FATMA ÖZER

TIP-FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

2024

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

GRANÜLOSİTLERİN HEMOSTAZA ETKİLERİNİN OPTİK AGREGOMETRE VE TROMBOELASTOGRAM İLE İNCELENMESİ

FATMA ÖZER

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2024



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

GRANÜLOSİTLERİN HEMOSTAZA ETKİLERİNİN OPTİK AGREGOMETRE VE TROMBOELASTOGRAM İLE İNCELENMESİ

Fatma ÖZER

ORCID 0009-0009-9936-0703

(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 "**Granülositlerin Hemostaza Etkilerinin Optik Agregometre ve Tromboelastogram ile 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.

Fatma ÖZER
Tarih ve İmza

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Fizyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Fatma ÖZER tarafından hazırlanan "**Granülositlerin Hemostaza Etkilerinin Optik Agregometre ve Tromboelastogram ile 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: Fatma ÖZER

Anabilim Dalı: FIZYOLOJI

Tez Konusu: Granülositlerin Hemostaza Etkilerinin Optik Agregometre ve Tromboelastogram ile 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 BEYANI ..... **II**
KABUL ONAY ..... **III**
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU ..... **IV**
İÇİNDEKİLER ..... **IV**
TÜRKÇE ÖZET ..... **VII**
İNGİLİZCE ÖZET ..... **VIII**
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ ..... **IX**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **4**
2.1. Granülositler 4
2.1.1. Nötrofiller 4
2.1.2. Eozinofiller 8
2.1.3. Bazofiller 10
2.2. Hemostaz 13
2.2.1. Vasküler Faz 14
2.2.2. Trombosit Fazı 14
2.2.3. Koagülasyon Fazı 15
2.2.4. Fibrinoliz Fazı 18
2.2.5. Antikoagülan Sistem 18
2.3. Trombositler 18
2.3.1. Trombosit Yapısı ve Üretimi 18
2.3.2. Trombosit Granülleri 21
2.3.3. Trombosit Fonksiyonu 23
2.4. Granülositler ve Trombositler Arasındaki İlişki 25
3. GEREÇ ve YÖNTEM **29**
3.1. Gönüllüler 29
3.2. Kan Örneklerinin Alınması 29
3.3. Sitratlı Tüpler 30
3.4. Granülositlerin İzole Edilmesi 30
3.5. Optik Agregometre Deneyleri 32
3.6. Tromboelastogram (TEG) Deneyleri 35
3.7. Tromboelastogram Parametreleri 36
3.8. İstatistiksel Analiz 37

4. BULGULAR 38
4.1. Tromboelastogram Sonuçları 38
4.2. Agregometre Sonuçları 48
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 53
6. KAYNAKLAR 56
7. SİMGELER VE KISALTMALAR 63
8. EKLER 64
9. TEŞEKKÜR 70
10. ÖZGEÇMİŞ 71

TÜRKÇE ÖZET

Doğal bağışıklık sistemi hücrelerinden olan granülositler, sitoplazmalarındaki granül tiplerine ve çekirdek yapılarına göre diğer lökositlerden ayrılırlar. Sitoplazmalarındaki granüllerin boya alma özelliğine göre nötrofil, eozinofil ve bazofil olarak 3 gruba ayrılırlar. Hemostaz; damar duvarında bir hasar meydana geldiğinde kan akışını engellemeden kanın damar dışına çıkmasını engelleyerek damar bütünlüğünü sağlayan fizyolojik bir süreçtir.

İmmünotromboz terimi ile pıhtılaşma aktivasyonunun doğuştan gelen bağışıklık sisteminin fonksiyonuna yardımcı olduğu, bağışıklık sistemi bileşenlerinin de tromboza katkıda bulunduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada lökosit alt gruplarından granülositlerin hemostaz üzerine etkileri optik agregometre ve tromboelastogram ile çalışılmıştır.

Tam kandan elde edilen granülositler ayrıştırıldıktan hemen sonra (0. saat [G-0]) ve 4 saat boyunca uyarılmadan (G-4) ve lipopolisakkarit ile uyarılarak [G(+)-4] inkübe edildikten sonra deneyler gerçekleştirildi. Agregometrede trombositten zengin plazma üzerine granülosit eklendi. ADP, kolajen ve epinefrin ile agregasyon uyarılarak trombosit agregasyonu gözlemlendi. Maksimum agregasyon değerleri kontrol grubuna göre değerlendirildi.

Tromboelastogram deneylerinde ise trombositten zengin plazmaya granülosit eklenerek, Ca^{+2} varlığında hemostaz süreci gözlemlendi. Değerler kontrol grubuna göre değerlendirildi.

0. saat agregometre deneylerinde granülositler, kontrol grubuna göre ADP ve kolajen ile uyarılan agregasyonlarda maksimum agregasyon değerlerini anlamlı olarak azalttı. Ne granülositlerin 4 saat inkübasyonu ne de LPS ile uyarılmaları, ADP, kollajen ve epinefrin ile uyarılan agregasyonlar üzerinde fark göstermedi.

Tromboelastogram deneylerinde 0. saat ve uyarılmayan granülositler hemostaz parametrelerine etki etmezken uyarılan granülositler hemostazı aktive etmiş ve hiperkoagülan bir durum oluşturmuştur.

Granülositlerin trombosit agregasyonunu inhibe ederken, uyarıldıklarında hemostazı arttırmaları yöntemler arası farklılıkları ön plana çıkarmanın yanısıra granülositlerin aktivasyon durumlarının da önemli olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Granülosit, trombosit, hemostaz, agregometre, tromboelastogram.

İNGİLİZCE ÖZET

Investigation of The Effects of Granulocytes on Hemostasis by Optical Aggregometer and Thromboelastogram.

Granulocytes, which are innate immune system cells, are distinguished from other leukocytes according to the granule types in their cytoplasm and their nuclear structure. They are divided into three groups: neutrophils, eosinophils and basophils, according to the dye-taking properties of the granules in their cytoplasm. Hemostasis; It is a physiological process that ensures vascular integrity by preventing blood from flowing out of the vessel without obstructing blood flow when damage occurs to the vessel wall.

The term immunothrombosis indicates that coagulation activation helps the function of the innate immune system and that immune system components also contribute to thrombosis. In this study, the effects of granulocytes, one of the leukocyte subgroups, on hemostasis were studied using optical aggregometer and thromboelastogram.

Experiments were performed immediately after the granulocytes obtained from whole blood were separated (0th hour [G-0]) and incubated for 4 hours without stimulation (G-4) and with stimulation with lipopolysaccharide [G(+)-4]. Granulocytes were added onto platelet-rich plasma in the aggregometer. Platelet aggregation was observed by stimulating aggregation with ADP, collagen and epinephrine. Maximum aggregation values were evaluated compared to the control group.

In thromboelastogram experiments, granulocytes were added to platelet-rich plasma and the hemostasis process was observed in the presence of Ca+2. Values were evaluated according to the control group.

In 0th hour aggregometer experiments, granulocytes significantly decreased the maximum aggregation values in ADP and collagen-stimulated aggregations compared to the control group. Neither incubation of granulocytes for 4 h nor stimulation with LPS showed any difference on ADP, collagen, and epinephrine-stimulated aggregations.

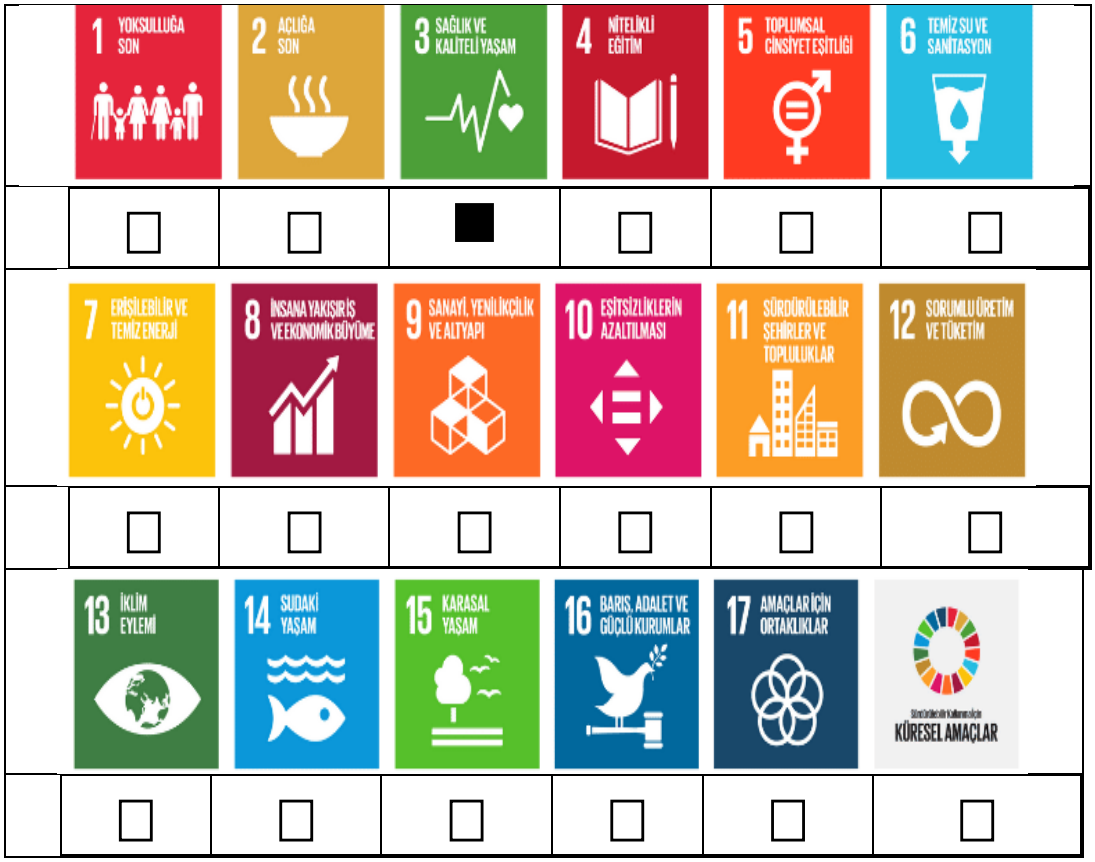
In thromboelastogram experiments, while hour 0 and unstimulated granulocytes did not affect hemostasis parameters, stimulated granulocytes activated hemostasis and created a hypercoagulant state.

While granulocytes inhibit platelet aggregation, they increase hemostasis when stimulated, not only highlighting the differences between methods, but also showing that the activation status of granulocytes is important.

Keywords: Granulocyte, platelet, hemostasis, aggregometer, thromboelastogram.

BUÜ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ



Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum **"Granülositlerin Hemostaza Etkilerinin Optik Agregometre ve Tromboelastogram ile 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

Hemostaz, yaralanmayı takiben kan kaybını sınırlamak için vasküler endotel, trombosit ve pıhtılaşma faktörleri ile vasküler hasarın kapatıldığı fizyolojik bir süreçtir. Hasarlı vasküler endotel tarafından başlatılır, ardından trombositlerin subendotelyal hücre dışı matrise hızlı bir şekilde adezyonu, aktivasyonu ve agregasyonu gerçekleşir. Pıhtılaşma faktörleri, çapraz bağlı bir fibrin ağı oluşturarak trombosit tıkacını sağlamlaştırmak için aktive edilmiş trombositlerin prokoagülan yüzeyinde toplanır. Fibrinoliz aşamasında hemostatik tıkaç parçalanır ve kan akışı yeniden sağlanmış olur (Ağar, 2021).

Trombositler, kemik iliğinde üretilen megakaryositlerin sitoplazmik parçacıkları olup, çekirdeksiz hücrelerdir. Hemostazdaki görevlerinin yanı sıra, trombositlerin inflamasyonda da önemli rolleri vardır. İnflamasyon ve hemostaz oldukça kompleks multifaktöriyel süreçler olup çeşitli hücreler arası karşılıklı etkileşimi içerir. Lökositler, trombositler, endotelyal hücreler ve bağ doku hücreleri arasında oldukça karmaşık bir etkileşim gerçekleşir (DelMaschio, Dejana, & Bazzoni, 1993; Klinger, 1997; Marcus, 1999; Siminiak, Flores, & Sheridan, 1995; Weksler, 1992).

Trombositler, granüllerinde, lökosit aktivasyonunun tüm aşamalarına (adezyon, kemotaksis, fagositoz ve oksijen radikallerinin ve granül bileşenlerinin salınımı dahil) etki edebilen geniş bir yelpazede çözünebilir proinflamatuar maddeler içerirler (Weksler, 1992). Bir çalışmada, trombosit yoğun granüllerden salınan ATP'nin nötrofillerde Fcg reseptör aracılı fagositozu ve solunum patlamasını arttırdığı gösterilmiştir (Zalavary, Grenegard, Stendahl, & Bengtsson, 1996). Başka bir çalışmada, adheze olan trombositlerin, nötrofillerin kemotaktik göçünü önemli ölçüde arttırdığı, bu etkilere P-selektinin aracılık ettiği ve artan CD11b/CD18 ekspresyonu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Bengtsson ve ark., 1999). Çalışmalar, tromboz ve vasküler hasar bölgelerinde biriken trombositlerin, dolaşımdaki nötrofillerin yapışmasını ve konsantrasyonunu artırma yetenekleri açısından endotel hücrelerinin yerine geçebileceğini ve bu sürecin, P-selektin ve ß2-integrinlerin sıralı etkisini gerektirdiğini göstermektedir.

Fagositoz işlevini gören polimorfonükleer lökositlerden (PML) salınan H_2O_2, çevresindeki eritrositleri hasara uğratırken trombositler üzerine de etkilidir. Canoso ve

ark. tarafından yapılan çalışmada (1974), H_2O_2'nin tek başına agregasyona sebep olmadığı ama ADP, kolajen, trombin ve epinefrin ile indüklenen agregasyonlarda primer agregasyonu ve disagregasyonu etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca oksidan stresin sebep olduğu H_2O_2 üretiminin, ADP ile uyarılan agregasyonu inhibe ettiği de gözlenmiştir (Koufos, & Sagone, 1980).

Nötrofillerin trombosit agregasyonunu trombositten zengin plazmada inhibe ettiği başka çalışmalarla da gösterilmiştir. Salvemini ve ark. nın yaptıkları çalışmada (1989); nötrofillerin ve makrofajların, eklenen hücre sayısıyla doğru orantılı olarak trombinle uyarılan agregasyonu inhibe ettiği saptanmıştır. Bu etkinin nötrofillerde cGMP artışı üzerinden kaynaklandığı ve bu inhibisyonun SOD ile güçlendirildiği bulunmuştur.

Lökositler tarafından salınan ve trombosit fonksiyonunu etkileyen maddeler arasında oksijen radikalleri, nitrik oksit, proteazlar, araşidonik asit metabolitleri ve trombosit aktive edici faktör yer alır (Levine ve ark., 1976; Selak, Chignard, & Smith, 1988; Valles, Santos, & Marcus, 1993). Trombosit fonksiyonlarını etkileyen bu maddelerin birbirine zıt etkili sonuçları da gözlenmiştir. Örneğin, oksijen radikallerinin trombosit agregasyonunu bir çalışmada arttırdığı (Handin, Karabin, & Boxer, 1977) başka bir çalışmada azalttığı (Levin ve ark., 1976) gösterilmiştir.

Arteriyel trombüs sıklıkla önemli sayıda lökositten oluşur ve tam kanda oluşan trombosit agregatları, eritrositlerin yanı sıra lökositleri de içerir (Rinder, Bonan, Rinder, Ault, & Smith, 1991). Son yıllardaki birçok çalışmada trombosit-lökosit (trombosit-monosit, trombosit-nötrofil agregaları) agregalarının özellikle inflamatuar olaylarda kanda arttığı gözlenmekte, hatta kardiyovasküler hastalıkların prognozunda bu agregaların miktarı, büyüklüğü gibi parametrelerin önemi üzerinde durulmaktadır.

Lökosit-trombosit etkileşiminin etkilerinin araştırılmasındaki zorluklar, hücresel fonksiyonların desteklenmesinden bloke edilmesine kadar değişen çeşitli süreçlerdeki farklı uygulamalardan kaynaklanmaktadır. Bu tutarsızlıkların çoğu yöntemdeki farklılıklara (hücre hazırlama prosedürleri gibi) atfedilebilir.

Bizim bu tez çalışmasındaki amacımız, lökosit alt gruplarından granülositlerin (nötrofil, eozinofil ve bazofiller) trombositler ve hemostaz ile etkileşimini araştırmaktır. Trombosit agregasyonu üzerine etkiler optik agregometrede, topluca hemostaz üzerine etkiler ise tromboelastogram ile çalışılmıştır. Granülositlerin kandan ayrıştırıldıktan hemen sonraki halleri, 4 saat boyunca bekletilmiş halleri ve 4 saat

boyunca lipopolisakkarit ile uyarılmış halleri değerlendirilmiştir. Trombositten zengin plazma üzerine eklenen farklı durumdaki granülositlerin trombosit agregasyonu (optik agregometre ile) ve pıhtı oluşum dinamikleri (tromboelastogram ile) üzerine etkileri ayrıntılı olarak incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Granülositler

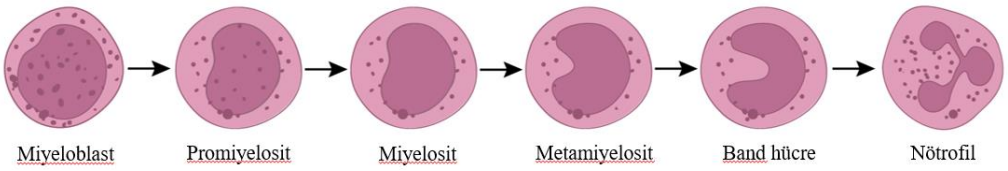
Granülositler, doğal bağışıklık sisteminde önemli bir yer alırlar. Kemik iliğinde bulunan pluripotent hematopoetik kök hücrelerden oluşan miyeloid hücrelerden köken alırlar. Kemik iliğinde olgunlaşarak dolaşıma geçerler. İhtiyaç durumunda periferik dokulara da göç edebilirler. Sitoplazmalarındaki granül tiplerine ve çekirdek yapılarına göre diğer lökositlerden ayrılırlar. Granülositlerde spesifik granüller ve azurofilik granüller (lizozom) bulunur. Çekirdekleri birbirine bağlı birkaç lobtan oluştuğu için polimorfonükleer lökositler de denmektedir. Granülositler yaşlandıkça çekirdekleri daha parçalı bir hal alır. Sitoplazmalarındaki granüllerin boya alma özelliğine göre 3 tipe ayrılırlar. Nötral boya alanlar nötrofil, asit boya alanlar eozinofil, bazik boya alanlar ise bazofil olarak isimlendirilir (Ağar, 2020).

2.1.1. Nötrofiller

Nötrofiller toplam lökositlerin yaklaşık %55-65'ini oluştururlar. Dolaşımda çapları 7 µm damardışında 10-12 µm'dir. Nükleusları mültilobüler yapıdadır. Dolaşımda yaşam süreleri 8-12 saat arasındadır. Patojen istilasında fagositozda görevli hücrelerdir. Kadınlarda bazı nötrofillerde yoğunlaşmış inaktif X kromozomunu belirten kromatin, küçük ayrı bir lobül oluşturur, bu yapıya Barr cisimciği denir. Toplam kan nötrofillerinin çoğunluğu damar lümeni içinde dolaşım havuzunda, bir kısmı endotele yapışmış marginal havuzda bulunur. Çok büyük bir kısmı da kemik iliği havuzunda bulunur. İhtiyaç durumunda kısa sürede dolaşıma geçer (Akay, 2014).

Nötrofiller kemik iliğinde miyeloid hücrelerden oluşmaktadır (granülopoez). İlk oluşan hücre olan miyeloblastın proliferasyonu yüksek kapasitedir. Hücre içinde nükleer materyal ve hafif bazofil granüller bulunur. Myeloblasttan sonra promiyolosit hücre oluşur. Bazofilik sitoplazmada primer (non-spesifik, azurofilik) granüller oluşmaya başlar. Granülün gerçek anlamda ortaya çıktığı aşamadır. Miyelositlerde çekirdek yoğunlaşmaya başlar. Primer granüllerin yanında sekonder (spesifik) granüller de ortaya çıkar. Metamiyelositlerde çekirdek şekillenmeye başlar ve spesifik granüllerin miktarı artar. Band hücrede çekirdek mültilobüler şeklini alır. Bu

aşamalardan sonra olgun nötrofil oluşur. Bu süreç 7-11 gün kadar sürmektedir. İlk 3 basamakta DNA sentezi ve mitoz bölünme gerçekleşirken, sonraki aşamalarda farklılaşma ve olgunlaşma görülür (Şekil 1). Nötrofillerin yapımı sitokinlerin denetimi altında gerçekleşir (Akay, 2014).



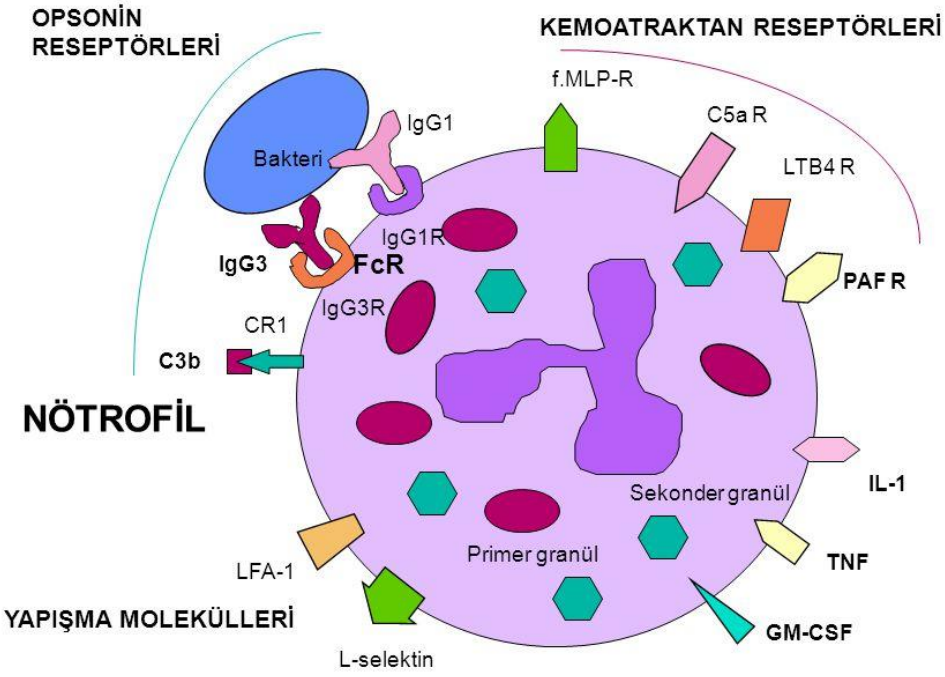
Şekil 1: Nötrofil oluşum aşamaları (Tsioumpekou ve ark., 2023 kaynağından uyarlanmıştır).

Nötrofillerin sitoplazmalarında patojenlerle savaşmada yardımcı enzim ve kimyasalların bulunduğu granüller yer alır. 3 tip granül bulunur; primer (azurofilik) granül, sekonder (spesifik) granül ve tersiyer granül. Primer granüller promiyelosit aşamada oluşmaya başlarlar. İçerisinde asit hidrolaz, miyeloperoksidaz (MPO), asit fosfataz, nötrofil elastaz ve katepsin G gibi birçok hidrolitik enzim bulunur. Sekonder granüller miyelosit aşamada oluşmaya başlarlar, Patojen hücre duvarı üzerinde ciddi hasara sebep olacak pentraksin ve lactoferrin lizozimleri içerirler. Laktoferrin patojen içindeki demiri bağlayarak patojen enzimleri işlevsiz hale getirir. Tersiyer granüller de nötrofilin enfeksiyon bölgesine gittiğinde bağ dokuda ilerleyebilmesi için kollegenaz, hiyolurodinaz ve elastaz gibi enzimleri içerir. Bu enzimler sayesinde bağ doku parçalanır ve nötrofil dokuya geçer (Guimares-Costa ve ark., 2012).

Nötrofiller granül içeriklerinden başka faktörler de salgılarlar. Bunlar arasında kemokinler, anjiyonik ve fibrinogenic faktörler, tümör nekrosis faktör (TNF) ve bazı sitokinler yer alır. Bunlara ek olarak reaktif oksijen üretiminden sorumlu nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve nitrit oksidaz tip 2 (NOX2) gibi enzimatik komplekslere de sahiptir (Mesa, & Vasquez, 2013).

Nötrofillerin yüzeyinde, hücresel aktivasyon ve hücre içi sinyalde görev alan reseptörler bulunur. Bunlar arasında G-protein- bağımlı reseptörler (GPCR), sitokin ve kemokin reseptörleri, adezyon reseptörleri, Toll-benzeri reseptörleri (TLR), kompleman sistemi opsonize eden reseptörler ve C tipi lektin reseptörleri (CLR) yer

alır. IgG ile opsonize edilmiş patojen fagositozunda Fc ailesi reseptörleri önemli role sahiptir (Şekil 2) (Rebar ve ark., 2001).

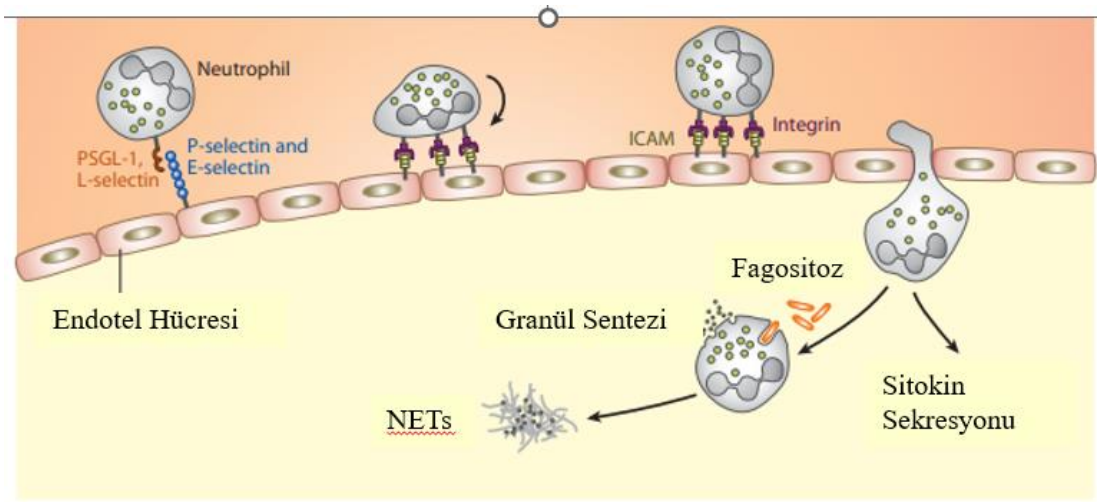


Şekil 2: Nötrofil reseptörleri (Olcay ORBAY'ın sunumundan alınmıştır).

Nötrofillerin aktivasyonu yangı bölgesinden salgılanan kemoatraktanların dolaşımdaki nötrofilleri uyarmasıyla başlar. Kemotaktik ajanlar fagositik hücrelerde lizozamal enzimlerin salınımını, patajonlerin ölümünde görevli süperoksit iyonlarının üretimini, araşidonik asit salınımını, prostaglandin ve lökotrienlerin sentezini uyarır. Bu ajanlar nötrofillerin yangı bölgesine hareket etmesini sağlar (kemotaksi). Yangı bölgesinden salgılanan histamin ve lökotrien gibi kimyasal mediatörler, Weibel Pallade isimli vezikülün damar endotelinin apikal yüzeyine çıkmasına neden olur ve endotel yüzeyinde P-selektin adı verilen kanca şeklinde proteinler oluşur. İnterlökine TNF ajanları da endotelde E-selektin oluşumunu uyarır. Oluşan selektinler nötrofil reseptörlerine bağlanarak gevşek bir endotel-nötrofil bağlanmasına neden olur (marjinasyon). Bu gevşek bağlar sayesinde nötrofiller endotel boyunca hareket eder (rolling). Nötrofillerde bulunan integrin adezyon molekülleri, yangı bölgesinden salgılanan IL-8 gibi kemotaktik faktörlerle konformasyonel değişikliğe uğrar. Adezyon sırasında integrinler endotelde yer alan intrasellüler adezyon molekülü

(ICAM) ile sıkı bir şekilde bağlanarak nötrofillerin kan akımı ile uzaklaşması engellenir. Yangı bölgesinden kaynaklanan histamin, brakidinin ve lökotrien endotel hücreleri arası bağlantıyı zayıflatarak nötrofillerin dokuya geçmesini sağlar (Şekil 3) (Rebar ve ark., 2001; Kumar, & Sharma, 2010).

Nötrofiller çeşitli stratejiler kullanarak patajenleri ortadan kaldırır. Enfeksiyona ilk yanıt veren, akut inflamasyonun baskın hücreleridir. Dolaşımdaki patojenleri fagosite ettiği gibi enfeksiyon bölgesinden salgılanan mediyatörler ile damar dışına göç ederek enfeksiyon alanındaki patojenleri de yok eder. Mediyatörler tarafından uyarılmadıkça dokuya geçmelerine izin verilmez. Nötrofiller; fagositoz, granüllerinin salınması (degranülasyon) ve nötrofil hücre dışı tuzakların oluşturulması ile antimikrobiyal fonksiyon gösterirler.



Şekil 3: Dolaşımdaki nötrofillerin dokuya geçişi (Stefan, 2014 kaynağından uyarlanmıştır).

2.1.1.1. Fagositoz

Fagositozun gerçekleşmesi için patojenin nötrofil membranıyla temas kurması lazımdır. Patojenlerin nötrofil tarafından tanınan moleküllerle kaplanmasına opsonizasyon, kaplayan moleküllere de opsonin adı verilir. IgG ve C3b opsonini patojen antijenine bağlanır. Bu kompleksler nötrofil membranındaki reseptörleriyle bağlanarak, nötrofilde aktin- miyozin kasılması ile patojen etrafını uzantılarıyla sarar. Patojen vezikül içerisinde sitoplazmaya alınır ve fagozomu oluşturur. Fagozom içerisindeki patojen oksidatif ve non-oksidatif yöntemiyle yok edilir. Oksidatif yöntem

(respiratik yanma), reaktif oksijen ürünleri (ROS) ile gerçekleşir. Non-oksidatif yöntemde nötrofil granülleri fagozom ile birleşerek içeriğini fagozoma boşaltır (Guimares-Costa ve ark., 2012).

2.1.1.2. Degranülasyon

Bu savunma yönteminde de nötrofiller, yangı bölgesindeki patojenler üzerinde etkili granül içeriklerini salgılar. Fakat bu moleküller seçici olmadığı için konak dokusu üzerine de patojen etki gösterebilir (Guimares-Costa ve ark., 2009).

2.1.1.3. Nötrofil Hücre Dışı Tuzakları (Neutrophil Extraceller Traps) (NETs)

Patojenlere karşı diğer bir savunma mekanizması da NETs'tir (Brinkmann ve ark., 2004). Patojen veya bazı moleküllerle karşılaşarak aktive olmuş nötrofillerin hücre içinde bir dizi reaksiyon gerçekleşerek çekirdek içeriğinin hücre dışına salınmasıdır (Branzk, & Papayannopoulos, 2013). NET'ler, DNA ve H1, H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarını içeren 15-17 nm çapında kromatin iplikçiklerinden oluşur (Manda, Pruchniak, Arazna, & Demkow, 2014). NETs sırasında nötrofilde hücre içinde birbirini takip eden pek çok nükleer ve sitoplazmik değişiklikler görülmektedir. Nötrofil patojenle karşılaştığında önce antimikrobiyal özellikte ve NETs oluşumu için gerekli olan ROS üretir. Elastaz ve MPO granüllerden nükleusa geçer. Çekirdekte histon modifikasyonu olur. Daha sonra nötrofilin çekirdeği eukromatin ve heterokromatin ayrımını kaybeder ve karakteristik lobular formu kaybolur, nükleer membran şişer ve bunu granül membranlarının parçalanması takip eder, böylece nükleer, sitoplazmik ve granül içerikleri birbirine karışır. Plazma membranının geçirgenliği artar ve kromatin serbest kalır. Sonuçta hücre dışına protein/histonca zengin ve başlangıçtaki hücre büyüklüğü ile kıyasla 10-15 kat büyük bir alanda yayılan bulut benzeri NETs çıkışı olur (Papayannopoulos, & Zychlinsky, 2009).

2.1.2. Eozinofiller

Eozinofiller kemik iliğinde bulunan miyeloid hücrelerden köken alırlar. Oluşan eozinofillerin hepsi dolaşıma geçmez, bir kısmı olgun eozinofil havuzunda depo edilir.

Kemik iliğinden salınımı büyük oranda IL-5 ve eotaksin ile düzenlenir. Lökositlerin %2-4'ünü oluştururlar. Çapları yaklaşık 8 μm, yarı ömürleri 8-12 saattir (Rothenberg, 1998). Uyarılmadıkları durumda dokularda 8-12 gün yaşayabilirler. Timüs, alt gastrointestinal sistem, uterus, dalak, yumurtalık ve lenf nodüllerinde de bulunurlar (Uhm, Kim, & Chung 2012). Eozinofiller alerjik reaksiyonlarda ve parazit enfoksiyonlarını içeren inflamatuar yanıtlarda görev alan hücrelerdir (Uhm ve ark., 2012). Bu durumlarda IL-5 depo havuzundaki eozinofillerin dolaşıma geçmesini sağlayarak kandaki düzeylerini arttırırlar (eozinofili).

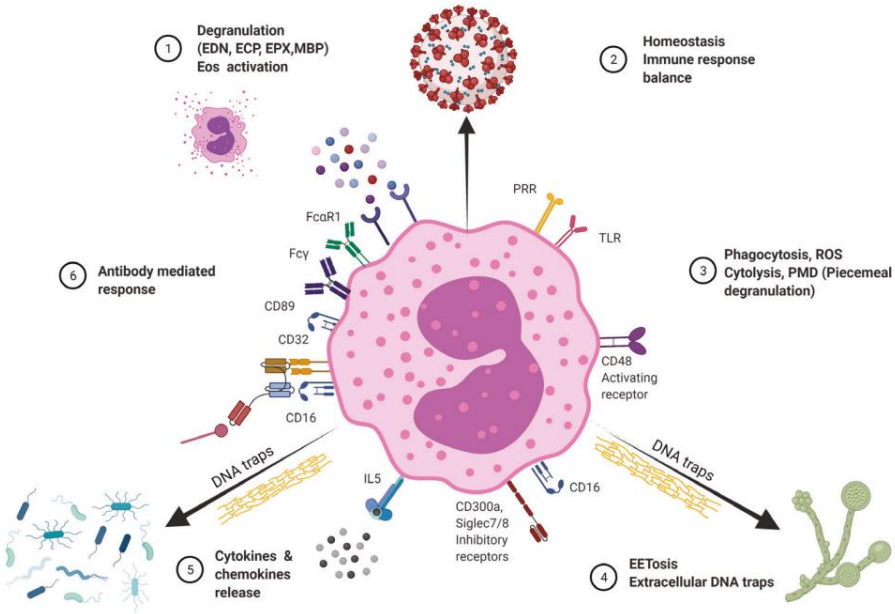
Eozinofiller, toll-benzeri reseptörler (TLR), nükleotid-bağlayıcı oligomerizasyon alanı (NOD) benzeri reseptörler, RIG-I-benzeri reseptörler (RLR) ve C-tipi lektin reseptörleri (CLR) gibi reseptörlere sahiptirler (Kvarnhammar, & Cardell, 2012). Eozinofiller reaktif nitrojen ve oksijen türleri (NOS ve ROS), IL-1β (Jung ve ark., 2015), tümör nekroz faktör-alfa (TNF-α), IL-4 gibi sitokinler (Wechsler ve ark., 2021), sisteinil lökotrienler, trombosit aktive edici faktörü (PAF) ve prostaglandinler gibi lipid mediatörleri salgılar. (Souza, Gropillo, & Neves 2017).

Eozinofiller sitoplazmalarında eozinofil peroksidaz (EPO), majör temel protein (MBP), eozinofil katyonik protein (ECP) ve eozinofil kaynaklı nörotoksin (EDN) gibi katyonik proteinler, sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri bulunmaktadır. Eozinofil granül proteinleri antibakteriyel, bakterisidal özelliklere sahiptir (Lehler ve ark., 1989). Eozinofillerin sitoplazmasında Charlet-Leyden kristal proteini (CLC/Galectin-10) ve lipid tanecikleri içeren birincil granüller bulunur (Varricchi, Bagnasco, Borriello, Heffer, & Canonica, 2016). Uyarıcı karşısında bu molekülleri salgılayarak etki gösterir. Parazitler alternatif kompleman yolunu aktifleştirerek C3b ile kaplanır. Eozinofiller reseptörleriyle bağlanarak majör temel proteinleri ve katyonik proteinlerini salgılayarak patojenin membranına zarar verir.

Eozinofillerde granül salınımı 3 şekilde gerçekleşebilir. Klasik degranülasyonda, granül zarı ile hücre zarı birleşerek granül içeriği çevreye salınır. Parça parça degranülasyon (PMD) en sık gözlenen formdur ve granül ile hücre zarı birleşmeden içerik salınır. Küresel ve tübüler veziküller aracılığıyla granül içeriği salınır. Sitolitik degranülasyonda nükleus ve hücre zarının çözülmesiyle tüm granüller içeriklerini çevreye verir. Tüm granüller, dış zarlarında kemokin, sitokin ve lipit reseptörlerini barındıran bağımsız organeller gibi davranır ve bu nedenle içeriklerini serbest

bırakmak için çeşitli uyaranlara yanıt verirler (Melo, & Weller, 2018). Bütün granüller bağımsız organel gibi hareket eder ve içeriklerini serbest bırakmak için çeşitli uyaranlara yanıt verirler.

Eozinofiller doğal bağışıklık hücreleriyle iletişim kurarak (mast hücreleri, dendritik hücreler, makrofajlar ve nötrofiller gibi), kemokinlerin ve sitokinlerin üretimini düzenler. Antijen sunumu yoluyla doğal ve adaptif bağışıklık arasında bağlantı kurar (Senbagavalli, Prakash, & Subash 2019). Eozinofil şematik gösterimi şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4: Eozinofil şematik gösterimi (BIoRender.com tarafından oluşturulmuştur).

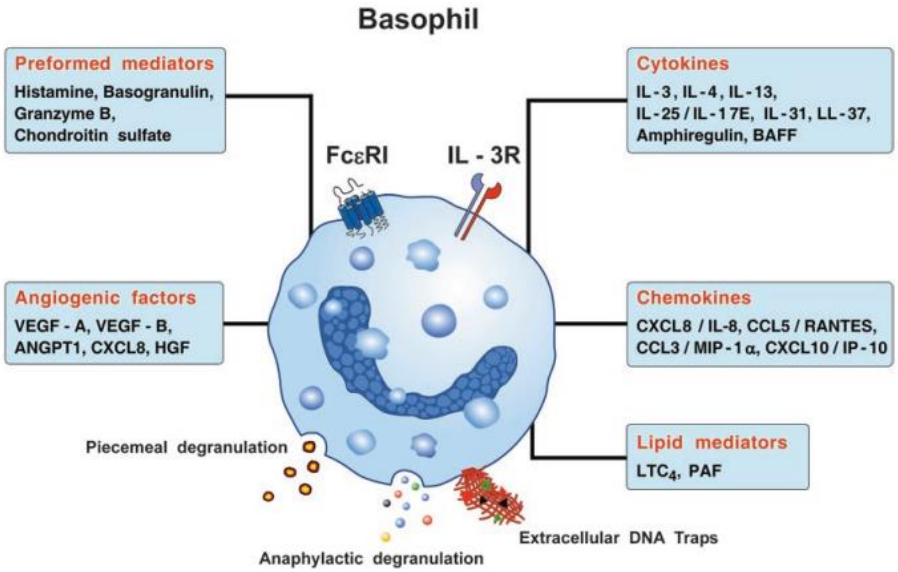
2.1.3. Bazofiller

Bazofiller, Paul Ehrlich tarafından tanımlanan yoğun çekirdeğe sahip, çapları 8-10 µm, periferik kan lökositlerinin %1'ini oluşturan kan hücreleridir (Ehrlich, 1879). Dolaşımda ömürleri 60-62 saattir. Kemik iliğinde bulunan miyeloid hücrelerden farklılaşırlar. Bazofil oluşumunu, gelişimini ve fonksiyonlarını düzenlemede görevli başlıca sitokin IL-3'tür. IL-5 ve granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) de bazofil gelişimini düzenleyen büyüme faktörleri arasındadır (Hirai, Monita, & Miyamoto, 1992).

Bazofiller kronik alerji inflamasyonunu aktive etmede, T-hücre yardımcısı 2 (Th2) hücre fonksiyonunu ve bağışıklık hücre hafızasını düzenleyen yeteneklere sahiptir. Sitokin, kemokin, kompleman sistem, prostaglandin (CRTH2), sisteinil lökotrien (LTD4, LTE4), immünoglobulin Fc (FcεRI ve FcγRIIb) ve toll benzeri reseptörler (TLR) bulundururlar (Sullivan, & Locksley, 2009). Bu reseptörlerin çoğu inflamasyonda görev alırlar.

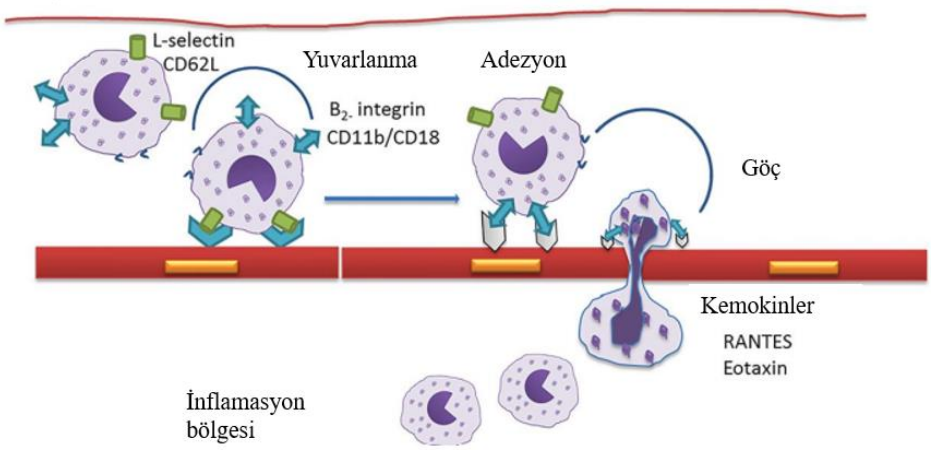
Antikorlar, proteazlar, IL-3, IL-18 ve IL-33 gibi sitokinler, TLR ligandları ve komplement faktörler varlığında bazofillerin aktivasyonu gerçekleşir. Aktive olan bazofiller granül içerisinde depolanan histamin, kondroitin ve kondroitin sülfat gibi proteoglikanlar, lökotrien, trombosit aktive edici faktör (PAF) gibi lipid mediatörleri, prostaglandinler ve proteolitik enzimleri gibi çeşitli maddeleri salgılar. Aktivasyon sonrasında, IL-3, IL-4, IL-6, IL-13, IL-25 gibi sitokinleri, RANTES, MIP-1α, MIP-1β, MCP-1 gibi kemokinleri ve GM-CSF gibi kemotaktik faktörleri üretir. Bunlar birçok immün hücreyi yangı bölgesine çekerler (Schroeder, Chichester, & Bieneman, 2009). IL-4, Th2 lenfositlerinin ve IgE salgılayan B-lenfositlerin oluşumunu uyarır (Suurmond ve ark., 2014). Histamin salınımında görevli en güçlü kemokin, MCP-1/CCL2'dir (Schleimer ve ark., 1989). Yukarıda yazılanlara ek olarak alerjenler ve parazit kaynaklı antijenler de doğrudan bazofilleri aktive edebilir. Proteaz aktivitesi olan antijenler, IgE bağımsız bir şekilde bazofilleri aktive eder. Aktif proteaz antijene sahip bazı alerjenler, örneğin ev tozu akarları (Dermatophagoides pteronyssinus 1) gibi, antijen spesifik IgE etkileşimi olmaksızın bazofilleri aktive eder ve bazofillerden IL-4 ve IL-13 üretimini indükler (Philips, Coward, Pritchard, & Hewitt, 2003).

Bazofillerde bulunan FcεRI'nin, polivalent antijenler veya IgE ile tanınan immün kompleksler tarafından çapraz bağlanmasıyla hücre sinyal yolunun aktive edilmesi, Ca^{+2} mobilizasyonu, granül ekzositozu, histamin salınımı ve sitokinlerin oluşumunu düzenler (Karasuyuma, 2010). Bazofillerde parça parça degranülasyon (PMD) ve anafilaktik degranülasyon (AND) olmak üzere 2 tür granül salınımı görülür. Anafilaktik degranülasyonda bazofil hızlı morfolojik değişikliklere uğrayarak granüllerin ekzositozu gerçekleşir. Parça parça degranülasyonda ise bazofiller ekzositoz olmadan granül içeriğini salgılarlar (Dvorak, Galli, Schulman, Lichtenstein, & Dvorak, 1983). Bazofilin şematik gösterimi şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5: Bazofilin şematik gösterimi (Birbrair, 2020).

Bazofillerin vasküler endotele adezyonu, IL-3, IL-5 ve GM-CSF gibi sitokinler ile düzenlenir (Bochner ve ark., 1990). Dolaşımda bulunan bazofillerin yangı bölgesine adezyonu ve yuvarlanması selektin reseptörü (CD62L) aracılığıyla gerçekleşir. Bazofil yüzeyindeki integrinler (CD11b/CD18) de daha sıkı adezyonda etkilidir (Yoshimura ve ark., 2003). Eotaksin/CCL11, bazofillerin dokuya geçmesini indükler. Bazofillerin eotaksine doğru göçü, çok zayıf FcεRI-çapraz bağlama aktivasyonu tarafından arttırılır. Bazofil göçü, IL-3, GM-CSF, IL-5 ve IL-4 gibi birkaç sitokin tarafından düzenlenir. Eotaksin spesifik ve özel olarak CCR3'e bağlanırken, RANTES CCR1 ve CCR3'e bağlanır. CCR1'e daha yüksek afinite ile bağlanır. Her iki kemokin de güçlü bir şekilde bazofil endotelyal göçü indükler (Şekil 6) (Iikura ve ark., 2001).

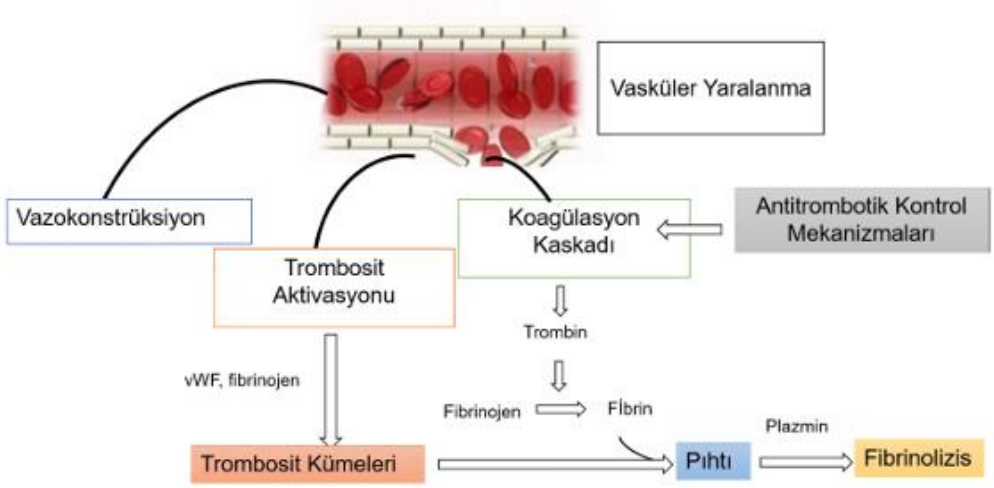


Şekil 6: Dolaşımdaki bazofillerin dokuya geçişi (Aljadi, 2017 kaynağından uyarlanmıştır).

2.2. Hemostaz

Hemostaz; damar duvarında bir hasar meydana geldiğinde kan akışını engellemeden kanın damar dışına çıkmasını engelleyerek damar bütünlüğünü sağlayan fizyolojik bir süreçtir (Mazza, 2002). Yaralanmayı takiben kan kaybını sınırlamak için vasküler endotel (vasküler faz), trombositler (trombosit fazı), koagülasyon faktörlerinin etkileşimi (koagülasyon fazı) ile vasküler hasar kapatılır. Oluşan hasarın iyileşmesi ve pıhtının eritilmesiyle kan akışı yeniden sağlanmış olur (Akay, 2014).

Hemostaz, hasarlı vasküler endotel tarafından başlatılır, vazokonstrüksiyon ile kanın akışı yavaşlatılır. Ardından trombositlerin subendotelyal hücre dışı matrise hızlı bir şekilde adezyonu, aktivasyonu, sekresyonu ve agregasyonuyla gevşek bir tıkaç ile kanama durdurulur (primer hemostaz). Trombosit tıkacı narin ve geçicidir. Hasar primer homostazın tolere edemeyeceği boyuttaysa devreye koagülasyon faktörleri girer. Koagülasyon faktörleri, çapraz bağlı bir fibrin ağı oluşturarak trombosit tıkacını sağlamlaştırır (sekonder hemostaz) (Chandler, 2006). Fibrinoliz aşamasında ise hemostatik tıkaç eritilir ve kan akışı yeniden sağlanmış olur (Şekil 7). Kanın pıhtılaşması (hemostaz) ve pıhtının eritilmesi (fibrinoliz) bir denge halindedir. Hemostazın ağır bastığı şartlarda pıhtı sınırlandırılamayıp, taşınıp damarların tıkanmasına (emboli) neden olur. Fibrinoliz ağır bastığında ise aşırı kan kaybına neden olur.



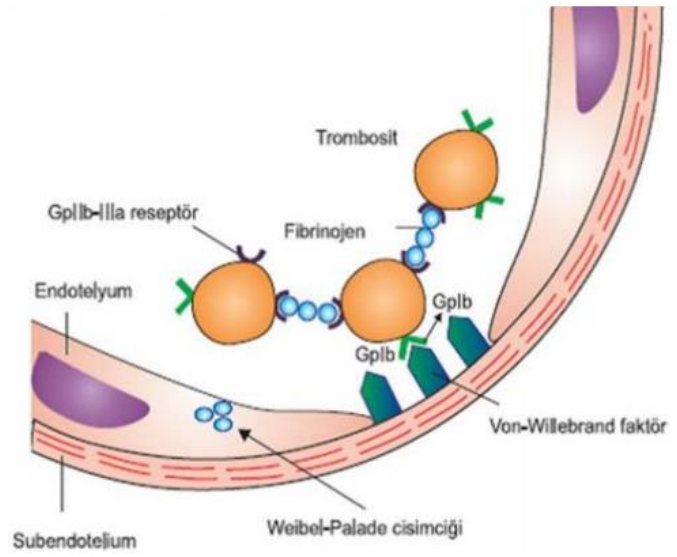
Şekil 7: Hemostaz mekanizması (Merve Arı'nın yüksek lisans tezinden alınmıştır).

2.2.1. Vasküler Faz

Damarın hasar görmesiyle aktif hale gelir. Serotonin (5-HT), TxA2 ve endotelin 1 (ET-1) salınmasıyla vazokonstrüksiyon meydana gelir. Hasarlı alan daraltılıp, kan kaybı azaltılır.

2.2.2. Trombosit Fazı

Hasarlı damar bölgesinde açığa çıkan subendotelyal kollajen fibrilleri ile trombosit Gp Ia/IIa ve Gp VI reseptörleri birleşerek kollajen-trombosit yapışmasına neden olur. Gp Ib/IX reseptörü de kolajene bağlı vWF ile birleşerek trombosit-subendotelyal mikrofibil yapışmasına neden olur. Bu bağlanma trombositlerin daha güçlü tutunmasını sağlar ve hasarlı bölgeden uzaklaşması engellenir. Gp IIb/IIIa ile fibrinojene bağlanır, fibrinojen köprüsü oluşturur (Şekil 8) (Sarratt ve ark., 2005).



Şekil 8: Trombosit adezyonu ve agregasyonu (Esra Çayır'ın uzmanlık tezinden alınmıştır).

Bu bağlanmalar trombositlerin sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunu arttırır ve granül içeriklerinin salınımına neden olur. ADP, serotonin, TxA2, PF-4, pıhtılaşma faktörleri, vWF, ATP ve histamin granül salgılarına örnektir. Bunlar trombositleri hasarlı bölgeye çekerek agregasyonu sağlar. Hemostatik tıkaç oluşturur (Şekil 7).

2.2.3. Koagülasyon Fazı

Bir dizi pıhtılaşma faktörlerinin aktivasyonuyla fibrinojenin fibrine dönüşmesiyle fibrin tıkacının oluşmasına koagülasyon (pıhtılaşma) kaskadı denir. Koagülasyon faktörlerinin çoğunluğu serin proteaz yapısındadır ve dolaşımda inaktif halde dolaşırlar. Sekonder hemostatik tıkacı oluşturmak için proteazlar tarafından parçalanarak aktif hale gelirler. Bir faktör bir sonrakini parçalayarak aktif hale getirir. Fibrinojenden fibrin oluşana kadar bu reaksiyon tekrarlanır. Fibrin trombositlerin arasını doldurarak pıhtıyı stabile eder (Hoffman ve ark., 2000). Koagülasyon sistem proteinleri ve işlevleri tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Koagülasyon ve anti-koagülasyon sistem proteinleri ve işlevleri (Gezer, 2012).

Adı	İşlevi
I (fibrinojen)	Fibrin adı verilen pıhtıyı oluşturur
II (protrombin)	Edimsel formu (IIa) ve I, V, VII, VIII, XI, XIII Protein C ve trombositleri aktive eder
Doku faktörü (DF)	VIIa'nın kofaktörüdür
Kalsiyum	Koagülasyon faktörlerinin fosfolipidlere bağlanmasını sağlar
V	Faktör X'un kofaktörüdür ve protrombinaz komplexini oluşturur
VII	Faktör IX ve X'u aktive eder
VIII (antihemofilik faktör-A)	Faktör IX'un kofaktörüdür ve tenaz komplexini oluşturur
IX (antihemofilik faktör-B)	Faktör X'u aktive eder, faktör VIII'le tenaz komplexini oluşturur
X	Faktör II'yi aktive eder ve faktör V ile protrombinaz komplexini oluşturur
XI	Faktör IX'u aktive eder
XII (Hageman faktörü)	Faktör XI, VII ve prekallikrein'i aktive eder
XIII	Fibrini stabilize eden faktör
von Willebrand Faktör	Faktör VIII'e ve subendoteldeki kollajene bağlanır, trombositlerin adezyonunu sağlar
Prekallikrein (Fletcher faktörü)	Faktör XII ve prekallikrein'i aktive eder, yüksek moleküler ağırlıklı kininojeni böler
Yüksek moleküler ağrılıklı kininojen (Fitzgerald faktörü)	Faktör XII, XI ve prekallikreinin karşılıklı aktivasyonunu destekler
Fibronektin	Hücre adezyonuna aracılık eder
Antitrombin III	IIa, Xa ve bazı diğer proteazları inhibe eder
Heparin kofaktör II	IIa'yı inhibe eder heparin ve dermatan sülfatın kofaktörüdür
Protein C	Va ve VIIIa'yı inaktive eder
Protein S	Aktive potein C'nin kofaktörüdür
Plazminojen	tPA ve ürokinaz aracılığı ile plazmine dönüşerek fibrini ve diğer bazı proteinleri parçalar
Alfa-2 antiplazmin	Plazmini nötralize eder
Doku plazminojen aktivatörü (tPA)	Plazminojeni aktive eder
Ürokinaz	Plazminojeni aktive eder
Plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAİ-1)	Endotelyal PAİ olup tPA ve ürokinazı etkisiz hale getirir
Plazminojen aktivatör inhibitörü-2 (PAİ-2)	Plasental PAİ olup tPA ve ürokinazı etkisiz hale getirir

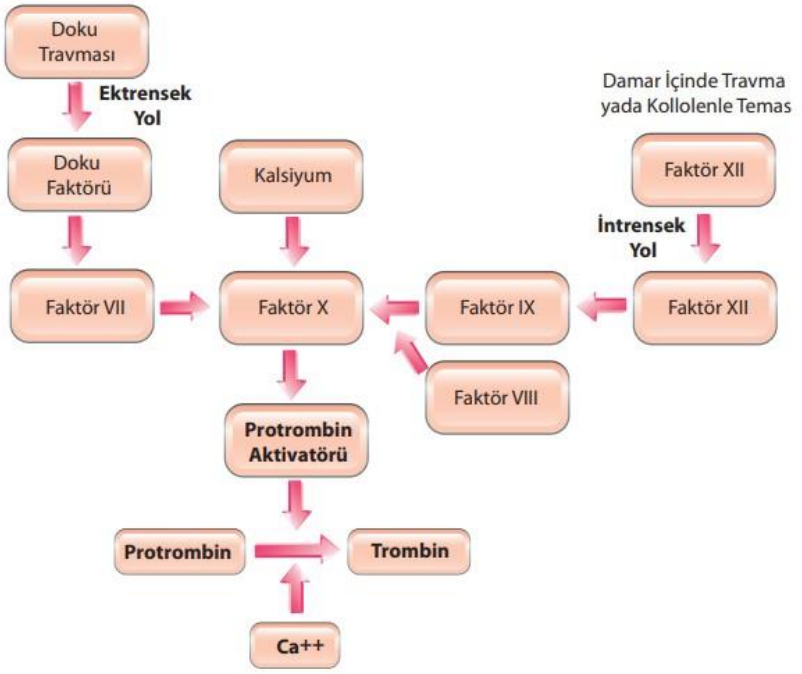
Koagülasyon basamakları intrinsik yolak ve ekstrinsik yolak olarak ikiye ayrılır. Bu iki yol faktör X'un aktiflenmesiyle birleşir. Faktör X'dan fibrin oluşumu sürecine de ortak yolak denir (Kern, 2005). İntrinsik yolak kan tarafından, ekstrinsik yolak ise kan dışı doku tarafından başlatılır. Bu yolakları aktive eden ve yolaklarda görevli proteinler farklıdır. Faktör X'un aktifleşmesiyle yolaklar birleşir, trombin ve fibrin oluşumu gerçekleşir (Şekil 9).

İntrinsik yolak damarın hasarlanması sonucu ortaya çıkan subendotel kollajen tarafından tetiklenir. Faktör XII (Hageman Faktör) aktifleşerek, aktif faktör XI ve yüksek molekül ağırlıklı kinnojen (HMWK) ile bir kompleks oluşturur. Bu kompleks

prekallikreinin kallikreine dönüşümüne yol açar. Kallikrein faktör XII'nin aktifleşmesini hızlandırır. Aktif faktör XI faktör IX'u, aktif faktör IX da faktör VIII ile beraber faktör X'u aktifleştirir. Faktör X'un aktifleşmesiyle intrinsik yol ortak yola devam eder (Burtis, C. A., Ashwood, E. R., & Bruns, D. E., 2013).

Ekstrinsik yolağı başlatan transmembran protein olan faktör III'tür (doku faktörü). Faktör III, dolaşımda bulunan faktör VII ile bağlanarak bir kompleks oluşturur. Bu komplekse Ca^{+2} (faktör IV) eklenmesiyle faktör X aktifleştirilir.

İntrinsik ve ekstrinsik yolak birleşip ortak bir yolak oluşturur. Aktif faktör X, aktif faktör V ve Ca^{+2} birleşerek bir kompleks oluşturur. Bu kompleks protrombini trombine dönüştürür. Trombin de fibrinojeni fibrin monomerlerine dönüştürür ve faktör XIII'ü aktifleştirir. Aktif faktör XIII de fibrin monomerleri arasında çapraz bağlar oluşturarak pıhtıyı sağlamlaştırır (Burtis, C. A., Ashwood, E. R., & Bruns, D. E., 2013).



Şekil 9: Koagülasyon yolakları (Nazan Atalan 2013 kaynağından uyarlanmıştır).

2.2.4. Fibrinoliz Fazı

Fibrinoliz, oluşan pıhtının eritilerek kan akışının tekrar eski haline döndürüldüğü bir süreçtir. Fibrinoliz fazının aktive olması için plazminojenin plazmine dönüştürülmesi gerekir. Plazmin, fibrin ve pibrinojeni parçalar. Plazminojen, doku plazminojen aktivatörü (t-PA) veya ürokinaz plazminojen aktivatörü (u-PA) tarafından plazmine dönüştürülür. Plazminojen aktivatör inhibitörü 1 (PA-1) ve plazminojen aktivatör inhibitörü 2 (PA-2) plazminojen aktivatörlerinin aktivitesini azaltırlar. α_2 antiplazmin (α_2 AP) plazmini inaktive eder (Lanzkowsky, 2005).

2.2.5. Antikoagülan Sistem

Vücudun doğal olarak kan pıhtılaşmasını önlemek veya kontrol etmek için kullandığı bir sistemdir. Hemostazın başlamasıyla aktive olarak aşırı trombüs oluşunu engeller. Antitrombin III, protein C, protein S ve doku faktörü yolu inhibitörü (TFPI) antikoagülan maddelerdir. Antitrombin III, trombin, faktör Xa, faktör IXa, faktör XIa'yı inhibe eder. Heparin varlığında etkisi artar. Protein C, faktör Va ve faktör VIIIa'yı inaktive eden bir proteindir. Protein S de Protein C'nin aktivitesini artırır (Adıgüzel, 2012). Doku faktörü yolu inhibitörü, endotel hücresi tarafından yapılır. Faktör VIIIa-faktör Xa-doku faktörü kompleksini inhibe ederek pıhtılaşmayı düzenler (Gatineau, 2002).

Normal şartlarda endotel hücreleri tarafından üretilen prostasiklin (PGI-2), nitrik oksit (NO) ve t-PA trombositlerin endotele yapışmasını önler. Trombomodulin, trombine bağlanarak protein C'yi aktive eder. Endotelin sağlıklı yapısı hemostatik dengede görev alır.

2.3. Trombositler

2.3.1. Trombosit Yapısı ve Üretimi

Trombositler; çapları 2-5 μm, kalınlıkları 0,5-1 μm, hacimleri ise 5-7 μm^3 olup, çekirdek içermeyen, bikonveks, yuvarlak ya da hafif oval şekildeki hücrelerdir. Dolaşımda ortalama yaşam süreleri 7-10 gündür (Maurice ve ark., 1998). Yaşam

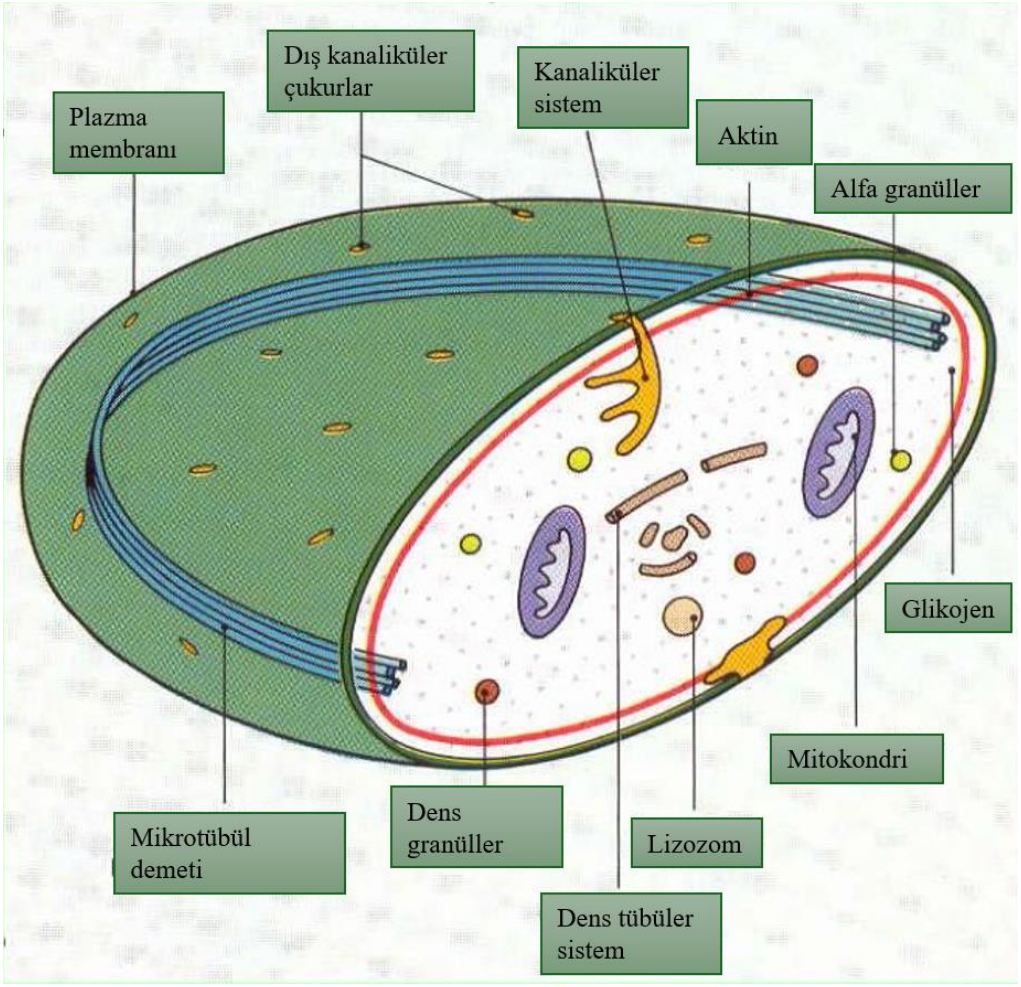
süreleri bittikten sonra dalakta parçalanıp, dolaşımdan uzaklaştırılırlar. Yetişkinlerdeki normal trombosit sayısı 150000-450000/mm^3'tür. Total trombositlerin 2/3'ü dolaşımda bulunurken, 1/3'ü ise dalakta sekrete edilir (Lee ve ark., 1993). Trombositler, 1860 yılında Zimmerman tarafından tanımlanmıştır. Trombositlerin hemostaz ve trombozdaki rolünü ortaya koyan kişi İtalyan doktor Bizzozero'dur.

Trombositler (plateletler), kemik iliğinin en büyük hematopoetik hücreleri olan megakaryositlerin sitoplazmik bölünmesiyle oluşan, periferik kanda bulunan en küçük hücrelerdir. Her bir megakaryositten 1000-3000 tane trombosit üretildiği tahmin edilmektedir. Megakaryositlerden trombosit oluşumu evreleri; megakaryoblast, bazofil megakaryosit, granüllü megakaryosit, trombositojen, protrombosit ve trombosit şeklindedir. Olgunlaşma sürecinde çekirdek proliferasyonu olurken hücre bölünmesi gerçekleşmez (Kaushansky, 2016).

Trombosit oluşumunun ilk evresinde çekirdek proliferasyonu gerçekleşir, megakaryosit sitoplazması genişler, sitoplazma, hücre iskelet proteinleri, trombosit spesifik granüller, granül içerikleri ve membranöz sistem ile dolar. İlk faz, megakaryositlerin megakaryosit spesifik büyüme faktörleri (MSBF) tarafından uyarılması ile gerçekleşir ve bu süreç günler sürer. İkinci evrede ise pro-trombositler oluşarak, saatler içinde trombositler dolaşıma salınır (Machlus, & Italiano, 2013).

Trombopoetin (TPO), megakaryositleri uyararak trombosit üretiminde görev alan en önemli hormondur. Megakaryositler ve trombositlerde bu hormon reseptörü bulunur. Karaciğerde, kemik iliğinde ve böbrek parankim hücrelerinde sentezlenir. TPO geni 3.kromozom (3q26-27) üzerinde bulunur (Sohma ve ark., 1994).

Trombositlerin yapısı incelendiğinde en dışta plazma membranı, membrana bağlı dış kanaliküler çukurlar ve kanaliküler sistem, stoplazmasında mitokondri, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı artıkları, glikojen, lizozom, hücre iskelet elemanları, alfa ve dens granüller gibi yapılar bulundurduğu gözlenmiştir (Şekil 10).



Şekil 10: Trombosit yapısı (Kemal Aslan'ın sunumundan uyarlanmıştır).

Megakaryositlerin yüzey membranından meydana gelen trombosit membranı (glikokaliks), protein ve lipitlerden oluşur. Hidrofobik tabakada yağ asit zincirleri, plazma tabakasında nötr fosfolipidler (fosfatidilkolin ve sfingomiyelin), sitoplazmik tabakada da anyonik veya polar fosfolipidler (fosfatidilinozitol, fosfatidiletanolamin ve fosfatidilserin) baskındır. Fosfatidilinozitol araşidonik asit sentezleyerek trombositlerin aktivasyonunda görev alır (Kunicki, & Nugent, 2012; Zieseniss, Zahler, Muller, Hermetter, & Engelmann, 2001).

Trombosit yüzeyinde hücrenin normal endotele yapışmasını engelleyen, fakat hasarlı damar duvarına (adezyon) ve trombositlerin birbirine yapışmasına (agregasyon) aracılık eden reseptör molekülleri ve glikoprotein yapıda kalın bir glikokaliks tabaka bulunur (Abrams, & Plow, 2013). Glikokaliks, sialik asit açısından

zengindir, bu da trombosit yüzeyine negatif yük kazandırmaktadır. Yüzeydeki sialik asit miktarı azalınca trombositlerde agregasyon başlar (Fritsma, 2015).

2.3.2. Trombosit Granülleri

Trombositler alfa granüller, dens (yoğun) granüller ve lizozomlar olmak üzere 3 temel granül içerir (Tablo 2).

Alfa granüller; trombositlerde en fazla bulunan granül çeşididir. Bu granüller adezyon proteinlerini, büyüme faktörlerini, alfa-1 antitripsin ve alfa-2 makroglobülin gibi enzimleri, koagülasyon ile ilişkili faktörleri içerir. Trombositler aktive olduklarında granül membranla bağlantılı kanaliküler sistemle birleşerek içeriği ortama salınır (Abrams, & Plow, 2013).

Dens granüller; hasarlı damar endotelinin vazokontriksiyonunu, trombositlerin adezyon ve agregasyonunu sağlar. ADP, ATP, pirofosfataz, histamin, serotonin ve fazlaca kalsiyum Ca^{+2} içerir (Gogstad ve ark., 1982).

Lizozomlar; pıhtının parçalanmasında görev alan asit fosfotaz, aril sülfataz gibi hidrolitik enzimleri içerir (Gogstad ve ark., 1982).

Tablo 2. Trombosit granülleri ve içerikleri (Çayır, 2019).

1. Dens Granüller:	ATP Kalsiyum ADP Fosfat Serotonin, Guanin nükleotid
2. Alfa Granüller:	
a. Enzimler:	α1 antitripsin α2 makroglobulin α2 antiplasmin C1-esteraz inhibitörü
b. Adezyon proteinleri:	Fibrinojen Fibronektin VWF (von Willebrand Faktör) Trombospondin Vitronektin GP IIb/IIIa P-Selektin
c. Büyüme faktörleri:	PDGF (Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü) TGFβ (Transforme Edici Büyüme Faktörü-β) Epidermal Büyüme Faktörü Endotelyal Büyüme Faktörü
d. Sitokin benzeri proteinler:	IL 1 CD 40 Ligand PF4 (Trombosit faktör-4) β-Tromboglobulin (BTG)
e. Pıhtılaşma faktörleri:	HMWK Plazminojen PAI-1 (Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1) Faktör V Faktör XI Fibrinojen Protein S
3. Lizozomlar:	β Galaktosidaz β Glukuronidaz α arabinosid N-asetil glukozamidaz Elastaz Kollejenaz Katepsin

2.3.3. Trombosit Fonksiyonu

Trombositler hemostaz ve pıhtılaşmada rol oynarlar. Bu rollerinin yanında immün dirençte, yara iyileşmesinde, inflamatuvar cevapta, tümör anjiyogenezinde ve metastaz oluşumunda da görev alırlar (Diz-Küçükkaya, Gushiken, & Lopez, 2006).

Adezyon, şekil değişikliği, primer agregasyon, trombosit içeriğinin salınması ve sekonder agregasyon trombosit fonksiyonlarındandır.

Trombositler düzgün bir yüzeye sahip diskoid şekilli hücrelerdir. Normal şartlarda endotel hücreleri tarafından üretilen prostasiklin (PGI2) nitrik oksit ve adenozin difosfataz gibi mekanizmalarla trombositlerin endotel hücrelerine adezyonu engellenir. Trombosit aktivasyonunda membranın iç yüzeyinde bulunan fosfolipidler dış yüzeyine geçerek fosfolipidden zengin yüzey oluşturur (Siess, 1989).

Damar bütünlüğünün bozulmasıyla subendotelyal kollajen açığa çıkar. Açığa çıkan kollejene yapışan trombositler şekil değiştirir ve subendotele yayılır. Kolajene yapışmasında Gp Ia/IIa görev alır. Trombositler hasarlı endotel ve subendotel bağ dokusu tarafından salgılanan glikoprotein olan vWF (von Willebrand Faktörü) aracılığıyla kollajene bağlanır. Bu bağlanmayı yüzeylerindeki GP Ib/IX yoluyla yaparlar. Trombosit yüzey reseptörünün hasarlı damar duvarına yapışma olayı adezyon olarak isimlendirilir. Trombositlerin adezyonuyla şekil değişikliği, içeriğinin salınımı ve agregasyon olayları başlamaktadır (Gachet, &Cazenave, 1991). Diskoid şeklindeki hücreler küresel şekil almakta ve uzantılarıyla başka trombositlerle ve damar duvarıyla ilişki kurmaktadır. Aktif trombositler ADP, serotonin, Tromboksan A2 (TxA2), trombosit faktör-4 (PF-4) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü gibi granül içeriklerini salgılayıp daha çok trombositi uyararak bölgede trombosit tıkacı oluştururlar. Trombositlerin yüzeyinde yüksek yoğunlukta bulunan vWF, fibrinojen, fibronektin, trombospondin alfa granüllerin içeriğinin salınımını aktive eder (Rao, 1993).

Aktif trombositlerden salınan vWF ve fibrinojen, trombosit reseptörü Gp Ib/IX adlı integrine bağlanarak trombositlerin kümeleşmesini sağlar. Bu kümeleşme olayına agregasyon adı verilir. Agregasyon ile daha fazla trombositin aktive olması ve trombositler arasında köprüler oluşması sağlanır. Böylece trombosit tıkacı oluşur (Peterson, & Lapentina, 1993).

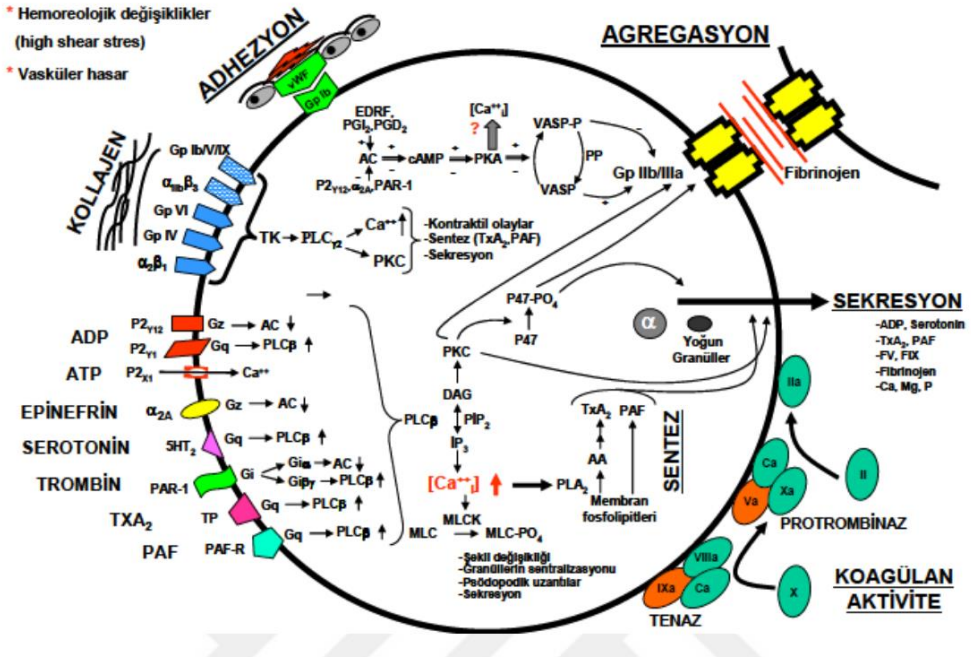
Primer agregasyon Ca^{+2} iyonu ve aktive trombositlerden salınan düşük yoğunluktaki uyarıcılar varlığında gerçekleşir. Adezyon, şekil değişikliği ve küçük kümeler oluşur. Sekonder kümeleşme uyarıcıların yüksek yoğunlukta olduğu ortamda gerçekleşir. Trobosit granül içeriklerinin de devreye girdiği agregasyondur (Gachet, & Cazenave, 1991; Woulfe, Yang, Prevost, O'Brien, & Brass, 2022).

Trombositleri aktive edebilecek pek çok madde bulunmaktadır. Trombin, TxA2, ADP, adrenalin, vazopressin, aktive nötrofil, trombosit aktive edici faktör (PAF) trombositleri aktive eden maddelerdendir (Huzoor-Akbar, Kundu, & Kornhauser, 1993). Trombositlerin agrege olup granüllerininin salınımı için Ca^{+2} iyonuna ve siklooksijenaz enzimine ihtiyaç duyulur (Gachet, & Cazenave, 1991). Siklooksijenaz; araşidonik asitten tromboksan ve prostasiklin gibi prostaglandinlerin oluşumundan sorumlu enzimdir. Trombosit uyarıcıların çoğu yüzeyde bulunan G protein ilişki reseptörlere bağlanarak hücre içi ikincil haberciler uyarılarak hücresel cevap oluşturulur.

Trombin, G proteini reseptörlerine bağlanarak tromboksan A2'nin serbest bırakılmasını, sitozolde Ca^{+2} miktarınının arttırılmasını ve siklik AMP (cAMP) miktarını düşürerek trombosit aktivasyonunu sağlar (Siess, 1989).

Trombositlerin aktivasyonuyla trombosit faktör-3 açığa çıkar. Faktör-3 pıhtılaşmada önemli role sahiptir. Aktif faktör IX ve VIII Ca^{+2} ile birleşerek tenaz adı verilen bir kompleks oluşturur. Tenaz kompleksiyle aktifleşen faktör X Ca^{+2} ile protrombinaz kompleksini oluşturur. protrombinaz trombosit yüzeyinde fibrin pıhtısı oluşumunda görevli trombin üretimini sağlar (Knoll, & Schafer, 1989).

Trombosit fonksiyonları şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11: Trombositlerin adezyon, aktivasyon, sentez, sekresyon, agregasyon ve koagülan aktivitelerinin şematik gösterimi (Engin SAĞDİLEK'in uzmanlık tezinden alınmıştır).

2.4. Granülositler ve Trombositler Arasındaki İlişki

Engelmann ve Massberg tarafından 2013 yılında icat edilen immünotromboz terimi, pıhtılaşma aktivasyonunun doğuştan gelen bağışıklık sisteminin fonksiyonuna yardımcı olduğu bir süreci tanımlamış ve bunun tersi de bağışıklık sistemi bileşenlerinin tromboza katkıda bulunduğu bir süreci tanımlamıştır (Engelmann, & Massberg, 2013).

Lökositler ve trombositler arasındaki etkileşim gerek inflamasyon bölgesinde gerek hemostatik bölgede birbirlerinin fonksiyonel kapasitelerini değiştirirler. Ayrıca lökosit-trombosit etkileşimi birçok önemli hastalıkta da (erişkin respiratuvar distres sendromu, ateroskleroz, myokard infarktüsü, septik şok ve nefrotoksik nefrit) yer alır (Packham, & Mustard, 1986; Rivkind, Siegel, Guadalupi, & Littleton, 1989; Wargovich, Nichols, & Mehta, 1987; Wu, Pippin, & Lefkowitz, 1993).

Lökositlerin pıhtılaşmaya katkısı hem uzun süredir ilgi duyulan hem de güncel yoğun çalışmaların konusudur. İntravital görüntüleme tekniklerinin, insanlarda trombozun patogenezini yakından taklit eden hayvan modellerinin ve lökosit

tarafından düzenlenen prokoagülan yolların seçici antagonistlerinin gelişmesiyle birlikte, lökositlerin trombozun düzenlenmesinde oynadığı rol ortaya çıkmaktadır. Lökositler, yani monositler, makrofajlar ve nötrofiller, pıhtılaşma ve fibrinolitik faktörleri eksprese eder, salgılarlar ve doğuştan gelen bağışıklık fonksiyonları yoluyla hemostatik sistemle etkileşime girerler. Lökositler, vasküler endotelyal hücreler üzerindeki prokoagülan ve adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu modüle eden sitokinler üretir. Lökosit degranülasyonu ve NETosis sırasında salınan antimikrobiyal ajanlar, trombositleri ve pıhtılaşma kaskadını doğrudan aktive eder. Ayrıca lökosit kemotaksisi ve fagositik fonksiyonlar da trombüs çözünürlüğünü düzenler (Swystun, & Liaw, 2016).

Normal fizyolojik koşullar altında hareketsiz lökositler kan akışkanlığının korunmasına katkıda bulunur. Fakat, proinflamatuar koşullar altında, lökositler hızlı bir şekilde fenotipik bir dönüşüme uğrayabilir, prokoagülan faktörleri veya pıhtılaşmayı aktive eden ajanları sentezleyebilir ve salgılayabilir. Ek olarak lökosit hücre yüzeyi pıhtılaşma faktörlerinin toplanması ve aktivasyonu için bir alan sağlayabilir (Tracy, Rohrbach, & Mann, 1983; Tracy, Eide, & Mann, 1985).

Bakterilere karşı nötrofillerin aktive olması, nötrofillerin granüllerinde nitrik oksit, süperoksit, hipoklorit ve aktif oksijen ve nitrojen metabolizmasının diğer ürünlerinin üretilmesi de dahil olmak üzere bir dizi öldürme mekanizmasını aktive eder (Rosen, Pou, Ramos, Cohen, & Britigan, 1995). Bu bakterisidal sistemlerin birçoğu konak proteinlerine ve hücrelerine zarar verir ve nötrofil, subakut veya kronik inflamasyon durumlarında konak hasarına önemli bir katkıda bulunur (Weiss, 1989).

Nötrofiller, trombüsteki lökositlerin baskın fraksiyonunu temsil eder ve nötrofil hücre dışı tuzaklarının (NET'ler) oluşumu ve pro-trombotik aracıların salgılanması yoluyla trombüs stabilizasyonuna katılır. Nötrofiller, trombosit P-selektin'in lökositler üzerindeki PSGL-1 ligandına bağlanması yoluyla trombositlere bağlanıp aktive olduklarında, NET'leri serbest bırakırlar. NET'ler, faktör XII'nin aktivasyonu yoluyla trombin oluşumunun yanı sıra daha fazla trombosit ve kırmızı hücre alımını teşvik eder, böylece trombüs yayılımında içsel pıhtılaşma yolunun rol oynadığını gösterir NET'lerin trombosit aktivasyonu üzerindeki etkisi çeşitli in vitro ve in vivo modeller kullanılarak karakterize edilmiştir (von Brühl ve ark., 2012; Fuchs, Brill, & Wagner, 2012; Mitroulis ve ark., 2011).

Aktive trombositler NETosis'i uyarabilseler de lökositler, heterotipik lökosit trombosit agregatları oluşturmak için aktive trombositlerle etkileşime girer. Proinflamatuar ve prokoagülan uyaranlara maruz kalmanın yanı sıra yüksek kayma stresinin bu komplekslerin oluşumunu teşvik ettiği gösterilmiştir. Aktive edildiğinde heterotipik agregatlar oluşur ve degranüle trombositler, yüzeylerinde lökosit yüzeyi PSGL-1'e bağlanan P-selektin'i açığa çıkarır (Christersson, Johnell, & Siegbahn, 2010; Hu ve ark., 2003).

Aktive edilmiş lökositler elastaz, katepsin G ve trombosit aktive edici faktör gibi güçlü trombosit aktivatörlerini serbest bırakarak trombosit aktivasyonunu ve agregasyonunu indükleyebilir (Renesto, & Chignard, 1993; LaRosa ve ark., 1994; Seth, Kumari, Dikshit, & Srimal, 1994).

Trombüs oluşurken trombositler ile polimorfonükleer lökositler (PML) temas halinde bulunurlar. PML'ler metabolik fonksiyonları sırasında ürettikleri birtakım 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 ve ark tarafından yapılan çalışmada (1974), 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 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 ve ark, 1976).

H_2O_2'nin trombosit agregasyonunu inhibe ettiğini gösteren çalışmaların yanı sıra aktive ettiğini gösteren çalışmalarda bulunmaktadır (Clark ve Klebanoff, 1980). Dahası çeşitli antioksidanlar ve H_2O_2'yi ortamdan uzaklaştıran maddeler ile de agregasyonun inhibe edildiği de gösterilmiştir (Yoshikawa ve ark, 1982.). Principe ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada da (1985) 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 gösterilmiştir. Nötrofillerin trombosit agregasyonunu trombositten zengin plazmada inhibe ettiği gösterilmiştir. Salvemini ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; 1989) nötrofiller ve makrofajlar, eklenen hücre sayısıyla doğru orantılı olarak trombinle uyarılan agregasyonu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bu etkinin nötrofillerde cGMP kaynaklandığını ve bu inhibisyonların SOD ile güçlendirildiğini bulmuşlardır.

Granülositlerin insan pulmoner mikrovasküler endotel hücrelerine (HPMEC'ler) yapışmasındaki rolünün araştırıldığı çalışmada aktifleştirilmiş granülositlerin inkübasyonu veya uyarılmamış granülositler ve trombositlerin kombinasyonu, hücrelerin yapışmasında küçük bir artışa neden olmuştur. Aktive edilmiş granülositlerin aktive edilmiş veya dinlenme halindeki trombositlerle veya dinlenme halindeki granülositlerin aktive edilmiş trombositlerle kombinasyonu, endotelyal hücrelere granülosit yapışmasında 3 kat daha fazla artışa neden olduğu görülmüştür (Zarbock ve ark., 2006).

Bir çalışmada pıhtılaşmanın aktivasyonunda granülositlerin gerekli olup olmadığını belirlemek için, aktive edilmiş endotelyal hücrelere nötrofil bağlanmasını önlemek amacıyla ICAM-1'in bloke edilmesinden önce ve sonra trombüs oluşumu ve fibrin oluşumu karşılaştırılmıştır. Trombüs oluşumu ve fibrin oluşumu, nötrofillerin endotele bağlanması engellendiğinde önemli ölçüde azalmıştır (Darbousset ve ark., 2012).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Tez projemiz, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 20 Aralık 2022 tarih ve 2022-20/19 sayılı kararı ve Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Araştırmaları Etik Kurulunun 8 Mayıs 2024 tarih ve 2024-7/16 sayılı kararı ile, Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi'nde yer alan, "İnsanlar Üzerinde Yapılan Tıbbi Araştırmalarla İlgili Etik İlkeler" göz önünde bulundurularak gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma ex vivo deneysel bir araştırma olup, sağlıklı gönüllülerden alınan kan örnekleri üzerinde yapılmıştır. Çalışmanın granülosit izolasyonu DENHAB İmmünoloji Laboratuvarında, agregometre ve tromboelastogram deneyleri ise Biyofizik Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

3.1. Gönüllüler

Çalışmaya; erişkin, sağlıklı, sigara içmeyen, aktif infeksiyonu bulunmayan, son 10 gün içerisinde trombositleri ve granülositleri etkilediği bilinen herhangi bir ilaç almamış olan (aspirin, antibiyotik, non-steroid antiinflamatuar ilaçlar, antihistaminik, antidepresan vb ilaçlar), 21-45 yaşları arasında gönüllüler dahil edilmiştir. Gönüllüler Bursa Uludağ Üniversitesi öğretim üyesi, personeli, öğrencisi ve yakınları olup, çalışma içeriği hakkında bilgilendirilip yazılı onayları alındıktan sonra çalışmaya dahil edildiler.

3.2. Kan Örneklerinin Alınması

Kan örnekleri en az 8 saatlik açlığın ardından kan alma konusunda uzman teknikerler tarafından, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı İmmünoloji Laboratuvarı'nda alındı. Kan örnekleri antecubital venden 21 G iğne kullanılarak üst kola hafif venöz staz oluşturularak alındı. Kan örnekleri daha önceden hazırlanmış olan sitratlı vacutainer'lı tüplere alındı. Gönüllülerin kan vermeden önce dinlenmiş ve sakin olmalarına dikkat edildi. Aynı gönüllüden 5 saatlik arayla 2 kez kan örneği alındı. İlk yapılan kan alma işleminde 2 tüp (yaklaşık 16 ml) kan alındı (0. saat deneyleri, G-0). Bu kanın 7 ml'si granülosit izole edilmek üzere immünoloji

laboratuvarına gönderildi. 1 ml kan hemogram ölçümü için ayrıldı. Kalan 8 ml kan Trombositten Zengin Plazma (TZP) elde etmek için kullanıldı. 5 saat sonra alınan 3 tüp (yaklaşık 24 ml) kan örneğinin tamamı [4. saat deneyleri, G-4, G(+)-4] TZP elde etmek için kullanıldı. Elde edilen TZP agregometre ve TEG deneyleri için kullanıldı. Kan örneği alındıktan sonra en geç 3 saat içerisinde tüm deneyler tamamlandı.

3.3. Sitratlı Tüpler

Molekül ağırlığı 294,10 g/mol olan (MERCK KGaA Darmstadt, Germany) tri-Sodium citrate dihydrate'tan 500 ml, 0,106 M'lık stok çözelti hazırlandı. İnsülin enjektörü ile 0,8 ml alınarak 8 ml'lik vacutainerlı tüplere kondu. Gönüllülerden kan alındığında (sitrat/kan: 1/9) 0,0106 M sitratla antikoagüle edilmiş tam kan örnekleri elde edildi.

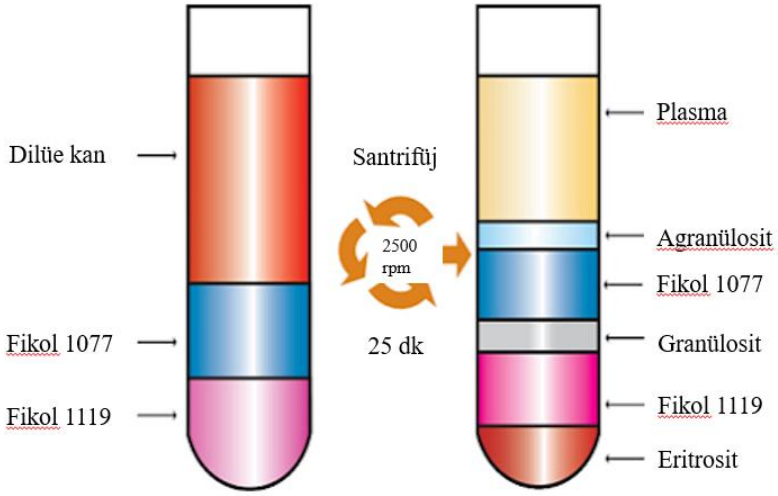
3.4. Granülositlerin İzole Edilmesi

Gönüllülerden alınan kanın 7 ml'si granülosit izolasyonu için kullanıldı. 7 ml kan ile 12 ml serumsuz RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium) (Sartorius, L-Glutamin, lot: 240501312) karıştırılarak kan dilüe edildi. Ayrı iki tüp alınarak en altına 1.5 ml fikol 1119 g/ml (Sigma, lot: RNBL3233) üzerine 1.5 ml fikol 1077 g/ml (Capricorn, lot: CP22-5404) ve tüplerin en üstüne de 6 ml dilüe kan eklendi. Kanın fikolle karışmamasına dikkat edildi. 2 tüp oda sıcaklığında, 2500 rpm'de 25 dk boyunca frensiz bir şekilde santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpün altından üstüne doğru; eritrosit, fikol 1119, granülosit, fikol 1077, agranülosit ve plazma gradyanı oluştu (Şekil 12). Plazma, agranülosit, ficol 1077 pastör pipetiyle alınıp atıldı. Granülositlerin bulunduğu gradyan toplanarak ayrı bir tüpe alındı ve 2 kez yıkandı. Yıkama işleminde tüpe PBS (Phosphate- buffered salin) eklenerek 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. İkinci yıkamanın sonunda tüp ters çevrilerek boşaltıldı. Dipte kalan hücreler (pellet) 1 ml tam besiyerinde (RPMI 1640, %10 FBS, %1 Penisilin-streptomisin) çözüldü ve granülositler sayıldı. 3.10^6 hücre 0. saat deneyleri için kullanıldı. Yaklaşık 200.000 hücre 0. saat akış sitometri boyaması için kullanıldı.

4 saatlik inkübasyon için kuyu başı 500.000 hücre toplam 200 µl'de olacak şekilde 96 kuyucuklu tabakaya (U bottom) ekildi. Granülositler lipopolisakkarit (LPS) (Sigma

L4516-1MG) ile uyarıldı LPS negatif grup için (G-4) 7 kuyucuk, LPS pozitif grup içinde [G(+)-4] 7 kuyucuk kullanıldı. LPS negatif kuyucuklarda hücreler 200 µl besiyeri içerisine ekildi. LPS pozitif kuyucuklarda ise hücreler 160 µl besiyeri içerisinde ekilerek üzerlerine 40 µl LPS eklendi (final konsantrasyon 1 µg/ml) ve 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda her iki grupta da 6 kuyucuk toplanarak (3.10^6 hücre) 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Tüpteki süpernatant atılıp pellet kısmına istenilen miktarda RPMI eklenerek 4. saat deneylerinde kullanıldı. Kalan 1'er kuyucukta akış sitometri boyaması için kullanıldı.

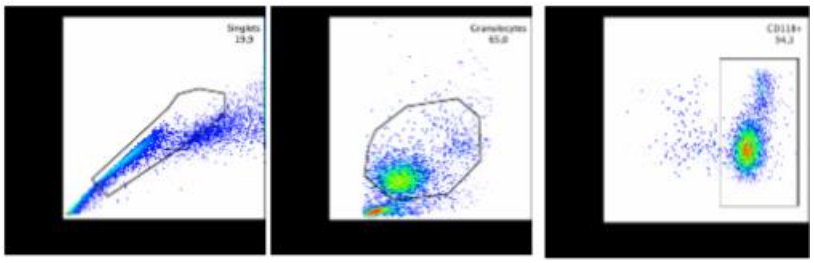
Akış sitometri çalışması için ayrılan örneklere nötrofil belirteci olan CD66b-FITC (Beckman Coulter lot:200070) 5µl eklenerek 4°C, karanlık ortamda 40 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra hücrelere tutunmayan boyaların ortamdan uzaklaşması için örneklere 1 ml PBS eklendi ve 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, üzerine 100 µl PBS eklenerek cihaza okutuldu. Örnek içerisindeki granülosit oranı belirlendi.



Şekil 12: Granülosit izolasyonu.

Akış sitometri çalışmasında kapılama stratejisi olarak, ilk önce FSC-H/FSC-A kapısından tek düşen hücreler belirlendi. Bu kapı içerisinden SSC-A/FSC-A açılarak hücreler boyut ve granül yapısı olarak değerlendirildi ve granülosit hücreleri kapılandı.

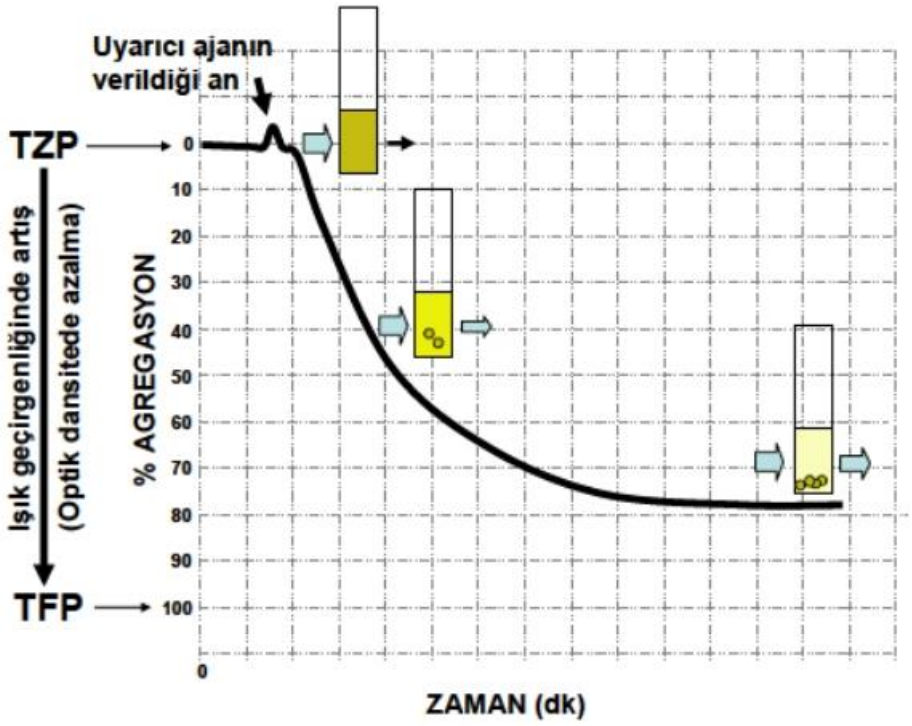
Granülosit hücreleri içerisinden CD11b-FITC pozitifliği, boya eklenmeyen negatif kontrol örneği (AF: oto-florasan) ile kıyaslanarak belirlendi (Şekil 13).



Şekil 13: Akış sitometri kapılama**.**

3.5. Optik Agregometre Deneyleri

Optik agregometreler modifiye edilmiş spektrofotometrik aletlerdir. Trombositten zengin plazmanın vücut ısısında inkübe edildiği, belirli bir hızda karıştırılırken uyarıcı ajanın eklenmesi ile trombositlerin agregatlar oluşturup ışık geçirgenliğindeki değişikliğin ölçüldüğü yöntemlerdir. Optik dansitesi yüksek olan trombositten zengin plazmaya ekzojen bir agonist eklendikten sonra oluşan trombosit agregatları gelişerek plazma daha berrak hale gelir ve ışık transmittansındaki artış ölçülür (Şekil 14). Ölçüm cihazında ışık kaynağı ve fotosel arasındaki küvette trombositten zengin plazma 37°C'de devamlı mıknatıs yardımıyla karıştırılır. Agonist eklendikten sonra trombositler agrege olur. Transmite edilen ışık fotosel ile ölçülür. Cihaz %0'dan (trombositten zengin plazmanın maksimal optik dansitesi) %100'e kadar (optik dansitesi minimum olan otolog trombositten fakir plazma) olan hız ve maksimal optik dansite artışını fotometrik olarak ölçer ve kaydeder. Elde edilen sinyaller trombosit agregasyonu sırasında ışık tranmittans artışını otomatik olarak grafiksel bir eğriye dönüştürür. Eğrinin eğimi, agregasyonun maksimal genliği (%) ve bekleme fazı (lag faz) otomatik olarak ölçülür.



Şekil 14: Optik agregometre prensibinin şematik gösterimi (Engin SAĞDİLEK).

Bu çalışmada Agregasyon ölçümleri Biyofizik laboratuvarında bulunan Platelet Aggregation Profiler® PAP-4CD (BIO/DATA CORPORATION, USA) optik agregometre cihazında yapıldı.

Trombosit aktivasyonunu başlatan agonistler, zayıf ve güçlü agonistler olarak sınıflanırlar. Kollajen, trombin gibi uyaranlar güçlü agonistlerdendir. Güçlü agonistler agregasyonun engellendiği şartlarda bile granül içeriğinin salınımını uyarabilirler. ADP, epinefrin gibi uyaranlar ise zayıf agonistlerdendir. Zayıf agonistler tek başlarına granül içeriğinin salınımını uyaramaz fakat trombositlerin agrege olmasını uyarabilirler. Agregasyon sonucunda granül salınımı gerçekleşebilir. En sık kullanılan agonistler trombin, kollajen, araşidonik asit, ristosetin, ADP ve epinefrindir. Çalışmamızda trombositleri uyarmak için ADP, kollajen ve epinefrin kullanıldı. (Helena Biosciences Europe, UK). Uyarıcı ajanların test son konsantrasyonları ADP için 4 μM, kollajen için 38 μg/ml, epinefrin için 20 μM olacak şekilde uygulandı.

0. saat deneyleri öncesinde gönüllüden alınan 2 tüp kan, 50 ml'lik falcon tüpüne boşaltılıp 3 kez alt üst edildi. Homojen hale gelen kandan 1 ml kan sayımı için, 7 ml granülosit izolasyonu için ayrıldıktan sonra kalan kandan TZP elde edildi. Kan 200 g'de 15 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüplerin üstünde kalan TZP pastör pipetiyle yeni bir tüpe alındı. 1 ml TZP hücre sayımı yapılmak üzere ayrıldı. TZP alındıktan sonra geriye kalan örnekler ikinci kez 2000 g'de 15 dk boyunca santrifüj edildi. Agregometre kalibrasyonunda kullanılacak trombositten fakir plazma (TFP) elde edildi.

Tam kan ve TZP hücre sayımları sonrasında tam kandaki granülosit sayısının (nötrofil + eozinofil + bazofil sayıları) trombosit sayısına oranı bulundu. Granülosit izolasyonu sonrasında elde edilen birim hacim başına granülosit sayısı, TZP içinde tam kandaki orana göre ayarlandı.

Agregometre deneyleri iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada granülositlerin herhangi bir uyaran ile inkübe edilmeden (0. Saat [G-0]) trombosit aktivasyonu üzerine etkisi incelendi. İkinci aşamada da hiçbir şekilde uyarılmayan (G-4) ve lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılan granülositler [G(+)-4] 4 saat inkübe edildikten sonra trombosit aktivasyonu üzerine etkilerine bakıldı.

İlk aşamada agregometre cihazında 2 kanal çalışıldı. Birinci kanal kontrol grubu olarak belirlendi ve tüpe 475 µl TZP, 15µl RPMI 1640 Medium (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium) eklendi **(Kontrol)**. İkinci kanal granülosit kanalı olarak kabul edildi ve tüpe 475 µl TZP, 15 µl granülosit hücre topluluğu eklendi **(G-0)**. Agregometrede deney başlatıldı. 3 dk boyunca herhangi bir uyraıcı ajan verilmeden granülositlerin doğrudan agregasyonu etkileyip etkilemediği gözlendi. 3 dk sonunda uyarıcı ajan her iki kanala da 10 µl olacak şekilde eklendi. Deneyde 3 uyarıcı ajan (ADP, kollajen ve epinefrin) kullanıldığı için test 3 tur yapıldı. Uyarıcı ajan eklendikten sonra agregasyon eğrisi 20 dk daha takip edilip test sonlandırıldı. Sonuçlar kontrol grubunun değerlerine göre değerlendirildi.

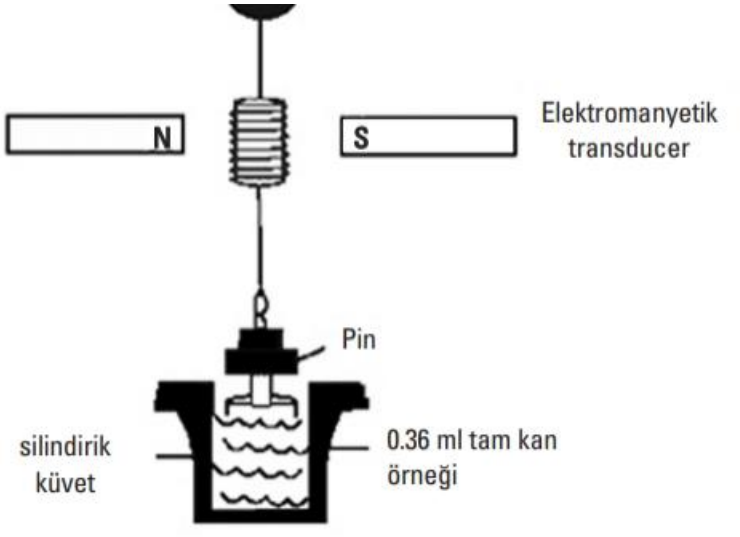
4 saatlik inkübasyondan sonraki ikinci aşamada ise agregometre cihazında 3 kanal çalışıldı. İlk kanal kontrol kanalı olup; 475 µl TZP, 15 µl RPMI eklendi **(Kontrol)**. İkinci kanal LPS ile uyarılmayan kanal olup; 475 µl TZP, 15 µl granülosit (-LPS) **(G-4)** eklendi. Üçüncü kanal uyarılan kanal olup; 475 µl TZP, 15 µl granülosit (+LPS)

[G(+)-4] eklendi. Test başladıktan sonra aynı prosedür izlendi. Her uyarıcı ajan için tekrarlandı.

3.6. Tromboelastogram (TEG) Deneyleri

Tromboelastogram temel olarak oluşan pıhtının visko-elastik ve mekanik özelliklerini değerlendirerek hemostatik sistem hakkında genel bir bilgi veren yöntemdir. Genel değerlendirme pıhtı oluşumunun başlamasından fibrinoliz de dahil olmak üzere tüm süreci kapsar. Hemostazın enzimatik süreci olan koagülasyon, trombositlerin aktivasyonu ve pıhtı erime süreci hakkında fikir verir.

Çalışmada tromboelastogram ölçümleri Biyofizik laboratuvarında bulunan TEG®5000 Thrombelastograph® (HAEMONETICS CORPORATION, MA, USA) cihazında yapıldı. Bu cihaz temelde elektromanyetik dönüştürücü, silindirik kap ve iğne (pin) kısımlarından oluşmaktadır (Şekil 15). Kap içerisine konan TZP'de trombosit-fibrin bağları oluşarak kaptaki rotasyon hareketleri pine aktarılır. Mekanik olarak pine aktarılan hareketler elektromanyetik dönüştürücü aracılığıyla elektriksel sinyallere dönüştürülür (Traverso, Caprini, & Arcelus, 1995).



Şekil 15: TEG analizinin çalışma prensibi (TEG kullanım kılavuzundan uyarlanmıştır).

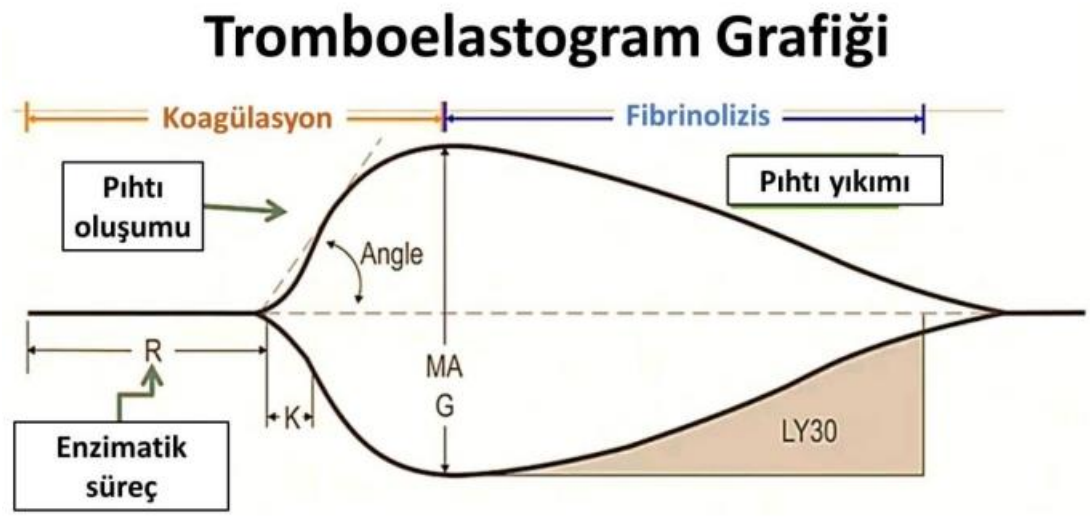
TEG deneylerinde kullanılan TZP yukarıda anlatıldığı şekilde elde edilmiştir. Deneyler 0. saat ve 4. saat olarak 2 aşamadan oluşmaktadır. 0. saat deneyinde LPS ile

uyarılmamış, inkübasyona bırakılmamış granülositler çalışıldı (G-0) TEG cihazındaki iki kanaldan biri kontrol diğeri deney grubu olarak aynı anda çalışılmıştır. Her iki kanala yerleştirilen kaplara 20'şer µl Ca^{+2} (0,2 M CaCl2) eklendi. Birinci kanala 330 µl TZP, 10 µl RPMI eklendi. İkinci kanala 330 µl TZP, 10 µl granülosit hücre topluluğu eklendi. İki kanal da test pozisyonuna getirilerek deney başlatıldı. Oluşan grafikte tüm parametreler çıkana kadar deney sürdürüldü.

4 saatlik inkübasyondan sonra elimizde olan -LPS ve +LPS granülosit hücreleri için 2 tur deney yapıldı. İlk turda -LPS hücreleri **(G-4)**, ikinci turda ise +LPS hücreleri **[G(+)-4],** RPMI içeren kontrol grubu ile çalışıldı. Grafik gözlemlenip deney sonlandırıldı.

3.7. Tromboelastogram Parametreleri

Ortaya çıkan tromboelastogram grafiklerinde, cihazın özel bilgisayar programı ile değerlendirilen parametreler şekil 16'da gösterilmiştir. Tüm parametreler kontrole göre değerlendirilmiştir.



Şekil 16: Tromboelastogram grafiğinin şematik gösterimi ve değerlendirilen parametreler (Merve Arı'nın yüksek lisans tezinden alınmıştır).

R (Reaksiyon zamanı) (dk): Test başlangıcından fibrinin ilk oluşma zamanına kadar olan dönemdir. Reaksiyon zamanı anlamına gelir ve ölçüme başlandığı andan iki eğri

arasındaki mesafenin 1 mm'ye ulaşmasına kadar geçen süreyi göstermektedir. 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. Hem trombin aktivitesi hem de fibrin oluşumu ile ilgilidir. K değeri pıhtı oluşum dinamiklerini gösterir. 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.

3.8. 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.

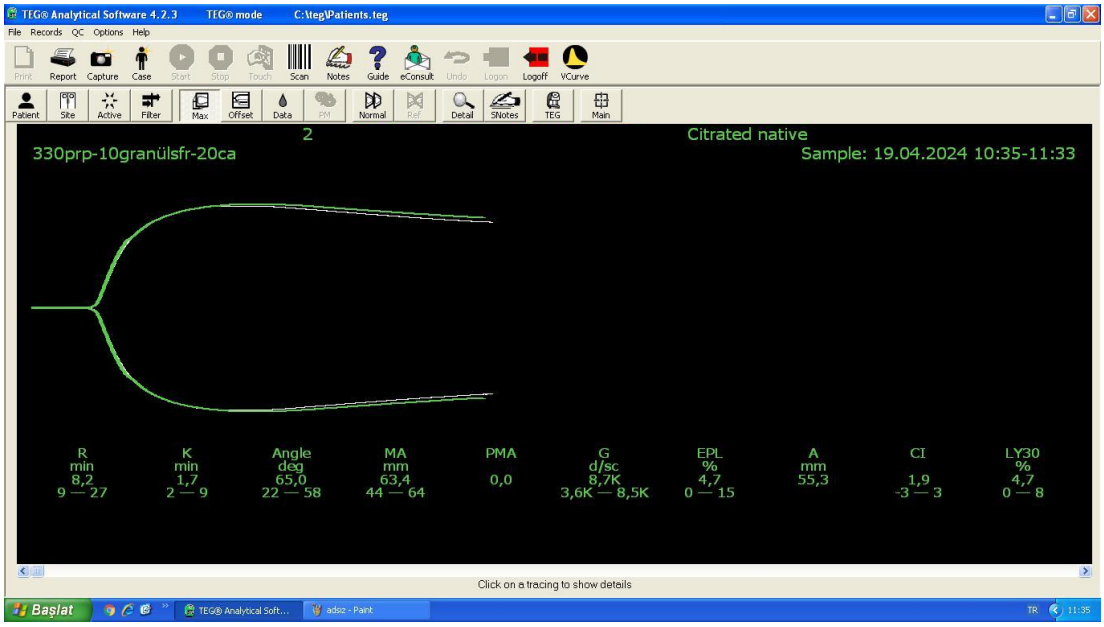
4. BULGULAR

4.1. Tromboelastogram Sonuçları

Granülositler ve trombositler tam kandan ayrıştırıldıktan hemen sonra (çalışma protokolünde 0. saat) trombositten zengin plazmaya (TZP) eklenen granülositlerin (G-0) kontrol grubuna göre tromboelastogram parametreleri üzerine etkileri çalışılmıştır. Granülositlerin, ayrıştırıldıktan hemen sonra TZP üzerine eklenmesi, tromboelastogram parametrelerinin hiçbiri üzerinde (LY30 hariç) anlamlı bir etki oluşturmamıştır. Aşağıda Şekil 17'de de görüldüğü gibi birçok parametre birbirine yakın sonuçlar vermiştir. Sadece, ortalamada, kontrol grubuna göre (%2,9) deney grubunda (G-0) lizis yüzdesinde (%2,3) anlamlı bir azalma gözlenmiştir (p=0,008). Pıhtının lizisi (çözünmesi) kontrol grubuna göre ortalama %22 azalmıştır.

Tablo 3: Granülositlerin 0. saat tromboelastogram parametreleri üzerine etkileri.

	G-0	Kontrol	%fark	p
R	6,7 ± 1,6 (4,1 - 8,2)	6,8 ± 1,3 (4,2 - 8,2)	-2,3 ± 11,8 (-32,8 - 6,5)	0,599
K	1,7 ± 0,6 (0,8 - 2,4)	1,6 ± 0,5 (0,8 - 2,2)	5,6 ± 22,6 (-21,1 - 53,8)	0,501
Angle	67,3 ± 7,5 (59,3 - 80,7)	68,8 ± 6,3 (60,2 - 79,8)	-2,1 ± 5,6 (-10,6 - 6,1)	0,285
MA	64,4 ± 7,8 (47,9 - 72,3)	64,8 ± 8,3 (47,2 - 73,6)	-0,5 ± 2,4 (-4,6 - 2,2)	0,538
G	9,6 ± 2,7 (4,6 - 13,1)	9,8 ± 3 (4,5 - 13,9)	-1,6 ± 7,3 (-15,1 - 7,3)	0,472
CI	2,4 ± 1,2 (-0,1 - 4)	2,4 ± 1,3 (-0,3 - 4)	-8,1 ± 24,8 (-66,7 - 7,1)	1,000
LY30	2,3 ± 1,7 (0,7 - 4,7)	2,9 ± 1,9 (1,2 - 5,8)	-22 ± 19,5 (-53,3 - 8,3)	**0,008**

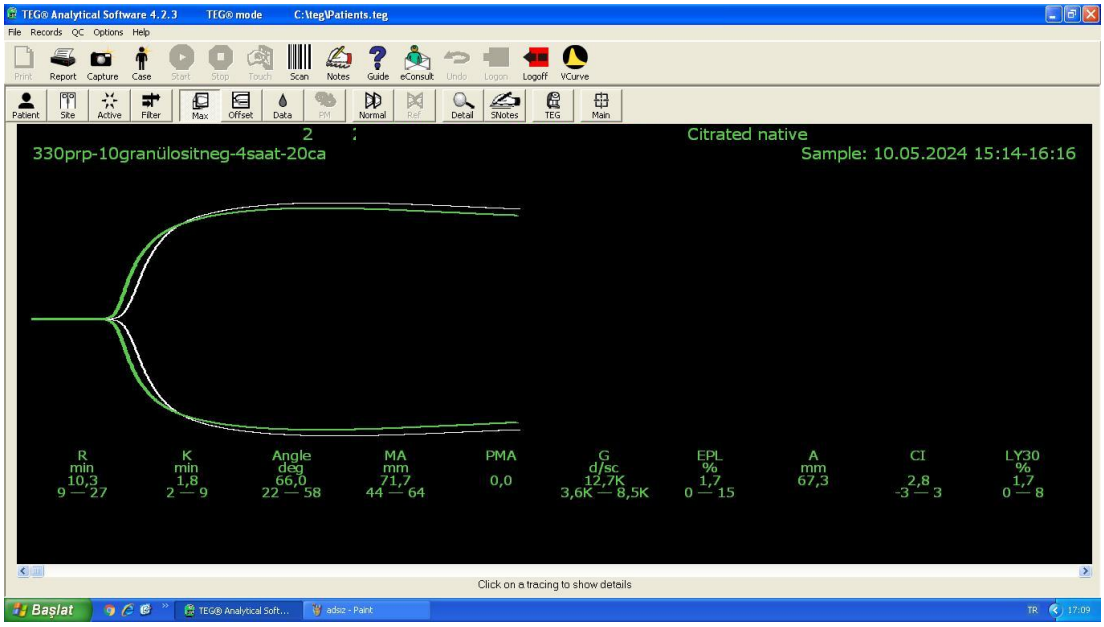


Şekil 17: 0. saat (G-0) tromboelastogram deneylerinden bir örnek.

Granülositler tam kandan ayrıştırıldıktan sonra, LPS ile muamele edilmeden 4 saat boyunca bekletildikten sonra (çalışma protokolünde 4. saat) trombositten zengin plazmaya (TZP) eklenen granülositlerin (G-4) kontrol grubuna göre tromboelastogram parametreleri üzerine etkileri çalışılmıştır. Granülositlerin, ayrıştırıldıktan sonra yaklaşık 4 saat bekletildikten sonra TZP üzerine eklenmesi, tromboelastogram parametrelerinin hiçbirinde anlamlı bir etki göstermemiştir. Şekil 18'de örnek bir tromboelastogram grafiği verilmiştir.

Tablo 4: Granülositlerin 4. saat tromboelastogram parametreleri üzerine etkileri.

	G-4	Kontrol	%fark	p
R	7 ± 1,6 (5,5 - 10,3)	8,2 ± 1,8 (6,2 - 11,3)	-12,8 ± 18 (-38,1 - 25)	0,073
K	1,7 ± 0,3 (0,9 - 2)	1,8 ± 0,5 (0,8 - 2,2)	1,7 ± 20,8 (-18,2 - 42,9)	0,765
Angle	66,3 ± 4,4 (63,1 - 76,9)	66,4 ± 5,5 (61,3 - 78,3)	0,1 ± 4,7 (-6,4 - 5,7)	0,956
MA	65,4 ± 4,5 (60,1 - 71,7)	67,2 ± 4,1 (63,3 - 75)	-2,5 ± 6,6 (-8,4 - 11,6)	0,326
G	9,7 ± 2,1 (7,5 - 12,7)	10,5 ± 2,2 (8,6 - 15)	-5,8 ± 21 (-22,4 - 39,8)	0,353
CI	2,5 ± 0,6 (1,9 - 3,6)	2,5 ± 0,6 (1,4 - 3,1)	6,9 ± 36,6 (-31 - 63,6)	0,892
LY30	7,4 ± 11,6 (0,9 - 30,6)	3,4 ± 4,9 (0,7 - 13,2)	121,1 ± 172,4 (-53,8 - 446,2)	0,220

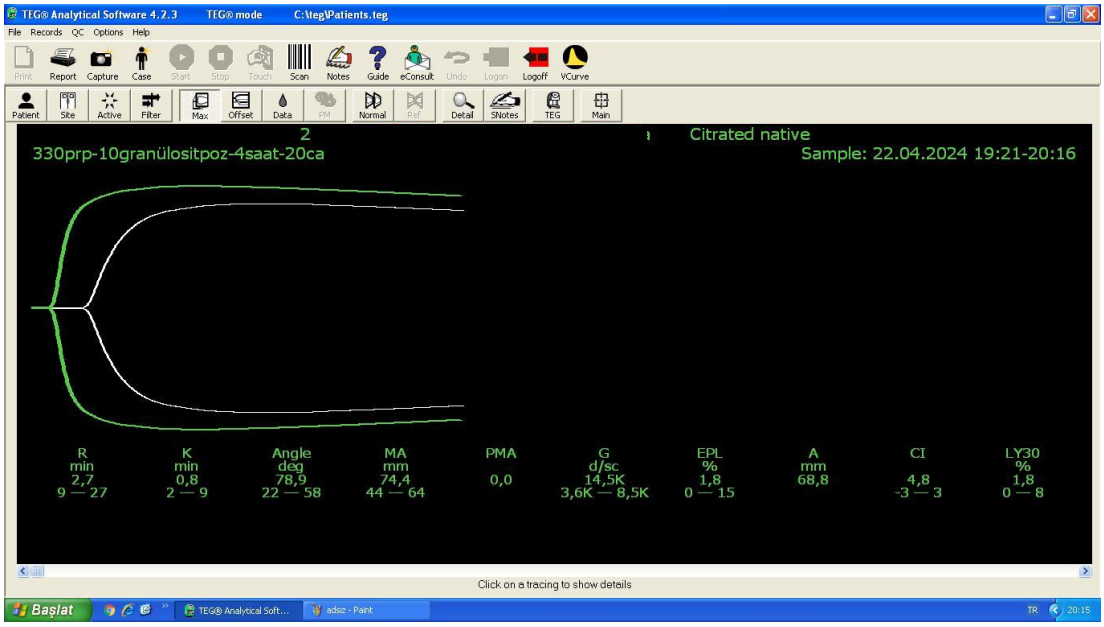


Şekil 18: 4. saat (G-4) tromboelastogram deneylerinden bir örnek.

Granülositler tam kandan ayrıştırıldıktan sonra, LPS ile 4 saat boyunca uyarılarak bekletildikten sonra (çalışma protokolünde 4. saat) trombositten zengin plazmaya (TZP) eklenen granülositlerin [G(+)-4] kontrol grubuna göre tromboelastogram parametreleri üzerine etkileri çalışılmıştır. Granülositlerin, ayrıştırılıp uyarıldıkları 4 saatten sonra TZP üzerine eklenmesi, tromboelastogram parametrelerinin hemen hemen hepsi üzerinde (LY30 hariç) anlamlı etkiler oluşturmuştur. R ve K parametrelerini anlamlı olarak ortalama %34,9 ve %30,9 kısaltmış, angle, MA, G ve CI parametrelerini ortalama %13,6; %9,1; %34 ve %75,1 arttırmıştır. Aktive olan granülositler, tromboelastogram üzerinde hemostazı arttırıcı etkiler göstermiştir. Aşağıda Şekil 19'te de görüldüğü gibi kontrol grubuna göre daha hiperkoagülan bir etki gözlenmektedir.

Tablo 5: Aktive edilmiş granülositlerin 4. saat tromboelastogram parametreleri üzerine etkileri.

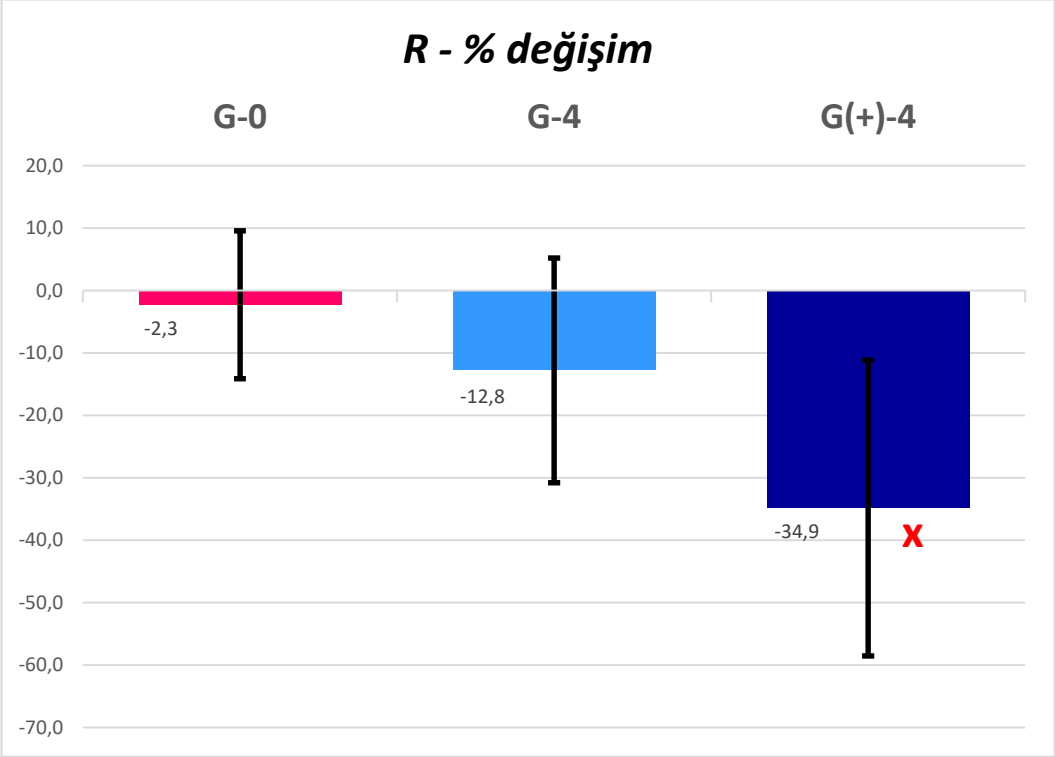
	G(+)-4	Kontrol	%fark	p
R	5,1 ± 1,7 (2,7 - 7,9)	7,9 ± 1 (6,9 - 9,5)	-34,9 ± 23,7 (-62,5 - 14,5)	**0,003**
K	1,2 ± 0,4 (0,8 - 1,8)	2 ± 0,8 (0,9 - 3,2)	-30,9 ± 28 (-54,8 - 12,5)	**0,019**
Angle	73 ± 5,1 (65,5 - 78,9)	64,9 ± 7,7 (49,5 - 76,9)	13,6 ± 12,5 (-3,4 - 34,1)	**0,014**
MA	71,7 ± 5,6 (61,8 - 77,5)	65,7 ± 4,9 (56,5 - 70,9)	9,1 ± 4,7 (1,5 - 17,2)	**0,002**
G	13,2 ± 3,2 (8,1 - 17,2)	9,8 ± 2 (6,5 - 12,2)	34 ± 19 (4,2 - 66,7)	**0,003**
CI	3,9 ± 1 (2,4 - 4,8)	2,4 ± 0,8 (0,9 - 3,3)	75,1 ± 57,3 (0 - 166,7)	**0,003**
LY30	1,8 ± 1,5 (0 - 3,8)	1,6 ± 0,9 (0,1 - 2,6)	-5,5 ± 69,5 (-100 - 100)	0,556



Şekil 19: 4. saat uyarılmış granülositlerin [G(+)-4] tromboelastogram deneylerinden bir örnek.

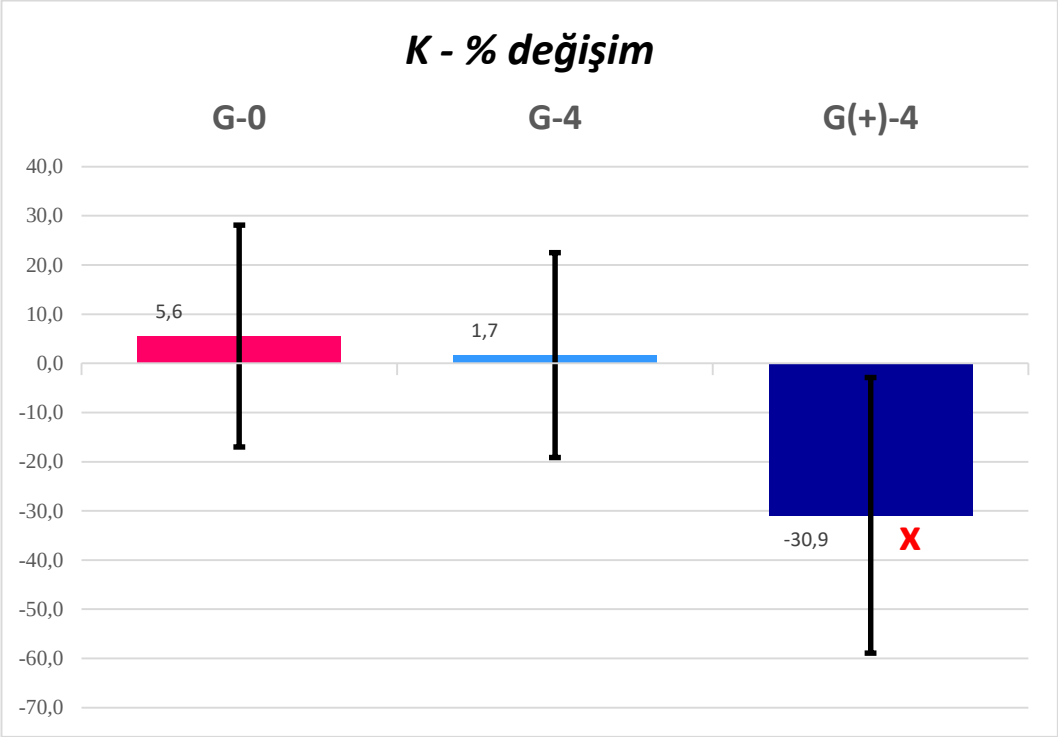
Kontrol grubuna göre sadece uyarılmış granülositler [G(+)-4] hemostazı aktive etmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar her bir grubun yüzde değişimleri üzerinden yapılmıştır.

G(+)-4 grubunda anlamlı olarak R zamanı kısalmıştır. Bu kısalma diğer iki gruba göre de anlamlı olarak farklıdır.



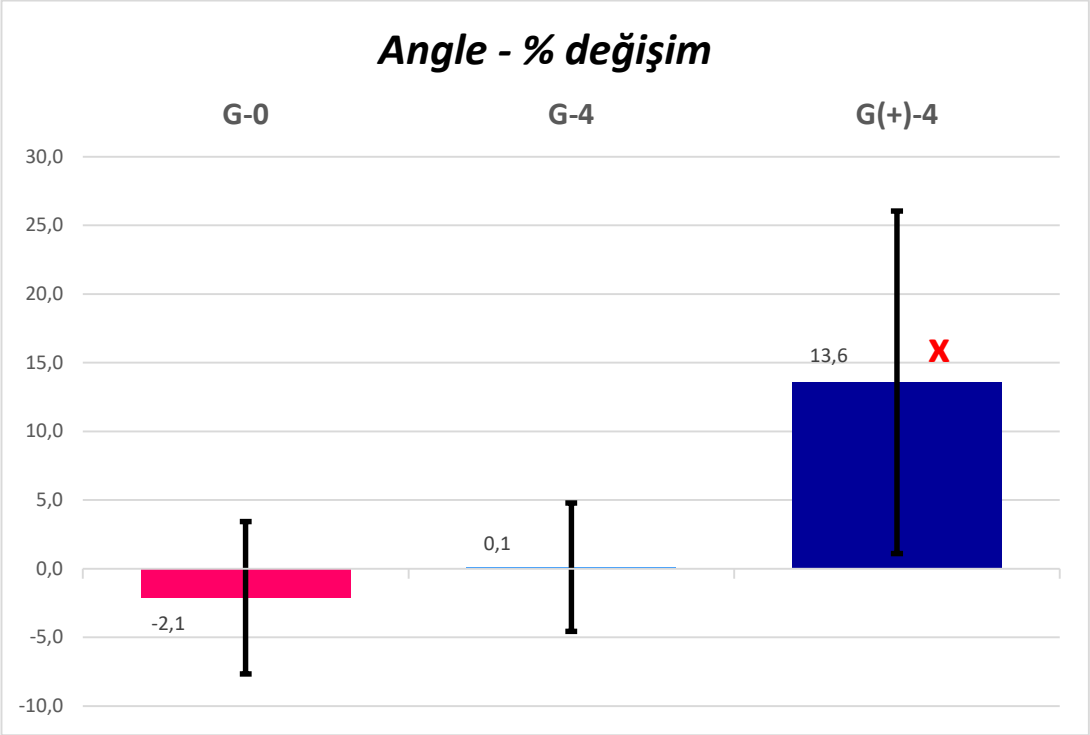
Şekil 20: R parametresinin gruplar arası karşılaştırılması.
[**X**: G(+)-4 grubu diğer iki gruptan anlamlı olarak farklı ($p<0,001$)].

G(+)-4 grubunda anlamlı olarak K zamanı kısalmıştır. Bu kısalma diğer iki gruba göre de anlamlı olarak farklıdır.



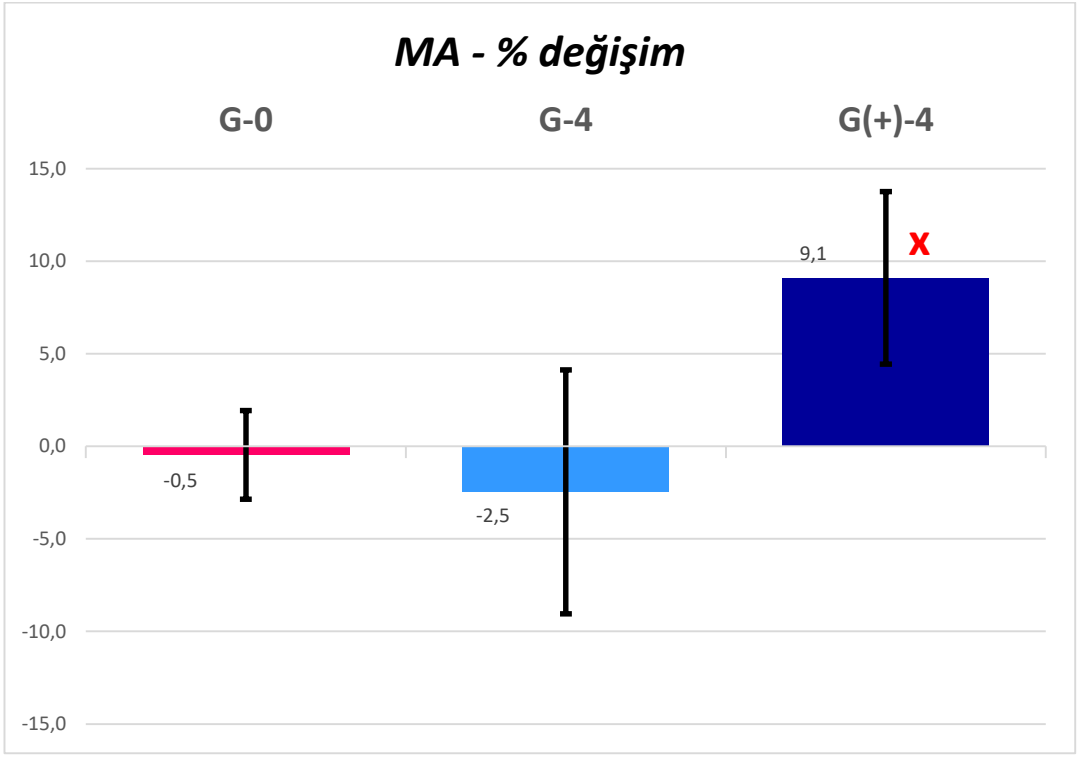
Şekil 21: K parametresinin gruplar arası karşılaştırılması.
[X: G(+)-4 grubu diğer iki gruptan anlamlı olarak farklı ($p<0,001$)].

G(+)-4 grubunda anlamlı olarak angle artmıştır. Bu artış diğer iki gruba göre de anlamlı olarak farklıdır.



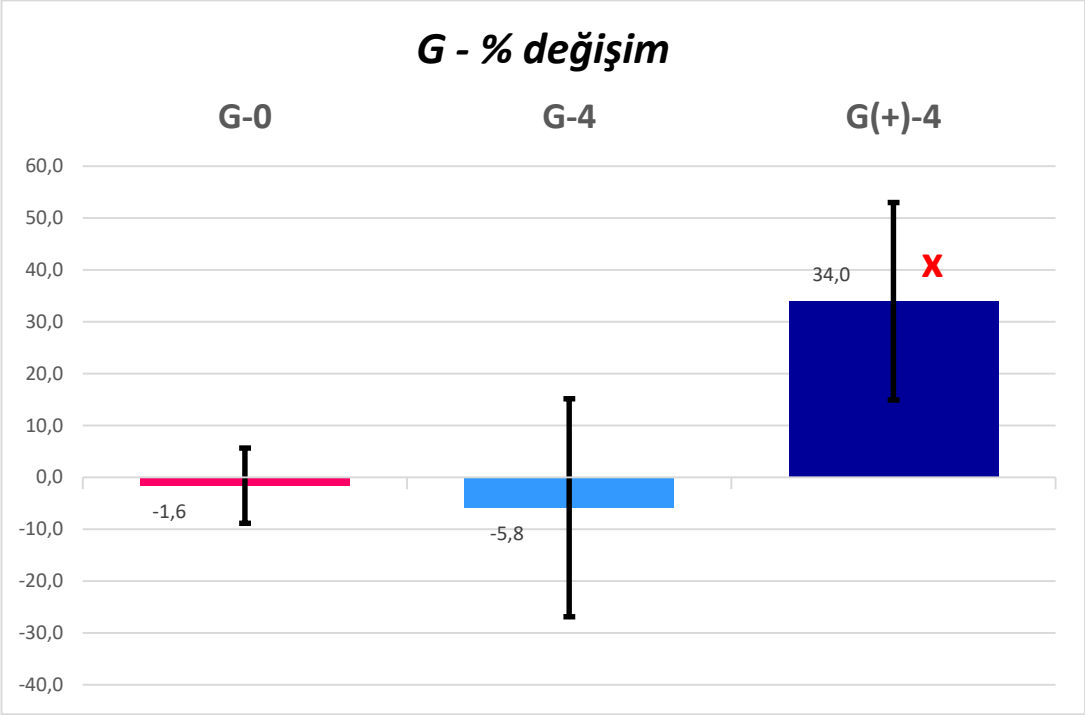
Şekil 22: Angle parametresinin gruplar arası karşılaştırılması.
[X: G(+)-4 grubu diğer iki gruptan anlamlı olarak farklı (p=0,007)].

G(+)-4 grubunda anlamlı olarak MA artmıştır. Bu artış diğer iki gruba göre de anlamlı olarak farklıdır.



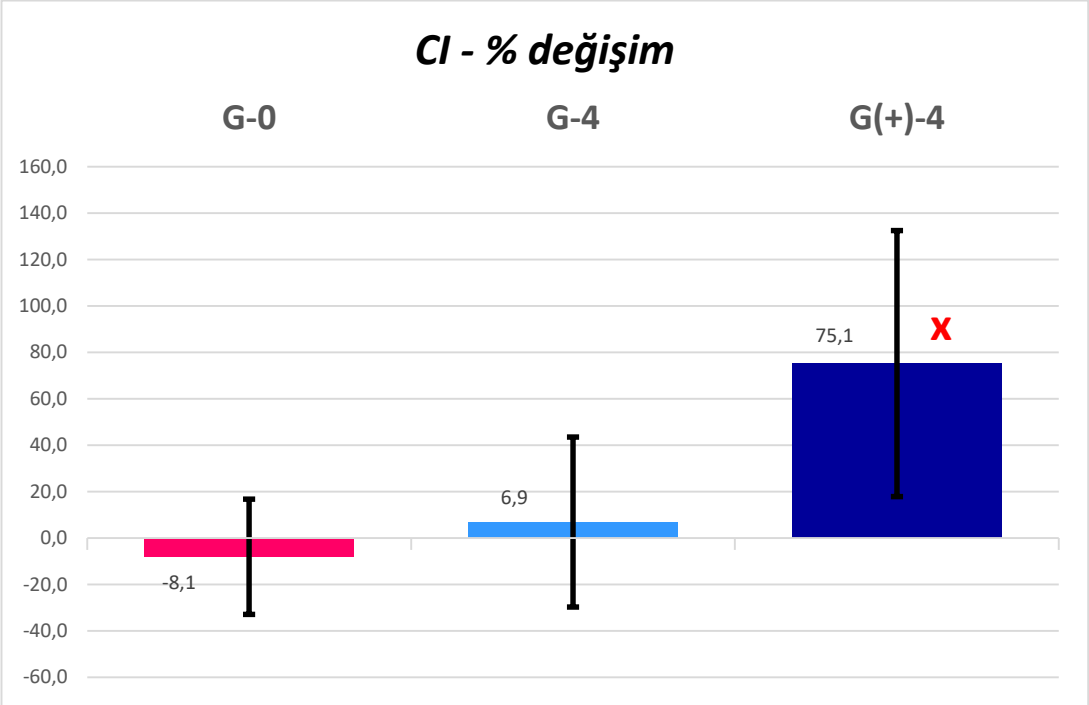
Şekil 23: MA parametresinin gruplar arası karşılaştırılması.
[X: G(+)-4 grubu diğer iki gruptan anlamlı olarak farklı (p=0,003)].

G(+)-4 grubunda anlamlı olarak G artmıştır. Bu artış diğer iki gruba göre de anlamlı olarak farklıdır.



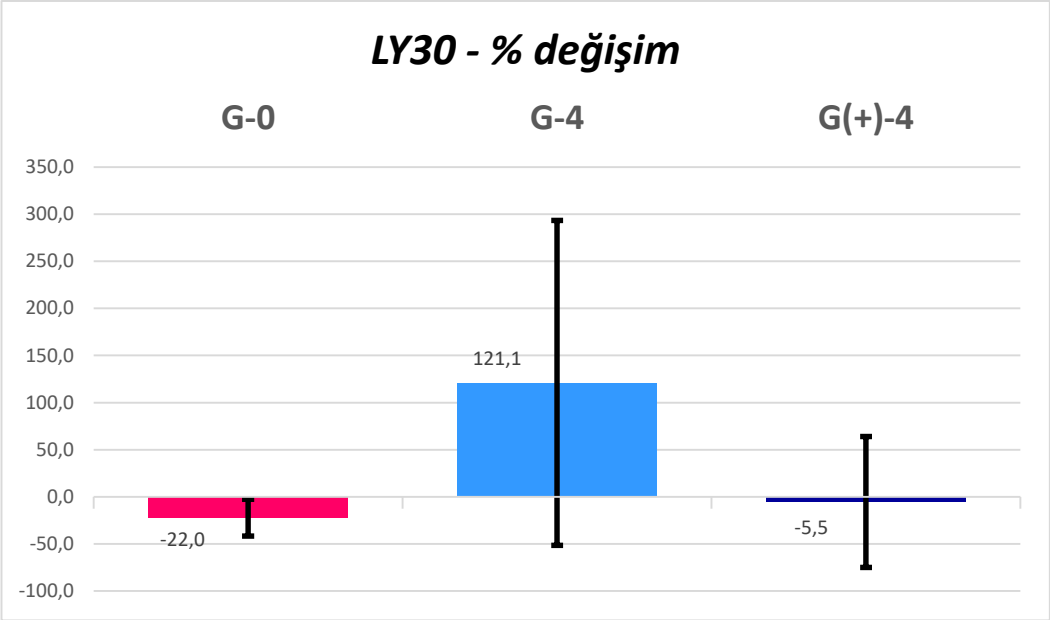
Şekil 24: G parametresinin gruplar arası karşılaştırılması.
[X: G(+)-4 grubu diğer iki gruptan anlamlı olarak farklı (p=0,002)].

G(+)-4 grubunda anlamlı olarak CI artmıştır. Bu artış diğer iki gruba göre de anlamlı olarak farklıdır.



Şekil 25: CI parametresinin gruplar arası karşılaştırılması.
[X: G(+)-4 grubu diğer iki gruptan anlamlı olarak farklı (p=0,007)].

Lizis açısından gruplar arası anlamlı bir farka rastlanmamıştır.



Şekil 26: LY30 parametresinin gruplar arası karşılaştırılması.
[Gruplar arası fark yok (p=0,064)].

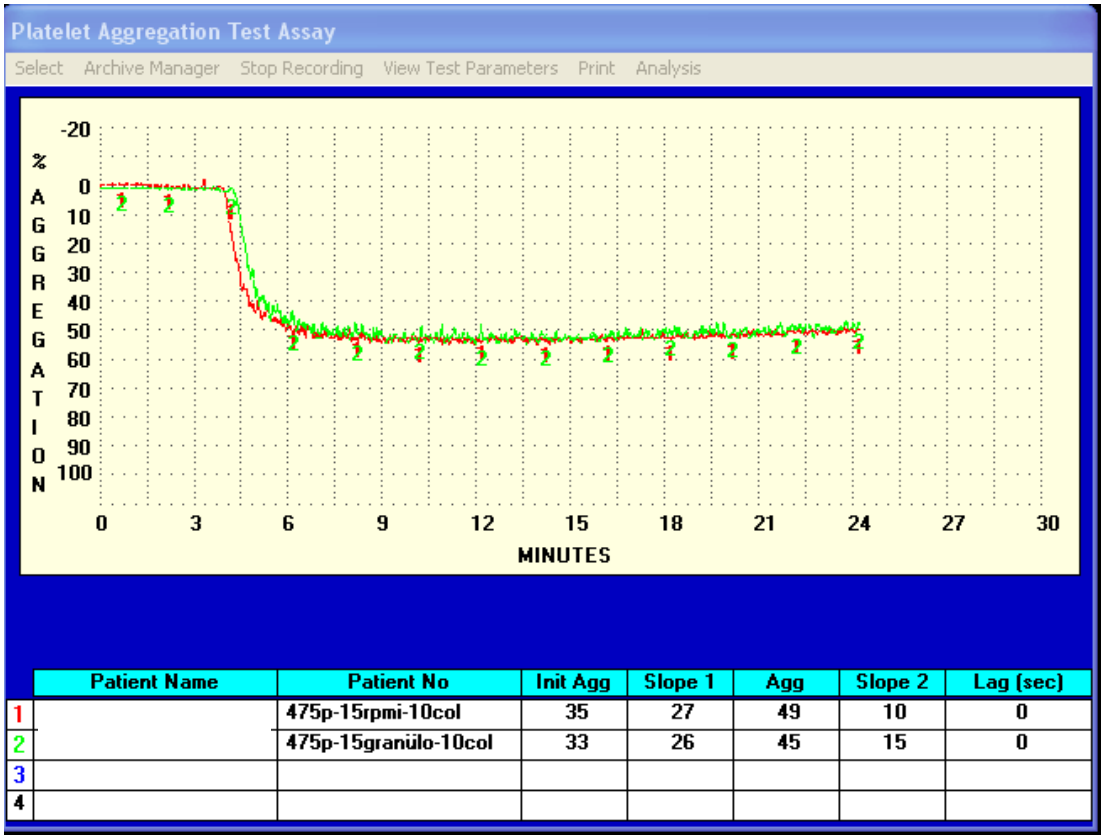
4.2. Agregometre Sonuçları

Granülositler ve trombositler tam kandan ayrıştırıldıktan hemen sonra trombositten zengin plazmaya (TZP) eklenen granülositler (G-0) kontrol grubuna göre ADP ve kolajen ile uyarılan agregasyonları maksimum agregasyon değerlerinde anlamlı olarak (p=0,027; p<0,001), ortalama %8,6 ve %8,4 azaltmıştır. Epinefrin ile uyarılan agregasyonda bir farklılık gözlenmemiştir.

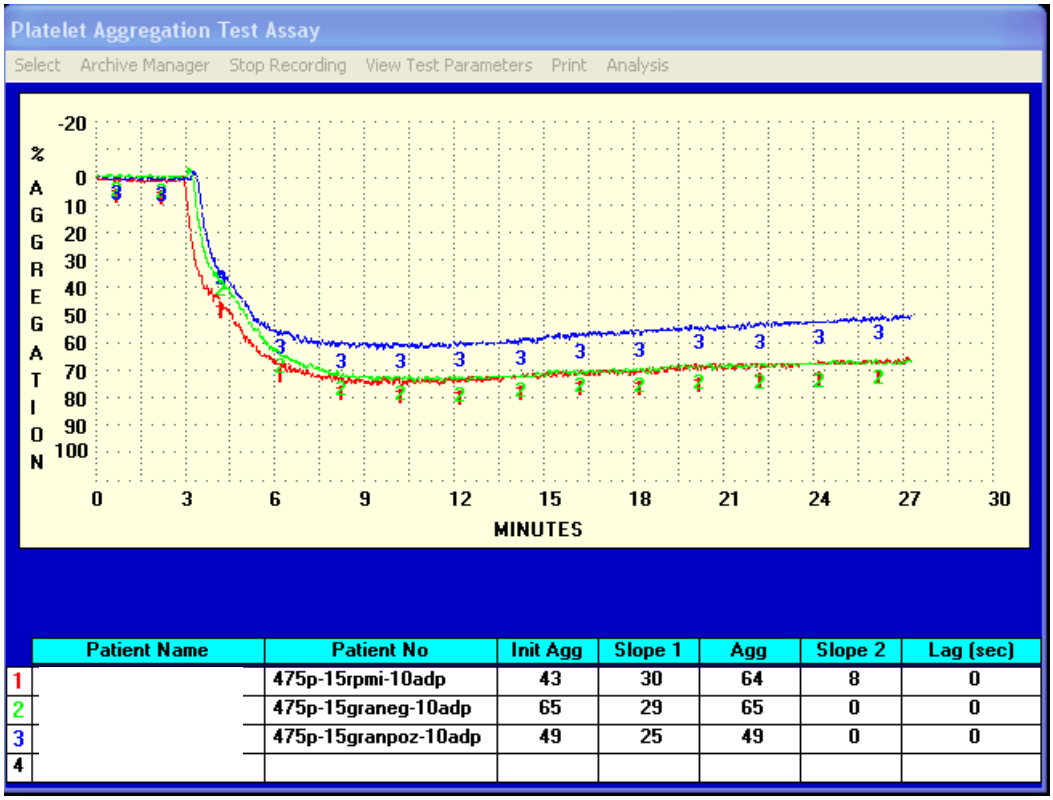
Ne granülositlerin 4 saat bekletilmesi ne de LPS ile 4 saat boyunca uyarılmaları, agregoetrede ADP, kollajen ve epinefrin ile uyarılan agregasyonlar üzerinde fark göstermemiştir.

Tablo 6: Granülositlerin 0. saat (G-0), 4. saat uyarılmamış (G-4) ve uyarılmış [G(+)-4] durumlarının agregasyon parametreleri üzerine etkileri.

	G-0	Kontrol	%fark	p
ADP-MA	56,9 ± 17,7 (29 - 78,6)	61,4 ± 15,5 (38 - 77,4)	-8,6 ± 9,2 (-23,7 - 1,6)	**0,027**
Col-MA	62 ± 15 (30 - 74)	67,6 ± 16,4 (34 - 82)	-8,4 ± 2,3 (-11,8 - -4,6)	**<0,001**
Epi-MA	69,9 ± 9,4 (51,8 - 80)	69 ± 8,9 (58,8 - 85)	1,5 ± 10 (-12,8 - 11,9)	0,753
	G-4	**Kontrol**	**%fark**	**p**
ADP-MA	63,8 ± 10,4 (48,4 - 73,4)	64,9 ± 9,7 (50 - 76)	-1,8 ± 6,4 (-10,8 - 5,9)	0,486
Col-MA	69,2 ± 9,2 (53 - 81)	70,2 ± 10 (51,8 - 82,2)	-1,2 ± 6,3 (-12,9 - 5,9)	0,554
Epi-MA	61,3 ± 13 (40 - 75)	67,2 ± 12,9 (49 - 86,2)	-7,5 ± 16,9 (-45,9 - 6,1)	0,220
	G(+)-4	**Kontrol**	**%fark**	**p**
ADP-MA	62,6 ± 9,7 (49 - 77)	64,9 ± 9,7 (50 - 76)	-3,4 ± 6,3 (-17,6 - 2,9)	0,194
Col-MA	69,2 ± 9,5 (50,6 - 82)	70,2 ± 10 (51,8 - 82,2)	-1,3 ± 5,4 (-11,9 - 5,6)	0,498
Epi-MA	62,8 ± 11,4 (45 - 78)	67,2 ± 12,9 (49 - 86,2)	-4,7 ± 17,1 (-39,2 - 12,2)	0,359

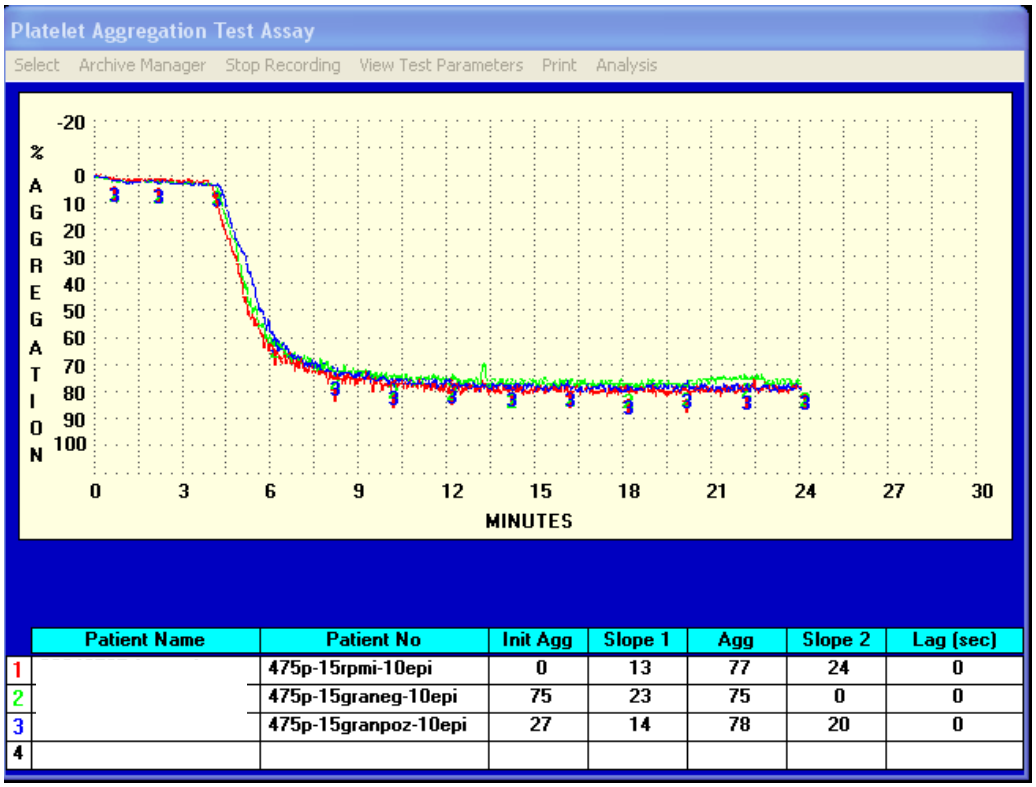


Şekil 27: 0. saat kollajen ile uyarılan agregasyon deneylerinden bir örnek.



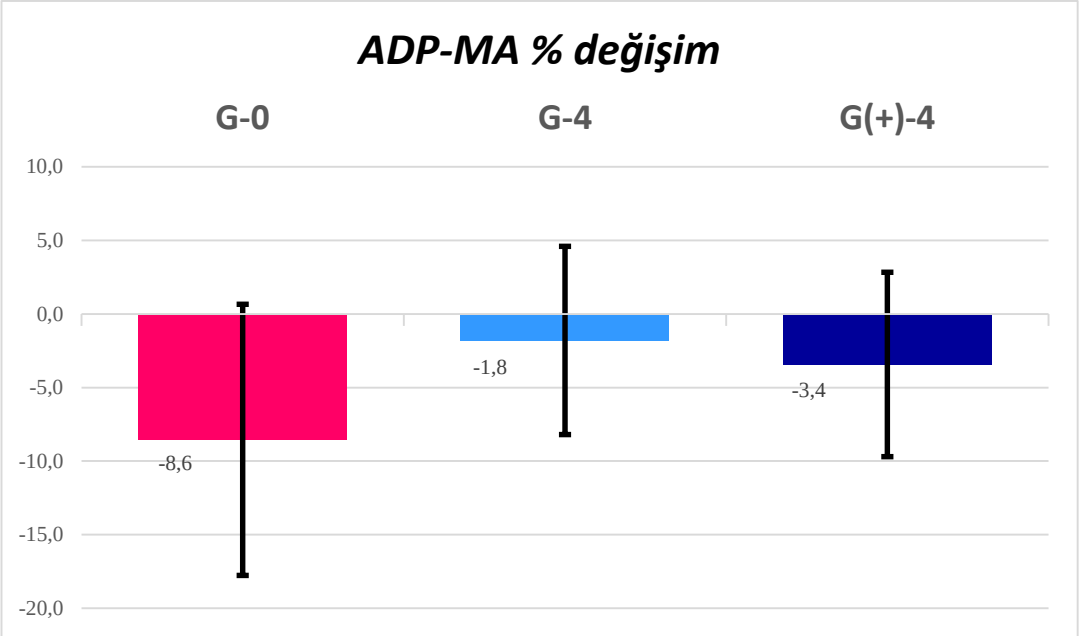
	Patient Name	Patient No	Init Agg	Slope 1	Agg	Slope 2	Lag (sec)
1		475p-15rpmi-10adp	43	30	64	8	0
2		475p-15graneg-10adp	65	29	65	0	0
3		475p-15granpoz-10adp	49	25	49	0	0
4							

Şekil 28: 4. saat ADP ile uyarılan agregasyon deneylerinden bir örnek.

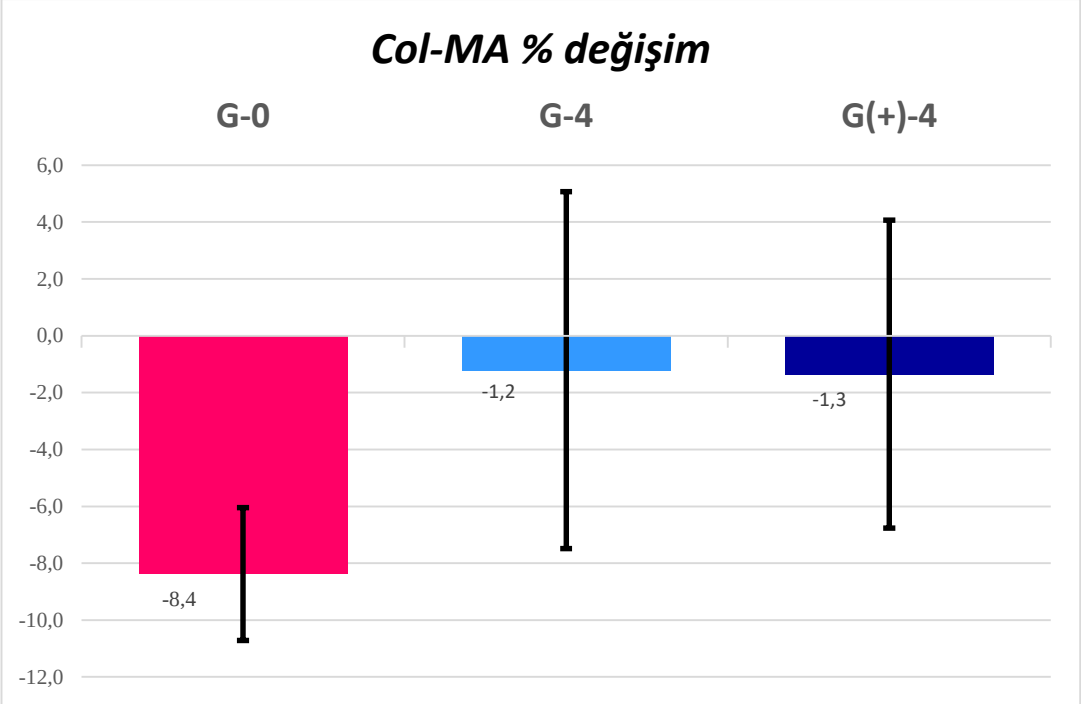


	Patient Name	Patient No	Init Agg	Slope 1	Agg	Slope 2	Lag (sec)
1		475p-15rpmi-10epi	0	13	77	24	0
2		475p-15graneg-10epi	75	23	75	0	0
3		475p-15granpoz-10epi	27	14	78	20	0
4							

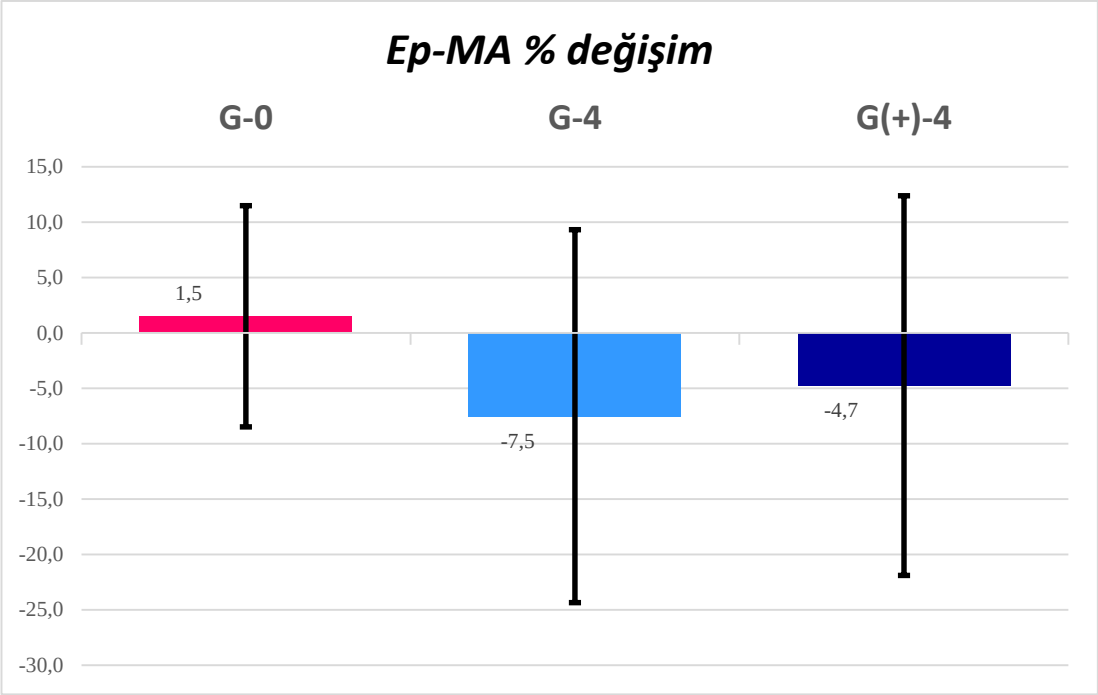
Şekil 29: 4. saat epinefrin ile uyarılan agregasyon deneylerinden bir örnek.



Şekil 30: Agregometrede ADP ile uyarılan agregasyonun MA parametresinin gruplar arası karşılaştırılması. [Gruplar arası fark yok (p=0,244)].



Şekil 31: Agregometrede kollajen ile uyarılan agregasyonun MA parametresinin gruplar arası karşılaştırılması.
[Gruplar arası fark yok (p=0,087)].



Şekil 32: Agregometrede epinefrin ile uyarılan agregasyonun MA parametresinin gruplar arası karşılaştırılması.
[Gruplar arası fark yok (p=0,237)].

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında, lökositlerin temel alt hücre gruplarından biri olan granülositlerin (nötrofil, eozinofil ve bazofiller) trombositler ve hemostaz ile etkileşimi araştırılmıştır. Trombosit agregasyonu üzerine etkiler optik agregometrede, topluca hemostaz üzerine etkiler ise tromboelastogram ile çalışılmıştır. Granülositlerin uyarılmış ve uyarılmamış halleri ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Trombositten zengin plazma üzerine eklenen farklı durumdaki granülositlerin trombosit agregasyonu üzerine etkileri, üç farklı uyarıcı ajanın varlığında (ADP, kolajen ve epinefrin) ve pıhtı oluşum dinamikleri üzerine etkileri tromboelastogram ile ayrıntılı olarak incelenmiştir.

Tam kandan granülositler ayrıştırılıp, hemen sonrasında TZP üzerine eklenerek 0. saat deneyleri yapılmıştır. Tromboelastogram parametrelerinden LY30 haricinde hiçbiri üzerinde granülositler anlamlı bir etki göstermemişlerdir. LY30 üzerindeki değişim, pıhtının çözünmesini azaltan, pıhtı stabilitesini arttıran bir etki olarak yorumlanabilir.

Granülositlerin tam kandan ayrıştırıldıktan sonra, LPS ile uyarılmadan ve uyarılarak 4 saat boyunca bekletildikleri protokolde 4. saat deneyleri yapılmıştır. Uyarılmadan 4 saat boyunca bekleyen granülositler, tromboelastoramda hemostazın hiçbir sürecine etki göstermemiştir. Sadece beklemek, granüler hücrelerde hemostaza etki edebilecek bir değişikliğe sebep olmamıştır.

LPS ile 4 saatlik uyarılma sürecinin sonunda granülositler tromboelastogram parametrelerinin LY30 hariç hepsini etkilemiş ve hemostazı arttıran hiperkoagülan bir durum yaratmıştır. Granülositlerin uyarılması, kandan ayrıştırıldıktan hemen sonraki durumlarına ve uyarılmadan bekletilmelerine göre LY30 hariç tüm tromboelastogram parametrelerinde anlamlı farklılık oluşturmuştur. Granülositlerin uyarılması trombositleri aktive etmiş, koagülasyonun enzimatik sürecini de hızlandırmıştır.

Agregometre deneyleri tromboelastogram deneylerine göre oldukça farklı sonuçlar vermiştir. 0. saat granülositler ADP ve kolajen ile uyarılan agregasyonları anlamlı olarak azaltmış, trombositleri inhibe etmiştir. Granülositlerin beklemesi ve uyarılması bu etkinin kaybolmasına sebep olmuştur.

Tromboelastogramdaki etkiler, granülositlerin uyarılmasının hemostazı aktive ettiği, trombositleri uyardığı, koagülasyonu hızlandırdığı, daha hiperkoagülan bir

durum yarattığı şekilde yorumlanabilir. Agregometredeki etkiler ise granülositlerin tam kandan ayrıştırıldıktan hemen sonra, 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 ADP, kolajen ya da epinefrin 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. Granülositlerin uyarılamaya fırsat bulamadan ortamda akut olarak bulunması trombositleri inhibe eden bir etkiye sebep olmakta iken uyarılmış granülositler hemostazın tüm süreçlerini aktive edebilmektedir.

Trombositlerin diğer trombositler ile, damar duvarı ile ve kandaki trombosit dışı diğer hücreler ile etkileşimi özellikle trombüs oluşumu sırasında aşikardır. Trombüs temel olarak agrege olan trombositlerden oluşmasının yanı sıra lökositlerden de zengindir. Aktive olan granülositlerin ürettikleri H_2O_2 miktarı da artar. Levine ve ark'nın yaptıkları çalışmada (1976) H_2O_2'nin bariz şekilde, ADP ile indüklenen agregasyonu inhibe ettiği, bu inhibisyonun katalaz ile tersine çevrildiği belirlenmiştir.

Nicolini ve Mehta (1990), trombosit ve nötrofillerin hücresel düzeyde agregasyonunu optik agregometrede ADP ve kolajen agonistleri ile çalışmışlardır. Trombosit + nötrofil grubu, kontrol grubuna göre agregasyonda bir azalma göstermiştir. Bizim verilerimiz de bu çalışmayı desteklemektedir.

Von Brühl ve arkadaşları (2012) farelerde derin ven trombozu (DVT) oluşturulup, patogenezinde önemli tromboz ve inflamasyon bağlantısını araştırmışlardır. DVT oluşturmak için akış kısıtlaması modelini kullanmışlardır. Akış kısıtlamasının nötrofil ve monositlerin hızlı bir şekilde bu bölgeye birikmesiyle DVT tetiklediğini göstermişlerdir. NET oluşumu ve FXII aktivasyonunu içeren bir süreç ile nötrofillerin DVT'na katkıda bulunduğunu, bu yolların inhibisyonunun da DVT oluşumunu önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir.

Trombositler, TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR8 ve TLR9 dahil olmak üzere çok sayıda TLR ailesi üyesini ifade eder (Aslam ve ark., 2006). Trombosit TLR4 sinyali,

trombosit aktivasyonuna, IL-1β açısından zengin mikropartiküllerin (MP) salınımına ve diğer hücrelerle etkileşimlerine yol açar (Brown, & Mclntyre, 2011). Nötrofil ve TLR4 ile uyarılan trombosit etkileşimleri, bakterileri yakalayabilen hücre dışı nötrofil tuzaklarının oluşumuna yol açar (Stahl ve ark., 2006). Trombosit TLR2'nin *Porphyromonas gingivalis* tarafından uyarılması, trombosit-nötrofil adezyonunda artışa neden olur. TLR2 yoluyla megakaryositlerin uyarılması, proinflamatuar gen ve protein ekspresyonunda artışa sahip trombositlerin üretimiyle sonuçlanır (Beaulieu ve ark., 2011).

Tromboelastogram deneylerinde 0. saat ve uyarılmayan 4. saat granülositlerin TZP'ye eklenmesi hemostaz sürecinde anlamlı bir fark oluşturmamıştır. LPS ile uyarılan granülositlerin TZP'ya eklenmesi ise hipekoagülan etki oluşturmuştur. Bir yandan Ca^{+2} ile aktive edilen koagülasyon kaskadı ve trombosit aktivasyonu diğer yandan LPS ile uyarılan granülositler, içeriklerini ortama vererek birbirlerini etkilerler. Bu çalışma ile lökosit alt grubu olan granülositlerin hemostaza olan etkisi ilk kez tromboelastogram ile çalışılmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada granülositlerin trombosit agregasyonu ve hemostaz süreci üzerine etkileri araştırılmıştır. Granülositlerin ADP ve kolajen aktivatörleri varlığında trombosit agregasyonunu inhibe ettiği, LPS ile uyarıldığında ise hemostazı arttırdığı görülmüştür.

6. KAYNAKLAR

Abrams, C. S., & Plow, E. F. (2013). *Molecular basis for platelet function*. In Hoffman, R. H., Benz, E. J., & Silberstein, L. E. (Eds.), Hematology: Basic Principles and Practice (6. baskı, pp. 1809–1820). *Elsevier*.

Adıgüzel, C., Kartı, S., Demir, M. (2012). *Pıhtılaşma bozuklukları. İç Hastalıkları* (Editörler: G. İliçin, K. Biberoğlu, G. Süleymanlar, S. Ünal) (3. baskı, ss. 1751-1756). Ankara: Güneş Kitapevi.

Ağar, E. (Ed.). (2020). *Türk Fizyologlar Derneği İnsan Fizyolojisi*. İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevi. s: 281-289.

Akay, M.T. (2014). *Genel histoloji* (9. baskı). Ankara: Palme Yayıncılık.

Aljadi, Z. (2017). *Innovative approaches to study basophil function in inflammation*. (Doctoral thesis, Karolinska Institutet, Stockholm).

Aslam, R., Speck, E. R., Kim, M., Crow, A., Bang, A., Nestel, F., … Semple, J. W. (2006). Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. *Blood*. https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2202.

Beaulieu, L. M., Lin, E., Morin, K. M., Tanriverdi, K., Freedman, J. E. (2011). Regulatory effects of TLR2 on megakaryocytic cell function. *Blood*. https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-304949.

Bengtsson, T., Frydén, A., Zalavary, S., Whiss, P., Orselius, K., & Grenegård, M. (1999). Platelets enhance neutrophil locomotion: evidence for a role of P-selectin. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 59(1), 1-11.

Birbrair, A. (Ed.). (2020). Tumor Microenvironment Hematopoietic Cells – Part A. *Springer Nature Switzerland.*

Bochner, B. S., McKelvey, A. A., Sterbinsky, S. A., Hildreth, J. E., Derse, C. P., Klunk, D. A., Lichtenstein, L. M., & Schleimer, R. P. (1990). IL-3 augments adhesiveness for endothelium and CD11b expression in human basophils but not neutrophils. *Journal of Immunology*, https://doi.org/10.4049/jimmunol.145.6.1832.

Branzk, N., & Papayannopoulos, V. (2013). Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Seminars in Immunopathology*. https://doi.org/10.1007/s00281-013-0384-6.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., ... & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* https://doi.org/10.1126/science.1092385.

Brown, G. T., & McIntyre, T. M. (2011). Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: Kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1β-rich microparticles. *Journal of Immunology,* 186(9), 5489-96. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001623.

Burtis, C. A., Ashwood, E. R., & Bruns, D. E. (Eds.). (2013). Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis (5th ed., 4th chapter). *Indian Journal of Clinical Biochemistry, 28*(1), 104–105.

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

Chandler, W. C. (2006). Physiology of hemostasis. In Spiess, B. D., Spence, R. K., & Shander, A. (Eds.), *Perioperative Transfusion Medicine* (2. baskı, pp. 78-91).

Lippincott Williams & Wilkins.
Christersson, C., Johnell, M., & Siegbahn, A. (2010). The influence of direct thrombin inhibitors on the formation of platelet-leukocyte aggregates and tissue factor expression. *Thrombosis Research*, 126(4), e327-e333. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.03.019.
Clark, R. A., & Klebanoff, S. J. (1980). Neutrophil-Platelet Interaction Mediated by Myeloperoxidase and Hydrogen Peroxide. *Journal of Immunology*, 124(1), 399-405. PMID: 6243151.
Darbousset, R., Thomas, G. M., Mezouar, S., Frere, C., Bonier, N. M., Renne, T., … Dubois, L. (2012). Tissue factor–positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood*. https://doi.org/10.1182/j.blood-2012-06-437772.
DelMaschio, A., Dejana, E., & Bazzoni, G. (1993). Bidirectional modulation of platelet and polymorphonuclear leukocyte activities. *Annals of Hematology*, 67, 23-31. https://doi.org/10.1007/BF01709662.
Diz-Küçükkaya, R., Gushiken, F. C., & Lopez, J. A. (2006). Thrombocytopenia. In Lichtman, M. A., Beutler, E., Kipps, T. J., Seligsohn, U., Kaushansky, K., & Prchal, J. T. (Eds.), Williams Hematology. (ss. 1749-1783). *The McGraw-Hill Companies.*
Dvorak, A. M., Galli, S. J., Schulman, E. S., Lichtenstein, L. M., & Dvorak, H. F. (1983). Basophil and mast cell degranulation: Ultrastructural analysis of mechanisms of mediator release. *Federation Proceedings*, 42, 2510-2515.
Ehrlich, P. (1879). Ueber die specifischen Granulationen des Blutes. Archiv für Anatomie und Physiologie. *Physiologische Abteilung*, 571–579.
Engelmann, B., & Massberg, S. (2013). Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(1), 34-45. https://doi.org/10.1038/nri3345.
Fritsma, G. A. (2015). Platelet Structure and Function. *Clinical Laboratory Science*, 28(2), 125-131.
Fuchs, T. A., Brill, A., & Wagner, D. D. (2012). Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(8), 1777-1783. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.242859.
Gachet, C., & Cazenave, J. P. (1991). ADP induced blood platelet activation: a review. *Nouvelle Revue Française d'Hématologie*, 33, 347-358.
Gastineau, D. A. (2002). Initiation and control of coagulation. In Manual of Clinic Hematology (3. baskı, ss. 355-368). Lippincott Williams & Wilkins.
Gezer S (2012) Koagülasyon testlerinin klinikte kullanımı. Türk Hematoloji Derneği s: 8-23.
Gogstad, G. O., Hagen, I., Korsmo, R., vd. (1982). Evidence for release of soluble, but not of membrane-integrated, proteins from human platelet alpha-granules. *Biochimica et Biophysica Acta,* 702, 81-89. https://doi.org/10.1016/0167-4838(82)90029-2.
Guimaraes-Costa, A. B., Nascimento, M. T., Froment, G. S., Soares, R. P., Morgado, F. N., Conceição-Silva, F., & Saraiva, E. M. (2012). Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 6748–6753. https://doi.org/10.1073/pnas.0900226106.
Handin, R. I., Karabin, R., & Boxer, G. J. (1977). Enhancement of platelet function by

superoxide anion. *Journal of Clinical Investigation*, 59(5), 959-963. https://doi.org/10.1172/JCI108718.

Hirai, K., Morita, Y., & Miyamoto, T. (1992). Hemopoietic growth factors regulate basophil function and viability. *Immunology Series*, 57, 587-600.

Hoffman, R., Benz Jr, E. J., Shattil, S. J. (Ed). (2000). Hematology: Basic Principles and Practice (ss. 197-216).

Hu, H., Varon, D., Hjemdahl, P., Savion, N., Schulman, S., & Li, N. (2003). Platelet-leukocyte aggregation under shear stress: differential involvement of selectins and integrins. *Thrombosis and Haemostasis*, 90(4), 679-687. https://doi.org/10.1160/TH03-05-0274.

Huzoor-Akbar, Kundu, N., & Kornhauser, R. (1993). Normal thrombin binding leads to greater fibrinogen binding and increased platelet aggregation in spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, 53(26), 1967-1974.

Iikura, M., Ebisawa, M., Yamaguchi, M., Tachimoto, H., Ohta, K., Yamamoto, K., & Hirai, K. (2004). Transendothelial migration of human basophils. *Journal of Immunology*, 173, 5189-5195. https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.8.5189.

Jung, Y., Wen, T., Mingler, M. K., Caldwell, J. M., Wang, Y. H., Chaplin, D. D., … Rothenberg, M. E. (2015). IL-1β in eosinophil-mediated small intestinal homeostasis and IgA production. *Mucosal Immunology*, 8, 930–942. https://doi.org/10.1038/mi.2014.123.

Kaushansky, K. (2016). Megakaryopoiesis and thrombopoiesis. In K. Kaushansky, M. A. Lichtman, J. T. Prchal, M. M. Levi, O. W. Press, L. J. Burns, & M. A. Caligiuri (Eds.), Williams Hematology (9th ed., pp. 1815-1828). New York, NY: McGraw Hill Education.

Kern, W. F. (2005). Hemostaz ve Tromboz. In PD&Hematoloji (Ed.), İlk Baskı (pp. 381-400).

Klinger, M. H. F. (1997). Platelets and inflammation. *Anatomy and Embryology*, 196, 1-11. https://doi.org/10.1007/s004290050075.

Knoll, M. H., & Schafer, A. I. (1989). Biochemical mechanism of platelet activation. *Blood*, 74, 1181-1195.

Koufos, A., & Sagone, A. L. (1980). Effects of Oxidant Stress on the Hexose Monophosphate Shunt Pathway of Platelets. *Blood*, 55(5), 835-840.

Kumar, V., & Sharma, A. (2010). Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology*, 10, 1325-1334. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.08.012.

Kunicki, T. J., & Nugent, D. J. (2012). Platelet glycoprotein polymorphisms and relationship to function, immunogenicity, and disease. In Marder, V. J., Aird, W. C., Bennett, J. S., Schulman, S., & White, G. C. (Eds.), Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice (6. baskı, pp. 393–399). Lippincott Williams & Wilkins.

Kvarnhammar, A. M., & Cardell, L. O. (2012). Pattern-recognition receptors in human eosinophils. *Immunology,* 136, 1365-2567.

Lanzkowsky, P. (2005). Disorders of Coagulation. In Manual of Pediatric Hematology and Oncology (4. baskı, pp. 295-322). New York.

LaRosa, C. A., Rohrer, M. J., Benoit, S. E., Rodino, L. J., Barnard, M. R., & Michelson, A. D. (1994). Human neutrophil cathepsin G is a potent platelet activator. *Journal of Vascular Surgery*, 19(2), 306-318.

Lee, G. R., Bithell, T. C., Foerster, J., Athens, J. W., Lukens, J. N. (1993). Platelets and

megakaryocytes. In G. R. Lee, & T. C. Bithell, (Eds.), *Wintrobe's Clinical Hematology* (pp. 511-539). Philadelphia, London: Lea & Febiger.

Lehrer, R. I., Szklarek, D., Barton, A., Ganz, T., Hamann, K. J., & Gleich, G. J. (1989). Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein. *Journal of Immunology*, 142, 4428–4434.

Levine, P. H., Weinger, R. S., Simon, J., Scoon, K. L., & Krinsky, H. I. (1976). Leukocyte-platelet interaction: Release of hydrogen peroxide by granulocytes as a modulator of platelet reactions. *Journal of Clinical Investigation,* 57, 955-963. https://doi.org/10.1172/JCI108372.

Machlus, K. R., & Italiano Jr, J. E. (2013). The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *Journal of Cell Biology*, 201(6), 785-96. https://doi.org/10.1083/jcb.201304054.

Manda, A., Pruchniak, M. P., Arazna, M., & Demkow, U. A. (2014). Neutrophil extracellular traps in physiology and pathology. *Central European Journal of Immunology*, 39, 116-21. https://doi.org/10.5114/ceji.2014.42136.

Marcus, A. J. (1999). Platelets: their role in hemostasis, thrombosis, and inflammation. In J. I. Gallin & R. Snyderman (Eds.), *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates* (pp. 77-95). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Maurice, M., Pardonge-Lavenne, E., Scheiff, J. M., et al. (1998). Blood Platelets. In Hemostasis, Thrombosis and Atherosclerosis: Morphology, Physiology, Pathophysiology and Pharmacology (pp. 13-48).

Mazza, J. J. (2002). Platelet disorders: hereditary and acquired. In Mazza, J. J. (Ed.), *Manual of Clinical Hematology* (3. baskı, pp. 181-194). Lippincott Williams & Wilkins.

Melo, R. C. N., & Weller, P. F. (2018). Contemporary understanding of the secretory granules in human eosinophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 104, 85–93. https://doi.org/10.1002/JLB.3MR1217-476R.

Mesa, M. A., & Vasquez, G. (2013). NETosis. *Autoimmunity Disorders*, 1, 1-7. https://doi.org/10.1155/2013/651497.

Mitroulis, I., Kambas, K., Chrysanthopoulou, A., ve diğerleri. (2011). Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1b and autophagy-related signaling in gout. *PLoS One*, 6(12), e29318. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029318.

Nicolini, F. A., & Mehta, J. L. (1990). Iloprost and tissue-type plasminogen activator differentially affect platelet aggregation in platelet-rich plasma and in whole blood. *Thrombosis Research*. https://doi.org/10.1016/0049-3848(90)90216-Y.

Nourshargh, S., Hordijk, P. L., & Sixt, M. (2010). Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 366-378.

Packham, M. A., & Mustard, J. F. (1986). The role of platelets in the development and complications of atherosclerosis. *Seminars in Hematology*, 23, 8-26.

Papayannopoulos, V., & Zychlinsky, A. (2009). NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends in Immunology*, 30, 513-521. https://doi.org/10.1016/j.it.2009.07.011.

Peterson, S. N., & Lapentina, E. G. (1993). Platelet activation and inhibition. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 53-63.

Phillips, C., Coward, W. R., Pritchard, D. I., & Hewitt, C. R. (2003). Basophils express

a type 2 cytokine profile on exposure to proteases from helminths and house dust mites. *Journal of Leukocyte Biology*, 73, 165-171.

Rao, G. H. R. (1993). Physiology of blood platelet activation. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 37(4), 263-275.

Rebar, A. H., MacWilliams, P. S., Feldman, B. F., Metzger, F. L., Pollock, R. V., & Roche, J. (2001). A Guide to Hematology In Dogs and Cats (ss. 69-82).

Renesto, P., & Chignard, M. (1993). Enhancement of cathepsin G-induced platelet activation by leukocyte elastase: consequence for the neutrophil-mediated platelet activation. *Blood*, 82(1), 139-144.

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.

Rivkind, A., Siegel, J. H., Guadalupi, P., & Littleton, M. (1989). Sequential patterns of eicosanoid, platelet, and neutrophil interaction in the evolution of the fulminant post-traumatic adult respiratory distress syndrome. *Annals of Surgery*, 210, 355-372. https://doi.org/10.1097/00000658-198909000-00012

Rosen, G. M., Pou, S., Ramos, C. L., Cohen, M. S., & Britigan, B. E. (1995). Free radicals and phagocytic cells. *FASEB Journal*, 9, 200-209.

Rothenberg, M. E. (1998). Eosinophilia. *New England Journal of Medicine*, 338, 1592-1600. https://doi.org/10.1056/NEJM199805283382206

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.

Sarratt, K. L., Chen, H., Zutter, M. M., Santoro, S. A., ve diğerleri. (2005). GPVI and α2β1 play independent critical roles during platelet adhesion and aggregate formation to collagen under flow. *Blood*, 106(4), 1268-1277.

Siess, W. (1989). Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiological Reviews*, 69(1), 58-178. https://doi.org/10.1152/physrev.1989.69.1.58

Schleimer, R. P., Derse, C. P., Friedman, B., Gillis, S., Plaut, M., Lichtenstein, L. M., & MacGlashan, D. W. Jr. (1989). Regulation of human basophil mediator release by cytokines. I. Interaction with antiinflammatory steroids. *Journal of Immunology*, 143, 1310-1317.

Schroeder, J. T., Chichester, K. L., & Bieneman, A. P. (2009). Human basophils secrete IL-3: Evidence of autocrine priming for phenotypic and functional responses in allergic disease. *Journal of Immunology*, 182, 2432-2438.

Selak, M. A., Chignard, M., & Smith, J. B. (1988). Cathespin G is a strong platelet agonist released by neutrophils. *Biochemical Journal*, 251, 293-299.

Senbagavalli Prakash Babu, Prakash B. Narasimhan, & Subash Babu. (2019). Eosinophil polymorphonuclear leukocytes in TB: What we know so far. *Frontiers in Immunology*, 10, 2639. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02639.

Seth, P., Kumari, R., Dikshit, M., & Srimal, R. C. (1994). Effect of platelet activating factor antagonists in different models of thrombosis. *Thrombosis Research*, 76(6), 503-512. https://doi.org/ 10.1016/0049-3848(94)90279-8.

Siminiak, T., Flores, N. A., & Sheridan, D. J. (1995). Neutrophil interactions with endothelium and platelets: Possible role in the development of cardiovascular injury. *European Heart Journal*, 16, 160-170.

Sohma, Y., Akahori, H., Seki, N., Hori, T., Ogami, K., Kato, T., … Miyazaki, H. (1994). Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene. *FEBS Letters*, 353, 57-61.

Ståhl, A.-L., Svensson, M., Mörgelin, M., vd. (2006). Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic Escherichia coli binds to platelets through TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome. *Blood*. https://doi.org/ 10.1182/blood-2005-08-3219.

Sullivan, B. M., & Locksley, R. M. (2009). Basophils: A nonredundant contributor to host immunity. *Immunity,* 30, 12-20. https://doi.org/ 10.1016/j.immuni.2008.12.006.

Suurmond, J., Stoop, J. N., Rivellese, F., Bakker, A. M., Huizinga, T. W., & Toes, R. E. (2014). Activation of human basophils by combined toll-like receptor- and FcepsilonRI-triggering can promote Th2 skewing of naive T helper cells. *European Journal of Immunology*, 44, 386-396. https://doi.org/ 10.1002/eji.201343617.

Swystun, L. L., & Liaw, P. C. (2016). The role of leukocytes in thrombosis. *Blood,* 128(6), 753-762. https://doi.org/ 10.1182/blood-2016-05-718114.

Thompson-Souza, G. A., Gropillo, I., & Neves, J. S. (2017). Cysteinyl leukotrienes in eosinophil biology: Functional roles and therapeutic perspectives in eosinophilic disorders. *Frontiers in Medicine*, 18, 106. https://doi.org/ 10.3389/fmed.2017.00106.

Tracy, P. B., Eide, L. L., & Mann, K. G. (1985). Human prothrombinase complex assembly and function on isolated peripheral blood cell populations. *Journal of Biological Chemistry*, 260(4), 2119-2124.

Tracy, P. B., Rohrbach, M. S., & Mann, K. G. (1983). Functional prothrombinase complex assembly on isolated monocytes and lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry,* 258(12), 7264-7267.

Traverso, C. I., Caprini, J. A., & Arcelus, J. I. (1995). The normal thromboelastogram and its interpretation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 21(Suppl)*, 7-13.

Uhm, T. G., Kim, B. S., & Chung, I. Y. (2012). Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 4(2), 68–79.

Varricchi, G., Bagnasco, D., Borriello, F., Heffer, E., & Canonica, G. W. (2016). Interleukin-5 pathway inhibition in the treatment of eosinophilic respiratory disorders: Evidence and unmet needs. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 16, 186–200. https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000251.

Vallés, J., Santos, M. T., Marcus, A. J., Sañer, L. B., Broekman, M. J., Islam, N., Ullman, H. L., & Aznar, J. (1993). Down-regulation of human platelet reactivity by neutrophils: participation of lipoxygenase derivatives and adhesive proteins. *Journal of Clinical Investigation*, 92(3), 1357-1365. https://doi.org/10.1172/JCI116709.

von Brühl, M.-L., Stark, K., Steinhart, A., Chandraratne, S., Konrad, I., Lorenz, M., … Massberg, S. (2012). Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. https://doi.org/ 10.1084/jem.20112322.

Wargovich, T. J., Nichols, W. W., & Mehta, J. L. (1987). Platelets and arachidonic acid derivatives in myocardial ischemia in an animal model. *Cardiovascular*

Clinics, 18, 115-133.

Wechsler, M. E., Munitz, A., Ackerman, S. J., Drake, M. G., Jackson, D. J., Wardlaw, A. J., ... (2021). Eosinophils in health and disease: A state-of-the-art review. *Mayo Clinic Proceedings*, 96, 2694–2707. https://doi.org/ 10.1016/j.mayocp.2021.04.025.

Weiss, S. J. (1989). Tissue destruction by neutrophils. *New England Journal of Medicine,* 320, 365-376. https://doi.org/ 10.1056/NEJM198902093200606.

Weksler, B. B. (1992). Platelets. In J. I. Gallin, I. M. Goldstein, & R. Snyderman (Eds.), Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates (pp. 727-746*). New York: Raven Press*.

Woulfe, D., Yang, J., Prevost, N., O'Brien, P. J., & Brass, L. F. (2002). Signal transduction during the initiation, extension, and perpetuation of platelet plug formation. In Michelson, A. D. (Ed.), Platelets (pp. 197–213). *Academic Press/Elsevier Science.*

Wu, X., Pippin, J., & Lefkowitz, J. B. (1993). Platelets and neutrophils are critical to the enhanced glomerular archidonate metabolism in acute nephrotoxic nephritis in rats. *Journal of Clinical Investigation*, 91(2), 766-773. https://doi.org/ 10.1172/JCI116295.

Yoshimura-Uchiyama, C., Yamaguchi, M., Nagase, H., Fujisawa, T., Ra, C., Matsushima, K., Iwata, T., Igarashi, T., Yamamoto, K., & Hirai, K. (2003). Comparative effects of basophil-directed growth factors. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 302, 201-206. https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00153-0.

Zalavary, S., Grenegård, M., Stendahl, O., & Bengtsson, T. (1996). Platelets enhance Fcγ receptor-mediated phagocytosis and respiratory burst in neutrophils: the role of purinergic modulation and actin polymerization. *Journal of Leukocyte Biology*, 60(1), 58-68. https://doi.org/10.1002/jlb.60.1.58.

Zarbock, A., Singbartl, K., & Ley, K. (2006). Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *Journal of Clinical Investigation.* https://doi.org/ 10.1172/JCI29499.

Zieseniss, S., Zahler, S., Muller, I., Hermetter, A., & Engelmann, B. (2001). Modified phosphatidylethanolamine as the active component of oxidized low density lipoprotein promoting platelet prothrombinase activity. *Journal of Biological Chemistry,* 276(23), 19828–19835. https://doi.org/ 10.1074/jbc.M007506200.

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP	:	Adenozin difosfat
AND	:	Anafilaktik degranülasyon
ATP	:	Adenozin trifosfat
cAMP	:	Siklik adenozin monofosfat
cGMP	:	Siklik guanozin monofosfat
CLR	:	C tipi lektin reseptörleri
DVT	:	Derin ven trombozu
DNA	:	Deoksiribo nükleik asit
EDN	:	Eozinofil kaynaklı nörotoksin
ECP	:	Eozinofil katyonik protein
EPO	:	Eozinofil peroksidaz
Gp	:	Glikoprotein
GMCSF	:	Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör
GPCR	:	G-protein-bağımlı reseptörler
H	:	Histon proteini
HMWK	:	Yüksek molekül ağırlıklı kininojen
HPMEC	:	İnsan pulmoner mikrovasküler endotel hücreleri
ICAM	:	İntrasellüler adezyon molekülü
IgG	:	İmmünoglobülin G
IL	:	İnterlökin
LPS	:	Lipopolisakkarit
MA	:	Maksimum genlik
MBP	:	Majör temel protein
MSBF	:	Megakaryosit spesifik büyüme faktörleri
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NET	:	Nötrofil hücre dışı tuzakları
NO	:	Nitrik oksit
NOX2	:	Nitrit oksidaz tip 2
NOS	:	Reaktif nitrojen türleri
NOD	:	Nükleotid-bağlayıcı oligomerizasyon alanı
PA	:	Plazminojen aktivitörü
PAF	:	Trombosit aktive edici faktör
PBS	:	Fosfat tamponlu salin
PF-4	:	Trombosit faktör-4
PGI	:	Prostaglandin
PML	:	Polimorfonükleer lökositler
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
TFPI	:	Doku faktörü yolu inhibitörü
TLR	:	Toll-like reseptörleri
TNF	:	Tümör nekroz faktör
TPO	:	Trombopoetin
tPA	:	Doku plazminojen aktivatörü
TxA2	:	Tromboksan A2
TZP	:	Trombositten Zengin Plazma
vWF	:	von Willebrand faktör
H_2O_2	:	Hidrojen peroksidaz

8. EKLER



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

Sayı : 2011-KAEK-26/936 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 *"Granülositlerin hemostaza etkilerinin optik agregometre ve tromboelastogram ile incelenmesi"* başlıklı araştırmanız ile ilgili kurulumuzun 20 Aralık 2022 tarih, 2022-20/19 nolu kararı ekte gönderilmektedir.

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

Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU
Kurul Başkanı

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

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

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Granülositlerin Hemostaza Etkilerinin Optik Agregometre ve Tromboelastogram ile 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 Fatma Özer, Yüksek Lisans Öğrencisi Öznur Gürel			
	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
	ARAŞTIRICILAR İÇİN TAAHHÜTNAME FORMU	☒	Tarih: 16.12.2022
	PROSPEKTİF ÖZELLİKLİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMA TAAHHÜTNAMESİ	☒	Tarih: 16.12.2022
	İKU klavuzunu okunduğunu dair taahhütname	☒	Tarih: 16.12.2022
	SONUÇ ÖZET RAPORU	☐	
	DİĞER:	☒	Araştırma ile başvuru ön yazısı (Tarih: 16.12.2022), sorumlu araştırmacı özgeçmişi, tüm araştırıcılar tarafından imzalanmış Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi, literatür

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Granülositlerin Hemostaza Etkilerinin Optik Agregometre ve Tromboelastogram ile İncelenmesi

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2022-20/19 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 formun 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 Kuruldan izin alınması gerektiğinin sorumlu araştırıcılara iletilmesine toplantıyı katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

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

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.TEFBAŞAĞAN MOĞOL Başkan Yardımcısı	Anesteziyoloji	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.M.Sarıaç YILMAZ Üye	Farmakoloji	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Hilal ÖZKAN Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD Yanıdoğan 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.Özen ÖZ GÜL Üye	İç Hastalıkları Endokr.ve Metab.	BUÜ.Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD Endokrinoloji ve Metabolizma BD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Keğan HUYSAL Üye	Hiyokimya	Bursa Yüksek İhtisas EAH Biyokimya	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doktor Öğretim Üyesi Ergin SAĞDİLEK Üye	Biyofizik	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Biyofizik AD	E ☒	K ☐	E ☒	H ☐	E ☒	H ☐	Çalışmada bulunduğu için görüş bildirmemiştir
Doktor Öğretim Üyesi Sezer ERER KAFA 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.Bekendiğiz Hukuk Bürosu	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Ayşe ŞEN Üye	Sağlık mesleği mezunlu olmayan üye	Serbest Meslek	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* Toplantıda İbdasını

Sayfa 2

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Araştırmaları Etik Kurulu

Sayı : 133
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 *"Granülositlerin hemostaza etkilerinin optik agregometre ve tromboelastogram ile incelenmesi"* başlıklı araştırmanızdaki değişiklik ile ilgili kurulumuzun 08 Mayıs 2024 tarih ve 2024-7/16 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: tfzirkaya@uludag.edu.tr Elektronik Ağ: www.tip.uludag.edu.tr

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Granülositlerin Hemostaza Etkilerinin Optik Agregometre ve Tromboelastogram ile 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.Engin Sağdilek			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı			
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ UNVANI/ADI/SOYADI	-Yüksek Lisans Öğrencisi Fatma Özer, Yüksek Lisans Öğrencisi Öznur Gürel -Doç.Dr.Dilşdem Yılyen 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	☐	
	İKU klavuzunun okunduğuna dair taahhütname	☒	Tarih: 03.05.2024
	SONUÇ ÖZET RAPORU	☐	
	DİĞER:	☒	Araştırma değişiklik başvuru üst yazısı (Tarih: 03.05.2024), çalışmaya dahil edilen araştırıcılar tarafından imzalanmış Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi

Sayfa 1

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Granülositlerin Hemostaza Etkilerinin Optik Agregometre ve Tromboelastogram ile İncelenmesi

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2024-7 / 16 Tarih: 08 Mayıs 2024
	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 20 Aralık 2022 tarih ve 2022-20/19 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 granülositlerin ayrılması ve uyarılması ile ilgili işlemler ve uyarılan granülositlerin 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 UÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Fahrettin UYSAL Üye	Çocuk Kardiyoloji	Bursa UÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Belkis Nihan COŞKUN Üye	Romatoloji	Bursa UÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Ayşegül DRUÇ	Nefroloji	Bursa UÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Emirsemi GÜRLÜLER Üye	Genel Cerrahi	Bursa UÜ Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Görevli
Doç.Dr.Mustafa ASUER Üye	Kalak Burun Boğaz	Bursa UÜ Tıp Fakültesi Kalak Burun Boğaz	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Görevli
Doç.Dr.Sada PEHLİVAN 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 UÜ Hukuk Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* Toplantıda Bulunma

Sayfa 2

9. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her zaman yardımcı olan, bilgi ve tecrübelerini aktaran, daima içtenlikle karşılayan danışmanım Sayın Doç. Dr. Engin SAĞDİLEK hocama, destekleri için Sayın Doç. Dr. Evren KILINÇ hocama ve eş danışmanım Diğdem YÖYEN ERMİŞ hocama sonsuz teşekküerlerimi sunarım. Bu süre boyunca bana destek veren değerli arkadaşlarım Öznur GÜREL, Sueda GÜNEŞ ve Emin ALİYEV'e, deneylere gönüllü olarak katılan arkadaşlarıma, deney kısmında yardım eden ve bilgilerini aktaran doktora öğrencisi Didem ÇAKIRSOY AKYÖNEY'e, immünoloji labaratuvarı çalışanlarına, bu zamana kadar desteklerini esirgemeyen ve bu süreçte gösterdikleri sabır için başta anneme, babama ve kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

10. ÖZGEÇMİŞ

8 Haziran 1998 tarihinde Bursa Osmangazi'de doğdu. Şirinevler İlköğretim Okulu ve Gülçiçek Hatun Kız AİHL'sini tamamladı. 2016 yılında Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2021 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi'nde yüksek lisans eğitimine başladı