

I - GİRİŞ VE AMAÇ

Tip 2 diyabetes mellitus (DM) erişkin dönemin sık görülen kronik hastalıklarından olup, kontrol altına alınmadığında vücuttaki tüm sistemleri etkilemekte ve çağımızın önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden birini oluşturmaktadır. Hemostatik sistem morbidite ve mortalite de önemli rol almakta ve patogeneğinde trombositlerin önemi ortaya çıkmaktadır. DM'li hastalarda trombositlerin bazal ve uyarıcı etkenler (kollojen, ADP, trombin, epinefrin, hiperglisemi, enfeksiyonlar, akut stres durumları vb.) ile artmış adezyon ve agregasyon gösterdiği in vivo ve in vitro çalışmalarla tespit edilmiştir. Özellikle antikoagulan almayanlarda aktive olmuş trombositler vasküler endotel hücrelerini, lökositleri ve monositleri etkileyerek mikroagregasyon ve tromboembolik komplikasyonlara yol açarlar.

Trombositlerin tip 2 DM'lu hastalardaki tromboembolik komplikasyonların etiyopatogenezindeki rolü çeşitli çalışmalarda desteklenmiştir. Bu çalışmalarda trombosit aktivasyon göstergelerinden özellikle GPIIb/IIIa (CD41/CD61), CD62p (P selektin) ve CD63, düzeylerinin diyabetik hastalarda daha çok arttığı tespit edilmiştir.

Biz de bu çalışmada, aspirin ve analjezik almayan, akut enfeksiyonu (viral, bakteriyel, fungal ve paraziter) olmayan, daha önce embolik hadise geçirmeyen tip 2 DM'lu hastalardaki bazal trombosit aktivasyonunun; HbA_{1c} düzeyi, diyabetin süresi, yaş, DM tedavisi (oral antidiyabetik, insülin ve diyet) ve sigara içimi ile ilişkisini araştırmayı planladık. Çalışmamızda trombosit fonksiyonlarını incelemek için daha avantajlı olduğu, trombosit aktivasyonu ile ilgili değişiklikleri, aktivasyonun boyutunu daha spesifik olarak belirleyebilmesi nedeniyle akım sitometrisi yöntemi tercih edildi. Trombositlerin spesifik göstergesi olarak CD41 monoklonal antikorunu, trombosit aktivasyonunu belirlemek için CD62p, CD42b ve CD61'e karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar kullanıldı.

Tip 2 DM'li hastalarda trombosit aktivasyonuna bağlı gelişebilecek patolojilerin önceden belirlenebilmesi, buna yönelik yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilebilmesini sağlayacaktır.

II - GENEL BİLGİLER

TİP 2 DİYABETES MELLİTUS

Tanım-Tarihçe

Diyabetes Mellitus, hiperglisemi ile karakterize, karbonhidrat, protein ve lipit metabolizmalarının bozukluğu ile seyreden, kronik ve progresif bir hastalıktır. Seyri sırasında mikrovasküler, makrovasküler ve nöropatik komplikasyonlar gelişebilmektedir. Pankreas insülin sekresyonunun mutlak veya rölatif yetersizliği veya insülin etkisizliği veya insülin molekülündeki yapısal bozukluklar sonucunda oluşan bu hastalık etyolojisi, genetik ve klinik tablosu ile heterojen özelliktedir ve bir sendromdur.

Bilinen en eski hastalıklardan olan DM, 20. yüzyılın en büyük halk sağlığı sorunu olup, 21.yüzyılda da sorun olmaya adaydır. İlk olarak Kapadokyalı Arateus, çok idrar yapan ve kilo kaybeden insanları sifonlu fiçıya benzeterek hastalığa ‘Diabetes’ adını vermiş ve klinik bulgular ile tanı koymuşken, 7.yüzyılda Mısırlı, Hintli ve Çinlilerce idrarın şekerli olduğu tadılmış ve ‘Lemadhumeha’ ballı idrar tanımlaması yapılmıştır. 11. yüzyılda İbn-i Sina, kaynatılan idrardaki tortuda bal tadını belirlemiştir. Daha sonraları laboratuvar yöntemleri önem kazanmıştır. 16. yüzyılda ‘Thomas Willis’ idrarda şeker tayini yapmış ve ‘Claude Bernard’ kan şekeri ölçümünü gerçekleştirmiştir. 1800’lü yıllarda Fehling idrarda glukozu kantitatif olarak tayin metodunu geliştirmiş ve aseton tayini yapılmaya başlanmıştır. 1900’lü yıllarda ise hastalığın etyopatogenezi ile ilgili pek çok bilgi edinilmiştir. Halen immunolojik ve genetik çalışmalar ile yeni bilgiler kazanılırken hastalığın önlenmesi yönünden çalışmalar devam etmektedir. Yaygın ve sık görülen endokrin ve metabolik bir hastalık olan DM, batı toplumlarında en önde gelen ölüm nedenlerindedir (1).

1994 Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre aşikar diyabetik insan sayısı 110.4 milyondur. Eğer bu hızla artmaya devam ederse 2010 yılında bu sayı iki misli olacaktır. Ülkemizde de bilinen diyabetik insan sayısı yaklaşık 3 milyondur.

Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) verilerine göre de 2000 yılında 20-79 yaş grubundaki prevalans %4.6’dır. Bu durum Kuzey Amerika’da %7.8 Türkiye’nde bulunduğu Doğu Akdeniz ve Ortadoğu ülkelerinde %7.7 olarak bulunmuştur. 2025 yılında dünya genelinde 300 milyon insanın diyabetik olması öngörülmektedir (1).

Ülkemizde yapılan en geniş çalışma ise Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Araştırması (TURDEP) olup, 20 yaş veya üzerinde bulunan, %55'i kadın toplam 24788 hastadan oluşan, popülasyon bazlı kesitsel bir alan çalışmasıdır. TURDEP çalışmasında DM prevalansı %7.2 (daha önce tanı almamış yeni DM %2.3) ve glikoz tolerans bozukluğu (IGT) prevalansı %6.7 (Dünya ve Avrupa popülasyonlarına göre standartlaştırılmış diyabet prevalansı %7.9 ve %7.0) bulunmuştur. Kadınlarda DM, IGT ve obezite (özellikle kırsal kesimde) daha yüksek oranda tespit edilmiştir (2). Gökçel ve arkadaşlarının Adana'da yapılan çalışmaya 1.637 randomize seçilmiş, 20–79 yaş arası erişkin birey alınmış ve erkelerde DM prevalansı %12.9 ve kadınlarda %10.9 iken toplam prevalans %11.6 olarak bulunmuştur (3). Keleştimur ve arkadaşlarının Kayseri'de 30 yaş üzerinde 1774 erişkinin 1452'sinde yapılan oral glikoz tolerans testi (OGTT) sonrasında %4 DM , %2.9 tanı konulmamış DM ve %9 IGT tespit edilmiş olup toplam IGT ise %15. 9 olarak bulunmuştur (4).

Diyabetin Sınıflaması

Son yirmi yıl içinde tip 2 diyabetin tanısı önemli ölçüde değişmiştir. İlk kez 1979'da Amerika Birleşik Devletleri'nde Ulusal Diyabet Veri Grubu (National Diabetes Data Group) tarafından DM'un ilk sınıflaması yapıldı. Dünya Sağlık Örgütü, 1980 ve 1985 yıllarında bu sınıflamayı temel alarak yeniden düzenledi. Bu sınıflama uluslararası kabul görmüş olup yaygın olarak kullanılmaktadır. Jüvenil DM yerine bu duruma daha uygun olan 'insulin dependent diabetes mellitus' (IDDM) veya tip 1 DM tanımlaması kullanılmaya başlandı. Daha sıklıkla erişkin yaşta ortaya çıkan diyabet ise 'noninsulin dependent diabetes mellitus' (NIDDM) veya tip 2 DM olarak isimlendirildi. Etiyopatogenezinde insülin direncinin ağırlıklı olarak rol aldığı tip 2 DM, sıklıkla erişkin yaşlarda ortaya çıkmasına rağmen, son yıllarda görülen dengesiz beslenme ve obezite ile birlikte çocuklarda giderek artan oranlarda görülmeye başlamıştır (5).

İlk kez 1979 yılında sınıflandırılan ve daha sonra değişik sınıflamalar yapılan bu hastalık grubu için Dünya Sağlık Örgütü ve Amerikan Diyabet Birliği (ADA) son olarak 1998'de yeni bir sınıflama önermiştir. Bu yeni sınıflama Tablo 1'de gösterilmiştir (5).

Tablo 1: DM'un 1998'deki Sınıflandırılması

A-Tip 1 DM : β hücre hasarına bağlı insülin yetersizliği ve ketozis

1- Tip 1A (otoimmün etioloji)

2- Tip 1B (idiyopatik, otoimmün etioloji gösterilemeyen olgular)

B-Tip 2 DM: Değişik derecelerde insülin yetersizliği ya da insülin direnci

C-Diğer spesifik tipler

1- Endokrin hastalıklara sekonder

- Cushing sendromu
- Hipofizer jgiantizm
- Akromegali
- Feokromasitoma
- Glukagonoma
- Hipertiroidi
- Somatostatinoma
- Diğerleri

2- Sekonder nedenler

- Kistik fibrozis
- Talasemi
- Hemokromatozis
- α -1 antitripsin eksikliği
- Kronik veya tekrarlayan pankreatit
- Neoplazi
- Travma/Pankreatektomi
- Fibrokalküloz pankreatopati
- Diğerleri

3-Beta hücre fonksiyonlarında bozukluğa yol açan genetik nedenler

- Maturity onset diabetes of youth (MODY)
- 20. kromozomda HNF 4a (MODY-1)
- 7. kromozomda glukokinaz (MODY-2)
- 12. kromozomda HNF 1a (MODY-3)
- 13. kromozomda IPF-1 (MODY-4)
- HNF-1 β geninde mutasyon (MODY-5)
- 2q geninde NeuroDI/BETA-2 (MODY-6)
- Diğerleri

6- Nadir genetik hastalıklar

- Down sendromu
- Klinefelter sendromu
- Prader-Willi sendromu
- Turner sendromu
- Wolfram sendromu (DIDMOAD)
- Lawrence-Moon-Biedel sendromu
- Miyotonik distrofi
- Ataksi-telenjiyektazi
- Porfiri
- Friedreich ataksisi

4- İnsülin reseptör gen mutasyonları

- Tip A insülin rezistansı
- Leprechaunizm
- Rabson-Mendenhall sendromu
- Lipoatrofik diyabet
- Diğerleri

7- Enfeksiyonlara sekonder

- Konjenital rubella
- Sitomegalovirüs
- Diğerleri

5- İmmün kaynaklı nadir diyabet formları

- Poliglandüler sendromlar
- "Stiff Man" sendromu
- Anti-insülin reseptör antikoları
- Otoimmün insülin sendromu (insülin antikoları)
- Diğerleri

8- Kimyasal ajanlara ve ilaçlara bağlı olarak gelişen

- Glukokortikoidler
- Tiazid grubu diüretikler
- L-asparaginaz
- Tiroid hormonu
- Nikotinik asit
- Pentamidin
- Vacor
- Alfa-adrenerjik agonistler
- Beta- adrenerjik agonistler
- İnterferon- α tedavisi
- Diğerleri

D-Gestasyonel diyabet: Gebelik esnasında ortaya çıkan ve daha önce herhangi bir glukoz tolerans bozukluğu tespit edilmemiş olanlardaki glukoz intoleransına denir.

Epidemiyoloji

Epidemiyolojik çalışmalar 1970'lerde fark edilen 'diyabet epidemisi'nin tanımlanmasında önemli rol oynamıştır. Pima Kızılderelilerinde (6) ve Pasifikteki Mikronezya Naurulularında (7) ve ardından diğer Pasifik ve Asya adalarında aşırı yüksek diyabet prevalansı bildirilmiştir. Bu çalışmalar göstermiştir ki, geleneksel yaşam tarzından batılı yaşam tarzına geçilmesi obezite, egzersizde azalma, beslenmede belirgin değişiklikler ve son olarak tip 2 diyabet gibi sonuçlara neden olmaktadır. Yapılan pek çok çalışmada tip 2 diyabetin çoğu gelişmiş ülkede epidemik oranlarda seyrettiğini göstermiştir. Diyabet şimdiden çoğu ülkede ilk beş ölüm nedeni arasında yer almaktadır. Tablo 2 dünya çapında diyabetli hasta sayısının izlediği trendi göstermektedir (8).

Tablo 2: Dünya çapında tip 1 ve 2 diyabetli hasta sayısına yönelik 1997-2010 yılları için tahmini değerler

Diyabet tipleri	1997	2000	2010
Tip 1	3.5 milyon	4.3 milyon	5.3 milyon
Tip 2	119.2 milyon	147.2 milyon	212.9 milyon
Tip1+Tip 2	122.8 milyon	151.2 milyon	218.3 milyon

Tip 2 diyabet epidemisi sadece insidans artışı ile değil, aynı zamanda mortalite hızları da göz önüne alınarak değerlendirilmiştir.

Etiyopatogenez

Her ne kadar tip 2 diyabetin klinik belirtileri çoğunlukla 40 yaşın üzerinde ortaya çıksa da ve artan vücut ağırlığı ile ilişkili olsa da, genetik faktörlerin patofizyolojide baskın rol oynadığı görülmektedir. İkizlerde çok yüksek bulunan uyum oranı, farklı sosyal çevrelerde büyütölseler bile, ikizlerden birinde tip 2 diyabet göröldüğünde diğerinde de sonraki yıllarda klinik olarak belirgin tip 2 diyabet gelişme olasılığının çok yüksek olduğu anlamına gelmektedir. Genetik predispozisyon bu nedenle majör bir belirteçtir ve diyabetik fenotipin oluşmasında çevresel faktörlerin sadece küçük bir etkisi olabilir. Bununla birlikte, yaşam tarzı ve diğer sosyal değişkenlerin oldukça büyük bir klinik önemi vardır.

Bu faktörlerin hastalığın başlangıcı ve olası koruyucu yaklaşımların uygulanma şansı üzerine güçlü etkileri vardır.

Glikoz homeostazisi göz önüne alındığında, klinik açıdan aşikar tip 2 diyabet, tipik olarak aşağıdaki sıra ile gelişen ve hastalık sürecinin farklı evrelerini temsil etmesi olası üç patofizyolojik fenomen ile karakterizedir:

- İnsülin duyarlılığında azalma veya insülin direnci
- Göreceli insülin yetersizliği ile birlikte pankreas beta-hücrelerinin fonksiyon bozukluğu
- Karaciğerde glikoz üretiminde artış

Pek çok epidemiyolojik araştırma göstermiştir ki, yükselmiş açlık kan şekeri ile birlikte karaciğerde glikoz üretiminin artması tip 2 diyabetin göreceli olarak geç bir fenomenidir. Tip 2 diyabet, bozulmuş insülin işlevi (insülin direnci) ve/veya bozulmuş insülin sekresyonu sonucunda ortaya çıkar. İnsülin direnci hastaların büyük çoğunluğunda karakteristik bir metabolik bozukluktur. Aşikar hipergliseminin gelişiminden önce ortaya çıkar. Bozulmuş insülin işlevi pek çok dokuda kendini belli eder örneğin iskelet kası, yağ dokusu ve karaciğer gibi. Bozulmuş işlevi telafi edbilmek için pankreas dokusundan insülin sekresyonu artar. Kompansatuvar hiperinsülinemi glikoz seviyesini normal düzeyde tutar, ancak diyabet gelişmeye eğilimli vakalarda, beta hücre aktivitesi azalır; bu durum hiperglisemik diyabet evresini hazırlar. Vakaların küçük bir kısmında diyabet, insülin sekresyonundaki primer bir defekt sonucu gelişir. Her yıl IGT olan kişilerin %2 ila %14'ünde (ortalama %5) tip 2 diyabet gelişir (9). Tip 2 diyabet için risk faktörleri değiştirilebilir ve değiştirilemez şeklinde ikiye ayrılabilir (Tablo 3).

Tablo 3: Tip 2 diyabet için değiştirilebilir ve değiştirilemez risk faktörleri

Değiştirilebilir	Değiştirilemez
<ul style="list-style-type: none">• Obezite• Santral Obezite• Fiziksel aktivite yetersizliği• Sigara kullanma• Alkol kullanma• Düşük lifli gıdalarla beslenme• Aşırı doymuş yağlarla beslenme	<ul style="list-style-type: none">• Etnik köken• Yaş• Cinsiyet• Genetik faktörler• Hipertansiyon öyküsü• Pozitif aile öyküsü• Dislipidemi öyküsü• Gestasyonel DM öyküsü• Düşük doğum ağırlığı• Glikoz intolerans öyküsü

Diyabetes Mellitusun Komplikasyonları

DM'lu hastaların tedavisinde insülinin kullanılmaya başlanması yaşam süresini uzatırken, bazı komplikasyonları da beraberinde getirmiştir. Tip 2 DM'un komplikasyonları kabaca akut ve kronik olarak iki gruba ayrılabilir (Tablo 4). Ayrıca tip 2 DM'un görülen en sık akut komplikasyonları arasında diyabetik ketoasidoz ve hipoglisemi sayılabilir.

Tablo 4: Tip 2 Diyabetin Komplikasyonları

Akut Komplikasyonlar	Kronik komplikasyonlar	
	Mikrovasküler komplikasyonlar	Makrovasküler komplikasyonlar
<ul style="list-style-type: none">• Ketoasidoz• Hipoglisemi• Kilo kaybı ve kilo alımı• İnsülin alerjisi• Enfeksiyona eğilim	<ul style="list-style-type: none">• Retinopati• Nefropati• Nöropati	<ul style="list-style-type: none">• Aterosklerozis• Hipertansiyon• Miyokardiyal hastalıklar

Diyabetin Kronik Komplikasyonları

Tip 2 DM'un kronik komplikasyonları genellikle mikrovasküler ve makrovasküler sistemi ilgilendirir. Kronik hiperglisemi uzun sürede çeşitli organlarda fonksiyon bozuklukları, hasar ve yetmezlik tablosu oluşturabilir. Mikrovasküler komplikasyonlar; retinopati, nefropati ve nöropati olmak üzere üç ana başlık altında toplanabilir (10, 11). Makrovasküler komplikasyonlar; koroner arter hastalığı, serebrovasküler olaylar ve periferik vasküler hastalıklar olup, daha çok lipid metabolizması ve pıhtılaşma mekanizmasındaki bozukluklar sonucunda meydana gelmektedirler (11).

Kronik hastalığın süresi, metabolik bozukluklar (hiperglisemi de dâhil olmak üzere) ve genetik faktörler de bu patolojik süreçte rol oynamaktadır. Literatürde klinik olarak aşikâr

diyabeti olmaksızın, tüm mikrovasküler komplikasyonların geliştiği vakalar bildirilmiştir. Abdella ve arkadaşları IGT olan 47 yaşında bir hastada nefrotik sendrom ve böbrek yetmezliği, ayrıca fundoskopi ile görülen proliferatif retinopati tespit etmişlerdir (12).

A- Makrovasküler Komplikasyonlar

Diyabetli hastalarda kardiyovasküler hastalık en önde gelen mortalite nedenidir. Ölümün büyük bir çoğunluğu koroner kalp hastalığına bağlıdır ve yaşa göre eşleştirilmiş diyabeti olmayan kişilere göre, özellikle kadınlar başta olmak üzere, risk 2 ila 4 kat daha fazladır (13). Gu ve arkadaşları Ulusal Sağlık ve Beslenme Anketlerinden (NHANES) yararlanarak yetişkin diyabetli hastaları normal kontrollerle karşılaştırmışlardır. İlk anketin sonuçları (1971-75) ikincisi ile (1982-84) karşılaştırıldığında; diyabeti olmayan erkeklerde yaşa göre düzeltilmiş kalp hastalığı mortalitesi %36.4 azalırken bu oran diyabetli erkeklerde azalma %13.1 olarak gerçekleşmiştir. Diyabeti olmayan kadınlarda %27 azalma görülürken diyabetli kadınlarda ise %23 artış görülmüştür (14).

Haffner ve çalışma arkadaşları, tip 2 diyabeti olan Finli hastalarla kontrolleri koroner kalp hastalığı mortalitesi açısından karşılaştırmışlar ve geçmişinde hiçbir kardiyak problem olmayan diyabetlilerde dahi çok daha fazla risk bulunduğunu görmüşlerdir (15-20). İlk kardiyak olaydan sonra diyabetli hastaların %50'si bir yıl içinde ölmekte ve bunların yarısı hastaneye dahi ulaşmamaktadır (16). Oldukça yüksek olan mortalite riskini azaltabilmek için primer korunma yaklaşımlarına gereksinim vardır. Hem tip 1 hem de tip 2 diyabette görülen makrovasküler hastalık tanısı ciddi bir problemdir. Makrovasküler hastalık etyolojisi, hiperglisemide belirgin rol oynamakla birlikte, pek çok faktöre bağlıdır. Tip 2 hastalarında pek çok kardiyovasküler risk faktörü mevcuttur ve bunlar insülin direnci sendromunun bir kısmını oluştururlar. Literatürde hipergliseminin koroner kalp hastalığı açısından bağımsız bir risk faktörü olması ile ilgili olarak kayda değer bir tartışma söz konusudur. Balkau ve arkadaşları Paris Prospektif Çalışmasının (Paris Prospective Study) mortalite verilerini gözden geçirmişler ve glikoz dağılımının üst seviyelerinde, ölüm riskinin yükselen açlık ve 2 saatlik glikoz seviyeleri ile sürekli olarak arttığını bulmuşlardır (17). Son dönemde yapılmış 20 çalışmanın meta regresyon analizi yapıldığında Coutinho ve arkadaşları (18) açlık, 1 ve 2 saatlik glikoz düzeylerinin yüksekliğinin kardiyovasküler olay riskini arttırdığını tespit etmişlerdir. DECODE çalışması 25.000'in üzerinde hastayı kapsamaktadır ve ortalama takip süresi 7.3 yıldır (19). Bu çalışma glikoz yüklemesinden 2 saat sonra yüksek bulunan kan glikoz

konsantrasyonun, açlık kan glikoz düzeylerinden bağımsız olarak, ölüm riskinde artış ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalar bir neden sonuç ilişkisini göstermemekle beraber glikoz düzeylerinde artış ile birlikte altta yatan kardiyovasküler risk faktörlerinde bir kötüleşme olabileceğine işaret etmektedirler.

B-Mikrovasküler komplikasyonları:

Mikrovasküler hastalığın patolojisinde yer alan mekanizmalar

a-İleri glikolize son ürünlerin oluşumu

Yüksek glikoz konsantrasyonu proteinlerdeki amino gruplarının glikolizi ile ileri glikolize son ürünlerin (AGE-advanced glycosylation end products) oluşmasına yol açabilir. Bu ürünlerin oluşumu ve depolanmasının uzun dönemde ortaya çıkan mikrovasküler komplikasyonların gelişimine katkı yaptığı düşünülmektedir. AGE'ler reseptörlere bağlanırlar ve makrofajlarda veya vasküler endotel hücrelerinde sinyal transdüksiyonunda değişikliklere yol açarlar. Vasküler endotel büyüme faktörünün (VGEF) ekspresyonunu, AGE'lerin ve oksidanların arttırdığına dair yeni bulgular mevcuttur. VGEF vasküler permeabilityyi artırarak retinada angiogeneze neden olur (20, 21).

b-Aldoz redüktaz aktivitesinde artış

Aldoz redüktaz enzimi retina, böbrek ve sinirlerin hepsinde de bulunduğundan, aldoz redüktaz yolu ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Hiperglisemi bu enzimin etkinliğinde artışa neden olmakta ve daha çok glikoz sorbitol'e dönüştürülmektedir. Sorbitol yavaş metabolize edilir ve sorbitol'ün nöropati ve retinopati nedeni olabilecek diğer metabolik değişikliklere yol açabileceği varsayılmaktadır. Bu yolun diyabetik nöropati ile ilişkisi en çok üzerinde araştırma yapılmış konudur (22).

c-Aşırı oksidan oluşumu

Oksidan oluşumunda artış pek çok farklı kaynaktan beslenir, örneğin glikoz otooksidasyonu, protein glikasyonu ve serbest radikal oluşumu gibi. Oksidanlar, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidasyonunda artış, proteinlerin çapraz bağlanması ve DNA'da artma da dâhil olmak üzere pek çok hücrel işlevi etkileyebilirler. Ek olarak oksidanların artması nitrik oksidin (NO) azalmasına yol açarak vazokonstriksiyon ve hipoksiye neden olabilir. Yakın zamanda yapılmış bir diyabetik retinopati çalışma-

sında vitamin E doz-bağımlı şekilde kullanılmış (1000-2000IU günlük) ve sonuçta tip 1 diyabet hastalarında retinal kan akımı değişikliklerinin normalleştiği görülmüştür (22).

d-Sinyal transdüksiyon yollarında değişiklikler

Hiperglisemi ile birlikte sinyal iletiminde pek çok değişiklik meydana gelir. Üzerinde en çok çalışma yapılmış yol diaçilgliserol, protein kinaz C (DAG- PKC) yoludur. Hiperglisemi, DAG ve PKC etkinliğini pek çok aracılık eden maddeler üzerinden artırır ve bu durum hücrede sayısız anormalliklere neden olur. Bunların arasında bazal membranda kalınlaşma, permeabilite artışı, koagülasyon ve kasılabilme yeteneğinde bozukluklar, angiogenezde artış ve kardiyomiyopati sayılabilir. Spesifik bir PKC beta izoform inhibitörünün kullanıldığı çalışmalarda kardiyovasküler hastalık, retinopati ve nefropatide görülen hemodinamik değişikliklerin dahi geç ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. İlaç olarak kullanımı için klinik çalışmalar, maküler ödem ve neovaskülarizasyon saptanan hastalar üzerinde devam etmektedir. Bu çalışmalarda görme kaybının önlenip önlenemeyeceği test edilmektedir (23).

Diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarının patogenezi açıklamaya yönelik geliştirilmiş olan pek çok teoriden yola çıkarak şunu söyleyebiliriz: tüm teorilerde kan glikoz düzeyinin yüksekliği yer almaktadır ve kan glikozu optimal düzeyde kontrol edilmelidir (24).

1. Diyabetik Nefropati

Gelişmiş ülkelerde son dönem böbrek yetmezliğinin (SDBY) en sık nedeni diyabetik nefropatidir. Tip 2 DM'de, diyabet tanısı konulmadan yıllar önce nefropati gelişmekte ve nefropati tanısı bazen SDBY gelişene kadar gecikebilmektedir (Tablo 5) oysa Tip 1 DM'li hastaların yaklaşık %30-40'ında nefropati ortaya çıkmakta ve bu hastaların çoğunluğunda klinik nefropati geliştikten sonraki 10-15 yıl içerisinde böbrek yetmezliği oluşmaktadır (1, 26, 67).

Tersine tip 2 diyabetli hastalarda, metabolik sendrom ve obezite nedeniyle hipertansiyon mevcuttur. Böbrek otoregülasyonunun kaybına bağlı bulgular sergileyebilirler, bu durum glomerülleri etkilemesi nedeniyle yüksek kan basıncı ile sonuçlanabilir (25). Tip 2 diyabette GFR'deki azalma oldukça hızlıdır. Bu nedenle tip 2 diyabeti olan proteinürili hastaların prognozu kötüdür, bu durum sadece böbrek hastalığına

ve gizli SDBY'e bağı değil aynen kardiyovasküler mortalite riskindeki artışa da bağlıdır, risk faktörlerini kontrol altına alan yeni ajanlarla önlenabilir. Beta blokerlerle disritmi, diüretiklerle aşırı sıvı yükü, anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri ile böbrekteki basınç artışı ve kardiyak bozukluklar kontrol altına alınabilir (26).

Tablo 5: Diyabetik Nefropati gelişindeki evreler ve özellikleri (67)

Evreler	Özellikleri
Evre I (Tanı öncesi diyabet olmaksızın klinik tanı)	Normal serum kreatinin ve yüksek GFR (ancak tip 1 diyabetteki ölçüde değil). Esansiyel hipertansiyon metabolik sendrom ve tip 2 diyabetle ilişkili olabileceği için kan basıncı yükselebilir.
Evre II "Sessiz evre"	Hipergliseminin tanı ve tedavisinden sonra anormal albuminüri genellikle görülmez. Daha iyi bir glisemi kontrolü ile GFR hafifçe düşebilir. Kan basıncı yükselme eğilimindedir.
Evre IIIa	Yıllarca diyabet tanısının koyulamadığı durumlarda klinik tanıda mikroalbuminüri saptanabilir.
Evre IIIb	Diyabetle yaşadıktan bir süre sonra kan basıncı yükselmesi ve glisemi kontrolü nedeniyle normoalbuminüriden tipik şekilde mikroalbuminüri gelişebilir. Böyle hastalarda hipertansiyon siktir. GFR hala normaldir.
Evre IV Aşıkardiyabetik nefropati	Diyabetten 10-15 yıl sonra tipik proteinüri metabolik kontrol ve kan basıncına bağlı olarak GFR değişken derecelerde azalır. Kardiyovasküler hastalık siktir. Biyopside bu hastalarda tipik lezyonlar söz konusudur nadiren başlangıçta hastalar değişiklik göstermez.
Evre V	Geç evre, böbrek yetmezliği veya hemen öncesi

Günümüzde tedavideki esas hedefin kan basıncını normale döndürmek olduğu aşıkardır (27, 28). Ayrıca hipergliseminin diyabetik böbrek hastalığının gelişiminde temel risk faktörü olduğu da açığa kavuşmuştur. Genetik faktörler henüz tanımlanmamıştır ve genetik faktörlerin karar verici karakterde olduğuna dair elimizde veri yoktur ancak gelişime etki edebilirler.

2.Diyabetik Retinopati

Diyabetik Retinopati (DR), diyabetin gözle ilişkili en sık rastlanılan kronik komplikasyonu olup, diyabet tanısı konulduğunda anjiyografi ile % 90 oranında saptanabilmektedir. Tam görme kaybı olan diyabetiklerin %85'inde körlük nedeni retinopatidir. DR gelişimine neden olan en önemli faktörler hiperglisemi ve süresidir. Sadece hiperglisemik etki damarlardaki otheregölasyonu bozabilmektedir. Kronik hiperglisemi göstergesi olan HBA_{1c} düzeyinin artmış olması ve beraberinde genetik yapının uygunluğu diyabetik retinopatiji hızlandıran diğer etkenlerdir (29-30). DR'deki erken histolojik değişiklikler; retinal kan akımında değişiklikler, bazal membranda kalınlaşma, kapillerlerin çapında artma, trombojenik prostaglandinlerin artmış sentezi, eritrositlerin deformabilite özelliklerinin azalmasına bağlı olarak damar iç çeperine yapışmaları, trombosit agregasyonunun artması, aşırı glikolize olmuş ürünlerin damardaki birikimi, artmış vasküler geçirgenlik, eritrositlerdeki değişiklikler, hızlanmış fibrinojen tüketimi ve fibrinolizisin azalmasıdır. Hiperinsülineminin uyardığı insülin benzeri büyüme hormonu, proinsülin seviyelerindeki değişme, karşıt insülin hormonların (adrenalin, glukagon, kortizon ve büyüme hormonu) uyarıları epitel büyüme faktörlerinin etkisini arttırıcı olaylar perisit endotel hücrelerinin sayı ve fonksiyonunu etkilerler. Bütün bu değişiklikler sonucunda kapillerlerin oklüzyonu ve hipoksemiye maruz kalan retinada iskemik adacıklar oluşur (31, 32).

3. Diyabetik Nöropati

Diyabetik nöropati; klinik ve subklinik bir tablo ile karşımıza çıkabilen, proksimal ve distal periferik sinirleri, otonom sinir sistemini, sensoriyal ve motor sinirleri etkileyen diyabetin sinir sisteminde yaptığı hasara denilmektedir. Diyabetik nöropati heterojen bir özellik taşımaktadır (33)(Tablo 6). Subklinik nöropati ise klinik semptomların aşikâr olmadığı elektrofizyolojik testler ve otonomik fonksiyon testleri ile saptanan bozukluk olarak tanımlanmıştır.

Tablo 6: Diyabetik nöropatinin sınıflandırılması (67)

Nöropati Tipi	Alt-sınıflar
1. Hızla düzelen nöropati	❖ Hiperglisemik nöropati
2. Kalıcı simetrik polinöropati	❖ Distal somatik sensorimotor nöropati ❖ Otonom nöropati ❖ Küçük lif tutulumu
3. Fokal/multifokal nöropati	❖ Kranial nöropati ❖ Torako-abdominal nöropati ❖ Kompresyon ya da tuzak nöropatileri ❖ Proksimal nöropatiler ❖ Fokal ekstremitte tutulumu

Diyabetik nöropati oluşmasında; biyokimyasal, hemodinamik değişiklikler ve genetik yatkınlığın da rolü olduğundan bahsedilmektedir (34, 35). Diyabetik nöropatinin etiyopatogenezinde otoimmüitenin de yer aldığı düşünülmektedir. Ayrıca alkol ve sigara kullanımının nöropati riskini arttırdığını gösteren çok merkezli çalışmalar mevcuttur (35, 36). DM’de artmış oksidatif stres, oluşan hidroksil radikalleri aracılığı ile endotelial hücrelere direkt toksik etki gösterir ve bu da kan-nöron bariyerinin bozulmasına neden olur. Mikrovasküler iskemi veya hipoksi progresif nöron hasarı ve kaybına sebep olur. Endonörial hipoksi ve nöron kan akımının azalması nöropatinin patogenezinde önemlidir. Oluşan bu endonöral mikrovasküler patoloji hipoksiye yol açarak segmental demiyelinizasyon ve aksonal dejenerasyona neden olur bu da sinir ileti hızını yavaşlatıp diyabetik nöropati semptomlarına neden olur (33, 35, 37, 38).

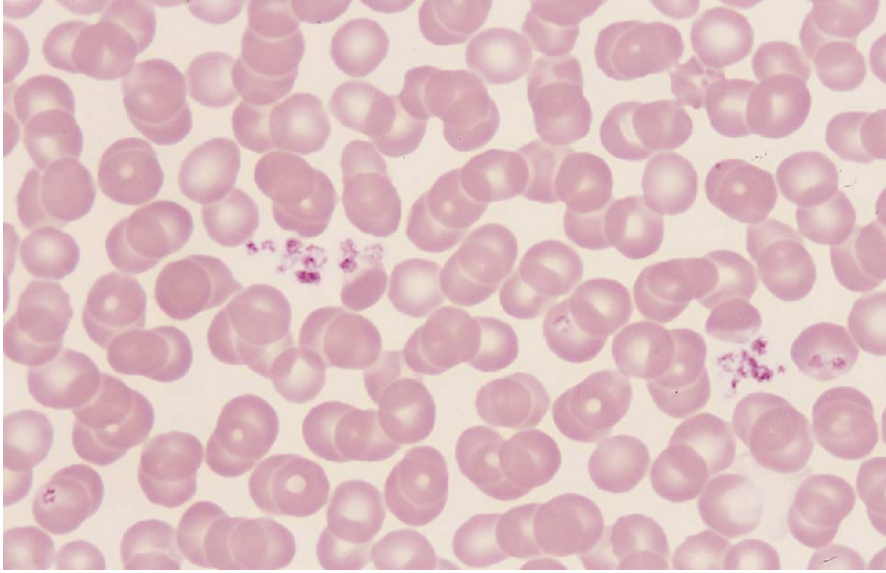
TROMBOSİTLER

Trombositler megakaryositlerin (Şekil 2) fragmentasyonu ile oluşan, çekirdeksiz, oval ya da bikonveks disk biçiminde nükleus içermeyen sitoplazma parçacıklarıdır. Uzun çapı 2-4 µm ve ortalama hacmi 7-10 fl olan bu hücrelerin ortalama

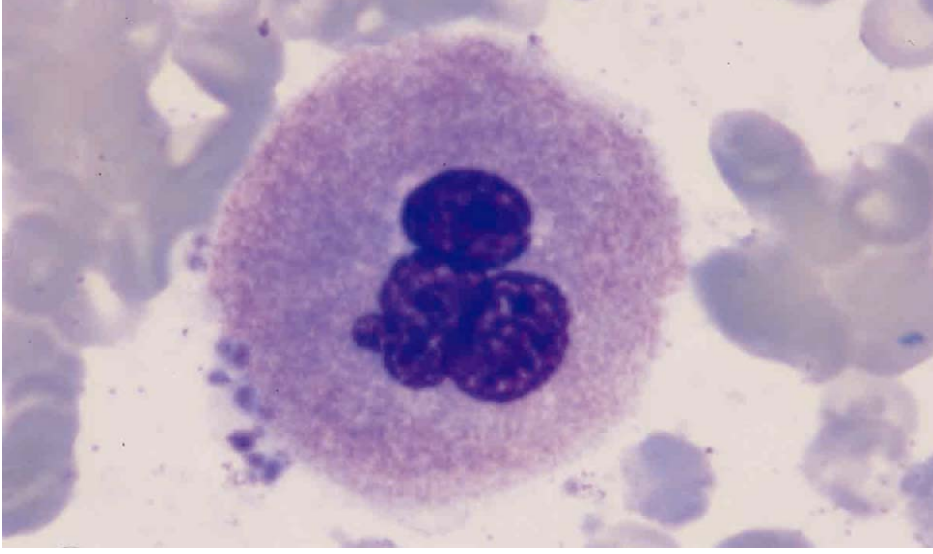
yaşam süresi 7-10 gündür. Bu sürenin sonunda retiküloendotelyal sistem tarafından dolaşımdan temizlenirler. Her mikrolitre periferik tam kanda (Şekil 1) yaklaşık olarak 150.000-450.000 trombosit bulunur. Hemostazın temel yapı taşlarıdır (39, 40).

Trombosit Yapısı

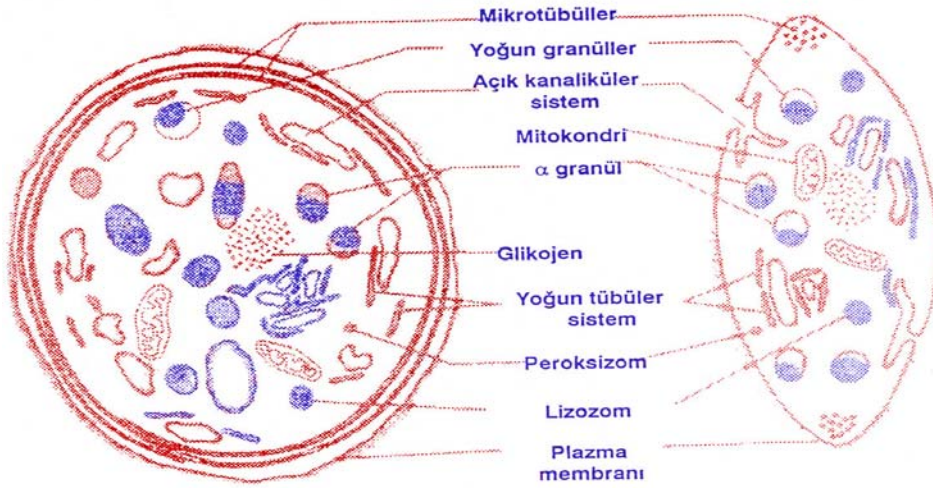
Trombosit hücre yapısı (Şekil 3) başlıca, trombosit zarı, açık kanaliküler sistem, hücre iskeleti, trombosit granülleri ve yoğun tübüler sistem olmak üzere toplam beş bölümde incelenebilir.



Şekil 1: Periferik yayma trombositler (Prof.Dr. İsmet Aydoğdu izniyle)



Şekil 2: Megakaryosit (Kemik iliği) (Prof.Dr. İsmet Aydoğdu izniyle)



Şekil 3: Trombosit Şematik Yapısı (39)

1. Trombosit Zarı

Trombosit hücre zarı, plazma membranı ve glikokaliks olmak üzere iki alt yapıdan oluşmaktadır. Periferik arter hastalığında, koroner arter hastalığında (42), preeklemside (41), aktif inflamatuvar barsak hastalığı olanlarda (43), trombosit aktivasyonun göstergelerinin arttığına dair çalışmalar bildirilmiştir. Trombosit membranı hemostaz, ateroskleroz, tromboz, vasküler onarım, anjiyogenesis, inflamasyon, metastaz ve bazı immünolojik olaylarla yakından ilişkilidir (44, 45, 46).

a. Plazma membranı

Çift katlı glikoprotein ve fosfolipitten oluşur. Hücre membranında glikoprotein yapısında dışardan gelen uyarıları hücre içine ileten adhezyon reseptörleri vardır. Bilinen kan hücreleri içinde trombosit membranı, en düşük yüzey alanda en yüksek reseptör dansitesine sahiptir. Membran yapısında ayrıca mukopolisakkaritler, Mg^{+2} bağımlı ATP'az, yüzey ilişkili kanaliküler sistem ve submembran tübüler sistem bulunur. Karbonhidrat kompleksi ise glukoz, galaktoz/mannoz, heksozaminler, siyalik asit ve frukozdan oluşur (45, 46, 47).

b. Glikokaliks

Hücre tipine göre değişen miktarda olan oligosakkaridler değişik yoğunluk ve kalınlıkta glikokaliks isimli bir tabaka oluştururlar. Oligosakkarid zincirleri aynı zamanda spesifik moleküller için reseptör işlevi görmektedirler (45, 48).

2. Açık Kanaliküler Sistem

Açık kanaliküler sistem, trombosit yüzey alanını genişletmek amacıyla vakuoller şeklinde yüzey membranının invajinasyonu ile oluşan kompleks bir ağ oluşturmaktadır. Granüllerin içerdikleri maddeler kanaliküler sistem aracılığıyla dış ortama salınmaktadırlar. Aynı zamanda aktivasyon sırasında trombositlerdeki psödopodların oluşumunu ve yayılmasını sağlayan plazma membranının bir deposu olarak işlev görmektedirler (45, 46, 49, 50).

3. Trombosit Hücre İskeleti

Trombosit hücre iskeleti esas olarak aktin filamanları ve mikrotübüllerden oluşur. Aynı zamanda hafif ve ağır zincirden oluşan miyozin içerir. Bu yapı trombosit morfolojisinin devamlılığını sağlar. Ayrıca trombositler uyarıldığında meydana gelen çeşitli kontraktıl olaylara aracılık ederler (46, 47).

4. Trombosit Granülleri

Trombositlerde dört tip depo organeli tanımlanmıştır.

- a. **Alfa granüller:** Bunlar kendi içinde içinde trombositte özgü olan ve trombositte spesifik olmayan plazma proteinleri olarak iki şekilde ayrılabilir (46, 59).

Trombositte özgü proteinler:

- PDGF
- Trombospondin
- PF-4 (Trombosit faktör-4)
- β -Tromboglobulin

Trombositte özgü olmayan plazma proteinleri:

- Fibrinojen
- Fibronektin
- Albümin
- Faktör V
- vWF
- Alfa-1 antitripsin
- Plazminojen
- Alfa-2 antiplazmin
- Alfa-2 makroglobulin
- Histidinden zengin glikoprotein
- Selektin (P-selektin)

b. **Yoğun granüller;** içinde ise ADP, ATP, GTP, GDP, serotonin, magnezyum, inorganik fosfat bulunmaktadır.

c. **Lizozomlar;** Bunların içinde β -Glukorinidaz, asit hidrolazlar, aril sülfataz, heparitinaz, β -N-asetilglukozaminidaz, β -N-asetilgalaktozaminidaz, β -Galaktozidaz, nötral proteazlar, α -arabinozidaz, katepsin D ve E bulunur.

d. **Peroksizomlar;** Bunların içinde katalaz, peroksidaz ve diğer oksidazlar bulunur (45, 46, 49).

5. Yoğun Tübüler Sistem

Bu sistem, elektron-yoğun materyal varlığından dolayı bu adı almıştır. Selektif olarak divalent katyonları bağlar. Yoğun tübüler sistem ayrıca trombosit siklooksijenaz ve prostaglandinlerin sentez yeridir. Bu sistem kalsiyum depolanması ve mobilizasyonunda rol oynar. Ayrıca peroksidaz aktivitesi göstermektedir ve bu enzim trombositik seri için bir işaret olarak kullanılmaktadır (46, 49).

Trombosit Membran Glikoproteinleri:

Trombositlerde reseptör fonksiyonu gören çeşitli membran glikoproteinleri tanımlanmıştır (Tablo 7). Trombosit membranı 3 ayrı major glikoproteinden ibarettir. Bunlar sırasıyla GP I, GP II ve GP III'dür. Glikoprotein I bölgesinde GP Ia, Ib ve Ic;

Glikoprotein II bölgesinde GP IIa, IIb ve Glikoprotein III bölümünde ise GP IIIa ve GP IIIb bulunur. Bunların yanında membranda GP IV ve GP V'de yer alır (50-53).

Glikoprotein Ia (GP Ia), trombositlerin kollajen tarafından aktivasyonunda işlev görür. **Glikoprotein Ib (GP Ib)**, trombosit membranında en çok bulunan siyaloglikoprotein olup, primer fonksiyonu immobilize vWF aracılığı ile trombositlerin vasküler subendotelyuma adhezyonuna aracılık etmektedir. Disülfid bağlarla bağlı α ve β subünitlerinden oluşur (46,54). GP Ib, aynı zamanda trombin de bağlar. Siyalik asitten çok zengindir ve membran yüzeyindeki negatif yükün büyük kısmını oluşturur. **GP V**, trombin için bir substrat görevi görür ve aynı zamanda GP Ib ile ilişkilidir (46, 55).

Tablo 7: Trombosit Membran Glikoproteinleri (87)

Glikoprotein (GP)	Ligand	İşlev
GP Ia/IIa	Kollajen	Adhezyon
GP Ic/IIa	Fn	Adhezyon
GP Ic'/IIa	Laminin	Adhezyon
GP IIb/IIIa	Fb, WF, Vn, Fn	Agregasyon, Adhezyon
Vitronektin reseptör	Vn, vWF, Fn,	Adhezyon
GP Ib/IX	vWF, trombin	Adhezyon
GP V		Trombin Substrat
GP IV	TSP, kollajen	Adhezyon
GMP – 140		Trombosit-lökosit etkileşimi

Fb: Fibrinojen

Fn: Fibronektin

Vn: Vitronektin

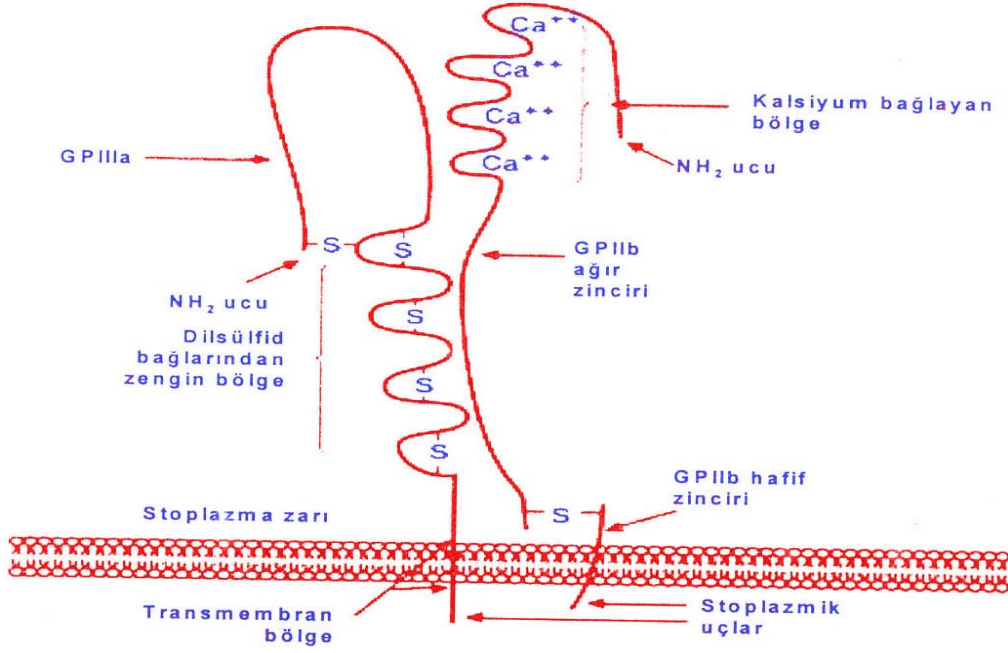
TSP: Trombospondin

vWF: von Willebrand Faktör

β :Beta grupları

GP IIb/IIIa (CD41/CD61) fibrinojen reseptörü: GP IIb/IIIa reseptörü, iki membran glikoproteininden oluşan ve trombosit membranı üzerinde en fazla bulunan integrindir. Total trombosit proteinlerinin % 1-3'ünü oluşturmaktadır. CD41/CD61'in α ve β subünitleri non-kovalent olarak birbirine bağlıdır. CD41/CD61 istirahatteki trombositlerin yüzeyinde kalsiyuma bağlı bir kompleks oluştururlar (Şekil 4). CD41/CD61 kompleksinin yaklaşık % 70'i trombosit yüzeyinde rastgele bir dağılımda bulunurken, geri kalanı ise yüzeyle bağlantılı kanaliküler sistem membranı ve sitoplazmik α granül membranında bulunmaktadır. Tüm CD41/CD61 kompleksleri trombosit aktivasyonundan sonra membran yüzeyinde eksprese olurlar. Bu kompleks aktive trombositlerde fibrinojen, fibronektin, vitronektin ve vWF'ü bağlayabilmektedir. Plazma fibrinojeninin olmadığı durumlarda, fibrinojen yerine vWF'ün GP IIb/IIIa

(CD41/CD61)'ya bağlanarak alternatif agregasyon mekanizmasını işlettiği gösterilmiştir (46, 48, 53, 54).



Şekil 4: GP IIb/IIIa'nın Yapısal Özelliklerini Gösteren Bir Şematik Model

Hücreler yüzeylerinde bulunan glikoprotein yapısındaki çeşitli reseptörler sayesinde diğer hücrelerle etkileşirler. Bu glikoproteinler antijenik yapıda olup aynı zamanda hücrenin kimliğini taşırlar. Hücre yüzeyindeki bu yapılar, günümüzde farklılaşma kümeleri (CD: Cluster of Differentiation) terimiyle adlandırılmaktadırlar. Her CD hücre yüzeyinde bulunan farklı bir antijenik yapıyı temsil etmektedir. Trombositlerin membran yüzeyinde bulunan glikoproteinler reseptörleri oluşturmaktayken, yine bu alanda yer alan fosfolipidler pıhtılaşma faktörlerini oluştururlar (46, 55-57).

Sadece trombositte bulunanlar ise şunlardır: CD41, CD42 a, b, c, d, CD51, CD61, CD62, CD63, CD107 a, b (57).

Bunlardan CD42 a, b, c vWF reseptörüdür. CD42 a, b, c'nin hasarlanmış damar duvarında subendotelyumda açığa çıkan vWF'e bağlanması adhezyon için gereklidir. CD42 a, b, c, eksikliğinde Bernard-Soulier sendromu ortaya çıkar. CD51 ile CD61 vitronektin reseptörünü, CD61 ile CD41 fibrinojen reseptörünü, CD36 kollajen, trombospondin ve P. falsiparum reseptörünü oluşturur. CD9 sinyal iletiminde rol almaktadır. CD62 (P-Selektin), CD63 in vitro trombosit aktivasyon göstergesidir. P selektin α granül sekresyonunu yansıtır. CD61 (İntegrin, GP IIIa) ise in vivo trombosit aktivasyon göstergesi olarak da kullanılmaktadır (Tablo 8) (46, 58).

CD63, 50 kd olup aktive trombositlerde monosit ve makrofajlarda da ekspre edilmektedir. CD63'ün 4 adet hidrofobik transmembran bölgesi vardır. VLA-3 ve VLA-6 integrinleri ile etkileşerek trombosit adhezyonuna katkıda bulunmaktadır (46, 66).

Tablo 8: Trombositlerde Eksprese Olan CD Molekülleri (46)

CD No	Antijen	Etki Hedefi
CD41a	GP IIb/IIIa (Ca ²⁺ bağımlı kompleks varlığı gerekli)	<ul style="list-style-type: none"> Fibrinojen bağlanması Trombosit agregasyonu (Trombin, Kollajen ve ADP ile) Hem dinlenme halindeki, hem de aktive trombositlere bağlanır
CD41b	GP IIb	<ul style="list-style-type: none"> Trombosit agregasyonu Trombosit sekresyonu (araşidonik asit, trombin)
CD42a	GP IX (GP Ib-Gp IX gerekli)	<ul style="list-style-type: none"> vWF bağlanması (Ristosetin ile) vWF'e bağımlı adhezyon Bernard Soulier'de negatif
CD42b	GP Ib	<ul style="list-style-type: none"> vWF bağlanması (Ristosetin ile) Bernard Soulier'de negatif
CD61	GP IIIa, İntegrin	<ul style="list-style-type: none"> Trombosit agregasyonu Trombosit sekresyonu (Kollajen, arşidonik asit, trombin) Fibrinojen bağlanması (ADP, arşidonik asit, PAF) Adhezyon Fibronektin, vWF, vitronektin, trombospondin bağlanması
CD62P (GMP-140 PADGEM)	P-Selektin (dinlenme halinde α -granül membran proteini, aktivasyon sonucu plasma membranında lokalize olur)	<ul style="list-style-type: none"> Adhezyon (nötrofil, monosit) α-granül sekresyonunun aktivasyonu
CD63	GP53 (lizozomal)	<ul style="list-style-type: none"> α-granül sekresyonunun aktivasyonu

Trombosit membranında reseptör görevi gören, trombosit adhezyonu, agregasyonu, sekresyonu ve aktivasyonunda önemli rol alan çeşitli yapılar tanımlanmıştır. Bunlar arasında integrinler, selektinler ve membran yapısındaki fosfatidil serini tanıyan anneksin V sayılabilir.

P-Selektin (CD 62, GMP-140, PADGEM):

P-selektin; GMP-140, PADGEM (Platelet activation dependent granule external membrane protein) ya da CD 62 olarak da adlandırılmaktadır. 140 kD molekül ağırlıklı bir α granül membran proteindir. P-selektin, ayrıca kemik iliğinde, megakaryositlerde, damar duvarını çevreleyen endotel hücrelerinin Weibel-Palade cisimciklerinde bulunur. Yapısı, nötrofillerin inflamasyon bölgesindeki endotele adhezyonuna aracılık eden bir endotel hücre reseptörü olan ELAM-1'e son derece benzerlik göstermektedir. P-Selektin istirahatteki trombositlerin yüzeyinde saptanmaz. Yalnızca trombosit aktivasyonu ve α granül salınım reaksiyonundan sonra trombosit membran yüzeyinde belirlediği gösterilmiştir. P-selektinin yüzeyel ekspresyonu α -granül içeriği ile orantılıdır. Bir kez salandıktan sonra tekrar içeriye alınmaz ve geri dönüşüzdür. Böylece P-selektin sadece aktive trombositlerin yüzeyine bağlanır. Bu özellikleri nedeni ile P-selektinin trombosit aktivasyonunu gösteren güvenilir bir belirleyici olarak kullanılması önerilmektedir. Dolaşımdaki aktive olmuş degranüle trombositler yüzeylerindeki P-selektini hızla kaybederler, ancak kan dolaşımında bulunmaya ve fonksiyonel özelliklerine devam ederler. Bu özellikleri nedeni ile P-Selektinin herhangi bir uyarı sonrası ölçülmesi in vitro aktivasyon potansiyelini göstermektedir (49, 59-61).

Endotel hücrelerindeki P-selektin; en yoğun olarak küçük ven ve venüllerde lokalizasyon gösterirken, küçük arterlerde, arteriollerde ve çok daha nadiren de kapillerlerde yama tarzında dağılım gösterebilmektedir. P-selektin, trombositlerde olduğu gibi endotel hücrelerinde de 'Weibel Palade cisimcikleri'nde granüller halinde depolanır. Bu cisimcikler, aynı zamanda vWF'ün yüksek molekül ağırlıklı multimerlerini çeşitli endotel hücre agonistleri tarafından salınana dek depolamaktadırlar. Yine aynen trombositlerde olduğu gibi, P-selektine karşı geliştirilmiş monoklonal antikörlerin, endotel hücrelerinin erken aktivasyonunu göstermede yararlı bir işaret olarak kullanılabileceği belirtilmektedir. P-selektinin uyarılmış trombositlerde ve endotel hücrelerinde hızlı bir şekilde salgı granül membranından yüzey membranına göçü nedeniyle, P-selektinin inflamasyon ya da vasküler hasar gibi hücrelerin büyük

çoğunluğunun aktive olduğu bölgelerde önemli bir reseptör olarak fonksiyon gördüğü düşünülmektedir (45).

P-selektin, aktive olmuş trombositler ve endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan, lökosit migrasyonunda, lökosit ve trombosit ilişkilerinin düzenlenmesinde ve lökositlerin pıhtı bölgesinde toplanmasında görev yapan bir adhezyon molekülüdür. Çalışmalar P-selektinin, lökositlerin gerek aktive trombositlere ve gerekse aktive endotel hücrelerine hızlı bir şekilde bağlanarak doku zedelenmesine karşı hemostatik ve inflamatuvar yanıt arasındaki iletişimi kolaylaştırmada önemli rol oynadığını göstermektedir. Yapılan çalışmalarda aktive trombositlerin monositlere, nötrofillere ve lenfositlere bağlandığı gösterilmiştir. Bu etkileşim, eriyebilir P-selektin proteini ve P-selektine karşı geliştirilmiş monoklonal antikolarla bloke edilebilmektedir (58, 60, 62).

P-selektin düzeyi; hemolitik üremik sendrom, DM, sigara, kanser ve aterosklerozda artar. Trombotik trombositopenik purpurada ise daha çok eriyebilir P-selektin seviyesi artmıştır (53, 59, 63).

TROMBOSİT AKTİVASYON BASAMAKLARI

A. Trombosit Adhezyonu

Hemostazda oluşan ilk adımlar trombosit adhezyonu, damar duvarının hasarı ve subendotelyal matriksin lokal cevabı ile başlatılır. Hasarlı bölgenin trombositlerle kaplanması, integrin adı verilen spesifik trombosit membran glikoproteinleri aracılığı ile olur. Endotel bütünlüğü bozulduğu zaman trombositler subendotelyal yapılara (kollagen, fibronektin, laminin, fibrinojen) adhezyon reseptörleri ile bağlanırlar. Kan akımının yavaş olduğu bölgelerde GP Ia/IIa, GP IV reseptörü ile kollagene direkt adhezyon gösterirler. Arteriyollerde ve mikrosirkülasyonda olduğu gibi kan akımının hızlı olduğu bölgelerde trombositlerin subendotelyal bölgedeki adhezif proteinlere bağlanabilmesi için yine bu bölgedeki vWF'üne ve buna özgü bir reseptör olan trombosit glikoprotein GP-Ib/IX kompleksine gereksinim vardır. Trombosit glikoprotein GP Ib-V-IX kompleksi arteriyel hasar sonrası normal yara iyileşmesi durumunda trombositlerin adhezif protein vWF'e yapışmasına aracılık ederler. Bazı adhezyon proteinleri subendotelyal matriks yapısında bulunmaları haricinde trombosit sekresyon granüllerinde ve/veya plazmada da bulunurlar. Mesela vWF ve fibronektin

her üç lokalizasyonda bulunurlarken, trombospondin yalnızca trombosit granüllerinde görülür. Adhezyona aracılık eden GP Ib-V-IX sistemi için trombosit aktivasyonuna ihtiyaç yoktur. Trombospondin ve kalsiyum da adhezyonda rol oynar (64, 65).

Özetle trombositlerin subendotelyal matriks komponentlerine adhezyonunda vWF, subendotelyal yüzey ile trombosit membranındaki GP Ib arasında bir köprü görevi görür. Fibronektin, kollajen, vitronektin, trombospondin gibi matriks adhezyon moleküllerine adhezyon da spesifik trombosit membran glikoproteinleri aracılığı ile olmaktadır (62, 68).

B. Trombosit Agregasyonu

Trombositin agregasyonu için öncelikle aktivasyonu gereklidir. Trombosit agregasyonu, adhezyondan sonra bölgeye gelen trombositlerin hemostatik tıkaç oluşturmaları için fibrin bağları ile birbirlerine birleşmeleridir (Şekil 5). Aktivasyon için ise ADP, kollajen, epinefrin, trombin, vazopressin, araşidonik asit gibi çeşitli agonistler ile trombositlerin uyarılması, beraberinde Ca^{+2} , Mg^{+2} gibi iyonların, fibrinojen, vWF gibi spesifik plazma proteinlerinin ve trombosit CD41/CD61 reseptörünün mevcut olması gerekir. Aktivasyonu stimüle eden maddeler, kalsiyumun intrasellüler mobilizasyonunu ve trombositlerin degranülasyonunu stimüle etmek için, çeşitli reseptörler ve diaçilgliserol fosfat ve inositol trifosfat gibi sekonder aracılar yoluyla hareket ederler. Bundan sonra, trombosit yüzeyinde protein bağlanma kısımları ortaya çıkar. Fibrinojen veya vWF, trombosit membran proteinlerinden CD41/CD61'e bağlanır ve komşu trombositlerle bağ oluşturarak trombositlerin agregasyonuna neden olur (Şekil 5). Fibrinojen, fibrin oluşturması ve trombosit agregasyonunu desteklemesi dolayısıyla trombüs oluşumunda iki ayrı role sahiptir. CD41/CD61 reseptörünün latent durumdan, fibrinojen bağlayabilecek aktif duruma geçmesi bütün agonistlerle olan trombosit aktivasyonunun ortak bir sonucudur. Ortamdaki divalan iyonlar uzaklaştırılınca, fibrinojenin artık trombositlere bağlanamadığı izlenir. Dimerik bir protein olan fibrinojenin komşu iki trombositin CD41/CD61 reseptörleri arasında köprü oluşturmak suretiyle trombosit agregasyonunu sağladığı düşünülmektedir. Fibrinojen ile CD41/CD61 bağlanması başlangıçta dönüşümlü bir reaksiyondur. Divalan iyonların ya da agonistlerin ortadan kalkması ile fibrinojen reseptöründen ayrılabilir. Uygun şartlar

altında fibrinojen ile CD41/CD61 arasındaki bağlanma stabilize olarak dönüşümsüz hale gelir. (46, 68, 69).

C. Trombosit Sekresyonu

Trombositler adhezyon ve agregasyonla birlikte granül içeriklerini kanaliküler sistem ile ortama salırlar ve ilk olarak yoğun granüller boşaltılır, sonra α -granül içerikleri ortama salınırlar (Şekil 5). Hücrenin bu esnada çapı artar ama bütünlüğü bozulmaz ve fonksiyonlarına devam edebilir. Trombin ve kollajen başta olmak üzere, çok sayıda madde sekresyonu başlatabilir. Sekresyon sırasında, salınan maddeler agregasyonun artmasına neden olurlar. Bu olaylar yara iyileşmesine, prokoagülan aktivitenin oluşmasına ve hasarlı bölgede trombin oluşumuna yol açarlar. Oluşan trombosit agregatları arasında fibrin meydana gelmesi ve daha ileri safhalarda, fibroblastların işe karışması ile pıhtı sabitleşir. Trombosit fonksiyonlarının normalden daha aktif şekilde oluşması, aterosklerozda olduğu gibi, hiperadhezyon, hiperagregasyon ve hipersekresyona neden olur (46, 68, 69).

Trombosit Aktivasyonunun Biyokimyasal Mekanizması

Trombositlerin fizyolojik olarak aktivasyon veya inhibisyonu aktive edici veya inhibe edici bir hücre dışı uyarının trombosit yüzeyindeki spesifik reseptörüne bağlanması ile başlar. Trombosit aktivasyonunun üç aşamada gerçekleştiği kabul edilir:

1)Uyarı: Trombositleri aktive eden daha önce de basedilen birçok madde vardır. Genellikle agonistlerin ortaya çıkmasına yol açarak trombosit aktivasyonuna neden olan bir olay vardır. Agonistlerin trombositlere bağlanması bu hücrenin aktivasyonunu başlatır. Trombosit aktivasyonunu başlatan agonistler ayrıca zayıf ve güçlü agonistler olarak da sınıflandırılabilirler. Güçlü agonistler;

- Trombin
- Kollajen
- Prostaglandin
- Endoperoksidler
- Tromboksan A₂

▪ Trombosit aktive edici faktör (PAF) vardır ve agregasyonun engellendiği şartlarda dahi granül sekresyonunu uyarabilirler. Zayıf agonistler ise;

- ADP
- Epinefrin
- Vazopressin
- Serotoninden oluşur ve granül sekresyonunu uyaramazlar. Bunlar, ancak trombosit agregasyonunu uyabilirler. Salınım reaksiyonu veya prostaglandin üretimini indükleyici maddeler:

- **Enfeksiyöz ajanlar ve ürünleri:** Virüsler, bakteriler, tüberkülin, endotoksin, antijen-antikor kompleksleri ve bazı bakteri toksinleri.
- **Proteinler:**Sığır faktör VIII, C-reaktif protein, DNA, ferritin, immünglobulinler, PAF, polimerize fibrin monomerleri.
- **Enzimler:** Tripsin, fosfolipazlar, papain, plazmin, komplemanın bazı komponentleri, alkalen fosfataz.
- **Diğerleri:** Hiperglisemi, hipoglisemi, asetil kolin, araşidonat, tromboksan A₂, kollajen ve çeşitli mikrofibriller, konkavalin A, yağ asitleri, iyonoforlar, lektinler, polilizin ve diğer katyonik polipeptidler, amniyotik sıvı metilen mavisi, nötrofil miyeloperoksidaz, fitohemaglutininler, ristosetin, yılan serumları, terapötik ultrasonikasyon, ultraviyole ışığı, nonkonjuge bilirubin, ürik asit kristalleri.

2) **Uyarı iletimi:** Hücre içindeki ikincil mesajcıların uyarıyı iletmeleriyle oluşur.

3) **Cevap:** Trombosit iskelet yapısının değişmesi (trombositin şekil değiştirmesi), trombositlerin fibrinojen aracılığı ile yapışıp küme oluşturmaları (= agregasyon) ve granül ekzositozu (= sekresyon) şeklinde olur (46, 70).

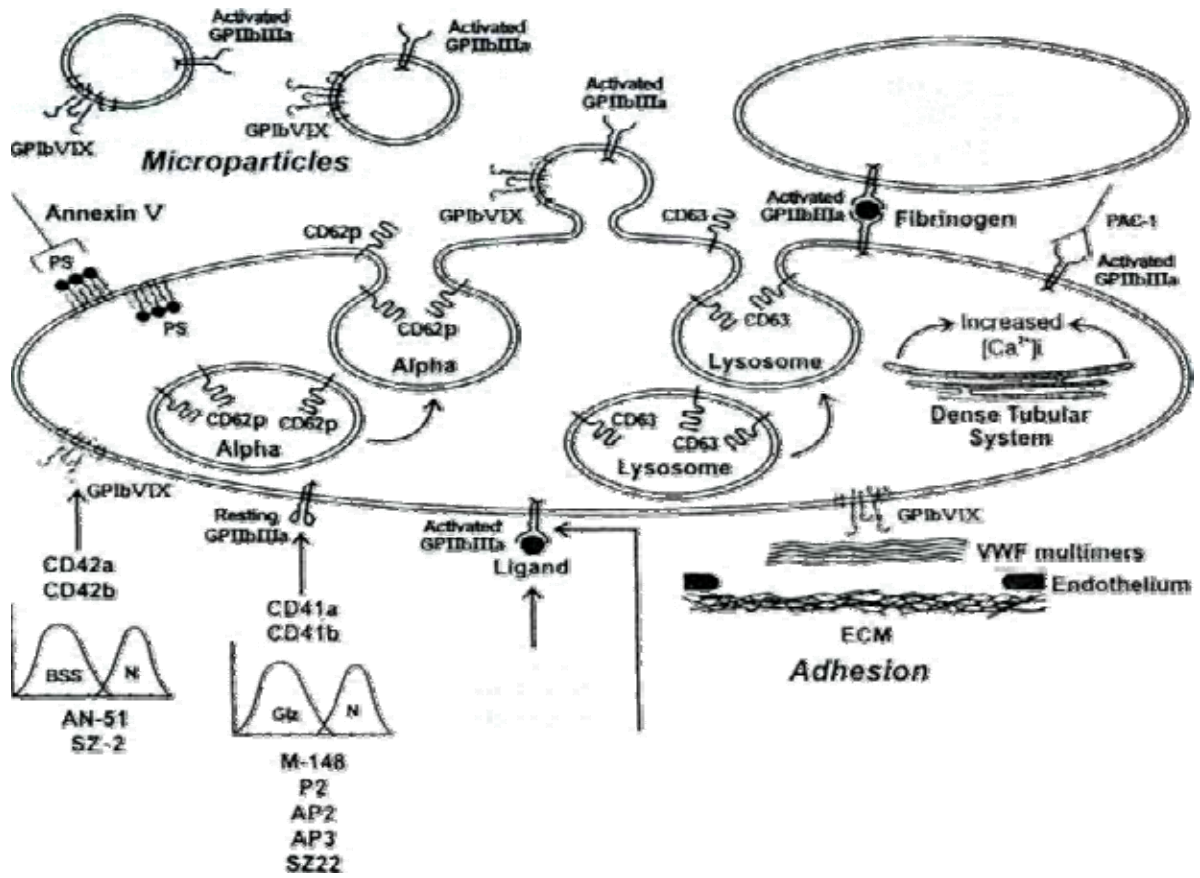
Uyarıya Trombositin Yanıtı

Trombositlerin aktive edici uyarılara yanıtı reverzibl ve irreverzibl trombosit yanıtı olmak üzere iki şekilde gerçekleşebilir:

a) Geridönüşümlü yanıt: Adhezyon, şekil değişikliği ve primer agregasyonu içerir. Trombositlerin endotel hücreleri arasındaki boşlukları kapatması, α granüllerden büyüme faktörlerinin salınımı ve subendoteliumdaki küçük defektlerin onarımı gibi fizyolojik işlevler geridönüşümlü trombosit yanıtı ile gerçekleşir (46, 71).

b) Geridönüşümsüz yanıt: Salınım reaksiyonunu ve sekonder agregasyonu içerir. Trombositlerin hemostatik işlevleri bu yanıt ile gerçekleşir. Trombosit salınım reaksiyonu, araşidonik asitten endoperoksidler, TXA₂ gibi metabolitlerin oluşumunu,

yoğun ve α granüller ile lizozom içeriklerinin salınımını içerir. Büyük trombosit agregatlarının oluşumu için bu salınım reaksiyonu gereklidir. Yoğun ve α granül içeriklerinin salınımı ile ilişkili iki mekanizma tanımlanmıştır. İlk mekanizma trombositlerin sekretuar granüllerin merkezileşmesi ve açık kanaliküler sistem aracılığı ile içeriklerini trombosit yüzeyindeki kanal ağızları yoluyla dışarı vermeleridir. Diğer mekanizma ise, sekretuar granüllerin membran ile ilişkili multiveziküler yapıların oluşumuna katılmak üzere periferde doğru yer değiştirmeleri ve sonra bu multiveziküler yapıların eriyerek içeriklerini çevreye salmalarındır (46, 72).



Şekil 5: Trombosit Aktivasyonunun Monoklonal Antikorlarla Gösterilmesi (40)

Anti-CD 62, α -granül membran proteini GMP-140'a karşı geliştirilmiştir. İstirahat halindeki trombositlerin yüzeyinde GMP-140 saptanamaz. Trombin ile aktivasyondan sonra GMP-140 trombosit plazma membranına doğru yer değiştirir. Böylece anti-CD 62 sadece aktive trombositlerin yüzeyine bağlanır. PAC-1, GPIIb/IIIa kompleksi üzerindeki fibrinojen bağlanmasına yönelik bir antikordur. İstirahatteki trombositlerde bu fibrinojen bağlanma bölgesi yüzeyde açığa çıkmaz. Trombin uyarımı GP IIB/IIIa kompleksinde yapısal bir değişikliğe neden olur. Sonuçta fibrinojen bağlanma bölgesi açığa çıkar, bu nedenle PAC-1 sadece aktive trombositlerin yüzeyine bağlanır.

Trombositler, fiziksel ya da kimyasal uyarılarla uyarıldığında birçok biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler olmaktadır. Trombositler istirahat halinde disk şeklindeki aktivasyon sonucu yapışkan psödopodlu, dendritik şekle dönüşürler (45, 46, 72). Bu reaksiyonlar zinciri trombosit aktivasyonu olarak adlandırılır. Aktivasyonla birlikte yüzey değişimleri, aktive trombositlerden salınan antijenlere yönelmiş monoklonal antikorlar kullanılarak ortaya konulmaktadır (54, 73, 74).

Monoklonal Antikorlar

Trombosit aktivasyonunu ölçmekte monoklonal antikorlardan en yaygın kullanılanları; CD41/CD61 kompleks ve α -granül membran proteininin ölçülmesiyle ilgili olanlardır ve monoklonal antikorlar içerisinde en geniş şekilde incelenmiş olanlar P-selektin'e karşı yönelmiş olanlardır. P-selektine spesifik monoklonal antikorlar, sadece degranüle olmuş trombositlere bağlanırlar ve istirahat halindeki trombositlere bağlanmazlar (72, 73). Monoklonal antikorlar, poliklonal olanlara tercih edilmektedir çünkü monoklonal antikorlar tüm spesifik epitoplara daha güvenilir bir şekilde satüre edip, non-spesifik bağlanma göstermeleri daha azdır. Fluoressein izotiyosiyanat (FITC), biotin, fikoeritrinle konjuge edilmiş antikorların kullanılması sekonder antikorların ilave edilmesi gereğini de ortadan kaldırdığı gibi, fikse edilmemiş örneklerde, hatalı olarak in vitro trombosit aktivasyonuna yol açan, zaman alıcı yıkama işlemlerini de ortadan kaldırmıştır. Bir partikülün trombosit olup olmadığının belirlenmesi için öncelikli olarak kapı alma işleminden sonra, spesifik GP Ib, GP IIb veya GP IIIa'nın floresanla işaretlenmiş olan monoklonal antikorlarından biri kullanılmalıdır. İncelenen söz konusu glikoprotein ekspresyonunu ölçmek için ise GP Ib-IX-V (CD42), GP IIb/IIIa (CD41/CD61) kompleksi, GMP-140 (CD62), lizozomal protein (CD63) gibi bir monoklonal antikorlar kullanılmaktadır. CD41a: GP IIb/IIa (CD41/CD61)'yı tanıyan antikordur ve trombosit tanımlamada kullanılır. CD 61: GP IIIa'yı tanıyan antikordur. İn vivo trombosit aktivasyonunu daha iyi yansıtır (62, 73).

Bu monoklonal antikorlar uyarılmamış trombosit yüzeyine hiç bağlanmazken veya minimal bağlanma gösterirken, aktive olmuş trombositlere spesifik olarak bağlanırlar. Bu nedenle "aktivasyona bağımlı" veya "aktivasyona özgü" antikorlar olarak adlandırılırlar (56).

Diyabette Trombosit Fonksiyonları

DM'taki aktive olmuş trombositler trombüs oluşumu ve anjiopatiye neden olmaktadır. Başlıca endotel hücre hasarı, fibrinolitik sistemde aksama ve pıhtılaşma ile ilgili proteinlerdeki değişiklikler, eritrosit deformabilite özeliğinin azalması, trombosit agregasyonu ve aktivasyonunun artması olarak sayılabilir. Diyabetlilerden elde edilen trombositlerde spontan ve stimulan ajanlar ile yüksek yapışma ve abartılı agregasyon görülmüştür, meydana gelen bu değişikliklerin çeşitli nedenleri vardır (75-77). Bunlar;

- Trombosit yüzeyindeki glikoprotein reseptörlerinin değişimi
- Trombosit yüzeyindeki glikoprotein reseptörlerinin agonist ve adhezif proteinlere bağlanmasında artış
- Trombosit yüzeylerinde bulunan ve adhezyonu sağlayan protein reseptörleri ile glikoproteinlerin iletişim bozuklukları
- Fibrinojene bağlanmada artış
- Membran akışkanlığında azalma
- Trombosit metabolizmasında bozulma
- Trombosit içi sinyal iletim yollarında meydana gelen değişikliklerdir.

DM'taki trombosit membranının biyofiziki değişimi, trombosit hipersensitivitesi ve hiperfonksiyonunun ana belirleyicilerinden biridir. Bu değişim şiddetli Ca^{+2} mobilizasyonu, artmış tromboksan sentezi ve salınımı gibi çeşitli metabolik bozuklukların da sorumlusu olabilir (75, 77, 78).

Tablo 9: DM'de Trombosit Fonksiyon anormallikleri (76, 79)

▶ Trombosit şekli	Diskoid ve sferoid şekildedir
▶ Trombosit volümü	Artmıştır
▶ Trombosit sürveyi	Normal veya azalmıştır
▶ Trombosit adhezyonu	Artmıştır
▶ Trombosit agregasyonu	Artmıştır
▶ Trombosit enzimleri	Fosfolipaz A ₂ artmıştır
▶ Trombosit glikoproteinleri	Moleküler ağırlık artmıştır
▶ Trombosit-lökosit-endotel hücre etkileşimi	Artmıştır
▶ Trombosit sekresyonu	Artmıştır
▶ Trombositlerin akışkanlığı	Değişmiştir
▶ Trombosit metabolizmasında	Bozulma olur
▶ Trombosit membran akışkanlığı	Azalmıştır
▶ Trombositlerde Ca ⁺² mobilizasyonu	Artmıştır
▶ Membran proteinlerindeki non-enzimatik glikolizasyon	Artmıştır
▶ Glikoprotein Ib ve Glikoprotein IIb/IIIa reseptörleri	Artmıştır
▶ Adhezyon molekülleri (P-selektin, VCAM-1)	Artmıştır

Trombosit aktivasyonu ile membran reseptörleri ve intramembranöz G proteini uyarılır sonrasında inositol 1,4,5 trifosfat (IP₃) ve 1,2 diaçilgliserol (DAG) oluşur. Bunlar ikincil uyarıcı fonksiyonu görürler. IP₃, Ca⁺² salınımını sağlayarak, Ca⁺² bağımlı enzimlerin aktive olmasına neden olurlar. DAG'un artması protein kinaz aktivasyonunu sağlayarak trombosit yüzeyindeki CD41/CD61 kompleksinde yapısal değişikliğe yol açarak bu kompleks üzerindeki fibrinojen reseptörünün ortaya çıkmasını sağlar. Bunu takiben serumda bulunan fibrinojen molekülleri trombosit membranında CD41/CD61'e bağlanarak trombosit agregasyonunun oluşmasını sağlar (76-80).

Trombositler damar intimasındaki düz kas hücrelerinin göçünü ve proliferasyonunu uyaran "trombosit kaynaklı büyüme faktörü" (PDGF)'yi salgırlar. PDGF hem kemotaktik, hem mitojendir ve özellikle monositler üzerinde kemotaksiktir.

Trombositlerde bol miktarda bulunan trombosit faktör-4, β -tromboglobulin ve siklo-oksijenaz siklusunu ürünleri de monositler üzerine kemotaksik etkilidirler (80, 81).

DM'lularda metabolik kontrol ile alakalı olarak trombosit membran proteinlerinin enzimatik olmayan glikolizasyonu ile protein yapı ve dizilimi, membran lipid dinamikleri ve membran akışkanlığı değişir. Aktive trombositler endotel hücreleri ve lökositler gibi hücrelerle etkileşebilirler. Araşidonat yolunun aktivasyonu ile artmış tromboksan A₂ oluşumu, artmış fosfoinozimid döngüsü ve buna bağlı olarak artmış Ca⁺² serbestleşmesi gerçekleşir. Tromboksan A₂, damar düz kasının kasılmasını ve trombosit agregasyonunu başlatır ve aynı anda prostasiklinin (PGI₂) etkisini de antagonize eder (75, 82).

DM'lu hastalardaki trombosit hipersensitivitesine bağlı olarak; dolaşımdaki trombositler daha sık epizotlarda granül boşalmasına uğrarlar (77). Normal durumlarda trombositler vazodilatasyon yapabilirler, buna karşın diyabetik hastalardan izole edilen trombositler vazodilatasyona aracılık edemezler. Bunun vazodilatasyonu inhibe eden bir faktörün salgılanması ile oluştuğu ileri sürülmekte ise de, diyabetiklerde azalmış NO sentezinin de rolü olduğu düşünülmektedir (83).

Kısaca, diyabetlilerde; trombosit aktivasyonu sonucu trombositlerin hiperagregasyonu ve hiperadhezyonuna uğraması, trombojenik prostaglandin derivelerinin artmış sentezi, kan viskozitesinde artışa yol açan plazma protein anomalileri, hızlanmış fibrinojen tüketimi, anti-trombin III'ün azalması, vWF ve fibrinojenin artması, fibrinolizisin azalması, kapiller bazal membran kalınlaşması, kapiller endotel hücre harabiyeti ve proliferasyonu mikrosirkülasyonda tıkanmalara ve hipoksiye neden olur. Oluşan mikrovasküler tıkanıklık ve doku iskemisi diyabetik komplikasyonların ortaya çıkmasına neden olur (46, 84).

Trombosit Fonksiyonları ve Akım Sitometri (AS) Yöntemi

AS çok sayıdaki hücrenin tek tek spesifik karakteristiklerini hızlı bir şekilde ölçen bir cihazdır. Bir örneğin AS ile analizinde hücrelerin süspansiyon haline getirilmesi ve monoklonal antikor ile işaretlenmesi ana kuraldır. AS'de süspansiyon halindeki hücreler dakikada 1.000-10.000 hücre hızında olmak üzere bir akım odasından geçerken bir lazer demeti ile incelenirler. Trombosit fonksiyonunu incelemek için klinikte kullanılan diğer testlerle karşılaştırıldığında AS'nin bazı avantajları:

- ✓ Çok az kan çalışma için yeterlidir
- ✓ Trombosit aktivasyonunun boyutunu direkt olarak ölçebilir
- ✓ Trombositlerin farklı alt gruplarının özelliklerini tespit edebilir
- ✓ Diğer yöntemlerden daha iyi standardize edilmiştir.

Mevcut birçok plazma testleri de trombositlerin aktive olup olmadığını indirekt olarak belirleyebilmekte, ancak trombosit aktivasyonu ile ilgili değişiklikleri ölçememektedirler. Bu yöntemler trombosit aktivasyonunun boyutunu ve trombositlerin farklı alt gruplarının özelliklerini tespit edemezler. Agregasyon çalışmaları ise semikantitatif ve bazı standardizasyon problemleri vardır (56, 73). AS'nin dezavantajları ise:

- Sadece dolaşan trombositlerin fonksiyonunu ölçmesi
- Aktive olmuş trombositlerin dolaşımdan hızlı şekilde temizlenmesi
- Yüksek maliyet gerektirmesi
- Örneklerin hazırlanmasının komplike olması
- Tecrübeli kullanıcı gerektirmesidir

Klinik AS, nispeten yeni ve hızlı gelişen bir medikal teknolojidir. Bugün üç ana uygulama alanı vardır. Bunlar başlıca klinik immünoloji, hematoloji ve medikal onkoloji sayılabilir. AS'nin trombositlerle ilgili mevcut uygulama alanları içinde dolaşımdaki aktive olmuş trombositlerin saptaması, trombosit hiperaktivitesinin değerlendirilmesi, GP IIb/IIIa antagonistleri ile yapılan tedavinin izlenmesi, kalıtsal trombosit yüzey glikoprotein eksikliklerinin teşhisi, retiküle trombosit sayısının saptanması sayılabilir (75, 62, 73) .

Bernard-Solier sendromu ve Glanzmann trombastenisi gibi trombosit membran glikoprotein kusurlarının tanısında AS çok değerli bir yöntemdir. Retiküle trombosit sayısı, yeni yapıp salınan trombositleri belirttiği için trombopoez hızının bir ölçümü olarak kullanılmaktadır. AS aracılığıyla trombosit spesifik ve lökosit spesifik monoklonal antikorlarla trombosit-nötrofil veya trombosit-monosit gibi heterotipik agregatlar belirlenebilir. Ayrıca, AS depolanmış trombosit konsantrasyonlarının kalite kontrolünde de yararlı olmaktadır (73, 82, 83).

III – GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, 1 Ocak- 30 Nisan 2005 tarihleri arasında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji Bilim Dalı tarafından tip 2 DM tanısı ile diyabet polikliniğine başvuran yaklaşık 1200 hasta içinden seçilerek yapıldı. Hasta grubunu, yaşları 34 ile 72 yaş arasında değişen, son 10 günde antiagregan, antikoagulan ve son 48 saatte de anti-enflamatuvar almamış, akut enfeksiyonu (viral, bakteriyel, fungal ve paraziter) olmayan ve daha önce embolik hadise geçirmemiş 70 hasta oluşturmaktaydı. Örnekler hastalardan sabah aç iken periferik venöz kandan alındı. Kontrol grubunu herhangi bir yakınması olmadan, sağlık taraması amacıyla başvuran, yaşları 39 ile 65 yaş arasında değişen trombosit fonksiyonlarını etkileyecek herhangi bir hastalıkları olmayan ve herhangi bir ilaç kullanmayan toplam 17 sağlıklı olgu oluşturdu. Çalışma için etik kuruldan izin alınarak, araştırmanın protokol no'su: 2005/28 olarak belirlendi.

Kan Örneklerinin Alınması -Çalışılması

Kan örnekleri tüm çalışma grubundan sabah saat 08.00 - 10.00 saatleri arasında, ön kol veninden, trombosit aktivasyonuna engel olmak için; ortalama 30 sn turnike uygulaması esnasında 19 G numaralı enjektör kullanılarak alındı. Bunun nedeni 1 mm'den (19 gauge) daha küçük çaplı iğne ucu ile alındığında kan hemoliz olmakta ve trombositler aktive olmaktadır (85). Kan örnekleri alınan diyabetik hastalarda trombosit aktivasyonuna yol açabilecek akut ketoasidoz, hiperglisemi ve hipoglisemi yoktu. İlk 2 ml kan boşaltıldıktan sonra 2.0 ml kan, EDTA ile alınan kanlarda trombositler aktive oldukları için sitrat içeren tüplere boşaltılarak çalışıldı.

Kan Örneklerinin Hazırlanması

Trombosit kümeleşmesini en aza indirmek ve çalışma konsantrasyonunu sağlamak için dilüsyonlar yapıldı. Örnekler %1 paraformaldehit ile tespit edildi. Dilüsyonlar için tampon olarak 'sequestrine buffer' kullanıldı. Sequestrine buffer'in hazırlanması 391 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 416 mg ve 11.5 g NaCl yaklaşık 200 ml distile suda eritilerek, üzerine 500 mg albümin ilave edildi. pH'sı 6.8'e ayarlanan solüsyonun toplam hacmi 250 ml'ye tamamlanarak kullanıma hazır hale getirildi. İlk 5 dakika içinde çalışılan tam kanlar trombositler erken izole edildiğinden sequestrine buffer kullanılmadan işleme alındı.

Kan Örneklerinin Çalışılması

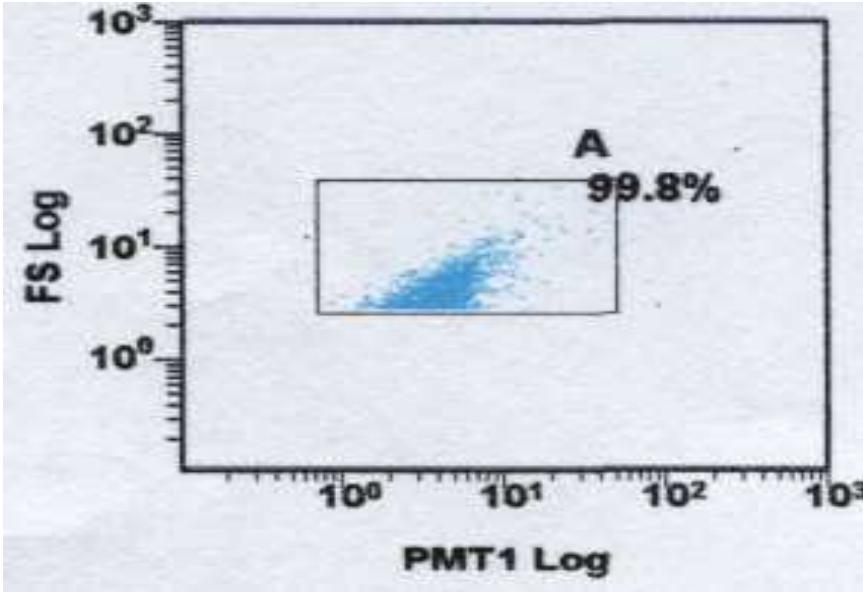
Trombosit aktivasyon parametreleri ise akım sitometri yöntemi ile çalışıldı. Fiksasyon işleminden sonra trombosit izolasyonu için numune 2000 G'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst kısmı (süpernatant kısım) başka bir tüpe alındı. Alınan kısım 4000 G'de 10 dakika santrifüj edilip, üst kısmı atıldı ve alt kısmı alındı. Son alınan numuneye 'sequestrin buffer' ile dilüsyon yapıldı. Dilüsyonlu materyal tekrar 4000 G'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında numunenin üst kısmı atılarak altta kalan örnekler oda ısısında karıştırılmadan 30 dakika süre ile inkübe edildi. Daha sonra 500 µL fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile sulandırılarak akım sitometride analiz edildi. Akım sitometrisi BECKMAN COULTER EPICS ALTRA cihazında yapıldı. Cihaz 15 W argon iyon lazeri ile donanmış ve 488 nm dalga boyunda çalışmaktaydı. Fluorescein izotiyosiyanat floresan 525 band geçişli, Fikoeritrin (PE) floresan ise 575 band geçişli filtre kullanılarak gösterildi. Cihazın floresan ve yan saçılım için kalibrasyonu her gün 10 µm akım kontrollü kalibrasyon boncukları kullanılarak yapıldı. Kan örnekleri saniyede ortalama 10.000 trombosit geçecek akım hızında lazer akımına maruz bırakıldı. Yan saçılım ve floresan verileri logaritmik modda voltaj ve kazanç ayarlamaları ile elde edildi.

Her monoklonal antikor için ayrı ayrı hazırlanan polipropilen tüplere yaklaşık 100.000 hücre konuldu. Üzerine, aşağıdaki kitlerden;

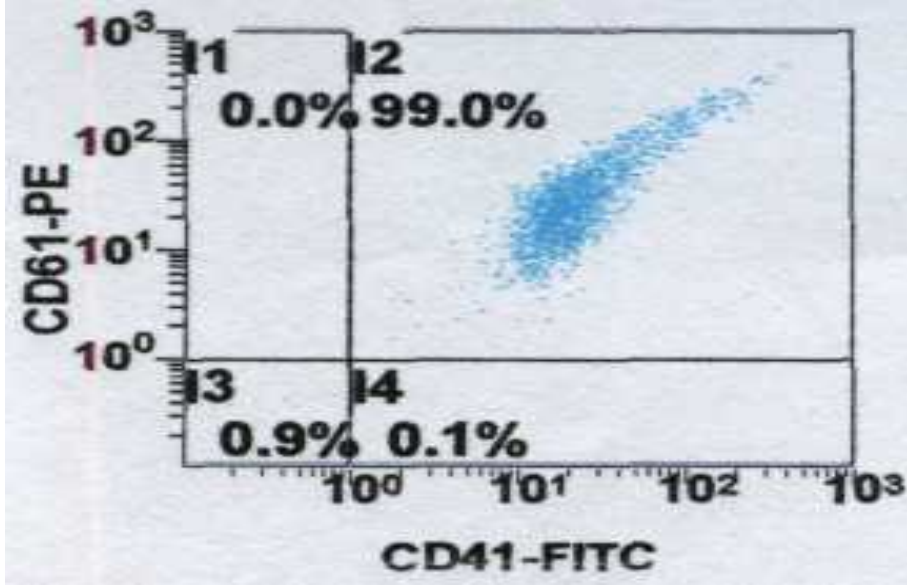
- CD 41 (GP IIb) (MHCD4101 FITC 100 T) CALTAG LABORATORIES (Code No: MG101)
- CD 42b (MHCD42b01 FITC 100T) CALTAG LABORATORIES (Code No: MG101)
- CD 61 (GP IIIa) (MHCD6101 FITC 100 T) CALTAG LABORATORIES (Code No: F0803)
- CD 62P (P-Selektin) (R-PE 120 T) ANCELL Immunology Research Products (Code No: 252-051)
- CD 63 (R-PE 120 T) ANCELL Immunology Research Products (Code No: 215-R50)
- Mouse İmmunoglobulin G1 (IgG₁) (FITC Negatif izotip) CALTAG LABORATORIES (Code No: MG101)
- Mouse İmmunoglobulin G1 (IgG₁) (RPE Negatif izotip) CALTAG LABORATORIES (Code No:MG104) monoklonal antikorlar ve immunglobulin

G1 izotipik kontrolden 10 µL ilave edildi.

Trombositler; 'forward scatter' ve 'side scatter' histogramından geçirilerek mikropartikül eradikasyonu uygulandı. Trombositler light scatter (ışık saçılım) paternlerine göre tanındı. Forward scatter (öne saçılım parametresi; hücrelerin boyutu hakkında bilgi veren parametre) ve side scatter (yana saçılım parametresi; hücrelerin granül içeriği hakkında bilgi veren parametre) dâhil tüm parametreler logaritmik modda düzenlendi. CD 41b (GP IIb) trombosit spesifik monoklonal antikor olarak kullanıldı. LFS/LSS histogramında trombosit oldukları düşünülen bölgeye kapı alındıktan sonra CD 41 pozitiflik yüzdesi ile alınan kapının uygunluğu tespit edildi (Şekil 6). Tespit edilen kapıda %90-98 oranında trombosit bulunmasına özen gösterildi. Trombosit aktivasyonunu belirlemek için, CD41-CD61 ve CD63-CD62 monoklonal antikorları kullanıldı (Şekil 7, 8, 9). Sonuçlar, antikor pozitif trombosit yüzdesi olarak verildi.



Şekil 6: Trombosit Kapı Alma işlemine Ait AS Histogram Örneği



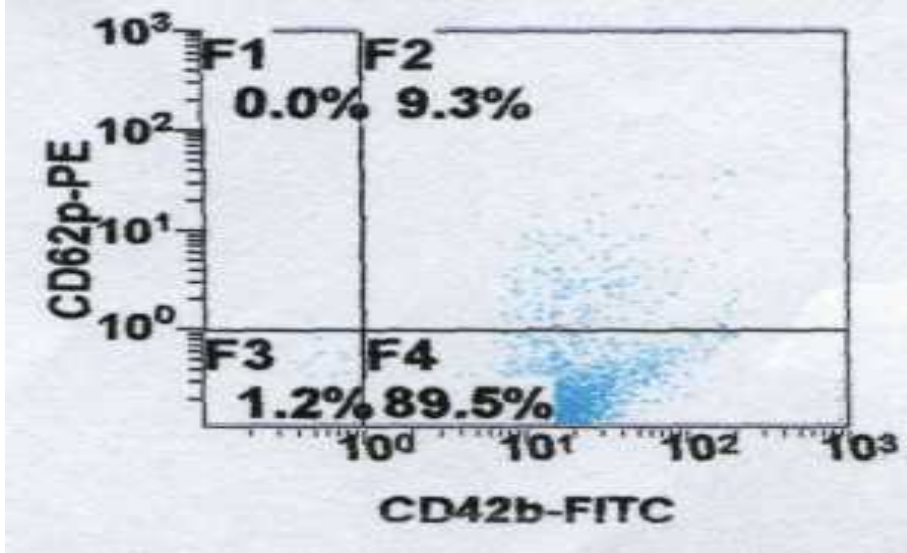
Şekil 7: CD 62 Antikoruna Ait AS Histogram Örneği

I1 alanı: Sadece CD61 ile işaretlenen hücreleri (% 0.0),

I2 alanı: CD41 ve CD61 ile işaretlenen hücreleri (% 99.0),

I3 alanı: CD41 ve CD61 ile işaretlenmeyen hücreleri (% 0.9),

I4 alanı: Sadece CD41 ile işaretlenen hücreleri (% 0.1) göstermektedir.



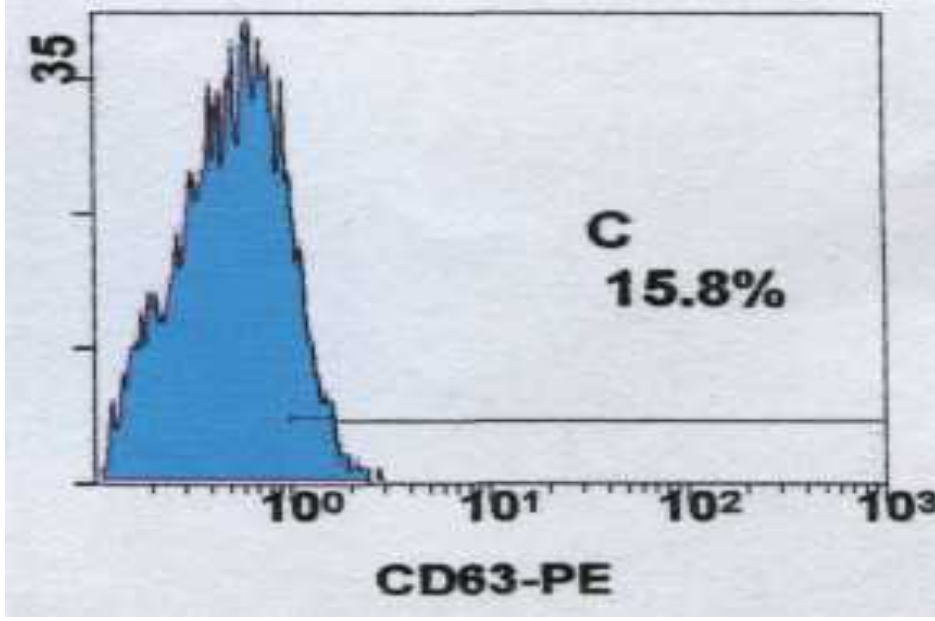
Şekil 8: CD 62p Antikoruna Ait AS Histogram Örneği

F1 alanı: Sadece CD62p ile işaretlenen hücreleri (% 0.0),

F2 alanı: CD42b ve CD62p ile işaretlenen hücreleri (% 9.3),

F3 alanı: CD42b ve CD62p ile işaretlenmeyen hücreleri (% 1.2),

F4 alanı: Sadece CD42b ile işaretlenen hücreleri (% 89.5) göstermektedir.



Şekil 9: CD 63 Antikoruna Ait AS Monohistogram Örneği

Glikolize hemoglobin (HbA_{1c}): EDTA'lı tüpe alınan venöz kan örneklerinden enzimatik yöntemle ve COBAS MIRA cihazı ile çalışıldı. Sonuçlar % olarak verildi.

Trombosit sayımları: Trombosit sayımı her çalışılan kan örneğinde eş zamanlı olarak çalışıldı. EDTA'lı venöz taze tam kan örnekleri kullanılarak BECKMAN-COUNTEL LH 700 kan sayım cihazında yapıldı.

İstatistiksel Değerlendirme:

İstatistikler Windows uyumlu SPSS[®] (Statistical Package for the Social Sciences) 13.0 ile yapıldı. Gruplar oluşturulurken kesim noktaları (cut-point, cut off) oluşturulmasında ROC eğrisi (Receiver operating characteristics curve) yöntemi kullanıldı. Grupların dağılımları n<30 olan gruplarda “Kolmogorov-Smirnov testi” ile değerlendirildi. Gruplardan normal dağılım gösterenlerden istatistiksel karşılaştırma için parametrik testlerden t-testi, normal dağılım göstermeyenlerde ise ‘Mann-Whitney U testi’ kullanıldı. Korelasyon analizlerinde normal dağılım göstermediği için ‘Spearman korelasyon analizleri’ kullanıldı. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık için p<0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

IV - BULGULAR

Çalışmaya alınan 34-72 yaş arası toplam 70 tip 2 DM'li hastanın 43'ü erkek (%61.42), 27'si kadın (%39.58) ve kontrol grubu olarak 17 sağlıklı erişkinin yaşları 39-65 arasında olup, bunların 15'i erkek (%87.77), 2'si kadın (%13.33) idi. Hasta grubundakilerin ortalama yaşları 50.57±8.33 yıl, sağlıklı kontrollerin ise 49.06±8.06 yıl olarak tespit edildi. Hastaların diyabet süreleri 1-288 ay arasında değişmekte olup, ortalama diyabet süreleri ise 58.20 ± 56.64 ay olarak saptandı. Ortalama HbA_{1c} düzeyleri DM'li grupta %9.05 ±2.58 olup, kontrol grubunda %5.98±0.44 olarak tespit edildi. Trombosit sayısı DM'lilerde (249.94 ± 57.45) 10³/μL, sağlıklı grupta ise (254.60±47.72) 10³/μL olarak saptandı. Hasta ve kontrol grubuna ait bulgular ortalama ± standart sapma (X ± SD) olarak verilmiştir. Çalışma gruplarına ait verilerin ve trombosit aktivasyon göstergelerinin ortalama değerleri Tablo 10 ve 11'de verilmiştir.

Tablo 10: Tip 2 DM'li Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Bulgular

	Diyabet	Kontrol	P
Vaka sayısı (n)	70	17	-
Cinsiyet	43 erkek, 27 kadın	15 erkek, 2 kadın	p <0.05
Diyabet süresi (ay)	58.20 ± 56.64	-	-
BMI (Kg/m²)	29.04±3.89	25.75±3.29	p>0.001
Yaş (yıl)	50.57±8.33	49.06±8.06	p <0.05
Trombosit (10³/μL)	249.94 ± 57.45	254.60±47.72	p <0.05
HbA_{1c} (%)	9.05 ±2.58	5.98±0.44	p>0.001
Total Kolesterol(mg/dl)	194.23±40.64	192.06±27.72	p <0.05
Trigliserit (mg/dl)	184.10±94.36	176.06±105.46	p <0.05
LDL-K (mg/dl)	117.11±36.23	112.63±28.79	p <0.05
HDL-K (mg/dl)	41.16±9.13	43.54±12.61	p <0.05
Beyaz Küre (10³/μL)	7.55±1.48	7.26±2.53	p <0.05
Sedimentasyon (mm/h)	10.93±5.99	11.06±4.87	p <0.05

BMI: Vücut Kitleİndeksi **LDL-K:** Düşük dansiteli lipoprotein-Kolesterol

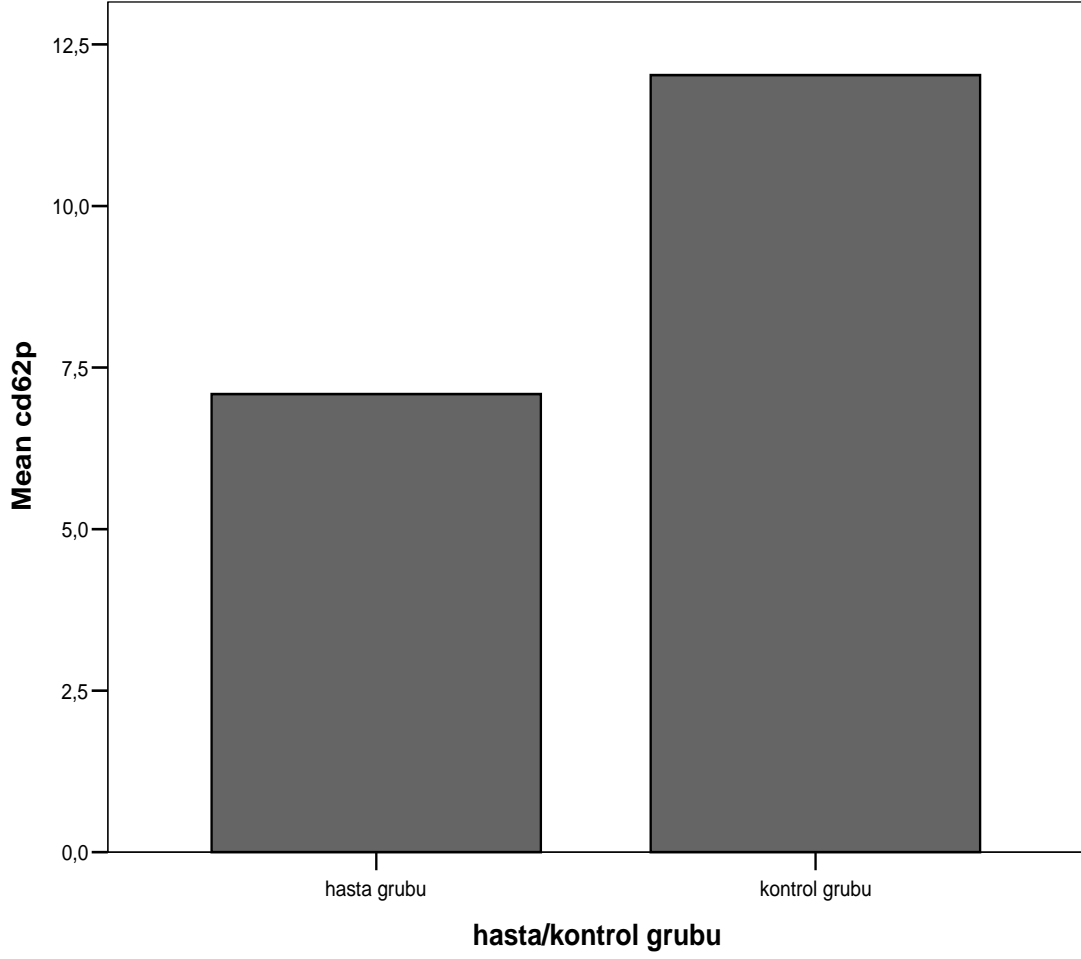
HDL-K: Yüksek dansiteli lipoprotein-Kolesterol

Hasta ve kontrol grubunun ortak parametreleri olan cinsiyet, yaş ve trombosit sayısı, total kolesterol, trigliserit, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, beyaz küre ve sedimantasyon arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($0.05 > p$). BMİ açısından bakıldığında ise gruplararası dağılım farklı (Two Sample Kolmogorov-Smirnov Z testi Sig-two-tailed $p=0.012$) olduğu için yapılan non-parametrik Mann-Whitney U (sig-two tailed) testte gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p > 0.001$). Hasta ve kontrol grubunun trombosit aktivasyon parametreleri Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11: Tip 2 DM’li Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Trombosit ve Aktivasyon Göstergeleri

Parametre	Diyabet (n: 70)	Kontrol (n: 17)	P
CD61 (%)	95.26±5.42	92.98±9.22	$p > 0.05$
CD62p (%)	7.09±11.16	12.02±15.66	$p > 0.05$
CD41 (%)	95.78±4.95	94.30±7.97	$p > 0.05$
CD42b (%)	94.71±7.69	91.90±9.87	$p > 0.05$
CD63 (%)	29.10±14.90	25.17±7.59	$p > 0.05$

Tip 2 DM’li hastalar ile aynı yaş grubundaki sağlıklı gönüllülerin trombosit aktivasyon göstergeleri karşılaştırıldığında; CD41, CD61, CD62p, CD63 ve CD42b gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermedi ($p > 0,05$). Ortalama CD62p değeri kontrol grubunda DM’lilere göre daha yüksek bulundu fakat istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (Şekil 10).



Şekil 10: Tip 2 DM’li ve Kontrol Grubunun ortalama CD62p değerleri

Hasta grubunda diyabet süresi, HbA_{1c} ile diğer parametreler arasındaki korelasyonlar Tablo 12’de verilmiştir.

Tablo 12: Tip 2 DM'li Hasta Grubunda Bulgular Arasındaki Korelasyonlar

	r	p
➡ Diyabetin süresi ile Hb arasında negatif korelasyon	0.325	0.006
➡ Diyabet süresi ile CRP arasında pozitif korelasyon	0.408	0.001
➡ Diyabet süresi ile Sedimantasyon arasında pozitif korelasyon	0.408	0.000
➡ Diyabetin süresi ile HbA _{1c} düzeyi arasında pozitif korelasyon	0.471	0.000
➡ HbA _{1c} ile yaş arasında pozitif korelasyon	0.254	0.035
➡ HbA _{1c} ile CRP arasında pozitif korelasyon	0.367	0.003
➡ HbA _{1c} ile CD62P arasında negatif korelasyon	0.237	0.049
➡ HbA _{1c} ile mikroalbuminüri arasında pozitif korelasyon	0,234	0,050

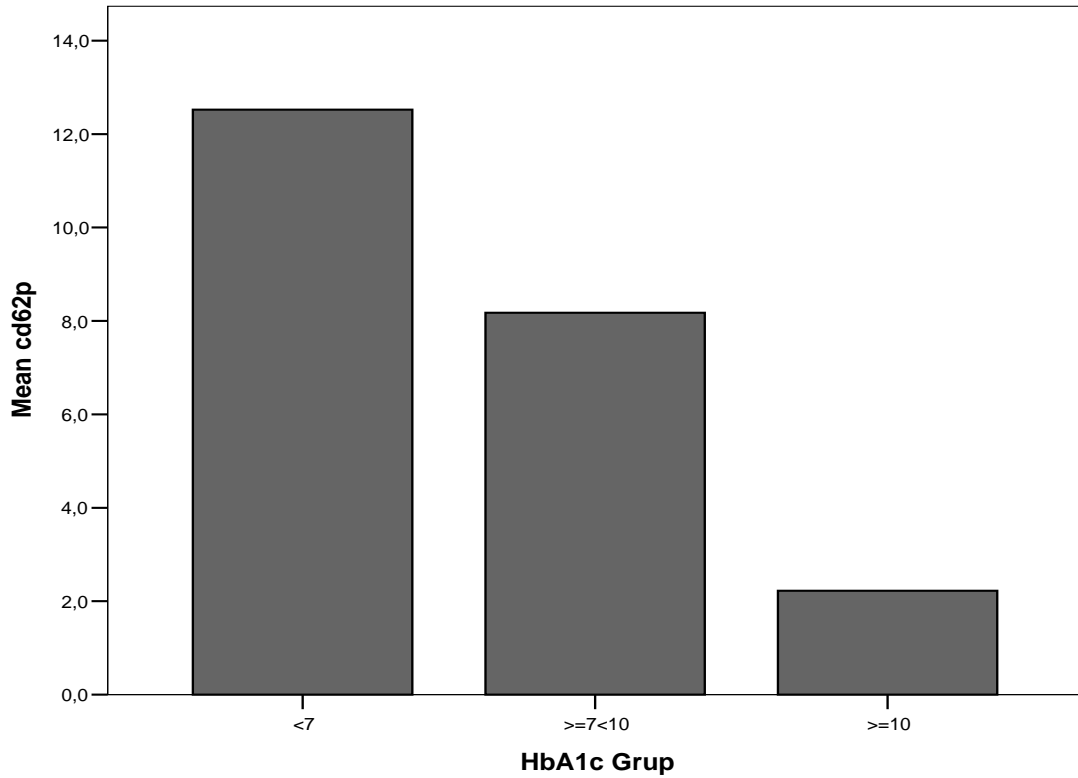
Tip 2 DM'li hastalar HbA_{1c} düzeylerine göre 3'e gruplandırıldığında;

HbA_{1c} göre 3 grup yapıldığında, trombosit ve aktivasyon göstergelerine bakıldığında; CD41, CD61, CD63 ve CD42b ve yaş açısından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p>0,05$). CD62p açısından ise grup 1 ve grup 3'de istatistiksel olarak (One-Way Anova-LSD) anlamlı farklılık vardı ($p=0.007$) (Şekil 11). DM süre açısından ise üç grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0.001$). Sonuçlar Tablo 13'te verilmiştir.

Tablo 13: HbA_{1c} düzeylerine göre 3 grubun karşılaştırması

	Grup I (n: 15)	Grup II (n: 34)	Grup III (n: 20)
Yaş (yıl)	48.61±8.14	50.18±7.79	53.25±9.53
DM Süresi (ay)	28.87±31.80	46.65±41.22	101.55±70.70
HbA_{1c} (%)	6.41±0.70	8.15±0.87	12.50±1.75
CD41 (%)	94.01±5.44	96.45±4.93	96.15±3.99
CD61 (%)	93.88±5.95	95.17±6.27	96.09±4.05
CD62p (%)	12.52±14.65	8.17±12.52	2.22±2.61
CD63 (%)	30.25±14.84	30.39±16.26	25.50±11.35
CD42b (%)	91.83±9.99	94.63±9.54	96.12±4.04

Grup I: HbA_{1c} düzeyleri % 7'nin altında olan hastalar: HbA_{1c} düzeyleri % 7'nin altında olan toplam 15 hasta bu gruba alındı. **Grup II:** HbA_{1c} düzeyleri \geq % 7 ve üstünde < %10 olan hastalardan oluşmaktaydı ve toplam 34 hasta bu gruba alındı. **Grup III:** HbA_{1c} düzeyleri \geq % 10 ve üstünde olan hastalardan oluşmaktaydı ve toplam 20 hasta bu gruba alındı.



Şekil 11: Hastaların Kontrol HbA_{1c} düzeylerine göre 3 grubun CD62p düzeyleri

Tip 2 DM'li hastalar, diyabet sürelerine göre 3 gruba ayrıldığında:

DM süreye göre grupların BMI açısından ve yaş açısından tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu. HbA_{1c} açısından ise grup I ve grup III'de ve grup II ve grup III arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı (sırasıyla p=0,007 ve p=0,015). Trombosit ve aktivasyon göstergelerine bakıldığında; CD41, CD61, CD62p, CD63 ve CD42b açısından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu (p>0,05) (Tablo 14).

Tablo 14: DM süreye göre 3 grubun karşılaştırması

	Grup I (n: 16)	Grup II (n: 29)	Grup III (n: 25)	P
Yaş (yıl)	49.38±8.23	49.38±7.60	52.72± 9.07	p>0.05
DM Süresi (ay)	1.81±1.68	24.33±4.51	114.44±52.48	p =0.000
HbA _{1c} (%)	7.97±2.35	8.48±1.92	10.38±2.87	α =0.007 β =0.015
Trb (10 ³ /μL)	247.0±67.21	249.46±53.79	252.36±57.12	p>0.05
CD41 (%)	95.25±3.96	95.52±6.17	96.41±3.94	p>0.05
CD61 (%)	95.36±3.25	94.57±7.10	96.03±4.07	p>0.05
CD62p (%)	9.19±13.52	7.89±12.25	4.80±7.70	p>0.05
CD63 (%)	26.59±13.13	28.87±15.32	30.97±15.88	p>0.05
CD42b (%)	94.57±5.12	93.33±10.49	96.47±3.93	p>0.05

α : Grup I-III arasında β: Grup II-III arasında Trb: Trombosit **Grup I:** Yeni tanı DM: Diyabet tanısı 6 aydan daha az olan 16 hasta bu gruba alındı. **Grup II:** Diyabet süreleri 6 ay/ayın üzerinde 60 aydan az 29 hasta bu gruba alındı. **Grup III:** Diyabet süreleri 60 ay ve üstünde 25 hasta bu gruba alındı.

Tip 2 DM'li hastalar, BMI'ya göre 3 gruba ayrıldı:

BMI'ya göre grupların DM süre, HbA_{1c} açısından ve yaş açısından tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu. Grup I ile Grup III arasında BK açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı. Yine Grup I ile Grup III arasında

CD42b ve trombosit sayıları arasında sınırda bir anlamlılık vardı (Tablo 15). Trombosit ve aktivasyon göstergelerine bakıldığında; CD41, CD61, CD62P, CD63 ve CD42b açısından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p>0.05$). Tablo 15’de hastaların özellikleri verilmiştir.

Tablo 15: BMİ’ye göre grupların karşılaştırılması

	Grup I (n: 5)	Grup II (n: 37)	Grup III (n: 28)	P
Yaş (yıl)	43.80±4.71	51.16±8.06	51.00±8,84	$\gamma >0.05$
DM Süresi (ay)	86.0±84.80	56.54±45.55	55.43±64.90	$\gamma >0.05$
HbA_{1c} (%)	10.24±2.66	8.91±2.50	9.03±2.70	$\gamma >0.05$
Trb (10³/µL)	304.60±44.89	237.75±47.65	255.86±65.45	$\alpha =0.055$
B.K (10³/µL)	9.20±1.06	7.34±1.57	7.53±1.26	$\alpha =0.037$
Tg(mg/dl)	109.0±17.63	189.56±113.69	190.50±67.06	$\alpha =0.041$
CD41 (%)	96.47±1.02	95.48±5.73	96.15±4.26	$\gamma >0.05$
CD61 (%)	89.75±13.03	95.32±5.34	95.97±3.48	$\gamma >0.05$
CD62p (%)	16.44±18.32	5.83±9.88	7.07±10.95	$\gamma >0.05$
CD63 (%)	26.42±6.22	30.69±16.59	27.47±13.78	$\gamma >0.05$
CD42b (%)	82.52±18.98	94.88±6.93	96.30±4.30	$\alpha =0.056$

α : Grup I-III arasında γ : tüm gruplar arası **BK**: Beyaz küre **Tg**: Trigliserit **Trb**: Trombosit **Grup I**; BMI <25 olan 5 hasta bu gruba dâhil edildi. **Grup II**: BMI \geq 25 ve <30 olan 37 hasta bu gruba dâhil edildi. **Grup III**: BMI \geq 30 olan 28 hasta bu gruba dâhil edildi.

Tip 2 DM’li hastalar, sigara içimine göre 3 gruba ayrıldığında:

DM süresi, yaş, BMI, HbA_{1c} ve trombosit sayısı açısından tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu. Trombosit ve aktivasyon göstergelerine bakıldığında; CD41, CD61, CD62P, CD63 ve CD42b açısından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p>0,05$). Hastaların sigara içme süreleri paket/yıl hesaplanarak tespit edildi. Hasta verileri Tablo 16’te gösterilmiştir.

Tablo 16: Sigara içimine göre grupların karşılaştırılması

	Grup I (n: 40)	Grup II (n: 18)	Grup III (n: 12)
Yaş (yıl)	50.76±8.95	49.72±7.58	51.54±8.16
Sigara (paket/yıl)	-	20.13±13.84	22.00±12.19
DM Süresi (ay)	62.95±65.86	42.83±44.70	63.62±41.61
HbA_{1c} (%)	9.28±2.80	8.67±2.20	9.11±2.46
Trombosit (10³/µL)	255.37±61.31	250.65±55.34	230.15±48.86
CD41 (%)	96.48±3.92	95.30±6.52	94.79±5.39
CD61 (%)	95.61±5.50	95.16±5.79	94.89±4.98
CD62P (%)	9.07±12.80	4.45±9.87	5.33±6.62
CD63 (%)	31.02±16.39	24.03±12.60	30.07±13.26
CD42b (%)	95.09±8.21	94.46±7.89	94.15±6.59

Grup I: Hiç sigara içmemiş 38 hasta bu gruba alındı. **Grup II:** Halen sigara içmekte olan 18 hasta bu gruba alındı. **Grup III:** Sigarayı terk etmiş 14 hasta bu gruba alındı.

Tip 2 DM’li hastalar, tedavi rejimine göre 3 gruba ayrıldığında:

DM süresi, yaş, BMI, HbA_{1c} ve trombosit sayısı açısından tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu. Trombosit ve aktivasyon göstergelerine bakıldığında; CD41, CD61, CD62P, CD63 ve CD42b açısından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu (p>0.05). Hasta verileri Tablo 17’de gösterilmiştir.

Tablo 17: Tedavi rejimine göre grupların karşılaştırılması

	Grup I (n: 38)	Grup II (n: 18)	Grup III (n: 14)
Yaş (yıl)	49.75±8.72	50.11±7.88	53.90±9.70
DM Süresi (ay)	16.00±23.97	59.61±46.91	119.50±76.02
HbA_{1c} (%)	8.56±2.69	8.63±2.30	11.66±2.18
Trombosit (10³/µL)	236.44±67.18	258.05±47.91	236.70 ±76.64
CD41 (%)	95.58±3.94	96.09±5.28	94.85±5.34
CD61 (%)	95.98±3.33	95.14±6.10	94.63±5.40
CD62P (%)	9.23±14.03	7.53±10.99	1.70±2.73
CD63 (%)	25.00±14.32	31.73±15.51	24.11±11.37
CD42b (%)	95.66±4.01	94.15±9.21	95.66± 4.35

Grup I; ilaçsız sadece diyet, egzersiz ve yaşam tarzı değişikliği ile izlenen 16 hastadan oluşmaktaydı. **Grup II**; oral anti-diyabetiklerden bir veya bir kaçından kullanan 44 hastadan oluşmaktaydı. **Grup III**; yalnızca insülin ve/veya birlikte oral anti-diyabetiklerden bir veya bir kaçından kullanan 10 hastadan oluşmaktaydı.

V - TARTIŞMA

Diabetes Mellitus, hiperglisemi ile karakterize, karbonhidrat, protein ve lipit metabolizmalarının bozukluğu ile seyreden, kronik ve progresif bir hastalıktır. Kronik süreçte hastalık hemen hemen tüm sistemleri etkilemektedir. Etkilenen sistemlerin en önemlilerinden biri de hemostaz ve koagülasyon olup diyabetlilerin yaşam süresini azaltan ve kardiyovasküler olay riskini artıran en hassas sistemdir. Bu sistemin içinde de trombositler çok kritik bir öneme sahiptir. Zamanla tromboembolik komplikasyonların daha iyi anlaşılmasıyla trombositler daha da önem kazanmıştır. Buna bağlı olarak tip 2 DM'ye bağlı gelişen komplikasyonların önlenmesi veya en aza indirgenebilmesi için trombosit aktivasyonu ile ilgili mekanizmaların açığa kavuşturulması gerekmektedir.

DM'li hastalarda trombosit aktivasyonu ile ilgili özellikle son yirmi yılda tekniğin de ilerlemesi sayesinde DM'li hastalarda trombosit aktivasyonu ile ilgili olarak birçok çalışma yapılmıştır. Glikoz verilen hastalarda trombosit yapışkanlığının arttığı gösterilmesi ile DM'li hastaların trombositlerinin stimulan ajanlara karşı hassas olduğu ve sağlıklı insanlara göre trombosit aktivasyonunun arttığı tespit edilmiştir (76, 77).

Trombosit aktivasyonunun artması, sebebi ne olursa olsun birçok doku ve organa zarar vermektedir. Aktivasyonun basamakları ise; trombosit adhezyon, agregasyon ve sekresyonunda artış ve trombüs formasyonunun oluşumu, sitotoksik reaktif oksijen radikallerinin oluşumu, trombosit ve endotel kaynaklı büyüme faktörlerinin artmış salınımı, endotelial disfonksiyon ve vasküler düz kas proliferasyonu sayılabilir (83). Trombositin aktive olmasıyla trombosit granüllerinden birçok vasoaktif madde salınmakta ve endotelle etkileşmektedir.

Preeklemside, aktif inflamatuvar barsak hastalığı olanlarda, akut miyokard infarktüsünde, inmede, pulmoner tromboembolide, periferik vasküler hastalıkta, kardiyopulmoner bypassda, diyabetik mikroanjyopatide, homozigot β talasemide ve migren gibi çeşitli patolojik durumlarda trombositlerin aktive olduğu gösterilmiştir (41, 42, 43, 58, 62, 73).

Çalışmamızda CD62p düzeyi tip 2 DM'li hastalarda, kontrol grubuna göre daha düşük saptandı fakat sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu sonuçlar istirahat (bazal) trombosit aktivasyon potansiyelinin tip 2 DM'li hastalarda artmadığını göstermektedir. Glisemik kontrolü kötü ($HbA1c \geq \%10$) olanlarda CD62p oranı, iyi glisemik kontrolü ($HbA1c < \%7$) olanlardan anlamlı olarak daha düşük saptandı. CD62p

ekspresyonu, glisemik kontrol (HbA_{1c}) ile ise negatif korelasyon göstermiştir ($r=0.237$, $p=0.049$). Literatürde bizim sonuçlarımıza benzer ve farklı sonuçlar bulunmaktadır. Örneğin, tip 1 DM'lilerde yapılan çalışmalardan, Rauch ve arkadaşları (86) CD62p ve trombospondin göstergelerini akım sitometri yöntemi ile incelemişler ve sonuçta bu göstergelerin salınımının mikroanjyopatili diyabetik olgularda azaldığını, bunun da trombosit yüzey göstergelerinin artmış tüketimine bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Hilberg ve arkadaşları (87) 16 tip 1 DM'li hastada yaptıkları çalışmada bazal CD62p düzeyinin artmadığını, ancak trombin reseptör aktive edici peptid ile uyarıldıktan sonra arttığını gözlemlemişlerdir. Hu ve arkadaşları (88) ise 15 tip 1 DM'li hastada yaptıkları çalışmada bazal CD62p ekspresyonunun artmadığını, ADP ve trombin ile uyarı sonrasında CD62p ekspresyonunun belirgin olarak arttığını ayrıca trombosit ve lökosit aktivasyonunun egzersiz ile arttığını göstermişlerdir. Yine, yeni yapılan Aslan'ın yaptığı çalışmada, 36 tip 1 DM'li hastalarla, kontrol grubu karşılaştırıldığında; tip 1 DM'li hastalarda CD62p düzeyinin ADP ile uyarı sonrasında belirgin olarak arttığı, ancak bazal CD62p düzeylerinin hastalarda daha düşük olduğu fakat kontrol grubu arasında farklılık göstermediğini tespit ettiler (89).

Literatürde aktivasyon markerlarının arttığına yönelik çalışmalar da mevcuttur. Örneğin, Nomura ve arkadaşları (90) 76 tip 2 DM'li hastada yaptıkları çalışmada, CD62'nin de bulunduğu, trombosit aktivasyon göstergelerinin hiperlipidemik tip 2 DM'li hastalarda, kontrol grubuna ve diyabetik olmayan hiperlipidemik hastalara göre daha yüksek olduğunu ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiğini bulmuşlardır. Keating ve arkadaşları (91) 21 tip 2 DM'li hastada yaptıkları çalışmada yüksek glukoz konsantrasyonlarının CD62p ekspresyonunu ve CD41/CD61'in aktivasyonunu arttırdığını göstermişler ve ADP ile uyarı sonrası P-selektin ekspresyonunun ve CD41/CD61 aktivasyonunun daha çok arttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, α granül sekresyon eşiğinin hiperglisemiye bağlı değiştiğini bildirmişlerdir. Shouzu ve arkadaşları (92) 73 DM'li hastada yaptıkları çalışmada trombosit tiklopidin öncesi CD62 ve CD63 düzeylerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda, diyabetli olma süresine göre gruplandırmalar yapıldığında, süre ile HbA_{1c} arasında pozitif korelasyon vardı fakat trombosit aktivasyon göstergeleri arasında anlamlı ilişki yoktu. Olguları diyabet sürelerine göre karşılaştırdığımızda diyabet süresi uzun olan olguların; yaşlarının daha büyük olduğu saptandı. Literatürde de diyabetin komplikasyonlarının gelişmesinde en güçlü risk faktörü olarak diyabetli

olma süresi gösterilmektedir (30, 67, 90, 93).

DM'li hastalarda hipergliseminin standart ve güvenilir göstergesi HbA_{1c} değeri ile doğrulanmaktadır (67). İyi metabolik kontrolün diyabetin komplikasyonlarının oluşumunu ve ilerlemesini yavaşlattığı bugün artık tartışmasız olarak kabul edilmektedir. 'United Kingdom Prospective Diabetes Study' (UKPDS) çalışmasında diyabetli hastalarda, iyi metabolik kontrol ile diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarının anlamlı olarak düştüğü tespit edilmiştir (94).

Nomura ve arkadaşları (90) 23 tip 2 DM'li hastada yaptıkları çalışmada trombosit aktivasyon işaretlerinin hiperlipidemik tip 2 DM'li hastalarda daha yüksek olduğunu gözlemişlerdir. Fakat bizim çalışmamızda hastalarımızın kontrol grubu ve kendi aralarında karşılaştırdığımızda hiperlipidemi açısından trombosit aktivasyon işaretlerinde anlamlı değişiklik saptamadık.

Çalışmamızda tip 2 DM'li hastalarda bazal CD63, CD42b, CD61 düzeylerinin tip 2 DM'li hastalarda HbA_{1c} düzeylerine göre gruplandırıldığında artmaması, hiperglisemik etkinin bu göstergeleri zaten yeterli düzeyde artırmış olmasına bağlandı. Bunun diğer bir nedeninin de trombosit izolasyonunda santrifüj yöntemi uygulanmasına sekonder olabileceği düşünüldü (85). Trombositlerdeki bu durum;

1. Aktive olan CD62'nin yarılanma ömrünün kısa olması ve tüketiminin hızlı olmasına,
2. Trombosit yüzeyindeki glikoprotein reseptörlerinin değişimine,
3. Trombosit yüzeylerinde bulunan ve adhezyonu sağlayan protein reseptörleri ile glikoproteinlerin iletişim bozukluklarına,
4. Membran akışkanlığında azalma, trombosit metabolizmasında bozulmaya,
5. Trombosit içi sinyal iletim yollarında meydana gelen değişikliklere, bağlı olabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak, trombosit aktivasyon işaretçilerinden CD62p'nin kontrol grubundan daha düşük olması ve glisemik kontrolün göstergesi olan HbA_{1c} ile negatif korelasyon göstermesi, özellikle kötü kontrollü tip 2 DM'li hastalarda trombosit fonksiyon bozukluğuna işaret edebilir.

VI - SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar şöyle sıralanabilir:

1. Tip 2 DM'li hastalarda bazal trombosit aktivasyon markeri CD62p düzeyi, kontrol grubuna göre daha düşük oranda bulundu.
2. Kötü metabolik kontrolün, tip 2 DM'li hastalarda (trombosit kullanımını artırarak) bazal P-selektin (CD62) değerini azalttığı bulundu.
3. Tip 2 DM'li hastalarda HbA_{1c} ile CD62P değeri arasında negatif korelasyon olduğu bulundu.
4. Tip 2 DM'li hastalar diyabet sürelerine göre karşılaştırıldığında, hastalık süresi uzun olan vakaların HbA_{1c} düzeylerinin arttığı bulundu.
5. HbA_{1c} ile yaş arasında pozitif korelasyon olduğu bulundu.
6. Diyabet süresi ile CRP arasında pozitif korelasyon olduğu bulundu.
7. HbA_{1c} ile mikroalbüminüri arasında pozitif korelasyon olduğu bulundu.
8. Diyabet süresi ile sedimantasyon arasında pozitif korelasyon olduğu bulundu.
9. Diyabetin süresi ile Hb arasında negatif korelasyon olduğu bulundu.

ÖZET

Tip 2 diyabetes mellituslu hastalarda bazal trombosit aktivasyonunun glisemik kontrol ile ilişkisi

Amaç: Biz bu çalışmada, glisemik kontrolle tip 2 DM'li hastalardaki bazal trombosit aktivasyon göstergeleri ile olan ilişkisini ve sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılmasını amaçladık. Aktivasyon göstergelerinin HbA_{1c} düzeyi, diyabet süresi, sigara içimi, hiperlipidemi, hipertansiyon, BMİ ve tedavi rejimi ile arasındaki ilişkisi incelendi.

Materyal Metod: Çalışmaya, daha önce antikoagülan ve/veye trombositleri etkileyecek (aspirin, varfarin, steroid veya non-steroid antiinflamatuvar ilaç vb.) ilaç almamış 70 tip 2 diyabetik hasta ve 17 sağlıklı gönüllü alındı. Trombositlerin aktive olamaması için kan örnekleri 19 gauge çaplı iğnelerle alındı ve antikoagulan olarak sitrat kullanıldı. Ölçümler için trombosit aktivasyonunda spesifik ve sensitif olduğundan akım sitometrisi yöntemi kullanıldı. Çalışmada trombosit spesifik göstergesi olarak CD41 monoklonal antikoru, trombosit aktivasyon göstergesi olarak, CD42b,CD61, CD63 ve CD62'ye karşı geliştirilmiş monoklonal antikolar kullanıldı.

Bulgular: Çalışmamızda, aktivasyon göstergeleri ile diyabet süresi, sigara içimi, hiperlipidemi, hipertansiyon, BMİ ve tedavi rejimi ile arasındaki anlamlı ilişki bulunmadı. Diyabetiklerde bazal CD62p değeri kontrol grubuna göre daha düşüktü. Fakat bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi. Glisemik kontrolü kötü (HbA_{1c}≥%10) olanlarda CD62p oranı, iyi glisemik kontrolü (HbA_{1c}<% 7) olanlardan anlamlı olarak daha düşük saptandı.

Tartışma: Bulgularımız, azalmış trombosit aktivasyonunun özellikle glisemik kontrolü kötü olanlarda tip 2 DM ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Tip 2 DM, Trombosit aktivasyonu, CD62, CD41/CD61, CD63

SUMMARY

The effect of glisemic control on basal platelet activation in patients with type 2 diabetes mellitus

Aims: In this study, we aimed to evaluate the effect of glisemic control on basal platelet activation in patients with type 2 diabetes mellitus and to compare with healthy controls. The relations between platelet activation markers and HbA1c level, duration of diabetes, smoking status, hypertension, hyperlipidemia, BMI and treatment regimen were investigated.

Material and methods: Seventy type 2 diabetic patients who were not using anticoagulants and/or drugs affects platelets (aspirin, warfarin, steroids or non-sterid anti-inflammatory drugs etc.) and 17 healthy controls were included in the study. The blood samples were drawn with 19 gauge needle and citrate was used as an anticoagulant so that platelets did not activate by collecting and examining. A spesific and sensitive method of platelet activation, flow cytometry were used for the measurements. In the study, monoclonal antibody CD41 was used as specific platelet indicator and monoclonal antibodies formed against CD42b, CD61, CD63 and CD62p were used as platelet activation markers.

Results: In our study, there was no significant relation between activation markers and duration of diabetes, smoking status, hypertension, hyperlipidemia, BMI and treatment regimen. Basal level of CD62p was lower in diabetics than in control group. But these difference was not statistically significant. CD62p level was significantly lower in patients with poor glisemic control (HbA1c \geq %10) than in tight control (HbA1c $<$ % 7).

Conclusions: Our finding indicate that type 2 DM may associated with decreased basal platelet activation, especially in patients with poor glisemic controls.

Keywords: Type 2 DM, Platelet activation, CD62, CD41/CD61, CD63

REFERANSLAR

1. Erdoğan G. Klinik Endokrinoloji. ANTIP AŞ yayımları Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınlar, No:23, Ankara 2003; 201-231.
2. Satman I, Yilmaz T, Sengul A, Salman S, Salman F, Uygur S, Bastar I, Tutuncu Y, Sargin M, Dinccag N, Karsidag K, Kalaca S, Ozcan C, King H, the TURDEP Group: Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the Turkish Diabetes Epidemiology Study. *Diabetes Care* 2002; 25:1551–1556.
3. Gokcel A, Ozsahin AK, Sezgin N, Karakose H, Ertorer ME, Akbaba M, Baklaci N, Sengul A, Guvener N. High Prevalence of Diabetes in Adana, a Southern Province of Turkey *Diabetes Care* 2003; 26:3031-3034.
4. Kelestimur F, Cetin M, Pasaoglu H, Coksevrim B, Cetinkaya F, Unluhizarci K, Unal S, Koker AH. The prevalence and identification of risk factors for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in Kayseri, Central Anatolia, Turkey. *Acta Diabetol* 1993; 6:85–91.
5. Dinneen SF, Maldonado D 3rd, Leibson CL, Klee GG, Li H, Melton LJ 3rd, Rizza RA. Effects of changing diagnostic criteria on the risk of developing diabetes. *Diabetes Care*. 1998; 21(9):1408-13.
6. Bennett PH, Burch TA, Miller M. Diabetes mellitus in American (Pima) Indians. *Lancet* 1971; ii:125-8.
7. Zimmet PZ, Taft P, Guinea A et al. The high prevalence of diabetes mellitus on a Central Pacific island. *Diabetologia* 1977; 13:111-15.
8. Shaw JE, de Courten M, Boyko E, Zimmet PZ. Impact of new diagnostic criteria for diabetes on different populations. *Diabetes Care* 1999; 22:762-6.
9. Yudkin JS, Alberti KGMM, McLarty DS, Swai H. Impaired glucose tolerance. Is it a risk factor for diabetes or a diagnostic ragbag? *Br Med j* 1990; 301:397-401.
10. Mario UD, Pugliese G. Pathogenetic mechanisms of diabetic microangiopathy. *International Congress Series* 2003; 1253: 171-182.
11. Skrha J. Pathogenesis of angiopathy in diabetes. *Acta Diabetol* 2003; 40:324-329.
12. Abdella N, Salman A, Moro M. Classical microangiopathic diabetic complications in the absence of overt diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 1990;8:283-6.
13. American Diabetes Association. Consensus Development Conference on the diagnosis of coronary heart disease in people with diabetes. *Diabetes Care* 1998;21:1553-9.
14. Gu K, Cowie CC, Harris MI. Diabetes and decline in heart disease mortality in US adults. *J Am Med Assoc* 1999; 281:1291-7.
15. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T et al. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 339:229-34.
16. Miettinen H, Lehto S, Salomaa V et al. Impact of diabetes on mortality after the first myocardial infarction. *Diabetes Care* 1998; 21:69-75.
17. Balkau B, Bertrais S, Ducimetiere P, Eschwege E. Is there a glycemic threshold for mortality risk? *Diabetes Care* 1999; 22:696-9.

18. Coutinho M, Gerstein HC, Wang Y, Yusuf S. The relationship between glucose and incident cardiovascular events: a metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care* 1999; 22:233-10.
19. The DECODE study group on behalf of the European Diabetes Epidemiology Group. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. *Lancet* 1999;354:617-25.
20. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG et al, Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994; 331:1480-7.
21. Brovnlee M, Cerami A, Vıassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1988; 338:1315-21.
22. Greene DA, Lattimer SA, Sima AAF. Pathogenesis and prevention of diabetic neuropathy. *Diabetes Metab Res Rev* 1988; 4:201-21.
23. Bursell SE, Clermont AC, Aiello LP et al. High dose vitamin E supplementation normalizes retinal blood flow and creatinine clearance in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22:1245-51.
24. Bursell SE, King GL. Can protein kinase C inhibition and vitamin E prevent the development of diabetic vascular complications? *Diabetes Res Clin Pract* 1999; 45:169-82.
25. New JP, Marshall SM, Bilous RW. Renal auto-regulation is normal in newly diagnosed normotensive NIDDM patients. *Diabetologia* 1998; 41:206-11.
26. Mogensen CE. The kidney in diabetes: how to control renal and related cardiovascular complications. *Am J Kidney Dis* 2001; 37:S2-S6.
27. Weir MR. Diabetes and hypertension: how low should you go and with which drugs? *Am J Hypertens* 2001; 14:17S-26S.
28. Adler AI, Stratton IM, Neil HAW et al. on behalf of the UK Prospective Diabetes Study Group. Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications 40 of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *Br Med J* 2000; 321:412-19.
29. Klein R, Sharrett AR, Klein BE, Moss SE, Folsom AR, Wong TY et al. The association of atherosclerosis, vascular risk factors, and retinopathy in adults with diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Ophthalmology* 2002; 109 (7): 1225-34.
30. Yenigün M. Diabetik mikroanjyopati ve diabetik makroanjyopati. Her yönü ile diabetes mellitus kitabı. Editör: Yenigün M. 2. baskı, Nobel tıp kitapevi. İstanbul- 2001; 318-375.
31. Hattat N. Diyabet Retinopatisinin Etiyopatogenezi. *Oftalmoloji* 1993; 2 (1): 13-15.
32. Efe B. Diabetik nöropati patogenezi. *Diabet Bilimi* 2003; 4 (1): 119-128.
33. Vinik AI, Freeman R, Erbas T. Diabetic autonomic neuropathy. *Semin Neurol.* 2003; 23: 365-372.
34. Singleton JR, Smith AG, Bromberg MB. Increased prevalence of impaired glucose tolerance in patients with painful sensory neuropathy. *Diabetes Care* 2001; 24 (8): 1448-53.

35. Perkins BA, Greene DA, Bril V. Glycemic control is related to the morphological severity of diabetic sensorimotor polyneuropathy. *Diabetes Care* 2001; 24 (4): 748-52.
36. Cameron NE, Cotter MA, Dines KC, Hohman TC. Reversal of defective peripheral nerve conduction velocity, nutritive endoneurial blood flow, and oxygenation by a novel aldolase reductase inhibitor, WAY-121, 509, in streptozotocin induced diabetic rats. *J Diab Comp* 1996; 10:43-53.
37. Greene DA, Sima AA, Stevens MJ, Feldman EL, Lattimer SA. Complications: neuropathy, pathogenetic considerations. *Diabetes Care* 1992; 15 (12): 1902-25.
38. Keaney JF, Loseph L. Diabetes, oxidatif stres, and platelet activation. *Circulation* 1999; 99:189-191.
39. Jungeria LC, Carnerio J, Kelley OR. *Basic Histology Seventh Edition Çeviri Editörü: Aytekin Y. 7. baskı, Barış Kiatabevi, 1993; 290-295.*
40. Michelson AD. How platelets work: platelet function and dysfunction. *J Thromb Thrombolysis* 2003; 16 (1-2): 7-12.
41. Holthe MR, Staff AC, Berge LN, Lyberg T. Different levels of platelet activation in preeclamptic, normotensive pregnant, and nonpregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190(4):1128-34.
42. Tan KT, Tayebjee MH, Macfadyen RJ, Lip GY, Blann AD. Platelets. Elevated platelet microparticles in stable coronary artery disease are unrelated to disease severity or to indices of inflammation. 2005 Sep;16(6):368-71.
43. Öztop İ. İnflamatuvar barsak hastalığı olan hastalarda periferik kan trombosit aktivasyonunun ve trombosit-lökosit agregatlarının değerlendirilmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Hematoloji-Onkoloji Bilim Dalı; Uzmanlık Tezi, İzmir; 1999:62.
44. Glassman AB. Platelet abnormalities in diabetes mellitus. *Ann Clin Lab Sci.* 1993; 23 (1): 47-50.
45. Michelson AD, Furman MI. Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. *Curr Opin Hematol.* 1999; 6 (5): 342-8.
46. Lee RG, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers MG. Editores, *Wintrobe's Clinical Hematology: Tenth Edition, MASS Publishin CO. 1999; 215-267.*
47. Kunicki TJ, Newmann PJ. The Molecular Immunology of Human Platelet Proteins. *Blood* 1992; 80: 1386-1404.
48. George JN, Shattil SJ. The clinical importance of acquired abnormalities of platelet function. *N Engl J Med* 1991; 324: 27-38.
49. Ni H, Freedman J. Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. *Transfus Apheresis Sci.* 2003; 28 (3): 257-64.
50. Beumer S, IJsseldijk MJ, de Groot PG, Sixma JJ. Platelet adhesion to fibronectin in flow: dependence on surface concentration and shear rate, role of platelet membrane glycoproteins GP IIb/IIIa and VLA-5, and inhibition by heparin. *Blood.* 1994; 84 (11):3724-33.
51. Smyth SS, Joneckis CC, Parise LV. Regulation of vascular integrins. *Blood* 1993, 81:2827-43.
52. Beumer S, Heijnen-Snyder GJ, IJsseldijk MJ, de Groot PG, Sixma JJ. Fibronectin in an extracellular matrix of cultured endothelial cells supports platelet adhesion via its ninth type III repeat: A comparison with platelet adhesion to isolated fibronectin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20 (4): 16-25.

53. Lalko CC, Deppe E, Ulatowski D, Lutgen A, Hart AP, Patton EA et al. Equine platelet CD62P (P-selectin) expression: a phenotypic and morphologic study. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003; 91 (2):119-34.
54. Gurney D, Lip GYH, Blann AD. A reliable plasma marker of platelet activation does it exist?. *Am J Hematol* 2002; 70 (2):134-144.
55. Peerchke EIB. Platelet membrane glycoproteins. Functional characterization and clinical applications. *Am J Elin Pathol* 1992; 98:455-463.
56. Michelson AD. Flow Cytometry: A clinical test of platelet function. *Blood* 1996; 87:4925-4936.
57. Demirel GY. Flow cytometry yöntemiyle apoptozis ölçümü. Yılmaz MT, Deniz G. *Flow cytometry ve tıpta kullanımı.* Bio med yayıncılık 1999-İstanbul: 67-77.
58. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL, Furman MI. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods* 2000; 21 (3):259-70.
59. Harrison P, Cramer EM. Platelet α -granules. *Blood Rev* 1993; 7:52-62.
60. Grünewald M., Griesshammer M. P-Selectin modulation in haemostasis: one size fits all? *Trends Mol Med.* 2004; 10 (1):9-12.
61. Kaur J, Cutler DF. P-selectin targeting to secretory lysosomes of Rbl-2H3 cells. *J Biol Chem.* 2002; 277 (12):10498-505.
62. Hickerson DH, Bode AP. Flow cytometry of platelets for clinical analysis. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2002; 16 (2):421-54.
63. Chong BH, Murray B, Berndt MC, Dunlop LC, Brighton T, Chesterman CN. Plasma P-selectin is increased in thrombotic consumptive platelet disorders. *Blood* 1994; 83 (6):1535-41.
64. Saelman EU, Kehrel B, Hese KM, de Groot PG, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK. Platelet adhesion to collagen and endothelial cell matrix under flow conditions is not dependent on platelet glycoprotein IV. *Blood* 1994; 83 (11):3240-4.
65. Rand ML, Leung R, Packham MA. Platelet function assays. *Transfus Apheresis Sci.* 2003; 28 (3):307-17.
66. Berditchevski F, et al. Leukocyte Typing V. *J Biol Chem* 1995; 270:17784-90.
67. Goldstein BJ, Müller-Wieland D, Editors. *Textbook of Type 2 Diabetes.* First Publish, Martin Dunitz Taylor Francis Group, 2003;1-221.
68. Fijnheer R, Modderman PW, Veldman H, Ouwehand WH, Nieuwenhuis HK, Roos D, de Korte D. Detection of platelet activation with monoclonal antibodies and flow cytometry. Changes during platelet storage. *Transfusion* 1990; 30 (1):20-5.
69. Yardımcı T, Yaman A, Ulutin ON. Characterization of platelet gamma glutamyl transferase and its alteration in cases of atherosclerosis. *Elin App Thromb Hemostas.* 1995; 1:103-113.
70. Nickels RM, Seyfert UT, Wenzel E, Menger MD, Vollmar B. A simple and reproducible method to reliably asses platelet activation. *Thromb Res* 2003; 110: 53-56.
71. Bergmeier W, Schulte V, Brockhoff G, Bier U, Zirngibl H, Nieswandt B. Flow cytometric detection of activated Mouse integrin α IIb β 3 with a novel monoclonal antibody. *Cytometry* 2002; 48:80-86.
72. Nickels RM, Seyfert UT, Wenzel E, Menger MD, Vollmar B. A simple and reproducible method to reliably asses platelet activation. *Thromb Res* 2003; 110: 53-56.
73. Ault KA. The clinical utility of flow cytometry in the study of platelets. *Semin Hematol* 2001; 38 (2):160-168.

74. Siess W. Molecular Mechanisms of platelet activation. *Physiological reviews* 1989; 69:59-178.
75. Rand ML, Leung R, Packham MA. Platelet function assays. *Transfus Apheresis Sci.* 2003; 28 (3):307-17.
76. Ghosh K. Thrombohaemorrhagic balance in diabetes mellitus. *J Indian Med Assoc.* 2002; 100 (7):428-32.
77. Sobol AB, Watala C. The role of platelets in diabetes-related vascular complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 2000; 50 (1):1-16.
78. Srivastava K, Dash D. Changes in membrane microenvironment and signal transduction in platelets from NIDDM patients-a pilot study. *Clin Chim Acta.* 2002; 317 (1-2):213-20.
79. Vink AI, Erbas T, Park TS, Nolan R, Pittenger GL. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24 (8):1476-85.
80. den Dekker E, Gorter G, Heemskerk JW, Akkerman JW. Development of platelet inhibition by cAMP during megakaryocytopoiesis. *J Biol Chem.* 2002; 277 (32):29321-9.
81. Cenni E, Granchi D, Veri E, Cavedagna D, Gamberini S, Falsone G et al. CD62, thromboxane B2, and beta-thromboglobulin: A comparison between different markers of platelet activation after contact with biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1997; 36:289-294.
82. Michelson AD. Platelet activation by thrombin can be directly measured in whole blood through the use of the peptide GPRP and flow cytometry: methods and clinical applications. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5 (1): 121-131.
83. Keaney JF, Lasek L. Diabetes, oxidative stress, and platelet activation. *Circulation* 1999; 99:189-191.
84. Michelson AD. Flow Cytometry: A clinical test of platelet function. *Blood* 1996; 87:4925-4936.
85. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture ed 4. Approved Standard, NCCLS Document H3-A3. Villanova, NCCLS, 1999.
86. Rauch U, Ziegler D, Piolot R, Schwippert B, Benthake H, Schultheiss HP, Tschoepe D. Platelet activation in diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. *Diabet Med.* 1999; 16(10):848-52.
87. Hilberg T, Eichler E, Glaser D, Schmidt V, Gabriel HH. Platelet activity, reactivity and platelet-leukocyte conjugate formation before and after exhaustive or moderate exercise in patients with IDDM. *Platelets* 2004; 15 (2): 101-8.
88. Hu H, Johansson BL, Hjemdahl P, Li N. Exercise-induced platelet and leucocyte activation is not enhanced in well-controlled Type 1 diabetes, despite increased activity at rest. *Diabetologia* 2004; 125:1378-7.
89. Aslan M. Tip 1 Diyabetes Mellituslu Hastalarda Trombosit Aktivasyonunun Diyabet Komplikasyonları İle İlişkisi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dili; Uzmanlık Tezi; Malatya- 2004.
90. Nomura S, Takahashi N, Inami I, Kajiura T, Yamada K, Nakamori H et al. Probucol and ticlopidine: effect on platelet and monocyte activation markers in hyperlipidemic patients with and without type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2004; 174:329-335.
91. Keating FK, Sobel BE, Schneider DJ. Effects of increased concentrations of glucose on platelet reactivity in healthy subjects and in patients with and without diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2003; 92 (11):1362-5.

92. Shouzu A, Nomura S, Omoto S, Hayakawa T, Nishikawa M, Iwasaka T. Effect of Ticlopidine on Monocyte-derived Microparticles and Activated Platelet markers in Diabetes Mellitus. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2004; 10 (2):167-73.
93. The Expert Committee on the Diagnosis, Classification of Diabetes Mellitus, Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes* 1997; 20:1183-1197.
94. Baldeweg SE, Yudkin JS. Implications of the United Kingdom prospective diabetes study. *Prim Care*. 1999; 26(4):809-27.