

16168

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI  
Prof.Dr. Gürbüz GÜMÜŞDİŞ

TROMBOSİT FERRİTİNİ  
VE  
TROMBOSİT FERRİTİN METABOLİZMASI  
Uzmanlık Tezi

Tez Sorumlusu  
Prof.Dr. Mustafa C. KARACA

T. C.  
Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi

Dr. Seçkin ÇAĞIRGAN

İZMİR - 1991

## Ö N S Ö Z

Trombosit fonksiyonunun devamlılığında, agregasyon sırasında trombosit içinde yer alan bazı maddelerin salınım olayı önemli bir yer tutmaktadır. Bugüne kadar trombositler içinde yer alan birçok maddenin bu olaya katılıp katılmadığı incelenmiştir. Ancak, trombosit içinde var olduğu gösterilen ferritinle ilgili böyle bir çalışma yoktur. Bu nedenle, trombosit ferritininin agregasyon sırasında ortama salınıp-salınmadığını saptamak için bu çalışmayı planladık.

Bu konuda çalışma yapmamı sağlayan ve çalışmanın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof.Dr. Mustafa C. KARACA'ya teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Ayrıca, tezimin laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan, İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Hematoloji Laboratuvarı çalışanlarına ve Nükleer Tıp Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç.Dr. Hayal ÖZKILIÇ'a da teşekkür ederim.

Temmuz - 1991

Dr. Seçkin ÇAĞIRGAN

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
GİRİŞ	1
GEREÇ VE YÖNTEM	6
BULGULAR	13
TARTIŞMA VE SONUÇ	18
ÖZET	22
KAYNAKLAR	24

## G İ R İ Ő

Trombositleri kanın ayrı bir Őekli elemanı olarak ilk kez 1882 yılında Bizzozero tanımlamıŐtır. Bizzozero ayrıca, bunların agregasyon, adezyon ve visköz metamorfozları üzerinde durmuş ve trombositlerin tıkaç yaparak kanamayı durdurduğuna da ilk kez dikkati çekmiŐtir (65, 72). Pıhtılaşma esnasında trombositlerin kümeleŐmesi ve sonra bu kümeleŐmiŐ trombositlerin eriyerek homojen bir maddeye deĐiŐimini tanımlayan visköz metamorfoz deyiimi ilk olarak Schimmelbush tarafından kullanılmıştır (52). Trombosit metamorfozu adı da verilen visköz metamorfoz olayı iki aŐamalı bir olaydır. Olay agregasyon ile baŐlar, bunu trombosit faktörlerinin ortama verililiŐi izler ve sonuğa sağlam ve irreversibl trombosit tıkaçı oluşur (30,50,53,54).

Wright, trombositlerin kökeninin kemik iliğindeki megakaryositler olduğunu bulmuş ; bunu izleyen araŐtırmalarla trombositlerin megakaryositlerle aynı antijene sahip olduğu floresan antikor tekniği ile gösterilmiş ve mikrosinematografi tekniği ile genç megakaryositlerin takip edilerek trombositlerin oluşumunun gözlenmesi ile bu bulgu tam kesinlik kazanmıştır (31,49,58,65,66,72).

20. yüzyıl baŐlarında trombositopenik hastalıklar tanımlanmıŐ, fakat 1920'den sonra uzun yıllar trombositlere gereken önemi veren çalışmalar yapılmamıŐtır. Bu arada bazı kalitatif trombosit hastalıkları tanımlanmıŐsa da, trombositlerin yapısını açıklayacak nitelikte araŐtırmalara rastlanmamıştır. 1948 yılında trombosit faktör-3 (TF-3)'ün bulunmasından sonra trombositler üzerindeki çalışmalar yoğunlaŐmış ve trombositlerin biofizyolojik özelliklerini açıklayan buluşlar yapılmıştır (59,65).

Trombositlerin ömrü çeşitli yöntemlerle ölçülmüş ; doğrudan doğruya trombosit transfüzyonları kullanılarak yapılan ölçümde, trombositlerin ortalama ömrü 5 gün bulunmuştur (24). Daha sonra <sup>51</sup>Cr ve diğer izotoplarla işaretlenmiş trombositlerle yapılan çalışmalarda trombosit ömrü 5-12 gün olarak saptanmıştır (1,2,5,14,18,22,45).

Trombosit adezyon ve agregasyonunda başlıca rol oynayan faktörün ADP olduğunun ortaya konması, diğer maddelerle meydana gelen bu olaylarda da ADP'nin önemli bir rol oynadığının gözlenmesi, kalitatif trombosit hastalıklarının daha da önem kazanmasına yol açmıştır (28, 64,70,72).

Bu çalışmaları izleyen dönemde trombositlerin biyokimyası üzerine yapılan çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Bu çalışmalarda trombositlerin protein, karbonhidrat, lipid, element ve birçok enzim içerdiği saptanmış ve kalitatif trombosit hastalıkları ile trombositlerin biyokimyasal yapısı arasında ilişki olduğu görülmüştür (6,25,33,37,41,59,65).

Trombositlerin içerdikleri maddeleri ortama vermeleri ilk kez 1956 yılında Ulutin ve Karaca'nın çalışmaları ile gösterilmiştir (60, 61,63). Aynı araştırmacılar 1957 yılında trombosit ozmotik direnç testini tanımlamışlar, bu test ile normal ve trombopatik trombositler arasındaki farkı belirtmişler ve primer trombopatilerde bir trombosit faktör-3 verişi kusuru olduğunu, trombosit faktör-3'e sahip trombopatik trombositlerin bu faktörü ortama veremediklerini göstermişlerdir (62). 1965 yılında Bowie ve arkadaşları tarafından "eksiklik (deficit) trombopatisi", 1970 yılında Holmsen ve Weiss tarafından "Storage pool disease" adlarıyla bu hastalığın yeni bir tipi tanımlanmıştır (8,26).

Burada defekt, trombositlerin trombosit faktör-3'den fakir oluşudur (7, 8,26,29,74). Trombastenide, trombositlerde veriş kusuru ve içerdiği maddelerde bir bozukluk saptanamamış, ancak son yıllarda trombosit membran glikoproteinlerinde defekt bulunmuştur (34,46).

Son yıllarda prostoglandinlerin trombosit fonksiyonlarına etkileri üzerine çalışmalar yapılmış, Prostoglandin  $E_1$ 'in trombosit agregasyonunu önemli derecede inhibe ettiği, Prostoglandin  $E_2$ 'nin ise trombosit agregasyonunu hızlandırdığı ortaya konmuş ve trombosit agregasyonuna en etkili prostoglandinin tromboksan  $A_2$  olduğu gösterilmiştir (17, 51,55,68). Trombositlerde araşidonik asitten oluşan tromboksan  $A_2$ 'nin kuvvetli bir vazokonstriktör etkiye sahip olduğu da gösterilmiştir. Ağızdan asetilsalisilik asit veya indomethacin alanlarda bu olayın meydana gelmediği ve kanama zamanının hafifçe uzadığı gözlenmiştir (9, 16). Araşidonik asidin tromboksan  $A_2$ 'ye çevrilişinin endoperoksit isimli ara maddenin üretimiyle ilgili olduğu ve damar duvarı sağlam olgularda bu ara maddenin endotel hücreleri tarafından hızla prostosikline çevrildiği gösterilmiştir. Bu madde trombosit agregasyonunda kuvvetli bir inhibitör rol oynadığı gibi, vazodilatatör etkiye de sahiptir (10,20). Böylece prostosiklin vazokonstriktör damar alanını lokalize edici bir madde olarak karşımıza çıkmaktadır (67).

Trombosit yönünden bugüne kadar harcanan bu çabalar kalitatif trombosit hastalıklarının patogenezi aydınlatmaya ve trombositlerin tromboembolik olaylarda oynadığı rolü saptamaya yönelik olmuştur (43,44). Bu çalışmalar arasında az da olsa trombositlerin mineral içeriği üzerinde durulmuştur. Trombositlerin sodyum, potasyum, magnezyum, kalsiyum, bakır, çinko ve demir gibi mineraller içerdiği

belirlenmiş ve bu minerallerin biyofizyolojik olaylardaki rolünü araştıran çalışmalar yapılmıştır (3,12,19,39,42,69).

Diğer mineraller yanında, ilk defa 1953 yılında Maupin trombositlerin demir içerdiğini bildirmiştir (42). Bundan sonra 1960 yılında A.A.Markosjan trombositlerin demir içerdiklerini kalitatif olarak göstermiştir (40). Broome ve arkadaşları 1963 yılında trombositlerde 2 ml paket hacimde 20 mikrogram kadar demir bulmuşlardır (42). 1978'de Baker ve arkadaşları trombosit demir değerini ortalama 0.009-0.019 mikrogram/ $10^9$  trombosit olarak saptamışlardır. 1981 yılında Bilkay ve Karaca, trombosit demirini  $0.0251 \pm 0.0052$  mikrogram/ $10^9$  trombosit olarak bildirmişler ve trombosit metabolizmasına etkisini inceledikleri çalışmalarında, kollajen dışında, agregasyon yapan maddelerle demirin agregasyon sırasında ortama verilmediğini göstermişlerdir (4). Aynı araştırmacılar, kalitatif trombosit hastalıklarında trombosit demir miktarını normal değerlerde bulmuşlardır (4).

Trombosit demiri ile ilgili bu çalışmalara karşın, bir depo demiri olan ve insan dokularının bir çoğunda var olduğu gösterilmiş olan ferritin ile ilgili çalışmalar son derece sınırlıdır. İlk kez Maupin, 1969 yılında yayınladığı kitabında, histokimyasal boya yöntemi ve elektron mikroskopuyla yapılan incelemede trombositlerin içinde ferritin bulunduğunu bildirmiştir (42). 1985 yılında Suzuki ve arkadaşları yayınladıkları bir çalışmada seruma ilave ettikleri katyonik ferritinin trombositlerin membranına yapıştığını, hatta trombosit içine girdiğini göstermişlerdir (57). İlk kez Dinçer ve arkadaşları, 1987 yılında yayınladıkları çalışmalarında, trombosit ferritin düzeyini

kantitatif olarak ölçmüşler, trombosit ferritinini kadınlarda 14.40 ng/10<sup>9</sup> trombosit, erkeklerde 15.29 ng/10<sup>9</sup> trombosit olarak bildirmişlerdir (15). Aynı araştırmacılar, bazı hematolojik hastalıklarda da trombosit ferritin düzeyini ölçmüşler, demir eksikliği gösteren olgularda trombosit ferritin düzeyini düşük, hemolitik anemili ve lösemili olgularda trombosit ferritin düzeyini yüksek olarak bulmuşlardır (11,15). Bu sonuçlar ile, trombosit ferritini ve serum ferritini düzeyleri arasında bir ilişkinin bulunduğu ve bu nedenle trombosit ferritin düzeyinin, depo demiri düzeyini yansıtabileceği bildirilmiştir.

Literatürde trombosit ferritini ile ilgili başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma, daha önceki çalışmalarla trombositlerin içinde varolduğu saptanan ferritinin trombosit metabolizmasındaki yerini, agregasyon sırasında ortama verilip verilmediğini saptamak amacıyla yapılmıştır.



## G E R E Ç V E Y Ö N T E M

### I. OLGULAR :

Bu çalışmada 10 olgu incelenmiştir. Bunların tümü, hiçbir hastalığı olmayan, hiçbir ilaç kullanmayan, serum ferritini ve trombositleri normal olan olgulardır.

İlk aşamada, tüm olgulardan klasik yöntemle trombosit elde edildikten sonra trombosit yıkama solüsyonunda homojenize edilmiş ve üç kez dondurulup eritilerek trombositlerin parçalanması sağlanmış ve parçalanma sonucu ortama çıkan ferritin düzeyi ölçülmüştür.

İkinci aşamada, yine aynı olgularda, trombositlerin agregan maddelerle (ADP, trombin, kollajen, adrenalin) enkübasyonundan önceki ve sonraki ferritin düzeyi saptanarak trombosit ferritininin gösterdiği değişiklikler araştırılmıştır. Ayrıca agregasyon öncesi ve sonrası plazma ferritin düzeyindeki değişimler de saptanmıştır.

### II. GEREÇLER :

Saf bir trombosit topağı elde edilmesi, agregasyon sağlanması, elde edilen 1 ml'lik trombosit süspansiyonlarındaki trombosit sayısının saptanabilmesi ve trombositlerden açığa çıkan ferritinin ölçümü için çeşitli miyarlar ve laboratuvar gereçleri kullanılmıştır.

#### A - KİMYASAL MADDELER :

##### SİTRAT :

Tri-Sodium Citrate-5,5-hydrate.

$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 5H_2O$ . Molekül ağırlığı : 357.16

ADENOSİNE-DİPHOSPHATE (ADP) (Diagnostica Stago)

ADP Stago flc. 0.1 mM

ADRENALİN (Diagnostica Stago)

Adrenalin Stago, 5 mM/ml (0.916 mg/1).

KOLLAJEN (Diagnostica Stago)

Collagene Stago, flc., 2 mg Collagene type 1.

TROMBİN (Roche)

Thrombin 0.1 gm, flc.

TRİS (Merck)

Hydroxy methyl amino methane.

$C_4H_{11}NO_3$ . Molekül ağırlığı 121.14

AMONIUM OXALAT

Riedel-De Haen Ag Seelze-Hannover.

B - MİYARLAR

SİTRAT

38 gram sodyum sitratın 1000 ml distile suya tamamlanmasıyla % 3.8'lik sitrat solüsyonu elde edilmiştir. Sitrat solüsyonu kan almak için 1/10 oranında kullanılmıştır.

ADENOSİNE-DİPHOSPHATE

0.1 mM ADP 1 ml distile suda sulandırılır. Hazırlanan solüsyon  $10^{-4}$  M olup,  $-20^{\circ}$  C'da saklanır. Kullanılacağı zaman 10 misli sulandırılıp  $10^{-5}$  M yapılır.

ADRENALİN

5 mM adrenalin 25 kez sulandırılır ve 200 mikrogram M yapılır.  $+4^{\circ}$  C'da 2 gün muhafaza edilir.

KOLLAJEN

1 ml distile suda sulandırılır. 24 saatte sık sık çalkalanarak polimerize edilir. 24 saat sonra Tris tamponu ile 4 misli sulandırılır. 500 mikrogram/ml olur ve +4° C'da muhafaza edilir. 2 ay dayanıklıdır.

TROMBİN

4600 ünitelik şişelerde bulunur. Üzerine 2.3 ml bidistile su, sonra 2.3 ml glicin eklenir. Stok solüsyon olarak tüplere 0.1 ml konarak -20° C'da saklanır. 0.1 ml trombin 100 ünite içerir. Kullanılacağı zaman istenilen dilüsyonda hazırlanır.

OWREN SOLÜSYONU

5.875 gm Na-Diethyl barbitürat, 7.335 gm NaCl, 785 ml bidistile suda eritilir. 215 ml HCl eklenir. pH : 7.3'dür.

TROMBOSİT YIKAMA SOLÜSYONU (Tris tampon) (23)

24.3 gm amino "tris" (hydroxy methyl) methane 1 litre bidistile suda eritilir. Bu solüsyondan 250 ml, 42 ml N hidroklorik asid ile asidifiye edilip 990 ml bidistile suya tamamlanır. 37° C'da pH : 7.2, 22° C'da pH : 7.4'dür.

C - FERRİTİN RIA KİT (Amershan)

Ferritin ölçümü için radioimmün assay yöntemine dayanan Ferritin RIA-Kit, Amershan kullanılmıştır.

D - DİĞER GEREÇLER

PARAFİLM (PARAFİLM M)

American Can Company

Marathon products. Neenah, Wisconsin

Tüplerin ağzını kapatmak için kullanılmıştır.

### TÜPLER

Kan almak ve çalışmayı sürdürmek için 10 ml'lik polietilen tüpler kullanılmıştır.

### PİPETLER

Çalışmada 1 ml, 2 ml, 5 ml'lik pipetler kullanılmıştır.

### E - CİHAZLAR

#### FAZ KONTRAST MİKROSKOBU

Zeiss marka mikroskop trombosit saymada kullanılmıştır.

#### SOĞUK SANTRİFÜJ

Christ II KS.

### **III - YÖNTEM :**

#### **1. TROMBOSİTLERİN ELDE EDİLMESİ**

Amaç, çok sayıda trombosit içeren bir trombosit topağı elde ederek, bunu 1 ml'lik sıvı ortamda saklamak ve bu 1 ml'lik yoğun trombosit süspansiyonunun ferritin içeriğini saptamaktır. Çalışmamızda trombositler klasik yöntemle hazırlanmıştır.

Klasik Yöntemle Trombosit Hazırlanması : Bir olgudan, 10 ml'lik polietilen tüplerden 8 tanesine toplam 80 ml kan alınmıştır. Kanın hemoliz olmaması ve yüzeyde yabancı cisimlerle temasa geçerek içeriğini değiştirmemesi için kalın iğneler kullanılmıştır. Antikoagulan olarak sitrat kullanılmıştır.

Trombosit morfolojisinin bozulmaması için soğuk santrifüj +10°C'a ayarlanmış (21,38), alınan kan 1200 rpm'de 20 dakika döndürüldükten

sonra 10 dk oda ısısında dinlendirilmiştir. Üstteki trombositten zengin plazmanın (TZP) 2/3'ü pipetler ile polietilen tüplere alınmıştır. Bu aşamada TZP, faz kontrast mikroskobunda eritrosit olup olmadığı yönünden kontrol edilmiş, eğer mikroskop alanında eritrosit görülürse, TZP tekrar 10 dakika 800 rpm'de döndürülerek eritrositler çöktürülmüştür. Üstteki TZP temiz polietilen tüplere aktarılarak, soğuk santrifüjde 3500 rpm'de 15 dakika çevrilerek trombosit topağı elde edilmiştir. Elde edilen trombosit kümesi, trombosit yıkama solüsyonu ile üç kez yıkamış, homojenize edildikten sonra her seferinde 15 dakika 3500 rpm'de çevrilerek tekrar trombosit topağı elde edilmiştir. Bu işlem yapılırken eritrosit bulunup bulunmadığına dikkat edilmiş, eğer mikroskop alanında eritrosit görülürse, tek bir eritrosit görülmeyinceye kadar yıkama işlemine devam edilmiştir. Son yıkamadan sonra elde edilen saf trombosit topağı usulüne göre ezilerek üzerine 0.1 ml trombosit yıkama solüsyonu konularak homojenize edilmiş, üzerine 1 ml daha ilave edilerek trombosit süspansiyonu hazırlanmıştır. Ardından bu süspansiyondan 0.1 ml alınarak faz kontrast mikroskobunda trombosit sayımı yapılmıştır. Bu süspansiyon üç kez dondurulup eritildikten sonra ferritin tayini yapılmıştır. Sonuçların standardize edilebilmesi için  $10^9$  trombositte isabet eden ferritin miktarı nanogram cinsinden hesaplanmıştır.

## 2. AGREGASYON ÇALIŞMALARI

Çalışmamızın amacı, trombositlerdeki ferritin miktarının saptanması ve agregasyon sırasındaki salıverilme olayında ferritinin ortama salınıp-salınmadığının araştırılması idi. Buna yönelik olarak yapılan çalışmalarda aşağıda anlatılan yöntem kullanılmıştır.

Yukarıda anlatıldığı gibi, her olgudan 80 ml kan alınmış ve TZP hazırlanmıştır. Elde edilen TZP'dan 3.6'şar ml 4 ayrı tüpe konmuş ve bunlara uygun şekilde hazırlanan agregat edici maddeler (ADP, trombin, kollajen, adrenalin) ilave edilerek usulüne uygun olarak her tüpte agregasyon sağlanmıştır. Agregasyon sağlandığı görüldükten sonra, yukarıda klasik yöntemle trombosit hazırlanmasında anlatılan yöntem aynen uygulanarak herbirinden ayrı ayrı trombosit topakları elde edilmiştir. Bu şekilde agregasyon yapılmadan elde edilen trombosit topağı ile, agregasyon sağlandıktan sonra elde edilen trombosit topaklarındaki ferritin düzeyleri ölçülerek aralarında farklılık olup olmadığı, trombositlerden agregasyon sırasında ferritinin ortama salınıp salınmadığı saptanmaya çalışılmıştır.

Ayrıca, trombositlerden agregasyon sırasında ferritin salınıyorsa, açığa çıkan ferritin plazmaya geçeceği düşüncesi ile, agregasyonsuz trombositten fakir plazmadan ve agregasyon sağlandıktan sonra elde edilen trombositten fakir plazmalardan örnek alınarak ferritin düzeyleri ölçülmüş ve karşılaştırılmıştır.

Agregasyon yapıcı maddeler olarak ADP, trombin, kollajen ve adrenalin kullanılmıştır.

ADP ile agregasyon : 10 olguda ADP ile agregasyon uygulanmıştır. 3.6 ml TZP'ya, 0.4 ml  $10^{-5}$  M ADP eklenmiş, böylece 4 ml'lik karışım elde edilmiştir. Karışımın içine magnet ve tüpün ağzına parafilm konarak her tüp ayrı ayrı alt-üst edilmiş ve karışımın köpürmemesine dikkat edilmiştir. Agregasyon oluştuktan sonra 10 dk bekletilmiş ve daha sonraki işlemlere geçilmiştir.

Trombin ile agregasyon : Trombin ile 10 olgu çalışılmıştır.

Hazırlanan trombin solüsyonuyla çok hızlı pıhtı oluşmuş, denenen değişik konsantrasyonlardaki trombin solüsyonlarına rağmen pıhtı meydana getirmeyecek, fakat agregasyon sağlayacak doz elde edilememiştir. Bu nedenle trombin ile çalışmada, 3.6 ml TZP'ya 1 u/ml'lik trombinden 0.4 ml ilave edilmiş, pıhtılaşma sonrası elde edilen serumda ferritin tayini yapılmış ve agregasyonsuz TFP'da ölçülen ferritin düzeyi ile karşılaştırılmıştır.

Kollajen ile agregasyon : Kollajen ile 10 olguda agregasyon sağlanmıştır. Hazırlanan kollajen stok solüsyonundan 0.4 ml, 3.6 ml TZP'ya ilave edilmiş ve agregasyon için bildirilen işlemler aynen uygulanmıştır.

Adrenalin ile agregasyon : Adrenalin ile 10 olguda agregasyon sağlanmıştır. Hazırlanan adrenalin solüsyonundan 0.4 ml, 3.6 ml TZP'ya ilave edilmiş ve agregasyon sağlanmıştır.

Sonuçta elde edilen trombosit süspansiyonları ve trombositten fakir plazmalarda ferritin ölçümleri Nükleer Tıp Anabilim Dalında, Ferritin RIA-Kit (Amershan) kullanılarak radioimmuno assay yöntemi ile yapılmıştır.

### 3. SONUÇLARIN HESAPLANMASI

İstatistikî analizler Ege Üniversitesi Bilgisayar Araştırma ve Uygulama Merkezinde Student t testi uygulanarak yapılmıştır.

## B U L G U L A R

### I - TROMBOSİTLERDEKİ FERRİTİN MİKTARI

a) Agregasyon uygulanmadan ve uygulandıktan sonra saptanan trombosit ferritin miktarları Tablo - 1'de gösterilmiştir.

b) Agregasyon uygulanmadan klasik yöntemle elde edilen trombosit ferritin değerlerinin ortalaması  $8.72 \text{ ng}/10^9$  trombosit olarak bulunmuştur.

c) ADP ile agregasyondan sonra elde edilen trombosit ferritin miktarı ortalaması  $8.664 \text{ ng}/10^9$  trombosit olarak bulunmuştur. Agregasyon sağlanmadan ve ADP ile agregasyon sağlandıktan sonra elde edilen trombosit ferritin düzeylerinin istatistiki karşılaştırılmasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $P > 0.05$ ) (Tablo - 2).

d) Kollajen ile agregasyondan sonra elde edilen trombosit ferritin miktarı ortalaması  $8.735 \text{ ng}/10^9$  trombosit olarak bulunmuştur. Agregasyon sağlanmadan ve kollajen ile agregasyon sağlandıktan sonra elde edilen trombosit ferritin düzeylerinin istatistiki karşılaştırılmasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $P > 0.05$ ) (Tablo - 3).

e) Adrenalin ile agregasyondan sonra elde edilen trombosit ferritin miktarı ortalaması  $9.615 \text{ ng}/10^9$  trombosit olarak bulunmuştur. Agregasyon sağlanmadan ve adrenalin ile agregasyon sağlandıktan sonra elde edilen trombosit ferritin düzeylerinin istatistiki karşılaştırılmasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $P > 0.05$ ) (Tablo - 4).

### II- TROMBOSİTTEN FAKİR PLAZMALARDA FERRİTİN MİKTARI

a) Agregasyon uygulanmadan ve uygulandıktan sonra elde edilen



trombositten fakir plazmalarda (TFP), ölçülen ferritin miktarları Tablo-5'de gösterilmiştir.

b) Agregasyon uygulanmadan elde edilen trombositten fakir plazma ferritin değerlerinin ortalaması 68.9 ng/ml olarak bulunmuştur.

c) ADP ile agregasyondan sonra elde edilen trombositten fakir plazma ferritin miktarı ortalaması 58.5 ng/ml olarak bulunmuştur. Agregasyon sağlanmadan ve ADP ile agregasyon sağlandıktan sonra elde edilen trombositten fakir plazma ferritin düzeylerinin istatistiki karşılaştırılmasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $P < 0.01$ ) (Tablo - 6).

d) Kollajen ile agregasyondan sonra elde edilen trombositten fakir plazma ferritin miktarı ortalaması 62.9 ng/ml olarak bulunmuştur. Agregasyon sağlanmadan ve kollajen ile agregasyon sağlandıktan sonra elde edilen trombositten fakir plazma ferritin düzeylerinin istatistiki karşılaştırılmasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $P < 0.05$ ) (Tablo - 7).

e) Adrenalin ile agregasyondan sonra elde edilen trombositten fakir plazma ferritin miktarı ortalaması 62.5 ng/ml olarak bulunmuştur. Agregasyon sağlanmadan ve adrenalin ile agregasyon sağlandıktan sonra elde edilen trombositten fakir plazma ferritin düzeylerinin istatistiki karşılaştırılmasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $P > 0.05$ ) (Tablo - 8).

f) Trombin ile pıhtılaşma sağlandıktan sonra elde edilen serum ferritin miktarı ortalaması 63.5 ng/ml olarak bulunmuştur. Agregasyon sağlanmadan elde edilen trombositten fakir plazma ile trombinle

enkübasyondan sonra elde edilen serum ferritin düzeylerinin istatistiki karşılaştırılmasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $P < 0.05$ ) (Tablo - 9).

Tablo - 1 : Agregasyon uygulanmadan ve uygulandıktan sonra saptanan trombosit ferritini ( $\text{ng}/10^9$  trombosit).

Olgular	Agregasyon öncesi	ADP ile agregasyon	Kollagen ile agregasyon	Adrenalin ile agregasyon
1	6.69	9.43	12.37	10.93
2	7.99	6.99	6.94	8.23
3	7.38	6.44	7.94	7.55
4	8.65	7.95	6.10	8.53
5	16.94	13.46	12.87	16.47
6	10.67	14.62	9.01	11.45
7	5.65	5.99	5.58	8.36
8	5.87	7.21	9.11	9.45
9	9.41	6.94	5.87	7.32
10	8.00	7.61	11.56	7.86

Tablo - 2 : ADP ile Agregasyonun Trombosit Ferritinine Etkisi ( $\text{ng}/10^9$  trombosit).

	Ortalama Değerler	Standart Sapma	P
ADP ile agregasyondan önce	8.720	2.254	$> 0.05$
ADP ile agregasyondan sonra	8.664		

Tablo - 3 : Kollajen İle Agregasyonun Trombosit Ferritinine Etkisi  
(ng/10<sup>9</sup> trombosit).

	Ortalama Değerler	Standart Sapma	P
Kollajen ile agregasyondan önce	8.720	3.250	> 0.05
Kollajen ile agregasyondan sonra	8.735		

Tablo - 4 : Adrenalin İle Agregasyonun Trombosit Ferritinine Etkisi  
(ng/10<sup>9</sup> trombosit).

	Ortalama Değerler	Standart Sapma	P
Adrenalin ile agregasyondan önce	8.720	1.987	> 0.05
Adrenalin ile agregasyondan sonra	9.615		

Tablo - 5 : Agregasyon Uygulanmadan ve Uygulandıktan Sonra Trombositten Fakir Plazma Ferritini (ng/ml).

Olgular	Agregasyon Öncesi	ADP ile enkübasyon	Kollajen ile enkübasyon	Adrenalin ile enkübasyon	Trombin ile enkübasyon
1	56.89	48.24	63.34	71.79	60.00
2	63.58	42.88	62.43	57.95	58.69
3	27.73	28.37	25.52	27.01	28.66
4	12.41	14.55	12.71	12.17	13.08
5	217.83	188.22	201.70	199.48	201.70
6	34.70	23.62	27.71	28.97	30.75
7	53.18	47.60	50.08	38.15	45.78
8	32.08	26.94	28.89	25.69	29.23
9	56.49	48.53	42.28	45.92	49.89
10	128.41	116.41	114.11	118.09	117.72

Tablo - 6 : ADP ile Agregasyonun TFP'nın Ferritinine Etkisi.

	TFP'nın Ortalama Ferritin Değerleri	Standart Sapma	P
ADP ile agregasyondan önce	68.90	9.37	< 0.01
ADP ile agregasyondan sonra	58.50		

Tablo - 7 : Kollajen ile Agregasyonun TFP'nın Ferritinine Etkisi.

	TFP'nın Ortalama Ferritin değerleri	Standart Sapma	P
Kollajen ile agregasyondan önce	68.90	7.39	< 0.05
Kollajen ile agregasyondan sonra	62.90		

Tablo - 8 : Adrenalin ile Agregasyonun TFP'nın Ferritinine Etkisi.

	TFP'nın Ortalama Ferritin Değerleri	Standart Sapma	P
Adrenalin ile agregasyondan önce	68.90	9.49	> 0.05
Adrenalin ile agregasyondan sonra	62.50		

Tablo - 9 : Trombin ile Enkübasyonun TFP'nın Ferritinine Etkisi.

	TFP'nın Ortalama Ferritin Değerleri	Standart Sapma	P
Trombin ile enkübasyondan önce	68.90	5.89	< 0.05
Trombin ile enkübasyondan sonra	63.50		

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Trombositlerin mineral içeriği ile ilgili araştırmalar yapılırken demir içeriği de araştırılmış ve ilk kez Maupin 1953 yılında Ferry'nin emisyon spektrografi yöntemini uygulayarak trombositlerde demir bulunduğunu göstermiştir (42). 1960 yılında A.A.Markosjan trombositlerin oksidasyonlardaki rolünü araştırırken trombositlerin demir içerdiklerini kalitatif olarak göstermiştir (40). 1978 yılında Baker ve 1981 yılında Bilkay (4) yaptıkları yayınlarda trombosit demir miktarını, sırasıyla 0.009-0.019 mikrogram/ $10^9$  trombosit ve  $0.0251 \pm 0.0052$  mikrogram/ $10^9$  trombosit olarak bildirmişlerdir.

Trombosit demiri ile ilgili var olan bu çalışmalara karşın, bir depo demiri olan ferritin ile ilgili çalışmalara son döneme kadar rastlamamaktayız. Maupin 1969'da yayınladığı kitabında histokimyasal boya yöntemi ve elektron mikroskopuyla yapılan incelemede trombositlerin içinde ferritin bulunduğunu bildirmiştir (42). Kanın diğer şekilli elemanları eritrositlerde ve beyaz seri hücrelerinde (monosit, lenfosit, granülosit) ferritinin varlığı gösterilmiş ve çeşitli hastalıklar-daki değişimleri oldukça geniş bir şekilde incelenmiştir (13,32,35,48, 56,71,73). Buna karşın son yıllarda yapılmış birkaç çalışma dışında, trombosit ferritini ile ilgili bir çalışma bildiğimiz kadarıyla yoktur. Suzuki ve arkadaşları, 1985 yılında yayınladıkları bir çalışmada, seruma ilave ettikleri katyonik ferritinin trombositlerin membranına yapıştığını, hatta trombosit içine girdiğini göstermişlerdir (57). 1987 yılında Dinçer ve Karaca trombositlerde ferritin bulunduğunu bildirmişler ve bu çalışmada da uygulanan yöntemle trombosit ferritin miktarını kantitatif olarak tayin etmişlerdir. Bu araştırmada  $10^9$  trombositte

isabet eden ortalama ferritin miktarı kadınlarda 14.40 ng, erkeklerde 15.29 ng olarak bulunmuştur (15). Aynı grup tarafından trombosit ferritininin bazı hematolojik hastalıklarla ilişkisi de araştırılmıştır. Demir eksikliği anemili olgularda trombosit ferritini normallerden anlamlı olarak daha düşük (ortalama değer =  $4.04 \pm 1.2$  ng/10<sup>9</sup> trombosit), hemolitik anemili ve lösemili olgularda yüksek (sırasıyla 119.20 ng/10<sup>9</sup> trombosit ve 192.08 ng/10<sup>9</sup> trombosit) olarak bildirilmiş ve trombosit ferritininin demir depolarının durumunu yansıtabileceği ileri sürülmüştür (11,15).

Biz de, bu çalışmamızda trombosit ferritininin trombosit fonksiyonu ile ilişkisini, agregasyon olayı sırasında trombosit içindeki ferritinin ortama salınıp salınmadığını saptamak istedik.

Çalışmamızda 10 olgudan klasik yöntemle elde edilen trombosit topağında trombosit ferritini ortalama değeri 8.72 ng/10<sup>9</sup> trombosit olarak bulunmuştur. Bu değer Dinçer ve Karaca'nın normallerde belirtmiş olduğu değerlerden daha düşük olmasına karşın, demir eksikliği anemili olgularda bildirilenden belirgin olarak daha yüksektir ve sonuçlardaki farklılığın serum ferritin düzeyleri ile ilişkili olduğu düşünülebilir.

Çalışmamızın temel amacı, trombositlerdeki ferritininin agregasyon yapıcı maddelerle değişip değişmediğinin saptanmasıydı. Trombositler adezyon-agregasyon haline geçtiklerinde veriş mekanizması işler ve bu veriş olayı visköz metamorfozla tamamlanır. Veriş olayı selektif bir olay olup, mitokondrilerin, sitosol ve membranların içerdiği maddeler selektif olarak tutulmaktadır. Holmsen ve Day, trombinin meydana getirdiği trombosit veriş olayı üzerinde selektif bir etkiye sahip olduğunu,

bu arada adenin nukleotidler, Laktad dehidrogenaz ve sitokrom C oksidaz'ın tutulan maddeler arasında olduğunu bildirmiştir (2). Trombositlerin spesifik uyarılara karşı depo granüllerinin içerdiği maddeleri salgıladıkları bilinmektedir. Trombositlerde 2 tip depo granülü olup, bunlardan birincisi yoğun granüller, diğeri ise alfa granüllerdir (47). Çeşitli agregasyon yapıcı maddelerden ADP ve adrenalinin sadece yoğun granülleri, kollajen ile trombinin ise her iki depoyu boşalttığı gösterilmiştir (27). Bizim çalışmamızda ADP, Kollajen, Adrenalin ile trombositler enkübe edildiğinde agregasyon yapıcı maddelerden önce ve sonra trombosit ferritininde anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu da agregasyon sırasında ferritinin salınmadığını göstermektedir. Trombosit ferritindeki agregasyon sonrası olabilecek değişikliklerin kontrolü olabileceği düşüncesi ile agregasyon uygulanmadan ve uygulandıktan sonra elde edilen trombosit fakir plazmalarda (trombin ile uygulamada serumda) da ferritin düzeyleri ölçülmüştür. Adrenalin ile enkübasyondan sonra elde edilen trombosit fakir plazmalarda anlamlı bir farklılık bulunmamış, ancak ADP, kollajen ve trombin ile enkübasyondan sonra elde edilen trombosit fakir plazmalarda istatistiki olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Bu sonuçlar, agregasyon öncesi ve sonrası saptanan trombosit ferritin sonuçları ile uyumsuzdur. Ayrıca, agregasyon sonrası salınım oluyorsa, agregasyon sonrası elde edilen plazmada ferritin düzeyinin yükselmesi beklenirken, bizim çalışmamızda bunun tam tersi sonuçlar bulunmuş, ADP, kollajen, adrenalin ve trombin ile enkübasyondan sonra elde edilen trombosit fakir plazmaların ortalama ferritin değerleri, agregasyon öncesi elde edilen trombosit fakir plazmanın ortalama ferritin değerinden daha düşük bulunmuştur. Bu

aşamada bu düşmenin nedeni kesin olarak açıklanamaz. Bir olasılık olarak, agregasyon sırasında serum ferritininin trombosit membranına absorbe olduğu ve agregasyon sonrası trombositler 3 kez yıkandığı için, bu yıkama sırasında absorbe olan ferritinin tekrar uzaklaştırıldığı ve bu nedenle trombositlerde saptanan ferritin düzeylerini değiştirmediği ve bu arada plazmada ferritin düzeyinin düştüğü ileri sürülebilir. Suzuki ve arkadaşlarının 1985'de yayınladıkları bir çalışmada seruma ilave ettikleri katyonik ferritinin trombositlerin membranına yapıştığını, hatta trombosit içine girdiğini göstermişlerdir (57). Bu çalışma da yukarıda ileri sürdüğümüz görüşün doğru olabileceğini göstermektedir. Ancak bu konuda henüz kesin bir şey söylemek için erkendir ve bu görüşün doğru olup olmadiğını saptamak için trombosit yıkama solüsyonunda, yıkama işleminden sonra ferritin olup olmadiğı araştırılabilir. Bunun dışında bu durumu açıklamakta bilmediğimiz bir mekanizma da geçerli olabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmamızda  $10^9$  trombositte isabet eden ferritinin 8.72 ng olduğu ve agregasyon sırasında ortama verilmediği gösterilmiştir.



## Ö Z E T

Bu çalışma, trombositlerin içerdiği ferritinin agregasyon sırasında ortama verilip verilmediğinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Normal 10 olguda klasik yöntemle trombosit topağı elde edilmiş ve bu topak ile, elde edilen TFP'da ferritin ölçümleri yapılmıştır. Daha sonra, ADP, kollajen ve adrenalin ile agregasyon sağlamış ve agregasyon sonrası elde edilen trombositlerde ve TFP'larda, ve trombin ile elde edilen serumda ferritin ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler radioimmün assay yöntemi ile yapılmıştır.

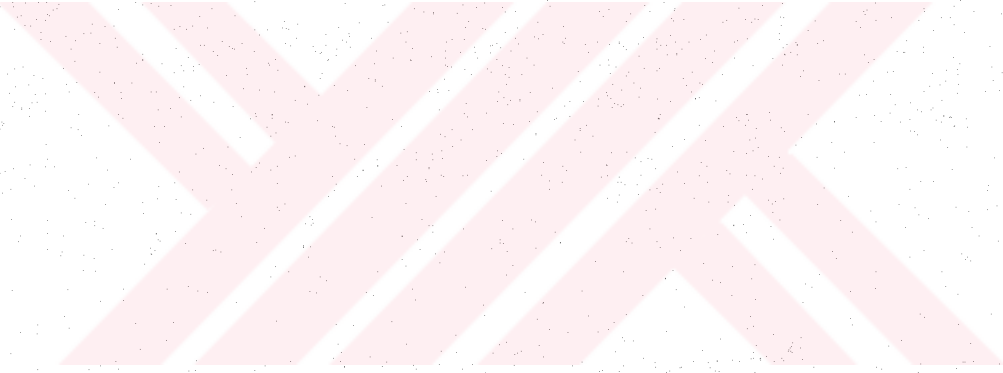
Saptadığımız bulgular şu şekilde özetlenebilir :

1. Klasik yöntemle elde edilen  $10^9$  trombositte isabet eden ortalama ferritin miktarı 8.720 ng olarak bulunmuştur.

2. ADP, kollajen ve adrenalin ile agregasyondan sonra trombosit ferritin miktarı ölçüldüğünde, ADP ile agregasyondan sonra 8.664 ng/ $10^9$  trombosit, kollajen ile agregasyondan sonra 8.735 ng/ $10^9$  trombosit ve adrenalin ile agregasyondan sonra 9.615 ng/ $10^9$  trombosit olarak bulunmuştur. Bu bulgular trombosit ferritininin agregasyon sırasında ortama verilmediğini göstermektedir.

3. ADP, kollajen, adrenalin ve trombin ile enkübasyon uygulanmadan ve uygulandıktan sonra elde edilen TFP'larda ferritin düzeyi ölçülmüş, enkübasyondan önce 68.9 ng/ml, ADP ile enkübasyondan sonra 58.5 ng/ml, kollajen ile enkübasyondan sonra 62.9 ng/ml, adrenalin ile enkübasyondan sonra 62.5 ng/ml ve trombin ile enkübasyondan sonra 63.5 ng/ml olarak bulunmuştur. Adrenalin ile enkübasyon dışında diğer agregan maddelerle agregasyon sırasında TFP ferritin düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir düşme olduğu saptanmıştır. Bu düşmenin

nedenin, agregasyon sırasında serum ferritininin trombosit membranına absorbe olmuş ve yıkama işlemi sırasında absorbe olan ferritinin tekrar uzaklaştırılmış olabileceği düşünülmüştür. Bunu saptamak için yıkama işleminden sonra trombosit yıkama solüsyonunda ferritin olup olmadığının araştırılması gerekmektedir.



## KAYNAKLAR

1. Aas K and Gardner F H : Survival of blood platelets labeled with chromium<sup>51</sup>. J.Clin.Invest. 37 : 1257, 1958.
2. Aster R H, Jandl J H : Platelet sequestration in man. I. Methods. J.Clin.Invest. 48 : 963, 1964.
3. Baker J R, McNeil J J and Lander H : Platelet metal levels in normal subjects determined by atomic absorption spectrophotometry. Thrombos. Haemostas. (Stuttg), 39 : 360, 1978.
4. Bilkay B Ç, Karaca M : Platelet iron. 1981 International Istanbul Symposia on Haematology. 533, 1981.
5. Bitchell T C, Athens J W, Cartwright E G and Wintrobe M M : Radioactive disopropyl fluorophosphate as a platelet label : An evaluation of in vitro and in vivo technics. Blood, 29 : 354, 1967.
6. Boullin D J : Platelet transaminases. Advances in biochemical psychopharmacology. Raven Press. New-York, 227, 1972.
7. Bowie E J and Owen C A Jr : Clinical disorders related to blood platelets. The circulating platelets. Ed. by SA Johnson, Academic Press, New-York, 473, 1971.
8. Bowie E J, Thompson J H and Owen C A Jr : The blood platelets (Including a discussion of the qualitative platelet disease). Mayo Clin.Proc. 40 : 625, 1965.
9. Bruch J W, Majerus P W : The role of prostaglandins in platelet function. Seminars in Hematology. 16 : 196, 1979.
10. Buntung S, Moncado S, Needleman P : Proceeding formation of prostaglandin endoperoxidase and rabbit aorta contracting substance (RCS) by coupling two enzyme systems. B.J.Pharmacol.56 : 344,1976.

11. Büyükkeçeci F, Özkılıç H, Karaca M, Özer A, Çağırğan S, Göker E, Dilber S : Ferritin metabolism in platelets. 5<sup>th</sup> Meeting of the Mediteranean Blood Club. 21 - 24 Sept. 1990, Antalya, Abs. Book MBC : 39, 1990.
12. Carroll H J and Gorstein F: Potassium transport in human platelets. Blood 24 : 852, 1964.
13. Cazzalo M, Arosio P, Barosi G, Bergemashi G, Dezza L, Ascari E : Ferritin in red cells of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. Brit.J.Haemat. 53 : 659, 1983.
14. Davey M C and Lander H : The behavior of infused platelets during the first twenty-four hours after infusion. Brit. J. Haemat. 10 : 94, 1964.
15. Dinçer F, Karaca M, Özkılıç H : Trombosit ferritini. Türk Hematoloji Derneği Kongresi, 23-25 Şubat 1987, Bursa, 530, 1987.
16. Ellis E A, Oelz O, Roberts L J, Payne N A, Sweetman B J, Niles A S and Oates J A : Coronary arterial smooth muscle contraction by a substance released from platelets : Evidence that is thromboxane A<sub>2</sub>. Science 193 : 1135, 1976.
17. Emmons P R, Hampton J R, Harrison M J G, Honour A J, Mitchel JRA : Effect of prostaglandin E<sub>1</sub> on platelet behavior in vitro and in vivo. Brit.Med.J. I : 468, 1967.
18. Gardner H F : Platelet kinetics and life. Span. Clinics in Haematology 1 : 307, 1972.
19. Gorstein F, Carroll J H, Puszkin E : Electrolyte concentrations, potassium flux kinetics and the metabolic dependence of potassium transport in human platelets. J.Lab.Clin.Med. 70 : 938, 1967.

20. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B : Thromboxanes : A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxidase. Proc. Natl. Acad. Sci. 72 : 2994, 1975.
21. Handin R I and Valeri C R : Improved viability of previously frozen platelets. Blood. 40 : 509, 1972.
22. Harker L A, Finch C A : Thrombokinetis in man. J. Clin. Invest. 48 : 963, 1969.
23. Harper A T : Laboratory guide disordered haemostasis. Butter-worth and Co. Ltd. 74, 1970.
24. Hirsch E O and Gardner F H : The transfusion of human platelets. J. Lab. Clin. Med. 39 : 556, 1952.
25. Holmsen H, Day H J, Pimental A M : Adenine nucleotide metabolism of blood platelets. V. Subcellular localization of some related enzymes. Biochemica et Biophysica Acta. 186 : 244, 1969.
26. Holmsen H and Weiss H J : Hereditary defect in platelet release reaction caused by a deficiency in storage pool of platelet adenine nucleotide. Brit. J. Haemat. 19 : 643, 1970.
27. Holmsen H, Day H J : The selectivity of the thrombin-induced platelet release reaction : Subcellular localization of released and retained constituents. J. Lab. Clin. Med. 75 : 840, 1970.
28. Holmsen H, Day H J : Biochemistry and physiology of blood platelets. Ann. Clin. Lab. Sci. 1038, 1971.
29. Holmsen H and Weiss H J : Further evidence for a deficient storage pool of adenine nucleotides in platelets from some patients with thrombocytopathia "Storage pool disease". Blood, 39 : 197, 1972.

30. Holmsen H and Day H J : The platelet release reaction and its role in platelet aggregation. *Acta. Med. Scand. Suppl.* 525 : 75, 1971.
31. Humprey J H : Origine of blood platelets. *Nature* 176 : 38, 1955.
32. Jacobs A, Peters E W, Bauminger E R, Eikelboom J, Ofer S, Rachmilowitz E A : Ferritin concentration in normal and abnormal erythrocytes measured by immunoradiometric assay with antibodies to heart and spleen ferritin and Mossbauer Spectroscopy. *Brit. J. Haemat.* 49 : 201, 1981.
33. Jamieson A G, Urban C L, Barber A J : Enzymatic basis for platelet. Collagen adhesion as primary step in haemostasis. *Nature, New Biology.* 234 : 5, 1971.
34. Jenkins C S P, Phillips D R, Clemetson K J, Meyer D, Larrieu M J, Luscher E F : Platelet membrane glycoproteins implicated in ristocetin induced aggregation. Studies of the proteins on platelets from patients with Bernard Soulier Syndrome and Von Willebrand's disease. *J. Clin. Invest.* 57 : 112, 1976.
35. Jones B M, Worwood M and Jacobs A : Isoferritins in normal leucocytes. *Brit. J. Haemat.* 55 : 73, 1983.
36. Karaca M : Normallerde ve trombositopatilerde trombositlerin tromboplastik faktörü ve lipid muhtevaları. Doçentlik Tezi, İzmir, 1963.
37. Karaca M, Stefanini M : Studies on platelets. XXV. Chemical analysis of platelets from with congenital and acquired thrombocytopathy, with special reference to phospholipids. *J. Lab. Clin. Med.* 67 : 229, 1966.
38. Kattlove H E, Alexander B and White F : The effect of cold on platelet function after short-term storage at cold temperatures. *Blood.* 40 : 688, 1972.

39. Lages B, Scrutton C M, Holmsen H, Day H J and Weiss J H : Metal ion contents of gel-filtreted platelets from patient with storage pool disease. *Blood*. 46 : 119, 1975.
40. Markosjan A A : Die physiologische bedeutung der thrombocyten. *Folia Haematologica* 79 : 1, 1962.
41. Marcus A J, Safrer L B, Ulmann H L : Present concepts of the platelet plasma membrane. *The platelets*. Ed. by K M Brinkhous. The Williams and Wilkins Co. 116, 1971.
42. Maupin B : Blood platelets in man and animals. Vol : I, Pergamon Press (first edition). 110, 1969.
43. Mustard J F, Packman M A : Thromboembolism. *Circulation*, 42 : 1, 1970.
44. Mustard J F : Atherosclerosis, thrombosis and clinical complications. *Thromboembolis. A new approach to therapy*. Ed. by J R Mitchell and J G Domenet. Academic Press London, New York, San Fransisco, 3, 1977.
45. Najean Y, Larrieu M J and Bernard J : Survie des plaquettes marquees du radiochrome. Etude de 104 observations. *Nouv. Rev. Franc. Hemat.* I : 36, 1961.
46. Nurden A T, Cean J P : The different glycoprotein abnormalities in thrombasthenic and Bernard-Soulier platelets. *Seminars in Hematology*. 16 : 234, 1979.
47. Pareti I F and Capitinio A : Platelets biochemistry and metabolism. *Platelets*. Ed. by Giovanni de Gaetano and Silvio Garattini. Raven Press. 35, 1977.

48. Peters S W, Jacobs A and Fitzsimons E : Erythrocyte ferritin in normal subjects and patients with abnormal iron metabolism. Brit. J. Haemat. 53 : 211, 1983.
49. Rebuck J W, Boyd C B, Monto R W : Morphologic evaluation of megakaryocytes. The Platelets. Ed. by Bronkhou. The Williams and Wilkins Co. 26, 1971.
50. Rosenthal R L, Vyas S B : Morphological studies on the mechanism of viscous metamorphosis of blood platelets. Blood platelets. Brown-Little and Co. Boston. Mass. 89, 1961.
51. Salzman E W : Platelets, prostaglandins and nucleotides. Platelets : A Multidisciplinary Approach Ed. by G. de Gaetano and S. Garattini. Raven Press, New York, 227, 1978.
52. Schimmelbusch G : Die blutplattchem und die blutgerrinnung wirchows. Arch. J. Path. Anat. 101 : 201, 1885.
53. Sharp A A : Viscous metamorphosis of blood platelets. A study of the relationship to coagulation factors and fibrin formation. Brit. J. Haemat. 4 : 28, 1958.
54. Sharp A A : Platelet viscous metamorphosis. Blood platelets. Brown and Little Co. Boston. Mass. 67, 1961.
55. Smith J B, Ingerman C M, Silver J M : Prostaglandins and precursors in platelet function. Biochemistry and pharmacology of platelets. (Ciba Foundation Symposium 35 new series), 207, 1975.
56. Summers M, Worwood M and Jacobs A : Ferritin in normal erythrocytes, lymphocytes, polymorphs, and monocytes. Brit. J. Haemat. 28 : 19, 1974.
57. Suzuki H, Tanoue K, Yamazaki H : Endocytosis by platelets during cationized ferritin - induced aggregation. Cell Tissue Research. 240 : 513, 1985.



58. Thiery J P and Basis M : Mecanisme de la plaquettogenese : Etude in vitro par la microcinematographie. Rev. Hemat. II : 162, 1956.
59. Turpie A G G, McNicol G P and Douglas A S : Platelets. Haemostasis and Thrombosis. Recent Advances in Haematology. Ed. by A. Goldberg and M. C. Brain Longman Group Limited. 249, 1971.
60. Ulutin O N, Karaca M : Trombositlerin TGT ile tetkiki ve bu hususta yeni müşahadeler. Türk Tıp Cem. Mec. 22, 473, 1956.
61. Ulutin O N, Karaca M : A new way of considering the pathogenesis and investigation about the platelet defect in cases of thrombopathia. Forum Medicum (İstanbul). 2 : 257, 1956.
62. Ulutin O N, Karaca M : Trombosit osmotik rezistans test. Türk Tıp Cem. Mec. 23, 64, 1957.
63. Ulutin O N, Karaca M, İnceman S, Tanındı Ş : Normal ve patolojik durumlarda trombosit "release" mekanizması. Simpozyum. Türk Hematoloji Cemiyeti VI. Kongresi, 1-3 Nisan, İstanbul, 3, 1971.
64. Ulutin O N : Qualitative platelet disorders. Classification and pathogenesis. Annals New York Academy of Sciences, 201: 174, 1972.
65. Ulutin O N : Notes on early history of the platelets. The platelets. Printed in Istanbul, Turkey by Kağıt ve Basım İşleri A.Ş., 1, 1976.
66. Vazquez J J, Lewis J H : Immunocytochemical studies on platelets. The demonstration of a common antigen in human platelets and megakaryocytes. Blood. 16 : 968, 1960.
67. Vermynen J : Physiology of haemostasis. Platelets : A multidisciplinary Approach. Ed. by G.de Gaetano and S.Garattini. Raven Press, New York, 4, 1978.

68. Von Creweld S, Pascha C N : Influence of the prostaglandin E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub> on aggregation of blood platelets. Nature, 218 : 361, 1968.
69. Wallach D F : Ca-Lipid complex in human platelets. Blood. 13 : 598, 1958.
70. Weiss H J : Platelet aggregation, adhesion and adenosine diphosphate release in thrombopathia. (Platelet factor-3 deficiency). Amer. J. Med. 43 : 570, 1967.
71. White G, Sumnurs M, Jacobs A : Ferritin synthesis in normal monocytes, lymphocytes and polymorphs. Brit.J.Haemat. 30:126,1975.
72. Wintrobe M M : Clinical Hematology (7.Ed). 372, 451, 1975.
73. Worwood M, Summers M, Miller F, Jacobs A and Whittaker J A : Ferritin in blood cells from normal subjects and patients with Leukaemia. Brit. J. Haematol. 28 : 27, 1974.
74. Zahavi J : Acquired "storage pool" disease of platelets. Thrombos. Haemostas (Stuttg). 35 : 501, 1976.