

T.C.
Marmara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya Anabilim Dalı

20740

**TROMBOSİTLERDE GLUKOZ BAĞLAYICI PROTEİNİN
ELDESİ, KİNETİĞİ, SAFLAŞTIRILMASI VE
DEFİBROTİDİN NORMAL VE ATEROSKLEROZLU
OLGULARDA GLUKOZ TRANSPORTUNA İN VİVO ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Ecz.Bahar Bezer-GÖKER

DANIŞMAN: Prof.Dr.Turay Yardımcı
M.Ü.Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

İstanbul - 1992

Bu tezin her aşamasında değerli katkı ve yardımlarını gördüğüm sayın hocam Prof.Dr.Turay Yardımcı'ya, aterosklerozlu olguların temininde yardımcı olan ve değerli fikirleriyle teze katkıda bulunan sayın hocamız Prof.Dr.Orhan N.Ulutine ve başta Ecz.Azize Yaman olmak üzere tüm M.Ü.Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim elemanlarına en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II. GENEL BİLGİLER.....	3
A. Trombositler.....	3
1. Trombosit fonksiyonları.....	3
2. Trombosit biyokimyası.....	4
3. Trombosit membranı.....	7
B. Transport şekilleri.....	7
C. Trombosit transport şekilleri.....	12
D. Ateroskleroz ve trombosit değişimleri.....	21
E. Defibrotid.....	22
III. ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	24
A. Maddeler.....	24
B. Araçlar.....	24
C. Olguların seçimi.....	25
D. Trombosit eldesi.....	25
E. Trombositlerde zamana bağlı glukoz transportu ve birikimi.....	26
F. Glukoz bağlayıcı proteinin ozmotik şok yöntemi ile eldesi ve saflaştırılması.....	27
G. Glukoz bağlayıcı proteinin deterjanla membrandan eldesi ve saflaştırılması.....	27
H. Glukoz bağlayıcı protein aktivitesinin HPLC yöntemiyle tayini.....	28
I. Glukoz bağlayıcı protein aktivitesinin gel filtrasyon yöntemi ile tayini	28
J. Glukoz konsantrasyonuna bağlı bağlayıcı protein kinetiği.....	29
K. Defibrotidin membran glukoz transportu üzerine in vivo etkisi.....	30
L. İstatistiksel analizler.....	30
M. İndirgenmiş SDS-6H poliakrilamid gel elektroforezi.....	31

IV. BULGULAR	33
A. Normal ve aterosklerozlu olgularda zamana bağlı, glukoz transportu ve birikimi	33
B. Ozmotik Şok sıvısında glukoz bağlayıcı protein aktivitesi	34
C. Trombosit membranının deterjan madde ile solubilizasyonu ve glukoz bağlayıcı proteinin saflaştırılması	41
D. Ozmotik Şok sıvısından elde edilen bağlayıcı protein kinetiği	42
E. Glukoz bağlayıcı proteinin saflaştırılması	45
F. Defibrotidin membran glukoz transportuna in vivo etkisi	45
G. LMW heparinin glukoz transportuna etkisi	49
H. Trombosit membran protein profiline in vitro defibrotid etkisi	49
I. Çeşitli hastalıklarda trombosit glukoz transportu	57
V. TARTIŐMA	59
VI. ÖZET	65
VII. SUMMARY	67
VIII. KAYNAKLAR	69
IX. KISALTMALAR	84

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Bugün ölüm nedenlerinin başında gelen ateroskleroz patogenezinde endotel hücresi yanında trombositlerin rolü çok büyüktür. Aterosklerozlu şahısların trombositlerinde hiperadezyon, hiperagregasyon ve hipersekresyon gibi trombosit fonksiyonlarındaki bozukluklar yanında özellikle trombosit membranındaki değişimler dikkati çekmektedir.

Agregasyon ve sekresyon gibi trombosit fonksiyonları hücrenin metabolik enerjisine bağlıdır. Bu enerjinin glikolizis yoluyla elde edilmesi ön planda gelir. Glikolizis hızının kontrol noktalarından biri glikolitik yıkımın başlangıç maddesi olan glukozun trombosit membranından trombosit sitoplazmasına transportudur.

Aterosklerozda trombosit fonksiyonlarının işbirliğinde ve kontrolünde trombosit membranının bütünlüğünün önemli bir yeri vardır. Yine aterosklerozda trombosit membranında gözlenen bazı değişiklikler rapor edilmiştir. Bu değişiklikler arasında; glukoz ve araşidonik asit aktif transport sistemindeki bozukluklar(1,2), membran fosfolipid ve glikoprotein dağılımındaki farklılıklar(3,4), γ -glutamil transferaz eksikliği(5) sayılabilir.

Aterosklerozlu hastaların trombositlerinde görülen glukoz aktif transport sistemindeki bozukluğun diabetes mellitus tip I'de olmadığı, aterosklerotik değişiklikler gösteren diabetes mellitus tip II'de bulunduğu gösterilmiştir(6).

Aktif transport sisteminden sorumlu glukoz bağlayıcı aktivite gösteren bir protein fraksiyonu soğuk ozmotik şok yöntemiyle elde edilmiş, ayrıca aterosklerotik olguların trombositlerinde şok sırasında glukoz bağlayıcı protein aktivitesinin bulunmadığı gösterilmiştir(7,8).

Glukoz transportunun diğer hücrelerde olduğu gibi trombositlerde de çok önemli olduğu ve hücrenin metabolik enerjisinin temini için bir kontrol noktası olduğundan, çalışmamızda normal olguların trombositlerindeki glukoz bağlayıcı proteinin membrandan deterjan madde ile direkt eldesi ve soğuk ozmotik şok yöntemi ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Glukoz bağlayıcı protein aktivitesinin kinetiği ve bu proteinin saflaştırılması da bu çalışmada planlanmıştır.

Ayrıca yeni bir antitrombotik ilaç olan defibrotidin trombosit glukoz aktif transport sistemine normal ve aterosklerozlu şahıslarda in vivo etkisi incelenmiştir.

II. GENEL BİLGİLER

A. TROMBOSİTLER:

Trombositler kanın şekilli elementlerinin en küçüğü olup kemik iliğinde megokaryositlerde gelişirler. Alt aşamadaki canlılarda çekirdekli olup memelilerde çekirdeksizdirler. Dolaşımında disk şeklinde bulunurlar; buradan uzaklaştırıldığında küresel şekle dönüşürler. Elektron mikroskopu ile yapılan çalışmalar trombositlerin mitokondri, ribozom ve endoplazmik retikulum içerdiklerini göstermiştir. DNA sentezi yoktur ancak protein sentezi vardır. Trombositler zengin granüllere ve yüzeyle sitoplazma arasında bağlantı sağlayan kanaliküler sistemlere sahiptirler(9).

1. Trombosit Fonksiyonları

Trombositler hemostazda önemli rol oynarlar. Hemostazdaki etkilerini kendilerine ait üç çeşit fonksiyonları ile gerçekleştirirler. Bu fonksiyonlar: adezyon, agregasyon ve sekresyondur. Damar yaralanmasında bazal membran, mikrofibriller, kollagen gibi endotel tabakanın altındaki vasküler dokulara trombositler yapışırlar (adezyon). Yapışan trombositler uyarılarak bir takım maddeleri (ADP, serotonin) dış ortama verirler (sekresyon). Salgılanan ADP agregasyonu artırırken, serotonin de damarı büzer(10). Oluşan trombosit agregatları arasına fibrinin dolması ile pıhtı sağlamlaşır.

2. Trombosit Biyokimyası

Trombositler ikincil agregasyon, sekresyon ve retraksiyon gibi fonksiyonlarını yürütebilmek için ve kontraktil hücrelerden olduklarından fazla miktarda metabolik enerjiye gereksinim duyarlar(11-13). Enerji metabolizması hücresel enerjinin oluşumunu ve kullanımını kapsar. Hücre dışından başta glukoz olmak üzere şekerler membrandan spesifik transport mekanizmalarıyla taşınarak hücre içine girerler. Glikolizis, sitrik asit döngüsü, mitokondrial oksidasyonlar ile parçalanarak gerek substrat seviyesinde fosforilasyon, gerekse oksidatif fosforilasyon yollarıyla enerji Pi ve ADP'den oluşan ATP molekülünün terminal fosfat bağının (γ -bağı) parçalanmasıyla elde edilir. ATP γ bağındaki enerji gereksiniminin olduğu proseslerde direkt olarak veya diğer nükleosid trifosfatlar aracılığıyla kullanılır. Enerji oluşumu ve kullanımı hücre içi ATP, ADP ve Pi konsantrasyonları oranları ile kontrol altında tutulur.

Trombositlerde başlıca enerji kaynağı glukozdur. Glukoz hücre içinde serbest veya glikojen halinde polimerleşmiş olarak bulunur(14-16). Fruktoz, mannoz ve galaktoz da az miktarda olmak üzere kullanılır. Yağ asitleri de trombositlerde okside olabilir ve enerji kaynağı olarak kullanılabilirler(17). Amino asitlerinde enerji kaynağı olabileceği tartışmalıdır. Ancak trombositlerin enerji kaynağı olarak yalnızca glutaminli ortamda uzun müddet bütünlüğünü koruduğu da gözlenmiştir(14).

Glukozun substrat olarak önemi ve glikojenin trombosit fonksiyonlarındaki rolü birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir(17-21). Glukoz eksikliğinde trombositlerin agregasyon ajanlarına hassasiyetleri azalır(22). Agregasyon ve sekresyon sırasında glikolizis artar(23). Agregasyon ajanları ile stimülasyon sonucu membrana bağlı Ca^{2+} serbestleşmesi ile birlikte c-AMP seviyesinde azalma rapor edilmiştir(24,25).

Trombositlerde glukozun büyük bir kısmı glikolizis yoluyla laktata çevrilir. Bu sırada açığa çıkan enerji trombosit fonksiyonları için çok önemlidir. Daha az miktarda glukoz ise sitrik asit siklüsüne girerek CO₂'e kadar katabolize olur. Heksoz monofosfat yolu ve glikojen yapım ve yıkımı da bu hücrelerde vardır(26).

İstirahat halindeki trombositlerde glukozun büyük bir kısmı Embden-Mayerhof yolu ile laktata yıkılır. Küçük bir kısmı ise heksoz monofosfat şantına girer. Uyarılmış trombositlerde ise spesifik granüllerden "release" başlar ve agregasyon gerçekleşir. Bu durumda sadece glikolitik akım değil, trombositin diğer yolları, glikojenoliz ve oksidatif fosforilasyon da hızlanır(16).

Trombositlerdeki glikolizis hızı eritrositlerin 13 katıdır(12). Glikolitik akım hızı mitokondrial solunuma, mitokondrial solunum ise glikolitik akım hızına bağlıdır.

Trombosit fonksiyonlarının sağlıklı çalışabilmesi için glikolizis kuvvetli bir kontrol altında olmalıdır. Glikolizisin 1. safhası, glukozun trombosit membranından transportudur, daha sonra G6P'a çevrilir, G6P düzeyi daimi sabit kaldığından heksokinaz üzerinde bir "feedback" inhibisyon kontrolü yapar. Trombosit lizatlarında bu enzimin V_{max}'ının 10¹¹ trombositte dakikada 11 µmol olduğu gözlenmiştir(14,18). Bu hız glikolitik akımın 3-4 katıdır. Heksokinaz reaksiyonu dengeden uzak olup, glukoz 6 fosfat yönüne doğru olduğundan glikolizisin kontrol noktası olarak düşünülür.

Kontrol altındaki 2. enzim fosfofruktokinazdır, bu allosterik bir enzim olup, F-6-P, ADP, c-AMP, Pi, Mg ve sitrat tarafından kontrol altında tutulur(26).

Glikolizisdeki kontrol enzimlerinden biri de piruvat kinazdır. Trombosit piruvat kinazı M tipinde olup fosfoenol piruvata yüksek afinite- lidir ve ATP tarafından in vitro inhibe edilir(27).

Glikolizis, glukoz utilizasyonu ve laktat oluşumunu takip ederek Avanoğlu tarafından istirahatte ve agrege olmuş trombositlerde normal ve aterosklerozlu şahıslarda çalışılmıştır(28,29). İstirahat halinde trombosit- ten zengin plazmada zamana bağlı glukoz kullanımında normaller ile ate- rosklerozlular arasında fark olmamakla beraber, laktat oluşumunun ate- rosklerozluların trombositlerinde artmış olduğu gözlenmiştir.

Hem aneorobik glikolizis hem de trikarboksilik asit döngüsü aynı anda inhibe edilirlerse hücre içi ATP seviyesi hızla düşer ve trombosit- lerin agregasyon olabilme yetenekleri azalır(30).

Trombositlerde glukoz 6 fosfata bağımlı glikojen sentazda tarif edilmiştir(31). Laboratuvarımızdaki bir araştırmada normal şahısların trombositlerinde glikojen miktarı mg trombosit başına $2,68 \pm 0,67$ mg (n:8) olarak bulunmuş ve aterosklerozlu şahısların trombositlerinde bu değer mg trombosit başına $2,06 \pm 0,78$ mg'a anlamlı olarak düştüğü gözlenmiştir(15).

Trombositlerde glukoneogenesis mevcudiyeti tartışmalıdır. Çün- kü glukoneogenesisin anahtar enzimleri olan fruktoz difosfataz ve fosfoe- nol piruvat kinaz aktiviteleri tesbit edilememiş fakat az miktarda da olsa glukoz 6 fosfataz aktivitesi gösterilmiştir(27).

Heksoz monofosfat yolunun önemi enerjiyi temin eden bir yol olmaktan çok trombositler için gerekli NADPH oluşumunda rol almasıdır. Bu yolun birinci enzimi glukoz 6 fosfat dehidrogenaz aktivitesini trombosit- llerde ilk olarak rapor eden Rudolph ve Schmitz bu enzimin mitokondride veya α granülalarda olabileceğini belirtmişlerdir(32).

Laboratuvarımızda bu enzimin trombositlerde varlığı ve "release inducer"ları olan ADP, adrenalin ve kollagen ile salgılandığı gösterilmiş- tir(33).

3. Trombosit Membranı

Trombosit membranı diğer hücrelerde olduğu gibi plazma ve hücre sitoplazması arasında seçici geçirgenlik işlemi görür(34). Singer tarafından ortaya atılan sıvı-mozaik modeline göre membranda çift tabakada (protein-fosfolipid, fosfolipid-protein) protein molekülleri dağılmış halde bulunur(35). Bu tabaka içine gömülü durumda olan integral proteinleri ve membranın dış yüzeyinde bulunan periferel proteinleri içerirler(34).

1968'de Benke elektron mikrograflarda trombositlerin yüzeyinin karbonhidrattan zengin bir bulutla kaplı olduğunu göstermiş ve 1970'de trombositlerden glikoprotein karakterde olan glikokaliks enzimatik parçalanma ile elde edilmiştir(36). Trombosit membran glikoproteinleri trombin, kollagen gibi trombosit aktivasyon ajanlarının adezyonda rol alan von Willebrandt faktörünün ve trombosit agregasyonunda rol alan fibrinojen ve trombospondinin reseptörlerini oluştururlar(37).

Trombosit glikoproteinleri molekül ağırlıklarına göre Romen rakamlarıyla büyükten küçüğe doğru I,II,III,..... IX gibi ve alt grupları ise yine büyükten küçüğe doğru küçük harflerle Ia, Ib, Ic.... gibi gösterilerek sınıflandırılırlar(37).

B. TRANSPORT ŞEKİLLERİ

Membrandan geçiş iki şekilde olur;

- 1) Makromoleküllerin geçişi
- 2) Mikromoleküllerin geçişi

Makromoleküllerin geçişi; membranda erime, pinositoz veya fagositoz denen olaylarla olur. Mikromoleküllerin geçişi ise, aktif ve pasif transportla olur. Pasif transport ise basit difüzyon, kolaylaştırılmış difüzyon diye ayrılır, aktif transport ve kolaylaştırılmış difüzyon aracılı transport sistemleridir.

1. Basit difüzyon

Maddelerin yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru geçmeleri sadece kinetik enerji ile olabilir ve bu olaya difüzyon denir. Lipidlerde eriyebilen maddelerin difüzyon yoluyla membranı geçmeleri doğaldır. Hücre içine maddelerin difüzyonu (F) aşağıdaki denklemlerle bulunur(38).

$$F = K_p (C_d - C_i)$$

F= net difüzyon, C_d = dıştaki konsantrasyon, K_p = permeabilite sabit değeri, C_i = içteki konsantrasyon,

2. Kolaylaştırılmış difüzyon

Lipitte erimeyen maddelerin zarıdan geçmesi kolaylaştırılmış difüzyon denen pasif bir yolla olur. Burada zarı oluşturan maddelerden biri iletilen madde ile birleşir ve böylece o maddenin zarın öbür tarafına geçişi kolaylaşır. Bu gibi iletilen maddelere taşıyıcı adı verilmekte olup, protein yapısında maddelerdir. Geçiş konsantrasyon ile doğru orantılıdır, belli bir konsantrasyona geldikten sonra doygunluk gösterir. Kolaylaştırılmış difüzyonda her zaman bir taşıyıcı kullanıldığı halde enerjiye gerek yoktur ve daima transport yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru olur(38,39).

3. Aktif Transport

Transport, elektrokimyasal gradyana karşı yokuş yukarıdır; bağlayıcı proteinlere ve metabolik enerjiye ihtiyaç gösterir.

Bağlayıcı proteinler sanki zara bağlı enzimler gibi hareket ederler. Bağlayıcı proteinlerin substratları için karakteristik bir K_m değerleri vardır. Bağlayıcı proteine bağlanan substrat kompetitif veya nonkompetitif olarak engellenebilir. Aktif transport saturasyon kinetiği gösterir(26,40). Aktif transportta metabolik enerji 4 ana yoldan temin edilebilir.

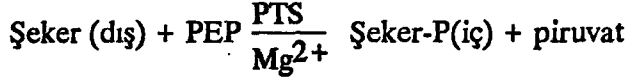
a) Na^+ Gradyanına bağlı transport (Na^+ kotransport)

Çeşitli transport proseslerinde direkt olarak ATP hidrolizi kullanılmaz. Bunun yerine transport elektrokimyasal gradyana bağlı iyon akımı ile gerçekleşir. Na^+/K^+ transport sistemi aracılığı ile hücre içi Na^+ 'u düşük tutulmaktadır. Bu yüzden Na^+ iyonunun hücre içine akımını oluşturan bir kuvvet meydana gelir(40,41). Örneğin; yüksek organizmalarda glukoz, Na^+ 'un hücre içine girişi ile birlikte transport olur. Yani Na^+ iyonu ve glukoz; spesifik transport proteinine bağlanıp, birlikte hücre içine girerler. İkisinin birlikte hareketi kotransport olarak adlandırılır(41). Bir simport taşıyıcı iki tür için aynı yönde, halbuki antiport taşıyıcı zıt yönde aktiftir. Glukoz transportunun miktar ve oranı, Na^+ gradyanına bağlıdır. Na^+ ile gerçekleşen simportlar, hayvan hücrelerinde amino asit birikiminde de kullanılırlar. Bazı hücrelerde; örneğin intestinumun "brushborder" mikrovilluslarında glukozun aktif transportu için zengin bir simport kullanılır. Cl^- transportu içinde ince barsaklarda Na^+ kullanımı ile simport bulunur. Ayrıca çeşitli hücrelerde; Ca^{2+} iyonları Na^+ iyonları kullanılarak antiport olur. $Na^+ - Ca^{2+}$ değişimi esnasında 1 Ca^{2+} iyonu hücre dışına çıkar, 3 Na^+ iyonu bunun yerine girer. Bu antiporter çeşitli hücrelerde düşük sitozolik Ca^{2+} düzeyinde önemini devam ettirmektedir. En önemli simport ve antiport hücrelerde Na^+ gradyanı kullanılarak Na^+-K^+ ATPaz sistemidir(41).

b) Grup Translokasyonu

Taşınan madde membranda organik reaksiyona girer ve fosforilasyona uğrayarak transport gerçekleşir.

Özellikle bazı bakterilere giren glukozun transportu membranda G6P oluşması ile olur. Bu çeşitli transporta; grup translokasyonu ismi verilir. Şeker fosfatları hücre membranına geçirgen değildir ve bunlar bakteri içinde birikirler. Fosfotransferaz sistemi ile dışarıya taşınma grup translokasyona en iyi örnektir. Fosfotransferaz sistemi ile dışarı taşınma reaksiyonu;



Bu grup translokasyonuna 4 protein katılır. HPr (ısıya dirençli protein), Enzim I, enzim II, enzim III. Enzim II integral membran protei-
nidir. Şeker fosforilasyonunda katalizördür ve transmembran kanal formun-
dadır(41). PEP'in fosforil grubu şekeri direkt transfer etmez. Daha çok
PEP'dan enzim I'e transfer olur ve sonra HPr'nin spesifik histidin artıkları-
na transfer olur. HPr'nin fosforile formundan sonra fosforil grupları enzim
III'e transfer olur. Söz konusu kanal periferel membran proteini ile enzim
II interaksiyonudur. Son basamakta fosforil grubu enzim III'den şekere
transloke olur. Fonksiyonel enzim kompleksi, 4 proteinden tekrar kuru-
lur(40,41). Bu proteinlerden bazıları genel fosfotransferaz sistemi içinde-
dir (HPr ve enzim I) bazıları da (enzim II ve III gibi) daha spesifiktir. Glu-
koz, laktoz ve fruktoz içindir.

c) ATP aracılığı ile oluşan transport (Na^+/K^+ pompası)

Bu sistem, Na^+ iyonunun transportuna bağımlı diğer maddelerin
transportu için gerekli enerjiyi temin eden bir sistemdir. Na^+ hücreden
dışarı çıkarken, K^+ hücre içine girer ve bu işlem sırasında ATP kullanı-
lır(39,41). Na^+/K^+ pompası 2 subüniteden oluşmuştur. $\alpha_2 \beta_2$ tetrameri ola-
rak membrandaki en önemli bileşiktir. α zinciri en az 7 transmembran
heliks ve ATPaz içerir ve bu membranın sitozolik tarafına lokalize olmuş-
tur. α 'nın küçük bir kısmı ekstrasellüler taraftadır ve bu kardiyotokik stero-
idlerin bağlanma yeridir. β zinciri ise 4 transmembran heliks içerir ve
membranda ekstrasellüler durumdadır, β zinciri transport aktivitesi veya
ATPaz için gerekli değildir(41).

Na^+/K^+ pompası E_1 ve E_2 olmak üzere 2 formdadır. E_1 formunun
hücrenin iç yüzünde iyon bağlama kavitesi vardır, E_2 'de ise bu kavite dış
yüzedir. E_1 Na^+ 'a, E_2 ise K^+ 'a yüksek afinite gösterir. Taşıyıcı ATP ile
fosforile olunca K^+ tercih eden konformasyondan, Na^+ tercih eden konfor-
masyona (E_1 şekli) geçer. Fosforun kompleksten ayrılması ise, onu tekrar

K^+ tercih eden konformasyonuna geçirir (E_2 şekli) Na^+-K^+ pompasına ATP'den Pi kopardığı için $Na^+ - K^+$ ATPaz denir. Pompadaki bu değişiklikler sonucu içeri alınan her 2 K^+ için 3 Na^+ iyonu dışarı atılır(41).

Ca^{2+} transportunda yine buradaki gibi E_1 ve E_2 formu vardır. Ca^{2+} , pompanın E_1 şekline bağlanır, bağlanma sitozol yüzündedir. Fosforilasyon ile şekil E_2 'ye döner. Ca^{2+} bağlanma yüzü bu sefer sarkoplazmik retikulum tarafındadır. Ca^{2+} release olur, çünkü E_2-P Ca^{2+} 'a düşük afinite-dedir(41). Bitkilerden elde edilen steroid türevleri güçlü Na^+-K^+ ATPaz ve pompa inhibitörüdür, digitoksigenin ve oubain gibi. Bunlar hücre dışına yerleşerek inhibisyon oluştururlar. Vanadat ise hücre içine yerleşir. Na^+-K^+ ATPaz'ın defosforilasyon reaksiyonunu inhibe ederler ve pompayı E_2-P formunda stabilize ederler.

d) Oksidatif reaksiyonlara bağlı transport

ATP ve fosfoenolpiruvat enerjisini kullanamayan birçok bakteri ve mitokondri membran transport sistemleri oksidatif fosforilasyonda oluşan enerjiye bağımlıdır. 1961 yılında ilk defa Mitchell oksidatif fosforilasyonda kemiozmotik teoriyi ileri sürmüştür(39). Bu teoride; elektronlar solunum zincirinde transfer edilirken, hücre membranı protona karşı geçirgen olmadığı için, protonlar membranın bir tarafında birikirler. Membranın diğer tarafında ise elektronlar toplanır. Bundan dolayı hidrojen iyonlarının kimyasal gradyanı dolayısı ile membranın her iki yüzünde bir pH farklılaşması yanında elektriksel membran potansiyel farklılığı oluşur. Bu da protonları hareketlendirici güç için gerekli enerjiyi temin eder(41).

C. TROMBOSİT TRANSPORT SİSTEMLERİ

Trombosit transport sistemleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo I. Trombosit transport şekilleri

SİSTEM	Kinetik Data	İnhibitör madde	Etkisiz madde	Kaynak
Glukoz (Aktif transport ve basit difüzyon)	<u>Sistem I</u> Km = 21,5 $\mu\text{mol/l}$ V _{max} = 9,114 nmol/l/10 ⁹ Tr/30' (İzole bağlayıcı protein) Mr ~ 25,000	2-deoksiglukoz DNP, KCN, NaN ₂ Arsenat Oubain	3-o-metil glukoz ADP Adrenalin İnsülin	6 74 75
	<u>Sistem II</u> Lineer kinetik			
2-deoksi glukoz (Aktif transport)	V _{max} = 0.34 $\mu\text{mol/l/10}^{11}$ Tr/dak.	D-glukoz, floretin, sitokalsin B, N-etil maleimid, mannoz, fruktoz, glukoz, oubain, DNP, KCN	5-sitokalsin İnsülin	11 76
3-o-metilglukoz (Aktif transport)	V _{max} = 0.34 mmol ve 0.26 $\mu\text{m/dak/10}^{11}$ Tr. Km = 1.74 mmol/l, V _{max} = 0.242 mmol/l/ml hücre/saniye	D-glukoz, floretin, N-etilmaleimid, forskolin, floridzin, sitokalsin B		42 43
Galaktoz (Aktif Transport)	Km = 22.72 mmol/l V _{max} = 35.08 nmol/l/10 ⁹ Tr/dak Km ₁ = 0.29 mmol/l V ₁ = 1.2 mmol/dak/10 ¹⁵ Tr. Km ₂ = 46 mmol/l V ₂ = 117 mmol/dak/10 ¹⁵ Tr.		aspirin	44 45

SİSTEM	Kinetik Data	İnhibitör madde	Etkisiz madde	Kaynak
Putresin (Aktif Transport)	Km=4.42 μ mol/l V _{max} =0.046 nmol 10 ¹⁰ Tr/dak. Spesifik membran Proteini:Mr: 55,000-66,000	2.4 DNP, spermin, spermidin	Tüm amino asitler, gramisidin, valinomisin	47
GABA (Aktif Transport)	Km=39.6 μ mol/l V _{max} =131.6 pmol/l/10 dak/10 ⁹ Tr.	nipekotik asit, cis-3-aminosiklohek- san, karboksilikasit		48
Alanin, Taurin (Aktif Transport)	Satürasyon kinetiği			48
Glisin (Aktif transport)	Satürasyon kinetiği	trombin, aspartik asit		77
Glutamik asit		trombin, aspartik asit		77
Glutamin (Aktif transport)	Satürasyon kinetiği			47
Fenil alanin (Aktif transport)	Satürasyon kinetiği			47
Arginin	Km = 3.9 μ mol/l V _{max} =58.8 nmol/l/10 ¹¹ Tr/dak.			78

SİSTEM	Kinetik Data	İnhibitör Madde	Etkisiz madde	Kaynak
Lisin, serin, sistein (Aktif transport)	Satürasyon kinetiği			79
Histidin (Aktif transport)	$K_m = 5,7 \mu\text{mol/l}$ $V_{\text{max}} = 3,33$ $\text{nmol/l}/10^{10}$ Tr/dak. (bağlayıcı protein izole edildi)	tirosin, fenilalanin, treonin, serin	Diğer amino asitler	49
Lösin (Aktif transport)	$K_m = 13,8 \mu\text{mol/l}$ $V_{\text{max}} = 3,33$ $\text{nmol/l}/10^9$ Tr/dak. (bağlayıcı protein izole edildi)	isolösin, valin	Diğer amino asitler	52
Dopamin	$V_{\text{max}1} = 4,4$ $\mu\text{mol/l}/10^{11}$ Tr $V_{\text{max}2} = 0.58$ $\mu\text{mol/l}/10^{11}$ Tr.	oubain ve desipramin	spiperon, domperidon, butaklomol	53 54
Serotonin (Aktif transport ve basit difüzyon)	<u>Sistem I:</u> Satürasyon kinetiği <u>Sistem II</u>	ADP, triptamin, reserpin, kokain, kardiak glikozidleri, metabolik inhibitörler imipramin, reserpin	putresin	59 47
Kalsiyum	$K_m = 0.6 \text{ mmol/l}$ ve $9.5 \mu\text{mol/l}$	Gd^{3+} , La^{3+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+}	verapamil, nifedipin	60,64

Sistem	Kinetik Data	İnhibitör madde	Etkisiz madde	Kaynak
Serbest yağ asitleri (Basit difüzyon)	Lineer kinetik	nöraminidaz		80
Palmitik asit (Basit difüzyon)	Lineer kinetik			65
Araşidonik asit (Aktif transport)	$K_m=0.14$ mmol/l $V_{max}=55.6$ nmol/10 ⁹ Tr/dak.	KCN, NaN ₂		2
Potasyum (K ⁺) (Na ⁺ /K ⁺ ATPaz sistemi)		oubain		73
Adenin (Aktif Transport)	PRP: $K_m=159$ nmol/l $V_{max}=100$ pmol/1/10 ⁹ Tr/dak. İzole trombosit: $K_m=453$ nmol/l, $V_{max}=397$ pmol/1/10 ⁹ Tr/dak.	guanin, adenin, hipoksantin, papaverin, adenin N-oksid, dinitrofenol, 2-deoksiglukoz, PGE ₁	SH grup inhibitörleri, pirimidin, oubain, antimisin A.	71
Adenozin (Aktif transport)	<u>Sistem I:</u> $K_m=9.8$ μ mol/l $V_{max}=800$ pmol/1/10 ⁹ Tr/dak. <u>Sistem II:</u> $K_m=9.4$ mol/l $V_{max}=106$ nmol/1/10 ⁹ Tr/dak.	papaverin, 2-deoksi glukoz, antimisin A, PGE ₁ , ADP, adenin, 2-deoksiglukoz, antimisin A	SH grup inhibitörleri, florizin, oubain, SH grup inhibitörleri, florizin, oubain	69 70
Adenozin difosfat (Aktif Transport)	Membran vesikülünde, $K_a=6,5$ μ mol/l spesifik bağlayıcı protein; MA: 160,000 Da, Kd: 6.5 μ mol/l	AMP, ATP, GDP, 2-kloroadenozin, -SH grup inhibitörleri, antiagregan ajanlar, metabolik inhibitörler	adenozin, dibutiril AMP	68

1. Glukoz transportu

Glukoz transportu, diğler hücrelerde olduğu gibi trombositlerde de glikolizisin ilk kontrol basamağıdır. Bu yüzden glukoz transporterlarının yapıları karakterize edilerek çeşitli hücre tiplerinde geniş araştırmaları yapılmış, kinetik parametreleri ve hormonal kontrolları tanımlanmıştır(42).

Glukozun trombositlere aktif transport ile $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pompa sistemini kullanarak girdiğı bildirilmiştir. 2-DOG'un da aynı aktif transport sistemi ile trombositlere girdiğı ve 3-OMG'un ayrı sistemi kullanarak trombositlere transport olduğu bildirilmiştir(6,11,42,43).

2- Galaktoz transportu

Galaktozun trombositlere aktif transport ile girdiğı, kinetiğı, normal ve aterosklerozluların trombositlerinde bir farklılık olmadığı fakat glikoprotein inkorporasyonunun aterosklerozda arttığı bildirilmiştir(4,44). Yapılan diğler bir çalışmada da trombosit transport kinetiğı incelenmiştir(45).

3- Histamin transportu

Trombositlerde histamin "uptake"i insan plazmasındaki miktarından 300 kat fazla konsantrasyonda takip edilmiştir ve agregasyon ajanları kullanıldığında uptake'in % 15 artış gösterdiği bildirilmiştir(46).

4- Putresin transportu

Putresin bir poliamin olup, bütün hücrelerde belli miktarda bulunan organik bir iyondur. Fizyolojik fonksiyonu hala bilinmemektedir. Poli-aminlerin trombosit agregasyonunu inhibe ettikleri gösterilmiş ve insan trombositlerinde putresin transportu çalışılmış ve aktif transport olduğu bulunmuştur(47).

Bu transport Na^+ gradyanına bağlı değildir, çünkü gramisidin iyonoforu ($1 \mu\text{mol/l}$) ve K^+ gradyanına etkili valinomisin iyonoforunun transporta etkisi bulunmamıştır. Putresin transportu, parsiyal olarak H^+ gradyanına bağlıdır. Ayrıca bu çalışmada putresin bağlayıcı protein elde edilmiş ve M.A. 55,000 ve 65,000 olarak bulunmuştur(47).

5) GABA transportu

Trombositlerde GABA ve nöroaktif diğer amino asitlerin alınımı temperatür ve Na^+ 'a bağımlıdır. Sinir uçlarının monoamin "release"i için uzun zamandan beri kan trombositleri modeli önerilmiştir. Monoaminoksidaz B tipini trombositlerin içerdiği gösterilmiştir. Yüzeylerinde α_2 ve adre-noreseptörlere sahiptirler. Bunlar nöron ve trombositlerin fonksiyonel benzerliğine delildirler(48).

6- Amino asit transportu

Trombositlerde kloramfenikole hassas bir protein sentezi mevcuttur(49,50). Ortamdaki amino asitler trombosit proteinlerine inkorpore olurlar. Trombositlerde en az 5 grup amino asit transport sistemi mevcuttur(51). Bunlar nötral, asidik, bazik, aromatik ve kükürt içeren amino asit sistemleridir. Bunlara ek olarak nötral amino asitlerden lösin, isolösin ve valin transportunu yapan aktif bir sistem vardır(52). Ozmotik şok metodu ile muamele gören trombositlerin şok sıvısında lösin bağlayıcı protein(52) ve histidin bağlayıcı protein(49) aktivitesi gösterilmiştir. l-fenilalanin, l-glutamin, β -alanin ve taurin'in trombositlere aktif transport sistemi ile girdiği bildirilmiştir(48).

7) Dopamin transportu

İnsan trombositleri dopamin alınımı ve "release"i yapar. Trombositler dopaminerjik nöronlarda bulunan D_1 ve D_2 reseptörlerine benzer membran komponentlerine sahiptirler. Santral Sinir Sisteminin dopaminerjik nöronlarının çalışması için periferel model teklif edilmiştir(53). Trombositlerde dopamin alınımı yolu selektif ve temperatüre bağlı bir mekanizmadır. Trombositlerde dopamin "uptake"i, dopamin D_1 reseptör agonisti SKF 38393'e ve dopamin D-2 reseptör agonistleri quinpirol ve bromokriptine karşı etkisizdir(53,54). Bu arada bromokriptinle yaptığımız bir çalışmada bu ilacın trombositleri in vivo ve in vitro etkilediği ve in vitro olarak trombosit membran glikoprotein dağılımını değiştirdiği gösterilmiştir(55).

8) Serotonin (5HT) transportu

5HT trombositlerde dens granüllerde birikir ve sekresyona uğrar. Aktif transport sistemi yanında, yüksek konsantrasyonlarda basit difüzyon ile transport olur. Trombositlerdeki serotonin "uptake"ini, monensin ve nigerisin iyonoforları (Na^+ ve K^+ 'a spesifik) azaltır(56). Trombositlerde 5-HT "uptake"i araştırılarak, mental hastalıklardaki serotonin etkisi incelenmiştir(57). Depresyonlu hastalarda tek elektrokonvülsif (ECT) tedaviden önce ve sonra trombosit 5-HT uptake'i araştırılıp, depresyonlu kişilerde V_{max} anlamlı olarak düşük bulunmuştur. ECT'den sonra ise V_{max} anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir(58).

Paroksetine ve imipramin spesifik serotonin "uptake" i dir, trombosit membranına bağlanma çalışmaları yapılmıştır. bağlanma paroksetin ve imipraminde benzer bulunmuştur. İmizeri trisiklik antidepressanların, nörotransmitter reseptör şiddette afiniteleri ve bağlanma özellikleri vardır(59).

9) Kalsiyum transportu

İnsan trombositlerinde, Ca^{2+} transportu sitozolik serbest Ca^{2+} konsantrasyonu ile muhafaza edilir. Trombosit sitozolünde ve dens tübüler sisteme lokalize iki intrasellüler Ca^{2+} havuzu vardır. Trombositler sitozolik serbest Ca^{2+} konsantrasyonunu en az $0,1 \mu\text{mol/l}$ olarak devam ettirirler. Diğer dokular Ca^{2+} "influx" limiti yaparlar. Dinlenme halindeki trombositlerde maksimum Ca^{2+} "influx"ı extrasellüler Ca^{2+} konsantrasyonundan 20-50 kat daha azdır(60). Ekstrasellüler Ca^{2+} "influx"ı ve Ca^{2+} 'un dens tübüler sistemden oluşması birlikte olur ve trombosit aktivasyonu, sitozolik serbest Ca^{2+} konsantrasyonunun artması ile gerçekleşir(61). Trombosit membranında aktif Ca^{2+} transportu için optimum pH: 7.6'dır. Mg ATP'nin ilavesi ile aktif Ca^{2+} transport aktivitesi artar. A 23187 Ca^{2+} iyonoforu fosfat varlığında Ca^{2+} 'un % 90 hızlı "release"ine neden olur. Ca^{2+} transportu Mg ATP'ye bağımlıdır. $K_m = 0,6 \text{ nmol/l}$ 'dur(62). Ca^{2+} ve c-AMP birbirine bağlı intrasellüler mesajcılardır. Trombositlerde trombosit aktivasyonu inhibe edildiğinde c-AMP miktarı artar ve trombosit membranındaki Ca^{2+} pompasının c-AMP stimülasyonu ile etkilendiği bilinir. Purifiye insan trombosit membranlarının Ca^{2+} pasif "release"i ve aktif transport kinetikleri tarif edilmiştir ve trombosit membranındaki Ca^{2+} -ATPaz'ın sarkoplazmik retikulumdaki Ca^{2+} pompası ile hemen hemen aynı olduğu bulunmuştur(63).

Ca^{2+} transportunda GPIIb ve III a da rol oynar bu, GP'lerin formu Ca^{2+} 'a bağlı olan komplekslerdir, dolayısıyla GPIIb ve IIIa kompleksi trombosit Ca^{2+} homeostazisi için gereklidir.

Ca^{2+} "influxu" Gd^{3+} ve La^{3+} (60) ile ayrıca Ca^{2+} kanal blokerleri olan Co^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , La^{3+} ile inhibe edilir(64). Verapamil ve nifedipin ile inhibe edilmediği görülmüştür(60).

10- Serbest yağ asitleri transportu

Serbest yağ asitleri trombositlerde albümine bağlı olarak ısıya ve enerjiye bağımlılık göstermeyen basit difüzyonla transport olurlar(65,66). Serbest yağ asitlerinin trombositlere taşınması serbest yağ asidi, albümin orantısına, yağ asidinin çift bağlarının miktarına bağlıdır(2).

11) ADP transportu

Trombositlerde, ADP transport sistemi geri dönüşümlü olup, ısıya, kanyonlara, membran tiol gruplarının bütünlüğüne bağımlılık gösterir(67). AMP, ATP, 2-kloroadenosin ve antiagreganlar, ADP transportunu inhibe ederler. c-AMP, adenosin, prostoglandin E₁ ise ADP transportuna etkisiz kalırlar. Trombosit membran vesiküllerinde, ADP transportu aynı karakterdedir. Trombositleri dondurup eriterek elde edilen "solubl" fraksiyonda, ADP bağlayıcı afinitesi yüksek (Kd= 6,5 µmol/l) ve yaklaşık molekül ağırlığı 150,000 olan bir protein elde edilmiştir(68).

12) Adenosin transportu

Trombositlerde, adenin ve adenosin, adenin nükleotidlere inkorpore olurlar, hücre içine giren adenosin hızla fosforlanarak AMP'ye çevrilir. Adenosin trombositlerde 2 ayrı aktif transport sistemini kullanır. Düşük Km değerli sistem, papaverin ve metabolik inhibitörler tarafından inhibe olur. Yüksek Km değerli sistem ise glukoz, solunum blokerleri ve adenin tarafından inhibe olur(69,70).

13) Adenin transportu

Adenin trombositlere aktif transport sistemi ile taşınır. Guanin, hipoksantin, adenin N-oksit, adenosin ve papaverin, bu sistemin kompetitif inhibitörleridir. SH grup inhibitörleri, pirimidinler ve oubain etkisiz kalmışlardır. Trombosit agregasyonu ile birlikte, adenin transportunda stimülasyon görülür(71). Bu sistem 2-deoksiglukoz ve prostoglandin E₁ tarafından inhibe edilir, antimiyacin A ise etkisizdir(71).

14) K^+ transportu

İnsan trombositlerinde yüksek intrasellüler K^+ konsantrasyonunu temin etmek hücrede ATP sentezinin devamlı aktif olmasını gerektirir. Trombositlerde aktif K^+ transportu için gerekli ATP, Na^+/K^+ ATPaz sistemi üzerinden etkisini gösterir. Oubain trombositlerde K^+ konsantrasyonunu düşürür(72,73).

D) ATEROSKLEROZ VE TROMBOSİT DEĞİŞİMLERİ

Ateroskleroz, kardiovasküler hastalıklar içindedir. Bugün ateroskleroz patogenezinde çeşitli hipotezler mevcuttur. Bunlar lipid ve kolesterol hipotezi, müral trombus hipotezi gibi çeşitlerdir(81).

Arter içinde meydana gelen aterom plakları veya düz kas proliferasyonu damar cidarının kalınlaşmasına ve daralmasına neden olur. İnsan trombositleri aterosklerozun gelişiminde önemli rol oynar. Vasküler hücre hasarı, hasara cevaben salgılanan trombositler arası maddelerin biyokimyasal etkileri nedeniyle oluşan trombuslar arter duvarına girebilir. Bu trombuslar aterosklerozun gelişiminde önemlidir. Aterosklerozlu kişilerin trombositlerinde hiperadezyon, hipersekresyon ve hiperagregasyon söz konusudur(82).

Aterosklerozlu şahıslarda; trombositlerden yüksek miktarda salgılanan maddeler, örneğin; tromboksan A_2 agregasyon ve sekresyona, serotonin; vazokonstrüksiyona, düz adele proliferasyon faktörü düz adale proliferasyonuna sebep olurlar. Bu arada aynı olgularda endotel hücrelerinde bir vazodilatatör olan ve trombosit agregasyon ve "release"ini önleyici etkisi olan prostosiklin (PGI_2) seviyesinin azalması müral trombus oluşumunu kolaylaştırır(6).

Aterosklerozluların Trombositlerdeki Değişimleri

Artan	Kaynak	Azalan	Kaynak
Cama adezyon	83,84	Tr.Antitrombin III	91
Formuar membrana adezyon	85	Tr.yarılma ömrü	92
Agregasyon	86,87	c-AMP	93
Sekresyon	87,88	Glukoz aktif transportu	1
a) ADP	9	Araşidonik asit aktif transportu	2
b) Fibrinojen	9	Glikojen miktarı	15
c) Tr.F4	9	γ -GT	5
d) Tr.antiplasmin	9		
Tr.PGF ₂	89		
Tr.antiplasmin	9		
Total fosfolipid	3		
Tromboksan sentaz	90		
Tromboksan A ₂	91		
Glikoprotein sentezi	4		

E. DEFİBROTİD

Obliteratif damar hastalıklarının tedavisinde kullanılan defibrotid, memeli hayvanların akciğerlerinden saflaştırılan DNA'nın depolimerizasyonu ile elde edilen bir polideoksiribonükleik asit olup özellikle damar endotelinin niteliklerini aktive edici bir ilaçtır(94).

Defibrotid beyaz-krem rengindedir. 1 kısmı 5 kısım suda çözünür. Sudaki pH'sı 7.5-8.5'dur. % 8,7 \pm 0,5 nükleik fosfor, % 19 \pm 2 deoksiriboz; % 9 \pm 1 adenin, % 8 \pm 1 guanin, % 9,5 \pm 0,5 timin, % 6,2 \pm 0,5 sitozin içerir. Purin/pirimidin oranı ise 0,85'dir. Molekül ağırlığı 16,000 dir. Son zamanlarda Crinos firması tarafından "Prociclide" adı altında piyasaya sürülmüştür.

Defibrotid'in antitrombotik etkisi vardır. İn vivo ve in vitro yapılan deneylerde trombus oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir(96).

Defibrotid'in fibrinolitik aktiviteye de etkisi olduğu bilinmektedir. Bu etkisini t-PA ve t-PAI seviyeleri üzerinde yapmaktadır(97).

Defibrotid, prostaglandin I₂ ve prostaglandin E₂'nin damar endotelinde yapımını ve salgılanmasını uyarır(94,98). Ayrıca MDA ve TxA₂ oluşumunu inhibe eder ve trombosit c-AMP düzeyinde artışa yol açar(99,100). Protein-C ve Protein-S düzeyinde de artışa yol açtığı görülmüştür(101). Defibrotid'in trombosit fonksiyonlarına(102) ve plazma heparin ve AT III aktiviteleri üzerine(103) etkisi vardır.

Defibrotid, farelerde, plazma ve serum proteinlerinde anlamlı bir artmaya neden olmaktadır(104). Aterosklerozlu olgularda, defektif olan glukoz transportunun, defibrotid tedavisinden sonra normale döndüğü laboratuvarımızda gösterilmiştir. Yine laboratuvarımızda defibrotid in aterosklerozlu olgularda defektif olan γ -GT seviyesini normal düzeye indirdiği bulunmuştur(105,106).

Ayrıca eritrositlerde de defibrotidin glukoz transport sistemini arttırıcı etkisi olduğu saptanmıştır(107).

III. ARAÇ - GEREÇ VE YÖNTEMLER

A. MADDELER

D-(u-¹⁴C) glukoz (sp.akt. 248-333 mCi/mmol), ¹⁴C-amino asid karışımı (Radiochemical Centre, Amersham), PPO, POPOP, aquasol, toluen (Atabay), D-(+) glukoz (Merck), sephadex G-25 (Pharmacia) HAOO25 filtreleri (Millipore), defibrotid (Crinos), LMW heparin, triton X-100, EDTA, akrilamid, BİS (N, N¹-metilen bis akrilamid), TEMED (N,N, N¹, N¹-tetrametil etilen diamin), MET (merkaptotanol), BFB (bromfenol mavisi), APS (amonyum persülfat), glisin, tris (hidroksi aminometan), SDS (Sodyum dodesil sülfat) ve coomassie parlak mavisi Sigma'dan temin edilmiştir. Diğer maddeler Merck firmasının amaca uygun saflıkta maddeleridir.

B. ARAÇLAR

Millipore filtrasyon manifoldu, Genco çalkalayıcı su banyosu, (Girgin Koll.Şti) ultrasantrifüj (Beckman, model J.21B), klinik santrifüj (Fete), Manyetik karıştırıcı (Kermanlar), pH metre (Orion research, ionalyzer/model 407A), Faz kontrast mikroskopu (Olympus), U.V. spektrofotometre (Schimadzu spektrofotometer U.V-120-02), HPLC (Waters HPLC-481 detektör değişken dalga boylu, 30 data modül, model 510 pompa) sıvı sintilasyon sayacı (Searle Isocap 300), Elektroforez aleti, power

supply EPS, power supply DPS (Pharmacia).

C. OLGULARIN SEÇİMİ

Bu çalışmada 8 normal ve 42 aterosklerozlu olgu tetkik edilmiştir. Aterosklerozlu olarak İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Hemostaz Bölümüne başvuran hastalardan alınan kan örnekleri kullanıldı.

Aterosklerozlu olguların saptanmasında tüm hastalarda trombosit hiperaktivitesi (hiperadezyon, hipersekresyon, hiperagregasyon) yanında aşağıdaki belirtilerden bir veya birkaçının varlığı saptanmıştır.

- Koroner sklerozlu,
- Miyokard infarktüsü geçirmiş,
- EKG belirtileri olan,
- Göz dibinde aterosklerotik belirtiler olan,
- Rutin laboratuvar testlerinden yüksek serum kolesterol, trigliserid ve total lipid değerleri gösteren,
- Plazma fibrinojen seviyesi yüksek olan ve fibrinolitik aktivitede yavaşlama gösteren olgular seçilmiştir.

Bağlayıcı protein çalışmalarında ise; 20-25 yaş grubunda 10 sağlıklı kişiden sağlanan kan örneklerinden yararlanılmıştır. Gerek kontrol, gerek ateroskleroz grubunun tetkikler sırasında herhangi bir ilaç altında bulunmamalarına, özellikle aterosklerozluların antikoagülan, antiagregan, antiadeziv ve antilipemik ilaçları kullanmamalarına dikkat edilmiştir.

D. TROMBOSİT ELDESİ

Normal ve aterosklerozlu şahıslardan venöz kan aç karnına 1:9 oranında 0,077 mol/l EDTA ile alındı. Alınan kan oda ısısında 20 dakika bekletildi. 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edilerek trombositten zengin plazma (PRP) ayrıldı. PRP plastik tüpler içinde 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek trombositler çöktürüldü. Trombositten fakir plazma

(PPP) atılıp, trombosit çökeleği PRP hacminin iki misli kadar Tris--NaCl-EDTA (0,03 mol/l Tris hidroksimetil aminometan + 0,12 mol/l NaCl + 0,005 mol/l EDTA, pH 7,4) tamponu ile yıkandı, 10,000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant ayrıldı. Aynı şekilde yıkama işlemi iki kere daha tekrarlandı. Elde edilen trombositler Tris-NaCl tamponunda süspande edildi. Brecher Cronkite yöntemi ile sayıldı(108). mm³ de 200,000 trombosit olacak şekilde tamponda süspande edildi. Kanın alınmasından sonra en geç 3 saat içinde transport deneylerine başlandı. Trombosit eldesi sırasındaki işlemler oda ısısında yapıldı.

E. TROMBOSİTLERDE ZAMANA BAĞLI GLUKOZ TRANSPORTU VE BİRİKİMİ(6)

Yıkamış ve Tris-NaCl tamponuna süspansiyon yapılmış trombositler plastik tüpler içinde 10 dakika 37° C'de çalkalayıcı su banyosunda ve +4° C'de tuzlu buz banyosunda preinkübasyona bırakıldı. 1:100 oranında ¹⁴C-glukoz ilave edilerek transport deneyine başlandı. Glukozun son konsantrasyonu 10⁻⁵ mol/l olarak sabit tutuldu. Belirli zaman aralıklarında (1., 5., 20. dakikalarda) 200 µl'lik numuneler otomatik pipettör yardımıyla alınarak, millipore membranlarından (Çap: 25 mm, delik ölçüsü: 0,45 mm) Millipore Manifold kullanılarak filtre edildi. Filtrelerde toplanan trombositler, 2 defa 2,5 ml'lik Tris-NaCl-EDTA (0,03 mol/l Tris-HCl, 0,12 mol/l NaCl, 0,005 mol/l EDTA pH: 7.4) yıkama çözeltisi ile yıkandı. Pipetleme, süzme ve yıkama işlemi 30 saniye içinde tamamlandı. Deney sonunda filtreler cam sintilasyon şişelerine aktarıldı, 37° C'de gece etüvde kurutuldu. 5 ml. PPO ve POPOP içeren spektrafluor-toluen kokteyli eklendi (6 g. PPO ve 75 mg POPOP + 1 l toluen). Radyoaktivite Searle isocap 300 likit sintilasyon sayacında sayıldı. "Quench" düzeltmeleri yapıldıktan sonra sonuçlar standart ¹⁴C-glukozun cpm değerinden 10⁹ trombosit hücrelerinin içerdiği nmol glukoz olarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Trombosit sayısı mm³'de 200,000 olursa:

$$\text{nmol şeker}/10^9 \text{ Tr} = \frac{\text{Cpm}_{\text{numune}} \times 10}{\text{Cpm}_1 \text{ nmol Std.}}$$

Deneylerin bir kısmında zamana bağılı transport ve birikim takip edildi. Bir kısmında ise yalnız 20 dakikalık birikime üçlü numunelerle bakılıp, ortalama değerler tek bir olgunun sonucu olarak bildirildi.

F. GLUKOZ BAĞLAYICI PROTEİNİN OZMOTİK ŞOK YÖNTEMİ İLE ELDESİ VE SAFLAŞTIRILMASI(6)

Bu çalışmada, sağlıklı bir kişiden 1:9 oranında EDTA'lı 200 ml. kan alındı. Trombositler elde edildi ve 3 kez yıkandı. Yıkanmış trombosit çökeleği 1:40 (w/v) oranında, oda ısısında, plastik tüpte, % 30'luk glukoz çözeltisinde homojen bir şekilde süspansiyon yapıp, 20 dakika oda sıcaklığında karıştırıldı. Trombositler 10,000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Üst faz atılarak, tüpün kenarları iyice kurulandı. Trombosit çökeğine 1:80 (w/v) oranında soğuk distile su eklenerek, homojen süspansiyon yapıldı. 30 dakika manyetik karıştırıcı ile soğukta karıştırıldı. 10,000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Trombosit çökeleği (şoka uğramış trombositler) tekrar Tris-NaCl tamponuna süspansiyon yapıldı (Son konsantrasyon; 200,000 Tr/mm³) ve transport deneyinde kullanıldı. Trombositten, soğuk ozmotik şok sırasında açığa çıkmış maddeleri içeren üst sıvı (şok sıvısı), % 95 kesitli (NH₄)₂ SO₄ presipitasyonuna tabi tutuldu, 10,000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek, elde edilen çökelek en az (5 ml) miktarda Tris-NaCl tamponunda eritildi, Tris-NaCl tamponu ile 2 gün soğukta dialize bırakıldı. Dializ olmuş şok sıvısının glukozu bağlama aktivitesinin tayini için gel filtrasyon ve HPLC yöntemi kullanıldı ve SDS_6H gel elektroforezine tabi tutuldu.

G. GLUKOZ BAĞLAYICI PROTEİNİN DETERJANLA MEMBRANDAN ELDESİ VE SAFLAŞTIRILMASI

Sağlıklı bir kişiden 1:9 oranında EDTA'lı 200 ml kan alındı. Trombositler elde edildi ve yine 3 kez Tris-NaCl tamponu ile yıkandı. Yıkanmış trombositler 4 kez dondurulup, eritildi, üst faz ayrıldı. Patlatılmış trombosit çökeleği son konsantrasyonu % 1 olmak üzere triton X100 ile muamele edildi. +4° C'de 16 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı.

10,000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve üst faz ayrıldı(47).

Her basamakta protein tayini için Lowry yöntemi(109) kullanıldı. Bu metodla elde edilen glukoz bağlayıcı proteinin, glukozu bağlama aktivitesi HPLC yöntemiyle saptandı.

H. GLUKOZ BAĞLAYICI PROTEİN AKTİVİTESİNİN HPLC YÖNTEMİYLE TAYİNİ

Ozmotik şok yöntemi ve triton X-100 ile muamele sonucu elde edilen glukoz bağlayıcı protein 1:100 oranında ¹⁴C-glukoz ile 15 dakika inkübasyona tabi tutuldu ve HPLC'ye tatbik edildi. Protein fraksiyonları ayrı ayrı tüplere toplandı. Daha sonra bu fraksiyonlardan 400 µl alındı, 5 ml Aquasol eklenerek sıvı sintilasyon sayacında sayıldı ve ¹⁴C-glukozun bağlandığı protein piki tespit edildi.

Bu amaçla kullanılan HPLC; Waters HPLC-481 olup, değişken dalga boylu detektörlü, 30 data modüllü, model 510 pompalıdır. Protein kolonu olarak PAK 300 W kullanıldı. Mobil faz olarak 0,1 mol/l fosfat tamponu (pH:7) kullanıldı. Kolondan 20 dakika tampon geçirilerek kolon stabilize edildi. HPLC akış hızı dakikada 0,9 ml, AUFS-0,02, kağıt hızı dakikada 0,5 cm ve dalga boyu 280 nm olacak şekilde ayarlandı. 25 µl örnek uygulandı. Aynı şekilde HPLC protein standartı tatbik edildi. Standart proteinlerin RT (tutulma zamanları) ile bağlayıcı protein pikinin RT'si kıyaslanarak molekül ağırlığı bulundu.

I. GLUKOZ BAĞLAYICI PROTEİN AKTİVİTESİNİN GEL FİLTASYON YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

Dializ olmuş şok sıvısının glukoz bağlama aktivitesinin tayini için HPLC metodu yanında gel filtrasyon metodu da kullanıldı. Sephadex G-25 bir gün önceden ıslatılarak şişirildi. Kolona homojen şekilde döküldü (boy= 23 cm x çap 0,9 cm). İçinden Tris-NaCl tamponu geçirilerek kolonun dengelenmesi sağlandı. % 0.1 "Blue dekstran" geçirilerek boşluk hacmi

hesaplandı. (Kolon hacmi 4 ml, Blue dekstran ise 5-8 ml'de çıktı) 1 ml şok sıvısına 0,1 ml ^{14}C -glukoz (10^{-3} mol/l)eklenerek 15 dakika karıştırıldı ve bu karışım sephadex G-25 kolonuna tatbik edildi. 1 ml'lik fraksiyonlar toplandı. Her fraksiyonda radyoaktif sayım yapıldı ve 280 nm dalga boyundaki absorpsiyonları okundu. Spesifik bağlama aktivitesi nmol/mg protein olarak hesaplandı.

Ayrıca ^{14}C -glukoz ilave etmeden önce 1 ml şok sıvısı yine sephadex G-25 kolonuna tatbik edildi. 1 ml'lik fraksiyonlar toplandı. Yüksek O.D. veren fraksiyonlardan 400 μl alındı, 4 μl ^{14}C glukoz (10^{-3} mol/l) eklendi, 10 dakika oda ısısında inkübe edildi, nitrosellüloz membranlardan süzülerek, radyoaktivitenin hangi fraksiyonda olduğu sıvı sintilasyon sayacında sayılarak öğrenildi. Yine bu en yüksek aktivite gösteren fraksiyonlar toplanarak liyofilize edildi ve SDS-6H gel elektroforezine verilerek ne derece saflaştığı tesbit edildi ve standart protein grafiği ile molekül ağırlığı tesbit edildi.

J. GLUKOZ KONSANTRASYONUNA BAĞLI BAĞLAYICI PROTEİN KİNETİĞİ

Ozmotik şok sıvısı ve ^{14}C -glukoz 1×10^{-5} mol/l, 2×10^{-5} mol/l, 5×10^{-5} mol/l ve 10×10^{-5} mol/l son konsantrasyonları olacak şekilde muamele edildi ve $+4^\circ \text{C}$ 'de 15 dakika inkübe edildi.

Nitrosellüloz membranlar Tris-NaCl tamponunda ıslatıldı ve Millipore manifold aletinde son hacim 200 μl olacak şekilde vakumla süzüldü. Filtreler sayım şişelerine aktarıldı ve PPO/POPOP çözeltisi eklenerek sıvı sintilasyon sayacında sayıldı. "Quench" düzeltmeleri yapılarak Michaleis-Menten ve Line-weaver Burk ve Scatchard grafikleri çizildi ve K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

K. DEFİBROTİDİN MEMBRAN GLUKOZ TRANSPORTU ÜZERİNE İN VİVO ETKİSİ

Defibrotidin glukoz transportuna etkisini incelemek için aterosklerozlu 42 olgu ve 8 normal olgu kullanıldı. 1:9 oranında EDTA'lı 20 ml kan örneği alındı. 600 mg defibrotid i.v. olarak enjekte edildi. Enjeksiyondan 2 saat sonra tekrar kan örneği alındı.

Bu olgulardan 9 tanesinde de yine ilaç verilmeden önce 1:9 EDTA'lı 20 ml kan örneği alındı. Hergün 600 mg defibrotid i.v. olarak 15 gün verildi ve 15. gün tekrar kan örneği alınarak glukoz transport deneyine başlandı.

Defibrotid etkisinin spesifik olup olmadığını öğrenmek amacıyla düşük molekülü heparin (LMW heparin CY 222) kullanıldı ve bu amaçla 3 aterosklerozlu olgudan 1:9 oranında EDTA'lı 20 ml kan örneği alındı. 0,6 cc. (12.000 choay ünitesi) CY222 deri altına enjekte edildi ve 3 saat sonra tekrar kan örneği alınarak glukoz transport deneyi gerçekleştirildi.

L. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER: Tıbbi Biometri Kitabındaki formüller kullanılarak yapıldı(110).

M. İNDİRGENMİŞ SODYUM DODESİL SÜLFAT GEL ELEKTROFOREZİ (SDS-6H-PAGE)(111)

SDS-6H gel elektroforezi Weber-Osborn metodunun bir modifikasyonudur. % 5'lik jeller kullanılır.

Kullanılan Çözeltiler:

1- Örnek tampon (A)	
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	0,442 g
Na ₂ H PO ₄	1,02 g
SDS	1.0 g
2-MET	1 ml

BFB	0,015 g
Üre	36 g 100 ml'ye tamamlanır.

2- Gel tamponu (B)

NaH₂ PO₄ 2H₂O 8.84 g 25° C'de pH:7

Na₂H PO₄ 20.45 g

980 ml'ye tamamlanır. Kullanılacağı zaman % 10 SDS'den 20 ml eklenir.

3- Akrilamid gel (C) çözeltisi

Akrilamid 11,1 g

Bis-Akrilamid 0,3 g 1000 ml'ye distile su ile tamamlanır.

4- APS çözeltisi: 100 mg APS 15 ml'ye tamamlanır.

5- Fiksatif çözeltisi

Metanol 400 ml

Asetik Asit 70 ml

Su 530 ml

6- Boyama çözeltisi

Metanol 400 ml

Asetikasit 70 ml

Su 530 ml hazırlanıp 500 ml sine 1,25 g Commassie brillant blue eklenip, karıştırılır.

7- Boya çıkarma çözeltisi

Metanol 50 ml

Asetikasit 75 ml

Distile su 875 ml

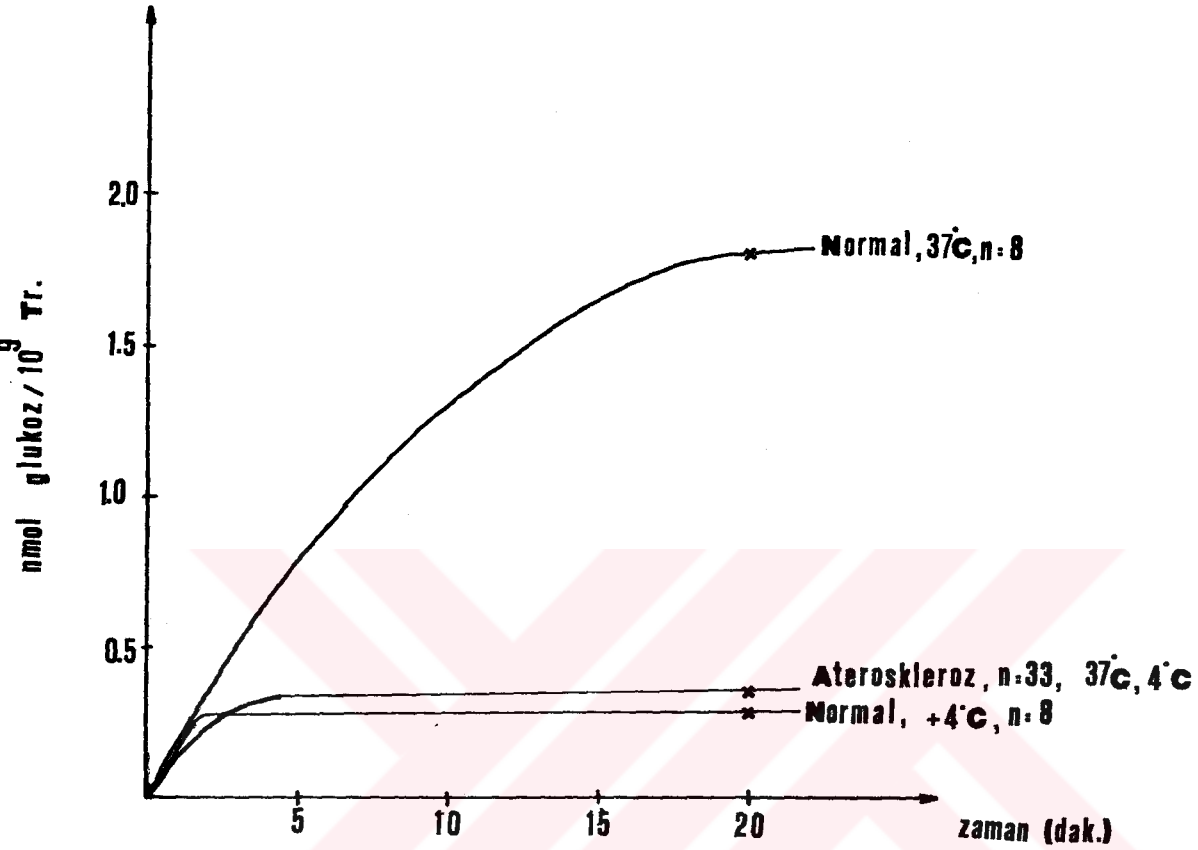
Gellerin hazırlanması; 0,5 cm çapında ve 10 cm uzunluğunda jel tüpleri kullanıldı. Gel tüpleri 7 cm uzunluğunda işaretlendi ve tüplerin altı parafilm ile kapatıldı.

12 gel için; 14,7 ml gel tamponu (B), 13,5 ml akrilamid gel çözeltisi (C), 1,5 ml APS çözeltisi erlenmayer içine konarak, soğukta vakum ile havası alındı. 0,3 ml SDS (% 10) çözeltisi ve 50 μ l TEMED üzerine ilave edildi. Gellerin üzerine 40 μ l distile su kondu ve polimerleşmesi beklendi. Bilinmeyen protein içeren örnekten 100 μ l, örnek tamponundan (A) 100 μ l alınıp karıştırıldı. Bütün örnekler, ve standart 100° C'de 60 saniye (örnek tampon içinde) bekletilerek proteinlerin denatüre edilmesi sağlandı. Gel başına 20 μ l örnek uygulandı. Her gel için 8mA akım verildi. (+) uç anoda, (-) uç katoda bağlandı. Elektroforez tamponu olarak gel tamponu (B) 1:1 oranında sulandırılarak kullanıldı. Marker çizgisi tüpün bitimine 1 cm kalan seviyeye geldiğinde akım kesildi. Sonra jeller çıkarıldı. Çıkarılan jeller fiksatif çözeltisinde en az 10 saat tutuldu. Boyama solüsyonunda bir gece tutulduktan sonra boya çıkarma solüsyonunda boyaları çıkarıldı.

IV. B U L G U L A R

A. NORMAL VE ATEROSKLEROZLU OLGULARDA ZAMANA BAĞ- LI GLUKOZ TRANSPORTU VE BİRİKİMİ

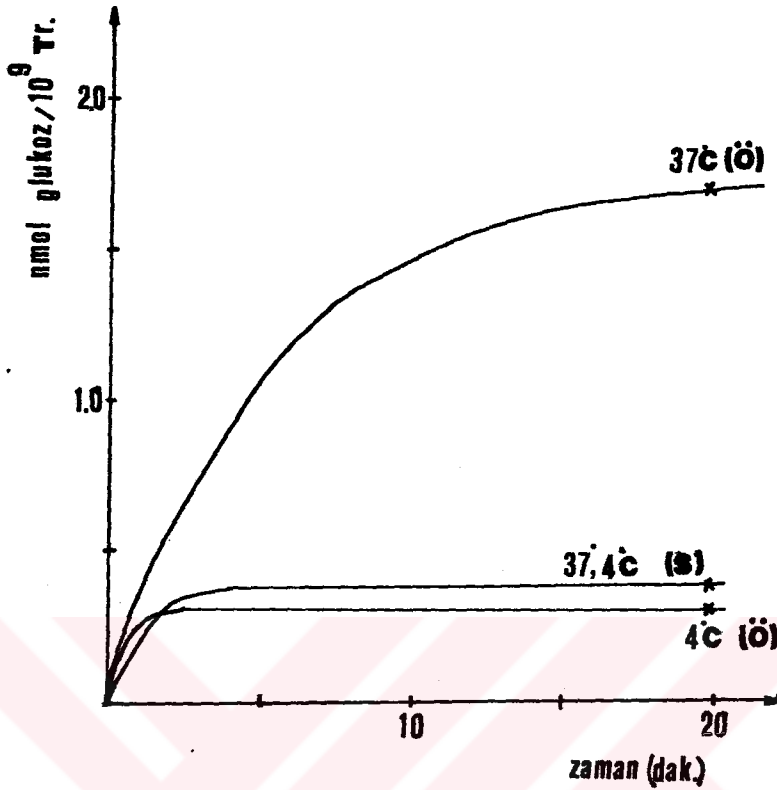
Şekil 1'de görüldüğü gibi ^{14}C -glukoz trombositlere zamana bağımlı olarak alınır. İçeri akım (influx) sonucu metabolik havuzda biriken ^{14}C -glukozun kısa bir süre sonra dışarı akımı (efflux) başlar ve bir müddet sonra "influx" ve "efflux" dengeye erişir, bu kararlı hal "influx" ve "efflux"un eşit olduğu yani dengede bulunduğu haldir. Trombositlerde zamana bağlı glukoz transportu, sıcaklığa bağımlılık gösterir, $+4^\circ \text{C}$ 'deki transport 37°C 'deki transportun % 50'sinin altındadır. $+4^\circ \text{C}$ 'deki birikim basit difüzyon ve ^{14}C -glukozun trombositlere nonspesifik bağlanmasıdır. 8 normal vakada yapılan glukoz transportu sonucu, 37°C 'de 20 dakikada $1,8 \pm 0,40$ nmol glukoz / 10^9 trombosit, $+4^\circ \text{C}$ 'de $0,26 \pm 0,09$ nmol glukoz / 10^9 trombosit, aterosklerozda ise $0,30 \pm 0,27$ nmol glukoz / 10^9 trombosit olarak bulundu (Şekil I).



Şekil I : Normal ve aterosklerozlu olguların trombositlerinde 37°C ve +4°C'de zamana bağlı ¹⁴C-glukoz transportu ve birikimi (son glukoz konsantrasyonu 10⁻⁵ mol/l dir).

B. OZMOTİK ŞOK SIVISINDA GLUKOZ BAĞLAYICI PROTEİN AKTİVİTESİ

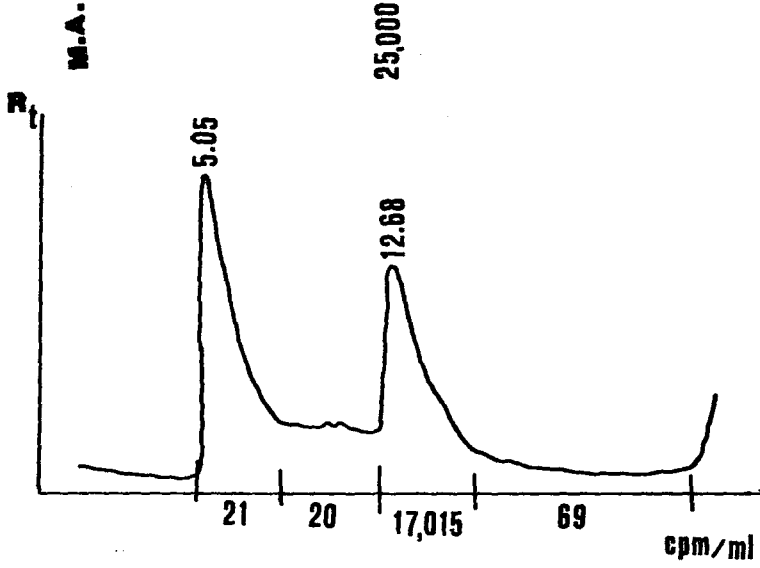
Soğuk ozmotik şok yönteminde, trombositlerin membrana serbest şekilde bağlı bulunan maddeleri şok sıvısına geçer. Soğuk ozmotik şokun trombositlerin aktif transport mekanizmasını bozduğu, glukoz bağlayıcı proteinin ozmotik şok sıvısına geçtiği Yardımcı tarafından gösterilmiştir(6). Soğuk ozmotik şoktan önce ve sonra zamana bağlı glukoz transportu 37°C ve +4°C'de aynı olup, şoka uğramamış trombositlerin +4° C'deki glukoz transportu ile aynıdır (Şekil II).



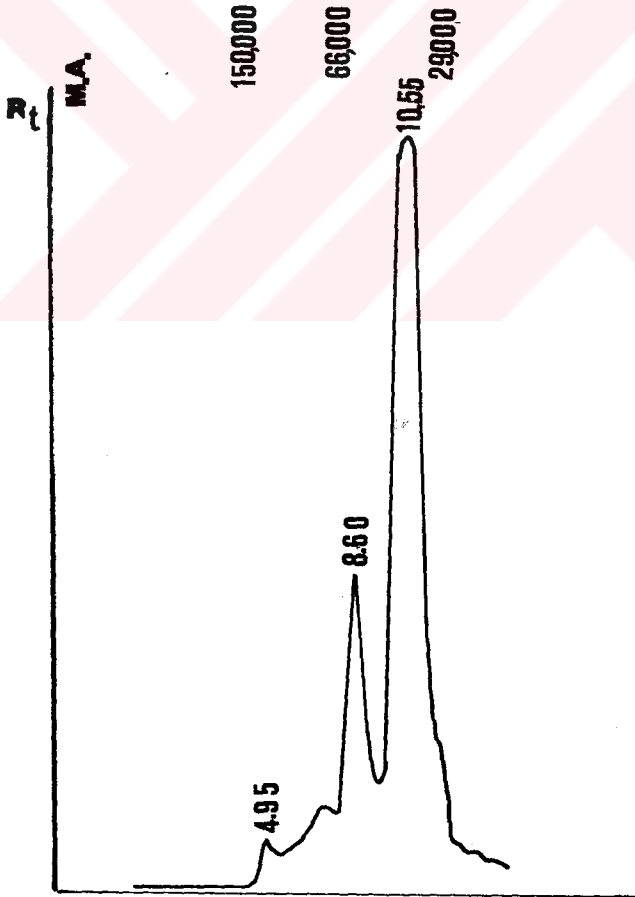
Şekil II : Normal bir olgunun trombositlerinde soğuk ozmotik şoktan önce (ö) ve sonra (s), zamana bağlı ^{14}C -glukoz birikimi (37°C ve $+4^\circ\text{C}$) (son glukoz konsantrasyonu 10^{-5} mol/l dir)

Bu şekilde elde edilmiş olan şok sıvısı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ presipitasyonuna tabi tutularak proteinler çöktürüldü. Presipitat Tris-NaCl tamponunda dialize bırakıldı. Dializden sonra bu sıvıda glukoz bağlayıcı protein aktivitesinin varlığına gel filtrasyon yöntemi ve HPLC ile bakıldı.

Ozmotik şok sıvısı, 1:100 oranında ^{14}C -glukoz ile 15 dakika karıştırıldı. Glukozun son konsantrasyonu 10^{-3} mol/l olarak ayarlandı. Sıcaklık bağlayıcı aktiviteyi etkilemediğinden, bağlayıcı aktiviteye $+4^\circ\text{C}$ 'de bakıldı. 15 dakikalık inkübasyondan sonra $25\ \mu\text{l}$ HPLC'ye tatbik edildi. Elüsyon sonucu HPLC kromatogramları şekil III de görülmektedir. Protein piklerinin tekabül ettiği fraksiyonlar toplanarak radyoaktif sayım yapıldı ^{14}C -glukozun en çok bağlandığı protein piki bağlayıcı protein olarak tesbit edildi. HPLC'ye protein standardı verilerek ozmotik şok sıvısında bulunan bağlayıcı proteinin molekül ağırlığı 25,000 Da olarak bulundu.

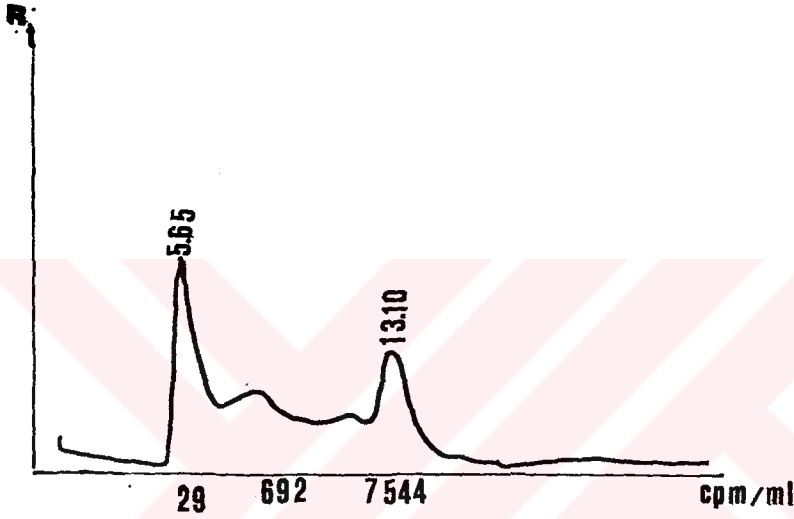


Şekil III : Ozmotik şok sıvısının HPLC'den elde edilen kromotogramı ve protein piklerinin molekül ağırlığı, bağlanan ^{14}C -glukozun cpm değerleri.



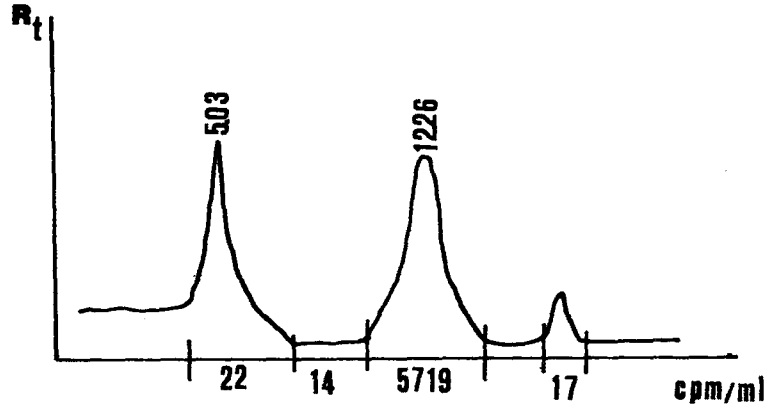
Şekil IV : HPLC protein standardının HPLC kromotogramı

Ayrıca glukoz bağlayıcı proteinin, başka maddelerin transportunda rol alıp almadığını öğrenmek amacıyla ^{14}C -amino asit karışımı 1:100 oranında ozmotik şok sıvısı ile 15 dakika karıştırıldı ve yine HPLC'ye tatbik edildi. Fraksiyonlar toplanarak sıvı sintilasyon sayacında sayıldı ve aynı fraksiyona ^{14}C -aminoasidin bağlanmış olduğu görüldü (Şekil V).



Şekil V : Ozmotik şok sıvısı + ^{14}C -amino asit karışımının HPLC'den elde edilen kromotogramı ve ^{14}C -amino asidin cpm değerleri

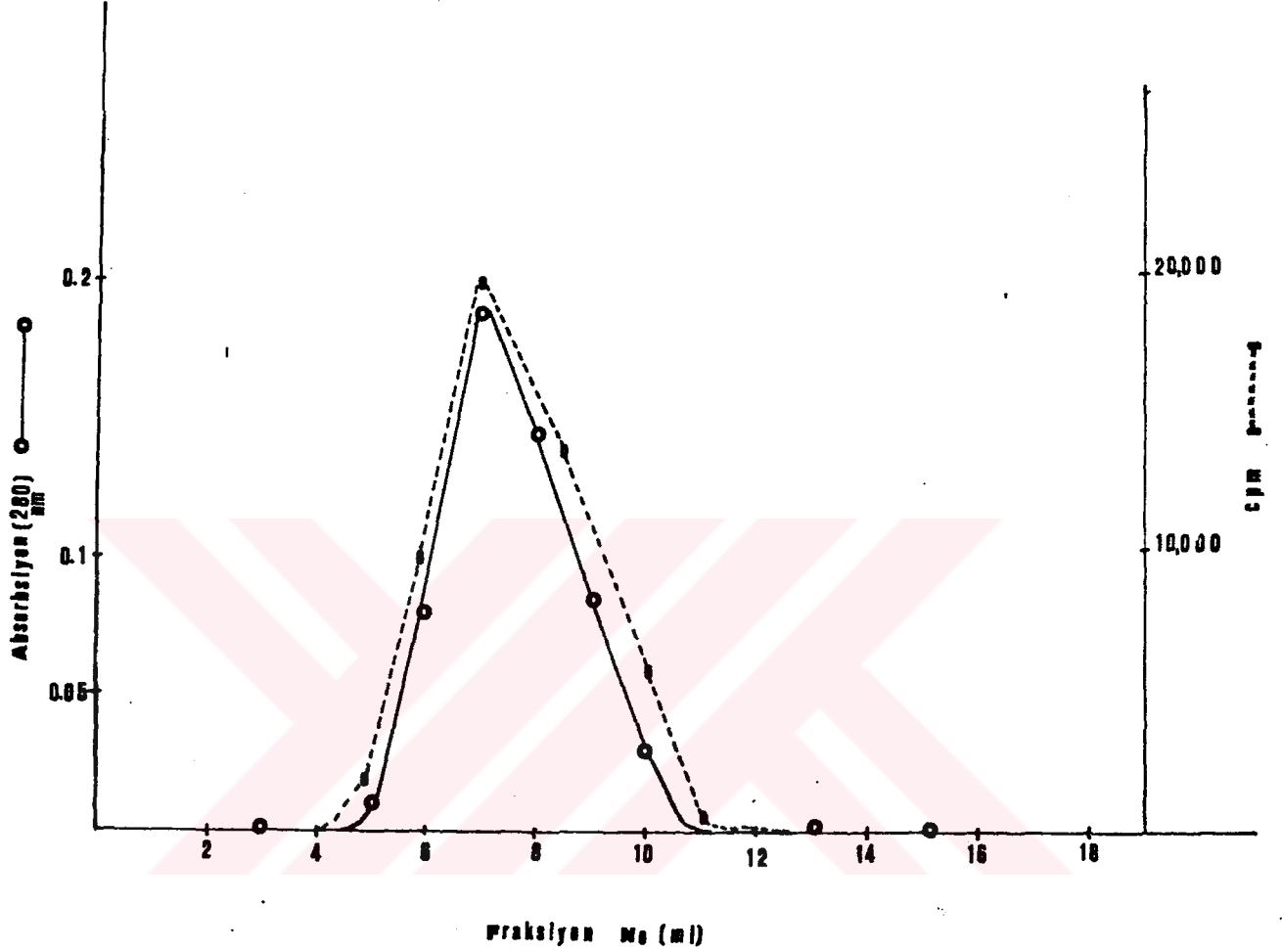
Elde edilen ozmotik şok sıvısından artakalan trombosit çökeleği mm^3 'de 500,000 trombosit olacak şekilde % 1 triton X-100 ile süspand edilip 16 saat (+4° C'de) karıştırıldı. 10,000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Triton X-100 ile solubilize edilen kısımda bağlayıcı protein aktivitesinin kalıp kalmadığını kontrol etmek amacıyla 1:100 ^{14}C glukoz ile 15 dakika karıştırıldı ve HPLC'ye verildi. Toplanan fraksiyonlar sıvı sintilasyon sayacında sayıldı ve bağlayıcı proteinin çoğuna yakın bir kısmının ozmotik şok sıvısına geçtiği, çok az bir miktarının ise trombositte kaldığı görüldü (Şekil VI).



Şekil VI : Ozmotik şok sıvısından arta kalan trombositlerin Triton X-100 ile solubilize edilip ^{14}C -glukozla muamelesinden sonra HPLC kromotogramı.

Ozmotik şok sıvısı 1:100 ^{14}C -glukoz ile 15 dakika karıştırıldıktan sonra Sephadex G-25 kolon kromatografisi yapıldı ve fraksiyonlar toplandı. Radyoaktif sayıma ve 280 nm dalga boyundaki absorpsiyona her fraksiyonda bakıldı. Protein ve ^{14}C -glukoz aynı fraksiyonlarda(6,7,8,9) çıktı. Protein ile beraber çıkan ^{14}C -glukoz bağlayıcı proteinle kompleksleşmiş ^{14}C -glukozdur. Böylece HPLC'de elde edildiği gibi kolon kromatografisinde de glukoz transportunda aracı olabilen bir protein elde edilmiş oldu (Şekil VII).

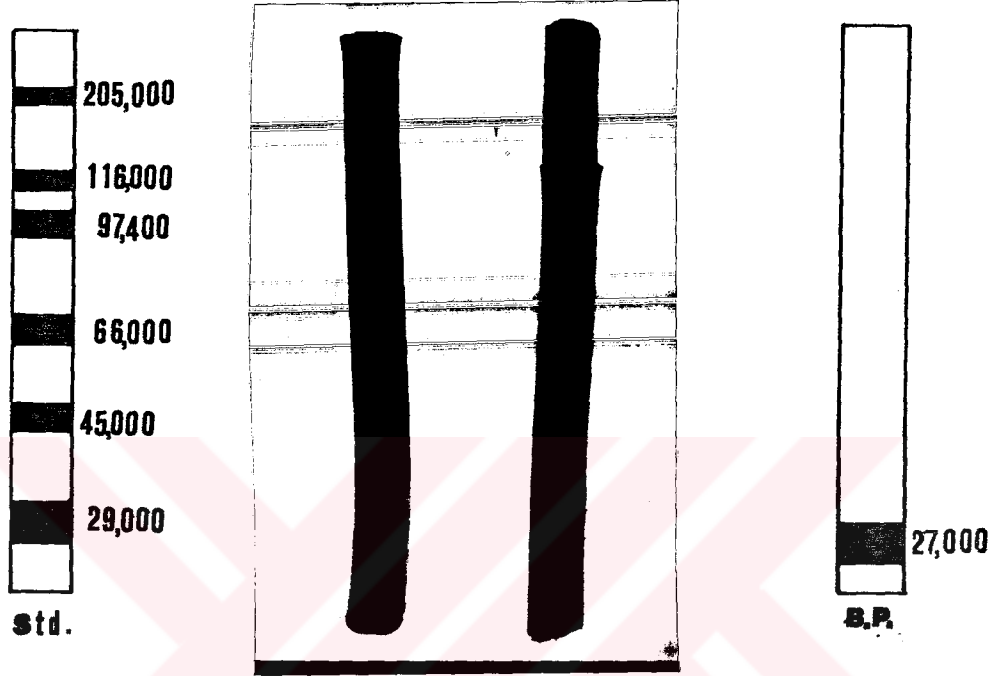
Ozmotik şok sıvısı Sephadex G-25 kolon kromatografisinden sonra yüksek O.D. veren fraksiyonlara sonradan 1:10 oranında ^{14}C -glukoz eklenip nitrosellüloz membrandan süzülerek gerçekleştirilen deneyde de ^{14}C -glukozun yine aynı fraksiyonlarda yüksek olduğu görüldü.



Şekil VII: Soğuk ozmotik şok sıvısı ile ^{14}C -glukoz karışımının Sephadex G-25 gel kromatogramı.

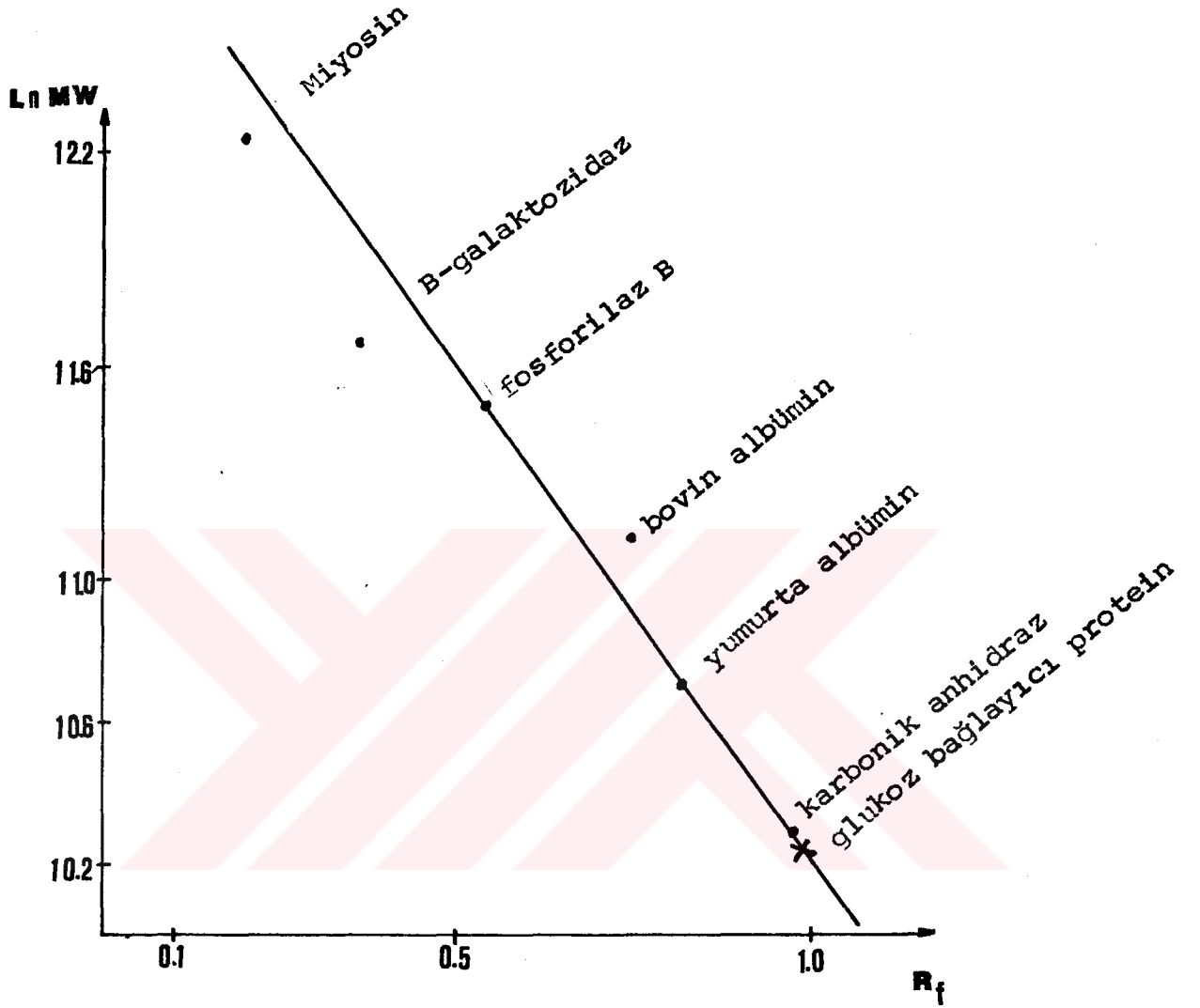
En yüksek O.D veren fraksiyon liyofilize edildi ve SDS-6H gel elektroforezi yapılarak proteinin ne derece saflaştırıldığı ve molekül ağırlığı standart proteinlerin molekül ağırlıklarının Ln ile Rf değerleri arasında çizilen grafikten elde edildi.

SDS gel elektroforezinde elde edilen tek bantın (bağlayıcı prote-
in) molekül ağırlığı 27,000 Da olarak bulundu (Resim I, Şekil VIII).



Resim I : Standart ve bağlayıcı proteinlerin SDS-6H gel elektroforezi ile molekül ağırlı-
nın saptanması

Standart Proteinler	Molekül ağırlığı M.W.	LnM.W	Uzunluk L cm	Marker uzunluğu M.L.cm	Rf
Miyosin	205,000	12,23	1,3	6,5	0,2
B-galaktozidaz	116,000	11,66	2,4	6,5	0,36
Fosforilaz b	97400	11,49	3,5	6,5	0,54
Bovin Albumin	66000	11,11	4,9	6,5	0,75
Yumurta albumin	45000	10,70	5,3	6,5	0,82
Karbonik Anhidraz	29000	10,28	6,4	6,5	0,98
Glukoz bağlayıcı protein	27000	10,20	6,45	6,5	0,99



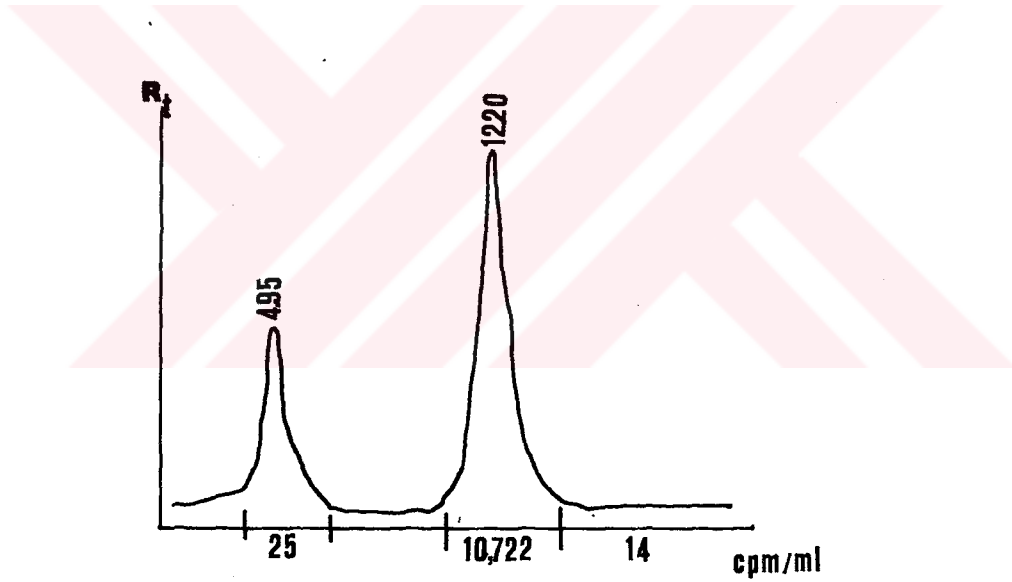
Şekil VIII - SDS-6H PAGE standart eğrisi

C. TROMBOSİT MEMBRANININ DETERJAN MADDE İLE SOLUBİLİZASYONU VE GLUKOZ BAĞLAYICI PROTEİNİN SAFLAŞTIRILMASI

Membran proteinleri ile yapılan çalışmalarda, kullanılan deterjanların membranla interaksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte membranın solubilizasyonuna sebep olduğu söylenmektedir(112).

Yaptığımız çalışmada, sağlıklı kişilerden elde edilen yıkanmış trombositler, önce 4 kez dondurulup eritildi, patlatılmış olan trombosit çökeleği son konsantrasyon % 1 triton X-100 olacak şekilde +4° C'de 16 saat karıştırıldı ve her basamakta protein tayini yapıldı. Santrifigasyon ile üst faz ayrıldı. Bağlayıcı protein tayini için HPLC'ye verildi.

HPLC'ye verilmeden önce glukoz bağlayıcı aktivitenin varlığını saptamak için triton X-100 ile solubilize edilen trombosit süpernatanı 1:100 oranında ¹⁴C-glukoz ile 15 dakika karıştırıldı ve HPLC'ye tatbik edildi. Fraksiyonlar ayrı ayrı tüplerde toplandı, sıvı sintilasyon sayacında sayıldı ve ¹⁴C-glukozun en çok bağlandığı protein piki bulundu. Bu pik standart protein ile karşılaştırılarak molekül ağırlığı hesaplandı (Şekil IX).

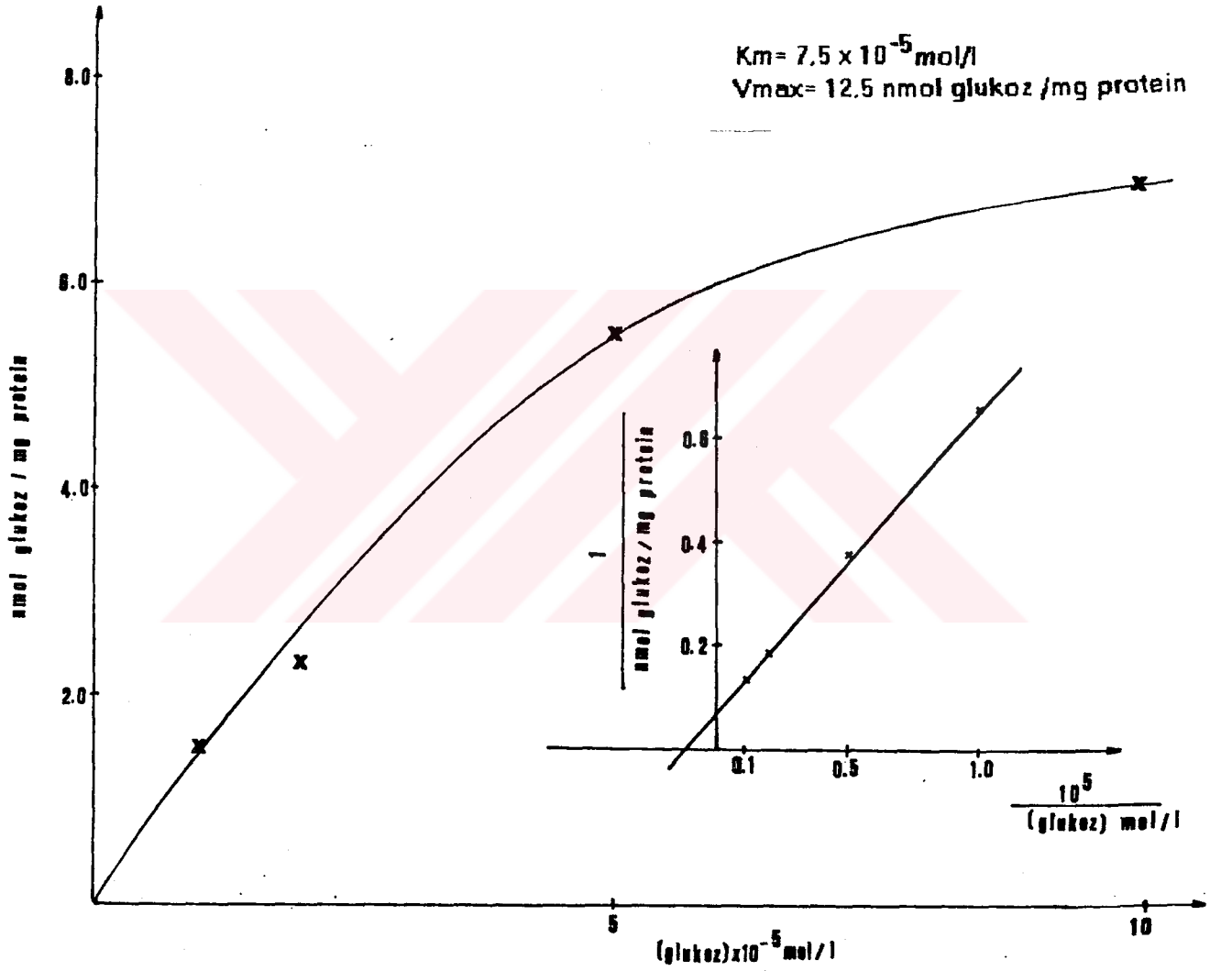


Şekil IX : Triton X-100 ile solubilize edilmiş trombositlerin HPLC'den elde edilen kromotogramı ve bağlanan ¹⁴C-glukozun cpm değerleri.

D. OZMOTİK ŞOK SIVISINDAN ELDE EDİLEN BAĞLAYICI PROTEİN KİNETİĞİ

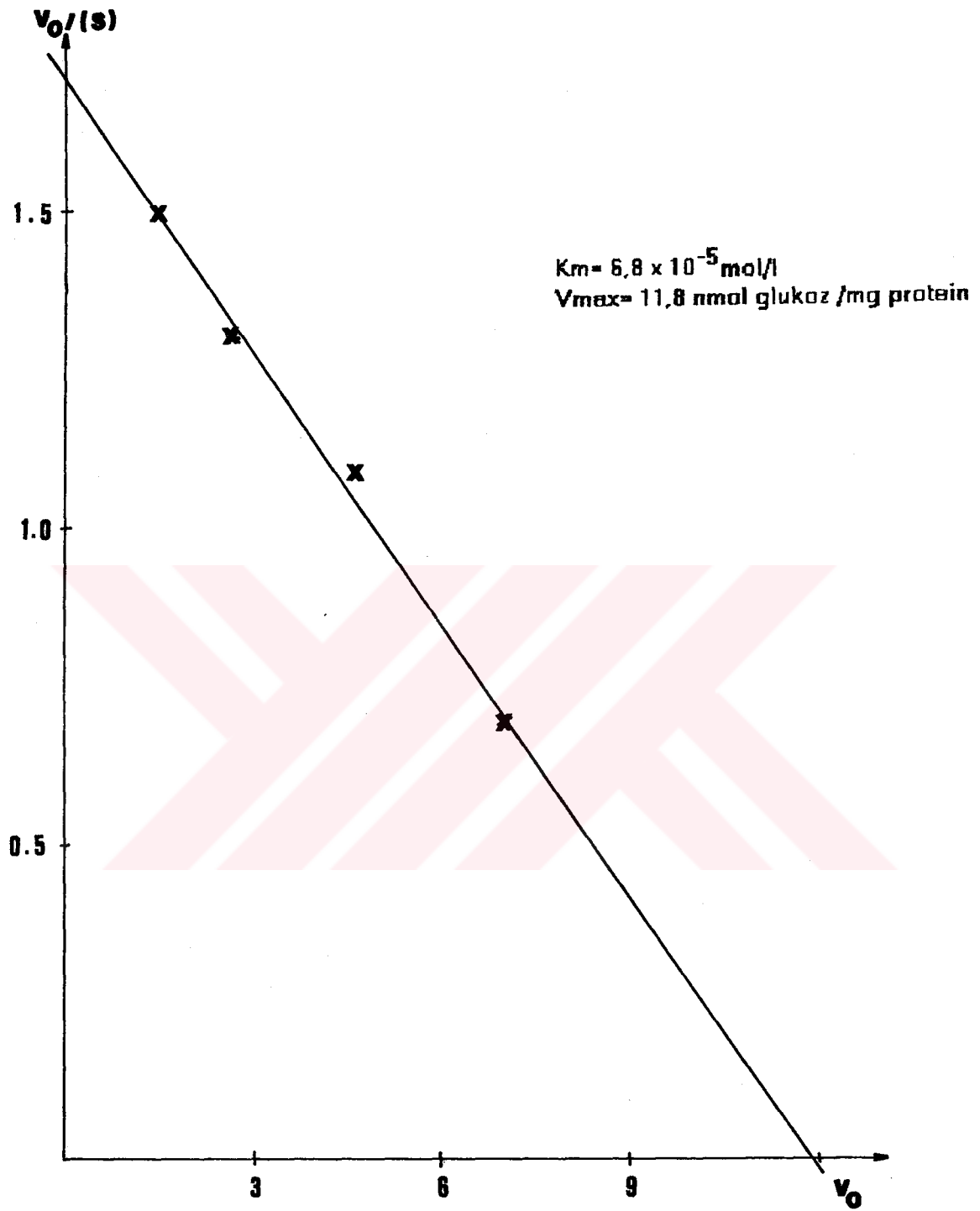
Ozmotik şok yöntemi ile elde edilen ozmotik şok sıvısı 1×10^{-5} mol/l, 2×10^{-5} mol/l, 5×10^{-5} mol/l, $1,0 \times 10^{-5}$ mol/l konsantrasyonlarda ¹⁴C-glukoz ile +4° C'de (buzda) 15 dakika inkübe edildi.

Nitrosellülöz membranlar, Millipore manifold kullanılarak filtre edildi ve nitrosellülöz membranlar sıvı sintilasyon sayacında sayıldı. Michaelis-Menten, Lineweaver Burk ve Scatchard grafiği çizildi. Lineweaver Burk grafiğine göre; $K_m = 7,5 \times 10^{-5}$ mol/l, $V_{max} = 12,5$ nmol glukoz/mg protein, Scatchard grafiğinde ise $K_m = 6,8 \times 10^{-5}$ mol/l, $V_{max} = 11,8$ nmol glukoz/mg protein olarak bulundu (Şekil X, Şekil XI).



Şekil X : Glukoz bağlayıcı proteinin Michaleis-Menten ve Lineweaver Burk grafiği.

(10 sağlıklı kişiden elde edilen trombositlerden ozmotik şok sıvısı elde edildi ve bunlar birleştirilerek transport kinetiği çalışıldı. Her bir nokta 2 li çalışmanın ortalamasıdır.)



Şekil XI : Glukoz bağlayıcı proteinin Scatchard grafiği.

E. GLUKOZ BAĞLAYICI PROTEİNİN SAFLAŞTIRILMASI

Soğuk ozmotik şok yöntemi ve triton X-100 ile solubilizasyon yöntemi sonucu kısmen saflaştırılan glukoz bağlayıcı proteinin spesifik aktiviteleri karşılaştırıldı. Ozmotik şok sonucu elde edilen fraksiyonların Sephadex G-25 kolon kromatografisinden sonra spesifik aktivitesi 53,2 nmol glukoz/mg protein, HPLC'den geçirildikten sonra 45,2 nmol glukoz/mg protein olarak bulunurken, triton X-100'le muameleden sonra 13,6 nmol glukoz/mg protein olarak bulundu.

Sephadex G-25 sonucu elde edilen glukoz bağlayıcı proteini 3,5 kez, HPLC sonucu ise 3,0 kez saflaştırılmış oldu (Tablo II).

F. DEFİBROTİDİN MEMBRAN GLUKOZ TRANSPORTUNA İN VİVO ETKİSİ*

8 normal ve 33 aterosklerozlu olguda 600 mg defibrotid i.v. olarak enjekte edildi. Enjeksiyondan önce ve 2 saat sonra 1:9 EDTA'lı kan örnekleri alındı. Glukoz transport deneyi yapıldı. Zamana bağlı transportta defibrotid'in aterosklerozlu olgularda arttırdığı görüldü, fakat bu artışın normallerin çok altında olduğu izlendi. Normal olgularda ise anlamlı bir fark görülmedi (Tablo III, Şekil XII).

* Preliminer çalışmalarımızda defibrotid'in glukoz transportuna in vitro etkisi olmadığı gözlenmiştir.

Tablo II : Trombositlerden glukoz bağlayıcı proteinin kısmi saflaştırılması

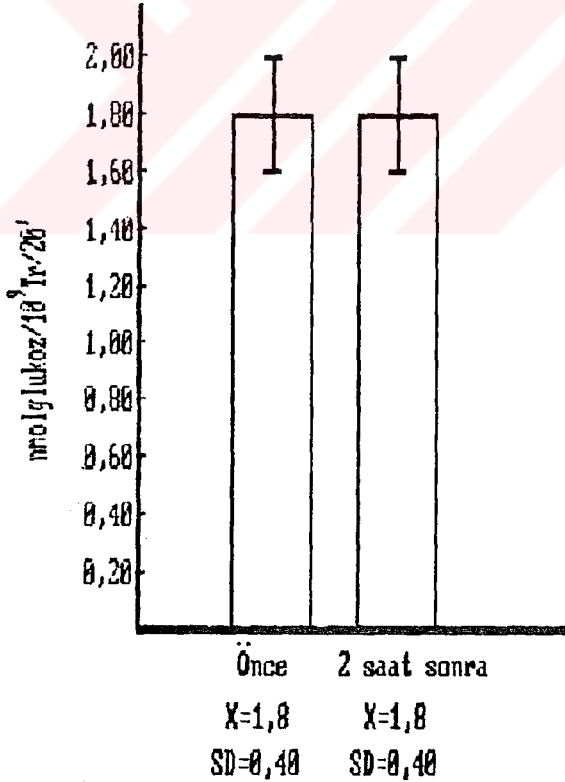
<i>Saflaştırma basamakları</i>	<i>Hacim (ml)</i>	<i>Total protein (mg)</i>	<i>Total aktivite</i>	<i>Spesifik aktivite/nmol glukoz/mg protein</i>	<i>Saflaştırma katsayısı</i>
Ozmotik şok sıvısı	42	17,64	264	15	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ ile çöktürme (% 95)	5	1,55	39	25,1	1,6
Sephadeks G-25 veya HPLC	1 ml	0,25	13,3	53,2	3,5
Dondurup, eritme Triton X-100	1 ml	0,52	11,3	45,2	3,0
Ozmotik şoktan geri kalan presipitat + Triton X-100	1 ml	0,25	5,02	20,0	

Tablo III: Normal olgularda defibrotidin trombosit glukoz transportu ve birikimine etkisi

Olgu adı	Net değerler	
	Önce	Sonra
1) H.B.	1,5	1,5
2) N.K.	2,1	1,9
3) Ő.B.	1,9	1,9
4) S.E.	2,4	2,6
5) B.B.	1,8	1,9
6) M.K.	2,1	1,9
7) F.A.	1,4	2,0
8) T.B.	1,2	1,2
	x=1,8	x=1,8
	SD= 0,40	SD= 0,40
		p>0,5

Tablo IV : Normal olgularda defibrotidin trombosit glukoz transport ve birikimine in vivo etkisi (+4°C ve 37°C'deki değerleri nmol glukoz/10⁹ Tr/20' olarak verilmiştir)

Olgu Adı	Önce (37°)	+4° C	Sonra (37° C)	+4° C
1) H.B	1,8	0,30	1,8	0,30
2) N.K.	2,35	0,25	2,25	0,35
3) ř.B.	2,24	0,34	2,26	0,36
4) S.E.	2,78	0,38	3,01	0,41
5) B.B.	2,19	0,39	2,35	0,45
6) M.K.	2,50	0,40	2,30	0,40
7) F.A	1,85	0,45	2,35	0,35
8) T.B.	1,6	0,40	1,6	0,40
	x= 2,16 SD= 0,39	x= 0,36 SD= 0,06	x= 2,24 SD= 0,41	x= 0,37 SD= 0,04



şekil XII : Normal olgularda defibrotidin trombosit glukoz transport ve birikimine in vivo etkisi

Defibrotid, glukoz transport birikimini aterosklerozlu olgularda $0,57 \pm 0,54$ nmol glukoz/ 10^9 trombosit, 2 saat sonra $0,77 \pm 0,67$ nmol glukoz/ 10^9 trombositte yükselttiği ve student t testi uygulandığında $p < 0,001$ olarak anlamlı olduğu bulundu Tablo V, Şekil XIII.

15 gün i.v. defibrotid (600 mg) uygulanmış 9 olgunun glukoz transportu sonucunda ise, transport değerleri, $0,30 \pm 0,27$ nmol glukoz/ 10^9 trombosit 2 saat sonra $0,41 \pm 0,35$ nmol glukoz/ 10^9 trombositte ve 15. gün sonunda $0,55 \pm 0,47$ nmol glukoz/ 10^9 trombositte yükseldiği görüldü ve student t testi uygulandığında, önce ve 2 saat sonra değerleri arasında $p < 0,01$, önce ve 15. gün değerleri arasında $p < 0,001$ olarak anlamlı bulundu (Tablo VII, Şekil XIV).

G. LMW HEPARİNİN GLUKOZ TRANSPORTUNA ETKİSİ;

3 aterosklerozlu olguda LMW heparin subkutan (12000 U) olarak uygulandı, önce ve 3 saat sonra glukoz transportunun $0,53$ nmol glukoz/ 10^9 trombosit/20 dakika olarak aynı kaldığı görüldü (Tablo IX, Şekil XVII).

H. TROMBOSİT MEMBRAN PROTEİN PROFİLİNE İNVİVO DEFİBROTİD ETKİSİ;

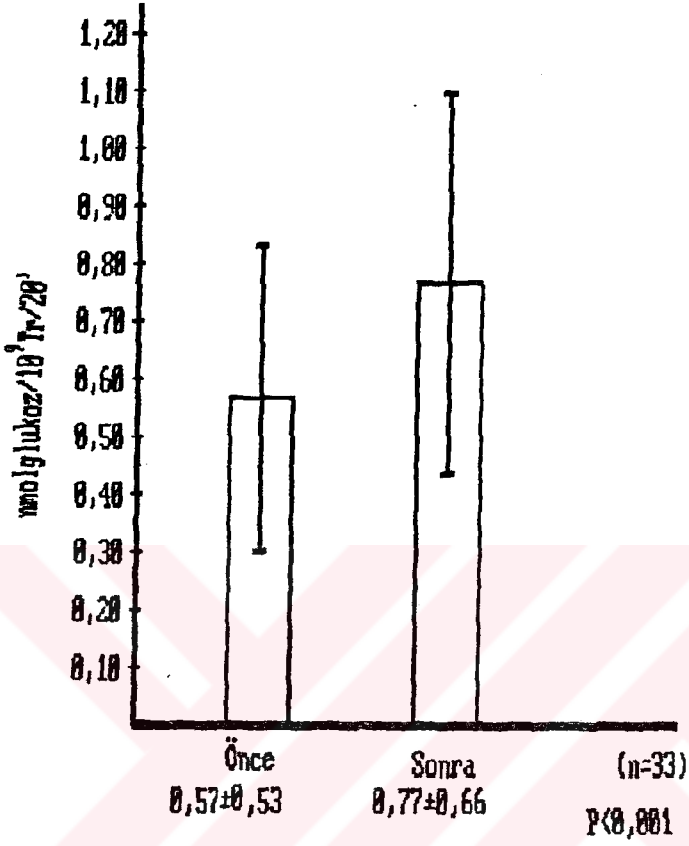
Aterosklerozlu olgularda defibrotid (i.v. 600 mg) uygulanmasından önce ve 2 saat sonra elde edilen trombositler triton X-100'le solubilize edildi, HPLC'ye verildiğinde önce ve sonra arasında $8,41$ RT'lı $66,000$ M.A.da bir proteinin varlığı gözlemlendi (Şekil XVIII).

Tablo V : Aterosklerozlu olgularda defibrotidin trombosit glukoz transport ve birikimine in vivo etkisi (nmol glukoz/10⁹ Tr/20')

Olgu adı	Net Değerler;	
	Önce	Sonra
1) Ş.B.	1,98	1,98
2) S.E.	1,35	2,40
3) B.B.	1,18	1,84
4) S.E.	0,80	0,80
5) M.S.	0,61	0,77
6) N.D.	0,97	1,15
7) N.S.	1,00	1,30
8) M.B.	0,92	1,07
9) M.A.E.	0,78	0,85
10) F.Ş.	2,27	2,74
11) M.C.T.	1,29	1,54
12) T.İ.	0,36	0,46
13) Ş.Ö.	0,22	0,25
14) A.P.	0,23	0,29
15) O.A.D.	0,40	0,45
16) T.Ö.	0,33	0,33
17) H.G.	0,32	0,49
18) İ.A.	0,89	1,09
19) B.D.	0,16	0,31
20) R.C.	0,11	0,12
21) H.G.	0,14	0,39
22) A.B.	0,26	0,34
23) T.B.	0,42	1,24
24) E.V.	0,25	0,27
25) N.B.	0,23	0,23
26) S.D.	0,14	0,28
27) T.Ö.	0,21	0,49
28) M.T.	0,10	0,12
29) E.T.	0,35	0,59
30) S.D.	0,18	0,79
31) F.B.	0,16	0,19
32) O.U.	0,28	0,29
33) E.Y.	0,21	0,24
	x = 0,57	x = 0,77
	SD = 0,54	SD = 0,67

Tablo VI : *Aterosklerozlu olgularda defibrotidin glukoz transport ve birikimine in vivo etkisi (+4° ve 37° C değerleri nmol glukoz/10⁹ Tr/20' olarak verilmiştir)*

Olgu Adı	Önce (37°C)	+4°C	Sonra (37°C)	+4° C
1) Ş.B	2,48	0,50	2,48	0,50
2) S.E.	1,65	0,30	2,70	0,30
3) B.B.	1,48	0,30	2,14	0,30
4) S.E.	1,10	0,30	1,10	0,30
5) M.S	0,91	0,30	1,07	0,30
6) N.D.	1,22	0,25	1,45	0,30
7) N.S.	1,30	0,30	1,60	0,30
8) M.B.	1,26	0,34	1,48	0,41
9) M.A.E.	1,16	0,38	1,26	0,34
10) Ş.Ş.	2,61	0,34	2,81	0,47
11) MC.T.	1,68	0,39	1,73	0,19
12) T.İ.	0,55	0,19	0,65	0,19
13) Ş.Ö.	0,52	0,30	0,55	0,30
14) A.P.	0,56	0,33	0,62	0,33
15) O.A.D.	0,74	0,34	0,79	0,34
16) T.Ö.	0,63	0,30	0,63	0,30
17) H.G.	0,53	0,21	0,71	0,22
18) İ.A.	1,42	0,45	1,44	0,35
19) B.D.	0,36	0,20	0,61	0,30
20) R.C.	0,31	0,20	0,46	0,34
21) H.G.	0,35	0,21	0,74	0,35
22) A.B.	0,44	0,18	0,55	0,21
23) T.B.	0,62	0,20	1,63	0,39
24) E.V.	0,50	0,25	0,51	0,24
25) N.B.	0,48	0,25	0,53	0,30
26) S.D.	0,27	0,13	0,41	0,13
27) T.Ö.	0,32	0,11	0,59	0,10
28) M.T.	0,25	0,15	0,22	0,10
29) E.T.	0,56	0,21	0,80	0,21
30) S.D.	0,31	0,13	0,92	0,13
31) F.B.	0,39	0,23	0,38	0,19
32) O.U.	0,48	0,20	0,49	0,20
33) E.Y.	0,43	0,22	0,44	0,20
	x=0,84	x=0,26	x=1,04	x=0,27
	SD=0,61	SD=0,09	SD=0,69	SD= 0,09



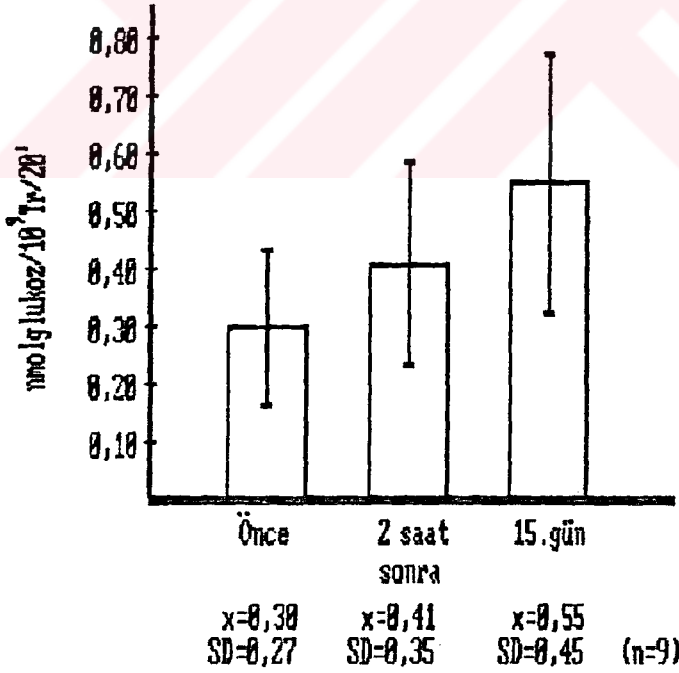
Şekil XIII: Aterosklerozlu olgularda defibrinotidin trombosit glukoz transport ve birikimine in vivo etkisi

Tablo VII: Aterosklerozlu olgularda defibrinotidin trombosit glukoz transport ve birikimine in vivo etkisi (nmol glukoz/10⁹ trombosit/20 dakika)

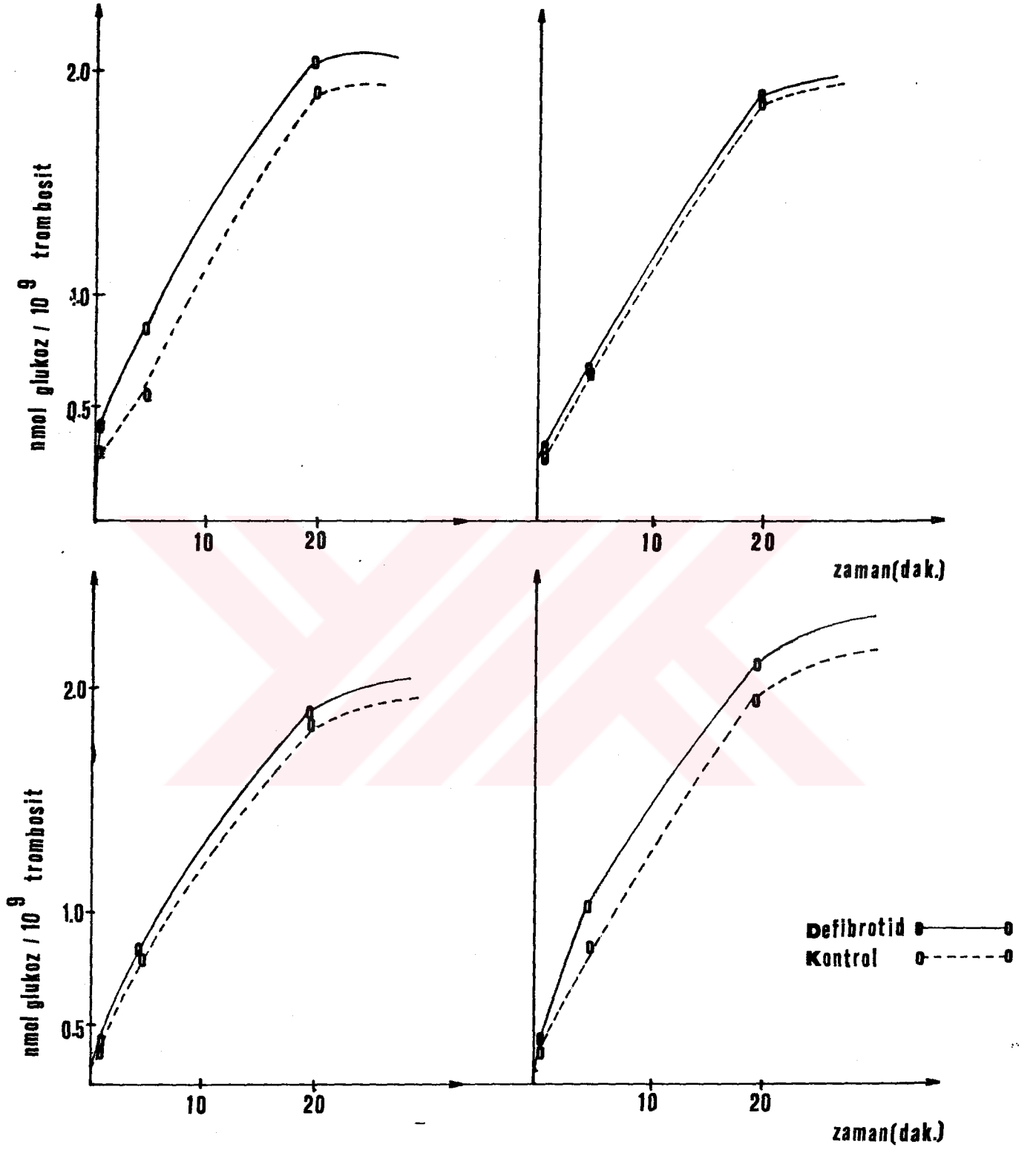
Olgu Adı	Net değerler		
	Önce	2 saat Sonra	15.gün
1) K.B.	1.00	1.3	1,78
2) S.G.	0,32	0,49	0,53
3) B.S.	0.11	0,12	0,30
4) T.A.	0.16	0.31	0,25
5) G.O.	0,14	0,39	0,39
6) E.Y.	0.16	0.19	0,44
7) A.Y.	0,30	0.35	0,45
8) R.E.	0.22	0.22	0,23
9) B.A.	0.31	0.37	0,66
	x=0.30	x= 0.41	x=0.55
	SD= 0.27	SD= 0,35	SD= 0.47

Tablo VIII: Aterosklerozlu olgularda defibrotidin trombosit glukoz transport ve birikimine in vivo etkisi (+4° C ve 37° C değerleri nmol glukoz/10⁹ tr/20 dakika olarak verilmiştir)

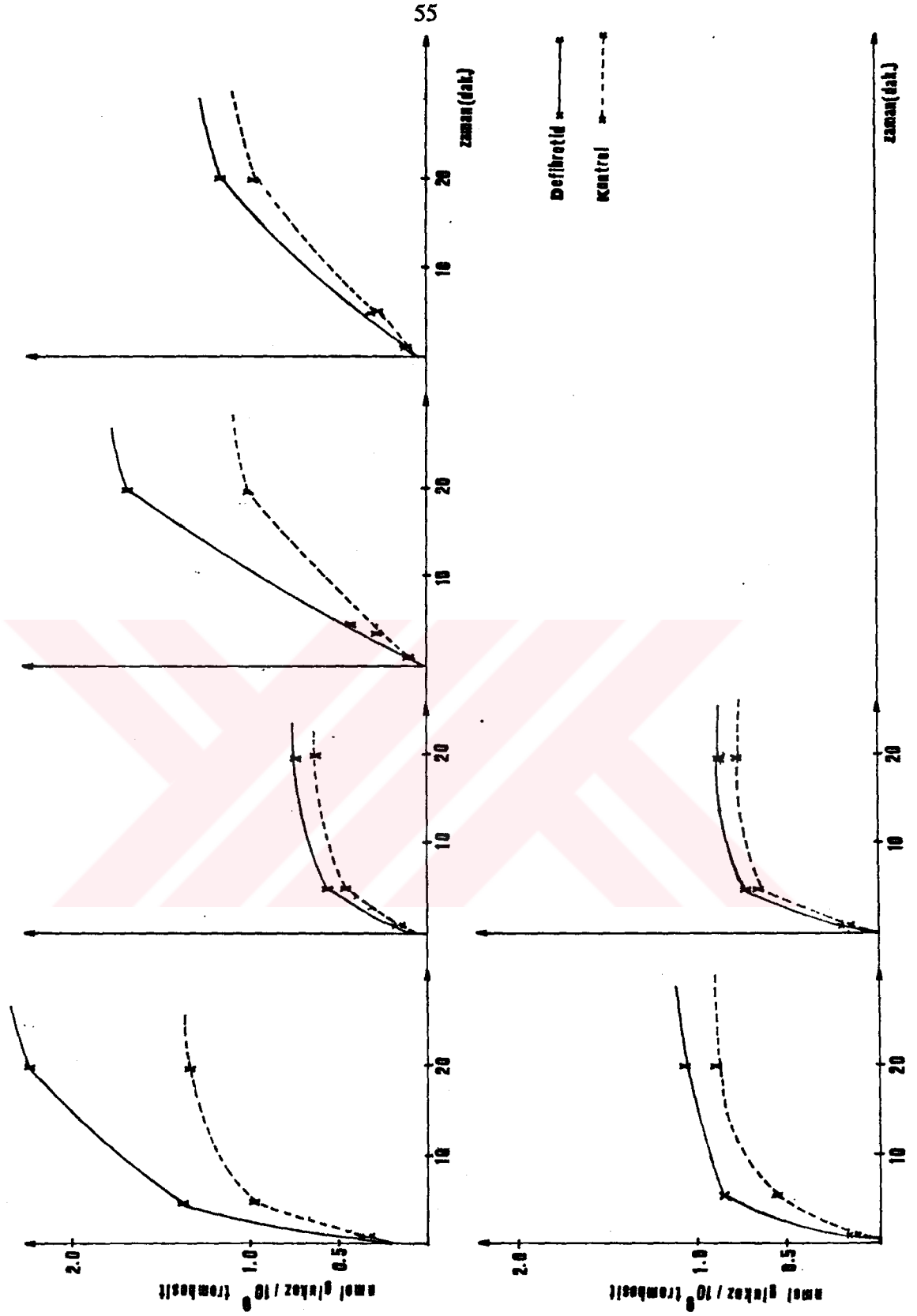
Olgu adı (Önce 37°C)	+4°C	2s. sonra (37°C)	+4°C	15.Gün (37°C)	+4°C	
1) K.B.	1,30	0,30	1,60	0,30	2,08	0,30
2) S.G.	0,52	0,20	0,69	0,20	0,63	0,10
3) B.S.	0,23	0,12	0,22	0,10	0,45	0,15
4) T.A.	0,28	0,12	0,51	0,20	0,45	0,20
5) G.O.	0,28	0,14	0,60	0,21	0,60	0,21
6) E.Y.	0,36	0,20	0,49	0,30	0,74	0,30
7) A.Y.	0,60	0,30	0,65	0,30	0,75	0,30
8) R.E.	0,44	0,12	0,44	0,12	0,38	0,15
9) B.A.	0,62	0,31	0,67	0,30	0,79	0,13
	x=0,51	x=0,20	x=0,65	x=0,22	x=0,76	x=0,20
	SD=0,32	SD=0,08	SD=0,38	SD=0,07	SD=0,5	SD=0,07



şekil XIV: Aterosklerozlu olgularda defibrotidin trombosit glukoz transport ve birikimine in vivo etkisi



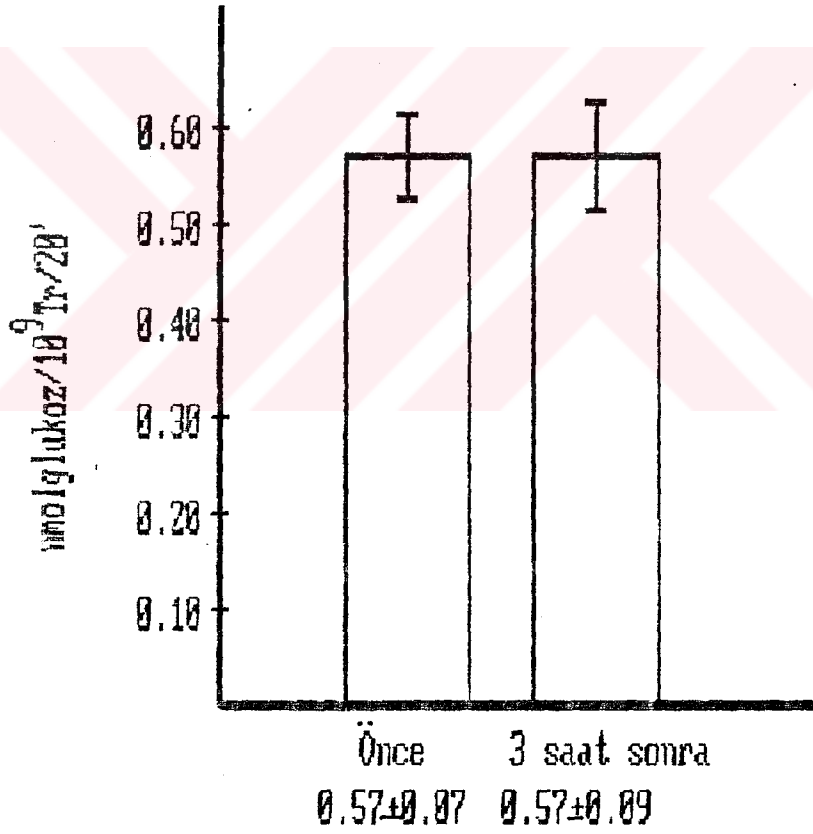
Şekil XV: Normal 4 olguda defibrinotid uygulamasından önce ve 2 saat sonra zamana bağlı net glukoz transportu (0.,5., 20. dakikalar)



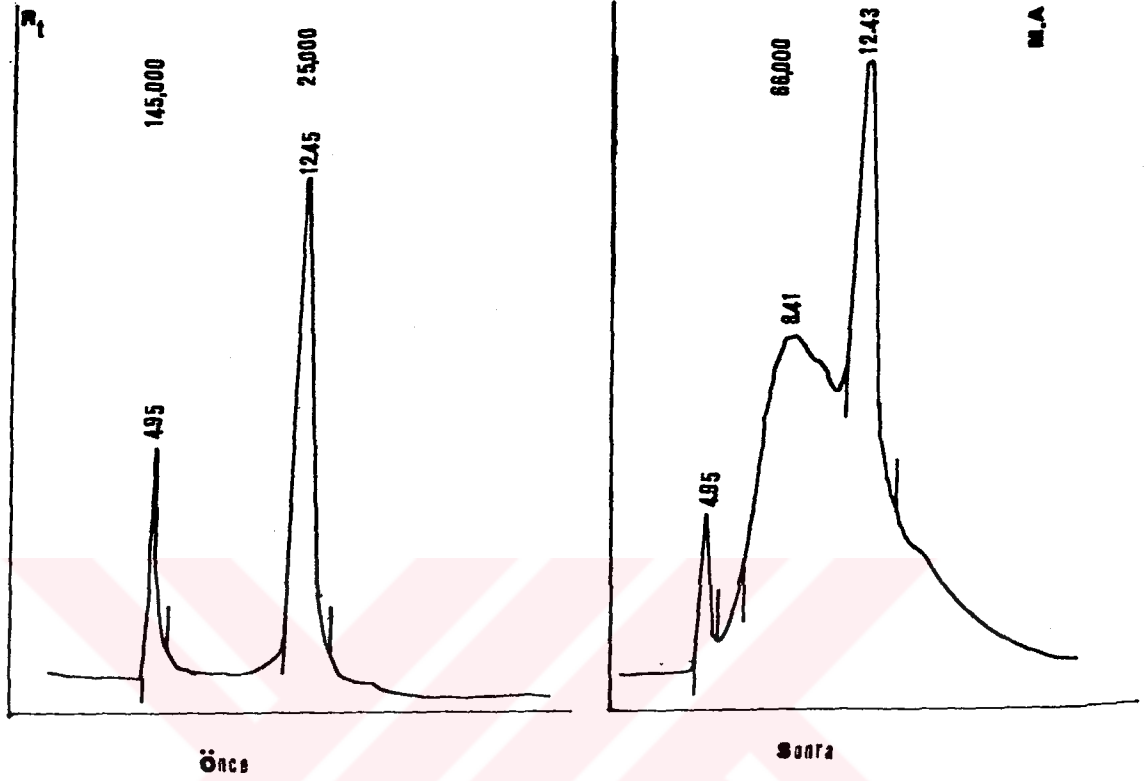
Şekil XVI: Aterosklerozlu 6 olguda defibrinotid uygulamasından önce ve 2 saat sonra zamana bağlı net glukoz transportu (0., 5., 20. dakikalar)

Tablo IX : Aterosklerozlu olgularda LMW heparinin glukoz transportuna etkisi (nmol glukoz/10⁹ trombosit/20 dakika)

Olgu adı	Net değerler	
	Önce	Sonra
1.N.D.	0,60	0,61
2) M.K.	0,45	0,43
3) H.K.	0,54	0,55
	x=0,53	x=0,53
	SD= 0,07	SD= 0,09



Şekil XVII: Aterosklerozlu olgularda LMW heparinin glukoz transportuna etkisi



Şekil XVIII: Trombosit membran protein profiline in vivo defibrotid etkisi

I. ÇEŞİTLİ HASTALIKLARDA TROMBOSİT GLUKOZ TRANSPORTU

Ateroskleroz vakalarında detaylı çalışılan glukoz transportuna çeşitli hastalıklarda birer vaka seçilerek 20 dakikalık glukoz birikimine bakıldı. Tablo X'da görüldüğü gibi dev hücreli trombopatide, takayushide, primer trombositemiada, düşük glukoz birikimi saptanırken, Behçet hastalığında normal sınırlar içinde birer değer elde edildi.

Tablo X: Çeşitli hastalıklarda trombositlerde glukoz birikimi

Olgular	*nmolglukoz/10 ⁹ Trombosit/20 dakika
Normal	1,8±0,40 (n:8)
Ateroskleroz	0,57±0,54 (n:33)
Dev hücreli trombopati	0,16
Primer trombositemia	0,30
Takayushi	0,54
Behçet hastalığı	2,1

* 37° C'de elde edilen sonuçlardan +4° C'deki sonuçlar çıkarılarak net birikim değerleri verilmiştir.

V. T A R T I Ő M A

Trombositlerde çeşitli maddelerin transportları ile ilgili çok sayıda çalışmalar bulunmaktadır. Bunlar putresin(47), histamin(46), serotonin(57-59) GABA(48), kalsiyum(62-64), serbest yağ asitlerinden palmitik asit(65,66), araşidonik asit(2), potasyum(73), adenin(71), adenozin(69), ADP(68) ve aminoasit(49-52) transportlarıdır.

Trombositlerde glukoz transportu, hücrenin metabolik enerjisinin temininde önemli kontrol noktasıdır. Transportu sağlayan, permeaz veya transporter veya taşıyıcı diye adlandırılan bağlayıcı proteinlerin bu sistemdeki önemi tartışılmaz.

Trombositlerde glukoz transportu ile ilgili çalışmalara 1970'den günümüze kadar rastlanmaktadır.

1970'de Solomon ve Gaut(76) fosforilasyondan ileriye metabolize olmayan 2-deoksiglukozun aktif transport sistemini kullandığını gösterirken, 1975'de Schneider(21) ise glukozun kolaylaştırılmış difüzyon yoluyla transport olduğunu bildirmiştir. Bu transportun insüline bağımlılığı konusunda birbirleriyle çelişkili sonuçlar rapor edilmiştir(20,21,76). Yardımcı tarafından, yüksek glukoz konsantrasyonunda, izole trombositlerde glukoz transportunun kolaylaştırılmış difüzyonla(113), düşük glukoz konsantrasyonunda ise DNP, KCN, arsenat ve oubain gibi metabolik inhibitörlerle inhi-

be edilebilen Na^+/K^+ pompasına bağımlı aktif transportla olduğu bildirilmiştir(6). Yine aynı çalışmada glukoz bağlayıcı protein trombositlerin ozmotik şok sıvısında tespit edilmiştir. Agregasyon, sekresyon ajanlarından kollogen, adrenalin, ADP ile etkilenmediği ve glukoz bağlayıcı proteinin bu maddelerle salgılanmadığı rapor edilmiştir(74). Sitratlı ve EDTA'lı ortamda transportun azalmaması bu sistemin Ca^+ iyonuna bağımlı olmadığı fikrini verir. Ca^{2+} iyonoforlarının glukoz transportuna etkisinin araştırılması değerli bilgiler verebilir.

Önceki bir çalışmamızda normal ve aterosklerozlu kişilerin trombosit membran glikoprotein dağılımı ve agregasyon, sekresyon ajanlarının glikoprotein dağılımına etkisi araştırıldı(55). Adrenalinle uyarılma sonucu değişen trombosit membran glikoproteinlerinin glukoz aktif transport sisteminde etkisiz olduğu sonucuna varabiliriz. Ayrıca bir dopamin agonisti olan bromokriptinin etkisi ile bu değişikliğin önlendiği, yine bromokriptinin ADP sekresyonunu önlediği(114), fakat aspirin gibi bromokriptininde trombosit glukoz transportuna etkisiz kaldığı gözlemlerimiz arasındadır.

Bu çalışmada, glukoz bağlayıcı protein eldesi, soğuk ozmotik şok yöntemi ve literatürde oldukça sık kullanılan noniyonik bir deterjan madde olan triton X-100 ile gerçekleştirildi. Trombosit membranına sıkıca bağlı olan integral proteinlerin eldesinde çoğunlukla triton X-100 kullanılmaktadır, triton X-100 fosfolipidlerin yerini alarak proteinlerin etrafını sarmakta ve proteinleri çözünür hale getirmektedir. Yani bu metodla membran solubilizasyonu gerçekleşir. Soğuk ozmotik şok yönteminde ise membrana serbestçe bağlı olan, periferel veya membran boyunca bulunan bağlayıcı proteinler serbestleşerek şok sıvısına geçmektedir. Her iki metodla elde edilen protein fraksiyonunun izokratik HPLC analizi sonucu 145,000 ve 25,000 molekül ağırlığında iki protein piki görüldü ve ^{14}C -glukoz spesifik bağlayıcı aktivite 25,000 molekül ağırlığındaki pikde tesbit edildi. Ozmotik şok yöntemiyle elde edilen bağlayıcı proteinin SDS-PAGE analizinde ise glukoz spesifik bağlayıcı proteinin Mr değeri 27,000 Da olarak tesbit edildi. Ozmotik şok sıvısının % 95 kesiti $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ presipitasyonu ve Sepha-

deks G-25 kolon kromatografisi sonucu glukoz bağlayıcı protein spesifik aktivitesi 53,2 nmol glukoz/mg protein olarak bulundu. Sephadeks G-25 kolon kromatografisi yerine izokratik HPLC uygulandığında glukoz bağlayıcı proteinin spesifik aktivitesi 45,2 nmol glukoz/mg protein olarak tesbit edildi. Dondurup eritme + tritonX-100'le solubilizasyondan sonra ise spesifik aktivite 13,6 nmol glukoz/mg protein olarak saptandı. Ozmotik şoka uğramış ve aktif glukoz transport kapasitesini kaybetmiş trombositlerin triton X-100'le muamelesi sonucu glukoz bağlayıcı protein spesifik aktivitesi 20,0 nmol glukoz/mg protein olarak saptandı.

Ozmotik şok sıvısı, amonyum sülfat presipitasyonuna tabi tutulduktan sonra Sephadeks G-25 kolon kromatografisi sonucu glukoz bağlayıcı protein 3,5 kez saflaştırılırken, kolon kromatografisi yerine HPLC kullanıldığında, bağlayıcı protein 3 kez saflaştırılmış oldu. Bu şekilde saflaştırılan bağlayıcı protein SDS-poliakrilamid gel elektroforezinde tek bant olarak tesbit edildi.

Trombositlerde, putresin transportunu sağlayan bağlayıcı proteinin 55,000 - 65,000 molekül ağırlığında ve bir glikoprotein olduğu bildirilmiştir(47). Bakterilerde ise amino asit bağlayıcı proteinlerinin 20,000 - 30,000 Mr civarında olduğu bilinmektedir(115). Eritrositlerdeki glukoz bağlayıcı protein (Band III protein) ise 50,000 - 60,000 ağırlığında bir protein olarak literatürde rapor edilmiştir(116).

Bu çalışmada, glukoz bağlayıcı proteinin molekül ağırlığının 25,000 - 27,000 olarak bulunması çeşitli maddelerin spesifik bağlayıcı proteinlerle transport edildiği fikrini desteklemektedir. Çalışmamızda amino asit bağlayıcı protein aktivitesi ise glukoz bağlayıcı proteinle birlikte tesbit edildi. Daha ileri saflaştırma metodlarının uygulanması ile amino asit ve glukoz spesifik bağlayıcı aktivitelerin birbirinden ayrılacağı ve kompetitif kinetik çalışmaları ile spesifik dereceleri saptanabileceği görüşündeyiz. Trombositlerde zamana bağlı glukoz birikimi üzerinde yapılan çalışmalarda şekerler ve metabolize olmayan analogları arasında spesifiklik incelenmiştir. Örneğin glukoz ve deoksiglukozun aynı sistemle taşındığı, galak-

toz ve 3-ometil glukozun ise ayrı permeaz sistemlerini kullandığı bildirilmiştir(117).

10 olgunun proteinlerini birleştirerek elde edilen bağlayıcı proteinin Km değeri $7,5 \times 10^{-5}$ mol/l, Vmax değeri ise 12,5 nmolglukoz/mg protein olarak Lineweaver Burk ve Scatchard çizimlerinden saptandı. Yardımcı, zamana bağlı glukoz birikimi kinetik çalışmalarında trombosit glukoz transportunun Km değerini $2.15 \pm 0.28 \times 10^{-5}$ mol/l ve Vmax değerini 9.11 ± 1.49 nmolglukoz/ 10^9 trombosit/30 saniye olarak saptamıştır(6). Glukoz bağlayıcı protein kinetik neticelerimizin trombosit glukoz transport kinetiğine uyumlu olduğu görülmektedir. Ozmotik şoka uğramış dolayısı ile glukoz bağlayıcı proteinini kaybetmiş trombositlerde glukoz aktif transportunun eksikliği ve glukoz bağlayıcı protein kinetiği ile trombosit glukoz kinetiğinin uyumlu olması bağlayıcı proteinlerin transport süreçlerindeki önemini vurgulamaktadır.

Trombositlerin beyin hücrelerinin periferal modeli olduğu görüldüğünden hareketle yapılan çalışmalarda depresyon vakalarında 5-HT transportunun defektif olduğu ve elektrokonvülsif tedavi sonucu normale göre düşük olan Vmax'ın anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir(57,58). Parkinsonlu olgularda trombosit dopamin transportunun defektif olduğu bildirilmiştir(54).

Trombastenik hastalarda, GPIIb ve III a eksikliğinde Ca^{2+} transportunun % 50 azaldığı rapor edilmiştir(60).

Bu çalışmada ise aterosklerozlu hastalar yanında, GPIb eksikliğinin tarif edildiği bir dev hücreli trombopatili olguda, bir primer trombositemia olgusunda, bir takayushi olgusunda trombositlerde glukoz birikiminin düşük olduğu, bir Behçet hastalığı olgusunda ise normal olduğu gözlemlendi. Burger hastalığında da Yardımcı ve arkadaşları trombosit glukoz transportunun normal değerlerde olduğunu gözlemişlerdir(118).

Primer hipotiroidili ve nefrotik sendromlu olgularda trombosit

glukoz transportunun defektif olduğu bildirilmiştir(119,120). Dikkat çekici bir husus bu hastalarla aterosklerozlu kişiler arasında müşterek laboratuvar parametreleri bulunmaktadır. Yani hiperlipemi ve hiperkolesterolemi vakalarıdır.

Yardımcı, tip I diabetes mellituslu olgularda glukoz transportunun normal olduğunu fakat tip II diabetes mellituslu olgularda defektif olduğunu bildirmiştir(6). tip II diabetes mellitustaki glukoz aktif transportunun eksikliğini aterosklerozlu olmalarından ileri geldiği görüşünü bildirmiştir.

Oral antidiabetiklerden sülfanilüre grubundan diamikron ve biguanid grubundan metforminin tip II diabetiklerde trombosit ve eritrosit glukoz transportunu artırdığı bildirilmiştir(121).

Ateroskleroz tedavisinde trombosit fonksiyonları yönünden etkili ilaçların trombosit glukoz transport defektine etkileri çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir.

Bir siklooksigenaz inhibitörü olan indobufenin aterosklerozlu olgularda glukoz transportuna etkili olmadığı, galaktoz transportuna etkisinin ise hafifçe arttırdığı yönünde olduğu bildirilmiştir(122).

Diğer bir çalışmada, çeşitli antiagregan ajanların (persantin, ksantinol niyasiyanat, aspirin, movesil) trombosit histidin transportuna etkileri bakılmış ve anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir(123). Bir polideoksiribonükleotid olan ve memeli hayvanların akciğerlerinden elde edilen defibrotidin trombosit glukoz transportuna in vivo etkisi incelendi ve 2 saat gibi kısa bir zamanda dahi anlamlı bir artış kaydedildi. Aterosklerozda (n=33) $0,57 \pm 0,54$ nmolglukoz/ 10^9 Tr/20 dakika olarak bulunan glukoz transportunun 2 saat sonra $0,77 \pm 0,67$ nmolglukoz/ 10^9 Tr/20 dakikaya yükseldiği görüldü. 15 günlük defibrotid tedavisi sonucunda 2 saat sonra olan artıştan daha anlamlı bir artış kaydedildi. Defibrotidten önce (n=9) $0,30 \pm 0,27$ nmolglukoz/ 10^9 Tr/20 dakika iken ,2 saat sonra $0,41 \pm 0,35$ nmol

glukoz/ 10^9 Tr/20 dakikaya arttığı ve 15. gün sonunda ise $0,55 \pm 0,47$ nmol glukoz/ 10^9 Tr/20 dakikaya yükseldiği görüldü. Defibrotid etkisinin in vivo olması defibrotid metabolik ürününün veya defibrotid ile oluşan plazmatik bir faktörün etkisinin glukoz transportunu arttırdığı görüşünü getirir. Diğer taraftan defibrotid uygulaması neticesi trombositlerin triton X-100 ile solubilizasyonu sonucunda 66,000 molekül ağırlıklı ve 280 dalga boyunda absorpsiyon gösteren bir maddenin, büyük bir olasılıkla bir proteinin varlığını saptamamız, defibrotidin direkt veya dolaylı olarak trombosit membranında bazı değişimlere sebep olduğu görüşünü de getirir. Diğer bir çalışmada bir membran markeri olan ve aterosklerozlu olguların trombositlerinde düşük bulunan glutamil transpeptidazın in vivo olarak defibrotid ile normallerin değerine yükselmesi bu görüşü kuvvetlendirici bir bulgudur(106).

Yapılan diğer bir çalışmada, yine aterosklerozda defibrotidin eritrosit glukoz transportunu arttırıcı etkisi sonuçlarımızı doğrulamakta ve defibrotidin etkisinin trombositlere spesifik olmadığını göstermektedir(107).

Bu çalışmada hemostatik parametrelere etkisi yönünden benzer etkiler gösteren düşük molekül ağırlıklı heparinin glukoz transportunu etkilemediği saptandı. Bu yönüyle defibrotid LMW heparinden farklıdır.

Tip II diabet hastalarında glukoz metabolizmasını düzene sokan ilaçların defektif glukoz transportunu düzeltmesi membran aktif glukoz transportunun bir metabolik kontrol noktası olduğu görüşünü kuvvetlendirmektedir.

VI.ÖZET

Normal ve aterosklerozlu kişilerde glukoz transportu ortamda 10^{-5} mol/l glukoz konsantrasyonunda takip edildi. Normal şahısların trombositlerinde 20 dakikalık glukoz birikimi $1,8 \pm 0,40$ nmol glukoz/ 10^9 trombosit (n=8) iken, aterosklerozlu şahısların trombositlerinde $0,57 \pm 0,54$ nmol glukoz/ 10^9 trombosit, $+4^{\circ}\text{C}$ de ise $0,26 \pm 0,09$ nmol glukoz/ 10^9 trombosit olarak bulundu (n=42).

Trombositlerin ozmotik şok sıvısında glukoz bağlayıcı protein aktivitesi normal şahıslarda 53,2 nmol glukoz/mg protein, triton X-100 le muameleden sonra ise 13,6 nmol glukoz/mg protein olarak saptandı. Bağlayıcı protein $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ presipitasyonu, Sephadex G-25 kolon kromatografisi ve izokratik HPLC ile 3-3,5 kez saflaştırıldı ve molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 27,000 Da, HPLC ile 25,000 Da olarak tespit edildi. Glukoz bağlayıcı proteinin Km değeri $7,5 \times 10^{-5}$ mol/l, Vmax değeri ise 12,5 nmol/glukoz/mg protein olarak bulundu. Antitrombotik bir ilaç olan defibrotid (i.v. 600 mg) aterosklerozlu şahıslarda 20 dakikalık glukoz birikimini $0,57 \pm 0,54$ nmol glukoz/ 10^9 trombositten 2 saat sonra $0,77 \pm 0,67$ nmol glukoz/ 10^9 trombositte yükselttiği görüldü (n=33). Normal vakalarda ise defibrotid uygulamasından önce ve sonra $1,8 \pm 0,4$ nmol glukoz/ 10^9 trombosit olarak saptandı (n=8).

15 gün süre ile hergün defibrotid uygulaması sonucunda ise 20

dakikalık glukoz birikimi önce; $0,30 \pm 0,27$ nmol glukoz/ 10^9 trombosit, 2 saat sonra $0,41 \pm 0,35$ nmol glukoz/ 10^9 trombosit, 15.gün sonunda ise $0,55 \pm 0,47$ nmol glukoz/ 10^9 trombosit olarak bulundu (n=9).

İn vivo defibrotid uygulamasından sonra 66,000 Da molekül ağırlığında bir proteinin solubilize trombosit membran fonksiyonunda ortaya çıktığı görüldü.

VII. SUMMARY

Glucose transport in normal and atherosclerotic subjects was followed at 10^{-5} mol/l glucose concentration by measuring the time dependent ^{14}C glucose accumulation. Glucose accumulation in normal subjects was found as 1.8 ± 0.40 nmol glucose per 10^9 platelets per 20 minutes at 37°C ($n=8$). It was found as 0.26 ± 0.09 nmol glucose per 10^9 platelets at $+4^\circ\text{C}$. In atherosclerotic patients glucose accumulation was 0.57 ± 0.54 nmol glucose per 10^9 platelets both at 37°C and $+4^\circ\text{C}$ ($n=42$).

In the osmotic shock fluid of platelets, glucose binding protein activity was found as 53.2 nmol glucose per mg protein in normal subjects and the platelets where membrane solubilization was done with triton X 100 had 13.6 nmol glucose per mg protein of binding activity. Binding protein was purified 3 to 3.5 times with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, Sephadex G-25 column chromatography and isocratic HPLC. Its molecular weight (M_r) was determined as 27.000 Da through SDS-PAGE and 25.000 Da through HPLC.

K_m value of glucose binding protein was found as 7.5×10^{-5} mol/l and V_{max} value as 1.25 nmol glucose per mg protein.

After 2 hours of defibrotide administration (600 mg i.v.) the glucose accumulation was increased from 0.57 ± 0.54 nmol glucose per 10^9

platelets for 20 minutes accumulation to 0.77 ± 0.67 nmol glucose per 10^9 platelets for 20 minutes accumulation in atherosclerotic patients ($n=33$). In normal cases it has been determined as 1.8 ± 0.4 nmol glucose per 10^9 platelets for 20 minutes accumulation both before and after the administration of defibrotide. According to the results of daily administration of defibrotide for 15 days, glucose transport values have been found as 0.30 ± 0.27 nmol glucose per 10^9 platelets for 20 minutes accumulation before the administration, 0.41 ± 0.35 nmol glucose per 10^9 platelets for 20 minutes accumulation after 2 hours of administration and 0.55 ± 0.47 nmol glucose per 10^9 platelets for 20 minutes accumulation at the end of 15 days of administration ($n=9$).

Upon in vivo defibrotide administration, a protein with 66,000 Da molecular weight was detected in the solubilized membrane fraction.

VIII. KAYNAKLAR

- 1- Yardımcı,T., Ulutin,O.N., Alteration of Platelet Glucose Transport system in atherosclerosis. Wiener Klin. Wschr. 98, 221-224, 1986.
 - 2- Çizmeçi, G., Yardımcı,T.U., Aytış,Ş., Ulutin,O.N.; Platelet membrane transport of arachidonic acid in normal subjects and atherosclerotics in. Antitrombin III Platelet and Thrombosis, Fibrinolysis (ed.) Palos, Vinazzer, H.Schmitt and Mayer, Vürzburg 83-88, 1982.
 - 3- Aktulga,A.Z., Ulutin,O.N., Platelet fosfolipid changes in atherosclerosis. Thrombos. Haemostas. (Stuttg) 38:32, 1977.
 - 4- Emekli,N.B., Trombositlerde Glikoprotein Sentezi, Galaktoz transportu ve trombosit glikoproteinleri,Doçentlik tezi, İstanbul Üniv.Cerrahpaşa Tıp Fak. İstanbul, 1981.
 - 5- Yaman,A., Normal ve Aterosklerozlu olguların trombositlerinde γ GT aktivitesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 1990.
 - 6- Yardımcı,T.U., Normal ve Aterosklerozlu olguların trombositlerinde glikoz membran transportu. Doçentlik Tezi. İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Tıp Fak., İstanbul, 1979.
-

- 7- Yardımcı,T.U., Defective Active Glucose Transport in Platelets of Atherosclerotic Patients. VII. Int. Cong. Tromb. Haem. Stuttgart, 348, 1979.
- 8- Yardımcı,T.U., The effect of osmotic shock on platelet membrane transport. *Hematologica*, 65, 516-522, 1980.
- 9- Ulutin,O.N., The Platelets. Fundamental and Clinical applications. Kağıt ve Basım İşleri A.Ş., İstanbul, 1976.
- 10- Weiss,H.J., Platelet Physiology and abnormalities of platelet function. *N.Eng. J. Med.* 293:531-541. 1975.
- 11- Leoncini,G., Maresca,M. Glucose Transport Across Plasma Membrane in Human Platelets. *Ital. J. Biochem.* 35(5), 287-295, 1986.
- 12- Mürer,E.H., Clot retraction and energy metabolism of platelets. Effect and mechanism of inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta.*, 172,266-299, 1969.
- 13- Mustard,J.F., Packham,M.A., Factors influencing platelet functions adhesion release and aggregation. *Pharmacol. Rev.* 22, 87-187, 1970.
- 14- Akkerman,J.W.N., Regulation of carbohydrate metabolism in platelets. A Review, *Thrombos. Haemostas.* 39, 712-725, 1978.
- 15- Ünlüer,A., Avanoğlu,Y., Erdağ,A., Yardımcı,T., Glycogen levels in the platelets of normal and atherosclerotic cases. *Thrombosis and Hemorrhagic Diseases*, Ulutin,O.N., Vinazzer,H. (Eds.) Gözlem Matbaası, İstanbul, 425-428, 1986.

- 16- Leoncini,G., Maresca,M., Balestrero,F., Armani,U., Plana,A., Some Aspects of Platelet Glucose metabolism in Thrombocytosis due to Myeloproliferative Disorders. *Thromb. Res.*, 34, 233-239, 1984.
- 17- Donabadian,R., Nemerson,Y., Fatty acid Oxidation by human platelets and its stimulation by thrombin. *Am.J. Physiol.* 221, 1283-1288, 1971.
- 18- Deory,S.C.C., Hirsch,J., Cooper,I., Energy metabolism in human platelets, interrelationship between glycolysis and oxidative metabolism. *Blood*, 36, 59-168, 1970.
- 19- Scott R.B., The role of glycogen in blood cells. *New Engl. J.Med.* 278, 1436-1439, 1968.
- 20- Karpaktin,S., Charmatz,A., Heterogeneity of human platelets. III. Glycogen metabolism in platelets of different sizes. *Brit.J.Haematol.* 19,135-143, 1970.
- 21- Schneider,W., Regulation of glycogen metabolism in human blood platelets. In *Platelets, Recent Duences in Basic Research and clinical Aspects.* Ed. Ulutin,O.N. Amsterdam, New York, Excerpta Medica, 107-109, 1975.
- 22- Kinlough-Ratbone,R.L., Packham,M.A., Mustard,J.F., The effect of glucose on the platelet response to releese inducing stimuli. *J.Lab. Clin. Med.*80, 247-255, 1972.
- 23- Gross,R., Schneider,W., Energy metabolism. In the circulation platelets. Ed: Johnson, J.A.² Academic Press, New York, 123-188, 1971.
- 24- Day,H.J., Holmsen,H., Concepts of the blood platelet release reaction. *Ser. Haemat.* 4, 3-9, 1971.

- 25- Salzman,E.W., Cyclic AMP and platelet functions. New England, J.Med. 286, 358-363, 1972.
- 26- Yardımcı T.U., Trombositlerde karbonhidrat ve enerji metabolizması. Temel Hematoloji ve Biyokimya Lisanüstü Yaz Okulu. Ekim 1989, Adana (Baskıda)
- 27- Schnijver,J., Koster,J.F., Hülsman,W.C., In significance of gluconeogenesis in human blood platelets. Europ. J. Clin. Invest. 5, 7-14, 1975.
- 28- Avanoğlu,Y., Aterosklerozlu olguların trombositlerinde glikoliz. Doçentlik Tezi, İstanbul Üniv.Cerrahpaşa Tıp Fak. İstanbul, 1982.
- 29- Ayanoglu,Y., The alteration of glucose utilization and lactate formation of platelets in the cases of atherosclerosis. In thrombosis and Hemorrhagic Disease. Eds.: Ulutin,O.N., Vinazzer,H., Gözlem Matbaası 417-424, 1986.
- 30- Akkerman,J.W.N., Holmsen,H.. Interrelationship among platelet responses; Studies on the burst. In proton liberation, lactate production and oxygen uptake during platelet aggregation and Ca^{2+} secretion. Blood, 57, 956-966, 1981.
- 31- Wainer,H., Wattiaux,R., Glycogen synthetase in blood platelets. Nature, 217:951-955, 1986.
- 32- Rudolph,G., Schmitz,G.; Zytochemische Nachweiss Methoden spezifischer Dehydrogenasen in menschlichen Thrombozyten, Folia Haemat.6, 379-384, 1962.
- 33- Yardımcı,T., Ulutin O.N., Glucose-6-Phosphate dehydrogenase activity in Human Platelets and its Secretion. Clin. Sci. 11, 142-147, 1976.

- 34- Berndt, M.C., Philips, D.R., Platelet membrane proteins; composition and receptor function. Platelets in Biology and Pathology-2 Chapter, 3, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 43-73, 1981.
- 35- Singer, S.J., Nicolson, G.L., The fluidmosaic model of the structure of cell membranes. Science, N.Y., 175, 720, 1972.
- 36- Pepper, D.S., Jamieson, G.A., Isolation of a macroglycopeptide from human platelets. Biochem 9, 3706-3713, 1970.
- 37- Yardımcı, T.U., Trombosit membran glikoprotein ve Trombosit Membran Transport Sistemleri Temel Hematoloji ve Biyokimya Lisanüstü Yaz Okulu Ekim 1989, Adana (baskıda)
- 38- Smith, E.L., Hill, R.L., Lehman, R., Lefkowitz, R.J., Handler, P., White, A., Principles of Biochemistry. General Aspects Seventh Edition McGraw-Hill Book Company. Chapter 14, Receptors and Transport 289-302. 1985.
- 39- Martin, D.W., Mayes, P.A., Rodwel, U.W., Granner, D.K., Harper's Review of Biochemistry Lange Medical Publications, Los Altos, California. 456-463, 1985.
- 40- Rawn, D.J., Biochemistry, Neil Patterson Publishers, Carolina Biological Supply Company, Burlington, North Carolina, 1023-1045, 1989.
- 41- Stryer, L., Biochemistry. W.H. Freeman and Company - New York, 949-973 1988.
- 42- Kim, H.D., Sergeant, S., Shukla, S.D., Glucose Transport in Human Platelets and its inhibition by Forskolin. J. Pharm. Exp. Ther. 236 (3), 585-589, 1986.

- 43- Horne,M.K., Hart,J.S., Cytochalasin inhibition of hexose transport by platelets. *Biochim. Biophys. Acta*, 903, 349-357, 1987.
- 44- Emekli,N.B., Galactose transport and glycoprotein changes in the platelets of atherosclerotics. *International Istanbul Symposia on Haemotology*. İstanbul 1981.
- 45- Horne,M.K., Hart,J.S., Galactose uptake by human platelets in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 586, 448-456, 1986.
- 46- Gill,D.S., Barradas,M.A., Mikhailidis,D.P., Dandona,P., Histamine uptake by human platelets. *Clin. Chim. Acta*, 168, 177-185, 1987.
- 47- Nadler,G.S., Takahashi,M.T., Putrescine transport in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta*, 812, 345-352, 1985.
- 48- Hambley J.W., Johnston,G.A.R., Uptake of Gamma-Aminobutyric acid by human blood platelet: Comparison with CNS uptake. *Life Sci.* 36, 2053-2062, 1985.
- 49- Yardımcı,T.U., Demir,E., Öndikmen,Ş., Ulutin,O.N., Histidine transport system in human platelets. *Platelets; Recent Advances in Basic Research and Clinical Aspects. Excerpta Medica, Int. Congr. Ser. no.357*, 110-117 Amsterdam, 1975.
- 50- Yardımcı,T.U., Öndikmen,Ş., Demir,E., Ulutin,O.N., Trombositlerde aktif histidin transport ile ilgili bir çalışma. *Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dergisi*, 108, 1974.
- 51- Yardımcı,T.U., Uğur,M.Ş., Emekli,N.B., Ulutin,O.N., Amino acid transport systems in human platelets. *Eur.Afr.Div., ISH, IV. Meeting, İstanbul*, 558, 1977.

- 52- Özbilen,A., Yardımcı,T., Ulutin,O.N., Leucine transport system in platelets. Eur.Afr.Div. ISH, V.Meeting Hamburg, 1979.
- 53- Dean,B., Copolov,D.L., Dopamine by platelets is Selective, Temperature dependent and not influenced by the dopamine D¹ or dopamine D₂ receptor. Life Sci. 45, 401-411, 1989.
- 54- Dean,B., Copolov,D.L., Dopamine uptake by the human platelet: effects of dopamine receptor agonists. Eur. J. Pharmacol. 173, 165-169, 1989.
- 55- Yardımcı,T., Göker,B., Hanachi,P., Effect of bromocriptine on platelets. Xth International Congres on Thrombosis May 22-27, Greece, 1988.
- 56- Feinstein,M.B., Handerson,E.G., Sha'afi,R.I., The effects of alterations of transmembrane Na⁺ and K⁺ gradients by ionophores (Nigericin, monensin) on seretonin transport in human blood platelets. Biochim. Biophys. Acta, 468, 284-295, 1977.
- 57- Healy,D., Leonard,BE., Monoamine transport in depression: Kinetics and dynamics. Journal of Affective Disorders, 12, 91-103, 1987.
- 58- Rausch,J.L., Rich,C.L., Risch,S.C., Platelet serotonin transport after a single ECT. Psychopharmacology, 95, 139-141, 1988.
- 59- Mellerup,E.T., Plenge,P., Engelstoft,M., High affinity binding of [3H] paroxetine and [3H] imipramine to human platelet membranes. Eur. J. Pharmacol. 96, 303-309, 1983.
- 60- Brass,L.F., Ca²⁺ Transport across the platelet plasma membrane. J. Biol. Chem. 260 (4), 2231-2236, 1985.

- 61- Ghigo,D., Treves,S., Turrini,F., Pannachia,A., Pescarmona,G., Basia,A, Role of Na^+/H^+ exchange in thrombin and arachidonic acid induced Ca^{2+} influx in platelets. *Biochim Biophys Acta*, 940, 141-148, 1988.
- 62- Adunyah,S.E., Dean,W.L., Ca^{2+} transport in Human Platelet Membranes. Kinetics of active Transport and Passive Release. *J. Biol. Chem.* 261(7), 3122-3127, 1986.
- 63- Adunyah,S.E., Dena,W.L., Regulation of human platelet membrane Ca^{2+} transport by cAMP and calmodulin-dependent phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*, 930, 401-409, 1987.
- 64- Blache,D., Clavatti,M., Ojeda,C., The effect of calcium channel blockers on blood platelet function, especially calcium uptake. *Biochim. Biophys. Acta*, 923, 401-412, 1987.
- 65- Aktulga,A., Yardımcı,T., Ulutin,O.N., $1\text{-}^{14}\text{C}$ palmitic acid transport and its distribution in phospholipids of normal and cirrhosis platelets. 16 Int. Cong. Hemat. Kyoto, Abst, No.7-65, 1976.
- 66- Aktulga,A., Yardımcı,T.U., Ulutin,O.N., Normal insan ve siroz trombositlerinde $1\text{-}^{14}\text{C}$ palmitik asit transportu ve fosfolipidlerdeki dağılımı. TB TAK V.Bilim Kongresi TAG, İstanbul, 527-532, 1975.
- 67- Born,G.V.R., Uptake of adenosine and of adenosine diphosphate by human blood platelets. *Nature*, 206:1121, 1965.
- 68- Nachman,R.L., Binding of adenosine diphosphate by human platelet membrane. *Biochemistry and Pharmacology of Platelets. Ciba Foundation symposium 35. Elsevier-Excerpta Medica. North Holland, Amsterdam, Oxford, New York, 23-46, 1975.*

- 69- Sixma, J.J., Lips, J.P.M., Trieschnigg, A.M.C., Holmsen, H., Transport and metabolism of adenosine in human blood platelets. *Biochim. Biophys. Acta.* 443, 33, 1976.
- 70- Philip, R.B., Francey, I., McElroy, F., Effects dipyridamole and five related agents on human platelet aggregation and adenosine uptake. *Thromb. Res.*, 3, 55-61, 1973.
- 71- Sixma, J.J., Holmsen, H. ve Trieschnigg, D.M., Adenin nucleotide metabolism of blood platelets. Transport of adenine into human platelets. *Biochim. Biophys. Acta*, 298, 460, 1973.
- 72- Cooley, M.H. ve Cohen, P., Potassium transport in human blood platelets. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 1967.
- 73- Wiley, J.S., Kuchibhotla, J., Shaller, C.C. ve Colman, R.W., Potassium uptake and release by human blood platelets. *Blood.* 48, 185, 1976.
- 74- Yardımcı, T.U., Alterations observed in the platelet glucose permease system of atherosclerotic subjects and the effect of release inducers on this system. In 1981 International Istanbul Symposia on Haematology. Eds. Ulutin, O.N., Berkarda, B., Sermet Matbaası, İstanbul, 37-48, 1982.
- 75- Göker, B., Yardımcı, T., Ulutin, O.N., Isolation of the Glucose Transporter from human platelets and restoration of the impaired platelet active transport of glucose in atherosclerotics with Defibrotide. XIII. International congress on Thrombosis and Haemostasis Amsterdam, 1991.
- 76- Soloman, H.M., Gaut, Z.N., Accumulation and metabolism of 2-deoxy D-glucose-1-¹⁴C in the platelet. *Biochem. Pharmacol.* 19, 2631, 1970.

- 77- Zieve,P.D., Soloman,H.M., Uptake of aminoacids by human platelets. Am.J. Physiol, 214, 58,1968.
- 78- Boullin,D.J., Votavova,M., Green,A.R., Protein synthesis by human platelets after accumulation of leucine and arginine. Thrombos, Diath. Haemorr, (Stuttg) 28,54, 1970.
- 79- Cooper,I.A., Firkin,B.G., Amino acid transport into human platelets and subsequent incorporation into protein. Thrombos. Diath. Haemorr. 23, 140, 1970.
- 80- Spector,A.A., Hoak,J.C., Warner,E.D., Fry,G.L., Utilization of long chain free fatty acids, by human platelets. J.Clin. Invest, 49, 1489-1496, 1970.
- 81- Ulutin,O.N., Yardımcı,T., Çizmecı,G., Emekli,N. and Balkuv-Ulutin Ş., Some observations on the alteration of hemostatic mechanism in atherosclerosis and its pathogenic relation to the disease. IVth International meeting of Danubian league Against Thrombosis and Haemorrhagic Diseases, İstanbul 1985.
- 82- Sinzinger,H., Role of Platelets in Atherosclerosis. Seminars in Thrombosis and Hemostasis. 12(2):124, 1986.
- 83- Ulutin,Ş.B., Trombüs oluşumu ve önlenmesi. Profesörlük Tezi, İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Tıp Fak., 1974.
- 84- Karaca M., Kabakçı,T., Kocataş,A., Özkan,N., Yeşilnil,S., Aterosklerozda trombosit adezitesi. Ege Üniv. Tıp Fak. Mec. 1:45, 1968.
- 85- Ulutin,Ş.B., Kayalı,H., Taşyürekli,M., Uğur,M.Ş., The platelet differential count on the formuar membrane in normal subjects and in the cases with atherosclerosis and the influence of the antiaggregating drugs. IV. Symposium on electronmicroscopy. İstanbul, 1976.

- 86- Caruelho,A.C.A., Colman,R.V., Lees,R.S., Clofibrate revelsal of platelet hypersensitivity in hiperlipoproteinemia. *Circulation*, 50:510, 1974.
- 87- Ulutin,O.N., Akman,N., Aktulga,A.Z., Emekli,N.B., Uğur M.Ş. ve Ulutin, Ş.B., The alteration of hemostatic mechanism in atherosclerosis. *New İstanbul Contr. Clin. Scs.* 12:92, 1977.
- 88- Ulutin,O.N., The platelet secretion mechanism in normal and pathological conditions. *J.Med. Enzymol*, 2:286, 1977.
- 89- Gürsoy-Aktulga,A., Normal ve aterosklerozlularda trombosit $PGF_2 \alpha$ oluşumu. XVII th. Inter Cong. Thrombos. Haemos. London, 1979.
- 90- McGuire,M.B., Ward,J.D., Russel,R.G.G., Best,L.C., Preston,F.E., Increased malonede aldehyde production invitro by platelets from patients with diabetes mellitus. XVI. Congr. ISH, Paris, 531, 1978.
- 91- Gryglowski,R.J., Dembinska-kieg, A.P., Zmuda,A., Gryglewski,T., Prostacyclin and thromboxane A_2 biosynthesis capacities of heart, arteries and platelets, at various stages of experimental atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*, 31:385, 1978.
- 92- Berkarda,B., Akakan,G., Urgancıoğlu,I., Normalde ve aterosklerozlularda fibrinojen ve trombosit yarı ömürlerinin birlikte tayini ve karşılaştırılmaları. *Haseki Tıp Bülteni*, 6:135, 1968.
- 93- Yardımcı,T.U., Emekli,N.B., Uğur,M.Ş., Ulutin,O.N., The c-AMP and c-GMP levels in platelets of the cases of atherosclerosis and normal controls. IV. meeting of Asian Pasific Div. FISH 25-29 Seaul, Korea, 1970.

- 94- Çizmeçi,G., Ulutin,O.N., Corrective effect of defibrotide on altered endothelium cell function in atherosclerosis. *Throm. Haemost.* 54:87, 1985.
- 95- Sibila,C., Crinos, Chemical analysis certificate No.23459, 1986.
- 96- Ulutin,O.N., Tunalı,H., Girişken,G., Aytış Ş.Y., Uğur,M.Ş. Balkuv, Ulutin,Ş., The effect of Fraction-P on the electrically induced thrombus formation in dogs; *Haemostasis*, 12:130, 1985.
- 97- Balkuv-Ulutin,Ş., Ulutin,T., Özsoy,Y., Göker,B., Ferhanoglu,B., Ulutin,O.N., defibrotidin fibrinolitik aktiviteye ve plazma t-PA ve PAI seviyelerine etkisi, 2. Çinko Simpozyumu ve XX.Ulusal Hematoloji Kongresi Özet Kitabı, 59, Ankara 1988.
- 98- Çizmeçi,G., Ulutin,O.N., Prostanoid syntesis in isolated leucocytes and invitro effect on defibrotide; "In: Thrombosis and Hemorrhagic Diseases", Eds: Ulutin,O.N. and Vinazzer H.: Gözlem Printing and Publishing, 199-204, 1986.
- 99- Çizmeçi,G., Invivo effects of defibrotide on platelet c-AMP and blood prostanoid levels. *Haemostasis* 16 (Suppl-1):31-35, 1986.
- 100- Yardımcı,T., Uğur,M.Ş., Kılıç,M.Y, Ferhanoglu,B., Ulutin,O.N., Aterosklerozlularda defibrotidin trombosit c-AMP düzeyine etkisi, 2. Çinko Simpozyumu ve XX.Ulusal Hematoloji Kongresi Özet Kitabı, 55, Ankara 1988.
- 101- Ulutin,T., Ulutin,Ş.B., Yardımcı,T., Demirkol,F., Ferhanoglu,B., Ulutin,O.N., Aterosklerozlularda Protein C ve Protein S plazma seviyeleri ve defibrotidin buna etkisi. 2. Çinko simpozyumu ve XX.Ulusal Hematoloji Kongresi Özet Kitabı 57, Ankara 1988.

- 102- Ulutin,O.N., Ulutin,Ş.B., Erbenği,T., Yardımcı,T., Çizmeci,G., Uğur,M.Ş., Özsoy,Y., Demirkol,F., Ulutin,T., Uzman,F., Ferhanoğlu,B., Defibrotidin Trombosit Fonksiyonlarına Etkisi, 2. Çinko Simpozyumu ve XX.Ulusal Hematoloji Kongresi Özet Kitabı, 55, Ankara 1988.
- 103- Özsoy,Y., Güven,K.C., Ulutin,Ş.B., Berkel,N.İ., Ulutin,O.N., Defibrotidein plazma heparin seviyesine ve AT III aktivitesine etkisi 2. Çinko Simpozyumu ve XX. Ulusal Hematoloji Kongresi Özet Kitabı, 58, Ankara, 1988.
- 104- Bayraktar,E., Uğur,M.Ş., Çevikbaş,A., Ulutin,O.N., Yardımcı T., Farelerde defibrotidin plazma ve serum protein değerine ve dağılımına etkisi. 2. Çinko Simpozyumu ve XX. Ulusal Hematoloji Kongresi, Özet Kitabı, 60. Ankara 1988.
- 105- Göker,B., Yardımcı,T., Ulutin,O.N., Defibrotidein trombositlerin ¹⁴C-glukoz transportuna etkisi,; 2. Çinko simpozyumu ve XX.Ulusal Hematoloji Kongresi özet kitabı, 56, Ankara 1988.
- 106- Yardımcı,T., Yaman,A., Ulutin,O.N., The levels of Glutamyl Transferrase and Glutathione in Platelets of Normals and Atherosclerotic subjects Before and After Defibrotide. 5 th Meeting of the Mediterranean Blood Club. 326 Antalya 1990.
- 107- Özer,N.K., Öncel,U., Ulutin,O.N., Emerk,K., Defibrotidin Aterosklerotik Hastaların Eritrosit Glukoz Taşınımına etkisi; XXII Ulusal Hematoloji Kongresi Özet Kitabı, 108 İstanbul 1991.
- 108- Brechen G., Cronkite,E.P., Morphology and enumeration of human blood plaletes. J.Ap.Physiol. 3:365, 1950.

- 109- Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L. Randall,R.J., Protein Measurement with the Folin Phenol reagen. J.Biol. Chem. 193:265, 1951.
- 110- Velicangil,S., Biyoistatistik (Biyoloji, Tıp, Dişhekimliği ve Eczacılık Bilimlerinde) Filiz Kitabevi, İstanbul, 1984.
- 111- Weber,K., Osborn,M. J.Biol.Chem. 244:4406, 1969.
- 112- Shiao,Y.J., Chen,J.C., Wang C.T., The solubilization and morphological change of human platelets in various detergents. Biochim. Biophys. Acta, 986, 56-67, 1989.
- 113- Yardımcı,T.U., Glucose Transport in Normal and Diabetic Platelets. Int.Soc. Haemat. Eur.African DİV. 4th Meeting Sept. 59, İstanbul 1977.
- 114- Bezer,B., Bromokriptinin Hematolojik Parametrelere etkisi. Yüksek Lisans Tezi, M.Ü.Eczacılık Fakültesi İstanbul, 1986.
- 115- Uçal,T., Histidine permease system in E.coli Ph.D.Thesis. p.p. 154 University of Connecticut Storrs, U.S.A. 1970.
- 1116-Abelson,N.J., Simon,M.I., Methods in Enzymology. Biomembrane, Transport, Membrane Isolation and Characterization Eds: Feischer, SZ., Fleischer B., Academic Press California 1989.
- 117- Yardımcı,T.U., Trombositlerde glukoz transport mekanizması; Normal ve aterosklerozlularda. Ulusal Nükleer Tıp ve Biyolojik Bilimler Kongresi, İstanbul, 1981.
- 118- Yardımcı,T., Özer,M., Ulutin,O.N., Burger hastalığında trombositlerde glukoz transportu. M.Ü. Eczacılık dergisi (Baskıda).

- 119- Yücel,R., Sönmezoğlu,K., Süer,A., Yardımcı,T., Urgancıoğlu,İ., Ulutin,O.N., Trombosit ¹⁴C-glukoz membran transportunun hipotiroidili olgularda incelenmesi. XXII. Ulusal Hematoloji Kongresi, İstanbul 1991.
- 120- Yücel,R., Özgüroğlu,M., Ülkü,U., Süer,A., Ulutin,O.N., Üre retansiyonu olmayan nefrotik sendromlu olgularda trombosit ¹⁴C glikoz membran transportunun incelenmesi XXII. Ulusal Hematoloji Kongresi, İstanbul 1991.
- 121- Sultuybek.G., Hatemi,H., Güven,M., Ulutin,T., Tavşan,E., Ulutin,O.N., Oral antidiabetiklerin trombositlerde ve eritrositlerde ¹⁴C-glikoz membran transportuna etkisi. XXII. Ulusal Hematoloji Kongresi, İstanbul, 1991.
- 122- Çizmeci G., Emekli,N., Yardımcı,T., Uğur,M.Ş., Ulutin,O.N., Effect of Indobufen on Platelet Metabolism. International İstanbul Symposia on Haematology, Ulutin,O.N., Berkerda,B. (Eds) Sermet Matbaası, İstanbul, 175, 1981.
- 123- Yardımcı,T.U., Membran Transport Systems in Human Platelets. Haematologica, 65, 498-508, 1980.

IX. KISALTMALAR

ADP	: adenzin difofat
ATP	: adenzin trifofat
c-AMP	: siklik adenzin monofofat
G6P	: glukoz-6-fofat
SDS-PAGE	: sodyum dodesil sulfat-poliakrilamid gel elektroforezi
EDTA	: etilendiamin tetrasetik asit
GABA	: gama amino butirik asit
R _T	: retansiyon zamanı
PRP	: trombosit zengin plazma
DNA	: deoksiribonükleik asit
ATIII	: antitrombin III
t-PA	: doku plazminojen aktivatörü
t-PAI	: doku plazminojen aktivatör inhibitörü
TXA ₂	: tromboksan A ₂
γ-GT	: γ-glutamil transferaz
Tr.F ₄	: trombosit faktör 4
2-DOG	: 2 deoksiglukoz
3-OMG	: 3 ortometilglukoz
PEP	: fosfoenolpiruvat
PTS	: fosfotransferaz sistemi
M.D.A	: malondialdehit