



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

TİROİD HORMON FAZLALIK VEYA EKSİKLİKLERİNİN TROMBOSİT AKTİVASYONU VE AGREGASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. H. Asuman YAVUZ

Antalya, 2001



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

TİROİD HORMON FAZLALIK VEYA EKSİKLİKLERİNİN TROMBOSİT AKTİVASYONU VE AGREGASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. H. Asuman YAVUZ

Tez Danışmanı : Doç.Dr.İhsan KARADOĞAN

“Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir”

Antalya, 2001

Gerek bu tezin hazırlanışı sırasındaki katkı ve yardımları, gerekse asistanlık eğitimim süresince bilgi, deneyim ve yol göstericiliği ile yetişmemde emeği olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. İhsan Karadoğan'a; her konuda sürekli desteğini gördüğüm Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Gülşen Yakupoğlu'na, ve bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen Özel Hematoloji Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürü borç bilirim.

Dr. H. Asuman Yavuz

Antalya, 2001

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.HİPERTİROİDİZMDE GÖRÜLEBİLEN HEMOSTATİK SİSTEM ANORMALLİKLERİ	5
2.1.1.Koagülasyon sisteminde saptanan değişiklikler	5
2.1.2.Fibrinolitik sistemde saptanan değişiklikler	5
2.1.3.Trombositler ile ilgili değişiklikler	5
2.1.4.Vasküler tonus:	5
2.1.5.Doğal antikoagülanlar ile ilgili değişiklikler	6
2.2.HİPOTİROİDİZMDE GÖRÜLEBİLEN HEMOSTATİK SİSTEM ANORMALLİKLERİ	6
2.2.1.Koagülasyon sistemi ile ilgili değişiklikler	6
2.2.2.Fibrinolitik sistem ile ilgili değişiklikler	7
2.2.3.Vasküler tonüs ile ilgili değişiklikler	8
2.2.4.Trombositler ile ilgili değişiklikler	9
2.2.5.Doğal antikoagülanlar	10
2.3.TROMBOSİTLER	10
2.3.1.Yapı	10
2.3.1.1.Trombosit granülleri	11
2.3.1.1.1.Alfa granüller	11
2.3.1.1.2.Yoğun granüller	11
2.3.1.1.3.Lizozomlar	12
2.3.2.İşlev	12
2.3.2.1.Trombosit adezyonu	12
2.3.2.2.Trombosit salıverme (release) reaksiyonu	13
2.3.2.3.Trombosit agregasyonu	13
2.3.2.4.Prokoagülan aktivite	13
2.4.TROMBOSİT AKTİVASYONU	15
2.4.1.Trombosit aktivasyon belirteçleri	17
2.5.TROMBOSİT AGREGASYON ÇALIŞMALARI	18
2.5.1.Optik agregasyon testleri	20
2.5.2.İmpedans agregometresi ile yapılan testler	21

2.6.AKIŞ SİTOMETRİSİ	22
2.6.1.Çalışma ilkeleri	22
2.6.2.Akış sitometrisi ile yapılan trombosit çalışmaları	23
2.6.3.Trombosit aktivasyonu sırasında oluşan trombosit membran değişikliklerinin akış sitometrik yöntemlerle gösterilmesi	24
2.6.3.1.GP-IIb-IIIa kompleksinde ve fibrinojen molekülünde olan değişiklikler	24
2.6.3.2.Alfa granül membran antijenlerinin gösterilmesi	25
2.6.3.3.Lizozom membran antijenlerinin gösterilmesi	26
2.6.3.4.Yoğun cisimcik membran antijenlerinin gösterilmesi	26
2.6.3.5.GP-Ib ekspresyonundaki azalışın saptanması	26
3.GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1.ÇALIŞMA GRUBU	27
3.2.TAM KAN SAYIMI	27
3.3.TİROİD FONKİYON TESTLERİ	28
3.4.AGREGASYON ÇALIŞMALARI	28
3.5.MONOKLONAL ANTİKORLAR	28
3.6.AKIŞ SİTOMETRİK ANALİZ	29
3.7.İSTATİSTİK	30
4.SONUÇLAR	31
5.TARTIŞMA	38
6.ÖZET	42
7.KAYNAKLAR	

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tiroid hastalıklarının seyri sırasında hemostatik sistemde çeşitli değişikliklerin olduğu bilinmektedir. Bunlar kendini subklinik laboratuvar bulgulardan klinik açıdan önemli olabilecek bozukluklara kadar değişen geniş bir yelpazede göstermekte hatta önemli tromboembolik olaylar veya kanamalar izlenebilmektedir. Genel olarak hipotiroidili hastalarda kanamaya yatkınlık (1), hipertroidili hastalarda ise tromboembolik olay sıklığında artış olduğu bilinmektedir (2,3). Tirotoksikoz nedeni ile ölen hastaların en az % 18' inden major tromboembolik olayların sorumlu olduğu gösterilmiştir (4). Tiroid hastalıklarında izlenen bu tür koagülopatilerin oluşumundan tiroid hormonlarının eksiklik veya fazlalıklarının trombositlerin, koagülasyon faktörlerinin üretim, sentez ve fonksiyonları ile kan akışkanlığının değişmesi gibi çeşitli parametreler üzerinde oluşturduğu direkt yada indirekt etkiler sorumlu tutulmaktadır (5). Ek olarak otoimmün kökenli tiroid hastalıklarında immün mekanizmaların yer aldığı hemostatik sistemde çeşitli bozukluklar da oluşabilmektedir.

Tiroid hastalıklarında hemostatik sistemde izlenen değişikliklerin patogeneğinde trombositlerin yerini belirlemeye yönelik yapılan çalışmaların sayısı sınırlıdır. Trombositlerin fonksiyonlarının değerlendirildiği çalışmalarda ise çelişkili sonuçlar izlenmektedir(6-11,14,15,18,19,22).

Hipertiroidili hastalarda trombosit döngüsünün (turnover) arttığı, trombosit yaşam süresinin azaldığı ve bunların sonucunda periferik kan trombosit sayılarında azalma, ortalama trombosit volümünde ise artma olduğu gösterilmiştir (6-9). Hipertiroidili hastalarda trombosit agregasyonunun değerlendirildiği bir çalışmada trombositlerin ADP ve kollajene karşı olan agregasyon yanıtlarının azaldığı gösterilmişken, diğer bir çalışmada agregasyon

yanıtları normal olarak bulunmuş, bir olgu sunumunda ise spontan agregasyon varlığı ve ristosetine artmış yanıt olduğu belirtilmiştir (10-12).

Hipotiroidili hastalarda ise trombosit sayılarının normal, azalmış veya artmış, ortalama trombosit volümünün normal veya azalmış olduğunu gösteren çelişkili yayınlar bulunmaktadır (13-22.). Trombosit fonksiyonlarının değerlendirildiği çalışmalarda ise trombosit adezivitesinin azaldığı, agregasyon yanıtlarının azaldığı veya arttığı, trombosit faktör 3 düzeyinin azaldığı, prostaglandin metabolizmasının bozulduğu ve kanama zamanının uzadığı gösterilmiştir (10,14-16,21,24-26,30,31)

Bu çalışmanın amacı, literatürde henüz yeterli bilgi bulunmayan trombosit fonksiyonlarının hipertiroidi ve hipotiroidili hastalarda değerlendirilmesidir. Hastaların ilk tanı anında ve antitiroid veya replasman tedavisi ile ötroid duruma geldikten sonra trombosit fonksiyonları hassas birer yöntem olan impedans agregometresi ve akış sitometrisi ile çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.HİPERTİROİDİZMDE GÖRÜLEBİLEN HEMOSTATİK SİSTEM ANORMALLİKLERİ

Hipertiroidili hastalarda %5-40 gibi bir oranda atrial fibrilasyona rastlanabilmektedir ve bu durum kardiojenik tromboembolik olaylar için major bir risk faktörüdür (63,64,75). Klinik bir çalışmada tirotoksikozdan ölüm nedenlerinin %18'ini major tromboembolik olaylar oluşturduğu gösterilmiştir(4). Normal sinüs ritmindeki hastalarda ise tromboemboli insidansı %8' dir(23). Otoimmün trombositopenik purpura ile Graves' hastalığı arasında ilişki gözlenmiş ve bu konuda pek çok çalışma yapılmıştır(24-26)). Otoimmün trombositopenik purpurası olan ancak klinik olarak tiroid hastalığı olmayan kişilerde yapılan bir araştırmada %8-14 oranında tiroglobulin düzeylerinde artış ve %17-41 oranında mikrozomal antikor pozitifliği saptanmıştır(27). Yine bu kişilerde yapılan prospektif çalışmalarda %8-14 oranında hipertiroidi geliştiği gözlenmiştir(24-25). Tersine Graves'li hastaların takiplerinde %11-22 oranında kolay morarma, trombositopeni ($<150.000 \mu\text{L}$), platelet bağlı Ig G seviyelerinde artış ve otoimmün trombositopenik purpura geliştiği gözlenmiştir(28). Hipertiroidili hastalarda gözlenen hemostaz anormallikleri aşağıda özetlenmiştir:

2.1.1.Koagülasyon sisteminde saptanan değişiklikler:

Tiroid hormon düzeylerinde artma endotel aktivasyonuna neden olabilmektedir sonuçta endotel ilişkili proteinlerin seviyelerinde artışla karakterizedir. Bu durum prokoagülan bir durumdur ve hipertiroidide görülen tromboemboli sıklığının artış nedenlerinden birisi olabileceği düşünülmektedir(29)

Graves hastalığında konjenital prekallikrein (Fletchor faktör) eksikliği saptanmıştır. Konjenital prekallikrein eksikliği bir koagülasyon bozukluğudur ve parsiyel tromboplastin

zamanında anlamlı uzama ile karakterizedir(30,31). Graves’li hastalarda simultane olarak otoimmün faktör VIII eksikliği gözlenmiştir(34). Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldıkları zaman Graves’li hastalarda antifosfolipid sendromunda bir artış gözlenmiştir. Sonuçta ortaya çıkan hiperkoagülabl durum; hipertiroidili ve eş zamanlı atrial fibrilasyonu olan hastalarda görülen tromboemboli insidansına göre çok fazladır(32,33).

Hipertiroidide gözlenen koagülasyona eğilim pek çok faktörle ilişkilidir:

- 1)Kan volümünde artış (artmış oksijen ihtiyacı sonunda eritropoetin üretiminin artması) (5)
- 2)Karaciğerdeki pıhtılaşma faktörlerinin sentezinde artış, (5)
- 3)Trombin ve plazmin aktivitesinde artma (5)
- 4)Metabolik olayların ve solunumun hızlanması sonucu fazla sıvı kaybı ve terleme (A4)

Bunlarla ilgili detaylı bilgiler tablo 1 ve 3’te görülebilmektedir.

Tablo 1: Hipertiroidizmle ilişkili koagülasyon sistemi bozuklukları

Parametre	
<u>İmmunojenik olmayan hipertiroidizm</u>	
Plateletler	Artmış yıkım Kısalmış platelet yaşam süresi Azalmış periferik platelet sayısı Artmış ortalama platelet volümü (MPV)
Hiperkoagülabl durum	Artmış metabolik hız Fazla sıvı kaybı Artmış karaciğer protein sentezi Artmış trombin ve plazmin aktivitesi Kardijenik tromboembolik durum
<u>İmmunojenik hipertiroidizm</u>	
Antifosfolipid sendromu	
Otoimmün trombositopenik purpura	
Otoimmün faktör VIII eksikliği	
Antikardiolipin antikör seviyelerinin artması	
Konjenital prekallikrein (Fletcher faktör) eksikliği	

2.1.2.Fibrinolitik sistemde saptanan değişiklikler:

Hipertiroidili hastalarda fibrinojen düzeyleri normal veya artmıştır ancak fibrinolitik aktivite normaldir(34-36). Öglobulin yıkım zamanı, plazminojen düzeyi ve plazminojen aktivatörleri azalmıştır(37,38). Plazminojen aktivatör inhibitörleri artmıştır(37). Sonuçta hiperkoagülabl bir durum ortaya çıkmaktadır. Tablo 4’de bu konu ile ilgili detaylı bilgiler görölmektedir.

2.1.3.Trombositler ile ilgili değişiklikler:

Hipertiroidizmde hızlanmış platelet turnoveri, kısalmış trombosit yaşam süresi ve sonuçta hafif azalmış trombosit sayısı olduğu değişik çalışmalarla gösterilmiştir(8). Trombosit turnoverindeki artışın aktive olmuş retiküloendotelial sisteme (RES) bağlı olduğu gösterilmiştir(7,39). Yapılmış olan bir çalışmada ötiroid ratlara tiroid hormonu verilmesi RES’te artmış sekestrasyon kapasitesine ve plateletlerin artmış yıkımına yol açmıştır(39). Hipertiroidili ratlarda ortalama trombosit volümünün 9,2 fl’e kadar çıktığı görölmüştür (normal 5,8-8,4 fl)(9). Bu kemik iliğinden daha genç olan trombositlerin dolaşıma geçmesi, B12 ve folik asit düzeylerinde azalma sonucu olan hafif düzeyde makrositik anemi ve ortalama trombosit volümünün artmasıyla açıklanmaktadır(40). Bütün bu trombosit kalitatif ve kantitatif bozukluklarının tamamı ötiroid durumun sağlanmasıyla geri dönmektedir (Tablo 1 ve 5)

2.1.4.Vasküler tonus:

Kardiovasküler sistem değişiklikleri hipermetabolizmaya bağlı dolaşım ihtiyacının fazla olması ve artmış olan bazal ısının dağıtılması sonucudur. İstirahat halinde iken vasküler direnç azalmıştır, kapiller frajilitede artış vardır ve kardiak output artmıştır(29). Yapılan deneysel bir çalışmada plazma vizkositesinin arttığı gösterilmiştir. Tromboksan A2 (TXA2) ve prostasiklinin vasküler tonüs ve platelet fonksiyonu üzerine olan önemli etkisi nedeniyle

anjina pektorisli ve atherosklerotik hastalığa yol açtığı bilinmektedir(42,43). Yapılan bir çalışmada hipertiroidizmde tromboksan üretiminde orta derecede bir azalma ve aortik prostasiklin üretiminde bir değişiklik bulunmamıştır(44). Hipertiroidili ratlarda yapılan bir çalışmada doku endotelin düzeylerinde azalma saptanmıştır(45).

2.1.5.Doğal antikoagülanlar ile ilgili değişiklikler:

Literatürde hipertiroidili hastalarda faktör V Leiden, protrombin gen mutasyonu, protein C ve S eksikliği, antitrombin III (ATIII) ve disfibrinojenemi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

2.2.HİPOTİROİDİZMDE GÖRÜLEBİLEN HEMOSTATİK SİSTEM ANORMALLİKLERİ

Hipotiroidili hastalarda morarma veya menoraji ile kendisini gösteren hafif bir kanama eğilimi vardır(1,46). Bunun nedeni multifaktöryeldir. Plateletlerle, koagülasyon faktörlerinin rolü minimaldir. Menorajinin yapılan bir çalışmada anovülasyona sekonder kırılma kanaması şeklinde olduğu ve kolay morarmannın ise ekstrasvasküler aralığın miksedematous transformasyonu sonucu olduğu düşünülmektedir(47-49). Bunların yanısıra hipotiroidili hastalarda gözlenen hemostaz anormallikleri ile ilgili detaylı bilgiler aşağıdadır.

2.2.1.Koagülasyon sistemi ile ilgili değişiklikler:

Hipotiroidide gözlenen hemostaz anormalliği kazanılmış von Willebrand hastalığı gibidir .Bu kendisini mukokütanöz kanama epizodları (burun veya dişeti kanaması, menoraji ve gastrointestinal kanama), aspirine ve alfa metil dopaya aşırı kanama cevabı, travma veya cerrahi sonrası major kanama ile göstermektedir(1,31,50). Buradaki patofizyolojik mekanizma; faktör VIII/vWF kompleksinde azalmış aktivite, ristosetin kofaktör aktivitesinde azalma ve plateletlerin adezyonunda bozulmadır. Hepsi birlikte sonuçta

parsiyel tromboplastin zamanında uzama, platelet agregasyonunda azalma ve kanama zamanında uzamaya neden olmaktadır(1,46). Hipotiroidili hastalarda faktör VIII antijen düzeyi azalmıştır fakat faktör VIII aktivitesi normaldir(51). Hipotiroidili hastalarda gözlenen diğer koagülasyon sistem anormalliği karaciğer protein sentezinde azalma sonucunda koagülasyon faktörlerinin değişik oranlarda sentezlenmesi sonucundadır (14,52,46). Bunlar tablo da gösterilmiştir. Hipotiroidizmde yapılan koagülasyon çalışmalarında; trombin zamanı normal, parsiyel tromboplastin zamanında uzama ve protrombin zamanı normal veya çok az azalmış olarak bulunmuştur (1,46) (Tablo 2 ve 3).

Tablo 2: Hipotiroidizmle ilişkili koagülasyon sistem bozuklukları

	Parametre
Plateletler	Azalmış periferik platelet sayısı Azalmış ortalama platelet hacmi (MPV) Kemik iliği megakaryopoezinde azalma Kemik iliği miksödemi
Koagülasyon faktörleri	Faktör VII, VIII, IX, XI, XII aktivitelerinde azalma Faktör II, VII, IX, X biyolojik yarı ömürlerinde uzama Daha yüksek dozda warfarine ihtiyaç duyulması
Otoimmün trombositopenik purpura Kazanılmış von Willebrand hastalığı Alfa metil dopa ve aspirinle kanama eğiliminin artırılması	

Tablo 3: Tiroid hastalıklarında koagülasyon faktörlerinde olan değişiklikler

	Hipertiroidi	Hipotiroidi
Fibrinojen (faktör 1)	N-↑	N
Faktör II	N-↓	N veya ↑
Faktör V	N	N
Faktör VII	↓	↓-↑
Faktör VIII	↑	↓-N
Faktör IX	N	↓-↑
Faktör X	N-↓	↑-N
Faktör XI	N	↓-N-↑
Faktör XII	N	↓
Antikoagülan duyarlılığı	↑ (warfarin)	↓

2.2.2.Fibrinolitik sistem ile ilgili değişiklikler:

Hipotiroidili hastalarda fibrinojen seviyeleri normal olmasına rağmen fibrinolitik aktivite artmıştır. Bu artmış aktivite plazminojen aktivitesinde artış ve plazminojen

aktivatöründe bir artışla beraberdir(38). Plazma aktivatör inhibitör seviyesi azalmıştır, antiplazmin seviyesi normaldir(37). AT-III seviyesi azalmıştır ve öglobulin lizis zamanı artmıştır (38,53). Hipotiroidili hastalardaki pıhtılaşma sistemi ile ilgili bu bozuklukların tamamı L-tiroksin tedavisi ile normale dönmektedir . Tiroid hormonlarının bu değişiklikleri nasıl yaptığı bilinmemektedir (Tablo 4).

Tablo 4:Tiroid hastalıklarının fibrinolitik sistem üzerine olan etkileri

	<u>Hipertiroidi</u>	<u>Hipotiroidi</u>
Fibrinojen	N-↑	N
Fibrinolitik aktivite	N	↑
Öglobulin yıkım zamanı	↓	↑
Plazminojen	↓	↑-N
Antiplazmin	N	N
Alfa-2-makroglobulin	N	↑
Alfa-1-antitripsin	↑	N
C1 inaktivatör	↑	N
Plazminojen aktivatörleri	↓	↑-N
Antitrombin III	N	↓
Plazminojen aktivatör inhibitörleri	↑	↓

2.2.3.Vasküler tonüs ile ilgili değişiklikler:

Hipotiroidizmde istirahat halinde vasküler tonüs artmıştır ve dolaşan kan volümü kardiyak outputtaki düşmeye bağlı olarak azalmıştır. Hipotiroidili hastalarda kapiller frajilitenin artmış olduğu söylenmekle beraber bu daha çok klinik bir gözlemdir Thomson'un 25 hipotiroidili hastada yaptığı bir çalışmada kapiller frajilitenin azaldığı gözlenmiştir ancak patofizyolojisi hakkında açıklama yoktur(29).

Hipotiroidizm maksimal trombin ile uyarılmış tromboksan (vazokonstriktör ve trombosit agregan) üretiminde bir azalma gözlenmiştir. Prostosiklin (vazodilatör) üretiminin yaşlanmayla birlikte azalmasını engellemiştir. Bu prostaglandin değişiklikleri L-tiroksin tedavisi ile normale dönebilir. Tiroid hormonlarının prostaglandin sentezine olan etkisi spekülatiftir ve trombosit membran fosfolipidlerindeki değişikliklerle veya prostaglandin sentetik enzim aktivitesinde değişikliklerle ilişkili olduğu düşünülmektedir(21).

2.2.4.Trombositler ile ilgili değişiklikler:

Hipotiroid ratlarda yapılan bir çalışmada trombosit sayısında azalma, aynı, artma ve trombosit fonksiyonunda değişiklikler ile beraber hafif kanama eğilimi saptanmıştır (13,19, 22).Hipotiroidizmde genellikle trombositlerin sayıları ve ortalama trombosit volümleri normaldir veya çok hafif azalmıştır (19,22). Bu anormallikler koagülasyon bozuklukları ile ilişkili değildir ve tiroid hormon replasmanı ile normale dönmektedir. Fakat kemik iliği megakaryopoezi azalmıştır (46). Kemik iliği miksödemi megakaryopoezin anlamlı derecede inhibe edilmesine neden olmaktadır (13). Tersine hashimoto tiroiditli hastalarda trombosit sayısı periferik yıkımın artması sonucu azalmaktadır ve kemik iliği megakaryopoezi buna yeterli yanıt verebilmektedir. Hipotiroidili hastalarda görülen diğer bir konu ise trombosit metabolizma anormallikleridir (trombosit membran fosfolipid ilişkili trombosit faktör-3'ün azalmış aktivitesi ve aspirin verilmesini takiben plateletlerden dolaşıma azalmış serotonin salınımıdır). Sonuçta bazı ilaçlar örneğin alfa-metil dopa ve aspirin trombosit disfonksiyonunu arttırabilir veya maskeleyebilir bu nedenle hipotiroidili hastalarda kullanırken dikkatli olunmalıdır(26) (Tablo 2 ve 5).

Tablo 5:Tiroid hastalıklarının platelet sayı ve fonksiyonları üzerine olan ana etkileri

	<u>Hipertiroidi</u>	<u>Hipotiroidi</u>
<u>Kemik iliği megakaryositi</u>	↓	↑
<u>Platelet sayısı</u>	N veya ↓	N veya ↑ veya ↓
<u>Ortalama platelet volümü</u>	↑	N veya ↑ veya ↓
<u>Platelet dağılım hacmi (PDW)</u>	↓	N -↑
<u>Platelet adezyonu</u>	↑	↓
<u>Platelet agregasyonu</u>	N	N -↓
<u>Platelet monoaminoksidaz</u>	N -↓	N
<u>Platelet faktörleri</u>		F3P ↓
<u>Platelet metabolizması</u>	Trombaksan N sentezi	Trombaksan N sentezi Aspirin ve alfa metil dopa'ya anormal yanıt Prostaglandin metabolizma anormallikleri
<u>Kanama zamanı</u>		↑

2.2.5.Doğal antikoagölanlar: Bu konuda yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Tiroid hormonları esas olarak nükleer reseptörleri etkilemekle beraber ayrıca ekstranükleer sitozolik maddeleri de direk olarak etkilerler. Bu maddeler mitokondri ve bazı enzimlerdir. Trombositlerde nükleus bulunmamakla beraber megakaryositlerde nükleus bulunur ve plateletlerde görölen etki, tiroid hormonun megakaryosit nükleusuna olan etkisinin sonucudur. Trombosit fonksiyonu myozin hafif zincir kinaz ve bunun fosforilasyonu ile düzenlenmektedir(54). Mamiye ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada tiroid hormonlarının trombositlerdeki bu enzimi inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu enzim Ca-kalmodulin bağımlı myozin hafif zincirinin fosforilasyonundan sorumludur ve sonuçta trombositlerin kontraksiyon metabolizmasını etkilemektedir. Masaki ve arkadaşlarına göre r-T3 ayrıca trombositlerdeki 20 kd proteinin fosforilasyonunu da etkilemektedir. Bu işlem sonuçta trombosit agregasyonunu etkilemektedir.

2.3.TROMBOSİTLER

2.3.1.Yapı

Trombositler megakaryositlerin fragmantasyonundan kaynaklanan 2-5 µm çapında 0,5-1 µm kalınlığında 5-7 µm³ hacminde, nükleus içermeyen, bikonveks, yuvarlak ya da hafif oval şekilde olan hücrelerdir(55-57). Vücutta total 10¹²düzeyinde bulunmasına karşın dolaşan kandaki trombositler yaklaşık 7 mL² lik bir hacim oluşturmaktadırlar. Dolaşan trombositler total platelet kitlesinin 2/3 ünün oluşturmakta olup geri kalan 1/3 ü dalakta sekestre edilir ve her iki havuz denge halindedir(57). Dolaşan plateletlerin değişim oranı günde litrede 35x10⁹ düzeyinde olup ortalama yaşam süreleri 7-10 gündür (55-57).Trombositler, May grünwald/Giemsa ile boyanan yaymalarda küçük, yuvarlak, bazen elonge, düzensiz parçacıklar olarak görölürler. Azurofilik mor granölasyon, yaklaşık 30 lekeden ibaret olarak mavi sitoplazmadan ayrımlanabilir. Aktivasyon başladıktan sonra

granüller santralize olur ve sitoplazma homojen bir hal alır (57). Granüller elektron mikroskopunda yuvarlak şekilli, yaklaşık 300 nm boyutlarında, tek bir membranla çevrili bire yoğunluk olarak görülürler.

2.3.1.1.Trombosit granülleri

Alfa granüller, yoğun cisimcikler ve lizozomlar olmak üzere 3 tip granül tanımlanmıştır. Bunların içerikleri ve işlevleri Tablo 6’da özetlenmiştir.

2.3.1.1.1.Alfa granüller

Alfa granüller trombositlerdeki azurofilik granüllerin yaklaşık %85’ini oluştururlar. Alfa granüllerin içerdiği çok sayıdaki substans iki grup halinde toplanabilir. İlk grup spesifik trombosit proteinlerini, ikinci grup ise plazma ya da doku moleküllerini içerir. Bunlar, ya prokoagulan etki göstererek, ya plateletlerin adezyon ve agregasyonlarını uyararak, ya da onarım süreçlerini hızlandırarak hemostaz aktivatörü işlevi gösterirler. Bu faktörler, salıverme faz sırasında plateletlerden çevre ortama salınırlar (57) .

“grey platelet sendromu” olarak bilinen, agregasyon yitimi ve hemorajik diatezle sonuçlanan tabloda trombositlerde alfa granül eksikliği söz konusudur(55-57).

2.3.1.1.2.Yoğun granüller

Tüm granüllerin %10’unu kapsar. Tipik olarak, veziküler membrandan belirgin bir halo ile ayrılan opak partiküller olarak görülürler. Merkezi partiküldeki yoğunluğun oldukça bol miktarda toplandığı kalsiyum bulunuşuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Kalsiyumdan başka yoğun cisimcikler adenosin difosfat (ADP) (total deponun %64’ü), adenosin trifosfat (ATP) ve serotonin gibi release sırasında salınan çeşitli maddeleri depoladığı gibi katekolaminler, pirofosfat ve ortofosfatları da içerir(55-57). Yoğun cisimcikler, endojen ADP

salınımına sekonder aggregasyonun olmayışı ile karakterize Hermansky Pudlak sendromunda eksiktir (55-57).

2.3.1.1.3.Lizozomlar

Daha az sayıda olup yalnızca asit fosfataz, aril sülfotaz gibi sindirici enzimlerden birinin varlığında gösterilebilir. Sikatrizasyon sırasında hemostatik tıkaçın eliminasyonunda rolleri vardır(56,57).

2.3.2.İşlev

Trombositlerin en önemli işlevi damarlarda zedelenme olduğu zaman mekanik bir tıkaç oluşumunu sağlamaktır. Bunu adezyon, sekresyon, aggregasyon ve prokoagülan özellikleri ile gerçekleştirilir.

2.3.2.1.Trombosit adezyonu

Kan damarlarında oluşan hasar sonucu subendotelial yağ dokusunun açığa çıkması ile trombositler bu bölgeye yapışırlar (adezyon). Trombositler ile damar duvar arasında oluşan etkileşim sırasında birçok adezyon molekülü rol alır. Von willbrand faktör (vWF) bir yandan subendotelial mikrofibriller ile bağlanırken diğer yandan trombosit membranındaki glikoprotein Ib (GP-Ib) ile bağlanır. GP-IIb-IIIa reseptör kompleksi ile trombositlerin vWF aracılığı ile damar duvarına yapışmalarını sağlayan ikinci bir bağlanma noktasını oluşturur. Subendotelial bölgedeki kollajen moleküllerine yapışma ise GP-Ia aracılığı ile olmaktadır. Trombosit adezyonu sonrası oluşan bir dizi metabolik reaksiyon ile trombositlerde salıverme (release), şekil değişikliği ve aggregasyon oluşumu başlamaktadır. Trombositler daha küresel bir şekil almaktadırlar ve uzun psödopotlar oluşturarak trombosit-trombosit ve trombosit- damar etkileşimlerini arttırmaktadırlar(56,57,59,60).

2.3.2.2.Trombosit salıverme (release) reaksiyonu

Trombositlerin kollajen ile karşılaşmaları ve /veya trombin etkisi ile granüllerde bulunan ADP, serotonin, fibrinojen, lizozomal enzimler, beta tromboglobulin (β -TG), trombosit faktör 4 (PF4) gibi maddeler salıverilirler.

Alfa granül glikoproteinleri ve bu proteinlerin salıverilişi , trombosit aktivasyonu için son derece duyarlı bir gösterge olarak kullanılmaktadır. Çünkü bu substanslar yoğun granüllerin salıverilişi için gerekli uyarıdan daha düşük uyarı ile salıverilebilirler.

Ayrıca kollajen ve trombinin etkisi ile trombosit prostoglandin sentezi artar. Protein kinaz C aracılığı ile protein fosforilasyonunu aktive eden diasilgliserol ve intrasellüler kalsiyum iyonlarının salınımına yol açan inositol trifosfat salıvrilmesi oluşur. Ayrıca tromboxan A₂, siklik adenezine monofosfat (CAMP) düzeylerini düşürerek salıverme reaksiyonunu arttırır.(56,57,59,60)

2.3.2.3.Trombosit aggregasyonu

Ortama salınan ADP ve TXA₂ile hasarlı bölgede daha fazla sayıda trombositlerin aggregasyonu gerçekleşir. Yeni katılan trombositlerde aktive olarak daha fazla salıverme reaksiyonuna yol açarlar ve oluşan bu pozitif geri beslenme sayesinde hasarlı endotelial alanda yeterince büyük bir plak oluşumu sağlanır (56,57,59,60).

2.3.2.4.Prokoagülan aktivite

Trombositlerin salıverme reaksiyonu ve aggregasyonunu takiben açığa çıkan PF-3 koagülasyonun iki önemli basamağında rol oynamaktadır. Aktive faktör IX ve VIII ile birlikte faktör X aktivasyonunda rol alan PF-3 aynı zamanda aktive faktör X ve V ile birlikte protrombinin trombine dönüştürülmesi basamaklarında yer almaktadır.(56,57,59,60)

Tablo 6. Platelet granüllerinin içerikleri ve işlevleri

ALFA GRANÜLLER

1. Spesifik proteinler

PF-4	*heparin nötralizasyonu *adezyon ve aggragsyonun uyarılması *bazofillerden histamin salıverilşinin uyarılması *nötrfil, monosit ve fibroblastlar üzeri,ne kemotaktik etki *lökosit elastazın aktivasyonu *kollajenaz inhibisyonu *çeşitli glikozaminoglikaların fiksasyonu
β-TG	*antiheparin etki *fibroblastlar üzerine kemotaktik etki
PDGF	*fibroblast ve düz kas hücrelerinin çoğalmasının uyarılması *nötrfil, monosit, fibroblast ve düz kas hücrelerine kemotaktik etki
Trombospondin	*aggregasyon ve fibrin oluşumu *hücre hücre etkileşimi *hemagglütinasyon

2. Plazma ya da doku molekülleri

Fibrinojen	*aggregasyon ve koagülasyon
Faktör V	*koagülasyon
VWF	*adezyon
Fibronektin	*adezyon
Trombospondin	*adezyon ve aggregasyon
Epinefrin	*vazokonstriksiyon ve aggregasyon
Plazminojen	*fibrinoliz
HMWK	*yangı, koagülasyon aktivasyonu

YOĞUN-CİSİMCİKLER

ADP	*adezyon ve aggregasyon
ATP	*enerji deposu
Kalsiyum	*şekli değişikliği, hareket, PG sentezinin aktivasyonu, koagülasyon
Anti plazmin	* koagülasyon

LİZOZOMLAR

Asit hidrolazlar	* sikatrizasyon sırasında hemostatik pıhtının ortadan kaldırılması
-------------------------	--------------------------------------------------------------------

2.4.TROMBOSİT AKTİVASYONU

Damar içinde pasif olarak dolaşan trombositler, damar duvarında bir zedelenme yada yabancı bir yüzeyle temas sonucunda hızla adezyon, şekil değişikliği, salıverme ve aggregasyon göstererek lokalize bir hemostatik tıkaç oluştururlar (59). Trombosit aktivasyon, trombosit yüzeyini etkileyebilen değişik uyarıcı ya da inhibe edici sinyallerle modüle edilen dinamik bir süreçtir(59). Trombositler bu çeşitli uyarıları algılayan spesifik membran reseptörleri taşırlar. Bu reseptörler yoluyla alınan sinyalleri hücre içinde bulunan ikincil haberciler kompleks bir biyolojik yanıtı dönüştürürler (60).

Trombosit yanıtı iki grup halinde sınıflandırılabilir(60):

- 1-Adezyon, şekil değişikliği ve primer agregasyon (reversibl yanıt)
- 2-Salıveriş reaksiyonu ve sekonder agregasyon (irreversibl yanıt)

Reversibl yanıt, trombositlerin endotel hücre tabakası arasındaki boşlukları kapatılması, büyüme faktörlerinin alfa granüllerinden salıverilişi ve subendoteldeki küçük defektlerin onarımı gibi fizyolojik işlevleri; irreversibl yanıt ise trombositlerin hemostatik işlevini içerir(60-62).

Uyarıya ilk fizyolojik yanıt, disk şeklinde ve düzgün olan trombositin adezyonu ve şekil değişikliğidir. 2-3 saniye içerisinde küre şeklini alan trombositlerde 7-8 saniye içerisinde uzun psödopodlar belirir(63,64). Trombositlerin küre şeklini alması, granüllerin merkezileşmesi ve kontraktıl hücre iskeletinin kasılması sonucu ortaya çıkar(65). Şekil değişikliği sırasında plazma membranının yüzeyide genişlemektedir. Bu da olasılıkla yüzey bağlantılı “ açık kanaliküler sistem” in dışı açılmasının bir sonucudur(66). Fizyolojik koşullarda şekil değişikliği, aggregasyon ve salıverilişe öncülük eder ve bir

öngerekliliktir(66-67). Şekil değişikliği sırasında trombositlerin prokoagülan aktiviteleride artmaktadır(68).

Çeşitli fizyolojik substanslar trombositleri aktive etmektedir. Bunların içinde en önemlileri:troöbositlerin adezyonunu uyaran vWF ve kollajen; koagülasyon sisteminde oluşan trombin; aktive trombositlerden salıverilen endoperoxidler/TXA2 ve ADP; dolaşımda bulunan epinefrin ve vazopressin, ve uyarılmış nötrofil ve makrofajlardan salınan trombosit aktivasyon faktörü (PAF)'dır(60).

Trombositler aktive olduğunda trombosit membranındaki lipid dağılımında değişiklikler olmakta ve negatif yüklü fosfotidilserinin büyük birbölümü membranın dış yüzeyine çıkmaktadır(69). Aktive trombositlerin bu özelliğinin hemostatik süreçte büyük önemi vardır. Negatif yüklü fosfolipidler faktör IXa, faktör VIIIa ve kalsiyumdan oluşan bir kompleks aracılığı ile faktör X'un faktör Ixa'ya ve yine faktör Xa, faktör Va ve kalsiyumdan oluşan bir kompleks aracılığıyla da protrombinin trombine dönüşümü belirgin olarak arttırmaktadır(70-72). İstirahat halindeki trombositler, membranın dış yüzeyinde fosfotidilkolin ve sfingomyelin gibi nötral fosfolipidleri içerdiklerinden faktör Xa ya da trombin oluşumunu uyarma kapasiteleri düşüktür(69). Trombositlerde faktör Va için 1000-2000 adet yüksek afiniteli bağlanma bölgeleri bulunmaktadır(73). Troöbosite bağlı faktör Va, faktör Xa için bir reseptördür ve trombosit başına faktör Xa için 200-300 bağlanma bölgesi bulunmaktadır(73). Aktivasyon sırasında ayrıca, koagülasyon ve fibrinoliziste önemli rolleri olan yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HMWK), faktör XIIa, faktör XIIIa, aktive protein c ve plazminojen içinde bağlanma bölgeleri eksprese edilir(74-76).

Aktive trombositler, doku plazminojen aktivatörü (t-PA) ve ürokinazla kompleks oluşturarak bunları inaktive eden trombosit aktivatör inhibitörü (PAI-1)'ide salıvermektedir(78). Alfa granüllerde bulunan PAI-1 yalnızca %5'i aktif durumda olup geri

kalan büyük bölümü latent formdadır. Aktive trombositlerden salıverilen TGF-B ise endotel ve düz kas hücrelerinde PAI-1 ekspresyonunu uyarmaktadır ve bu hücrelerde oluşan PAI-1 aktif formdadır(78).

2.4.1.Trombosit aktivasyon belirteçleri

Son yirmi yıl içerisinde araştırmacılar pretrombotik ya da trombotik durumun belirlenmesi amacıyla *in vivo* olarak aktive trombositlerin varlığını göstermeye yönelik duyarlı ve spesifik yöntemler geliştirmeye çalışmışlardır. Bunlar:

a.Dolaşan trombosit agregatları,(79-81)

b.Aktive trombositlerden salıverilen ve plazma ya da idrarla saptanan metabolitler
(PF-4, β -TG, 2,3- dinor-TXB2, 11-dehydro-TXB2) (82,83)

c.İmmunolojik yöntemler

(platelet –associated FXIII, GP-IIb-IIIa, LAMP-1ve –2, GP-53, GMP-33, GMP-140)(84,85)

Trombositler normal koşullar altında dolaşımda istirahat durumunda bulunurlar ve birçok fizyolojik agonistlerden bir veya birkaçı ile uyarıldıkları zaman trombosit adezyon ve aggregasyonuna yol açan değişikliklere uğrarlar. Bu değişiklikler *in vivo* koşullarda olabilecekleri gibi, *in vitro* koşullardan da önemli oranda etkilenmektedirler(86). Trombosit aktivasyonunun değerlendirilmesi amacıyla kullanılan PF-4, β -TG, tromboxan metabolitlerinin serum ve idrarda ölçümü gibi biokimyasal yöntemlerin çoğunluğunda uygulanan manipülasyonlar nedeni ile teknik hataların doğurduğu yanıltıcı test sonuçları ile karşılaşmak mümkündür. Bu nedenle klinik olarak yaygın kullanım alanı bulamamışlardır.

Akış sitometrik yöntemlerle, trombosit aktivasyonu sırasında trombosit yüzeyinde oluşan değişikliklerin değerlendirilmesi yoluyla da trombosit aktivasyonunun monitorize edilmesi mümkündür. Özellikle tam kan yönteminin kullanıldığı durumlarda, trombositler

doğal ortamları içinde analiz edilmektedirler ve santrifügasyon gibi teknik nedenlerle trombosit aktivasyonuna yol açarak yanıltıcı sonuçlar doğurabilecek manipölasyonlar bulunmamaktadır. Bu nedenle trombosit aktivasyonlarının değerlendirilmesinde akış sitometrik yöntemlerin kullanılması, PF-4, β -TG, trombaksan metabolitlerinin serum ve idrarda ölçümü gibi biokimyasal yöntemler kullanıldığı analizlere göre daha doğru ve güvenilir sonuçların alınmasını sağlamaktadır(85).

2.5.TROMBOSİT AGREGASYON ÇALIŞMALARI

Trombosit agregasyonu, bir trombositin diğer bir trombosite yapışmasını tanımlayan bir terimdir. Bu olay trombositte zengin plazma veya tam kana agregan maddelerin (agonist) konulması ile indüklenir. Trombosit agregasyonunun oluşabilmesi için kalsiyum, fibrinojen, plazma faktörleri ve agregan ajanlara gereksinim bulunmaktadır. Kullanılan agregan ajanın tipi ve konsantrasyonuna göre alınan yanıtlar farklı olmaktadır. ADP, epinefrin, kollajen ve ristosetin agonist olarak klinikte en sık kullanılan maddelerdir. Agonist olarak bu maddelerin kullanılmasının nedeni *in vivo* koşullarda da bu maddelerin trombosit agregasyonunda rol almalarından kaynaklanmaktadır.(59,60)

ADP ve epinefrin trombosit organellerinde bulunan ve primer hemostatik plak oluşumu sırasında aktive olan trombositlerden salınan ve trombosit agregasyonunu arttıran maddelerdir. Kollajen ise, trombositlerde bulunmayan ancak damarlarda oluşan hasar sonrası açığa çıkan ve trombositleri aktive ederek agregasyon ve primer hemostatik plak oluşumunu sağlayan bir dizi reaksiyonun başlamasına yol açan ilk maddelerdir. Bu nedenle *in vitro* çalışmalarda trombositlerin yanıtlarının değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Trombin, araşidonik asit, kalsiyum ionophore, ristosetin, bovine faktör VIII ve serotonin ise daha çok özel durumlarda ve deneysel çalışmalarda kullanılan agonistlerdir.

Primer ve sekonder olmak üzere *in vitro* olarak iki tip agregasyon yanıtı söz konusudur. Primer agregasyon reversibldir ve saliveriş reaksiyonu oluşmaz. Sekonder agregasyon ise saliveriş ile birlikte irreversibldir. Trombositlerin agregasyonu, fibrinojenin bağlanabileceği fibrinojen reseptörlerinin belirmesini gerektirir(60). Primer agregasyon hücre dışı ortamda kalsiyum ve/veya magnezyumun varlığında ve düşük konsantrasyondaki bir agonistin uyarımıyla gerçekleşir. Bu agregasyon ve disagregasyon, fibrinojenin reseptörüne bağlanıp ayrılmasıyla ilişkilidir. Yüksek agonist konsantrasyonundan sonra gözlenen irreversibl agregasyon ise başlıca saliverme reaksiyonunun bir sonucudur. Büyük trombosit agregatlarının oluşumuna ADP, araşidonik asitten oluşan endoperoksidler ve TXA2, yoğun cisimciklerden salınan kalsiyum ile alfa granüllerden salınan adezif proteinler aracılık eder. Alfa granüllerin saliverilmesi, trombosit yüzeyinde yüksek konsantrasyonda fibrinojen, fibronektin, trombospondin ve vWF sağlar(60). Alfa granül ve yoğun granül içeriklerinin saliverilmesi tüm trombosit agonistleri ile uyarıdan sonra gözlemlenebilirken, lizozomal saliveriliş yalnızca yüksek konsantrasyonda trombin ya da kollajen ile olasıdır (87). Saliverme reaksiyonu sırasında extrasellüler alana geçen endoperoksidler/TXA2'nin oluşumunun trombosit yanıtını reversiblden irreversible dönüşümünde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir(88-90).

Trombosit agregasyon çalışmaları günümüzde trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanılan en duyarlı *in vitro* testlerden biridir. Diğer bir çok teknikle tanı konulmasının mümkün olmadığı bir çok hastalıkta , hem tanısal hem de tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Trombositlerin değişik agonistlere karşı gösterdikleri yanıtlar arasındaki farklılıklar, trombasteni, Bernard-Soulier sendromu, von Willebrand hastalığı ve non-steroid antiinflamatuvar ilaçların etkileri gibi konjenital veya kazanılmış bir çok fonksiyon bozukluğunun tanısında kullanılmaktadır.

Klinikte trombosit agregasyon testleri agregometre adı verilen cihazları ile yapılmaktadır. Bu cihazların iki farklı sistemle çalışan tipi bulunmaktadır. Optik sistemle çalışan agregometrelerde trombositten zengin plazma kullanılırken, impedans agregometrelerinde tam kan kullanılmaktadır.

2.5.1.Optik agregasyon testleri

İlk kez 1962 yılında Born tarafından trombositten zengin plazma örneklerinde trombosit agregasyonunun değerlendirilmesi amacıyla geliştirilen kolorimetrik bir testtir(91).

Optik agregometreler sabit dalga çalışan spektrofotometrelerdir. Örneğin konduğu 37 C'ye ısıtılmış bir bölüm bulunmaktadır. Örneğin içine konulan metal bir çubukçuk manyetik ortamda, trombositlerin birbirine temasını arttırmak için karıştırıcı olarak kullanılmaktadır. Optik sistemle çalışan agregometreler için antikoagüle kan örneği düşük santrifüj hızında çevrilerek trombositten zengin plazma ve yüksek hızda çevrilerek trombositten fakir plazma elde edilmektedir.

Optik agregometrenin çalışma prensibi, spektrofotometredeki örnek bölümü içinden geçen ışığın transisyonunda oluşan değişikliklerin zamana göre kaydedilmesi temeline dayanmaktadır. Örnek kabına PZP konulduğu zaman trombositlerin varlığı nedeniyle ışığın bir kısmı soğrulmaktadır ve bu değer %0 olarak kabul edilmektedir. Örnek kabına PFP konulduğu zaman ortamda trombosit olmadığı için ışık minimal soğrulmaktadır ve yüksek olan bu transmisyon değeri %100 olarak kabul edilmektedir. PZP içine trombosit agregasyonuna yol açan bir agonist eklendiği zaman trombositler agregat olmakta ve ışığın transmisyonu zaman içinde artan agregasyona paralel olarak artmaktadır. Zaman içinde ışığın transmisyonunda oluşan bu değişiklikler grafik olarak kaydedilmektedir. Bu şekilde

oluşan agregasyon eğrilerinin eğimleri ve dakikalar içindeki oranları hesaplanarak agregasyon yanıtları değerlendirilmektedir.

2.5.2.İmpedans agregometresi ile yapılan testler

Tam kan yöntemi ile trombosit agregasyonunun impedans metodu kullanılarak değerlendirilmesi ilk kez 1980 yılında Cardinal ve Flower tarafından geliştirilmiştir(92).

İmpedans agregometresi ile yapılan çalışmalarda antikoagüle tam kan kullanılmakta olup PZP ve PFP hazırlanmasına gerek bulunmamaktadır. Çalışma sistemi optik sisteme göre oldukça farklıdır.

Yine 37 C'ye ısıtılmış ve metal çubukçuk ile karıştırılan örnek içine elektronik bir prob konulmaktadır. Bu prob üstünde iki ince metal tel bulunmaktadır. Probun örnek içine daldırılmasıyla birlikte, metal tellerin üstü trombositler ile tek bir kat şeklinde kapatılmaktadır. Bu nedenle iki metal tel arasına milivolt düzeyinde elektrik yükü uygulandığı zaman bir elektriksel dirençle karşılaşmaktadır. "Ohm" olarak ölçülen bu direnç bazal değer (0 ohm) olarak kabul edilmektedir. Ardından ortama agonist eklenmesi ile birlikte trombositler metal tellerin üzerinde agregat olmakta ve iki metal tel arasındaki direnç artmaktadır. Artan direncin zaman içindeki değişimi grafik olarak çizdirilerek agregasyon eğrileri elde edilmektedir. Belirli bir zaman dilimi içinde oluşan direnç değişikliği, izlenen maksimum direnç değişikliği veya ortamdaki dakikadaki maksimum değişiklik hızı (grafik eğilimi) gibi parametreler "ohm" cinsinden agregasyon yanıtı olarak değerlendirilmektedir.

İmpedans agregometresi ile yapılan ölçümler için PZP ve PFP hazırlanmasına gerek bulunmamaktadır. Bu nedenle tam kan örneğine trombosit aktivasyonuna yol açarak agregasyon yanıtlarını etkileyebilecek olan santrifügasyon gibi işlemler uygulanmamaktadır.

Ayrıca trombositler kendi doğal ortamları içinde incelendikleri için, trombosit fonksiyonlarında etkili olabilecek bir çok labil faktör ve diğer hücreler ortamdan uzaklaştırılmamaktadır. Testlerin değerlendirilmesinde optik sistem kullanılmadığı için lipemik, trombositopenik veya dev trombositleri olan hastalarda da impedans agregometresi güvenle uygulanabilmektedir. Tüm bu faktörler impedans agregometresi ile yapılan çalışmaların değerini optik sisteme göre arttırmaktadır.

2.6. AKIŞ SİTOMETRİSİ

2.6.1. Çalışma ilkeleri

Akış sitometrisi, sıvı bir ortam içinde dağılmış olarak bulunan hücre veya partiküllerin özelliklerinin incelendiği bir tekniktir. Partikül veya hücreler tek sıra şeklinde özel bir bölmeden istenen hızda akarak geçerler. Bu sırada incelenecek olan hücrelerin üzerine belirli bir dalga boyunda laser ışığı gönderilir ve hücrelerden yansıyan ışığın özellikleri alıcılar tarafından kaydedilerek bilgisayara değerlendirmek üzere aktarılır. Alıcılardan biri hücrelerin büyüklüklerini, diğeri granüleritesini ve bir diğeri ise yansıtıkları floresans yoğunluğunu algılar. Bu bilgiler, bilgisayar yardımı ile histogramlar şeklinde korele edilerek incelenebilmektedir. Hücreler tek sıra halinde alıcıların önünden geçtiği için, çok kısa bir süre içinde binlerce hücrenin her birinin özellikleri tek tek kaydedilmektedir. Histogramlar üzerinde büyüklük ve granüleritelere göre değişik alanlarda toplanan hücre popülasyonlarının etrafına çizilen pencereler ile sadece istenilen popülasyonlar üzerinde değerlendirme yapmak mümkündür. Floresans ile bağlanmış monoklonal antikorlar kullanılarak incelenen hücrelerin üzerindeki antijenik yapılar tanınabilmektedir. Böylece hücre yüzey işaretleri saptanarak normal veya patolojik hücrelerin tiplendirilmesi yapılabilmekte ve hastalık durumlarında tedavilere verdikleri yanıtlar monütereze

edilebilmektedir. Akış sitometrisi ile , süspansiyon haline getirilebilen her hücre popülasyonu üzerinde çalışma yapmak mümkündür(93).

2.6.2.Akış sitometrisi ile yapılan trombosit çalışmaları

Akış sitometrik yöntemlerin trombosit çalışmalarında kullanılması, fizyolojik ve/veya patolojik durumlarda trombositlerin davranışları konusunda birçok bilgi edinilmesini sağlamıştır. Trombositlerin yabancı ortamlar ile karşılaşmaları fizyolojilerini değiştirmektedir. Kan alımı sırasında turnike uygulanması, vene iğne ile girilmesi, enjektör içine kanın aspire edilmesi, kan örneğinin tüplere konulması ve trombositlerin diğer hücrelerden izolasyonu için uygulanan manipülasyonlar sırasında trombositlerde birçok fizyolojik değişiklik olabilmektedir(86). Bu nedenle trombositlerle ile çalışma yapılması zordur. Özellikle tam kan yöntemleri kullanılarak yapılan akış sitometrik çalışmalarda bu sorunlar tümüyle aşılmasa da büyük oranda azaltılabilmektedir(85). Tam kan yönteminin akış sitometrisi ile yapılan çalışmalarda birçok yönden üstünlüğü bulunmaktadır. Bu yöntemde mikrolitre düzeylerindeki kan örnekleri çalışma için yeterli olacağından infant ve bebeklerde, trombositopenik hastalarda çalışmaların yapılması mümkündür. Tam kan yönteminin kullanılması sırasında trombositlerin santrifugasyonu ve yıkanmaları gerekmemektedir, bu nedenle trombositlerin aktivasyonuna yol açarak test sonuçlarını etkileyebilecek olan manipülasyon hataları en aza indirilebilmektedir. Ayrıca akış sitometrisi ile trombosit subpopülasyonlarının yanıtlarını ayrı ayrı değerlendirmek mümkündür. β -TG veya PF-4 ölçümleri ile trombosit aktivasyonlarının değerlendirilmesi bu olanağı sağlayamamaktadır. Birçok fizyolojik ve patolojik durumda akış sitometrisi ile yapılan trombosit yüzeyi üzerindeki antijenik yapılar tanınarak trombositlerin idantifikasyonu yapılabilmekte, aktivasyon durumları ve agonistler ile uyarıldıkları zaman gösterdikleri agregasyon yanıtları incelebilmektedir.

2.6.3.Trombosit aktivasyonu sırasında oluşan trombosit membran değişikliklerinin akış sitometrik yöntemlerle gösterilmesi

ADP veya epinefrin gibi zayıf bir agonist ile trombositlerin stimülasyonu platelet GP-IIb-IIIa kompleksinde fibrinojen reseptör bölgesini açığa çıkararak fibrinojenin bağlanmasını kolaylaştıracak şekilsel bir değişikliğe yol açmaktadır ve trombosit-trombosit agregasyonu oluşmaktadır. Trombositler agrege olduklarında veya trombin ya da damar duvarındaki kollajen gibi kuvvetli bir agonist ile uyarıldıklarında ise degranülasyon oluşmaktadır. Degranülasyon sırasında granül membranı hücre yüzeyine taşınmaktadır ve granül membranındaki spesifik glikoproteinler neo-antijen olarak aktive trombosit membranında belirmektedir. Trombosit granüllerinden salınan proteinler bu esnada trombosit yüzeyine yapışmaktadır. Tüm bu değişikliklerin akış sitometrik yöntemlerle saptanması mümkündür(93).

2.6.3.1.GP-IIb-IIIa kompleksinde ve fibrinojen molekülünde olan değişiklikler

Trombosit aktivasyonu sırasında GP-IIb-IIIa kompleksinde olan değişiklikler birkaç yolla gösterilebilir. Örneğin aktive hale gelmiş GP-IIb-IIIa kompleksine karşı geliştirilmiş olan monoklonal antikorlar (PAC-1) aracılığı ile(94) , ya da aktivasyon sonucu GP-IIb-IIIa kompleksine yapışan fibrinojen molekülü , anti-fibrinojen poliklonal veya monoklonal antikorlar ile saptanabilir(95). Aktive olmuş GP-IIb-IIIa kompleksi daha düşük afinitede olmak üzere vWF ve fibronektin için de reseptör özelliğine sahiptir. Bu nedenle aktive olmuş trombositlerin taşıdıkları vWF ve fibronektinin, bu moleküllere karşı geliştirilmiş poliklonal veya monoklonal antikorlar ile gösterilmesi de mümkündür(96,97).

Aktive olmuş GP-IIb-IIIa kompleksine bağlandığı zaman fibrinojen molekülünün kendisinde de şekil değişikliği olmaktadır. Bu yeni değişikliği saptayabilen monoklonal

antikorların kullanılması ile aktive olmuş trombositlere yapışmış olan fibrinojenin, plazmadaki fibrinojenden bağımsız olarak görülmesi mümkündür(86).

Aktive olmuş GP-IIb-IIIa kompleksine fibrinojen molekülünün yapışması ile GP-IIb-IIIa kompleksinde yeni bir şekilsel değişiklik ortaya çıkmakta ve böylece LIBS (ligand induced binding sites) adı verilen yeni epitoplara karşı geliştirilen monoklonal antikorlar ile de aktive trombositlerin saptanması mümkündür(98).

2.6.3.2. Alfa granül membran antijenlerinin gösterilmesi

Trombosit aktivasyonunun gösterilmesi, degranülasyon sonucu trombosit yüzeyinde beliren granül membran antijenlerinin saptanması yoluyla da yapılabilmektedir. GMP-140 bunlar içinde ilk tanımlanan antijenlerden birisi olup PADGEM, CD62 antijen ve P-selektin olarak da adlandırılmaktadır(99,100). GMP-140 alfa granüllerin membranları üzerinde bulunmaktadır. Ayrıca yoğun granüllerin membranları üzerinde de gösterilmiştir(101). İstirahat durumunda ki trombositlerin yüzeyinde 1000 molekülden daha az sayıda iken, trombosit aktivasyonu ile hücre başına 10.000 molekülün üzerine çıkmaktadır(102,103). Selektinler ailesinin bir üyesi olan P-selektin, ELAM-1 (E-selektin) ve lenfosit homing reseptör (L-selektin) gibi bir adezyon molekülüdür(100-104). Nötrofiller ve monositler için yapışma yeri olan P-selektinin aktive trombositlerin RES hücreleri tarafından dolaşımdan uzaklaştırılmasında rol oynadığı düşünülmektedir(105).

Alfa granüllerin membranlarında bulunan GMP-33 de P-selektin gibi istirahat halindeki trombositlerde çok az sayıda bulunduğu halde, aktivasyonla ekspresyonu belirgin olarak artan başka bir antijendir(106).

Trombositlerdeki alfa granüllerin içinde bulunan ve aktivasyon ile ortama salınan trombospondin ve PF-4, degranülasyondan sonra trombosit üzerindeki reseptörlerine bağlanmaktadır. Bu nedenle trombosit üzerinde bulunan trombospondin de trombosit aktivasyon göstergesi olarak kullanılabilir(107).

2.6.3.3.Lizozom membran antijenlerinin gösterilmesi

Plateletlerdeki lizozomların membranlarında bulunan GP-53 veya CD63 olarak bilinen bir glikoprotein de platelet aktivasyonu ile hücre zarında ekspresyonu artmaktadır (96,108). Fonksiyonu tam olarak bilinmeyen bu proteine diğer hücrelerde ve tümör hücrelerinde de rastlanabilmektedir (109).

Lizozomal membranlarda bulunan ve aktivasyon ile platelet membranlarında ekspresyonu artan diğer iki protein LAMP-1 ve LAMP-2 dir (110)

2.6.3.4.Yoğun cisimcik membran antijenlerinin gösterilmesi

Granulophysin yoğun granül membranında bulunan ve platelet aktivasyonu ile ekspresyonu artan diğer bir antijendir. (101)

2.6.3.5.GP-Ib ekspresyonundaki azalışın saptanması

Trombin ile oluşan platelet aktivasyonu sırasında, yüzeye bağlanan kanalikular sistem ve alfa granül membranlarındaki GP-IIb-IIIa kompleksinin translokasyonu nedeni ile GP-IIb-IIIa kompleks ekspresyonu artarken diğer taraftan kanaliküler sisteme sekestrasyonu nedeni ile GP-Ib ekspresyonunda azalma olmaktadır (107).

Tüm bu yöntemler, trombosit aktivasyonundaki küçük değişikliklerin duyarlı birer göstergesidirler ve bu nedenle *in vitro* koşullarda trombosit aktivasyonun gösterilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.ÇALIŞMA GRUBU

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji Bilim Dalı ve İç Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniklerine başvuran ve yaşları 26 ile 61 (ortanca 44) arasında değişen 18 hipertiroidi (8 Graves ve 7 multinodüler guatr, 3 toksik adenom) ve 7 hipotiroidi tanısı almış hastalar üzerinde yapıldı. Yaş ve cinsiyet uyumlu 10 sağlıklı birey kontrol grubu olarak kullanıldı. Hastaların hiçbirinde kanama anamnezi, ailede kanamalı hastalık, splenektomi öyküsü ve son 10 gün içinde aspirin ve NSAI (non-steroid antiinflamatuvar) ilaç gibi trombosit fonksiyonlarını etkileyecek ilaç kullanımı öyküsü yoktu. Hipertroidili hastalara 300-600 mg/gün dozda propiltioürasil, hipotroidili hastalara 0,25 µg/gün dozda L-Tiroksin PO hastalar ötroid oluncaya kadar doz ayarlaması ile uygulandı. Hipertroidili hastalara antitiroid tedavi süresince beta blokör tedavi verilmedi. Hastalardan tedavi öncesi ve tedavi ile ötiroid hale geldikten sonra kan örnekleri geniş çaplı özel iğne ile staz yapmaksızın,ön kol üzerinde uygun çapta bir vene girilerek alındı. İlk 2mL kan örneği EDTA içeren tüplere alınarak otomatik tam kan sayımı için kullanıldı. Daha sonraki örnekler trombosit agregasyon ve aktivasyon çalışmalarında kullanılmak üzere % 3,8 oranında sodyum sitrat içeren (1mL sitrat 9 mL kan örneği) tüplere alındı. Tüm çalışmalar kan örneklerinin alınmasından sonra en geç 2 saat içerisinde gerçekleştirildi.

3.2.TAM KAN SAYIMI

Tam kan sayımı Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda bulunan Cell-dyne 3700, Abbott otomatik tam kan sayım cihazı kullanılarak çiftli çalışma ilkeleri ile yapıldı.

3.3.TİROİD FONKİYON TESTLERİ

Tiroid fonksiyon testleri chemiluminescence immunoassay (ACS:180 Chiron Diagnostics) yöntemi ile ölçüldü.

3.4.AGREGASYON ÇALIŞMALARI

Trombositlerin agonistlere karşı agregasyon yanıtlarının değerlendirilmesinde Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Özel Hematoloji Laboratuvarı'nda bulunan tam kan yöntemiyle çalışan impedans agregometresi (Chrono-Log Whole Blood ImpedanceAggregometer, model 550, Chrono-Log Havertown,PA,U:S:A) kullanıldı.

Trombositlerin agonistlere (Chrono-Log,Havertown,PA;U.S.A) karşı olan agregasyon yanıtlarını değerlendirilmesi amacıyla ADP 10 $\mu\text{mol/L}$, kollajen 2 $\mu\text{mol/L}$ ve ristosetin 10 $\mu\text{mol/L}$ 'lik final konsantrasyonlarında kullanıldı.

Agregasyon yanıtları aşağıda belirten şekilde değerlendirildi:

- i.Dakikalık maksimum agregasyon hızı (ohm/dakika)
- ii.Agonistin eklenmesinden sonra 3. ve 6. dakikalardaki maksimum agregasyon düzeyi (ohm)
- iii.Agonistin eklenmesinden sonra izlenen maksimum agregasyon düzeyi (ohm)

3.5.MONOKLONAL ANTİKORLAR

Akış sitometresi ile yapılan ölçümlerde incelenen partiküllerin trombosit olduklarının gösterilmesi amacıyla insan trombosit glikoprotein (GP)-IIIa (CD61) antijenine karşı

geliştirilmiş olan floresan ile direk olarak bağlı mouse monoklonal antikor (anti-CD61-FITC, Immunotech) kullanıldı.

Aktive trombositlerin saptanması amacıyla insan trombosit CD-62 (p-selektin) antijenine karşı geliştirilmiş olan floresan direk olarak bağlı mouse monoklonal antikor (anti-CD62 PE Immunotech) kullanıldı.

3.6.AKIŞ SİTOMETRİK ANALİZ

Trombosit aktivasyon analizleri Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Özel Hematoloji Laboratuvarında bulunan akış sitometresi (Epics XL-MCL, Coulter Electronics INC., FL, USA) kullanılarak gerçekleştirildi.

Akış sitometresi ile yapılacak analizler için tam kan yöntemi kullanıldı. Kan örnekleri, hastalardan ve eş zamanlı kontrol grubundan alınmasını takiben en geç 10 dakikalık süre içinde laboratuvara ulaştırıldı ve 5 µL kan örneği, 50µL Heps-buffered saline (HPS) (0,145 mol/L NaCl, 5×10^{-3} mol/L KCL, 1×10^{-3} mol/L MgSO₄, 0,01 mol/L Heps, pH 7,4) ve 5 µL monoklonal antikor (anti-CD61-FITC veya anti-CD62-PE veya negatif izotipik kontrol) içeren tüplere konuldu. Örneklerin 20 dakika süre ile karanlık bir ortamda ve oda sıcaklığında inkübasyonunu takiben 0,5 mL %2'lik formyl saline (%0,9 NaCl içinde formaldehyde) konularak trombositler dilue ve fikse edildi. En geç 2 saat içinde akış sitometresi ile ölçümler yapıldı.

Akış sitometresi 15 mikron çapındaki boncuklar (Immunocheck, Coulter Electronics, Inc., FL, USA) ile kalibre edildikten sonra tam kan yöntemi ile hazırlanan örnekler cihaza verildi. Parçalanmış hücre artıkları ve elektronik kirlilik ön saçının (forward scatter)

üzerinde ayarlama yapılarak uzaklaştırıldı. Öncelikle trombositler büyüklük ve granüleritelerine göre hücrelerin dağılımlarını gösteren ön (forward) ve 90 derecelik yan saçınım (right-angle light scatter) histogramı kullanılarak, eritrosit ve lökositlerden ayrıldı ve trombositler ile ilgili analizler belirlenen bu bölge üzerinde gerçekleştirildi. Analiz bölgesindeki partiküllerin en az %98'inin CD61 taşıdığı gösterildi (CD61 pozitif partikül yüzdesi). Aktive trombosit oranının saptanması için analiz bölgesindeki partiküllerden negatif izotipik kontrolün floresansından daha yoğun antiCD62-PE floresans gösterenlerin total partikül içerisindeki yüzdesi (CD62 pozitif trombosit yüzdesi) saptandı. CD62 floresans yoğunluğu, yani trombosit başına düşen ortalama CD62 molekül miktarının göstergesi olarak ortalama kanal numarası (mean channel number) kullanıldı.

3.7.İSTATİSTİK

İstatistik analizler SPSS hazır istatistik paket programı (SPSS for Windows, Version 10.0, SPSS inc., IL, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Gruplar arası ve tedavi öncesi ve sonrası farklılıkların analizinde non-parametrik "*Mann Whitney –U testi*" ve "*Wilcoxon's signe- rank test*" ve korelasyonlar için "*Spearman's rank correlation coefficients*" kullanıldı. 0.05 den küçük "p" değerleri anlamlı olarak kabul edildi. Metin içersisinde, tablo ve şekillerdeki değerler ortalama (SD) ve ortanca (min-max) (minimum-maksimum) olarak verildi.

4.SONUÇLAR

1. Yaş, cinsiyet, beyaz küre ve trombosit sayısı ve ortalama trombosit volümü açısından değerlendirme:

a. Kontrol grubu ile hipo ve hipertroidili hastaların ilk tanı anındaki parametreleri açısından anlamlı bir fark saptanamadı (Tablo 7-8).

b. Hastaların tedavi öncesi ve ötroid duruma geldikten sonra bakılan parametreleri arasında anlamlı fark saptanamadı (Tablo 7-8).

2. Serbest T3 (sT3), serbest T4 (sT4) ve TSH düzeyleri açısından değerlendirme:

a. Hipertroidili hastalarda tedavi öncesi sT3 ve sT4 değerleri sağlıklı kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek ($p<0,0001$), TSH düzeyi ise düşük ($p<0,0001$) bulundu (Tablo 9).

b. Hipotroidili hastalarda tedavi öncesi sT3 ve sT4 değerleri sağlıklı kontrol grubundan anlamlı olarak düşük ($p<0,0001$), TSH düzeyi ise yüksek ($p<0,0001$) bulundu (Tablo 9).

c. Hasta grubunda tedavi öncesi ve ötroid duruma geldikten sonra ölçülen tiroid hormon düzeyleri arasında da anlamlı fark gözlemlendi (Tablo 9).

3. Agregasyon yanıtları açısından değerlendirme:

a. Kontrol grubu ile hastaların tedavi öncesi ADP, kollagen ve ristosetine verdikleri agregasyon yanıtları açısından anlamlı bir fark saptanamadı ($p>0,05$) (Tablo 10-a ve 10-b).

b. Hipertiroidili hastalarda tedavi öncesi ve antitiroid tedavi sonrası ötroid durumda agregasyon yanıtları açısından anlamlı fark saptanamadı ($p>0,05$) (Tablo 10-a ve 10-b).

c. Hipotiroidili hastalarda tedavi öncesi ve tiroid replasman tedavisi sonrası ötiroid durumda agregasyon yanıtları açısından anlamlı fark saptanamadı ($p>0,05$) (Tablo 10-a ve 10-b).

4. Trombosit aktivasyonu açısından değerlendirme:

- a. Kontrol grubu ile hastaların tedavi öncesi CD62 yüzdeleri ve hücre başına düşen CD62 yoğunluğu (ortalama kanal numarası) açısından anlamlı bir fark saptanamadı ($p>0,05$) (Tablo 11)
- b. Hipertiroidili hastalarda tedavi öncesi ve antitroid tedavi sonrası ötroid durumda CD62 yüzdeleri ve hücre başına düşen CD62 yoğunluğu (ortalama kanal numarası) açısından anlamlı fark saptanamadı ($p>0,05$) (Tablo 11).
- c. Hipotiroidili hastalarda tedavi öncesi ve troid replasman tedavisi sonrası ötroid durumda CD62 yüzdeleri ve hücre başına düşen CD62 yoğunluğu (ortalama kanal numarası) açısından anlamlı fark saptanamadı ($p>0,05$) (Tablo 11).
- d. Hipertiroidili hastalarda ilk tanı anında serbest T3 düzeyi ile hücre başına düşen CD62 molekül yoğunluğu arasında anlamlı pozitif korelasyon saptandı ($p<0.05$).

5. Anti-fosfolipid antikor ve anti-trombosit antikor açısından değerlendirme:

Hasta ve kontrol grupları anti-fosfolipid antikor (APA) ve anti-trombosit antikor (ATA) pozitiflikleri açısından da araştırılmış olup hiper ve hipotroidili birer hastada APA; hipertroidili iki, hipotroidili bir hastada ise ATA pozitif olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda ise her iki antikor pozitiflik saptanmamıştır.

Tablo 7:Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri

		<u>Hipertiroid</u> <u>Ortalama (SD)</u> <u>Ortanca (min-max)</u>	<u>Hipotiroid</u> <u>Ortalama(SD)</u> <u>Ortanca (min-max)</u>	<u>Kontrol</u> <u>Ortalama (SD)</u> <u>Ortanca (min-max)</u>	p
Yaş		45 ±9 45 (26-61)	46 ±16 47 (15-70)	43 ±11 43 (16-61)	>0,05
Cinsiyet	K	16	5	12	
	E	2	7	2	

K: kadın

E: erkek

Tablo 8:Kontrol grubu ile hasta grubunun tedavi öncesi ve tedavi ile ötiroid olduktan sonra ki beyaz küre ve trombosit sayıları

		<u>Hipertiroid</u> <u>Ortalama (±SD)</u> <u>Ortanca (min-max)</u>	<u>Hipotiroid</u> <u>Ortalama (±SD)</u> <u>Ortanca (min-max)</u>	<u>Kontrol</u> <u>Ortalama(±SD)</u> <u>Ortanca (min-max)</u>	p
Beyaz küre sayısı(10⁹/L)	TÖ	7,0 ±1,9 7,2(5,0-10,6)	7,0 ±1,4 6,5 (4,0-11,0)	7,8 ±1,4 8,1 (5,1-9,6)	>0,05
	TS	8,0±1,2 8,4(6,0-10,5)	7,6±1,4 7,5(7,5-9,6)		
	p	>0,05	>0,05		
Trombosit Sayısı (10⁹/L)	TÖ	277 ±68 283 (156-429)	229±41 225 (176-302)	256 ±67 243 (192-384)	>0,05
	TS	264 ±61 265 (179-353)	252 ±61 252 (214-291)		
	p	>0,05	>0,05		
MPV	TÖ	9,28 ±0,68 9,21 (8,24-10,6)	9,60 ±1,61 9,44 (7,44-12,8)	9,36 ±0,96 9,53 (7,8-11,25)	>0,05
	TS	9,18 ±0,62 9,28 (7,75-9,92)	9,25 ±0,76 9,29 (7,83-10,26)		
	p	>0,05	>0,05		

TÖ: tedavi öncesi

TS: tedavi sonrası

Tablo 9: Kontrol ve hasta grubunun tedavi öncesi ve tedavi ile ötiroid olduktan sonra ki tiroid hormon düzeyleri

		<u>Hipertiroid</u> Ortalama (SD) Ortanca (min-max)	<u>Hipotiroid</u> Ortalama (SD) Ortanca (min-max)	<u>Kontrol</u> Ortalama (SD) Ortanca (min-max)	p
sT3 (pg/L)	TÖ	9,74 ±5,34 7,82 (4,46-25,0)	1,99 ±0,69 1,8 (1,15-3,17)	3,33 ±0,77 3,11 (2,84-5,91)	<0,001
	TS	2,77 ±0,38 2,80 (2,27-3,4)	2,59 ±0,51 2,73 (1,63-3,1)		
	p	<0,001	<0,001		
sT4 (ng/dL)	TÖ	9,31 ±12,41 3,46 (1,39-35,2)	0,79 ±0,34 0,64 (0,35-1,42)	1,43 ±0,19 1,00 (0,61-2,77)	<0,001
	TS	1,28 ±0,49 1,35 (0,35-1,8)	1,58 ±0,68 1,29 (0,98-2,94)		
	p	<0,001	<0,001		
TSH (µu/mL)	TÖ	0,05 ±0,10 0,01 (0,01-0,3)	45,5 ±72,06 11,29 (7,94-57,93)	1,15 ±0,63 1,00 (0,61-2,2)	<0,001
	TS	2,06 ±1,41 1,56 (0,5-5,18)	2,08 ±1,63 1,65 (0,5-5,27)		
	p	<0,001	<0,001		

TÖ:Tedavi öncesi

TS:Tedavi sonrası

Tablo 10-a: Kontrol ve hasta grubunun tedavi öncesi ve tedavi ile ötiroid olduktan sonra ki agregasyon yanıtları açısından değerlendirme

			Hipertiroid Ortalama (SD) Ortanca (min-max)	Hipotiroid Ortalama (SD) Ortanca (min-max)	Kontrol Ortalama (SD) Ortanca (min-max)	P
MAH ohm/dk	Kollajen	Tedavi öncesi	6,5 ±3,2 6,0 (1,5-12,5)	7,1±4,0 6,5(3,0-13,5)	6,0±2,4 6,2 (2,0-10,0)	>0,05
		Tedavi sonrası	8,2 ±3,3 8,5 (4,5-12,5)	8,0 ±4,2 9,0 (1,0-14,0)		
		p	>0,05	>0,05		
	Ristosetin	Tedavi öncesi	10,8 ±8,6 6,5 (3-28,5)	6,5±5,3 5 (1,5-17,5)	9,0±5,0 7,5(3,0-18,0)	>0,05
		Tedavi sonrası	15,0 ±10,90 11 (3-28,5)	11,5 ±11,33 9,2 (2-33,5)		
		p	>0,05	>0,05		
	ADP	Tedavi öncesi	6,2 ±4,9 6,0 (2,0-8,5)	3,6 ±1,37 3,7(2,0-5,0)	5,2±3,6 4,0(2,5-16,0)	>0,05
		Tedavi sonrası	8,5 ±3,6 7,5 (2,5-14,5)	7,8±5,2 6,5(1,0-17,5)		
		p	>0,05	>0,05		
MAD Ohm	Kollajen	Tedavi öncesi	18,6±6,7 18,0(8,0-34,0)	18,0 ±4,7 18,0 (10,5-22,5)	19,5±4,6 20,5(9,5-24,0)	>0,05
		Tedavi sonrası	20,2 ±5,9 20,0 (3,0-28,5)	21,9 ±8,5 25,0 (5,0-32,0)		
		p	>0,05	>0,05		
	Ristosetin	Tedavi öncesi	18,8 ±6,9 18,0 (8,0-27,0)	13,21 ±8,69 12,0 (4,0-26,5)	19,6±5,5 17,0(12,0-28,0)	>0,05
		Tedavi sonrası	20,6 ±8,4 17,0 (6,5-35)	17,6 ±9,5 15,7 (9,0-32,5)		
		p	>0,05	>0,05		
	ADP	Tedavi öncesi	15,14±6,9 13,7 (4,0-17,5)	12,5 ±6,7 13,0 (4,0-20,0)	16,6±5,3 16,0(10,0-30,0)	>0,05
		Tedavi sonrası	21,0 ±5,7 20,0 (13,0-30,0)	18,2 ±9,1 14,0 (8,0-32,0)		
		p	>0,05	>0,05		

TÖ:Tedavi öncesi
TS:Tedavi sonrası

MAH:Maksimum agregasyon hız
MAD:Maksimum agregasyon düzeyi

Tablo 10-b:Kontrol ve hasta grubunun tedavi öncesi ve tedavi ile ötiroid olduktan sonra ki agregasyon yanıtları açısından değerlendirme

			Hipertiroid Ortalama (SD) Ortanca(min-max)	Hipotiroid Ortalama (SD) Ortanca (min-max)	Kontrol Ortalama (SD) Ortanca (min-max)	p
3.dak AD Ohm	Kollajen	Tedavi öncesi	12,9 ±6,6 12,0 (1,0-26,0)	11,6 ±4,3 10,5 (6,0-17,5)	13,3±4,4 15,5(10,0-17,5)	>0,05
		Tedavi sonrası	16,35±3,91 17 (11-22,5)	17,07 ±8,18 18 (1-26)		
		p	>0,05	>0,05		
	Ristosetin	Tedavi öncesi	15,1 ±6,0 14,5 (8,0-30,5)	15,1 ±6,0 11,0 (4,0-26,0)	14,8±5,2 14,8(8,0-22,0)	>0,05
		Tedavi sonrası	16,6±7,0 15,2 (5,0-22,5)	13,8 ±10,15 12,0 (3,0-32,0)		
		p	>0,05	>0,05		
	ADP	Tedavi öncesi	11,3 ±6,0 10,5 (3,0-22,5)	7,6 ±3,3 7,7 (3,5-11,5)	10,5±3,7 9,5(6,0-18,0)	>0,05
		Tedavi sonrası	15,2 ±4,5 15,5 (6,5-22,5)	14,6 ±8,9 10,5 (2,0-26,0)		
		p	>0,05	>0,05		
6.dak AD Ohm	Kollajen	Tedavi öncesi	17,0±6,5 17,0 (5,5-26,0)	16,8±4,6 17,0 (10,0-21,5)	17,9±4,5 19,7(8,5-22,5)	>0,05
		Tedavi sonrası	20,0 ±4,3 19,5 (11,0-26,5)	21,1 ±9,0 23,5 (3,0-31,0)		
		p	>0,05	>0,05		
	Ristosetin	Tedavi öncesi	17,8 ±6,2 17,5 (8,0-33,5)	13,1±8,6 12,0 (4,0-26,5)	18,3±5,5 15,5(10,5-27,0)	>0,05
		Tedavi sonrası	19,4 ±7,9 17,0(6,0-35,0)	16,8 ±9,3 14,7(9,5-32,5)		
		p	>0,05	>0,05		
	ADP	Tedavi öncesi	15,3 ±7,0 15,0(2,0-27,5)	11,6±4,3 12,0(4,0-18,5)	14,5±4,6 14,5(8,0-25,0)	>0,05
		Tedavi sonrası	19,5 ±5,2 19,0(10,0-30,5)	17,64±10,1 12,5(5,0-31,0)		
		p	>0,05	>0,05		

TÖ:Tedavi öncesi
TS:Tedavi sonrası

MAH:Maksimum agregasyon hız
MAD:Maksimum agregasyon düzeyi

Tablo 11: Kontrol ve hasta grubunun tedavi öncesi ve tedavi ile ötiroid duruma geldikten sonra ki CD 62 yüzdesi ve ortalama kanal numarası

		<u>Hipertiroid</u> Ortalama (SD) Ortanca (min-max)	<u>Hipotiroid</u> Ortalama (SD) Ortanca (min-max)	<u>Kontrol</u> Ortalama (SD) Ortanca (min-max)	P
<u>CD62%</u>	<u>TÖ</u>	21 ±19 14 (2-53)	18 ±16 13 (4-43)	4 ±1 4 (3-8)	>0,05
	<u>TS</u>	25 ±25 20(2-74)	22 ±26 10 (1-67)		
	<u>p</u>	>0,05	>0,05		
<u>CD62 MCN</u>	<u>TÖ</u>	7,21 ±3,79 5,80 (2,17-14,8)	9,13 ±5,20 7,9 (3,18-15,6)	10,56 ±6,57 7,27 (4,97-24,2)	>0,05
	<u>TS</u>	11,58 ±9,01 8,35 (2,52-28,2)	8,44 ±5,52 7,02 (3,54-13,2)		
	<u>p</u>	>0,05	>0,05		

TÖ:Tedavi öncesi

TS:Tedavi sonrası

5.TARTIŞMA

Tiroid hastalıklarının seyri sırasında hemostatik sistemde değişikliklerin olduğu bilinmektedir. Genelde izlenen değişikliklerin çoğunun kendini subklinik şekilde göstermesine rağmen, önemli kanama veya tromboembolik olaylarla da karşılaşılabilir (52). Örneğin, hipertiroidili hastalarda arteriyel tromboembolik olay sıklığı % 8-40 arasında bildirilmekte, özellikle serebral tromboembolilere sık rastlanmaktadır (2,3). Tiroid hastalıklarında hemostatik sistemde izlenen değişikliklerin patogenezi açığa çıkarmak üzere yapılan bir çok çalışmada tiroid hormonlarının eksiklik veya fazlalıklarının kalp ve dolaşım sistemi üzerine etkileri incelenmiştir (111,112). Hemostatik sistemde yer alan koagulan ve antikoagulan proteinler, fibrinolitik ve antifibrinolitik sistemler ile endotel fonksiyonlarının değerlendirildiği çalışmaların sayısı ise sınırlıdır(5,30,31,34,37,38,52,53,113-118). Trombositlerin rolünün araştırıldığı çalışmalarda ise daha çok hormonların trombosit sayıları ve volümü üzerine yaptığı etkiler araştırılmıştır. Trombosit fonksiyonlarını saptamaya yönelik yapılan çalışmaların sayısı son derece az olup çelişkili sonuçlar bildirilmiştir(6-9,13-15,19-22,24,25).

Bizim yaptığımız çalışmada trombosit fonksiyonları hipertiroidili ve hipotiroidili hastalarda iki farklı yöntem olan impedans agregometresi ve akış sitometresi ile değerlendirilmiş ve sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

Trombosit agregasyon çalışmaları günümüzde trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanılan en duyarlı *in vitro* testlerden biridir. Bu çalışmalar agregometre adı verilen cihazlar ile yapılmaktadır. Bu cihazların iki farklı sistemle çalışan tipi bulunmaktadır. Optik sistemle çalışan agregometrelerde trombositten zengin plazma kullanılırken, impedans agregometrelerinde ise tam kan kullanılmaktadır. Yaptığımız bu

çalışmada agregasyon testlerinde hipertiroidili, hipotiroidili hastalar ve sağlıklı kontrol grubu arasında agregasyon yanıtları açısından fark bulunamazken, hastalar ötiroid duruma geldikten sonra yapılan agregasyon testlerinde de anlamlı değişiklik saptanmamıştır. Literatürde yer alan çok az sayıdaki çalışmada ise hem hipertiroidi hem de hipotiroidili kişilerde agregasyon yanıtlarının arttığı, azaldığı veya değişmediği yönünde çelişkili sonuçlar yer almaktadır(10,12,119). Tüm bu çelişkili sonuçların nedeni kullanılan agregasyon yöntemlerinin farklı ve standart olmayışından kaynaklanıyor olabilir. Diğer çalışmalarda agregasyon testleri optik sistemle yapılmıştır. Bizim çalışmamızda ise optik yönteme göre bazı üstünlükleri bulunan tam kan yönteminin kullanıldığı impedans agregometresi kullanılmıştır. İmpedans agregometresi ile yapılan ölçümler için trombosit zengin ve fakir plazma hazırlanmasına gerek olmadığından kan örneğine trombosit aktivasyonuna yol açarak agregasyon yanıtlarını etkileyebilecek olan santrifügasyon gibi işlemler uygulanmamaktadır. Ayrıca trombositler kendi doğal ortamları içinde incelendikleri için, trombosit fonksiyonlarında etkili olabilecek bir çok labil faktör ve diğer hücreler ortamdaki uzaklaştırılmamaktadır. Testlerin değerlendirilmesinde optik sistem kullanılmadığı için lipemik, trombositopenik veya dev trombositleri olan hastalarda da impedans agregometresi güvenle uygulanabilmektedir.

Tiroid hastalıklarının seyri sırasında trombosit aktivasyonunun değerlendirildiği İngilizce literatürde yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır. Otoimmün tiroid hastalıklarında tiroid dokusu ve endotel yüzeyinde adezyon moleküllerinin ekspresyonunun incelendiği az sayıda çalışma yayınlanmıştır (41,120-123). Hara ve ark.(41) tarafından yapılan bir çalışmada Grave's Hastalığı olan hastalarda plazmada solubl p-selektin düzeyine bakılmıştır. Bu çalışmada plazma solubl p-selektin düzeylerinin hasta grubunda sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğu, anti-tiroid tedavi verilmesi ile hastalar ötiroid hale geldikten yaklaşık 6 ay sonra p-selektin düzeylerinin normale döndüğü gösterilmiştir (41). Plazma p-

selektin düzeyleri ile serbest tiroid hormon düzeyleri arasında bir korelasyon saptanamamıştır. Bizim yaptığımız çalışmada trombosit aktivasyonunun hassas bir göstergesi olan trombosit yüzeyinde eksprese olan p-selektin (CD62) molekül yüzdesi ve her bir trombosit başına düşen molekül sayısının indirekt bir göstergesi olan CD62 yoğunluğu (ortalama kanal numarası) akış sitometresi ile araştırılmıştır. Hasta ve kontrol grubu arasında ve hastalar ötiroid duruma geldikten sonra yapılan ölçümlerde anlamlı bir fark saptanamazken, hipertiroidili hastalarda ilk tanı anında bakılan serbest T3 düzeyi ile trombosit yüzeyinde eksprese olan p-selektin yoğunluğu arasında pozitif korelasyon saptanmıştır ($p < 0,05$). Bu durum tiroid hormon fazlalığının trombosit aktivasyonuna yol açtığını destekleyen bir bulgudur, ancak CD62 taşıyan hücre yüzdesinde artış olmaması ve sağlıklı kontroller ile hasta grubu arasında anlamlı fark bulunmaması nedeni ile trombosit aktivasyonunun daha çok subklinik düzeyde olduğunu düşündürmektedir.

Trombosit yüzeyinde eksprese edilen CD62 molekülü aktivasyondan sonra kısa bir süre hücre yüzeyinde izlenmekte, aynı zamanda aktive olan trombositler monosit ve nötrofillere yapışabilmektedir. Bu nedenle bizim çalışmamızda hastalar ile kontrol grubu arasında CD62 ekspresyonu yönünden farklılık olmaması, aktive trombositlerin akış sitometresinde ölçüm alanı içine alınamamış olmasından da kaynaklanabilir. Bu olasılığın değerlendirilebilmesi için nötrofil/monosit-trombosit komplekslerinin ve plazma soluble p-selektin düzeyinin değerlendirildiği çalışmaların yapılması yararlı olabilir.

Beta-bloker tedavisinin değişik hasta gruplarında ve sağlıklı kişilerde trombosit agregasyonu ve aktivasyonu üzerine farklı etkilerinin olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (8,124-127). Çalışmamızda beta-bloker tedavisinin olası etkilerini önleyebilmek için beta-bloker tedavisi kullanması gereken hipertiroidili hastalar çalışmaya alınmamıştır. Trombosit agregasyonlarının değerlendirildiği diğer çalışmalarda beta-bloker tedavisi alan hastalar

olduğu için literatürde izlenen çelişkili sonuçlardan beta-bloker kullanımı sorumlu olabilir.

Çalışmamızda yer alan hasta ve kontrol grupları anti-fosfolipid antikor (APA) ve anti-trombosit antikor (ATA) pozitiflikleri açısından da araştırılmış olup hiper ve hipotiroidili birer hastada APA; hipertiroidili iki, hipotiroidili bir hastada ise ATA pozitif olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda her iki antikor yönünden pozitiflik olmamasına karşın bu antikorların hemostatik sistem üzerinde etkileri yönünden yorum yapabilmek için olgu sayılarının yetersiz olduğu açıktır.

Yaptığımız bu çalışmada trombosit aktivasyonu ve trombositlerin agonistlere karşı gösterdikleri agregasyon yanıtları hassas testler olan impedans agregometresi ve akış sitometrisi ile ölçülmüş, hasta grupları ile kontroller arasında anlamlı farklılık saptanamamıştır. Bu durum hipertiroidi ve hipotiroidili hastalarda hemostatik sistemde izlenen tromboemboli yada kanamaya yatkınlık gibi durumlardan trombositlerin ön planda sorumlu olmadıklarını düşündürmektedir. Tiroid hastalıklarında izlenen hemostatik sistem değişikliklerinden daha çok tiroid hormonlarının eksiklik veya fazlalıklarının koagülasyon – fibrinolitik sistem ve/veya endotel üzerinde yaptığı direkt yada indirekt etkiler sorumlu olabilir. Ayrıca özellikle otoimmün kökenli tiroid hastalıklarında koagülasyon sistemi, trombositler ve/veya endotel ile etkileşebilen otoantikorların da sorumlu olabileceği akılda tutulmalıdır.

6.ÖZET

Tiroid hastalıklarının seyri sırasında hemostatik sistemde çeşitli değişikliklerin olduğu bilinmektedir. Bunlar kendini subklinik laboratuvar bulgularından klinik açıdan önemli olabilecek bozukluklara kadar değişen geniş bir yelpazede göstermekte hatta önemli tromboembolik olaylar veya kanamalar izlenebilmektedir. Genel olarak hipotiroidili hastalarda kanamaya yatkınlık, hipertiroidili hastalarda ise tromboembolik olay sıklığında artış olduğu bilinmektedir. Tiroid hastalıklarında izlenen bu tür koagülopatilerin oluşumundan tiroid hormonlarının eksiklik veya fazlalıklarının trombositlerin, koagülasyon faktörlerinin üretim, sentez ve fonksiyonları ile kan akışkanlığının değişmesi gibi çeşitli parametreler üzerinde oluşturduğu direkt yada indirekt etkiler sorumlu tutulmaktadır. Tiroid hastalıklarında hemostatik sistemde izlenen değişikliklerin patogenezinde trombositlerin yerini belirlemeye yönelik yapılan çalışmaların sayısı sınırlıdır. Trombositlerin fonksiyonlarının değerlendirildiği çalışmalarda ise çelişkili sonuçlar izlenmektedir.

Bu çalışma yaşları 26 ile 61 (ortanca 44) arasında değişen 18 hipertiroidi (8 Graves ve 7 multinodüler guatr, 3 toksik adenom) ve 7 hipotiroidi tanısı almış hastalar üzerinde yapıldı. Yaş ve cinsiyet uyumlu 10 sağlıklı birey kontrol grubu olarak kullanıldı. Hipertiroidili hastalara tanı konduktan sonra 300-600mg/gün dozda propiltiourasil (PTU), hipotiroidili hastalara 25 µg/gün dozda L-Tiroksin PO ile başlandı. Hastalar ötiroid oluncaya kadar hastanın klinik ve laboratuvar sonuçlarına göre doz titrasyonu ile doz ayarlaması yapıldı. Hastalardan tedavi öncesi ve tedavi ile ötiroid hale geldikten sonra kan örnekleri alındı. Trombositlerin agonistlere karşı agregasyon yanıtlarının değerlendirilmesinde tam kan yöntemiyle çalışan impedans agregometresi kullanıldı. Aktive trombositlerin saptanması amacıyla insan trombosit CD-62 (p-selektin) antijenine karşı geliştirilmiş olan anti CD62 FITC direk olarak bağlı mouse monoklonal antikor kullanıldı. Trombosit başına düşen ortalama CD62 molekül miktarının indirekt göstergesi olarak ortalama kanal numarası

(mean channel number) kullanıldı. Yaptığımız bu çalışmada agregasyon testlerinde hipertiroidili, hipotiroidili hastalar ve sağlıklı kontrol grubu arasında agregasyon yanıtları açısından fark bulunamazken, hastalar ötiroid duruma geldikten sonra yapılan agregasyon testlerinde de anlamlı değişiklik saptanmamıştır. Benzer şekilde trombosit p-selektin (CD62) molekül yüzdesi ve CD62 yoğunluğu (ortalama kanal numarası) açısından da anlamlı bir fark saptanamazken, hipertiroidili hastalarda serbest T3 düzeyi ile trombosit yüzeyinde eksprese olan p-selektin yoğunluğu arasında pozitif korelasyon saptanmıştır ($p<0,05$). Bu durum hipertiroidi ve hipotiroidili hastalarda hemostatik sistemde izlenen tromboemboli yada kanamaya yatkınlık gibi durumlardan trombositlerin ön planda sorumlu olmadıklarını düşündürmektedir. Tiroid hastalıklarında izlenen hemostatik sistem değişikliklerinden daha çok tiroid hormonlarının eksiklik veya fazlalıklarının koagülasyon – fibrinolitik sistem ve/veya endotel üzerinde yaptığı direkt yada indirekt etkiler sorumlu olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Myrup B, Bregengard C& Faber J. Primary haemostasis in thyroid disease. *J of Intern Med* 1995;238:59-63
2. Presti CF, Hart RG. Thyrotoxicosis, atrial fibrillation and embolism, revisited. *Am Heart J* 1989;117:976-977
3. Bar-Sela S, Ehrenfeld M, Eliakim. Arterial embolism in thyrotoxicosis with atrial fibrillation. *Arch Intern Med* 1981;141:1191-1192
4. Parker JLW&Lawson DH. Death from thyrotoxicosis. *Lancet* 1973 ii 894-895
5. Marongiu F, Cont M, Murtas ML, et al. Anticardiolipin antibodies in Graves' disease: relationship with thrombin activity in vivo. *Thromb Res* 1991;64:745-749
6. Woodruff P. The behaviour of the platelets in thyrotoxicosis. *Med J of Australia* 1940;2:411-414
7. Lamberg BA, Kivikangas V & Pelkonen R. Thrombocytopenia and decreased life span of thrombocytes in hyperthyroidism. *Ann of Clin Res* 1971;3:98-102
8. Panzer S, Haubenstock A. Platelets in hyperthyroidism:Studies on platelet counts, Mean platelet volume. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:491
9. Ford NC, Toomath RJ, Carter JM, et al. Mean platelet volume is increased in hyperthyroidism. *Am J of Hem* 1988;27:190-193
10. Masunaga R, Nagasaka A, Nakai A,et al. Alteration of platelet aggregation in patients with thyroid disorders. *Metab* 1997;46:1128-1131
11. Licata G, Davi G, Scaglione R,et al. Platelet function in hypo-and hyperthyroidism. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1989; 65(9):847-852
12. Hoylaerts MF, Thys C, Arnout J,et al. Recurrent arterial thrombosis linked to autoimmune antibodies enhancing von Willebrand factor binding to platelet and inducing Fc γ - R II reseptor-mediated platelet activation. *Blood* 1998;91(8): 2810-2817

13. Axelrod, A.R. & Berman, L. The bone marrow in hyperthyroidism and hypothyroidism. *Blood* 1951;6:436-453
14. Edson JR, Fecher DR, Doe RP: Low platelet adhesiveness and other hemostatic abnormalities in hypothyroidism. *Ann Intern Med* 82:342-346, 1975
15. Hellem AJ, Seggaard E & Solem JH. The adhesiveness of human blood platelets and thyroid function. *Acta Med Scand* 1975, 197:15-17
16. Nordoy, A., Vik-mo, H. & Bernstein, H. Haemostatic and lipid abnormalities in hypothyroidism. *Scand J Haematol* 1976, 16:154-160
17. Tudhope, G. R. Endocrine disorders. In Israels, M. C. G. & Delamore, I. W. (eds) *Haematological Aspects of systemic disease*. W. B. Saunders, London, 1976, pp. 162-200
18. Endo, Y. Relationship between thyroid function and platelet counts. *Acta Haematol* 1985, 74:58-59
19. Ford H.C., Carter J.M. Chronic hypothyroidism does not lead to small-sized platelets in the circulation *Thromb Haemost* 1988, 60:524
20. Stern, B. & Altschule, M.D. Hematological studies in hypothyroidism following total thyroidectomy. *J Clin Invest* 1936, 15:633-641
21. O.Sjoberg, R.J., Kidd, G. S., Swanson, E. et al. Thromboxane and prostacyclin generation in hypothyroidism. *Clin Res* 1984, 32:690 A
22. Van Doormal, J.J., van der Meer, J., Oosten, H.R., Haie, M. R. & Doorenbos, H. Hypothyroidism leads to more small-sized platelets in circulation. *Thromb Haemost* 1987, 58:964-965
23. Savage, R.A. & Sipple, C. Marlow. Myxedema. *Arch Pathol Lab Med*. 1987, 111:375-377
24. Gardikas, C., Arapakis, G. & Dervenagas, S. The effect of certain hormones on platelet aggregation in vitro. *Acta Haematol* 1972, 47: 297,302
25. O'Regan, S. & Fong, J.S.C. Platelet hyperaggregability in hypothyroid rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1978, 158:575-577

26. Zeigler, Z., Hasiba, U., Lewis, J., Vagnucci, A., West, V.A. & Bezek, E.A. Hemostatic defects in response to aspirin challenge in hypothyroidism. *Am J Hemtol* 1986, 23:391-399
27. Zeigler, Z., Hasiba, U., Lewis, J., et al. Exaggeration of defective platelet function by methyl dopa in hypothyroidism. *Am J Hematol* 1984;17:209-215
28. Ingbar.S.H. The Thyroid gland. In:Wilson, J.D.& Foster, D.W. (eds) *Williams textbook of endocrinology* 7th edition. W.B.Saunders. Philadelphia. 1985.pp.682-815
29. Hymes K, Blum M, Thomson J.A. Alterations in capillary fragility in thyroid disease. *Clin Sci* 1964; 26: 55-60
30. Tachman ML & Guthrie GP Jr.Hypothyroidism: diversity of presentation. *Endocr Rev* 1984;5:456-465
31. Dalton RG, Savidge GF, Matthews KB et al. Hypothyroidism as a cause of acquired von Willebrand's disease. *Lancet* 1987;i:1007-1009
32. Mayaudon H, Crozes P, Riveline JP,et al. Anticorps antiphospholipids an cours d'une maladie de Basedow. *Press Medicale* 1994;23:1496
33. Hofbauer LC, Spitzweg C & Heufelder AE. Graves' disease associated with the primary antiphospholipid syndrome. *J of Rheum* 1996;23:1435-1437
34. Loeliger EA, Esch vd B.The biological disappearance rate of prothrombin, factors VII, X, and X from plasma in hypothyroidism hyperthyroidism, and during fever. *Thromb Diathes Haemorrh* 1963;10:267-277
35. Kellett HA, Sawers JSA, Boulton FE, et al. Problems of anticoagulation with warfarin in hyperthyroidism. *Q J Med.* 1986;58:43-51
36. Padro T, Hoogen vd CM, Emeis JJ. Experimental hypothyroidism increases plasminogen activator inhibitor activity in rat plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993;4:797-800
37. Bennett N.B, Ogston G., Mc Andrew G.M. The Thyroid and fibrinolysis. *Br Med J,* 1967;4:147-148

38. Rennie J.A.N., Bewsher P.D., Murchison L.e., Ogston D. Coagulation and fibrinolysis in thyroid disease. *Acta Haemotol* 1978;59:171-177
39. Kurata Y, Nishioeda Y, Tsubakio T, et al. Thrombocytopenia in Graves' disease: effect of T3 on platelet kinetics: *Acta Haemotol.* 1980; 63:185-190
40. Wintrobe M.w. *Clinical Hematology.* 8th edn. Lea and Febiger, Philadelphia, PA 1981.
41. Hara H., Sugita E., Sato R., et al. Plasma selectin levels in patients with Graves' disease. *Endocrine Journal* 1996;43 (6):709-713
42. Moncada S., Vane JR. Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood vessel walls . *N Engl J Med* 1979;300:1142-7
43. Harlan JM, Harker LA. Hemostasis, thrombosis, and thromboembolic disorders. *Med Clin North Am* 1981;65:855-80
44. Walden TA, McDermott MT, Swanson E, et al. The effect of hyperthyroidism on thromboxane and prostacyclin production. Program of the Sixty-seventh Ann Meeting of The Endocrine Society 1985;358
45. Lam H.C., Wang J.P., Lee LT., et al. Tissue contents of endothelin vary according to thyroid hormone status in rat. *J of Cardiovasc Pharm* 1993;22:299-302
46. Ford HC, Carter JM. Hemostasis in hypothyroidism. *Post Grad Med* 1990;66:280-284
47. Goldsmith RE, Sturgis SH, Lerman J, et al. The menstrual pattern in thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1952;12: 846-855
48. Scott JC. & Mussey, E. Menstrual patterns in myxedema. *Am J Obstet Gynecol* 1964;90:161-165
49. Longcope C. The male and female reproductive systems. In: Ingbar, S.H. & Braverman, L.E. (eds) *The Thyroid*, 5th edition. J.B. Lippincott, Philadelphia, 1986, pp. 1194-1199
50. Attivissimo LA, Litchman SM & Klein I. Acquired von Willebrand's syndrome causing a hemorrhagic diathesis in a patient with hypothyroidism. *Thyroid* 1995;5:399-401

51. Bleising NE, Hambley H & McDonald GA. Acquired von Willebrand's disease and hypothyroidism. *Postgrad Med J* 1990;66:474-476
52. Simone JV, Abildgaard CF, Schulman I: Blood coagulation in thyroid dysfunction. *N Eng J Med* 1965;273:1057-1061
53. Farid NR, Griffiths BL, Collins JR, et al. Blood coagulation and fibrinolysis in thyroid disease. *Thromb Haemost* 1976;35:415-422
54. Hagiwara M, Mamiya S, Hidako H. Selective binding of L-Thyroxine by myosin light chain kinase. *The J of Biol Chem* 1989;264:40-44
55. Lee GR, Bithell TC, Foester J, et al. Platelets and megakaryocytes, In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, eds. *Wintrobe's Clinical Hematology*, Ninth edition. Lea & Febiger, Philadelphia, London 1993, pp 511-39
56. Ulutin O. *The platelets: Fundamentals and Clinical Applications*. İstanbul, Turkey 1976, pp 1-6
57. Maurice M, Pardonge-Lavenne E, Scheiff JM, et al. Blood Platelets, In: *Hemostasis, Thrombosis and Atherosclerosis: Morphology, Physiology, Physiopathology and Pharmacology*. Hologramme, 1988, pp 13-48
58. Gogstad GO, Hagen I, Korsmo R, et al. Evidence for release of soluble, but not of membrane-integrated, proteins from human platelet alpha-granules. *Biochim Biophys Acta* 1982;702:81-9
59. Knoll MH, Schafer AI. Biochemical mechanism of platelet activation. *Blood* 1989;74:1181-95
60. Siess W. Molecular mechanism of platelet activation. *Physiol Rev* 1989;69:58-178
61. Baumgartner HR. Platelet interaction with vascular structures. *Thromb Diath Haemorrh* 1972;51 (suppl)161-76
62. Page CP. The involvement of platelets in non-thrombotic processes. *Trends Pharmacol Sci* 1988;9:66-71
63. White JG: Shape change. *Thromb Diath Haemorrh* 1974;60:159-71

64. Hantgan RR. A study of the kinetics of ADP-triggered platelet shape change. *Blood* 1984;64:896-906
65. Carroll Rc, Butler RG, Morris PA, et al. Seperable assembly of platelet pseudopodal and contractile cytoskeletons. *Cell* 1982;30:385-93
66. White JG. Electron microscopic studies of platelet secretion. *Prog Hemostasis Thromb* 1974;2:49-98
67. Milton JG, Frojmovic MM. Adrenaline and adenosine diphosphate-induced platelet aggregation require shape change. Importance of pseudopods. *J Lab Clin Med* 1984;104:805-15
68. Ehrman M, Toth E, Frojmovic MM. A platelet procoagulant activity associated with platelet shape change. *J Lab Clin Med* 1978;92:393-401
69. Bevers EM, Comfurius P, van Rijn JLML, et al. Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets. *Eur J Biochem* 1982;122:429-36
70. Rosing J, van Rijn JLML, Bevers EM, et al. The role of activated human platelets in prothrombin and factor X activation. *Blood* 1985;2:319-32
71. Walsh PN, Biggs R. The role of platelets in intrinsic factor Xa formation. *Br J Haematol* 1972;22:743-50
72. Walsh PN. Different requirements for intrinsic factor Xa forming activity and platelet factor 3 activity and their relationship to platelet aggregation and secretion. *Br J Haematol* 1978;40:311-9
73. Tracey PB, Peterson JM, Nesheim ME, et al. Interaction of coagulation factor V and factor Va with platelets. *J Biol Chem* 1979;254:10345-9
74. Greengard JS, Griffin JH. Receptors for high molecular weight kininogen on stimulated washed human platelets. *J Biol Chem* 1984;259:14721-6

75. Sinha D, Seaman FS, Koshy A, et al. Blood coagulation factor XIa binds specifically to a site on activated human platelets distinct from that for factor XI. *J Clin Invest* 1984;73:1550-3
76. Greenberg CS, Shuman MA. Specific binding of blood coagulation factor XIIIa to thrombin-stimulated platelets. *J Biol Chem* 1984;259:14721-6
77. Harris KW, Esmon CT. Protein S is required for bovine platelets to support activated protein C binding and activity. *J Biol Chem* 1985;260:2007-11
78. Loskutoff DJ. Type I plasminogen activator inhibitor and its potential influence on thrombolytic therapy. *Semin Thromb Haemost* 1988;14:100-9
79. Wu KK, Hoak JC. A new method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency. *Lancet* 1974;4:924-6
80. Schwartz MB, Hawiger J, Timmons S, et al. Platelet aggregates in ischemic heart disease. *Thromb Haemost* 1980;43:185-88
81. Ündar L, Türkay C, Korkmaz L. Circadian variation in circulating platelet aggregates. *Ann Med* 1989;21:429-33
82. Kaplan KL, Owen J. Plasma levels of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation in vivo. *Blood* 1981;57:199-202
83. Reilly IAG, Roy L, Fitzgerald GA, et al. Biosynthesis of thromboxane in patients with systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon. *Br Med J* 1986;292:1037-9
84. Devine DV, Andestad G, Carter CJ. Platelet-associated factor XIII as a marker of *in vivo* platelet activation. XIIIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, amsterdam, The Netherlands, 30 June-6 July, abstract 108, pp.680
85. Abrams C, Shatill SJ. Immunological detection of activated platelets and platelet derived microparticles in humans. *Blood* 1990;75:128-38
86. Kaplan KL, Broekman MJ, Chernoff A, et al. Platelet alpha granule proteins: studies on release and subcellular localization. *Blood* 1979;53:604-18

87. Smith JB, Ingerman C, Kocsis J, et al. Formation of prostaglandins during the aggregation of human blood platelets. *J Clin Invest* 1973;52:965-9
88. Siess W, Bohlig B, Weber PC, et al. Prostaglandin endoperoxide analogues stimulate phospholipase C and protein phosphorylation during platelet shape change. *Blood* 1985;65:1141-8
89. Siess W, Weber PC, Lapetina EG. Activation of phospholipase C is dissociated from arachidonate metabolism during shape change induced by thrombin or platelet activating factor. Epinephrin does not induce phospholipase C activation or platelet shape change. *J Biol Chem* 1984;259:8286-92
90. Born GVR. Quantitative investigations into the aggregation of blood platelet. *J Physiol Lond* 1962;67:162
91. Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: A novel device for assessing platelet behaviour in blood. *J Pharmacol Meth* 3 1980;158:135
92. Laerum OD. Introduction and general outline of hemopoiesis. In: Laerum OD, robert B. Eds., *Flow Cytometry in Hematology*. Academic Press, London 1992, pp.3-8
93. Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF: Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem* 1985;260:11107-14
94. Warkentin TE, Powling MJ, Hardisty RM. Measurements of fibrinogen binding to platelets in whole blood by flow cytometry: a micromethod for the detection of platelet activation. *Br J Haematol* 1990;76:387-94
95. Cox 1991. Cox AD, Janes SL,, Goodal AH. Fibrinogen and vWF share a common binding site on GPIIb-IIIa:direct evidance in whole blood. *Br J Haematol* 1991;77:104
96. Ejim OS, Powling MJ, Dandona P, et al. A flow cytometric analysis of fibronectin binding to platelets from patients with peripheral vascular disease. *Thromb Res* 1990;58:519-24
97. Frelinger AL, Cohen I, Plow EF. Selective inhibition of integrin function by antibodies specific for ligand-occupied receptor conformers. *J Biol Chem* 1990;265:6346-52

98. McEver RP, Martin MN. A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J Biol Chem* 1984;259:9799-804
99. Bavalacqua M, Butcher E, Furie B. Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell* 1991;67:233-42
100. Israels SJ, Gerrard JM, Jacques YV, et al. Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140). *Blood* 1992;80:143-52
101. Sternberg PE, McEver RP, Shuman MA, et al. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* 1985;101:880-6
102. Berman CL, Yeo EL, Wencel-Drake JD, et al. A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation: Characterization and subcellular localization of platelet-activation-dependent granule-external membrane protein. *J Clin Invest* 1986;78:130-7
103. Stoolman LM. Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. *Cell* 1989;56:907-10
104. Larsen E, Celi A, Gilbert GE, et al. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 1989;59:305-12
105. Metzelaar MJ, Heijnen HF, Sixma JJ, et al. Identification of a 33-Kd protein associated with the alpha-granule membrane (GMP-33) that is expressed on the surface of activated platelets. *Blood* 1992;79:372-9
106. Capitanio AM, Niewiarowski S, Rucinski B. Interaction of platelet factor 4 with human platelets. *Biochem Biophys Acta* 1985;839:161-73
107. Aikien MI, Ginsberg MH, Plow EF. Mechanism for expression of thrombospondin on the platelet cell surface. *Semin Thromb Haemost* 1987;13:307-16
108. Nieuwenhuis HK, van Oosterhout JJG, Rozemuller, et al. Studies with monoclonal antibody against activated platelets: Evidence that a secreted 53,000-molecular weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation. *Blood* 1987;70:838-45

109. Metzelaar MJ, Clevers HJ. Lysosomal membrane glycoproteins in platelets. *Thromb Haemost* 1992;68:378-82
110. Logan LC. Chapter 16, Hemostasis, In:mazza JJ ed., *Man of Clin Hem*, Second edition. Little ,Brown and Company, USA, 1995, pp. 349-79
111. Polikar R, Burger AG, Scherer US, Nicod P The Thyroid and the heart. 1993;87:1435-1441
112. Woeber KA. Thyrotoxicosis and the heart. *N Engl J Med* 1992;327:94-98
113. Surks MI & Ocampo E. Subclinical thyroid disease. *Am J of Med* 1996;100:217-223
114. Klein I, Becker DV & Levey GS. Treatment of hyperthyroidism. *Ann of Intern med* 1994;121:281-288
115. Presti C& Hart RG. Thyrotoxicosis, atrial fibrillation and embolism, revisited. *Am Heart J* 1989;117:976-977
116. Albers G. W Summation.in:Albers G.W.moderator. Stroke prevention in nonvalvular atrial fibrillation. *Annals of Intern Med* 1991;115:734-736
117. Rogers J.S., Shane S.R., Jencks F.S. Factor VIII activity and thyroid function. *Ann Intern Med* 1982;97:713-16
118. Hume R. Fibrinolytic activity and thyroid function. *Br Med J*, 469-75
119. Burggraff J, Lalezari S, Emeis J.J,et al. Endothelial function in patients with hyperthyroidism before and after treatment with propranolol and thiamazol. *Throid* 2001;11:153-160
120. Marazuela M, Sanchez-Madrid F, Acevedo A,et al. Expression of vascular adhesion molecules on human endothelia in autoimmune thyroid disorders. *Clin Exp Immunol* 1995;102(2):328-34
121. Wenisch C, Myskiw D, Gessl A, et al. Circulating selectins, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80 (7):2122-6

122. Aubert VD, Bene MC, Leclere J, et al. CD31, CD62E, and CD62p identify a specific pattern of endothelial activation in Graves' disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;76(2):170-9
123. Wenisch C, Myskiw D, Parschalk B, et al. Soluble endothelium-associated adhesion molecules in patients with Graves' disease. *Clin Exp Immunol* 1995 ;99(2):311
124. Patki KC, Joglekar SJ, Kamat Sk, et al. Effect of prazosin GITS, atenolol, nifedipine SR, and enalapril on ADP-induced platelet aggregation. *J Assoc Physicians Indi* 1998;1:26-9
125. Makris TK, Stavroulakis GA, Krespi PG, et al. Fibrnolytic/hemostatic variables in arterial hypertension: response to treatment with irbesartan or atenolol. *Am J Hypertens* 2000 ;13(7):783-8
126. Wlazlowski R, Kruszynski G, Goch JH. Effects of nitrates and beta-blockers on platelet aggregation in patients with coronary heart disease *Pol Merkuriusz Lek* 2000;8(44):77-9
127. Korbut R, Swies J, Markinkiewicz E, Gryglewski RJ. Thrombolytic activity of beta-adrenolytic drug, sotalol. *J Physiol Pharmacol* 1998;49(1):51-60