



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



RATLARDA VİTAMİN C VE SEROTONİN'İN KAN PULCUĞU ÜZERİNE ETKİSİ

Ayşe ORHAN

**HFİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nesrin SULU**

2009- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RATLARDA VİTAMİN C VE SEROTONİN'İN
KAN PULCUĞU ÜZERİNE ETKİSİ**

Ayşe ORHAN

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nesrin SULU**

2009- ANKARA

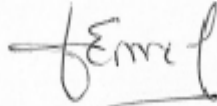
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı

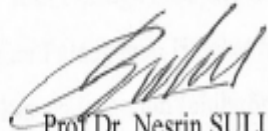
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

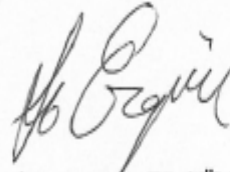
Tez Savunma Tarihi : 17 / 07 / 2009



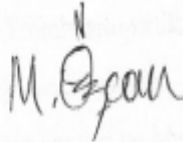
Prof.Dr. Bahri EMRE
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



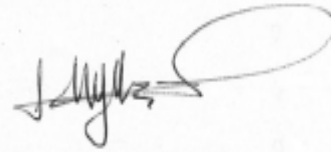
Prof.Dr. Nesrin SULU
Ankara Üniversitesi



Prof.Dr. Levent ERGÜN
Ankara Üniversitesi



Prof.Dr. Mukaddes ÖZCAN
İstanbul Üniversitesi



Prof.Dr. Çiğdem ALTINSAAT
Ankara Üniversitesi
Raportör

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kan Pulcuğu	1
1.1.1. Kan Pulcuğunun Tanımı	1
1.1.2. Kan Pulcuğunun Yapısı	1
1.1.2.1. Kan Pulcuğu Granülleri	2
1.1.3. Kan Pulcuklarının Oluşumu ve Yaşam Süresi	2
1.1.4. Kan Pulcuğu Aktivasyonu	3
1.1.5 Kan Pulcuğunun Hareket Mekanizması	4
1.1.6. Kan Pulcuğunun İnhibitörleri	4
1.1.7. Von Willebrand Faktörü	5
1.1.8. Kan Pulcuğunun Fonksiyonları	5
1.1.9. Kan Pulcuklarının Sayımı	6
1.1.10. Immun Trombositopenik Purpura (ITP)	7
1.2. Kan Pulcuğu ve Serotonin	9
1.2.1. Serotoninin Sentezi ve Metabolizması	9
1.2.2. Serotoninin Hücreye Taşınım Mekanizması	10
1.2.3. Serotoninin Görevleri	11
1.2.4. Serotoninin Kan Pulcuğu ile İlişkisi	12
1.3. Kan Pulcuğu ve Vitamin C	13
1.3.1. Vitamin C'nin Sentezlenmesi	13
1.3.2. Biyolojik Sistemlerde Vitamin C'nin Rolü	13
1.3.3. Vitamin C'nin Kan Pulcuğu ile İlişkisi	15
1.3.4. Vitamin C ile Serotoninin ilişkisi	16

1.4. Tezin Amacı ve Önemi	17
2. GEREÇ VE YÖNTEM	18
2.1. Hayvan Materyali	18
2.2. Deney Kurgusu	18
2.3. Metot	19
2.3.1. Kan Alınması	19
2.3.2. Kullanılan Yöntemler	19
2.3.2.1. Yöntemlerde Kullanılan Malzeme ve Yardımcı Aletler	19
2.3.2.2. Serotonin (5-HT) Hazırlanması	20
2.3.2.3. Fosfotungustat Metodu ile Vitamin C'nin Analizi	20
2.4. İstatistiksel Analiz	21
3. BULGULAR	22
3.1. Kan Pulcuğu Sayısı (PLT), Kan Pulcuğu Yüzdesi (PCT) Değerleri	22
3.2. Ortalama Kan Pulcuğu Hacmi ve Kan Pulcuğu Dağılım Genişliği Değerleri	24
3.3. Plazmada Vitamin C Düzeyleri	25
4. TARTIŞMA	27
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	33
ÖZET	34
SUMMARY	35
KAYNAKLAR	36
EKLER	46
EK-1 Ankara Üniveristesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 29.09.2007 tarihli kararı	46
EK-2 Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 16.07.2008 tarihli kararı	47
ÖZGEÇMİŞ	48

ÖNSÖZ

Kan, vücudumuzda homeostatik dengeyi sağlayan ve başta patojenik mikro organizmalar ve allerjenler olmak üzere zararlı dış etkenlerden koruyan bir dokudur. Dokulara oksijen ve besin maddelerinin girişi, karbondioksit ve metabolik atıkların çıkışı kan yoluyla olur. Ayrıca hormonlar, birçok yapısal ve fonsiyonel doku faktörleri ile immunoglobulinlerin tümü kan yoluyla taşınırlar. Kan, hücresel unsurlar ve plazmadan oluşur. Hücreler alyuvarlar (eritrositler), akyuvarlar (lökositler) ve kan pulcuklarıdır (trombositler). Alyuvarlar kanın oksijen taşıyan, akyuvarlar vücudu enfeksiyonlara karşı koruyan, kan pulcukları ise kanın pıhtılaşmasında görev alan hücrelerdir (Yılmaz, 1984.)

Kan pulcuğunun kemik iliğinde megakaryositler tarafından oluşturulduğu 1906 yılında Wright tarafından bulunmuştur. Feldman ve arkadaşlarına (2000) göre ilk defa 1882 yılında Bizzozero, kan pulcuklarının yapışabilme özelliğini, kanın pıhtılaşma işleminde ve tromboz oluşumunda görev aldığını bildirmiştir. 1914 yılında pıhtılaşma problemi çözülmüş, 1930 yılında Rh faktörü keşfedilerek kan hastalıklarında ya da kanamalı durumlarda sağaltım amacıyla kan nakli yapılmaya başlanmıştır (Bithell, 1993).

Kan pulcuklarının başlıca görevleri damarların yaralanmalarında tıkaç oluşturup kanamayı durdurmaştır. Kan pulcukları trombostein, serotonin, ADP ve ATP gibi maddeler içerirler. Ayrıca trombosit faktör 3 ile büyüme faktörü denilen maddeleri de taşırlar. Damar zedelenmelerinde bir taraftan tıkaç şekillenirken diğer taraftan tıkaçı oluşturan yapılar serotonin salgırlar. Bu madde, damar duvarındaki düz kas tellerini etkileyerek damarları daraltır ve böylece kan kaybını azaltır. Kan pulcuğu oranı azalan hastalara kanamanın önlenmesi amacıyla kan pulcuğu suspansiyonları verilmektedir (Slatter ve ark., 2003). Bu çalışmanın amacı, serotonin ve vitamin C'nin kan pulcukları üzerine etkisini araştırarak konu üzerinde yapılan çalışmalara katkıda bulunmaştır.

Hem tez çalışmalarım hem de Fizyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimi yaptığım süre boyunca deneyim, destek ve her türlü yardımını esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Nesrin SULU'ya, Tez İzleme Komitesi üyesi Prof. Dr. Çiğdem ALTINSAAT ile Prof. Dr. Levent ERGÜN'e, Gazi Üniversitesi İmmunoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ümit BAĞRIAÇIK'a, istatistik çalışmalarımda yardımcı olan Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootehni Bölümü Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Zahide KOCABAŞ'a teşekkür ederim. Ayrıca yardım ve desteklerinden dolayı Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri ile çalışma arkadaşlarıma da teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER ve KISALTMALAR

5-HIAA	5-HidroksiİndolAsetik Asit
5-HT	5-HidroksiTryptamin (Serotonin)
ADP	Adenozin difosfat
β-TG	β-ThromboGlobulin
CFU-M	Megakaryocytic colony formation
dH₂O	Distile su
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
GP	Glikoprotein
IFN-α	Interferon –alfa
ITP	Immun Trombositopenik Purpura
LDL	Düşük-yoğunluklu lipoprotein
MAO	MonoAminOksidaz
μl	Mikrolitre
ml	Mililitre
MPV	Ortalama kan pulcuğu hacmi
MW	Moleküler ağırlık
NO	Nitrik Oksit
PAF	Kan pulcuğu aktive edici faktör
PCT	Kan pulcuğu yüzdesi
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDW	Kan pulcuğu dağılım genişliği
PF-4	Kan pulcuğu faktör-4
PLT	Kan pulcuğu
ROS	Reaktive oksijen türü
SC	Deri altı
SERT	Serotonin taşıyıcı protein
THB	Tetrahidrobiopterin
TxA₂	Tromboksan A ₂
VWF	Von Willebrand Faktör

ŞEKİLLER

Şekil 3.1: Gruplarda kan pulcuğu sayısının zamana göre değişimi.	22
Şekil 3.2: Gruplarda kan pulcuğu yüzdesinin zamana göre değişimi.	22
Şekil 3.3: MPV (fl) ve PDW (%) değerlerinin zamana göre değişimi.	24
Şekil 3.4: Vitamin C'nin (mg/ml) zamana göre değişimi.	25
Şekil 3.5: Gruplarda plazma vitamin C düzeyleri.	26

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1: Gruplarda kan pulcuğu sayısı, kan pulcuğu yüzdesi, ortalama kan pulcuğu hacmi, kan pulcuğu dağılım genişliği ve vitamin C değerleri..	23
Çizelge 3.2: Ortalama kan pulcuğu hacmi (MPV) ve kan pulcuğu dağılım genişliği (PDW) değerlerinin zamana göre değişimi.	24
Çizelge 3.3: Vitamin C'nin zamana göre değişimi.	25
Çizelge 3.4: Gruplarda plazma vitamin C düzeyleri.	26

1.GİRİŞ

1.1. Kan pulcuğu

1.1.1. Kan Pulcuğunun Tanımı

Memelilerde kan pulcuğu (platelet), aşağı sınıf omurgalılarda trombosit olarak isimlendirilen hücreler kan pıhtısının oluşumunda görev alırlar. Düşük kan pulcuğu seviyeleri veya fonksiyon bozuklukları (disfonksiyon) kanamayı artırır. Özellikle $10.000/\text{mm}^3$ altındaki kan pulcuğu değerleri ciddi kanama riski yaratır. Asemptomatik olarak seyreden yüksek kan pulcuğu seviyeleri tromboza (damarda kanın pıhtılaşması) neden olabilir (Berkenboom ve ark., 1993). Kan pulcukları, çok sayıda granül ihtiva eden renksiz sitoplazma parçacıklarıdır. Filogenetik olarak alyuvarlar ve kan pulcukları benzerlik gösterirler. Her ikisi de aşağı sınıf omurgalılarda çekirdekli, memelilerde anükleer (çekirdeksiz) ve disk şeklindedir (Tavassoli, 1980).

1.1.2. Kan Pulcuğunun Yapısı

Çapı $2,5 \mu$ kadar olan kan pulcuklarının özellikle kedilerde, kırmızı kan hücrelerine eşit büyüklükte olduğu bildirilmektedir (Jain, 1993). Kan pulcuğu plazma membranı, sitoplazma içine doğru parmak şeklinde girerek yüzeye açılan ve kanaliküler sistem adı verilen bir kanal sistemi oluşturur. Kan pulcuklarında DNA yoktur. Ribozomlar ise çok nadir görülür. Az miktarda RNA mevcuttur (Akay, 2007). Birkaç farklı granül tipi içerir. Bu granüllerde ADP, ATP, Ca, serotonin ve pirofosfat gibi maddeler bulunur (Özdemir ve Özdemir, 2006). Kan pulcuğunun sitozolünde (cytosol) önemli enzimler de vardır (Tavassoli, 1980). Kan boyaları ile boyanan frotilerde periferleri soluk mavi orta kısımları ise koyu mor renkli olarak görülür. Perifer kısımlarına hiyalomer, orta kısımlarına granulomer denir. Kan pulcuklarında farklı türde granüller, glikojen toplulukları ve yağ damlacıkları bulunur. Sitoplazmasında az sayıda mitokondriyon ve bol miktarda glikojen granülleri yer

alırken, plazma membranında fosfolipitlerin çok, glikoprotein az olduğu bir yapı görülür. Glikoproteinlerin endotele değil yaralanan bölgeye bağlandığı bildirilmektedir (Rao, 1999). Plazma membranının hemen altında yer alan mikrotubulus demetleri ve bu demetlerin aralarındaki aktin filamentleri, pulcuklara hem iskelet oluşturarak bikonveks şeklini kazandırır, hem de yalancı ayaklar meydana getirmesine yardımcı olur (Sağlam ve ark., 2001).

1.1.2.1. Kan Pulcuğu Granülleri

Kan pulcuklarının sitoplazmasında, daha çok ortaya yakın yerleşmiş taneciklerden yapılmış koyu boyanan bir kütle bulunur. Bunlara granül denir. Granüller, mitokondriyonlar, lipid damlacıkları ve çeşitli tipte madde içeren vakuollerden oluşurlar (Erkoçak, 1983; Akay, 2007). Bunların delta granülleri, alfa granülleri ve asit hidralaz içeren granüller olmak üzere üç ayrı türü vardır. Delta granülleri ADP, ATP, kalsiyum iyonları, pirofosfat ve serotonin (plazmadaki serotoninini alarak depolarlar) içeren 250-300 nm çapındaki granüllerdir (Bithell,1993). Alfa granülleri faktör I, faktör V, faktör VIII, platelet faktör 4 (PF- 4), β - tromboglobulin (β -TG), serotonin, nötralizan protein, von Willebrand factorü (vWF), trombositin türeyen büyüme faktörü [platelet-derived growth factor (PDGF)], fibrinojen, vitronektin, trombospondin içeren 300-500 nm çapındaki granüllerdir. Granüllerin içerdikleri maddeler, iltihaplara verilen tepkide ve hemostazda rol alırlar (Siebers ve ark., 1989). Asit hidralazlar içeren granüller 175-200 nm çapında olup örnek olarak, endoglikozidaz ve heparin verilebilir (Siebers ve ark., 1989).

1.1.3. Kan Pulcuklarının Oluşumu ve Yaşam Süresi

Kan pulcuğu kemik iliğinin megakaryosit diye adlandırılan büyük ve çok çekirdekli hücrelerinin parçalarından oluşur. Megakaryosit parçaları sistemik dolaşıma girince kan pulcuğu olarak adlandırılırlar (Tong ve ark., 1987). Başlıca karaciğer tarafından üretilen trombopoietin hormonu, kan pulcuğu yapımını uyarır ve çoğalmasını kontrol eder. Serres ve ark. (1999) Wistar ırkı ratlara, trombopoietin peptit benzeri GW395058'i 500 μ l/kg, 1000 μ l/kg ve 2000 μ l/kg dozlarında ve 1 ay süresince her gün

intravenöz uygulamışlardır. Çalışmanın sonucunda kan pulcuğu sayısının 2000 $\mu\text{l/kg}$ doz uygulanan grupta üç kat arttığını; aynı grupta 2 hafta sonra kan pulcuğu sayısının $6,796 \times 10^3/\text{mm}^3$ olduğunu bildirmişlerdir. Megakaryositlerden kan pulcuğunun oluşumu yaklaşık olarak 3-4 gün sürer (Jain, 1993). Kan pulcuklarının dolaşımdaki ömrü 9-10 gündür. Daha sonra dalakta parçalanır. Hiposplenizm (dalağın fonksiyonunda azalma veya yok olma) yüksek kan pulcuğu sayımlarına, hipersplenizm (dalağın aktivitesinde anormal artış) düşük kan pulcuğu sayımlarına neden olabilir (Rao, 1999).

1.1.4. Kan Pulcuğu Aktivasyonu

Kan pulcuğu aktivatörleri antidiüretik hormon (ADH), adenosin difosfat (ADP), tromboksan A_2 (T_XA_2), serotonin ve kan pulcuğu aktive eden faktördür (PAF). Membran lipidlerinden sentezlenen PAF'nin kan pulcuğunda reseptörü vardır. Ayrıca bu aktivatörler nötrofil ve eozinofil granülositler, monositler, endotel hücreleri ile mast hücrelerinden de salgılanır (Heptinstall ve ark., 1986). İnsan kan pulcukları PAF ve ADP'ye karşı daha az duyarlı iken sığır, at, fil ve koyunlarda kan pulcukları PAF'nin nanomolar, ADP'nin mikromolar konsantrasyonlarına karşı reaksiyon gösterir. Köpek, kobay ve tavşan kan pulcukları PAF ile birleştikten sonra agregre olurlar. Ancak fare ve rat kan pulcukları PAF'ye karşı duyarsızdır. İnsan kan pulcukları ise T_XA_2 aktivatörüne diğer hayvanlara göre daha duyarlıdır (Schalm, 1994).

Kan pulcukları kollajen ile temas ettiğinde aktive olurlar. Damar endoteli hasar gördüğünde altındaki kollajen (bağ dokusu) açığa çıkar ve kan pulcuklarını aktive ederek kollajene bağlanmasına neden olur. Böylelikle hasarlı bölge üzerine kan pulcukları kümelenir ve kan pulcuğu tıkaçı oluşturur (Yılmaz, 1984). Oluşan tıkaçın granül içeriği ortama boşaldığında, açığa çıkan vazokonstriktör özellikteki serotonin damar duvarındaki düz kasların kasılmasını sağlayarak hasarlanmış bölümde kan akımını engeller. Ayrıca, kümeleşme (agregasyon) sırasında kan pulcuklarında yüksek oranda bulunan miyozin ve aktin filamentleri kasılarak oluşan tıkaçı güçlendirir. Kan pulcukları, plazmada bulunan fibrinojene ilave olarak kendisi de

fibrinojen salgılar. Sonuçta pıhtılaşma sırasında daha çok fibrinojen fibrine dönüşür ve daha fazla sayıda kan pulcuğu ile birlikte diğer kan hücrelerinin tutunacağı fibröz ağ oluşur (Feldman ve ark., 2000).

1.1.5. Kan Pulcuğunun Hareket Mekanizması

Kan pulcukları, hemostazın sağlanması için vücudun mutlak surette ihtiyaç duyduğu kan hücreleridir (Yılmaz, 1984) ve pıhtılaşma mekanizmasından başka birçok fizyolojik mekanizmalarda da görev aldığı bilinmektedir (Guyton ve John, 2001). Yangı ve immunolojik reaksiyonlarda, kan damarları endotel tabakasının bozukluklarında, kan dolaşımına giren madde ve ilaçlara karşı organizmanın reaksiyonunda etkilidirler. Kan pulcuklarından serbest bırakılan arabulucular, hücreler arasındaki aktiviteyi hızlandırarak damar endotelindeki yaranın iyileşmesini sağlamaktadır. Kan pulcukları üzerinde yapılan in vitro çalışmalarda kan pulcuklarının hücre içinde ve hücreler arasındaki arabuluculuğuna bağlı olarak iyileşmeyi hızlandığı ortaya konmuştur (Rao, 1999).

Kan pulcukları arasında da birbirlerinden farklı biyokimyasal farklılıkların olduğundan bahsedilmektedir (Feldman ve ark., 2000). Bütün memelilerde özellikle dokunun tamir olması, inflamasyon ve damar travmalarına karşı kan pulcuğu biyolojisinin vermiş olduğu yanıtın temel olarak hep aynı olduğu bildirilmiştir (Rao, 1999). Kan pulcuğu sayısı azaldığında birbirlerine yapışmaları ve yeterli bir tıkaç oluşturmaları zorlaşır (Feldman ve ark., 2000).

1.1.6. Kan Pulcuğunun İnhibitörleri

Kan pulcuğunun inhibitörlerine örnek olarak prostasiklin ve nitrik oksit (NO) verilebilir. Damar duvarı, prostasiklin (PEI₂) isimli kuvvetli bir kan pulcuğu agregasyon inhibitörü (engelleyici) sentezler. Böylece kan pulcuğu tıkaçı sadece hasarlı bölgede oluşur, çevreye yayılmaz.

Nitrik oksit (NO), ilk zamanlar endotel kökenli gevşeme faktörü olarak tanımlanmış, fizyolojik ve patolojik süreçte görevli önemli bir taşıyıcı molekül içerdiği bildirilmiştir (Yılmaz, 1984). Endotel kökenli NO, damar genişletici görevinin yanı sıra kan pulcuğunun kümeleşmesine, birbirine ve damar çeperine yapışmasını engeller. Bu özellikleriyle NO kanın akışkanlığını sağlar, trombozisi önler. İleri yaşlarda arteriosiklerozisde önemli rolü vardır (Slatter ve ark., 2003). Nitrik oksidin, megakaryositlerden kan pulcuğu şekillenmesinde düzenleyici görevinden de bahsedilmektedir (Tavassoli, 1980).

1.1.7. Von Willebrand Faktörü

Von Willebrand Faktörü (vWF), hem endotel hücrelerinde hem de megakaryositlerde sentezlenir. Kan pulcuğu düzeyindeki vWF reseptörleri, membran GP (G proteini) 1b'de ve kısmen de GP 1b/IX-V kompleksinde lokalizedir. Glikoprotein 1 beta (GP 1b) ve GP VI'dan intrasellüler sinyallerin oluşumu kan pulcuklarının aktivasyonuna neden olur. Von Willebrand Faktörü hasarlı damar duvarına yapışarak kan pulcuklarının buraya tutunmasını kolaylaştırır. Bu nedenle koagülasyon için önemlidir. Von Willebrand Faktörü eksikliğinde koagülasyon bozuklukları görülür. Bu faktörün eksikliğinden kaynaklanan hastalığa von Willebrand hastalığı denmektedir (Özmen ve ark., 2007). Von Willebrand Faktörü kan pulcuğu aktivatörlerindendir (Feldman ve ark., 2000).

1.1.8. Kan Pulcuğunun Fonksiyonları

Kan pulcuğunun bilinen fonksiyonları, adezyon, sekresyon, aktivasyon ve agregasyondur. Düşük kan pulcuğu sayımı (trombositopeni) ve yüksek kan pulcuğu sayımı (trombositoz) koagülasyon problemlerinin ortaya çıkmasına neden olabilir (Lothar ve ark., 1981). Kan dokusu, organizmada son derece yaygın bir damar ağı içinde sürekli dolaşım halinde bulunduğu için, vücudun herhangi bir bölgesindeki yaralanma, önlem alınmadığı takdirde önemli miktarda kan kaybıyla sonuçlanabilir. Ancak, hem damar sistemi hem de kanın bizzat kendisi kan kaybının önlenmesine yönelik bir dizi koruyucu mekanizmaya sahiptir. Bir damarın hasara uğraması

halinde kanamanın durdurulması üç aşamalı bir mekanizma ile sağlanır: 1- Vazokonstriksiyon, 2- Kan pulcuğu tıkaçının oluşumu, 3- Koagülasyon (pıhtılaşma) (Rao, 1999).

Koagülasyon, sıvı halde bulunan kanın, pıhtı ya da trombus denilen jel kıvamlı katı bir maddeye dönüşmesidir. Pıhtılaşma, plazma proteinlerinden fibrinojenin fibrine dönüştüğü zaman gerçekleşir. Fibrinojen karaciğer tarafından yapılan ve plazmada her zaman bulunan çubuk şeklinde bir proteindir. Fibrin başlangıçta gevşek bir iplik ağ gibidir. Oluştuktan hemen sonra kovalent çapraz bağlarla kuvvetlenir. Bu olay, faktör XIII denilen bir plazma enzimi sayesinde gerçekleşir. Fibrinojen kanda her zaman bulunur, fakat trombin normalde kanda bulunmaz, yalnızca pıhtılaşma olayı uyarıldığında zaman oluşur (Yılmaz, 1984) Uyarılmadan önce kanda protrombin denilen inaktif şekilde bulunur. Kan damarının yaralandığı bölgede enzimatik olarak trombine çevrilir. Trombin de faktör XIII'ü aktive eder. Vücutta devamlı olarak mikroskopik küçük damar yırtıkları sık sık oluşur. Ancak bunu fark etmeyiz. Kan pulcukları ve fibrinojenler damar hasarlarının giderilmesinde ve sağaltılmasından sorumludur (Guyton ve John, 2001).

1.1.9. Kan Pulcuklarının Sayımı

Kan pulcuklarının sayımı laboratuarda hemasitometre ya da otomatik kan sayım makinesi kullanılarak ölçülür. Acil durumlarda kan frodisinden yararlanarak da tahminde bulunulabilir (Slatter ve ark., 2003). Özellikle kedilerde, kan alma esnasında travma şekillenirse kan pulcuğu kümeleşmesinden dolayı en az hatalı sonucu laboratuvar sonucu verir. Kan pulcuğu kümeleşmesinin sebep olduğu pseudotrombositopeni nedeniyle otomatik hücre sayıcısı tarafından trombositopeninin doğrulanması muayene için önemlidir (Özatlı, 2004). Normalde kedi ve köpeklerde kan pulcuğu sayısı yaklaşık 200000-600000 hücre/ μ l arasındadır. Kedi ve köpeklerde kanamalar esnasında kan pulcuğu sayısı 30000 hücre/ μ l'den daha aşağıya düşmez (Slatter ve ark., 2003). Ratta kan pulcuğu $620-1450 \times 10^3/\text{mm}^3$, tavşanda $720-750 \times 10^3/\text{mm}^3$ (Çetin ve ark., 2004) oranındadır. Kan pulcuğu, koyunda $500 \times 10^3/\mu\text{l}$, golden hamsterde $500-800 \times 10^3/\mu\text{l}$, insanda $150-450 \times 10^3/\mu\text{l}$

oranında bulunmaktadır (Schalm, 1994). Atlarda kan pulcuğu sayısının sığırlara oranla daha düşük olduğu görülür. Labaratuar farelerinde kan pulcuğu sayısı 1 milyondan üzerindedir. Domuzda ise kan pulcuğu sayısının yaşa bağlı olduğu; genç domuzlarda ergin domuzlara oranla daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Jain, 1993).

Kan pulcuklarının sayısal azlığı ya da fonksiyonel bozukluğu bir takım bulgu ve semptomlara yol açmaktadır. Kan pulcuğu sayısı $20-50\ 000/\text{mm}^3$ arası değerlerde hafif travmalarda bile kanama olabilir ve özellikle $10\ 000/\text{mm}^3$ altındaki değerlerde ciddi kanama riski vardır (Berkenboom ve ark., 1993).

Kan pulcuğunun sayıca azalması bir hastalık değil, trombositopeni olarak adlandırılan bir bulgudur. Trombositopeniler yapım azlığı, yıkım artışı ve kan pulcuğu dağılımındaki bozukluklara bağlı olarak şekillenmekle birlikte bir etiyolojik neden birçok farklı mekanizmalarla trombositopeni yapabilir (Feldman, 2000). Nitekim Dunleavy ve ark. (2005), kronik asfeksi oluşturdıkları Wistar ratlarda kan pulcuğu sayısına bakmış, kronik asfeksi tablosunun kan pulcuğu sayısına etkisinin olmadığını bildirmiştir. Walter (1999), çalışmasında üç grup halinde değişik oranlarda karbondioksit solunumun yaptırdığı erkek ratlarda hematolojik değerlere bakmış; kontrol ve diğer gruplar arasında önemli bir fark olmadığını bildirmiştir.

1.1.10. İmmün Trombositopenik Purpura (ITP)

İdiopatik trombositopenik purpura, ilaçlara bağlı trombositopeniler, infeksiyonla birlikte immün trombositopeniler, kanser ve sistemik otoimmün hastalıklara bağlı trombositopeniler, transfüzyon sonrası purpura, trombotik trombositopenik purpura, hemolitiküremik sendrom, masif transfüzyona bağlı trombositopeni, yaygın damariçi pıhtılaşma ile birlikte bulunan trombositopeniler, megakaryositlerin hipoplazisi veya baskılanması, ineffektif trombopoiez, herediter trombositopeniler, gestasyonel trombositopeni, siklik trombositopeniler gibi nedenlere bağlı olarak kan pulcuğu sayısı azalmaktadır (Lothar ve ark., 1981). Zhou ve ark. (2008), çalışmalarında immün trombositopeni hastalarda, kan pulcuğu sayısında azalma ile birlikte ortalama kan pulcuğu hacmi (MPV) ve kan pulcuğu dağılım genişliği (PDW) oranının ve

kümeleşmiş kan pulcuğu oranının yüksek olduğunu, kan pulcuğu sayısı normal ve artmış hastalarda ise kan pulcuğu dağılım genişliği (PDW) ve ortalama kan pulcuğu hacminin (MPV) düşük olduğunu bildirmiştir.

İmmun trombositopenik purpurada bilinmeyen bir nedenle bağışıklık sistemi kan pulcuklarını yabancı olarak işaretler. Bu da kan pulcuklarının başta dalak olmak üzere savunmada görev alan organlarda parçalanmasına yol açar (Brox ve ark., 1988; Özatlı, 2004). Hansen ve Balthasar (2001), anti-Glikoprotein IIb/IIIa monoklonal antikor (7E3) kullanarak Sprague-Dawley ratta kan pulcuğu sayısında azalmanın görüldüğü ITP modelini oluşturarak, ITP'nin mevcut tedavi seçeneklerine alternatif olabilecek tedavi tekniklerinin oluşturulmasını amaçlamışlardır. İmmun trombositopenik purpura tedavisinde hedef, bağışıklık sisteminin baskılanarak kan pulcuklarına karşı antikor gelişiminin engellenmesi ve dalakta kan pulcuklarının parçalanmasının durdurulması ve kan pulcuğu sayısının artırılmasıdır. Bu amaçla kortikosteroid ilaçlar, intravenöz immunglobulin, Anti-D ve hayatı tehdit eden durumlarda kan pulcuğu süspansiyonu kullanılır. İlaçlardan kalıcı etki sağlanamazsa splenektomi de gerekebilir (Hirano ve Ueoka, 2007). Jubelirer (1993), kan pulcuğu sayısında azalma belirtisiyle seyreden hastalarda vitamin C'nin etkili olmadığını, Wicke (1994), kan pulcuğu sayısının; kortikosteroidler, vinca alkaloidler, siklofosfamid, azathioprine, staph protein A column, danazol kullanılarak artırılabilirliğini; yüksek dozda vitamin C'nin netlik kazanmamış, yararı sınırlı olabilecek uygulama olabileceğini bildirmiştir. Karduss ve ark. (1993) çalışmalarında kronik ITP'li 13 hastaya oral yolla 2 gr. Vitamin C'yi 8 hafta uygulamışlar kan pulcuğu sayısında anlamlı bir artış olmadığını dolayısıyla vitamin C'nin kronik ITP tedavisinde etkili olmadığını bildirmişlerdir. George ve Davidoff (1997) ise çalışmalarında kan pulcuğu sayısını artırmak amacıyla kullanılan Vitamin C'nin immün trombositopenik purpura tedavisinde etkili olduğu bildirmişlerdir. Kan pulcuğu sayısında artışın görüldüğü başarılı tedavi sonucu elde edilmiş ve tolerasyonun mükemmel sonuçlandığı rapor edilmiştir (Brox ve ark., 1988; Calpin ve ark., 1998).

Kronik ITP, kan pulcuklarının makrofajlar tarafından yıkımlanmasıyla karakterizedir. Öncelikli olarak dalakta yıkımlanır. Hem çocuklarda hem de yetişkinlerde meydana gelir. Tedavi olarak dalağın çıkarılması (splenectomy) sık başvurulan yöntemdir (Brox ve ark., 1988). Kronik ITP tedavisinde siklosporin, interferon-alpha (IFN-alpha) da kullanılır (George ve Davidoff, 1997).

Akut ve kronik ITP tedavisi yapılan hastaların hepsinde vitamin C kullanıldığında kan pulcuğu oranının muhafaza edildiği belirlenmiştir. İmmun trombositopenik purpura hastalarında vitamin C kullanımı tedaviden kesinlikle uzaklaşmadığı için güvenilir ve tedavi maliyeti açısından alternatif olduğu bildirilmiştir (Brox ve ark., 1988). İmmun trombositopenik purpuralı ve subdural hematomu olan bazı hastalarda Çin bitki tedavisi ile birlikte vitamin C kullanılmış, tedavi sonrasında kademeli olarak kan pulcuğunun arttığı ve hiçbir yan etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Hirano ve Ueoka, 2007).

1.2. Kan pulcuğu ve Serotonin

1.2.1. Serotoninin Sentezi ve Metabolizması

Organik bir bileşik olarak serotonin, $C_{10}H_{12}N_2O$, triptofandan şekillenmiştir. Aktif bir nörotransmitterdir. Serotonin, vücutta vazgeçilmez bir aminoasit olan triptofanın hidroksilasyonu ve dekarboksilasyonu ile yapılır. Vücutta serotonin, ince bağırsaklarda öncelikle enterokromaffin hücrelerde üretilir. Dolaşım sisteminde kan pulcuğunun kümeleşmesi esnasında (kan pulcuğunun içerisinde serotonin depolanır) serotonin serbest hale geçer. Serotonerjik nöronlardan salındıktan sonra, serotoninin büyük kısmı geri alınır ve monoaminoksidaz (MAO) tarafından 5-hidroksiindolasetik asite (5-HIAA) dönüştürülerek etkisiz hale getirilir. Bu madde, serotoninin idrarda bulunan ana metabolitidir (Guyton ve John, 2001). İdrarla atılan 5-HIAA miktarı, vücuttaki serotonin metabolizma hızının bir göstergesi olarak kullanılır (Haga ve ark., 1996).

Serotoninin sentezinde ilk aşamada ko-faktör olarak tetrahidrobiopterin (THB), demir, oksijen ile birlikte triptofan hidroksilaz enzimi gereklidir. İkinci aşamada ise dopa dekarboksilaz ile birlikte vitamin C, vitamin B₆, çinko, magnezyum gereklidir (Desole ve ark., 1987; Diliberto ve ark., 1991).

Enzim ve ko-faktörler bu reaksiyon aşamaları için sınırlandırıcı değildir. Beyinde bulunan triptofanın hemen hemen hepsi serotonine dönüştürülür (Metzner ve ark., 2005). Tüketilen besinlerdeki triptofanın, aminoasit zincir kollarının ve karbonhidratın yüksek olması serotoninin artmasına neden olur. Çünkü hem karbonhidrattan glukoz hem de aminoasit zincir kollarından özellikle lösin insülin sekresyonunu artırır. İnsülin, kas hücreleri içinde aminoasit zincir kollarının taşınımını kolaylaştırır. Bu sayede büyük miktarda nöral aminoasit taşınımı için rekabetin azalması, serotoninin kan-beyin bariyerinden geçişini kolaylaştırır (Strachan ve ark., 2005). Çok miktarda karbonhidrat içeren besin maddelerinin alınması serotoninin elde edilmesindeki hızı artırmıştır (Goldsmith ve ark., 1986).

1.2.2. Serotoninin Hücreye Taşınım Mekanizması

Serotonerjik nöronların plazma zarlarında bulunan taşıyıcı proteinleri, transmitterlerin yeniden geri alınmasından sorumludur. Serotonin taşıyıcıları, serotonin moleküllerini hücre membranının karşı tarafına taşır. Taşıyıcılar, uyumu sağlayacak değişiklikleri geçirir ya da değişikliklere uğrar (Martin-Cora ve ark., 2000). Serotonin taşıyıcıları (SERT), diğer protein taşıyıcılara (norepinefrin ve dopamin taşınımı) benzerlik gösterir. Sitoplazmanın içinde yer alan polipeptit ve fosforilasyon bölgesi aynı yapılardan oluşur. Serotoninin bağlandığı bölgenin, seçici inhibitörlerin de hedefi olduğu bilinmektedir (Borne, 1994).

Serotonin taşınımı (SERT), hücre dışı Na⁺ ve Cl⁻ ile ayarlanır. Na⁺, Cl⁻'un yerine kısmi olarak NO₂, brom ve diğer anyonlar da serotonin taşınımında görev alır. Hücre içi potasyum (K⁺), hareket mekanizması için de kullanılır fakat diğer iyonlar ile de yer değiştirebilir (Matthias ve ark., 2005). Genellikle de hidrojen (H⁺) ile yer değiştirdiği görülür. Na⁺/K⁺ pompası (Na⁺/K⁺ ATPaz) hücre dışı Na⁺ kadar hücre içi

K^+ iyonlarının da hücre dışına pompalanmasını sağlar. Elektriksel potansiyelin üretilmesine ilaveten protein taşınımı amacıyla da Na^+ konsantrasyonundan yararlanılır (Lin ve ark., 2002). Ayrıca protein taşınımı hücrede Cl^- iyonlarının azalmasına sebep olur. Serotonin işlevinde ilk adım, taşıyıcı proteinin Na^+ ile bağlanmasıyla oluşur. Serotoninin Cl^- ile birlikte bağlanmasından sonra ilk şekli belirlenir (Martin-Cora ve ark., 2000). Serotonin kompleksi başlangıçta, taşıyıcı protein içinde Na^+ ve Cl^- 'da uygun bir değişiklik yaratır ve taşıyıcı proteinin nöronun içine doğru hareketiyle serotonin ve iyonlar nöronun sitoplazmasında serbest bırakılır. Sonra, hücre içi K^+ , bir diğer taşınım siklusu için taşıyıcıların yeniden ayarlanmasında SERT'e bağlanır. Bağlanmayla işgal edilmemiş bir alan oluşur. Bir kez daha tekrarlanmadan önce K^+ oluşturularak hücrenin dışına serbest bırakılır (Buhot ve ark., 1999).

1.2.3. Serotoninin Görevleri

Monoamin nörotransmitter olarak serotoninin merkezi sinir sisteminde (Hensler, 2005; Slotkin ve ark., 2005), gastrointestinal sistemde (Lepard ve ark., 1996) ve kardiovasküler sistemde üstlenmiş olduğu roller bilinmektedir (Watts, 2005; Hauso ve ark., 2007). Kan pulcuğu ile kan damarları arasındaki ilişki nedeniyle serotoninin damar tonusu ve kan basıncındaki rolü, araştırılan bir konudur (Marcos ve ark., 2004). Plazmadaki serbest serotonin düzeyi hipertansiyona neden olur (Diaz ve ark., 2008). Hematopoetik sistemde, serotoninin megakaryositlerle ve kan pulcuğuyla yakın ilişkisi vardır. Serotonin kanda % 90 kan pulcuğu içerisinde depolanır (Fanburg ve ark., 1997). Serotonin megakaryositopoezisi $5-HT_2$ reseptörü aracılığıyla stimüle eder (Yang ve ark., 1996). Son yapılan araştırmalar ile serotoninin iskelet sisteminde bazı roller üstlendiği, iştah kontrolü, uyku, hafıza, öğrenme, ısı kontrolü, ruh hali, halusinasyon ve cinsel davranışlar (Lychkova, 2004; Pirinçci ve ark., 2005), kardiyovasküler işlev, kas kontraksiyonu ve endokrin regülasyonunda etkili olduğu bildirilmiştir (Droogmans ve ark., 2007). Serotoninin, kan pulcuklarının hemostazis'inde (Maurer-Spurej, 2005), bezlerin motilitesinde, karsinoid tümörlerin sekresyonunda da önemli rollere sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, serotoninin titremeyi önlemek (Grimaldi ve ark., 1999) ya da ısı kaybını

artırmak yoluyla, ısı kaybı mekanizmalarını harekete geçirdiği bildirilmektedir (Strachan ve ark., 2005).

1.2.4. Serotonin Kan Pulcuğu ile İlişkisi

Kan pulcukları, günümüz yaşam koşullarında doğrudan ya da dolaylı olarak baskı altındadır. Stres, radyo ve ses dalgaları, devamlı olarak yüklenen radyasyon, gıda maddeleri ile alınan biyolojik ve kimyasal maddeler kandaki kan pulcuğu sayısını azaltmaktadır (Hata ve ark., 1988). Diyetle alınan serotoninin kan pulcuğu serotoninini artırdığı bildirilmiştir (Xiao ve ark., 1998). Ayrıca serotonin enjeksiyonunun ratlarda doza bağlı olarak kan pulcuğu sayısında azalmaya neden olurken, kobaylarda böyle bir etkisi görülmediği bildirilmektedir (Smith, 1989).

Damar içindeki endotel hasar gördüğünde, hasarlı bölge üzerine kan pulcukları kümelenir ve trombotik tıkaç oluşturur. Bunun sonucu olarak da ihtiva ettikleri granüllerin içeriğini ortama boşaltır (Matondo ve ark., 2009). Kan pulcuğunda bulunan ve serbest kalan serotonin damar duvarındaki düz kasların kasılmasına neden olarak hasarlı damar bölümünden kan akımını engeller.

Lechin ve ark. (2004b) trombogenezisde serotonin ile kan pulcuğu arasındaki ilişkiyi açıklarken, kan pulcuğunun sayısından ziyade trombogenezisin oluşumundaki gerçeklerin görülmesi gerektiğini ifade etmişlerdir. Immun trombositopenik purpurayı tedavi etmek için noradrenerjik aktivasyonun artırılarak nörofarmakolojik tedaviden yararlanılmaya çalışılmıştır (Gobbi ve ark., 2003). Sürpriz bir şekilde kan pulcuğu sayısından ziyade serotonin düzeyinin ayarlanması kanamanın durdurulması ve klinik iyileşme ile doğru orantılı olduğu tespit edilmiştir (Dale ve ark., 2002). Bu bulgu, kan pulcuğundaki yoğun granüllerinde depo edilen serotonin ile bağlantılıdır. Serbest kalan serotoninin kan pulcuğu aktivasyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Lechin ve ark., 2004a, Letter). Serotoninin mevcudiyetinde fibrinojen, kan pulcuğunun hücre yüzeyindeki prokoagulant faktörü oranının artmasına bağlı olarak, kan pulcuğunun aktive olan yüzeyine bağlanır. Bu yüzden serotonin, hemostatik süreçte asıl rolü üstlenmiştir (Lechin ve ark., 2004b).

1.3. Kan Pulcuğu ve Vitamin C

1.3.1. Vitamin C'nin Sentezlenmesi

Askorbik asit olarak da bilinen vitamin C, çoğu hayvanlar ve bitkiler tarafından kendi bünyelerinde olan glukozdan üretilebilir. İnsanlar ve bazı primatlar vitamin C'yi üretmediklerinden bunu besinlerden almak zorundadır. Bütün taze sebze, meyve ve etler bir miktar vitamin C içerir (Duyff, 2002). Ancak vitamin C, ısıya hassas olduğundan pişirme esnasında hızla bozulur (Pauling, 2007).

1.3.2. Biyolojik Sistemlerde Vitamin C'nin Rolü

Antioksidan bir enzim kofaktörü olarak Vitamin C, bağırsaktan emilmesi, plazma konsantrasyonu, hücresel dağılımı, kullanımı ve dışarı atılımını içeren farmakokinetik etkileriyle ele alınabilir (Padayatty ve ark., 2003). Vitamin C, tipik peroksil radikallerle suda tepkimeye girer. Askorbat molü başına yakalanan peroksil radikallerinin sayısı, düşük askorbat yoğunluklarında 2'den, yüksek askorbat yoğunluklarında sıfıra kadar değişiklik gösterir. Bunun nedeni yüksek askorbat seviyelerinde radikal yakalamayla rekabet eden kendi kendini sonlandıran reaksiyonlardır. Vitamin C, insanlar için zorunlu bir besindir.

Vitamin C'nin dokularda doymuş düzeyde bulunması, gebelik, süt verme dönemi, zehirlenme, bakteri toksinleri veya enfeksiyonlara, soğuk, yaralanma gibi streslere karşı konulması için önemlidir. Aynı şekilde yanık ve ameliyatlarda günlük gereksinimin artırılması gerekir. Ağızdan doğum kontrol hapları alınması, hamilelik, sigara içilmesi gibi durumlarda da gereksinim artabilmektedir (Dawson ve ark, 1999). Bazı araştırmacılar (Padayatty ve ark, 2003; Droogmans ve ark., 2007; Hirano, 2007) Vitamin C'nin kanser ve kalp hastalığının önlenmesinde, sıradan soğuk algınlığının önlenmesi şeklinde bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde rol oynadığını belirtmektedir.

Kan dolaşımı ile dokulara taşınan vitamin C'nin fazlası böbreklerden idrarla dışarı atılır. Gereğinden fazla alınan vitamin C'nin bir bölümü de monosakkaritlerde olduğu gibi karbondioksit ve suya okside olur. Vitamin C'nin kandaki ve idrardaki düzeyleri alınanla orantılıdır (Levine ve ark., 1992; Ekuni ve ark., 2009). Vitamin C yetersiz alındığında kan ve idrardaki miktarları azalır. Kan ve idrardaki vitamin miktarının azlığı, dokularda yeterli miktarda vitamin C'nin bulunmadığının işareti sayılır (McCluskey, 1985).

Son yıllarda yapılan araştırmalar (Levine, 1992; Peel ve ark., 2006), vitamin C'nin bağ dokuda bulunan kollajenin sentezinde görev aldığını ortaya koymuştur. Vitamin C'nin kan damarlarının kuvvetli olmasında da görev yaptığı sanılmaktadır. Vitamin C yetersizliğinde kan damarları zayıflamakta ve ufak darbelerle kanamalar görülebilmektedir. Enfeksiyonlar vücut doku ve sıvılarındaki vitamin C miktarını azaltmaktadır. Enfeksiyonlarda beyaz kan hücrelerinde vitamin C düzeyi düştüğünden bağışıklığın zayıfladığı bildirilmektedir (Pauling, 2008).

Vücudun diğer bazı besin maddelerinden yararlanmasında ve steroid hormonların sentezinde Vitamin C'nin görev aldığı bildirilmiştir (Higdon, 2006). Vitamin C'nin epinefrin ile yara ve iltihaplanmaya karşı etkinlik gösteren steroidlerin sentezinde rolü olduğu da bildirilmiştir (Naziroğlu ve ark., 2004). Naziroğlu ve ark. (2004) ile Naziroğlu ve Butterworth (2005)'un Wistar ırkı ratlarda yaptıkları çalışmalarda, vitamin C'nin kan pulcuğu sayısını önemli oranda artırdığını belirtmiştir. Vitamin C'nin demir, kalsiyum, B vitaminlerinden tiamin, riboflavin, folik asit, pantotenik asit ile A ve E vitaminlerinin vücutta daha elverişli olarak kullanılmalarında gerekli olduğu bildirilmiştir (Padayatty ve ark., 2003). Folik asidin etkin şekli olan tetrahidrofolik aside dönüşmesi askorbik asidin yardımı ile olmaktadır. Diğer B vitaminlerinin kullanılmasındaki etkinliği ise bağırsak florasının olumlu yönde değişmesini ve dolayısı ile daha çok B vitamini sentezlenmesini sağlamasındandır. Vitamin C, bazı toksik öğelerin etkisini azaltmaktadır. Örneğin vücuda alınan nitritlerin kanser yapıcı nitrozoma dönüşümünü önlemektedir. Vitamin C'nin hücre çalışmasında görev alan birçok öge ile ilişkisi olmasına karşın bu ilişkilerden birçoğunun gerçek mekanizması henüz yeterince açıklanamamıştır (McCluskey, 1985).

1.3.3. Vitamin C'nin Kan Pulcuğu ile İlişkisi

Oksidatif stres, farklı reaktif oksijenik türlerin (ROS) şekillenmesiyle birlikte işemik kalp hastalıkları, arteriyosklerozis, kardiomiyopati, kalp kapağı hastalıkları, doğmasal kalp yetmezliği gibi ciddi birçok hastalığın patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır (Bergendi ve ark., 1999).

Süperoksit negatif iyonlar gibi ROS'de düşük-yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu içeren proatherojenik aktivatöre sahiptir. Arteriosklerozik lezyonun erken döneminde kan pulcukları bulunur (Thomas, 2000). Aktive oldukları zaman kan pulcukları ROS'yi üretebilir ve arteriosklerozik lezyonların ilerlemesini, düz kasların proliferasyonuna sebep olan epidermal büyüme faktörü, transformik büyüme faktörü, kan pulcuğundan ayırt edilen büyüme faktörü gibi bazı kuvvetli mitojenik yapıları salgılar (Malle ve Saltler, 1994).

Kan pulcukarı lokal çevrelerindeki aktif ROS hücrelerini hedef almaktadır. ROS'nin fonksiyonu işaretlenmiş moleküller gibi kan pulcuğu aktivasyonunun stimülasyonunu sağlamaktır. Kan pulcuklarının aktivasyonunun devam etmesi durumunda, kendiliğinden kan pulcuğunun agregasyonunu şekillendirmektedir. Kan pulcuğunun agregasyonu da koroner damar hastalıklarıyla bağlantılıdır (Blockmans ve ark, 1995).

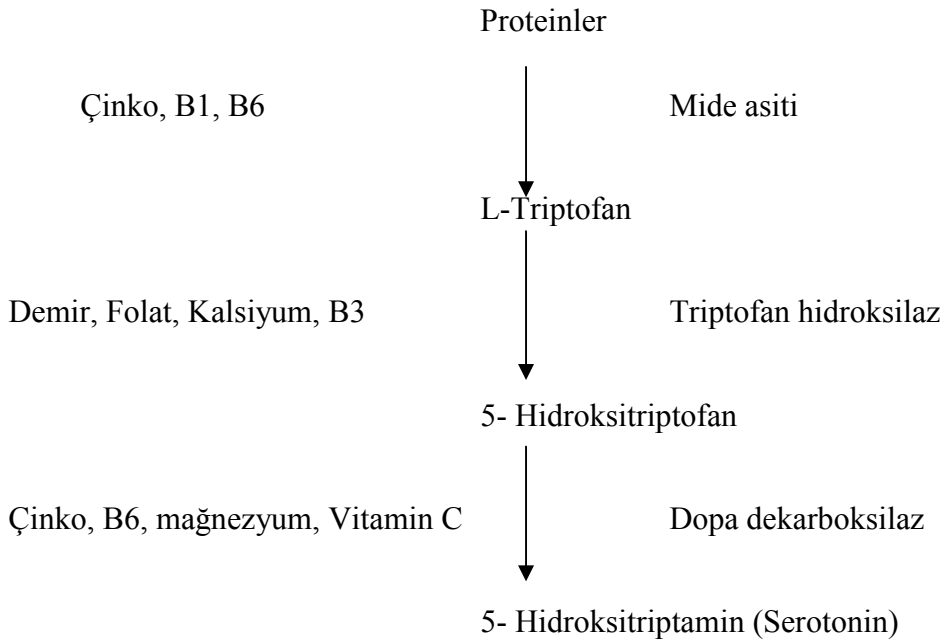
Epidemiyolojik, klinik ve in vitro çalışmalar; antioksidatif karakterdeki diyetler ile koroner kalp hastalığından ölümler arasında bir bağlantının olduğunu göstermektedir. Fakat diyetlerin koruyucu bir etkisinin olduğu çok net değildir (Halliwell, 2000). Meyvalar, baklagiller, sebzeler, kırmızı şarap karotenoit, fenol, flavonoit, tokotrinol ve vitamin C gibi antioksidanlarca zengindir. Antioksidan diyetlerin kardiovasküler sistemi koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir. Bunlar aynı zamanda kan pulcuğunun aktivasyonunun azalmasına ve lipid ya da lipoprotein modülasyonuna neden olur (Hung ve ark., 2000).

Bitki hücrelerinin bileşiği olan vitamin C, vitamin E ve selenyumun inorganik formu kan pulcuklarının in vitro olarak biyolojik aktivasyonunu değiştirmektedir

(Wilkinson ve ark, 1999). Vitamin C azalmasının damar sertliğine ve kan pulcuğunun agregasyonuna sebep olduğu bildirilmiştir (Olas ve ark, 2000). Yüksek dozdaki vitamin C, antioksidan olarak hareket etmektedir. Fakat düşük konsantrasyonların prooksidatif etkiye sebep olduğu bildirilmiştir (Olas ve Wachowicz, 2002). Reis ve ark., (1999) Wistar ratlarda yaptığı çalışmada, Siklosporin A ile hipertansiyon oluşturmuş, üç gruba ayırdığı ratlarda kan pulcuğu serotonin miktarına, kan pulcuğu kümeleşmesine, kan basıncı seviyesi ile kan pulcuğu sayısı ile ortalama kan pulcuğu hacmine bakmışlardır. Kontrol grubuna portakal suyu verilmiş, 0. gün kan pulcuğu sayısı $611 \pm 16 \times 10^9/L$, MPV ise $5,3 \pm 0,1(fl)$ olarak, 15. gün, kan pulcuğu sayısı $631 \pm 31 \times 10^9/L$, hacminin ise $5,4 \pm 0,1(fl)$ olduğunu bildirmektedir.

1.3.4. Vitamin C ile Serotonin ilişkisi

Vitamin C'nin önemli görevlerinden biri de neurotransmitterlerin sentezinde katalizör olmasıdır. Ekzojen aminoasit olan triptofandan serotoninin sentezlenmesinde vitamin C gerekli ve önemlidir (Chakraborty ve Chakraborty, 1999; Kuhn ve Arthur, 1999; Harel ve ark, 2002).



(Desole ve ark, 1987; Diliberto ve ark, 1991)

Serotoninin de vitamin C gibi antioksidan özelliği vardır. Sagara ve ark. (2007), rat ceninine ait beyin hücrelerinden ayırdıkları nöronları oksidatif strese karşı koruyabilmek için serotonin kullandılar ve sonuçta vitamin C'nin yok denecek kadar az olan etkisine karşın serotoninle nöronların üç gün canlı tutulabildiğini bildirdiler. İnsan göbek kordonu epitel hücrelerinde hipergliseminin toksik etkisi araştırıldığında askorbik asitin mikromolar konsantrasyonlarda bile endotel hücrelerinin ölmesini engellediği, histamin ve serotoninin spazmogenik (kasılma) etkisini askorbik asitin azalttığı bildirilmiştir (Joshi ve ark., 2008). *Drosophila melanogaster*'in neden olduğu oksidatif strese karşı serotonin, melatonin, lipoik asit ve vitamin C'nin etkisi araştırılarak serotoninin, melatoninin, vitamin C'nin ve lipoik asitin oksidatif strese karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Bonilla ve ark, 2006). Vitamin C eksikliği depresyon ve histeri semptomlarına neden olur. Vitamin C'nin depresyon tanısında yardımcı olduğu, kronik yorgunlukta serotonin seviyesindeki azalma ile birlikte plazma vitamin C düzeyinde de düşme görüldüğü rapor edilmiştir (Khanzode ve ark, 2003; Dhir ve Kulkarni, 2008).

1.4. Tezin Amacı ve Önemi

Vitamin C'nin kan pulcuğu üzerine etkisinin varlığı bildirilse de (Levine, 1992). konu ile ilgili az sayıda literatür olması nedeniyle çalışma planlanmıştır. Ayrıca kan pulcuğu konusundaki çalışmalarda ratlara, vitamin C uygulamasının yanısıra serotoninin de belirli miktarda farklı bir gruba in vivo olarak verilmesi ile ilgili elde edilen sonuçlar, literatür bilgisine katkı sağlayacaktır.

Son yıllarda kan pulcuğu sayısında azalma belirtisiyle seyreden hastalıkların artması ve uygulanan tedavi yöntemlerinin pahalı, güç ve yan etkileri kuvvetli olması nedeniyle araştırmada yardımcı tedavi yöntemi olarak vitamin C ve serotonin uygulamalarının kan pulcuğu sayısı (PLT), kan pulcuğu yüzdesi (PCT), ortalama kan pulcuğu hacmi (MPV) ve kan pulcuğu dağılım genişliği (PDW) ile plazma vitamin C düzeyine etkileri incelenerek bu konuda yapılacak çalışmalara kaynak olabilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Çalışmada Ankara Üniveristesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 29.09.2007 gün ve 16.07.2008 günü kararları uyarınca, 250-300 g ağırlığında 18 adet Wistar ırkı, ergin, erkek rat rasgele olarak 3 eşit gruba ayrıldı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ünitesinden temin edilen ratlar, bu üniteye bakıldı. Çalışma boyunca deney hayvanları aynı koşullarda barındırıldı.

2.2. Deney Kurgusu

Çalışmada kullanılan deney hayvanları canlı ağırlıkları tartılarak 6'lı gruplar halinde 3 ayrı kafese yerleştirildi (Chaudhary ve ark, 2009). Birbirlerine uyum sağlayabilmeleri amacıyla bir haftalık bir adaptasyon periyodu uygulandı. Deney hayvanları kontrol, serotonin ve vitamin C grubu olmak üzere 6'lı üç ayrı kafeste barındırıldı. Deney aşaması toplam 15 gün sürdü.

Sıfırıncı günde 3 gruptan da kan örnekleri alındı. Kan örnekleri alındıktan sonra birinci grup olan kontrol grubuna deney süresi boyunca her gün 0,2 ml fizyolojik tuzlu su (FTS) derialtına enjekte edildi. İkinci grupta yer alan ratlara 2 mg/kg canlı ağırlığa derialtı yolla serotonin (Kikta ve ark., 1983; Gustafsson ve ark 2005; Ovsianikov ve Berezino, 2005) (Sigma Aldrich, H7752-1 G) verildi. Serotonin uygulaması birbirini takip eden üç gün boyunca tekrarlandı. Üçüncü gruba ise deney süresince deri altı yolla 100 mg/kg canlı ağırlık/gün dozunda vitamin C (Mehta ve Mehta, 1999; Soylu ve ark., 2006) (Redoxon Ampul, Roche) uygulandı.

Deneyin 0. 3. 7. ve 15. gününde bütün ratlardan alınan kan örneklerinde kan pulcuğuna ilişkin parametreler ile plazma vitamin C düzeyi belirlendi ve çalışmanın deney hayvanları ile ilgili aşaması sonlandırıldı. Çalışmada kullanılan deney hayvanları, deney hayvanları ünitesine iade edildi.

2.3. Metot

2.3.1. Kan Alınması

Deneysel çalışmanın her aşamasında EDTA'lı tüplere kuyruk venasından (*Vena sacralis mediana*) kan örnekleri (3 ml) alındı. Alınan kanlardan her grupta kan pulcuğu sayısı (PLT), kan pulcuğu yüzdesi (PCT), ortalama kan pulcuğu hacmi (MPV) ve kan pulcuğu dağılım genişliği (PDW) değerlerine bakıldı. Ayrıca tüm gruplarda 0. 3. 7. ve 15. gün plazma vitamin C analizleri yapıldı. Kan parametreleri otomatik kan sayım cihazı kullanılarak tespit edildi (Horiba ABX. Pentra DX -120) . Alınan kan örnekleri 10 dakika 3000 devirde santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı ve vitamin C analizinin yapılacağı güne kadar -30 °C'de saklandı.

2.3.2. Kullanılan Yöntemler

2.3.2.1. Yöntemlerde Kullanılan Malzeme ve Yardımcı Aletler

- Santrifüj (Benchtop centrifuge, Allegra X-12R centrifuge, Beckman Coulter Inc, USA)
- Vortex (Heidolph, Reax control, No 541- 11)
- Spektrofotometre (BioTek Int., Synergy HT)
- Su banyosu (Techne, Tempette junior, TE-8J)
- Otomatik kan sayma makinesi (Horiba ABX, Pentra DX- 120)
- Hassas terazi (AND electronic balance, ER-182A)
- Serologikal pipet makinesi Socorex pipet makinası (Acura 825) ve Drummond pipet makinesi
- 96'lık düztabanlı ELISA plate (TPP, No: 96396)
- 96'lık mikro plate (Greiner, No: 039180)
- EDTA'lı 2 ml'lik hazır tüp (Vacurette, Sodyum Fluoride/ EDTA K3, Greiner bio-one)
- Pipet uçları (Greiner bio-one, Cellstar (606 180/5 ml) ve Greiner 100 µl uçları)

- Oksalik asit (Oxalsäure, Merck)
- H_2SO_4 (MW: 3,7 molar)
- L-askorbik asit (MW: 176,12)
- Vitamin C (Redoxon Ampul, Roche)
- Serotonin (5- Hydroxytryptamine Creatinin Sulfate Coplexi) (Sigma Aldrich, H7752- 1 G)
- Na_2WO_4 (Sodyum tungustat, Merck)
- Na_2HP_4 (Merck)

2.3.2.2. Serotonin (5-Hydroxytryptamine) Hazırlanması

5-Hydroxytryptamine Creatinin Sulfate Complexi (Sigma Aldrich H7752-1G) fizyolojik tuzlu su içerisinde 25 mg/ml olacak şekilde solüsyon hazırlandı.

2.3.2.3. Fosfotungustan Metodu ile Vitamin C Analizi

Stok Standart: 10 mg L-askorbik asit (MW: 176,12) kullanıldı. 1 ml oksalik asit içerisinde 10 mg askorbik asit çözdürüldü. askorbik asidin tartılmasında hassas teraziden yararlanıldı.

Çalışma Standardı: %1 çalışma standardı hazırlamak için stok standart % 0,5 oksalik asit solüsyonu ile 50 kez dilue edildi ve %1 mg çalışma standardı ile % 1 mg; %0,1 mg; %0,01 mg; %0,001mg çalışma standartları olacak şekilde hazırlandı.

Renk reaktifi:

A karışımı:	Na_2WO_4 (Sodyum tungustat)	5 g.
	Na_2HP_4	2,5 g.
	Distile su (dH ₂ O)	7.5 l.
B karışımı:	H_2SO_4 (MW: 3,7 molar)	1,25 g
	Distile su (dH ₂ O)	3,75 l.

B karışımı yavaş yavaş A karışımına eklendi. 100 dereceye ayarlanan su banyosunda 2 saat inkube edildi.

Çalışmada plazmadaki vitamin C düzeyi, fosfotungustat metodu (Kyaw, 1978; Büyükbaş ve ark., 1986; Rutkowski ve Grzegorzcyk, 2007) kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edildi. Bu amaçla 96'lık mikro plate'lerde örnekler için ayrılan her bir kuyucuk içerisine 50 µl. plazma, 50 µl. çalışma standardı ve 50 µl. renk reaktifi ilave edildi. Her kuyucukta total hacim 150 µl oldu. Aynı plate'de standartlar için ayrılan kuyucuklara 50 µl ilgili standartın dilüsyonu, 50 µl. çalışma standardı ve 50 µl. renk reaktifi ilave edildi. Toplam hacimden sonra plate 30 dakika oda ısısında inkube edildi. İnkubasyon sonrasında 3000 devirde 2500 rpm 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası plate'deki tüm kuyucuklardan dikkatli bir şekilde 100'er µl süpernatant (santrifüj sonrası üstte kalan sıvı kısım) 96'lık düz tabanlı ELİSA plate'ye her kuyucuk kendi belirlenen örneğini içerecek şekilde aktarıldı. Plate elle hafifçe sallanarak kuyucuklar içerisindeki solüsyonun tam tabana oturması sağlandı. Spektrofotometrede 700 nm'de okutuldu. Sonuç değerlendirmede standartlar baz alındı.

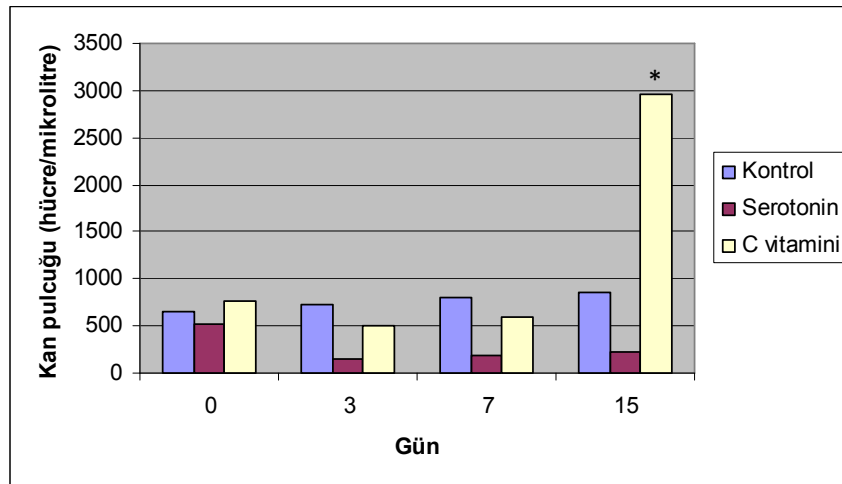
2.4. İstatistiksel Analiz

Kan pulcuğu sayısı (PLT), ortalama kan pulcuğu hacmi (MPV), kan pulcuğu yüzdesi (PCT), kan pulcuğu dağılım genişliği (PDW) ve plazma vitamin C seviyesi bakımından elde edilen gözlemler faktöriyel düzende tekrarlanan ölçümlü varyans analizi tekniği ile değerlendirilmiştir. Denetlemede muamele faktörünün 1- kontrol, 2- serotonin ve 3- vitamin C olmak üzere üç seviyesi ile zaman faktörünün 0. gün, 3. gün, 7. gün ve 15. gün olmak üzere dört seviyesi bulunmaktadır. Tekrarlanan ölçümler zaman faktörünün seviyelerinde gerçekleştirilmiştir. Varyans analizi sonuçları doğrultusunda farklı grupların saptanmasında Duncan testi kullanılmıştır. Verilerin analizinde SPSS 15 paket programı kullanılmıştır (Winer ve ark, 1991).

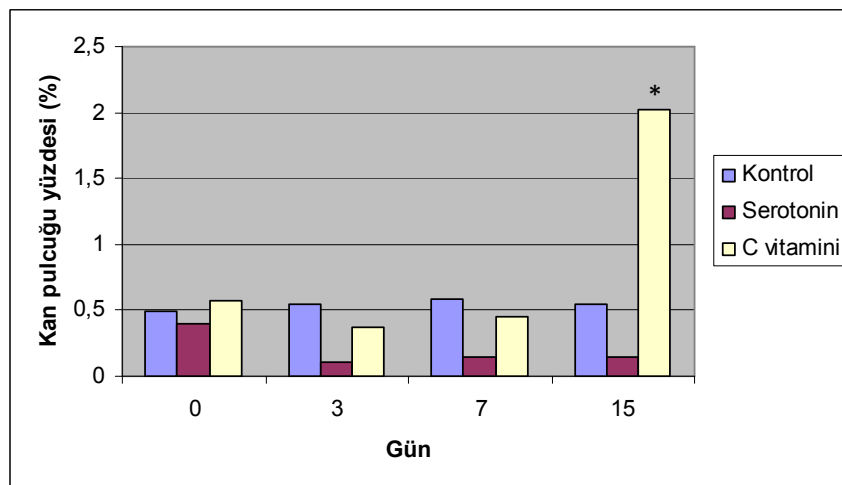
3. BULGULAR

3.1. Kan Pulcuğu Sayısı (PLT), Kan Pulcuğu Yüzdesi (PCT) Değerleri

Kan pulcuğu miktarları ve kan pulcuğu yüzdesinin gruplarda zamana göre değişimleri çizelge 1’de belirtilmektedir. Kan pulcuğu miktarları ve kan pulcuğu yüzdesi açısından değerlendirildiğinde vitamin C verilen grupta hem grup içi hem de gruplar arası kan pulcuğu sayıları (çizelge 3.1, şekil 3.1) ile kan pulcuğu yüzdesi değerleri (çizelge 3.1, şekil 3.2) 15. günde anlamlı olarak arttı ($p<0,05$). Kontrol ve serotonin gruplarında ise kan pulcuğu sayısı ve kan pulcuğu yüzdesi istatistik olarak anlamlı bulunmadı.



Şekil 3.1: Gruplarda kan pulcuğu sayısının zamana göre değişimi (* $p<0,05$).



Şekil 3.2: Gruplarda kan pulcuğu yüzdesinin zamana göre değişimi (* $p<0,05$).

Çizelge 3.1: Gruplarda kan pulcuğu sayısı, kan pulcuğu yüzdesi, ortalama kan pulcuğu hacmi, kan pulcuğu dağılım genişliği ve vitamin C değerleri.

Grup	Gün	Kan pulcuğu (hücre/ μ l)	Kan pulcuğu yüzdesi (%)	Ortalama kan pulcuğu hacmi (fl)	Kan pulcuğu dağılım genişliği (%)	Vitamin C (mg/ml)
Kontrol	0	651 $\pm$ 161 ^a	0,4920 $\pm$ 0,1220 ^a	7,65 $\pm$ 0,24	33,9 $\pm$ 0,77	0,308 $\pm$ 0,081
	3	719 $\pm$ 135 ^a	0,5500 $\pm$ 0,0996 ^a	7,70 $\pm$ 0,15	33,8 $\pm$ 0,81	0,372 $\pm$ 0,050
	7	805 $\pm$ 188 ^a	0,5880 $\pm$ 0,1340 ^a	7,38 $\pm$ 0,19	32,5 $\pm$ 0,39	0,302 $\pm$ 0,104
	15	855 $\pm$ 121 ^a	0,5400 $\pm$ 0,0775 ^a	6,28 $\pm$ 0,32	28,3 $\pm$ 1,52	0,296 $\pm$ 0,130
Serotonin	0	585 $\pm$ 82 ^a	0,4070 $\pm$ 0,1000 ^a	7,41 $\pm$ 0,20	34,3 $\pm$ 0,38	1,414 $\pm$ 0,047
	3	481 $\pm$ 127 ^a	0,3430 $\pm$ 0,0850 ^a	7,15 $\pm$ 0,27	33,1 $\pm$ 1,42	1,362 $\pm$ 0,080
	7	744 $\pm$ 165 ^a	0,4970 $\pm$ 0,1190 ^a	6,88 $\pm$ 0,18	32,4 $\pm$ 1,55	1,059 $\pm$ 0,098
	15	1095 $\pm$ 127 ^a	0,7430 $\pm$ 0,0670 ^a	6,71 $\pm$ 0,23	31,2 $\pm$ 0,49	1,360 $\pm$ 0,172
Vitamin C	0	764 $\pm$ 103 ^{B,a}	0,6100 $\pm$ 0,1230 ^{B,a}	7,28 $\pm$ 0,23	32,6 $\pm$ 0,33	0,515 $\pm$ 0,130
	3	504 $\pm$ 128 ^{B,a}	0,4880 $\pm$ 0,1040 ^{B,a}	7,98 $\pm$ 0,70	34,9 $\pm$ 1,60	0,509 $\pm$ 0,156
	7	601 $\pm$ 161 ^{B,a}	0,3400 $\pm$ 0,1460 ^{B,a}	7,90 $\pm$ 0,38	33,3 $\pm$ 1,34	0,135 $\pm$ 0,035
	15	2956 $\pm$ 1261 ^{A,b}	2,0220 $\pm$ 0,9340 ^{A,b}	6,90 $\pm$ 0,45	31,0 $\pm$ 1,34	0,224 $\pm$ 0,070

Her sütündeki ^{A,B} grup içi, ^{a,b} gruplar arası farklılığı ifade etmektedir (p<0,05).

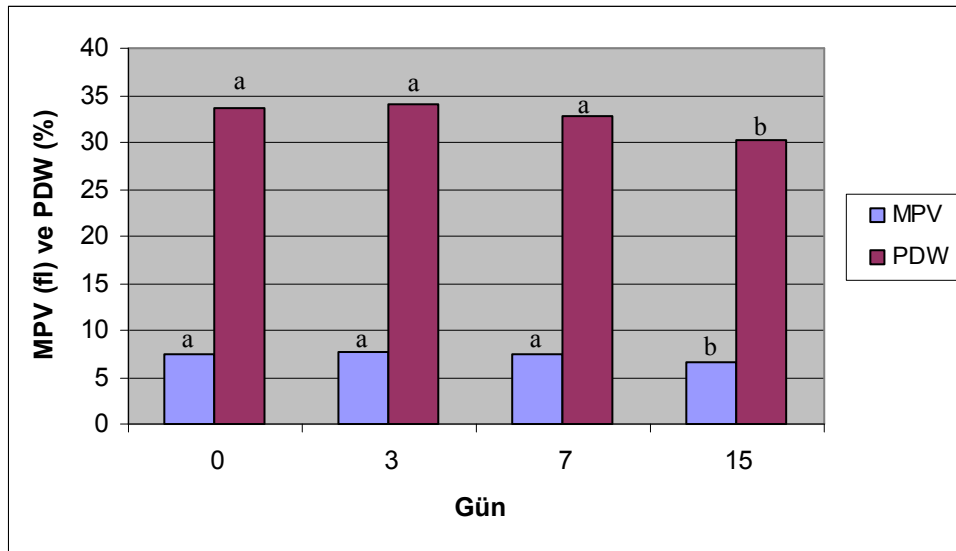
3.2.Ortalama Kan Pulcuğu Hacmi ve Kan Pulcuğu Dağılım Genişliği Değerleri

Ortalama kan pulcuğu hacmi (çizelge 3.2 ve şekil 3.3) ve kan pulcuğu dağılım genişliği (çizelge 3.2 ve şekil 3.3) değerleri sadece zaman bağlı olarak 15. günde anlamlı olarak azaldı ($p<0,01$). Bununla birlikte gruplar arası fark anlamlı değildi ($p>0,05$).

Çizelge 3.2: Ortalama kan pulcuğu hacmi (MPV) ve kan pulcuğu dağılım genişliği (PDW) değerlerinin zamana göre değişimi.

Değerler	Gün			
	0	3	7	15
MPV (fl)	7,450±0,128 ^a	7,611±0,250 ^a	7,389±0,176 ^a	6,633±0,197 ^b
PDW (%)	33,600±0,335 ^a	33,961±0,741 ^a	32,778±0,661 ^a	30,197±0,727 ^b

^{a,b} : Her satırdaki farklı harfler istatistik olarak farklılığı ifade etmektedir ($p<0,01$).



Şekil 3.3: MPV (fl) ve PDW (%) değerlerinin zamana göre değişimi (a,b: $p<0,01$).

3.3. Plazmada Vitamin C Düzeyleri

Yapılan varyans analizi sonucunda; grup x zaman interaksyonu istatistik olarak önemli bulunmamıştır. Sadece grupların ve zamanların ortalamaları arasındaki farklar istatistik olarak önemli bulunmuş ($p<0,01$) ve Duncan testi sonuçları ortalamaların yanında harfli gösterim yaklaşımıyla belirtilmiştir. Zamanlar arasındaki fark gruptan gruba değişmemektedir. Gruplar arasındaki fark zamandan zamana değişmemektedir. Zamana göre karşılaştırıldığında plazma vitamin C düzeyinin 7. günde diğer günlere göre azaldığı ($p<0,01$) bulundu (çizelge 3.3 ve şekil 3.4). Serotonin verilen grupta plazma vitamin C düzeyi diğer gruplara göre anlamlı olarak ($p<0,01$) yüksek olduğu bulundu (çizelge 3.4 ve şekil 3.5).

Çizelge 3.3: Vitamin C'nin zamana göre değişimi.

Değerler	Gün			
	0	3	7	15
Vitamin C (mg/ml)	0,745±0,127 ^a	0,748±0,121 ^a	0,499±0,108 ^b	0,626±0,145 ^{a,b}

^{a,b} : Farklı harfler istatistik olarak farklılığı ifade etmektedir ($p<0,01$).

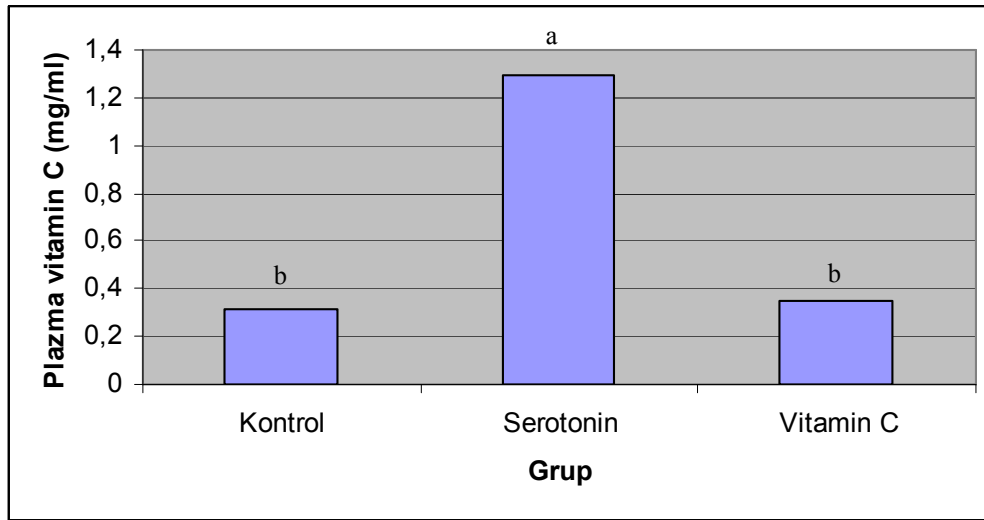


Şekil 3.4: Vitamin C'nin (mg/ml) zamana göre değişimi (a,b: $p<0,01$).

Çizelge 3.4: Gruplarda plazma vitamin C düzeyleri.

Grup	Vitamin C (mg/ml)
Kontrol	0,319±0,045 ^b
Serotonin	1,299±0,059 ^a
Vitamin C	0,346±0,062 ^b

^{a,b} : Farklı harfler istatistik olarak farklılığı ifade etmektedir (p<0,01).



Şekil 3.5: Gruplarda plazma vitamin C düzeyleri (a,b: p<0,01).

4. TARTIŞMA

Son yıllarda birçok hastalığın tanı ve tedavi yöntemini belirlemek için kan değerlerinin yanında kan pulcuğunun incelenmesi, spesifikasyona gidilmesini ve etkin tedavi sürecinin başlatılmasını sağlamıştır. Günümüzde birçok hastalıkta; immün hastalıklar, fizyopatolojik olarak kan pulcuğu yapımının azalması, yıkımının ve kullanımının artması, enfeksiyonlar, ilaçlar, kalıtsal nedenler, kemik iliği hastalıkları ya da metabolik nedenlere bağlı olarak kan pulcuğu sayısında azalma bir belirti olarak tanımlanmaktadır. Kan pulcuğu sayısı yanında kan pulcuğu dağılım genişliği (PDW), ortalama kan pulcuğu hacmi (MPV) ve kan pulcuğu yüzdesinin (PCT) belirlenmesi de tanı ve tedavi yönteminin tanımlanmasında önem arzeder (Lothar ve ark., 1981).

Kan pulcuğu sayısında azalma ile seyreden hastalıkların nedenleriyle birlikte geniş bir yelpazeye yayılması ve sıklıkla görülmesi, tedavi sürecinin önemini göstermektedir. Ancak günümüzde kan pulcuğu sayısının normal değerlere ulaşması için uygulanan tedavi yöntemleri; yan etkileri kuvvetli olan güç ve pahalı (kortikosteroidler, dalağın operasyonla alınması, bağışıklık sistemini baskılayan ajanlar) yöntemlerdir (Hansen ve Balthasar, 2001). Çalışmada, toksik yan etkisi olmayan alternatif tedavi yöntemi olabilecek vitamin C ve serotoninin kan pulcuğu sayısı, kan pulcuğu dağılım genişliği, ortalama kan pulcuğu hacmi ve kan pulcuğu yüzdesi üzerine etkisi araştırıldı. Megakaryositlerden kan pulcuğunun oluşumunun yaklaşık olarak 3-4 gün sürmesi nedeniyle (Jain, 1993), tüm gruplardan uygulamalara başlamadan 0. gün devamında da 3. gün ve 7. gün ile vitamin C uygulamasının sonlandırıldığı 15. günde kan örnekleri alınmıştır.

Jubelirer (1993), yaptığı çalışmada, kan pulcuğu sayısında azalma ile seyreden hastalara her sabah 2 gr. vitamin C'yi 10 hafta süresince uygulamış, çalışma sonucu olarak uygulanan vitamin C dozunun kan pulcuğu sayısına etkili olmadığını belirtmiştir. Wicke (1994) çalışmasında, kan pulcuğu sayısının kortikosteroidler, vinca alkaloidler, siklofosfamid, azathioprine kullanılarak artırılabilceğini; yüksek dozda vitamin C'nin netlik kazanmamış, yararı sınırlı olabilecek uygulama

olabileceğini belirtmiştir. Brox ve ark. (1988), 8 ITP'li hastaya kahvaltıdan önce günlük 2 gram oral yolla, gün içersinde de sıvı halde vitamin C'yi ilave olarak uygulamışlar ve kan pulcuğu sayısında artış bildirmişlerdir. Buna karşın Karduss ve ark. (1993) çalışmalarında kronik ITP'li 13 hastaya oral yolla 2 gr/gün Vitamin C'yi 8 hafta uygulamışlar kan pulcuğu sayısında anlamlı bir artış olmadığını bildirmişlerdir. Hirano ve Ueoka (2007) çalışmalarında, vitamin C ve kortikosteroid benzeri etki gösteren EK-49'un (Çin bitkisel ilaç numunesi) kan pulcuğu sayısı üzerinde etkisini araştırmış ve vitamin C ve EK- 49 kombinasyonunun kan pulcuğu sayısında kademeli olarak artış sağlandığını, olumsuz yan etkilerinin olmadığını bildirmişlerdir. Mehta ve Mehta, (1999), ratta 100 mg/kg/gün vitamin C'yi 15 gün süresince uyguladıklarında kan pulcuğu kümeleşmesini engellediğini ve bu doz vitamin C uygulamasının koroner kalp hastalıklarını profilaktik tedavisinde etkili olduğunu bildirmektedir. Naziroğlu ve ark. (2004), Naziroğlu ve Butterworth, (2005) Wistar ratta yaptıkları çalışmada, vitamin C ve vitamin E kombinasyonunun deney modellerinde antioksidatif etki olarak kan pulcuğu sayısını önemli oranda artırdığını belirtmiştir.

Çalışmada ratlara, vitamin C uygulaması Mehta ve Mehta'nın (1999) bildirdikleri doz subkutan yoldan verildi. Uygulamanın 15. gün kan değerleri sonucunda hem zaman hem de gruplar arasında kan pulcuğu sayısı ve kan pulcuğu yüzdesindeki artış istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Serres ve ark., (1999) Wistar ırkı rata, trombopoietin peptit benzeri GW395058'i 2000 $\mu\text{l/kg}$ dozunda uyguladıklarında; 0. günde $1504 \times 10^3/\text{mm}^3$ olan kan pulcuğu sayısının iki hafta sonra $6796 \times 10^3/\text{mm}^3$ yükseldiği bildirilmektedir. Bu çalışmada vitamin C grubunda 0. gün kan pulcuğu ortalama sayısı 764 ± 103 iken, 15. günde 2956 ± 1261 'e yükselmesi Serres ve ark., (1999)'nın çalışmaları ile paralellik göstermektedir. Vitamin C'nin kemik iliğindeki megakaryositik koloni oluşturan ünite (CFU-M, megakaryocytic colony formation)'yi etkileyerek kan pulcuğu sayısını artırdığı düşünülmektedir (Brox ve ark., 1988). Bu sonuç her ne kadar literatürde bildirilen değerlere benzerlik gösteriyorsa da Walter (1999) farklı yorumları engellemek için kontrol ve deney gruplarına ait kan pulcuğu değerleri karşılaştırılarak istatistik anlam elde edilmelidir demektedir. Nitekim Walter (1999), erkek ratlarda karbondioksit

solunumunun hematolojik parametreler üzerine etkisini araştırdığı çalışmada kan pulcuğu sayısının $793 \pm 95,1 \times 10^3/\mu\text{l}$ olduğunu bulmuş, karbondioksit solunumunun kan pulcuğu sayısını değiştirmedığını bildirmiştir. Bildirilen değerler bu çalışmanın kontrol grubu ile 0. gün değerlerine paralellik göstermektedir. Walter (1999), çalışmasında kontrol grubunun önemini vurgulamaktadır. Ratlarda Dunleavy ve ark., (2005) nın, elde ettikleri kontrol grubu kan pulcuğu sayısı $880 \pm 20,1 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$, Nakanishi (1997) $600-700 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ ve Jackson ve Edward (1977) $1000 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ bildirdikleri değerler ile bu çalışmada elde edilen kontrol grubu kan pulcuğu sayısı ile (0. gün değeri 651 ± 161 , 3. gün değeri 719 ± 135 , 7. gün değeri 805 ± 188 ve 15.gün değeri 855 ± 121) paralellik göstermektedir. Aynı şekilde kontrol grubu kan pulcuğu değerleri Reis ve ark.,'nın (1999) bildirdikleri 0. gün kan pulcuğu sayısı $611 \pm 16 \times 10^9/\text{L}$ ile de uyum göstermektedir. Vitamin C uygulaması sonrası kan pulcuğu sayısı (PLT) ve kan pulcuğu yüzdesindeki (PCT) artış Naziroğlu ve ark. (2004) ve Hirano ve Ueoka (2007), Brox ve ark. (1988) çalışmalarıyla uyumlu; Jubelirer (1993), Karduss ve ark. (1993) ve Wicke (1994) çalışmalarıyla uyum göstermemektedir.

Zhou ve ark. (2008) yaptığı çalışmada immün trombositopenili hastalarda ortalama kan pulcuğu hacmi (MPV) ve kan pulcuğu dağılım genişliği (PDW) ve kümeleşmiş kan pulcuğu oranının yüksek olduğunu, kan pulcuğu sayısı normal ve artmış hastalarda ise kan pulcuğu dağılım genişliği ve ortalama kan pulcuğu hacminin düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Tschopp ve Zucker (1972) ile Serres ve ark. (1999)'nın yaptıkları çalışmalarda bildirdikleri kontrol grubundaki MPV değerleri sırasıyla $6,4 \pm 0,6$, $5,1$ (fl), PDW değeri ise $40,6$ (%) (Serres ve ark., 1999). Bu çalışmada kontrol grubu MPV değerleri $7,45 \pm 0,13$, PDW değeri $33,60 \pm 0,34$ (%)'dir.

Bu çalışmada vitamin C grubunda kan pulcuğu ortalama sayısının 15. günde anlamlı olarak yükseldiği (2956 ± 1261 , $p < 0,05$); kan pulcuğu dağılım genişliği ve ortalama kan pulcuğu hacmi istatistik olarak karşılaştırıldığında gruplar arası anlamlı bir fark olmamasına karşın zamanlar arası karşılaştırıldığında 15. günde hem kan pulcuğu dağılım genişliği ($30,197 \pm 0,727$, $p < 0,01$) hem de ortalama kan pulcuğu hacminde anlamlı ($6,633 \pm 0,197$, $p < 0,01$) azalmanın Zhou ve ark. (2008) bildirileriyle uyum göstermektedir.

Serotoninin merkezi sinir sisteminde (Hensler, 2005; Slotkin ve ark., 2005) gastrointestinal sistemde (Lepard ve ark., 1996) ve kardiovasküler sistemde (Watts, 2005; Hauso ve ark., 2007) üstlenmiş olduğu roller bildirilmektedir. Özellikle hemostatik süreçte serotoninin üstlendiği rol (Lechin ve ark., 2004); kanamanın durdurulması ve klinik iyileşme için kan pulcuğu serotoninin önemi (Dale ve ark., 2002); diyetle alınan serotoninin kan pulcuğu serotoninini artırdığı bilgisi (Xiao ve ark., 1998) ve kan pulcuğu ile kan damarları arasındaki ilişki nedeniyle serotoninin damar tonusu ve kan basıncındaki rolü (Marcos ve ark., 2004) düşünülerek serotoninin kan pulcuğu değerleri üzerine etkisi araştırıldı. Yang ve ark. (1996) vücutta çok sayıda ekstrasöronal fonksiyonu olan monoamin nörotransmitter serotoninin megakaryositopoezis üzerinde mitojenik stimülasyonu 5-HT₂ aracılığıyla sağladığı belirtilmiştir. Buna karşın Lechin ve Van Der Dijs, (2004b), trombogenezisde serotonin ile kan pulcuğu arasındaki ilişkiyi açıklarken, kan pulcuğunun sayısından ziyade trombogenezis'in oluşumundaki gerçeklerin görülmesi gerektiğini ifade etmişler, kan pulcuğunda depolanan serotonin düzeyinin önemini belirtmişlerdir. Serotoninin mitokondri membran hasarlarını önlediğini de bildirmişlerdir. Matondo ve ark. (2009) ratlarda yaptıkları çalışmalarında; serotoninin kan pulcuğu sayısına, ortalama kan pulcuğu hacmine ve yüzdesine etkisi olmadığını bildirmiştir. Son yıllarda plazma serotonin seviyesinin artırılmasıyla yapılan yani serotoninin yoğun dozda ve uzun süreli uygulamalarının yapıldığı çalışmalarda kalp damar hastalıklarına neden olduğu bildirilmiştir (Diaz ve ark. 2008). Gustafsson ve ark. (2005) çalışmalarında ratlara ilk üç gün 50 mg/kg olmak üzere üç ay süresince günlük 20 mg/kg serotoninini deri altı yolla uygulamışlar ve serotoninin karsinoid kalp hastalığına neden olduğunu bildirmişlerdir. Hauso ve ark. (2007) yüksek serotonin düzeyi (hiperserotoninemi) oluşturdukları ratta kalp kapakçıklarında hasar ve fibrozis ile birlikte kalp hastalıkları patogenezinde serotoninin etkisinin küçümsenmeyecek düzeyde olduğunu bildirmişlerdir. Tüm bu çalışmalarda yüksek doz ve uzun süreli serotonin uygulamalarının kuvvetli yan etkilerinin olduğu bildirildiğinden bu çalışmada Ovsianikov ve Berezino'nun (2005), Kikta ve ark. (1983) bildirdiği düşük doz uygulandı. Bu çalışmada uygulanan doz ve gün (Ovsianikov ve Berezino, 2005; Kikta ve ark, 1983; Gustafsson ve ark., 2005) sonucunda serotonin grubunda kan pulcuğu sayısı, kan pulcuğu yüzdesi

bakımından istatistik olarak anlamlı bir fark görülememiştir (serotonin grubundaki kan pulcuğu sayısı 0 günde 585 ± 82 , 3. günde 481 ± 127 , 7. günde 744 ± 165 ve 15. günde 1095 ± 127 ; kan pulcuğu yüzdesi ise 0. gün $0,407 \pm 0,100$, 3. gün $0,343 \pm 0,085$, 7. gün $0,497 \pm 0,119$ ve 15 .gün $0,743 \pm 0,067$). Bu çalışmada serotonin grubunda kan pulcuğu sayısı bakımından fark olmamasının nedeni kullanılan doz ile ilişkili olduğu düşünülebilir. Nitekim, Smith (1989) ratlarda serotoninin doza bağımlı olarak kan pulcuğu adezyon ve agregasyonlarını artırarak kan pulcuğu sayısında düşüş olduğunu bildirmektedir. Aynı çalışmada serotoninin kobaylarda kan pulcuğu sayısına etkili olmadığını bildirilmiştir. Bu da serotoninin kan pulcuğu sayısına, adezyonu ve agregasyonuna etkisinin doza, türe ve veriliş şekline bağlı olarak değişebileceğini düşündürmektedir. Tschopp ve Zucker (1972), Wistar ratta yapmış olduğu çalışmada kontrol grubunda serotonin miktarını 889 ± 147 hücre $\times 10^3/\mu\text{l}$ bulunduğunda kan pulcuğu sayısını da heparinize kanda 996 ± 266 hücre $\times 10^3/\mu\text{l}$, kan pulcuğu hacmini ise $6,4 \pm 0,6$ fl olarak bildirmektedir. Bu çalışmada ise 2 mg/kg canlı ağırlığa (Ovsiannikov ve Berezino'nun (2005), Kikta ve ark. (1983) verilen serotonin grubunda kan pulcuğu sayısı ve hacminde kontrole göre bir değişiklik olmamıştır. Çalışmada 2 mg/kg serotonin verilen grupta kan pulcuğu sayısının ve volümünün artmaması serotonin dozuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Dozla ilgili yapılan çalışmalarda (Gustafsson ve ark., 2005; Hauso ve ark., 2007; Diaz ve ark., 2008) doza bağımlı olarak ratlarda kalple ilgili fonksiyon bozukluklarının şekillenmesi nedeniyle dozun kademeli olarak artırılması gerektiği diğer araştırmacılar tarafından da vurgulanmaktadır (Gustafsson ve ark., 2005; Hauso ve ark., 2007; Diaz ve ark., 2008). Reis ve ark., (1999) erkek ratlarda kan pulcuğu serotonin miktarı ve kan pulcuğu hacmini belirlediği çalışmada kontrol grubunda 0. ve 2. haftada sırasıyla serotonin miktarlarını 1105 ± 41 ng/ml, 999 ± 24 ng/ml, kan pulcuğu sayısı 611 ± 16 , 631 ± 31 hücre $\times 10^3/\mu\text{l}$, kan pulcuğu hacmi $5,3 \pm 0,1$, $5,4 \pm 0,2$ fl olarak bulmuştur. Bu çalışmada 3 gün boyunca 2 mg/kg serotonin uygulaması kontrol grubuyla kan pulcuğu sayısı ve hacmi yönünden karşılaştırıldığında ilave edilen serotonin bu değerleri etkilememiştir. Reis ve ark., (2009) bağışıklık sistemini baskılayan antibiyotiklerin kullanıldığı çalışmada kan pulcuğu sayısı, kan pulcuğu hacmi, kan pulcuğu yüzdesi ve kan pulcuğu dağılım genişliği ile serotonin miktarlarına bakmış ve kan pulcuğu sayı ile kan pulcuğu yüzdesinde azalma olduğunu, kan pulcuğu

hacmi ve kan pulcuğu dağılım genişliğinde fark olmadığını bildirmiştir. Aynı çalışmada plazma ve kan pulcuğu serotonin miktarı ise siklosporin verilen grupta kontrole göre bir değişiklik göstermemiş, sirolimus verilen grupta ise bu değerler artış göstermiştir. Bu da serotonin miktarının pek çok etkenden etkilenerek kan pulcuğu parametrelerini değiştirdiği görülmektedir (Reis ve ark., 2009). Bu çalışmada kan pulcuğu sayısı ve kan pulcuğu yüzdesi değerleri değişmemiş olmasına rağmen kan pulcuğu hacmi ile kan pulcuğu dağılım genişliği değerleri yapılan uygulamalardan zamana bağlı olarak etkilenmiştir.

Ekuni ve ark. (2009), Levine ve ark. (1992) ratta vitamin C alımına bağlı olarak plazma vitamin C seviyesinin arttığını bildirmişlerdir. Çalışmada bu literatüre paralel olarak 0. gün, 3. gün ve 15. günde plazma vitamin C düzeyinin artmış olduğu tespit edildi. Tüm gruplardan eş zamanlı alınan kan plazma örneklerinden fosfotungustat metodu ile kolorimetrik olarak tayin edilen vitamin C düzeyi istatistik olarak karşılaştırıldığında; plazma vitamin C düzeyleri açısından hem zamanın hem de grubun etkisi istatistik olarak anlamlı bulundu. Zamana göre karşılaştırıldığında plazma vitamin C düzeyinin 7. günde diğer günlere göre azaldığı ($p<0,01$); gruplar arası karşılaştırıldığında ise serotonin grubunda, diğer gruplara göre plazma vitamin C seviyesinde artma görüldü ($p<0,01$). Serotonin uygulaması yapılan grupta plazma vitamin C seviyesinin yüksek olması; Kuhn ve Arthur (1999), Chakraborty ve Chakraborty (1999), Harel ve ark. (2002), Diliberto ve ark. (1991), Desole ve ark.'nın (1987) ekzojen aminoasit olan triptofandan serotoninin sentezlenmesinde vitamin C'nin gerekli olduğu bildirilerine dayanarak; vitamin C'nin serotoninin triptopandan üretimini aşamasında kullanılmasıyla ilişkilendirilebilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada vitamin C ve serotoninin ratlarda kan pulcuğu sayısı, kan pulcuğu yüzdesi, ortalama kan pulcuğu hacmi, kan pulcuğu dağılım genişliği ve plazma vitamin C düzeyi incelenmiştir. Araştırmadan elde edilen bulgular ışığında şu sonuçlar elde edilmiştir.

- Vitamin C'nin kan pulcuğu sayısını (PLT) ve kan pulcuğu yüzdesini (PCT) artırabileceği düşünülmektedir. Çalışmada yapılan uygulamaların kan pulcuğu dağılım genişliği (PDW) ve ortalama kan pulcuğu hacmini (MPV) zamana bağlı olarak azalttığı belirlenmiştir.
- Serotonin kan pulcuğu sayısı (PLT) ve kan pulcuğu yüzdesi (PCT) üzerine etkisinde anlamlı bir sonuca varılamamıştır. Serotonin ratlarda yüksek doz ve uzun süreli uygulandığı araştırmaların sonucunda raporlanan kalp hastalığı patogenezi düşünülerek; kademeli olarak artırılan dozlarda serotoninin kan pulcuğu parametrelerine etkisi ileride yapılacak çalışmalar için önerilebilir. Ayrıca Fluoxetine gibi serotonin düzeyini 5-HT₂ üzerinden artıran bir ilaç da benzer araştırmalara dahil edilebilir.
- Araştırmanın 7. gününde, plazma vitamin C düzeyindeki istatistiksel olarak anlamlı düşme, 15. günde vitamin C grubunda kan pulcuğu sayısı ve yüzdesindeki artış dikkate alındığında; vitamin C'nin kan pulcuğu üretiminde kullanıldığı düşünülebilir.
- Serotonin plazma vitamin C seviyesini artırabileceği belirlenmiştir.

ÖZET

Ratlarda vitamin C ve serotoninin kan pulcuğu üzerine etkisi

Kan pulcuğu sayısı üzerine vitamin C ve serotoninin etkisinin araştırılması amaçlanan bu çalışmada 18 adet Wistar rat, her grupta 6 rat olacak şekilde üç gruba ayrılmıştır. Gruplar kontrol, vitamin C ve serotonin grubu olarak tanımlanmıştır. Vitamin C (100 mg/kg, 15 gün), serotonin (2 mg/kg, 3 gün) deri altı uygulanmıştır. Kontrol grubuna da fizyolojik tuzlu su uygulanmıştır. Uygulamaya başlamadan 0. gün, uygulama sonrası 3., 7., ve 15. gün kanları alınarak kan pulcuğu sayısı, kan pulcuğu dağılım genişliği (PDW), ortalama kan pulcuğu hacmi (MPV) ve yüzde kan pulcuğu (PCT) ve eş zamanlı olarak kan plazma vitamin C düzeyine bakılmıştır.

Vitamin C verilen grupta kan pulcuğu sayısının ve yüzde kan pulcuğu sayısı arttığı ($p<0,05$), kan pulcuğu dağılım genişliği ve ortalama kan pulcuğu hacminin ise düştüğü ($p<0,01$) görüldü. Serotonin verilen grupta ise önemli bir fark olmadığı ($p>0,05$) görüldü.

Plazma vitamin C düzeyi gruplar arası karşılaştırıldığında serotonin grubunda diğer gruplara göre artış görüldü ($p<0,01$). Zamana bağlı olarak 7. günde diğer gün sonuçlarına göre daha düşük bulundu ($p<0,01$).

Anahtar Sözcükler: Kan pulcuğu, Serotonin, Vitamin C, Rat.

SUMMARY

The Effects of Vitamin C and Serotonin on Platelet Indices in the Rats

This study aims to elucidate the effects of Vitamin C and serotonin on the platelet indices. It has been conducted on 18 Wistar rats. The rats have been divided into three groups with 6 rats in each group. The groups have been named, "Vitamin C," "Serotonin" and "Control" Groups. Vitamin C (100 mg/kg for 15 days), serotonin (2 mg/kg for 3 days) were administered subcutaneously. The animals in the Control Group was administered saline solution. Blood samples have been obtained on days 0, 3, 7 and 15. Platelet indices such as Platelet Count, Platelet Distribution Width (PDW), Mean Platelet Volume (MPV) and *Platelet* Crit (PCT) were recorded simultaneously with Vitamin C levels.

Rats that received Vitamin C had an increase in platelet count and PCT ($p<0.05$), but a decrease in PDW and MPV ($p<0.01$). Statistical analysis of data did not demonstrate a significant change in the rats that received serotonin ($p>0.05$).

When Vitamin C levels were compared, the levels of the "Serotonin Group" was significantly ($p<0.01$) higher than the other groups. In all groups the Vitamin C levels were lower on the 7th day compared to other days in the study ($p<0.01$).

Key Words: Platelet, Vitamin C, Serotonin, Rat

KAYNAKLAR

- AKAY, T. (2007). Genel Histoloji. 6. Baskı, Palme Yayınevi, Ankara.
- BERKENBOOM G., PREUMONT, N., PRADIER, O., GOLDMAN, M., CARPENTIER, Y., VACHIER, J.L., BITHELL, C.T. (1993). Platelets and megakaryocytes. *Windrobs*, 3.Th Edition, 511-523.
- BERGENDI, L., BENES, L., DURACKOVA, Z., FERENCIK, M.(1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*, **65**: 1865-1874.
- BITHELL, C.T. (1993). Platelets and megakaryocytes. *Windrobs*, 3th Ed., 511-523.
- BLOCKMANS, D., DECKMYN, H., VERMYLEN, J. (1995). Platelet activation. *Blood Rev*, **9**: 143-156.
- BORNE, R.F. (1994). Serotonin: The Neurotransmitter for the 90's. *Drug Topics*, **2**: 108-120.
- BONILLA, E., MEDINA-LEENDERTZ, S., VILLALOBAS, V., MOLENA, L., BOHORQUEZ, A. (2006). Paraquat-induced oxidative stress in drosophila melanogaster, effects of melatonin, glutathione, serotonin, minocycline, lipoic acid and ascorbic acid. *Neurochem Res*, **31 (12)**: 1425-1432.
- BROX, A., HOWSON-JAN, K., FAUSER, A.A. (1988). Successful Treatment of Immune Thrombocytopenia with Ascorbic Acid. *Immunohematology*, **70**: 341-344.
- BUHOT, M.C., MALLERET, G., SEGU, L. (1999). Serotonin receptors and cognitive behaviour an update. *Idrugs*, **2**: 426-37.
- BÜYÜKBAŞ, S., ERSÖZ, B., BAYINDIR, O., MENTEŞ, G. (1986): Fosfotungustik asit yöntemiyle plazma askorbik asiti tayini. *Ege Üni Tıp Fak Derg*, **25**: 4, 1233-1238.
- CALPIN, C., DICK, P., POON, A., FELDMAN, W. (1998). Is Bone Marrow Aspiration Needed in Acute Childhood Idiopathic Thrombocytopenic purpura to Rule out Leukemia. *Arch pediatr adolesc Med*, **152**: 49, 345-347.
- CHAKRABORTY, A.K., CHAKRABORTY, D.P., (1999). The effect of tryptophan on dopa-oxidation by melanosomal tyrosinase. *Int J Biochem*, **25(9)**: 1277-1280.

- CHAUDHARY, M., TAMTA, A., SEHGAL, R.(2009). Sub-chronic toxicity study in wister rat to evalvate toxicity profile of ceftriaxone tazobactrum combination. *The Internet journal of infectious diseases*, **7**(2), 50-55.
- ÇETİN, N., BİLGİLİ, A., KOYU, A. (2004). Tavşanlarda Flor uygulamasının bazı kan parametreleri üzerine etkisi. *EÜ J Health Science*, **13** (2): 46-50.
- DALE, G.L., FRIESE, P., BATAR, P., HAMILTON, S.F., REED, G.L., JACKSON, K.W. (2002). Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant protein on the cell surface. *Nature*, **415**: 175-179.
- DAWSON, E., EVANS, D., HARRIS, W., TETER, M., MCGANITY, W. (1999). "The effect of ascorbic acid supplementation on the blood lead levels of smokers". *J Am Coll Nutr*, **18** (2): 166-70.
- DESOLE, M.S., ANANIA, A., ESPOSITO, G. (1987). Neuro chemical and behavioral changes induced by ascorbis acid and d- amphetamine in the rat. *Pharmacol Res Comm*, **19**: 441-450.
- DHIR, A., KULKARNI, S.K. (2008). Venlafaxine reverses chronic fatigue-induced behavioral, biochemical and neurochemical alterations in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, **89** (4): 563- 571.
- DIAZ, J., WEI, N., THOMPSON,J., KING, A., FINK, G.D., WATTS, S.W. (2008). Arterial 5- Hydroxytryptamine transporter function is impaired. *J Pharmacol Exp Ther*, **325** (4): 714-722.
- DILIBERTO, E.J.,DANIELS, A.J. (1991). Viveros Multi compart mental secretion of ascorbate and its dual role in dopamine b- hydroxylation. *Am J Clin Nutr*, **54**: 1163-1172.
- DROOGMANS, S., FRANKEN, P.R., GARBAR, C., WEYTJENS, C., COSYNS, B., LAHOUTTE, T., CAVELIERS, V., PIPELEERS-MARICHAL, M., BOSSUYT, A., SCHOORS, D. (2007). In vivo model of drug-induced valvular heart disease in rats: pergolide-induced valvular heart disease demonstreted with echocardiography and correlation with pathology. *European Heart J*, **28**: 2156-2162.
- DUNLEAVY, M., DOOLEY, M., COX, D., BRADFORD, A. (2005). Chronic intermittent asphyxia increases platelet reactivity in rats.. *Exp Physiol*, **90**, 411-6.

- DUYFF, R. (2002). American Dietetic Association: Complete Food and Nutrition Guide. 2nd Ed. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, NJ.
- EKUNI, D., TOMOFUJI, T., SANBE, T., IRIE, K., AZUMA, T. (2009). Vitamin C intake attenuates the degree of experimental atherosclerosis induced by periodontitis in the rat by decreasing oxidative stress. *Archives of Oral Biology*, **54(8)**: 723-729.
- ERKOÇAK, A. (1983). Genel Histoloji. Kan dağıtım cılık Yayıncılık Ltd., İstanbul.
- FANBURG, B.L., LEE, S.L. (1997). A new role for an old molecule: Serotonin as a mitojen. *Am J Physiol*, **272**: 795-806.
- FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN N.C., SCHALM, O.W. (2000). Schalm's Veterinary Hematology, Fifth Ed, Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore.
- GEORGE, J.N., DAVIDOFF, F. (1997). Idiopathic Thrombocytopenic Purpura: Lessons from a Guideline. *Annals*, **126**: 317-318.
- GRIMALDI, B., BONNIN, A., FILLION, M.P., PRUDHOMME, N., FILLION, G. (1999). 5-Hydroxytryptamine moduline: a novel endogenous peptine involved in the control of anxiety. *Neuroscience*, **93**: 1223-1225.
- GOBBI, G., MIRANDOLA, P., TAZZARI, P.L., RICCI, F., CAIMI, L., CACCHIOLI, A. (2003). Flow cytometry detection of serotonin content and release in resting and activated platelets. *Br J Haematol*, **121**: 892-896.
- GOLDSMITH, B.M., FEINSTEIN, C., MUNSON, S. (1986). Determination of a reference range for whole blood serotonin in a pediatric population using high pressure liquid chromatography with electrochemical detection. *Clin Biochem*, **19(6)**: 359-63.
- GUSTAFSSON, B.I., TOMMERAS, K., NORDUM, I., LOENNECHEN, J.P., BRUNSVIK, A., SOLLIGARD, E. (2005). Long-Term serotonin administration induces heart volue disease in rats, *Circulation*. **111**: 1517-1522.
- GUYTON, A.C., JOHN, J.E. (2001). Textbook of Medikal Physiology, Onuncu Ed., Yüce yayınları & Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. Ankara.
- HAGA, N., MIZUMOTO, M., SATOH, E., MOCHIKI, F., MIZUSAWA, K., OHSHIMA, K., ITOH, Z. (1996). Role of endogenous 5-hydroxytryptamine in the regulation of gastric contractions by motilin in dogs, *AJP Gastrointestinal and Liver Physiology*, **270**: 20-28.

- HAREL, Z., BIRO, F., KOLLAR, L., RIGGS, S., FLANAGON, P., VAZ, R. (2002). Supplementation with vitamin C and/or vitamin B6 in the prevention of Depo-Provera side effects in adolescents. *J Pediatr Adolesc Gynecol*, **15 (3)**: 153-158.
- HATA, T., KAWABATA, A., KITA, T., ITOH, E., NISHIMURA, Y. (1988). Changes in platelet count and related parameters in sart-stressed mice and the action of administered neurotrophin. *The Japanese J of Pharmacology*, **47 (4)**: 349-356.
- HALLIWELL, B. (2000). Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease, how should we move forward. *Cardiovasc Res*, **47**: 410-418.
- HANSEN, R.J., BALTHASAR, J.P. (2001). Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and platelet binding of an anti-glycoprotein IIb/IIIa monoclonal antibody (7E3) in the rat: A quantitative rat model of immune thrombocytopenic purpura, *The journal of pharymacology and experimental therapeutics*, 298 (1), 165- 171.
- HAUSO, O., GUSTAFSSON B.I., LOENNECHEN, J.P., STUNES, A.K., NORDRUM, I., WALDUM, H.L. (2007). Long-Term serotonin effects in the rat are prevented by terguride. *Regulatory Peptides*, **143**: 39-46.
- HENSLER, J.G. (2005). Serotonergic modulation of limbic system. *Neurosci Biobehav Rev*, **10**: 1016-25.
- HEPTINSTALL, S., FOX, S., CRAWFORD, J. (1986). Inhibition of platelet aggregation in whole blood by dipyridamole and aspirin. *Thrombosis Research*, **42**: 215-223.
- HIGDON, J. (2006). Vitamin C, Oregon State University Micronutrient Information Center, [http://lpi.oregonstate.edu/Infocenter/vitamins/vitamin C](http://lpi.oregonstate.edu/Infocenter/vitamins/vitamin%20C), Eriřim Tarihi: 03.07.2007.
- HIRANO, A., UEOKA, H. (2007). Successful treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura by Chinese herbal medicine EK-49 and ascorbic acid in an elderly patient developing chronic subdural hematoma. *Geriatrics and Gerontology International*, **7(1)**: 83-88.
- HUNG, L.M., CHEN, J.K., HUANG, S.S, LEE, R.S., SU, M.J. (2000). Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res*, **47**: 549-555.
- JACKSON, C.W., EDWARDS, C.C. (1977). Biphasic thrombopoietic response to severe hypobaric hypoxia. *Br J Haematol*, **35**, 233-44.

- JAIN N.C.(1993). Essential of veterinary hematology, First Ed, Lea and Febiger, Philadelphia.
- JOSHI, M.S., BAUER, J.A., WERBOVETZ, K.A., BARSZCZ, T., PATIL, P.U. (2008). Pharmacological and Biological screening of ascorbigen, protection against glucose-induced endothelial cell toxicity. *Phytother Res*, **22(12)**: 1581-1585.
- JUBELIRER, S.J. (1993). Pilot study of ascorbic acid for the treatment of refractory immuno thrombocytopenic purpura. *Am J Hemato*, **43**: 44-46.
- KARDUSS, U.A., MORALES POLANCO M.R., PIZZUTO CHAVEZ, J., MEILLON GARCIA, L.A.(1993). Results of the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura with ascorbic acid, *Gac Med Mex* 129 (1), 23-25.
- KHANZODE, S.D., DAKHALE, G.N., KHANZODE, S.S., SAOJI, A., PALASODKAR, R. (2003). Oxidative damage and major depression, the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. *Redox Rep*, **8(6)**: 365-370.
- KIKTA, D.C., BARNEY C.C., THREATTE, R.M., FREEGLY, M.J., ROWLAND, N.E., GREENLEAF, J.E. (1983). On the mechanism of serotonin-induced dipsogenesis in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, **19(3)**, 519-525.
- KUHN, D.M., ARTHUR, R.E. (1999). L- DOPA quinone inactivates tryptophan hydroxylase and converts the enzyme to a redoxcycling quinoprotein. *Brain Res Mol*, **73 (1-2)**: 78-84.
- KYAW, A. (1978). A simple colorimetric method for ascorbic acid determination in blood plasma. *Clin Chim Acta*, **16**: 151-157.
- LECHIN,F., VAN DER DIJS, B. (2004a). Platelet serotonin and thrombostasis. *J Clin Invest*, Letter.
- LECHIN,F., VAN DER DIJS, B. (2004b). Platelet aggregation, platelet serotonin and pancreatitis. *JOP J Pancreas*, **5(4)**: 237-238.
- LEPARD, K.J., CHI, J., MOHAMMED, J.R., GIDENER, S., STEPHENS, R.L. (1996). Gastric antisecretory effect of serotonin: quantitation of release and site of action. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **271**: 669-677.

- LEVINE, M., DHARIWAL, K.R., WASHKO, P., WELCH, R., WANG Y.H., CANTILENA, C.C., YU R. (1992). Ascorbic acid and reaction kinetics in situ: a new approach to vitamin requirements. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 169–172.
- LIN, M.T., CHUANG J.I. (2002). Melatonin potentiates 5-HT (1A) receptor activation in rat hypothalamus and results in hypothermia. *J Pineal Res*, **33(1)**: 14-19.
- LOTHAR, B., HUEBSCH, M.D., LAURENCE, A., HARKER, M.D. (1981). Platelet function disorders. *West J Med*, **134**: 109-127.
- LYCHKOVA, A.E. (2004). Serotonergic nervous system in intact heart and abdominal organs. *Bull Exp Biol Med*, **138**: 127-130.
- MALLE, E., SALTIER, W. (1994). Platelets and the lipoproteins, native, modified and platelet modified lipoproteins. *Plalets*, **5**: 70-83.
- MARCOS, E., FADEL, E., SANCHES, O., (2004). Serotonin induced smooth muscle hyperplasia in various forms of human pulmonary hypertension. *Circ Res*, **94**: 1263-1270.
- MARTIN-CORA, F.J., FORNAL, C.A., METZLER, C.W., JACOBS, B.L. (2000). Single-unit responses of serotonergic medullary and pontine raphe neurons to environmental cooling in freely moving cats. *Neuroscience*, **98**: 301-309.
- MATONDO, R.B., PUNT, C., HOMBERG, J., TOUSSAINT M.J., KISJES, R., KORPORCOL, S.J., AKKERMAN, J.W., CUPPEN, E., DE BRUIN, A. (2009) Deletion of the serotonin transporter in rats disturbs serotonin homeostasis without impairing liver regeneration. *Am J Physiol*, **296 (4)**: 963-968.
- MATTHIAS, P., CALLAHAN, R., AU, J., KINDLER, C.H., YOST, C.S. (2005). Antiemetics of the 5-Hydroxytryptamine 3A antagonist class inhibit muscle nicotinic acetylcholine receptors. *Anesth Analg*, **101**: 715-21.
- MAURER-SPUREJ, E. (2005). Circulating serotonin in vertebrates. *Cell Mol Life Sci*, **62**: 1881-1889.
- McCLUSKEY, E.S. (1985). Which vertebrates make vitamin C. Origins. **12(2)**: 96-100.
- MEHTA, J., LI D., MEHTA J.L. (1999). Vitamins C and E prolong time to arterial thrombosis in rats. *The journal of Nutrition*, **129**: 109-112.

- METZNER, L., KOTRA, G., NEUBERT, K., DANIEL, H., BRANDSCH, M. (2005). Serotonin, tryptophan, and tryptamine are effective inhibitors of the amino acid transport system PAT1. *The FASEB J*, **19**: 1468-1473.
- NAKANISHI, K., TAJIMA, F., NAKATA, Y., OSADA, H., SUGIYAMA, K., MARUTA, H., KAWAI, T., SUZUKI, M., TORIKATA, C. (1997). Hypercoagulable state in a hypobaric, hypoxic environment causes non-bacterial thrombotic endocarditis in rats. *J Pathol*, **181**, 338-46.
- NAZİROĞLU, M., ŞİMŞEK, M., KUTLU, M. (2004). Moderate exercise with a dietary vitamin C and E combination protects against streptozotocin-induced oxidative damage to the blood and improves fetal outcomes in pregnant rats. *Clin Chem Lab Med*, **42** (5): 511-517.
- NAZİROĞLU, M., BUTTERWORTH, P.J. (2005). Protective effects of moderate exercise with dietary vitamin C and E on blood antioxidative defense mechanism in rats streptozotocin induced diabetes. *Can J Appl Physiol*, **30** (2): 172-185.
- OLAS, B., WACHOWICZ, B., BUCZYNSKI, A. (2000). Vitamin C suppresses the cisplatin toxicity on blood platelets. *Anti-Cancer Drugs*, **11**: 487-493.
- OLAS, B., WACHOWICZ, B. (2002). Resveratrol and vitamin C as antioxidants in blood platelets. *Thrombosis Research*, **106**: 143-148.
- OVSİANNIKOV, V.I., BEREZINO, T.P. (2005). Mechanisms of serotonin effect on motility of ileocaecal zone in alert rabbits. *Russ Fiziol Zh Im*, **91**: 437-439.
- ÖZATLI, D. (2004). Trombositopeni: Ne çok nedeni var, XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi, IV. Hematoloji ilk basamak kursu. **21**, 3.
- ÖZDEMİR, A.Ö., ÖZDEMİR, G. (2006). Homeostaz Bozukluklarında Nörolojik Etkilenim. *J Turk Cerebrovascul Dis*, **12**: 33-40.
- ÖZMEN, F., ATALAR, E., ÖZER, N. (2007). Akut koroner sendromda trombositler ve glikoprotein IIb/IIIa inhibitörleri. *Turk J Cardiol*, **10**: 91-100.
- PADAYATTY, S., KATZ, A., WANG, Y., ECK, P., KWON, O. (2003). Vitamin C as an Antioxidant evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr*, **22** (1): 18-25.
- PAULING, L. (2007). "Evolution and the need for ascorbic acid". *Proc Natl Acad Sci*, **67** (4): 1643-8.

- PAULING, L. (2008). Discussion of function, deficiency, disease prevention, disease treatment, food sources, new research and recommendations from the linus. [http:// www. Ipi. Oregonstate. edu/ infocenter/vitamins/Vitamin C](http://www.Ipi.Oregonstate.edu/infocenter/vitamins/Vitamin%20C). Eriřim Tarihi: 17.10.2008.
- PEEL, T., ALEGRE, L., CONGENI, R., EL-ZORKON, M.M., FIORANI,M. (2006). Vitamin C: New Research, First Ed., Nova Publishers, New York.
- PİRİNÇCİ, İ., ATEŞŞAHİN, A., KARAHAN, İ. (2005). The effects of Fenfluramine on blood and tissue serotonin (5-Hydroxytryptamine) levels in rats. *Turk J Vet Anim Sci*, **29**: 857-863.
- RAO, G.H.R. (1999). Handbook of Platelet Physiology and Pharmacology, Kindle Ed, Kluwer Akademik Publishers, Boston.
- REIS, F., TAVARES, P., FONTES RIBEIRO, C.A., ANTUNES, F., TEIXEIRA, F. (1999). The peripheral serotonergic system and platelet aggregation in cyclosporin A-induced hypertensive rats. *Thromb Res*, **96**, 365-72.
- RUTKOWSKI, M., GRZEGORCZYK, K. (2007). Modifications of spectrophotometric methods for antioxidative vitamins determination convenient in analytic practice. *Acta Sci Pol, Technol Aliment*, **6 (3)**: 17-28.
- SAGARA, J., FUJIWARA, K., SAKAKURA, Y., SATO, H., BANNAI, S., MAKINO, N. (2007). Beneficial effect of antioxidants in purified neurons derived from rat cortical culture. *Brain Res*, **1131 (1)**: 11-16.
- SAĞLAM, M., AŞTI, R.N., ÖZER, A. (2001). Genel Histoloji. Genişletilmiş 6. Baskı, Yorum Matbaacılık, Ankara.
- SCHALM, O.W. (1994). Veretinary Hematology, Sekond Ed, Chapter 65, McGraw-Hill, Philadelphia.
- SERRES, M., YEAGER, R.L., DILLBERGER, J.E., LALONDE, G., GARDNER, G.H., RUBENS, C.A., SIMKINS, A.H., SAILSTAD, J.M., MCNULTY, M.J., WOOLEYJ.L. (1999). Pharmacokinetics and hematological effects of the pegylated thrombopoietin peptide mimetic GM395058 in rats and monkeys after intravennous or subcutaneous administration, *Stem Cells* **17**, 316-326.
- SIEBERS, R.W., WAKEM, P.J., CARTER, J.M. (1989). Long- Term intra individual variation of platelet parameters. *Medical Laboratory Sciences*, **46**: 77-78.

- SLATTER, D.H., WITHROW, S., VASSEUR, P., TANG, H., VAIL D. (2003). Textbook of small Animals Surgery, 1. Chapter, 3rd Edition, WB Saunders, New York.
- SLOTKIN, T.A., COUSINS, M.M., TATE, C.A., SEIDLER, F.J. (2005). Serotonergic cell signaling in an animal model of aging and depression: Olfactory bulbectomy elicits different adaptations in brain regions of young adult. *Neuropsychopharmacology*, 30: 52-57.
- SMITH, G.M. (1989). Involvement of 5-hydroxytryptamine in platelet aggregation in vivo in rats and guinea pigs. *Thromb Haemost*, 61, 463-7.
- SOYLU, A.R., AYDOGDU, N., BASARAN, U.N., ALTANER, S., TARCIN, O., GEDIK, N., UMIT, H., TEZEL, A., DOKMECI, G., BALOGLU, H., TURE, M., KUTLU, K., KAYMAK, K. (2006). Antioxidants vitamin E and C attenuate hepatic fibrosis in biliary-obstructed rats. *World J Gastroenterol*, 12, 6835-41.
- STRACHAN, A.T., LEIPER, J.B., MAUGHAN, R.J. (2005). Serotonin 2C receptor blockade and thermoregulation during exercise in the heat. *Med Sci Sports Exerc*, **37(3)**: 389-94.
- TAVASSOLI, M. (1980). Megakaryocyte – platelet axis and the process of platelet formation and release. *Blood*, **55(4)**: 537-545.
- THOMAS, M.J. (2000). Physiological aspects of low-density lipoprotein oxidation. *Curr Opin Lipidol*, **11**: 297-301.
- TONG, M., SETH, P., PENINGTON, D.G. (1987). Proplatelets and stress platelets. *Blood*, **69 (2)**: 522-528.
- TSCHOPP, T.B., ZUCKER M.B. (1972). Hereditary defect in platelet function in rats. *Blood*, 40, 217-26.
- WALTER, G.L. (1999). Effects of carbon dioxide inhalation on hematology, coagulation, and serum clinical chemistry values in rats. *Toxicol Pathol*, **27**, 217-25.
- WATTS, S.W. (2005). 5-HT in systemic hypertension. *Clinical Science*, **108**: 399-412
- WICKE, R. (1994). Traditional Chinese Herbal Science: Volume 1, The Language and patterns of life. 5th Ed, Rocky mountain Herbal Institute, Hot Springs, Montana.

- WILKINSON, I.B., MEGSON, I.L., MACCALLUM, H., SOGO, N., COCOKCOFT, J.R. WEBB, D.J. (1999). Oral vitamin C reduces arterial stiffness and platelet aggregation in humans. *J Cardiovasc pharmacol*, **34**: 690-693.
- WINER, B.J., DONALD, R.B., KENNETH, M.M. (1991). Statistical Principles in experimental Desing, Third Ed, A. Bradford Hill. London.
- XIAO,R., BECK,O., HJEMDAHL, P. (1998). On the accurate measurement of serotonin in whole blood. *Scand J Clin Lab Invest*, **58(6)**: 505-510.
- YANG, M., SRIKIATKHOCHORN, A., ANTHONY, A. (1996). Serotonin uptake, storage and metabolism in megakaryoblast. *Int J Hematol*, **63**: 137-142.
- YILMAZ, B. (1984). Fizyoloji. Hacettepe Taş Kitabevi. Ankara.
- ZHOU, J., JIANG, N.G.,KUANG, L.H., LIAO, J. (2008). Combined indicators for diagnosing immune thrombocytopenic purpura. *Sichuan Da Xue Chinese*, **39 (6)**: 1000-1003 (özet).

EKLER

EK 1

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

TOPLANTI TARİHİ :31/10/2007
TOPLANTI NO :2007-9
DOSYA NO :2007-44
KARAR NO :2007-9-29

Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Nesrin Sulu'nun araştırma yürütücüsü olduğu, doktora öğrencisi Ayşe Orhan'ın ortak çalışmaları olan "Ratlarda Vitamin C ve Serotoni'nin Kan Pulcuğu Üzerine Etkisi" başlıklı proje çalışmaları Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre uygun bulunarak onaylanmasına katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.



Prof.Dr.Hakan YARDIMCI
Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel
Etik Kurulu Başkanı

EK 2

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

16/07/2008

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ :16/07/2008

TOPLANTI NO :2008-23

DOSYA NO :2008-67

KARAR NO :2008-23-111

Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Nesrin Sulu'nun araştırma yürütücüsü olduğu, doktora öğrenci Ayşe Orhan'ın ortak çalışmaları olan "Ratlarda Vitamin C ve Serotini'nin Kan Pulcuğu Üzerine Etkisi" başlıklı çalışmaları ile ilgili olarak 31.10.2007 tarih ve 9-29 sayılı onay kararından sonra Kurulumuza yaptıkları deney hayvanı ile ilgili yöntem değişikliği hakkındaki 23.06.2008 tarih ve 256 sayılı yazı ile bildirilen başvuruları Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre uygun bulunarak onaylanmasına, katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.

ASLININ AYNIDIR

16/07/2008

Prof.Dr.Hakan YARDIMCI
Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel
Etik Kurulu Başkanı



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: : Ayşe
 Soyadı : Orhan
 Doğum yeri ve tarihi: Kırşehir; 28.09.1974
 Uyuğu : T.C.
 Medeni Durumu : Evli
 İletişim adresi : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji ABD
 Dışkapı/Ankara
 Telefon : 312- 2413533
 GSM : 536-6913828
 e-mail : ayseo@migros.com.tr
 Yabancı Dili : İngilizce

II- Ünvanları

Veteriner Hekim : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi-1996

III- Eğitimi

1991-1996 Yüksek Öğrenim, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
 1990-1984 Orta Öğrenim, Kırşehir Lisesi, Kırşehir
 1979-1983 İlk Öğretim, Hazar İlköğretim Okulu, Ankara

IV- Ödül ve Sertifikalar

14-15 Kasım 2008 TMI Eğitimcinin Eğitimi
 2007 Takdir ve Teşekkür, Koç Holding

2006	Kalite Ödülü, Koç Holding
28-29.04.2007	ISO 22000/HACCP Food Management System Assesment Awareness Training Course – TÜV Rheinland
28-29.04.2007	Meslekiçi Eğitim Programı Katılım Belgesi- Türk Veteriner Hekimleri Birliği
25-26.Mart.2005	Internal Auditor – TÜV Rheinland
12-13.03.2005	Meslekiçi Eğitim Programı Katılım Belgesi(ISO 9001 Bilinçlendirme Eğitimi) Türk Veteriner Hekimleri Birliği
14-15.02.2005	ISO9001:2000 Kalite Yönetim Sistemi Bilgilendirme Eğitimi - TÜV Rheinland
25-26.03.2005	Meslekiçi Eğitim Programı Katılım Belgesi- Türk Veteriner Hekimleri Birliği
24-26.06.2004	Gıda Hijyeni ve Gıda Güvenliği Katılım Belgesi- Türk Veteriner Hekimleri Birliği
24-25 Haziran 2004	HACCP Eğitimi- TÜV Rheinland