The platelet release reaction: Granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, 12, 261–273.

Rinder, H. M., Bonan, J. L., Rinder, C. S., Ault, K. A., & Smith, B. R. (1991). Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood. *Blood*, 78(7), 1730–1737.

Robertson, S., & Miller, M. R. (2018). Ambient air pollution and thrombosis. *Particle and Fibre Toxicology*, 15(1), 1. https://doi.org/10.1186/s12989-017-0237-x

Salvemini, D., De Nucci, G., Gryglewski, R. J. & Vane, J. R. (1989). Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 6328-6332.

Sang, Y., Roest, M., de Laat, B., de Groot, P. G., & Huskens, D. (2021). Interplay between platelets and coagulation. *Blood Reviews*, 46, 100733. https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100733

Schrottmaier, W. C., Kral, J. B., Badrnya, S., & Assinger, A. (2015). Aspirin and P2Y12 inhibitors in platelet-mediated activation of neutrophils and monocytes. *Thrombosis and Haemostasis*, 114, 478–489.

Shevchuk, O., Jurak Begonja, A., Gambaryan, S., Totzeck, M., Rassaf, T., Huber, T. B. & Sickmann, A. (2021). Proteomics: A tool to study platelet function. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4776.

Silverstein, R. L., Asch, A. S., & Nachman, R. L. (1989). Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion. *Journal of Clinical Investigation*, 84, 546–552. https://doi.org/10.1172/JCI114197

Simoni, Y., Fehlings, M., Kloverpris, H. N., McGovern, N., Koo, S. L., Loh, C. Y., ... Price, D. A. (2017). Human innate lymphoid cell subsets possess tissue-type based heterogeneity in phenotype and frequency. *Immunity*, 46(1), 148–161.

Singh, M. V., Davidson, D. C., Jackson, J. W., Singh, V. B., Silva, J., Ramirez, S. H., & Maggirwar, S. B. (2014). Characterization of platelet-monocyte complexes in HIV-1-infected individuals: possible role in HIV-associated neuroinflammation. *Journal of Immunology*, 192, 4674–4684.

Singh, M. V., Davidson, D. C., Kiebala, M. & Maggirwar, S. B. (2012). Detection of circulating platelet-monocyte complexes in persons infected with human immunodeficiency virus type-1. *Journal of Virological Methods*, 181(2), 170–176.

Steiner, M., & Anastasi, J. (1976). Vitamin E. An inhibitor of the platelet release reaction. *J. Clin. Invest*, 57(3), 732-737.

Sun, L., Su, Y., Jiao, A., Wang, X., & Zhang, B. (2023). T cells in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 235.

Suzuki, H., Murasaki, K., Kodama, K., & Takayama, H. (2003). Intracellular localization of glycoprotein VI in human platelets and its surface expression upon activation. *British Journal of Haematology*, 121, 904–912.

Swirski, F. K., & Nahrendorf, M. (2013). Leukocyte behavior in atherosclerosis,

myocardial infarction, and heart failure. *Science*, 339(6116), 161–166.
Szántó, T., R. (2012). New insights into von Willebrand disease and platelet function. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 38(1), 55–63. https://doi.org/10.1055/s-0031-1300952
Tacke, F., Alvarez, D., Kaplan, T., Jakubzick, C., Spanbroek, R., Llodra, J. & Randolph, G. (2007). Monocyte subsets differentially employ ccr2, ccr5, and cx3cr1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *The Journal of Clinical Investigation*, 117, 185–194.
T Cells, (2024, 5 Haziran). Erişim adresi: https://www.physio-pedia.com/T_Cells
Thomas, G., Tacke, R., Hedrick, C. C., & Hanna, R. N. (2015). Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35, 1306–1316.
Thon, J. N., Peters, C. G., Machlus, K. R., Aslam, R., Rowley, J., MacLeod, H., ... Hartwig, J. H. (2012). T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling. *The Journal of Cell Biology*, 198, 561–574. https://doi.org/10.1083/jcb.201111136
van Furth, R., & Cohn, Z. A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 128, 415–435.
van Furth, R., Cohn, Z. A., Hirsch, J. G., Humphrey, J. H., Spector, W. G., & Langevoort, H. L. (1972). The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization*, 46(6), 845–852.
Vargaftig, B. B., Trainer, Y., & Chignard, M. (1975). Blockade by metal complexing agents and by catalase of the effects of arachidonic acid on platelets: relevance to the study of anti-inflammatory mechanisms. *Eur. J. Pharmacol*, 33(1), 19-29.
Walz, A., Dewald, B., von Tscharner, V., & Baggiolini, M. (1989). Effects of the neutrophil-activating peptide NAP-2, platelet basic protein, connective tissue-activating peptide III and platelet factor 4 on human neutrophils. *Journal of Experimental Medicine*, 170, 1745–1750. https://doi.org/10.1084/jem.170.5.1745
Weber, C., Belge, K. U., von Hundelshausen, P., Draude, G., Steppich, B., Mack, M., ... Ziegler-Heitbrock, H. W. (2000). Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *Journal of Leukocyte Biology*, 67(5), 699-704. https://doi.org/10.1002/jlb.67.5.699
Wu, S.-Y., Fu, T., Jiang, Y.-Z., & Shao, Z.-M. (2020). Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Molecular Cancer*, 19, 120.
Yeung, J., Hawley, M., & Holinstat, M. (2017). The expansive role of oxylipins on platelet biology. *Journal of Molecular Medicine*, 95(6), 575–588. https://doi.org/10.1007/s00109-017-1542-4
Yoshikawa, T., Furukawa, Y., Murakami, M., Watanabe, K., Kondo, M. (1982). Hydrogen peroxide and platelet function. *Blood*, 43(5), 645-656.
Zawada, A. M., Rogacev, K. S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R.-R., Fliser, D., & Heine, G. H. (2011). SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood*, 118(12), e50-e61.
Zawada, A. M., Schneider, J. S., Michel, A. I., Rogacev, K. S., Hummel, B., Krezdorn, N., … Heine, G. H. (2016). DNA methylation profiling reveals differences in the 3 human monocyte subsets and identifies uremia to induce DNA methylation changes during differentiation. *Epigenetics*, 11(4), 259-272. https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1158363

Zhang, Y., Wallace, D. L., de Lara, C. M., Ghattas, H., Asquith, B., Worth, A., ... Macallan, D. C. (2007). In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology*, 121, 258–265.

Zibandeh, N. (2017, 5-6 Mayıs). Mezenkimal Kök Hücre İzolasyon Teknikleri ve İmmünolojik Parametreler [Konferans sunumu]. 6. Kök Hücre Sempozyumu, Türkiye.

Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., … Lutz, M. B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116(16), e74-e80.

7. SİMGELER ve KISALTMALAR

ADP	:	Adenozin difosfat
OCS	:	Açık Kanal Sistemi
A2AP	:	Alfa 2 Antiplazmin
APC	:	Antijen Sunan Hücreler
ATIII	:	Antitrombin III
AA	:	Araşidonik Asit
RPMI	:	Besiyeri
FaktörIV	:	Ca^{2+}
CCL	:	C-C Kemokin Ligand
CCR	:	C-C Kemokin Reseptör
CX3CR1	:	CX3C Motif Kemokin Reseptör 1
NK	:	Doğal Öldürücü Hücreler
TF	:	Doku Faktörü
TFPI	:	Doku Faktörü Yolağı İnhibitörü
tPA	:	Doku Plazminojen Aktivatörü
CD	:	Farklılaşma kümesi
PIP2	:	Fosfatidilinositol-4, 5-bisfosfat
PBS	:	Fosfat Tamponlu Salin
PLCγ	:	Fosfolipaz Cγ
DTH	:	Gecikmiş Aşırı Duyarlılık
GPIbVIX	:	Glikoprotein Ib-V-IX
GPVI	:	Glikoprotein VI
FaktörXII	:	Hageman Faktörü
H_2O_2	:	Hidrojen Peroksidaz
ICAM-1	:	Hücrelerarası Tutunma Molekülü 1
HIV	:	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HLA-DR	:	İnsan Lökosit Antijeni
IFN γ	:	İnterferon Gama
IL	:	İnterlökin
COL	:	Kolajen
LFA1	:	Lenfosit Fonksiyonu İle İlişkili Antijen 1
LPS	:	Lipopolisakkarit
MHC	:	Majör Histokompatibilite Kompleksi
Mac-1	:	Makrofaj-1 Antijeni
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar
ml	:	Mililitre
TREM-1	:	Miyeloid Hücrelerde İfade Edilen Tetikleyici Reseptör 1
M	:	Molar
MCP-1	:	Monosit Kemoatraktan Protein-1
ng	:	Nanogram
NFkB	:	Nükleer Faktör Kappa B
NR4A1	:	Nükleer Protein 4A1
OPA	:	Optik Agregometre
PBMC	:	Periferik Kan Mononükleer Hücreleri

PA1	:	Plazminojen Aktivatör İnhibitörü 1
PA2	:	Plazminojen Aktivatör İnhibitörü 2
PML	:	Polimorfonükleer Lökositler
PGE2	:	Prostaglandin E2
PAR-4	:	Proteaz Aktive Reseptör 4
PDI	:	Protein Disülfit İzomeraz
PKC	:	Protein Kinaz C
CD62P	:	P-selektin
PSGL1	:	P-selektin Glikoprotein Ligand-1
P2Y1	:	Purinerjik Reseptör 1
P2Y12	:	Purinerjik Reseptör 2
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
S1P	:	Sfingozin-1-Fosfat
S1PR	:	Sfingozin-1-Fosfat Reseptörü
COX1	:	Siklooksijenaz-1
CTLA-4	:	Sitotoksik T-Lenfosit İlişkili Protein 4
SOD	:	Süperoksit Dismutaz
TCR	:	T Hücre Reseptörleri
TLT-1	:	TREM Benzeri Transkript 1
TR1AP	:	Trombin Reseptörü Aktive Edici Peptid
TEG	:	Tromboelastogram
TxA2	:	Tromboksan A2
PF3	:	Trombosit Faktörü 3
PF4	:	Trombosit Faktörü 4
PDGF	:	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
TFP	:	Trombositten Fakir Plazma
TZP	:	Trombositten Zengin Plazma
TSP1	:	Trombospondin 1
TSP2	:	Trombospondin 2
TLR	:	Toll Benzeri Reseptör
TNFα	:	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
Th	:	T Yardımcı Hücreler
uPA	:	Ürokinaz Plazminojen Aktivatörü
vWF	:	von Willebrand Faktör
VAMP-8	:	Vezikül İlişkili Membran Proteini 8
DTS	:	Yoğun Tübüler Sistem
HMWK	:	Yüksek Moleküler Ağırlıklı Kininojen
DAG	:	1,2-diasilgliserol
12-LOX		12-lipoksijenaz

8. EKLER

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 2011-KAEK-26/ 737 22 /12 / 2022
Konu : Etik kurul kararı

Sayın Dr.Öğr.Üyesi Engin SAĞDİLEK
Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Kurulumuza başvurusunu yaptığınız ve sorumlu araştırmacısı olduğunuz *"Mananäkleer lökositlerin trombosit fonksiyonları ve hemostaz üzerine etkilerinin incelenmesi"* başlıklı araştırmanız ile ilgili kurulumuzun 20 Aralık 2022 tarih, 2022-20/20 nolu kararı ekte gönderilmektedir.

Araştırmanın tamamlanma bildiriminin ve özet sonuç raporunun kurulumuza iletilmesi için bilgilerinize sunulur.

Prof.Dr.Mustafa HAGİMUSTAFAOĞLU
Kurul Başkanı

EKLER:
1-Karar (2 adet)
2-BGO formu (1 adet)

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Rektörlük Binası, Görükle Kampüsü 16059 Nilüfer/BURSA
Tel: 0-224-2950020 Fax: 0-224-2950029
e-posta: uukaek@uludag.edu.tr Elektronik Ağ: www.tip.uludag.edu.tr

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Mononükleer Lökositlerin Trombosit Fonksiyonları ve Hemostaz Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 2011-KAEK-26
	AÇIK ADRESİ	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Rektörlük Binası Kat.1 Görükle Kampüsü Nilüfer/ Bursa
	TELEFON	0.224. 295 00 20
	FAKS	0.224. 295 00 29
	E-POSTA	uukaek@uludag.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Dr.Öğr.Üyesi Engin Sağdilek			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı			
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ UNVANI/ADI/SOYADI	Yüksek Lisans Öğrencisi Öznur Gürel, Yüksek Lisans Öğrencisi Fatma Özer			
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü			
	DESTEKLEYİCİ	Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Prospektif araştırma			
	ARAŞTIRMANIN YAPILIŞ AMACI	Yüksek lisans tez çalışması			
	ARAŞTIRMANIN BAŞLAMA TARİHİ/ SÜRESİ	15.01.2023/ 1 yıl			
	GÖNÜLLÜ/DOSYA SAYISI	30			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

	Belge Adı	Tarihi	Dili
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR İÇİN BAŞVURU FORMU	16.12.2022	Türkçe
	Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	16.12.2022	Türkçe

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	ARAŞTIRMA BÜTÇE FORMU	☒	Tarih: 16.12.2022
	ARAŞTIRMACILAR İÇİN TAAHHÜTNAME FORMU	☒	Tarih: 16.12.2022
	PROSPEKTİF ÖZELLİKLİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMA TAAHHÜTNAMESİ	☒	Tarih: 16.12.2022
	İKÜ Klavuzunun okunduğuna dair taahhütname	☒	Tarih: 16.12.2022
	SONUÇ ÖZET RAPORU	☐	
	DİĞER:	☒	(Araştırma ile ilgisinde bir yazar) (Tarih: 16.12.2022), Yüksek lisans öğrencisi, Ders araştırmacı bilgileri listeden seçilmeli) Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi, literatür

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Mononükleer Lökositlerin Trombosit Fonksiyonları ve Hemostaz Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

KARAR BİLGİLERİ

Karar No: 2022-20/20 **Tarih: 20 Aralık 2022**

Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelendi.

1-Araştırmanın başvurusu dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna,

2- Araştırmanın yürütülmesi sırasında Etik kurul kaşesi bulunan "Onam" formlarının kullanılması ve bu formu çalışmaya katılan gönüllülere çalışma hakkında sözlü bilgi verilmesi sonrasında eksiksiz bir şekilde doldurulmasına,

3-Araştırmanın başlama tarihinin bildirilmesi ve araştırma tamamlandığında özet bir sonuç raporunun hazırlanarak kurulumuza iletilmesine,

4-Araştırma protokolünde ve başvuru formunda yapılacak tüm değişiklikler için Etik Kurulun izin alınması gerektiğinin sorumlu araştırıcılara iletilmesine toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünleri Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI/ADI SOYADI	Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU

ÜYELER

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Bursa UÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.HÜSEYİN AĞDOĞAN MÖĞÖL Başkan Yardımcısı	Anesteziyoloji	Bursa UÜ Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.M.Sarıtaş YILMAZ Üye	Farmakoloji	Bursa UÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Nihal ÖZKAN Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Bursa UÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD Nefroloji BD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Hasan ARI Üye	Kardiyoloji	Bursa Yüksek İhtisas EAH Kardiyoloji Kliniği	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Alpaslan TÜRKKAN Üye	Halk Sağlığı	Bursa UÜ. Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Ozan ÖZ GÜL Üye	İç Hastalıkları Endokrin ve Metab.	BUÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AC Endokrinoloji ve Metabolizması BD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Kağan HUYSAL Üye	Biyokimya	Bursa Yüksek İhtisas EAH Biyokimya	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doktor Öğretim Üyesi Ergün SAĞDİLEK Üye	Biyofizik	Bursa UÜ Tıp Fakültesi Biyofizik AD	E ☒	K ☐	E ☒	H ☐	E ☒	H ☐	Çalışmada herhangi bir görevi olmadığı için gönüllü katılımcılardan
Doktor Öğretim Üyesi Sunar ERER KAYA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	Bursa UÜ Tıp Fakültesi, Tıp Tarihi ve Etik AD.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Av. Ahmet BAYRAM	Hukuk	Bursa UÜ Rektörlüğü Hukuk Bürosu	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Ayşe ŞEN Üye	Sağlık sosyolojisi sonrasında eğitimcilik üzerine	Sosyal Hizmet	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* Toplantıda Bulunma

Sayfa 2

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Araştırmaları Etik Kurulu

Sayı : 132
Konu : Etik kurul kararı

15/05/ 2024

Sayın Doç.Dr.Engin SAĞDİLEK
Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Kurulumuza başvurusunu yaptığınız ve sorumlu araştırmacısı olduğunuz *"Monomikleer lökositlerin trombosit fonksiyonları ve hemostaz üzerine etkilerinin incelenmesi"* başlıklı araştırmanızdaki değişiklik ile ilgili kurulumuzun 08 Mayıs 2024 tarih ve 2024-7/15 nolu kararı ekte gönderilmektedir.

Gereği için bilgilerinize sunulur.

Prof.Dr. Soner CANDER
Etik Kurul Başkanı

EK:
-Karar (2 adet)

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Rektörlük Binası, Görükle Kampusü 16059 Nilüfer/BURSA
Tel: 0-224-2950021 e-posta: arsakayn@uludag.edu.tr Elektronik Ağ: www.tip.uludag.edu.tr

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Monositlerin Lökositlerin Trombosit Fonksiyonları ve Hemostaz Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Araştırmaları Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ	Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Rektörlük Binası Kat.1 Görükle Kampüsü Nilüfer/ Bursa
	TELEFON	0.224. 295 00 21
	E-POSTA	-

BAŞVURU BİLGİLERİ	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Ergin Sağdilek			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı			
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ UNVANI/ADI/SOYADI	-Yüksek Lisans Öğrencisi Öznur Gürel, Yüksek Lisans Öğrencisi Fatma Özer -Doç.Dr.Dilşdem Yüyen Ermiş, Doktora öğrencisi Didem Akyüney			
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	-Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü -Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ	Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Prospektif araştırma			
	ARAŞTIRMANIN YAPILIŞ AMACI	Yüksek lisans tez çalışması			
	ARAŞTIRMANIN BAŞLAMA TARİHİ/ SÜRESİ	15.01.2023/ 1 yıl + 1 yıl ek süre			
	GÖNÜLLÜ/DOSYA SAYISI	30			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

	Belge Adı	Tarihi	Dili
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR İÇİN DEĞİŞİKLİK BAŞVURU FORMU	03.05.2024	Türkçe

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	ARAŞTIRMA BÜTÇE FORMU	☐	
	ARAŞTIRICILAR İÇİN TAAHHÜTNAME FORMU	☒	Tarih: 03.05.2024
	PROSPEKTİF ÖZELLİKLİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMA TAAHHÜTNAMESİ	☐	
	BÜ Klavuzunun okunduğuna dair taahhütname	☒	Tarih: 03.05.2024
	SONUÇ ÖZET RAPORU	☐	
	DİĞER:	☒	Araştırma değişiklik başvuru üst yazısı (Tarih: 03.05.2024), çalışmayı dahil edilen araştırıcılar tarafından incelenmiş Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Mononükleer Lökositlerin Trombosit Fonksiyonları ve Hemostaz Üzerine Etkilerinin İncelenmesi
KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 2024-7 / 15** **Tarih: 08 Mayıs 2024** Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 20 Aralık 2022 tarih ve 2022-20/20 nolu kararı ile uygun bulunan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırmada yapılan değişikliklerin **uygun** bulunduğuna toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. **Yapılan değişiklikler:** - Çalışma protokolü *(Protokolde yer alan mononükleer lökositlerin (agranülositlerin) ayrılması ve uyarılması ile ilgili işlemler ve uyarılan agranülositlerin uyarılmışlık düzeylerinin tespit edilmesi Doç.Dr.Diğdem Yöyen ermiş'in sorumluluğunda doktora öğrencisi Didem Akyöney tarafından gerçekleştirilmesi)* - BUÜ.Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr.Diğdem Yöyen Ermiş ve Doktora öğrencisi Didem Akyöney'in yardımcı araştırmacı olarak çalışmaya dahil edilmeleri - Çalışmaya 1 (bir) yıl ek süre verilmesi

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, BUÜ. Sağlık Araştırmaları Etik Kurul Yönergesi
BAŞKANIN UNVANI/ADI SOYADI	Prof.Dr.Soner CANDER

ÜYELER

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Soner CANDER Başkan	Endokrinoloji ve Metabolizma	Bursa U.Ü.Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Fahrettin UYSAL Üye	Çocuk Kardiyoloji	Bursa U.Ü.Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Belkes Nilsen COŞKUN Üye	Hematoloji	Bursa U.Ü.Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Ayşegül ORUÇ	Nefroloji	Bursa U.Ü.Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Evrimsen DÜRLÜLER Üye	Genel Cerrahi	Bursa U.Ü.Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Görevli
Doç.Dr.Mustafa ASLIER Üye	Kalbi Burun Boğaz	Bursa U.Ü.Tıp Fakültesi Kalbi Burun Boğaz	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Görevli
Doç.Dr.Sinda PEKLİVAN Üye	Hemşirelik Bölümü	BUÜ. Sağlık Bilimleri Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Ayşen ÇAKIR Üye	Fizyoloji	Bursa U.Ü.Fizyoloji AD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Çiğdem Mine YILMAZ Üye	Hukuk Fakültesi	Bursa U.Ü.Hukuk Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* Toplantıda Bulunma

Sayfa 2

9. TEŞEKKÜR

Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimi aldığım süre boyunca desteği ile yanımda olan, bilgi ve tecrübelerine her zaman başvurduğumuz danışman hocam Doç. Dr. Engin SAĞDİLEK'e, bizlere olan desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Evren KILINÇ hocamıza, deneylerimize büyük katkı sağlayan eş danışmanım Doç Dr. Diğdem YÖYEN ERMİŞ ve doktora öğrencisi Didem ÇAKIRSOY hocama saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım

Laboratuvarda her daim bizimle birlikte çalışan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen arkadaşlarım Sueda GÜNEŞ'e, Fatma ÖZER'e ve Emin ALİYEV'e en içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tezimin deney aşamalarında yardımcı olan İmmünoloji laboratuvarı teknikerlerine ve deneylerime gönüllü olarak katılan arkadaşlarıma sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

10. ÖZGEÇMİŞ

19 Ocak 1999 tarihinde Bursa Osmangazi' de doğmuştur. İlk ve ortaöğretimi Bursa Lütfi Banuşoğlu İlköğretim Okulunda tamamlamıştır. Lise öğrenimini Bursa Şükrü Şankaya Anadolu Lisesinde tamamlamıştır. 2017 yılında liseden mezun olarak Bursa Uludağ Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Lisans bölümüne başlamıştır. 2021 yılında lisans bölümünden mezun olarak Fizyoloji Yüksek Lisansına başlamıştır.