



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİABETES MELLİTUSLU HASTA TROMBOSİTLERİNDE
TYRO-3, AXL ve MER (TAM) RESEPTÖR SAYILARININ
BELİRLENMESİ**

Hüsniye DAĞDEVİREN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Fikriye URAS

İSTANBUL-2012

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()

Anabilim Dalı : Biyokimya (ECZ)

Tez Sahibi : Hüsniye DAĞDEVİREN

Tez Başlığı : Diabetes Mellituslu Hasta Trombositlerinde Tyro-3, Axl ve Mer (TAM) Reseptör Sayılarının Belirlenmesi

Sınav Yeri : M.Ü. Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

Sınav Tarihi : 03.02.2012

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Fikriye URAS

Kurumu

M.Ü Eczacılık Fakültesi Biyokimya
Anabilim Dalı

İmza

**Sınav Jüri Üyeleri (Unvan,
Adı, Soyadı)**

Yrd. Doç. Dr. Derya ÖZSAVCI

M.Ü Eczacılık Fakültesi Biyokimya
Anabilim Dalı

Doç. Dr. Azize ŞENER

M.Ü Eczacılık Fakültesi Biyokimya
Anabilim Dalı

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun 23/02/2012 tarih ve 20 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

F. Arıcıoğlu.

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU

Müdür Vekili

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

24.01.2012

Hüsniye DAĞDEVİREN

I. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım ilk günden itibaren tecrübe ve birikimleriyle bana yol gösteren, tezimin her basamağında benimle birebir ilgilenen ve hoş görüşünü hiç eksik etmeyen değerli hocam Prof. Dr. Fikriye URAS'a,

Yüksek lisans eğitimime olan katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi değerli hocalarıma,

Beraber çalışma fırsatı bulmaktan onur duyduğum, bilgi birikimleriyle bana destek olan Yrd. Doç. Dr. Gülderen YANIKKAYA DEMİREL'e,

Tez çalışmalarım boyunca bilgilerini benden esirgemeyen ve yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Derya ÖZSAVCI'ya, Dr. Özlem BİNGÖL ÖZAKPINAR'a, Dr. Özge ÇEVİK'e,

Yeditepe Üniversite Hastanesi Kök Hücre Laboratuvarında çalışmalarımızı sürdürmemizi sağlayan Prof. Dr. Sami KARTI'ya, hasta grubunun çalışmaya katılmasındaki emeğinden dolayı Yrd. Doç. Dr. Hasan AYDIN'a,

Deney süresi boyunca birlikte çalışmaktan zevk aldığım ve birçok konuda samimiyetleriyle her zaman yanımda olan Bio. F. Tuba AKDENİZ'e, Bio. Sema AKTAŞ'a, Gülçin KALAYCI KIRCI'ya, Özgür ALBAYRAK'a,

Tezimi yazarken bilgilerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen, her türlü sıkıntı ve mutluluğumda yanımda olan arkadaşım Zeynep KARACA'ya,

Tüm hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen, bana güvenerek her zaman yanımda olan ve beni hiç yalnız bırakmayan anneme, babama ve ablalarıma; sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hüsniye DAĞDEVİREN

II. İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR.....	iv
II. İÇİNDEKİLER.....	v
III. KISALTMALAR ve SİMGELER.....	viii
IV. ŞEKİL, RESİM ve TABLO LİSTESİ.....	x
i. Şekil listesi.....	x
ii. Tablo listesi.....	xii
1. ÖZET.....	13
2. SUMMARY.....	14
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	15
4. GENEL BİLGİ.....	17
4.1. Diabetes Mellitus.....	17
4.1.1. Sınıflandırma.....	18
4.1.1.1. Tip 1 diabetes mellitus.....	20
4.1.1.2. Tip 2 diabetes mellitus.....	20
4.2. Trombositler.....	22
4.2.1. Trombosit morfolojisi.....	22
4.2.2. Trombosit fonksiyonları.....	24
4.2.2.1. Trombosit adezyonu.....	24
4.2.2.2. Trombosit agregasyonu.....	25
4.2.2.3. Trombosit sekresyonu.....	26
4.3. K Vitamini.....	26
4.3.1. K vitaminine bağımlı pıhtılaşma proteinleri.....	29
4.3.1.1. Protrombin (faktör II).....	29
4.3.1.2. Faktör VII.....	30
4.3.1.3. Faktör IX.....	30
4.3.1.4. Faktör X.....	31
4.3.1.5. Protein C.....	31
4.3.1.6. Protein S.....	32

4.3.2. K vitaminine bağımlı diğer proteinler	33
4.3.2.1. Matriks gla proteini (MGP).....	33
4.3.2.2. Gla rich protein (GRP)	33
4.3.2.3. Gas6 (Growth Arrest-Specific Protein 6).....	34
4.4. TAM (Tyro-3, Axl, Mer) Reseptörleri	36
4.4.1. Tirozin kinaz reseptörleri (RTK)	36
4.4.2. Tyro3 (Sky) , Axl, Mer (TAM) reseptörlerinin yapısı.....	38
4.4.3. TAM reseptörlerinin hücre ve dokulardaki rolü.....	42
4.4.4. Axl reseptörü.....	45
4.4.5. Tyro3 (Sky) reseptörü.....	47
4.4.6. Mer reseptörü.....	47
4.5. Akan Hücre Ölçer (Flow Cytometry).....	49
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	51
5.1. Çalışma grupları	51
5.2. Kan Örnekleri.....	51
5.3. Kimyasal Maddeler.....	52
5.4. Cihaz ve Gereçler.....	52
5.5. Trombosit İzolasyonu.....	52
5.6. Akan hücre ölçer Yöntemiyle Reseptörlerin Analizi.....	53
5.7. Antikorların Optimizasyon ve Titrasyonu.....	56
5.8. QIFI Kitle Reseptör Sayısının Hesaplanması.....	56
5.9. İstatistiksel Analiz.....	58
6. BULGULAR.....	59
6.1. Trombosit Spesifikliğinin Belirlenmesi.....	59
6.2. Trombosit Yüzeyindeki TAM Reseptör Sayıları.....	59
6.3. Diyabetik Grupta Biyokimyasal Parametrelerle Reseptör Sayılarının.....	74
İlişkisi	

7. TARTIŞMA	76
8. KAYNAKLAR.....	83
9. ETİK KURUL ONAYI	100
10. ÖZGEÇMİŞ.....	101

III. KISALTMALAR ve SİMGELER

ADA: Amerikan Diyabet Birliği

ADP: Adenozin difosfat

AHÖ: Akan Hücre Ölçer

APC: Aktive protein C

ATP: Adenozin trifosfat

CRP: C-reaktif protein

DM: Diabetes mellitus

DSÖ: Dünya sağlık örgütü

EGF: Epidermal büyüme faktörü

ELISA: Enzim-bağlı immünsorbent ölçüm

ERBB: Epidermal büyüme faktör reseptörleri

ERK: Hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz

FBS: Fetal sığır serumu

FITC: Floresin izotiyosiyanat

FNIII: Fibronektin III

Gas6: "Growth arrest specific protein"- 6

GFR: Glomerül filtrasyon hızı

Gla: γ -karboksiglutamik asit

HbA1c: Hemoglobin A1c

HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein (High density lipoprotein)

IDDM: İnsüline bağımlı diabetes mellitus (Insulin Dependent Diabetes Mellitus)

IFNs: İnterferon tip 1

Ig: İmmunglobulin

KLL: Kronik lenfositik lösemili

KLM: Kronik miyeloid lösemi

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein (Low density lipoprotein)

LG: Laminin G

MGP: Matriks Gla Proteini

MS: Multipl skleroz

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NIDDM: İnsüline bağımlı olmayan diabetes mellitus (Noninsulin-dependent diyabetes mellitus)

PAR -1 reseptör: Proteaz-Aktivasyon Reseptör 1

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

PI3K: Fosfatidilinositol-3 hidroksi kinaz

PLG: Açlık kan şekeri

PRGP1: Prolince zengin Gla Proteini 1

PRGP2: Prolince zengin Gla Proteini 2

PRP: Trombositten zengin plazma

PS: Fosfatidilserine

PLG: Plazma glukoza

PTK: Protein Trozin Kinaz

RPE: Retinal pigment epitelyal

RTK: Tirozin Kinaz Reseptör

RT-PZR: Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SFLLRN: Trombin reseptör aktivasyon peptidi

SHBG: Steroid hormonu bağlayan globulin

TAM: Tyro-3 (Sky), Axl ve Mer

TLR: “Toll”-benzeri reseptör

TNF: Tümör nekroz faktör

TulpI: “Tubby-like protein” 1

TURDEP: Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi

VDKH: Vasküler düz kas hücreleri

IV. ŞEKİL ve TABLO LİSTESİ

i. Şekil listesi

Şekil 1. Trombosit hücre yapısı.

Şekil 2. Trombosit adezyonunun farklı aşamalarının elektron mikroskop görüntüleri.

a) aktive olmamış trombosit x 10,000; b) şekil olarak değişmiş ve psödopod oluşturmuş trombosit x 5,000; c) yayılmış trombosit x 3,000.

Şekil 3: K vitamininin Kimyasal yapısı: A) Filokinon; B) Menakinon (K2 vitamini); C) menadion (K3 vitamini).

Şekil 4. Protrombin molekülünün şematik olarak görüntülenmesi.

Şekil 5. Gas6 ve protein S'in yapısı.

Şekil 6. Sitokin reseptörleri. a) Tirozin kinaz reseptörleri (RTK); b) Tip I / Tip II reseptörler.

Şekil 7. a) TAM reseptör ailesinin ortak yapısı; b) Protein S ve Gas6'nın ortak bölgelerinin yapısı: N-terminal Gla bölgesi, dört epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri bölge ve iki laminin - G (LG) bölgesi.

Şekil 8. İki immunglobulin bölgesi aracılığıyla LG1 bölgelerine ligand bağlanır.

Şekil 9. K vitaminine bağımlı Protein S ve Gas6 ligandlarının Axl, Tyro3 (Sky) ve Mer reseptörlerine bağlanması.

Şekil 10. TAM ligand- reseptör özgülüğü.

Şekil 11. Akan hücre ölçer genel çalışma prensibi.

Şekil 12. Akan hücre ölçerde analize hazırlanan tüpler.

Şekil 13. 1.-4. tüplerde bulunan reaktifler.

Şekil 14. a) Hücre büyüklüğü ve granületesine göre seçilen trombosit kapısı, b) CD41 pozitifliği.

Şekil 15. Sağlıklı gruptan bir olguya ait aktive edilmemiş trombositlerdeki yüzey reseptör ölçümleri: a) Axl, b) Tyro3 (Sky), c) Mer.

Şekil 16. Sağlıklı gruptan bir olguya ait ADP ile aktive edilmiş trombositlerdeki yüzey reseptör ölçümleri: a) ADP kontrol (hiç antikor içermiyor), b) Axl, c) Tyro3 (Sky), d) Mer.

Şekil 17. Tip 2 diyabetik gruptan bir olguya ait aktive edilmemiş trombositlerdeki yüzey reseptör ölçümleri: a) Axl, b) Tyro3 (Sky), c) Mer.

Şekil 18. Tip 2 diyabetik gruptan bir olguya ait ADP ile aktive edilmiş trombositlerdeki yüzey reseptör ölçümleri: a) ADP kontrol (hiç antikor içermiyor), b) Ax1, c) Tyro3 (Sky), d) Mer.

Şekil 19. QIFI kit kurulum ve kalibrasyonu ile elde edilen grafik. (FS: “forward scatter”, SS: “side scatter”).

Şekil 20. Sağlıklı grupta aktive edilmemiş ve ADP ile aktive edilmiş trombosit yüzeyindeki TAM reseptör sayıları. (** p=0.004; p<0.05, *p=0.033; p<0.05)

Şekil 21. Kontrol grubunda aktivasyon öncesi ve sonrasında trombosit yüzey reseptör sayıları. Önce: Aktivasyon öncesi. Sonra: ADP ile aktivasyon sonrası.

Şekil 22. Tip 2 Diyabetik grupta aktive edilmemiş ve ADP ile aktive edilmiş trombosit yüzeyindeki TAM reseptör sayıları.

Şekil 23. Tip 2 diyabetik grupta aktivasyon öncesi ve sonrasında trombosit yüzey reseptör sayıları. Önce: Aktivasyon öncesi. Sonra: ADP ile aktivasyon sonrası

Şekil 24. Kontrol ve hasta grubunda Ax1 reseptör sayıları, a) aktivasyon öncesi, b) aktivasyon sonrası.

Şekil 25. Kontrol ve hasta grubunda Tyro3 (Sky) reseptör sayıları, a) aktivasyon öncesi, b) aktivasyon sonrası.

Şekil 26. Kontrol ve hasta grubunda Mer reseptör sayıları, a) aktivasyon öncesi, b) aktivasyon sonrası.

ii. Tablo listesi

Tablo 1: 2011 ADA Diyabet tanı kriterleri.

Tablo 2. Diabetes Mellitusun Etiyolojik Sınıflaması.

Tablo 3. K vitaminine bağımlı proteinler.

Tablo 4. 1- 10 tüplerde bulunan antikorların gösterimi.

Tablo 5. Kontrol grubuna ait AHÖ'den elde edilen ortalama kanal sayısı (X mean)

Tablo 6. Diyabetik gruba ait AHÖ'den elde edilen ortalama kanal sayısı (X mean)

Tablo 7. Kontrol grup için hesaplanan trombosit yüzey reseptör sayıları.

Tablo 8. Diyabetik grubun yüzey reseptör sayıları.

Tablo 9. Diyabetik grubun cinsiyete göre istatistiksel karşılaştırılması

Tablo 10. Kontrol ve hasta grubuna ait trombosit yüzey reseptör sayılarının istatistiksel olarak karşılaştırılması.

Tablo 11. Diyabetik gruba ait biyokimyasal değerler.

Tablo 12. Diyabetik grubtaki reseptörlerle CRP ve PLG arasındaki korelasyon.

1. ÖZET

İmmünite/enflamasyonun düzenlenmesinde Gas6'nın rolü önem kazanmaktadır. Bu sistemlerin tip-2-diyabet patogeneziyle ilişkisi vardır. Gas6/TAM yolağının diyabet ve komplikasyonlarıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu tezin amacı, tip-2-diyabetli hastaların trombositlerinde TAM [Tyro3 (Sky), Axl, Mer] yüzey reseptör sayılarını belirlemek ve kontrol-grupla karşılaştırmaktır. Akan hücre ölçer yöntemiyle belirlenen reseptör sayıları: Sağlıklı grupta (n=21) Tyro3 (Sky) =9,308±4,261, Axl için Median=8,378 (25. persantil=6,145-75. persantil=10,624), Mer için Median=8,539 (6,339-9,737); Diyabetik grupta (n=24) Tyro3 (Sky) için Median=6,312 (5,251-9,983), Axl için Median=6,902 (6,051-13,982), Mer için Median=7,338 (5,708-8,908) olarak bulundu. Sağlıklı grupta ADP-aktivasyonu Tyro3 (Sky) ve Mer sayıları artarken (p=0.004 ve p=0.033), Axl'de anlamlı bir değişim görülmedi (p=0.243). ADP aktivasyonu, diyabetik grupta reseptör sayılarında anlamlı bir değişime yol açmadı (p>0.05), (p=0.935, Axl; p=0.149, Sky; p=0.088, Mer). Diyabetik ve kontrol grubun ADP-aktivasyonu öncesi ve sonrasında trombosit reseptör sayıları birbiriyle karşılaştırıldığında, üç tür reseptörde de anlamlı farkın olmadığı görüldü (p>0.05). Diyabetik grubun bazı biyokimyasal test sonuçlarıyla, TAM reseptör sayıları arasında korelasyon saptandı: Serum CRP seviyesiyle, aktivasyon sonrasındaki Mer reseptör sayısı arasında negatif bir korelasyon (r=-0.518); serum CRP seviyesiyle, aktivasyon öncesi Tyro3 (Sky) reseptör sayısı arasında negatif bir korelasyon (r=-0.654); açlık glukozuyla, aktivasyon sonrası Axl reseptör sayısı arasında pozitif bir korelasyon bulundu (r=0.855). Trombositler endotel hücreler, lökositler ve eritrositlerle sürekli etkileşim halindedir. Bu yüzden onlardaki değişiklikler, tüm damar sistemini etkileyebilir. Gas6/TAM yolağının, diabetin mikro- ve makro-anjiopati komplikasyonlarında rolü olabilir. Kapsamlı temel bilim ve klinik araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Gas6, TAM reseptörleri, tip-2 diabet, trombosit

2. SUMMARY

Quantification of TAM Receptors on Platelet Surface in Patients with Diabetes Mellitus

Several reports revealed that the Gas6 has been involved in the regulation of immunity/inflammation, which is related to the pathogenesis of type 2 diabetes. It seems like that Gas6/TAM system represents an important mechanism for diabetes mellitus and its complications. The objective of this thesis is quantification of TAM receptors (Tyro3, Axl, Mer) on platelet surface in patients with type 2 diabetes and compare the results with the control. TAM receptors were quantified by flow cytometry. The following results were found in resting platelets: Tyro3 (Sky) = $9,308 \pm 4,261$, Axl Median = 8,378 (25. percentiles = 6,145-75. percentiles = 10,624), Mer Median = 8,539 (6,339-9,737) in healthy controls (n=21); Tyro3 (Sky) Median = 6,312 (5,251-9,983), Axl Median = 6,902 (6,051-13,982), Mer Median = 7,338 (5,708-8,908) in diabetic group (n=24). In the control group, the receptors Tyro3 (Sky) and Mer increased significantly after activation of platelets with ADP (p=0.004 and p=0.033, respectively) but Axl (p=0.243). In diabetic group, activation of platelets with ADP did not cause any significant increase in all three type of receptors (p>0.05), (p=0.935, Axl; p=0.149, Sky; p=0.088, Mer). When diabetic group compared with the control in respect to Tyro3 (Sky), Axl and Mer, there were no significant difference for resting platelets but also after activation with ADP (p>0.05). In diabetic patients, an inverse correlation was observed between serum CRP and the receptor Mer on activated platelets (r=-0.518), and also Tyro3 (Sky) (r=-0.654) on resting platelets. A correlation was observed between fasting plasma levels and the receptor Axl on activated platelets from diabetic patients (r=0.855). There are interactions among platelets, endothelial cells, erythrocytes, and leukocytes. Any problem with platelets may affect the homeostasis of the vessel system. Gas6/TAM signaling may play a potential role in the pathogenesis of micro- and macro-complications of type 2 diabetes.

Key words: Gas6, platelet, TAM receptors, type2-diabetes

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabetli hastaların mikrovasküler ve makrovasküler dolaşımı normal değildir ve bu komplikasyonlar trombosit fonksiyon bozukluğuyla ilişkilidir. Mikrovasküler komplikasyonlar; retinopati, nefropati ve nöropati olmak üzere üç ana başlık altında toplanabilir. Makrovasküler komplikasyonlar ise koroner arter hastalığı, serebrovasküler olaylar ve periferik vasküler hastalıklar olup, daha çok lipid metabolizması ve pıhtılaşma mekanizmasındaki bozukluklar sonucunda meydana gelmektedirler.

Mikro ve makro anjiopati gibi komplikasyonlar sebebiyle diyabetiklerde trombotik ve aterosklerotik bozuklukların görülme sıklığı çok yüksektir. Endotel hücre hasarı, fibrinolitik sistemde bozulma, eritrosit deformabilite özelliğinin azalması, trombosit agregasyonu ve aktivasyonunun artması, tromboz sürecine katkıda bulunan olaylardır. Diyabetik hastalara ait trombositlerde, spontan ve stimulan ajanlar varlığında adezyon ve agregasyon artmıştır. Diabetes mellituslu hastaların dolaşımında aktive olmuş şekilde dolaşan trombosit sayısının normalden fazla olduğu ve bu nedenle tromboza daha fazla eğilimli olduğu öne sürülmektedir. Bu durumun anjiopati gelişmesinde rol oynadığı, ileri sürülmüştür.

Gas6 (Growth arrest specific-6) proteini, K-vitaminine bağımlı protein ailesinin bir üyesidir ve bir reseptör ligandır. Tirozin kinaz reseptör ailesi üyelerinden Ty-3 (Sky), Axl ve Mer' in (TAM) ligandır. K vitaminine bağımlı diğer bir protein olan protein S ile büyük bir yapısal benzerliğe sahip olmasına rağmen, Gas6 antikoagülan özellik göstermez. TAM reseptörlerinin yokluğunda, farelerde tromboz gelişiminin inhibe edildiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiş; bu durum trombosit agregasyon ve sekresyon bozukluğu ile ilişkilendirilmiştir. TAM reseptörlerinin pıhtı stabilizasyonu ile ilgili olabileceği hipotezi ortaya atılmıştır. Gas6 reseptörlerinin hangi tip hücrelerde ne miktarda olduğuna dair bilgiler yetersizdir. Fizyolojik etki mekanizması henüz aydınlatılmamıştır.

Enflamasyon, koagülopati, kanser, otoimmün hastalıklar, diyabetik vasküler ve renal hastalıklarla Gas6 ve TAM reseptörlerinin ilişkili olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan bazı deneysel hayvan ve temel bilim çalışmaları, diyabetik böbrek ve damar hastalıklarının patogenezinde Gas6 ve reseptörlerinin rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Henüz Gas6 ve TAM reseptörlerinin klinik önemiyle ilgili bilgiler çok azdır. Ayrıca diyabetik hastalara ait çeşitli biyokimyasal parametrelerin, bu sistemle ilişkisi olup olmadığı bilinmemektedir. Gas6 geni susturulmuş farelerde diyabetik nefropati gelişmesinin daha az olduğu görülmüştür. Ayrıca uzak doğu ülkelerinde uzun süredir nefropati tedavisinde kumadin kullanılmıştır.

Bütün bu bilgiler Gas6/TAM sistemi diyabet ve komplikasyonlarıyla oranında bir ilişki olabileceğine işaret etmektedir. Bu tezin amacı, diabetes mellituslu hastaların trombosit yüzeyindeki TAM reseptörlerinin her birinin (Tyro-3, Axl ve Mer) sayısını ölçmektir. Bu amaçla, aktive olmamış ve aktive edilmiş trombosit yüzeyindeki TAM reseptörleri akım sitometri yöntemiyle kantitatif olarak ölçülmesi planlanmıştır. Normal sağlıklı kişiler ve diyabetik olgulardan alınan kan örneklerinde trombosit izolasyonunu takiben, her bir reseptöre özgün antikorlar kullanılarak akan hücre ölçerle reseptör sayıları belirlenecektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM), insülin salgısı, insülin etkisi veya her ikisindeki bozukluklardan kaynaklanan kronik hiperglisemiyle karakterize bir metabolik hastalıktır. Diyabetteki karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması bozukluklarının temeli; insülinin hedef hücrelerdeki yetersiz etkisine dayanır (1). Pankreas insülin sekresyonundaki yetersizlik, insülin etkisizliği veya insülin molekülündeki yapısal bozukluklar bu hastalığın temelini oluşturmaktadır. Hastalığın seyri sırasında mikrovasküler, makrovasküler ve nöropatik komplikasyonlar gelişebilmektedir.

Bilinen en eski hastalıklardan olan DM, en büyük halk sağlığı sorunlarından biridir. İlk olarak Kapadokyalı Arateus, çok idrar yapan ve kilo kaybeden insanları sifonlu fiçiya benzeterek hastalığa “Diabetes” adını vermiş ve klinik bulgularla tanı koymuştur. 7. yüzyılda Mısırlı, Hintli ve Çinlilerce idrarın şekerli olduğu tadılmış ve “Lemadhumeha” ballı idrar tanımlaması yapılmıştır. 11. yüzyılda İbn-i Sina, kaynatılan idrardaki tortuda bal tadını belirlemiştir. Daha sonra 16. yüzyılda Thomas Willi idrarda şeker tayini yapmış ve Claude Bernard kan şekeri ölçümünü gerçekleştirmiştir. 1800’lü yıllarda Fehling idrarda kantitatif glukoz metodunu geliştirmiş ve aseton tayini yapılmaya başlanmıştır. 1900’lü yıllarda ise hastalığın nedeniyle ilgili pek çok bilgi edinilmiştir. Halen immunolojik ve genetik çalışmalarla yeni bilgiler kazanılırken, hastalığın önlenmesi yönündeki çalışmalar devam etmektedir. Yaygın ve sık görülen endokrin ve metabolik bir hastalık olan DM komplikasyonları, gelişmiş toplumlarda önde gelen ölüm nedenlerinden biridir (2). Henüz bu komplikasyonların moleküler mekanizması bilinmemektedir.

Türkiye’ye baktığımızda, Eylül 1997-Mart 1998 tarihleri arasında 24,788 kişi gerçekleştirilen TURDEP (Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi) çalışmasının sonuçlarına göre:

- Ülkemizde tip 2 diyabet prevalansı %7.2, bozulmuş glukoz toleransı (IGT) prevalansı ise % 6.7 olarak bulunmuştur.
- Bu oranlara dayanarak 2000 yılı nüfus sayımına göre ülkemizde 2.6 milyonun üzerinde tip 2 diyabetli ve 1.8 milyon civarında IGT’li bireyin yaşadığı hesaplanmıştır.

- Ülkemizde yaşayan diyabetlilerin %32'sinin hastalığının farkında olmadıkları da ortaya çıkmıştır (3).

4.1.1. Sınıflandırma

İlk kez 1979'da Amerika Birleşik Devletleri'nde Ulusal Diyabet Veri Grubu (National Diabetes Data Group) tarafından DM'un sınıflaması yapıldı ve daha sonra da 1985 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından diyabetin geniş bir sınıflandırılması yapıldı. Juvenil DM yerine bu duruma daha uygun olan "insüline bağımlı diabetes mellitus" (Insulin Dependent Diabetes Mellitus, IDDM) veya tip 1 DM tanımlaması kullanılmaya başlandı. Daha sıklıkla erişkin yaşta ortaya çıkan diyabet "insüline bağımlı olmayan diabetes mellitus" (Noninsulin Dependent Diabetes Mellitus, NIDDM) veya tip 2 DM olarak isimlendirildi. İnsülin direncinin ağırlıklı olarak rol aldığı tip 2 DM, sıklıkla erişkin yaşlarda ortaya çıkmasına rağmen, son yıllarda görülen dengesiz beslenme ve obeziteyle birlikte, çocuklarda giderek artan oranlarda görülmeye başlamıştır (4, 5, 6).

Amerikan Diyabet Birliği (ADA) tarafından 1997 yılında önerilen yeni sınıflama, insüline bağımlı olan ve insüline bağımlı olmayan diyabet yerine tip 1 ve tip 2 diyabet terminolojisini ortaya atmıştır (7, 8, 9). 2007 yılında gözden geçirilen sınıflandırmada, insüline bağımlı ve insüline bağımlı olmayan diyabet terimlerini kaldırmış ve sırasıyla tip 1 ve tip 2 diyabet isimleri verilmiştir. Diğer bir değişiklik anormal glukoz toleransı ve potansiyel glukoz tolerans anormalliği kategorilerinin kaldırılmasıdır (10).

2011 ADA kriterlerine göre diyabet tanısı, açlıkta en az 2 defa ardışık olarak ölçülen venöz plazma örneğindeki glukoz düzeyinin >126 mg/dL olması ile konur. Açlık veya tokluk durumuna bakılmaksızın günün herhangi bir zamanında ölçülen venöz plazma örneğinde glukoz düzeyinin >200 mg/dL olması ve beraberinde poliüri, polidipsi ve açıklanamayan kilo kaybı gibi diyabet semptomlarının varlığı ile de diyabet tanısı konulabilir (11). Artık Hemoglobin A1c'nin (HbA1C)%6,5 den yüksek olması da diyabet tanı kriterleri arasında yer almıştır. HbA1C'nin NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program) onaylı ve DCCT (The Diabetes Control and Complications Trial) metoduna göre standardize edilmiş bir yöntem kullanılarak ölçülmüş olması gerekmektedir.

Tablo 1: 2011 ADA Diyabet tanı kriterleri (11).

HbA1C \geq %6,5	NGSP onaylı ve DCCT metoduna göre standardize edilmiş bir yöntem kullanılarak ölçülmelidir.
Veya	
Açlık glukozu \geq 126 mg/dl (7,0 mmol/l)	Açlık, test öncesinde en az 8 saat hiç kalori alınmaması olarak tanımlanmıştır.
Veya	
OGTT de 2-saatlik plazma glukozu \geq 200 mg/dl (11,1 mmol/l)	Test, suda çözülmüş 75 g anhidr glukoz eşdeğerinde bir glukoz yüklemesi kullanılarak WHO tarafından tarif edildiği şekilde uygulanmalıdır.
Veya	
Rastgele plazma glukozu \geq 200 mg/dl (11,1 mmol/l)	Hiperglisemi veya hiperglisemik krizin klasik semptomlarına sahip bir hasta olması.

Tablo 2. Diabetes Mellitusun Etiyolojik Sınıflaması (10).

I-Tip 1 diyabet (B hücre yıkımı, genellikle mutlak insülin eksikliğine yol açan) A- immün aracı B- idiyopatik
II-Tip 2 diyabet (Aşırı insülin direnciyle beraber rölatif insülin eksikliği veya ağır insülin salgı bozukluğuyla beraber insülin direnci)
III-Diğer spesifik tipler A- B hücre fonksiyonunda genetik defekt 1-Kromozom 12, HNF-1 (MODY 3) 2-Kromozom 7, glukokinaz (MODY 2) 3-Kromozom 20, HNF-4 (MODY 1) 4-Kromozom 13, insülin promotör faktör-1 (IPF-1;MODY 4) 5-Kromozom 17, HNF-1 (MODY 5) 6-Kromozom 2, NeuroD1 (MODY6) 7-Mitokondriyal DNA B- İnsülin etkisinde genetik defekt 1-Tip A insülin rezistansı 2-Leprechaunizm 3-Rabson-Mendenhall sendromu 4-Lipoatrofik diyabet

C- Ekzokrin pankreas hastalıkları	
1-Pankreatit	2-Travma/pankreatektomi
3-Neoplazm	4-Kistik fibrosis
5-Hemakromatozis	6-Fibrokalküloz pankreas
D- Endokrinopati	
1-Akromegali	2-Cushing sendromu
3-Glukagonoma	4-Feokromasitoma
5-Hipertiroidizm	6-Somatostatinoma
7-Aldesteronoma	
E-İlaç yada kimyasallara bağlı	
1-Vacor	2-Pentamidin
3-Nikotik asit	4-Glukokortikoidler
5-Tiroid hormonu	6-Diazoksit
7-B-adrenerjik agonistler	8-Tiazidler
9-Dilantin	10- Interferon
F- Enfeksiyonlar	
1-Konjenital rubella	2-Sitomegalovirus
G-İmmun aracılı diyabetin nadir formları	
1-“Stiff-man” sendromu	2-Anti-insülin reseptör antikolları
H- Diyabetle bazen birlikteliği olan genetik sendromlar	
1-Down sendromu	2-Klinefelter sendromu
3-Turner sendromu	4-Wolfram sendromu
5-Friedreich ataksisi	6-Huntington koresi
7-Laurence-Moon-Biedl sendromu	8-Miyotonik distrofi
9- Porfira	10-Prader-Willi sendromu
IV-Gestasyonel diyabet mellitus (GDM)	

4.1.1.1. Tip 1 diabetes mellitus

Tip 1 DM daha çok çocuklarda ve genç erişkinlerde görülmektedir. Pankreasta bulunan ve insülin üreten beta hücrelerinin idiyopatik olarak otoimmün bir süreç sonunda zedelenmesiyle oluşmaktadır. Olgularda mutlak ya da göreceli bir insülin yetersizliği olduğundan, insülin hormonunun ömür boyu dışarıdan alınma zorunluğu vardır (12, 13, 14).

4.1.1.2. Tip 2 diabetes mellitus

Tip 2 diyabetes mellitus gelişiminde;

- Pankreas β hücresinin fonksiyon bozukluğu,
- İnsülin direnci, insülin duyarlılığında azalma, dokulardaki insülin reseptörlerinde direnç sonucunda glukoz metabolizma bozukluğu,

- Hepatik glukoz üretim artışı

gibi üç ana metabolik bozukluk sorumlu tutulmaktadır (15, 16, 17, 18).

İnsülin direnci bir multisistem hastalık olup genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle obezite, fiziksel ve ruhsal stres, gebelik, 40 yaş üzerinde olma ve ilaç tedavisi hastalığın oluşumunda etkili olan risk etmenleri arasındadır (15, 16, 19). İnsülin üretimi, insülinin reseptöre bağlanması ve intrasellüler sinyal iletimini kapsayan insülin sinyal yolağı basamaklarından herhangi birisinde meydana gelen hücresel anormallikler, insülin direncine yol açabilir. Ayrıca bozulmuş insülin fonksiyonu iskelet kası, yağ dokusu ve karaciğer gibi pek çok dokuda da kendini belli eder (20).

Tip 2 diyabet hastalarında yüksek tansiyon ve protrombotik olaylar en belirgin sorundur. Bu da koagülasyon sisteminin aktivasyonunda artışa sebep olur. Bu yüzden trombosit adezyonu ve agresyonunda artış gözlenmektedir (21, 22, 23). Protrombotik olaylar, yakın zamanda metabolik sendrom olarak kabul edilmiştir. Metabolik sendromlu insanlarda koagülasyon faktör modelleri, tromboza teşvik veya trombolizi geciktirici olarak belirtilmiştir. Protrombotik durumda, fibrinojen seviyeleri artmış; plazminojen aktivatör inhibitörü artmış ve trombosit fonksiyonları farklı anormallikler göstermektedir (19). Bu artan prokoagülan aktivitenin, nefropati ve retinopatinin ortaya çıkmasına katkıda bulunduğu sanılmaktadır (26). Diyabetli hastaların mikrovasküler ve makrovasküler dolaşımı normal değildir ve bu komplikasyonlar trombosit fonksiyon bozukluğuyla ilişkilidir. Mikrovasküler komplikasyonlar; retinopati, nefropati ve nöropati olmak üzere üç ana başlık altında toplanabilir (25, 26). Makrovasküler komplikasyonlar ise koroner arter hastalığı, serebrovasküler olaylar ve periferik vasküler hastalıklar olup, daha çok lipid metabolizması ve pıhtılaşma mekanizmasındaki bozukluklar sonucunda meydana gelmektedirler (25).

Tip 2 diyabetin morbidite ve mortalitesinde, hemostatik sistemin önemli bir rol oynadığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (27). Fibrin, pıhtı oluşumuna ve trombosit agregasyonuna katkıda bulunmakta ve fibrinojen seviyeleri diyabette artmaktadır. Fibrinolitik aktivitenin de tip 2 diyabetlilerde düşük olduğu belirtilmiştir. Bundan dolayı plazminojen aktivatör inhibitör seviyeleri artmış, plazminojenden plazmin

oluşumu inhibe edilmiştir (19). Komplikasyonlarda damar içinde trombin üretimi artar ve fibrinolitik potansiyel azalır (28, 29).

Diyabetik hastaların kan dolaşımındaki aktive olmuş şekilde dolaşan trombositlerin, pıhtı oluşumu ve anjiopatiye neden olduğu öne sürülmektedir. Endotel hücre hasarı, fibrinolitik sistemde bozulma, eritrosit deformabilite özelliğinin azalması, trombosit agregasyonu ve aktivasyonunun artması, tromboz sürecine katkıda bulunan olaylardır. Diyabetlilerden elde edilen trombositlerde, spontan ve stimulan ajanlar varlığında adezyon ve agregasyonda artış görülmüştür (30, 31). Bu nedenle diyabetli hastaların damar hastalıklarının gelişmesinde trombositlerin önemli bir rolü vardır (19).

4.2. Trombositler

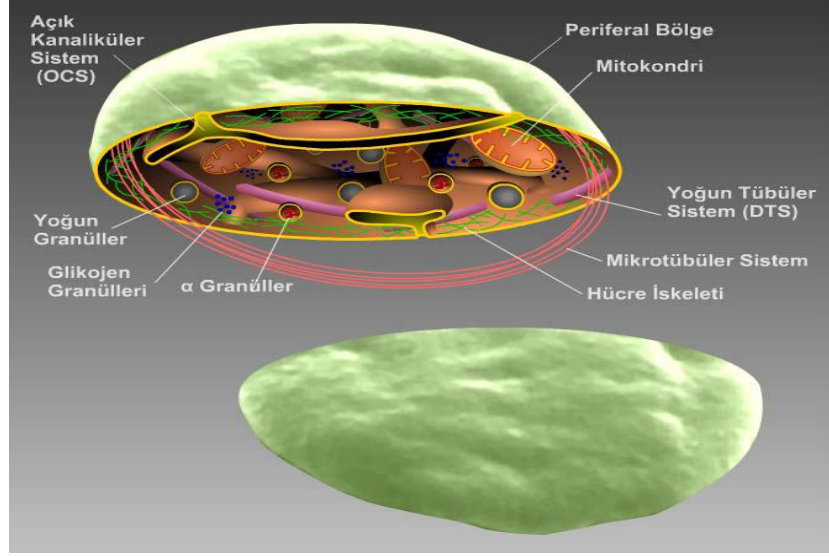
4.2.1. Trombosit morfolojisi

Trombositler, kemik iliğindeki megakaryositlerden üretilen çekirdeksiz hücrelerdir (32). İlk kez 1860'da Zimmerman, sonra da 1865'de Manschultz tarafından tanımlanmıştır. Kan pıhtılaşmasındaki rolü ise 1878'de Zimmerman ve Haryan tarafından ortaya konmuştur. İlk önceleri hücre parçaları olarak tanımlanmasına rağmen daha sonra aktif hücreler olduğu ve megakaryositler tarafından yapıldığı ilk kez 1882'de Bizzazereo tarafından belirtilmiştir (33, 34).

Trombositler $7\pm 4.8 \mu\text{m}^3$ hacindedir. Pıhtı oluşumuna katılıp tüketilmediği zaman; ortalama yaşam süresi 7-10 gündür. Bu hücreler protein ve yağ asitleri sentezleme yeteneğine sahiptir. Adezyon (yapışma), sekresyon (salgılama) ve agregasyon (kümeleşme) fonksiyonlarına sahiptir (35). Önceleri trombositlerin primer olarak sadece pıhtı oluşumuyla ilgili olduğu düşünülüyordu. Ancak şimdi hemostaz reaksiyonlarında daha kritik rol oynadıklarınadair deliller giderek güçlenmektedir (36). Trombositler, pürüzlü yüzeylere temas ettiklerinde psödopod oluşturur, üst üste birikebilir ve içeriklerini ortama salıverirler. Aktivasyon sırasında yapı ve görünümünü değiştirirler. Elektron mikroskopuyla yapılan incelemelerde, aktive olmamış trombositlerin genellikle disk şeklinde olduğu görülebilir (Şekil 2a).

Trombosit yüzeyine plazmada bulunan bazı proteinler de bağlanabilir. Bunlardan bazıları koagülasyon faktörleri olan fibrinojen, F VII ve F IX'dur. Ayrıca trombosit yüzeyinde glikoprotein yapısındaki reseptörler, lipoproteinler ve

fosfolipidler bulunur (36, 37). Trombositlerin sitoplazmik matriksi bir membranla çevrilidir ve çeşitli organellere sahiptir. Trombositler mitokondri, alfa granül, yoğun granül, vakuol, vezikül, mikrotübül, mikrofilament, glikojen ve lipid inklüzyonları, endoplazmik retikulum, golgi kompleksi ve ribozomlar içerirler (38) (Şekil 1).



Şekil 1. Trombosit hücre yapısı (www.platelet-research.org. Erişim tarihi: 2009).

Elektron mikroskopunda sitoplazma 3 bölge olarak görülür (Şekil 1).

1. Periferik bölge: Bu bölge, dış kabuk, unit membran ve submembran alanını kapsar. Hücrede uyarana yanıt vermek için gerekli kimyasal etkileşimler ve hücre-hücre adezyonu için uygun ortam oluşturur (39, 40, 41).

2. Sol jel bölgesi (Hyalomer): Bu bölgede mikrotübüller, mikrofilamanlar, yoğun tübüler sistem bulunur. Mikrotübül ve mikrofilamanların yer aldığı fibröz elemanlardan oluşan, organelden fakir, ancak bir iki granül içeren sol-jel bölgesi, “hyaloplazma” adını da alır (42, 43, 44).

3. Organel bölgesi (Granülomer): Tüm trombosit organelleri megakaryositlerdeki ana yapılarını korur (36). Trombositlerde iki tip granülün varlığı bilinmektedir: Bunlar yoğun granüller ve α -granüllerdir. Yoğun granüllerde başlıca serotonin, ADP (Adenin difosfat) ve ATP (Adenin trifosfat) depolanır. En çok α -granüller vardır ve çeşitli lizozomal enzimleri içerir. Trombosit α - granülleri megakaryositlerdekinden daha büyük olabilir (42, 45).

Trombositlerin, hemostaz dışında organizma için yararlı diğer bazı etkileri olabileceği de düşünülmektedir. Virüs ile enfekte hücrelerin ve bakteriler gibi kana geçen yabancı organizmaların çevresinin kuşatılarak toksik etkilerinin engellenmesi ve fagositoz için elverişli hale getirilmesi buna örnek olarak verilebilir. Diğer taraftan trombosit agregasyonu bazı koşullarda organizma için zararlı da olabilir. Örneğin, damar içinde kan akımını engelleyen pıhtı oluşumu tıkanmış damarların beslediği dokularda ölüme yol açabilir (46).

4.2.2. Trombosit fonksiyonları

Trombositler, hemostaz ve tromboz sürecinde temel rol oynar: Kanın normal damar bütünlüğünü sağlayarak birbirlerini ve diğer hücreleri etkilemeden kan damarları içinde dolaşırlar ve hasar durumunda kanamayı önleyerek katkıda bulunurlar. Ek olarak, trombositler doğal immün savunma ve inflamatuvar cevabın düzenlenmesi için özelleşmiş hücrelerdir.

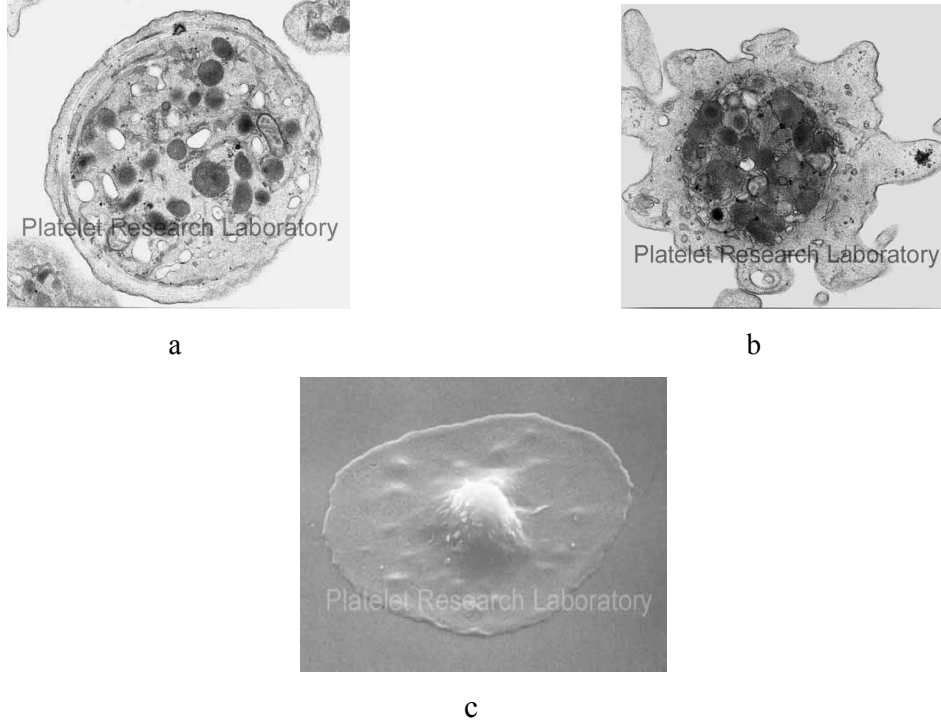
Damar duvarı hasarlandığında, trombositler açığa çıkan subendotelial matrikse toplanır; oluşturulan hemostatik tıkaçla, damar duvarındaki sızıntı engellenir (47, 48). Trombositler hemostatik sürece, adezyon (yapışma) fonksiyonuyla katılır.

4.2.2.1. Trombosit adezyonu

Dinlenme durumundaki trombositler, diskoid yapıdadır ve düzgün bir yüzeye sahiptir. Trombositlerin aktivasyonuna yol açan maddeler, agonist olarak adlandırılır. Her bir agonist, trombositteki spesifik reseptörlere tutunarak trombosit içindeki seri reaksiyonları tetikler.

Endotelde meydana gelen hasar bölgesinde hemostatik tıkaç oluşturmak için trombositler iki spesifik proteinle etkileşerek subendotelial materyale tutunur: Kollajen ve vonWillebrand faktör (vWF) (49). Trombosit yüzey reseptörü GPIb (glikoprotein Ib) ile subendoteldeki komponentler (genellikle kollajen lifler) arasında bağlantı (köprü) oluşur. Yani trombosit subendotele bağlanır. Kollajen trombositini uyarak trombosit aktivasyonunu başlatır (50). Trombosit adezyonu iki fazda gerçekleşir: Başlangıçtaki kontakt fazda trombosit damar duvarına küçük bir membran parçası veya psödopodlar yoluyla bağlanır. Bunu takip eden yayılma

fazında ise trombosit, subendotelyal dokuya geniş bir membran alanıyla daha sıkı bir şekilde bağlanır (51).



Şekil 2. Trombosit adezyonunun farklı aşamalarının elektron mikroskop görüntüleri. a) aktive olmamış trombosit x 10,000; b) şekil olarak değişmiş ve psödopod oluşturmuş trombosit x 5,000; c) yayılmış trombosit x 3,000 (www.platelet-research.org. Erişim tarihi: 22 Şubat).

4.2.2.2. Trombosit agregasyonu

Agonistler, kalsiyum ve fibrinojen gereklidir. (Az miktarda fibrinojen) Uyarılmamış trombositlere trombosit agregasyonunda bağlanabilir. Ancak agonistler eklendiğinde, zamana bağlı şekilde bağlanmada artış gözlenir. Eğer sistem kalsiyum yönünden fakirse, uyarılmış trombositlere fibrinojen bağlanmaz. Sonuçta agonistlerin rolü fibrinojen reseptörlerini uyarmaktır. Bu olaylar serisi, trombosit agregasyonun fibrinojen-bağımlı yolunu tanımlamaktadır. Trombosit agonistlerinin tetiklediği ortak olay, reseptörlere bağlanmayı sağlamaktadır (49).

Araşidonik asitten sentezlenen Tromboksan A2 (TxA2), yoğun granüllerden sekrete edilen ADP ve Ca^{+2} ile alfa granüllerden sekrete edilen adeziv proteinler, geri dönüşümsüz trombosit agregatlarının oluşumuna neden olur. Fibrinojen, fibronektin,

trombospondin ve vonWillebrand faktörün (vWF), trombosit yüzeyinde yüksek konsantrasyonlardaki varlığı, alfa granüllerin sekresyonunu uyarır (33, 50, 51).

4.2.2.3. Trombosit sekresyonu

Trombositin bir diğer önemli fonksiyonu, çeşitli maddeleri ortama salıvermesidir yani sekresyon özelliğidir. Bu maddeler pıhtı yapısını değiştirebilir; koagülasyonu regüle eder; hücre adezyonu, damar duvarındaki hücre gelişiminin düzenlenmesine katkıda bulunur. α granüller, yoğun granüller ve lizozomlardan oluşan sekretuvar organellerin içeriklerini sekrete etmesi, hasarlı damar bölgesindeki diğer hücreleri aktive eder ve hücresel adezyonu artırır (52, 53). Bu maddeler ya trombositlerde önceden oluşmuş depo granüllerden ya da membran fosfolipidlerinden açığa çıkarak sekrete edilir (49). Trombosit kümeleşmesi sırasında granüllerin merkezde toplanması, sekresyon yanıtının gerçekleşebilmesi için gereklidir (50).

Trombositler, hücre mitozu, kollajen yapımının artması, hasarlı bölgeye diğer hücrelerin göçü, damarsal iç büyümenin başlatılması ve hücre farklılaşmasını sağlayan önemli büyüme faktörlerine sahiptir. Trombosit konsantrasyonunun artmasıyla, yara yerinin hızlı ve daha kolay iyileşmesi sağlanır. Bu şekilde trombositler pıhtı oluşumunda, sonrasında, yara iyileşmesinde önemli rol oynar ve büyüme faktörleri salgılayarak yara iyileşmesini başlatır ve destekler (54). K vitaminine bağımlı pıhtılaşma faktörlerinin, aktive olmuş trombosit yüzeyine bağlanmasıyla pıhtılaşma reaksiyonlarının gerçekleştiği bilinmektedir.

4.3. K Vitamini

K vitamini biyokimyacı Henrik Von Dam tarafından 1929'da tesadüf sonucu bulunmuştur. Yağdan fakir diyetle beslenen tavuklarda deri altı ve kas içi kanamalarının, daha önce bilinmeyen yağda erir bir madde eksikliği yüzünden olabileceğini ileri sürdü. Yeşil yapraklı bitkiler ve tohumların, kanamayı önlediğini gözlemledi ve eksik olan bu vitamini "Koagulationsvitamin" kelimesinin baş harfini isim olarak verdi (55).

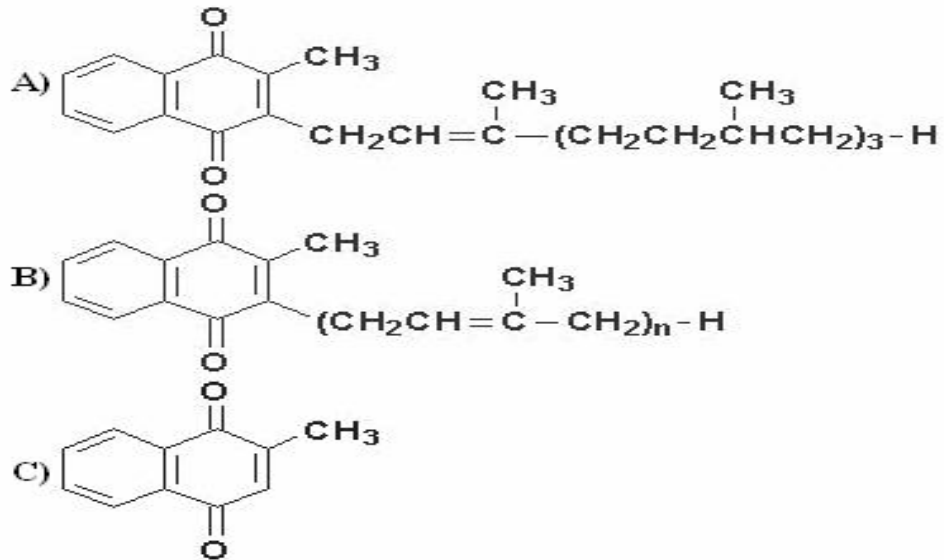
K vitamini, biyokimyasal yapısı 2-Metil-1,4-naftokinon grubu içeren ve poli izoprenoid bir zincirle substitüe edilmiş olan çeşitli naftokinon türevleridir (56). K vitamini üç formda bulunur, bunlardan ikisi doğal birisi sentetiktir.

1. K1 vitamini (fitonadion, fillokinon) 2-Metil-3-fetil-1,4-naftokinon kimyasal yapısına sahip olan, öncelikle yiyeceklerden alınan ve alındığı formuyla dolaşıma katılan K vitamin türüdür (Şekil 3A) (57).

2. K2 vitamini (menakinon) naftokinonun üçüncü pozisyonunda multi izopren üniteleriyle birçok vitaminleri kapsar. Bu gruptaki vitaminler MK-n olarak ifade edilir; (n) alifatik yan zincirdeki izoprenoid kalıntıların sayısını belirtir. 13 grup idantifiye edilmiştir. In vitro en etkin şekli MK-4 olarak bildirilmiştir. Fermente edilmiş yiyeceklerde ve bağırsaklarda bulunur. Bağırsak mikroflorası tarafından sentez edilmektedir (Şekil 3B) (58, 59, 60, 61, 62, 63, 64).

3. K3 vitamini (menadion): 2-Metil-1,4-naftokinon yağda çözünen sentetik olarak üretilen en basit yapı K vitamini türevidir. Bu vitaminden türeyen menadion sodyum bisülfitle menadiol sodyum disülfat ve menadion sodyum difosfat suda çözünen K vitamini türevidir (Şekil 3C) (57). Bu vitamin doğal değil sentetiktir.

Doğal besin maddelerinde bulunan K vitaminlerinin barsaktan emilimini safra tuzları ve yağlar kolaylaştırır. Barsak hücrelerine geçen K vitamini şilomikronlar aracılığıyla lenf sistemine, oradan da kana geçer. Menadion suda çözünen bir K vitamini olduğu için emilimi safra ve yağlara bağlı değildir (32).



Şekil 3. K vitamininin kimyasal yapısı: A) Fillokinon; B) Menakinon (K2 vitamini); C) menadion (K3 vitamini) (58).

K vitamini yağda eriyen esansiyal bir vitamindir ve tek bir enzimatik reaksiyonda görev alır. Bu reaksiyon, K vitaminine bağımlı proteinlerin biyosentezi sırasında glutamik asidin, γ -karboksiglutamik aside (Gla) dönüştüğü reaksiyondur (55). Bu dönüşüm, karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumunda posttranslasyonel modifikasyonla olur: Glutamat kalıntısındaki gama-hidrojeni yerine, karboksil grubunun bağlanmasıyla γ -karboksiglutamik asit (Gla) kalıntıları oluşur. İlk olarak 1974 de protrombinde keşfedilmiştir (58, 59, 60, 65, 66, 67).

Gla, kalsiyum iyonlarını bağlayarak proteinin üç boyutlu yapısının değişmesine sebep olur. Bu sayede koagülasyon proteinleri negatif yüklü membranlara, özellikle fosfatidil serine bağlanabilir. Aktive olmuş trombositlerde membran değişiklikleri olur, reseptörlerin sayı ve konumu farklılaşır (68, 69, 70, 71, 72)). K vitamini eksikliğinde Gla proteinlerinin posttranslasyonel karboksilasyonu bozulur. Bu defektif Gla proteinlerine *PIVKA* (Proteins Induced by Vitamin K Absence) veya deskarboksi proteinler adı verilir. Örneğin K vitamini eksikliğinde oluşan protrombine PIVKA-II veya des-gamma-karboksi-protrombin adı verilir. Defektin şiddetine göre bu proteinler kalsiyum iyonlarını bağlamada yetersiz kalır (73, 74). K vitaminine bağımlı proteinleri plazmadan izole etmek için iki değerli katyonlara olan ilgisinden faydalanılır (75, 76, 77, 78, 79, 80, 81).

Kan koagülasyon ve antikoagülasyon zincir reaksiyonunda yer alan K vitaminine bağımlı plazma proteinlerinin bazı yapısal özellikleri ortaktır (82, 83) ve çoğu serin proteazdır. Bu proteinler yapısal olarak tripsin-kimotripsin ailesine benzemesine rağmen, molekül büyüklükleri bu ailedeki proteinlerin 2 katıdır. Yapısal bölgeleri, tripsin benzeri bölgelerden farklıdır; membran etkileşimi veya protein kompleks oluşumundan sorumludur. Membran yüzeylerin ve kalsiyum iyonlarının varlığında, faktör VIII ve faktör V gibi kofaktörler tarafından kan pıhtılaşma proteazlarının enzim aktivitesi artırılmaktadır (84). Protrombin, faktör VII, faktör IX, faktör X karaciğerde sentezlendiği için, karaciğer bozukluğunda aktiviteleri azalır (85).

K vitamini, koagülasyonda önemli bir rol oynar. Osteokalsin ve matriks Gla proteinleriyle birlikte protrombin (faktör II), faktör VII, faktör IX ve faktör X sentezinde gerekli olan bir kofaktördür. K vitamininin diğer önemli bir rolü antikoagülan olarak işlev gören protein C ve protein S'nin sentezinde görev almasıdır

(86). K vitaminine ait reaksiyonlar warfarin, kumarin gibi antikoagulanlar tarafından inhibe olur (87).

Koagülasyon proteinleri dışında; kemik, kıkırdak, akciğer, böbrek ve başka dokularda da K vitaminine bağımlı proteinler izole edilmiştir (59, 60, 61, 88, 89). Growth arrest-specific protein 6 (Gas6) bunlardan birisidir. Ayrıca sinyal iletiminde PRGP1-4 (prolince-zengin Gla proteinleri 1, 2, 3 ve 4) ün de işlevi olduğu gözlenmiştir (66).

Tablo 3. K vitaminine bağımlı proteinler (90).

KOAGÜLASYON SİSTEMİ PROTEİNLERİ	DİĞER PROTEİNLER
Protrombin Faktör VII Faktör IX Faktör X Protein C Protein S Protein Z	Osteokalsin Matriks Gla proteini Gla Rich Protein (GRP) Nefrokalsin Prolince zengin Gla Proteini 1 (PRGP 1) Prolince zengin Gla Proteini 2 (PRGP 2) Plak Gla Proteini Gas 6 (growth arrest spesifik- 6) “Conantokin” G “Conantokin” T K vitamini karboksilaz enzimi Periositin

4.3.1. K vitaminine bağımlı pıhtılaşma proteinleri

4.3.1.1. Protrombin (faktör II)

Protrombin 68.700 molekül ağırlığında bir plazma proteindir. Normal olarak konsantrasyonu 15 mg/dL'dir (91, 92). Tek bir polipeptitten oluşan glukoprotein yapıdaki protrombinin biyolojik ömrü 68 saattir. Karaciğerin parankim hücrelerinde sentezlenir. Tek zincir halindeki protrombin molekülünde iki bölüm vardır. Gla taşıyan “Pro” ve “ trombine dönüşen kısım = pretrombin 2 ” dir. Glikoprotein yapılı olduğu için molekülde şeker birimleri de içerir.

4.3.1.4. Faktör X

Faktör X molekül ağırlığı 55,000 olan bir glikoproteindir. Diğer koagülasyon faktörlerinden farklı olarak polipeptid zincirinden meydana gelmiştir. Plazma konsantrasyonu 12 µg/mL'dir (32). Disülfid bağıyla kovalent olarak bağlı, bir ağır zincir bir hafif zincirden oluşmaktadır (95). Hafif zincirde 11 Gla'ya sahiptir (96). Hem ekstrinsek hem intrinsek sistem kompleksinin substratıdır ve kompleksin kesiştiği noktada aktifleşir (32). Birkaç saniye içinde protrombini trombine parçalar ve pıhtılaşma işlemi devam eder.

4.3.1.5. Protein C

Protein C, ilk kez 1960'da antikoagülan etkisi tanımlanan bir proteindir. "Autoprotrombin II-Antikogülant" adı ile ilk defa dünya literatürüne Ulutin, Mammen ve Seegers tarafından duyurulmuştur (32).

Trombin genellikle prokoagülasyon aktiviteye sahip kabul edilmekle birlikte; bazı önemli homeostatik antikoagülan etkilere de sahip olan çok fonksiyonlu bir proteindir. Ana görevlerinden biri endotel yüzey proteini olan trombomoduline bağlanmaktır (97). Trombomodulin ile trombin birleşerek auto -II-A'yı aktif hale getirir. Auto-II-A da faktör V ve faktör VIII aktif hale getirir. 1975 yılında ilk defa Emekli ve Ulutin tarafından autotrombin II-A'nın deney hayvanlarında yaygın damar içi pıhtılaşmasını önleyici etkisi gösterilmiştir.

1976 yılında Stenfle yapmış olduğu bir çalışmada; koagülasyon sisteminde Protein C adıyla yeni bir antikoagülan maddeyi dünyaya duyurmuştur. Seegers bu protein fraksiyonlarını incelediğinde autoprotrombin II-Antikoagülant ve protein C'nin aynı molekül olduğunu göstermiştir (32).

Karaciğerde sentez edilir. Trombin trombomodulin kompleksi endotelial protein C reseptör varlığında protein C'yi aktive ederek; aktive protein C'ye (APC) dönüştürür. APC, faktör Va ve faktör VIIa'yı selektif olarak proteolize uğratır. APC'nin faktör V ve faktör VIII'e spesifik bu etkisi için protein S ile kompleks oluşturması ve uygun bir fosfolipid yüzeyin olması gerekir (98, 99). APC antitrombotik bir serin proteazdır. APC, faktör Va ve VIIa'yı inaktive etmek suretiyle faktör Xa ve trombin oluşumunu inhibe eder. APC'nin dolaşımdaki yarı ömrü 20 dakika olup, çeşitli proteaz inhibitörleri (başlıca protein C inhibitör) ile

yıkılır ve nötröle edilir (100). Protein C dolaşımında inaktif formda bulunur ve aktive olduğunda antikoagulan, antiinflamatuvar ve fibrinolitik özellikler gösterir (97, 101).

4.3.1.6. Protein S

Bir glikoproteindir. Karaciğerde, endotel hücrelerinde, megakaryositlerde, testisin leyding hücrelerinde ve osteoblastlarda sentezlenir. Plazma düzeyi 20–25 mg/L olup, plazmada 2 şekilde bulunur; % 60'ı düzenleyici bir protein “C4b-bağlayıcı protein” e bağlı olarak ve %40'ı plazmada serbest halde. Protein S'nin sadece serbest olan formu; faktör Va ve VIIIa'nın yıkımında APC için kofaktör olarak görev yapar (98, 99, 100, 101, 102). Protein S C4b bağlayıcı proteinle kompleks oluşturduğunda, APC'nin kofaktörü olarak fonksiyon yapamaz (103).

Protein S, APC ile katalizlenen faktör Va'nın inaktivasyonunu faktör Xa varlığında sağlar (30). Ayrıca protein S, faktör Xa aktivitesiyle inhibe olabilir (104). Protein C ve protein S'nin C terminal bölgesi serbesttir. Bu iki protein N terminal uçları ile endotel hücresi reseptörlerine bağlanır. Bu proteinlerin hücre membranına bağlanması Gla bölgeleri aracılığıyla olmaktadır (32). Protein S (ProS) ~60 aminoasitlik bir “Gla bölgesi”ne sahiptir. Gla bölgesiyle negatif yüklü fosfatidilserine bağlanır (105).

Protein S, K vitaminine bağımlı bir protein olan Gas6 proteiniyle benzer yapıdadır. Her ikisi de tirozin kinaz reseptör ailesinden olan TAM (Tyro3, Axl, Mer) reseptörlerine bağlanabilir. Protein S'nin retina epitelyumunda hem Mer hem de Tyro3 reseptörlerine bağlanabildiği gözlenmiştir. Protein S güçlü bir mitojenik aktiviteye sahiptir ve iskemik/hipoksik hasarlarda nöronları koruduğu öne sürülmüştür. Ayrıca Protein S, hepatositlerin yanı sıra vasküler endotel hücrelerde de sentezlenir. Ancak vasküler endotel hücrelerdeki rolü henüz kesin olarak bilinmemektedir (105).

4.3.2. K vitaminine bağımlı diğer proteinler

4.3.2.1. Matriks gla proteini (MGP)

MGP proteini K vitaminine bağımlı ve geniş bir doku dağılımına sahip hücre dışı matriks proteindir. Endoplazmik retikulumda, posttranslasyonel değişime uğrar (Price ve ark. 1983; Price ve Williamson 1985, 2008) (107). İlk kez 1983 yılında sığır kemiği ekstraktından izole edilen MGP, daha sonra sıçan (1986), insan (1988), fare (1991), köpek balığı (1994) ve tavukta (1998) hem protein hem de mRNA düzeyinde tespit edilmiştir (108). 84 aminoasitten oluşmakta ve moleküler ağırlığı 10kDa büyüklüğündedir. Yapısında 19 aminoasitlik, zarlar arası bölgede bir ileti peptidi, gama-karboksilaz tanıma bölgesi, Gla bölgesi, 11 aminoasitlik işlevi bilinmeyen bir bölgesi daha vardır (109). Glutamik asit birimlerinin 5 tanesi, K vitamini ve bikarbonat iyonlarını gerektiren bir reaksiyonla, gama-karboksilasyona uğrayarak γ -karboksiglutamik asite dönüşür (110, 111). Gla bölgesi hidroksipatit için yüksek bağlanma afinitesine sahiptir. MGP hem yüksek afiniteyle kalsiyum bağlar hem de doku organizasyonuna katılır (110). Gelişmekte olan kemik ve kırık dokularda yüksek düzeyde sentezlenir ve hücre dışı matriksin kalsifikasyonunu düzenler (112, 113).

En çok akciğer ve kalpte sentezlenmekle beraber kemik ve böbreklerde de sentezi yapılmaktadır (114). MGP proteinin varlığı yumuşak dokularda kireçlenmeye karşı güçlü bir inhibitördür (110). MGP proteini kireçlenme riski olan yerlerde; kalsiyum tuzu çevresinde; kırık ve vasküler dokularda tespit edilmiştir (109). MGP mutasyonunda yumuşak doku kalsifikasyonu ile karakterize Keutel Sendromu adı verilen bir hastalık oluşur.

4.3.2.2. Gla rich protein (GRP)

Yakın zamanda mersin balığının (*Acipenser naccarii*) yetişkin türlerinde K vitaminine bağımlı yeni bir protein bulunmuş ve bu proteine zengin Gla kalıntıları içermesinden dolayı Gla Rich Protein (GRP) (Viegas ve ark. 2008) adı verilmiştir. GRP proteini omurgalıların tüm taksonomik gruplarıyla ortologdur ve evrim boyunca son derecede iyi korunmuştur. Bu proteinin kalsiyum bağlama kapasitesi yüksektir (115). GRP'nin insanlarda sentezi yapıp yapılmadığı araştırılmış ve çeşitli

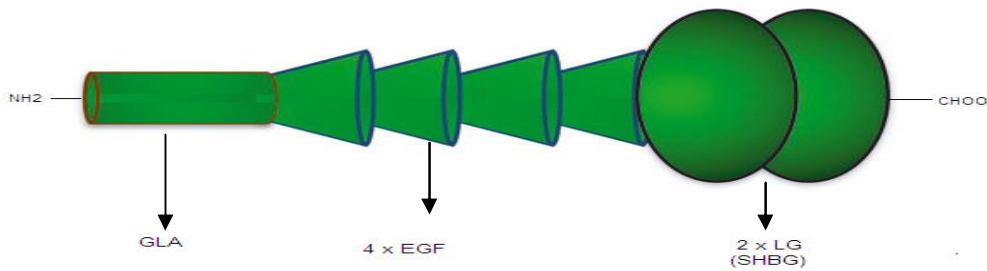
yöntemlerle protein birikimi ve lokalizasyonu tespit edilmiştir. Mersin balığındaki GRP esas olarak kıkırdak dokularla ilişkili olmasına rağmen, insan ve sıçanda deri ve vasküler sistemde de sentezlendiği gösterilmiştir (66, 116).

Mersin balığı ve insan GRP'si %78 benzerlik göstermektedir. GRP, mersin balığı kıkırdağında; sıçan iskeleti, kıkırdak ve kemiklerinde sentezlenmektedir. Mersin balığında 16 Gla, memelilerde 15 Gla kalıntısı bulunmaktadır (Viegas ve ark. 2008) (115). Molekül ağırlığı 21.5 kDa büyüklüğündedir (66). Bununla birlikte GRP'nin in vitro ve in vivo çalışmalarda mineral oluşumunda etkili, güçlü bir yumuşak doku kalsifikasyon modülatörü olduğu düşünülmektedir. İnsan ve sıçanlarda yumuşak dokularda biriktiği gösterilmiştir (116).

4.3.2.3. Gas6 (Growth Arrest-Specific Protein 6)

İlk defa 1993 yılında adından söz edilen Gas6 geni, 1995'te floresan in situ hibridizasyonu ile insan 13q34 kromozomunda keşfedildi. Protein S ile %44 lük bir benzerlik göstermektedir. Ama koagülasyon reaksiyonlarında bir rolü yoktur (117). Bir plazma proteini olan Gas6, 75kDa büyüklüğündedir. Trombosit α - granüllerini de içeren birçok dokuda bulunmaktadır (118, 119, 120).

Gas6, N terminalinde 11-12 glutamik asit kalıntısı içeren bir Gla bölgesine sahiptir (118, 119). Gla bölgesi dışında, dört ardışık epidermal büyüme faktör (EGF) benzeri bölgeler, 2 globular laminin G (LG) benzeri birimden oluşan streoid hormon bağlayıcı globulin (SHBG) ve büyük bir karboksit terminal bölgesi vardır (117).



Şekil5. Gas6 ve protein S'nin yapısı (121).

SHBG bölgesi, Gas6 reseptörü olan Axl'in bağlanma bölgesidir (121). Gas6'daki Gla-bölgelerinin, hücre-hücre etkileşimleri veya fosfolipid membranlara bağlanmada rol oynadığı sanılmaktadır (119).

Gas6'nın esas sentez yeri, karaciğer değildir. Ekspresyonu ilk önce fibroblastlarda saptanmış, daha sonra endotelial hücreler, vasküler düz kas hücreleri, kemik iliği hücreleri, perisitler, kılcal damar duvarın, miyeloid progenitör hücrelerde ve en çok makrofajlar, granülositler ve dendritik hücreleri içeren immün sistem hücrelerinde üretildiği görülmüştür (120, 123, 124).

Gas6'nın hücre göçü, adezyonu, büyümesi; yaşamının devamı, lökosit sekestrasyonu ve migrasyonu, trombosit agregasyonu, hematopoez, çoğalma, apoptoz ve fagositoza kadar geniş bir alanda fonksiyon gördüğüne dair yayınlar vardır (120, 125). Gas6 hücrede mitojenik aktivite göstermekte ve ayrıca hücrenin S fazına girişini koordine etmektedir (117). Mitojenik etkisi yaralanma, enflamasyon ve tamir mekanizmalarıyla ilişkili olarak ilk defa mezankimal hücre kültüründe açıklanmıştır (122, 125). Gas6, reseptör tirozin kinaz ailesinden Axl, Tyro3 (Sky) ve Mer reseptörlerinin ligandıdır ve fonksiyonlarını bu reseptörler aracılığıyla gerçekleştirmektedir.

Gas6'nın insan trombositlerindeki ekspresyonu tartışmalıdır. Ancak yapılan bazı çalışmalarla insan ve fare plazmasında Gas6 proteini saptanmıştır (126). Anabilim Dalımızda yapılan bazı çalışmalarda Gas6'ya ait mRNA'ların, hem insan (127) hem de fare (128) trombositlerinde var olduğu gösterildi: İnsan megakaryosit ve trombositlerinde Gas6 varlığını belirlemek için ilk olarak bu hücrelerde Gas6 geninin ekspresyonu incelendi. Gas6 için 338 baz çiftlik (bç) bölgenin amplifikasyonu yapıldı. Bu bulgu, insan Gas6 geninin trombosit ve megakaryositlerde ekspresyonunun yapıldığını ortaya koymaktadır (127). Fare trombositlerinde RT-PZR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) reaksiyonları sonucunda Gas6 genine ait 400 bç'lik bölge amplifikasyonu yapıldı. Bu bulguyla Gas6 mRNA'sının var olduğunu anlaşıldı (128). Gas6'nın, trombosit agregasyonu ve aktivasyonunun düzenlenmesine katıldığı gösterilmiştir (129). Fare modellerinde, Gas6 proteinin hem ADP hem de α -2- adrenerjik reseptör fonksiyonlarını etkileyerek trombosit agregasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (130). Gas6'nın trombosit degranülasyon ve agregasyon cevabının reseptör aracılı olduğu düşünülmektedir. Trombosit yüzeyinde

yer alan bir ya da daha çok transmembran reseptörünün uyarılmasıyla, trombositler aktive olur. Gas6 geninden yoksun bırakılmış farelerin trombozdan korunduğu düşünülmektedir (129). Gas6 reseptörlerinin yokluğunda, birincil trombosit agregasyonunun gerçekleştiği görülmüştür. Fakat trombosit granül sekresyonu ve azalan sinyaller aracılığıyla trombosit agregatlarının stabilizasyonu bozulmuştur (131).

Gas6'nın hücrelerde rol oynadığı düşünülen bazı fonksiyonları:

- NIH/3T3 hücrelerini apoptozdan koruduğu görülmüştür (132).
- β -katenin stabilizasyonu ve memeli hücrelerinde T-hücre transkripsiyonel aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (133).
- Gas6'nın, G-proteinine bağlı reseptör agonistleri, trombin ve anjiotensin – II için bir büyüme-engelleyici faktör olduğu; vasküler endotel hücrelerde eksprese edildiği ve in vitro endotel hücreleri aktive etmek için granülosit adezyonunu inhibe ettiği düşünülmektedir (134).
- Lökosit ve endotel hücreleri; inflamasyon ve yara iyileşme periyodunda Gas6 ve reseptörlerini eksprese eder (123).

Çeşitli böbrek hastalıklarında mesangial hücrelerde artış olmaktadır. Bu hücrelerin çoğalmasında çeşitli büyüme faktörleri etkili olmaktadır: trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü, interlökin-6 (118). Eritroblastlarda da, Gas6 güçlü bir hayatta kalma faktörüdür ve eritropoetinin etkilerini artırmaktadır (124). Gas6, endotel hücreleri tarafından üretilmektedir (125). Gas6'nın fonksiyonları hakkında son yıllarda çok sayıda araştırma yayınlanmıştır. Bu yayınlardan birçoğu Uras F tarafından çok detaylı olarak 2006'da derlenmiştir (135).

4.4. TAM (Tyro-3, Axl, Mer) Reseptörleri

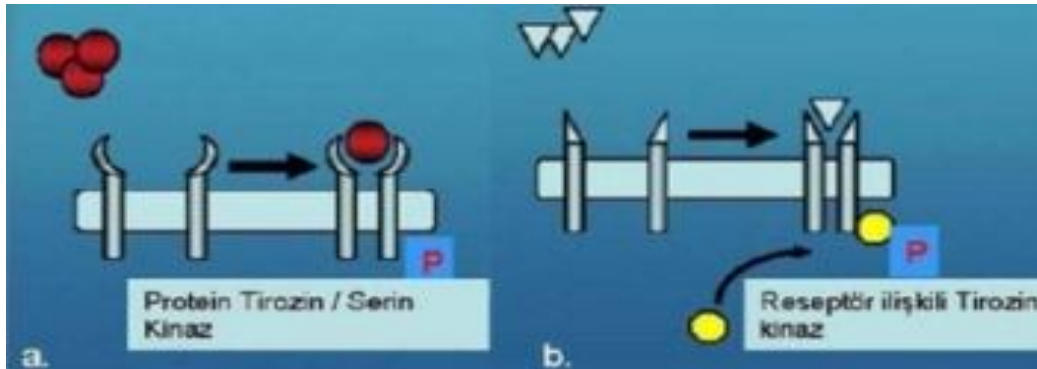
4.4.1. Tirozin kinaz reseptörleri (RTK)

Genel olarak protein yapısına sahip olan membran reseptörleri, hücre dışı bir ligand etki bölgesi, en az bir transmembran segmenti ve hücre içi bir katalitik bölgeden (enzimden) oluşur. Enzimatik aktiviteye sahip olan reseptörler altı sınıfta incelenebilir: Tirozin kinaz reseptörleri (RTK), tirozin-kinazla-ilişkili reseptörler,

reseptör-benzeri fosfatazlar, serin/treonin kinaz reseptörleri, guanil siklaz reseptörleri ve histidin-kinaz- ilişkili reseptörler (136).

Tirozin kinaz reseptörleri transmembran proteinlerdir. Bu grupta insülin; epidermal vasküler endotelial büyüme faktörleri gibi pek çok alt üye bulunmaktadır. Bu yüzey reseptörleri, enzimatik aktiviteye sahip olup substrat proteinlerdeki tirozin kalıntılarını fosforiller. Tirozin kinaz reseptörleri, sitoplazmik bölgede aktivasyondan sorumlu bir bölgeye sahiptir. Tirozin kinaz reseptörlerinin hücre dışı kısmına ligandın bağlanmasıyla, sitoplazmik tarafta yer alan tirozin kalıntıları fosforilasyona uğrar. Bu reseptörler arasında hücre membranında bulunan reseptörlerden G-proteinleri ve sinyal ileten enzimler yer alır (137).

İnsan genomunda 1000 civarında protein kinaz geni tespit edildi. Bunların yaklaşık 100'ü protein tirozin kinazlara aittir. Bunların 58'i reseptör tipidir (138). RTK'da hücre dışı ligand bağlacı bölgeler, bir transmembran bölge (139, 140) ve bir sitoplazmik kinaz bölgesi ile alt familyalarında farklı olan 20 yapısal sınıf vardır (138).



Şekil 6. Sitokin reseptörleri. a) Tirozin kinaz reseptörleri (RTK); b) Tip I / Tip II reseptörler (141).

Hücrenin dinlenme evresinde RTK ların inaktif ve aktif formları denge halindedir. Bu reseptörler büyüme faktörlerine bağlandıktan sonra aktif hale geçer ve sitoplazmadaki hedef proteinlerle etkileşerek sinyal iletimini gerçekleştirir. Ligandın bağlanmasını takiben, reseptör kendi kendini fosforile eder ve RTK aktivasyonu başlar. İkinci aşamada ise, bu fosforile bölgelere çeşitli adaptör proteinler bağlanır ve uyarının hücre içine iletilmesi sağlanır (142). Enzim ligandla bağlanarak aktive olduğu zaman, adenosin- 5'- trifosfat (ATP) grubundan kinaz bölgesindeki seçilmiş bazı tirozin kalıntılarına, bir fosfat transfer olur. Böylece reseptörde meydana gelen otofosforilasyon, reseptör aktivitesini artırır; bu fosforlanan bölgelere çeşitli adaptör

proteinler bağlanırlar ve uyarının hücre içine iletilmesi sağlanır. Adaptör proteinlerin ortak yapısal özelliği, Src Homology 2 (SH2) bölgesine sahip olmasıdır. Bu proteinler SH2 bölgeleri aracılığıyla reseptöre bağlanarak, RTK ile sitoplazmadaki efektör proteinler arasında köprü görevi yapar. Fosfataz aktivitesine sahip olan spesifik proteinler, RTK aktivasyonunun sonlandırılmasından sorumludur. Fizyolojik koşullarda, sinyal iletimi tersinir özellik taşır ve RTK aracılı iletim kontrol altında tutulur (139, 143). Kinaz bölgelerinin aktivasyonu ve sinyalizasyon akışı sırasında reseptörü oluşturan iki ayrı zincir, ligandın bağlanmasını takiben dimerize olur (139, 140).

RTK'lar proto-onkogenlerin gelişmesinde ve kanser metastazında büyük bir öneme sahiptir (144). Karsinogenez sürecinde sürekli ve kontrolsüz bir RTK aktivitesi söz konusudur. Bu yüzden tümör gelişmesi ve ilerlemesinde önemli bir rol oynarlar. Mutasyon, delesyon ya da amplifikasyonlarla protein kinazların ekspresyonunu kısıtlayıcı şartlar ortadan kaldırıldığında, tümör gelişimi hızla ilerler. Kanser hücrelerinde hayatta kalma, hareketlilik ve yayılmanın yanı sıra anjiyogenez ve kemoterapiye direnç gelişir. 1980'lerden bu yana protein kinazlar, kanser tedavi stratejisi geliştirmede önemli bir yer tutmaktadır (145).

RTK ailesine mensup olan epidermal büyüme faktör reseptörleri (ERBB) ve efrin (ephrin) reseptörleri hakkında nisbeten daha kapsamlı bilgiye sahibiz. Ancak bu ailenin son tespit edilen reseptörleri olan TAM reseptörleri hakkındaki bilgiler henüz yetersizdir (146).

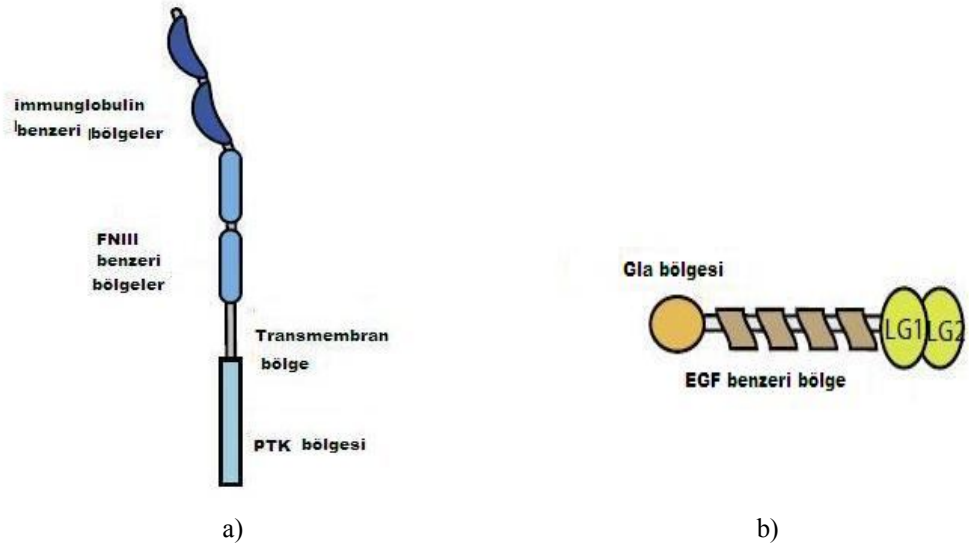
4.4.2. Tyro3 (Sky), Axl, Mer (TAM) reseptörlerinin yapısı

Tirozin kinaz reseptör (RTK) ailesine ait üç reseptör Tyro3 (Sky), Axl, Mer (TAM) 1991 de klonlanmıştır (147). İnsan genomundaki 58 RTK dan üçü, TAM reseptörlerine aittir ve omurgalılara özgüdür (148). Önceleri TAM reseptörlerine şimdikinden farklı isimler verilmişti. Fakat NCBI (National Center for Biotechnology Information) resmi isimlendirmesiyle Tyro3 (Sky), Axl, Mer olarak adlandırılmışlardır (149). Başlangıçta, klonlanmış TAM proteinlerinin tek başına olduğu sanılıyordu ve 1995 yılına kadar ligandları bilinmiyordu (150). Bir dizi biyokimyasal ve hücre kültür deneyleriyle, Gas6 ve Protein S'nin TAM reseptörleriyle yakından ilişkili iki protein olduğu ve onların ligandı olduğu tespit

edildi (149). TAM reseptörlerinin ekspresyonu gelişim sırasında azken; doğumdan yetişkinliğe kadar geçen sürede diğer tirozin kinaz reseptörlerinde olduğu gibi fazladır (150).

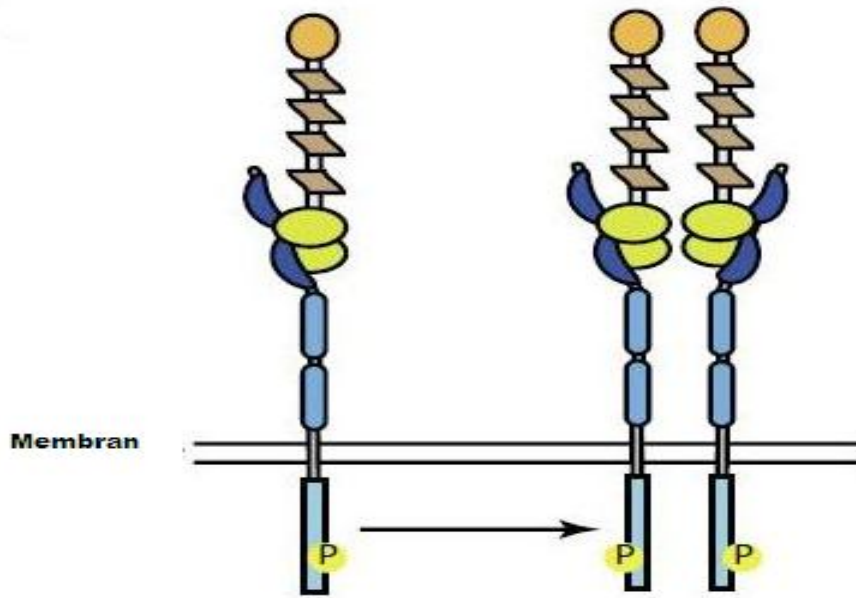
TAM reseptörleriyle onun ligandları olan Gas6 ve proteoin S'nin *Ciona intestinalis* ve *Ciona savignyi* gibi urokordatların genomunda evrim geçirdiğine dair kanıtlar bulunmuştur (151). Bu şekilde; sitokinler ve onların reseptörlerinde sınıf 1 ve sınıf 2'nin ortaya çıktığı düşünülmektedir (152, 153). Fizyolojik ve fiziksel gelişimi göz önüne alındığında, TAM reseptörleri ve sitokinlerin birlikte evrimleşmiş olabileceği sanılmaktadır. Omurgalılarda TAM reseptörleri ve ligand çifti vardır. *Ciona* da ise reseptör aracılığıyla ya da reseptör olmaksızın Gas6 doğrudan apoptotik hücreye bağlanır. Ayrıca *Ciona* TAM agonistleri olan Gas6 ve Protein S, iki hücre arasında fiziksel köprü vazifesi görür. Ligandların C-terminal SHBG bölgeleri, TAM reseptörlerine bağlanmada; N-terminal Gla bölgeleri ise plazma membranlarındaki fosfatidilserine bağlamada görev alır (151).

TAM reseptörlerinin yapısında; hücre dışı bölgede iki N-terminal immunoglobulin bölgesi ve iki fibronektin tip-III benzeri bölge bulunur (150, 154) (Şekil 7). Diğer tirozin kinazlarda olduğu gibi TAM reseptörleri de dimer olarak fonksiyoneldir. Ayrıca reseptörlerin hem hetero- hem de homo-dimer formları olduğu bilinmektedir. Reseptörün liganda bağlanmasında N-terminal immunoglobulin benzeri bölge etkilidir (150). Ligand bağlayıcı bölgeyi, transmembran bölgesi ve sitoplazmik hücre içi proteoin tirozin kinaz (PTK) fosforilasyon bölgeleri takip eder (150, 154). İntraselüler kısımdaki karboksi terminal bölgede KW(I/L)A(I/L)ES dizisi son derece korunmuştur (155).



Şekil 7. a) TAM reseptör ailesinin ortak yapısı; b) Protein S ve Gas6'nın ortak bölgelerinin yapısı: N-terminal Gla bölgesi, dört epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri bölge ve iki laminin - G (LG) bölgesi (150).

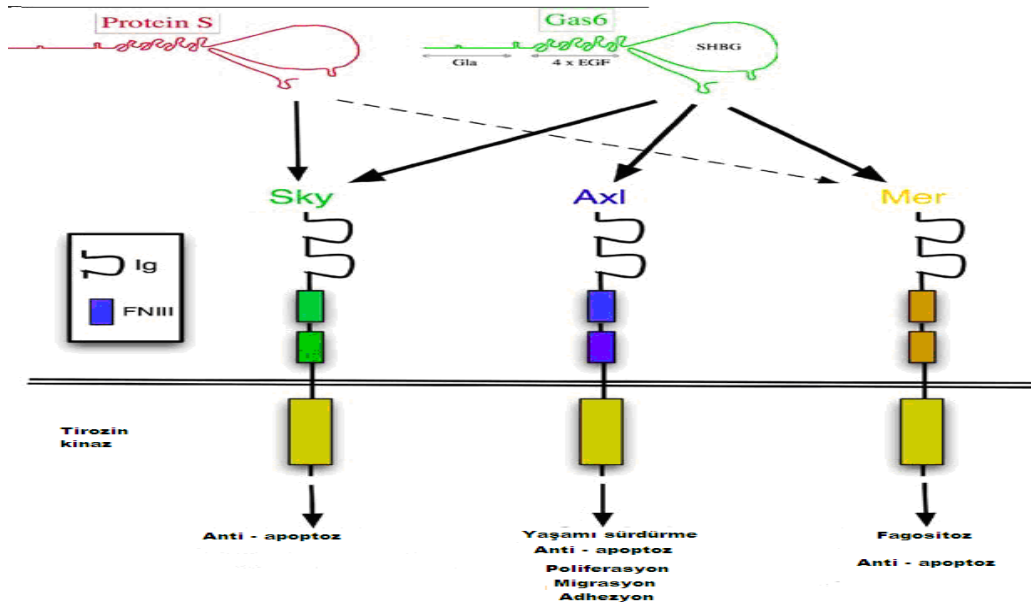
Bu reseptörler Gas6 ve protein S bağlanınca aktive olurlar (156).



Şekil 8. İki immunglobulin bölgesi aracılığıyla LG1 bölgelerine ligand bağlanır (150).

TAM reseptörleri Gas6'nın yaygın olduğu dokularda çoktur. Tirozin aracılı otofosforilasyonla, üç reseptör Gas6'ya bağlanabilir ve aktive olur. Afinitesi sırası $Axl \geq Tyro3 \gg Mer$ şeklindedir (157). Hücre membran yüzeyindeki fosfolipidler negatif yüklüdür ve Gas6 fosfatidilserine (PS) bağlanabilir (150).

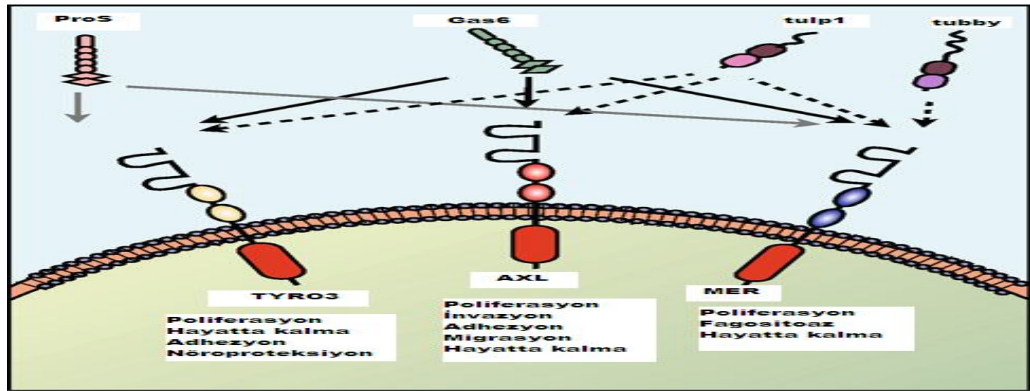
TAM'ın ikinci ligandı Protein S dir. Gas6 ile aynı yapısal bölgelere sahiptir ve %44'lük bir benzerlik göstermektedir. Protein S'nin %60'ı karaciğerde sentezlenir ve C4b bağlayıcı proteinle kompleks oluşturur. Dolaşımdaki seviyeleri Gas6 dan 1000 kat fazladır. Protein S konsantrasyonu plazmada 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ iken, Gas6'nın normal seviyesi 20-50 ng/ml arasındadır ve sağlıklı bireyler arasında büyük fark vardır (157, 158, 159, 160) (Şekil 9). Gas6 seviyesiyle ilgili olarak anabilim dalımızda yapılan bir çalışmada, yetişkin plazmasında ortalama Gas6 konsantrasyonu 9.1 ± 4.5 ng/ml olarak bulundu. Kadınlarda ortalama 9.9 ± 4.69 ng/ml iken, erkeklerde bu değer 8.28 ± 4.2 ng/ml olarak saptandı (161).



Şekil 9. K vitaminine bağımlı Protein S ve Gas6 ligandlarının Axl, Tyro3 (Sky) ve Mer reseptörlerine bağlanması (162).

Her üç TAM reseptörü, farklı afiniteleri ($Axl \gg Mer > Sky$) ve sinyalleri aracılığıyla Gas6'ya bağlandığını söylemiştik. Caberoy ve ark. 2010 yılında TAM reseptörlerine bağlanabilen iki yeni ligand keşfettiklerini bildirdiler: tuppy ve Tulpl (Tubby-like protein 1) proteinleri. Bu proteinler RPE (retinal pigment epitelyal)

hücrelerin ve makrofajın fagositozunu kolaylaştırmaktadır. Köprü molekül görevindedir. Her iki proteinde klasik sinyal peptidin sıra dışı salgılandığı gösterilmiştir (163). Reseptörlere ligand olarak bağlandığında fagositoz sinyalizasyonu başlatır. Tulp1 TAM'ın üç reseptörüne de bağlanır. Ama tubby yalnızca Mer'e bağlanır. Tulp1 ve tubby ağırlıklı olarak nöral dokuların ve fotoreseptörlerin hücre içinde eksprese edilir (164).



Şekil 10. TAM ligand- reseptör özgülüğü (165).

4.4.3. TAM reseptörlerinin hücre ve dokulardaki rolü

TAM reseptörleri, Gas6 ve Protein S immün, vasküler, üreme, merkezi sinir sistemi ve hematopoetik dokular olmak üzere çeşitli memeli dokularında sentezlenir (149, 166, 167). Hücrel süreçlerde önemli rolleri vardır: Hücrenin hayatta kalması, farklılaşması ve proliferasyonu; sinyal yollarında ileti, immunomodülasyon, fagositoz, migrasyon, hematopoez, trombosit agregasyonu (150, 157, 168) ve pıhtı stabilizasyonu (112, 169, 170). Eritropoezde, kanser gelişim ve ilerlemesinde de yer almaktadır. Ayrıca osteoklastik fonksiyon düzenlenmesinde de etkilidir (171, 172).

TAM reseptörlerinin, fagositik hücrelerle bağlantı sağladığına dair bulgular vardır. Apoptotik hücrelerin fagositozu sırasında Gas6 ve Protein S'nin Gla bölgelerinin, membrandaki fosfatidilserine bağlanması önemli bir özelliktir. Gas6'nın yapısında bulunan SHGB bölgesi, TAM reseptörlerinin bağlanmasında ve aktivasyonunda gereklidir (156, 158, 173). TAM reseptörleri geni yok edilmiş hayvanlarda fagositik fonksiyonun bozulduğu bildirilmiştir (173, 174).

Ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyon (PZR) analiziyle insan trombositlerinde bu reseptörlerin varlığı incelenmiştir (169). Farelerde trombosit bağımlı pıhtı oluşumunda Gas6'nın rolü olduğu öne sürüldü. Bir başka çalışmada Gas6 reseptörlerinin her birinin trombosit aktivasyonuna bireysel katkısı, insanlarda in vitro, farelerde in vivo olarak incelendi (131). İnsan trombositlerinin ADP ve PAR-1 reseptör peptidi (Proteaz-Aktivasyon Reseptör 1), SFLLRN (trombin reseptör aktivasyon peptidi) ile aktivasyonunda Tyro3 (Sky) ve Mer'in düzenleyici olduğu bildirilmiştir. Axl bu agonistlerle aktive edilen trombosit cevabını arttırmıştır. Aynı çalışmada Gas6 ya da Tyro3 (Sky) antikollarının varlığında tromboz oluşumunun farelerde azaldığı görüldü. Farede Gas6 ya da Tyro3 (Sky) aktivasyonu inhibe edildiğinde, kanamada artış olmamıştır. Degranülasyon ve agregasyon yanıtının Gas6 reseptörleriyle arttığı görülmüştür.

Gas6/Protein S-TAM reseptörleri trombosit fonksiyon sisteminin farklı bileşenleriyle birlikte çalışır. Hayvan modelleri kullanılarak ateroskleroz oluşumu ve inflamasyon gelişimiyle ilişkisi olabileceği öne sürülmüştür (159, 167).

TAM reseptörlerinin sinir, üreme ve vasküler sistem yanında immün sistemde de önemli bir role sahip olabileceği bildirilmiştir. Yapılan birçok çalışma, TAM reseptörlerinin immün yanıt için önemini desteklemektedir. TAM genlerinde meydana gelen ciddi mutasyonlar incelenmiş ve bunların immün sistemi yakından etkilediği gözlenmiştir: Lemke G. ve ark. (2001) mutant farelerle yaptıkları deneyde, doğumdan yaklaşık 3 hafta sonra periferik lenfoid organlarda TAM'ın yüksek oranda artmaya başladığını; 6 ay sonra bu farelerin dalak ve lenf modüllerinin yabancı tip farelerden 10 kat daha büyük olduğunu gözlemledi. Sonuçta üçlü mutant farelerin tüm dokularında hem miyeloid hem de lenfoid popülasyonun artması nedeniyle lenfosit kolonileri gözlemlendi. Şaşırtıcı şekilde, TAM eksik farelerde, otoimmün hastalıklara yatkınlık gözlemlendi: Periferik lenfoid organların büyümesine ek olarak, klinik otoimmün belirtiler; eklem şişliği, cilt lezyonları, kanama ve böbrek glomerülünde IgG birikmesi gibi klinik bulgular görüldü. Humoral bulgular: Dolaşımda birden fazla oto-antikör mevcudiyeti, çift sarmal DNA, plazma membran fosfolipitleri ve kollajen (175).

TAM reseptörleri dentritik hücreler ve makrofajların inflamasyonunu inhibe eder; apoptotik hücre ve membranlı organellerin apoptozunu şiddetlendirir; "naturel

killer” hücrelerin olgunlaşmasını uyarır (176). Bu olayların her biri TAM reseptörü ve sitokin sinyalizasyon sistemi arasındaki ilişkiye dayanır. Bunun önemi önceleri hiç bilinmiyordu. Günümüzde ise üzerinde aktif olarak çalışılan bir araştırma alanıdır. TAM reseptör sinyalizasyonunun, proinflamatuvar sitokinler–tümör nekroz faktör (TNF), interlökin–6 (II-6), II-12 ve interferon tip 1(IFNs) gibi proinflamtuvar sitokinlerin TRL (Toll- like receptor) aracılı üretimini inhibe ettiği bulunmuştur.

Gas6, Protein S ve TAM reseptörlerinin, tümörler arası dokular ve makrofajlardaki yerleşiminin spesifik rolleri olduğu düşünülmektedir. Özefagus, göğüs, akciğer, karaciğer ve astrositoma, glioblastoma, glioma, prostat, mide, tiroid, kolorektal, yumurtalık ve kronik lenfoid- miyeloid lösemi gibi kanser tiplerinde rolü bulunmaktadır (168, 177, 178, 179).

Retinada, gözün arkasındaki spesifik büyük epitel hücrelerinde Tyro3 (Sky) ve Mer reseptörleri eksprese edilir (180, 181). Bu reseptörlerin fonksiyonları dış segmentteki fotoreseptörlerin fagositozu açısından önemlidir (181). TAM reseptörlerinden yoksun bırakılmış farelerde, fotoreseptörler dejenere olmuş şekildedir (182). Daha sonraları insanda, farede ve sıçanlarda, sadece Mer geninde meydana gelen mutasyonların bile bu sonucu oluşturduğu gözlenmiştir (181).

Son yapılan çalışmalarda, virüslerin hücreye girişinde TAM reseptörlerinin rolü olduğu ortaya çıkmıştır. Virüsün hücre içine girmesi, belirli hücre yüzey reseptörlerinin kodlanmış viral zarf proteinlerine bağlanmasıyla olur. Gas6 birden fazla viral zarf proteinlerinde ve “psödo” tiplerinde doğal enfektiviteyi arttırır. Gas6 virüs- hedef hücre arasında bağlayıcı, virion- zarf arasında Axl reseptörüyle köprü görevi görür. Apoptotik hücrelerin fagositik boşluğunda da Gas6’nın köprü olarak etki yaptığı bilinir. Vaccinia virüs replikasyonun, Gas 6 yoluyla apoptoz taklidi yaparak hücre içine girdiği rapor edilmiştir. Böylece Gas6 psödo tip lentiviral ve vaccina virüs enfektivitesini arttırır. Kısaca Gas6 hedef hücrelerle virüs arasında bir köprü görevi yapar. TAM reseptörlerinden Axl reseptörü hedef hücrelerin yüzeyinde eksprese edilir. Zarflı virüsler insan Gas6 Gla bölgelerinde fosfatidilserin bağlayıcıdır (183).

Makrofajlar bir dizi yüzey reseptörü sayesinde apoptotik hücreleri tanır. Bunlar arasında TAM kinazlar, özellikle Mer, apoptotik hücre klirensinde önemli bir rol oynar (184).

4.4.4. Axl reseptörü

Axl reseptörü ilk defa 1988 yılında kronik miyeloid lösemili 2 hastada kimliği belirsiz bir gen olarak tespit edildi. Axl ismi Yunancada “kontROLSÜZ” anlamına gelen “*anexelekto*” dan türetilmiştir (177). Axl; UFO, Tyro7 ve Ark (Janssen ve ark., 1991; Lai ve Lemke, 1991; O’Byran ve ark., 1991; Rescigno ve ark., 1991) isimleriyle de adlandırılmıştır (150, 148). 894 aminoasitten oluşur ve 98 kDa molekül ağırlığındadır (155, 185). Axl 19q13.2 kromozomda yer alır, 20 ekzonu vardır. KML (kronik miyeloid lösemi) ve kronik miyoproliferatif hastalıkta klonlanmıştır (177). Axl reseptörü homofilik özellik göstermektedir ve son günlerde yapılan çalışmalarda Axl ve Tyro3 (Sky)’ün heterodimer olabileceği de gözlemlenmiştir (150, 156). Axl ve Tyro3 (Sky) benzer genomik yapıda, aynı sayıda ekzon ve boyuta sahiptir (186). Bu genomik benzerliğe rağmen Axl ve Mer en benzer tirozin kinaz aminoasit dizimine sahiptir (138, 187).

Hücre dışı alanda altı N- bağılı glikozilasyon bölgesi içerir. Axl’in iki şekli vardır. Post translasyonel modifikasyona bağılı olarak bunların boyutları ve moleküler ağırlıkları farklıdır. Axl reseptörünün hücre dışı bölgede iki Ig bölge ve iki fibronektin(FN) III bölgesi vardır (155, 188, 189, 190). Birçok çalışmada LG bölgelerinin ara buluculuk yaptığı gösterilmiştir. Özellikle, Gas6/Axl kompleksinin fonksiyonel sinyal yapısı incelendiğinde, 2 heterotetramer reseptör molekülü ve 2 ligand molekülünün sirküler şekilde bulunduğu görülmüştür (150).

Axl sinyalizasyon akışında büyüme faktörü aracılı protein, fosfatidilinositol-3 hidroksi kinaz (PI3K), RAT sarkoma (RATS) ve hücre dışı sinyal düzenleyici kinazlar (ERK) yer alır (177). Protein S’ in Axl reseptörüyle ligand olarak ilişkisi olmadığı belirtilmiştir (141).

Gas6/Axl’in önemli hücre fonksiyonları arasında hücre adezyonu, büyüme, hücre sağ kalımı, migrasyon, çoğalma, fagositoz ve apoptoz inhibisyonunun yer aldığı bildirilmiştir. Son bilgiler, Axl ailesinin fagositoz ve makrofaj aktivasyonunda merkezi düzenleyici olduğunu göstermektedir (166, 191, 192). Makrofaj ve dendritik hücrelerde, en belirgin olarak Axl ve Mer ekspresyonu gerçekleşmektedir (193). Nöral hücrelerin migrasyonu, hayatta kalması ve gen ekspresyonunu da etkilemektedir (194). İmmun yanıtı bastırma, sitokin sekresyonunu düzenleme,

apoptotik hücre kalıntılarını temizleme, oligodendritler, nöronlar ve mikroglia hücrelerinde rol aldığı bildirilmiştir.

Gas6/Axl, hücre içi sinyalleri uyararak trombosit agregasyonu ve granülasyonunda düzenleyici bir etki göstermiştir (119). Konishi ve ark. (2004) Gas6/Axl sinyalizasyonunun, yaralanmalarda biyolojik bir sinyal oluşturduğunu gözlemlemiştir (150). Gas6/Axl sinyal yolu, düz kas hücreleri ve NIH/3T3 fibroblastlarında antiapoptotik ve mitojenik cevap oluşturmaktadır.

Axl, vasküler düz kas hücreleri (VDKH) dahil olmak üzere çeşitli hücre tipinde ekprese edilir (195, 196) Diyabetik ve vasküler hastalıkların gelişiminde Axl'in rolü olduğu gösterilmiştir. Diyabetik sıçan böbrek glomerülünde Gas6/Axl ekspresyonu yüksektir. Ayrıca Gas6'sız farelere ve Gas6 aktivasyonu inhibe edilmiş farelere warfarin uygulandığında diyabetik nefropatinin daha hafif olduğu görülmüştür (197). Bunlar, diyabetin vasküler komplikasyonlarında Axl'in rolü olduğunu düşündürmektedir. VDKH'de glukozun, Gas6/Axl sinyali üzerinde güçlü bir etki yaptığı gözlenmiştir. Ayrıca Gas6/Axl, yüksek glukoz seviyelerinde göçe neden olmuştur. Oysa düşük glukoz seviyelerinde, Gas6/Axl aracılı hücre sağ kalımını artmıştır. Böylece glukozun, Axl sinyalinin değişiminde rolü olduğu görülmüştür. Gas6-Axl'in diyabetle ilişkili renal ve kardiyovasküler komplikasyonlarda önemli bir patojenik etki gösterdiği sanılmaktadır (110). Miyeloid kökenli hücrelerde Axl reseptörünün yapısal gen olarak aşırı ve sürekli ekspresyonu sağlandığında, insüline bağımlı olmayan diabetes mellitus gelişmesine sebep olmuştur (198).

Kronik lenfositik lösemili (KLL) hasta plazmalarında fosforile Axl reseptörüne rastlanmıştır. Bu Axl reseptörleri, muhtemelen lösemi B hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Yapılan araştırmalarda KLL-B hücrelerinde fosforile Axl ve Axl olarak bulunduğu bildirilmiştir. Ancak aktivasyonu en fazla olan, fosforile Axl'dir. Axl aktivasyonu KLL- B hücrelerinde sağ kalımı etkiler (145).

Axl ve KML ilişkisinden sonra, başka hastalıklarla ilişkisi de yayınlanmıştır: Multiple skleroz (MS) gibi demiyelinizasyonu hastalıkları bunlardan biridir. Axl yetişkin sinir sisteminde düşük seviyelerde ifade edilmektedir (199, 198). Santral sinir sisteminde hem Axl hem de Mer reseptörünün sentezi; Tyro3 (Sky) den daha azdır (150). Ayrıca Axl reseptörünün, adipoz üzerinde hem in vitro hem in vivo olarak büyük bir etkisi vardır (200).

4.4.5. Tyro3 (Sky) reseptörü

Tyro3 (Sky), transmembran yapıda tirozin kinaz reseptörler alt familyasındandır. Ohashi ve ark. tarafından Axl'e homolog olduğu bulunmuş ve Tyro3 (Sky) olarak adlandırılmıştır (201). Etk2, Dtk, Brt, Rse, Sky ve Tif olarak farklı isimlerle adlandırılmıştır (Lai ve Lemke, 1991; Biesecker ve arkadaşları 1993; Dai ve arkadaşları 1994; Mark ve arkadaşları 1994; Ohashi ve arkadaşları 1994; Crosier ve arkadaşları 1996) (166). 890 aminoasitten oluşur ve moleküler ağırlığı 97kDa'dır.

Hücre dışı alanda iki Ig bölgesi ve iki FNIII bölgesi içerir (202). Pierce ve ark. (2008) Axl ve Tyro 3 (Sky) reseptörlerinin heterodimer yapıda olduğunu ve Axl-Tyro3 (Sky)'ün plazmadaki seviyelerinin düşük olduğunu bildirmiştir (150, 203). Lemke ve Rothlin (2008) Axl ve Tyro3 (Sky)'ün hem hetero hem de homodimer yapıda olduğunu söylemiş fakat ispatlayamamışlardır (150).

Yapısal olarak birbirine benzer olan Protein S ile Gas6, Tyro3 (Sky)'ün ligandıdır (166). Önceleri insanda Protein S/Tyro3 (Sky) aktivitesi tam tanımlanamazken, sonraki çalışmalarda insanlarda Protein S'nin Tyro3 (Sky) reseptörünü aktive ettiği görülmüştür. Ancak, yakın zamanda hem Mer hem Tyro3 (Sky) reseptörlerinin Protein S ligandıyla aktive olduğu bulunmuştur (150). Ayrıca, farelerde Gas6/Tyro3 (Sky) sinyalizasyonu pıhtı oluşum riskini azaltmıştır. Bu aktivasyon bloke edildiğinde, kanamada da artışa meyil olmamıştır (119).

Tyro3 (Sky)'ün nöral dokulardaki sentezi, Axl ya da Mer den daha fazladır. Tyro3 (Sky) ekspresyonu ayrıca kemik osteoklastları, yumurtalık, testis, göğüs, akciğer, böbrek ve retinada da gerçekleşir. İnsanda hematopoetik hücreler, monositler, makrofajlar ve trombositlerde de bulunmaktadır (186). Özellikle serebral korteks, hipokampus ve serebelluma bağlı bazı amigdaloid çekirdeklerde Tyro3 (Sky) seviyeleri fazladır (166). Kemirgen sinir sistemi içinde Tyro3(Sky) beyin dokusunda çok fazla eksprese edilir (150). Bu üç reseptörün sertoli hücrelerinde de sentezlendiği gösterilmiştir (166).

4.4.6. Mer reseptörü

Mer reseptörü ilk olarak tavuk retrovirüs RLP30'dan izole edildi v-ryk adı verildi. Sonra embriyonik tavuk beyinde klonlanmasıyla adı c-eyk olarak değiştirildi. Daha sonra insan B- lenfositlerinde eksprese edildiği saptanınca, c-Mer

olarak adı değiştirildi (177). Tyro12, Eyk ve Nyk gibi farklı isimlerle de adlandırılmıştır (Lai ve Lemke, 1991; Jia ve ark., 1992; Jia ve Hanafusa, 1994; Ling and Kung, 1995) (204). Mer 2q14.1 kromozomda yer alır, 19 ekzonu bulunmaktadır (161). 999 aminoasitten oluşur ve molekül ağırlığı yaklaşık 110 kDa'dır.

Hücre dışı alanda iki Ig bölgesi ve iki FNIII bölgesi içermektedir (205). Mer'in ekspresyonu hematopoetik monositler, makrofajlar, dentritik hücreler, "naturel killer" hücreler, megakaryositler, trombositler ve b lenfositlerde gerçekleşir (169, 177, 192, 203, 206, 207, 208). Plazmadaki Mer'in, apoptotik hücrelerin ve trombosit agregasyonunun makrofaj klerensini engellediği gösterilmiştir (203). Orginal olarak lösemi B ve T hücrelerinde tespit edildikten sonra "mantle" hücreli lenfoma, mide kanseri, hipofiz adenomu, melanoma, prostat kanseri ve göğüs kanserinde de tespit edildi.

Mer sinyalizasyon akışında büyüme faktörü aracılı protein, PI3K, RATS ve ERK vardır. Sinyalizasyon akış yolunda esas hedef, hücre tipi ve dokunun mikro çevresidir (177).

Önceleri Mer için başlıca ligandın Gas6'nın olduğuna inanılıyor ve Protein S'in Mer için ligand olduğu bilinmiyordu (191). Sonradan Protein S'nin Mer'in aktivasyonunda rol aldığı anlaşıldı. Son çalışmalarda Gas6'nın, Axl, Tyro3 (Sky) ve Mer için heterofilik ligand olduğu bildirildi (125). Protein S'nin hem makrofajlarla apoptotik hücre fagositozu hem de makrofajda Mer otofosforilasyonunu teşvik etme yeteneğinde olduğu gösterildi (149).

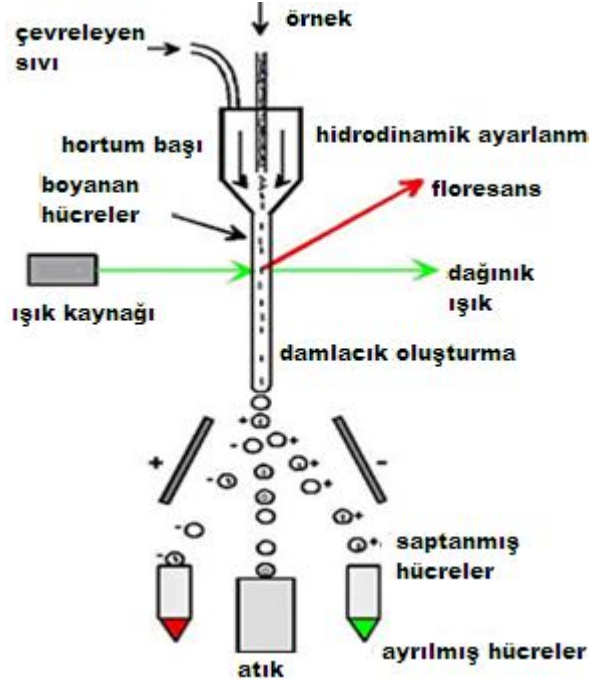
Gelişmiş insan trombositlerinde Tyro3 (Sky) ve Mer'in Gas6 ile etkileştiği görüldü (119). Gerçek zamanlı PZR ve "Western blot" metotları kullanılarak Mer reseptörünün fare ve insan trombositlerinde eksprese edildiği bulundu. Gas6/ Mer aktivasyonunun, in vitro trombosit fonksiyonunun düzenlenmesine ve in vivo trombositte bağımlı trombozla ilişkili olduğu yayınlandı (125).

Mer reseptörü apoptotik hücre fagositozunun önemli bir aracıdır (191). Apoptotik hücrelerin yok edilmesini, aktin iskelet hücre bileşenlerinin harekete geçmesini ve yeniden yapılandırılmasını sağlar. Makrofaj ve dentritik hücrelerde TAM reseptörlerinden Axl ve Mer'in ifadesi daha belirgindir (148). Mer, makrofaj ve dentritik hücre sitokin ürünlerinin düzenleyicisidir. Apoptotik hücrelerin işlevsel fagositozunda, Gas6'nın Mer için tek ligand olduğu gözlenmiştir. Makrofaj

fagositozundaki Gas6 ya bağlı rol, Mer'in immün cevapta büyük bir öneme sahip olduğunu düşündürmektedir. İmmün sistemdeki Mer ekspresyon modeli ve inflamatuvar cevaptaki fonksiyonu son zamanlarda çok dikkat çekmektedir. Fakat immün sistemde yer alan organlardaki Mer'in ekspresyon durumu henüz tam olarak anlaşılamamıştır (191).

4.5. Akan Hücre Ölçer (Flow Cytometry)

Akan hücre ölçer (AHÖ), çeşitli hücreler süspansiyon halinde bir akış kanalı boyunca tek tek lazer ışığıyla aydınlatılmış bir bölmeden geçerken oluşan sinyaller analiz edilir. Oluşan sinyaller, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleriyle ilgilidir. Hücreye bağlanan çeşitli boyalar kullanılır (209, www.uni-greifwald.de/immunotecah/meth, erişim tarihi: 2011). AHÖ cihazı başlıca akış (sıvı) sistemi, ışık kaynağı (lazer ışını), filtreler, sinyal dedektörleri; bilgisayar ve yazılım programları ve ayırma mekanizması (cell sorting) bileşenlerinden oluşmaktadır.



Şekil 11. Akan hücre ölçer genel çalışma prensibi (210).

Akıcı sistem bir merkezi kanaldan oluşur ve örnek buradan cihaza verilir. Boyalı hücreler borudan tek tek akarak lazer ışınından geçirilir ve hücreler ışık saçılımı ile floresan ışımaya verir. Merkezdeki örneği içeren sıvı (laminar akıntı) ve çevreleyen sıvı (sheath fluid) birbirine karışmadan ilerlemektedir. Işık kaynağı olarak AHÖ cihazında ksenon ve kseneon civa lambalar kullanılabilirse de sıklıkla farklı tip lazerlere ek olarak argon (438nm) ve helyum (633 nm) lazer kaynağı da kullanılır.

AHÖ sol tarafında bulunan lazerden çıkan ışın lazerle aynı yönde dümdüz giderek bu kanaldan tek sıra halinde geçen hücrelere çarpar ve foton enerjisi açığa çıkar. Etrafa yayılan ışınlar "forward scatter channel" (FSC) denilen bir lens yardımıyla toplanır. FSC dedektörü hücrenin boyutu hakkında bilgi verir. Uyarılan ışığa yaklaşık 90° açıyla yayılan ışığın ölçülmesiyle ise "side scatter channel" (SSC) olarak adlandırılır. SSC partiküllerin granüler içerikleri, iç yapısı hakkında bilgi verir. Antikorlar aracılığıyla antijeni göstermek için kullanılan renkli maddelere fluorokrom maddeler (floresan antikor) denir (211, 212). Floresan filtreler ve detektörler yardımıyla bunların şiddeti ölçülür.

AHÖ yardımıyla hücre ya da partikülün immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi edinilebilir. AHÖ en çok hematoloji alanında kullanılır:

- Lösemik hücrelerin immunfenotiplemesi,
- Hücrenin DNA içeriğinin ve hücre döngüsünün analizi,
- Hematopoetik kök hücrelerin sayılması ve alt gruplarının belirlenmesi,
- Hücre canlılığının tespit edilmesi, apoptoz ile ilgili araştırmalar,
- Çoklu ilaç direncinin tespit edilmesi,
- Hücresel immun yanıtın belirlenmesi,
- Trombosit çalışmaları (213).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Çalışma grupları

Bu çalışma için Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Araştırmalar Ön Değerlendirme Komisyonundan onay alınmıştır. Bu tezde iki çalışma grubu vardır: Tip 2 Diyabetik grup ve sağlıklı kontrol grup. Çalışmaya dahil olan kişilerin her biri bilgilendirilmiş ve onayı alınmıştır. Hastalar ve sağlıklı kişiler kan verdikleri günden en az bir hafta öncesinde aspirin ve benzeri herhangi bir antikoagülan ilaç almamıştı.

Kontrol grubu 21 sağlıklı ve gönüllü kişiden oluşmuştur. Bu kişilerin açlık kan glukoz düzeyleri 100 mg/dL'nin altındadır. Diyabetik grup Yeditepe Üniversite Hastanesi Endokrinoloji Bölümünde takip edilen 24 Tip 2 diabetes mellituslu erişkin hastadan oluşmuştur. Yrd. Doç. Dr. Hasan Aydın tarafından Tip 2 diabet mellitus tanısı konmuş ve izlenmekte olan hastalardan, rutin kontrol amacıyla alınmış kan örneklerinin bir kısmı bu çalışmada kullanılmıştır.

-Diyabetli gruba dahil edilme kriterleri: Tip 2 diabet mellitus tanısı almış olmak.

-Diyabetli ve kontrol gruptan hariç tutulma kriterleri: Bir hafta içinde antikoagülan ilaç kullanmış olmak.

5.2. Kan Örnekleri

Hastalardan ve kontrol grubundan 1:9 oranında sitratlı tüplere (mavi kapaklı) en az 2x2 mL venöz kan örneği alındı. Açlık kan örneği olması tercih edildi. Alınan kan örneklerinde derhal trombosit izolasyonu yapıldı.

5.3. Kimyasal Maddeler

	<u>Marka</u>
Apiraz	Sigma
Fetal Sığır Serum (FBS)	Hyclone
Fosfat tamponlu salin (PBS)	Hyclone
Adenozin difosfat (ADP)	Chrono-PAR
İnsan Axl proteinine karşı monoklonal antikor (Fare)	R&D
İnsan Tyro3(Sky) proteinine karşı monoklonal antikor (Fare)	R&D
İnsan Mer proteinine karşı monoklonal antikor (Fare)	R&D
Sekonder antikor -Floresan etiketli Fare Ig (Keçi)	Santa Cruz Biotechnology
FITC- İşaretli insan CD 41'e karşı antikor	BioLegend
QIFI kit FITC Konjuge Kantitasyon Kalibrasyon Kiti	Dako

5.4. Cihaz ve Gereçler

<u>Cihaz ve gereçler</u>	<u>Marka</u>
Akan hücre ölçer	Beckman Culter Cytomics FC 500
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Rotina 38

5.5. Trombosit İzolasyonu

Çözeltiler

- %1'lik PBS içinde hazırlanmış, %2'lik FBS çözeltisi,
- Apiraz çözeltisi: Orijinal ambalajında liyofilize halde bulunan apiraz, 500 U/mL konsantrasyonda olacak şekilde suyla sulandırıldı. Sonra 10 µL'lik bölümlere ayrılarak -20°C'de saklandı. Bu stok çözeltiden 1/100 oranında distile su ile seyreltilerek çalışma çözeltisi hazırlandı (10 µL stok apiraz çözeltisi + 990 µL distile su). Bu çözelti + 4°C'de saklandı.

Yöntem

- Hastalardan veya sağlıklı kontrol gruptan 1:9 oranında alınan sitratlı venöz kan örneği, 1100 rpm (210 x g) de 10 dakika santrifüj edildi. Eritrosit ve lökositler çöktürüldü.

- Trombositten zengin plazma (platelet rich plasma-PRP) 5 mL'lik santrifüj tübüne aktarıldı.

- PRP üzerine 10 µL/mL olacak şekilde apiraz çalışma çözeltisi eklendi ve 37°C 15 dakika inkübasyona bırakıldı.

- İnkübasyondan alınan örnek, 10 adet falkon tüpüne 100'er µL olacak şekilde dağıtıldı. Her bir tübe 1 mL %2 FBS içeren PBS çözeltisi eklendi ve daha sonra hafif şekilde vorteks karıştırıcıda karıştırıldı. 3000 rpm (1570 x g) de 5 dakika santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırıldı. Daha sonra çökeltiliyi oluşturan trombositler üzerine 1 mL %2 FBS içeren PBS çözeltisi eklenerek süspansiyon hazırlandı. Santrifüj edildikten sonra üst faz tekrar atıldı. Böylece tek bir olguya ait trombosit çökeltilisini içeren 10 ayrı tüp hazırlanmış oldu (Şekil 12).

5.6. Akan Hücre Ölçer Yöntemiyle Reseptörlerin Analizi

Çözeltiler

- Stok Sekonder antikor-Floresan etiketli Fare Ig (Keçi) antikor çözeltisi: Orijinal ambalajında sıvı halde bulunan GAM-FITC sekonder antikor çözeltisi, mikro PCR tüplerine 5'er µL olarak ayrıldı ve + 4°C saklandı. Her çalışma gününde bunlar distile su ile 1:10 oranında seyreltildi ve taze olarak kullanıldı.

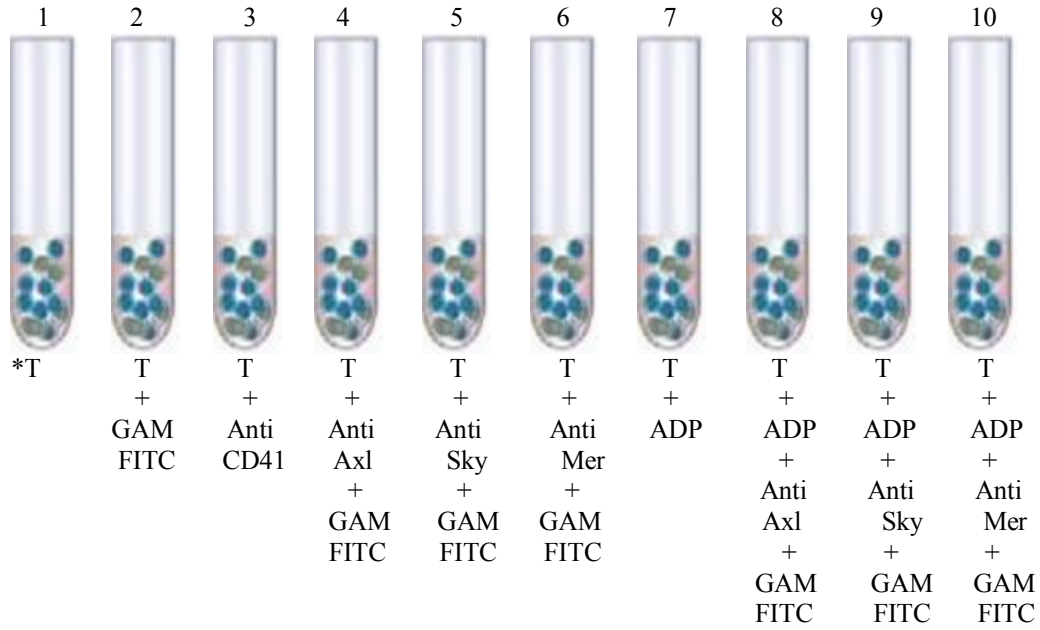
- İnsan Ax1 proteinine karşı farede üretilen monoklonal antikor çözeltisi: Orijinal ambalajında 500 µg/mL konsantrasyonda sıvı halde bulunan antikor çözeltisinden, 100'er µL mikro PCR tüplerine ayrıldı ve - 20°C'de saklandı.

- İnsan Tyro3 (Sky) proteinine karşı farede üretilen monoklonal antikor çözeltisi: Orijinal ambalajında 500 µg/mL konsantrasyonda sıvı halde bulunan antikor çözeltisinden 100'er µL mikro PCR tüplerine ayrıldı ve - 20°C'de saklandı.

- İnsan Mer proteinine karşı farede üretilen monoklonal antikor çözeltisi: Orijinal ambalajında 500 µg/mL konsantrasyonda sıvı halde bulunan antikor çözeltisinden 100'er µL mikro PCR tüplerine ayrıldı ve - 20°C'de saklandı.

- FITC- İşaretli insan CD 41'e karşı antikor çözeltisi: Orijinal ambalajında sıvı halde bulunan antikor çözeltisi seyreltilmeksizin kullanıldı.

- ADP: Orijinal olarak her bir küçük şişede liyofilize halde bulunan 2,5 mg ADP üzerine, 5 mL serum fizyolojikle eklendi. 10 dakika bekletildi, karıştırıldı ve sonra 50'şer µL'lik bölümlere ayrılarak - 20°C'de saklandı.



Şekil 12. Akan hücre ölçerde analize hazırlanan tüpler (*Trombositler)

Yöntem

Akan hücre ölçerde (AHÖ) analiz edilmek üzere şekilde görülen 10 tüpte aşağıdaki işlemler yapıldı.

1. Tüp: Bu tübe 400 µL FBS içeren PBS çözelti eklenerek süspansiyon edildi. Hiç bir antikor ilavesi yapılmadı. Akan hücre ölçerde ölçüm yapılmaya kadar +4°C'de saklandı. Bu süre hiçbir zaman 1 saati geçmedi.

Aşağıdaki 2., 3., 4., 5. ve 6. tüplerde bulunan trombositler üzerine, aktive edici hiçbir reaktif eklenmedi. 7., 8., 9. ve 10. tüplerde bulunan trombositler önce ADP ile aktive edildi sonra tüplere farklı antikorlar eklendi:

2. Tüp: 5 µL GAM- FITC sekonder antikor çözeltisi,

3. Tüp: 10 µL FITC- İşaretli insan CD 41'e karşı antikor,

4. Tüp: 20 µL İnsan Axl proteinine karşı farenden elde edilen monoklonal antikor çözeltisi,

5. Tüp: 20 µL İnsan Tyro3 (Sky) proteinine karşı farenden elde edilen monoklonal antikor çözeltisi,

6. Tüp: 20 µL İnsan Mer proteinine karşı farenden elde edilen monoklonal antikor çözeltisi.

Yukardaki tüpler hafifçe karıştırıldı ve oda sıcaklığında 15 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

7., 8., 9. ve 10. tüplerdeki trombositlerin üzerine önce 500'er µL FBS içeren PBS çözeltisi eklendi. Daha sonra 5 µL ADP eklenerek 15 dakika 37°C su banyosunda inkübe edildi. Böylece trombositler aktive edilmiş oldu.

-İnkübasyon sonrası 2.-10. tüplere 1 mL FBS içeren PBS çözeltisi eklenip karıştırıldı ve 3000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz atıldı.

2. tüpte bulunan trombosit çökeltisi üzerine 1 mL FBS içeren PBS çözeltisi eklenerek süspanse edildi. Bir kere daha 3000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve üst faz atıldı. 400 µL FBS içeren PBS çözeltisi eklendi ve AHÖ'de okunmak üzere +4°C'ye kaldırıldı.

Sonra sadece 3. ve 7. tüplere 400'er µL FBS içeren PBS çözeltisi eklendi ve AHÖ'de okunmak üzere +4°C'ye kaldırıldı.

4., 5. ve 6. tüplere 5'er µL GAM- FITC antikor çözeltisi; 8. tüpe 20 µL Axl; 9. tüpe 20 µL Sky; 10. tüpe 20 µL Mer antikor çözeltisi eklendi. Bu tüplerin her biri hafifçe karıştırıldı ve karanlıkta oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Sonra bunlar 1 mL FBS içeren PBS çözeltisiyle yıkandı. 3000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Sonra yıkama işlemi 4., 5. ve 6. tüpler için bir kez daha tekrarlandı. Tüplere 400 µL FBS içeren PBS çözeltisi eklendi ve AHÖ'de okunmak üzere +4°C'ye kaldırıldı.

8., 9. ve 10. tüplerde bulunan trombosit çökeltisi üzerine 5'er µL GAM- FITC antikor çözeltisi eklendi. Hafifçe karıştırıldı ve oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüplere 1 mL FBS içeren PBS çözeltisiyle yıkandı ve 3000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz atıldı. Sonra yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı. Çökelti üzerine 400 µL FBS içeren PBS çözeltisi eklenerek trombositler süspanse edildi.

1.-10. Tüplerin hepsi akan hücre ölçerde analiz edildi. 1. tüp trombosit kapısı alınmak için kullanıldı. 3. tüp CD41 antikorunu içerdiği için trombositlerin spesifikliğini belirlemede kullanıldı. 2. tüpte primer antikor bulunmadığı ve sadece sekonder antikor bulunduğu için negatif kontrol olarak kullanıldı. 7. tüp sadece ADP içeriyordu.

Her bir tübün içindeki reaktifler tablo 4'de özetlenmiştir.

Tablo 4. 1- 10 tüplerde bulunan antikorların gösterimi

	1. Tüp	2. Tüp	3. Tüp	4. Tüp	5. Tüp	6. Tüp	7. Tüp	8. Tüp	9. Tüp	10. Tüp
*T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GAM-FITC	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Anti-CD41	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ADP	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Anti-AXL	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Anti-SKY	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Anti-MER	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+

*Trombosit

5.7. Antikorların Optimizasyon ve Titrasyonu

Tyro3 (Sky) , Axl ve Mer antikor dilüsyon oranlarını optimize etmek için antikor titrasyonu yapıldı. Tyro3 (Sky) , Axl ve Mer reseptör antikorlarının stok çözeltilerinden (500 µg/mL) bir dizi dilüsyon yapıldı: 100 µg/mL, 80 µg/mL, 40 µg/mL, 30 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL. Tyro3 (Sky) için 30 µg/mL, Axl için 10 µg/mL ve Mer için 10 µg/mL olacak şekilde optimum antikor konsantrasyonları seçildi.

5.8. QIFIKit'le Reseptör Sayılarının Hesaplanması

- Testin prensibi:

QIFIKit, immunofloresans ölçüm esasına dayanarak hücre yüzey antijenlerinin akan hücre ölçerle kantitatif tayininde kullanılır. QIFI kitin içinde “set-up” boncukları, kalibrasyon boncukları ve FITC konjugatı vardır. Boncuklara 5 farklı oranda antikor bağlanmıştır. Bu boncukların her biri yaklaşık 10 µm çapındadır. Boncuklara bağlanmış monoklonal antikorların, molekül sayısına oranı 1,800–530,000 arasındadır. Bu boncuklar monoklonal antikorlarla işaretlenmiş hücreleri taklit eder şekilde dizayn edilmiştir. Boncukların antikor bağlama kapasiteleriyle, trombositlerin antikor bağlama kapasiteleri birbiriyle karşılaştırılarak, trombosit başına düşen ortalama reseptör sayısı hesaplanmıştır.

- Antijen bağlama kapasitesinin ölçülmesi:

Antikor Bağlama Kapasitesi (ABC): Her bir hücrenin bağladığı primer monoklonal antikor sayısı, bilinen konsantrasyonda floresan bağlama kapasitesi olan mikroboncuklar aracılığıyla hesaplanmıştır.

Bir örnek üzerinden şöyle anlatılabilir: FITC bağlı CD41-antikoruyla elde edilen pozitiflik değerinin ortalama kanal sayısı 10; 10 değerine en yakın boncuk grubu (10,000 antikor bağlama bölgesi olan) için elde edilen değer 12 ise hesaplama için doğru orantı kullanılır: Ortalama kanal değeri 12 olan boncuklarda 10,000 antikor bağlama bölgesi varsa, ortalama kanal sayısı 10 olan CD41 için kaç antikor bağlama bölgesi (reseptörü) vardır? Buna göre sonuç 8,333 bağlanma bölgesidir.

AHÖ'de kullandığımız QIFI kit yardımıyla sağlıklı kontrol ve diyabetik olgulardaki trombosit reseptörlerinin antikor bağlama kapasiteleriyle TAM reseptör sayıları hesaplandı.

Çözeltiler

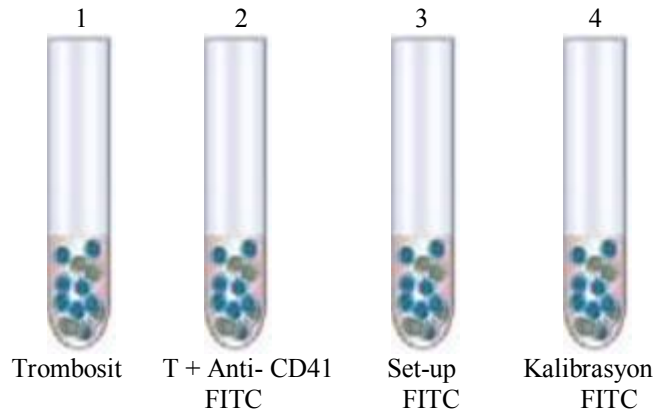
- %1'lik PBS içinde hazırlanmış olan %2'lik FBS çözeltisi

- FITC konjugatı çalışma çözeltisi: Kit içinde orijinal ambajında sıvı haldedir.

Her seferinde %1'lik PBS ile 1:50 dilüe edilerek kullanıldı.

Yöntem

- Sitratlı tüpe alınan kan örneği 1100 rpm de 10 dakika sanrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen PRP den 100'er µL tüplere dağıtıldı.



Şekil 13. 1.-4. tüplerde bulunan reaktifler

- Bu tüplerden 1. ve 2. tübe 1 mL FBS içeren PBS çözeltisi eklendi ve karıştırıldı. 150 x g de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst fazlar atıldı. Bu işlem bir kere daha tekrarlandı.

- Trombosit çökeltisi üzerine şekil 13'de görülen ve içinde sadece trombosit bulunan 1. tübe 400 µL FBS içeren PBS eklendi ve +4°C'ye kaldırıldı. 2. tübe 20 µL Anti- CD41 antikorunu eklendi. 30 dakika +4°C'de karanlıkta inkübasyona kaldırıldı.

- Yıkama işlemi; İnkübasyon sonrası 2. tübe 3 mL FBS içeren PBS çözeltisi eklendi ve yavaşça vorteks karıştırıcıda karıştırıldı. 300 x g de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz 50 µL kalacak şekilde aspire edildi.

- Yıkama işlemi bir kere daha tekrarlandı.

- FITC konjugatı çalışma çözeltisinden 100 µL alarak (2. tübe) eklendi ve +4°C'de 45 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

- İnkübasyon sonrası 3 mL FBS içeren PBS eklenerek yıkandı ve yıkama işlemi iki kere tekrarlandı. Üst fazlar atıldı. Son olarak 2. tübe 400 µL FBS içeren PBS çözeltisi eklendi ve AHÖ'de inceleninceye kadar +4°C'de saklandı.

3. ve 4. tüpler:

- 3. tüpe 100 µL "set-up" boncukları, 4. tüpe 100 µL kalibrasyon boncukları eklendi ve iki kere yıkama işlemi uygulandı. Üst faz atıldı.

- Dilüe edilen FITC konjugat, her bir tübe (3. ve 4. tüplere) 100'er µL eklendi ve +4°C'de 45 dakika karanlıkta inkübasyona kaldırıldı.

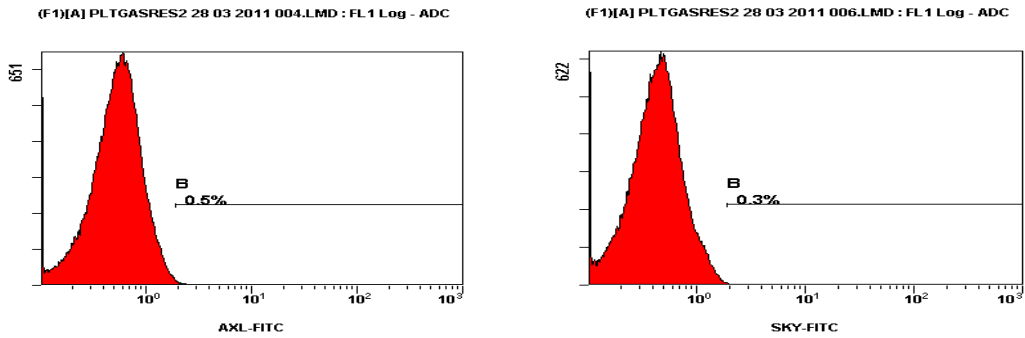
- Daha önce 1. ve 2. tüplere uygulandığı şekilde 3. ve 4. tüplere de yıkama işlemi iki kere uygulandı. Sonra 400 µL FBS içeren PBS çözeltisi eklendi. Tüplerin AHÖ'de analizi yapıldı.

5.9. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada istatistiksel analizler SPSS 11.5 (statistical packages for social sciences) paket programı ile yapılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel yöntemlerin (ortalama, standart sapma) yanı sıra, ikili grupların karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi ve Shapiro-Wilk testi kullanılmıştır. Sonuçların istatistiksel anlamlılığı için $p < 0.05$ düzeyi esas alınmıştır.

spesifik antikorlar eklenerek materyal metod bölümünde detayları anlatıldığı şekilde bir dizi deney yapıldı. Ölçüm yöntemlerinin optimizasyonu için önce antikor titrasyonları gerçekleştirildi.

Sağlıklı gruptan bu reseptör ölçümleriyle ilgili olarak elde edilen histogramlardan bir tanesi örnek alınarak şekil 15’de görülmektedir. (Trombositler aktive edilmeden önce).

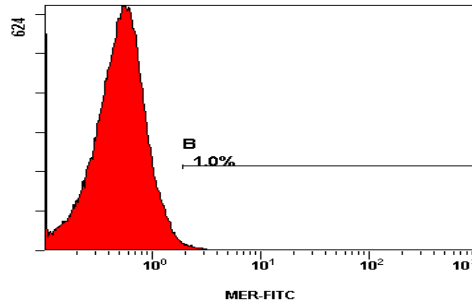


a

b

Region	Number	% Total	% Gated	X mean	Region	Number	% Total	% Gated	X mean
ALL	89208	89.21	100.0	0.607	ALL	86595	86.59	100.00	0.49
B	431	0.43	0.48	4.08	B	237	0.24	0.27	8.24

(F1)[A] PLTGASRES2 28 03 2011 005.LMD : FL1 Log - ADC

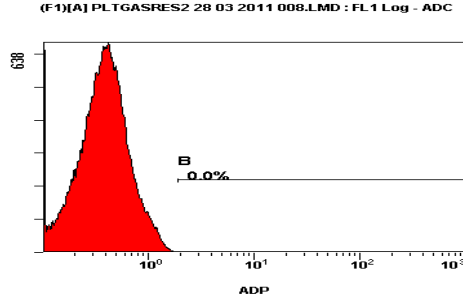


c

Region	Number	% Total	% Gated	X mean
ALL	88743	88.74	100.00	0.64
B	853	0.85	0.96	5.01

Şekil 15. Sağlıklı gruptan bir olguya ait aktive edilmemiş trombositlerdeki yüzey reseptör ölçümleri: a) Axl, b) Tyro3 (Sky), c) Mer.

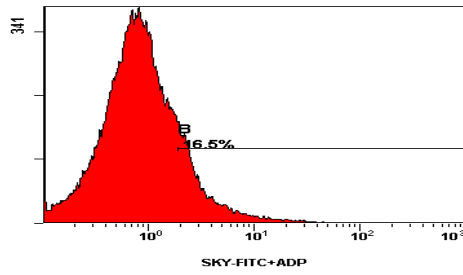
Şekil 15’deki bulgular aktive edilmemiş trombositlere ait bulgulardır. Aynı olgunun ADP’yle aktive edilmiş trombosit yüzeyindeki reseptörlere ait histogramlar şekil 16’de görülmektedir.



a

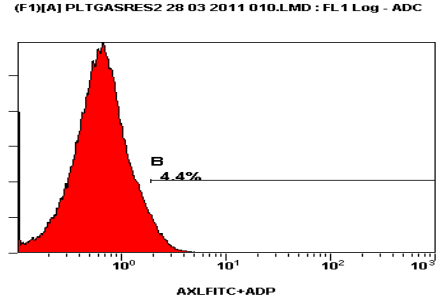
Region	Number	% Total	% Gated	X mean
ALL	88250	88.25	100.00	0.42
B	28	0.03	0.03	2.92

(F1)[A] PLTGASRES2 28 03 2011 012.LMD : FL1 Log - ADC



c

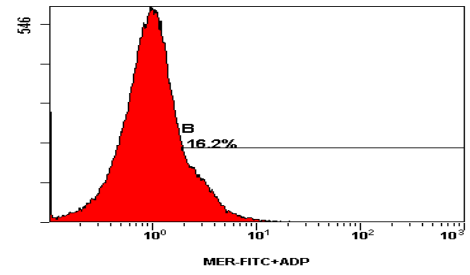
Region	Number	% Total	% Gated	X mean
ALL	69192	69.19	100.00	2.23
B	11447	11.45	16.54	9.73



b

Region	Number	% Total	% Gated	X mean
ALL	89669	89.67	100.00	0.826
B	3917	3.92	4.37	7.75

(F1)[A] PLTGASRES2 28 03 2011 011.LMD : FL1 Log - ADC



d

Region	Number	% Total	% Gated	X mean
ALL	86722	86.72	100.00	1.56
B	14039	14.04	16.19	10.6

Şekil 16. Sağlıklı gruptan bir olguya ait ADP ile aktive edilmiş trombositlerdeki yüzey reseptör ölçümleri: a) ADP kontrol (hiç antikor içermiyor), b) Axl, c) Tyro3 (Sky), d) Mer.

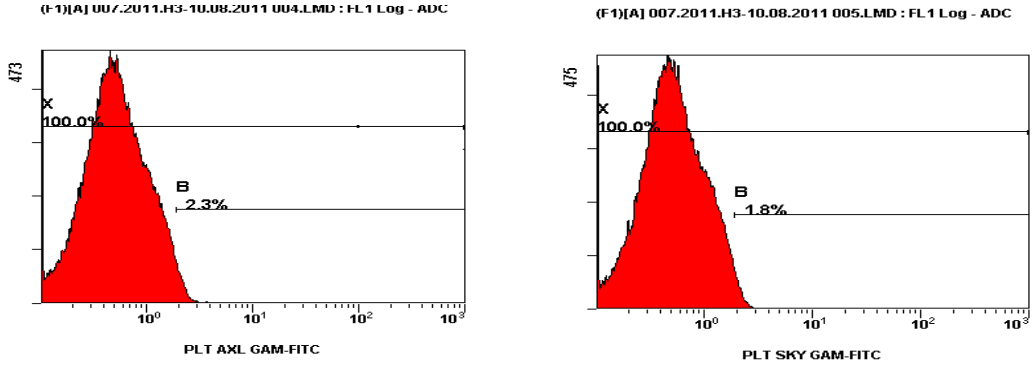
Kontrol grubuna ait AHÖ den elde edilen ortalama kanal sayısı (X mean) tablo 5’de görülmektedir.

Tablo 5. Kontrol grubuna ait AHÖ'den elde edilen ortalama kanal sayısı (X mean)

Trombosit yüzeyindeki TAM reseptörlerine ait Ortalama kanal sayısı (X mean)							
		Aktive olmamış trombositler			ADP ile aktive olmuş trombositler		
*K/E		Axl	Sky	Mer	Axl	Sky	Mer
1	K	15	21.9	50.4	25.5	25.8	46.2
2	K	4.98	32.9	16.1	59.4	20.4	18.2
3	K	4.43	4.8	5.9	5.0	4.1	4.3
4	K	4.0	3.5	3.5	6.7	16.8	7.2
5	K	4.1	3.8	4.3	3.7	4.6	3.9
6	K	5.1	5.2	4.8	3.2	5.7	3.5
7	E	6.8	6.7	7.0	3.5	10.6	5.8
8	K	4.8	8.2	5.1	7.7	9.7	10.6
9	E	4.2	3.7	3.8	3.1	10.4	15.2
10	K	17.4	9.2	16.9	14.2	4.9	18.0
11	K	5.3	2.5	3.1	4.7	6.6	3.6
12	K	15.2	2.5	2.4	11.0	7.8	10.9
13	K	3.0	3.0	3.3	3.3	3.1	3.2
14	K	2.9	3.4	3.0	3.3	3.0	3.2
15	K	2.4	2.4	2.5	2.7	2.6	2.6
16	K	3.2	3.2	3.3	3.0	3.2	3.1
17	K	6.9	5.2	3.0	6.3	7.5	6.8
18	K	4.9	5.2	4.6	8.8	9.4	6.0
19	K	5.2	8.0	4.3	6.6	9.6	9.0
20	E	7.4	7.3	6.8	4.5	7.0	4.4
21	E	3.3	4.1	4.2	3.9	5.1	3.8

* K/E: Kadın/ Erkek

Aktive olmamış trombosit reseptör ölçümleriyle ilgili olarak Tip 2 diyabetik gruptan bir olguya ait histogramlar şekil 17'de görülmektedir.

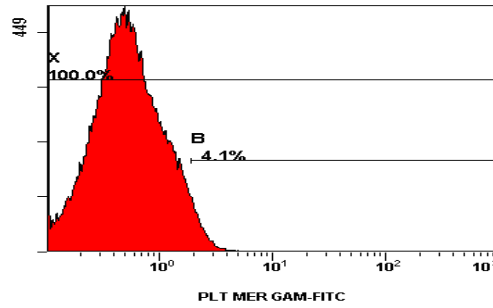


a

b

Region	Number	% Total	% Gated	X mean	Region	Number	% Total	% Gated	X mean
ALL	85115	85.11	100.00	0.685	ALL	85010	85.01	100.00	0.661
B	1927	1.93	2.26	4.99	B	1542	1.54	1.81	4.43

(F1)[A] 007.2011.H3-10.08.2011 006.LMD : FL1 Log - ADC

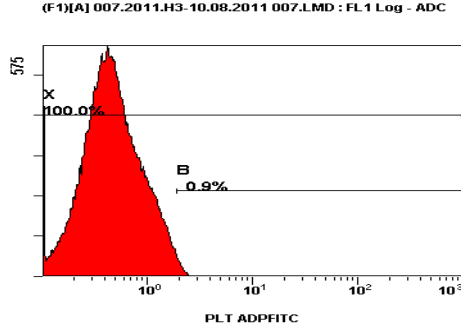


c

Region	Number	% Total	% Gated	X mean
ALL	85062	85.06	100.00	0.792
B	3477	3.48	4.09	5.71

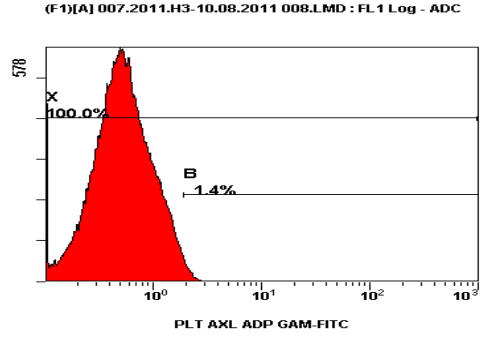
Şekil 17. Tip 2 diyabetik gruptan bir olguya ait aktive edilmemiş trombositlerdeki yüzey reseptör ölçümleri: a) Axl, b) Tyro3 (Sky), c) Mer.

Şekil 17'deki bulgular aktive edilmemiş trombositlere ait bulgulardı. Aynı olgunun ADP'yle aktive edilmiş trombosit yüzeyindeki reseptörlere ait histogramlar şekil 18'de görülmektedir.



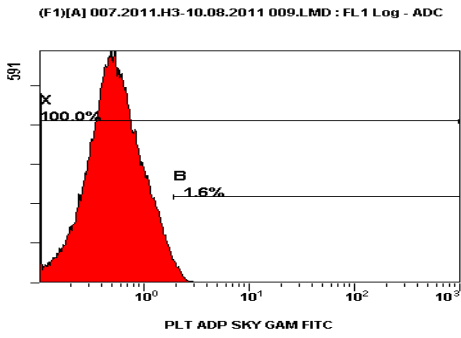
a

Region	Number	% Total	% Gated	X mean
ALL	92181	92.18	100.00	0.559
B	874	0.87	0.95	2.14



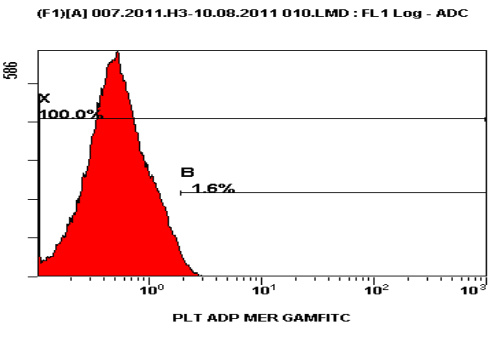
b

Region	Number	% Total	% Gated	X mean
ALL	92310	92.31	100.00	0.655
B	1254	1.25	1.36	5.16



c

Region	Number	% Total	% Gated	X mean
ALL	93542	93.54	100.00	0.688
B	1484	1.48	1.59	6.77



d

Region	Number	% Total	% Gated	X mean
ALL	92515	92.52	100.00	0.656
B	1515	1.51	1.64	4.92

Şekil 18. Tip 2 diyabetik gruptan bir olguya ait ADP ile aktive edilmiş trombositlerdeki yüzey reseptör ölçümleri: a) ADP kontrol (hiç antikor içermiyor), b) Axl, c) Tyro3 (Sky), d) Mer.

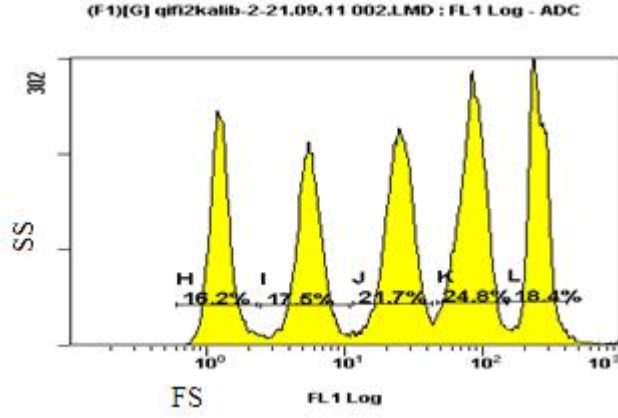
Diyabetik gruba ait AHÖ den elde edilen ortalama kanal sayısı (X mean) tablo 6'da görülmektedir.

Tablo 6. Diyabetik gruba ait AHÖ'den elde edilen ortalama kanal sayısı (X mean)

Trombosit yüzeyindeki TAM reseptörlerinin Ortalama kanal sayısı (X mean)							
		Aktive olmamış trombositler			ADP ile aktive olmuş trombositler		
*K/E		Axl	Sky	Mer	Axl	Sky	Mer
1	E	55.0	74.6	82.0	94.1	53.8	90.5
2	E	92.6	49.7	27.7	80.7	38.1	64.2
3	K	33.1	14.0	13.7	19.3	59.7	23.0
4	E	4.9	4.4	5.7	5.2	6.8	4.9
5	E	4.4	7.8	5.5	6.4	9.1	8.4
6	E	5.5	4.9	4.8	5.3	4.3	4.6
7	K	4.8	4.7	4.9	4.4	4.5	4.3
8	E	4.5	3.6	5.1	5.7	4.2	3.7
9	E	6.2	4.2	4.8	5.8	2.8	5.3
10	K	5.2	3.7	3.9	4.7	4.0	3.9
11	K	16.7	17.9	14.5	16.2	19.8	18.1
12	K	4.6	4.4	4.2	4.5	4.5	5.2
13	E	3.9	3.9	4.3	4.5	5.0	4.9
14	E	4.3	4.0	4.0	6.0	6.7	12.0
15	K	3.2	3.4	3.6	3.2	3.2	3.2
16	E	4.0	4.1	3.9	3.6	3.7	3.5
17	E	3.8	4.2	3.9	23.5	19.5	23.6
18	E	5.4	5.7	5.5	5.6	6.3	5.1
19	K	4.7	4.9	4.6	4.4	3.8	4.0
20	K	4.1	3.8	4.3	3.7	4.6	3.9
21	K	4.6	8.7	4.7	11.2	6.3	16.6
22	K	13.6	13.0	9.17	5.0	7.0	4.63
23	K	13.3	3.0	4.1	4.1	4.5	5.1
24	E	3.4	3.5	3.9	6.9	6.6	7.4

* K/E: Kadın/ Erkek

QIFI kit yardımıyla sağlıklı kontrol ve diyabetik olgulardaki trombosit yüzey reseptörlerinin miktarı hesaplandı. Kalibrasyon boncukları için AHÖ'de elde edilen histogramlar şekil 19'da görülmektedir. Buradan elde edilen ortalama kanal sayıları kullanılarak önce antikor bağlama kapasitesi hesaplandı.



Region	Number	% Total	% Gated	X mean
ALL	69293	69.29	100.0	80.7
H	11192	11.19	16.15	1.28
I	12132	12.13	17.51	5.64
J	15016	15.02	21.67	25.3
K	17177	17.18	24.79	85.4
L	12746	12.75	18.39	255

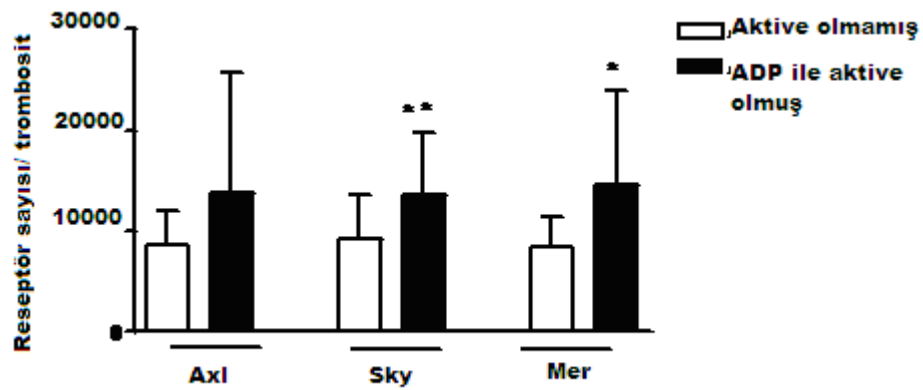
Şekil 19. QIFI kit kurulum ve kalibrasyonu ile elde edilen grafik. (FS: “forward scatter”, SS: “side scatter”).

İki ayrı gruba ait hesaplanan trombosit yüzey reseptör sayıları tablo 7 ve tablo 8’de görülmektedir.

Tablo 7. Kontrol grup için hesaplanan trombosit yüzey reseptör sayıları.

Trombosit yüzeyindeki TAM reseptör sayıları (Reseptör sayısı/trombosit)							
Aktive olmamış trombositler				ADP ile aktive olmuş trombositler			
		Axl	Sky	Mer	Axl	Sky	Mer
1	K	11,907	11,848	10,266	20,211	20,348	24,291
2	K	6,908	12,973	12,780	32,256	16,089	28,708
3	K	6,145	6,658	9,379	13,844	10,142	17,769
4	K	5,576	9,764	9,626	10,738	26,672	22,976
5	K	8,378	7,649	8,661	7,447	9,349	7,872
6	K	10,401	10,664	9,774	6,455	11,595	7,062
7	E	13,720	13,639	14,226	7,103	21,450	11,818
8	K	6,253	6,435	6,658	6,435	6,880	7,589
9	E	8,560	7,406	7,589	6,253	21,046	30,172
10	K	34,539	18,698	33,547	56,923	9,936	35,730
11	K	10,624	3,370	6,233	9,430	13,315	7,325
12	K	30,172	3,383	3,221	22,260	15,764	22,057
13	K	6,071	6,010	6,739	6,597	6,354	6,415
14	K	4,812	6,880	6,071	6,698	6,152	6,496
15	K	3,235	3,262	3,329	9,118	3,492	3,519
16	K	6,415	6,536	6,658	5,990	6,415	6,192
17	K	13,922	10,503	6,071	12,749	15,197	13,700
18	K	9,713	10,563	9,329	17,868	18,961	12,202
19	K	10,422	16,270	8,782	13,255	19,386	18,212
20	E	14,995	14,671	13,801	9,066	14,165	8,985
21	E	6,617	8,277	8,418	7,811	10,341	7,690

K: Kadın; E: Erkek

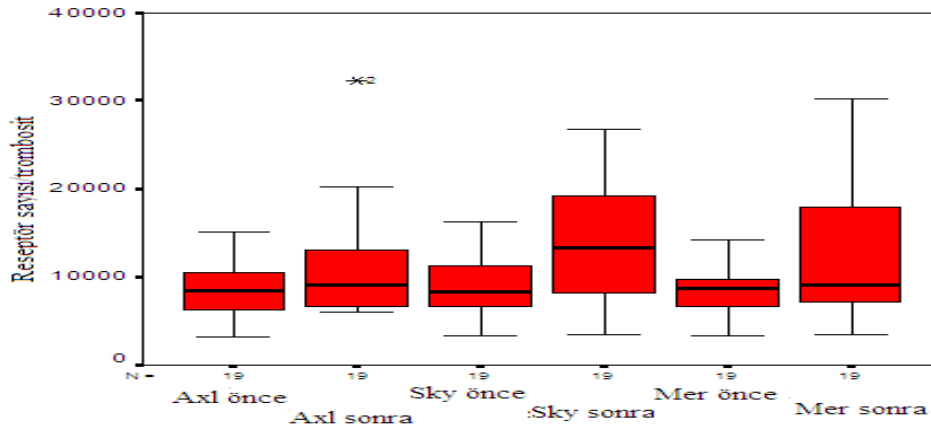


Şekil 20. Sağlıklı grupta aktive edilmemiş ve ADP ile aktive edilmiş trombosit yüzeyindeki TAM reseptör sayıları. (** p=0.004; p<0.05, *p=0.033; p<0.05)

Şekil 20’de sağlıklı gruba ait (n=21) trombosit reseptör sayıları görülmektedir: Aktivasyon öncesi Tyro3 (Sky)=9,308±4,261, Axl için Median=8,378 (25. persantil=6,145-75. persantil=10,624), Mer için Median=8,539 (6,339-9,737)’dir. Aktivasyon sonrası Tyro3 (Sky)=13,478±6,222, Axl için Median=9,117 (6,647-15,856), Mer için Median=11,817 (7,193-22,516) değerleri bulundu.

Aktive olmuş ve aktive olmamış trombosit yüzey reseptör sayılarını karşılaştırmak için istatistiksel analiz yapıldı (Şekil 21). Tyro3 (Sky) için; Shapiro-Wilk testi uygulandı (örnek sayısı <30) ve $p>0.05$ kuralına göre normal dağılım gösterdiği için analizleri Paired Samples testi ile yapıldı. $p=0.004$ olup $p<0.05$, aktivasyon sonrasında Tyro3 (Sky) reseptör sayısında, aktivasyon öncesine göre anlamlı bir fark bulundu.

Axl, Mer için; Shapiro-Wilk testi uygulandı (örnek sayısı <30) $p<0.05$ kuralına göre normal dağılım göstermediği için ortalamaların karşılaştırılmasında nonparametrik test olan Wilcoxon testi yapıldı. Axl için $p=0.243$ ($p>0.05$) Mer için $p=0.033$ ($p<0.05$) bulunmuştur. Aktivasyon sonrasında Axl reseptör sayılarında, aktivasyon öncesine göre anlamlı bir fark bulunamamışken, Mer reseptör sayısında aktivasyon öncesine göre anlamlı bir fark bulunmuştur.

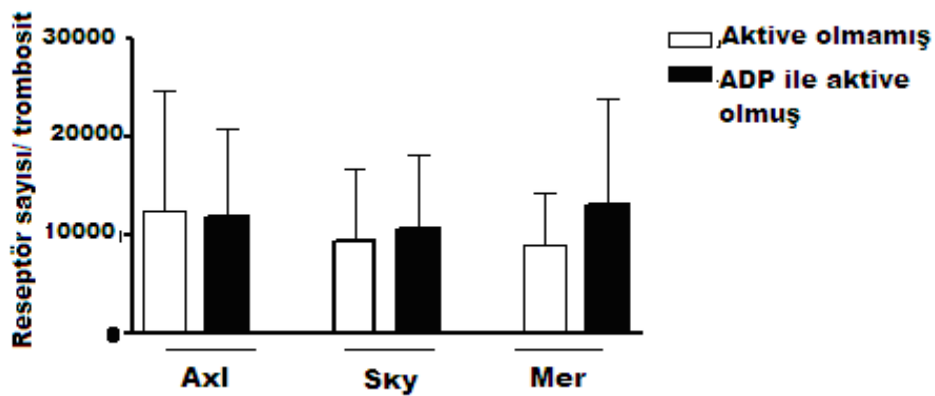


Şekil 21. Kontrol grubunda aktivasyon öncesi ve sonrasında trombosit yüzey reseptör sayıları. Önce: Aktivasyon öncesi. Sonra: ADP ile aktivasyon sonrası.

Tablo 8. Diyabetik grup için hesaplanan trombosit yüzey reseptör sayıları.

Trombosit yüzeyindeki TAM reseptör sayıları (Reseptör sayısı/ trombosit)							
Aktive olmamış trombositler				ADP-Aktive olmuş trombositler			
*K/E	Axl	Sky	Mer	Axl	Sky	Mer	
1	E	89,628	121,568	137,909	158,259	87,672	152,205
2	E	155,736	78,396	43,693	134,882	60,098	104,620
3	K	52,211	22,227	21,750	30,641	97,287	36,280
4	E	6,922	6,145	9,124	8,245	10,818	6,825
5	E	6,076	12,463	8,772	10,242	14,557	13,406
6	E	8,708	6,769	6,589	8,517	6,006	6,436
7	K	6,617	6,478	6,783	6,104	6,256	5,909
8	E	6,298	4,212	8,117	9,108	5,854	4,376
9	E	9,843	5,868	6,603	8,133	4,506	8,533
10	K	7,269	4,318	4,635	6,534	5,507	4,565
11	K	26,513	28,418	23,021	25,720	31,435	28,736
12	K	6,409	6,090	5,757	6,298	6,187	8,277
13	E	4,506	4,565	6,090	6,284	8,021	6,853
14	E	5,979	5,479	5,563	9,619	10,738	19,174
15	K	3,718	3,941	4,235	3,812	3,800	3,741
16	E	5,563	5,660	5,271	4,938	5,174	4,813
17	E	5,313	3,928	5,438	37,068	30,759	37,226
18	E	8,692	9,156	8,836	8,884	10,115	8,165
19	K	6,561	6,839	6,339	6,048	5,230	5,549
20	K	28,584	8,560	8,358	9,309	8,499	9,916
21	K	9,309	17,403	9,511	22,664	12,749	32,951
22	K	26,996	26,056	19,629	9,916	13,963	9,309
23	K	26,401	6,071	8,297	8,094	9,106	10,118
24	E	6,880	7,083	7,892	13,963	13,356	14,975

*K: Kadın; E: Erkek

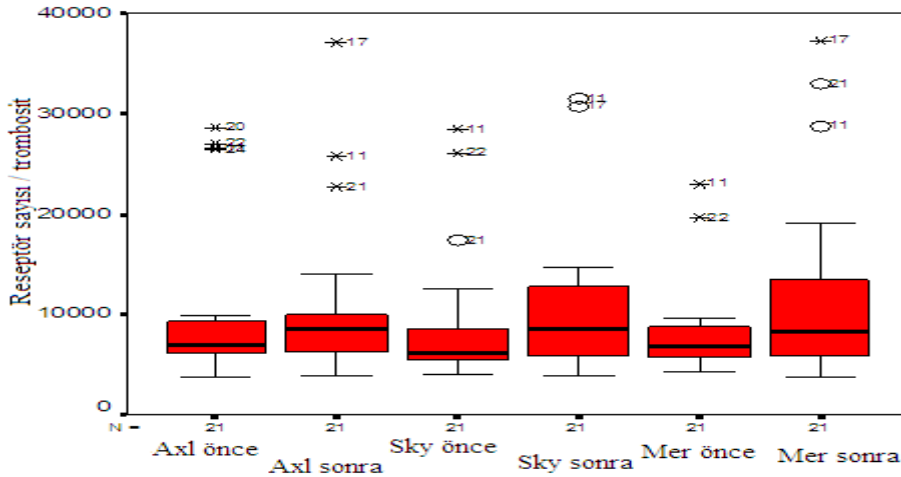


Şekil 22. Tip 2 Diyabetik grupta aktive edilmemiş ve ADP ile aktive edilmiş trombosit yüzeyindeki TAM reseptör sayıları.

Şekil 22’de Tip 2 diyabetik gruba ait (n=24) trombosit reseptör sayıları görülmektedir. Aktivasyon öncesi Tyro3 (Sky) için Median=6,312 (5,251-9,983),

Axl için Median=6,902 (6,051-13,982), Mer için Median=7,338 (5,708-8,908). Aktivasyon sonrasında Tyro3 (Sky) için Median=8,499 (5,680-13,052), Axl için Median=8,700 (6,294-11,172), Mer için Median=8,405 (5,819-16,024) değerleri bulundu.

Aktive olmuş ve aktive olmamış trombosit yüzey reseptör sayılarını karşılaştırmak için istatistiksel analiz yapıldı (Şekil 23). Axl, Mer ve Tyro3 (Sky) için Shapiro-Wilk testi uygulandığında (örnek sayısı <30) $p < 0.05$, normal dağılım göstermemiştir. Bunun için ortalamaların karşılaştırılmasında nonparametrik test olan Wilcoxon testi yapıldı. Axl için $p=0.935$, Tyro3 (Sky) için $p=0.149$, Mer için $p=0.088$ değerleri bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, aktivasyon sonrasındaki Axl, Tyro3 (Sky) ve Mer reseptör sayıları ile aktivasyon öncesindeki reseptör sayıları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 23. Tip 2 diyabetik grupta aktivasyon öncesi ve sonrasında trombosit yüzey reseptör sayıları. Önce: Aktivasyon öncesi. Sonra: ADP ile aktivasyon sonrası

Diyabetik gruptaki reseptör sayıları cinsiyete göre istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Tablo 9). Axl, Mer ve Tyro3 (Sky) için Shapiro-Wilk testi uygulandığında (örnek sayısı <30) $p < 0.05$, normal dağılım göstermemiştir. Bunun için ortalamaların karşılaştırılmasında nonparametrik test olan Mann-Whitney Testi yapıldı. Diyabetik gruptaki reseptör sayılarında kadın-erkek arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$).

Tablo 9. Diyabetik grubun cinsiyete göre istatistiksel karşılaştırılması

		Kadın	Erkek	p değeri
		Reseptör sayısı/ trombosit	Reseptör sayısı/ trombosit	
Axl	<u>*Akt öncesi</u> Median (25.persantil- 75.persantil)	9,309 (6,561–26,996)	6,880 (5,770–9,275)	0.259
	<u>*Akt sonrası</u> Median (25.persantil- 75.persantil)	8,094 (6,103–22,664)	9,107 (8,189–25,515)	0.284
Sky	<u>*Akt öncesi</u> Median (25.persantil- 75.persantil)	6,838 (6,070–22,226)	6,145 (5,022–10,809)	0.505
	<u>*Akt sonrası</u> Ortalama± SD Min-max	8,499 (5,507–13,962)	10,737 (5,930–22,657)	0.622
Mer	<u>*Akt öncesi</u> Median (25.persantil- 75.persantil)	8,296 (5,756– 19,629)	7,892 (5,826–8,980)	0.931
	<u>*Akt sonrası</u> Median (25.persantil- 75.persantil)	9,308 (5,548–28,736)	8,532 (6,630–28,200)	0.582

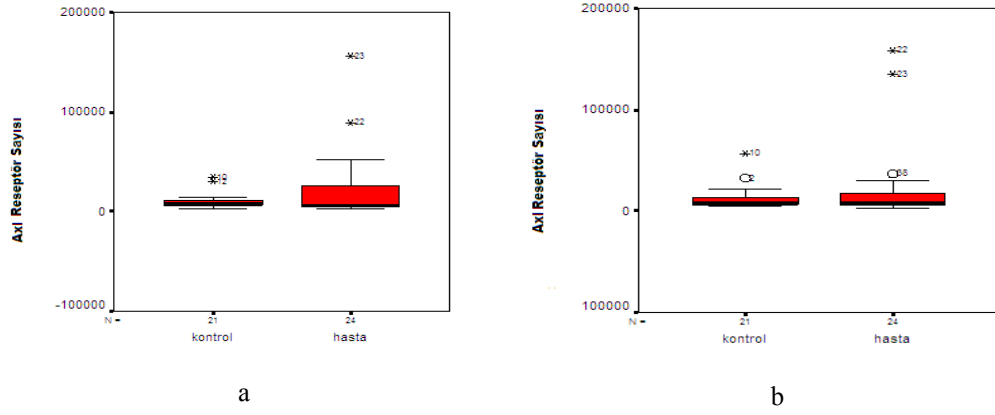
*Akt: Aktivasyon

Diyabetik gruptaki reseptör sayıları kontrol grubuyla istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Şekil 24, 25, 26 ve tablo 10). Axl, Mer ve Tyro3 (Sky) için Shapiro-Wilk testi uygulandığında (örnek sayısı <30) $p < 0.05$, normal dağılım göstermemiştir. Bunun için ortalamaların karşılaştırılmasında nonparametrik test olan Mann-Whitney Testi yapıldı. Kontrol grup ve hasta grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

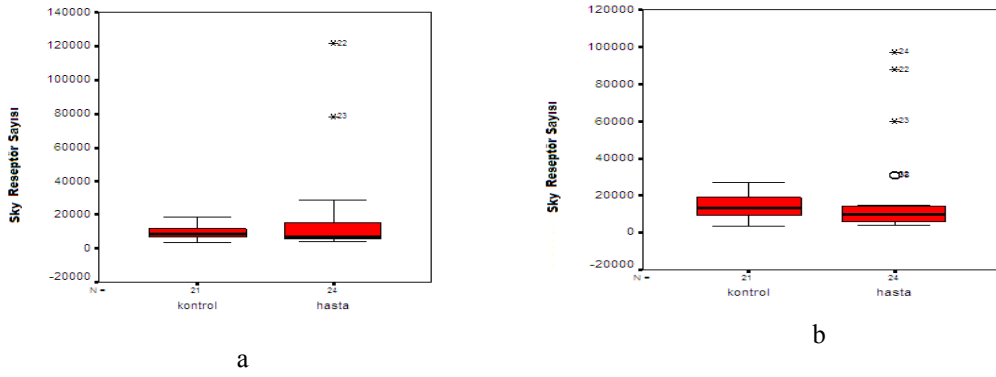
Tablo 10. Kontrol ve hasta grubuna ait trombosit yüzey reseptör sayılarının istatistiksel olarak karşılaştırılması.

		Kontrol Reseptör sayısı/ trombosit	Hasta Reseptör sayısı/ trombosit	p değeri
Axl	<u>*Akt öncesi</u> Median (25.persantil- 75.persantil)	8,378 (6,145-10,624)	6,902 (6,051-13,982)	0.946
	<u>*Akt sonrası</u> Median (25.persantil- 75.persantil)	9,117 (6,647-15,856)	8,700 (6,294-11,172)	0.909
Sky	<u>*Akt öncesi</u> Median (25.persantil- 75.persantil)	Ortalama±SD= 9,308±4,261 Min-Max= 3,262-18,698	6,312 (5,251-9,983)	0.554
	<u>*Akt sonrası</u> Median (25.persantil- 75.persantil)	Ortalama±SD= 13,478±6,222 Min-Max= 3,492-26,672	8,499 (5,680-13,052)	0.237
Mer	<u>*Akt öncesi</u> Median (25.persantil- 75.persantil)	8,539 (6,339-9,737)	7,338 (5,708-8,908)	0.554
	<u>*Akt sonrası</u> Median (25.persantil- 75.persantil)	11,817 (7,193-22,516)	8,405 (5,819-16,024)	0.733

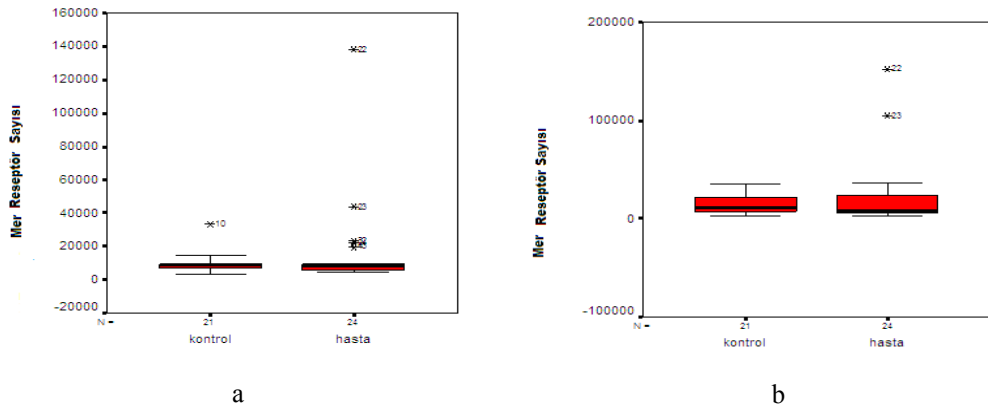
*Akt: Aktivasyon



Şekil 24. Kontrol ve hasta grubunda Ax1 reseptör sayıları, a) aktivasyon öncesi, b) aktivasyon sonrası.



Şekil 25. Kontrol ve hasta grubunda Tyro3 (Sky) reseptör sayıları, a) aktivasyon öncesi, b) aktivasyon sonrası.



Şekil 26. Kontrol ve hasta grubunda Mer reseptör sayıları, a) aktivasyon öncesi, b) aktivasyon sonrası.

6.3. Diyabetik Grupta Biyokimyasal Parametrelerle Reseptör Sayılarının İlişkisi

Diyabetik gruba ait tablo 11’de görülen biyokimyasal değerler, hasta dosyalarından alınarak elde edildi. Bu parametrelerin her biriyle reseptör sayıları arasındaki ilişki istatistiksel olarak incelendi.

Tablo 11. Diyabetik gruba ait biyokimyasal değerler

Diabetes Mellituslu Hastaların Biyokimyasal Değerleri												
K/E	PLG	HbA1C	CRP	LDL	HDL	Trigliserid	Kreatinin	GFR	Glukozüri	MA		
	mg/dL	%	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mL/dak	mg/dL	mg/dL		
1	E	173	7.1	3.1	162	30	145	0.70	128	Negatif	134	
2	E	133	6.2	2.4	154	50	176	0.59	146	Negatif	5.78	
3	E	133	6.1	7.3	147	40	194	0.81	99	Negatif	553	
4	E	127	7.1	2.3	133	43	153	64	1	Negatif	14.8	
5	E	141	8.9	2.4	125	56	87	0.90	93	Negatif		
6	K	122	6.5	2.9	84	96	132	0.47	131	Negatif	11.5	
7	E	122	6.3	11.2	76	44	288	0.78	113	Negatif	75.5	
8	E	175	6.8	0.5	132	45	67	0.69	114	Negatif	13.7	
9	K	142	7.4	21.2	94	45	178	0.66	92	Negatif	9	
10	K	91	5.8	2	119	53	146	0.65	100	Negatif		
11	K	109	6.13	3	95	95	92	0.70	89	Negatif	12.6	
12	E	110	6.3	3.7	53	32	122	0.86	95	Negatif	12.6	
13	E	114	6.0	4.8	148	49	219	0.83	98	100	6.59	
14	K	113	13.1	7.9	107	50	190	0.69	94	Negatif	12	
15	E	150	7.9	4.5	96	34	130	0.74	123	Negatif	15.2	
16	E	289	13.1	1.4	75	68	110	0.76	116	250		
17	E	138	6.1	2.3	54	47	382	1.35	52	Negatif		
18	K	103	5.9	1.5	145	64	49	0.65	92	Negatif	3.93	
19	K	164	7.4	2	70	34	180	0.63	130	Negatif		
20	K	152	7.5	3.8	115	45	101	0.63	100	Negatif	3.65	
21	K	150	6.2	1.4	82	60	170	1.31	39	Negatif	4.61	
22	K	122	6.7	1	119	55	100	0.63	98	Negatif	12.8	
23	E	107	5.1	3.2	143	64	142	0.98	80	Negatif		

K/E: Kadın/Erkek, PLG: Plazma glukoz, GFR: Glomerül filtrasyon hızı, Glukozüri: İdrarda glukoz, MA: Mikroalbuminüri

Hasta grubunun TAM reseptörlerinin aktivasyon öncesi- aktivasyon sonucuna ve biyokimyasal test sonuçlarına göre Spearman's korelasyon testi yapılmıştır. Bu korelasyona göre:

Tablo 12. Diyabetik gruptaki reseptörlerle CRP ve PLG arasındaki korelasyon.

	CRP	PLG
Tyro (Sky) Aktivasyon Öncesi	p=0.008 r=-0.654	p=0.951 r=0.14
Mer Aktivasyon Sonrası	p=0.048 r=-0.518	p=0.318 r=0.229
Axl Aktivasyon sonrası	p=0.383 r=-0.243	p=0.000 r=0.855

CRP: C-reaktif protein; PLG: Açlık kan glukozu

Diyabetik hasta grubunun bazı biyokimyasal test sonuçlarıyla, aktivasyon öncesi ve aktivasyon sonrasındaki TAM reseptör sayılarıyla korelasyon olduğu saptandı: Serum CRP seviyesiyle, aktivasyon sonrasındaki Mer reseptör sayısı arasında negatif bir korelasyon ($r=-0.518$); serum CRP seviyesiyle, aktivasyon öncesi Tyro3 (Sky) reseptör sayısı arasında negatif bir korelasyon ($r=-0.654$); açlık glukozuyla, aktivasyon sonrası Axl reseptör sayısı arasında pozitif bir korelasyon bulundu (korelasyon kat sayısı=0.855).

7. TARTIŞMA

Enflamasyon, koagülopati, kanser, otoimmün hastalıklar, diyabetik vasküler ve renal hastalıklarla Gas6 ve TAM reseptörlerinin ilişkili olduğu bildirilmiştir (186). Bilindiği gibi diyabetin mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonları birçok hastalığa sebep olmaktadır. Mikrovasküler komplikasyonları retinopati, nefropati ve nöropatiye yol açarken, makrovasküler komplikasyonları koroner kalp hastalığı, periferik damar hastalığı ve serebrovasküler bozukluklara yol açmaktadır. Son yıllarda yapılan bazı deneysel hayvan ve temel bilim çalışmaları, diyabetik böbrek ve damar hastalıklarının patogeneğinde Gas6 ve reseptörlerinin rolü olabileceğini düşündürmektedir (197, 213, 214). Diyabetik sıçanların glomerüllerinde, Gas6/TAM ekspresyonunun arttığı ve bunun mezangial ve glomerüler hipertrofiye sebep olduğu bildirilmiştir (197). Gas6 ve onun reseptörü olan Axl'in mezangial hücre proliferasyonunu indükleyerek, diyabetik nefropatinin erken evre patogeneğinde anahtar rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Düz kas hücrelerinde (VKDH) Gas6/TAM sisteminin, düşük glukoz seviyesinde hücrenin hayatta kalma süresini arttırdığı; buna karşılık yüksek glukoz seviyesinde hücre göçünü arttırdığı görüldü (215). Diyabetik hastalarda VKDH göçünün daha fazla olduğu ve diyabette, aterosklerotik lezyonlarda VKDH yığılmasının daha şiddetli olduğu bilinmektedir (213). Bütün bu temel bilim araştırma sonuçları, Gas6 ve TAM reseptörlerinin diyabetin renal ve kardiovasküler komplikasyonlarının meydana gelmesinde rolü olabileceğini işaret etmektedir. Henüz Gas6 ve TAM reseptörlerinin klinik önemiyle ilgili bilgiler çok azdır. Ayrıca diyabetik hastalara ait çeşitli biyokimyasal parametrelerin, bu sistemle ilişkisi olup olmadığı bilinmemektedir.

Dr. Ahmet Rıza Uras danışmanlığında anabilim dalımızla ortak yürütülen bir tıpta uzmanlık tez çalışmasında Dr. Aybala Erek, diyabetik nefropatili hastalardaki plazma Gas6 seviyesiyle mikroalbuminüri arasında bir ilişki olup olmadığını araştırdı (214). Bu çalışmaya 32 mikroalbuminüri diyabetik hasta, 34 mikroalbuminürisi olmayan diyabetik hasta ve 34 sağlıklı kişi kontrol grubu olarak dahil edildi. Plazma Gas6 seviyeleri ELISA yöntemiyle ölçüldü. Üç grup arasında Gas6 açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0.035$). Albuminüri diyabetik hasta grubunda plazma Gas6 seviyeleri (23.5 ± 10.1 ng/ml), albuminüri olmayan diyabetik hasta grubuna (18.5 ± 6.6 ng/ml) göre istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti. Ayrıca

Gas6 ve albüminüri arasında anlamlı pozitif bir korelasyon bulundu ($p=0.003$). Albüminüri ve CRP: albüminüri ve fibrinojen; albüminüri ve HbA1C arasında pozitif bir korelasyon bulundu ($p<0.05$).

Dünyada ve ülkemizde plazma Gas6 seviyesi için şu ana kadar yapılmış kapsamlı bir referans değer belirleme çalışması yoktu. Bu konuda Zeynep Karaca, Fikriye Uras'ın danışmanlığında bir lisansüstü tezi hazırladı (161). Çalışmaya 18-60 yaş aralığında sağlıklı ve gönüllü 249 kişi (126 kadın ve 123 erkek) dahil edildi. Optimizasyon ve validasyonunu yaptığımız bir ELISA metodunu Gas6 ölçümü için kullandık. IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) ve CLSI'nin (Clinical and Laboratory Standards Institute) önerilerine göre parametrik olmayan yöntemle, plazma Gas6 proteininin referans aralığını belirledik. Kadın ve erkek arasında anlamlı fark olmaksızın, yetişkin insan plazmasında Gas6 referans aralığını, %90 güven aralığında; alt sınır (2.5 persantil)=2.39 ng/ml (1.12–3.08) ve üst sınır (97.5 persantil)=18.93 ng/ml (17.99–22.47) olmak üzere belirledik. Bugüne kadar ülkemizde ilk defa yapılmış olan bu tezle, Türkiye'ye ait ilk plazma referans aralık değerlerini belirledik.

Bazı çalışmalar Gas6 ve TAM yolunun, VKDH çoğalmasıyla karakterize ateroskleroz gibi hastalıklarda rolü olabileceğini düşündürüyor. 2008 yılında Cavet ve arkadaşları, farklı glukoz konsantrasyonlarının VKDH'deki Axl sinyali üzerine etkilerini incelediler ve glukozun, Axl sinyalini değiştirdiğini gözlemladiler (215).

2010 yılında Hung Y-J. ve arkadaşları, tip 2 diyabetik hastalarda plazma gas6 seviyesini ölçtüler (216): Çalışma grubu 100 tip 2 diyabetli hasta; 82 bozuk glukoz toleranslı olgu; 96 normal olgudan meydana geliyordu. Plazma gas6 seviyesinin, tip 2 diyabetli hastalarda istatistiksel anlamlı olarak normalden daha düşük olduğunu bildirdiler. Ayrıca bu değerler tümör nekroz faktör (TNF)-alfa, interlökin (IL)-6 ve "vasküler hücre adezyon molekülü" (VCAM)-1 seviyeleriyle de ters orantılıydı. Gas6 seviyesi yükseldikçe, tip 2 diyabet riskinin azaldığını hesapladılar: TNF-alfa, IL-6, hsC-reaktif protein (CRP), E-selektin, "intercellular adhesion molecule-1" ve VCAM-1 seviyeleri de dahil ederek riski yeniden hesapladıklarında, bu ilişkinin daha da güçlü olduğunu gördüler. Bu bulguları, Gas6/TAM yolunun tip 2 diyabet, enflamasyon ve endotel disfonksiyonuyla ilişkili olduğu ve bu olayların patojenezinde önemli bir rol oynayabileceği şeklinde yorumladılar. Hipotezleri

şuydu: Hiperglisemi Gas6/TAM yolu sinyali azaltıyor; bunun sonucunda da Gas6/TAM yolu ve insülin sinyali arasındaki iletişimle, nitrik oksit ve endotelin-1 üretiminde denge bozuluyordu.

2009 yılında Devaraj ve arkadaşları 34 tip 1 diyabetik hastada yaptıkları bir çalışmada plazma gas6 seviyesini ELISA yöntemiyle ölçtüler (217). “Toll-like receptor” 2 (TLR2) ve TLR4 seviyelerini, akım sitometresiyle monositlerde ölçtüler. TLR4 seviyesi diyabetiklerde anlamlı olarak yüksek bulunurken, gas6 seviyesinde normale göre anlamlı bir fark bulmadılar.

Anabilim dalımızda yapılan iki tez çalışmasındaysa, fare ve insan trombositlerinde Gas6 proteini ve reseptörlerinin varlığını, mRNA ve protein seviyesinde araştırıldı (127, 128). Deney hayvanı olarak kullandığımız 25 adet, spesifik patojen içermeyen, 8-10 haftalık, 25-30 gr ağırlığındaki Balb-C ırkı dişi/erkek fare trombositlerinde Gas6 ve TAM reseptörlerine ait mRNA varlığını araştırmak için trombositlerden total RNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra, RT-PZR (Revers transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu) ile Gas6 ve reseptörlerine ait primerler varlığında mRNA ölçümleri yapıldı. GAS6 genine ait 400 bç'lik bölge ile Mer genine ait 238 bç'lik bölgenin amplifikasyonu, fare trombositlerinde GAS6 ve Mer mRNA'sının var olduğunu gösterdi. Buna karşın farklı döngü ve sıcaklıklarda yapılan RT-PZR reaksiyonlarında, Tyro3 (Sky) ve Axl'a ait mRNA varlığı saptanamadı. Özetle, fare trombositlerinde Gas6 ile TAM reseptörlerinden sadece Mer'i kodlayan mRNA'ların var olduğu görüldü. ELISA'yla yapılan ölçümlerde ise Gas6, Axl ve Tyro3 (Sky) protein seviyelerinin, ölçülebilir sınırların altında olduğu tespit edildi. Mer seviyesini farede ölçmek için henüz ticari kit olmadığından onun seviyesi belirlenemedi.

Kronik hafif bir enflamasyon ve immun sistem aktivasyonunun tip 2 diyabet patogeneziyle yakından ilişkili olduğuna dair yayınlar vardır (218). 2001 yılında Lu Q ve Lemke G, dendritik hücreler ve makrofajlardaki enflamatuvar cevabın Gas6/TAM sinyaliyle inhibe olduğunu gösterdiler. Bu bulgular, immunité ve enflamasyonun düzenlenmesinde Gas6'nın bir rolü olabileceğini göstermektedir (175). Üç TAM reseptör geni de susturulmuş farelerde Gas6 seviyesinin düşük; monosit ve makrofajların hiperaktivasyona sahip; monositlerin, lipopolisakkarid

uyarısına TNF-alfa ve IL-6'nın aşırı sekresyonuyla reaksiyon verdiği yayınlandı (219).

Kurohara ve arkadaşlarının obez olmayan farelerde yaptıkları bir araştırmada düşük doz warfarinin, siklofosfamidle oluşturulan diyabet insidansını azalttığını bildirdiler (220). Bilindiği gibi warfarin K vitaminine bağımlı proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonunu durdurarak, onların normal fizyolojik aktivite göstermelerini önlemektedir. Gas6 da bir K vitaminine bağımlı protein olarak bu durumdan etkilenir. Bu yüzden Gas6'nın Tip 1 diyabeti önlemede immunmodülatör olabileceğini öne sürdüler.

Tip 2 diyabetik hastalarda Gas6 c.834 + 7G>A polimorfizminin, düşük kardiovasküler hastalık riskle paralel olduğu rapor edildi (221). Bu polimorfizme sahip olan tip 2 diyabetiklerde, glukoz seviyesinin daha düşük ve plazma gas6 seviyesinin daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu polimorfizmin, tip 2 diyabetten koruyucu etkisi olabileceği öne sürüldü. Bu çalışmada ayrıca şu sonuçlar elde edildi: Genel olarak, bu polimorfizmi taşıyan veya taşımayan, tip 2 diyabetiklerdeki plazma gas6 seviyesi normal gruptan daha düşüktü.

1999 yılında Augustine ve arkadaşları, sürekli şekilde Axl üreten transgenik farelerde hematopoetik malinite gelişmediğini ama sürpriz bir şekilde noninsulin-dependent diyabetes mellitus (NIDDM) geliştiğini yayınladılar (198). Axl ekspresyonu, miyeloid hücrelerde lösemi oluşmasına ya da ilerlemesine yol açmamıştı. Ektopik Axl ekspresyonunun, TNF-alfa üretimindeki endojen modülasyonu indirekt olarak etkileyerek NIDDM fenotipine yol açtığını düşündüler.

2009'da Jiang ve arkadaşları, plazma Gas6 seviyesinin kardiovasküler hastalıklarla, özellikle de akut koroner sendromla ilişkili olduğunu saptadılar (222). Prospektif bulgular, endotel disfonksiyonuyla ateroskleroz ilişkisini göstermektedir, endotel disfonksiyonu aterosklerozda önemli bir basamaktır (223). Endotelial disfonksiyonu hipertansiyon, ateroskleroz, ve koroner kalp hastalıklarını kapsayan kardiovasküler hastalıkları etkiler (224). Endotel hücreleri, lökositler, trombositler ve eritrositler gibi damar içindeki diğer bütün hücrelerle etkileşim içindedir. Bu yüzden trombosit ve lökositlerdeki patolojik değişiklikler, endoteli de etkilemektedir. Son zamanlarda yapılan iki çalışma insanlarda Gas6'nın endotel hücreleri ve lökositlerde sentezlendiğini gösteriyor (225, 226).

Trombosit aktivasyonu ve agregasyonu kardiyovasküler hastalıkların gelişmesinde önemli bir rol oynar. Klinik ve patolojik çalışmalarda, kanda aktive olmuş trombositler ve trombositlerin hiperaktivitesi; akut miyokard enfarktüsü, hiperlipoproteinemi ve diabetes mellitus gibi kardiyovasküler olaylarla yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir. Trombosit aktivasyonu trombosit yüzeyinde bulunan bir ya da daha fazla transmembran reseptörünün stimülasyonu ile sonuçlanan ve trombosit içi sinyal yollarının katılımıyla düzenlenen hemostatik bir mekanizmadır. Trombosit aktivasyonu ve trombus gelişimiyle Gas6'nın rolü olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiş ve Gas6 trombosit fonksiyonun potansiyel bir mediatörü olarak tanımlanmıştır (169). Fare ve insan trombositlerinde Gas6 proteininin var olup olmadığı konusunda birbiriyle çelişkili yayınlar bulunmaktadır. Bazı yayınlar, insan trombositlerinde Gas6'nın var olmadığını bildirirken, bazıları da var olduğu yönündeydi. Gas6'nın trombosit aktivasyon ve agregasyondaki rolünün belirlenmesinin ardından hangi Gas6/reseptör veya reseptörlerinin bu olayda rol oynadığı da araştırılmaya başlandı. Chen ve ark (2004) insan ve fare trombositlerinde Gas6'nın ve Gas6 reseptörlerinden sadece Mer'de bulunduğunu RT-PZR ile göstermişler ve Mer geni taşımayan fare trombositlerinin kollagen ve U46619 agonistlerinin düşük dozlarına cevap vermediklerini göstermişlerdir. Buna karşın ADP'ye cevabın Mer geni taşıyan fare trombositleriyle benzer olduğunu ortaya koymuşlardır (125). Angelillo-Scherer ve ark (2005) ise, Gas6 ve her üç reseptörünün de fare ve insan trombositlerinde bulunduğunu RT-PZR ile göstermişler ve her üç reseptörün eksikliğinde farelerin trombozdan korunduğunu ve trombositlerin agregasyonlarının bozulduğunu belirlemişlerdir. Gas6 geni taşımayan farelerin trombosit agregatlarının normal trombosit agregatlarına göre oldukça gevşek paketlenildiği, az sayıda kontakt noktaları bulunduğu ve tamamen degranüle olmamış trombositlerden oluştuğu da bu çalışmada dikkat çeken önemli noktalardır (170).

Cosemans ve ark (2010) TAM reseptörlerinin trombosit aktivasyonundaki rolünü belirlemek için yaptıkları çalışmada ADP aktivasyonunu takiben Gas6 ve TAM reseptör cevabındaki değişikliklerin fosfatidilinositol 3-kinaz ve integrin GpIIb/IIIa (glikoprotein IIb/IIIa) sinyalleri aracılığıyla tetiklendiğini göstermişlerdir (227). Biz çalışmamızda Gas6 reseptörlerinin trombosit sinyal yollarıyla olan

etkisinden ziyade TAM reseptör ekspresyonunun aktivasyona bağlı oluşan değişiklikleri inceledik. Trombosit aktivasyonu ve buna bağlı reseptör değişikliklerinin belirlendiği çalışmalarda çeşitli aktivasyon belirteçleri, agonistlere karşı agregasyon cevabı ve trombositte sekrete edilen ürün miktarı farklı yöntemlerle belirlenmiştir. Bu belirteçler araştırmalarda farklı sonuçlar vermelerine rağmen testler yetersiz kalıp hassas sonuçlar elde edilemeyebilmektedir. Trombosit antikorlarıyla ilgili yapılan çalışmalarda kantitatif AHÖ kullanılması daha spesifik ve daha net sonuçlar elde etmemize yardımcı olur. Kantitatif olmayan AHÖ verileri spesifik antikorları tanıyan hücrelerin yüzdeleriyle ifade edilirler. Bu parametreler oldukça bağımsızdır ve aktivasyon öncesi ve sonrası reseptör ifadelerinin minimal değişkenliğini yansıtmazlar. Bu nedenle çalışmamızda “latex” standart boncuklar kullanılarak trombosit yüzeyindeki TAM reseptör sayılarını belirlemeyi tercih ettik. Sonuçlarımıza göre: Akan hücre ölçer yöntemiyle sağlıklı gruba ait aktive olmamış trombosit yüzeyindeki TAM reseptör sayıları; Tyro3 (Sky)=9,308±4,261, Axl için Median=8,378 (25. persantil=6,145-75. persantil=10,624), Mer için Median=8,539 (6,339-9,737)’dir. Aktivasyon sonrası Tyro3 (Sky)=13,478±6,222, Axl için Median=9,117 (6,647-15,856), Mer için Median=11,817 (7,193-22,516) bulundu. Diyabetik gruba ait aktive olmamış trombosit yüzeyindeki TAM reseptör sayıları: Tyro3 (Sky) için Median=6,312 (5,251-9,983), Axl için Median=6,902 (6,051-13,982), Mer için Median=7,338 (5,708-8,908). Aktivasyon sonrasında Tyro3 (Sky) için Median=8,499 (5,680-13,052), Axl için Median=8,700 (6,294-11,172), Mer için Median=8,405 (5,819-16,024) bulundu. Görüldüğü gibi sağlıklı grupta Tyro3 (Sky) reseptörü aktive olmamış trombosit yüzeyinde en çok; Mer ise en düşüktür. Diyabetik grupta Axl aktive olmamış trombosit yüzeyinde en fazladır. Sağlıklı gruba ait aktivasyon öncesi ve sonrası (ADP ile) trombosit yüzey reseptör sayıları karşılaştırıldığında, Tyro3 (Sky) ve Mer reseptör sayılarının aktivasyon sonrasında istatistiksel anlamlı olarak artmış olduğu görüldü (sırasıyla, p=0.004 ve p=0.033). Axl’da aktivasyona bağlı istatistiksel anlamlı bir artış saptanmadı (p=0.243) (p>0.05). Diyabetik grupta ise her üç reseptör sayısında, ADP ile aktivasyon öncesi ve sonrasında istatistiksel anlamlı bir fark gözlenmedi (p>0.05) (Axl için p=0.935, Tyro3 (Sky) için p=0.149, Mer için p=0.088). Kontrol grup ve diyabetik gruba ait aktivasyon öncesi ve aktivasyon sonrasındaki trombosit yüzey reseptör sayıları

karşılaştırıldığında, istatistiksel anlamlı bir farkın olmadığı görüldü (Her biri için $p>0.05$). Ayrıca diyabetik hasta grubunun bazı biyokimyasal test sonuçlarıyla, aktivasyon öncesi ve aktivasyon sonrasındaki TAM reseptör sayılarıyla korelasyon olduğu saptandı: Serum CRP seviyesiyle, aktivasyon sonrasındaki Mer reseptör sayısı arasında negatif bir korelasyon ($r=-0.518$); serum CRP seviyesiyle, aktivasyon öncesi Tyro3 (Sky) reseptör sayısı arasında negatif bir korelasyon ($r=-0.654$); açlık glukozuyla, aktivasyon sonrası Axl reseptör sayısı arasında pozitif bir korelasyon bulundu (korelasyon kat sayısı=0.855).

AHÖ ve diğer yöntemlerle aktivasyon sonrası TAM reseptör ifadelerinin değişimini gösteren çeşitli çalışmalarda genelde aktivasyona bağlı artışlar gözlenmiş ve böylece bu reseptörlerin trombosit aktivasyonu ile yakından ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Gould ve ark (2005) insan trombositlerinde her üç reseptörün de bulunduğunu akım sitometresiyle belirlenmiş; Tyro3 (Sky) ve Mer reseptörlerinin bloke edilmesi trombosit aktivasyonunu inhibe ederken, Axl reseptörünün blokasyonu ise bu cevabı arttırmıştır (119). Elektron mikroskobu kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada, trombosit yüzeyinde TAM reseptör ifadesinin ve Gas6 bağlanmasının ADP aktivasyonuna bağlı olarak arttığı ve GpIIb/IIIa reseptöründe bu mekanizmada yer aldığı belirlenmiştir. Bu ve benzer çalışmalarda elde edilen bulgular reseptörlerde aktivasyona bağlı total artışlar olabileceğini göstermesine rağmen kantitatif veriler değildir (227). Aynı zamanda trombosit yüzeyinde bulunan diğer reseptör sayılarının belirlendiği çeşitli çalışmalarda bulunmaktadır. Ancak Gas6/TAM reseptör sayılarının belirlendiği bir çalışmaya literatürde rastlamadık. Bulgularımız ışığında trombosit yüzeyindeki TAM reseptörlerini kantitatif olarak belirlemiş olduk (68, 228). Böylece bu çalışmanın sağlıklı ve diyabetli olgulardaki Gas6/TAM reseptörleri, trombositlerdeki kantitasyonu ile ilgili literatüre katkı sağlayabileceği inancındayız.

İmkânlarımızın kısıtlı olması nedeniyle epinefrin, trombin ve kollagen ile aktivasyondan sonra reseptör sayılarının nasıl değiştiğini inceleyemedik. Ancak yeni bir projede bu araştırmaya devam edilecektir. Ayrıca trombositlerdeki bu reseptörleri uyaran esas ligand Gas6 mı yoksa protein S midir? Bu sorunun cevabını da henüz bilmiyoruz. İleride gerçekleştirilecek kapsamlı araştırmalar bu konuya açıklık getirecektir.

8. KAYNAKLAR

1. Erdoğan G. (2003). Klinik Endokrinoloji. ANTIP AŞ yayınları Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınlar, No:23, Ankara 201-231.
2. Satman İ. (2006). Diabetes Mellitus epidemiyolojisi. In: İmamoğlu Ş. Diabetes Mellitus. İstanbul: Deomed medikal yayıncılık, 27-52.
3. Satman İ. (2007). Tip 2 Diabetes Mellitus. In: Büyüköztürk K. İç hastalıkları cilt I. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 501-32.
4. National Diabetes Data Group. (1979). Classification and diagnosis of diabetes mellitus and categories of glucose intolerance. *Diabetes*, 28:1039-57.
5. World Health Organization. (1985). Diabetes mellitus: Report of a WHO study group. Technical report series 727, Geneva
6. The Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (1997). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 20:1183 -1197.
7. Canhoroz M. (2005). Canhoroz M. Serum adiponektin seviyesinin glisemik kontrol üzerine etkisinin değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi; İstanbul.
8. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (2003). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 1:S5-20.
9. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. (2003). *Diabetes Care*, 26: 3160 - 3167.
10. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (2007). *Diabetes care*, 30: S42-S47
11. Executive Summary: Standards of Medical Care in Diabetes—2011. (2011). *Diabetes care*, S4-10.
12. World Health Organization. (1999). Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications: Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva, World Health Organization.
13. Birrer RB, Sedaghat VD (2003). Exercise and diabetes mellitus. *Phys Sportsmed*, 31(5) 29 – 41.
14. Goldstein JB, Müller-Wieland D. (2004). Tip 2 Diyabet. (Çev. Ed: Akman C) 1. baskı, A. Martin Dunitz London and New York.
15. Uysal HH. (2003). Diyabetik ayakta fizyoterapi yaklaşımlarının duyu bozuklukları üzerindeki etkisi. 4:1.

16. Dinneen SF, Maldonado D, Leibson CL, Klee GG, Li H, Melton LJ, Rizza RA. (1998). Effects of changing diagnostic criteria on the risk of developing diabetes. *Diabetes Care*, 21(9):1408-13.
17. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, Mitch W, Smith SC, Sowers JR. (1999). Diabetes and cardiovascular disease: a statement for health professionals from the American Heart Association. *Circulation*, 100:1134–1146.
18. Hunter SJ, Garvey WT. (1998). Insulin action and insulin resistance: Diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction and the glucose transport effector system. *Am J Med*, 105: 331- 345.
19. Lee GR, Bithall TC, Foerster J Wintrobe's. (1993). Clinical Hematology, Philadelphia-London:9
20. Ekman C, Stenhoff J, Dahlbäck B. (2010). Gas6 is complexed to the soluble tyrosine kinase receptor Axl in human blood. *J Thromb Haemost*, 8(4): 838-44.
21. Skrha J. (2003). Pathogenesis of angiopathy in diabetes. *Acta Diabetol*, 40: 324-329.
22. Takada Y, Urano T, Watanabe I. (1993). Changes in fibrinolytic parameters in male patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Thromb Res*; 71:405-415.
23. Kannel WB, D' Agostino RB, Wilson PWF ve ark. (1990). Diabetes, fibrinogen and risk of cardiovascular disease: the Framingham experience. *Am Heart J*; 120:67 – 676.
24. Gregg J Silverman. (2010). Rethinking the red wolf disease: does Protein S suppress systemic lupus erythematosus clinical activity? *Arthritis Res Ther*, 12:144.
25. Almer L, Nilsson IM. (1975). On fibrinolysis in diabetes mellitus. *Acta Med Scand*, 198: 101–106.
26. Banga JD, Sixma JJ. (1986) Diabetes mellitus, vascular disease and thrombosis. *Clin Haematol*, 15: 465–492.
27. Mario UD, Pugliese G. (2003). Pathogenetic mechanisms of diabetic microangiopathy. International Congress Series, 1253:171-182.
28. Rand ML, Leung R, Packham MA. (2003). Platelet function assays. *Transfus Apher Sci*; 28 (3):307- 17.
29. Sobol AB, Watala C. (2000). The role of platelets in diabetes-related vascular complications. *Diabetes Res Clin Pract*, 50 (1):1-16.
30. Solymoss S, Tucker MM, Tracy PB. (1988). Kinetics of inactivation of membrane-bound factor Va by activated protein C. *J. Biol. Chem*, 263:14884-14890

31. Nesheim ME, Canfield WM, Kisiel W, Mann KG. (1982). Studies of the capacity of factor Xa to protect factor Va from inactivation by activated protein C. *J Biol. Chem*, 10; 257(3): 443- 447
32. Emekli N. (2006). Diabetes Mellitus, *Temel ve Uygulamalı Biyokimya*, 4:240-241.
33. Gerrard JM. (1988). Platelet aggregation: cellular regulation and physiologic role. *Hosp Pract (Off Ed)*, 89-104.
34. Peterson SN, Lapentina EG. (1993). Platelet activation and inhibition. *Annals New York Academy of Sciences*, 53-63.
35. Parise LV, Smyth S, Collier B. (2001). Platelet morphology, biochemistry, and function. Dç: Beutler E, editor. *Williams Hematology sixth edition*. North America: McGraw-Hill. S. 1375-1385.
36. Bloom W, Fawcett DW. (1982). Blood platelets. *A Textbook of Histology*, 139-144.
37. Lassila R, Laustiola KE. (1992). Cigarette smoking and platelet-vessel wall interactions. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 46: 81-86.
38. Ersöz G. (1992). Submaksimal Egzersizin Trombosit Fonksiyonları Üzerine Etkisi. *Uzmanlık Tezi*, Ankara.
39. Zucher-Franklin D. (2000). Megakaryocyte and Platelet Structure. In *Hematology Basic Principles and Practice*. Hoffman R, Benz, EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave, 3rd Edition, Churchill Livingstone, USA, 1730-1740.
40. Ulutin ON. (1976). Platelet morphology. In *The platelets*, 1st Edition, Kağıt ve Basım isleri A.S., Turkey, 7-36.
41. Williams W, Beutler E, Erslew A, Lichtman M. (1985). Platelet morphology and function. In *Hematology*, 4th Edition, Mc Graw Hill Book Company, USA, 1121-1135.
42. Burckhardt JJ, Anderson WHK, Kearney JF, Cooper MD. (1982). Human blood monocytes and platelets share a cell surface component. *60:767-771*.
43. Rausch JL, Fefferman M, Ladisich-Rogers DG, Menard M. (1989). Effect of nicotine on human blood platelet serotonin uptake and efflux. *Prog Neuro-Psychopharmacol and Biol Psychiat*, 13: 907-916.
44. Smyth SS, Mcever RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepalley GM, French PA, Dauerman HL and Becker RC. (2009). Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost*, 7:1759–66.
45. Zucker MB, Nachmias VT. (1985). Platelet activation. *Atherosclerosis*, 5:2-18.
46. Edward F. P, Michelle M. P, and Yan-Qing Ma. (2007). Integrin α IIb β 3. *Platelets*, Editor Alan D. Michelson, London, UK, Second Edition, 165-178.

47. Caen JP, Rosa JP. (1995). Platelet-vessel wall interaction: from the bedside to molecules. *Thromb Haemost*, 74:18-24.
48. Jurk K, Kehrel BE. (2005). Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost*, 31:381-92.
49. Plow EF, Ginsberg MH. (2000). The Molecular Basis for Platelet Function. In *Hematology Basic Principles and Practice*. Eds Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave, 3rd Edition, Churchill Livingstone, USA, 1741-1752.
50. Gachet C, Cazenave JP. (1991) ADP induced blood platelet activation; a review. *Nouv Rev Fr Hematol*, 33:347-358.
51. Cerrito F, Lazzaro MP, Gaudio E, Arminio P, Aloisi G. (1993). 5H₂-receptors and serotonin release: Their role in human platelet aggregation. *Life Sci*, 53:209-215.
52. Dale GL, Friese P, Batar P, Hamilton SF, Reed GL, Jackson KW, Clemetson KJ, Alberio L. (2002). Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature*, 10;415(6868):175-9.
53. Suzuki H, Kaneko T, Sakamoto T, Nakagawa M, Miyamoto T, Yamada M, Tanoue K. (1994). Redistribution of alpha-granule membrane glycoprotein IIb/IIIa (integrin alpha IIb beta 3) to the surface membrane of human platelets during the release reaction. *J Electron Microsc (Tokyo)*, 43(5):282-9.
54. Caffesse RG, Quinones CR. (2000). Polypeptide growth factors and attachment proteins in periodontal wound healing and regeneration. *Periodontol*, 1:69-79.
55. Suttie JW. (1993). Synthesis of vitamin K-dependent proteins. *FASEB*, 7:445-452.
56. Pereira SP, Rawbothom D, Fitt S, Sheaver MS, Wendon J, Williams R. (2005). Pharmacokinetics and efficacy of oral versus intravenous mixed-micellar phylloquinone (vitamin K1) in severe acute liver disease. *J Hepatol*, 42:365-370.
57. Bolton-Smith C, Pirice RJG, Fenton ST, Harrington DJ, Shearer MJ. (2000). Compilation of a provisional UK database for the phylloquinone (vitamin K1) content of foods. *Br J Nutr*, 83 (4):389-399.
58. FAO/WHO. (2002). Human Vitamin and Mineral Requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Thailand; Rome, Italy.
59. Higdon J. (2003). Health Implications and Intake Recommendations. In: *An Evidence-Based Approach to Vitamins and Minerals* New York: Thieme.
60. Booth S, Saltzman EA. (2001). Vitamin K: Structure and function. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. London, England.

61. Langman M. (2003). Part 2 Fat soluble Vitamins. Vitamin K. In: Expert Group on Vitamins and Minerals. Safe Upper Levels for Vitamins and Minerals: 154-161.
62. Kayaalp SO. (2002). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 10. Baskı, Hacettepe - Tas, Ankara: 1480-1484.16.
63. Knapen MH, Hamulyak K, Vermeer C. (1989). The effect of vitamin K supplementation of circulating osteocalcin (bone Gla protein) and urinary calcium excretion. *Ann Intern Med*, 111:1001-1003.
64. Kamao M, Suhara Y, Tsuqawa N, Okano T. (2005). Determination of plasma vitamin K by high liquid chromatography with fluorescence detection using vitamin K analogs as internal standart. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed. Life Sci*, 816:41-48.
65. Gardill SL, Suttie JW. (1990). Vitamin K epoxide and quinone reductase activities. Evidence for reduction by a common enzyme. *Biochem Pharmacol*. 40:1055-1061.
66. Viegas CSB, Simes DC, Laize V, Williamsons MK, Prices PA, Cancela ML. (2008). Gla-rich Protein (GRP), A New Vitamin K-dependent Protein Identified from Sturgeon Cartilage and Highly Conserved in Vertebrates. *J Biol Chem*, 283-52.
67. Gürdöl F, Ademoğlu E. (2010). K vitamini. *Biyokimya*, Nobel Tıp Kitap Evleri. İstanbul 2;461-462.
68. Özsavcı D, Yardımcı T, Demirel GY, Demiralp E, Uras F, Önder E. (2002). Flow cytometric assay of platelet glycoprotein receptor numbers in hypercholesterolemia. *Platelets* 13:223-9.
69. Özsavcı D, Yardımcı T, Demirel GY, Uras F, Hekim N, Ulutin ON. (2001). Apo-A1 binding to platelets detected by flow cytometry. *Thromb Res* 103:117-22.
70. Sener A, Ozsavci D, Oba R, Demirel GY, Uras F, Yardimci KT. (2005). Do platelet apoptosis, activation, aggregation, lipid peroxidation and platelet-leukocyte aggregate formation occur simultaneously in hyperlipidemia? *Clin Biochem*. 38(12): 1081-7.
71. Sener A, Enc E, Ozsavci D, Vanizor-Kural B, Yanikkaya-Demirel G, Oba R, Uras F, Demir M. (2010). Exogenous L-Arginine and HDL Can Alter LDL and ox-LDL-Mediated Platelet Activation : Using Platelet P-Selectin Receptor Numbers. *Clin Appl Thromb Hemost*.
72. Tetik S, Uras F, Ekşioğlu-Demiralp E, Turay Yardimci K. (2008). Low-density lipoprotein specifically binds glycoprotein IIb/IIIa: a flow cytometric method for ligand-receptor interaction. *Clin Appl Thromb Hemost*. 14(2):210-9.

73. Uras F, Uras AR, Yardımcı T, Sardana MK. (2000). Determination of the N- terminal amino acid sequence of the purified prothrombin from a patient with liver cirrhosis. *Thromb Res* 99:277-83.
74. Yıldız F, Acunaş B, Cidol Ş, Uras F, Say A. (1996). Oral ve intramusküler K vitamini uygulama etkinliğinin plazma K vitamini eksikliğine bağlı-protein ölçümleri ile belirlenmesi. *Haseki Tıp Bülteni* 34:41-5.
75. Uras AR, Uras F, Yardımcı T, Ulutin ON. (1994). Purification of factor IX, factor X, protein S and protein C from bovine plasma and evaluation with HPLC. *Turk J Med Sci*, 22:89-95.
76. Pekgöz E, Uras F, Uras AR, Akın G, Yardımcı T, Ulutin ON. (1993). Production of antibodies against bovine factor X and protein S by immunization of rabbits. *Turk J Med Sci* 19:383-90.
77. Uras F, Uras AR, Özkazanç D, Yardımcı T, Ulutin ON. (1994). Purification of human prothrombin and preparation of antibody. *Turk J Med Sci* 21:239-43.
78. Uras AR, Uras F, Yardımcı T, Ulutin ON. (1991). Purification of prothrombin from bovine plasma and its evaluation with HPLC. *J Phar Univ Marmara* 7:95-105.
79. Otamış T, Uras F, Uras AR, Yardımcı T. (2001). Separation/purification of vitamin K dependent plasma proteins in prothrombin complex by HPLC. *Clin Chem* 47:569, Part 2 Suppl. S, A173-A174.
80. Takeya H, Kawabata S, Nakagawa K, Yamamichi Y, Miyata T, Iwanaga S. (1988). Bovine factor VII: Its purification and complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 263:14868-77.
81. Takeya H, Kawabata S, Nakagawa K, Yamamichi Y, Miyata T, Iwanaga S. (1988). Bovine factor VII: Its purification and complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 263:14868-77.
82. Sunnerhagen M, Drakenberg T, Forsen S, Stenflo J. (1996). Effect of Ca on the structure of vitamin K-dependent coagulation factors. *Haemost*, 26:45-53.
83. Tulinsky A. (1991). The structures of domains of blood proteins. *Thromb Haemost*, 66:16-31.
84. Magnusson S, Petersen TE, Sottrup-Jensen L, Claeys H. (1975). Eds: Reich E, Rifkin DE, and Shaw E, *Proteases and Biological Control*. Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. 2;123.,
85. Koldaş M, Uras F. (2001). Avidin-Biotin ELISA for measurement of prothrombin in human plasma. *Thromb Res* 102:221-7.

86. Shearer MJ. (2000). Role of vitamin K and Gla proteins in the path-ophysiology of osteoporosis and vascular calcification. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 3(6):433-438.
87. Fasco MJ and Principe LM. (1982). R-and S-Warfarin inhibition of vitamin K and vitamin K-2,3-epoxide reductase activities in the rat. *J Biol Chem,* 257:4894-4901.
88. Greer FR. (1999). Vitamin K status of lactating mothers and their infants. *Acta Paediatr Suppl,* 88(430): 95-103.
89. Isarangkura P, Mahasandana C, Chuansumrit A, Angchaisuksiri P. (2004). Acquired bleeding disorders: the impact of health problems in the developing world. *Haemophilia,* 10(4):188-95.
90. Gürbüz Ü. (2006). Sığır plazmasındaki K vitamini bağımlı proteinlerin iki boyutlu elektroforezle ayrılması. Yüksek lisans tezi; İstanbul (Danışman: Prof. Dr Fikriye Uras).
91. Çavuşoğlu H. (2002). Cecil Essentials of Medicine. 5. ed Normal Hemostaz, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. İstanbul. 449.
92. Çavuşoğlu H. (1996). Hemostaz ve Kan Pıhtılaşması, ed. Tıbbi Fizyoloji. 9. ed., Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. İstanbul. 463.
93. Lee GR, Foerster J, Athens JW, Lukens JN. (1993). Bithell TC. Blood coagulation. Wintrobe's clinical hematology. Philadelphia. *Lea ve Febiger,* 9: 913-919
94. Braunstein KM, Noyes CM, Griffith MJ, Lundblad RL, Roberts HR. (1981). Characterization of the defect in activation of factor IX Chapel Hill by human factor *Xia* *J Clin Invest.* 68(6):1420-1426.
95. Davie EW and Fujikawa K. (1975). Basic mechanisms in blood coagulation. *Annu Rev. Biochem,* 44:799-829.
96. Di Scipio RG, Hrmudson MA, Yates SG, Davie EW. (1977). A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmasfactor), factor X (Stuart factor) and protein *S* *Biochem,* 22,16(4):698-706.
97. Esmon CT. (2003). The Protein C Pathway. *Chest,* 124:26-32.
98. Aiach M, Borgel D, Gaussem P, Emmerich J, Alhenc-Gelas M, Gandrille S. (1997). Protein C ve Protein S deficiencies. *Semin Hematol* 34(3): 05-217.
99. Rodgers GM. (1999). Thrombosis and Antithrombotic Therapy. In Lee GR, Foersters J, Hematology (10th ed.) Williams and Wilkins, *Baltimore:* 1782-1818.
100. Brummel-Ziedins K, Orfeo T, Jenny NS, Everse SJ, Mann KG. (2004). Blood coagulation and fibrinolysis. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B eds Wintrobe' s Clinic. Hematology 11th ed. Baltimore: Williams Wilkins.: 709.

101. Grinnell BW, Joyce D. (2001). Recombinant human activated protein C. A system modulator of vascular function for treatment of severe sepsis. *Crit Care Med.* 29:53-60.
102. Dahlback B. (1986). Inhibition of protein Ca cofactor function of human and bovine proteins by C4b-binding protein. *J Biol Chem.*, 261:12022-12027.
103. Rosen SB, Sturk A. (1997). Activated protein C resistance – A major risk factor for thrombosis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 35(7):501-16.
104. Heeb MJ, Rosing J, Bakker HM, Fernandez JA, Tans G, Griffin JH. (1994). Protein S binds to and inhibits factor Xa Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A, 29; 91(7):2728-2732.
105. Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi C, Schneider C. (1993). The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol*, 13(8):4976-85.
106. Zhu D, Wang Y, Singh I, Robert D, Bell, Deane R, Zhong Z, Sagare A, Ethan A. Winkler, Berislav V. Zlokovic. (2010). Protein S controls hypoxic/ischemic blood-brain barrier disruption through the TAM receptor Tyro3 and sphingosine 1-phosphate receptor. *Blood*, 115:4963-4972.
107. Kaartinen MT, Murshed M, Karsenty G, McKee MD. (2007). Osteopontin Upregulation and Polymerization by Transglutaminase 2 in Calcified Arteries of Matrix Gla Protein-deficient Mice. *J Histochem Cytochem*, 55(4):375–386.
108. Hale JE, Fraser JD, Price PA. (1988). The identification of matrix Gla protein in cartilage. *J Bio Chem*, 263:5820–5824.
109. Hackeng TM, Rosing J, Spronk HMH, Vermeer C. (2001). Total chemical synthesis of human matrix Gla protein. *Protein Sci*, 10:864–870.
110. Herrmann S-M, Whatling C, Brand E, Nicaud V, Luc JG, Tired L, Henney A, Gariépy FC, Simon A, Evans A, Ruidavets J-B, Arveiler D. (2000). Polymorphisms of the Human Matrix Gla Protein (MGP) Gene, Vascular Calcification and Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:2386-2393.
111. Cancela L, Hsieh CL, Francke U, Price PA. (1990). Molecular structure, chromosome assignment and promoter organization of the human matrix Gla protein gene. *J Biol Chem*, 265:15040–15048.
112. Luo G, D'souza R, Jogue D, Karsenty G. (1995). The matrix Gla protein gene is a marker of the chondrogenesis cell lineage during development. *J Bone Miner Res*, 10:325–334.

113. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. (1997). Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*, 386:78–81.
114. Fraser JD, Price PA. (1988). Lung, heart and kidney express high level of Mrna for the possible functions of matrix Gla protein and for the tissue distribution of the γ -carboxylase. *J Biol Chem*, 263:11033.
115. Viegas CSB, Conceic N, Fazenda C, Simes DC and Cancela M L. (2010), Expression of Gla-rich protein (GRP) in newly developed cartilage-derived cell cultures from sturgeon (*Acipenser naccarii*); 214–218.
116. Viegas CSB, Cavaco S, Neves PL, Ferreira A, Joa˜o A, Williamson MK, Price PA, Cancela ML, Simes DC. (2009). Gla-Rich Protein Is a Novel Vitamin K-Dependent Protein Present in Serum That Accumulates at Sites of Pathological Calcifications. *Am J Pathol*, 175:2288–2298.
117. Mc Cormack O, Chung WY, Fitzpatrick PF, Flynn CB, Harrison M, Fox E, Gallagher E, Mc Goldrick A, Dervan PA, Mc Cann A, Kerin MJ. (2008). Growth arrest-specific gene 6 expression in human breast cancer. *Br J Cancer*, 1141–1146.
118. Yanagita M. (2004). Gas6, warfarin, and kidney diseases. *Clin Exp Nephrol*. 8:304–309.
119. Gould W R, Baxi SM, Schroeder R, Peng YW, Leadly RJ, Petersn JT, Perin LA. (2005). Gas6 receptors Axl, Tyro3 (Sky) and Mer enhance platelet activation and regulate thrombotic responses. *J Thromb Haemost*, 3;733–41.
120. Balogh I, Hafizi S, Stenhoff J, Hansson K, Dahlback B. (2005). Analysis of Gas6 in Human Platelets and Plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 10;1161.
121. Hafizi S, Dahlback B. (2006). Gas6 and protein S Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. *FEBS J* 273;5231–5244.
122. Tjwaa M, Moon L, Lutgens E. (2009). Pleiotropic role of growth arrest-specific gene 6 in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 20:386–392.
123. Tjwa M, Bellido-Martin L, Lin Y, Lutgens E, Plaisance S, Bono F, Delesque-Touchard N, Herve C, Moura R, Billiau AD, Aparicio C, Levi M, Daemen M, Dewerchin M, Lupu F, Arnout J, Herbert JM, Waer M, Frutos PG, Dahlback B, Carmeliet P., Hoylaerts MF, Moons L. (2008). Gas6 promotes inflammation by enhancing interactions between endothelial cells, platelets and leukocytes. 05-089565.
124. Lutgens E, Tjwa M, Frutos PG, Wijnands E, Beckers L, Dahlback B, Daemen MJAP, Carmeliet P, Moons L. (2008). Genetic loss of Gas6 induces plaque stability in experimental atherosclerosis. *J Pathol*, 216:55–63.

125. Chen C, Li Q, Darrow AL, Wang Y, Derian CK, Yang J, Garavilla L, Andrade-Gordon P, Damiano BP. (2004). Mer Receptor Tyrosine Kinase Signaling Participates in Platelet Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1118-1123.
126. Healy AM, Schwartz JJ, Zhu X, Herrick BE, Varnum B, Farber HW. (2001). Gas 6 promotes Axl-mediated survival in pulmonary endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280:L1273–L1281.
127. Bingöl-Özakpınar Ö. (2010).İnsan trombositleri ile gas6 (growth arrest spesifik- 6) proteini arasındaki ilişki. Doktora Tezi; İstanbul. (Danışman: Prof. Dr. Fikriye URAS).
128. Küçük B B. (2011) Fare Trombositlerinde gas6 (Growth Arrest Spesifik-6) Varlığının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi; İstanbul. (Danışman: Prof. Dr. Fikriye URAS).
129. Burnier L, Borgel D, Angelillo-Scherrer A, Fontona P. (2004). Plasma levels of the growth arrest-specific gene 6 product (Gas6) and antiplatelet drug responsiveness in healthy subjects. *J Thromb Haemost*, 126:645–87.
130. Andersen J. (2006) Advances in hematology. *Clin Adv Hematol Oncol*. 4(6):432-434.
131. Kubisz P, MD, DSc, Bartosova L, MD, Ivankova J, MS. Holly P, MD, Stasčko J, MD, PhD, Skerenova M, MS Pullmann R, MD, MS, (2009). Is Gas6 Protein Associated With Sticky Platelet Syndrome? . *J Thromb Haemost*. 000(00) 1-4.
132. Goruppi S, Ruaro E, Varnum B, Scheinder C. (1999). Gas6-mediated survival in NIH3T3 cells activates stress signalling cascade and is independent of Ras. *Oncogene*, 22;18(29):4224-36.
133. Goruppi S, Chiaruttini C, Ruaro ME, Varnum B, Schneider C. (2001) Gas6 induces growth, beta-catenin stabilization, and T-cell factor transcriptional activation in contact-inhibited C57 mammary cells. *Mol Cell Biol*. 21(3):902-15.
134. Cavet ME, Smolock EM, Ozturk OH, World C, Pang J, Konishi A, Berk BC. (2009). Gas6–Axl Receptor Signaling Is Regulated by Glucose in Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 10.1161.
135. Uras F, Uras AR. Yeni Gla-Proteinleri: Gas6 ve Matriks Gla-Proteini. Tromboz Hemostaz ve Anjiyoloji (Editör O.N. Ulutin), Sayfa 39-51, 2006.
136. Alberts B. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, (Garland Science, Taylor & Francis Group, 29 West 35th Street, New York, NY 10001-2299.
137. Pawson T, Raina M, Nash P. (2002)Interaction domains: From simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS L*,513:2-10.
138. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, 19,5548-5557.
139. Schlessinger J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.

140. Ullrich A, Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203- 212.
141. Yılmaz Ö, Turgay N. (2009). Sitokin ilişkili Hücre İçi Sinyal İletimi ve Paraziter Enfeksiyonlardaki Önemi. *T Parazitol Derg.* 33 (4): 301 – 306.
142. Doğan AL, Güç D. (2004). Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35:34- 42.
143. Pawson T. (2004). Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell*, 116,191-203.
144. Blume-Jensen P, Hunter T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411,355-365.
145. Asish KG, Charla S, Justin B, Traci S, Tait DS, Debabrata M, Neil EK. (2011). The novel receptor tyrosine kinase Axl is constitutively active in B-cell chronic lymphocytic leukemia and acts as a docking site of nonreceptor kinases: implications for therapy. *Blood*. 117(6):1928-1937.
146. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*; 298:1912–1934.
147. Lai C, Lemke G. (1991). An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system. *Neuron*. 6: 691–704.
148. Lemke G, Burstyn-Cohen T. (2010). TAM receptors and the clearance of apoptotic cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1209; 23–29.
149. Lemke G, Rothlin CV. (2008). Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol*. 8(5):327–336.
150. Michele D, Binder Trevor J, Kilpatrick. (2009). TAM Receptor Signalling and Demyelination. *Neurosignals*, 17: 277–287.
151. Kulman JD. (2006). Vitamin K-dependent proteins in *Ciona intestinalis*, a basal chordate lacking a blood coagulation cascade. *Proc Natl Acad Sci*, 103:15794-15799.
152. Liongue C, Ward AC. (2007). Evolution of Class I cytokine receptors. *BMC Evol Biol*, 7- 120.
153. Krause CD, Pestka S. (2005). Evolution of the Class 2 cytokines and receptors, and discovery of new friends and relatives. *Pharmacol Ther*, 106: 299–346.
154. Rothlin CV, Lemke G. (2010). TAM receptor signaling and autoimmune disease. *Curr Opin Immunol*, 22:1–7.
155. O'Bryan JP. (1991). Axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*, 11,5016- 5031.

156. Sun WS, Misao R, Iwagaki S, Fujimoto J, Tamaya T. (2002). Coexpression of growth arrest-specific gene 6 and receptor tyrosine kinases, Axl and Sky, in human uterine endometrium and ovarian endometriosis. *Ann Oncol*, 552-558.
157. Silverman GJ. (2010). Rethinking the red wolf disease: does Protein S suppress systemic lupus erythematosus clinical activity? *Arthritis Res Ther*, 12:144.
158. Qingxian L, Qiutang L, Qingjun L. (2010). Regulation of phagocytosis by TAM receptors and their ligands. *Front Biol*, 5(3):227–237.
159. Hurtado B, Abasolo N, Muñoz X, García N, Benavente Y, Rubio F, García de Frutos P, Krupinski J, Sala N. (2010). Association study between polymorphisms in GAS6-TAM genes and carotid atherosclerosis. *Thromb Haemost*, 104(3):592-8.
160. Nagai K, Arai H, Yanagita M, Matsubara T, Kanamori H, Nakano T, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Doi T. (2003). Growth arrest-specific gene 6 is involved in glomerular hypertrophy in the early stage of diabetic nephropathy. *J Biol Chem*, 278:18229–18234.
161. Karaca Z. (2011). Yetişkinlerde Plazma gas6 (Growth Arrest Spesifik-6) Proteini için Referans Aralığının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi; İstanbul. (Danışman: Prof. Dr. Fikriye URAS).
162. Hafizi S, Dahlback B. (2006). Signalling and functional diversity within the Axl subfamily of receptor tyrosine kinases. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 17,295–304
163. Caberoy NB, Zhou Y, Li W. (2010). Tubby and tubby-like protein 1 are new MerTK ligands for phagocytosis. *EMBO J*, 29(23):3898–3910.
164. Li W. (2011). Eat-me signals: keys to molecular phagocyte biology and “appetite” control. *J Cell Physiol*, 10.1002.
165. Schmidt T, Ben-Batalla I, Schultze A, Loges S. (2011). Macrophage–tumor crosstalk: role of TAMR tyrosine kinase receptors and of their ligands. *Cell Mol Life Sci*, 10.1007/s00018-011-0863-7.
166. Tang H, Song C, Haikun W, Hui W, Qingxian L, Daishu H. (2009). TAM receptors and the regulation of erythropoiesis in mice. *Haematologica*. 94(3).
167. Hurtado B, Muñoz X, Recarte-Pelz P, Garcia N, Luque A, Krupinski J, Sala N, García de Frutos P. (2011). Expression of the vitamin K-dependent proteins GAS6 and protein S and the TAM receptor tyrosine kinases in human atherosclerotic carotid plaques. *Thromb Haemost*, 105:873–882.
168. Brandao L, Migdall-Wilson J, Eisenman K, Graham DK. (2011). TAM Receptors in Leukemia: Expression, Signaling, and Therapeutic Implications. 16(1- 2):47-63.
169. Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, Arnout J, Dewerchin M, Hoylaerts M, Herbert J, Collen D, Dahlback B, Carmeliet P. (2001).

- Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat Med*, 7: 215–21.
170. Angelillo-Scherrer A. (2005). Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *J Clin Invest*; 115:237–246
 171. Nakamura YS. (1998). Tyro 3 receptor tyrosine kinase and its ligand, Gas6, stimulate the function of osteoclasts. *Stem Cells*, 16:229–238.
 172. Katagiri M. (2001). Mechanism of stimulation of osteoclastic bone resorption through Gas6/Tyro3 a receptor tyrosine kinase signaling, in mouse osteoclasts. *J Biol Chem*; 276:7376–7382.
 173. Nakagawa A, Shiratsuchi A, Tsuda K, Nakanishi Y. (2005). In vivo analysis of phagocytosis of apoptotic cells by testicular Sertoli cells. *Mol Reprod Dev*, 71:66–177.
 174. Ueno H, Mori H. (1990). Morphometrical analysis of Sertoli cell ultrastructure during the seminiferous epithelial cycle in rats. *Biol Reprod*, 43:69–776.
 175. Lu Q, Lemke G. (2001). Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro3 family. *Science*, 293:306–311.
 176. Tingting D, Yue Z, Qiaoyuan C, Keqin Y, Daishu H. (2011). Toll-like receptor-mediated inhibition of Gas6 and ProS expression facilitates inflammatory cytokine production in Mouse macrophages. *Immunology*, 135,40–50
 177. Anupam V, Steven L. W, Hariprasad V. (2011). Targeting Axl and Mer Kinases in Cancer. 10.1158/1535-7163
 178. Levy DE, Darnell JE Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 3:651–662.
 179. Avilla E, Guarino V, Visciano C. (2011). Activation of TYRO3/AXL Tyrosine Kinase Receptors in Thyroid Cancer. *Cancer Res*, 10.1158/0008-5472
 180. Prasad D. (2006). TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Mol Cell Neurosci*; 33:96–108
 181. Fei Y, Qiutang L, Yan K, Qingjun L, Lixia H, Henry J K, Hui S, Qingxian L. (2011). TAM Receptor Knockout Mice Are Susceptible to Retinal Autoimmune Induction. *Neuroscience*, 52-7.
 182. Lu Q. (1999). Tyro3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature*, 398:723–728.
 183. Kouki M, Yiming X, Tove O, Benhur L, Asim D, Anna MW, Irvin SYC. (2011). The Soluble Serum Protein Gas6 Bridges Virion Envelope Phosphatidylserine to the TAM Receptor Tyrosine Kinase Axl to Mediate Viral Entry. *Cell*, 255- 257

184. Suh C-H, Hilliard B, Li S, Merrill JT, Cohen PL. (2010). TAM receptor ligands in lupus: Protein S but not Gas6 levels reflect disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*, 12: R146.
185. O'Bryan JP, Fridell YW, Koski R, Varnum B, Liu ET. (1995). The transforming receptor tyrosine kinase, Axl, is post-translationally regulated by proteolytic cleavage. *J Biol Chem*, 270, 551-557.
186. Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK. (2008). TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res*, 100,35-83
187. Graham DK. (1995). Cloning and developmental expression analysis of the murine c-mer tyrosine kinase. *Oncogene*, 10,2349-2359.
188. Neubauer A. (1994). Expression of axl, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis. *Blood* 84, 1931-1941.
189. Schulz AS, Schleithoff L, Faust M, Bartram CR, Janssen JW. (1993). The genomic structure of the human UFO receptor. *Oncogene* 8, 509- 513
190. John PO, Roy AF, Patricia CC, Andreas N, Barry K, Carol P, Rafael E III, Michelle MLB, HShelton E, Edison TL. (1991) Axl, a Transforming Gene Isolated from Primary Human Myeloid Leukemia Cells, Encodes a Novel Receptor Tyrosine Kinase. *Mol Cell Bio*, 5016-5031
191. Shao WH, Zhen Y, Eisenberg RA, Cohen PL. (2009). The Mer receptor tyrosine kinase is expressed on discrete macrophage subpopulations and mainly uses Gas6 as its ligand for uptake of apoptotic cells. *Clin Immunol*, 133,138–144.
192. Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK. (2010). Taking aim at Mer and Axl receptor tyrosine kinases as novel therapeutic targets in solid tumors. *Expert Opin Ther Targets*, 14(10): 1073- 90.
193. Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI. (2007). TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* 131, 1124–1136.
194. Piercea A, Xua M, Bliesnera B, Liud Z, Richardsd JA, Tobete S, Wiermana ME. (2011). Hypothalamic but not pituitary or ovarian defects underlie the reproductive abnormalities in Axl/Tyro3 null mice. *Mol Cell Endocrinol*, 10.1016
195. Melaragno MG, Fridell YW, Berk BC. (1999).The Gas6/Axl system: a novel regulator of vascular cell function. *Trends Cardiovasc Med*, 9:250–253.
196. Berk BC. (1999). Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: pathways activated by specific tyrosine kinases. *J Am Soc Nephrol*, S62–S68.

197. Nagai K, Arai H, Yanagita M, Matsubara T, Kanamori H, Nakano T, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Doi T. (2003). Growth arrest-specific gene 6 is involved in glomerular hypertrophy in the early stage of diabetic nephropathy. *J Biol Chem*, 278:18229–18234.
198. Augustine KA, Rossi R, Van G, Housman J, Stark K, Danilenko D, Varnum B, and Medlock E. (1999). Noninsulin-dependent diabetes mellitus occurs in mice ectopically expressing the human Axl tyrosine kinase receptor. *J Cell Physiol*, 181: 433–447.
199. Jason GW, Celia FB, Olivier L, Michael FG, Fernando M, Heather A A, Anne LP, Vladislav T, Bridget SZ. (2011). Loss of the receptor tyrosine kinase Axl leads to enhanced inflammation in the CNS and delayed removal of myelin debris during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *JNI*, 8-49
200. Scroyen I, Frederix L, Lijnen HR. (2011). Axl deficiency does not affect adipogenesis or adipose tissue development. *Obesity (Silver Spring)*10.1038
201. Ohashi K, Nagata K, Toshima J, Nakanos T, Arita H, Tsuda H, Suzuki K, Mizuno K. (1995). Stimulation of Sky Receptor Tyrosine Kinase by the Product of Growth Arrest-specific Gene 6. *Eur J Biochem*, 270; 39,22681–22684
202. Trevor NS, Greg C, Martin G, Cary L, Joanne B, Czeslaw R, Karen M, John F, David R, Pamela FJ, Piotr M, Terence ER, Nancy JT DHC, Peter SD, George LL, Claudio B, Mitchell PG, Greg L, David JG, George DY (2004). The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Blood*, 661-670.
203. Wu J, Ekman C, Jönsen A, Sturfelt G, Bengtsson A, Gottsäter A, Lindblad B, Lindqvist E, Saxne T, Dahlbäck B. (2011). Increased plasma levels of the soluble Mer tyrosine kinase receptor in systemic lupus erythematosus relate to disease activity and nephritis. 13: R62.
204. Prieto AL, Weber JL, Lai C. (2000). Expression of the Receptor Protein- Tyrosine Kinases Tyro-3, Axl, and Mer in the Developing Rat Central Nervous System. *J Comp Neurol*, 425:295–314.
205. Nitu T, Yi W, Veera D, Reiko A, Thaddeus CG, Brian V, Raymond BB. (2007). Autophosphorylation Docking Site Tyr- 867 in Mer Receptor Tyrosine Kinase Allows for Dissociation of Multiple Signaling Pathways for Phagocytosis of Apoptotic Cells and Down-modulation of Lipopolysaccharide-inducible NF-B Transcriptional Activation. *J Biol Chem*, 283
206. Graham DK, Dawson TL, Mullaney DL, Snodgrass HR, Earp HS. (1994). Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer. *Cell Growth Differ*. 5,647-657.

207. Shao WH, Eisenberg RA, Cohen PL. (2008). The Mer receptor tyrosine kinase is required for the loss of B cell tolerance in the chronic graft-versus-host disease model of systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 180,7728-7735
208. Behrens EM. (2003). The mer receptor tyrosine kinase: expression and function suggest a role in innate immunity. *Eur J Immunol*,33,2160- 2167.
209. Dunphy CH. (2004). Applications of Flow Cytometry and immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology. *Arch Pathol Lab Med*, 128:9,1004-1022.
210. Sayed D, Bakry R, El-Sharkawy N, Zahran A, Khalaf MR. (2010). Flow Cytometric Platelet Cross-Matching to Predict Platelet Transfusion in Acute Leukemia. *J Clin Apher*, 00:000–000.
211. Deniz G. (2007) Flow sitometrik tekniklerin klinik kullanımı. Türkiye Klinikleri. *J In. Med Sci*, 3(43):73-80.
212. Dr. Klara DALVA.(2011). Hematoloji’de Akım Sitometri Kullanımı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Ankara.
213. Suzuki LA, Poot M, Gerrity RG, Bornfeldt KE. (2001). Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels. *Diabetes*, 50:851–860.
214. Erek A, Akpınar O, Uras F, Uras AR. (2010). A Candidate therapeutic target for diabetic nephropathy;Gas6
215. Cavet ME, Smolock EM, Ozturk OH, World C, Pang J, Konishi A, Berk BC. (2008). Gas6-axl eceptor signaling is regulated by glucose in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28:886–891.
216. Hung YJ, Lee CH, Chu NF, Shieh YS. (2010). Plasma Protein Growth Arrest–Specific 6 Levels Are Associated With Altered Glucose Tolerance, Inflammation, and Endothelial Dysfunction. *Diabetes Care*, 33(8):1840-4.
217. S. Devaraj MR Dasu SH Park I Jialal. (2009) Increased levels of ligands of Toll-like receptors 2 and 4 in type 1 diabetes. *Diabetologia*, 52:1665–1668.
218. Pickup JC. (2004). Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 27: 813–823.
219. Lemke G, Lu Q. (2003). Macrophage regulation by Tyro 3 family receptors. *Curr Opin Immunol*, 15:31–36.
220. Kurohara M, Yasuda H, Moriyama H, Nakayama M, Sakata M, Yamada K, Kotani R, Hara K, Yokono K, Nagata M. (2008). Low-dose warfarin functions as an immunomodulator to prevent cyclophosphamide-induced NOD diabetes. *Kobe J Med Sci*, 23;54(1):E1-13.

221. Lee CH. (2011). The growth arrest-specific 6 (Gas6) gene polymorphism c.834+7G>A is associated with type 2 diabetes. *Diab Res Clin Pract* doi:10.1016/j.diabres.2.09.013
222. Jiang L, Liu CY, Yang QF, Wang P, Zhang W. (2009). Plasma level of growth arrest-specific 6 (GAS6) protein and genetic variations in the GAS6 gene in patients with acute coronary syndrome. *Am J Clin Pathol*, 131:738–743.
223. Sheetz MJ, King GL. (2002)Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA*, 288:2579–2588.
224. Nigro J, Osman N, Dart AM, Little PJ. (2006). Insulin resistance and atherosclerosis. *Endocr Rev*, 27:242–259.
225. Borgel D, Clauser S, Bornstain C, Bieche I, Bissery A, Remones V, Fagon JY, Aiach M, Diehl JL. (2006). Elevated growth-arrest-specific protein 6 plasma levels in patients with severe sepsis. *Crit Care Med*, 34: 219–222.
226. Gibot S, Massin F, Cravoisy A, Dupays R, Barraud D, Nace L, Bollaert PE. (2007). Growth arrest-specific protein 6 plasma concentrations during septic shock. *Crit Care*, 11:R8.
227. Cosemans MEMJ, Van Kruchten, Olieslagers S, Schurgers LJ, Verheyen FK, Munnix ICA, Waltenberger J, Angelillo-Scherrer A, Hoylaerts MF, Carmeliet P, Heemskerk JWM. (2010).Potentiating role of Gas6 and Tyro3, Axl and Mer (TAM) receptors in human and murine platelet activation and thrombus stabilization. *Journal of Thromb Haemost*, 8: 1797–1808.
228. Tomer A, Koziol J, McMillian R. (2006).Autoimmune Thrombocytopenia: Determination of Platelet-Specific Autoantibodies by Flow Cytometry. *J Thromb Haemost*, 47:697–700.

9. ETİK KURUL ONAYI



MARMARA ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Araştırmalar

Ön Değerlendirme Komisyonu

PROJENİN ADI: Diabetes Mellituslu Hasta Trombositlerinde Tyro-3, Axi ve Mer (TAM) Reseptör Sayılarının Belirlenmesi
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Prof. Dr. Fikriye URAS
PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR: Hüsniye DAĞDEVİREN
ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI: 30.11.2010 – 08

Sayın Prof. Dr. Fikriye URAS

99 protokol nolu “Diabetes Mellituslu Hasta Trombositlerinde Tyro-3, Axi ve Mer (TAM) Reseptör Sayılarının Belirlenmesi” isimli projeniz Enstitümüzün ön değerlendirme komisyonunda incelenmiş ve araştırmanın Komisyonumuzun ön değerlendirme kriterlerine uygunluğuna karar verilmiştir.

Prof. Dr. Gülden Z. OMURTAG
Komisyon Başkanı

Doç. Dr. Ebru IŞIK ALTURFANLI
Komisyon Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Gül AYANOĞLU DÜLGER

Prof. Dr. Can KIZLER

Doç. Dr. Oğuzhan DEYNELİ

Doç. Dr. Asım ZİNGİ

Yrd. Doç. Dr. Murat ÇEKİN

Yrd. Doç. Dr. Mustafa TAŞDEMİR

Öğr. Gör. Dr. Tolga GÜVEN

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Hüsniye	Soyadı	Dağdeviren
Doğum Yeri	Artova	Doğum Tarihi	15.05.85
Uyruğu	T .C.	Tel	
E-mail	husniye.dagdeviren@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (ECZ) Programı	2012
Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	2008
Lise	Çemberlitaş Anadolu Lisesi	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Orta	Orta	Orta

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	49							

Başarılımış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS:

International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puam	71	72	73
(Diğer) Puam			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Mikrosoft word, Excel, Power Point	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

