

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı**

**HEMOLİTİK MEKANİK TRAVMAYA MARUZ
BIRAKILAN ERİTROSİTLERDE NİTRİK OKSİDİN
VE POTASYUM KANAL BLOKAJININ
KORUYUCU ETKİSİ**

Pınar ÜLKER

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2007

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı**

**HEMOLİTİK MEKANİK TRAVMAYA MARUZ
BIRAKILAN ERİTROSİTLERDE NİTRİK OKSİDİN
VE POTASYUM KANAL BLOKAJININ
KORUYUCU ETKİSİ**

Pınar ÜLKER

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Oğuz Kerim BAŞKURT**

**Bu Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir**

“Kaynakça Gösterilerek Tezinden Yararlanılabilir”

Antalya, 2007

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma, jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez danışmanı: Prof. Dr. Oğuz Kerim BAŞKURT
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Aysel AĞAR
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Ümit Kemal ŞENTÜRK
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. V. Nimet UYSAL
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Fevzi Ersoy
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2007 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nurettin Oğuz
Enstitü Müdürü

ÖZET

Dolaşım sisteminde etkili mekanik kuvvetler hemolitik düzeyin altında seyretmektedir. Ancak, yapay organlarda yada vücut dışı dolaşım alanlarında meydana gelen mekanik kuvvetler hemolitik seviyeye ulaşmakta ve hemolize neden olmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalar nitrik oksidin ve potasyum kanal blokajının subhemolitik travmada koruyucu bir rolü olduğunu göstermiştir. Bu çalışma, subhemolitik travmada görülen koruyucu etkilerin hemolitik travmada da gözlenip gözlenemeyeceğini test etmek amacıyla planlanmıştır. Sağlıklı on gönüllü bireyden alınan venöz kan örnekleri, hematokritleri 0.4 L/L olacak şekilde otolog plazma ile resuspanse edilmiştir. Daha sonra bu kan örnekleri beş eşit gruba ayrılmıştır: Kontrol, Mekanik stres (MS), M.S.+Sodyum nitroprussid (SNP), M.S.+Tetraethylammonium (TEA) ve M.S.+Klotrimazol (CLT). M.S.+SNP , M.S.+TEA ve M.S.+CLT grupları sırasıyla 10^{-4} M SNP, 10^{-7} M TEA, 3×10^{-5} M CLT ile oda sıcaklığında bir saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben mekanik stres gruplarına ait kan örnekleri, bir pompa aracılığı ile 200 mmHg basınç altında cam bir kapiller borudan (çapı= 0.06 cm; uzunluğu= 33 cm) yarım saat boyunca geçirilmiştir. Mekanik stres uygulamasından sonra kan örneklerinde hemoliz oranı, eritrosit deformabilitesi ve tam kan sayımı yapılmış ve eritrositler morfolojik olarak incelenmiştir. Kapiller boruda meydana gelen kayma kuvveti hemolitik seviyenin altında olmasına rağmen, kanın bu mekanik stres düzeneğinden yarım saat boyunca geçmesi yaklaşık olarak % 3 oranında hemolize neden olmuştur. Meydana gelen hemoliz, kan örneklerinin SNP, TEA yada klotrimazol ile muamele edilmesi ile engellenememiştir. Bunun yanında mekanik stres uygulaması, eritrosit deformabilitesi ve eritrosit morfolojisinde önemli değişimlere neden olmamıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan mekanik stres düzeneği eritrositlerde, özellikle de pompadan geçişleri sırasında önemli düzeyde hemolize yol açmış, ve bu hemoliz NO donörü veya K^+ kanal blokörlerinin kullanılması ile engellenememiştir.

Anahtar kelimeler: Kayma gerilimi, mekanik travma, hemoliz, nitrik oksit

ABSTRACT

Shear forces effective in the normal mammalian circulatory system remain below the hemolytic threshold. However, mechanical trauma to red blood cells (RBC) during blood flow through artificial organs or extracorporeal circuits may exceed this threshold and results in hemolysis. It has been previously demonstrated that nitric oxide and potassium channel blockage play a protective role in non-hemolytical mechanical trauma to RBC. This study was designed to test if this protective effect can also be observed in hemolytic mechanical trauma to RBC. Heparinized venous blood samples were obtained from ten healthy, adult donors. The hematocrits of all blood samples were adjusted to 0.4 L/L by recombining the packed RBC and autologous plasma and divided into five groups; Control, mechanical stress (MS), M.S.+Sodium nitroprussid (SNP), M.S.+Tetraethylammonium (TEA) and M.S.+Clotrimazole (CLT). M.S.+SNP, M.S.+TEA and M.S.+CLT groups were incubated in room temperature for 1 hour with SNP (10^{-4} M), TEA (10^{-7} M) and Clotrimazole (3×10^{-5} M) respectively. After incubation, blood samples from mechanical stress groups were pumped through a glass capillary (diameter= 0.06 cm; length= 33 cm) using a roller pump, to maintain a pressure gradient of 200 mmHg, for 30 minutes. At the end of the mechanical stress application, hemolysis ratio, RBC deformability and whole blood cell count were measured and cell morphology was analysed. Although the calculated wall shear stress within the capillary tube was below hemolytical threshold, 30 minutes flow of blood under these circumstances result in about 3% hemolysis monitored by the measurement of plasma hemoglobin. A series of 10 experiments revealed that the degree of hemolysis was not affected by including SNP, TEA or clotrimazole in the blood sample. Besides that, mechanical stress application did not cause significant alterations in RBC deformability or cell morphology.

In conclusion, as the calculated shear stress in the capillary tube in the system was below the hemolytical threshold, the hemolysis was caused mainly by the roller pump used in the system. The findings of the present study showed that neither nitric oxide nor potassium channel blockage could prevent this mechanical damage.

Key words: Shear stress, mechanical trauma, hemolysis, nitric oxide

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması, projelendirilmesi ve gerçekleşmesinde değerli katkı ve eleştirileriyle bana yol gösteren sayın hocam Prof. Dr. Oğuz Kerim BAŞKURT'a, öneri ve eleştirileri için değerli hocalarıma, tezin bütün aŐamalarında bana destek olan çalışma arkadaŐım Mehmet Üykl'ye, her zaman dostluklarını ve yardımlarını hissettiğim çalışma arkadaŐlarım zlem Yalçın, Melike Cengiz ile Fizyoloji Anabilim Dalı'ndaki diğer araştırma görevlisi arkadaŐlarıma ve sonsuz sabır ve destekleri için değerli aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	
2.1. Dolaşım sisteminde etkili mekanik kuvvetler	3
2.1.1. Kayma Gerilimi	3
2.1.2. Dolaşım Sisteminde Duvar Kayma Gerilimi	5
2.1.2.1. Kayma Geriliminin Dolaşım Sistemine Etkileri	6
2.2. Vücut Dışı Dolaşım ve Kan Hücrelerinin Hasarı	7
2.2.1. Vücut Dışı Dolaşım	7
2.2.2. Vücut Dışı Dolaşımda Kan Hücrelerinin Hasarı	9
2.2.3. Vücut Dışı Dolaşımda Subhemolitik Kayma Gerilimi	10
2.2.4. Subhemolitik Kayma Geriliminin Eritrositlere Etkileri	12
2.2.4.1. Subhemolitik kayma geriliminin eritrositlerin iyon geçirgenliğine etkisi	12
2.2.4.2. Subhemolitik kayma gerilimi ve gardos kanalları	13
2.2.4.3. Subhemolitik kayma gerilimi ve Ca 'a bğlı mekanizmalar	15
2.2.4.4. Subhemolitik Kayma Gerilimi ve NO	16
2.2.5. Vücut Dışı Dolaşımda Hemoliz ve Hemolitik Travma	17
2.3. Hipotez	19

GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1.	Kan Örneklerinin Hazırlanması	21
3.2.	Deney Protokolü	21
3.2.1.	Mekanik Stres Uygulaması	21
3.2.2.	Hemoliz Oranının Saptanması	23
3.2.3.	Eritrosit Deformabilitesinin Değerlendirilmesi	23
3.2.4.	Tam Kan Sayımı	24
3.2.5.	Morfolojik Eritrosit İncelemeleri	
3.3.	Diğer Yöntemler	24

BULGULAR

4.1.	Mekanik Stresin Hemolitik Etkisi	25
4.2.	Mekanik Stres Uygulamasının Eritrosit Deformabilitesine Etkisi	25
4.3.	Tam Kan Sayımı	26
4.4.	Mekanik Stres Uygulamasının Eritrosit Morfolojisine Etkisi	27

TARTIŞMA

SONUÇLAR

KAYNAKLAR

ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BK	:	Yüksek düzeyde iletken gardos kanalları
Ca⁺⁺	:	Kalsiyum
Ca⁺⁺-ATPaz	:	Kalsiyum ATPaz
cAMP	:	Siklik adenozin 3',5' monofosfat
cGMP	:	Siklik guanozin 3',5' monofosfat
Cl⁻	:	Klor
cp	:	Centi poise
CPB	:	Kardiyopulmener bypass
EDRF	:	Endotel kaynaklı gevşetici faktör
eNOS	:	Endotelyal nitrik oksit sentaz
EI	:	Elongasyon indeksi
ES	:	Eritrosit sayısı
EDTA	:	Etilendiamin tetraasetik asit
fL	:	Femtolitre
Hb	:	Hemoglobin
HbS	:	Hemoglobin S
HCl	:	Hidroklorik asit
HCO₃⁻	:	Bikarbonat
Htc	:	Hematokrit
IK	:	Orta düzeyde iletken gardos kanalları
iNOS	:	Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
K⁺	:	Potasyum
KH₂PO₄	:	Potasyum fosfat
Mg⁺⁺	:	Magnezyum
n	:	viskozite
Na⁺	:	Sodyum
NO	:	Sodyumnitroprussid

NOS	:	Nitrikoksid sentaz
Na⁺-K⁺-ATPaz	:	Sodyum-potasyum ATPaz
OEH	:	Ortalama eritrosit hacmi
OEHK	:	Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu
P	:	Basınç
Pa	:	Pascal
PBS	:	İzotonik fosfat tamponu
PGE1	:	Prostaglandin E1
PGE2	:	Prostaglandin E2
PI3K	:	Fosfoinozid 3 kinaz
PKA	:	Proten Kinaz A
PKC	:	Protein kinaz C
PLC	:	Fosfolipaz C
PVP	:	Polivinil pirrolidon
Q	:	Akım
r	:	Yarıçap
RP	:	Roller pompa
SK	:	Düşük iletken gardos kanalları
SNP	:	Sodyum nitroprussit
SS	:	Kayma gerilimi
TEA	:	Tetraetilamanyum klorür
W	:	Duvar kayma gerilimi
V	:	Akım hızı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Kayma Geriliminin Etki Yönü.	4
2.2. Damar dallanmalarının kayma gerilimine etkileri	5
2.3 Kalp- akciğer makinasının şematik görünümü	8
2.4. Hemodiyalizde vücut dışı dolaşım kan devresi	9
2.5. Kardiyopulmoner bypass işleminde kayma gerilimi seviyeleri	10
2.6. Eritrosit iyon taşıma yolları	12
2.7. Gardos kanalının yapısı	14
2.8. Kardiyopulmoner bypass işlemi sırasında alınan kan örneklerinde hemoliz	18
2.9. Açık kalp ameliyatlarında plazmaya salınan hemoglobin seviyeleri	19
3.1. Mekanik stres düzeneği	22
4.1. Hemoliz oranı	25
4.2. Eritrosit deformabilitesi	26
4.3. Tam kan sayımı	27
5.1. Sistemde kullanılan pompanın hemoliz oranına etkisi	27

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
4.1. Kontrol ve mekanik stres gruplarına ait hematolojik parametreler.	27

GİRİŞ

Kanın hücresel elemanları, dolaşım sisteminde buldukları süre içinde mekanik etkilere maruz kalır ve bu etkiler kan hücrelerinin normal morfolojilerini ve fonksiyonlarını değiştirebilir. Normal dolaşım koşullarında, dolaşım sisteminin büyük bir bölümünde kan hücrelerine etki eden mekanik kuvvetlerin büyüklüğü, hasara yol açabilecek boyutlarda değildir. Ancak kan hücreleri, kardiyopulmoner bypass, yapay kalp ve kalp kapakçığı [1], dolaşım destekleme cihazları [2, 3], hemodiyaliz ekipmanları [4] gibi yapay ortamlarda daha büyük mekanik kuvvetlerin etkisinde kalırlar. Yüksek kayma gerilimi, türbülans, yabancı yüzeylere çarpma kanın yapay organlarla temasta olduğu durumlarda kaçınılmazdır ve hemolize neden olabilir [5, 6].

Kan hücrelerinin yabancı yüzeylerle uzun süreli teması ve bu yüzeylere çarpması kan hücrelerinde çeşitli yanıtların gelişmesine neden olur. Bunlar arasında eritrositlerin mekanik özelliklerinde meydana gelen olumsuz değişimler ve eritrositlerin mekanik olarak yıkımı (hemoliz), lökositlerin ve trombositlerin aktivasyonu, inflamatuvar mediyatörlerin konsantrasyonlarının artması yer almaktadır [7-9].

Vücut dışı dolaşımında hemolizin başlıca nedeni, kan hücrelerinin mekanik hasarıdır. Mekanik hemoliz, eritrosit membranının, hücrenin tolere edebileceğinden büyük mekanik kuvvetlerin etkisinde parçalanması sonucu eritrosit içeriğinin serbest kalmasıdır [10]. Kan hücrelerinin, yapay organların akım alanlarında maruz kaldığı mekanik kuvvetler arasında en çok araştırılan ve bilgi sahibi olunanı, kayma gerilimidir. Fizyolojik seviyelerin üstündeki kayma kuvvetlerinin eritrosit membranında hasara neden olduğu bilinmektedir. Eritrositlerde hemolitik bir hasar ortaya çıkması için etki eden kayma kuvvetlerinin ise 300 dyn/cm^2 den fazla olması gerektiği bildirilmiştir [11].

Literatüre göre, eritrositlerde hemolitik bir hasar meydana getiren kayma kuvveti seviyelerinin altındaki kayma gerilimi hemolize neden olmamakla birlikte, eritrositlerde bir dizi değişikliğe neden olmaktadır. "Sub-hemolitik travma" olarak isimlendirilen bu etkinin, eritrosit metabolizmasında, membran organizasyonunda ve iyon taşınmasında ortaya çıkabilen değişimlere bağlı olarak geliştiği vurgulanmaktadır. Bu konuda yapılan çeşitli çalışmalarda, sub-hemolitik travmanın eritrosit membranında lipid moleküllerinin kaybına neden olduğu, eritrosit içi kalsiyum iyon konsantrasyonunda artış yarattığı ve bu yollarla eritrosit reolojisi üzerine etkili olduğu gösterilmiştir [10, 12, 13].

Normal eritrosit fizyolojisi üzerine etkili olan bir başka faktör de nitrik oksittir [14-16]. Endotel hücrelerinde sentezlenen NO, sadece yakında bulunan düz kas hücrelerini etkilemekle kalmaz aynı zamanda vasküler lümene de diffüze olarak kan hücreleriyle de etkileşir [17]. Ayrıca, insan kırmızı kan hücreleri, nitrik oksit sentezinin indüklenebilir (NOS2 ya da iNOS) ve sabit (NOS3 ya da eNOS) formlarına sahip oldukları için kendi NO'larını sentezleyebilirler [18]. Nitrik oksidin eritrosit mekaniği üzerine etkileri bir kaç araştırmanın konusunu oluşturmuştur. Bor-Küçükataç ve arkadaşları NO'nun doza bağımlı bir şekilde, eritrositlerin mekanik özellikleri açısından düzenleyici bir role sahip olabileceğini bildirmişlerdir [15, 19]. Bu etkinin olasılıkla guanilat siklazdan bağımsız mekanizmalarla ve muhtemelen eritrosit membranından potasyum geçişinin inhibisyonu aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir [15, 19]. Öte yandan, Nitrik oksit'in (NO) yüksek kayma gerilimine maruz bırakılan eritrositlerde meydana gelen mekanik bozulmayı önleyebileceği de ileri sürülmektedir [20]. Laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada sub-hemolitik düzeyde kayma gerilimine maruz bırakılan eritrositlerde ortaya çıkan deformabilite bozukluğunun, NO donorü olan sodyum nitroprusit (SNP) tarafından doza bağımlı olarak engellendiği, aynı zamanda non-selektif potasyum kanal blokeri olan Tetra Etil Amonyum (TEA)'nın da benzer şekilde koruyucu bir etki gösterdiği saptanmıştır.

Özellikle klinik uygulamalarda yeri olan hemodiyaliz pompaları, kalp-akciğer pompası gibi düzeneklerde eritrositlerin mekanik strese maruz kaldığı ve hemoliz geliştiği yukarıda belirtilmiştir. Bu yolla ortaya çıkan mekanik stresin eritrosit reolojisi ve hemolizi üzerine olan olumsuz etkilerinin nitrik oksit donörü kullanılarak önlenileceği düşünülmüş ve bu çalışma planlanmıştır. Bu çalışmada aynı zamanda spesifik ve non spesifik K⁺ kanal blokörleri kullanılarak nitrik oksidin olası koruyucu etki mekanizmasının aydınlatılması da hedeflenmiştir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Dolaşım Sisteminde Etkili Mekanik Kuvvetler

Kan, diğer sıvıların prensiplerine benzer şekilde basıncın yüksek olduğu yerden düşük olduğu yere doğru hareket etme eğilimindedir. Vücut içinde kanın hareketi, kalp tarafından oluşturulan yüksek ve düşük basınçlar sayesinde gerçekleşmektedir. Kalbin bir pompa gibi çalışarak kasılmasıyla oluşturduğu itici güç, kanın damar sistemi içine fırlatılmasını sağlar. [21].

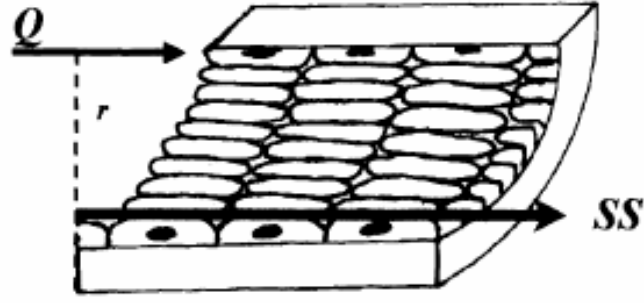
Geniş elastik ve kaslı damarlardan, arteriyollerden ve prekapiller damarlardan oluşan arteriyal sistem, kalp tarafından oluşturulan ve büyüklüğü, sıklığı ve yönü geniş ölçüde değişen hemodinamik kuvvetlerin etkisi altındadır [22]. Vücut içinde kan damarlarına etki eden bu hemodinamik kuvvetler, iki sınıfta incelenir : Basınç ve kayma gerilimi. Basınç, kardiyak kontraksiyon ile meydana gelir ve damar duvarına dik olarak etki eder. Kayma gerilimi ise kan akımı ile meydana gelir ve damar duvarına paralel olarak etki eder. [23-25].

2.1.1. Kayma Gerilimi

Kan akımının neden olduğu mekanik kuvvetlerden önemli bir tanesi kayma gerilimidir [22]. Kayma gerilimi, laminar akım koşullarında sıvı tabakalarının birbirinin üzerinde kaymasını sağlayan kuvvet olarak tanımlanır. Damar duvarının intimal yüzeyinde yerleşmiş olan endotel hücreleri, sürekli olarak kayma geriliminin etkisi altındadır [22, 26, 27].

Matematiksel şekilde bir vektör olarak ifade edilen kayma gerilimi, belirli bir büyüklüğü ve yönü olan bir kuvvettir. Silindirik borularda sıvı hareketini sağlayan bu kuvvet, dyn/cm^2 olarak, yani birim alana uygulanan kuvvet şeklinde ifade edilir [28]. (şekil 2.2). Buna göre μ viskozite, Q akım hızı, π sabit sayı ve r damar yarıçapı olmak üzere kayma gerilimi şu şekilde ifade edilebilir: [25].

$$S.S.= 4\mu Q / \pi r^3 \quad (1)$$



Şekil 2.1. Kayma Gerilimi (SS). Kayma geriliminin büyüklüğü, kan viskozitesi (μ) ve kan akım hızı (Q) ile doğru, damar yarı çapının (r) üçüncü kuvveti ile ters orantılıdır. (Kaynak 25'den alınmıştır.)

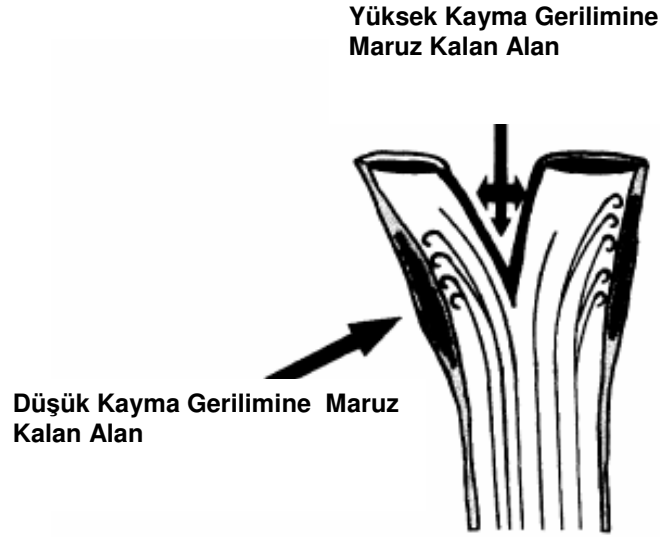
Kayma gerilimi, formülünden de anlaşılacağı gibi önemli ölçüde damarın yarıyapına bağlıdır. Bu nedenle damar yarıçapında meydana gelen küçük bir değişim kayma geriliminde önemli değişimlere neden olmaktadır [23]. Arteriyal ve venöz vasküler sistemlerde etkili olan kayma gerilimi seviyeleri birbirinden farklıdır. Bu farklılık, yapısal olarak farklı lümen çaplarına sahip olmalarının yanı sıra farklı akım hızlarına sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Arterler, venlere göre daha yüksek kan akım hızına ve daha dar bir lümene sahip olup, bu damarlarda görülen kayma gerilimi seviyeleri $10-70 \text{ dyn/cm}^2$ arasındadır. Oysa daha düşük akım hızına ve daha geniş çapa sahip olan venlerde kayma gerilimi $1-6 \text{ dyn/cm}^2$ arasında değişmektedir [28, 31].

Doğal akım koşullarında endotel hücrelerine etki eden kuvvetler ise duvar kayma gerilimi olarak ifade edilirler. Endotel yüzeyine paralel şekilde etki eden duvar kayma geriliminin büyüklüğü, damar duvarına komşu olan sıvının hareket hızı (duvar kayma hızı) ile marjinal alandaki sıvının viskozitesi tarafından belirlenir. Duvar kayma gerilimini etkileyen en önemli faktörler ise kanın akışkanlık özellikleridir [24, 29-32].

2.1.2. Dolaşım Sisteminde Duvar Kayma Gerilimi

Vücut içindeki kan akımı, düz bir boruda meydana gelen akımdan farklıdır. Bu farkın iki önemli nedeni vardır. İlki, kan akımının pulsatil karakterde olması ve diğeri kan damarı geometrisinin dolaşım sistemi boyunca değişikliğe uğramasıdır [33]. Belirtilen nedenler kan akımının dolaşım sistemi boyunca değişmesine sebep olmaktadır. Bu değişiklikler en çok damar eğimlerinin görüldüğü bölgeler de göze çarpar. Duvar kayma hızının damarın kesit alanı boyunca değiştiği bu bölgelerdeki kan akım hızı, eğimin olduğu taraftaki damar duvarında düşük iken damarın diğer duvarında daha yüksektir [24]. Damar eğimlerinin yanı sıra, damar dallanmaları da duvar kayma hızının dolaşım sistemi boyunca değişmesine neden

olmaktadır. Bu bölgelerde kan akım hızı dallanmanın olduğu iç duvarda en yüksek iken dış duvarda en düşüktür [34].



Şekil 2.2. Damar dallanmalarının duvar kayma gerilimine etkisi (Kaynak 26'den alınmıştır)

Damarların dallanma bölgelerindeki damar şekline bağlı olarak kayma geriliminde görülen değişikliklere örnek olarak sol ana koroner arter verilebilir [34]. Burada akımın ayrıldığı noktada ortalama kayma gerilimi 50 dyn/cm^2 den fazla olabilirken, dış lateral duvarda ortalama kayma gerilimi sıfıra yakındır [32].

Kanın akım hızı ve buna bağlı olarak duvar kayma gerilimini etkileyen bir diğer faktör, kardiyak döngüdür. Kardiyak döngü sırasında kan akım hızı ve duvar kayma gerilimi sistolde en yüksek seviyelerine ulaşırken; diyastolde daha düşük seyreder. Kardiyak döngünün $2/3$ ünü oluşturmasından dolayı döngünün diyastol fazındaki duvar kayma gerilimi seviyesi, hesaplanan ortalama duvar kayma geriliminin büyük kısmını oluşturmaktadır. Ayrıca sistol fazı boyunca nabız basıncındaki artışın yanı sıra duvar kayma geriliminde görülen artış da arter çapında meydana gelen artışa bağlı olarak sınırlandırılmaktadır. Bu etki özellikle elastik arterlerde görülmektedir [35].

Yukarıda belirtilen şekil değişiklikleri ve pulsatil kan akımı nedeniyle vücut içinde duvar kayma gerilimini belirlemek kolay değildir. Vücut içindeki duvar kayma gerilimi seviyesini tam olarak belirlemek için, duvara yakın bölgedeki kan akım hızı ile bu bölgede akan kanın viskozitesinin bilinmesi gereklidir. Ancak, hem kayma hızı hem de kan viskozitesi damar kesitinde değişmektedir. Bu nedenlerden dolayı insanlarda arteryal duvar kayma gerilimi hesaplamaları, %20-50 arasında hatalı olabilmektedir [36].

2.1.2.1. Kayma Geriliminin Dolaşım Sistemine Etkileri

Kayma geriliminin kardiyovasküler fizyoloji ve patofizyoloji için önemi, hemodinamik özellikleri tanımlanmış damar bölgelerinde ateroskleroz oluşumunun araştırılması ile açığa çıkmıştır [37, 38]. Bu çalışmalarda arterlerin düz seyreden bölgelerinin düzenli laminar akıma maruz kaldığı ve bu bölgelerin aterosklerotik plak gelişiminden korunduğu; buna zıt olarak, dallanma, yada eğimlerin görüldüğü damar bölgelerinde ise laminar akımın bozulduğu, kayma geriliminin düzensiz bir hal aldığı ve bu bölgelerin aterosklerotik plak gelişimine daha yatkın olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, kayma geriliminde meydana gelen değişimlerin, aterosklerotik plak gelişimini de içeren patolojik durumlarda önemli bir rol oynayabileceğini kanıtlamıştır [39].

Normal laminar akım koşullarında oluşan fizyolojik kayma gerilimi, vasküler fonksiyonun düzenlenmesinde önemli roller oynamaktadır. Kayma gerilimi, vasküler tonüsün ve çapın düzenlenmesi, damar duvarı yeniden yapılanması ve inflamatuvar cevapları içeren çeşitli hücresel yapı ve fonksiyonları düzenlemektedir[40]. Kayma gerilimi, önemli işlevlerini, endotel hücrelerinden koagülasyon kaskatını direkt yada indirekt düzenleyen faktörlerin salgılamasını uyarak gerçekleştirir. Bu faktörler arasında prostasiklin, nitrik oksit, kalsiyum, trombomodülin ve doku plasminojen aktivatörü bulunmaktadır [39].

Vasküler sistemde belirtilen önemli rollerinin olması nedeniyle, kayma gerilimi seviyeleri dolaşım sistemi boyunca sabit tutulmaya çalışılır. Bu nedenle kayma geriliminde meydana gelen değişikliklere cevap olarak arterler kayma gerilimi seviyelerini sabit tutmak üzere adaptasyon sürecine girerler. Bu adaptasyon ortalama duvar kayma geriliminin belirli sınırlar dahilinde korunmasında önemli bir role sahiptir [36, 41].

Kayma geriliminde meydana gelen ani değişiklikler, damar çapında geçici düzenlemelere neden olmaktadır. Bu düzenlemeler, vazoaaktif agonistlerin salınımı ve miyojenik tonüsün değişimi aracılığı ile gerçekleşmektedir. Kayma geriliminde görülen kronik değişimler ise genellikle patolojik durumlarda görülmekte ve damar duvarının şeklinde ve yapısında genel olarak yeniden yapılanma (vasküler remodelling) olarak tanımlanan ve hücre proliferasyonunu, apoptosisi, matriks sentezini ve degradasyonunu içeren önemli adaptif değişimlere neden olmaktadır [17, 40, 42-45].

Damar duvarında, kan akımının görüldüğü luminal yüzeye yerleşmiş olan endotel hücreleri, kayma kuvvetini algılayıp bu kuvvetlere yanıt veren hücreler arasında önemli bir yere sahiptir [26]. Kayma geriliminin hücreler tarafından nasıl algılandığı, kayma gerilimi algılanmasını takiben aktive olan

hücre içi yolakları ve bu yolaklar ile hangi genlerin aktive olduğu konusunda geniş araştırmalar yapılmıştır [39]. Endotele direk olarak etki eden kayma kuvveti, endotel hücrelerinin gen ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörlerini etkiler ve bu yolla endotel hücrelerinin yapı ve fonksiyonunu modüle eder [26, 39].

2.2. Vücut Dışı Dolaşım ve Kan Hücrelerinin Hasarı

2.2.1. Vücut dışı dolaşım

Vücut dışı dolaşım, basit olarak kanın vücut dışında bulunan bir sistemden dolaşımı olarak tanımlanır. Modern tıpta sıkça kullanılan bir yöntem olan vücut dışı dolaşım teknolojisinde, vücuttan çıkan kanın belirli işlemlerden geçerek tekrar vücuda dönmesi amaçlanır.

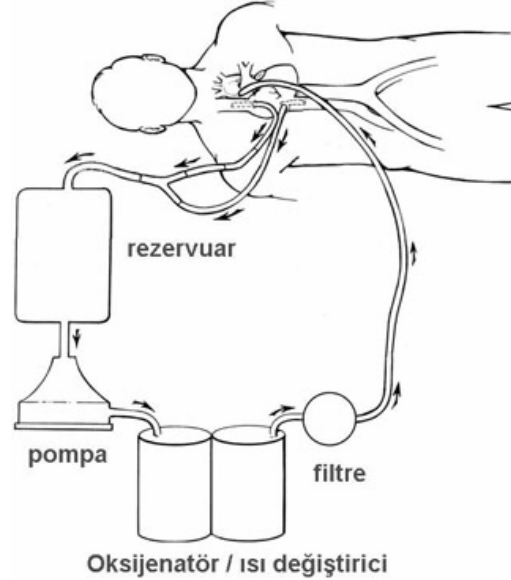
Vücut dışı dolaşıma verilebilecek en iyi örnek, kardiyopulmoner bypass işlemidir. Kanın, vücut dışında karbondioksitten arındırılıp oksijenlendirilerek kalp-akciğer makinası ile tekrar vücuda pompalanması suretiyle kalp ve akciğerlerin görevini geçici olarak bir makinanın üstlenmesine kardiyopulmoner bypass denilir. Açık kalp cerrahilerinde rutin olarak kullanılan kardiyopulmoner bypass tekniğinin ana prensibi, hastadan alınan kanın oksijenize edilerek tekrar hastaya geri döndürülmesidir [46].

Kalp akciğer makinalarının bileşenleri ise şöyledir:

- Kanı kalpten veya büyük venlerden toplayan venöz kanüller,
- Cerrahi sahadaki kanın aspire edilmesini ve bu kanın tekrar sisteme kazandırılmasını sağlayan emici bir sistem (suction),
- Kalp odalarındaki kanın boşalmasını ve kalbin dekomprese edilmesini sağlayan bir diğer emici sistem (vent),
- Venöz kanüllerden ve diğer emici sistemlerden gelen kanın toplandığı bir venöz rezervuar,
- Kanın oksijenlenmesini sağlayan bir oksijenatör,
- Kanın soğutulup ısınmasını sağlayan bir ısı değiştirici (heat exchanger),
- Kalbin pompa işlevini üstlenen bir pompa
- Sisteme karışma olasılığı olan partiküllerin temizlendiği bir filtre sistemi
- Oksijenlenmiş ve filtre edilmiş kanı hastanın arteriyel sistemine ileten arteriyel kanüller,
- Sistem işleyişinin ve kanül basınçlarının izlenebildiği bir monitör sistemi

Yukarıda belirtilen ve bir çok bileşenden oluşan kalp akciğer makinaları temel olarak, akciğer işlevlerini gören bir oksijenatör ve kalp işlevini gören bir pompadan ibarettir. Bunlarla birlikte sistemde bulunan ve hastadan gelen kanın depolandığı rezervuar ve sistemde dolaşan kanın

ısını ayarlamaya yarayan ısı değiştirici kalp akciğer makinasının temel işlevlerini açıklar [47]. Kalp-akciğer akinasının şematik görünümü, şekil 2.3.'de görülmektir.

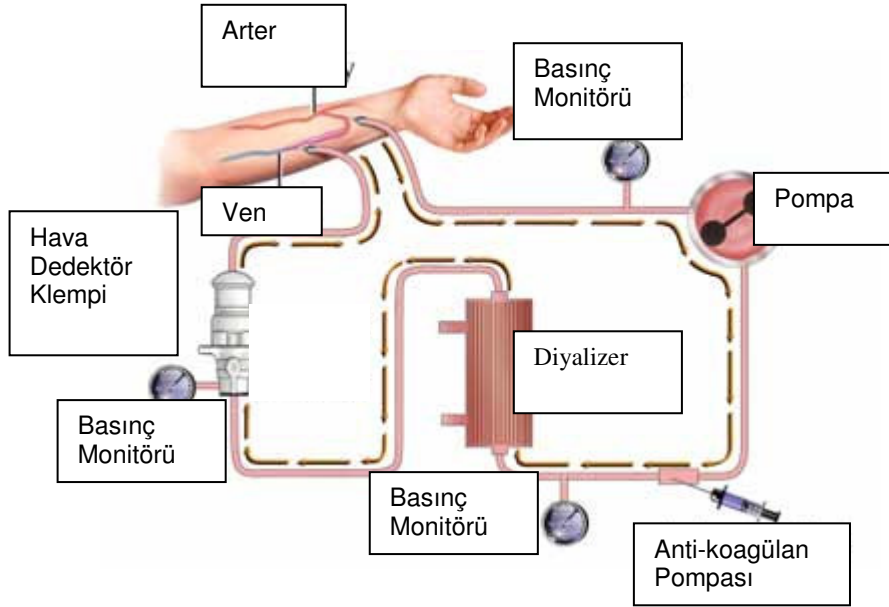


şekil 2.3. Kalp akciğer makinasının şematik görünümü. (Kaynak 47'den alınmıştır)

Vücut dışı dolaşıma verilebilecek bir diğer örnek, hemodiyalizdir. Deneysel olarak ilk hemodiyaliz uygulaması, 1913 yılında nefrektomize köpekler üzerinde yapılmıştır. İnsandaki ilk uygulaması ise, 1944 yılında Hollandalı bir hekim olan Kolff tarafından gerçekleştirilmiştir. Diyaliz, akut ve kronik böbrek yetmezliği sonucu kanda metabolik atıkların ve toksik maddelerin birikmesi nedeniyle sıvı-elektrolit dengesinde meydana gelen bozulmaların düzeltilmesinde kullanılan ve yarı geçirgen bir membran aracılığı ile hastanın kanı ve diyaliz solüsyonu arasında sıvı-solüt değişimini temel alan konservatif bir tedavi yöntemidir.

Hemodiyaliz işlemi sırasında hastanın kanı uygun bir yolla (kateter, a-v fistül yada greftler) damardan alınarak hemodiyaliz makinaları ve hemodiyaliz solüsyonları aracılığıyla temizlenir ve tekrar hastaya verilir. Hemodiyaliz mebranı adı verilen zar üzerindeki porlar, protein ve kan hücreleri gibi büyük çaplı moleküllerin membrandan geçmesine izin vermezken; su, sodyum, potasyum, üre gibi çapları porların çapından daha küçük olan moleküllerin porlardan geçmesine olanak sağlar. Porlardan geçebilen küçük moleküller membranın iki tarafındaki konsantrasyonları eşitlenene kadar yüksek konsantrasyonlu olarak bulundukarı taraftan diğer tarafa doğru yer değiştirir. Bu kurala göre membran yüzeyinden hasta kanı ve diyaliz sıvısı arasında madde geçişleri başlar. Böylece kanda yüksek oranda bulunan ancak diyaliz sıvısında bulunmayan üre, kreatinin, fosfor ve daha bir çok üremik toksin

membrandan geçerek diyaliz sıvısına karışır ve vücuttan uzaklaştırılır. Hemodiyaliz hastanın ihtiyacına göre haftada 2-3 kez ve yaklaşık 4'er saat süreyle uygulanır.



Şekil 2.4. Hemodiyalizde vücut dışı dolaşım devresi (Kaynak 48'den alınmıştır)

Hemodiyaliz makinaları esas olarak ekstrakorporeal kan devresi ve diyaliz sıvısı devresi olmak üzere iki bölümden oluşur. Ekstrakorporeal kan devresi, kanın arteriyovenöz (AV) fistülünün arteriyal tarafından alınıp diyalizlerden geçirildikten sonra AV fistülünün venöz tarafına geri verildiği sistemin adıdır (Şekil 2.4.). Ekstrakorporeal kan devresinin elemanları ise şöyledir : [47, 48].

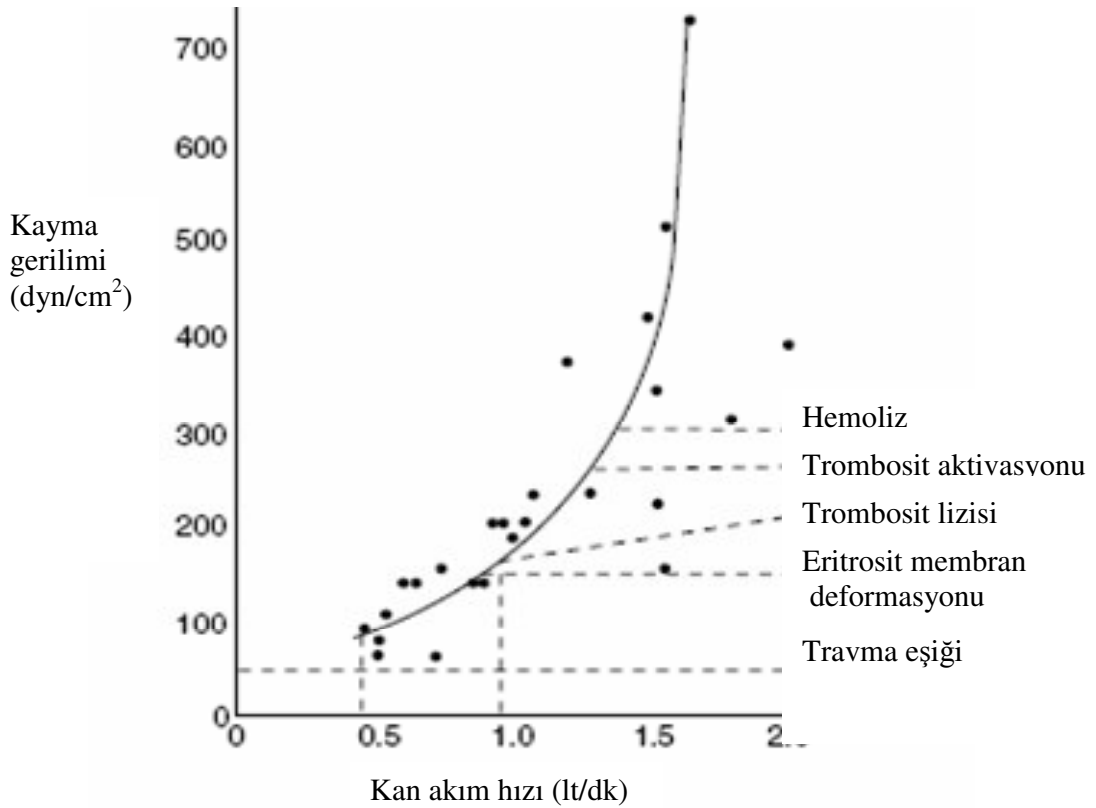
- Hemodiyaliz seti
- Diyalizer
- Hemodiyaliz makinasına ait parçalar
- Arteriyal ve venöz basınç monitörleri
- Kan pompası
- Heparin pompası
- Hava kabarcığı dedektörü
- Otomatik akım durdurucular (klempler)

2.2.2. Vücut Dışı Dolaşımında Kan Hücrelerinin Hasarı

Kan hücreleri vücut dışı dolaşım bölgelerinde pompalar, borular ve membranlar gibi çeşitli vücut dışı dolaşım bileşenleri ile uzun süreli olarak temasta bulunur. Bu temas, hücrelerde bir dizi değişikliğin gelişmesine neden

olur. Son yıllarda bu konuda yapılan çalışmalar, yapay dolaşım alanlarında meydana gelen hasarın en aza indirilmesini amaçlamaktadır. Ancak bütün çabalara rağmen, kan hücrelerinin mekanik travmaları günümüzde de önemli bir sorun olmaya devam etmekte ve başta hemoliz olmak üzere hiperkoagülasyon, tromboembolizm, kanama, iskemik atak, felç, hipertansiyon, anemi ve hatta çoklu organ yetmezliği gibi klinik komplikasyonların önde gelen nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir [49-52].

Eritrositlerde hasar mekanizmalarının aktivasyonuna yol açan travma çeşitleri, subhemolitik ve hemolitik travma olmak üzere iki farklı grupta incelenir. Bunlar arasındaki en önemli fark meydana getirdikleri hasar derecesidir. Subhemolitik travma hemolize neden olmazken; hemolitik travma değişen oranlarda hemolize neden olmaktadır. Her iki travma çeşidinin gelişmesinde en önemli faktör, vücut dışı dolaşım alanlarında meydana gelen fizyolojik olmayan akım koşullarıdır [20]. Kardiyopulmoner bypass işleminde yaygın olarak kullanılan kataterler ile yapılan in-vitro çalışmalar, hücrelerin tolere edebileceği kayma gerilimi seviyesinin 50 dyn/cm^2 olduğunu gösterilmiştir. Bu değer üstündeki kayma gerilimi seviyeleri, kan hücrelerinde çeşitli olumsuz değişimlere neden olmaktadır. Kayma geriliminin hemolize neden olan en düşük seviyelerinin ise $250-300 \text{ dyn/cm}^2$ olduğu belirtilmiştir [53].



Şekil 2.5. CPB işleminde kullanılan kataterlerde deneysel olarak tespit edilen kayma gerilimi seviyeleri ve neden olduğu hasarlar (Kaynak 53'den alınmıştır).

2.2.3. Vücut Dışı Dolaşımında Subhemolitik Kayma Gerilimi

Subhemolitik düzeyde kayma geriliminin neden olduğu travmada, hücre membranını tam olarak hasarlanmaz ancak, eritrosit metabolizması, membran organizasyonu ve iyon taşınması değişir [54].

Sub hemolitik ya da sublethal travmanın fark edilebilmesi ve nitelendirilmesi hemolize neden olan hemolitik travmaya göre çok daha zordur [54]. Bir çok kriter, sub hemolitik mekanik stresin belirlenmesine yardımcı olmaktadır [11, 20]. Buna göre;

- 1) Mekanik stres uygulamasından sonra eritrosit süspansiyonlarında hemoliz meydana gelmez.
- 2) Mekanik stres uygulamasından sonra dilüe eritrosit süspansiyonlarının ışık mikroskopi çalışmalarında, eritrositler normal hücre morfolojisindedir ve görüntüde hücre fragmentleri gözlenmez.
- 3) Mekanik hemoliz, 300dyn/cm^2 den büyük kayma geriliminin uygulanması ile meydana gelmeye başlar.

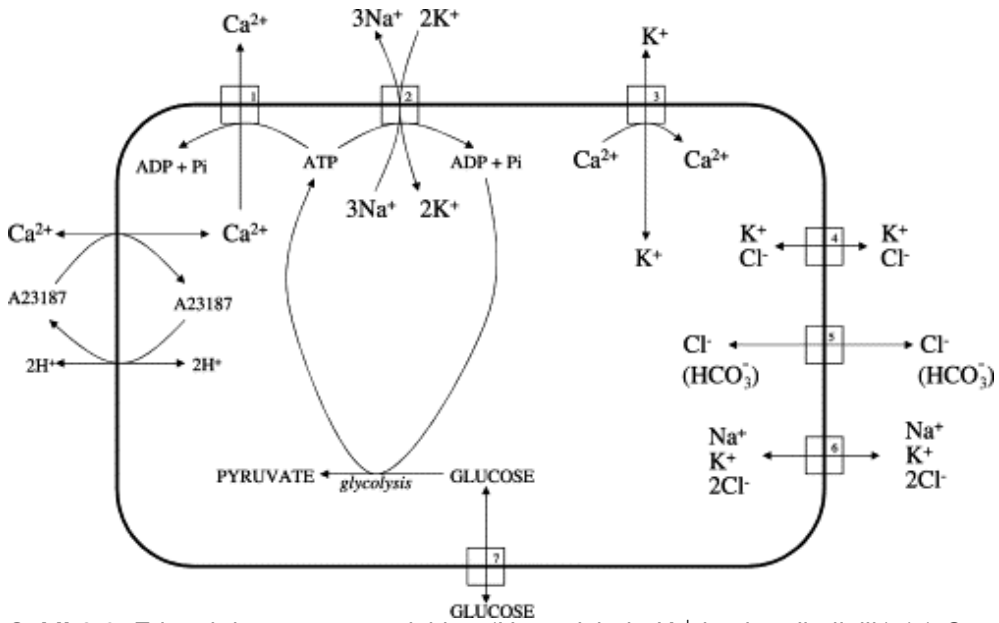
Sub hemolitik kayma geriliminin neden olduğu önemli olaylar arasında, membran permeabilitesinde artış ve membrana bağlı asetilkolinesteraz aktivitesinde düşüş yer almaktadır [55]. Ayrıca subhemolitik kayma gerilimi, plazma proteinlerinin konsantrasyonlarında düşmeye, serum yağ asitlerinde, trigliseridlerinde ve total lipidlerde ise artmaya neden olmaktadır [54, 55]. Sub hemolitik kayma gerilimi, eritrositlerin mekanik özelliklerinde de değişimler meydana getirmektedir [2, 20]. Bunlar arasında eritrosit deformabilitesi ve agregasyonunda görülen değişimler önemli yer tutar. Kan hücrelerini sub hemolitik düzeyde etkileyen yapay kalp ve kalp kapakçığı gibi dolaşıma destek olan cihazların kan viskozitesinde artışa ve eritrosit deformabilitesinde düşüşe neden olduğu uzun zamandır bilinmektedir [2, 56]. Bunun yanında bu araçların hastaların eritrosit agregasyonlarında da artışa neden olduğu Kameneva ve arkadaşları tarafından göstermiştir [2]. Vücuda implante edilen bu cihazların yanında kalp akciğer pompası gibi vücut dışı ortamlarda meydana gelen subhemolitik kayma geriliminin eritrositlerin mekanik özelliklerine olan etkileri de Baskurt ve arkadaşları tarafından çalışılmıştır. Bu çalışmada [20] eritrositler kısa süreli olarak sub hemolitik düzeyde (120 dyn/cm^2) kayma gerilimine maruz bırakılmış ve sub hemolitik kayma geriliminin eritrosit deformabilitesine etkileri incelenmiştir. Çalışmanın bulgularına göre eritrosit deformabilitesi mekanik stresten etkilenmekte ve sub hemolitik kayma gerilimi eritrosit deformabilitesinin önemli düzeyde düşmesine neden olmaktadır [20]. Meydana gelen bu reolojik bozulmanın derecesi ise kayma geriliminin uygulama süresiyle orantılıdır ve uygulama süresi arttıkça eritrositlerin deformabilitelerinde meydana gelen bozulma derecesi de artmaktadır [20].

Eritrositlerin mekanik ve biyokimyasal özelliklerinde görülen değişiklikler, bu hücrelerin mekanik olarak hasarlanmasından ileri gelmektedir. Mekanik stresin yukarıda belirtilen etkileri, mekanik stres sürecinin hücrelerde yaşlanmaya benzer etkiler yarattığını düşündürmektedir. Zira eritrosit yaşlanma sürecinde de eritrositlerin deformabiliteleri düşer, agregasyonları ve mekanik frajiliteleri artar [58].

2.2.4.Subhemolitik Kayma Geriliminin Eritrositlerin Mekanik Özelliklerine Etkileri

2.2.4.1.Sub Hemolitik Kayma Geriliminin Eritrositlerin İyon geçirgenliğine Etkisi

Memelilerin diğer hücrelerinde olduğu gibi, eritrositlerde de hücre hacmini belirleyen temel faktör, hücrenin katyon içeriğidir. Eritrositlerde katyon gradienti başlıca iyon pompaları tarafından düzenlenmektedir. Eritrosit membranında iki önemli pompa bulunur. Bunlar, sodyum-potasyum pompası(Na^+/K^+ ATPaz) ve kalsiyum pompası(Ca^{+2} ATPaz) dir. Na^+/K^+ ATPaz hücrede tek değerlikli katyon içeriğinin belirlenmesinde rol oynayan enzimdir. Bu enzim, hücre içinde yüksek K^+ konsantrasyonlarının korunması amacıyla üç Na^+ iyonunu hücreden çıkarıp yerine 2 K^+ iyonunu alan ve ATP'ye bağımlı olarak çalışan bir pompadır. Ca^{+2} ATPaz ise hücre içinde çift değerlikli katyon içeriğini belirleyen pompadır [20, 59].



Şekil 2.6. Eritrosit iyon taşıma yolları (Hücre içinde K^+ dağılımı ile ilgili.) (1) Ca^{2+} -ATPaz; (2) Na^+ , K^+ -ATPaz; (3) Gardos kanalı; (4) K^+/Cl^- birlikte taşınımı; (5) Band 3 anyon değiştiricisi; (6) $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ birlikte taşınımı; (7) Glukoz taşıyıcısı (Kaynak 59' dan alınmıştır.)

Kayma geriliminin eritrositlere olan etkileri üzerine yapılan ilk çalışmalar, bu kuvvetin eritrositlerin tek değerlikli ve çift değerlikli katyonlara karşı geçirgenliğini arttırdığını göstermiştir [60, 61]. Sub-hemolitik kayma gerilimi, eritrosit membranından iki yönlü ve konsantrasyon-bağımlı bir şekilde iyon geçişini indüklemektedir [12]. Bu iyon geçişleri, hücreden potasyum çıkışı ile hücreye kalsiyum ve sodyum girişini içermektedir. Peitersen ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada eritrositler 130 dyn/cm^2 şiddetindeki kayma kuvvetine, 2 dakika süreyle maruz bırakılmış ve bu sub hemolitik kayma gerilimi sitozolik kalsiyum miktarının %50 artmasına neden olmuştur [12]. Takip eden yıllarda yapılan araştırmalarla kayma gerilimine cevaben eritrositlerde hücreye giren Na^+ ve hücreden çıkan K^+ 'un hemen hemen eşit miktarda olduğu ve hücreden K^+ çıkışının kayma geriliminin 200 dyn/cm^2 seviyesinden itibaren başladığı kanıtlanmıştır [62]. Yukarıda belirtilen ve eritrositlerin Na^+ , K^+ ve Ca^{+2} katyon geçirgenliğinde meydana gelen artışların aksine kayma gerilimi bu hücrelerin anyon değişimini etkilememektedir [63].

2.2.4.2. Subhemolitik Kayma Gerilimi ve Gardoş Kanalları

İnsan eritrositlerinde K^+ un membrandan taşınmasını sağlayan dört farklı yol bulunmaktadır [64-67]. Bunlar

- 1) Na-K ATPaz,
- 2) $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ birlikte taşınımı,
- 3) K^+/Cl^- birlikte taşınımı,
- 4) Ca^{+2} ile aktive olan K^+ kanallarıdır.

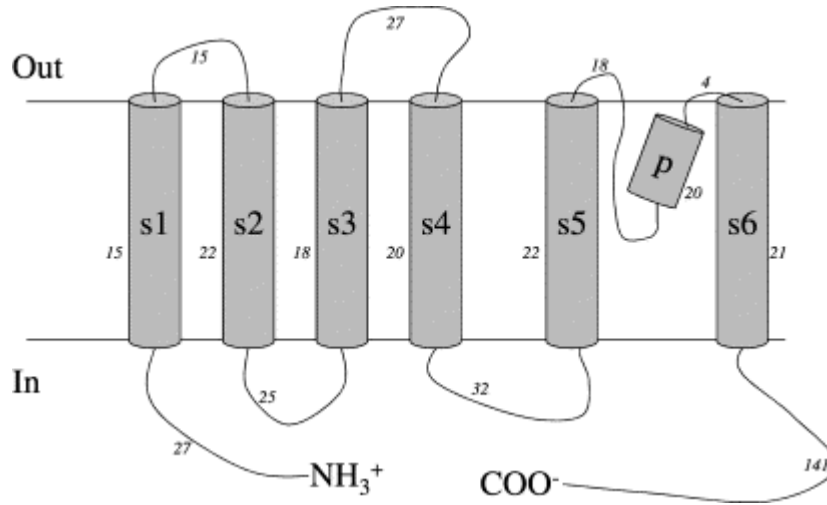
İnsan eritrositlerinde K^+ geçirgenliğinin büyük oranda Ca^{+2} a bağlı olarak arttığı ilk kez 1958 yılında Gardos tarafından belirtilmiştir [59, 68]. Daha sonra yapılan araştırmalar, K^+ a spesifik bir membran proteininin (gardoş kanalı) bu olaydan sorumlu olduğunu kanıtlamıştır [59].

Gardoş kanallarını, yapısal iletkenlikleri, ilaçlara olan duyarlılıkları ve voltaja olan bağımlılıklarına göre sınıflandırmak mümkündür. Buna göre bugüne kadar yüksek, orta ve düşük iletken olmak üzere 3 tip Gardoş kanalı tanımlanmıştır [69, 70].

- 1) Düşük iletken gardoş kanalları(SK): iletkenlikleri 4-14 pS arasında değişir, apamin ile bloke olur ve voltaja duyarlı değildir. Bu kanallar özellikle sinir sisteminde bulunur.
- 2) Orta iletken gardoş kanalları(IK): 11-40pS iletkenliğe sahiptir, voltaj bağımsızdır ve klotrimazol ve diğer imidazol antimikotikleri ile inhibe olurlar. Eritrositlerde, lökositlerde, akciğer ve pankreas daha bir çok dokuda bulunurlar.

- 3) Yüksek iletken gardoş kanalları (BK): 100-250pS arasında yapısal iletkenliğe sahiptir, büyük oranda voltaja bağımlıdır ve başlıca kas ve sinir hücrelerinde bulunur.

Gardoş kanalı, 427 amino asitten oluşan ve moleküler ağırlığı 47.8 kDa olan bir iyon kanalıdır. Bu kanalın 6 transmembran motifi bulunan bir homotetramer olduğu düşünülmektedir. Yapısında bulunan s5-s6 motifleri arasında kalan bölgede bir çukur bulunmaktadır. Bu kanalların K^+ a olan duyarlılıkları, karbonil oksijen atomlarından kaynaklanmaktadır. Bu protein, 4 subüniteden oluşur, her subünite bir α heliks ve K^+ iletkenlik düzenleyicisi içermektedir. [71-73].



Şekil 2.7. Gardoş kanalının monomerik alt ünitesinin yapısı. s1-s6 bölgeleri, 6 transmembran domeini, p s5-s6 motifleri arasında yer alan çukur alan. İtalik olarak belirtilen numaralar, belirtilen bölgede yer alan aminoasit sayısı. (Kaynak 59'dan alınmıştır.)

Gardoş kanalları, fizyolojik Ca^{+2} konsantrasyonu olan 20–50 nM seviyelerinde inaktiftir. Bu kanalların aktivasyonu ise hücre içinde kalsiyumun artmasına neden olan patolojik ya da deneysel koşullarda gerçekleşir. Mekanik stres de hücre içinde içinde Ca^{+2} artışına neden olmakta ve gardoş kanallarının aktive olmasına neden olduğu düşünülmektedir. Eritositlerde Gardoş kanallarının aktivasyonu için gereken minimum Ca^{+2} seviyesinin yaklaşık olarak 150nM olduğu bildirilmiştir [74, 75].

Hücre içindeki Ca^{+2} konsantrasyonunun artması ile aktive olan Gardoş kanalları, hızlı bir şekilde hücreden K^+ çıkışına neden olur. K^+ konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda Gardoş kanalının aktivasyonu, hücreyi çok hızlı bir şekilde hiperpolarize ederek, voltaj bağımlı yollarla hücreden Cl^- ya da HCO_3^- iyonlarının taşınımı için uygun bir gradient oluşturur. K^+ , Cl^- ve HCO_3^- in hücreden çıkışı, aynı zamanda osmotik olarak hücreden su çıkışına neden olarak hücre dehidrasyonuna sebep olur [76]. Ca^{+2} 'un, Gardoş kanalı üzerindeki etkisi çeşitli faktörlerle değişmektedir. Pellegrino ve Pellegrini yaptıkları çalışmayla, Gardoş kanallarının Ca^{+2} 'a

olan duyarlılığının endojen protein kinaz A tarafından düzenlendiğini göstermişlerdir [67]. Hücre içindeki etkisini PKA aracılığı ile gösteren paratiroid hormon ve prostaglandin E2 (PGE₂) de hücre içinde Ca⁺² artışına neden olarak Gardoş kanalının aktivasyonunu sağlamaktadır [77]. Mekanik stresin eritrositlere etkisini araştıran Oonishi ve arkadaşları 1998 yılında yaptıkları bir araştırma sonunda, mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerde de PGE1 ve PGE2 üretiminin arttığını belirtmişlerdir [78]. Bu araştırmalar, mekanik stresin de eritrosit gardoş kanalını aktive ettiğini göstermektedir.

2.2.4.3. Subhemolitik Kayma Gerilimi ve Ca⁺²'a Bağlı Mekanizmalar

Hücre membranının mekanik olarak hasarlanması, hücrelerde gerime duyarlı iyon kanallarının aktivasyonunu yoluyla iyon akımlarının başlamasına neden olur. Yakın geçmişte yapılan çalışmalar, kayma geriliminin insan eritrositlerinde de gerime duyarlı-Ca⁺²'a geçirgen katyon kanallarının açılmasını sağlayarak hücreye Ca⁺² girişine neden olduğunu göstermiştir [79].

Mekanik stres ile aktive olan katyon kanallarından hücreye giren kalsiyum, hücre içinde düzenleyici mekanizmalarda görev alan çeşitli proteinleri aktive etmektedir. Bu proteinler arasında kalmodulin, Ca⁺²/kalmodulin bağlı protein kinaz, fosfolipaz C (PLC) ve protein kinaz C (PKC) yer almaktadır. Ca⁺², bu proteinler arasından özellikle kalmoduline bağlanmak yoluyla hücre membranının yapısal ve mekanik özelliklerinin düzenlenmesinde önemli roller üstlenir. Ca⁺² ve kalmodülün etkilerini başlıca eritrosit membranında bulunan kalsiyum pompası ve spektrin üzerinde gösterir [80-83].

Eritrosit yaşlanması, gerime duyarlı-Ca⁺²'a geçirgen katyon kanallarının aktivitesinde artış meydana getirirken hücreden Ca⁺² çıkışını sağlayan Ca⁺² pompasının aktivitesinde düşüşe neden olmaktadır [79]. Çekirdek taşıyan hücrelerde programlı hücre ölümü sürecinin tipik belirteçleri, hücre büzülmesi, membran katlanması ve fosfatidilserin asimetrisinin bozulmasıdır. Bu durumlar aynı zamanda Ca⁺² iyonoforu iyonominin ile muamele edilerek hücre içi Ca⁺² seviyeleri artırılan eritrositlerde de görülmektedir [84-86]. Son zamanlarda eritrositlerde programlı hücre ölümünün başlaması için gerekli temel sinyalin non-selektif katyon kanallarından Ca⁺² girişinin olduğu belirtilmektedir [87]. Ayrıca hücre içine Ca⁺² girişi, negatif yüklü membran fosfolipitlerinin lipid tabaka içinde taşınmasını sağlayan bir proteini (scramblase) aktive eder. Bu aktivasyon, fosfatidilserinin membranın iç yüzünden dış yüzüne taşınmasını sağlar. Hücre membranının dış yüzeyine yerleşen fosfatidilserin, fagositik hücrelerin eritrositleri tanımasını kolaylaştırarak bu hücrelerin dolaşımdan uzaklaşmasına neden olmaktadır. Mekanik stres de etkisini, gerime duyarlı katyon kanallarının aktivasyonu ile hücreye Ca⁺² girişine neden olarak

yapmaktadır. Bu şekilde Gardoş kanalları aktive olmakta ve hücre dehidrasyonu ve büzülmesi meydana gelmektedir [61, 88, 89].

Membranın mekanik olarak hasarlanması ve Ca^{+2} a geçirgen kanalların açılmasına bağlı olarak hücre içine ani Ca^{+2} girişi, sadece yukarıda bahsedilen proapoptotik mekanizmayı stimüle etmez; bunun yanında aktomiyosin II kompleksinin oluşumu ile hücre iskeletinin lokal olarak tamirinin başlamasına da neden olur [90]. Ayrıca eritrosit membran proteini olan spektrin de mekanik stresin hasar verici etkilerine karşı eritrosit bütünlüğünün korunmasında önemli bir rol üstlendiği düşünülmektedir [91].

2.2.4.4. Subhemolitik Kayma Gerilimi ve NO

Günümüzde NO'nun kardiyovasküler sistem, santral sinir sisemi, immün sistem, gastrointestinal sistem başta olmak üzere bir çok organ sisteminde önemli fizyolojik düzenleyici rolleri olduğu bilinmektedir [92-97]. NO, kardiyovasküler sistemde myokard kontraktilitesinin, trombosit agregasyonunun, damar tonüsünün ve periferik rezistansın düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir. Bunlara ek olarak NO, damar düz kas proliferasyonunun inhibe edilmesinde sağlar [92, 95, 98-101]. Santral sinir sisteminde öğrenme, hafıza, ağrı, uyku ve beslenmeyi içeren önemli fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesine aracılık eder [92, 93, 98, 102].

Dolaşım sisteminde, endotel hücreleri ve makrofaj gibi hücrelerin yanı sıra eritrositler de NO sentezleyebilecek sistemlere sahiptir [17, 18, 102, 103]. Bu konuda yapılan ilk çalışmalardan biri, Jubelin ve arkadaşlarına aittir. Bu çalışmada NOS izoenzimleri olan eNOS ve iNOS'un eritrositlerde de bulunduğu gösterilmiştir [18]. Ancak Kang ve arkadaşları yetişkin insan eritrositlerden elde edilen iNOS ve eNOS izoformlarının her ikisinin de katalitik aktivitesinin olmadığını göstermişlerdir [104]. Günümüze değin yapılan bu çalışmalar, eritrositlerde NOS varlığını kanıtlamış ancak NOS aktivitesini ve eritrositlerden NOS'a bağlı olarak salınan NO ürünlerini belirleyememiştir. Bu konuyla ilgili yapılan son araştırmada (Kelm ve arkadaşları) [105], kanın kendi elemanlarından köken alan NO'nun hemen hemen tamamının eritrositlerden sentezlendiği gösterilmiştir. Bu çalışmalarla, eritrosit fonksiyonu için NOS'un önemli olduğu vurgulanmıştır. Böylece eritrositlerde bulunan NOS'un bu hücrelerin sadece olgunlaşma süresinde görev aldığı ve olgun eritrositte fonksiyonel olmayan bir protein olduğu görüşü ortadan kalkmıştır. Elektron mikroskop ve immunogold işaretleme teknikleri kullanılarak yapılan incelemeler, NOS'un eritrositlerde, sitosolde ve membranın iç yüzeyinde lokalize olduğunu gösterilmiştir [105].

Son yıllarda yapılan bir çalışmada eritrositlerde NO/cGMP/PKG yolağının bir sonraki basamağı olan çözünebilir guanilat siklazın mevcut olduğu kanıtlanmıştır [20, 106]. Bu nedenle eritrositlerde bulunan NOS'un da başlıca guanilat siklaz üzerinden etki ettiği düşünülmektedir. NO, eritrosit

membranından iyon taşınmasını büyük ölçüde etkilemektedir Bununla ilgili olarak, insan eritrositlerinde Na/H değişimini ve koyun eritrositlerinde K-CL birlikte taşınımını aktive ettiği gösterilmiştir [107, 108]. Her iki durumda da cGMP bağımlı yollar kullanılmaktadır. Ayrıca NO donörleri ile tetiklenen eritrositlerde Na-K-ATPaz ve Ca ATPaz aktivitesi de artmaktadır [109].

Literatüre göre NO'nun normal eritrosit fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rolleri vardır [14, 15, 110, 111]. Baskurt ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada NO'nun eritrosit mekanik özellikleri üzerine düzenleyici bir rolü olduğunu tesbit etmişlerdir [15]. Bu çalışmanın bulgularına göre, normal eritrosit deformabilitesinin sağlanmasında ve sürdürülmesinde NO'nun belirli konsantrasyonlarda bulunması esastır. NO'nun bu konsantrasyonun üzerinde bulunması ise, eritrosit mekanik davranışını olumsuz yönde etkilemektedir [15]. Bu doza bağımlı düzenleyici etkinin büyük olasılıkla guanilat siklazdan bağımsız mekanizmalar aracılığı ile olduğu düşünülmektedir. NO'nun eritrosit deformabilitesini düzenlerken kullandığı hücre içi yollar tam olarak aydınlatılamamış olsa da NO'nun etkilerini K⁺ kanalları üzerinden gerçekleştirdiğine dair kanıtlar bulunmuştur. NO, eritrosit membranından K⁺ çıkışıını inhibe etmekte ve bu yolla eritrosit deformabilitesi üzerine düzenleyici etkisini göstermektedir [15]. NO'nun eritrosit mekanik özelliklerinde belirtilen düzenleyici etkilerinin olması, eritrositler üzerinde olumsuz etki gösterdiği bilinen mekanik stres uygulamalarında da etkilerinin araştırılmasına zemin hazırlamıştır. Yapılan çalışmalar, NO'nun mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerde koruyucu bir etki gösterdiğini kanıtlamıştır [20]. Mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerde NO sentezinin inhibe edilmesi, eritrosit deformabilitesinde ek bir bozulmaya neden olmamıştır. Bu sonuçlar, eritrosit stoplazmasında NO miktarını azaltan NOS inhibitörleri ile mekanik stresin hücre içinde aynı hedef üzerinden etki gösterdiği anlamına gelmektedir (eritrosit membranından K⁺ çıkışı). Zira K⁺ kanal blokörü uygulaması, eritrositlerde mekanik strese bağlı olarak gelişen hasarlanmalara karşı tamamen koruyucu bir etki göstermektedir [20].

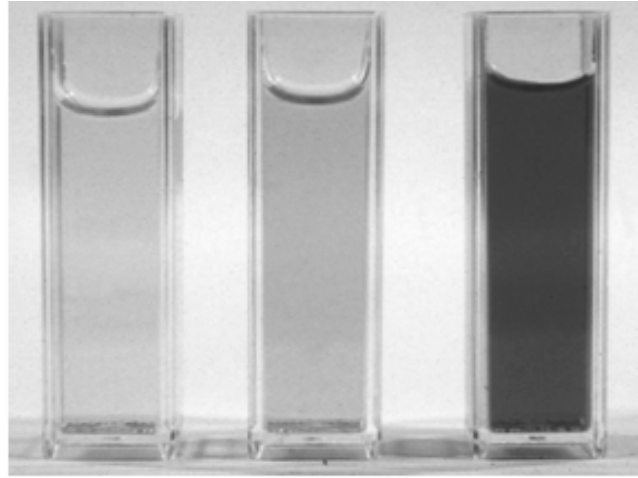
2.2.5. Vücut Dışı Dolaşımda Hemoliz ve Hemolitik Travma

Hemolitik travmanın en önemli sonucu, mekanik hemolizdir. Mekanik hemoliz, eritrosit membranının, hücrenin tolere edebileceğinden büyük mekanik kuvvetlerin etkisiyle parçalanması sonucu eritrosit içeriğinin serbest kalmasıdır [10]. Meydana gelen hemolizin seviyesini belirleyen başlıca faktör ise, eritrositlerden plazmaya serbest bırakılan hemoglobinin plazma konsantrasyonudur.

Vücut dışı dolaşım alanlarında gerçekleşen hemoliz, mekanik ve biyokimyasal faktörleri içeren birçok nedenle ortaya çıkmaktadır. Bu nedenler arasında yüksek kayma gerilimi, türbülans, kanın yabancı yüzeylere uzun süreli olarak temas etmesi ve kanın bu yüzeylere çarpması yer almaktadır.

Vücut dışı dolaşım alanlarının kullanıldığı kardiyopulmoner bypass ve hemodiyaliz işlemlerinde meydana gelen hemoliz derecesi geniş olarak çalışılmıştır. Yapılan çalışmalarda, işlem başlangıçlarında ve işlem sonlarında hemoliz değerlendirmeleri yapılmış (Şekil 2.8.) ve bu işlemlerin hemolize neden oldukları gösterilmiştir [53].

Vücut dışı dolaşım sırasında meydana gelen hemoliz, eritrositlerden plazmaya hemoglobin salınmasına neden olmaktadır. Karaciğer ve böbrekler, plazmada serbest olarak bulunan hemoglobini dolaşımdan sürekli olarak uzaklaştırır. Ancak, yüksek seviyelerde hemolizin meydana geldiği durumlarda vücudun hemoglobini uzaklaştırma kapasitesi yetersiz kalır ve dolaşımdaki serbest hemoglobin miktarı büyük oranda artar [112].



Şekil 2.8. Kardiyopulmoner bypass başlangıcında (solda), ortasında (ortada) ve sonunda (sağda) hastadan alınan kan örneklerinin plazması. Sağdaki numune kardiyopulmoner baypas işleminin sonunda rezervuardan alınmıştır. (Kaynak 53'den alınmıştır).

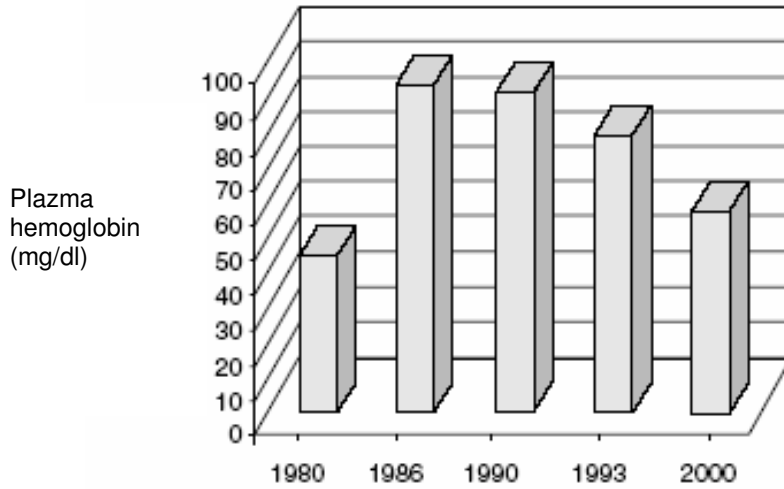
Plazmada serbest hemoglobinin artması, bir çok fizyolojik fonksiyonu olumsuz yönde etkilemekte ve yaşamı tehdit eden durumların oluşmasına neden olabilmektedir. Plazmada bulunan serbest hemoglobin, nitrik oksite yüksek afinite gösterir. Hemoglobin, nitrik okside yüksek afinite ile bağlanarak dolaşımdaki NO seviyesinin ciddi oranlarda azalmasına neden olur. Dolaşımda NO seviyesinin azalması ise damarlarda güçlü bir şekilde vazokonstriksiyon gelişmesine neden olarak kardiyovasküler sistem üzerinde önemli zararlı etkiler oluşturur [113]. Bu etkiler arasında tromboembolizm, renal hasar ve nörolojik disfonksiyon gibi dolaşım sistemini ciddi şekilde etkileyen komplikasyonlar yer almaktadır [114].

Kardiyopulmoner bypass işlemi boyunca meydana gelen hemolizin nedenleri 1969 yılında Converse Peirce tarafından tanımlanmıştır [53, 115]. Buna göre nedenler şu şeklide sıralanabilir.

- 1) Pompanın hareketi
- 2) Sistemde bulunan boru ve kanüllerin ani boyut değişikliklerinden kaynaklanan kayma kuvvetleri
- 3) Oksijenatörlerde meydana gelen yüzey gerilimi
- 4) Yüksek akım hızlarında oluşan türbülans akımları.

Son 20 yıl boyunca açık kalp ameliyatlarında ölçülen plazma hemoglobin konsantrasyonları, 1980-1986 yılları arasında görülen ve kullanılan kanül çapları ve pompa hızlarına bağlı olarak meydana geldiği düşünülen bir artışın dışında hemolizin bugüne kadar kademeli olarak azaldığını göstermektedir [53]. (Şekil 2.9.) Bu azalma, CPB sisteminde hemolizin ana nedeni olan ve kanın aspire edilmesini ve bu kanın tekrar sisteme kazandırılmasını sağlayan emici bir sistem olan 'cardiotomy suction' sisteminde kullanılan kanül boyutlarının değiştirilmesi ve pompa hızının dikkatli bir şekilde ayarlanması olduğu düşünülmektedir [53].

Ancak yine de bugüne kadar kan hasarının mekanizması ve tolere edilebilen gerim yükleri tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Bu nedenle fizyolojik akım koşullarına uygun olarak çalışan ve hemolize neden olmayan yapay sistem tasarımları mevcut değildir [116].



Şekil 2.9. Açık kalp ameliyatlarında uygulanan kardiyopulmoner bypass işlemi sırasında plazmaya salınan hemoglobin miktarı. 1980-1986 yılları arasında plazma hemoglobin konsantrasyonlarındaki artışın ardından hemoliz giderek azalmıştır. (Kaynak 53 'den alınmıştır.)

2.3. Hipotez

Kan hücreleri, yapay organlarda ve yapay dolaşımın sağlandığı vücut dışı dolaşımında sürekli olarak mekanik kuvvetlerin etkisi altındadır. Bu mekanik kuvvetler, kan hücrelerini subhemolitik yada hemolitik düzeyde etkilemektedirler. Literatürde subhemolitik mekanik kuvvetlerin kan

hücrelerine etkileri ve etki mekanizmaları üzerine yapılan araştırmalar mevcuttur [2, 20, 116, 117]. Bunun yanında, özellikle klinik uygulamalarda önemli yeri olan vücut dışı dolaşım alanlarının neden olduğu hemolitik travma ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır. Ancak vücut dışı dolaşım alanlarında meydana gelen mekanik hücre travmalarının önüne geçilememiş ve bu durum tehlikeli komplikasyonların gelişimine neden olmuştur [116]. Bu nedenle vücut dışı dolaşım alanlarında hemolize neden olan hemolitik travmanın anlaşılması ve etkilerinin önlenmesi büyük önem taşımaktadır.

Subhemolitik kayma geriliminin eritrositlere olan etkilerini inceleyen araştırmalarda subhemolitik kayma geriliminin eritrosit deformabilitesini önemli derecede düşürdüğu ve NO'nun meydana gelen bu mekanik bozulmayı önlediği ileri sürülmüştür [20]. NO'ya benzer şekilde non-selektif potasyum kanal blokeri olan Tetra Etil Amonyum (TEA)'nın da eritrositleri bu mekanik hasardan koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır [20]. Bu bulgular, NO'nun belirtilen koruyucu etkilerini, eritrositlerde mekanik stresin neden olduğu K⁺ çıkışını inhibe etmek suretiyle gösterdiğini düşündürmektedir. Bahsedilen bulgulardan yola çıkarak NO 'nun subhemolitik stres uygulamalarındaki koruyucu etkilerinin hemolitik strese maruz bırakılan eritrositlerde de gözlenebileceği düşünölmüş ve bu çalışma planlanmıştır. Bu çalışma, hemolitik strese maruz kalan eritrositlerde nitrik oksidin ve potasyum iletkenliğinin azaltılmasının eritrositleri mekanik travmaya karşı koruduğu hipotezini test etmek amacıyla planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kan Örneklerinin Hazırlanması

Çalışma, 24–53 yaş arası 10 gönüllü erkek bireylerden alınan kan örnekleri kullanılarak yapıldı. Deneklerin ön kol venlerinden etilendiamintetraasetik asit (EDTA)' lı (1.5 mg/dl) tüplere alınan kan örnekleri, dakikada 2700 devirde beş dakika boyunca santrifüj edilip plazmaları ayrıldı. Plazması ayrılan örnekler, izotonik fosfat tamponu (PBS) ile üç kez yıkandı ve elde edilen eritrosit paketi hematokriti 0.40 L/L olacak şekilde otolog plazma ile resuspanse edildi.

3.2. Deneş Protokolü

Hematokriti ayarlanmış her örnek beş eşit bölüme ayrıldı. Bu örnekler aşağıdaki gibi muamele edildi:

1. Kontrol
2. Mekanik stres (MS)
3. Mekanik stres (MS) + Sodyumnitroprussid (SNP)
4. Mekanik stres (MS) + Tetraetilamonyum klorür (TEA)
5. Mekanik stres (MS) + Klotrimazol (CLT)

Kontrol ve mekanik stres gruplarına herhangi bir kimyasal madde eklenmedi. Diğer gruplar, oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 10^{-4} M SNP, 10^{-7} M TEA, 3×10^{-5} M CLT ile oda sıcaklığında bir saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben mekanik stres gruplarındaki kan örnekleri, aşağıda (bölüm 3.3.) tanımlanan mekanik stres düzeneğinde, 37 °C'de yarım saat süreyle 162 dyn/cm^2 kayma gerilimine maruz bırakıldı.

Yukarıda belirtilen şekilde mekanik strese maruz bırakılan mekanik stres gruplarına ve kontrol grubuna ait kan örneklerinde hemoliz oranı ve eritrosit deformabilitesi ölçüldü, tam kan sayımı yapıldı ve eritrosit morfolojisi değerlendirildi.

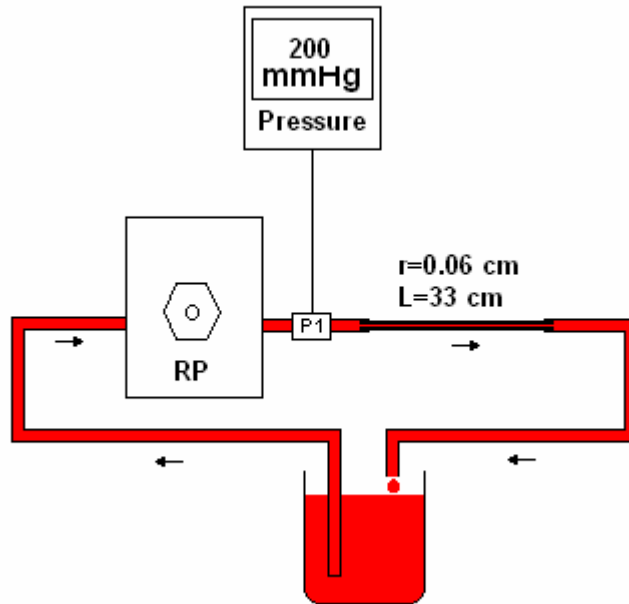
NO donörü SNP, (10^{-4} M) izotonik fosfat tamponunda, non spesifik potasyum kanal blokörü TEA, (10^{-7} M) distile suda, spesifik potasyum kanalı blokörü klotrimazol (3×10^{-5} M) ise etilen içinde çözüldü.

3.2.1.Mekanik Stres Uygulaması

Kan örnekleri, Şekil 3.1’de şematik olarak gösterilen bir mekanik stres düzeneği içinde kontrollü olarak mekanik stres altında bırakılması amaçlandı. Bu mekanik stres düzeneği, kanın belirli bir akım ve basınç altında kapiller bir borudan geçmesini sağlamaktadır. Bu amaçla, bir kan haznesi, hazneden pompaya giden plastik bir kanal, kanın sistem içine itilmesini sağlayan bir pompa, bir adet basınç ölçer ve cam kapiller boru kullanılmıştır. Kapiller borudan geçen kanın akım hızı, basıncı 200 mmHg da sabit tutacak şekilde pompa aracılığı ile ayarlanmıştır. Bu şekilde kan, belirli bir basınç altında çapı 0,06 cm, uzunluğu 33 cm olan kapiller bir borudan geçirilmiştir. Bu koşullar altında kapiller boruda oluşacak kayma kuvveti (S.S.), Q akım hızı, μ viskozite, r kapiller borunun yarıçapı ve π sabit sayı olmak üzere, aşağıdaki eşitlikle hesaplanabilir.

$$S.S.= 4\mu Q / \pi r^3 \quad (1)$$

Bu eşitlikte yer alan parametreler şöyledir: Kapiller borunun yarıçapı 0,03 cm, kanın düzenekten geçerken akım hızı 48,6 cm/sec, kanın viskozitesi ise 0,05 poise. Bu koşullar altında yukarıda belirtilen eşitlikle hesaplanan kayma gerilimi, 162 dyn/cm² dir.



Şekil 3.1. Mekanik stres düzeneği (RP: pompa, P1: Basınç transdüresi)

3.2.2. Hemoliz Oranının Saptanması

Hemoliz oranlarının saptanması amacıyla, kan örneklerinin hem tam kan hem de plazma hemoglobin konsantrasyonları ölçüldü. Plazma hemoglobin konsantrasyonlarının ölçülmesi için, mekanik stres düzeneğinden alınan kan örnekleri dakikada 2500 devirde beş dakika boyunca santrifüj edildi ve plazmaları ayrıldı. Bu plazmanın 200 µl si 800 µl drabkin çözeltisi (1,13 mM KH₂PO₄, 0,6 mM Potasyum fersiyamid 0,8 mM Potasyum siyanid, 500ml %30 Triton X-100 VE 1100 ml distile su) ile karıştırılıp karanlık bir ortamda 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra absorbans değeri spektrofotometrede 546 nm'de okundu. Okunan absorbans değeri, daha önceden belirlenen ve hemoglobin konsantrasyonlarına karşı gelen absorbans değerlerine göre çizilen standart grafikte yerine konuldu. Bu şekilde absorbans değerine karşılık gelen konsantrasyon miktarı hesaplandı. Tam kan hemoglobin konsantrasyonlarının ölçümü için de mekanik stres düzeneğinden alınan kan örneklerinin 50 µl si ile 2.5 ml drabkin çözeltisi karıştırıldı ve tam kan hemoglobin konsantrasyonları, plazma hemoglobin ölçümünde olduğu gibi daha önceden çizilmiş standart grafiğe göre değerlendirildi. Hemoliz oranı da her örnek için ölçülen tam kan ve plazma hemoglobin konsantrasyonları oranlanarak hesaplandı.

3.2.3. Eritrosit Deformabilitesinin Değerlendirilmesi

Eritrosit deformabilitesi bir ektasitometre (LORRCA, RR Mechatronics, Hoorn, The Netherlands) kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi [118]. Eritrositler, izotonik fosfat tamponu içinde yoğunluğu %5, viskozitesi 23 olacak şekilde hazırlanmış polivinyl-pyrrolidone (PVP-360) (Sigma, St. Louis, MO, USA) çözeltisi içinde yaklaşık 1/200 dilüsyonda süspansiyon haline getirildi. Bu süspansiyonun yaklaşık bir mililitresi aralarında 0,3 mm boşluk kalacak şekilde birbirine uyan iki cam silindirden oluşan bir viskometre sistemine yerleştirildi. İki cam silindirin arasındaki boşluğa doldurulan süspansiyon, dıştaki cam silindirin sistemi kontrol eden bilgisayar tarafından, uygun kayma kuvvetlerini oluşturmak üzere hesaplanan bir hızda döndürülmesiyle, bu kuvvetlerin etkisi altında bırakıldı. Belirlenen aralıktaki kayma kuvvetlerini oluşturacak dönme hızları bilgisayar tarafından izotonik fosfat tamponu-PVP çözeltisinin viskozitesi de dikkate alınarak hesaplandı. Bu sırada sabit silindirin içinde yer alan bir lazer kaynağından çıkan ışın, eritrosit süspansiyonuna ulaşmakta ve sonra bir ekran üzerine yansıyan difraksiyon paterni, süspansiyondaki eritrositlerin şeklini ve dönme hareketinin yarattığı akıma orientasyonlarını yansıtmaktadır. Artan kayma kuvvetlerine paralel olarak, eritrositler normal şekilleri olan bikonkav disk formundan elipsoid forma dönüşmektedir. Bu dönüşümün derecesi ise eritrositlerin şekil değiştirme yetenekleri (deformabilitesi) ile doğru orantılıdır. Bundan yola çıkarak elipsoid difraksiyon paterninin uzun (A) ve kısa eksenlerinin (B) uzunluklarının bilgisayar tarafından saptanmasıyla $EI=A-B/A+B$ şeklinde elongasyon indeksi (EI) hesaplandı. Ölçümler 37 °C de yapıldı. EI değerleri dokuz kayma kuvveti

arasında (0.3-30 Pa) ölçüldü. Bu değerler kullanılarak her örnek için maksimum elongasyon indeksinin yarısı kadar şekil değiştirmeye neden olan kayma kuvveti (SS1/2) Lineweaver- Burke analizi kullanılarak hesaplandı [119].

3.2.4. Tam Kan Sayımı

Kan örneklerinde eritrosit sayısı (ES), hemoglobin (Hb), hematokrit (Hct), ortalama eritrosit hacmi (OEH) ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (OEHK), elektronik bir hematoloji analizörü (Micros, ABX Co., Fransa) kullanılarak saptandı.

3.2.5. Eritrosit Morfolojisinin Değerlendirilmesi

Kan örnekleri 1/10 oranında otolog plazma ile sulandırılarak, Olympus BX 50 markalı ışık mikroskopunda morfolojik olarak incelendi.

3.3. Diğer Yöntemler

Viskozite ölçümleri, mekanik stres düzeneğinde meydana gelen kayma kuvvetini hesaplamak amacı ile örneklerin bir kısmında gerçekleştirildi. Ölçümler bir rotasyonel viskometre ile (Brookfield DV- II Viscometer), 37°C de, 37.5, 75.0, 150, 375, 750 ve 1500 s⁻¹ kayma hızlarında yapıldı.

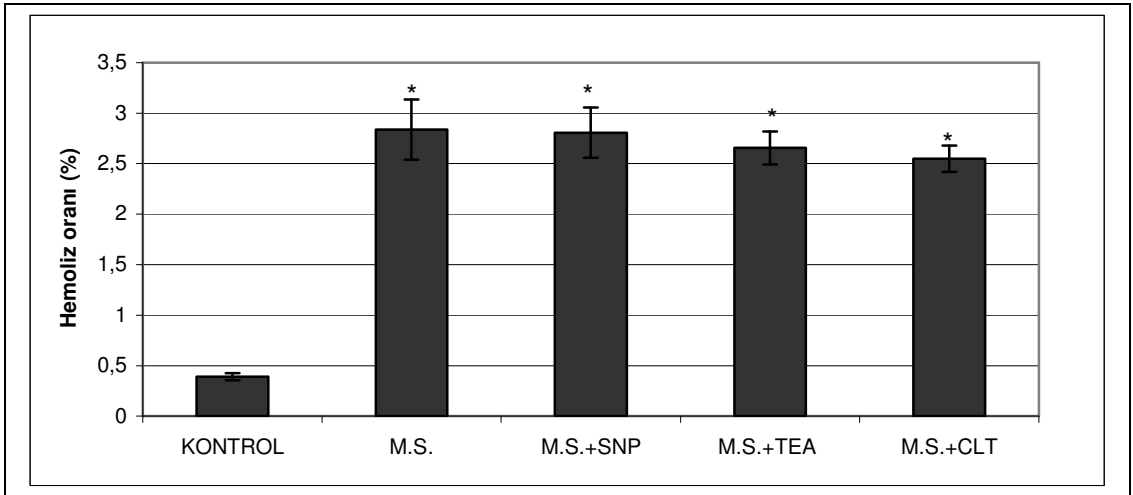
3.4. İstatistiksel Değerlendirmeler

Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verildi. Değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında tek yönlü varyans analizi kullanıldı. İstatistiksel olarak önemli bulunan değişkenler için grupların ikili karşılaştırmalarında Newman Keuls post hoc testi kullanıldı.

BULGULAR

4.1. Mekanik Stresin Hemolitik Etkisi

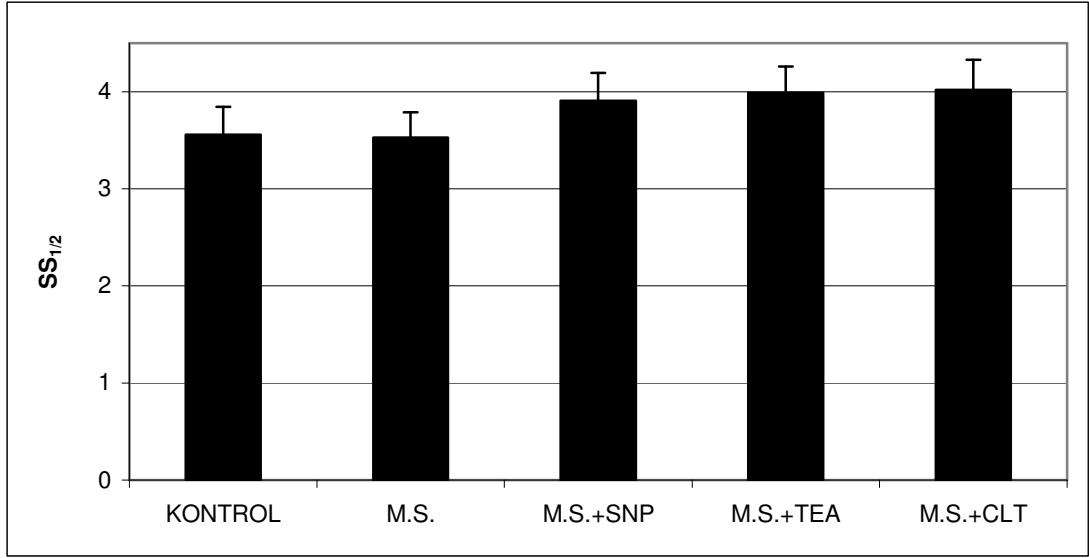
Kontrol ve mekanik stres gruplarında ölçülen mekanik hemoliz oranı, şekil 4.1 de gösterilmiştir. Mekanik stres grubunda stres uygulamasını takiben ölçülen hemoliz oranı, mekanik stres uygulanmayan gruba kıyasla yaklaşık olarak 3 kat artmıştır. Benzer şekilde, MS+SNP, MS+TEA ve MS+CLT gruplarında mekanik stres uygulamasının ardından ölçülen mekanik hemoliz oranı da kontrole göre istatistiksel olarak önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Ancak kimyasal ajan ile muamele edilmiş mekanik stres grupları olan MS+SNP, MS+TEA ve MS+CLT grupları ile M.S. grubu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır.



Şekil.4.1.Kontrol ve mekanik stres gruplarına ait hemoliz oranı değerleri. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. (n=10) , *: $p < 0.001$, kontrol grubundan fark. M.S.+SNP, M.S.+TEA ve M.S.+CLT gruplarının mekanik stres grubundan istatistiksel olarak önemli bir farkı yoktur. ($p > 0.05$)

4.2. Mekanik Stres Uygulamasının Eritrosit Deformabilitesine Etkisi

$SS_{1/2}$ değerlerindeki değişiklikler şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Mekanik stres uygulamasından önce ve sonra yapılan eritrosit deformabilite ölçümlerinde mekanik stres eritrosit deformabilitesini kontrole göre önemli ölçüde değiştirmemiştir. Bunun yanında MS+SNP, MS+TEA ve MS+CLT gruplarında gerçekleştirilen deformabilite ölçümlerinin kontrol grubundan farkı önemli değildir.



Şekil 4.2. Kontrol ve mekanik stres gruplarına ait eritrositlerde maksimum elongasyon indeksinin yarısı kadar şekil değiştirmeye neden olan kayma kuvveti ($SS_{1/2}$) değerleri. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. (n=10)

4.3. Tam Kan Sayımı

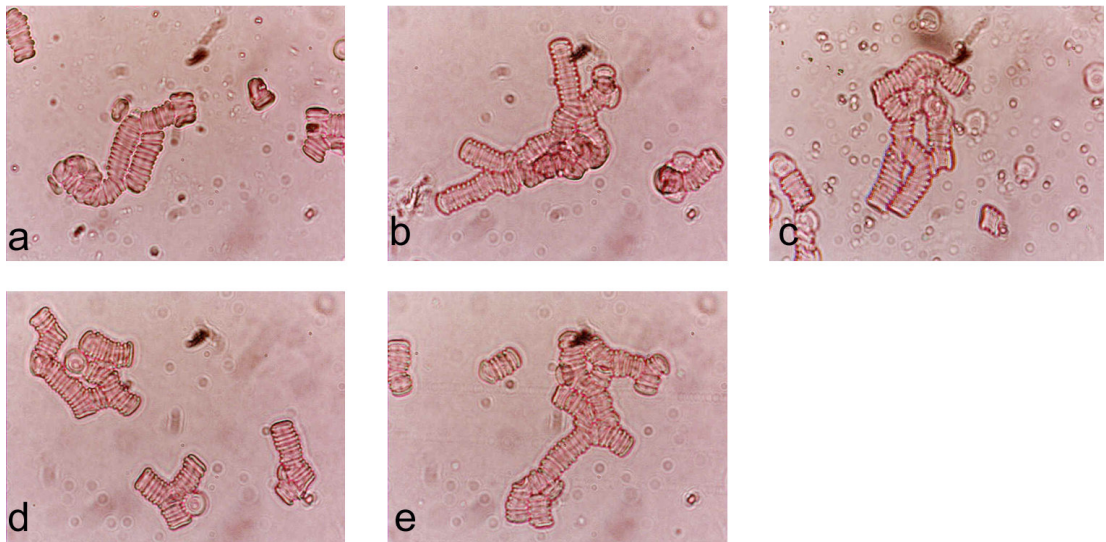
Kontrol ve mekanik stres uygulanan gruplara ait tam kan sayımı çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Yarım saat süreyle 37 °C de yapılan mekanik stres uygulaması, kırmızı kan hücresi sayısı ve hematokrit (Htc) değerini kontrole göre önemli düzeyde düşürmüştür. Bunun yanında NO donörü SNP ($10^{-4}M$), non-spesifik K^+ kanal blokörü tetraetilamonyum klorür TEA ($10^{-7}M$) ve spesifik K^+ kanal blokörü klotrimazol ($3 \times 10^{-5}M$) ile inkübe edilen gruplarda da mekanik stres grubundan bir fark saptanmamıştır. Ayrıca mekanik stresin tek başına veya kimyasal ajanlar ile birlikte uygulanması ortalama eritrosit hacmi ve ortalama eritrosit konsantrasyonunda kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir değişikliğe neden olmamıştır.

Tablo.4.1. Kontrol ve mekanik stres gruplarına ait hematolojik parametreler. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. OEH, ortalama eritrosit hacmi, OEHK, ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu. (n=10) , *: p< 0.01, kontrol grubundan fark. Mekanik stres grubu ile kimyasal ajan kullanılan gruplar arasında önemli bir fark yoktur. (p>0.05)

	Kontrol	M.S.	M.S.+SNP	M.S.+TEA	M.S.+CLT
Eritrosit ($10^{12}/L$)	4.851 \pm 0.065	4.393 \pm 0.071*	4.414 \pm 0.056*	4.421 \pm 0.081*	4.433 \pm 0.088*
Hematokrit (l/l)	0.420 \pm 0.712	0.381 \pm 0.736*	0.385 \pm 0.844*	0.384 \pm 0.833*	0.382 \pm 0.552*
OEH (fl)	87.56 \pm 0.973	87.22 \pm 0.96	87.00 \pm 0.9428	87.22 \pm 0.8784	87.11 \pm 0.9782
OEHK (g/dl)	392.9 \pm 1.722	393.3 \pm 1.764	395.7 \pm 1.726	394.6 \pm 1.811	394.7 \pm 1.709

4.4. Mekanik Stres Uygulamasının Eritrosit Morfolojisine Etkisi

Mekanik stres uygulamasından sonra kontrol ve mekanik stres gruplarına ait kan örneklerinde yapılan morfolojik incelemeler şekil 4.3.de gösterilmiştir. Işık mikroskobu ile yapılan bu incelemelerde, kontrol ve mekanik stres grupları morfolojik olarak farklılık göstermemektedir.



Şekil 4.3. Kontrol ve mekanik stres gruplarına ait örneklerde, rulo formasyonu gösteren eritrositler. a) Kontrol, b)M.S., c) M.S.+SNP, d) M.S.+TEA, e) M.S.+ CLT

TARTIŞMA

Bu çalışmanın bulguları, çalışmada kullanılan düzenek ile uygulanan mekanik stresin eritrositleri travmaya uğratarak hemolize neden olduğunu ve meydana gelen hemolizin NO donörü SNP, non spesifik K⁺ kanal blokörü TEA ve spesifik K⁺ kanal blokörü Klotrimazol ile engellenemediğini göstermektedir.

Bu mekanik stres düzeneğinde kullanılan temel unsurlar, bir peristaltik pompa ve kanın içinden aktığı bir kapiller borudur. Bu sistemde yer alan pompa, pek çok vücut dışı dolaşım sistemlerinde yer alan pompaların bir benzeridir. Kapiller boru ise yine bu sistemde yer alan kanüller, her boyuttaki borular, oksijenatör, diyaliz aparatları ve benzeri diğer donanımları modellemektedir. Boru ile pompa arasına yerleştirilen bir basınç transdüseri ile boru girişindeki basınç, pompa hızı değiştirilerek 200 mmHg'ya ayarlanmaktadır. Bu durumda hematokriti 0.40 L/L'ye ayarlanmış kanın yaklaşık 50 cm/sn akım hızı ile sisteme pompalanması halinde kapiller boru içinde oluşacak duvar kayma kuvveti 162 dyn/cm² olarak hesaplanmıştır (Bölüm 3.3). Bu sistemde borunun içindeki duvar kayma kuvveti literatürde kayıtlı verilere göre hemoliz oluşturma eşiği olarak kabul edilen 300 dyn/cm²'nin altında olduğu halde, 30 dakikalık pompalama işlemi sonrasında %3 civarında hemoliz meydana gelmektedir.

Vücut dışı dolaşım sistemlerinde kullanılan bileşenlerin kan hücrelerini etkilediği uzun süredir bilinmektedir [120, 121]. 1960 ve 1970'li yılların sonlarından itibaren mekanik kuvvetlerin kan hücrelerine etkilerini incelemek amacıyla yapılan çalışmalar, kan hücrelerinin kayma gerilimine belirgin bir hassasiyetleri olmasına karşın; yapay dolaşım sistemlerinde oluşan basınç, kanın yabancı yüzeylere çarpması ve kanın hava ile teması gibi diğer etkilere karşı yüksek bir toleransa sahip olduğunu göstermiştir [11, 122, 123]. Bu sistemlerde kayma geriliminin hücrelere olan hasarlayıcı etkisi özellikle kanül ve kateter gibi dolaşım alanının daraldığı noktalarda oluşmaktadır. Bu noktalar aynı zamanda kan akım hızlarının lokal olarak yükseldiği ve kan akımının laminar karakterinin bozulup türbülant hale geldiği bölgelerdir [53]. Bugüne kadar kan hücrelerinin hasarından yukarıda da belirtildiği şekilde özellikle sistemde kullanılan dar çaplı kanüllerdeki ani boyut değişikliklerinin sorumlu olduğu düşünülmüştür [53]. Ancak, bu konuda yapılan çalışmalar, kanın vücut içine itilmesini sağlayan pompaların da bu hasarda büyük bir rol oynadığını ve hemoliz, trombosit aktivasyonu ve trombin oluşumuna neden olduğunu göstermiştir [53, 124, 125]. Vücut dışı dolaşım sistemlerinde pompa kullanımıyla ilgili yapılan çalışmalar, özellikle pompaların hareketinden ve

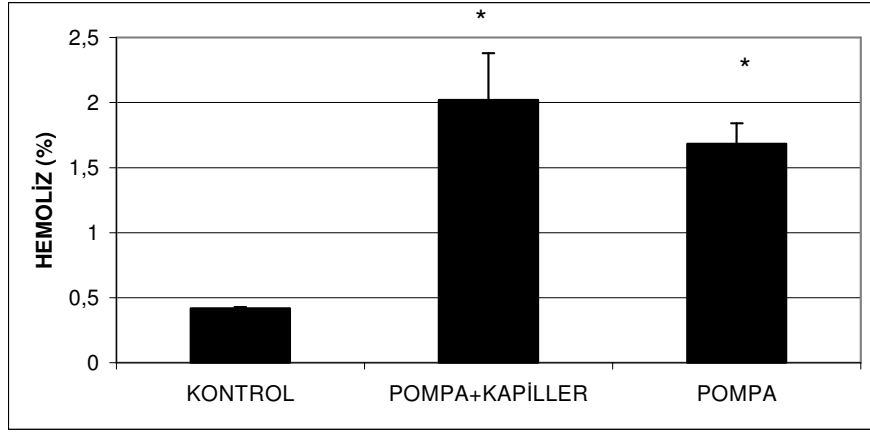
dönme hızından kaynaklanan mekanik kuvvetlerin, sistem koşullarına bağlı olarak gelişen hemoliz derecesini büyük oranda etkilediğini göstermiştir. Ayrıca bu sistemlerde kullanılan farklı pompa çeşitleri de hemoliz derecesini farklı düzeylerde etkilemektedir [53, 120].

Bu çalışmada, özellikle pompa kullanılan klinik uygulamalara model oluşturmak üzere, hemolize neden olduğu ön çalışmalarla belirlenmiş olan bir mekanik stres düzeneği kullanılmıştır. Bu düzenekte yarım saat süresince mekanik strese maruz bırakılan kan örneklerinde önemli derecede hemoliz olduğu gösterilmiş ve oluşan hemoliz SNP, TEA ve CLT'ün pompalanan kana eklenmesiyle azaltılamamıştır. Daha önce laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada subhemolitik düzeyde kayma gerilimi uygulanan eritrositlerin mekanik stres öncesinde NO ile muamele edilmesinin ve hücrelerden K^+ çıkışının bloke edilmesinin, bu hücreleri mekanik kuvvetin hasarlayıcı etkilerinden koruduğu gösterilmiştir [20]. Dolayısıyla bu çalışmada elde ettiğimiz sonuç, olasılıkla sistemimize dahil olan pompanın içinde meydana gelen yüksek mekanik hasardan kaynaklanmış ve SNP, TEA ve CLT hücreleri mekanik stresin hasarlayıcı etkilerinden korumakta başarısız kalmıştır.

Bu çalışmada kullanılan mekanik stres düzeneğinde, pompa ve cam kapiller boru olmak üzere kan hücrelerinin hasarına neden olabilecek iki farklı alan mevcuttur. Cam kapiller boruda meydana gelen kayma gerilimi seviyesi, ortalama 162 dyn/cm^2 olarak hesaplanmıştır. Bu değer kayma geriliminin hemolize neden olan seviyelerinin altındadır. Yapılan ek bir çalışmada aynı şekilde hazırlanan kan örnekleri kapiller borunun yer almadığı bir hidrolik devreden aynı pompa yardımıyla aynı hızda 30 dakika pompalanmış ve ölçülen hemoliz oranları kapiller borunun yer aldığı hidrolik devre ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Bu ek deneyde, kapiller borunun sisteme dahil olması halinde de önemli ölçüde hemoliz ortaya çıktığı saptanmıştır. (Şekil 5.1.). Bu bulgu, mekanik stres uygulanması sonucunda saptanmış olan hemolizin önemli bir bölümünün kapiller içinde değil, peristaltik pompa içinde gerçekleştiğini göstermektedir.

Mekanik stres, eritrositlerde çeşitli hücre içi sinyal yollarının aktivasyonuna ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine neden olur. Bu değişiklikler, plazma membranının mekanik olarak zedelenmesi ve membranda bulunan gerime duyarlı iyon kanallarının aktivasyonuna bağlanmaktadır [126]. Bu konuda yapılan çalışmalar, subhemolitik mekanik travmanın hücreden iki yönlü ve konsantrasyon bağımlı bir şekilde iyon akımlarının gerçekleşmesine neden olduğunu kanıtlamıştır. Bu iyon akımları, hücreden K^+ çıkışı ve hücreye Na^+ ve Ca^{+2} girişini içermektedir. Oonishi ve arkadaşları, eritrositleri çok kısa süreli olarak yüksek kayma gerilimine (6600 dyn/cm^2 , 0.6 sn) maruz bırakmış ve bu koşullarda meydana gelen hasarın, hücrelere Ca^{+2} girişinin engellenmesi ile önlenebileceğini göstermiştir [127]. Johnson ve Tang ise, mekanik stresin eritrositlerde Ca^{+2} ile aktive olan K^+

kanallarını aktive ettiğini ve bu yolla hücrelerden K^+ çıkışına yol açtığını belirlemişlerdir [61].



Şekil 5.1. Pompanın hemoliz oranına etkisi. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir (n=2). *: $p < 0.001$, kontrol grubundan fark. Pompa ve Pompa + kapiller grupları arasında önemli bir fark yoktur ($p > 0.05$).

Mekanik stresin subhemolitik düzeylerinin eritrosit mekanik özelliklerinde bozulmaya neden olduğu bilinmektedir. Kamaneva ve arkadaşları başta olmak üzere bir çok araştırmacının farklı düzeylerde ve farklı uygulama sürelerine bağlı kalarak yaptıkları çalışmalar, subhemolitik düzeylerde uygulanan mekanik stresin eritrosit deformabilitesini olumsuz yönde etkilediğini göstermiştir [2, 20, 61, 117]. Mekanik strese bağlı olarak ortaya çıkan eritrosit deformabilitesindeki azalmanın nedenlerinin başında eritrosit içi Ca^{+2} konsantrasyonundaki artış gelmektedir. Daha önce de belirtildiği gibi kayma gerilimi, eritrositte stoplazmik Ca^{+2} düzeyini belirgin ölçüde arttırmaktadır. Bu artış, Gardoş kanalı olarak bilinen Ca^{+2} bağımlı K^+ kanallarının aktivasyonuna ve eritrosit dışına K^+ ve buna bağlı olarak sıvı sızmasına neden olur. Eritrosit dışına K^+ ile birlikte sıvının da sızması, hücrede şekil bozukluğu oluşturmak yoluyla eritrosit deformabilitesini azaltmaktadır. Bu durum, OEHK'nın ve internal viskozitenin artışı yoluyla eritrosit deformabilitesinde belirgin azalmayla sonuçlanır. Dahası, eritrosit içinden K^+ ile birlikte sıvı kaybının da oluşması, eritrosit deformabilitesini belirleyen diğer bir önemli faktör olan hücre geometrisinde değişiklik yaratarak deformabilitedeki bozulmaya katkıda bulunur. Laboratuvarımızda daha önce yapılan bir çalışmada, hücre içinde sentezlenen NO'nun eritrosit mekanik özelliklerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı, doza bağımlı olan bu etkinin guanilat siklazdan bağımsız mekanizmalar aracılığı ile, özellikle de eritrositlerden K^+ çıkışının inhibisyonu ile olduğu gösterilmiştir [15, 20]. Öte yandan K^+ kanal blokajının ve/veya NO donörü kullanımının, subhemolitik düzeyde mekanik stresin yarattığı eritrosit deformabilitesindeki bozulmaya karşı koruyucu etkileri de bir başka çalışmada gösterilmiştir [20].

Hemolitik düzeyde mekanik stres uyguladığımız bu çalışmada ise belirgin ölçüde hemoliz oluşmuş, ancak hemolize uğramayan eritrositlerde

deformabilite açısından kontrol grubundan herhangi bir fark gösterilememiştir. NO donörü kullanılması veya K⁺ kanal blokörlerinin uygulanması da deformabilite üzerinde ek bir değişiklik yaratmamıştır. Hemoliz oluşmasına rağmen eritrosit deformabilitesinin değişmemesinin nedeni tam olarak açık değildir. Takami ve arkadaşları bu konuda yaptıkları çalışmada [128], kan örneklerini 8 saat boyunca akım hızı 5 ml/dk olacak şekilde ayarlanmış ve girişinde ve çıkışındaki basınç farkı 100 mmHg olan bir pompadan geçirmişler ve bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak hemoliz oluşmasına rağmen eritrosit deformabilitesinin değişmediğini göstermişlerdir. Bu araştırmacılar, pompa içinde eritrosit parçalanması gerçekleşinceye kadar eritrosit deformabilitesinin değişmeden kaldığı hipotezini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca mekanik kayma kuvveti uygulaması ile oluşan eritrosit membran rotasyonunun, eritrosit membranının incelmeye ve oluşan mikroporlardan kademeli olarak Hb çıkışına neden olabileceği ileri sürülmüştür [54, 128]. Bu nedenle, bizim çalışmamızda gözlenen hemolize rağmen eritrosit deformabilitesinin değişmemesi bulgusu bu nedenlerden kaynaklanıyor olabilir. Bununla birlikte, bizim çalışmamızda, sistemimiz koşullarında uygulanan mekanik stresin eritrosit deformabilitesinin önemli belirleyicileri olan eritrosit hacmi ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonlarında önemli bir değişikliğe neden olmadığı saptanmıştır. Ayrıca mekanik stres uygulamasından sonra hücrelerin şekil incelemeleri yapılmış ve mekanik stresin hücrelerin şeklinde de bir değişikliğe neden olmadığı izlenmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan mekanik stres düzeneği eritrositlerde, özellikle de pompadan geçişleri sırasında önemli düzeyde hemolize yol açmış, ve bu hemoliz NO donörü veya K⁺ kanal blokörlerinin kullanılması ile engellenememiştir. Pompa içinde nerede ve hangi büyüklükte oluştuğu tam olarak bilinmeyen mekanik kuvvetler, bu sistemde gözlenen hemolizden ve subhemolitik düzeyde koruyucu etkileri olduğu bilinen ajanların etki gösterememesinden sorumlu olabilir.

SONUÇLAR

- 1) Mekanik stres grubunda stres uygulamasını takiben ölçülen hemoliz oranı, mekanik stres uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak 3 kat artmıştır. SNP ($10^{-4}M$), TEA ($10^{-7}M$) ve klotrimazol ($3 \times 10^{-5}M$) gruplarında da mekanik stres uygulamasının ardından ölçülen mekanik hemoliz oranı kontrole göre önemli ölçüde artmış olup belirtilen ajanlar eritrositleri hemolizden korumakta etkisiz kalmıştır.
- 2) Mekanik stres uygulamasından önce ve sonra yapılan eritrosit deformabilite ölçümleri, mekanik stresin eritrosit deformabilitesini kontrole göre önemli ölçüde değiştirmedeğini gösterilmiştir. Ayrıca mekanik stres uygulamasından sonra SNP, TEA ve Klotrimazol gruplarında gerçekleştirilen deformabilite ölçümleri de kontrolden ve mekanik stres grubundan önemli olarak farklı değildir.
- 3) Kontrol ve mekanik stres uygulanan gruplara ait örneklerinde yapılan tam kan sayımları, mekanik stres uygulamasının kırmızı kan hücresi sayısı ve hematokrit (Htc) değerlerini kontrole göre önemli düzeyde düşürdüğü ve hücrelerin SNP, TEA ve klotrimazol ile muamele edilmesinin bu düşüşü engelleyemediği gösterilmiştir. Ayrıca mekanik stresin tek başına veya kimyasal ajanlar ile birlikte uygulanması ortalama eritrosit hacmi ve ortalama eritrosit konsantrasyonunda kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir değişikliğe neden olmamıştır.
- 4) Çalışmamızda mekanik stres uygulamasını takiben morfolojik eritrosit incelemeleri de yapılmıştır. Kontrol ve mekanik stres gruplarına ait kan örneklerinde ışık mikroskobu ile yapılan bu incelemelerde mekanik stres uygulamasından sonra hücre morfolojilerinde değişim saptanmamıştır.
- 5) Pompa içinde meydana gelen mekanik kuvvetler, bu sistemde gözlenen hemolizden ve subhemolitik düzeyde koruyucu etkileri olduğu bilinen ajanların etki gösterememesinden sorumlu olabilir.

KAYNAKLAR

1. Khanna A., Tandon R., Basu A.K., Shrivastava S. Red blood cell survival in patients with ventricular septal defect and patent ductus arteriosus. *Clin Pediatr (Phila)*.20.349-53,1981.
2. Kameneva M.V., Antaki J.F., Borovetz H.S., Griffith B.P., Butler K.C., Yeleswarapu K.K., Watach M.J., Kormos R.L. Mechanisms of red blood cell trauma in assisted circulation. Rheologic similarities of red blood cell transformations due to natural aging and mechanical stress. *Asaio J*.41.M457-60,1995.
3. Takami Y., Yamane S., Makinouchi K., Glueck J., Nose Y. Mechanical white blood cell damage in rotary blood pumps. *Artif Organs*.21.138-42,1997.
4. Sweet S.J., McCarthy S., Steingart R., Callahan T. Hemolytic reactions mechanically induced by kinked hemodialysis lines. *Am J Kidney Dis*.27.262-6,1996.
5. Bernhard W.F., LaFarge C.G., Liss R.H., Szycher M., Berger R.L., Poirier V. An appraisal of blood trauma and blood-prosthetic interface during left ventricular bypass in the calf and humans. *Ann Thorac Surg*.26.427-37,1978.
6. Winslow V. mechanism of hemoglobin toxicity. *thromb haemost*.70.36-41,1993.
7. Giersiepen M., Wurzinger L.J., Opitz R., Reul H. Estimation of shear stress-related blood damage in heart valve prostheses--in vitro comparison of 25 aortic valves. *Int J Artif Organs*.13.300-6,1990.
8. Kormos R.L., Borovetz H.S., Griffith B.P., Hung T.C. Rheologic abnormalities in patients with the Jarvik-7 total artificial heart. *ASAIO Trans*.33.413-7,1987.

9. Hung T.C., Borovetz H.S., Kormos R.L., Butter D.B., Yie C.L., Pristas J.M., Griffith B.P., Hardesty R.L. Artificial heart. Hemorrhology and transient ischemic attacks. *ASAIO Trans.*36.M132-5,1990.
10. Ohta Y., Otsuka C., Okamoto H. Changes in surface roughness of erythrocytes due to shear stress: atomic force microscopic visualization of the surface microstructure. *J Artif Organs.*6.101-5,2003.
11. Nevaril C.G., Lynch E.C., Alfrey C.P., Jr., Hellums J.D. Erythrocyte damage and destruction induced by shearing stress. *J Lab Clin Med.*71.784-90,1968.
12. Dao K.M., O'Rear E.A., Johnson A.E., Peitersen S.E. Sensitivity of the erythrocyte membrane bilayer to subhemolytic mechanical trauma as detected by fluorescence anisotropy. *Biorheology.*31.69-76,1994.
13. Kodicek M., Suttner J., Mircevova L., Marik T. Red blood cells under mechanical stress. *Gen Physiol Biophys.*9.291-9,1990.
14. Bateman R.M., Jagger J.E., Sharpe M.D., Ellsworth M.L., Mehta S., Ellis C.G. Erythrocyte deformability is a nitric oxide-mediated factor in decreased capillary density during sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*280.H2848-56,2001.
15. Bor-Kucukatay M., Wenby R.B., Meiselman H.J., Baskurt O.K. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*284.H1577-84,2003.
16. Korbut R., Gryglewski R.J. The effect of prostacyclin and nitric oxide on deformability of red blood cells in septic shock in rats. *J Physiol Pharmacol.*47.591-9,1996.
17. Chen L.Y., Mehta J.L. Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function. *J Cardiovasc Pharmacol.*32.57-61,1998.
18. Jubelin B.C., Gierman J.L. Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide. *Am J Hypertens.*9.1214-9,1996.

19. Caramelo C., Riesco A., Outeirino J., Millas I., Blum G., Monzu B., Casado V., Sanchez L., Mosquera J.R., Casado S., et al. Effects of nitric oxide on red blood cells: changes in erythrocyte resistance to hypotonic hemolysis and potassium efflux by experimental maneuvers that decrease nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.*199.447-54,1994.
20. Baskurt O.K., Uyuklu M., Meiselman H.J. Protection of erythrocytes from sub-hemolytic mechanical damage by nitric oxide mediated inhibition of potassium leakage. *Biorheology.*41.79-89,2004.
21. Reneman R.S., Arts T., Hoeks A.P. Wall shear stress--an important determinant of endothelial cell function and structure--in the arterial system in vivo. Discrepancies with theory. *J Vasc Res.*43.251-69,2006.
22. Resnick N., Yahav H., Shay-Salit A., Shushy M., Schubert S., Zilberman L.C., Wofovitz E. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Prog Biophys Mol Biol.*81.177-99,2003.
23. Lehoux S., Tedgui A. Cellular mechanics and gene expression in blood vessels. *J Biomech.*36.631-43,2003.
24. Shaaban A.M., Duerinckx A.J. Wall shear stress and early atherosclerosis: a review. *AJR Am J Roentgenol.*174.1657-65,2000.
25. Paszkowiak J.J., Dardik A. Arterial wall shear stress: observations from the bench to the bedside. *Vasc Endovascular Surg.*37.47-57,2003.
26. Carallo C., Irace C., Pujia A., De Franceschi M.S., Crescenzo A., Motti C., Cortese C., Mattioli P.L., Gnasso A. Evaluation of common carotid hemodynamic forces. Relations with wall thickening. *Hypertension.*34.217-21,1999.
27. Sirois E., Charara J., Ruel J., Dussault J.C., Gagnon P., Doillon C.J. Endothelial cells exposed to erythrocytes under shear stress: an in vitro study. *Biomaterials.*19.1925-34,1998.
28. Lipowsky H.H. (Ed.):*Shear stress in the circulation*. In: Bevan JA, Kaley G, Rubanyi GM. (Ed.): *Flow-Dependent Regulation of Vascular Function* New York. Oxford University Press, 28–45.1995.

29. Oyre S., Ringgaard S., Kozerke S., Paaske W.P., Erlandsen M., Boesiger P., Pedersen E.M. Accurate noninvasive quantitation of blood flow, cross-sectional lumen vessel area and wall shear stress by three-dimensional paraboloid modeling of magnetic resonance imaging velocity data. *J Am Coll Cardiol.*32.128-34,1998.
30. Brands P.J., Hoeks A.P., Hofstra L., Reneman R.S. A noninvasive method to estimate wall shear rate using ultrasound. *Ultrasound Med Biol.*21.171-85,1995.
31. Malek A.M., Alper S.L., Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *Jama.*282.2035-42,1999.
32. Nerem R.M., Alexander R.W., Chappell D.C., Medford R.M., Varner S.E., Taylor W.R. The study of the influence of flow on vascular endothelial biology. *Am J Med Sci.*316.169-75,1998.
33. Edelman R.R., Manning W.J. Magnetic resonance angiography and flow quantification of coronary arteries. *Magn Reson Imaging Clin N Am.*1.339-47,1993.
34. Rabinovitz RS L.M., Nerem RM. Effects of branching angle in the left main coronary bifurcation. *Circulation.*4.157-67,1976.
35. Reneman R.S., Meinders J.M., Hoeks A.P. Non-invasive ultrasound in arterial wall dynamics in humans: what have we learned and what remains to be solved. *Eur Heart J.*26.960-6,2005.
36. Wootton D.M., Ku D.N. Fluid mechanics of vascular systems, diseases, and thrombosis. *Annu Rev Biomed Eng.*1.299-329,1999.
37. Gimbrone M.A., Jr., Topper J.N., Nagel T., Anderson K.R., Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci.*902.230-9; discussion 39-40,2000.
38. Ku D.N., Giddens D.P., Zarins C.K., Glagov S. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis.*5.293-302,1985.
39. Cunningham K.S., Gotlieb A.I. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest.*85.9-23,2005.

40. Davies P.F. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev.*75.519-60,1995.
41. Koller A., Huang A. Development of nitric oxide and prostaglandin mediation of shear stress-induced arteriolar dilation with aging and hypertension. *Hypertension.*34.1073-9,1999.
42. Langille B.L., O'Donnell F. Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science.*231.405-7,1986.
43. Cho A., Mitchell L., Koopmans D., Langille B.L. Effects of changes in blood flow rate on cell death and cell proliferation in carotid arteries of immature rabbits. *Circ Res.*81.328-37,1997.
44. Davies P.F., Remuzzi A., Gordon E.J., Dewey C.F., Jr., Gimbrone M.A., Jr. Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.*83.2114-7,1986.
45. Dimmeler S., Haendeler J., Rippmann V., Nehls M., Zeiher A.M. Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett.*399.71-4,1996.
46. Solak H (Ed): ekstrakorporeal dolaşım. İstanbul 20-40 2005.
47. www.gata.edu.tr/cerrahibilimler/kalp.damar/kalp-akciğer.html. 2006.
48. Ersoy F. (Ed.): Hemodiyalizde kullanılan araç ve gereğler In: Utaş C.,Akpolat T. (Ed.): Hemodiyaliz hemşiresi el kitabı. İstanbul: Güzelsanatlar matbaası; 30-51, 2000.
49. Somody E., Ferrieres J., Dumazer P., Mignon-Conte M., Galinier F., Bernadet P. [Renal hemosiderosis caused by chronic hemolysis in a patient with a Saint-Jude mitral valve prosthesis]. *Arch Mal Coeur Vaiss.*86.111-3,1993.
50. Hirayama T., Roberts D., William-Olsson G. Mechanical trauma to red blood cells caused by Bjork-Shiley and Carpentier-Edwards heart valves. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg.*19.253-6,1985.

51. Gildein H.P., Onaldi D., Gordjani N. Acute renal failure due to mechanical haemolysis after percutaneous catheter occlusion of a patent arterial duct. *Int J Cardiol.*63.317-8,1998.
52. Schulte H.D., Sygula E., Bourgeois M., Pottgen W., Seipel L. [Severe mechanical haemolysis after correction of a partial atrioventricular canal (author's transl)]. *Thoraxchir Vask Chir.*26.117-23,1978.
53. Wright G. Haemolysis during cardiopulmonary bypass: update. *Perfusion.*16.345-51,2001.
54. Sutura S.P. Flow-induced trauma to blood cells. *Circ Res.*41.2-8,1977
55. Indeglia R.A., Shea M.A., Forstrom R., Bernstein E.F. Influence of mechanical factors on erythrocyte sublethal damage. *Trans Am Soc Artif Intern Organs.*14.264-72,1968.
56. Kameneva M.V., Marad P.F., Brugger J.M., Repko B.M., Wang J.H., Moran J., Borovetz H.S. In vitro evaluation of hemolysis and sublethal blood trauma in a novel subcutaneous vascular access system for hemodialysis. *Asaio J.*48.34-8,2002.
57. R.M. W. Mechanism of hemoglobin toxicity. *Thromb Haemost.*70.36-41,1993.
58. Kameneva M.V., Garrett K.O., Watach M.J., Borovetz H.S. Red blood cell aging and risk of cardiovascular diseases. *Clin Hemorheol Microcirc.*18.67-74,1998.
59. Maher A.D., Kuchel P.W. The Gardos channel: a review of the Ca²⁺-activated K⁺ channel in human erythrocytes. *Int J Biochem Cell Biol.*35.1182-97,2003.
60. Johnson R.M., Gannon S.A. Erythrocyte cation permeability induced by mechanical stress: a model for sickle cell cation loss. *Am J Physiol.*259.C746-51,1990.
61. Johnson R.M., Tang K. Induction of a Ca(2+)-activated K⁺ channel in human erythrocytes by mechanical stress. *Biochim Biophys Acta.*1107.314-8,1992.

62. Ney P.A., Christopher M.M., Hebbel R.P. Synergistic effects of oxidation and deformation on erythrocyte monovalent cation leak. *Blood*.75.1192-8,1990.
63. Johnson R.M., Tang K. DIDS inhibition of deformation-induced cation flux in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*.1148.7-14,1993.
64. Garrahan P.J., Glynn I.M. The stoichiometry of the sodium pump. *J Physiol*.192.217-35,1967.
65. Canessa M.L. The Na-K-Cl cotransport in essential hypertension: cellular functions and genetic environment interactions. *Int J Cardiol*.25 Suppl 1.S37-45,1989.
66. Brugnara C., Van Ha T., Tosteson D.C. Role of chloride in potassium transport through a K-Cl cotransport system in human red blood cells. *Am J Physiol*.256.C994-1003,1989.
67. Pellegrino M., Pellegrini M. Modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels of human erythrocytes by endogenous cAMP-dependent protein kinase. *Pflugers Arch*.436.749-56,1998.
68. Gardos G. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*.30.653-4,1958.
69. Alcayaga C., Cecchi X., Alvarez O., Latorre R. Streaming potential measurements in Ca²⁺-activated K⁺ channels from skeletal and smooth muscle. Coupling of ion and water fluxes. *Biophys J*.55.367-71,1989.
70. Latorre R., Oberhauser A., Labarca P., Alvarez O. Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu Rev Physiol*.51.385-99,1989.
71. Vandorpe D.H., Shmukler B.E., Jiang L., Lim B., Maylie J., Adelman J.P., de Franceschi L., Cappellini M.D., Brugnara C., Alper S.L. cDNA cloning and functional characterization of the mouse Ca²⁺-gated K⁺ channel, mlk1. Roles in regulatory volume decrease and erythroid differentiation. *J Biol Chem*.273.21542-53,1998.

72. Doyle D.A., Morais Cabral J., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*.280.69-77,1998.
73. Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*.417.515-22,2002.
74. Tiffert T., Spivak J.L., Lew V.L. Magnitude of calcium influx required to induce dehydration of normal human red cells. *Biochim Biophys Acta*.943.157-65,1988.
75. Tiffert T., Lew V.L. Kinetics of inhibition of the plasma membrane calcium pump by vanadate in intact human red cells. *Cell Calcium*.30.337-42,2001.
76. Hunter M.J. Human erythrocyte anion permeabilities measured under conditions of net charge transfer. *J Physiol*.268.35-49,1977.
77. Li Q., Jungmann V., Kiyatkin A., Low P.S. Prostaglandin E2 stimulates a Ca²⁺-dependent K⁺ channel in human erythrocytes and alters cell volume and filterability. *J Biol Chem*.271.18651-6,1996.
78. Oonishi T., Sakashita K., Ishioka N., Suematsu N., Shio H., Uyesaka N. Production of prostaglandins E1 and E2 by adult human red blood cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*.56.89-101,1998.
79. Romero P.J., Romero E.A. Effect of cell ageing on Ca²⁺ influx into human red cells. *Cell Calcium*.26.131-7,1999.
80. Takakuwa Y., Mohandas N. Modulation of erythrocyte membrane material properties by Ca²⁺ and calmodulin. Implications for their role in regulation of skeletal protein interactions. *J Clin Invest*.82.394-400,1988.
81. Tanaka T., Kadowaki K., Lazarides E., Sobue K. Ca²⁺(+)-dependent regulation of the spectrin/actin interaction by calmodulin and protein 4.1. *J Biol Chem*.266.1134-40,1991.

82. Nunomura W., Takakuwa Y., Tokimitsu R., Krauss S.W., Kawashima M., Mohandas N. Regulation of CD44-protein 4.1 interaction by Ca²⁺ and calmodulin. Implications for modulation of CD44-ankyrin interaction. *J Biol Chem.*272.30322-8,1997.
83. Minetti G., Low P.S. Erythrocyte signal transduction pathways and their possible functions. *Curr Opin Hematol.*4.116-21,1997.
84. Romero P.J., Romero E.A. Differences in Ca²⁺ pumping activity between sub-populations of human red cells. *Cell Calcium.*21.353-8,1997.
85. Daugas E., Cande C., Kroemer G. Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ.*8.1131-3,2001.
86. Berg C.P., Engels I.H., Rothbart A., Lauber K., Renz A., Schlosser S.F., Schulze-Osthoff K., Wesselborg S. Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ.*8.1197-206,2001.
87. Lang K.S., Duranton C., Poehlmann H., Myssina S., Bauer C., Lang F., Wieder T., Huber S.M. Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ.*10.249-56,2003.
88. Connor J., Pak C.C., Schroit A.J. Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells. *J Biol Chem.*269.2399-404,1994.
89. Manno S., Takakuwa Y., Mohandas N. Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.*99.1943-8,2002.
90. LaBarbera M. Principles of design of fluid transport systems in zoology. *Science.*249.992-1000,1990.
91. Wallis C.J., Babitch J.A., Wenegieme E.F. Divalent cation binding to erythrocyte spectrin. *Biochemistry.*32.5045-50,1993.
92. Lowenstein C.J., Dinerman J.L., Snyder S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med.*120.227-37,1994.

93. Ignarro L.J. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci Rep.*19.51-71,1999.
94. Vallance P., Hingorani A. Endothelial nitric oxide in humans in health and disease. *Int J Exp Pathol.*80.291-303,1999.
95. Gentiloni Silveri N., Mazzone M., Portale G., Carbone L. Nitric oxide. A general review about the different roles of this innocent radical. *Minerva Med.*92.167-71,2001.
96. Ignarro L.J., Cirino G., Casini A., Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol.*34.879-86,1999.
97. Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.*327.524-6,1987.
98. Bhagat K., Vallance P. Nitric oxide 9 years on. *J R Soc Med.*89.667-73,1996.
99. Lloyd-Jones D.M., Bloch K.D. The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med.*47.365-75,1996.
100. Shinde U.A., Mehta A.A., Goyal R.K. Nitric oxide: a molecule of the millennium. *Indian J Exp Biol.*38.201-10,2000.
101. Nonami Y. The role of nitric oxide in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Jpn Circ J.*61.119-32,1997.
102. Marin J., Rodriguez-Martinez M.A. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther.*75.111-34,1997.
103. Carvajal J.A., Germain A.M., Huidobro-Toro J.P., Weiner C.P. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol.*184.409-20,2000.
104. Kang E.S., Ford K., Grokulsky G., Wang Y.B., Chiang T.M., Acchiardo S.R. Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins. *J Lab Clin Med.*135.444-51,2000.

105. Kleinbongard P., Schulz R., Rassaf T., Lauer T., Dejam A., Jax T., Kumara I., Gharini P., Kabanova S., Ozuyaman B., Schnurch H.G., Godecke A., Weber A.A., Robenek M., Robenek H., Bloch W., Rosen P., Kelm M. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood*.107.2943-51,2006.
106. Petrov V., Lijnen P. Regulation of human erythrocyte Na⁺/H⁺ exchange by soluble and particulate guanylate cyclase. *Am J Physiol*.271.C1556-64,1996.
107. Adragna N.C., White R.E., Orlov S.N., Lauf P.K. K-Cl cotransport in vascular smooth muscle and erythrocytes: possible implication in vasodilation. *Am J Physiol Cell Physiol*.278.C381-90,2000.
108. Adragna N.C., Lauf P.K. Role of nitrite, a nitric oxide derivative, in K-Cl cotransport activation of low-potassium sheep red blood cells. *J Membr Biol*.166.157-67,1998.
109. Pernollet M.G., Lantoine F., Devynck M.A. Nitric oxide inhibits ATP-dependent Ca²⁺ uptake into platelet membrane vesicles. *Biochem Biophys Res Commun*.222.780-5,1996.
110. Bor-Kucukatay M., Yalcin O., Gokalp O., Kipmen-Korgun D., Yesilkaya A., Baykal A., Ispir M., Senturk U.K., Kaputlu I., Baskurt O.K. Red blood cell rheological alterations in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats. *Clin Hemorheol Microcirc*.22.267-75,2000.
111. Korbut R., Gryglewski R.J. Nitric oxide from polymorphonuclear leukocytes modulates red blood cell deformability in vitro. *Eur J Pharmacol*.234.17-22,1993.
112. Kameneva M.V., Repko B.M., Krasik E.F., Perricelli B.C., Borovetz H.S. Polyethylene glycol additives reduce hemolysis in red blood cell suspensions exposed to mechanical stress. *Asaio J*.49.537-42,2003.
113. Kameneva M.V., Burgreen G.W., Kono K., Repko B., Antaki J.F., Umezu M. Effects of turbulent stresses upon mechanical hemolysis: experimental and computational analysis. *Asaio J*.50.418-23,2004.
114. Seiyama A S.Y., Tateshi N, Maeda N. Viscous properties of partially hemolyzed erythrocyte suspension. *Biorheology*.28.452,1991.

115. Peirce C. *Extracorporeal circulation for open heart surgery* 1969.
116. Grigioni M., Daniele C., Morbiducci U., D'Avenio G., Di Benedetto G., Barbaro V. The power-law mathematical model for blood damage prediction: analytical developments and physical inconsistencies. *Artif Organs*.28.467-75,2004.
117. Kameneva M.V., Undar A., Antaki J.F., Watach M.J., Calhoon J.H., Borovetz H.S. Decrease in red blood cell deformability caused by hypothermia, hemodilution, and mechanical stress: factors related to cardiopulmonary bypass. *Asaio J*.45.307-10,1999.
118. Ohno M., Hardeman M.R. G.P.T., Dobbe J.G.G., Lettinga K.P. Laser-assisted optical rotational cell analyzer (lorrca). A new instrument for measurement of various structural hemorheological parameters. *Clin Hemorheol Microcirc*.14.606-18,1994.
119. Baskurt O.K., Meiselman H.J. Analyzing shear stress-elongation index curves: comparison of two approaches to simplify data presentation. *Clin Hemorheol Microcirc*.31.23-30,2004.
120. Paparella D., Galeone A., Venneri M.T., Coviello M., Visicchio G., Cappabianca G., Maselli G., Marraudino N., Quaranta M., De Luca Tuppiti Schinosa L. Blood damage related to cardiopulmonary bypass: in vivo and in vitro comparison of two different centrifugal pumps. *Asaio J*.50.473-8,2004.
121. Mulholland J.W., Massey W., Shelton J.C. Investigation and quantification of the blood trauma caused by the combined dynamic forces experienced during cardiopulmonary bypass. *Perfusion*.15.485-94,2000.
122. Blackshear P.L., Jr., Dorman F.D., Steinbach J.H. Some Mechanical Effects That Influence Hemolysis. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*.11.112-7,1965.
123. Bernstein E.F., Blackshear P.L., Jr., Keller K.H. Factors influencing erythrocyte destruction in artificial organs. *Am J Surg*.114.126-38,1967.

124. Nishinaka T., Nishida H., Endo M., Miyagishima M., Ohtsuka G., Koyanagi H. Less blood damage in the impeller centrifugal pump: a comparative study with the roller pump in open heart surgery. *Artif Organs*.20.707-10,1996.
125. Morgan I.S., Codispoti M., Sanger K., Mankad P.S. Superiority of centrifugal pump over roller pump in paediatric cardiac surgery: prospective randomised trial. *Eur J Cardiothorac Surg*.13.526-32,1998.
126. Ko K.S., McCulloch C.A. Partners in protection: interdependence of cytoskeleton and plasma membrane in adaptations to applied forces. *J Membr Biol*.174.85-95,2000.
127. Oonishi T., Sakashita K., Uyesaka N. Regulation of red blood cell filterability by Ca²⁺ influx and cAMP-mediated signaling pathways. *Am J Physiol*.273.C1828-34,1997.
128. Watanabe N., Sakota D., Ohuchi K., Takatani S. Deformability of red blood cells and its relation to blood trauma in rotary blood pumps. *Artif Organs*.31.352-8,2007.

ÖZGEÇMİŞ

04.09.1981 yılında Antalya'da dünyaya gelen Pınar ÜLKER, ilk öğrenimini Antalya Dedeman ilkokulunda, orta öğrenimini Kamile Çömlekçioğlu ortaokulunda tamamladı. 1999 yılında Antalya Karatay Lisesinden mezun oldu ve Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde yüksek öğrenimine başladı. 2004 yılında lisans diplomasını alıp aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.