

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
SPOR HEKİMLİĞİ ANABİLİM DALI

**TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN TEDAVİ EDİCİ
ETKİSİNİ MELOKSİKAM VE DİKLOFENAK DEĞİŞTİRİR Mİ?**

Dr. Burkay UTKU

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2014

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
SPOR HEKİMLİĞİ ANABİLİM DALI

TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN TEDAVİ EDİCİ ETKİSİNİ
MELOKSİKAM VE DİKLOFENAK DEĞİŞTİRİR Mİ?

Dr. Burkay UTKU

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mahmut Nedim DORAL

“Bu tez çalışması 1308 no.lu proje olarak Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir.”

ANKARA

2014

TEŞEKKÜR

Asistanlık sürem boyunca bilgi, sevgi ve desteğini esirgemeyen değerli Başöğretmenim ve tez danışmanım canım hocam Prof. Dr. Mahmut Nedim Doral'a;

Asistanlık eğitimim boyunca egzersizin fizyolojisini zihinlerimize kazıyan, bilimsel makaleleri özümseten ve tezime her aşamada destek veren kıymetli hocam Prof. Dr. Haydar Demirel'e;

Sabrı ve hoşgörüsü için minnettar olduğum ve tezimin son haline ulaşmasında bilgi ve desteğini esirgemeyen bölüm başkanım değerli hocam Prof. Dr. Feza Korkusuz'a;

Tezimle ilgili sonsuz desteği ve katkıları için Prof. Dr. Gülriz Erişgen'e;

Tez ve uzmanlık sınavım ile ilgili bütün ayrıntıları organize eden Yrd. Doç. Dr. Gürhan Dönmez'e, gönüllülerden kan alma konusunda şefkatli elleri ile bana yardımcı olan Kan Alma Ünitesi'nin değerli hemşirelerine, tezimin laboratuvar kısmında bilgi ve tecrübesini esirgemeyen Ar.Gör. Şenay Suljevic'e ve Noushin Azadpour'a ve tezimin istatistik analizi ile ilgili yardımlarını esirgemeyen Gözde Beşler ve Prof. Dr. Mutlu Hayran'a;

Değerli mesai arkadaşlarım Doç. Dr. Defne Kaya, Yiğitcan Karanfil, Murat Yıldırım, Pelin Yargıç, Mehmet Emin Akçer, Begül Çetin, Bektaş Yıldırım'a;

Canım anem Sultan Utku, babam Cahit Utku ve kardeşim Burak Utku'ya;

Eğitim hayatım boyunca bana hep destek olan ve iki tane canımdan öte çocuk veren canım eşim Ezgi Şimşek Utku'ya ve tabii ki beni hayata sıkı sıkı bağlayan canım oğlum Yiğit Alp Utku'ya ve canım kızım Ela Duru Utku'ya;

Canım kardeşlerim Evrim, Zeynep ve Fatoş'a ve canım yeğenim Evren'e ve Nesrin annem ve Sadık Babama;

Ve özel bir insan Prof. Dr. Levent Özçakar'a;

SONSUZ TEŞEKKÜRLER; İYİ Kİ VARSINIZ!

ÖZET

Utku B. Trombositten Zengin Plazmanın Tedavi Edici Etkisini Meloksikam ve Diklofenak Değiştirir mi? Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakóltesi Spor Hekimliği Uzmanlık Tezi, Ankara 2014.

Trombositten zengin plazma (TZP) uygulaması, kas-iskelet sistemi yaralanmalarında sık kullanılan bir tedavi modalitesidir. Trombositler, büyüme faktörlerinden yoğun hücrelerdir ve aktive ve agregre olarak bu faktörleri yaralı dokuya bırakabilmektedirler. Non-steroid antiinflatuar ilaç (NSAİİ)lar da antiinflatuar etkileri için kas-iskelet sistemi yaralanmalarında kullanılmaktadır. Bazı NSAİİ'lerin Siklooksijenaz-1 (COX-1) enzimini üzerinden Tromboksan A2 (TXA2) sentezini inhibe ettiği ve anti agregan etki gösterebildikleri bilinmektedir. Acaba eş zamanlı NSAİİ ve TZP tedavisi, TZP'nin iyileştirici etkisini değiştirebilir mi?

Çalışmamızda 20 sağlıklı erkek gönüllüden kan alıp Anitua tekniği ile TZP hazırlanmıştır. Elde edilen TZP'ler 6 gruba ayrılmış ve gruplar kontrol grubu diklofenak düşük ve yüksek doz, meloksikam düşük ve yüksek doz ve asetilsalisilik asit grubu şeklinde bölünmüştür. 20 dakika ilaçlarla temas sonrası, her gruba pıhtı oluşumu için %10'luk kalsiyum klorür eklenmiş ve 20 dakika beklenmiştir. Daha sonra süpernatant eldesi için örnekleri santrifüje edip elde edilen süpernatantlardan ELISA yöntemi ile plateletten derive büyüme faktörü (PDGF)-AB ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) miktar tayini yapılmıştır. Elde edilen değerler, herhangi bir grup için istatistiksel anlamlılık göstermemiştir ($p>0,05$).

Sonuç olarak diklofenak, meloksikam ve asetilsalisilik asit eklenen örneklerden hazırlanan TZP'nin PDGF-AB ve VEGF miktarları ortalamaları, gruplar için benzerdir.

Anahtar Kelimeler: Trombositten zengin plazma, Diklofenak, Meloksikam, PDGF-AB, VEGF

Destekleyen Kuruluş: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi, Proje No: 1308

ABSTRACT

Utku B. Do Meloxicam and Diclofenac change the therapeutic effect of platelet rich plasma (PRP)? Hacettepe University Sports Medicine Faculty, Thesis in Sports Medicine Residency, Ankara 2014.

The application of PRP is a common treatment modality in musculoskeletal injuries. Platelets are such cells containing much more growth factors and can secrete these factors inside the tissue by being activated and aggregated. Non-steroid antiinflammatory drugs (NSAIDs) are also being used for their antiinflammatory effects in musculoskeletal injuries. Some NSAIDs are known to inhibit the synthesis of Thromboxane A₂ (TXA₂) via the enzyme cyclooxygenase-1 (COX-1) inhibition and to have antiaggregant effects. Can synchronous treatment of PRP and NSAID change the therapeutic effect of PRP?

In our study, blood was obtained from 20 healthy male volunteers and prepared PRP with Anitua technique described in the literature. Then PRPs were separated into six groups and the groups are in order control, diclofenac minimum dose, diclofenac maximum dose, meloxicam minimum dose, meloxicam maximum dose and acetylsalicylic acid groups. After exposure of drugs for 20 minutes for every group, 10% calcium chlorur was added for clotting and waited for 20 minutes. After then, the specimens were centrifuged for obtaining supernatants and supernatants were used for determination of platelet derived growth factor (PDGF)-AB and vascular endothelial growth factor (VEGF) amounts by ELISA methodology. The values for any groups has no statistical significant meaning ($p>0,05$).

Finally, the mean amounts of PDGF-AB and VEGF in PRP's prepared from diclofenac, meloxicam and acetylsalicylic added and no addiction (control) samples are similar for each groups.

Key Words: Platelet Rich Plasma, Diclofenac, Meloxicam, PDGF-AB, VEGF Supported by Hacettepe University Scientific Researches Unit, Project Number: 1308

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
RESİMLER	xii
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xiv
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	
2.1. Trombositlere Genel Bakış	3
2.2. Trombosit Organelleri	4
2.3. Trombosit Aktivasyonu	10
2.4. Büyüme Faktörleri	14
2.5. Trombositten Zengin Plazma (TZP)	18
2.6. Non-Steroid Antiinflatuar İlaçlar	22
2.7. Diklofenak Sodyum	25
2.8. Meloksikam	26
GEREÇ VE YÖNTEM	
3.1. Çalışma Tasarımı	29
3.2. Çalışmaya Katılabilme Kriterleri	29
3.3. Trombositten Zengin Plazma Hazırlanması	29

3.4.	Çözeltilerin Hazırlanması ve Eklenmesi	32
3.5.	Büyüme Faktörü Eldesi	33
3.6.	Büyüme Faktörü Konsantrasyonlarının Değerlendirilmesi	35
3.7.	İstatistik Yöntemi	35
BULGULAR		
4.1.	Büyüme Faktörleri Miktarları	36
4.2.	Trombosit-Büyüme Faktörü Korelasyonu	39
TARTIŞMA		41
SONUÇ VE ÖNERİLER		46
KAYNAKLAR		47

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACS	Otolog serum
ADP	Adenozin difosfat
ASA	Asetilsalisilik asit
AKS	Açık kanaliküler sistem
BK	Beyaz küre
Ca ⁺²	Kalsiyum
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
cAMPase	Adenilat siklaz
cGMP	Siklik guanidin monofosfat
COX	Siklooksijenaz
COX-1	Siklooksijenaz-1
COX-2	Siklooksijenaz-2
C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NONa	Diklofenak Sodyum
D1	Diklofenak minimum doz
D2	Diklofenak maksimum doz
DAG	Diaçil gliserol
DTS	Dens tübüler sistem

ECGF	Endotelyal hücre büyüme faktörü
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EM	Elektron mikroskopu
bFGF	Fibroblast büyüme faktörü
GMP 140	Granül membran proteini 140
GLUT-3	Glukoz transport molekülü-3
GTP	Guanidin trifosfat
HETE	Hidroksieikozatetraenoik asit
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
HPETE	Hidroperoksieikozatetraenoik asit
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IP3	İnozitol trifosfat
K	Kontrol
KK	Kırmızı küre
mcg	mikrogram
M1	Meloksikam minimum doz
M2	Meloksikam maksimum doz
ng	nanogram
NSAİİ	Non-steroid antiinflamatuar ilaçlar

NSF	N-metilamid duyarlı füzyon proteini
PAR-1	Protease activated receptor-1
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Trombosit kökenli büyüme faktörü
PECAM	Trombosit endotelyal hücre adezyon molekülü
pg	pikogram
PGE2	Prostaglandin E2
PGI2	Prostasiklin
PIP2	Fosfatidil inozitol bifosfat
PLA2	Fosfolipaz A2
PMCA	Plazma membranı kalsiyum ATPaz
PPGF	Büyüme faktörlerinden fakir çözelti
PPP	Trombositten fakir plazma
PRGF	Büyüme faktörlerinden zengin çözelti
PSP	Fosforillenen trombosit Sec1 proteini
SERCA	Sarkoplazmik endoplazmik retikulum kalsiyum ATPaz
SNAP	NSF ile ilişkili proteinler
SNARE	SNAP ile ilişkili membran proteinleri
TGF- β	Transforme edici büyüme faktörü

TXA2	Tromboksan A2
TZP	Trombositten zengin plazma
VAMP	Vezikül ile ilişkili proteinler
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
vWf	von Willebrand faktör
α -G	Alfa granüller
δ -G	Dens granüller
λ -G	Lizozomlar

RESİMLER

Resim	Sayfa
2.1 Trombositlerin yüksek rezolüsyonlu elektron mikroskopisi ile görüntülenmesi.	5
3.1 TZP hazırlamak için kan alımı	31
3.2 TZP hazırlanışı	32
3.3 TZP aktivasyonu sonrası oluşan pıhtılar	34

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1 Farklı trombosit organellerinin şematik görüntüsü	7
2.2 Sitolitik kalsiyum konsantrasyonunun düzenlenmesinde kalsiyum ATPazların rolü	13
2.3 Büyüme faktörlerinin hücreler üzerine etkisi	15
2.4 Büyüme faktörlerinin görevleri	16
2.5 PDGF izoformlarının PDGF reseptörlerine bağlanma şeması	18
2.6 Anitua TZP hazırlama tekniği	20
2.7 İki aşamalı santrifüj yöntemi ile klasik TZP hazırlama yöntemi	21
2.8 Araşidonik asit metabolizması	22
4.1 PDGF-AB miktar tayininin gruplara göre dağılımı	36
4.2 VEGF miktar tayininin gruplara göre dağılımı	38
4.3 TZP trombosit sayısı ile PDGF-AB arasındaki korelasyon	39

TABLÖLAR

TABLO		Sayfa
2.1	Trombosit yapısındaki granüllerin içerikleri	6
3.1	Gönüllülerin yaş ve kan değerleri	30
3.2	Gruplara eklenen ilaç ve TZP miktarları	33
4.1	PDGF-AB miktarlarının gruplara göre tanımlayıcı istatistikleri	36
4.2	VEGF miktarlarının gruplara göre tanımlayıcı istatistikleri	38

GİRİŞ

Her yıl, dünyada 100 milyondan fazla kas-iskelet sistemi yaralanması (kas-tendon-kemik) oluşur (128). Bu yaralanmalar, sporcularda spora ara vermeyi gerektirmekte ve rekreatif spor yapan insanların günlük spor aktivitelerini ve işyerlerindeki çalışma kapasitelerini bile etkilemektedir ve klinik olarak yüklediği bu mesuliyetten dolayı da hızlı iyileşme için hep yeni ürünler arayışları devam etmektedir (1, 2).

Trombositten zengin plazma (TZP), kişiden alınan kanın çeşitli santrifüj işlemlerinden geçirilmesi ile elde edilen otolog platelet konsantresidir (3). Trombositlerin in vivo veya in vitro olarak etkinleşmesi sonucu, içerdikleri büyüme faktörlerinin ortama salınması, doku üzerinde iyileştirici etki gösterir. Bu büyüme faktörleri; trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), transforme edici büyüme faktörü (TGF- β 1), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve fibroblast büyüme faktörüdür (bFGF) (1-3). PDGF-AB özellikle mezenkimal kökenli hücreler için önemli bir mitojendir. VEGF ise anjiogenezi tetikleyen pro-anjiogenetik bir büyüme faktörüdür. Bu iki büyüme faktörünün hazırlanan TZP'deki miktarları, trombosit etkinleşmesinin bir göstergesi olarak kabul edilebildiği gibi, TZP'nin uygulanacak dokuda sağlayacağı etkinlik hakkında da ışık tutar (4-6).

Kas-iskelet dokusunda meydana gelen bir yaralanmanın tedavisinde anti-inflamatuar ve analjezik etkilerinden dolayı, non-steroid antiinflamatuar ilaçlar (NSAİİ) sıklıkla kullanılmaktadır. Non-selektif NSAİİler, siklooksijenaz-1 (COX-1) enzim sentezini ve dolayısıyla bu yolağın bir ürünü olan tromboksan A₂ (TXA₂) enzim sentezini inhibe ederek trombositlerin aggregasyonunu inhibe etmektedirler. Selektif NSAİİ'ler ise sadece siklooksijenaz-2 (COX-2) enzim sentezini inhibe ettikleri için TXA₂ sentezi üzerine etkili değildir (7). Trombositlerin alfa granüllerinde bulunan büyüme faktörlerini hücre dışına sekrete edebilmeleri için aktive ve dolayısıyla agrege olmaları gerekmektedir. NSAİİ kullanımının trombosit fonksiyonu ve agregasyonu üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar literatürde mevcut olup farklı NSAİİ etken maddeleri açısından sonuçlar farklılık göstermektedir (8,9). Bu bilgiler ışığında

NSAİİ kullanmış bir bireyden alınan kandan hazırlanan TZP'nin etkinliğinin değişmesi beklenmektedir.

Çalışmanın amaçları;

- 1- NSAİİ kullanan bireylerden alınan kandan hazırlanan TZP'lerde, aktivasyon ile ortaya çıkacak büyüme faktörlerinin etkilenip etkilenmediğini göstermek.
- 2- Non-selektif (diklofenak) ve selektif (meloksikam) NSAİİ kullanımı arasında TZP etkinleştirilmesi ile elde edilecek büyüme faktörleri arasında fark olup olmadığını araştırmak.

Çalışmanın hipotezleri ;

- 1- TZP uygulanacak kişide non-selektif NSAİİlerin kullanımı TXA2yi inhibe ettiği için, TZP kalitesini etkileyebilir.
- 2- Selektif NSAİİler, TZP uygulanacak kişilerde TXA2 yolağını daha az etkilediği için ve TZP kalitesini daha az bozacağı için, ağrı ve enflamasyon kontrolü için güvenle kullanılabilir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Trombositlere Genel Bakış

Trombositler, kemik iliğinde megakaryositlerin sitoplazmalarından koparak meydana gelirler. 2-3 mikrometre (μm) çapları, 6-10 femtolitre hacimleri ve düzensiz şekilleriyle kan bileşenleri içinde bulunan en küçük hücrelerdir. Kemik iliğinde ve akciğerlerde megakaryosit sitoplazmasının bölünmesiyle oluşurlar. Bir megakaryositten ortalama 2000-7000 trombosit oluşmaktadır. Kandaki normal konsantrasyonları mm^3 'de 150.000 – 450.000'dir. Kanda çekirdeksiz olarak yaklaşık 7-10 gün boyunca yaşarlar. Çekirdekleri yoktur; ama mitokondri, mikrotübül ve granüller (α , δ , ve λ) içerirler. Her trombositte ortalama 50-80 granül bulunmaktadır. Bu granüller, yapılarında 30'dan fazla protein bulundururlar. Trombositlerin aktive olmasıyla, bu içerik salınır. Bugüne kadar, trombositlerin yapısında yaklaşık 1100 farklı protein tipi bulunmuştur. Trombositler, kısıtlı yaşamlarında mütevazı bir hayat sürerler ve çoğu zaman da hiçbir faaliyet göstermeden retiküloendotelial sistem tarafından temizlenirler. Eğer aktive olmalarını gerektirecek bir durumla karşılaşırlarsa, içeriklerindeki birçok protein ve büyüme faktörlerini ortama salgırlar ve homeostazisde, hücre membran adherensinde, agregasyonda, pıhtı oluşumunda, doku tamiri ve angiogeneizde rol oynayabilirler (1-5).

Trombositlerin en dış tabakasını yüksek rezolüsyonlu bir elektron mikroskopu (EM) ile değerlendirecek olursak, kıvrımlı ve bol girintili çıkıntılı olduğu dikkatimizi çekecektir. Bu küçük kıvrımlar ve aralardaki küçük boşluklar, trombositler bir yüzeye yapışacakları zaman onlara ekstra bir yüzey sağlarlar (Resim 2.1). Aktifleşmemiş durumdaki trombositler diskoid yapıları ile yaklaşık $8 \mu\text{m}^2$ yüzey alanına sahiptirler. Trombositler ADP, trombin gibi agonistlerle aktifleşmesi sonucu şekil değişimi ile yalancı kolları olan ekinosferosit bir yapıya dönüşürler ve bu yolla yüzey alanları $13 \mu\text{m}^2$ 'e kadar genişler (6).

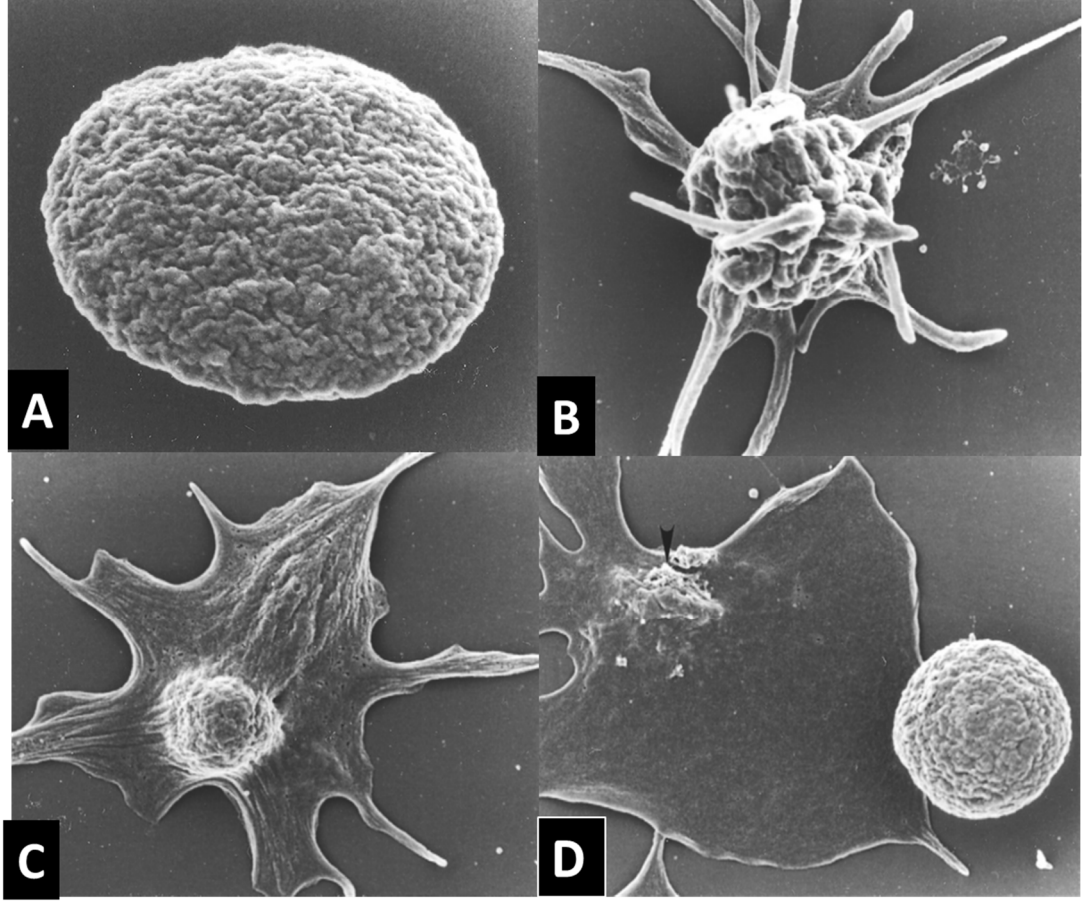
Ayrıca, yapılan çalışmalar ve boyamalar sonucunda, trombosit plazma membranının diğer kan hücrelerinden farklı olarak kalın bir glikokaliks tabaka taşıdığı gösterilmiştir. Peki bu kalın glikokaliks tabaka ne işe yarar? Yüzeyinde bulunan minör ve majör glikoprotein reseptörleri ile hasarlı yüzeye trombosit adezyonunu

kolaylaştırır; trombosit aktivasyonunu ateşler; agregasyonu başlatır ve pıhtı oluşumunu düzenler.

Trombositler, içerdikleri az sayıda mitokondri ve çok sayıda olan ve sitoplazmaya dağılmış spesifik granüller, diğer yapısal bileşenler olan mikrotübüller, aktin flamanları ve enerji kaynağı olan glikojenler ve karışık bir zar yapısı ile kendine özgü çekirdeksiz bir hücredir. Karışık zar yapısını birazcık açacak olursak, sitozol ile zar arasında köprü görevi gören açık kanaliküler sistem (AKS) ve önemli metabolik enzimleri taşıyan dens tübüler sistem (DTS) karşımıza çıkar. Mitokondri ve DTS metabolik süreçte önemli rol oynarken, asıl önemli görev trombositlerin önemli proteinlerini depolayan ve aktifleşme esnasında salgılayan granüllerine düşmektedir (α , δ , ve λ) (Şekil 2-1). Granüllerin zengin içerikleri Tablo 2.1'de kısaca özetlenmiştir. Granüller aslında tipik birer salgı vezikülleridirler; içerikleri hücre dışına salgılanırken, granül membranında bulunan belirli proteinler trombosit yüzeyine doğru hareket eder ve yüzeye yapışarak plazma zarının proteini haline gelirler; bu birleşme, granül içeriklerinin salgılanmasının organize ve planlı bir şekilde yürütüldüğünün önemli bir göstergesidir (7).

2.2. Trombosit Organelleri

Mitokondri : Mitokondriler, dış ve iç zardan oluşan iki katmanlı bir zar yapısına sahiptirler. İç zarın iç yüzeyinde mitokondri matriksi mevcuttur. Trombositlerin mitokondrileri de tıpkı diğer mitokondriler gibi yağ asitlerinin oksidatif olarak yıkımı ve oksidatif fosforilasyon aktivitelerini gerçekleştirebilme kapasitesine sahiptirler ve bu sayede trombosit agregasyonu ve aktivasyonu için gerekli olacak enerjiyi sentezleyebilirler (8).



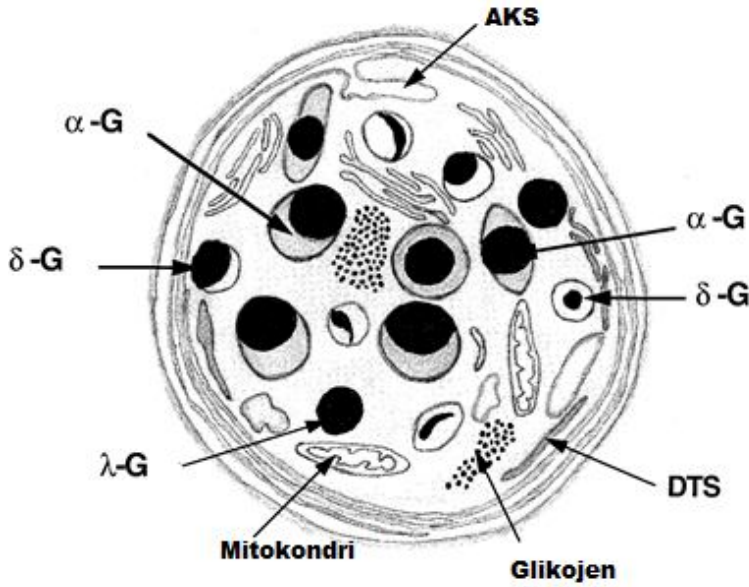
Resim 2.1 Trombositlerin yüksek rezolüsyonlu elektron mikroskopisi ile görüntülenmesi. A) Aktive olmamış trombositlerin dış yüzeyi beyin giruslarını andırmakta. B) Aktivasyonun erken dönemi; dış yüzey hala diskoid trombositin dış yüzeyine benzer. C) Yayılmakta olan trombositin bir başka erken dönem görüntüsü. Hücre merkezindeki kıvrımlı görüntü yavaş yavaş yok olmakta ve psödopodların arası hücre stoplazması ile dolmakta. D) Yayılmış ve düzleşmiş olan aktive trombosit ile dış yüzeyi bol kıvrımlı olan aktive olmamış diskoid trombositin farkı -White ve ark. (3)'ndan alınmıştır.

Açık Kanaliküler Sistem : AKS, trombosit yüzey membranı ile iletişime geçen ve bağlantılar sağlayan, yüzey membranının yılanımsı kıvrıntıları ile hücre içine girmesi ile oluşan bir zar yapısıdır. Kanalların yüzey alanları çok geniştir ve bu kanallar trombosit salgı fazı esnasında granül içeriklerinin dışarı boşalmasına izin verdiği gibi, plazmadan fibrinojenin α granüllere geçişine ya da dışardan kimyasal ve/veya parçalar halindeki bazı moleküllerin ya da mikroorganizmaların hücre içine geçişine

izin verir. Ayrıca trombositlerin yaralı vasküler yüzeylerde yayılmasını ve geniş bir alanı kaplamasını sağlayan da yine AKS'nin açılan ve genişleyen kanallarıdır (9).

Dens Granül 'Pro-agregan moleküller'	Alfa Granül 'Adezyon ve yenilenme molekülleri'	Lizozomlar 'Temizleyen moleküller'
<p>Nükleotidler:</p> <ul style="list-style-type: none"> Adenin:ATP, ADP Guanin:GTP, GDP <p>Aminler:</p> <ul style="list-style-type: none"> Serotonin (5-HT) Histamin <p>Bivalan katyonlar:</p> <ul style="list-style-type: none"> Kalsiyum Magnezyum Pirofosfat 	<p>Proteoglikanlar:</p> <ul style="list-style-type: none"> Trombosit özgül: β TG, PF4 Seruglisin, HRGP PBP, CTAP-III, NAP-2 <p>Adezif glikoproteinler:</p> <ul style="list-style-type: none"> Fibronektin, Vitronektin, Thrombospondin, vWF, <p>Hemostaz ile ilgili faktör ve kofaktörler:</p> <ul style="list-style-type: none"> Fibrinojen, Faktör V, VII, XI, XIII Kininojenler,Plazminojen,ProteinS, <p>Hüresel mitojenler:</p> <ul style="list-style-type: none"> PDGF, TGFβ, ECGF, EGF, VEGF, IGF, İnterlökin-β <p>Proteaz inhibitörleri:</p> <ul style="list-style-type: none"> α2-makroglobülin,α2-antitripsin vb... <p>Ayrıca</p> <ul style="list-style-type: none"> İmmünglobülinler: IgG, IgA, IgM Albümin, GPIa/Multimerin 	<p>Asit proteazlar:</p> <ul style="list-style-type: none"> Katepsin D, E KarboksipeptidazA, B Kolajenaz Asit fosfataz Arilsülfataz <p>Glikohidrolazlar</p> <ul style="list-style-type: none"> Heparinaz N-asetil-glukozaminidaz β-glukronidaz β-galaktozidaz β-glycerophosphatase Glukozidaz Fukozidaz Arabinozidaz, mannozidaz

Tablo 2.1 Trombosit yapısındaki granüllerin içerikleri- Rendu ve ark. (7)'ndan alınmıştır.



Şekil 2.1 Farklı trombosit organellerinin şematik görüntüsü. Trombositte özgü 3 farklı granül kolaylıkla ayırt ediliyor. Granüller içinde en büyüğü şekilde de görüldüğü gibi, koyu düzensiz çekirdeği ve gri matrisi ile α -granüller (α -G). Çekirdek yoğunluğu tüm sitoplazmayı dolduran, orta büyüklükteki granüller ise lizozomlar (λ -G). En küçük hacme sahip olan granüller ise dens granüllerdir (δ -G)-Rendu ve ark. (7)'ndan alınmıştır.

Dens Tübül Sistem: Trombositlerin aktivasyonundaki en önemli role sahip olan prostaglandinlerin sentezinde, DTS membranı önemli görevlere sahiptir. Bu hücre içi membran, araşidonik asidi, tromboksana parçalayan siklooksijenaz ve tromboksan sentetaz enzimlerini yapısında bulundurur. Bir iyonofor gibi davranan TXA₂, trombosit yüzeyindeki reseptörüne bağlanması aşamasında, kalsiyumun da DTS yapısından kontraktıl elemanların bulunduğu plazmaya geçişini sağlar (7, 10). DTS, trombositlerin sarkoplazmik retikulumudur ve kalsiyumun sarkoplazmik retikulundan kontraktıl elemanların bulunduğu plazmaya salıverilmesiyle, tıpkı kas hücresindeki gibi kontraksiyon gerçekleşir ve aynı zamanda sitoplazmadaki kalsiyum bağımlı enzimleri aktif hale gelir (fosfolipaz A₂, miyozin hafif zincir kinaz, proteazlar). DTS yapısındaki kalsiyum, trombosit kalsiyum miktarının yaklaşık %30'unu karşılar. DTS, depoladığı kalsiyum ve adenilat siklaz aracılığı ile trombosit aktivasyonunu düzenler. Kalsiyumun organellerden salıverilmesi, sarkoplazmik endoplazmik retikulumlarda bulunan kalsiyum ATPaz (SERCA) enzimleri ile

kontrol edilir. DTS zar yapısında bulunan SERCA'lar, plazma membranında bulunan kalsiyum ATPazlar (PMCA) ile sıkı bir ilişki içindedirler. Kalsiyum ATPazlar, sitoplazmik siklik AMP (cAMP) seviyeleri ile kontrol altında tutulur. Sitolitik kalsiyum ve cAMP seviyeleri arasında bir denge vardır : sitozolik cAMP miktar artışı, kalsiyumun DTS içinde kalmasını sağlar; bununla birlikte sitozolik cAMP miktarındaki azalma, DTS içindeki kalsiyumun sitoplazmaya boşalmasını ve trombosit aktivasyonunun oluşmasını sağlar. Aktivasyon ve sonrasında granül içeriklerinin salgısı için, kalsiyum önemli bir rol oynamaktadır. Antiagregan ilaçların temel prensibi de trombosit içi sitozolik cAMP miktarını yükseltip trombositlerin aktive olmasını engellemektir (3, 7).

Dens granüller (δ-G): Dens granüller, yaklaşık 150 nm çapları ile, mevcut olan en küçük granüllerdir. Opak yoğun bir çekirdekleri ve bunu çevreleyen berrak bir sitoplazmaları ve en dışta bir membranları mevcuttur (Bkz. Şekil 2.1). Erken megakaryosit döneminde oluşmaya ve matürasyon esnasında içi adenin nükleotidleri ve serotonin ile dolmaya başlar (11).

Dens granül içerikleri protein olmayan küçük moleküllerdir. Çok yüksek oranda adenin nükleotidleri içermektedirler. Ayrıca trombosit kalsiyum miktarının yaklaşık %70'i burada depolanmaktadır fakat DTS havuzunun aksine, trombosit aktivasyonu için salınmaz. Yoğun çekirdeğinin içinde, adenin nükleotidleri ve onların pirofosfat formları, intramoleküler kuvvetlerin de etkisiyle, kalsiyum ve serotonin ile sıkı kompleksler oluşturmaktadır (12). Oluşan bu ağır kompleksler, dens granüllere özgü iki özellik sağlamaktadır: (i) yapısında bulundurduğu yüksek orandaki kalsiyum, çözünür halde değildir ve dens granüle yüksek oranda stabilite kazandırır, (ii) dens granüller yapılarında plazmaya göre neredeyse 1000 kat yüksek konsantrasyonda serotonin depolayabilirler. Yapılarındaki yüksek oranda bulunan fosfor da bu stabiliteye katkıda bulunur (13).

Dens granüller, lizolesitin ve GM3 gangliozidden zengindirler (14). Küçük GTP bağlayan proteinler olan ral ve rab27 de, dens granüllerin membranında yer almaktadır ve bu proteinler granüllerin içeriklerinin salgılanması için gerekli proteinlerdir (15). Ekzositoz ile granüllerini dışarıya salgılayan veziküllerde olduğu gibi, dens granül membranı, salgılama sonrası trombosit membranı ile birleşir ve

dens granül membran proteinleri, aktive trombosit hücre yüzeyinde eksprese edilmeye başlar (7).

Alfa granüller (α -G): Alfa granüller, trombositlerde hem sayı, hem de hacim bakımından en büyük granüllerdir (Bkz. Şekil 2.1). 200-400 nm çapında, tek membranlı, sferik veya ovoid şekillidirler. İntraganüler içeriklerine göre, farklı boyanma özelliklerine sahiptirler. İki ana parçadan oluşurlar: proteoglikan içeren koyu çekirdekleri ve parlak görümlü gri matriksleri (16). Matriksleri de kabaca üçe ayrılır: (i) nükleoide komşu bölge; (ii) plazmatik proteinler içeren orta bölge; ve (iii) von Willebrand Faktör (vWf), multimerin ve faktör V gibi büyük proteinlerin de bulunduğu tübüler yapıları barındıran periferik bölge (17).

Alfa granüller, hem megakaryositik dönemden beri sentezlenmeye başlanan proteinlerin paketlenmesi, hem de doğal iyileşme potansiyeli olan proteinlerin depolandığı granüllerdir (18). Henüz olgunlaşmamış megakaryositlerde alfa granüller de küçük ve olgunlaşmamış görünümündedirler. Daha megakaryositik dönemde iken bile, endoplazmik retikulumlarda sentezlenen proteinler, trans-golgi iletişim ağı ile veziküllerde depolanmaya başlarlar.

Alfa granüller, yapılarında hemostaz, inflamasyon, yara iyileşmesi gibi kritik görevlerde rol alan proteinler içermektedirler. Yapılarında, mitojen faktör olarak, PDGF, TGF- β , VEGF, EGF ve IGF-1 içerirler. Ayrıca yapılarında iki tane proteaz inhibitörleri bulunmaktadır : plazminojen aktivatör inhibitörü-1 , α -1 proteaz inhibitörü , doku faktör yolak inhibitörü ve trombosit özgü 2 farklı protein olan trombosit özgü kollajenaz inhibitörü, tromboglobulin beta (β -TG), platelet faktör 4 (PF 4) ve faktör XI inhibitörü.

Alfa granüllerin ana membran proteini daha önceden GMP140 olarak adlandırılan, şimdilerde CD62 antijeni ya da diğer bir tabirle P-selektin olarak bilinen proteindir. Trombosit aktivasyonu sonrasında, CD62 antijeni, trombosit yüzeyinde eksprese olmaya başlar. Alfa granül membranında, ayrıca GPIIb/IIIa, GPIV (CD36), tetraspanin CD9, osteonektin, glukoz transport molekülü GLUT-3, trombosit endotelial hücre adezyon molekülü (PECAM), vitronektin reseptörü ve GMP33 proteinleri de bulunmaktadır. Ayrıca, granül membranında, sekresyonun düzenlenmesi için gerekli olan GTP bağlayan proteinler bulunur (Rap1, rab4, rab6 ve rab8) (7).

Lizozomlar : Lizozomlar, asidik ortamda aktive olan sindirim enzimleri içermektedirler. Alfa ve dens granüller ile kıyaslandıklarında, 175-250 nm çapları ile orta büyüklükte dirler. Megakaryositlerin en erken döneminden itibaren bulunan lizozomlar, ilk başta küçük boyutlardadır. Megakaryosit olgunlaşması ile, veziküllerin boyut ve sayıları artar (19).

Lizozomlar, glikozidazlar, proteinazlar ve bakterisidal aktiviteye sahip katyonik proteinler içermektedirler. Membranlarında lizozomal integral proteini olan LIMP (CD63) taşırlar ve aktivasyon sonrasında trombosit yüzeyinde CD63 proteini eksprese olmaya başlar (7).

2.3. Trombosit Aktivasyonu :

Sekresyon Fazı : Trombosit agonistleri, trombosit yüzeyindeki reseptörlerine bir kere yapıştığı zaman, sinyal transdüksiyonu aktivasyon sürecini başlatır. Agonist-reseptör bağlanması ile aktive olan guanidintrifosfat (GTP) bağımlı G proteinler ile sinyal, membran boyunca iletilir. G proteinler, hücre içi ikincil habercilerin oluşumunda rol oynayan bazı enzimlerin aktivasyonuna yol açar. Trombositlerin aktivasyonunda iki hücre içi yol önemli rol oynar:

- Trombositlerin herhangi bir uyarı sonucu fosfolipaz C aktivasyonu ve sonucunda diaçilgliserol (DAG) ve inozitol trifosfat (IP3) oluşumu gerçekleşir. Ortaya çıkan IP3 de dens tübül sistemden kalsiyumun hücre içine mobilize olmasını sağlar. DTS, üzerinde IP3 bağlanma bölgeleri içerir. IP3'ün DTS'e bağlanması ile reseptörle yakın bağlantısı olan Ca^{2+} kanalları açılır. Böylece, önce bir kalsiyum piki oluşurken, devamında bazal kalsiyum konsantrasyonuna ulaşılır. Kalsiyumun fazlasının hücre dışına çıkarılıp çıkarılmayacağı ve tekrar intrasellüler depolanıp depolanmayacağı, PMCA ve SERCA arasında oluşan denge yolları ile düzenlenir. Her iki ATPaz da, ATP varlığında kalsiyum transportu yaparlar (Şekil 2.1).
- Membran fosfolipitlerinden fosfolipaz A2 (PLA2) ile araşidonik asit serbestleşmesi ve TXA2 oluşumu gerçekleşir. TXA2 trombosit membranı üzerindeki reseptörüne bağlanarak trombosit aktivasyonuna yol açar.

Hücrede yer alan diğer ikincil haberciler cAMP ve siklik guanidin monofosfat (cGMP), trombosit fonksiyonlarını baskırlarlar (20-2). Hücre içi Ca^{2+} 'un en önemli regülatörü cAMP'dir. cAMP, Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPaz ile sitozolik Ca^{2+} iyonunu DTS'e taşır. Ayrıca fosfatidil inozitol bifosfat (PIP2) hidrolizini de inhibe ettiği bilinmektedir. cGMP artışı da PIP2 hidrolizini inhibe ederek Ca^{2+} artışını baskırlar (23-5).

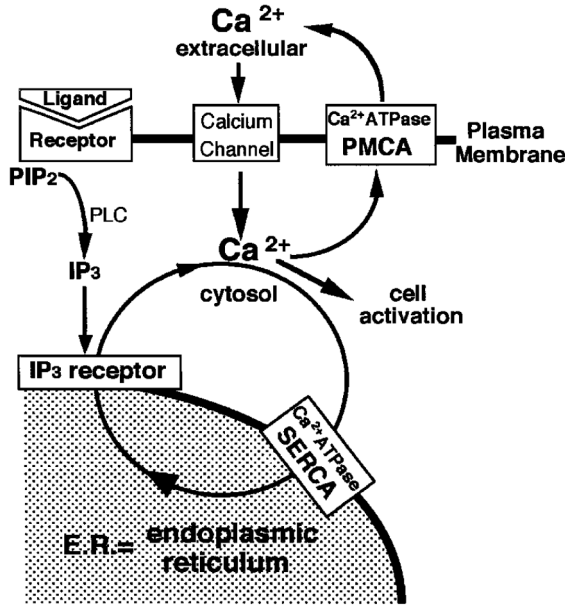
Trombosit aktivasyonundaki en önemli faz olan trombosit granüllerinin içeriklerinin salınımı, dışarıdan ortama herhangi bir kalsiyum eklenmese dahi meydana gelebilir; çünkü sekresyon için gerekli kalsiyum miktarı DTS tarafından karşılanabilmektedir. Uyarılmamış trombositlerde, sitozolik kalsiyum konsantrasyonu [Ca^{2+}] 100 Nm değerinin altındadır. Aktivasyon sonrası DTS içindeki kalsiyum hızla sitozole deşarj olur ve DTS, ince uzun şeklinden, yuvarlak veziküler bir hale dönüşür ve mikrotübüller aracılığı ile merkezde konumlanmış olan granüller, aktivasyon sonrası hareketlenerek AKS ile temasa geçerler (26).

Trombositlerin salgı reaksiyonu, tıpkı düzenli bir şekilde meydana gelen diğer sekretuar olaylar gibidir: (i) granüller, mikrotübüllerin konstrüksiyonu ve granüle bağlı halde bulunan GTP bağlayan proteinler aracılığıyla plazma membranına doğru hareket ederler, (ii) kenetlenirler ve (iii) füzyona uğrarlar. Kenetlenme işlemi, granül ve plazma membranının kenetlenmesini içermektedir. Kenetlenme işlemi sonrası granül ve plazma membranı birleşir ve içeriklerini aktarır (füzyon). Veziküllerin birleşmesi aşamasında, veziküllerin yüzeyindeki spesifik belirteçler, plazma membranı üzerindeki reseptörler tarafından kolayca tanınırlar. Membranların füzyonu, enerji gerektiren bir işlemdir ve bu işlem, özel proteinler tarafından katalize edilir. Bu özel proteinlerden birisi olan N-metilamid duyarlı füzyon proteini (NSF), ATPaz aktivitesine sahiptir ve bu sayede membran füzyonu için gerekli olan enerji ihtiyacının karşılanmasını sağlar. NSF ile ilişkili proteinler (SNAP), ekzositozun oluşmasında rol oynar ve bu proteinlerle ilişkili spesifik membran proteinleri SNARE olarak adlandırılırlar. Sırasıyla hedef hücre üzerindeki ve vezikül üzerindeki reseptörler de, tSNARE ve vSNARE olarak adlandırılırlar. Spesifik vSNARE ve vezikül ile ilişkili proteinler (VAMP), vezikülleri tanımlarlar. Her bir spesifik ekzostotik kor kompleks oluşumu esnasında, vSNARE molekülleri, karşı taraftaki VAMP ya da tSNARE moleküllerine bağlanırlar.

Önemli tSNARE'lerden sintaksin 2, dens granüller ve lizozomların kenetlenmesi için, sintaksin 4 ise, alfa granüller ve lizozomların kenetlenmesi için hedef moleküllerdir (27, 28).

Sonuç olarak granül ekzositozu şu şekilde gerçekleşir: aktivasyon ile ortaya çıkan kalsiyum mobilizasyonu ve spesifik membran GTPaz proteinleri (alfa granüller için Rab4 veya Rab 27, dens granüller için ral), sitoskeletal kontraksiyonu ve granül hareketlerini başlatır. Böylece granüller, plazma membranı ile yakınlaşırlar. Her üç granül de sekresyon için SNAP-23 proteinini kullanırlar (27). Kenetlenme sonrası trombosit yapısında ortaya çıkan heterotrimerik kompleks, şu elemanları içerir : VAMP, SNAP-23 ve sintaksin. Protein kinaz C aktive edilir ve çözünebilir alfa ve gamma SNAP proteinleri, kenetlenmiş komplekse bağlanır. SNF ATPaz kompleksinin oluşmasıyla, füzyon ve sonrasında kompleksin dağılması meydana gelir. Bütün bu kaynaşma ve dağılma işlemleri, protein kinaz C tarafından fosforillenen trombosit Sec1 proteini (PSP) tarafından düzenlenir. Trombositlerin salgı reaksiyonu, intrasellüler granüllerin ortadan kalkarak, membran yüzeylerindeki GMP 140 ve CD 63 proteinlerinin plazma membranında eksprese olması ile sona erer.

Peki bu salgı reaksiyonu nasıl ölçülür? Yapılan kinetik çalışmalara göre, salgı içeriklerini ilk boşaltan dens granüller ve sonra sırasıyla alfa granüller ve lizozomlardır (29, 30). İlk iki granül %100'e yakın olarak tüm içeriklerini salgılamakta, lizozomlar en yoğun aktivite durumlarında bile %60 içeriklerini ancak salgılamakta. Dens granüllerinin içeriklerini salgılayıp salgılamadıkları, salgılanan serotonin ile, alfa granüller β - tromboglobülin ve platelet faktör 4 ile ve lizozomlar da glikohidrolazlar ile tespit edilirler. Ama günümüzde daha az trombosit ile akım sitometri yardımı ile daha kolay anlaşılabilirler. Granüllerin salgı sonrası trombosit yüzeyine gönderdikleri spesifik reseptörler aracılığı ile (dens granüller için granülofiz, α granüller için P-Selektin ve lizozomlar için CD63) tespit yapılır. Yalnız unutulmamalıdır ki; akım sitometri, sekrete edilmiş granül sayısı veya içerikleri ile ilgili kantitatif bir değer vermez ve granül içeriklerinin tespiti yönteminde olduğu gibi kinetik bir çalışma yapmaya izin vermez (7).



Şekil 2.2 Sitolik kalsiyum konsantrasyonunun düzenlenmesinde kalsiyum ATPazların rolü. Fosfolipaz C aktivasyonu ile oluşan IP3 molekülü, reseptörüne bağlanır ve IP3 duyarlı kalsiyum depolarından yani endoplazmik retikulumlardan (trombositler için dens tübüler sistem) kalsiyum salınımı gerçekleşir. Kalsiyum piki ve sonrasında bazal değerlerine dönmesi esnasında, fazla kalsiyumun plazma membranı dışına atılmasını sağlayan PMCA ve hücre içi depolara geri gönderen SERCA aktif rol oynar-Enouf ve ark. (31)'ndan alınmıştır.

Granül İçeriklerinin Etkileri : Yukarıda bahsedilen bir dizi mekanizma sonucu, granüller içeriklerini dış ortama boşaltmaktadırlar. Her bir granül içeriğinin kendine özgü fonksiyonları bulunmaktadır :

- Dens granüllerin içeriklerinin sekresyonu, diğer trombositlerin agregasyonunu kuvvetlendirmektedir. Şöyle ki; dens granüllerin ortama saldıgı ADP ve Ca²⁺ proagregan ajanlardır. Ayrıca serotonin de zayıf bir proagregan ajan olmasına rağmen, oluşturduğu lokal vazokonstriksiyon ile agregasyona katkı sağlar. Migren tanısı konan hastaların trombositlerinde serotonin miktarlarında azalma dikkat çekicidir (32).
- Alfa granüller, iyileşme faktörleri salgılamaktadırlar. GPIIb/IIIa, reseptörleri fibrinojen ve vWf'ye bağlanarak pıhtılaşmayı tetikler ve bu esnada granüller içeriklerini salgılar. Faktör V ve faktör Xa aracılığıyla pıhtılaşmaya katkıda bulunur (33). SPARC ailesi üyelerinden trombospondin ve osteonektin, gibi diğer adeziv proteinlerle trombosit yüzeyinde multimoleküler kompleksler

oluşturarak yara yerindeki iyileşmeyi şekillendirirler. Aktivasyon sonrasında trombosit yüzeyinde eksprese edilen P-selektin, lökosit ve endotel hücre yüzeyindeki P-selektin glikoprotein ligand 1'e bağlanarak bu hücrelerle bağlantı halinde olur. Alfa granüllerin yapısında trombosit köken alan kollajenaz inhibitörü de, kollajen yapım ve yıkım döngüsünü düzenlemektedir. PF4 ve β TG proteinleri anti-heparin aktivitesine sahiptirler ve prostasiklin aktivitesini inhibe etmek için endotel hücrelere bağlanırlar. Yine α -granül yapısında bulunan serglisin, PF4 ve kollajene bağlanarak ve bir taraftan da lenfosit adezyon molekülü olan CD44'e de bağlanarak inflamatuvar süreci düzenler (34-6).

- Lizozomlar, oluşan trombüsü ve meydana gelen agregat materyalini salgıladıkları hidrolitik enzimlerle ortadan kaldırır.

2.4. Büyüme Faktörleri

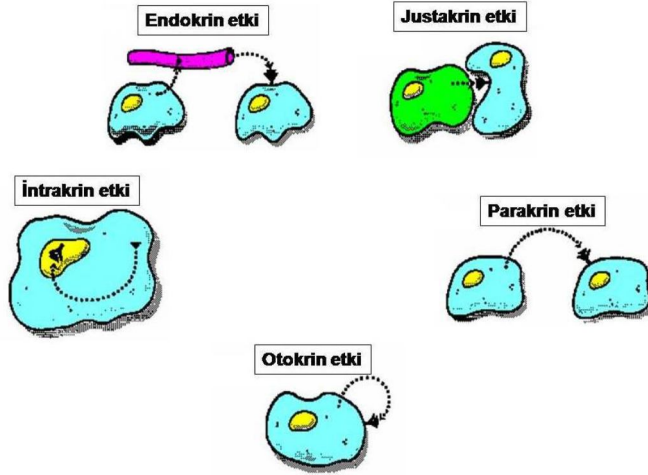
Büyüme faktörleri, hücrelerin büyümelerini ve/veya farklılaşmalarını lokal veya sistemik çeşitli yollarla etkileyen polipeptid yapılarıdır (37, 38). Farklılaşma faktörleri ise, tıpkı büyüme faktörleri gibi işlev görürler ve aynı zamanda hücrenin fenotipik karakterini kontrol eden öncü hücrelerin olgunlaşmış hücrelere dönüşmesini sağlarlar (39, 40). Genel olarak büyüme ve farklılaşma faktörleri kısmen veya tamamen inaktif öncü moleküller olarak ortamda bulunurlar ve proteolitik mekanizmalarla etkin hale gelirler. Hedef hücrelerin yüzeylerinde bulunan reseptörlere bağlandıktan sonra protein kinazları aktive edip hücre içi sinyal yolunu başlatarak etki gösterirler. Büyüme ve farklılaşma faktörleri hücreleri çeşitli şekillerde etkileyebilmektedir (Şekil 2.3). Bu faktörler; hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını, migrasyonlarını, protein sentezlerini artırabilir veya azaltabilir, morfolojik özelliklerini değiştirebilirler (41).

Büyüme ve farklılaşma faktörleri etkiledikleri hücrelere göre farklı gruplarda sınıflandırılmaktadır:

- Endokrin etki: Faktör kan yolu ile taşınır ve uzaktaki hedef hücre etkilenir.
- Parakrin etki: Salınan hücrenin etrafındaki farklı hücreler etkilenmektedir.
- Otokrin etki: Hedef hücre salınan hücrenin kendisidir.
- Justakrin etki: Büyüme faktörleri salgılandıkları hücre zarına bağlanarak

komşu hücreyi etkilerler.

- İntrakrin etki: Büyüme faktörü/reseptör kompleksi hücre içine alınır (Şekil 2.3).



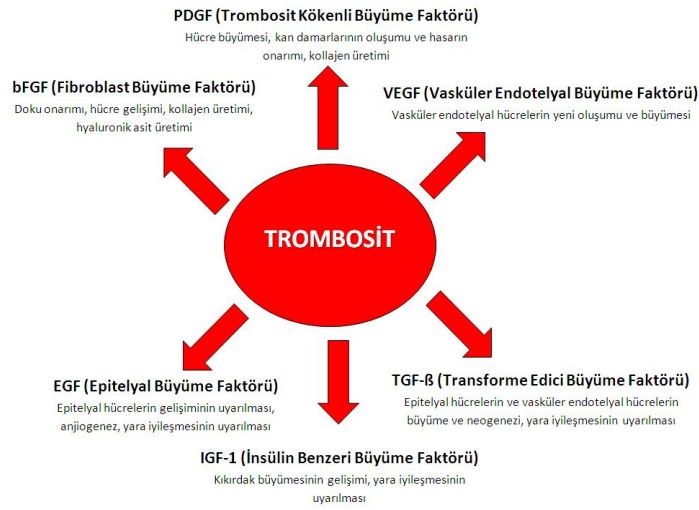
Şekil 2.3 Büyüme faktörlerinin hücreler üzerine etkisi-Kutlu HB (42)'nin tez çalışmasından alınmıştır.

Birçok yetişkin dokudaki hücreler dinlenme fazındadır. Bu faz hücre döngüsünün G0 fazı olarak adlandırılır. Bölünen hücreler interfaz (G1, S, G2) ve M fazlarından geçerler. G0 durumundaki hücrelerin G1 fazına geçmesi bir takım özel uyarılar gerektirir (43).

Çeşitli büyüme faktörleri G0/G1'de hazırlayıcı ve/veya devam ettirici faktör olarak rol oynarlar ve hücrelerin bölünmeyen durumdan bölünme durumuna geçmesini kontrol ederler. Bir hücrenin S fazına geçmesi için her iki uyarının da mevcut olması gereklidir.

Trombositler, alfa granüllerin yapılarında bulunan büyüme faktörlerini sekresyon fazı esnasında ortama salgırlar ve ortamda mevcut büyüme faktörleri, varsa yaralı dokuda iyileşmeyi tetikler. Bu büyüme faktörleri, PDGF, TGF- β , VEGF, EGF ve IGF-1'dir (Şekil 2.4) (44, 45).

Bu büyüme faktörlerinden PDGF ve VEGF aşağıda daha ayrıntılı açıklanacaktır :



Şekil 2.4 Büyüme faktörlerinin görevleri

PDGF: PDGFler, hücre düzeyindeki etkilerini, iki yapısal tirozin kinaz reseptörü olan PDGF- α ve PDGF- β üzerinden sağlayan, disülfid köprülü dimerik büyüme faktörü ailesindedir ve beş farklı PDGF ligandı bulunmaktadır : PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD (Şekil 2.5). Potent bir mitojen olan PDGF, fibroblast proliferasyonunu artırır. Platelet alfa granülleri PDGF için depo görevi görse de, farklı çalışmalarda farklı hücrelerin de sentezleyebileceği ortaya konmuştur. PDGF, fibroblastlar, vasküler düz kas hücreleri, glomerüler mezangial hücreler gibi mezenkimal hücreler için potent bir mitojen ve kemotaktik ajandır. PDGF tarafından düzenlenen iyileşme yolağındaki aşırı yanıt, kronik enflamasyona bağlı ortaya çıkan fibrozis şeklinde karşımıza çıkabilir. PDGF reseptörü tirozin kinaz inhibitörleri (imatinib vs...) günümüzde fibrotik hastalıkların, KML ve çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Normal şart ve koşullar altında, düz kas hücreleri ve fibroblastlar düşük sayıda PDGF reseptörleri içermektedir. Herhangi bir enflamasyon durumunda, yapılan immünohistokimyasal çalışmalara göre, yaralanmış dokuda PDGF reseptörlerin sayısı artmaktadır. Bazı durumlarda, dışardan PDGF uygulanması, nötrofil ve makrofaj kemotaksisini ve fibroblast proliferasyonunu da uyardığı için; PDGF ile tedavi edilen yara dokusunda daha fazla fibroblast ve glikozaminoglikandan zengin granülasyon dokusu ve artmış neovaskülarizasyon ve reepitelizasyon mevcuttur. Lokal PDGF enjeksiyonlarının dekübitus ülserleri ve

diyabette ortaya çıkan yara iyileşmesi gecikmelerinde de etkili olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (46, 47).

VEGF : VEGF yani vasküler endotelyal büyüme faktörü, önemli bir anjiogenez mediatörüdür ve neovaskularizasyon esnasında regülasyonu artar. VEGF, vasküler endotelyal hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve tüp oluşumunu uyarır. Vasküler sızıntıyı artırır ve monosit kemotaksisini ve B hücre proliferasyonunu indükler. VEGF, tirozin kinaz reseptör ailesinden 2 reseptöre bağlanarak etki gösterir : VEGFR-1 ve VEGFR-2. VEGFR-2, VEGF'nin bağlandığı ana reseptördür ve VEGF'nin vasküler endotelyal hücreler üzerindeki proliferatif etkisini indükler. VEGFR-2'ye bağlanan VEGF, intrasellüler kinazlar aracılığı ile reseptörlerini otofosforiller ve bu da mitojenik ve proliferatif sinyalin oluşmasını sağlar (48).

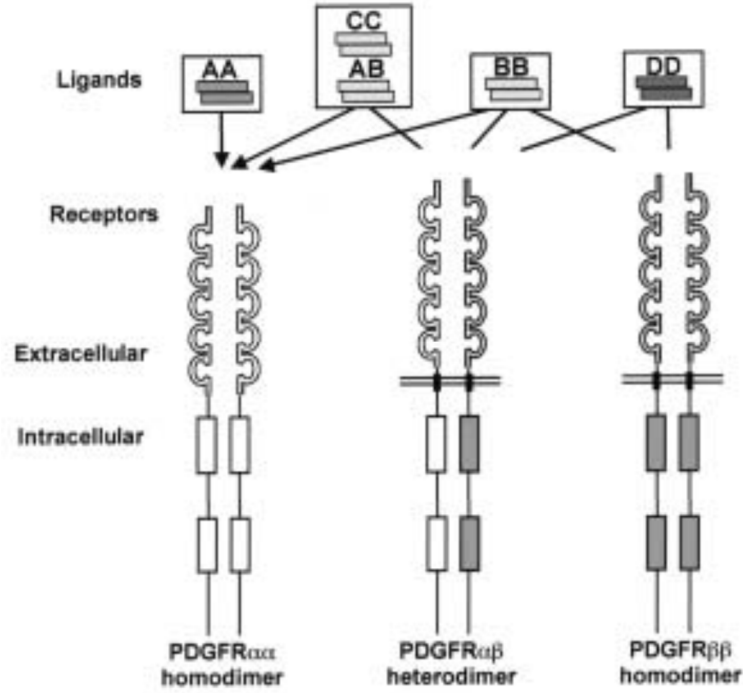
VEGF'nin, tümör hücrelerinden salgılanan, damar geçirgenliğini artırarak asit oluşumuna katkıda bulunan bir madde olduğu düşünülmüş ve bu nedenle 1983'te "vascular permeability factor" olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar doğrultusunda VEGF olarak ismi değiştirilmiş, en kuvvetli fizyolojik ve patolojik anjiogenez uyarıcısı olduğu tespit edilmiştir (110, 111). Homodimerik yapıda, 34-46 kDa ağırlığına, glikoprotein yapıda bir faktör olup, plasental büyüme faktörü ve PDGF ile yapısal benzerlik gösterir. Vasküler endotelyal büyüme faktörünün şu an için bilinen farklı büyüklüklerde beş adet izoformu mevcuttur. Benzer biyolojik etkilere sahip 121,145, 165, 189 ve 206 formlarından baskın olarak bulunanları VEGF121 ve VEGF165 formlarıdır.

Yara iyileşmesinde önemli rol oynayan fibroblast, inflamatuvar ve endotelyal hücrelerin proliferasyon ve göçünün uyarılmasında görevlidir ve vasküler geçirgenliği artırır (112-114).

İlk olarak tümör hücreleri tarafından sentez edildiği bulunmasına rağmen, endotel hücreleri, makrofaj, düz kas, lenfosit, monosit, nötrofiller, trombositler, keratinositler ve astrositler gibi birçok farklı hücre tipi tarafından da doku hipoksisine ve düşük glukoz değerlerine cevap olarak salınır. İnsanlarda, yara ve kırık iyileşmesi sırasında normal olarak salınmaktadır.

Yaralanma sonrası hasar bölgesinde, VEGF ve VEGF mRNA hızla artar ve bu artıştan birincil olarak nötrofil ve fibroblastlar sorumludur. Yaralanma alanında

vasküler zedelenmeye bağlı oksijen miktarı azalır; oluşan hipoksi VEGF mRNA'sını güçlü şekilde stimüle eder (112).



Şekil 2.5 PDGF izoformlarının PDGF reseptörlerine bağlanma şeması; oklar ligandların reseptör affinitesini göstermekte-Alvarez ve ark. (46)'ndan alınmıştır.

2.5. Trombositten Zengin Plazma (TZP)

Trombositten zengin plazma uygulaması, son yıllarda gittikçe popülerite kazanan, özellikle kas-iskelet sistemi hastalıkları ile uğraşan tıp dalları arasında gittikçe yaygınlaşan bir tedavi metodolojisidir. TZP, kısaca 'küçük hacimdeki plazma içine sıkıştırılmış otolog platelet konsantresi' şeklinde tanımlanabilir. TZP'nin yüksek miktarda büyüme faktörü ihtiva ettiği düşünülmektedir. TZP'nin 1990 yılından beri yaygınlaşmasını sağlayan mantık, önemli büyüme faktörlerini ve sinyal moleküllerini bünyesinde bulundurması ve aktivasyon ile çevre dokuya salgılaması olmuştur.(49-52)

TZP, yüksek miktarda trombosit içeren bir plazmadır. Aktive edildiğinde pıhtılaşabilir. Normal pıhtıdan biraz farklıdır. Normal pıhtı bünyesinde %94 kırmızı

küre (KK) hücreleri, %5 trombosit hücreleri ve %1 beyaz küre (BK) hücreleri bulunmaktadır. TZIP tarafından oluşturulan pıhtıda ise, buna zıt olarak %94 trombosit hücreleri, %5 KK hücreleri, %1 BK hücreleri bulunmaktadır (45).

TZIP'nin hastanın kendi kanından hazırlanması nedeniyle immün yanıt riski olmaması ve aynı zamanda maliyetinin düşük olması en önemli avantajlarıdır (53). TZIP, sadece içerisindeki büyüme faktörleri ile değil, aynı zamanda fiziksel ve kimyasal özellikleri ile de yara iyileşmesinde etkili olmaktadır. İçerdiği yoğun fibrinojen sayesinde TZIP hazırlanması sonrasında trombositler aktive olarak fibrin ağı oluşturmaktadır. Oluşan 3 boyutlu fibrin ağ da pıhtının stabilizasyonunu sağlamakta, beraber uygulandığı materyallerin uygulanmasını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca oluşan fibrin ağ, bölgeye gelen rejenerasyon kapasitesi olan hücrelerin tutunması için iskele görevi de görmektedir (54, 55).

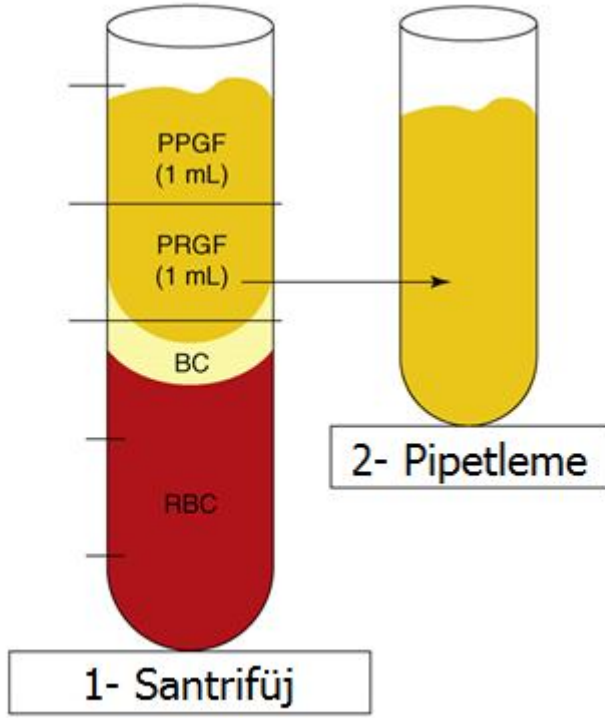
Mevcut TZIP hazırlama teknikleri, ortak özelliklere sahiptirler: kan antikoagülanlı tüplere alınır ve santrifüj ile çevrilir. Hazırlama zamanı tekniğine göre değişse de, hemen hemen bir saat içinde tamamlanır. Genellikle ilk santrifüj aşaması, kanı tabakalara ayırır: en altta kırmızı küre (KK) tabakası, hemen üstünde trombositlerin yoğun olarak bulunduğu buffy coat olarak adlandırılan tabaka ve en tepede asellüler ya da trombositten fakir plazma (PPP). Daha sonraki aşamalar değişmekle birlikte, temel felsefe aynıdır: elde edilebildiği kadar fazla trombosit eldesi. Daha sonra elde edilen TZIP, direk yaralı bölgeye ya da dışarıda trombosit aktivatörleri ile aktive edildikten sonra elde edilen büyüme faktörler aracılığıyla dokuya uygulanır (1, 56).

Manuel TZIP hazırlama metodolojisi, temel olarak iki akıma ayrılır: (i) trombositten zengin ama lökositten fakir TZIP, (ii) hem trombosit hem de lökositten zengin TZIP.

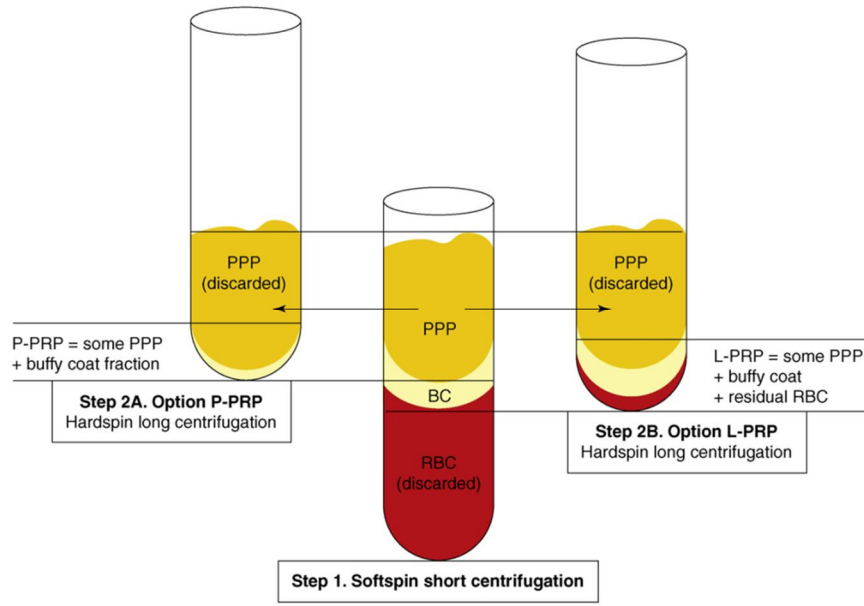
Manuel olarak trombositten zengin ama lökositten fakir TZIP hazırlama metodolojisi konusundaki en iyi örnek, Anitua'nın TZIP metodolojisidir. Anitua tekniğinde venöz kan, sitratlı küçük tüplere alınır ve hafif devirde santrifüj edilerek, yukarıda da bahsedildiği gibi üç farklı katmana ayrılır. Anitua, elde edilen asellüler plazma tabakasının üst kısmını büyüme faktörlerinden fakir çözelti (PPGF) olarak adlandırırken, bu kısmı tüplerden ayırmakta ve kalan plazmayı büyüme faktörlerinden zengin çözelti (PRGF) olarak adlandırmıştır ve bu tabakayı toplayarak ayrı bir tüpe aktarmıştır (50-2). Bütün tüplerden elde ettiği PRGF'leri de %10'luk

kalsiyum klorür ile aktive ederek büyüme faktörlerini açığa çıkarmayı başarmıştır (Şekil 2.6).

Hem trombosit hem de lökositten zengin TZP hazırlama metodolojisi biraz daha farklıdır: ilk santrifüj sonrası katmanlara ayrılan kanın buffy coat ve trombositten fakir plazma tabakaları ayrılır, kırmızı küre bulaşı olmaması önemlidir. Bu iki tabaka ayrı bir tüpe transfer edildikten sonra yüksek devirde yeni katmanlar elde edebilmek için tekrar santrifüj edilir. İkinci santrifüj sonrası plazmanın PPP olarak adlandırılan kısmın çoğu atılır ve geriye kalan kısım uygulama için ayrılır (Şekil 2.7).



Şekil 2.6 Anitua'nın PRGF tekniği olarak adlandırdığı metodoloji. Birinci aşamada sitratlı tüplere alınan kan, 460 veya 580 g kuvvette 8 dakika çevirilir. Daha sonra tabakalara ayrılır. İkinci aşamada ise PPGF atılarak, büyüme faktörlerinden zengin PRGF ayrılır. Pıhtılaştırmak için, içine kalsiyum klorür eklenir-Ehrenfest ve ark.(56)'ndan alınmıştır.



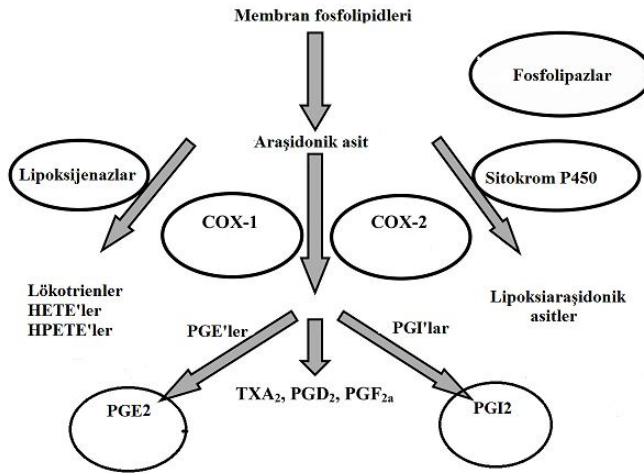
Şekil 2.7 İki aşamalı santrifüj yöntemi ile klasik TZP hazırlama yöntemi. İlk tur çevirme sonrası kan kırmızı küre, buffy coat ve asellüler plazma şeklinde üç tabakaya ayrılıyor. Lökositten fakir TZP için buffy coat tabakasının az bir kısmı ve plazma ayrılırken, lökositten zengin TZP için buffy coat tabakasının tamamı, plazma ve bir miktar rezidüel kırmızı küre tabakası ayrılır. Daha sonra yüksek hızlı santrifüj sonrası altta kalan yoğun plazma TZP olarak ayrılır- Ehrenfest ve ark.(56)'ndan alınmıştır.

Büyüme faktörleri, aktivasyon işlemi sonrası, sağlıklı trombositlerden salgılanabilmektedir. Alfa granülleri trombosit hücre membranı ile birleşir ve burada histon ve karbonhidrat zincirlerinin eklenmesiyle protein büyüme faktörleri biyoaktif hale geçer. Bu yüzden, TZP yapımı sırasında trombositler zarar görür ve varlığını sürdüremez hale gelirse biyoaktif büyüme faktörleri salgılayamazlar, bu da başarılı sonuçların alınmasını engeller (57). Büyüme faktörleri dokuya uygulandıktan sonra pıhtı retrakte olur ve degranüle olur. Büyüme faktörleri ekstrasellüler matrikste depolanır. Bundan sonra matriksin kimyasal yapısının değişmesi ile büyüme faktörleri salınır, trombositlerin hücre membranında bulunan tirozin-kinaz reseptörlerine bağlanır ve bu hücreleri aktive eder. Gerçek bağlanma bölgesi hücrenin diğer yüzündedir. Büyüme faktörlerinin reseptörlerle birleşmesi sonrası, tirozin kinaz reseptörünün eksternal parçası ile sitoplazmadaki haberci protein aktive

olur. Aktive olmuş tirozin kinaz reseptörünün sitoplazmik kuyruğu artık haberci proteinler için bağlanma bölgesi olarak görev yapar. Bu aktivasyon ile hücre çekirdeğine girip hücre bölünmesini sağlayan hedef genlerin aktivasyon kaskadı başlar. Takiben, haberci RNA transkripsiyonu olur ve hücre tamiri ve rejenerasyonu kaskadı başlar. Büyüme faktörleri mutajenik değildir; normal gen regülasyonu ve normal yara iyileşmesi “feed-back” kontrol mekanizması ile çalışan doğal proteinlerdir (58-60).

2.6. Non-Steroid Anti-inflamatuar İlaçlar

NSAİİ’ler etkilerini prostaglandin sentezini azaltarak gösterirler (61-4). Prostaglandinler, yapılarında bir halka taşıyan 20 karbonlu doymamış yağ asiti türevleridir. Genellikle sentezlendikleri dokuda lokal olarak etkilidirler ve hızlı bir şekilde etkin olmayan metabolitlerine dönüşürler. Membran fosfolipidleri ve fosfolipidlerden sentezlenen TXA₂, lökotrienler ve hidroperoksieikozatetraenoik asit (HPETE) ve hidroksieikozatetraenoik asit (HETE) gibi prostaglandinlere benzeyen ve benzer öncü maddelerden sentezlenen lipidler kısaca şekil 2.8’de özetlenmiştir.



Şekil 2.8 Araşidonik asit metabolizması-Kaynak 65’den alıntıdır.

Prostaglandinler çoğu etkilerini hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanarak sağlarlar. Endojen olarak dokuda üretilen prostaglandinler ve metabolitleri belirli bir hücre tipinin verdiği yanıtların ince ayarını yapan lokal sinyaller olarak davranırlar. Fonksiyonları dokudan dokuya çok büyük farklılıklar gösterebilir. Örneğin; TXA₂’nin trombositlerden salgılanması yeni trombositlerin toplanmasını

saglamaktadır. Ancak diğer dokularda TXA2'nin yüksek konsantrasyonları daha farklı bir sinyal taşır; örneğin belirli bazı düz kas hücrelerinde TXA2 kasılmaya neden olur. Prostaglandinler allerjik ve inflamatuvar reaksiyonlarda salgılanan kimyasal mediyatörlerin bir grubunu oluşturmaktadır (66, 67). Prostaglandinler 20 karbonlu bir yağ asiti olan araşidonik asitten sentezlenirler (66). Araşidonik asit hücre zarlarında fosfolipitlerin yapısında bulunmaktadır (68, 69). Serbest araşidonik asit doku fosfolipitlerinden PLA2 ve diğer açıl hidrolazların etkisiyle açığa çıkar. Bu olay hormonların ve diğer uyarıların kontrolü altındadır (66).

Eikozanoitlerin arasidonik asitten sentezlenmesinde rol oynayan iki önemli yol vardır (66):

Lipoksijenaz yolu:

Çeşitli lipoksijenazlar arasidonik asitten 5-HPETE, 12-HPETE ve 15-HPETE sentezlenmesini sağlarlar. Bunlar araşidonik asitin dayanıklı bir yapıya sahip olmayan peroksitlenmiş türevleridirler ve sentezlendikleri dokuya bağlı olarak hidroksillenmiş türevleri olan HETE'lere, lökotrienler veya lipoksinlere dönüştürülürler (64, 66).

Siklooksijenaz yolu:

Prostaglandinler, tromboksanlar ve prostasiklinler gibi halka yapısı taşıyan tüm eikozanoitler siklooksijenaz yoluyla sentezlenirler. Siklooksijenaz enziminin iki farklı gen tarafından ve farklı fizyopatolojik olaylarca uyarılan iki alt grubu bulunmaktadır (63, 64, 67):

- COX-1:

COX-1 enzimi genelde homeostazisi düzenleyici özelliktedir ve aktivitesi genelde sabittir (68, 69). COX-1 70 kd ağırlığındadır ve dokuzuncu kromozomda bulunan bir gen tarafından kodlanmaktadır Enzim etkinliği genel olarak dört farklı bölgede bulunmaktadır (70).

Trombositlerde: Araşidonik asitin TXA2'ye dönüşmesini sağlar. Trombositlerdeki TXA2 yapımındaki azalma sonucu trombosit toplanması ve vazokonstriktif etki, dolayısı ile tromboza olan eğilim azalır (70).

Mide mukozasında: Yaygın olarak bulunur. Hücre koruyucu prostaglandinlerin oluşumundan sorumludur. Baskılanması sonucu mide mukozasında koruyucu etki sağlayan prostaglandinlerin sentezi azalır ve ülser oluşumu kolaylaşır (71, 72).

Vasküler endotelde: Özellikle aterosklerotik bölgelerdeki prostasiklin (PGI₂) üretiminde rol oynadığı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (73, 74).

Böbrek ve vasküler yapıda: Toplayıcı kanallarda ve Henle kulpunda yaygın olarak bulunmaktadır. Bu bölgelerde Prostaglandin E₂ (PGE₂) sentezini uyararak böbrek kan akımını arttırarak su ve tuz tutulumunu azaltır (71, 72).

- Siklooksijenaz-2:

Ağırlığı COX-1 ile aynı olup birinci kromozomdaki bir gen tarafından kodlanmaktadır. Aminoasit dizilimi yaklaşık %60 oranında COX-1 ile benzerlik gösterir (70). COX-2 geni inflamasyon başta olmak üzere birçok durumda uyarılabilir (75). Sitokinler ve büyüme faktörleri bu enzimin işlevini arttırmaları. İnflamatuvar süreçlerde COX-2 aktivitesinde belirgin artış olmaktadır (75-7).

Nonspesifik NSAİİ'ler hem COX-1 hem de COX-2 enzimini değişik derecelerde düşük seçicilikle baskırlar (78).

NSAİİ'lerin genel özellikleri:

NSAİİ'lerin çoğu organik asit yapısındadır. pH azaldıkça ilaçların lipitte çözünen non-iyonize miktarları artıp, ilacın hücre zarının lipid yapısıyla birleşimi fazlaşacağından, NSAİİ'ler seçici olarak mide, böbrek medullası ile iskemik ve inflamasyonlu bölgeler gibi asiditesi fazla olan dokularda daha fazla birikirler.

NSAİİ'lerin etkileri:

NSAİİ'ler, aspirin de dâhil olmak üzere tedavide inflamasyon (antiinflamatuvar) ve ağrıyı azaltırlar (analjezi), ateşi düşürmek (antipiretik) üzere 3 temel tedavide kullanılır. NSAİİ'lerin güçleri bu üç etki açısından birbirlerinden farklıdır.

Antiinflamatuvar etkileri:

NSAİİ'ler siklooksijenazı engellediklerinden prostaglandinlerin yapımını baskılayarak prostaglandinlerin rol oynadığı inflamatuvar reaksiyonları kontrol altına alır.

Analjezik etkileri: PGE₂ inflamatuvar süreçte hücrelerden bölgesel olarak salgılanan bradikinin, histamin ve diğer kimyasal mediyatörler sinir uçlarının daha duyarlı hale gelmesine neden olmaktadır (79).

Antipiretik etkileri:

Ön hipotalamusta yer alan termoregülatuvar merkezin uyarılmasına bağlı olarak ateş ortaya çıkar. Enfeksiyon, aşırı duyarlılık reaksiyonları, malignite veya inflamasyon

nedeniyle uyarılan lökositlerden salgılanan pirojenik (vücutta ates oluşmasına neden olan) etkili sitokinler tarafından uyarılan PGE2 sentezi termoregülatuar merkezin ayar noktasını (set-point) yükseltmektedir. NSAİİ'ler PGE2'nin sentezini ve salınımını azaltarak vücut ısısını düşürmektedir. NSAİİ'ler ısı merkezinin hızla normale dönmesini sağlamaktadır. Periferik vazodilatasyon ve terleme ile ısı kaybını arttırarak atesli hastaların vücut ısısını düşürmektedir (67, 74).

Diger etkiler:

Menstrüel krampları azaltır (78, 80). Etki mekanizmaları kandaki prostaglandin düzeyini azaltmaya dayanır. Ilaca ağrı baslar başlamaz veya menstrüasyonun başlamasıyla birlikte başlanır ve 48–72 saat devam edilir. Ortalama tedavi yanıtı %67–95 arasındadır. NSAİİ'lerin bir gurubuna yanıt vermeyen hasta baska bir gruptaki NSAİİ'lere cevap verebilir (81, 82). Patent duktus arteriosus'un kapanmasına yardımcı olur (83). Oküler inflamasyon, sok, periodontal hastalık ve spor travmasının tedavisinde, kanser kemoterapisinde, cerrahi girisimlerde kullanılır.

2.7. Diklofenak Sodyum

Diklofenak sodyumun ana farmakolojik profili yaklaşık otuz yıl önceki birçalışma ile kurulmuş ve keşfedilmiştir. Ancak, gastrointestinal sistem toleransı, periferik analjezik aktivitesi ve kısmen biyokimyasal etkileşim yerleri ile ilgili bilgiler bu bileşikte yeni yaklaşımları harekete geçirmiştir (84). Diklofenak sodyum etken maddesini içeren ilaçlar sadece reçete ile kullanılabilir. 1970'lerde aspirinin siklooksijenazı inhibe ettiği keşfedildikten sonra diklofenak sodyum geliştirilmiştir (85).

Diklofenak sodyum, analjezik antiinflamatuvar ve antipiretik etkilerinden dolayı ateş, baş ağrısı ve kronik artritte geniş olarak kullanılan bir NSAİİ'dir. Diklofenak sodyum'un kimyasal formülü şu şekildedir: $C_{14}H_{11}Cl_2NONa$. Diklofenak sodyum, zayıf sarımsı-beyazdan açık beje kadar olan renklerde olabilen kristalize tozdur. Oda sıcaklığında stabildir. Dikkatli saklanmalıdır çünkü toksik etkilidir (86).

Diklofenak Sodyum Etki Mekanizması

Diklofenak sodyum potent siklooksijenaz inhibisyonunda rol oynar, araşidonik asit salınımını azaltır ve araşidonik asit geri alımını (reuptake) artırır. Hedef enzimleri;

COX-1 ve COX-2'dir. Diklofenak sodyum bir arasıdonik asit olan prostoglandin ve tromboksanların doğrudan inhibisyonunu yöneten COX enziminin inhibitörüdür (87-9). Siklooksijenazın tam olarak bilinen iki formu vardır ve bunlardan COX-1 esas form, COX-2 ise inflamasyondan sorumlu olan formdur (90, 91). COX-2 inhibisyonunun etkide ana mekanizma olduğu düşünülmektedir. Bunun yanında COX-1 inhibisyonu da NSAİİ'lerin gastrointestinal sistem toksisitesine neden olmaktadır (91). Bu durum yeni NSAİİ'lerin geliştirilmesinin düşünülmesine yol açmıştır. Selektif COX-2 inhibitörlerinin yüksek antiinflamatuvar etki sağladığı, düşük tipik nonsteroidal antiinflamatuvar ilaç toksisitesi gösterdiği görülmüştür (92). Klinik kullanımda ise diklofenak sodyum ciddi hepatotoksik etki göstermektedir. Diklofenak kullanıcılarının yaklaşık 100.000 de 3,6'sında %8'lik bir ölüm oranı ile ciddi karaciğer hasarı gelişmektedir. Buna rağmen diklofenak sodyum toksisitesinin altında yatan mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır, toksisite doku proteinleri ve reaktif metabolitlerin kovalent bağlanmasıyla ilgili metabolik ve immünolojik mekanizmaya bağlanmaktadır (93).

2.8. Meloksikam

Meloksikam, antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkilere sahip olduğu hayvanlarda gösterilmiş bulunan, enolik asit sınıfından bir nonsteroid antiinflamatuvar ilaçtır. Meloksikam, bütün standart enflamasyon modellerinde güçlü bir antiinflamatuvar etki göstermiştir. Meloksikamın enflamasyon mediatörleri olarak bilinen prostaglandinleri inhibe etmesi, anlatılan bu etkileri açıklayan ortak bir mekanizma olabilir. Meloksikamın ülserojen dozuyla ve antiinflamatuvar etki sağlayan dozuyla ilgili olarak sıçanlardaki adjuvan artritinde yapılan karşılaştırmalar, bu ilacın nonsteroid antiinflamatuvar grubundaki standart ilaçlardan daha üstün terapötik sınırlara sahip olduğunu doğrulamıştır. Meloksikam in-vivo olarak, enflamasyon yerindeki prostaglandin biyosentezini, mide mukozasındaki veya böbrekteki prostaglandin sentezinden daha güçlü bir şekilde inhibe etmiştir.

Bu artmış ilaç emniyeti profilinin COX-1'den daha çok COX-2'nin selektif olarak inhibe edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Meloksikamın COX-1'den ziyade COX-2'yi selektif olarak inhibe ettiği, kobay makrofajları, sığır aort endotel hücreleri (COX-1 aktivitesinin test edilmesi amacıyla), fare makrofajları (COX-2 aktivitesinin test edilmesinde) ve cos-hücrelerinde yapılan rekombinan insan

enzimleri gibi çeşitli hücre sistemlerinde in-vitro gösterilmiştir. Nonsteroid antienflamatuar ilaçlarda COX-2 inhibisyonunun terapötik fayda sağladığını, COX-1 inhibisyonunun ise midedeki ve böbrekteki yan etkilerden sorumlu olduğunu gösteren kanıt sayısı, gittikçe artmaktadır. Önerilen meloksikam dozlarına eşlik edebilen perforasyonlar, ülserler ve ülser kanamaları gibi advers gastrointestinal olayların insidansının, diğer nonsteroid antienflamatuar ilaçların standart dozlarına kıyasla çok daha düşük olduğu, klinik çalışmalarda gösterilmiştir.

Meloksikam, peroral kullanım sonrası iyi oranda (%89) emilir. Besinlerle birlikte alınması, emilimde değişiklik yapmaz. Peroral 7.5 ve 15 mg'lık dozlardan sonraki ilaç konsantrasyonları dozla orantılıdır. Kararlı plazma düzeyleri, 3-5 gün içerisinde elde edilir. Bir yıldan daha uzun devam eden sürekli tedavi sonrasındaki ilaç konsantrasyonları, kararlı plazma düzeyleri elde edildikten sonrakilere benzer. Plazmadaki meloksikamın %99'undan fazlası plazma proteinlerine bağlanır. Günde tek doz şeklindeki kullanımla ilacın plazma konsantrasyonlarında meydana gelen dalgalanmalar nispeten az olup kararlı plazma düzeylerine ulaştıktan sonra Cmax / Cmin (doz öncesi) konsantrasyonları arasındaki farklar 7.5 miligramlık dozlarda 0.4-1.0 mcg/ml; 15 miligramlık dozlarda 0.8-2.0 mcg/ml arasında değişir.

Meloksikam sinovyal sıvıya iyi geçer ve burada, plazmadakinin yaklaşık yarısı kadar konsantrasyona ulaşır.

Meloksikam, büyük oranda metabolize olur ve günlük dozun %5'ten daha düşük bir bölümü, hiç değişmeksizin dışkıyla vücuttan uzaklaştırılır. Meloksikam değişmemiş olarak idrarda eser miktarda bulunur. Meloksikamın metabolizmasında başlıca yol, maddenin tiyazolil bölümündeki metil grubunun oksidasyonudur ve metabolitlerin yaklaşık yarısı idrarla, kalanı dışkıyla vücuttan atılır. Meloksikamın ortalama vücuttan eliminasyon yarı-ömrü 20 saattir.

Ne karaciğer yetmezliği ne de hafif-orta şiddetteki böbrek yetmezliği meloksikam farmakokinetiğini önemli ölçüde etkiler.

Plazma klirensi ortalama 8 ml/dakikadır ve yaşlılarda daha azdır. Dağılım hacmi düşük olup ortalama 11 litre dolayındadır. Bu değerler hastadan hastaya %30-40 kadar değişiklik gösterebilir.

Meloksikam, özellikle aşağıdaki endikasyonlarda kullanılan bir nonsteroid antienflamatuar ilaçtır :

- Romatoid artritinin semptomatik tedavisi
- Ağrılı osteoartrit (artroz, dejeneratif eklem hastalığı) semptomatik tedavisi
- Ankilozan spondilitinin semptomatik tedavisi

GEREÇ VE YÖNTEM

“**Trombositten Zengin Plazmanın Tedavi Edici Etkisini Meloksikam ve Diklofenak Değiştirir mi?**” isimli tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 08.01.2014 tarihli, 16969557-15 sayılı GO 13/566-07 no’lu kararı ile etik açıdan uygun bulunmuştur ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir.

3.1. Çalışma Tasarımı

Çalışmamız prospektif, kontrollü bir çalışmadır. Trombosit ve lökosit sayıları ve çalışma gruplarımız bağımsız değişkenlerimiz, VEGF ve PDGF-AB büyüme faktör miktarları bağımlı değişkenlerimizdir.

3.2. Çalışmaya Katılabilme Kriterleri

Çalışmaya 18-35 yaş aralığında, sigara içmeyen, herhangi bir kanama ya da pıhtılaşma bozukluğu bulunmayan ve son 10 gün içinde herhangi bir ilaç (özellikle aspirin ve non-steroidal antiinflatuar ilaçlar) ya da alkol kullanmamış sağlıklı, erkek gönüllüler dahil edilmiştir. (95, 103). Çalışmaya katılmaya engel herhangi bir durumu söz konusu olmayan gönüllülere çalışma hakkında bilgi verilmiş, katılmak isteyenlere aydınlatılmış onam formu doldurtulmuş ve çalışmaya dahil edilmişlerdir. Çalışmaya katılan gönüllülerin yaş, trombosit ve lökosit değerleri ile ilgili tanımlayıcı istatistik verileri Tablo 3.1’de verilmiştir.

3.3. Trombositten Zengin Plazma Hazırlanması

Çalışmaya katılma kriterlerini karşılayan 20 gönüllüden, en az 3 saat açlık sonrası, 21 gauge kelebek set (Dahlhausen Scalp Vein Set CE, Köln, Almanya) ve enjektör (Genject A.Ş., Türkiye) ile 10-15 cc venöz kan alınmıştır ve 10 cc’lik 1/9 oranında %3.8’lik sodyum sitrat eklenmiş olan polipropilen tüplere (BD Vacutainer®, BD-Plymouth, PL6 7BP, UK) ayrılmıştır (Resim 3.1).

Örnek No	Yaş	Tam Kan Trombosit(μ l)	Tam Kan Lökosit(μ l)	TZP Trombosit(μ l)	TZP Lökosit(μ l)
1	22	172000	4600	244000	900
2	23	235000	6000	410000	1500
3	23	214000	6200	427000	1200
4	22	239000	8800	512000	1200
5	22	260000	7000	516000	2600
6	22	330000	8900	624000	2100
7	23	282000	7100	692000	500
8	23	231000	8200	436000	700
9	22	161000	5600	308000	1700
10	22	211000	8500	412000	2200
11	22	240000	8700	478000	2200
12	24	274000	6200	523000	2500
13	32	191000	6500	358000	1700
14	28	263000	8200	528000	3200
15	21	246000	6600	537000	1500
16	22	217000	5600	401000	800
17	26	269000	6900	484000	1300
18	22	179000	6100	318000	1500
19	28	259000	8500	485000	1100
20	31	221000	5700	429000	2000

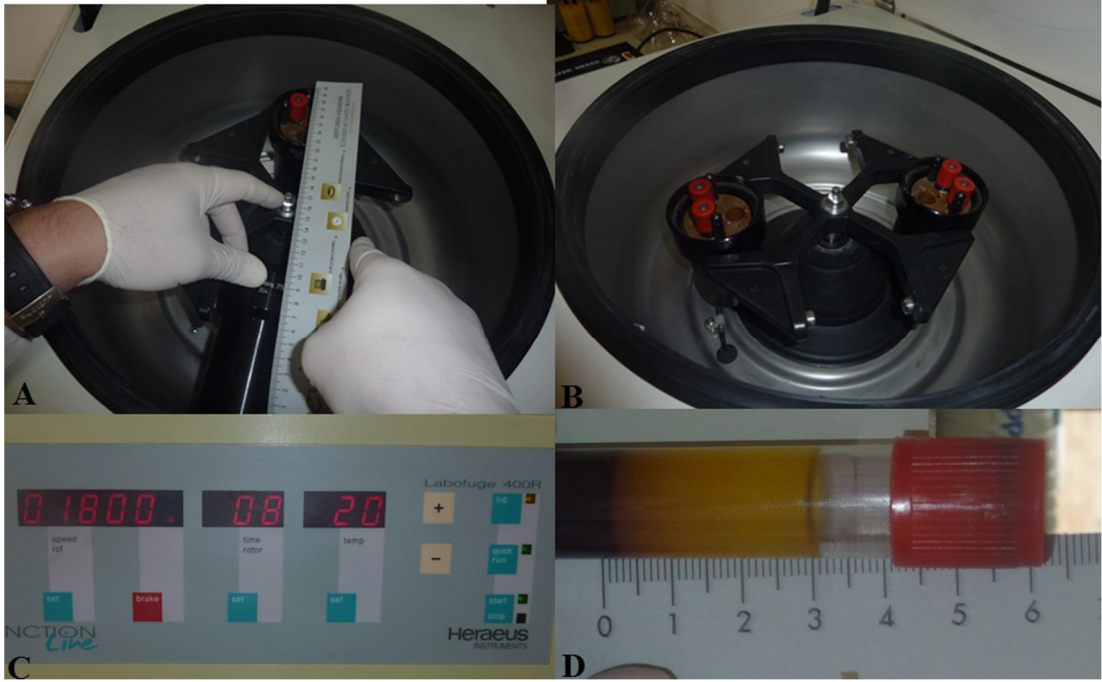
Tablo 3.1 Çalışmamıza katılan gönüllülerin yaş ve mikrolitrede tam kan trombosit, lökosit ve TZP trombosit ve lökosit değerleri



Resim 3.1 A) TZP hazırlamak için kelebek seti ile kan alımı. Trombositlerin tüpe hızlı çarpmasını ve aktive olmasını engellemek için kelebek seti kullanılıyor. B) Alınan kan 1/9 oranında sitrat eklenmiş tüplere aktarılıyor.

Gönüllülerin, başlangıç kan değerleri, Beckman Coulter LH 780 Analyzer® cihazı aracılığı ile sayılmıştır. Alınan kanlar Heraeus Labofuge 400R® model santrifüj cihazı ve Anitua tekniği ile (580 Gforce, 8 dk) santrifüj edilmiştir (52). Anitua tekniği ile 3-4 cc. TZP elde edilmiştir (Resim 3.2).

Hazırlanan plazma 0,5 ml'lik 6 eşit plastik tüpe homojen olarak aktarılmıştır. Bu 6 grup sırasıyla K, D1, D2, M1, M2 ve ASA şeklindedir (K: Kontrol, D1: Diklofenak minimum doz, D2: Diklofenak maksimum doz, M1: Meloksikam minimum doz, M2: Meloksikam maksimum doz, ASA: Asetilsalisilik asit). Kontrol grubuna herhangi bir ilaç eklenmemiştir. Geri kalan TZP, yine aynı tam kan sayım makinesi ile hücre sayımı için kullanılmıştır.



Resim 3.2 TZP hazırlanışı. A) 580 g kuvveti RPM değerine çevirmek için makinanın dönme yarıçapının hesaplanması. G kuvvetin karşılığı olarak denk gelen RPM değeri referans web sitesi aracılığı ile hesaplanabilir (105). B) Santrifüj cihazında dengeli sıralanan tüpler, C) Anitua tekniğine göre çevirme hızı ve süresi D) TZP elde etmek için plazma miktarının ölçülmesi

3.4. Çözeltilerin Hazırlanması ve Eklenmesi

Diklofenak ve meloksikam ilaç çözeltileri hazırlanırken, mevcut literatürden yararlanılmış ve bu iki ilacın piyasada bulunan minimum ve maksimum dozlarının kullanımı sonucu oluşan kan-ilaç dozu sağlanacak şekilde plazmalara ilaç süspansiyonları eklenmiştir. Diklofenak kullanımı sonrası kan dozları yaklaşık olarak 0,5-2,5 mcg/ml aralığında seyretmektedir (96-8). Çalışmamızda TZP'ye eklenecek diklofenak dozunu belirlerken, minimum diklofenak dozu olarak 0,5 mcg/ml ve maksimum doz olarak da 2,5 mcg/ml kabul edilmiştir. Diclomec 75mg/3ml. i.m. ampul®'den 0,1 ml.yi 50 ml. %0,9luk serum fizyolojik içinde çözerek, 1/500lük, 1 ml.sinde 0,05 mg. içeren diklofenak çözeltisi elde edilmiş ve 0,5 ml. lik TZP çözeltisine, final konsantrasyonları 0,5mcg/ml ve 2,5 mcg/ml olacak şekilde diklofenak dozları eklenmiştir. Meloksikam için de literatür bilgileri ve ilaç prospektüsü bilgileri doğrultusunda minimum ve maksimum kan dozları olarak 0,8 ve 2 mcg/ml belirlenmiştir (99-101). Meloksikam çözeltisi hazırlarken, Melox 15

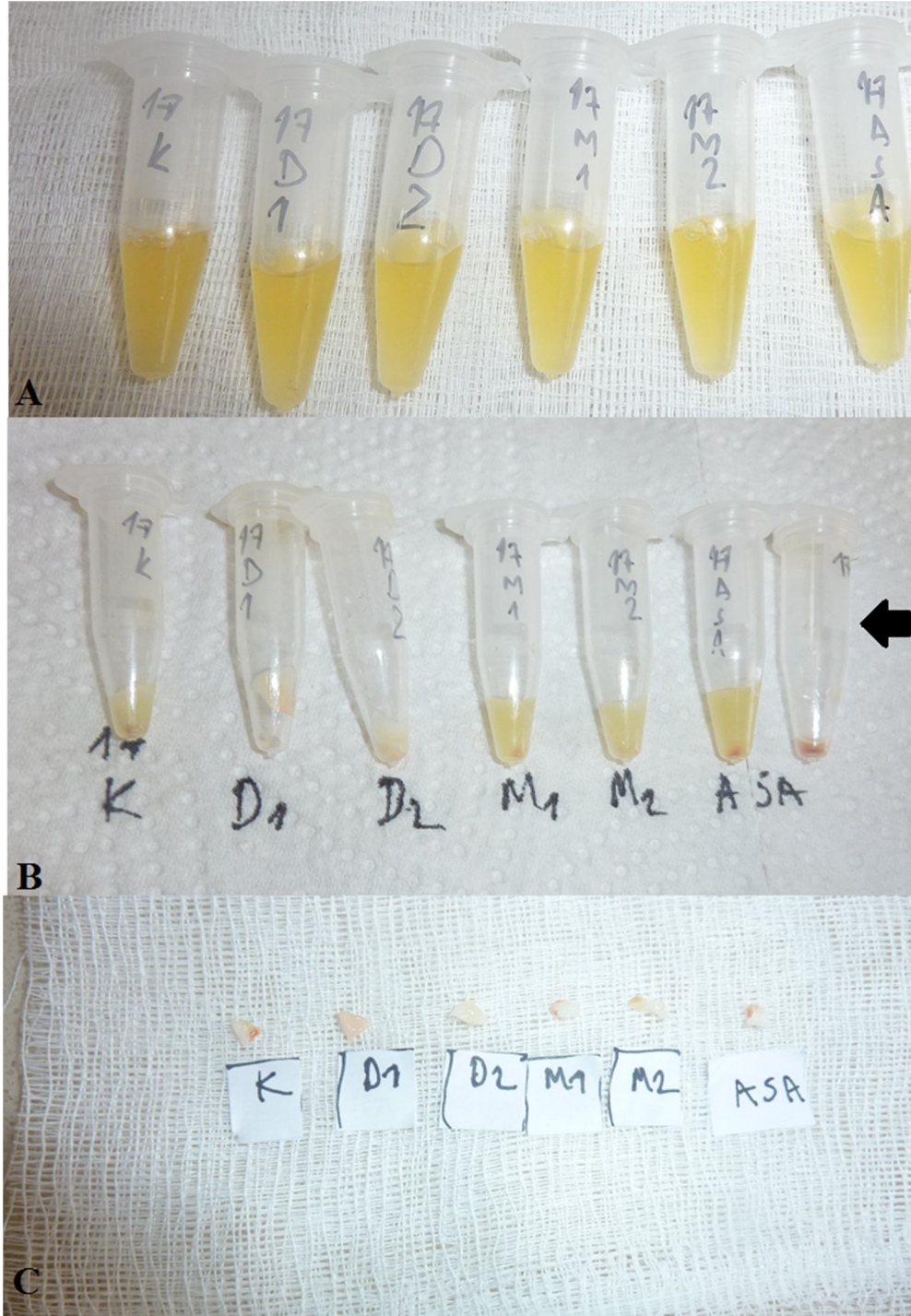
mg/1,5 ml ampul®’den 0,1 ml.yi 25 ml. %0,9luk serum fizyolojik içinde çözerek, 1/250lik, 1 ml.sinde 0,04 mg içeren meloksikam çözeltisi elde edilmiştir. Yine mevcut literatür çalışmasını baz alarak, literatüre uygun, 110 ml Phosphate buffered saline (PBS), 90 ml ASA içinde çözülerek son ilaç konsantrasyonu 454 µM olacak şekilde ASA çözeltisi hazırlanmış ve son gruba eklenmiştir (102, 103) (Tablo 3.2). Her gruba eklenen ilaçlar sonrası, oda sıcaklığında yaklaşık 20 dakika ilaç ile inkübasyona bırakılmıştır (97, 103).

Gruplar	Eklenen TZP(µl)	Eklenen İlaç(µl)	Eklenen SF(µl)	Final Konsantrasyon(µl)
K	500	Ø	50	550
D1	500	5,5	44,5	550
D2	500	27,5	22,5	550
M1	500	11	39	550
M2	500	27,5	22,5	550
ASA	500	50	Ø	550

Tablo 3.2. Gruplara eklenen ilaç ve TZP miktarları (K: Kontrol, D1: Diklofenak minimum doz, D2: Diklofenak maksimum doz, M1: Meloksikam minimum doz, M2: Meloksikam maksimum doz, ASA: Asetilsalisilik asit)

3.5. Büyüme Faktörü Eldesi

Her bir TZP grubu için 550 µl plazmaya 27,5 µl %10’luk CaCl₂ eklenmiş ve 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır (52) (Resim 3.3). Daha sonra plazmalar, süpernatant eldesi için 1000 g kuvvette 10 dakika çevrilmiştir (104). Ve toplanan süpernatantlar analiz edileceği tarihe kadar -20°C’de saklanmıştır.



Resim 3.3 TZP aktivasyonu sonrası oluşan pıhtılar A) 6 ayrı tüpte ilaç ve kalsiyum klorür ile inkübe edilmiş TZP'ler. B, C) Süpernatantlar ayrıldıktan sonra geriye kalan pıhtılar. Siyah ok ile gösterilen tüpe kalsiyum eklenmemiştir. Bu nedenle oluşan pıhtı fibrinojen içermeyen çok küçük bir pıhtıdır. (K: Kontrol, D1: Diklofenak minimum doz, D2: Diklofenak maksimum doz, M1: Meloksikam minimum doz, M2: Meloksikam maksimum doz, ASA: Asetilsalisilik asit)

3.6. Büyüme Faktörü Konsantrasyonlarının Değerlendirilmesi

Trombositlerin içerdiği büyüme faktörlerinden daha önce belirlenmiş olan PDGF-AB ve VEGF miktar tayini için Quantikine kolorimetrik sandwich ELISA kitleri (R&D, Minneapolis, MN, USA) kullanılmıştır. İnsan PDGF-AB ELISA yöntemi için, daha önce literatürde Anitua tekniği ile elde edilmiş PDGF-AB miktarları ve kit standart kalibrasyon değerleri ve kit kullanma kılavuzunda yer alan serum örneklerinin dilüsyonu ile ilgili açıklama da göz önüne alınarak (52, 53, 54, 106), yükleme yapılacak her bir serum örneğinin 1/70 oranında kalibratör dilüenti ile dilüe edilmesine karar verilmiş ve çıkan sonuçlar göz önüne alınca, 1/70 dilüsyon oranının, insan TZP'sinden elde edilen PDGF-AB büyüme faktörünün miktar tayini için uygun bir dilüsyon yöntemi olduğuna karar verilmiştir. Her bir örnek, ELISA yöntemi ile 2 defa çalışılmıştır.

3.7. İstatistik Yöntemi

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 20 yazılımı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemler (Shapiro-Wilk) kullanılarak incelendi. Tanımlayıcı analizler, normal dağılmayan VEGF miktar verileri için ortanca ve çeyreklerarası aralık kullanılarak verildi. Normal dağılan PDGF-AB verileri içinse ortalama ve standart sapmalar kullanılarak tanımlayıcı analizler verildi. VEGF miktarının ölçülebildiği örnek sayısının parametrik test varsayımlarına uymadığı belirlendiğinden, bu parametreler için gruplar arası değişimin istatistiksel anlamlılığı Friedman testi kullanılarak incelendi. Normal dağılım gösteren PDGF-AB verileri için, gruplar, tek yönlü ANOVA testi kullanılarak karşılaştırıldı. İstatistiksel anlamlılık için toplam tip-1 hata düzeyi %5 olarak kullanıldı.

BULGULAR

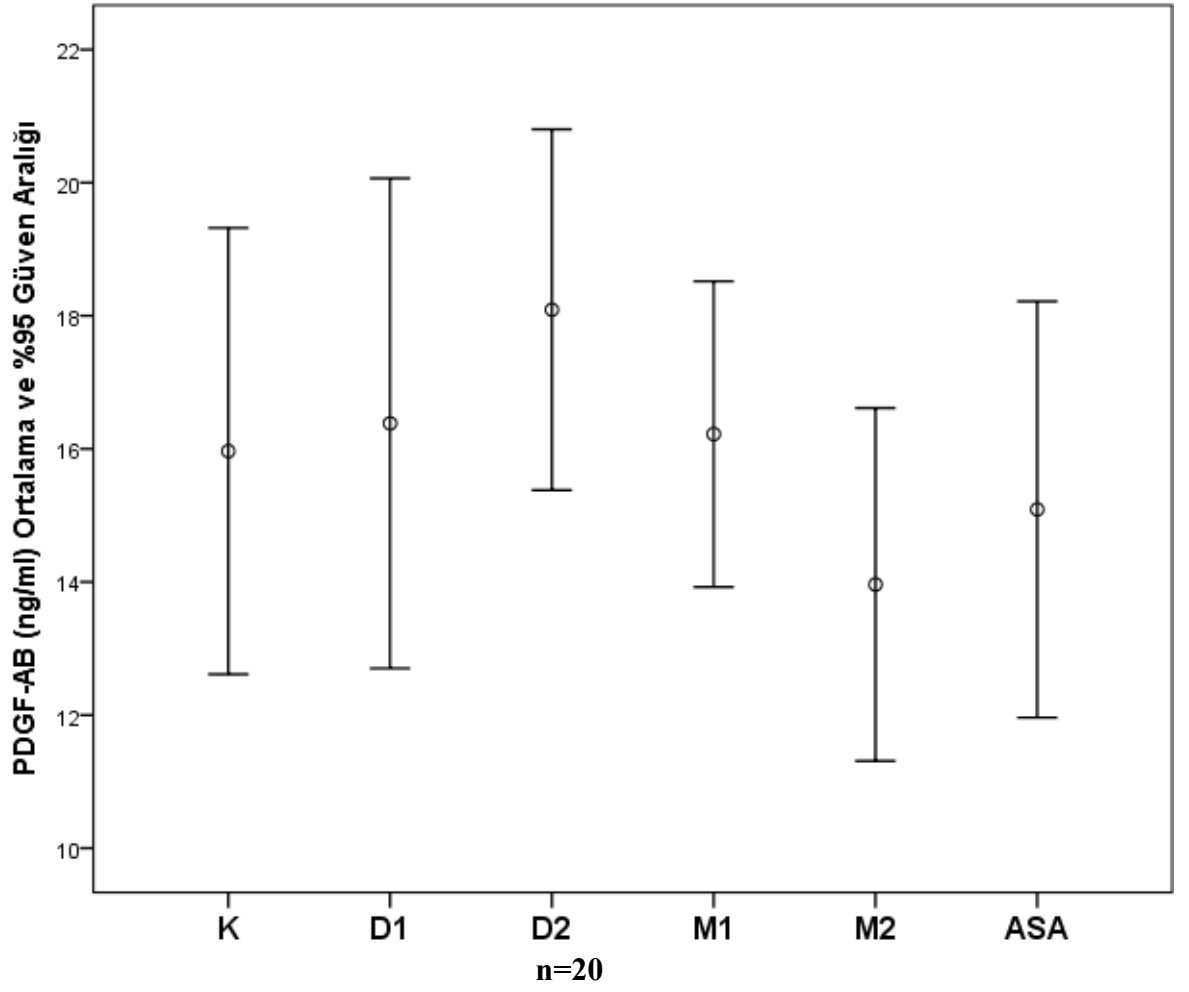
4.1 Büyüme Faktörleri Miktarları

1- PDGF-AB verileri ise normal dağılım özelliği göstermektedirler. Bu veriler için tekrarlı ölçümlü veri analizi yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen küresellik varsayımı sonuçlarına göre, gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p=0,33$). Çalışmada kullanılan diklofenak, meloksikam ve asetilsalisilik asit, TZP'den salgılanan PDGF-AB miktarını değiştirmemektedir (Tablo 4.1, Şekil 4.1).

2- VEGF parametreleri, normal dağılıma uygun değildir. Bu nedenle VEGF verileri için Friedman test uygulanmış ve gruplar arası farklılık yoktur ($p=0,31$). Bu verilerin ışığında, çalışmamızda kullanılan Diklofenak, Meloksikam ve Asetilsalisilik asit, trombositlerin sekresyonunu azaltmadığı sonucu çıkarılmaktadır.

	Ortalama	Standard Deviasyon	Ortanca	Persentil 25	Persentil 75
K	15,966	7,166	16,294	10,537	21,179
D1	16,384	7,866	13,325	11,235	22,111
D2	18,091	5,792	18,505	14,050	22,396
M1	16,222	4,907	16,459	13,058	18,912
M2	13,962	5,666	14,568	10,417	17,052
ASA	15,089	6,683	15,534	10,089	19,595

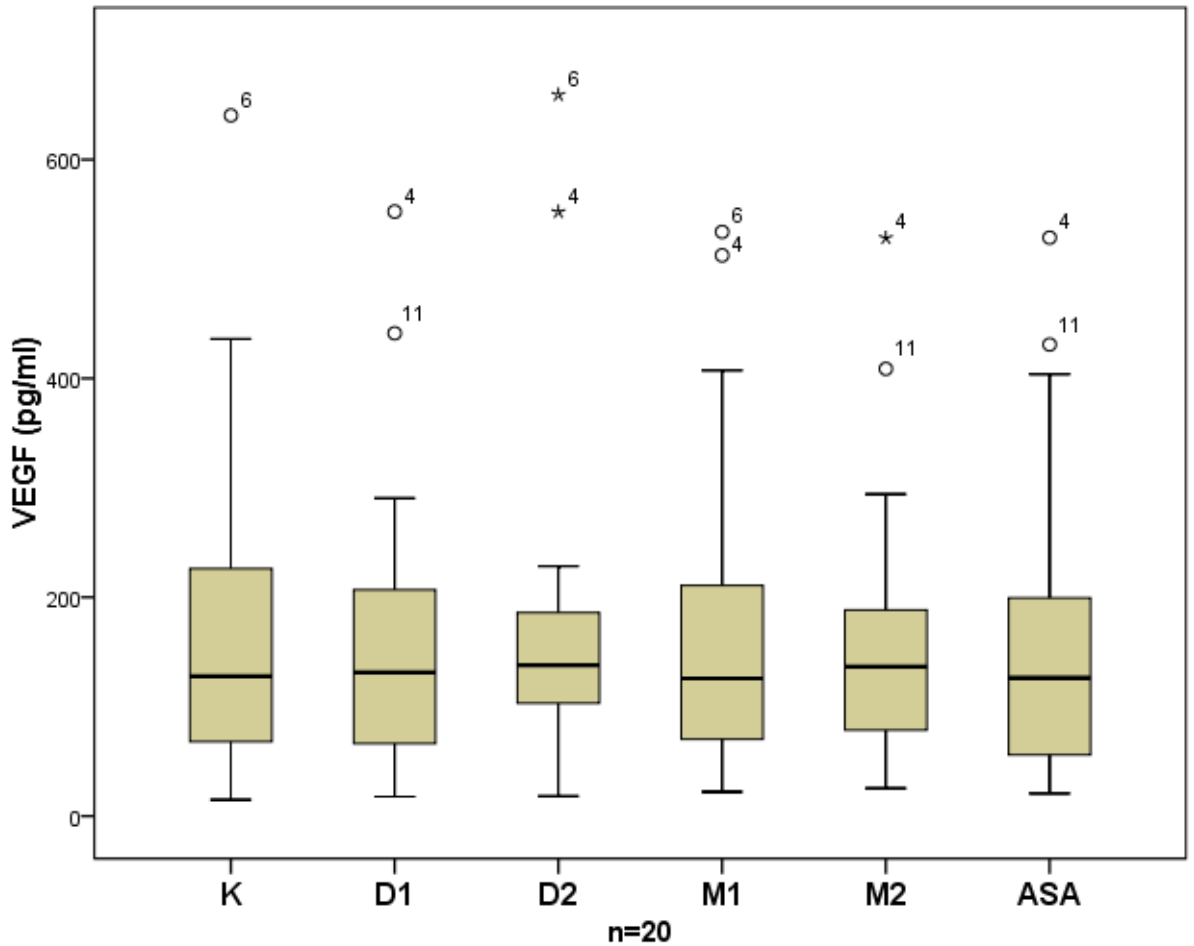
Tablo 4.1 PDGF-AB miktarlarının (ng/ml) gruplara göre tanımlayıcı istatistikleri (K: Kontrol, D1: Diklofenak minimum doz, D2: Diklofenak maksimum doz, M1: Meloksikam minimum doz, M2: Meloksikam maksimum doz, ASA: Asetilsalisilik asit)



Şekil 4.1 PDGF-AB miktar tayininin gruplara göre dağılımı (1: Kontrol, 2: Diklofenak minimum, 3: Diklofenak maksimum, 4: Meloksikam minimum, 5: Meloksikam maksimum, 6: Asetilsalisilik asit)

	Ortalama	Standard Deviasyon	Ortanca	Persentil 25	Persentil 75
K	166,4345	151,8649	127,7490	68,1060	226,1075
D1	160,3964	137,2524	131,3640	66,2810	206,8550
D2	178,3759	157,2282	137,8345	103,3015	185,8735
M1	168,8504	149,7729	125,9080	70,3485	210,8955
M2	162,1707	125,9793	136,5050	78,6830	188,3260
ASA	164,7733	145,0545	126,1455	56,0555	199,4380

Tablo 4.2 VEGF miktarlarının (pg/ml) gruplara göre tanımlayıcı istatistikleri (K: Kontrol, D1: Diklofenak minimum doz, D2: Diklofenak maksimum doz, M1: Meloksikam minimum doz, M2: Meloksikam maksimum doz, ASA: Asetilsalisilik asit)

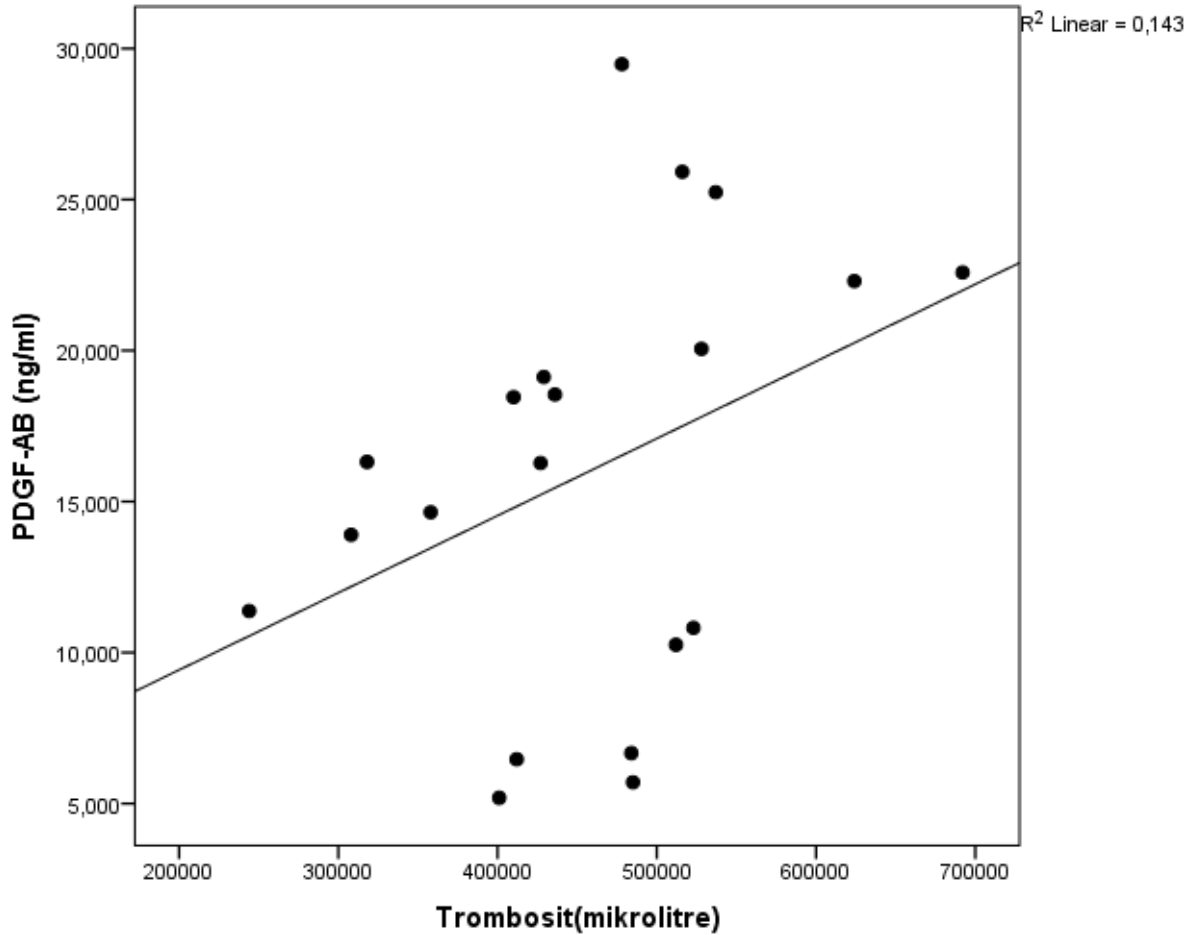


Şekil 4.2 VEGF miktar tayininin gruplara göre dağılımı (1: Kontrol, 2: Diklofenak minimum, 3: Diklofenak maksimum, 4: Meloksikam minimum, 5: Meloksikam maksimum, 6: Asetilsalisilik asit)

4.2. Trombosit-Büyüme Faktörü Korelasyonu

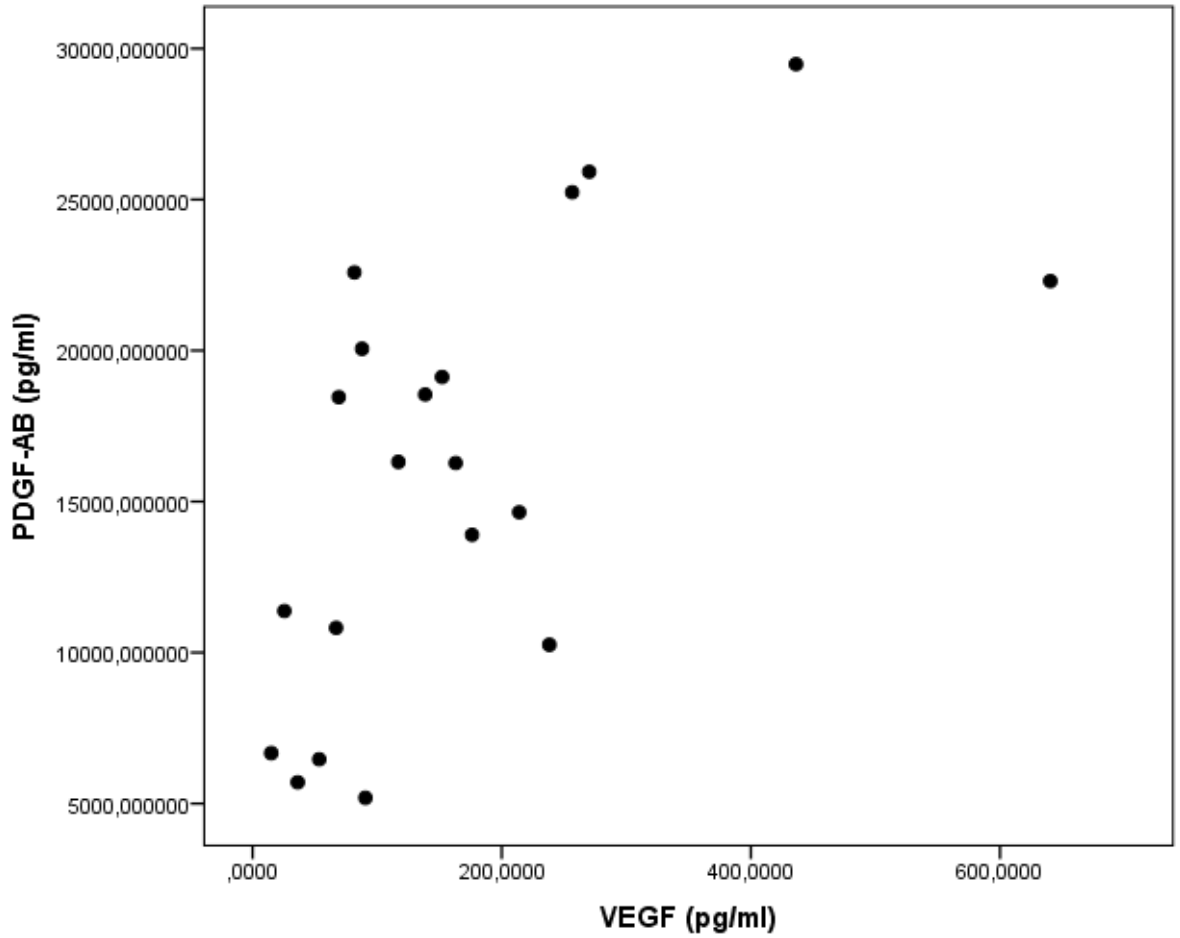
Kontrol grubunda elde edilen VEGF ve PDGF-AB büyüme faktörleri ile TZP'lerin trombosit ve lökosit sayıları arasındaki korelasyon analiz sonuçlarına göre normal dağılım gösteren TZP trombosit sayıları ile PDGF-AB büyüme faktör miktarları arasında orta güçte istatistiksel anlamlılığa yakın aynı yönlü bir korelasyon saptanmıştır ($r=0,38$, $p=0,1$) (Şekil 4.3).

TZP lökosit sayıları ile PDGF-AB ve VEGF miktar verileri arasında istatistiksel anlamlı bir korelasyon saptanmadı (sırasıyla $r= 0,30$ $p=0,19$ ve $r=0,30$ $p=0,19$). Aynı şekilde TZP trombosit sayıları ile VEGF miktar verileri arasında da istatistiksel anlamlı bir korelasyon saptanmadı. ($r=0,21$ $p=0,37$)



Şekil 4.3 TZP trombosit sayısı ile PDGF-AB arasındaki korelasyon grafiği

Kontrol grubundaki PDGF-AB ve VEGF büyüme faktörlerinin TZP'den salınan miktarlarının birbiri ile korele olup olmadığını anlamak için yapılan korelasyon analizinde en az bir grup normal dağılım göstermediği için, gruplara Spearman korelasyon analizi yapılmış ve sonuç olarak ilaç eklenmemiş TZP'den elde edilen PDGF-AB ve VEGF miktarlarının birbiri ile pozitif yönde güçlü ve istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde korele olduğu bulunmuştur ($r= 0,61$, $p= 0,004$).



Şekil 4.4 PDGF-AB ile VEGF miktar korelasyon grafiği

TARTIŞMA

Çalışmamızın amacı, COX-1 sentezini geri dönüşümlü inhibe eden diklofenak, COX-1 sentezi üzerine etki etmeyen meloksikam ve COX-1 sentezini geri dönüşümsüz inhibe eden Asetilsalisilik asit etken maddelerinin, trombosit salgı fonksiyonuna etki edip etmediğini, iki büyüme faktörü PDGF-AB ve VEGF'nin ilaç eklenmiş ve eklenmemiş grupta miktar tayini ile ortaya koymaya çalışmaktı. Özellikle antiaggregan olduğu bilinen asetilsalisilik asit etken maddesi eklenen grup ile herhangi bir ilaç eklenmemiş grup arasında Ca⁺⁺ eklenmesini izleyen dönemde, büyüme faktörleri açısından anlamlı istatistiksel fark olacağını bekliyorduk. Ama her iki büyüme faktörü açısından da, gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir fark saptanmadı. Bu sonucu da, diklofenak, meloksikam ve asetilsalisilik asit trombositlerden PDGF-AB ve VEGF salınımını etkilemiyor şeklinde yorumladık. Verilerimizin ortalama ve ortanca değerlerinin birbirine çok yakın değerler olması da bu yorumumuzu güçlü bir şekilde desteklemektedir.

Çalışmamızda, lökositlerin de büyüme faktörü içerdiği literatür bilgisinden dolayı (56, 106), lökosit oranı en az olarak TZP hazırlayabileceğimiz mevcut yöntemlerden Anitua tekniğini tercih ettik. Çalışmamızda kontrol grubundan elde ettiğimiz büyüme faktörü miktarları, Anitua tekniği ile hazırlanmış diğer örneklerde elde edilen büyüme faktörü miktarları ile yakın değerler içermektedirler. Bizim çalışmamızda ,ilaç eklenmemiş ve %10'luk kalsiyum klorür ile aktive edilmiş grupta ortalama PDGF-AB miktarı $15,96 \pm 7,16$ nanogram/mililitre (ng/ml) iken, literatürde (51) Anitua tekniği ile hazırlanan TZP'den elde edilen PDGF-AB miktarı $17,6 \pm 3,8$ ng/ml.dir. Yine aynı şekilde bizim çalışmamızda ilaç eklenmemiş ve %10'luk kalsiyum klorür ile aktive edilmiş grupta ortalama VEGF miktarı $166,4 \pm 151,8$ pg/ml iken, ,literatürde (51) Anitua tekniği ile hazırlanan TZP'den elde edilen VEGF miktarı 142 ± 17 pg/ml idi (51). Yine Anitua tekniği ile yapılan başka çalışmalarda büyüme faktör miktar tayinleri, kişiye ve elde edilen TZP'nin trombosit sayısına göre farklılık gösterse de, bizim sonuçlarımız bu veriler ile paraleldir (50-52).

Çalışmamız, non-steroid antiinflamatuvar ilaçların büyüme faktör miktarları üzerine etkisinin değerlendirilmesi açısından bilginiz dahilindeki ilk çalışmadır. Daha önce non-steroid antiinflamatuvar ilaçların antiaggregan etkileri ile ilgili çalışmalar

yapılmıştır ama TZP içinde iyileştirici etkiyi ortaya koyan büyüme faktörleri ve non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar arasındaki ilişkiyi ortaya koyan mevcut bir çalışma yoktur. Yokoyama ve ark.larının yaptığı bir çalışmada (97), TZP'ye belirli aralıklarla NSAİİ'ler ve ASA eklenmiş ve birbirleri ile etkileşimleri değerlendirilmiştir. Agregometre ile ilaç öncesi ve sonrası agregasyon yüzdelerindeki değişimlerin incelendiği bu çalışmada diklofenak ve meloksikamın antiagregan etkisi %30'un altında bulunmuştur. Bu çalışma gözönünde bulundurulduğunda, bizim çalışmamızda kullanılan diklofenak ve meloksikam zayıf antiagregan ilaçlar olarak kabul edilebilir ve bu da diklofenak ve meloksikam eklenen gruplarda büyüme faktör verilerinin ilaç eklenmeyen grupla benzer olmasını açıklayabilir. Öte yandan ise yine aynı çalışmada, ASA tek başına %60-80 arası değişen oranlarda agregasyonu inhibe edebilmektedir. Bizim çalışmamızda ise ASA eklenen grupla ilaç eklenmeyen grup arasında VEGF ve PDGF-AB miktarları arasında fark yoktur. Blaicher ve ark.ları tarafından yapılan bir başka çalışmada (107) ise, gönüllülere tek doz NSAİİ verildikten sonra 3.cü ve 12. Saatte PFA-100® cihazı ile ölçümler yapılmıştır. Diklofenak için de tıpkı ASA gibi üçüncü saatin sonunda PFA-100® cihazı ile ölçülen in vitro kanama zamanında istatistiksel anlamlı değişiklikler bulmuşlardır.

VEGF, bilinen en potent anjiogenetik faktördür ve hatta tümör progresyonu ve metastaz ile çok sıkı bir ilişki içerisindedir ve neovaskülarizasyon esnasında progresyonu artar (115). Birçok tümör dokusu tarafından VEGF salgılanabilmektedir. Anti VEGF tedavilerinin tümör doku büyüklüğünü azalttığı ortaya konmuş ve bu sonuç da tümör kanlanması ile ilişkilendirilmiştir (116) . Avasküler bir doku olan korneada, bazı patolojik durumlara bağlı olarak anjiogenez görülebilir ve bu da beraberinde birçok problem ortaya çıkarır. Korneal neovaskülarizasyon genellikle kimyasal yanıklar, iskemi, enfeksiyon, travma gibi durumlarda ortaya çıkabilir. Özellikle hipoksi, anjiogenezi arttırmaktadır. Yapılan çalışmalar ile anti VEGF terapilerin (bevacizumab, ranibizumab, pegaptanib) korneal neovaskülarizasyonu azalttığı ve neovasküler yaşa bağlı maküler dejenerasyon, neovasküler glokom ve diabetik retinopati gibi rahatsızlıklarda tedavi ajanı olarak olumlu sonuçlar verdiği belirtilmiştir (117-20).

VEGF, vasküler endotelial hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve tüp oluşumunu uyarır. Vasküler sızıntıyı artırır ve monosit kemotaksisini ve B hücre

proliferasyonunu indükler. VEGF, tirozin kinaz reseptör ailesinden 2 reseptöre bağlanarak etki gösterir : VEGFR-1 ve VEGFR-2. VEGFR-2, VEGF'nin bağlandığı ana reseptördür ve VEGF'nin vasküler endotel hücreler üzerindeki proliferatif etkisini indükler. VEGFR-2'ye bağlanan VEGF, intrasellüler kinazlar aracılığı ile reseptörlerini otofosforiller ve bu da mitojenik ve proliferatif sinyalin oluşmasını sağlar (48). VEGF, hipoksiden etkilenir ve miktarı artmaya başlar. Vasküler damar yatağındaki endotel hücrelerini aktive eder. VEGF, endotel hücre proliferasyonunu özellikle VEGFR2 reseptörünü indükleyerek ortaya çıkarır.

Endotel hücrelerden salınan PDGF de güçlü bir mitojen ve kemoatraktan olarak yeni damarların bazal membranlarının oluşmasına destek sağlamaktadır ve anjiogenezdeki rolü çok önemlidir. Awazu ve ark.ları tarafından yapılan bir çalışmada (121), tümör anjiogenezinin sadece anti VEGF terapi yerine hem PDGF hem de VEGF reseptörlerini inhibe eden bir molekül ile daha etkili olarak inhibe edilebildiği ortaya konmaktadır.

PDGF, fibroblastlar, vasküler düz kas hücreleri, glomerüler mezengial hücreler gibi mezenkimal hücreler için potent bir mitojen ve kemotaktik ajandır. PDGF tarafından düzenlenen iyileşme yolağındaki aşırı yanıt, kronik enflamasyona bağlı ortaya çıkan fibrozis şeklinde karşımıza çıkabilir. PDGF reseptörü tirozin kinaz inhibitörleri (imatinib vs...) günümüzde fibrotik hastalıkların, KML ve çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Normal şart ve koşullar altında, düz kas hücreleri ve fibroblastlar düşük sayıda PDGF reseptörleri içermektedir. Herhangi bir enflamasyon durumunda, yapılan immünohistokimyasal çalışmalara göre, yaralanmış dokuda PDGF reseptörlerin sayısı artmaktadır. Bazı durumlarda, dışardan PDGF uygulanması, nötrofil ve makrofaj kemotaksisini ve fibroblast proliferasyonunu da uyardığı için; PDGF ile tedavi edilen yara dokusunda daha fazla fibroblast ve glikozaminoglikandan zengin granülasyon dokusu ve artmış neovaskülarizasyon ve reepitelizasyon mevcuttur. Lokal PDGF enjeksiyonlarının dekübitus ülserleri ve diyabette ortaya çıkan yara iyileşmesi gecikmelerinde de etkili olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (46, 47). Biz de çalışmamızda büyüme faktörleri olarak PDGF-AB ve VEGF'yi mitojen ve anjiogenetik etkilerinden dolayı yaralı dokuya sağlayacağı katkılar için tercih ettik.

TZP tedavileri son yıllarda gittikçe önem kazanmaktadır. Kas-iskelet sistemi yaralanmalarında birçok farklı alanda kullanılabilir (1,2). Bir çalışmada rat tibialis anterior kasında tekrarlayan izometrik kontraksiyonlarla strain oluşturulup ve birkaç defa 100 µl PRP enjeksiyonu yapılmıştır. Oluşturulan geniş ve küçük strainler üzerindeki etkileri, PRP yapılmayan grupla karşılaştırıldığı zaman, daha geniş olan strain yapısında 3.cü günde, daha küçük strain alanında 7.ci ve 14.cü günlerde fonksiyonel iyileşme gözlenmiştir (122). Yine yapılan bir başka kas çalışmasında otolog büyüme faktörleri içeren otolog serumun (ACS) iyileştirici etkisi araştırılmış ve kas yaralanması olan 18 sporcu 5 ml. ACS İLE, 11 sporcu da actovegin ve traumeel ile tedavi edilmiştir. ACS grubunda sahaya dönüş zamanı istatistiksel olarak anlamlı olarak azalma saptanmıştır (123). Yapılan bir olgu sunumunda klinik olarak ve manyetik rezonans görüntüleme yöntemi ile ortaya konmuş semimembranöz kasta mevcut 2.ci dereceden bir yırtığın tek doz TZP enjeksiyonu ile iyileştiği ortaya konmuştur (124). Kronik ağrılı tendon rahatsızlıkları da TZP'nin uygulama alanlarındandır. Aşil tendonlarına transeksiyon yapılan ratlarda, uygulanan TZP sonrası kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman tendon kallus dokusu güç ve sertlik artışı birinci hafta sonunda %30 daha fazla olmuştur (125). Yine sonuçları MRG ve histolojik olarak ortaya konmuş bir başka çalışmada, koyun infraspinatus kası tamir modelinde yapılan TZP, iyileşme bölgesinde yeni kemik ve fibrokartilaj doku üretimini sağlamış ve tendon kemik iyileşmesindeki osteoindüktif etki ortaya konmuştur (126). Bu olumlu sonuçlara rağmen TZP'nin klinik etkilerini tam olarak ortaya koyabilmek için, Maffuli ve Del Buono'nun da belirttiği gibi güçlü 1. seviye klinik çalışmalar gerekmektedir (127).

Çalışmamızda bazı kısıtlılıklar mevcuttu. Her grup için ilaçların verilmesinden sonra, ilaçların trombosit aggregasyonunu ne derece etkilediğini ortaya koyabilecek bir test yöntemi kullanma şansımız olmadı. Dolayısıyla aktivasyon bozulmadığı halde aggregasyonun bozulduğunu gösterme şansımız olmadı. Ayrıca Anitua yöntemi kullanıp, hazırladığımız TZP'lerde, lökosit sayımız $1620 \pm 771,577$ (ortalama \pm standart sapma) / µl şeklindeydi. Anitua'nın kendi çalışmalarında belirttiği ortalama TZP lökosit sayısı olan mikrolitrede 200'ün altı değerine ulaşamadı (50-52). Elde edilen TZP'lerin trombosit sayıları, kişilerin bazal trombosit sayıları ile orantılı olarak değişkendi. Dolayısıyla her örnekten elde edilen

büyüme faktörü değerleri de trombosit sayılarına göre değişkenlik gösterdi. TZP'nin içerdiği trombosit sayıları fazla olan bazı gruplarda istatistiksel olarak aykırı değerler elde edildi. Başlangıçta, trombosit sayılarını ortak bir paydada eşitlemek, her grup için daha yakın değerlerde büyüme faktör miktarları ortaya çıkarabilirdi. Ve elde edilen süpernatantları hücre kültürü ortamına inkübe etmek, bu iki büyüme faktörünün etkisini ortaya koymak açısından etkili olabilirdi.

Daha önce yapılan çalışmalarda, özellikle aspirin olmak üzere, diklofenak ve meloksikamın da invitro ortamda 4-8 dakika TZP ile teması sonucunda kollajen ile indüklenmeye çalışılan trombosit aggregasyonunu değişik derecelerde inhibe ettiği bilinmekteydi (103, 107). Daha önceden yapılan çalışmalar göstermiştir ki kalsiyum, protrombini trombine çevirmekte ve güçlü bir agonist ve agregan olan trombinin de protease activated receptor-1 (PAR-1) aracılığı ile fosfolipaz C yolağını aktive ederek, ani bir intrasitozolik kalsiyum deşarjı ile birlikte trombosit aktivasyon ve sekresyonunu gerçekleştirmektedir (108, 109). Biz de çalışmamızda Anitua tekniğindeki gibi, pıhtı oluşturmak için ortama %10'luk kalsiyum klorür ekledik. Eklenen ilaçların PDGF-AB ve VEGF sekresyon miktarını etkilememesini, güçlü bir trombosit aktivatörü ve agonisti olan trombinin fosfolipaz C yolu aracılığı ile yaptığı güçlü agregan etkiye bağladık. NSAİİ'ler fosfolipaz A₂ yolağı üzerinden ilerleyen yolak üzerinde inhibisyon yaparlarken trombin, fosfolipaz C yolağı üzerinden kuvvetli bir agregasyon tetiklemektedir (86-8,91, 92, 107-9).

SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu in vitro deneysel çalışmanın sonuçlarına göre alınan kan örneklerine diklofenak, meloksikam ve asetilsalisilik asit eklenmesi, trombositlerden PDGF-AB ve VEGF salınımını etkilememiştir. Trombositlerin içinde granüllerde bulunan ve aktivasyon ile sekrete edilen birçok protein bulunmaktadır (Bkz. Tablo 2.1). Bunun için yukarıda kullanılan ilaçların trombosit sekresyonunu kesinlikle etkilemediğini söylemek bu çalışmanın nihai kararı olmayabilir. Ama bu çalışmanın sonucuna göre, PDGF-AB ve VEGF miktarları, yukarıdaki ilaçların TZP'ler ile teması sonucu etkilenmemiştir. Bu sonuç da Anitua tekniğinde ortama kalsiyum eklenmesinin, trombinin aktif hale getirmesi ve güçlü aktivatör ve agregan etkisinin bu ilaçlar tarafından inhibe edilemediği şeklinde yorumlanabilir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre bir tedavi yöntemi olan TZP uygulaması yapılacak hastaya steroid olmayan analjezik-antiinflamatuvar olarak diklofenak veya meloksikam önerilebilir. Bu ilaçlar, TZP'nin içindeki trombositlerin büyüme faktörü sekresyonunu etkilemeyecektir. Yapılan bu çalışma in vitro bir çalışmadır. Bu çalışmayı, yukarıdaki ilaçları kullanan insanlardan TZP hazırlayarak yapmak ve trombositlerin aktive ve agregat olup olmadığını ortaya koymak için farklı bir yöntem eklemek yapılan bu çalışmanın geçerlik ve güvenilirliğini destekleyecektir.

KAYNAKLAR

1. Engebretsen L, Steffen K, Alsousou J, Anitua E, Bachl N, Devilee R, Everts P, Hamilton B, Huard J, Jenoure P, Kelberine F, Kon E, Maffulli N, Matheson G, Mei-Dan O, Menetrey J, Philippon M, Randelli P, Schamasch P, Schwellnus M, Vernec A, Verrall G. IOC consensus paper on the use of platelet-rich plasma in sports medicine. *Br J Sports Med.* 2010;44:1072-81.
2. Rodrigues SV, Acharya AB, Thakur SL. Platelet-rich plasma. A review. *N Y State Dent J.* 2012;78:26-30.
3. White JG. Platelet Structure. ‘Platelets (Second Edition)’ (Ed. Michelson AD.)’de Elsevier 2007;s:45-73.
4. Kılıçturgay K. İmmünolojiye Giriş ; Güneş kitapevi , Bursa. Genişletilmiş 2.basım, 1991.
5. White J.G. Gerrard J.M. Ultrastructural Features of abnormal blood platelets. *Am J Pathol* 1976;83:590-614.
6. Gawaz M. Blood Platelets: Physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles and therapy for atherotrombotic disease. George Thieme Verlag, 2001.
7. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets.* 2001;12:261-73.
8. Verhoeven AJ, Mommersteeg ME, Akkerman JW. Metabolic energy is required in human platelets at any stage during optical aggregation and secretion. *Biochim Biophys Acta* 1984; 800:242–50.
9. White JG, Escolar G. Current concepts of platelet membrane response to surface activation. *Platelets.* 1993;4:175-89.
10. Gerrard JM, White JG, Rao GH, Townsend D. Localization of platelet prostaglandin production in the platelet dense tubular system. *Am J Pathol.* 1976;83:283-98.

11. Youssefian T, Cramer EM. Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. *Blood*. 2000;95:4004-7.
12. Pletscher A, Da Prada M, Berneis KH, Tranzer JP. New aspects on the storage of 5-hydroxytryptamine in blood platelets. *Experientia*. 1971;27:993-1002.
13. Skaer RJ, Peters PD, Emmines JP. The localization of calcium and phosphorus in human platelets. *J Cell Sci*. 1974;15:679-82.
14. Chatterjee D, Anderson GM. The human platelet dense granule: serotonin uptake, tetrabenazine binding, phospholipid and ganglioside profiles. *Arch Biochem Biophys*. 1993;302:439-46.
15. Jilkina O, Bhullar RP. Generation of antibodies specific for the RalA and RalB GTP-binding proteins and determination of their concentration and distribution in human platelets. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1314:157-66.
16. Suzuki H, Katagiri Y, Tsukita S, Tanoue K, Yamazaki H. Localization of adhesive proteins in two newly subdivided zones in electron-lucent matrix of human platelet alpha-granules. *Histochemistry*. 1990;94:337-44.
17. Hayward CP, Furmaniak-Kazmierczak E, Cieutat AM, Moore JC, Bainton DF, Nesheim ME, Kelton JG, Côté G. Factor V is complexed with multimerin in resting platelet lysates and colocalizes with multimerin in platelet alpha-granules. *J Biol Chem*. 1995;270:19217-24.
18. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev*. 1993;7:52-62.
19. Bentfeld-Barker ME, Bainton DF. Identification of primary lysosomes in human megakaryocytes and platelets. *Blood*. 1982;59:472-81.
20. Rao GH. Physiology of blood platelet activation. *Indian J Physiol Pharmacol*. 1993;37:263-75.
21. Zucker MB, Nachmias VT. Platelet activation. *Arteriosclerosis*. 1985;5:2-18.
22. Brass LF, Hoxie JA, Kieber-Emmons T, Manning DR, Poncz M, Woolkalis M. Agonist receptors and G proteins as mediators of platelet activation. *Adv Exp Med Biol*. 1993;344:17-36.
23. Siess W, Grünbergt B, Lubert K. Functional relationship between cyclic AMP-dependent protein phosphorylation and platelet inhibition. In Authi KS, eds. *Mechanisms of Platelet Activation and Control*. New York: Plenum Press, 1993;344:229-35.

24. Sage SO, Sargeant P, Heemskerk JWM et al. Calcium influx mechanisms and signal organisation in human platelets. *Adv Exp Med Biol.* 1993;344:69-82.
25. Scrutton MC. The platelet as a Ca^{2+} driven cell: mechanisms by which may modulate Ca^{2+} driven responses. *Adv Exp Med Biol.* 1993:1-13.
26. Ebbeling L, Robertson C, McNicol A, Gerrard JM. Rapid ultrastructural changes in the dense tubular system following platelet activation. *Blood.* 1992;80:718-23.
27. Chen D, Bernstein AM, Lemons PP, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 in dense core granule release. *Blood.* 2000;95:921-9.
28. Chen D, Lemons PP, Schraw T, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 and 4 in lysosome release. *Blood.* 2000;96:1782-8.
29. Rendu F, Marche P, Maclouf J, Girard A, Levy-Toledano S. Triphosphoinositide breakdown and dense body release as the earliest events in thrombin-induced activation of human platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983;116:513-9.
30. Rendu F, Marche P, Viret J, Maclouf J, Le Bret M, Tenza D, Caen J, Levy-Toledano S. Signal transduction in normal and pathological thrombin-stimulated human platelets. *Biochimie.* 1987;69:305-13.
31. Enouf J, Bobe R, Lacabaratz-Porret C, Bredoux R, Corvazier E, Kovacs T, Papp B. The platelet Ca^{2+} transport ATPase system. *Platelets.* 1997 Jan;8:5-14.
32. Ferrari MD, Saxena PR. On serotonin and migraine: a clinical and pharmacological review. *Cephalalgia.* 1993;13:151-65
33. Alberio L, Safa O, Clemetson KJ, Esmon CT, Dale GL. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. *Blood.* 2000;95:1694-702.
34. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature.* 1992;359:848-51.

35. Marcondes S, Lafay M, Brohard-Bohn B, de Nucci G, Rendu F. Platelets induce human umbilical vein endothelial cell proliferation through P-selectin. *Life Sci.* 2000;66:1817-26.
36. Cooper TW, Eisen AZ, Stricklin GP, Welgus HG. Platelet-derived collagenase inhibitor: characterization and subcellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:2779-83.
37. Anusaksathien O, Giannobile WV. Growth factor delivery to re-engineer periodontal tissues. *Curr Pharm Biotechnol.* 2002;3:129-39.
38. Lee SJ. Cytokine delivery and tissue engineering. *Yonsei Med J.* 2000;41:704-19.
39. Lee JE, Kim SE, Kwon IC, Ahn HJ, Cho H, Lee SH, Kim HJ, Seong SC, Lee MC. Effects of a chitosan scaffold containing TGF-beta1 encapsulated chitosan microspheres on in vitro chondrocyte culture. *Artif Organs.* 2004;28:829-39.
40. Ripamonti U, Reddi AH. Tissue engineering, morphogenesis, and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8:154-63.
41. Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, Matsuzaki H, Hashimoto S, Muramatsu T, Shima K, Matsuzaka K, Inoue T. Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. *Microsc Res Tech.* 2003;60:491-502.
42. Kutlu HB. Trombositten zengin plazma emdirilmiş kitosan temelli taşıyıcıdan PDGF, TGF- β ve IGF-1 büyüme faktörlerinin salım kinetiklerinin saptanması ve kitosan taşıyıcı jel ile uygulanan trombositten zengin plazmanın periodontal ligament hücreleri ve sementoblastlar üzerindeki etkilerinin belirlenmesi: in vitro. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Periodontoloji programı doktora tezi, 2011 Ankara.
43. Raff MC. Size control: the regulation of cell numbers in animal development. *Cell.* 1996;86:173-5.
44. Cole BJ, Seroyer ST, Filardo G et al. Platelet-rich plasma : where are we now and where are we going? *Sports Health* 2010;2:203-10
45. Rodrigues SV, Acharya AB, Thakur SL. Platelet-rich plasma. A review. *N Y State Dent J.* 2012;78:26-30.

46. Alvarez RH, Kantarjian HM, Cortes JE. Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. *Mayo Clin Proc.* 2006 Sep;81(9):1241-57.
47. Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family : four gene products from five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15:197-204.
48. Chang JH, Garg NK, Lunde E et al. Corneal neovascularization : an anti-VEGF therapy review. *Surv Ophthalmol.* 2012;57:415-29.
49. Halpern BJ, Chaudhury S, Rodeo SA. The role of platelet-rich plasma in inducing musculoskeletal tissue healing. *HSS J.* 2012;8:137-45.
50. Anitua E, Andía I, Sanchez M et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res.* 2005;23:281-6.
51. Anitua E, Sanchez M, Zalduendo MM et al. Fibroblastic response to treatments with different preparations rich in growth factors. *Cell Prolif.* 2009;42:162-70.
52. Anitua E, Zalduendo MM, Alkhraisat MH et al. Release kinetics of platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in growth factors. *Ann Anat.* 2013;195:461-6.
53. Mehta S, Watson JT. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. *J Orthop Trauma.* 2008;22:432-8.
54. Sonnleitner D, Huemer P, Sullivan DY. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000;15:879-82.
55. Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Kenney EB. Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. *J Periodontol.* 2002;73:198-205.
56. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009;27:158-67.

57. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 Jun;85:638-46.
58. Carlson NE, Roach RB, Jr. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J Am Dent Assoc.* 2002;133:1383-6.
59. Freymiller EG, Aghaloo TL. Platelet-rich plasma: ready or not? *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62:484-8.
60. Antoniades HN, Williams LT. Human platelet-derived growth factor: structure and function. *Fed Proc.* 1983;42:2630-4.
61. Oates JA, FitzGerald GA, Branch RA, et al.: Clinical implications of prostaglandin and thromboxane A2 formation, *N Engl J Med.* 1988;319:761-7.
62. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol.* 1971;231:232-5.
63. Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ, Johnston JJ, Jaffee BD, Covington MB, Contel NR, Eng VM, Collins RJ, Czerniak PM, et al. Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature.* 1995;378:406-9.
64. Stanfield KM, Khan KN, Gralinski MR. Localization of cyclooxygenase isozymes in cardiovascular tissues of dogs treated with naproxen. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001;80:309-14.
65. <http://annonc.oxfordjournals.org/content/15/2/185/F3.expansion>
66. Smith WL, Bell TG. Immunohistochemical localization of the prostaglandin-forming cyclooxygenase in renal cortex. *Am J Physiol.* 1978;235:F451-7.
67. Khan KN, Venturini CM, Bunch RT, Brassard JA, Koki AT, Morris DL, Trump BF, Maziasz TJ, Alden CL. Interspecies differences in renal localization of cyclooxygenase isoforms: implications in nonsteroidal antiinflammatory drug-related nephrotoxicity. *Toxicol Pathol.* 1998;26:612-20.
68. Kömhoff M, Grone HJ, Klein T, Seyberth HW, Nüsing RM. Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *Am J Physiol.* 1997;272:F460-8.

69. Nantel F, Meadows E, Denis D, Connolly B, Metters KM, Giaid A. Immunolocalization of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human elderly. *FEBS Lett.* 1999;457:475-7.
70. Haas JA, Knox FG. Effect of meclofenamate or ketoconazole on the natriuretic response to increased pressure. *J Lab Clin Med.* 1996;128:202-7.
71. Currie MG, Needleman P. Renal arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Physiol.* 1984;46:327-41.
72. Langenbach R, Morham SG, Tiano HF, Loftin CD, Ghanayem BI, Chulada PC, Mahler JF, Lee CA, Goulding EH, Kluckman KD, Kim HS, Smithies O. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell.* 1995;83:483-92.
73. Vio CP, Cespedes C, Gallardo P, Masferrer JL. Renal identification of cyclooxygenase-2 in a subset of thick ascending limb cells. *Hypertension.* 1997;30:687-92.
74. Yang T, Singh I, Pham H, Sun D, Smart A, Schnermann JB, Briggs JP. Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *Am J Physiol.* 1998;274:F481-9.
75. Henry G, Garner WL. Inflammatory mediators in wound healing. *Surg Clin North Am.* 2003;83:483-507.
76. Ma C, Tarnuzzer RW, Chegini N. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in mesothelial cells and their regulation by transforming growth factor-beta1. *Wound Repair Regen.* 1999;7:477-85.
77. Brooks DP, DePalma PD, Pullen M, Elliott JD, Ohlstein EH, Nambi P. SB 234551, a novel endothelin--A receptor antagonist, unmasks endothelin-induced renal vasodilatation in the dog. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31:S339-41.
78. Rodríguez F, Llinás MT, González JD, Rivera J, Salazar FJ. Renal changes induced by a cyclooxygenase-2 inhibitor during normal and low sodium intake. *Hypertension.* 2000;36:276-81.

79. Skøtt O, Jensen BL. Cellular and intrarenal control of renin secretion. *Clin Sci (Lond)*. 1993;84:1-10.
80. Bock HA, Hermle M, Brunner FP, Thiel G. Pressure dependent modulation of renin release in isolated perfused glomeruli. *Kidney Int*. 1992;41:275-80.
81. Lorenz JN, Weihprecht H, Schnermann J, Skøtt O, Briggs JP. Renin release from isolated juxtaglomerular apparatus depends on macula densa chloride transport. *Am J Physiol*. 1991;260:F486-93.
82. Bengtsson U, Johansson S, Angervall L. Malignancies of the urinary tract and their relation to analgesic abuse. *Kidney Int*. 1978;13:107-13.
83. Nguyen G, Burckle C, Sraer JD. The renin receptor: the facts, the promise and the hope. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2003;12:51-5.
84. Shaw KJ, Do YS, Kjos S, Anderson PW, Shinagawa T, Dubeau L, Hsueh WA. Human decidua is a major source of renin. *J Clin Invest*. 1989;83:2085-92.
85. Naftilan AJ, Zuo WM, Ingelfinger J, Ryan TJ Jr, Pratt RE, Dzau VJ. Localization and differential regulation of angiotensinogen mRNA expression in the vessel wall. *J Clin Invest*. 1991;87:1300-11.
86. Menassé R, Hedwall PR, Kraetz J, Pericin C, Riesterer L, Sallmann A, Ziel R, Jaques R. Pharmacological properties of diclofenac sodium and its metabolites. *Scand J Rheumatol Suppl*. 1978;22:5-16.
87. Kayaalp S.O. (2002) Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 25. Yıl onuncu baskı
88. Ku EC, Lee W, Kothari HV, Kimble EF, Liauw L, Tjan J. The effects of diclofenac sodium on arachidonic acid metabolism. *Semin Arthritis Rheum*. 1985 N;15:36-41.
89. USPDI 2002 Reviewed by the United States Pharmacopeial Convention, Inc. USP DI, Edition 22:412-31.
90. Shen S, Marchick MR, Davis MR, Doss GA, Pohl LR. Metabolic activation of diclofenac by human cytochrome P450 3A4: role of 5-hydroxydiclofenac. *Chem Res Toxicol*. 1999;12:214-22.
91. Camu F, Vanlersberghe C. Pharmacology of systemic analgesics. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2002;16:475-88.

92. Stichtenoth DO, Frölich JC. The second generation of COX-2 inhibitors: what advantages do the newest offer? *Drugs*. 2003;63:33-45.
93. Iveson TJ, Ryley NG, Kelly PM, Trowell JM, McGee JO, Chapman RW. Diclofenac associated hepatitis. *J Hepatol*. 1990 Jan;10:85-9.
94. Melox fort tablet ilaç prospektüsü, Nobel İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş., 1999.
95. Munsterhjelm E, Niemi TT, Syrjälä MT, Ylikorkala O, Rosenberg PH. Propacetamol augments inhibition of platelet function by diclofenac in volunteers. *Br J Anaesth*. 2003;91:357-62.
96. Zeitlinger M, Rusca A, Oraha AZ, Gugliotta B, Müller M, Ducharme MP. Pharmacokinetics of a new diclofenac sodium formulation developed for subcutaneous and intramuscular administration. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2012;50:383-90.
97. Yokoyama H, Ito N, Soeda S, Ozaki M, Suzuki Y, Watanabe M, Kashiwakura E, Kawada T, Ikeda N, Tokuoka K, Kitagawa Y, Yamada Y. Influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs on antiplatelet effect of aspirin. *J Clin Pharm Ther*. 2013;38:12-5.
98. Zeitlinger M, Rusca A, Oraha AZ, Gugliotta B, Müller M, Ducharme MP. Pharmacokinetics of a new diclofenac sodium formulation developed for subcutaneous and intramuscular administration. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2012;50:383-90.
99. Voltaren ilaç prospektüsü. Novartis.
100. Tacca MD, Pasqualetti G, Gori G, Pepe P, Di Paolo A, Lastella M, De Negri F, Blandizzi C. Comparative pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of branded and generic formulations of meloxicam in healthy male volunteers. *Ther Clin Risk Manag*. 2013;9:303-11.
101. Melox fort tablet ilaç prospektüsü, Nobel İlaç Sanayii.
102. Mazzeo D1, Panina-Bordignon P, Recalde H, Sinigaglia F, D'Ambrosio D. Decreased IL-12 production and Th1 cell development by acetyl salicylic acid-mediated inhibition of NF-kappaB. *Eur J Immunol*. 1998;28:3205-13.
103. Munsterhjelm E, Niemi TT, Ylikorkala O, Silvanto M, Rosenberg PH. Characterization of inhibition of platelet function by paracetamol and its interaction with diclofenac in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2005;49:840-6.

104. Anitua E, Muruzabal F, Alcalde I, Merayo-Llodes J, Orive G. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates corneal wound healing and reduces haze formation after PRK surgery. *Exp Eye Res.* 2013;115:153-61.
105. <http://promega.wordpress.com/2013/11/08/converting-rpm-to-g-force-rcf-and-vice-versa-2/>
106. Werther K, Christensen IJ, Nielsen HJ. Determination of vascular endothelial growth factor (VEGF) in circulating blood: significance of VEGF in various leucocytes and platelets. *Scand J Clin Lab Invest.* 2002;62:343-50.
107. Blaicher AM, Landsteiner HT, Zwerina J, Leitgeb U, Volf I, Hoerauf K. Effect of non-selective, non-steroidal anti-inflammatory drugs and cyclo-oxygenase-2 selective inhibitors on the PFA-100 closure time. *Anaesthesia.* 2004;59:1100-3.
108. Strukova SM. Thrombin as a regulator of inflammation and reparative processes in tissues. *Biochemistry (Mosc).* 2001 Jan;66:8-18.
109. Bahou WF. Thrombin Receptors "Platelets (Second Edition)" (Ed. Michelson AD.)'de Elsevier 2007;s:45-73.
110. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000 Apr;6(4):389-95.
111. Currie LJ, Sharpe JR, Martin R. The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: a review. *Plast Reconstr Surg.* 2001 Nov;108(6):1713-26.
112. Colville-Nash PR, Willoughby DA. Growth factors in angiogenesis: current interest and therapeutic potential. *Mol Med Today.* 1997 Jan;3(1):14-23.
113. Becker JC, Beckbauer M, Domschke W, Herbst H, Pohle T. Fibrin glue, healing of gastric mucosal injury, and expression of growth factors: results from a human in vivo study. *Gastrointest Endosc.* 2005 Apr;61(4):560-7.
114. Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S. The molecular control of angiogenesis. *Int Rev Immunol.* 2002 Jan-Feb;21(1):33-49.
115. Senger D, Van De Water L, Brown L, et al. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 1993;12:303-324.
116. Kim KJ, Li B, Winer J, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993;362:841-844.

117. Krebs I, Lie S, Stolba U, et al. Efficacy of intravitreal bevacizumab (Avastin) therapy for early and advanced neovascular age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol.* 2009; 87:611–7.
118. Avila MP, Farah ME, Santos A, Carla L, Fuji G, Rossi J, Nau J. Three-year safety and visual acuity results of epimacular 90 strontium/90 yttrium brachytherapy with bevacizumab for the treatment of subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Retina.* 2012;32:10-8.
119. Bock F, Konig Y, Dietrich T, et al. Inhibition of angiogenesis in the anterior chamber of the eye. *Ophthalmologe.* 2007; 104:336–44.
120. Habot-Wilner Z, Barequet IS, Ivanir Y, et al. The inhibitory effect of different concentrations of topical bevacizumab on corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol.* 2010; 88:862–7.
121. Awazu Y, Mizutani A, Nagase Y, Tsuchiya S, Nakamura K, Kakoi Y, Kitahara O, Takeuchi T, Yamasaki S, Miyamoto N, Iwata H, Miki H, Imamura S, Hori A. Anti-angiogenic and anti-tumor effects of TAK-593, a potent and selective inhibitor of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Sci.* 2013;104:486-94.
122. Hammond JW, Hinton RY, Curl LA, et al. Use of autologous platelet-rich plasma to treat muscle strain injuries. *Am J Sports Med* 2009;37:1135–42.
123. Wright-Carpenter T, Klein P, Schäferhoff P, et al. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: a pilot study on sportsmen with muscle strains. *Int J Sports Med* 2004;25:588–93.
124. Hamilton B, Knez W, Eirale C, Chalabi H. Platelet enriched plasma for acute muscle injury. *Acta Orthop Belg.* 2010 Aug;76(4):443-8.
125. Aspenberg P, Virchenko O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand* 2004;75:93–9.
126. Kovacevic D, Rodeo SA. Biological augmentation of rotator cuff tendon repair. *Clin Orthop Relat Res* 2008;466:622–33.
127. Maffulli N, Del Buono A. Platelet plasma rich products in musculoskeletal medicine: any evidence? *Surgeon.* 2012 Jun;10(3):148-50.

128. Ljunqvist A., Schweltnus MP, Bachl N et al. International Olympic Committee consensus statement: molecular basis of connective tissue and muscle injuries in sport. *Clin Sports Med.* 2008;27:231-9.

