

T.C

Marmara Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

ASPIRİNİN
ERİTROSİTLERDEKİ GLİKOLİZE
ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Kim. Müh. Nebahat Demirhan

Danışman

Doç. Dr. Nesrin Emekli

İstanbul - 1986

İ Ç İ N D E K İ L E R

Sayfa

1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER -----	1
1- Glikolizin Tarihçesi -----	1
2- Glukozun Hücre İçinde Kullanılması ---	2
3- Glikoliz ve Safhaları -----	4
- Glukozun ATP ile Fosforilasyonu -----	7
- Glukozun Triozlara Dönüşümü -----	10
- Gliseraldehit-3-fosfatın, 1,3-Difosfo gliserik aside Oksidasyonu ve Fosfat Gurubunun ADP'a Transferi -----	10
- Fosfat Gurubunun , Fosfoenolpiruvik asitten ADP'a Transferi -----	11
- Fosfogliserik Asidin, Fosfoenolpiruvik Aside Dehidratasyonu -----	12
- Piruvik asidin Laktik Aside Dönüşümü -	13
4- Eritrosit ve Önemi -----	14
5- Eritrositlerde Glikoliz -----	16
6- Aspirin -----	18
II- AMAÇ -----	19
III- YÖNTEM ve GEREÇLER -----	20
1- Eritrositlerin Hazırlanması -----	20
2- Glukoz Tayini -----	20
3- Enzimatik Yöntemle Laktik Asit Tayini--	22
IV- BULGULAR -----	24
V- TARTIŞMA -----	31
VI- ÖZET -----	35
VII- SUMMARY -----	36
VIII- KAYNAKLAR -----	37

G İ R İ Ő V E G E N E L B İ L G İ L E R

GLİKOLİZİN TARİHÇESİ

Alkolik fermentasyon ve glikolizim nasıl gerçekleŐtiđi uzun seneler birbirini izleyen araştırmalar sonunda aydınlatılabildi. Bazı önemli noktalar daha sonra bir çok metabolik yolların araŐtırılmasında kullanıldı. XIX. yüzyıl sonlarında halâ fermentler (daha sonra enzim denildi) konusunda tartıŐılıyor ve bunlardan bazılarının yalnız canlılarda mı iŐ görebildiği soruluyordu. 1897 yılında Alman kimyacısı Edward Buchner, maya hücrelerinden maya enzimlerini ayırdıktan sonra, glukozun yine etil alkole dönüŐebildiđini gösterdi. Mayanın yaptığı enzimlerin , maya öldürüldükten sonra da iŐ grebildiğinin Buchner tarafından keŐfedilmesi biokimyasal açıdan çok önemli sonuçlar dođurmuŐtur. Bundan sonra yapılan araştırmalar bir çok enzimlerin tek tek ayrılma ve tanınmasını mümkün kılmıŐtır (1).

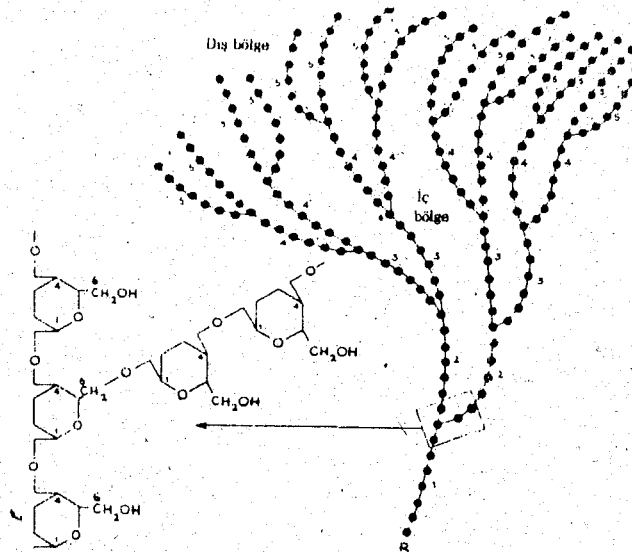
Pasteur, fermentasyonun canlı maya hücrelerindeki enzimler tarafından gerçekleŐtirildiđini açıkladı. Daha sonra fermentasyon için fosfatlara , iki fosfat gurubu içeren heksozlara ihtiyaç olduğu belirtilerek ikinci büyük adım İngiltere den W.J. Young ve A.Harden tarafından atıldı. Harden ve Young fermentasyonun zymase denen enzim tarafından gerçekleŐtirildiđini buldular. Zymasenin etkili olabilmesi için bu enzimin koenzimine ihtiyaç olduğu, bunun da oksido-redüksiyon enzimi nikotinamid adenin dinukleotit (NAD) olduğu bulundu. Diğer önemli gözlemler ise, bazı inhibitörlerin bulunması ve bu inhibitörlerin varlığında fermentasyon olayının durmasıdır.

Gustav Embden ve Otto Meyerhof glukozun bir dizi reaksiyon ile piruvata dönüşümünü ve sırasını bulmuŐlardır. Bu yo-

la Embden-Meyerhof yolu dendi. Bileşik Devletlerden G.T Co-ri, Polonyadan J.Parnas ve Berlinden Otto Warnburg'un Embden Meyerhof yolunun aydınlatılmasında büyük yardımları olmuştur (1,2).

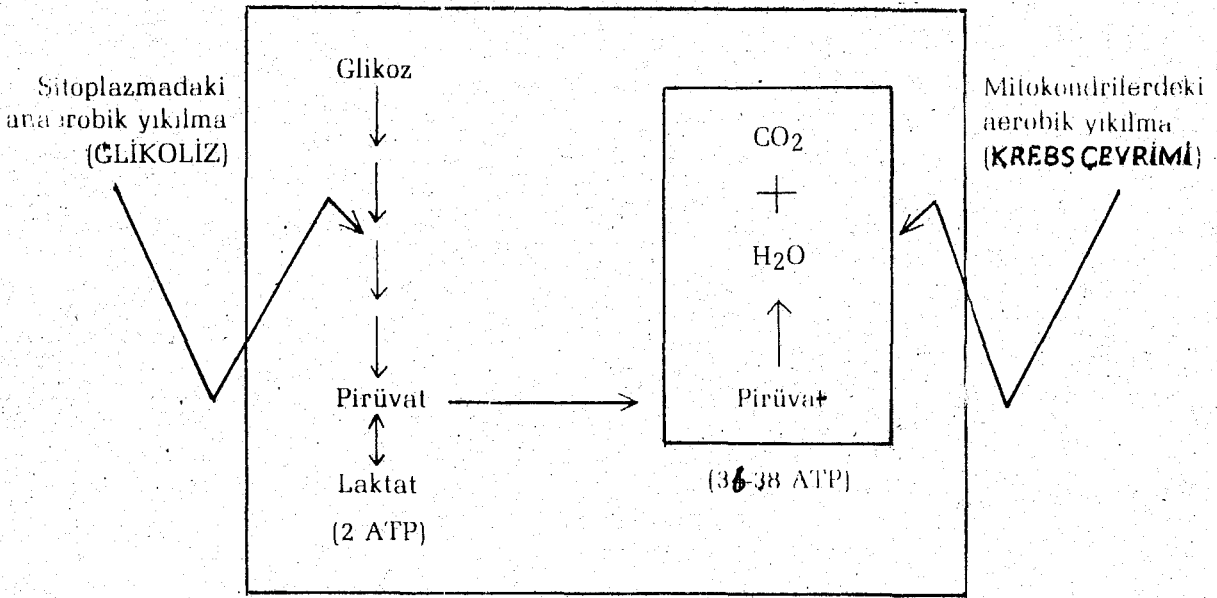
GLUKOZUN HÜCRE İÇİNDE KULLANILMASI

Memelilerin en önemli enerji kaynağı (ortalama %60'1) karbonhidratlardır. Sindirim olayı sırasında karbonhidratlar kendilerini oluşturum monosakkaritlere ayrılır. Di yada polisakkaritlerin parçalanması ile oluşan monosakkaritler, ince bağırsak mukozasından geçerek veneporta yolundan karaciğere ulaşır. Monosakkaritlerin en önemli üyesi glukozdur. Kana geçen glukoz çeşitli metabolizma yollarını izleyerek kullanılır. Dokularda yakılarak organizmaya enerji sağlar, asetil Co-A üzerinden yağ asitlerine dönüşür, fazlası şekil l'de görüldüğü gibi glikojen şeklinde depo edilir.



ŞEKİL 1- Glukoz birimlerinin glikojen molekülünde dizilişi
(Harper 15. baskıdan alınmıştır)

Özellikle karaciğer ve kaslarda hemen kullanılmayan glukoz glikojen olarak depolanır (glikojenez). Gerektiğinde glukoz serbest duruma geçerek enerji maddesi olarak kullanılır (glikojenoliz). Şekil 2'de glukozdan enerji elde edilirken meydana gelen reaksiyonlar kısaca özetlenmiştir.



ŞEKİL 2- Sitoplazmada anaerobik, mitokondrilerde aerobik yıkım ve ATP oluşumu.

Glukozun enerji maddesi olarak kullanılması çeşitli şekillerde olur. Bunlardan bizim üzerinde duracağımız Glikoliz veya Embden-Meyerhof yolu yani oksijensiz ortamda, glukozdan ATP oluşumudur. Ortamda oksijen olduğu zaman glukozun yıkılması Piruvik asit üzerinden devam eder (laktik asit oluşmaz). Piruvik asidin asetil Co-A'ya dönüşmesi ile glukoz Krebs çevriminde yıkılmaya başlar ve glikolize göre daha fazla ATP elde edilir. Bu yola oksidatif fosforilasyon, glukozun indirekt oksidasyonu, sitrik asit döngüsü, trikarboksilik asit döngüsü de denir. Sitrik asit döngüsü ile glukozun oksidasyonu mitokondrilerde gerçekleşir. Eritrositlerde mitokon-

dri olmadığı için bu yol geçerli değildir. Şekil 2'de piruvatın mitokondride CO_2 ve H_2O ya dönüşümü ve oluşan ATP ler görülmektedir.

Glukozun diğer bir oksidasyon yolu da Direkt oksidasyon veya Warburg Dickers, Pentoz fosfat yoludur. Bu yolla glukoz pentoz fosfatlara dönüşerek DNA ve RNA'nın yapısına giren pentozları oluşturur. Ayrıca gerektiğinde bu yolla da her bir glukoz molekülü başına 36 mol ATP elde edilir(3,4).

GLİKOLİZ VE SAFHALARI

Glikoliz, oksijensiz ortamda glukozun piruvik asit üzerinden laktik aside yıkılması olayıdır. Glukoz bu yolla yıkılarak oluşan her laktik asit başına 2 ATP lik kimyasal enerji oluşturmaktadır.

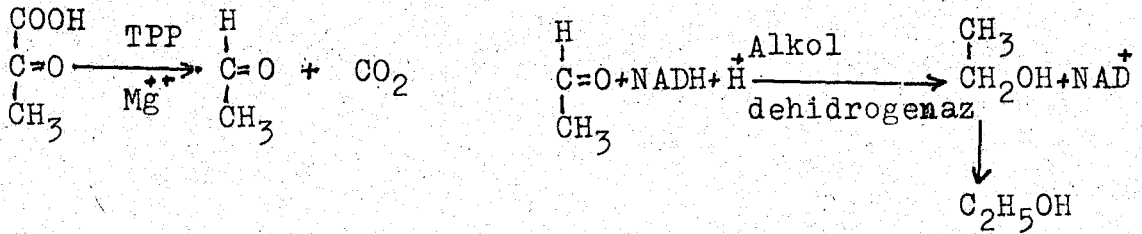
Glikoliz olayında her biri başka basamağı katalizleyen 11 enzimin rol aldığı bilinmektedir. Bu enzimler sitoplazmada bulunur ve burada sentezlenirler. Bütün karalı multi enzimli sistemlerde olduğu gibi, enzimler bir birlerine fiziksel ve kimyasal etkide bulunmadan bağımsız olarak bir arada bulunmaktadırlar.

Glikoliz olayı iki basamakta meydana gelir. Reaksiyonun başlama basamağı yani ilk basamakta enerjiye ihtiyaç vardır. Bu enerji ATP'den sağlanır. Reaksiyon dizisinin esas amacı glukoz molekülünden ATP şeklinde enerji elde etmek olduğu halde ilk basamakta 2 mol ATP harcanır ve glukoz molekülü üçer karbonlu iki küçük moleküle bölünür. Meydana gelen moleküllere birer fosfat gurubu bağlanır. Fosfat gurubu enzim - substrat kompleksinin teşkilinde aracı gurup olarak hizmet eder. İkinci basamakta üç karbonlu moleküllerden laktik asit oluşumuna kadar bir dizi reaksiyon meydana gelirken, molekül başına 4 ATP elde edilir. İkiisi kullanıldığından hücrenin net ATP kazancı 2 tane dir.

Glikolizin amacı organizmaya gerekli olan kimyasal enerjiyi O_2 gerektirmeden ve kısa yoldan sağlamaktır. Glikoliz-

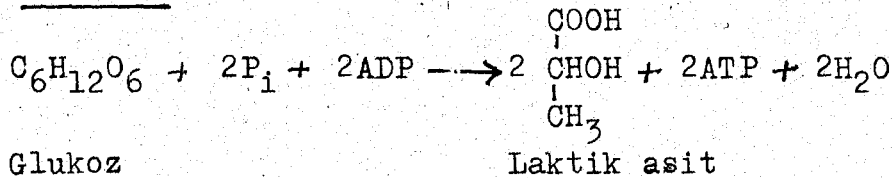
de , glukoz molekülü başına elde edilen toplam enerji , glukozun oksidasyonu ile elde edilene göre çok azdır. Ancak düşük oksijen basıncında bile , dokuların gereken enerjiyi bu yoldan sağlayabilmeleri yönünden çok önemlidir.

Glukozdan anaerobik olarak enerji elde edilmesinde organizmanın çeşidine göre alkolik fermantasyon yolu da kullanılır. Fermantasyon sonunda glikolizdeki laktik asit yerine, etil alkol ve CO₂ meydana gelir. Glikoliz ve alkolik fermantasyonda aynıdır. Ancak alkolik fermantasyonda glikoliz enzimlerine ilave olarak iki değişik enzim daha gereklidir. Bunlardan birisi piruvik asidin asetaldehite dönüşümünü sağlayan ve TPP ye gereksinim gösteren piruvat dekarboksilaz, diğeri ise , asetaldehidin etanole dönüşümünü kataliz eden alkol dehidrogenazdır.

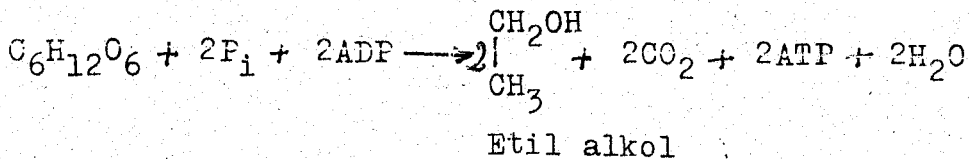


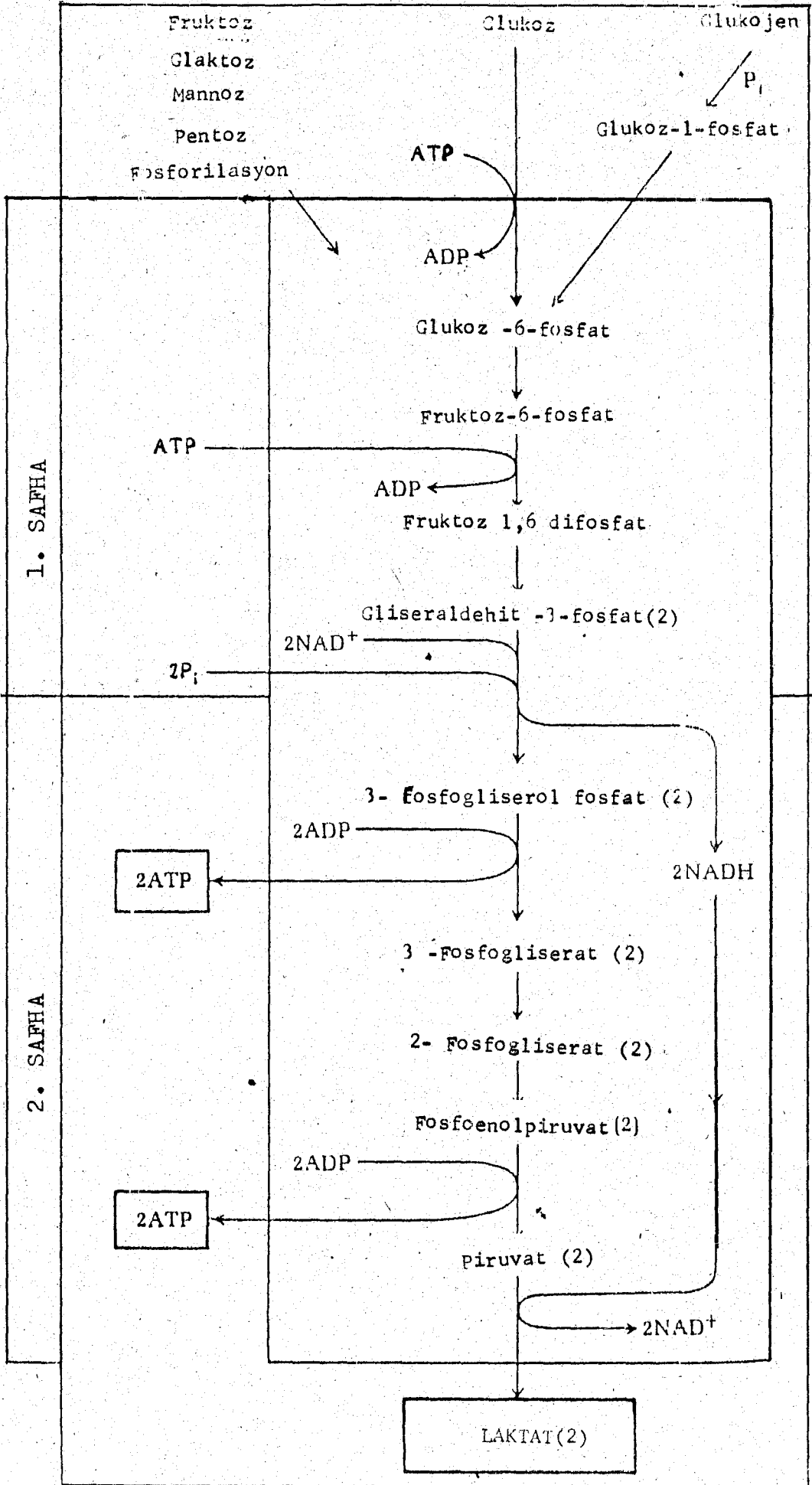
Glikoliz ve alkolik fermantasyon reaksiyonlarını enerji içerikleri ile birlikte aşağıdaki şekilde gösterebiliriz:

Glikoliz:



Alkolik Fermantasyon:





ŞEKİL 3 - Glikoliz ve safhaları (Leninger'dan alınmıştır).

Glikoliz sırasında üç farklı kimyasal olay meydana gelir:

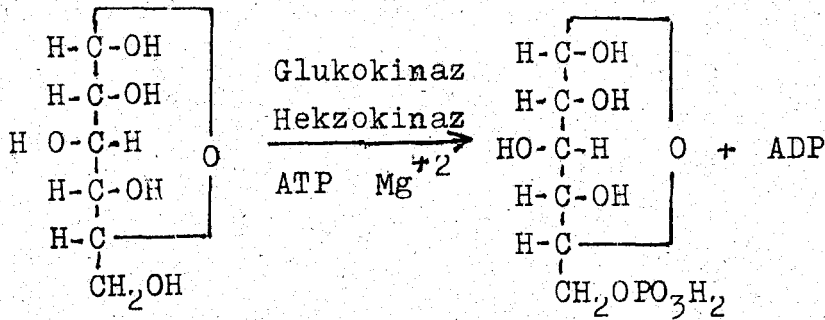
- 1)- İnorganik fosfatların yerleşmesi reaksiyonu.
- 2)- Oksido-redüksiyon reaksiyonları(elektron ge-
çişi ile).
- 3)- Glukozun laktik aside dönüşümü reaksiyonları
(karbon iskeletindeki değişme ile).

GLİKOLİZİN BİRİNCİ SAFHASI

D- Glukozun ATP ile Fosforilasyonu: Glikolizde mey-
dana gelen ilk enzimatik tepkimedir.

Glikoliz sırasında iki kademede ATP kullanılır. İlk kademede ATP, nötral glukoz molekülünü negatif duruma geti-
rerek daha sonraki enzimatik olaya hazırlamak için kullanı-
lır. Hücre içinde glukozun büyük bir kısmı fosfatlar halin-
de bulunur. Glukozun ATP tarafından glukoz-6-fosfata dönü-
şümü reaksiyonunu hegzokinaz ve glukokinaz enzimleri katal-
lizler. Ancak bunların D-glukoza karşı afiniteleri farklı-
dır.

Her iki enzim için reaksiyon aşağıdaki gibidir:



Glukoz

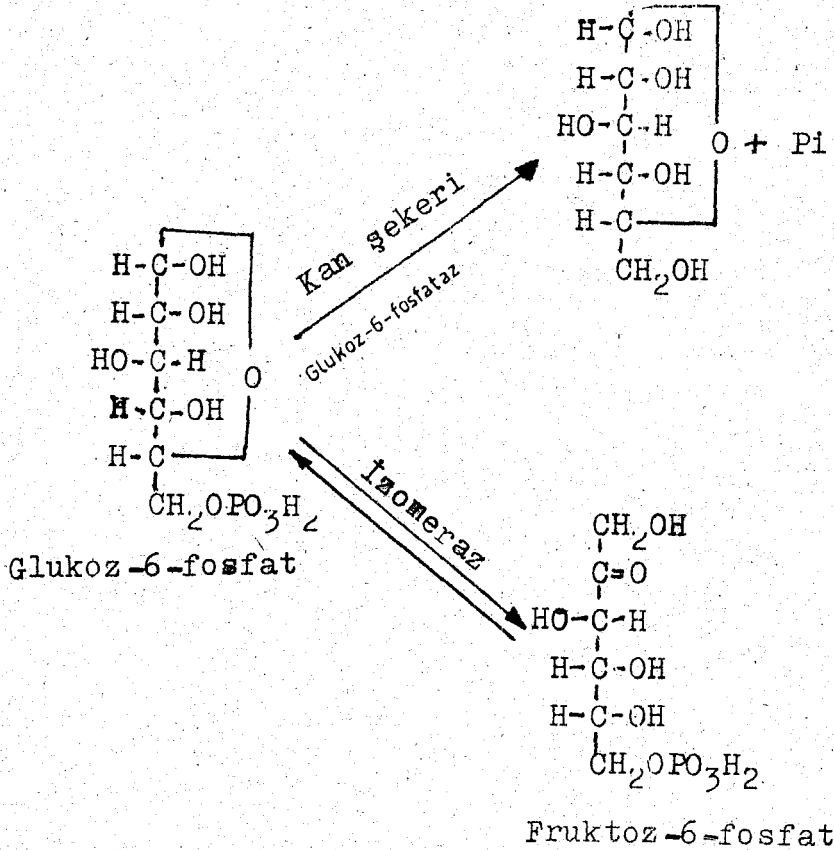
Glukoz-6-fosfat

Hekzokinaz birçok dokulardan elde edilmiştir. Mol. a-
ğırlığı 100.000 civarındadır. Heksoz ve heksoz esaslı bütün
şekerlerin fosfatlaşma reaksiyonlarını katalizler. Glukozu
fosforile eden ikinci tip enzim olan glukokinaz enzimi sade-

ce D-glukozu fosforile eder diğer hesozlara etki etmez. Daha çok karaciğerde bulunur (Kaslarda bulunmaz) ve kan şekerinin çok fazla yükselmesi halinde görev yapar. Kandaki şeker konsantrasyonunun artması ile ortaya çıkan bir hastalık olan diabetes mellitus da (Şeker hastalığı) şeker konsantrasyonunu düşürerek insülin gibi etki eder. Her iki enzimin görev yapabilmesi için Mg^{2+} veya Mn^{2+} kanyonlarına ihtiyaç vardır.

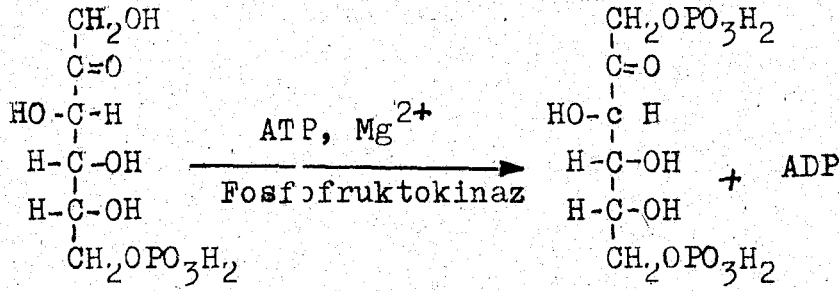
Glukoz-6-fosfatın Fruktoz-6-fosfata dönüşümü:

Dönüşüm, kas dokusunda bulunan fosfoglukoizomeraz enzimi aracılığı ile gerçekleşir. Mol. ağırlığı 130.000 civarındadır. Mg^{2+} ve Mn^{2+} iyonlarına ihtiyacı yoktur. Fruktoz-6-fosfata dönmeyen glukoz-6-fosfat molekülleri glukoz-6-fosfataz enzimi aracılığı ile karaciğerde serbest glukoz ve fosforik aside parçalanır. Bu sayede kana serbest glukoz molekülü verilmiş olur.

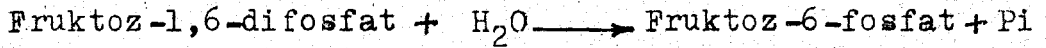


Fruktoz-6-fosfatın Fruktoz-1,6-difosfata fosforilasyonu:

Bu basamakta fruktoz-6-fosfat, bir molekül daha fosfat alarak fruktoz-1,6-difosfata dönüşür. Reaksiyonu katalizleyen enzimin adı Fosfofruktokinazdır. Bu enzimin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 380.000 civarındadır. Görev yapabilmesi için Mg^{2+} iyonlarına ihtiyaç vardır.

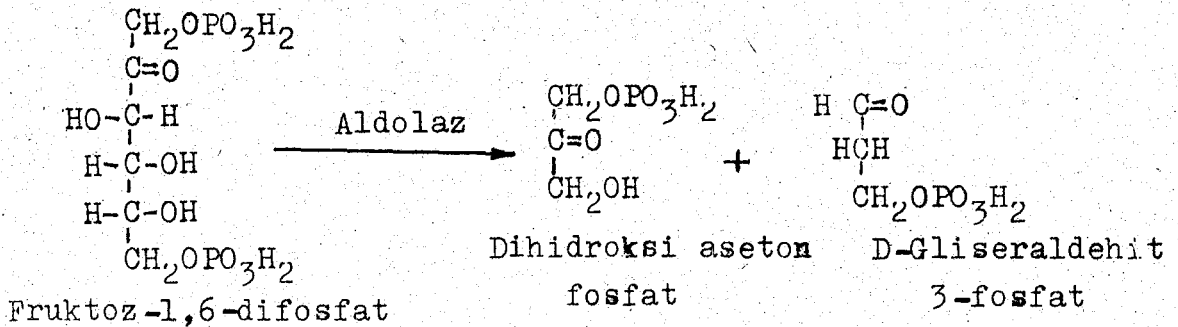


Fruktoz-1,6-difosfat Hesozdifosfataz enziminin katalitik etkisi ile hidroliz olarak , fruktoz-6-fosfata dönüşür. Bu olay glukozun biosentezine zemin hazırlar.



Fruktoz-1,6-difosfatın Dihidroksiaseton fosfat ve gliseraldehit-3-fosfata parçalanması:

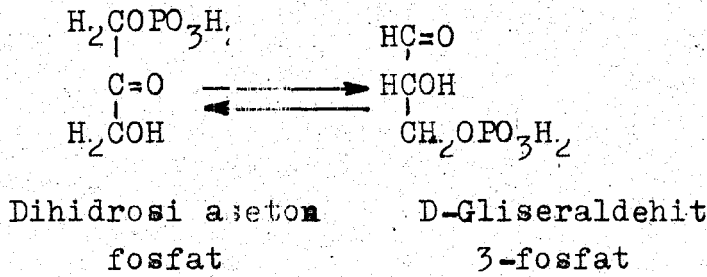
Fruktoz-1,6-difosfat iki mol. trioza parçalanır. Reaksiyonu Adolaz enzimi katalizler.



Aldolaz enzimi tavşan kasından ,kristal halde kolayca ayrılabilir. Enzimin görev yapabilmesi için K^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} iyonlarından birine ihtiyacı vardır. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 65.000 kadardır.

Triozfosfatların oluşumu:

İki mol. triozfosfattan sadece D-gliseraldehit-3-fosfat kimyasal değişikliğe uğramaya devam ederek laktik aside kadar varır. Diğer trioz, gliseraldehit -3-fosfata dönüşerek reaksiyona katılır. Her iki triozun birbirine dönüşümünü Triozfosfat izomeraz enzimi sağlar

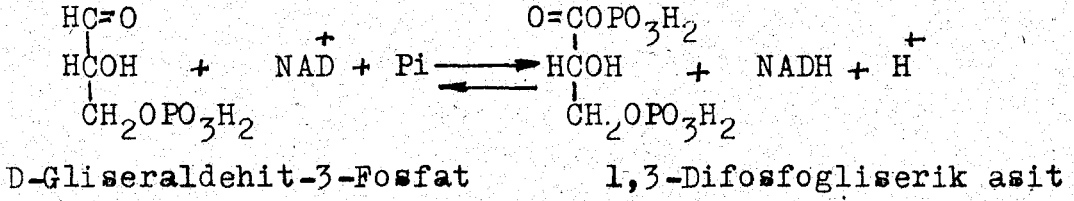


GLİKOLİZİN İKİNCİ SAFHASI

Bu safhada 1 mol. glukozdan elde edilen 2 mol. gliseraldehit-3-fosfat, aşağıdaki bir dizi reaksiyon sonunda 2 mol. laktik aside dönüşür. Bu olay sırasında yüksek enerji bağlı fosfat bileşikleri (ATP) meydana gelir.

Gliseraldehit-3-fosfatın, 1,3-Difosfogliserik aside oksidasyonu:

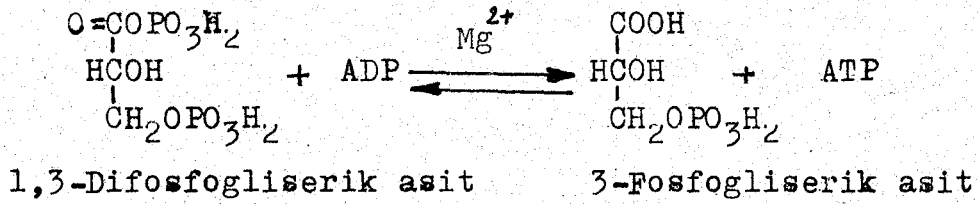
Bu basamak ile anaerobik glikolizin enerji sağlayan basamağı başlamaktadır. Gliseraldehit-3-fosfatta, aldehit grubunun oksidasyonu ile enerji depo edilir. Bu bir oksido-reduksiyon reaksiyonu safhası olup ilk yüksek enerji bağlı fosfat bileşiği meydana gelir. Reaksiyon fosfogliseraldehit dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenir. Bu enzim mayadan yada tavşan kasından kristal halde çıkarılabilir. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 140.000 civarındadır.



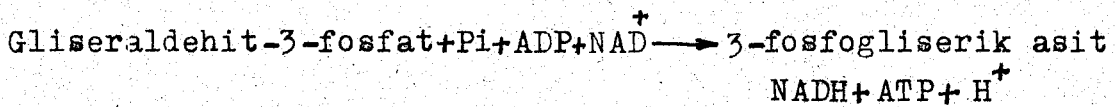
Bu reaksiyonda, gliseraldehit-3-fosfattaki aldehit gurubu karboksil gurubuna yükseltgenir. NAD, reaksiyon sırasında gliseraldehit-3-fosfattaki aldehit gurubundan elektron alarak indirgenir. Glikolitik olay sırasında gliseraldehit-3-fosfattan piruvata elektron taşıyıcı olarak hizmet eder.

Fosfat gurubunun 1,3-Difosfogliserik asitten ADP ye transferi:

Bu reaksiyon ilk defa Warburg ve arkadaşları tarafından açıklanmıştır. Reaksiyonda 1,3-difosfogliserik asit 3-fosfogliserik aside dönüşür. Glikolitik olayın ikinci enerji elde edilen basamağıdır. Reaksiyonu Fosfogliseratkinaz enzimi katalizler.



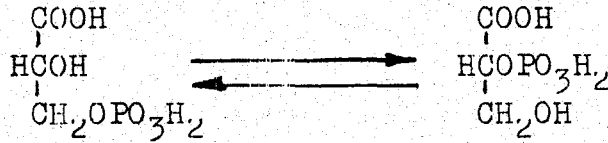
İkinci safhanın ilk reaksiyonu ile bu reaksiyon toplu olarak gösterilecek olursa :



enerji elde edilen ilk reaksiyonda	ΔG^0 : 1.5 kcal mol ⁻¹
" " " ikinci "	ΔG^0 : - 4.5 kcal mol ⁻¹
Toplam	ΔG^0 : - 3.0 kcal mol ⁻¹

3-Fosfogliseric asidin, 2-Fosfogliseric aside dönüşümü:

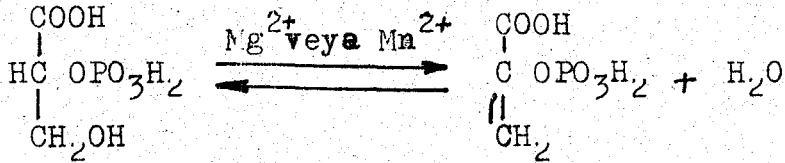
Reaksiyon Fosfoglisero Mutaz tarafından katalizlenir. Bu sırada çok küçük miktarda enerji açığa çıkar.



3-Fosfogliseric asit 2-Fosfogliseric asit

2-Fosfogliseric asidin Fosfoenolpiruvik aside dehidratasyonu:

Bu basamakta meydana gelen dehidratasyon reaksiyonu sonunda fosfoenolpiruvik asit meydana gelir. Reaksiyonu Enolaz enzimi katalizler.



2-Fosfogliseric asit Fosfoenolpiruvik asit

Enzimin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 85.000 kadardır ve Mg^{2+} ve Mn^{2+} iyonlarına ihtiyacı vardır.

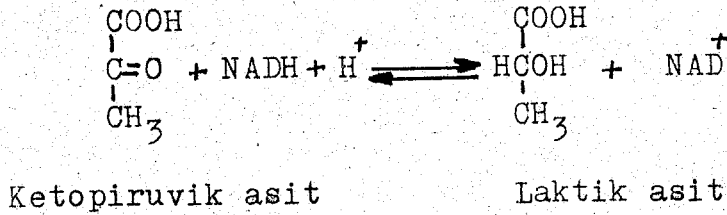
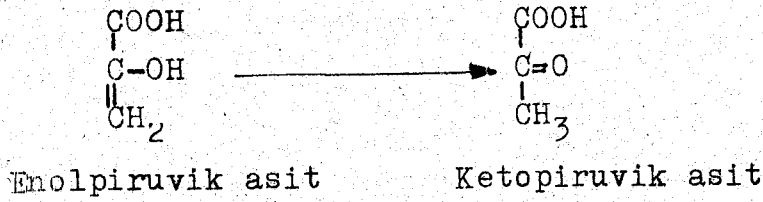
Fosfat gurubunun Fosfoenolpiruvik asitten ADP'a transferi:

Fosfoenolpiruvik asit Piruvatkinaz enzimi ile fosfatını ADP'a vererek ATP oluşumuna neden olur. Glikoliz sırasında ikinci ATP'in oluşum yeri bu reaksiyondur. Enzimin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 250.000 civarındadır ve K^+ , Cs^+ , Rb^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} iyonlarına ihtiyacı vardır. Piruvatki-

naz düzenleyici bir enzimdir. Yüksek konsantrasyonda fosfoenolpiruvik asit , fruktoz-1,6-difosfat tarafından aktive ATP,AMP,sitrat,alanin ve uzun zincirli yağ asidi tarafından inhibe edilir.

Piruvik asidin Laktik aside dönüşümü:

Bu basamak glikolizin son basamağıdır. Reaksiyon laktik dehidrogenaz tarafından katalizlenir. Piruvik asidin laktik aside indirgenmesinde elektronlar, NAD tarafından taşınır. Reaksiyon sırasında çok fazla enerji (-6 kcal mol⁻¹) açığa çıkar. Ancak daha önce enolpiruvik asidin ketopiruvik aside dönüşmesi gerekir(1 ,2).

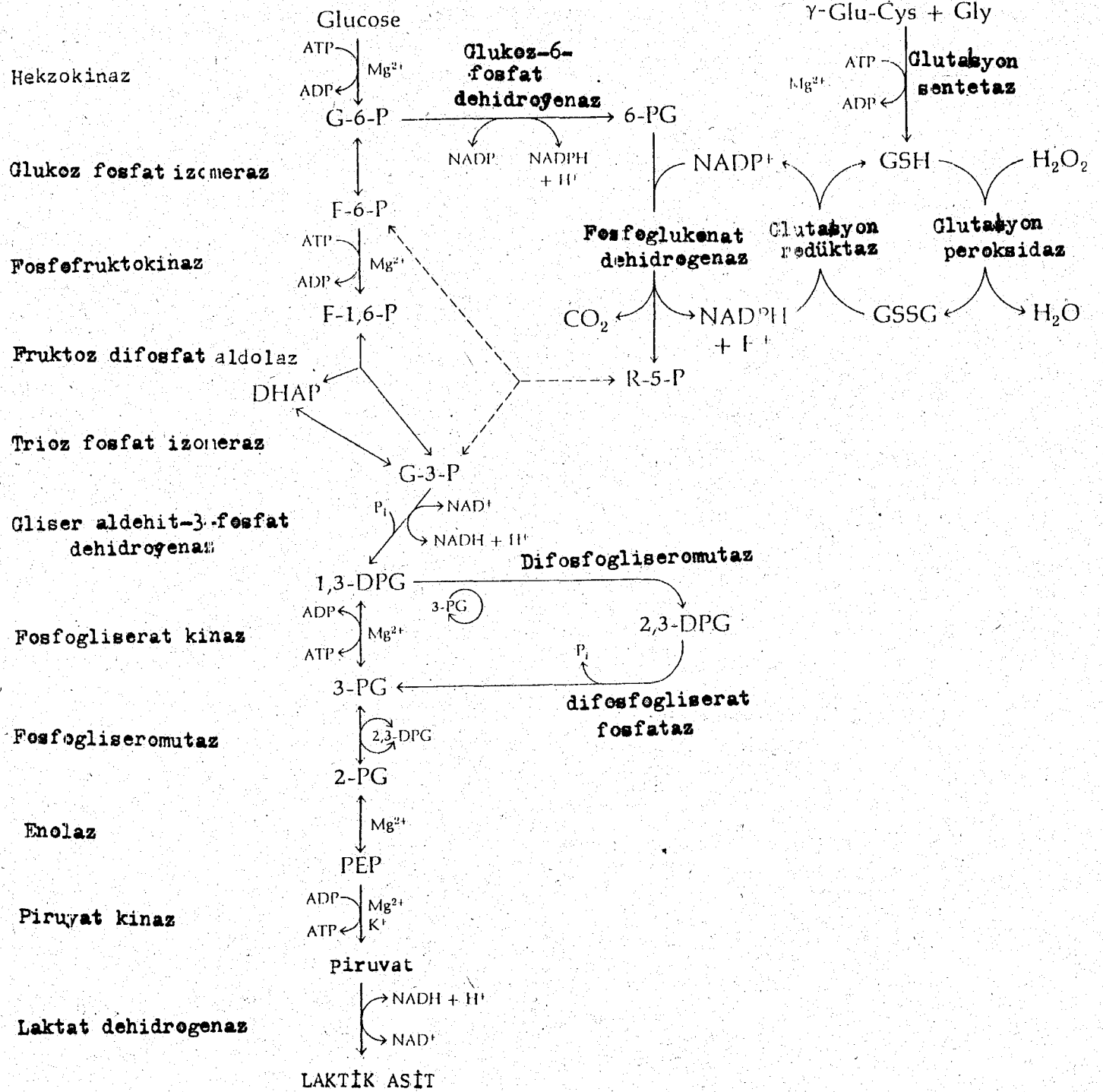
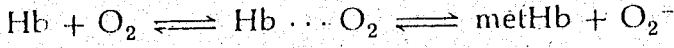


ERİTROSİT VE ÖNEMİ

Eritrositler, özellikle oksijen taşımakla görevli kan hücreleridir. Olgun eritrositler disk şeklinde ve çekirdeksizdir. Ağırlıklarınının % 35'ini hemoglobın teşkil eder. Bu nedenle Eritrositlere hemoglobın taşıyan kan hücrelerinde denir. Şekillerini koruyabilmek ve hemoglobın demirini indirgenmiş halde tutabilmek için enerjiye muhtaçtırlar. Eritrositler enerji ihtiyaçlarını glukoz metabolizmasından (mitokondrileri olmadığı için anaerobik yoldan) sağlarlar.

Erişkinlerde eritrositler tamamen kemik iliğinde yapılır. Fetusde ve bazı patolojik durumlarda kemik iliği dışında dalak, karaciğer, lenf gangliyonları tarafından yapılabilir. Birçok kan hastalığının belirtisi olan anemi sırasında eritrosit sayısı veya hemoglobın miktarı azalır. Böylece kanın oksijen taşıma kapasitesi düşer(4). Ayrıca , bazı hallerde Hemoglobindeki 2+değerli demir iyonu 3+ değere oksitlenerek methemoglobini meydana getirir. Methemoglobın oksijeni taşıyamaz. Dolayısı ile methemoglobın teşekkülü hücrenin canlılığını tehdit eder. Glukozun diğer bir yıkım yolu olan pentoz fosfat yolunda oluşan NADPH enziminin de gerekli olduğu, glutatyon sistemi tarafından methemoglobın oluşumu önlenir. H_2O_2 ayrıca diğer eritrosit proteinlerini ve eritrosit zarını bozar. Hücrede O_2 fazlalığı ile oluşan H_2O_2 , glutatyon peroksidaz ile H_2O 'ya dönüştürülür. Böylece H_2O_2 'in zararlı etkisi birbirine bağımlı metabolik yollarla ortadan kalkmış olur. Şekil 4'de eritrositlerde glikoliz ve pentoz fosfat yolu ilişkisi görülmektedir.

(O₂⁻).



ŞEKİL 4- İnsan eritrositlerinde glikoliz, glikoliz enzimleri ve glutasyon metabolizması arasındaki ilişki (White Handler Smith 1975'den alınmıştır.)

ERİTROSİTLERDE GLİKOLİZ

Eritrositlerin daha önce açıkladığımız fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için enerjiye ihtiyaçları vardır. Mitokondrileri olmadığı için gerekli enerji anaerobik yoldan sağlanır.

Eritrositlerde glikoliz ile bir glukoz molekülünden 2 mol. piruvat veya 2 mol. laktat meydana gelir. Bu sırada 2 mol. ATP açığa çıkar, NAD indirgenmiş şekli olan NADH'e dönüşür. ATP katyon pompalarının işlemesi için gerekli enerjiyi sağlar. Bu pompalar sodyumu eritrosit dışına atarken potasyumu eritrosit içine sokar. ATP, aynı zamanda eritrositin şeklini koruması ve zarın sağlam kalmasında yardımcıdır (17,4).

İnsan eritrositlerinde glikoliz metabolizmasında belirtilen enzimlerin eksikliğine bağlı çeşitli hemolitik anemiler bildirilmiştir. Glikoliz metabolizmasında yer alan ve anemiye neden olan enzimlerden piruvat kinaz eksikliği dışında diğerleri pek nadir olarak görülür. Bu gruptaki anemiler resesif olarak geçerler: eritrositlerde önemli şekil bozukluğu yapmazlar. Bu yolda anemiye neden olan başlıca enzimler şunlardır:

- 1) - Hekzokinaz
- 2) - Glukoz fosfat izomeraz
- 3) - Fosfofruktokinaz
- 4) - Trioz fosfat izomeraz
- 5) - Fosfogliserat kinaz
- 6) - Piruvatkinaz
- 7) - 2,3-Difosfogliseromutaz
- 8) - Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz

Yapılan bir araştırmaya göre glikoliz olayında etkili olan maddelerin denge durumundaki konsantrasyonları aşağıdaki gibidir.

	Konsantrasyon (μM)
Glukoz	5.000
Glukoz-6-fosfat (G6P)	83.000
Fruktoz-6-fosfat (F6P)	14.000
Fruktoz-1,6-difosfat (FDP)	31.000
Dihidroksiaseton fosfat (DHP)	138.000
Gliseraldehit-3-fosfat (GAP)	18.000
3-Fosfogliserat (3PG)	118.000
2-Fosfogliserat (2PG)	29.500
Fosfoenolpiruvat (FEP)	23.000
Piruvat (Pyr)	51.000
Laktat (Lact)	2.900
ATP	1.850
ADP	138.000
Fosfat	1.000

Yukarıdaki maddelerin denge konsantrasyonlarından glikoliz reaksiyonları sırasında her bir kademe için serbest enerji değişimleri stokiometrik olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanabilmektedir.

$$\Delta G: \Delta G' + RT \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b}$$

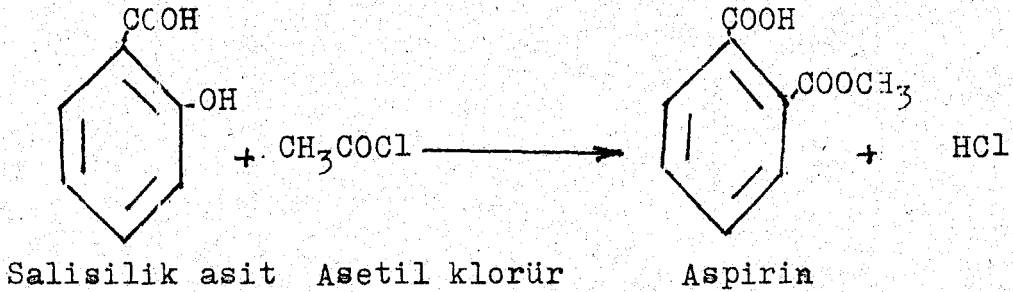
Elde edilen verilerden eritrositlerde glikoli sırasında açığa çıkan serbest enerji miktarında bir dengenin var olduğu, ancak Piruvatkinaz, Hekzokinaz, Fosfofruktokinaz reaksiyonlarında zaman zaman büyük düşüşler meydana gelerek denge durumundan uzaklaşıldığı görülmüştür(1).

ASPIRİN

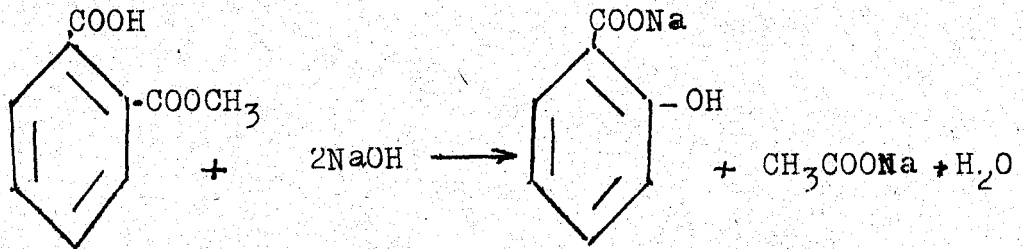
Aspirinin önemi 1927 yılında Hanzlik tarafından ortaya atılmış, 1948 de Greenberg, 1963 de Randall tarafından etkileri açıklanmıştır. Aspirin, günümüzde analjezik, antipiretik ve antienflamatuar olarak çok kullanılan bir ilaçtır.

Orto-hidroksi benzoik asit olan salisilik asit tahriş edici özelliğe sahip olduğundan ancak harici olarak kullanıldığı halde, aspirin ve sodyum salisilat gibi salisilik asit türevleri sistemli olarak organizmaya zarar vermeden kullanılmaktadır. Salisilatlar yapılarındaki salisilik asit ile etkilidir fakat aspirin asetil gurubu ile proteinleri asetilleyerek de etkili olabilmektedir (22)

Aspirinin elde edilme reaksiyonu:



Aspirinin hidroliz reaksiyonu:



A M A Ç

Hücrenin canlılığını sürdürmesi enerjiye bağımlıdır. Hücreler, besinlerden ve havanın oksijeninden sağladıkları enerji ile çeşitli fonksiyonlarını yürütürler. Yapılan çeşitli araştırmalar bunun böyle olduğunu kanıtlamıştır. Bu nedenle çeşitli kimyasal maddelerin veya ilaçların in vitro şartlarda hücrenin enerji metabolizmasına etkisi literatürde önemli bir konu olarak dikkati çekmektedir.

Aspirinin asetil gurubunun , önemli kan hücrelerinden biri olan trombositlere etkisi incelenmiş ve bu ilacın trombosit fonksiyonları üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Bu etkinin ise trombositlerin enerji metabolizması aracılığı olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından incelenerek açıklanmış ve bilhassa glikoliz üzerinde durulmuştur (8,9,10,11,12,13,14).

Biz bu çalışmamızda , aspirinin diğer önemli bir kan hücresi olan eritrositlerin enerji metabolizmasına etkili olup olmadığını araştırmak istedik. Bu amaçla in vitro şartlarda eritrositlerdeki glikolize aspirinin etkisini araştırdık.

YÖNTEM VE GEREÇLER

ERİTROSİTLERİN HAZIRLANMASI

Flörürlü kandan elde edilen eritrositler, 3 kere serum fizyolojik ile hemoliz edilmeden yıkandı. Son yıkamadan sonra eritrosit sayımı yapıldı ve mm^3 'de $2.5 \cdot 10^6$ eritrosit olacak şekilde serum fizyolojik ile sulandırıldı. Bu eritrosit süspansiyonu eşit hacimde iki tüpe ayrıldı. Birine 1/9 oranında aspirin(%30 luk) diğere ise aynı oranda serum fizyolojik ilave edildi. Her iki tüptende glukoz ve laktat tayinleri için örnekler alındı. Hemen sonra enkübasyona terk edilerek iki saat sonra ilaçlı ve ilaçsız eritrosit süspansiyonlarında glukoz ve laktat tayinleri yapıldı.

GLUKOZ TAYİNİ

İlaçlı ve ilaçsız eritrosit süspansiyonlarında glukoz tayini Somogy Nelson yöntemi ile yapıldı (15,17).

Metodun prensibi: Proteinsiz süzüntüdeki şeker, Cu^{++} yi Cu^+ e indirger. Sarı kırmızı çökeltiyi arsenomobildik asit oksitler kendi de daha küçük oksitlere indirgenir. Hasil olan yeşil veya mavi renk Beckman spektrofotometresinde okundu. Bu metodun normal değerleri % 60-100 mg'dır.

KULLANILAN AYIRAÇLAR

1- %5 Çinko sülfat çözeltisi: 50 gr $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ distile suda eritilir ve bir litreye tamamlanır.

2- 0.3 N Baryum hidroksit: 43.7 gr $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ tartılıp distile su ile bir litreye tamamlanır. Sıvı kısmı dekante edilir. Normalitesi titrasyon ile kontrol edildi.

3- Fehling A ve B çözeltileri: Fehling A için 50 gr Na_2CO_3 , 50 gr sodyum potasyum tartarat, 40 gr $NaHCO_3$ ve 400 gr susuz Na_2SO_4 1600 ml distile suda çözülür. Sonra hacmi 2 litreye distile su ile tamamlanır. $37^\circ C$ ' de saklanır.

Fehling B için 155 gr $CuSO_4$ biraz distile suda çözülür. 5 ml derişik H_2SO_4 ilave edildikten sonra distile su ile 1 litreye tamamlanır.

Kullanılacağı zaman A çözeltisinden 9.6 ml , B çözeltisinden 0.4 ml alınıp karıştırılır.

4- Stok glukoz çözeltisi: 1 gr glukoz % 0.2 gr benzoik asit çözeltisinde çözülür ve % 0.2 lik benzoik asit çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlanır.

5- Glukoz çalışma standardı: Stok çözeltisinden 1 ml alınıp %0.2 benzoik asit çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlanır.

6- Renk ayıracı: 900 ml distile suda 50 gr amonyum molibdat çözülür. 42 ml H_2SO_4 , 50 ml % 12'lik disodyum arsenat katılır, karıştırılır. $37^\circ C$ 'de 48 saat bekletilir, koyu rekli şişede saklanır.

DENEYİN YAPILIŞI

Şeker tayini yapılacak eritrosit süspansiyonundan 1 ml alınarak üzerine 15 ml su, 2 ml Ba(OH)₂ eriyiği, 2 ml ZnSO₄ eriyiği katılıp iyice karıştırıldı ve iki dakika sonra süzüldü. Üç Folin tüpü alınıp, birincisine bu süzüntüden 2 ml (deney), ikincisine 2 ml su (ayıraç körü), üçüncüsüne 2 ml glukoz standardı (standart) konulup daha sonra hepsine 2 ml bakır ayıracı pipetlendi. 10 dakika kadar su banyosunda tutuldu. İyice soğutulduktan sonra her birine 2 ser ml renk ayıracı katılıp folin tüpleri distile su ile 25 ml'ye tamamlandı. 530 nm dalga boyunda spektrometrede okundu ve aşağıdaki formüle göre şeker (glukoz) tayini yapıldı.

Numune absorbanası

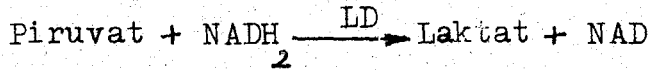
$$\frac{\text{Numune absorbanası}}{\text{Standart absorbanası}} \times 100 : \% \text{ mg Glukoz}$$

Standart absorbanası

ENZİMATİK YÖNTEMLE LAKTAT TAYİNİ

Sigma firmasının Piruvat/ laktat kantitatif tayin seti kullanıldı.

Metodun prensibi: Reaksiyonun prensibini aşağıdaki reaksiyon en iyi şekilde açıklamaktadır.

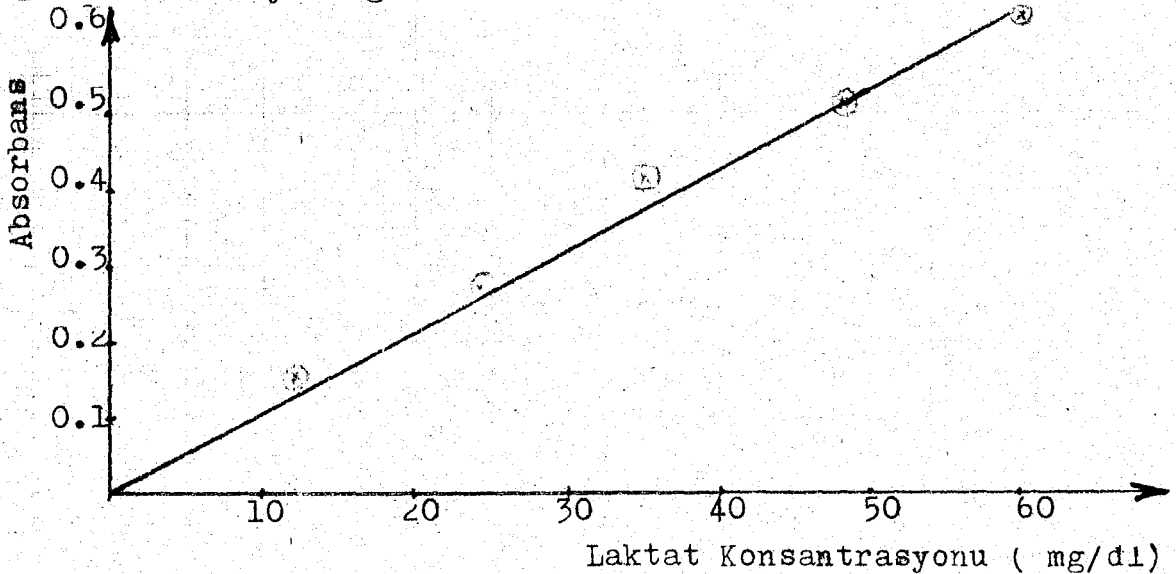


İndirgenmiş nükleotid (NADH) 340 nm'de yüksek absorbanans verdiği halde , yükseltgenmiş nükleotid (NAD) 340 nm'de daha düşük absorbanans vermektedir. Yukarıdaki reaksiyona göre laktat miktarını ölçmek için NAD'in fazlası konur. Bu durumda reaksiyon sağdan sola doğru gider. Ölçüm sırasın-

da absorbansın artma nedeni , artmış olan NADH miktarı dolayısı ile dir. Bu da gerçek laktat miktarı ile doğru orantılıdır. Bilinen standardın değişik konsantrasyonları ile yapılan ölçümlerle çizilen standart eğriden, ölçmediğimiz laktat örneğinin değeri kantitatif olarak hesaplanabilir.

DENEYİN YAPILIŞI

1 ml laktat miktarı tayin edilecek eritrosit süspansiyonu, 2 ml % 8 lik perklorik asit içeren santrifüj tüpüne konur. 5 dakika buz içinde bekletilir. Bu sırada örnekteki mevcut olan proteinler çöker. 10 dakika 1500rpm'de santrifüj edilir ve süpernatant laktat tayini için kullanılır. Bu amaçla N.D içeren şişeye , 2 ml glisin tamponu, 4 ml distile su , 0.1 ml laktat dehidrogenaz ilave edilip karıştırıldı. Bu karışımdan 2.8 ml blank için, 2.8 ml ölçülecek numune için ayrıldı. Blank için ayrılana 0.2 ml % 8 lik perklorik asit ilave edildi. Numune için ayrılana ise 0.2 ml yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan süpernatant dan ilave edildi. Her iki kuvet 37°C'de 30 dakika enkübe edildi Blank referans olarak kabul edilerek 340 nm'de numunenin absorbansı okundu . Standardın değişik konsantrasyonları ile aynı şekilde kalibrasyon eğrisi çizildi. Numunenin değeri kalibrasyon eğrisinden okundu.



ŞEKİL 5- Laktat değerleri için çizilmiş kalibrasyon eğrisi.

B U L G U L A R

TABLO 1- Eritrosit süspansiyonlarında başlangıç ve enkübasyonun 2. saatlerinde elde edilen glukoz değerleri (mg/dl).

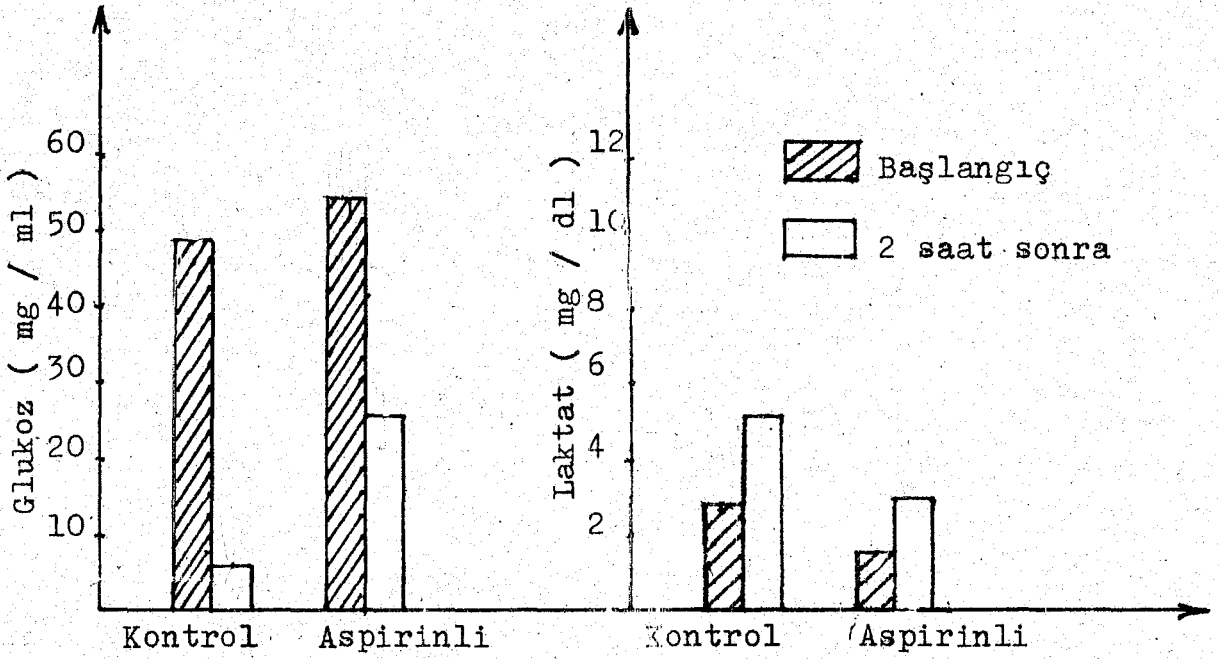
Deneyler	Kontrol			Aspirinli		
	Başlangıç	2. saat	%Azalma	Başlangıç	2.saat	%Azalma
1	48.42	5.26	89.13	50.42	26.31	47.81
2	32.00	27.00	15.62	32.00	32.00	0
3	25.00	5.00	80.00	30.00	28.00	6.66
4	49.90	36.00	27.85	52.00	43.00	17.30
5	43.40	38.00	12.44	52.00	47.00	9.61
6	32.00	27.00	15.62	30.00	30.00	0
7	31.20	15.20	51.28	31.30	27.00	13.73
8	26.00	21.00	19.23	28.00	26.00	7.14
Ort.	35.99	21.80	38.89	38.21	32.41	12.78
SD	9.86	12.67	30.65	12.16	8.20	15.02
SE	2.46	3.16	7.66	4.29	2.05	3.75
t	8.58			1.68		
p	$p < 0.001$			$p < 0.1$		

TABLO 2- Eritrosit süspansiyonlarında başlangıç ve enkübasyonun 2. saatlerinde enzimatik yöntem ile elde edilen laktat değerleri (mg/dl).

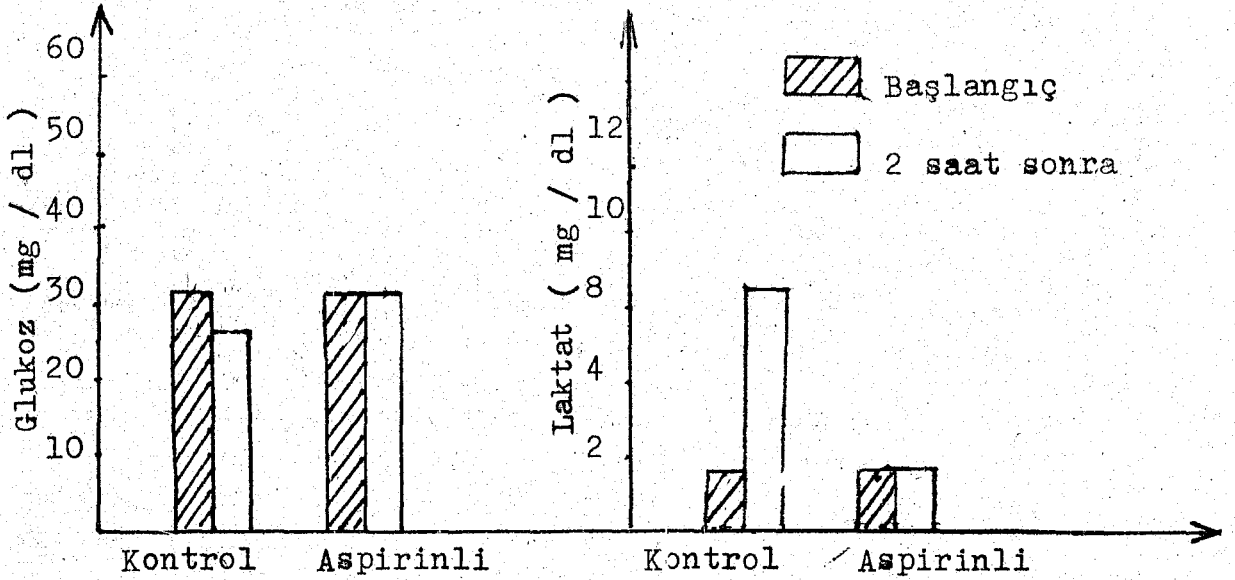
Deneyler	Kontrol			Aspirinli		
	Başlangıç	2.saat	%Artma	Başlangıç	2.saat	%Artma
1	1.90	5.20	173.68	1.65	2.50	51.51
2	1.78	6.60	274.15	1.92	1.92	0
3	1.95	6.20	217.94	1.99	2.90	45.72
4	2.00	4.20	110.00	2.00	2.50	25.00
5	2.10	5.60	166.66	2.40	3.80	58.33
Ort.	1.94	5.56	188.48	1.99	2.71	36.11
SD	0.11	0.92	123.00	0.26	0.71	23.72
SE	0.04	0.41	55.00	0.11	0.31	10.60
t	10.46			0.73		
p	$p < 0.001$			$p < 0.30$		

TABLO 3- Aynı zamanda hazırlanmış beş ayrı eritrosit süspansiyonunda kontrol ve aspirin ilavesinden sonraki glukoz ve laktat değerleri (mg/dl).

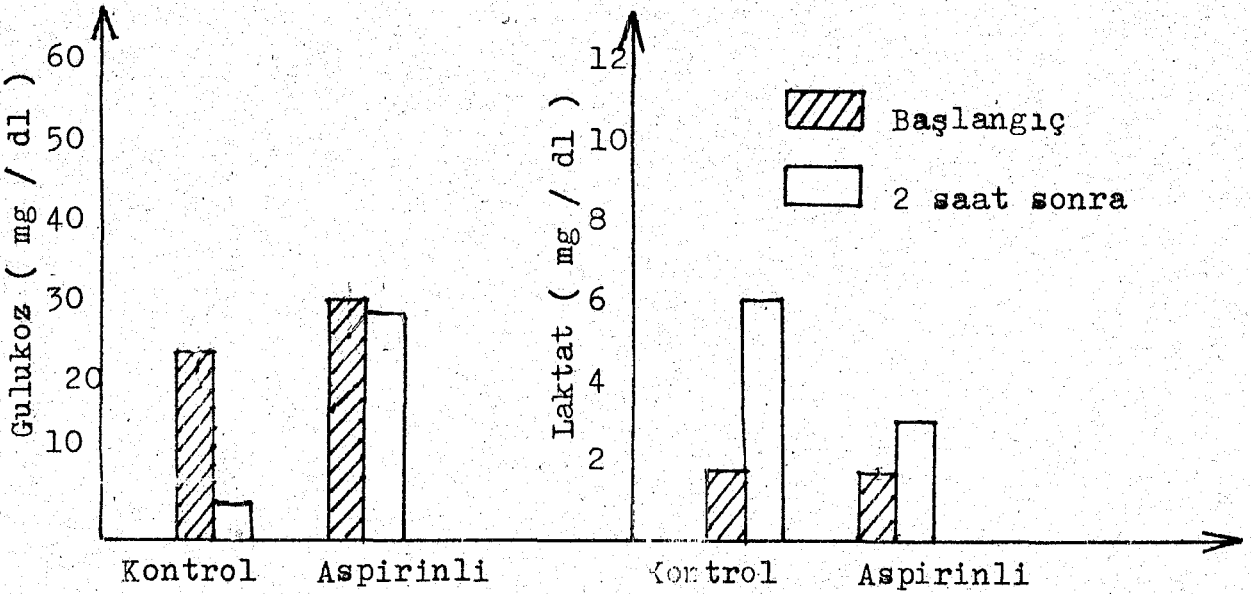
Olgular		Kontrol		Aspirinli	
		Glukoz mg/dl	Laktat mg/dl	Glukoz mg/dl	Laktat mg/dl
1	Başlangıç	48.42	1.90	50.42	1.65
	2. Saat	5.26	5.20	26.31	2.50
2	Başlangıç	32.00	1.78	32.00	1.92
	2. Saat	27.00	6.60	32.000	1.95
3	Başlangıç	25.00	1.95	30.00	1.99
	2. Saat	5.00	6.20	28.00	2.90
4	Başlangıç	49.90	2.00	52.00	2.00
	2. Saat	36.00	4.20	43.00	2.50
5	Başlangıç	43.40	2.10	52.00	2.40
	2. Saat	38.00	5.60	47.00	3.80



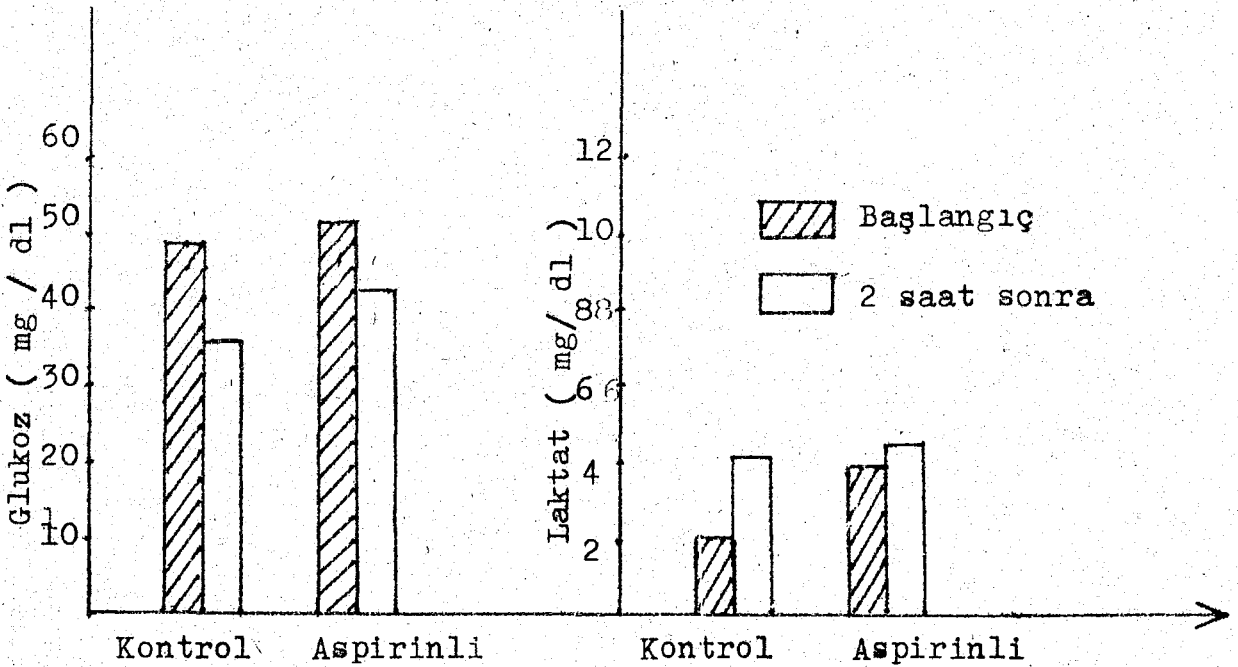
Şekil 6 - Eritrosit süspansiyonlarında kontrol ve aspirin ilavesinden sonra 1. olgudaki başlangıç ve 2 saat sonra elde edilen glukoz ve laktat değerleri.



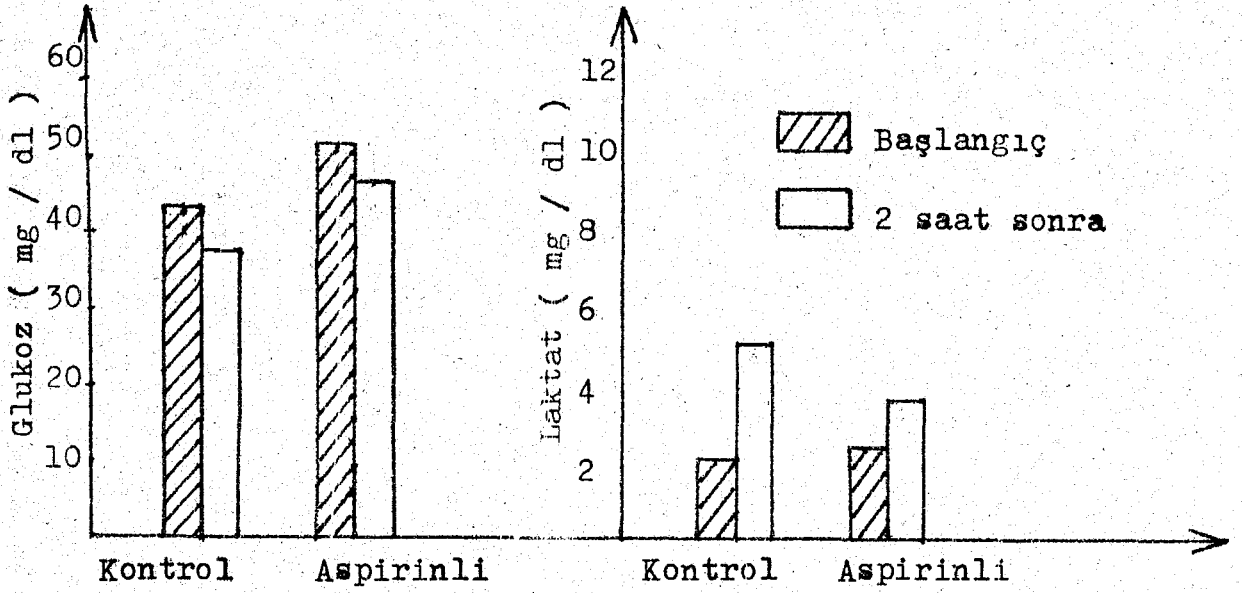
Şekil 7 - Eritrosit süspansiyonlarında kontrol ve aspirin ilavesinden sonra 2. olgudaki başlangıç ve 2 saat sonra elde edilen glukoz ve laktat değerleri.



Şekil 8 - Eritrosit süspansiyonlarında kontrol ve aspirin ilavesinden sonra 3. olgudaki başlangıç ve 2 saat sonra elde edilen glukoz ve laktat değerleri.



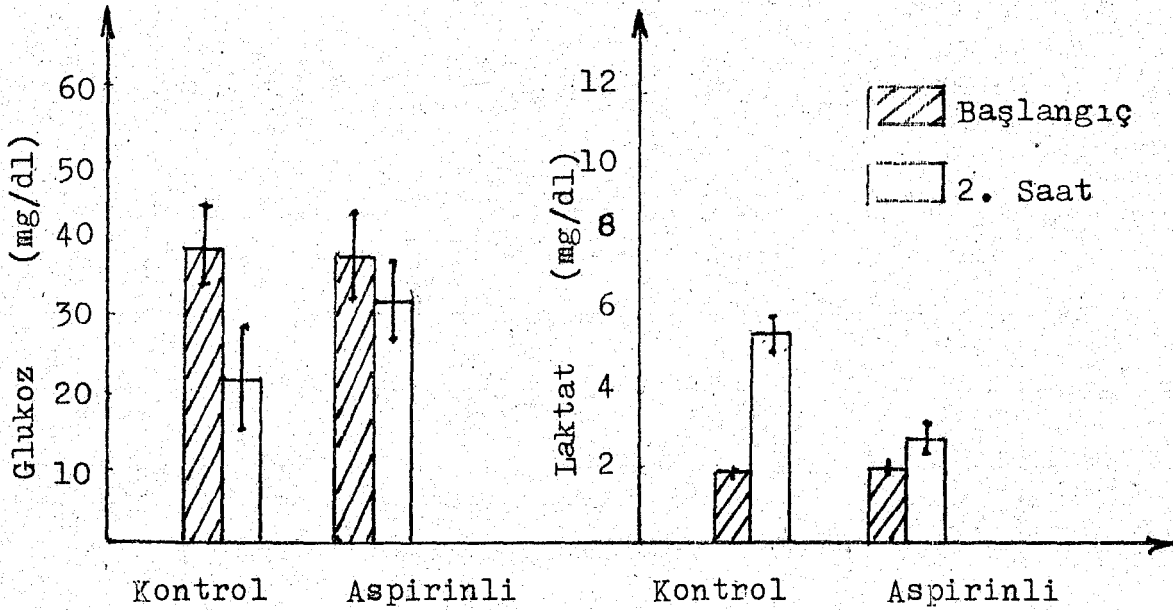
Şekil 9 - Eritrosit süspansiyonlarında kontrol ve aspirin ilavesinden sonra 4. olgudaki, başlangıç ve 2 saat sonra elde edilen glukoz ve laktat değerleri.



Şekil 10- Eritrosit süspansiyonlarında kontrol ve aspirin ilavesinden sonra 5. olgudaki, başlangıç ve 2 saat sonra elde edilen glukoz ve laktat değerleri.

TABLO 4- Eritrosit süspansiyonlarında başlangıç ve enkübasyonun 2. saatlerinde elde edilen ortalama glukoz ve laktat değerleri (mg/dl).

	Kontrol		Aspirinli	
	Glukoz	Laktat	Glukoz	Laktat
Başlangıç	35.99	1.94	38.21	1.99
2. Saat	21.80	5.56	32.41	2.71



Şekil 11- Eritrosit süspansiyonlarında kontrol ve aspirin ilavesinden sonra tüm olgulardaki, başlangıç ve 2 saat sonra elde edilen ortalama glukoz ve laktat değerleri.

T A R T I Ő M A

Bulgular bölümünde Şekil 6,7,8,9,10,11 ve tablo 1,2,3,4 de görüldüğü gibi, yüksek dozda aspirin, eritrositlere glukoz girişini anlamlı ölçüde azaltmaktadır.

Eritrositler özellikle oksijen taşımakla yükümlü kın hücreleri olmasına rağmen, içinde çeşitli biokimyasal olaylar gerçekleşir. Eritrositlerin normal Şekli olan konkav disk Şeklini koruyabilmesi için, katyon pompasının çalışması gerekir. Bu pompa çalıştığında sodyum dışarı atılır. Bu olay glikoliz esnasında sağlanan ATP ile gerçekleşir(4). Eğer glikolizden yeterli enerji sağlanmazsa yukarıda sözünü ettiğimiz olay gerçekleşmez, dolayısı ile eritrositler normal Şeklini koruyamaz bu da eritrosit zar bozukluğuna neden olur. Buna bağılı olarak klinikte eritrosit fonksiyon bozukluğu ve anemiler(kansızlık) görülür.

Yaptığımız bu araŐtırmada, aspirinin etkisi ile eritrositlere glukoz girişi azalınca laktat artışında da kontrole göre bir azalmanın olduğunu saptadık (Şekil 6,7,8,9,10,11 Tablo 2,3,4). Bu incelemeye dayanarak da aspirinin eritrositlerde glikolizi inhibe ettiğini düşündük. Eritrositlerde glikoliz diğer hücrelere göre bir üstünlük taşımaktadır. Bu hücrelerin mitokondrileri olmadığı için gerekli ATP'yi oksijensiz Şartlarda glikolizle elde edebilmektedir. Başka bir deyiŐle sitrik asit döngüsü ile ATP elde edilememektedir.

Eritrositin yaklaşık % 35'ini kapsayan hemoglobin, akciğerlerden dokulara oksijen, dokulardan akciğere CO₂ taşır. hemoglobinin bu görevini yapması için, içindeki demirin +2 değerli olması gerekir. Bazı istenmeyen Şartlarda demir + 2 değer-

den +3 değere oksitlenerek methemoglobin teşekkül eder ve hemoglobin görevini yapamaz. Methemoglobin teşekkülünü önleyecek glutatyon sistemi de yine ATP gerektiren çeşitli metabolik yollardan sonra oluşarak, hücredeki bu zararlı etkiyi önler. Yine eritrositlerdeki glikoliz esnasında bir ara ürün olarak meydana gelen 2,3-difosfogliserat da hemoglobinin oksijeni dokulara kolayca bırakmasını sağlar.

Eritrositlerdeki Embden-Meyerhof yolunun yani glikolizin gerçekleşmesi Şekil 4'de görüldüğü gibi 11 enzimin fonksiyonları ile gerçekleşir. Klinikte bu enzimlerden birinin eksikliği ile glikolizin zarara uğradığı yani ATP üretilmediği görülür. Enzim hangi basamağı kataliz ediyorsa o basamak inhibe olacağı için o noktada ara ürünlerde bir artma ve azalma söz konusu olacağından hücredeki metabolit miktarı değişecek, aynı zamanda ATP üretimi azalacaktır. Bunun sonucu olarak da, bu enzim eksikliği hastalıklarında eritrositlere ait çeşitle klinik bozukluklar ortaya çıkmaktadır (4).

Görülüyorki, ister ilaç etkisi ile, ister herhangi bir enzim eksikliğine bağlı olarak glikolizin engellenmesi eritrositlerde çeşitli şekil bozuklukları veya hemoglobin taşınmasına engel olacak kusurlar ortaya çıkarır.

Ulutin ve arkadaşları (14), aspirinin yalnız laboratuvar şartlarında değil, in vivo şartlarda da glukozun trombositlere girişini engellediğini, dolayısı ile laktat oluşumunda bir azalma izlediklerini bildirmişlerdir. Trombositlerin başlıca fonksiyonlarından biri olan agregasyon olayı kan pıhtılaşmasında çok etkilidir (8,9). Trombositlerden ADP çıkışı ile kanda pıhtılaşma gerçekleşir. ADP çıkışı ise, enerji gerektiren bir olaydır. Trombosit hücresinde glikoliz olayı enerji açığa çıkaran metabolik yol olması nedeni ile önem taşımaktadır. Aspirin trombositlerde glikolizi inhibe ederek ATP oluşumunu azaltır. Buna bağlı olarak agregasyon olayını hızlandıran ADP çıkışı da azalır (10). Trombositlerde ADP'nin azalması bir taraftan kanamayı artırarak normal kişilerde zararlı olabilecek durum ortaya çıkarırken, diğer taraftan pıhtı oluşumuna engel o-

larak, bazı durumlarda yararlı bir etki oluşturabilmektedir. Bu nedenle aspirinin trombositlere etkisi klinikde tedavi amacı ile kontrollü olarak kullanılır (11,12,13).

Bulgularımıza göre; eritrositlere glukoz girişi azaldığı için , eritrositlerde glikoliz, dolayısı ile enerji oluşumu azalmaktadır. Laktat oluşumunda kontrol'e göre saptanan anlamlı azalma ile de glikolizin önlendiğini düşünüyoruz. Bunun nedenleri, aspirinin bu olayı nasıl gerçekleştirdiği, çeşitli yönlerden tartışılabilir. Aspirin , eritrosit zarında bulunan glukoz taşıyıcı proteinleri asetillettiği için glukoz içeriye giremiyebilir, prostoglandinler üzerinde etkili olabilir. Aspirin bilindiği gibi proteinlerin lizin kalıntılarına asetilleyen bir maddedir (20,22). Aspirinin salisilat grubu asetil grubu ile birlikte , sterik engelleme yaparak glukozun nonenzimatik olarak kollajene bağlanmasını engeller (18,19). Aspirinin bu etkisi diyabetin komplikasyonlarını önleyici bir etki olarak düşünülüp tedavi amacı ile kullanılabilir. Çünkü kollajenin nonenzimatik glikozillenmesi önlenip çapraz bağlanma sayısı azalacak dolayısı ile diyabette istenmeyen bir komplikasyon olan kollajenin yapısı daha az bozulacaktır. Bazı çalışmalarda ise, aspirinin hipoglisemik etkisi olduğu bildirilmektedir(21).

Çalışmalardan anlaşılacağı gibi aspirinin hücre fonksiyonlarına etkisi bazen olumlu yönde, bazen de olumsuz olabilmektedir (21). hücre veya vucuttaki proteinlere yaptığı olumlu etkiler değerlendirilmekte ve tedavi amacı ile kullanılmaktadır. Ancak olumsuz etkilerinin de bilinerek yüksek dozlarından kaçınılması zorunludur.

Sonuç olarak, eritrositlerde glikolizin normal olarak işlemesi , hücrenin canlılığını koruması dolayısıyla fonksiyonlarını yapabilmesi için gerekli bir olaydır. Yukarıda tartışıldığı gibi, glikolizin herhangi bir nedenle engellenmesi hücrenin hayati görevini aksatır. Bizim çalışmamızda gösterdiğimiz gibi, aspirin, eritrositlerde glikolizi engellemektedir. Ancak biz invitro şartlarda bu etkiyi gördük. Sürekli olarak insanlar tarafından tedavi amacıyla

kullanılan aspirinin dozu daha dūşüktür. Fazla miktarda ve in vivo şartlarda alınan aspirinin eritrosit metabolizmasına etkisi , kanımızca incelemeğe değer bir konudur.

Ö Z E T

Eritrositler, mitokondrileri olmadığı için gerekli olan ATP'ı oksijensiz şartlarda , glikoliz yolu ile elde edebilmektedirler. Glikoliz olayında 1 mol glukozdan 2 mol laktik asit meydana gelirken, 2 ATP lik enerji elde edilir.

Aspirinin trombositlerde glikolizi inhibe ettiği daha önce yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. Biz aspirinin eritrositlerde de aynı etkiyi yapabileceği düşüncesinden yola çıktık. Önce belli konsantrasyonda glukoz çözeltisi ilave edilmiş olan eritrosit süspansiyonlarında başlangıca göre 2. saatte glukoz değerlerinin nasıl değiştiği incelendi. Aynı anda aspirinli süspansiyonda elde edilen değerlerle karşılaştırıldı. Aspirinli süspansiyonda kontrole göre saptanan anlamlı azalma, glikolizin inhibe edildiğini göstermektedir. Aspirinin bu etkisini glukoz tayini ile gördükten sonra , aynı süspansiyonlarda glukoz ile birlikte laktik asit tayini de yaparak olayı başka yönden de kanıtlamak istedik.

Yatığımız bu çalışmalar sonunda aspirinli süspansiyonda glukoz kullanımının yavaşladığını, daha az laktik asit teşekkül ettiğini tesbit ettik. Sonuç olarak aspirinin, eritrositlerde glikolizi inhibe ettiği görüldü.

S U M M A R Y

Since erythrocytes don't have any mitochondria, they can produce the necessary ATP by means of glycolysis 1 mole glucose is converted into 2 moles of lactic acid and 2 ATP is also produced.

It has been shown in the previous studies that aspirin inhibits glycolysis in platelets. We thought that aspirin can have same effect on erythrocytes too. First, the changes in glucose concentration in erythrocytes suspensions where definite amount of glucose was added, it was determined in 2 hours time, at the same time it was also compared with the quantities obtained from aspirin treated suspension. Significant decrease was observed in the erythrocytes suspension with aspirin and this shows indirectly inhibition of glycolysis in erythrocytes with aspirin. In addition, the lactic acid production was also determined to confirm the above results and as expected aspirin inhibited the formation of lactic acid significantly in erythrocytes.

In conclusion, aspirin inhibits the utilization of glucose and concomitant with this, it also inhibits lactic acid formation. Therefore glycolysis is inhibited by aspirin in erythrocytes.

K A Y N A K L A R

- 1- LENİNGER, A.L.: Biochemistry. 2. baskı. Worth kitapevi U.S.A. s.417 , (1979).
- 2- BİNGÖL, G.: Biokimya , Ankara Üniversitesi yayınları, s.46 (1983).
- 3- HARPER, M.A.: Review of physiological chemistry, s. 461, (1974).
- 4- BERKARDA, B., MÜFTÜOĞLU, A.Ü., ULUTİN, O.: Kan hastalıkları. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, s.73, (1981).
- 5- WHITE, A., HANDLER, P., SMITH, R. ve LEHMAN, R.I.: Principles of Biochemistry, Mc graw Hill Comp.s.1269, (1978).
- 6- MAZUR, A. ve HARROW, B.: Text book of Biochemistry, Saunders kitapevi, s.263, (1971).
- 7- LATNER, L.A.: Clinical Biochemistry, 7. baskı, Saunders kitap- evi, s. 260, (1975).
- 8- ULUTİN, O.N., EMEKLİ, N.B. ve YARDIMCI, T.U.: The effect of as- pirin and indobufen on platelet glikoprotein and protein synthesis Heamostasis, 12,1-2, s. 57, (1982).
- 9- BUCHANAN, M.R., DEJANA, E., MUSTAND, J.F. ve HIRSH, J.: Prolonged inhibition of PGI₂ production and associated increased trombogenic effect in arteries after aspirin administration.

Thrombosis and Haemostasis, 1,42,60,(1979).

- 10- PATRICK,G.C.,RUSSO,M. ve HUFNAGE,H.:Aspirin dosage and antitrombotic effect. Thrombosis and Haemostasis 1,42,60 (1979).
- 11- TREMOLI,E.,MADEMA,P.,MARAZONI,F.M. ve COLLI,S.: Differential effect of asetilsalisilic acid on platelet and leucocyt Thromboksen Formation. Thrombosis,12,1,182, (1982).
- 12- EMEKLİ,N.B.,ULUTİN,O.N.: Aspirin ve indobufenin glukoprotein sentezine etkisi. XVIII. Ulusal Hematoloji Kongresi Hacettepe Üniversitesi ve Türk Hematoloji Derneği. 2-4 Aralık,Ankara, (1982).
- 13- EMEKLİ,N.B.,ULUTİN,O.N.: The effect of cyclooxygenase inhibitors on the glycoprotein synthesis. International İstanbul Symposium, Sermet Matbaası, s.89, (1982).
- 14- ULUTİN,Ş.B.,AKTUĞLU,G.,BECİT,N. ve ULUTİN,O.N.: In vivo ve in vitro tecrübelerde aspirinin glukoz utilizasyon ve laktat formasyonuna etkisi. Hematoloji 11, s.67, (1971).
- 15- SOMOGY,M.: Determination of Blood Sugar. J. Biol. Chem. 160,69, (1945).
NELSON,N.: Photometrik adaptation of Somogy Mathot for the determination of gluköz. J.Biol. Chem. 153, 375, (1944).
- 16- MANN,F.G., SAUNDERS,B.C.: Introduction to Practical Organic Chemistry. 2. Baskı, s.71, (1964).
- 17- YENSOM,M.: Klinik Biokimya laboratuvar çalışmaları, Sanal Matbaası, s. 340, (1982).
- 18- MALBENAN,S.HANDELSMAN,D.J. , DELIBRASE,T.: The effect of salisilates on non enzimatik glycosylation and thermal stability of collagen in Diabetic Rats. Diabetes, 33, 745-751, (1984).

- 19- HEWINS, D. PACKARD, D.N., CRAWFORD, I.P. ve RATT, R.S.: Structure change in human serum albumin induced by ingestion acetylsalicylic acid. J.Clin Invest. 42, 536, 542 (1969).
- 20- ARKINSON, D.C. ve COLLER, H.C.: Salicylate molecule mechanism of Therapeutic action. Pharmacol Chemoth. 17, 233 (1980).
- 21- BARON, S.H.: Salicylate as hypoglycemic agent. Diabets, care. 5, 64-71, (1971).
- 22- GOODMAN ve GILMAN's: The Pharmacological Basis of Therapeutic. Mac Millian kitabevi, Newyork s. 688 (1980).