

9263

T.C.  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Fizyoloji Anabilim Dalı

VİTAMİN B6'NİN TROMBOSİT AGREGASYONUNA  
ETKİSİ

Arş.Gör.Mehmet AYBAK

YÖNETİCİ  
Yrd. Doç. Dr. Abdurrahman ŞERMET

Yüksek Lisans Tezi

Diyarbakır-1990

T. C.  
Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi

## İÇİNDEKİLER

- Giriş.....	1-3
- Genel Bilgiler.....	4-29
- Materyal ve Metod.....	30-40
- Bulgular.....	41-57
- Tartışma.....	58-61
- Özet.....	62-63
- Kaynaklar.....	64-71

## TEŐEKKÜR

Dicle Üniversitesi Tıp Fakóltesi Fizyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimim süresince devamlı yardım, ilgi ve alakasını esirgemiyen Anabilim Dalı Başkanımız Deęerli Hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Orhan DENLİ'ye, tezimin hazırlanmasında gerekli ilgi, tenkid ve tavsiyeleriyle bana yardımcı olan Rehber Hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Abdurrahman ŞERMET'e Őükranlarımı arz ederim.

Tezimin yazılmasında büyük emeği geçen Sayın İsmail YILDIZ'a ve Anabilim Dalımızdaki bütün arkadaşlarıma teőekkürlerimi sunarım.

Mehmet AYBAK

## GİRİŞ

Lipid, karbohidrat ve protein metabolizmasında görevli en azından elli enzimin aktivitesi için vitamin B6'ya ihtiyaç vardır. (65). Vitamin B6 ayrıca hemoglobin ve pek çok nörotransmitterin biyosentezinde ko-enzim olarak görev yapar(43). KO-enzim olarak biyolojik aktivite gösterebilmesi için pyridoxal 5-phosphate şekline dönüştürülür(22).

Son yıllarda pyridoxal phosphatın ko-enzim dışında başka fonksiyonlarının bulunduğu belirtildi(65). Yapısında bulunan reaksiyoner aldehit gurubu ile bir kısım proteinlerin ve enzimlerin aktivitesini değiştirdiği, yapılan deneysel çalışmalarla ispatlandı(22).

Hücre membranında bulunan enzimlerin, proteinlerin ve reseptörlerin aktivitesini etkileyebileceği, böylece hücrenin fonksiyonlarını değiştirebileceği düşüncesi çeşitli araştırmalara konu olmuştur. Bir kısım amino asitlerin ve elektrolitlerin hücre membranından transportunu arttırdığı gösterildi(1 ). Bu özelliklere sahip olan vitamin B6 trombosit fonksiyonunu değiştirebilir mi? Vitamin B6 eksikliği bulunan maymunlarda trombozis ve aterosklerotik lezyonların bulunduğu Rinehart ve Greenberg tarafından yapılan deneysel çalışmalarla tesbit edildi(61). Cully ve Wilson yüksek dozda metionin ve homosisteinin yol açtığı öldürücü trombozis ve pulmoner

embolinin vitamin B6 tedavisi ile önlenemediğini gösterdiler(48). Subbaro ve arkadaşları yaptıkları in vitro çalışmada pyridoxal fosfatın ADP, Trombin ve Epinefrin gibi agonistlere karşı sekonder agregasyonu inhibe ettiğini, kanın koagülasyon zamanını anlamlı olarak uzattığını buldular(67).

Vitamin B6 eksikliğinde plazma kolesterolünün özellikle LDL-Kolesterol düzeyinin arttığı gösterilmiştir(30,3 ). Vitamin B6 uygulaması ile plazma total kolesterol düzeyinin azaldığı, HDL-Kolesterol miktarının arttığı ayrıca ispatlanmış bulunmaktadır(67,46) Plazma total kolesterolü yüksek, HDL-Kolesterol düzeyi düşük olan kişilerde trombosit membranında kolesterol miktarının arttığı, agreganlara karşı trombositlerin daha duyarlı olduğu bilinmektedir(16). Vitamin B6'nın plazma total kolesterol düzeyini azaltıcı, HDL-Kolesterol düzeyini yükseltici etkisi dikkate alındığında dolaylı olarak trombosit agregasyonunu inhibe edebileceği düşüncesi ortaya çıkar. Ancak bunu direkt olarak gösteren bir deneysel çalışma literatürde mevcut değildir.

Trombosit agregasyonunu etkileyen bir başka faktör de plazma çinkosudur(.15). Çinkonun biyolojik membranları stabilize edici etkisi pek çok çalışma ile gösterilmiştir( 9,7,8 ). Trombosit agregasyonunu inhibe edici etkisi Chvapil ve arkadaşlarının çalışmaları ile ispatlanmıştır( 14). Son yıllarda vitamin B6'nın çinko metabolizmasını etkilediği konusunda araştırmalar yapılmaktadır. Ancak bu konudaki çalışmaların sonuçları çelişkilidir. Bir kısım bilim adamlarına göre vitamin B6 plazma çinkosunu arttırmaktadır( 57,21). Çelişkili olmakla birlikte vitamin B6'nın plazma çinkosunu etkilediği göz önüne alınacak olursa dolaylı olarak trombosit agregasyonunu değiştireceği anlaşılır.

Literatür taramasından edindiğimiz bilgilere göre bunu da doğrudan gösteren herhangi bir araştırma yapılmamıştır. Bununla birlikte vitamin B6'nın trombosit agregasyonuna etkisi konusunda yapılmış olan çalışmaların sonuçları çelişkilidir. Bazı araştırmacılara göre farmakolojik dozda vitamin B6 uygulaması plazma pyridoxal phosphat düzeyini yükselttiği halde trombositlerin kollojene karşı agregasyon cevabını etkilememektedir(64 ).

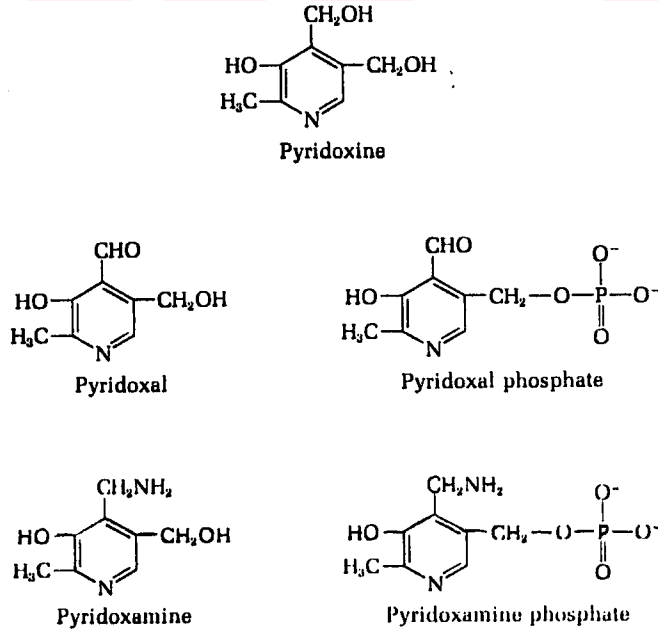
Vitamin B6 trombosit agregasyonunda fizyolojik bir inhibitör olabilir mi? Literatür bilgilerinin çelişkili olması bu soruya cevap vermeyi güçleştirmektedir. Sorunun çözümlenmesine katkıda bulunmak amacıyla bu çalışmayı gerçekleştirmiş bulunuyoruz. Çalışmamızın sonuçlarına göre vitamin B6'nın trombosit agregasyonunda azaltıcı etkiye sahip olduğu özellikle agregasyonun sekonder fazını inhibe ettiği, bu etkisini doğrudan ve dolaylı olarak gösterdiği, direkt etkisinin trombosit membranında agonistlere özgü reseptörleri bloke ederek, dolaylı etkisini ise plazma çinkosu ile kolesterol düzeylerini değiştirerek gösterdiği kanısına varıldı.

## GENEL BİLGİLER

### VİTAMİN B6

Vitamin B6 suda eriyen bir vitamin olup sıcaklığa ve asitlere karşı oldukça dayanıklı bir yapısı vardır. Alkali ortama ve ışığa duyarlıdır. Yiyeceklerdeki vitamin B6 içeriğinin %70'i pişirme, arıtma v.s. gibi işlemler sırasında kaybedilir(65). Yetişkin bir insanın günlük ihtiyacı 2 mg kadardır. Vücudun vitamin B6'ya ihtiyacı protein alımı ile doğrudan orantılıdır( 5).

Varlığı 1938 yılında açıklığa kavuşan vitamin B6 besinlerde farklı oranlarda üç değişik formda bulunur(49). Pyridoxine, pyridoxamine ve pyridoxal olarak alınan vitamin B6'nın intestinal emilimden sonra çoğu karaciğere taşınmakta ve kolaylaştırılmış difüzyonla karaciğer hücresine alınmaktadır. Burada pyridoxal kinase tarafından fosforile edilerek pyridoxal, pyridoxine ve pyridoxamine fosfat oluşturulur(12). Son iki bileşik, flavine bağımlı bir oksidaz tarafından pyridoxal 5-phosphat'a çevrilerek biyolojik aktivite kazanır(38).



Şekil 1: Vitamin B6'nın Çeşitli Biyokimyasal Formları.

Pyridoxal phosphate karaciğer hücresinde, hücre için gerekli enzimleri oluşturmak üzere apoenzimler tarafından bağlanmakta veya plazmaya verilmektedir. Plazmada albümin ile güçlü bir kompleks oluşturarak dokulara taşınmaktadır(77). Alkalen fosfataz ile hidrolizden sonra, serbest pyridoxal hücreler tarafından alınmakta ve burada tekrar fosforile edilmektedir(49,38).

pyridoxal aynı zamanda karaciğer ve böbrekte pyridoxal dehidrogenaz tarafından pyridoxic aside oksitlenerek inaktive edilir(22).

#### Biyokimyasal Fonksiyonları

Vitamin B6 lipid, karbohidrat ve protein metabolizmasında pek çok enzimatik reaksiyona ko-enzim olarak katılmaktadır(22). Porfirin sentezi için de gereklidir. Bir ko-faktör olarak  $\Delta$ -amino-levulinik asidin sentezinde işe karışır(36). Bir kısım nörotransmitterin biyosentezinde görev yapar(59). Son zamanlarda yeni fonksiyonları da belirlenmiş durumdadır(37,55). Pyridoxal phosphate, glikojen bağlarının koparılmasında rol oynayan fosforilaz enzim sisteminin bir bölümünü teşkil eder. Triptofan sentezi ve triptofanın niasine dönüşümü için de gereklidir(72). Linoleik asidin prostaglandinlerin ön maddesi olan araşidonik aside dönüşümünde ve sinir sisteminde miyelin oluşumu için sfingolipid sentezinde görev yapar(65).

#### Tablo I: Pyridoxal Phosphatın Katıldığı Bir Kısım Biyokimyasal Reaksiyonlar

A- Amino Asit Metabolizmasında:

- 1- Transaminasyon
- 2- Deaminasyon



- 3- Desülfürasyon
- 4- Dekarboxilasyon
- 5- Racemization
- 6- Bağlama
- 7- Sentez
- B- Porfirin Sentezi
- C- Niasin Sentezi
- D- Glikojenoliz
- E- Araşidonik Asit Sentezi
- F- Sifingolipid Sentezi
- G- Nörotransmitter Sentezi (Dopamin, GABA, Norepinefrin, Seroto.)

#### Hastalıklarla İlişkisi

Bazı doğuştan metabolizma bozuklukları B vitaminleri ile tedavisi düzeltilmektedir. Bu hastalıklar vitamin eksikliğinden ziyade enzim eksikliği veya enzim aktivitesindeki eksikliğe bağlı olarak ortaya çıkar(65). Söz konusu hastalıklarda enzim ile ilişkili ko-enzimin verilmesi metabolik problemi kısmen veya tamamen ortadan kaldırır. Olumlu cevap alınabilmesi için genellikle vitamin yüksek dozda uygulanır. Tablo II'de vitamin B6 ile tedavi edilebilen hastalıklar gösterilmiştir.

Tablo II: Vitamin B6'ya Cevap Veren Hastalıklar

<u>Hastalık</u>	<u>Sorumlu Enzim</u>
Homocystinuria	Cystathionine B-synthase
Cystathioninuria	$\gamma$ -Cystathionase
Xanthurenic aciduria	Kynureninase
Infantile Convulsions	Glutamate Decarboxylase
Hyperoxaluria	D-Glyceric dehidrogenase
	Glyoxylate: $\alpha$ -ketoglutarate carboligase

Retina ve Choroid  
atrophy

Ornithine ketoacid  
amino transferase

Erişkin insanlarda vitamin B6 eksikliği Seborrheic dermatitis, mide bulantısı, kusma, depresyon, peripheral neuritis, oksalat metabolizmasında bozukluklar, immün cevapların baskılanması, anemi ve mukozal membranlarda lezyonlara yol açar(65). Söz konusu durumlar vitamin B6 eksikliği oluşturulan sıçanlarda görülmekle birlikte karaciğer yağlanması, büyüme geriliği, zayıflama ve mental yetersizlik de tabloya eklenir(69).

İnsanlarda vitamin B6 eksikliği çok nadir görülür. Bununla birlikte ilaç olarak vitamin B6 antagonistlerini kullananlarda, özellikle östrojen muhtevası progesterondan fazla olan oral kotraseptiv drogları alan bayanlarda, hamilelerde, süt veren annelerde ve alkolik kişilerde vitamin B6 eksikliği tanımlanmıştır(56).

Tablo III: Vitamin B6 Antagonistleri

<u>Drog</u>	<u>Referans</u>
İzoniazid	90(17)
Hydralazine	90(17)
Penicillamine	91(33)
Cycloserine	51(65)
Deoxypyridoxine	51(65)
L-Dopa	51(65)

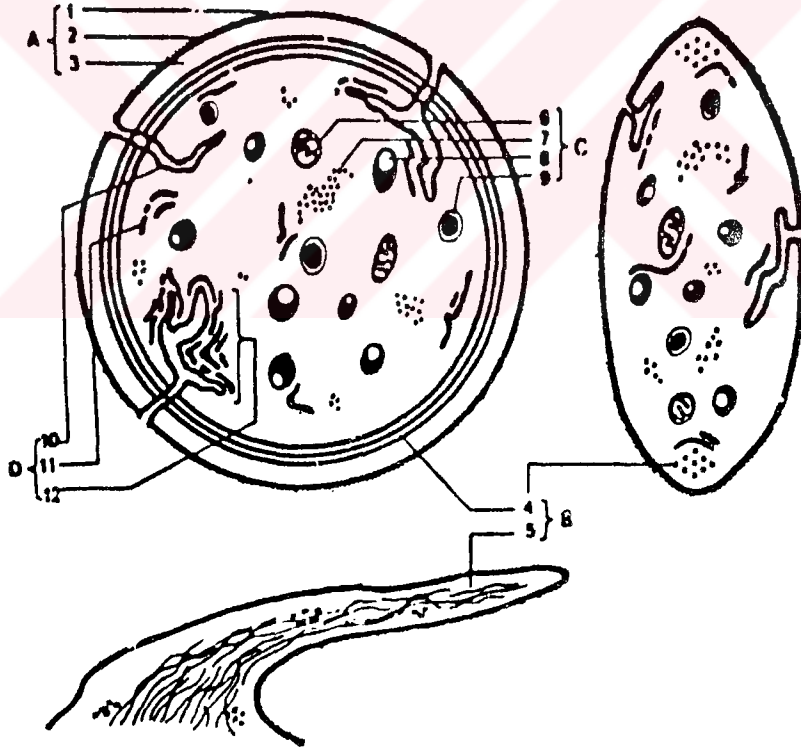
İntra ve extrahepatik safra yollarının tıkanıdığı durumlarda, karaciğer sirozunda, kronik böbrek yetmezliğinde, orak hücre anemisinde plazma pyridoxal fosphat düzeyi düşük bulunmuştur(49).

Deneysel vitamin B6 eksikliğinde plazma total kolesterol düzeyinin önemli ölçüde yükseldiği ve aterosklerotik lezyonların geliştiği gösterilmiştir(30,3 ). En son araştırmalara göre plazma pyridoxal phosphat düzeyinin miyokard infarktüsü için plazma kolesterolü ve HDL-kolesterolünden daha duyarlı bir risk indikatörü olabileceği ileri sürülmektedir(49).



## TROMBOSİTLERİN FONKSİYONEL MORFOLOJİSİ

Trombositler 3-5 mikron çapında, 0,5-1,0 mikron kalınlığında oval veya mekik biçiminde hücrelerdir. Nükleusları yoktur, çok yoğun salgı granülleri içerirler(42,34). Ekvatoryal düzlemde geçen enine kesitlerinde salgı granülleri ile çevrilmiş marjinal mikrotübül elementleri, birkaç küçük mitokondri, yoğun tübüler sistem olarak bilinen internal membran sistemi elektron mikroskopunda görülebilir. Bununla birlikte trombositin iç kısmından yüzeye açılan belirgin bir açık kanaliküler sistemi vardır(31). Trombosit aktive olunca salgı granülleri açık kanaliküler sisteme boşaltılır.



Şekil 2 : Aktive olmamış trombositin vertikal ve horizontal planda kesitleri ile pseudopod yapısı. I : A) Periferik zon; 1. glycocalyx, 2. triküminer ünite membran, 3. submembran alan. B) sol-gen zon; 4. mikrotübül, 5. mikrofilament. C) organel zon 6. mitokondriya, 7. glikojen, 8. alfa granül, 9. dense bodi. D) Membran sistemi; 10. kanaliküler sistem, 11. dense tubuler sistem, 12. membran kompleksi.

Trombosit yüzeyinde trombositleri stimüle eden agonistlerin bağlandığı bol miktarda spesifik reseptörler vardır. Ayrıca fibri- nojen, faktör Va, faktör Xa gibi koagülasyon faktörlerinin bağlan- dığı cryptic reseptörler de bulunur(31). Bunlar agregasyonda gö- revli yapıştırıcı proteinler için bağlanma bölgesi olarak görev yaparlar(47).

Trombositin yapısını dört ana bölgeye ayırarak incelemek mümkündür(29): 1-Periferel Zon, 2- Sol-gel Zon, 3- Organel Zon ve 4- İnternal Membran Zon.

#### 1- Periferel Zon

Bu bölge üç tabakadan meydana gelmiştir(29). En dışta gliko- proteinden zengin glikokalix tabakası yer alır. Adezyon ve agre- gasyon reaksiyonları için trombositleri aktive eden substratlara mahsus reseptörler bu tabakada yer alır. Elliden fazla glikoprote- inin bulunduğu ispatlanmıştır(60). Bu glikoproteinler moleküler a- ğırlıklarına göre beş guruba ayrılabilir(29):

I: Moleküler ağırlığı 135.000'den büyük

II: Moleküler ağırlığı 115.000-134.000

III: Moleküler ağırlığı 100.000-115.000

IV: Moleküler ağırlığı 90.000-100.000

V: Moleküler ağırlığı 90.000'den küçük

Alt guruplar a,b,c gibi harflerle gösterilir. Ib, IIb, III ve V trombosit membranında en çok bulunan glikoproteinlerdir. Ib, IIb ve III'ün trombosit fonksiyonunda özel rolleri vardır(6). Gliko- protein Ib membranın dış tabakasına yerleşmiştir ve bol miktarda sialik asit içerir. Membrana negatif yük kazandırarak uyarılmamış trombositlerin kümeleşmesini önler. Bununla birlikte bu glikopro- tein trombositlerin subendotelyuma yapışmasında von Willebrand faktör için reseptör görevi yapar(50). Glikoprotein IIb ve III transmembran proteinleri olup aktin filamentlerine bağlanırlar.

Trombosit agregasyonunda fibrinojen gibi yapıştırıcı proteinler için reseptör görevi yaparlar( 29).

Periferal zonun orta kısmını iki katlı fosfolipid tabakasından oluşan hücre membranı teşkil eder(63). Dış ve iç tabakadaki fosfolipid molekülleri asimetrik bir şekilde dağılmışlardır. Fosfatidiletanolamin her iki yüzeyde hemen hemen eşit miktarda olduğu halde sfingomiyelin daha çok dış tabakada, fosfatidilserin ve fosfatidilinozitol daha çok iç tabakada yer alır (29,63).



Şekil 3: Trombosit Membran Glikoproteinleri.

Periferal bölgenin iç kısmı hücre membranı ile dairesel mikrotübül band arasında yer alır. Submembran filamentlerini içerir. Trombositlerin şeklini korumada ve psödopod oluşturulmasında rol oynar(25).

### 2- Sol-Gel Zon

Bu bölge stoplazma matrixinden yapılmıştır. Mikrotübül, mikrofilament ve submembran filamentlerini oluşturan proteinleri içerir(51).

Mikrotübüller uyarılmamış trombositlerde hücre membranının hemen altında ekvatoryal düzlemde dairesel biçimde yerleşmiş 8 ila 24 sirküler bantdan oluşur(31). Her bir mikrotübül tübülün moleküllerinden yapılmış 12 ila 15 filamentin bir araya gelmesiyle oluşur. Çapı yaklaşık 25 nm kadardır. Mikrotübüller trombositlerin disk biçimini korumada ve internal kontraksiyonda görev yaparlar(23).

Mikrofilamentler yaklaşık 10 Å kalınlığındadır ve diğer hücrelerdeki aktin filamentlerine benzerler. İnternal kasılma ve psödopod oluşumundan sorumlu olan bu kontraktıl filamentlerde aktin/miyozin oranı 100/1'dir(29).

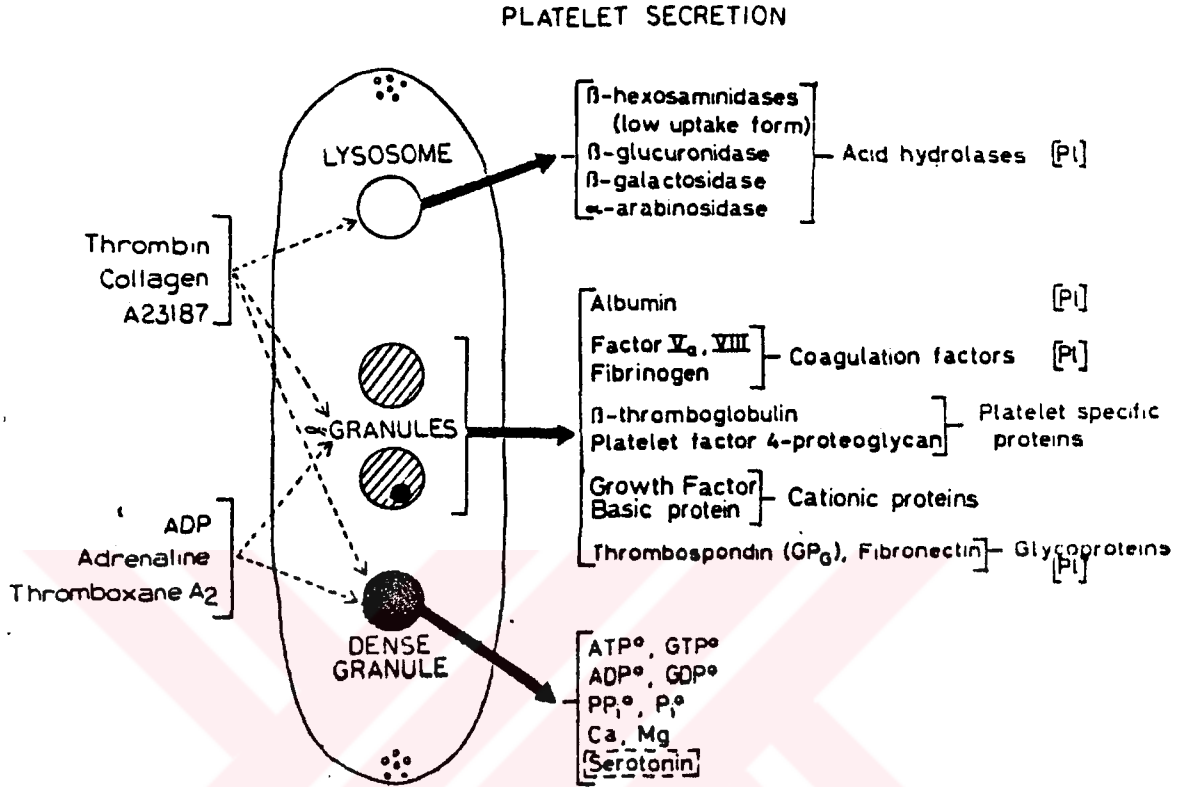
Submembran filamentleri hücre membranı ile dairesel mikrotübül bandı arasında yer alırlar. Mikrotübüller ile birlikte trombosit şeklinin korunması ve psödopod formasyonunu sağlarlar(31).

### 3- Organel Zon

Trombosit organelleri trombosit fonksiyonlarında önemli görevleri olan maddeleri depo eder ve salgırlar. Endoplazmik retikulum ve Golgi apareyi kalıntılarında çeşitli enzimlerin sentezi yapılır ve bol miktarda kalsiyum depo edilir(28). Organel olarak lizozomlara ve küçük mitokondrilere de sahiptirler.

Salgı maddeleri içeren yoğun cisimciklerde ATP, ADP, serotonin ve kalsiyum bulunur.

Şekil 4: Trombositlerdeki Depo Granüllerinin Tipleri ve Muhtevaları.



Elektron mikrograflarında yoğun olan bu granüllerde bol miktarda kalsiyum ve fosfat iyonlarının varlığı gösterilmiştir(29). Salgı proteinlerinin depolandığı cisimcikler  $\alpha$ -granüller olarak bilinir(31;29). Bu granüller fibrinojen, faktör V, faktör VIII:R gibi bir kısım koagülasyon faktörlerini, fonksiyonları yeterince bilinmeyen trombosit faktör 4 ve  $\beta$  Tromboglobulin gibi spesifik proteinleri, katyonik proteinler olarak mitojenik faktör, permeabilite faktörü, kemotaktik faktör, bakterisidal faktör, agregasyonda yapıştırıcı fonksiyonu olan glikoprotein tabiatında trombospondin, fibronektin ve vitronektin içerir(58).

Lizozomlar bir çok asit hidrolazları ihtiva eder. Trombositler yüksek konsantrasyonda kollojen veya trombin gibi kuvvetli stimuluslarla uyarıldığında bu parçalayıcı enzimler extraselüler ortama geçer(70).



#### 4- İnternal Membran Zon

Trombositler iki internal membran sistemine sahiptirler:

1- Yoğun tübüler sistem, 2- Açık kanaliküler sistem. Yoğun tübüler sistem kasılma olaylarının başlamasında önemli olan kalsiyumu sağladığı gibi içerdiği enzimlerle prostaglandin sentezinde de görev yapar(25,31,29). Hücrenin membranına bağlanan açık kanaliküler sistem plazmaya taşınacak maddeler için giriş yolunu oluşturmaktadır. Ayrıca salgılanacak maddeler için de bir çıkış kapısı gibidir(29). Açık kanaliküler sistem yoğun kanaliküler sistemin elementleri ile birlikte kas hücrelerindeki transver tübül ve sarkoplazmik retikulum denilen özel membran komplekslerini oluştururlar(71).

#### Trombopoiezis

Trombositlerin kandaki normal konsantrasyonu  $1mm^3$ 'te 150.000 ila 350.000 arasında değişebilir. Trombositler kemik iliğinde, hemopoietik serinin çok geniş hücreleri olan ve kemik iliğini terkedip dolaşıma giremeyen megakaryositlerden oluşurlar(28).

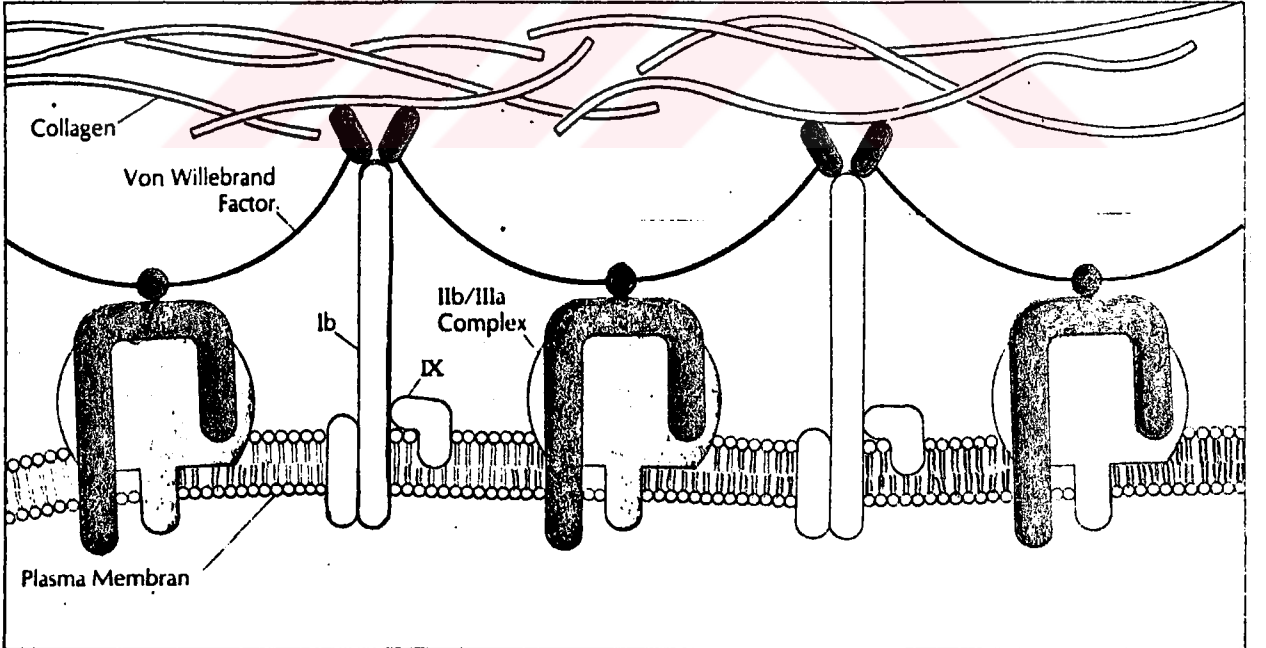
Trombosit yapımının düzenlenmesinde trombopoietin veya benzeri bir faktörün etkili olduğu ileri sürülmüştür. Trombopenik yapılan hayvanların serumu normal hayvanlara verilmesi trombosit sayısında artışa yol açmıştır. Trombopoietin ayrıntılı olarak tam incelenmiş değildir. Bu humoral faktörün trombosit sayısından ziyade trombosit kitlesini regüle ettiği iddia edilmektedir(27).

Dalağın çıkarılması dolaşımdaki trombosit sayısında artışa yol açar. Böylece trombosit sayısının düzenlenmesinde görevli bir organ olduğu anlaşılmıştır(29).

### TROMBOSİTLERİN FİZYOLOJİK FONKSİYONLARI

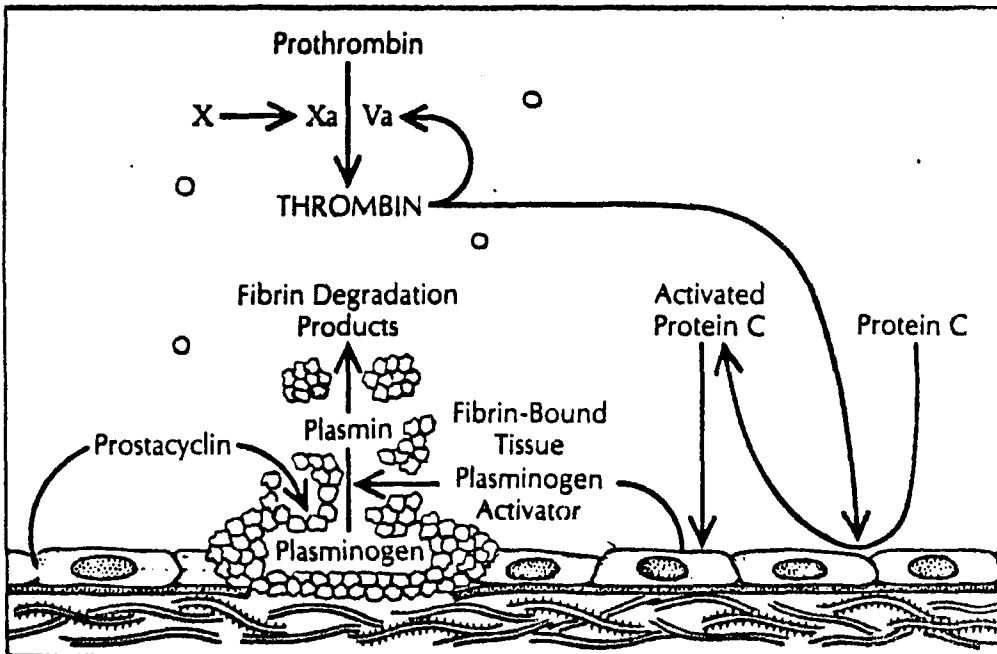
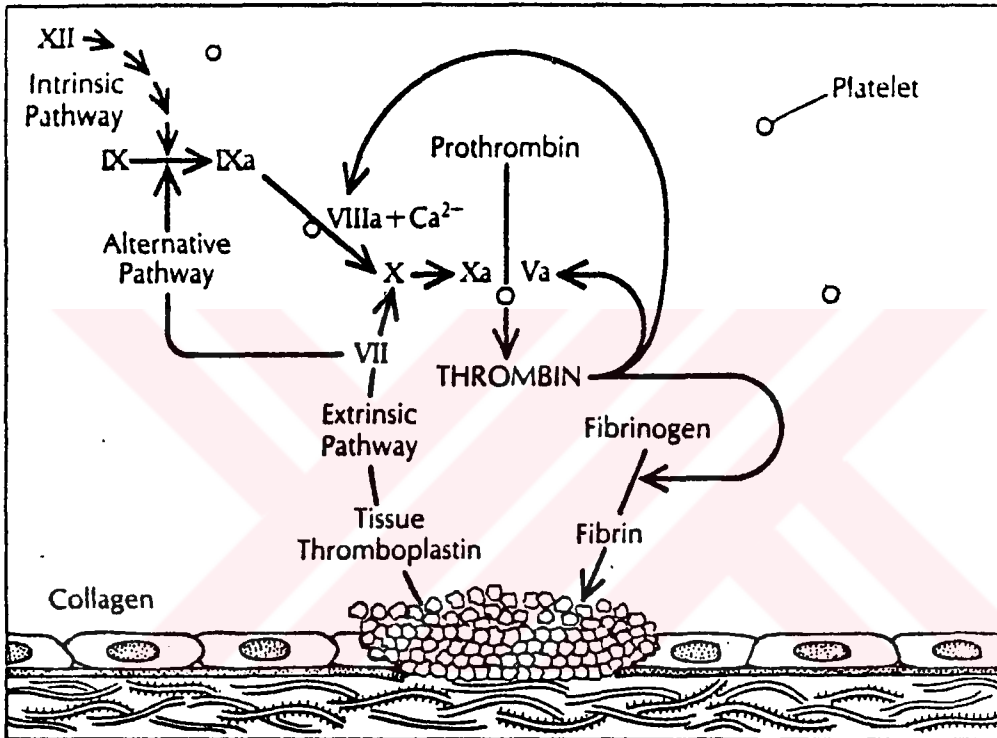
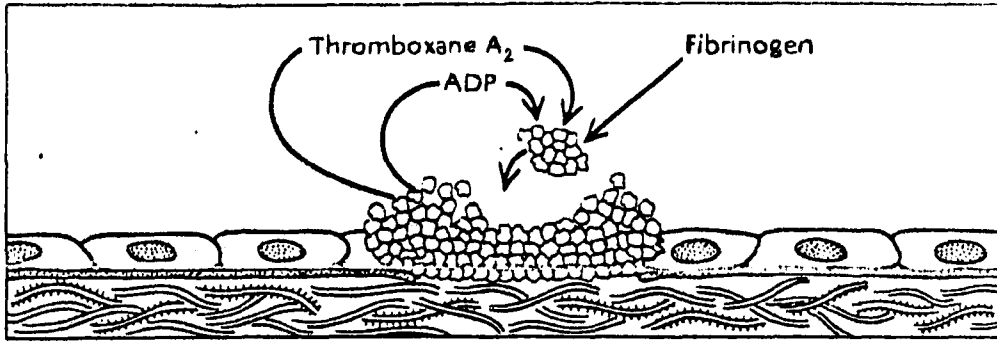
Trombositlerin başlıca fonksiyonu kanamanın durdurulmasında hemostatik tıkaçı oluşturmak ve kanın koagülasyonuna katılmaktadır(25,29,31). Hemostatik plak formasyonu; trombositlerin subendotelyuma yapışması(adezyon), agregasyon, sekresyon, tromboxan sentezi ve pıhtının retraksiyonu olaylarını kapsar(Şekil 6,7,8,9).

Adezyon: Trombositler subendotelyumun fibril biçimindeki yapılarına ve kollojene yapışma kabiliyetine sahiptirler. Elips şeklindeki trombositler aktive olunca küresel şekle dönüşürler ve çok hızlı bir şekilde psödopodlar çıkarırlar(25,66). Bu değişim 5 saniyeden daha az bir süre içinde gerçekleşir. Şekil değişikliği ekstraselüler kalsiyuma ve fibrinojene bağlı değildir. Trombosit aktivasyonunun bu erken fazında aktin polimerizasyonu ve marginal mikrotübüllerin parçalanması söz konusudur(31). Şekil değişikliğinin önemi yeterince bilinmiyor.



Şekil 5: Zedelenmiş Damar Endoteline Trombositin Adezyonu.

Şekil 6: Hemolitik Plak Formasyonu.



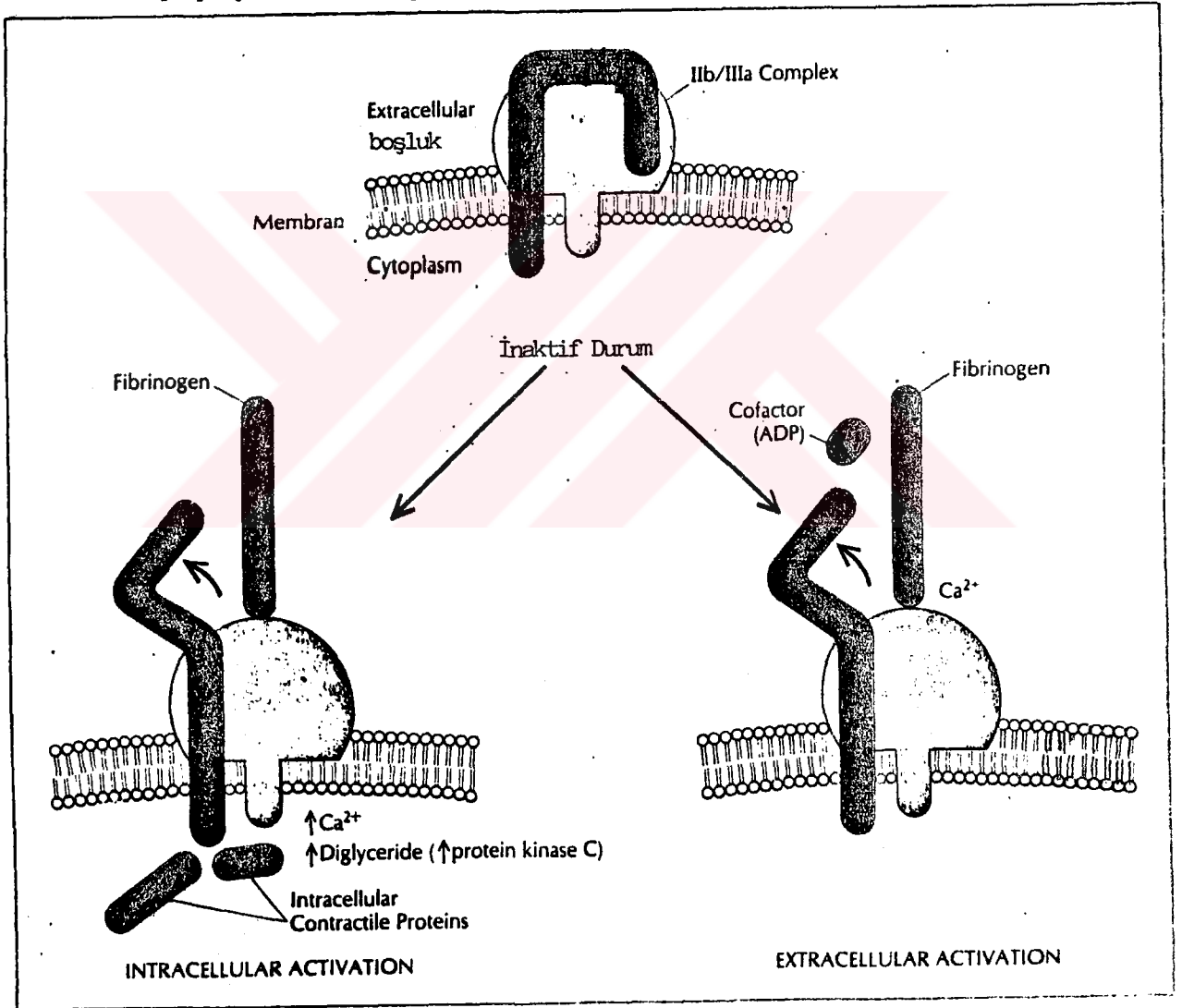
Trombosit adezyonu için von Willebrand faktörün bulunması zorunludur. Trombosit membranında bulunan Ib ve IIb / IIIa glikoprotein kompleksi von Willebrand faktörü için reseptör görevi yaparlar(Şekil 5). Şekilde görüldüğü gibi von Willebrand faktörü bir taraftan trombosit membranındaki reseptörlerine diğer taraftan kollajene tutunarak trombositlerin subendotelyuma yapışmalarını sağlar. Trombosit sayısı, eritrosit sayısı ve kanın viskozitesi adezyonu etkiler(68).

Agregasyon: Trombosit agregasyonu çok kompleks bir olaydır. İn vitro çalışmalar agregasyonun iki çeşit olduğunu göstermiştir: 1- Primer agregasyon, 2- Sekonder agregasyon. Primer agregasyon sekresyon reaksiyonu olmadan görülür ve reversibl bir olaydır. Sekonder agregasyon ise irreversibl olup sekresyonla birlikte gerçekleşir(45).

Trombositler subendotelyuma temas edince veya başka agonistler tarafından uyarıldığında yoğun granüllerden ADP salgılanmaya başlar. ADP uyarılmamış trombositlerin membranında kendine mahsus reseptöre bağlanır. ADP ile yeterince uyarılmış olan trombositlerin  $\alpha$ -granüllerinden yapıştırıcı proteinler salgılanır. Aynı anda trombosit membranından araşidonik asit serbestlenmesi hızlanır. Araşidonik asitten siklooksijenaz ve tromboxan sentetaz enzimlerinin vasıtası ile Tromboxan  $A_2$  oluşturulur. Tromboxan  $A_2$  ve ADP sinerjetik olarak dolaşımdaki trombositlerin damar hasarının olduğu bölgede toplanmasına yol açarak agregasyonu başlatmış olurlar(25,29,31).

Trombositlerden salgılanan yapıştırıcı proteinler agregasyonda(trombositleri birbirine yapıştırmada) görev yaparlar. Bunların bir kısmı plazmada hazır olarak bulunmaktadır(31). Fibrinojen, von Willebrand faktör, fibronektin ve vitronektin denilen ya-

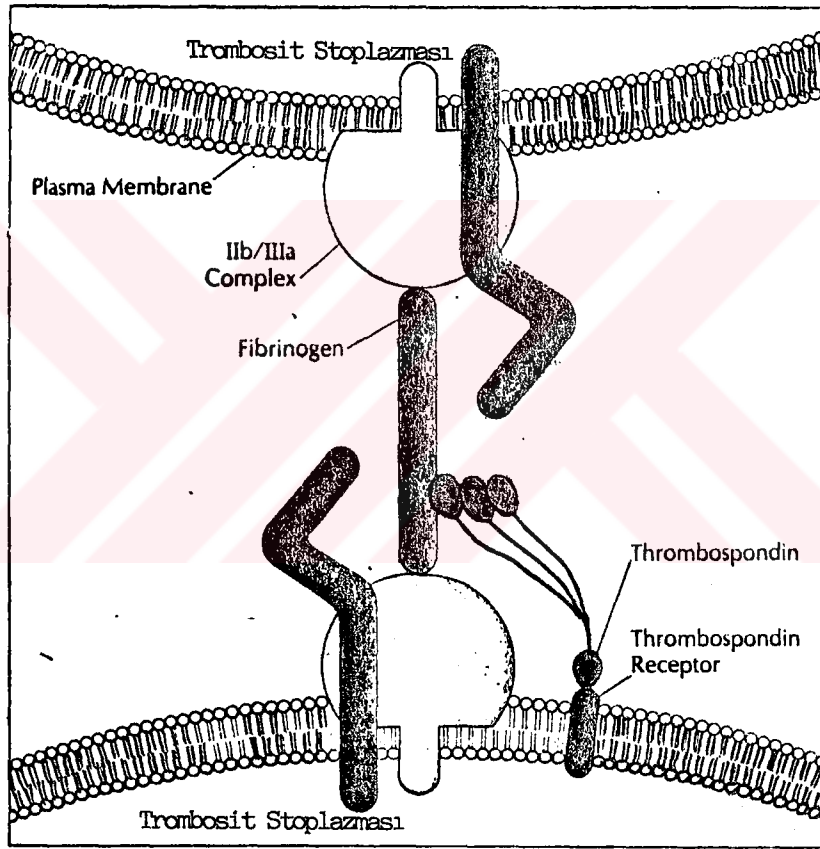
piştırıcı proteinler için trombosit membranında bulunan glikoprotein IIB/IIIa kompleksi reseptör görevi yapar<sup>(25)</sup>. Dinlenme halindeki trombositlerde yapıştırıcı proteinlerin bağlanacağı reseptör bölgesi kapalı durumdadır. Trombositler uyarıldığında reseptörün (glikoprotein IIB/IIIa kompleksi) bağlama veya tanıma bölgesi açılır(Şekil7 ). Şekilde de görüldüğü gibi yapıştırıcı protein(fibrinojen) açık olan bağlanma bölgelerine tutunarak trombositlerin birbirine yapışmasını sağlar<sup>(25)</sup>.



Şekil 7: İnaktif ve Aktif Durumdaki Trombositin Membranında Bulunan Fibrinojen Reseptörü IIB/IIIa Glikoproteininin Pozisyonu.

Glikoprotein IIb/IIIa kompleksinin eksikliği veya yapısının kusurlu olması kanama bozukluğuna yol açar. Bu durum klinikte Glanzmann's thrombosthenia olarak bilinir(31).

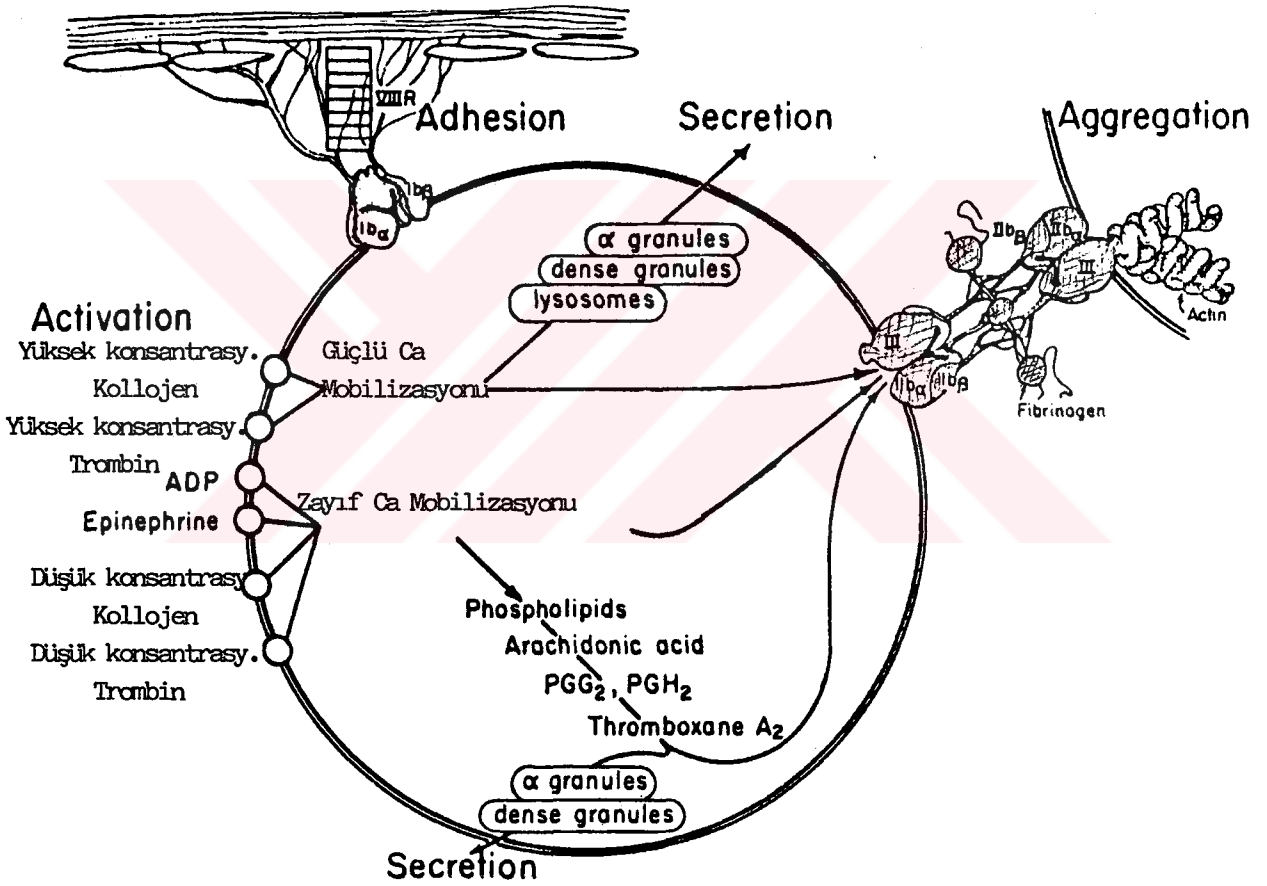
Trombospondin bir diğer yapıştırıcı protein olup 420.000 mol. ağırlığında bir glikoproteindir(25). İlk önce insan trombositlerinde bulunmuş daha sonra endotelial hücrelerde, fibroblastlarda ve düz kas hücrelerinde varlığı gösterilmiştir.



Şekil 8: Agregasyon Mekanizmasında Rol Alan İki Farklı Reseptör Modelinin Şematik Görünümü.

Yukarıdaki şekil 10'da görüldüğü gibi trombospondin molekülü, bir taraftan trombosit membranındaki reseptörüne diğer taraftan fibrinojene bağlanarak trombositler arasındaki fibrinojen köprülerini güçlendirir(25).

Trombositlerin uyarılması (agonistlerin spesifik membran reseptörlerine bağlanması) stoplazmada serbest  $Ca^{++}$  düzeyini arttırır (35). Kalsiyum mobilizasyonu denilen bu olay agonistlerin yapısına ve konsantrasyonuna bağlıdır. Kollajen ve trombin düşük konsantrasyonlarda zayıf, yüksek konsantrasyonlarda kuvvetli kalsiyum mobilizasyonuna yolaçarlar. Halbuki ADP ve epinefrin düşük ve yüksek konsantrasyonlarda aynı etkiyi gösterirler. Yani zayıf kalsiyum mobilizasyonuna neden olurlar (29).



Şekil 9: Normal Trombosit Cevaplarının Şematik Olarak Gösterilmesi.

Zayıf kalsiyum mobilizasyonunu sağlayanlara zayıf agonistler, kuvvetli kalsiyum mobilizasyonuna neden olanlara da kuvvetli agonistler denilir. Primer agregasyonu başlatan zayıf agonistler tromboxan  $A_2$  vasıtası ile sekonder agregasyonu da gerçekleştirebilirler (Şekil 9). Buna karşı kuvvetli agonistler doğrudan sekresyon



reaksiyonu oluşturarak sekonder agregasyona neden olurlar.

Primer agregasyon yolu aktive olunca aşağıdaki olaylar birbirini izler:

1- Şekil değişikliği, psödopod oluşumu, organellerin hücre merkezinde toplanmasını sağlamak için mikroflament ve mikrotübüllerin kasılması.

2- Yoğun granüller,  $\alpha$ -granüller ve lizozomların sekresyonu (salgılanacak maddelerin tabiatı agonistlerin yapısı ve konsantrasyonuna bağlıdır).

3- Ortamda trombin, kollajen, araşidonik asit gibi agonistlerin bulunması halinde oksijen alımı ve tromboxan sentezinin artması söz konusudur( 11,25 ).

ADP, kollojen, epinefrin ve trombin fizyolojik önemi olan agonistlerdir(25,29,31). ADP düşük konsantrasyonlarda(örneğin:0,5 $\mu$ M) primer trombosit agregasyonunu oluşturur. Trombosit membranında spesifik reseptörlere ADP bağlanınca şekil değişikliği meydana gelir ve fibronojen bağlanma bölgeleri(glikoprotein IIb/IIIa) açığa çıkar( 6). Fibrinojen bu reseptör bölgelerine bağlanır ve agregasyona neden olur. ADP konsantrasyonunun yüksek olduğu ortamda trombositler uyarılınca araşidonik asitten tromboxan sentezlenir. Tromboxan  $A_2$  yoğun granüllerin ve  $\alpha$ -granüllerin salgılanmasına neden olarak irreversibl sekonder agregasyonu sağlar(24). Kollajen düşük konsantrasyonlarda tromboxan  $A_2$  sentezi vasıtası ile  $\alpha$ -granüller, yoğun granüller ve lizozomlardan çeşitli maddeler salgılatarak trombosit agregasyonunu meydana getirir. Kollajen konsantrasyonunun yüksek olması, tromboxan sekresyonundan bağımsız bir mekanizma ile agregasyona neden olur(Şekil 9 ). Epinefrin düşük konsantrasyonlarda primer, yüksek konsantrasyonlarda tromboxan  $A_2$  vasıtası ile sekonder agregasyonu oluşturur. Bu özellikleri ile



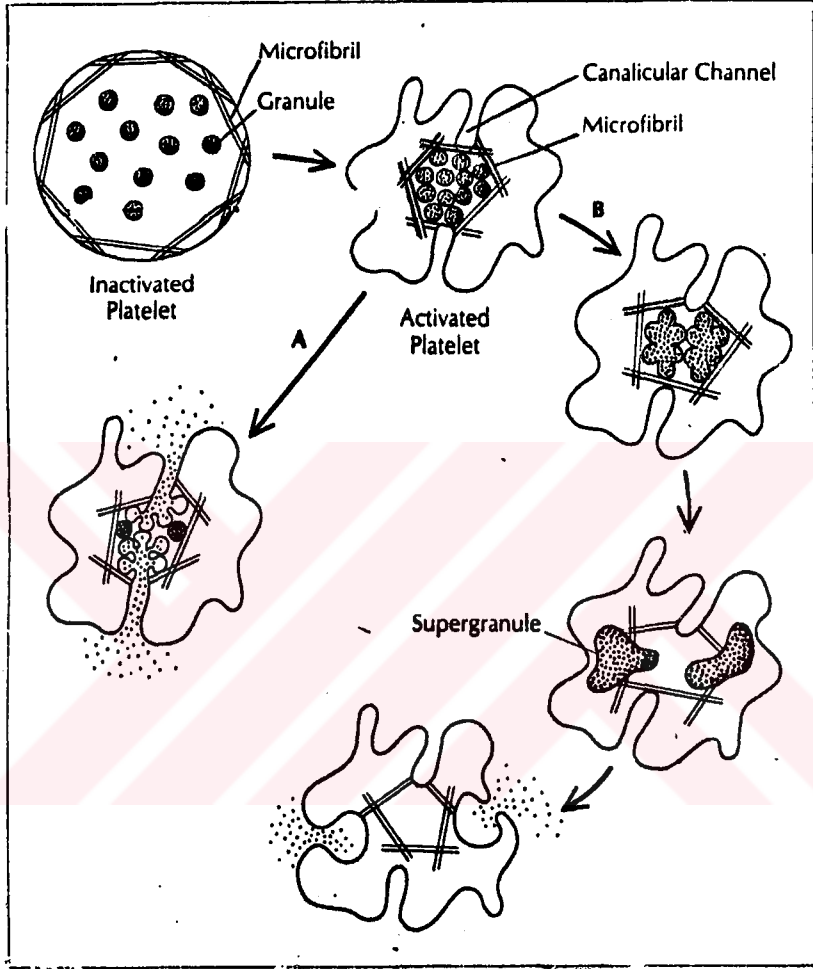
ADP'ye benzeyen epinefrin diğ er agreganların neden oldu ğ u şek il de ğ işik li ğ ini oluşt uramaz(25).

Yo ğ un granüller,  $\alpha$ -granüller ve lizozomların muhtevasını salgılatmak suretiyle irreversible trombos it agregasyonuna yol aç an trombin bu etkisini iki de ğ işik mekanizmayı aktive ederek gösterir. Tromboxan  $A_2$  sentezinin söz konusu oldu ğ u mekanizma fizyolojik yön den fazla önemli de ğ ildir. Tromboxan sentezine ba ğ ımlı olmayan diğ er yolun fizyolojik önemi daha fazladır(54).

Sekresyon: Trombositlerdeki yo ğ un granüller,  $\alpha$ -granüller ve lizozomların içinde bulunan salgı maddelerinin neler oldu ğ u trombositlerin fonksiyonel morfolojisi anlatılırken açıklandı. Bu bölümde daha çok sekresyon mekanizmalarından söz edilecektir. Trombosit sekresyonu diğ er salgı hücrelerinde oldu ğ u gibi exocytosis denilen bir fenomen şek linde gerçekleşir. Bu olayda muhtevası salgılanacak olan granül extraselüler ortamla de ğ i halinde bulunan bir membranla kaynaş makt a ve granülün içindeki maddeler kısmen veya tamamen hücre dış ı sıvısına verilmektedir. Trombosit sekresyonunda yo ğ un granüller plazma membranı ile kaynaş tı ğ ı halde  $\alpha$ -granüller hücrenin yüzeyine aç ılan kanaliküler sistemle(internal membran) kaynaş ır(25,29).

Sekresyon olayı stoplazmik  $Ca^{++}$  konsantrasyonunun yükselmesiyle baş lar(29). Agonist, trombos it membranındaki spesifik reseptörüne bağ lanınca plazma membranının iç tabakası ve yo ğ un tübüler sistemden plazmaya kalsiyum salıverilir. Plazmaya salıverilen kalsiyumun miktarı, agonistin yapısına ve konsantrasyonuna ba ğ lıdır. Stoplazmaya geçen iyonize kalsiyum kalmodulin ile ilişkiye girer. Kalsiyum-kalmodulin kompleksi miyozin kinazı aktive eder. Aktif miyozin kinaz miyozin hafif zincirini fosforile eder. Miyozin fosforile olunca aktin filamentleri ile ilişkiye girer. Böylece kont-

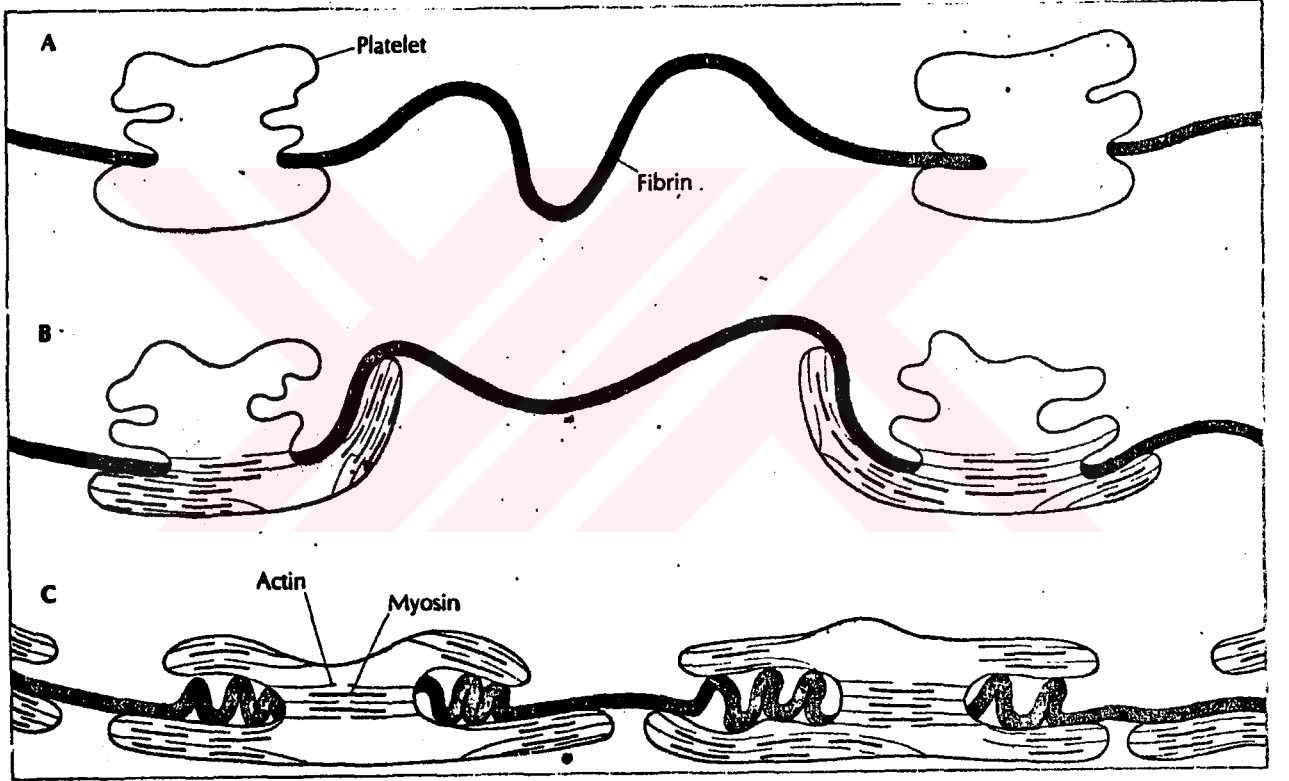
reaksiyon başlar. Şekil 12'de görüldüğü gibi mikrofibrillerin kasılması ile granüller iki taraftan sıkıştırılmakta ve hücrenin merkezinde bir araya getirilmektedir(25).



Şekil 10: Trombosit Degranülasyonunun İki Farklı Hücresel Mekanizmaları.

Granüllerin hücre merkezinde toplanması olayını ilk önce gösteren White olmuştur. Bu bilim adamına göre; granüller merkezde toplandıktan sonra hücrenin yüzeyine açılan kanaliküler sistemin kanalları ile kaynaşarak muhtevalarını extraselüler ortama verirler(25).

Ginsberg ve çalışma arkadaşlarının önerdikleri görüşe göre ise; merkezde toplanan granüller biribirleriyle birleşerek daha büyük granülleri oluştururlar. Bu süper granüllere su ve elektrolitlerin girmesi sonucu granüller genişler ve muhtevaları seyrelir. Sertliği azalmış olan bu birleşik granüller aktin-miyozin mikrofibril ağının kasılmasıyla trombositin merkezinden periferine doğru hareket ederler(Şekil<sup>10</sup> ). Daha sonra plazma membranı ile kaynaşır ve muhtevalarını boşaltırlar(25,29).



Şekil 11: Elektron Mikroskopik Çalışmalardaki Pıhtı Kontraksiyonunun Şematik Bir Görünümü. Trombositlerin Fibrin İplikçikleriyle Birbirine Bağlanması, Sonra Psödopodların Çıkarılması ve Pıhtının Retraksiyonu.

Mikroflamentlerin Kasılması: Trombositler aktive olunca kotraktil filamentleri kasılır ve ultrastrüktürlerinde bir seri değişiklikler meydana gelir(25). Bunları şöylece sıralıyabiliriz; 1- Şekil değişikliği(disk biçimindeki trombositlerin küresel şekle dönüşmesi), 2- Psödopod oluşumu, 3-  $\alpha$ -granüllerin hücre merkezinde toplanması ve 4- Degranülasyon(sekresyon).

Kas hücrelerinde olduğu gibi trombositlerde de başlıca kontraktıl proteinin aktin olduğu bilinmektedir(25). Kasılabilmesi için monomerik globüler aktin(G-aktin), fibriler aktin(F-aktin) şekline polimerize edilir. Globüler aktin ile fibriler aktin arasındaki dengeyi, değişik proteinler regüle eder.

Bu proteinler şunlardır: 1- Profilin; aktin molekülleri ile 1/1 oranında birleşerek polimerizasyonun uygun bir şekilde oluşmasına izin verir. 2-  $\alpha$ -Actinin ve aktin bağlayan protein; polimerizasyonu arttırmakla görevli proteinlerdir.

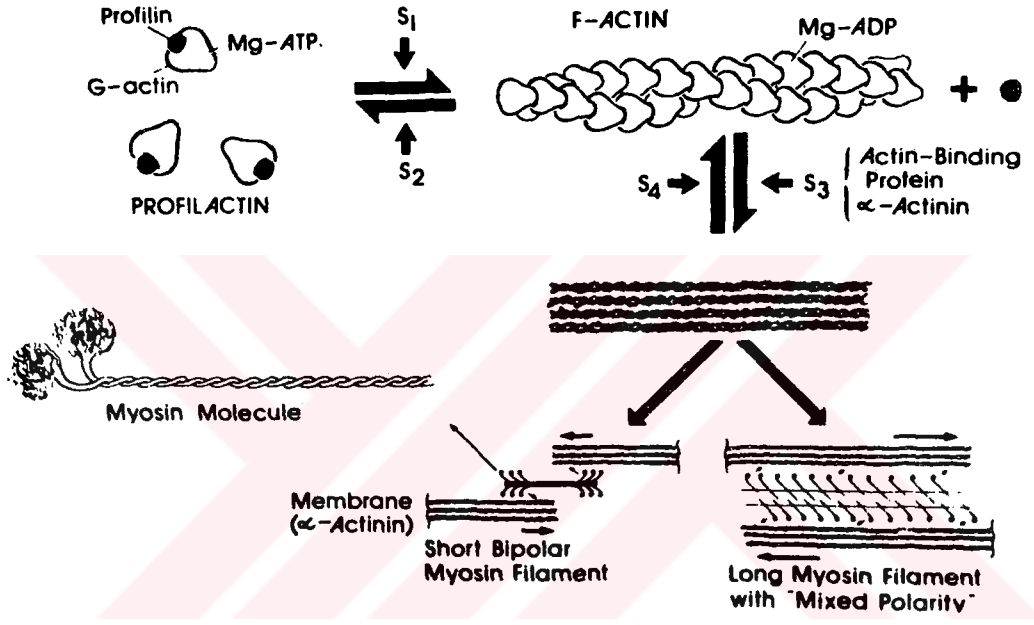
3- Gelsolin; fibriler aktinin uzunluğunu düzenliyen kalsiyuma bağımlı bir proteindir(29).

Trombosit miyozini dimerik yapıda iki ağır zincir(moleküler-ağırlığı 200.000) ve iki çift hafif zincirlerden meydana gelmiştir(Şekil 12). Hafif zincirler miyozin molekülünün baş bölümünü oluşturur. Baş bölümü ATP-ase aktivitesine sahiptir.

Kasılma miyozin filamentlerinin çapraz kolları üzerinde aktin filamentlerinin kayması şeklinde meydana gelir(Şekil 12).

Aktin filamentleri stoplazmada veya plazma membranında bulunan proteinlere(anchoring proteinler) tutunmuş durumdadır. Aktin filamentlerini demirliyen bu proteinlerin yapısı yeterince bilinmiyor(25). Kasılmanın olabilmesi için Mg.ATP-ase aktivitesi ve miyozin hafif zincirinin fosforile olması gerekir(29).

Kalmodulin ile aktive olan miyozin kinaz miyozin hafif zincirini fosforile eder. Kalmodulin  $Ca^{++}$  ile aktifleştigiğine göre kasılmanın stoplazmadaki serbest  $Ca^{++}$  konsantrasyonuna bağımlı bir olay olduğu açıkça görülmektedir.



Şekil 12 : Trombositlerin Kontraksiyon Mekanizmasının Modeli.

### VİTAMİN B6'NİN TROMBOSİT AGREGASYONUNA ETKİSİ

Vitamin B6 pyridoxal 5-phosphata dönüştükten sonra bir koenzim olarak metabolik reaksiyonlardan sorumlu pek çok enzimin aktivitesinde görev yapar(44,49,65). Yaklaşık 20 yıl kadar önce pyridoxal 5-phosphatın ko-faktör olmadığı başka enzimlerin ve proteinlerin fonksiyonunu değiştirdiği(62) anlaşılınca vitamin B6'nın trombosit fonksiyonlarına etkisi araştırma konusu haline gelmiştir.

Vitamin B6 eksikliği oluşturulan Rhesus maymunlarında trombosis atherosclerotic lezyonların geliştiği Rinehart ve Greenberg tarafından gösterilmiştir(61). Daha sonra yapılan çalışmalarda vitamin B6 eksikliğinin köpeklerde, sıçanlarda ve tavşanlarda da benzer lezyonlara neden olduğu gözlenmiştir(26). Trombosit agregasyonunun vitamin B6 eksikliğinde artmış olduğunu gösteren bu çalışmalar vitamin B6'nın antitrombotik ajan olabileceği izlenimini vermektedir.

Subarrao ve arkadaşlarının yapmış oldukları in vitro çalışmaya göre epinefrin, ADP ve trombin ile aktive edilen trombositlerde 0,8 mmol pyridoxal fosfat sekonder agregasyonu tamamen önlemektedir. Pyridoxal fosfat konsantrasyonu 2 mmol'ün üzerinde olunca primer agregasyon da inhibe olmaktadır(64). Aynı araştırmacı grubunun başka bir çalışmasında vitamin B6'nın koagülasyon zamanını önemli ölçüde uzattığı görülmüştür.

Kornecki ve Fienberg'e göre vitamin B6'nın trombosit membranında ADP reseptörünü inaktive ederek veya trombositlerde cyclic AMP konsantrasyonunu arttırarak agregasyonu inhibe etmektedir(37). Halbuki Packham ve arkadaşlarının daha sonra yapmış oldukları araştırmalara göre vitamin B6, ne cyclic AMP konsantrasyonunu arttırarak ne de ADP reseptörünü bloke ederek trombosit agregasyonunu etkilememektedir(40).

Farmakolojik dozda vitamin B6 tedavisinin plazma pyridoxal

phosphat düzeyinde yükselmeye neden olduğu halde trombositlerin ADP ve kollajene karşı duyarlılığını etkilemediği Schoene ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir.

Şimdiye kadar yapılmış araştırmaların sonuçlarına bakarak vitamin B6'nın trombosit agregasyonuna etkili olup olmadığını kesin olarak söylemenin mümkün olmadığı literatürden anlaşılmaktadır.

Vitamin B6'nın lipid metabolizmasında önemli fonksiyonlarının bulunduğu bilinmektedir. Vitamin B6 eksikliğinde karaciğerde kolesterol sentezini arttırdığı, plazma total kolesterol düzeyinin önemli ölçüde yükseldiği bildirilmiştir( 3,46). Farmakolojik dozda uygulanan vitamin B6'nın deney hayvanlarında ve insanlarda plazma total kolesterol düzeyini düşürdüğü ve HDL-kolesterol miktarını arttırdığı gösterilmiştir(45). Plazmada kolesterol düzeyinin özellikle LDL-kolesterolün arttığı durumlarda trombosit membranında kolesterol birikimi sonucu trombositlerin agonistlere daha duyarlı olduğu ispatlanmıştır(20). Plazma HDL- kolesterol düzeyinin artması trombosit agregasyonuna inhibe edici yönde etki gösterir(19). Vitamin B6'nın plazma kolesterol düzeyini azaltıcı ve HDL-kolesterol miktarını arttırıcı etkisi dikkate alınırca trombosit agregasyonu ile ilişkisinin olabileceği ortaya çıkar. Yaptığımız literatür çalışmasına göre bunu doğrudan gösteren bir araştırma yapılmıştır.

Trombosit agregasyonunu etkileyen bir başka faktör çinko iz elementidir. Çinkonun biyolojik membranları stabilize edici etkisi yapılan pek çok çalışma ile ispatlanmıştır(13,15,39). Chvapil ve arkadaşlarına göre çinko iyonları trombositlerde sekresyonu ve agregasyonu inhibe etmektedir(15). Son yıllarda yapılan araştırmalara göre vitamin B6 çinko metabolizmasını etkilemektedir(21,41). Ancak bu konuda elde edilmiş bilgiler çelişkilidir. Çelişkili de olsa vitamin B6'nın plazma çinko düzeyini değiştirerek trombosit

agregasyonunu etkileyebileceđi dűşűncesi ortaya çıkmaktadır. Bu dűşűncemizi dođrudan ispatlayan herhangi bir arařtırmaya literatűrde rastlıyamadık.

Sonuç olarak vitamin B6'nın trombosit agregasyonuna etkisi henűz yeterince aydınlatılamamıştır.



## MATERYAL VE METOD

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı ve İç Hastalıkları Anabilim Dalında yapılan bu deneysel çalışmada yaşları 19-24, vücut ağırlıkları 65-80 kg arasında değişen, sigara alışkanlığı olmayan, sağlıklı ve gönüllü erkek deneklerden yararlanıldı.

Deneklerin 12'si kontrol, 12'si deney gurubu olacak şekilde iki guruba ayrıldı. Gurupların seçiminde aralarında önemli yaş farklılığı bulunmamasına dikkat edildi.

Çalışmaya başlarken her iki grupta bulunan deneklerden yaklaşık 12 saatlik açlığı takiben venöz ve kapiller kan örnekleri alındı. Sitratlı venöz kan örneklerinde, trombositlerin ADP ve Epinefrine karşı agregasyon cevapları Chrono-Log 330 model agregometre ile belirlendi. Sitratsız kan örneklerinde plazma lipidleri ve Çinko iz elementinin düzeyi Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi (Perkin Elmer 103 Model).

Kapiller kan örnekleri trombosit sayımı için kullanıldı. Ayrıca kanama ve koagülasyon zamanları aşağıda belirtilen yöntemlerle tayin edildi.

Deney gurubuna vitamin B6 (Pyridoxine-HCl) oral yoldan yaklaşık 5 mg/kg/gün olacak şekilde tek doz halinde dört hafta boyunca her gün uygulandı. Kontrol gurubuna aynı süre ile plasebo (0 numara kase içinde şeker) verildi. Dördüncü haftanın sonunda

yeniden kan örnekleri alındı ve yukarıda belirtilen işlemlerin aynı-  
nısı tekrarlandı.

#### Trombosit Agregasyonunun Ölçümü

Sitratlı venöz kan örneklerinden trombositlerin ADP ve Epi-  
nefrine karşı agregasyonu Born ve O'Brien'in yöntemine göre aşağı-  
da açıklandığı şekilde belirlendi(10,52).

1-12 saatlik açlığı takiben sabahleyin kahvaltı yapmadan ve  
bir hafta öncesine kadar herhangi bir ilaç kullanmayan deneklerden  
9 ml venöz kan alınarak %3,8'lik 1 ml sodyum sitrat ihtiva eden  
bir tüpe boşaltıldı.

2-Çalkalamadan yavaşça karışmaları temin edildi.

3-160 g'de 10 dakika santrifuj edilerek trombositten zengin  
plazma (PRP) elde edildi.

4-Silikonize Pastör pipeti ile PRP alınarak plastik tüplere  
konuldu.

5-Trombositten fakir plazma (PPP) elde etmek için artta ka-  
lan sitratlı kan örneği 4000 g'de en az 6 dakika santrifuj e-  
dildi. Pastör pipeti ile alınan PPP, plastik tüplere konuldu.

6-Trombositten zengin plazma örneklerinde trombosit sayısı  
3 ml'de  $200.000 \pm 20.000$  olacak şekilde PPP ile gerekli dilüsyon-  
lar yapıldı.

7-Agregasyon testleri kan örnekleri alındıktan 30 dakika  
sonra, en geç 3 saati geçmemek şartıyla gerçekleştirildi.

#### Kullanılan Reaktifler

1-ADP Ana Çözeltisi: 1 ml'de 2 mg olacak şekilde hazırlandı.  
ADP trihidratın disodyum tuzu %0,9 NaCl eriyiği içinde çözüldü.  
pH:6,8 olacak şekilde 0,1 N NaOH ilave edildi.

Trombositlerce zengin plazma ile karıştırıldığında ADP'nin son

konsantrasyonu 1,7 M olarak ayarlandı.

2-Epinefrin Ana Çözeltisi: % 0,9 NaCl eriyiğiyle 20 mcg/ml olacak şekilde hazırlandı.

Trombositten zengin plazmadaki konsantrasyonu 5,4 mM olarak ayarlandı.

3-Sodyum Sitrat Çözeltisi: 3,8g sodyum sitrat tartıldı. Bir miktar distile su ile çözüldükten sonra hacim 100 ml'ye tamamlandı.

#### Kanama Zamanı Tayini

Kanama zamanı Ivy Yöntemi ile belirlendi(53). Tansiyon aletinin manşonu dirsek bükümünün biraz üstünde, kola takıldı ve 40 mmHg'lik bir basınç uygulandı. Bu uygulanan basınç sabit tutuldu. Ön kolun pronotor yüzeyi alkol ile temizlendi. Ciltte lanset ile 3 mm derinliğinde delik açıldı. Her 30 saniyede bir oluşan kan damlası kurutma kağıdına emdirildi. Kağıdın deriye değmemesine özen gösterildi. Bu yöntemle normal kanama süresi 3-4 dakika kadardır.

#### Koagülasyon Zamanı Tayini

Koagülasyon zamanını belirlemek için Tüp Yöntemi kullanıldı(53). Deneklerden venöz kan örnekleri plastik enjektörlere alınmaya başlar başlamaz kronometre çalıştırıldı. Alınan kan 8 mm çapındaki dört tüpe 1'er ml olacak şekilde konuldu. Tüpler 37 °C'deki su banyosuna yerleştirildi. 1 dakika ara ile tüpler 90° eğilerek kanın akıp akmadığı kontrol edildi. Bu yöntemle normal koagülasyon zamanı 6-9 dakika kadardır.

#### Serum Total Lipid Düzeyi

Serum total lipid düzeyini belirlemek için Sulfofosfovanilin Yöntemi kullanıldı(4 ). Bu yöntem karbon-karbon çift bağı içeren

lipidlerin sıcak derişik sülfürik asitle reaksiyonu sonucu oluşan keton ve ketal guruplarını vanilin ile oluşturduğu pembe renkli bileşiklerin ölçümü esasına dayanmaktadır.

Reaktifler

1-Derişik Sülfürik Asit

2- %0,6'lık vanilin çözeltisi: 600 mg vanilin tartıldı ve 100 ml'lik balon jøjeye aktarıldı. Bir miktar distile su ile iyice çözüldükten sonra hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

3-Fosfovanilin Reaktifi: 100 ml %0,6'lık vanilin çözeltisinin 1 litrelik erlenmayer içine konuldu ve devamlı karıştırılarak üzerine 400 ml orto fosforik asit eklendi. Kahverengi şişede oda sıcaklığında saklandı.

4-1000 mg'lık Lipid Standardı: 1 gr saf zeytin yağı(Sigma) tartıldı ve 100 ml'lik cam balona konuldu. Bir miktar absölü alkol ile çözüldükten sonra hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı: Cam kapaklı deney tüpleri Standart ve Örnek olarak işaretlendikten sonra sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı.

	Standart	Örnek
Lipid Standardı	0,1 ml	—
Serum	—	0,1ml
Sülfürik Asit	5 ml	5 ml

15 dakika kaynar su banyosunda tutuldu. Soğuk su altında soğutulduktan sonra aşağıdaki işlemler uygulandı.

	Kör	Standart	Örnek
Sülfürik Asit	0,2 ml	-	-
Kaynatılıp Soğutulmuş Standart Karışımı	-	0,2 ml	-
Kaynatılıp Soğutulmuş Örnek Karışımı	-	-	0,2 ml
Fosfovanilin Reaktif	5 ml	5 ml	5 ml

Tüpler iyice çalkalandı, oda ısısında 30 dakika bekledikten sonra spektrofotometrede 530 nm dalga boyunda köre karşı optik absorbansları okundu. Bulunan değerler formüle uygulanarak total lipid düzeyleri belirlendi.

$$\text{Örn.Konsant.} = \frac{\text{Standartın Konsantrasyonu (\%mg)}}{\text{Standartın Optik Absorbansı}} \times \text{Örn. Optik Absorbansı}$$

#### Serum Total Kolesterol Ölçümü

Serum total kolesterolü Zak Yöntemi ile belirlendi( 73 ).

#### Reaktifler

1-Derişik Sülfürik Asit

2- Derişik glasiyal asetik asit

3- Demir-III-klorür reaktifi: 140 mg  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  tartıldı, glasiyal asetik asitte çözümlenerek hacim 100 ml'ye tamamlandı. Koyu renkli şişede oda sıcaklığında saklandı.

4- Kolesterol standardı: 200 mg kristalize saf kolesterol 100 ml'lik balona konuldu. Propil alkol ile çözüldükten sonra hacim 100 ml'ye tamamlandı.

#### Deneyin Yapılışı

Santrifüj tüpleri, standart ve örnek olarak işaretlendi.

	Standart	Örnek
Kolesterol Standardı	0,1 ml	-
Serum	-	0,1 ml
Demir -III-Klorür Reaktifi	4 ml	4 ml

İyice çalkalandı, 30 dakika oda ısısında bekletildi. Sonra 3000 devir/dakikada 15 dakika santrifüj edildi. 3 tane deney tüpü alındı, kör, standart ve örnek olarak işaretlendi.

	Kör	Standart	Örnek
Demir -III- Klorür Reaktifi	2 ml	-	-
Standart Üst Sıvısı	-	2 ml	-
Örnek Üst Sıvısı	-	-	2 ml
Glasiyal Asetik Asit	2 ml	2 ml	2 ml
Sülfirik Asit	2 ml	2 ml	2 ml

İyice çalkalandı, oda sıcaklığında 30 dakika beklendikten sonra 560 nm'de okundu. Hesaplamada aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{Örnekteki Kolesterol Konsantrasyonu(\% mg)} = \frac{\text{Standardın Konsantrasyonu(\% mg)}}{\text{Standardın Optik Dansitesi}} \times \text{Örnek O.D.}$$

### Serumda HDL-Kolesterol Ölçümü

Prensip: Presipitasyon yöntemleri ile serumda HDL-kolesterol ölçümünün temel prensibi apoprotein B'nin çöktürülmesi ve üst sıvıdan kolesterol ölçülmesidir. Bu çalışmada rutin klinik laboratuvar uygulamalar için pratik ve güvenilir bir teknik olduğu ileri sürülen Fosfotungstat-MgCl<sub>2</sub> ile presipitasyon yöntemi kullanılmıştır(32).

Presipitasyondan sonra üst sıvıdan kolesterol ölçümü, Zak Yöntemi'nin laboratuvarımız şartlarında ufak değişiklikler uygulanması ile yapılmıştır.

1- Fosfotungstik asit çözeltisi: 4,025 g H<sub>3</sub>P(W<sub>3</sub>O<sub>10</sub>)<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O tartılıp 50 ml distile suda çözüldü. Üzerine 16 ml 1mol/L NaOH çözeltisi eklendi. Hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2- MgCl<sub>2</sub> = 2 mol/L

3- Derişik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

4- Derişik glasial asetik asit

5- FeCl<sub>3</sub> reaktifi: Zak Yöntemi'nde hazırlanmış aynı konsantrasyondaki reaktif kullanıldı.

6- Kolesterol serum havuzu standardı: Kolesterol için hazırlanan serum havuzu standardı aynen kullanıldı.

Deneyin Yapılışı: Bir santrifüj tüpü alındı.

	Örnek
Serum	2 ml
Fosfotungstik Asit Reaktifi	0,2 ml
2M MgCl <sub>2</sub> Çözeltisi	0,05 ml

İyice çalkalandı, oda ısısında en az 15 dakika beklendi. Sonra 1500 g'de +4 °C'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst sıvı berrak ise deneyde kullanıldı. Üst sıvı bulanık olduğu zaman serum, % 0,9'luk NaCl ile iki kat sulandırıldı, presipitasyon çözeltileri de iki kat çok kullanıldı, sonra aynı santrifüj işlemi tekrarlandı. Deney sonunda bulunan HDL-kolesterol değeri sulandırma faktörü olan 2 ile çarpıldı. Sonra 2 adet santrifüj tüpü alındı, standart ve örnek olarak işaretlendi.

	Standart	Örnek
Kolesterol Standardı	0,1 ml	-
Örnek Üst Sıvısı	-	0,3 ml
Demir -III- Klorür Reaktifi	3,9 ml	5,7 ml

30 dakika oda ısısında beklendi. 3000 devir / dakikada 15 dakika santrifüj edildi. Sonra üç deney tüpü alındı, kör, standart ve örnek olarak işaretlendi.



	Kör	Standart	Örnek
Demir -III- Klorür	4 ml	2 ml	-
Standart Üst Sıvısı	-	2 ml	-
Örnek Üst Sıvısı	-	-	4 ml
Sülfürik Asit	2 ml	2 ml	2 ml

İyice çalkalandı, 30 dakika oda ısısında beklendikten sonra 560 nm' de optik dansiteler köre karşı okundu.

Hesaplama: Başlangıçta örnekler fosfotungstat-MgCl<sub>2</sub> karışımı ile 1,125 kat sulandırıldı. Kolesterolün ölçümü için alınan üst sıvı da 20 kat sulandırıldı(0,3 ml üst sıvıya 5,7 ml FeCl<sub>3</sub> reaktifi eklendi). Standart ise 40 kat sulandırıldı(0,1 ml serum havuzu standardına 3,9 ml FeCl<sub>3</sub> reaktifi eklendi). Ayrıca örnekler deney tüplerine 4'er ml aktarılırken, standart 2 ml aktarıldı. Yani örnekler standarda göre 4 kez daha konsantre oldu. Bu nedenle HDL-kolesterolü hesaplanacak standart olarak serum havuzundaki gerçek kolesterol düzeyinin 1/4'ü alındı.

$$\text{Örnekteki HDL-Kolesterol Konsantrasyonu(\% mg )} = \frac{A}{\text{Standart Optik Dansite}} \times \text{Örnek O.D.} \times F$$

A=Serum havuzu kolesterol standardı / 4

F=Örneğin sulandırılma faktörü=1,125

Serumda Trigliserit Ölçümü

( Triglicerides-Kit, ref 61671 bio MERIEUX )

Prensip: Serum asit ortamda izopropanol-heptan karışımı ile ekstrakte edilir. Bunun sonucu iki faz oluşur. Alttaki fazda fosfolipitler, bilirubin, glukoz ve serbest gliserol gibi polihidroksilatlar kalır.

Üstteki fazda transesterifikasyon ile gliserole hidrolize olan trigliseritler kalır. Gliserolün periodat ile oksidasyonu sonucu formaldehit meydana gelir. Formaldehit de Hantzsch reaksiyonuna göre asetilaseton ve amonyum asetat ile sarı renkli bir kompleks oluşturur. Bu renk nedeni ile spektrofotometrik olarak trigliserit konsantrasyonu ölçülür.

Reaktifler

1- Reaktif I : 0,08 N  $H_2SO_4$

2- Reaktif II : Triolein 1g/L, 35 hacim izopropanol 20 hacim heptan ( standart )

3- Reaktif III : Sodyum etilat 0,1 mol/L

4- Reaktif IV : Sodyum metaperyodat 0,03 mol/L

5- Reaktif V : Asetil aseton 300 mol/L

6- Reaktif VI : Amonyum asetat 2 mol/L

7- Reaktif VII : Asetil aseton çalışma çözeltisi : 1 hacim reaktif V ile, 10 hacim reaktif VI karıştırıldı. Deneyden hemen önce hazırlandı.

8- Ekstraksiyon çözeltisi: 20 hacim heptan, 35 hacim izopropanol karışımı.

Deneyin Yapılışı: 3 adet deney tüpü alındı, kör, standart ve örnek olarak işaretlendi.

Ekstraksiyon Çözeltisi	4 ml	4 ml	4 ml
	Kör	Standart	Örnek
Distile Su	0,2 ml	-	-
Reaktif 2 ( Standart )	-	0,2 ml	-
Serum	-	-	0,2 ml

Her tüp 30 saniye şiddetle çalkalandı. İki fazın ayrılması için bir kaç dakika beklendi. Tekrar 3 deney tüpü alındı, kör, standart ve örnek olarak işaretlendi.

	Kör	Standart	Örnek
Kör Tüpündeki Sıvının Üst Fazı	0,5 ml	-	-
Standart Tüpündeki Sıvının Üst Fazı	-	0,5 ml	-
Örnek Tüpündeki Sıvının Üst Fazı	-	-	0,5 ml
Reaktif 3	3 ml	3 ml	3 ml

En az 5 dakika oda ısısında beklendi.

Reaktif 4	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
-----------	--------	--------	--------

İyice çalkalandı.

Asetil Aseton Çalışma Çözeltisi	1 ml	1 ml	1 ml
---------------------------------	------	------	------

30 dakika 37 °C su banyosunda tutuldu. Soğuk su altında soğutulduktan sonra 405 nm'de optik dansiteler köre karşı okundu. Aşağıdaki formüle göre değerlendirildi.

$$\text{Örneğin Konsantrasyonu } (\% \text{mg}) = \frac{\text{Standartın Konsantrasyonu}}{\text{Standart Optik Dansite}} \times \text{Örnek O.D.}$$

Elde edilen bulgular Student's-t-Testine tabi tutuldu ve literatür bilgileri ışığında tartışıldı.

## BULGULAR

### 1-Vitamin B6'nin Trombosit Agregasyonuna Etkisi

Kontrol gurubunda plasebo uygulamadan önce ADP ile oluşan trombosit agregasyonu  $\%81,84 \pm 6,14$ , dört haftalık plasebo uygulamasından sonra  $\%82,80 \pm 9,24$  olarak belirlendi. Plasebo uygulamasının trombosit agregasyonuna etkisinin olmadığı dikkati çekti. Deney gurubunda vitamin B6 uygulamadan önce ADP'ye karşı trombosit agregasyonu  $\%83,70 \pm 7,52$  olduğu halde vitamin B6 uygulandıktan sonra aynı agregana cevabı  $\%43,14 \pm 9,53$  değerine düştü. Bu bulgulara göre vitamin B6 tedavisi trombositlerin ADP'ye cevabını yaklaşık olarak  $\%48$  oranında azaltmıştır. Her iki kontrol değerleriyle karşılaştırıldığında fark, istatistiki olarak anlamlı bulundu ( $P < 0,001$ ).

Trombositlerin epinefrine karşı agregasyon cevabı kontrol gurubunda tedavi öncesi  $\%67,07 \pm 8,55$ ; tedavi sonrası  $\%70,24 \pm 6,79$  olarak bulundu.

Deney gurubunda vitamin B6 uygulamadan önce  $\%71,82 \pm 6,53$  olarak belirlendi. Bu kontrol değerleri arasında önemli bir farklılığın olmadığı görüldü.

Buna karşı vitamin B6 tedavisinin epinefrin ile oluşan trombosit agregasyonunu  $\%42,23 \pm 6,70$  düzeyine düşürerek önemli ölçüde azalttığı dikkati çekti. Azalmanın, yaklaşık olarak  $\%41$  oranında olduğu hesaplandı. Kontrol değerleriyle karşılaştırıldığında fark çok önemli bulundu ( $P < 0,001$ ).

Bu çalışmada vitamin B<sub>6</sub>'nın primer agregasyonu etkilemediği, ADP ve Epinefrin gibi agreganlara karşı trombosit agregasyonunu azaltıcı etkisini, sekonder agregasyonu (realese reaksiyonu) inhibe ederek gösterdiği belirlendi.

### 2-Vitamin B<sub>6</sub>'nın Kanama-Koagülasyon Zamanı ve Trombosit Sayısına Etkisi

Kontrol gurubunda plasebo öncesi kanama zamanı 78,75<sup>+</sup>9,32 saniye bulundu. Plasebo uygulandıktan sonra 80,00<sup>+</sup>9,77 saniye bulundu. Deney gurubunda tedavi öncesi 79,58<sup>+</sup>10,13 saniye olan kanama zamanı vitamin B<sub>6</sub> uygulamasından sonra 110,00<sup>+</sup>6,26 saniyeye ulaştı. Vitamin B<sub>6</sub> tedavisi sonunda kanama zamanının önemli ölçüde (P<0,001) uzadığı görüldü. Bununla birlikte kanama zamanındaki artışın fizyolojik sınıarı aşmadığı dikkati çekti.

Koagülasyon zamanı kontrol gurubunda tedavi öncesi 194<sup>+</sup>19,99 saniye, tedavi sonrası 189<sup>+</sup>8,90 saniye, deney gurubunda tedavi öncesi 189<sup>+</sup>10,18 saniye olarak tesbit edildi. Bu kontrol değerleri arasında önemli bir farklılık bulunmadı. Dört haftalık vitamin B<sub>6</sub> tedavisinin kanama zamanında olduğu gibi koagülasyon zamanını da önemli ölçüde arttırarak (P<0,001) 275<sup>+</sup>20,60 saniye düzeyine ulaştırdığı gözlemlendi. Artmış olan bu koagülasyon zamanının fizyolojik sınırlar içinde kalması ilginç bir bulgu olarak değerlendirilmeye neden oldu.

Trombosit sayısı kontrol gurubunda tedavi öncesi 315.000<sup>+</sup>36.140, tedavi sonrası 335.000<sup>+</sup>26.320, deney gurubunda tedavi öncesi 350.000<sup>+</sup>25.970, vitamin B<sub>6</sub> uyguladıktan sonra 325.000<sup>+</sup>24.720 olarak bulundu. Vitamin B<sub>6</sub> tedavisinin trombosit sayısında önemli bir değişiklik oluşturmadığı tesbit edildi.

### 3-Vitamin B6'nın Plazma Lipid Düzeylerine Etkisi

Kontrol gurubunun plasebo öncesi plazma total lipid düzeyi  $581 \pm 31,08$  mg/dl, plasebo uygulandıktan sonra  $569 \pm 28,63$  mg/dl olduğu tesbit edildi. Deney gurubunda tedavi öncesi  $573 \pm 10,69$  mg/dl olarak belirlenen plazma total lipid düzeyi vitamin B6 tedavisi ile  $519 \pm 10,65$  mg/dl düzeyine düştüğü görüldü. Plazma total lipid düzeyine vitamin B6'nın bu düşürücü etkisi önemli bulundu ( $P < 0,001$ ).

Plazma total kolesterol düzeyi kontrol gurubunda tedavi öncesi  $164 \pm 12,61$  mg/dl, tedavi sonrası  $170 \pm 11,53$  mg/dl olarak belirlendi. Vitamin B6 tedavisinin plazma total kolesterol düzeyini önemli ölçüde azalttığı görüldü. Deney gurubunda tedavi öncesi  $156 \pm 6,99$  mg/dl olarak belirlenen plazma total kolesterol düzeyi vitamin B6 tedavisi ile  $116 \pm 5,69$  mg/dl düzeyine indi ( $P < 0,001$ ).

HDL-Kolesterol düzeyi kontrol gurubunda tedavi öncesi  $38,25 \pm 3,72$  mg/dl, tedavi sonrası  $36,41 \pm 2,93$  mg/dl olarak ölçüldü. Deney gurubunda tedavi öncesi  $37,91 \pm 2,27$  mg/dl olarak belirlenen HDL-Kolesterol düzeyinin vitamin B6 tedavisi ile  $48,66 \pm 2,74$  mg/dl'ye yükseldiği dikkati çekti. Vitamin B6 tedavisinin HDL-Kolesterol düzeyine bu olumlu etkisi istatistiki yönden anlamlı bulundu ( $P < 0,001$ ).

#### 4-Vitamin B6'nın Serum Çinkosuna Etkisi

Kontrol gurubunun tedavi öncesi serum çinko düzeyi  $102,51 \pm 9,53 \mu\text{g/dL}$ , plasebo tedavisinden sonra  $101,76 \pm 12,55 \mu\text{g/dL}$ , deney gurubunun ise tedavi öncesi  $96,62 \pm 10,72 \mu\text{g/dL}$  olarak belirlendi. Bu kontrol değerleri arasında önemli bir değişiklik bulunmadı. Vitamin B6 tedavisi sonucunda serum çinko düzeyinin  $138,79 \pm 15,84 \mu\text{g/dL}$ 'ye yükseldiği tesbit edildi. Kontrol değerleri ile karşılaştırıldığında serum çinkosundaki bu artışın anlamlı olduğu görüldü ( $P < 0,001$ ).

Tablo I: Vitamin B6'nin Trombosit Agregasyonuna Etkisi.

KONTROL GURUBU (n=12)		DENEY GURUBU ( n=12 )	
Agregan	Tedavi Öncesi Agregasyon İndeksi (%)	Tedavi Sonrası Agregasyon İndeksi (%)	Tedavi Sonrası Agregasyon İndeksi (%)
ADP	81,84 ± 6,14 <sup>a</sup>	82,80 ± 9,24	83,70 ± 7,52
EPİNEFRİN	67,07 ± 8,55	70,24 ± 6,79	71,82 ± 6,53
			43,14 ± 9,53 <sup>b</sup>
			42,23 ± 6,70 <sup>b</sup>

a : Ortalama ± Standart Sapma

b : Tedavi Öncesi Kontrol Değerlerine Göre Farkın Önemi (P<0,001)



Tablo II: Vitamin B6'nin Kanama ,Koagülasyon Zamanına ve Trombosit Sayısına Etkisi.

	KONTROL GURUBU ( n=12 )		DENEY GURUBU ( n=12 )	
	Tedavi Öncesi	Tedavi Sonrası	Tedavi Öncesi	Tedavi Sonrası
KANAMA ZAMANI ( Sn )	78,75 ± 9,32 <sup>a</sup>	80 ± 9,77	79,58 ± 10,13	110 ± 6,26 <sup>b</sup>
KOAGÜLASYON ZAMANI ( Sn )	194 ± 19,99	189 ± 8,90	189 ± 10,18	275 ± 20,60 <sup>b</sup>
TROMBOSİT SAYISI ( ...x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	315 ± 36,14	335 ± 26,32	350 ± 25,97	325 ± 24,72

a : Ortalama ± Standart Sapma

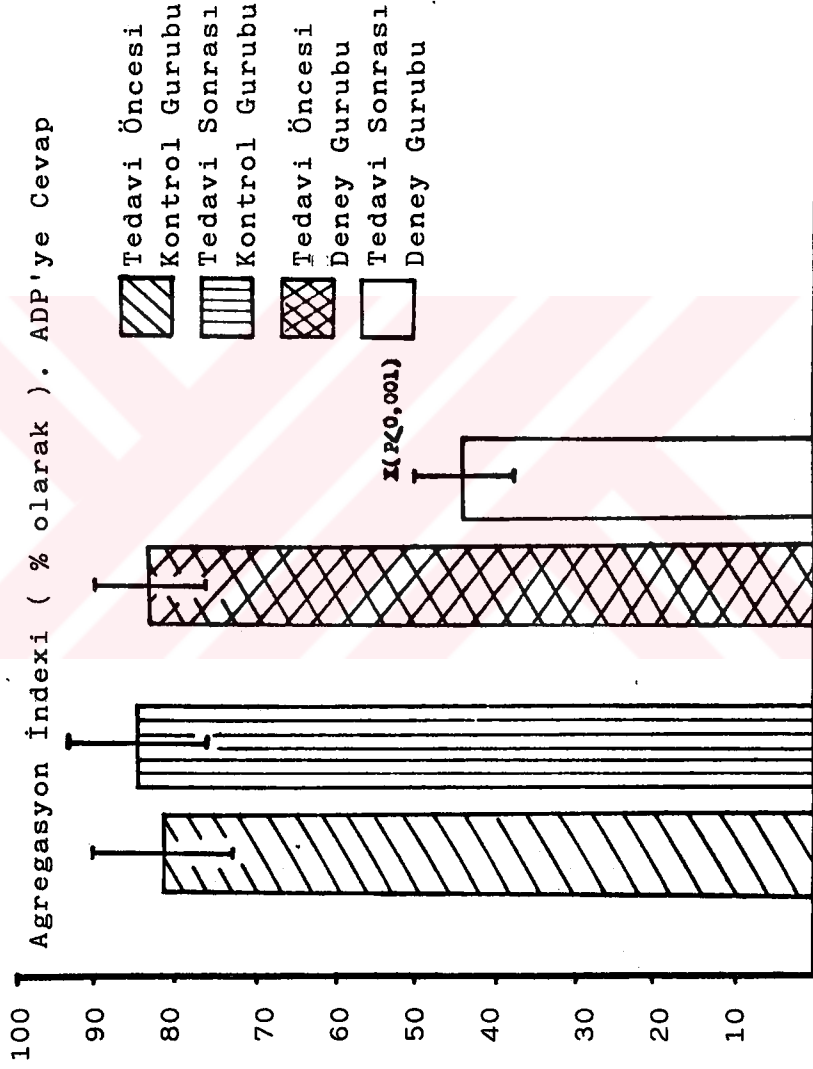
b : Tedavi Öncesi Kontrol Değerlerine Göre Farkın Önemi (P<0,001)

Tablo III : Vitamin B6'nin Plazma Lipid Düzeylerine Etkisi.

	KONTROL GRUBU ( n=12 )		DENEY GRUBU ( n=12 )	
	Tedavi Öncesi	Tedavi Sonrası	Tedavi Öncesi	Tedavi Sonrası
TOTAL LİPID ( mg/dl )	581 ± 31,08 <sup>a</sup>	569 ± 28,63	573 ± 10,69	519 ± 10,65 <sup>b</sup>
TOTAL KOLESTEROL ( mg/dl )	164 ± 12,61	170 ± 11,53	156 ± 6,99	116 ± 5,69 <sup>b</sup>
HDL-KOLESTEROL ( mg/dl )	38,25 ± 3,72	36,41 ± 2,93	37,91 ± 2,27	48,66 ± 2,74 <sup>b</sup>

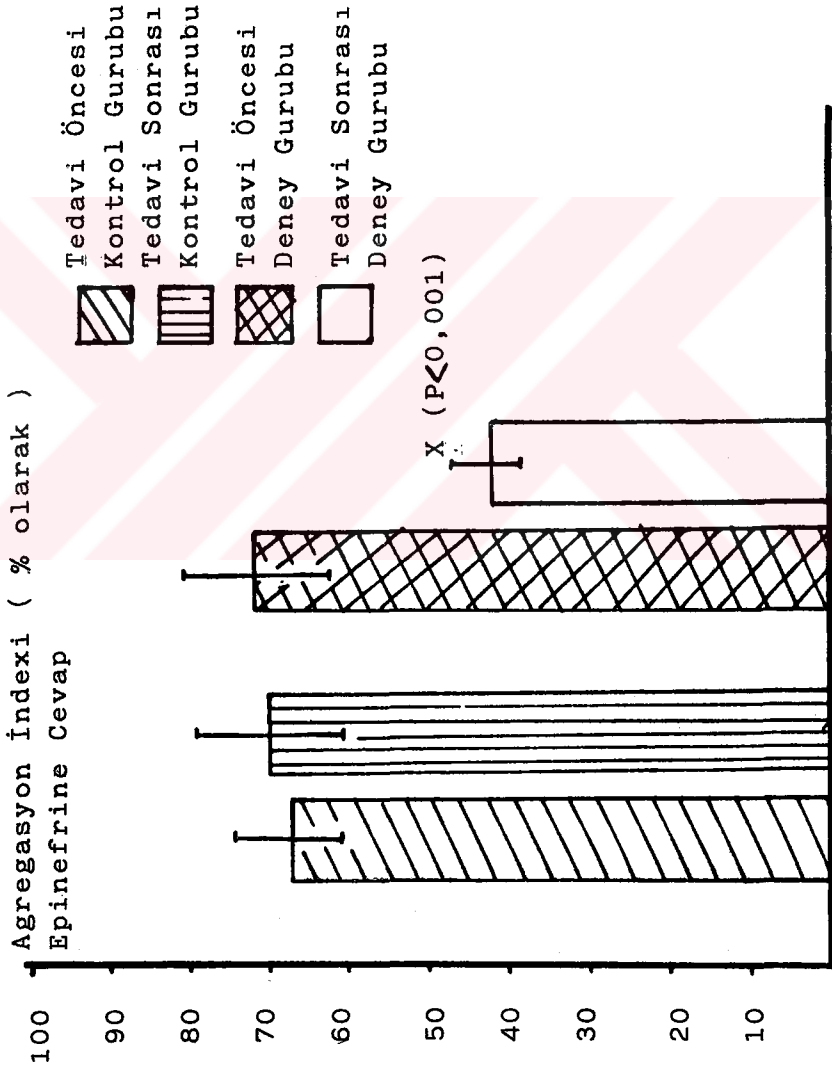
a : Ortalama ± Standart Sapma

b : Tedavi Öncesi Kontrol Değerlerine Göre Farkın Önemi (P<0,001)



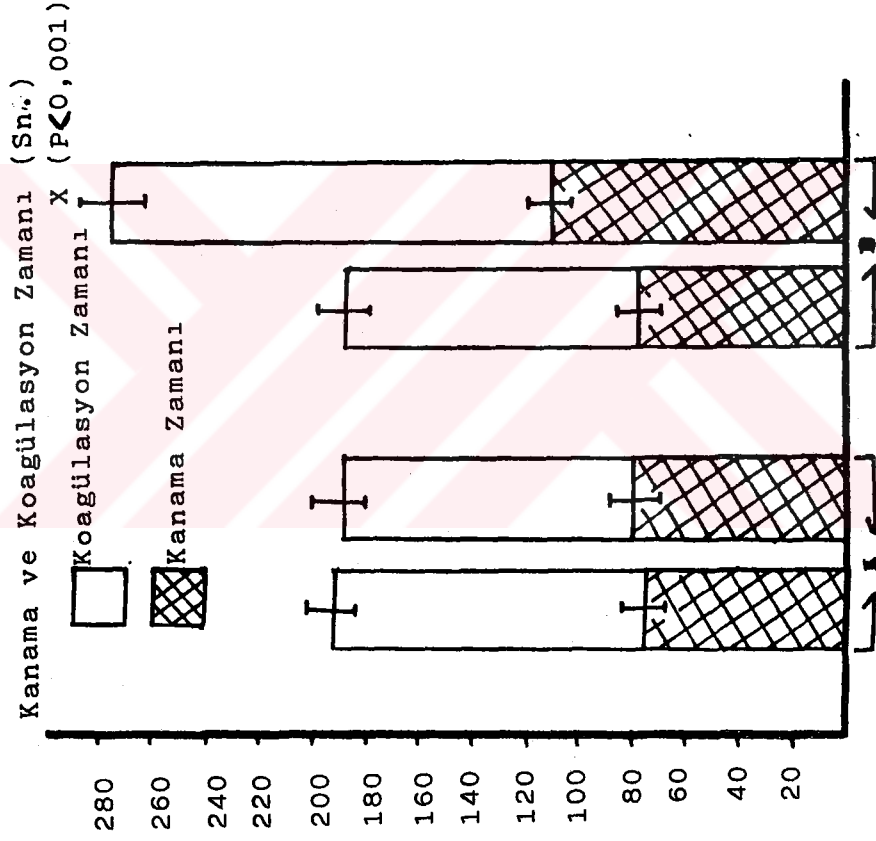
Şekil I: ADP ile oluşan Trombosit Agregasyonuna Vitamin B6'nın Etkisi.

X: Tedavi Öncesi Kontrol ve Deneş Gurublarına göre önem kontrolü.



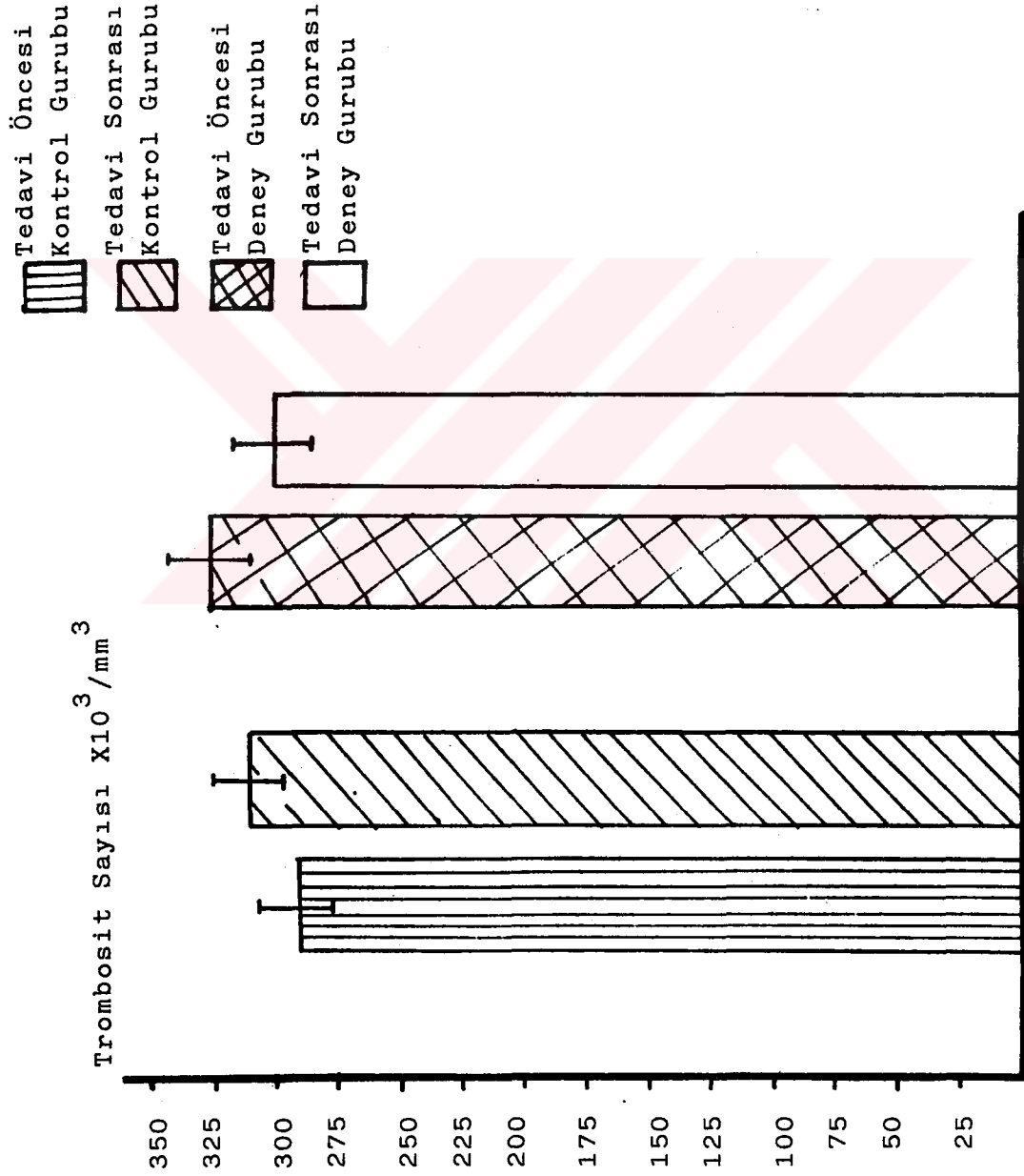
Şekil II: Epinefrin ile oluşan Trombosit Agregasyonuna Vitamin B6'nın Etkisi.

X: Tedavi Öncesi Kontrol ve Deneş Gurublarına göre önem kontrolü.

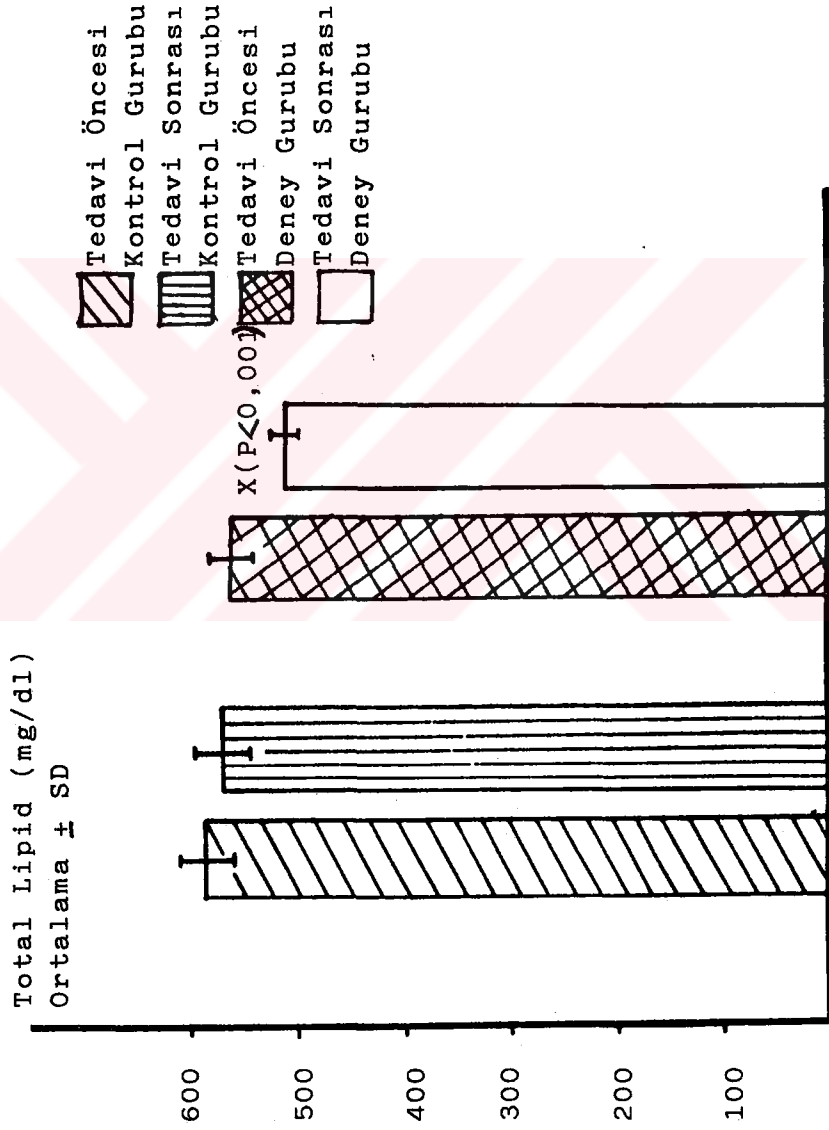


Şekil III: Vitamin B6'nın Kanama ve Koagülasyon Zamanına Etkisi.

X: Tedavi Öncesi Kontrol ve Deney Gurublarına Göre Önem Kontrolü.

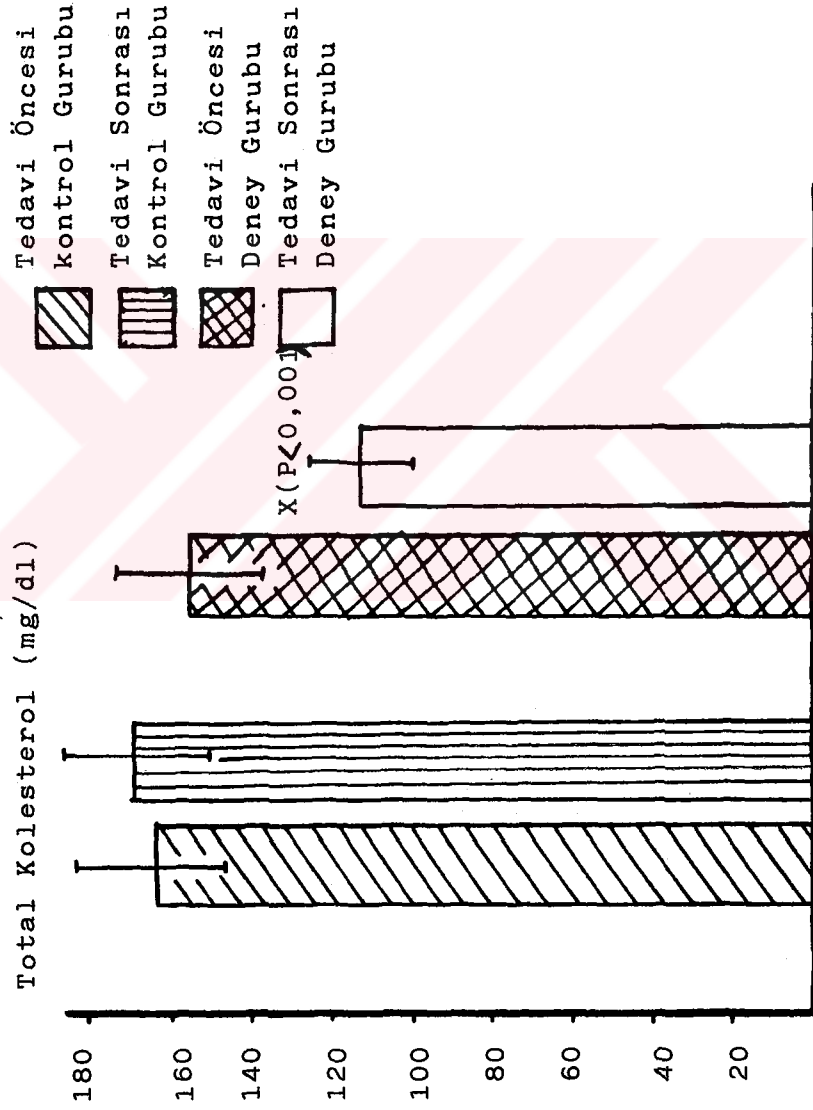


Şekil IV: Vitamin B6'nin Trombosit Sayısına Etkisi



Şekil V: Vitamin B6'nın Plazma Total Lipid Düzeyine Etkisi.

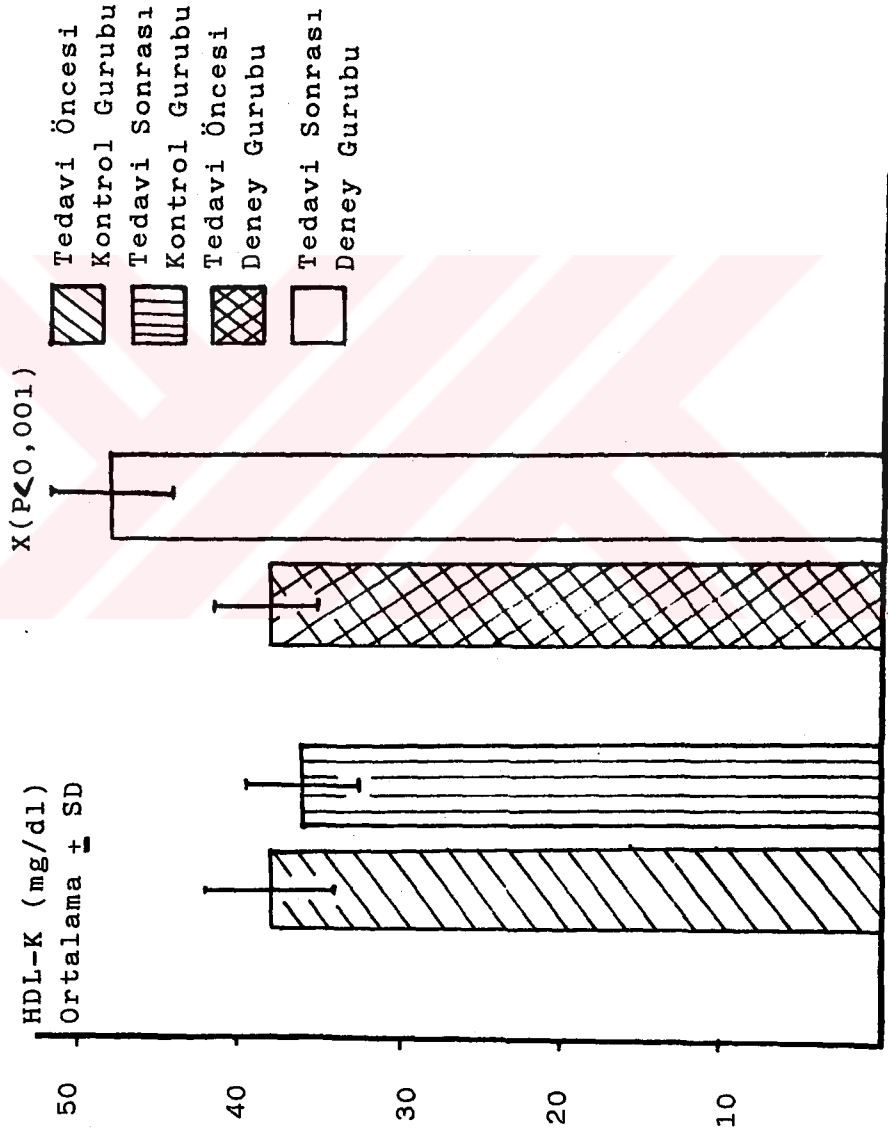
X: Tedavi Öncesi Kontrol ve Deney Gurublarına Göre Önem Kontrolü.



Şekil VI: Vitamin B6'nın Plazma Total Kolesterol Düzeyine Etkisi.

X: Tedavi Öncesi Kontrol ve Deneysel Gurublarına Göre Önem Kontrolü.





Şekil VII: Vitamin B6'nın Plazma HDL-K Düzeyine Etkisi.

X: Tedavi Öncesi Kontrol ve Deneysel Gurublarına Göre Önem Kontrolü.

DENEK NO	ADE'YE CEVAP (% olarak)				EPİNERİNE CEVAP (% olarak)				PLAZMA ÇİNKO SEVİYESİ (µg/dl)			
	KONTROL		DENEY		KONTROL		DENEY		KONTROL		DENEY	
	TEDAVİ ÖNCESİ	TEDAVİ SONRASI	TEDAVİ ÖNCESİ	TEDAVİ SONRASI	TEDAVİ ÖNCESİ	TEDAVİ SONRASI	TEDAVİ ÖNCESİ	TEDAVİ SONRASI	TEDAVİ ÖNCESİ	TEDAVİ SONRASI	TEDAVİ ÖNCESİ	TEDAVİ SONRASI
1	79,4	72,4	76,3	47,7	47,4	59,4	69,9	39,9	110,02	99,32	86,13	158,14
2	86	87	82,5	55,6	82,8	68,4	75	44,8	89,30	89,20	89,12	113,60
3	75	67	86	38,6	64,9	65,9	81	45,2	92,43	78,00	78,00	150,00
4	81,7	90,7	92,3	60,5	68	70	75,3	45	98,74	92,41	91,42	157,14
5	92,6	86,8	77,1	38,2	73,5	77	74,4	51	120,48	118,68	99,42	140,57
6	86	84	86,7	39,4	59,3	69	67	37,3	112,06	97,24	101,99	110,00
7	73,3	78,4	71,3	35	59	59	81,2	53	100,97	120,12	93,68	150,85
8	87	95,2	84,9	37,2	72,4	77,2	72,5	47,5	88,78	99,87	120,00	123,42
9	79,3	81,3	90,8	51,5	76,2	73,8	70	38,4	110,36	115,33	101,40	147,14
10	84,2	83,5	73,6	27,7	69	73,4	71,8	39	104,32	110,25	98,62	138,39
11	72,4	70,5	93,4	48,3	76	80,3	66,4	36	100,58	102,70	106,38	140,05
12	85,2	96,2	89,6	38	67,4	70,5	57,4	29,7	101,10	99,05	99,29	136,27
ORT.	81,84	82,80	83,70	43,14	67,07	70,24	71,82	42,23	102,51	101,76	96,62	138,79
S.D.	6,14	9,24	7,82	9,53	8,55	6,79	6,53	6,70	9,53	12,55	10,72	15,84

Tablo IV : Vitamin B6'nin Trombosit Agregasyonuna ve Plazma Çinko Düzeyine Etkisi.

DENEK NO	KANAMA ZAMANI (Sn)				KOAGÜLASYON ZAMANI (Sn)				TROMBOSİT SAYISI ( $\times 10^3 / \text{mm}^3$ )				
	KONTROL		DENEY		KONTROL		DENEY		KONTROL		DENEY		
	TEDAVİ ÖNCESİ	TEDAVİ SONRASI	TEDAVİ ÖNCESİ	TEDAVİ SONRASI	TEDAVİ ÖNCESİ	TEDAVİ SONRASI	TEDAVİ ÖNCESİ	TEDAVİ SONRASI	TEDAVİ ÖNCESİ	TEDAVİ SONRASI	TEDAVİ ÖNCESİ	TEDAVİ SONRASI	
1	75	60	90	120	180	180	180	180	270	365	300	350	300
2	90	90	75	90	185	205	195	285	285	300	375	335	315
3	75	75	90	135	225	180	180	255	255	250	350	350	350
4	75	75	75	90	195	195	195	205	285	360	375	375	350
5	75	75	75	105	210	180	180	270	270	275	300	330	320
6	90	90	90	105	205	195	195	300	300	300	320	400	350
7	75	75	70	120	195	195	195	180	270	325	350	320	315
8	90	90	90	105	180	195	195	205	285	330	320	320	320
9	75	75	90	150	180	180	180	270	270	275	350	375	350
10	75	90	75	105	195	195	195	195	280	350	350	325	275
11	60	90	75	105	210	195	195	180	255	350	315	350	350
12	90	75	60	90	180	180	180	195	285	315	320	375	310
ORT	78,75	80	79,58	110	194	189	189	189	275	315	335	350	325
±D.	9,32	9,77	10,13	6,26	19,59	8,90	10,18	20,60	36,14	26,32	25,97	24,72	

Tablo V : Vitamin B6'nin Kanama , Koagülasyon Zamanı ve Trombosit Sayısına Etkisi.

DENEK NO	TOTAL LİPİD ( mg/dl )				TOTAL KOLESTEROL ( mg/dl )				HDL - KOLESTEROL ( mg/dl )			
	KONTROL		DENEY		KONTROL		DENEY		KONTROL		DENEY	
	TEDAVİ ÖNCESİ	TEDAVİ SONRASI	TEDAVİ ÖNCESİ	TEDAVİ SONRASI	TEDAVİ ÖNCESİ	TEDAVİ SONRASI	TEDAVİ ÖNCESİ	TEDAVİ SONRASI	TEDAVİ ÖNCESİ	TEDAVİ SONRASI	TEDAVİ ÖNCESİ	TEDAVİ SONRASI
1	615	597	583	530	180	178	166	126	41	43	41	53
2	560	554	565	510	167	160	148	110	38	36	36	46
3	596	583	570	525	149	154	158	118	36	34	38	45
4	541	532	578	504	171	176	150	120	38	34	39	52
5	620	605	563	532	167	172	160	120	42	38	37	46
6	540	533	580	512	144	150	146	115	35	36	40	48
7	618	608	595	535	147	153	152	125	40	37	35	49
8	572	560	575	508	174	180	162	118	37	35	39	52
9	548	536	560	520	179	178	149	115	32	32	40	48
10	615	600	567	508	167	175	165	110	39	35	36	48
11	585	570	580	527	154	165	162	112	35	37	34	46
12	563	540	560	517	173	180	157	109	46	40	40	51
ORT.	581	569	573	519	164,33	170,08	156,25	116,50	38,25	36,41	37,91	48,66
S.D.	31,08	28,63	10,69	10,65	12,61	11,53	6,99	5,69	3,72	2,93	2,27	2,74

Tablo VI : Vitamin B6'nin Plazma Lipid Düzeylerine Etkisi.

## TARTIŞMA

Farmakolojik dozda vitamin B6 uyguladığımız deney gurubunda trombositlerin ADP'ye duyarlılığı yaklaşık % 48, epinefrine cevabı % 41 oranında azaldı. Agregometreden elde edilen grafiklere bakıldığında vitamin B6'nın trombosit agregasyonu azaltıcı etkisini salgı reaksiyonu(sekonder agregasyon) inhibe ederek gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu bulgular Subbaro ve arkadaşları(67) ile Kornecki ve arkadaşlarının(37) daha önce yapmış oldukları çalışmaları destekler niteliktedir. Bununla birlikte vitamin B6'nın trombosit agregasyonuna etkili olmadığını bildiren Schoene ve arkadaşları(64) ile Packham ve arkadaşlarının(55) araştırmaları ile uyum göstermektedir. Bu konuda literatür bilgilerinin çelişkili olması kesin kanıya varmayı güçleştirmektedir.

Maymun, köpek, sıçan ve tavşanlarda deneysel vitamin B6 eksikliği trombozis ve aterosklerotik lezyonlara yol açar(26,61). Yüksek dozda metiyonin veya homosistein ile tavşanlarda ortaya çıkan pulmoner emboli ve öldürücü trombozis vitamin B6 ile önlenmektedir(48). Kalıtsal homosisteinüria' da vasküler trombozis, tromboembolizm, ateroskleroz komplikasyonlarında bulunur. Bu hastaların vitamin B6 veya pyridoxal phosphat ile tedavi edilebildiği klinik çalışmalarla gösterilmiştir(37).

Kadınlarda oral kontraseptif kullanımının vitamin B6 eksikliğine yol açtığı, trombozis ve ateroskleroz riskini arttırdığı bilinmektedir. Bu bilgiler vitamin B6'nın trombosit agregasyonunu inhibe edebileceği düşüncesini kuvvetlendirici niteliktedir. Bizim çalışmamızda da vitamin B6'nın ADP ve epinefrin ile oluşan trombosit agregasyonunu azalttığı görüldü.

Tablo II'de görüldüğü gibi vitamin B6 trombosit sayısını etkilemeden kanama zamanını önemli ölçüde uzatmaktadır. Kanama zamanının uzamış olmakla birlikte fizyolojik sınırı aşmadığı görülmektedir. Aynı şekilde koagülasyon zamanının da 4 haftalık vitamin B6 tedavisi ile anlamlı olarak uzadığı ve fizyolojik değeri aşmadığı anlaşılmaktadır. Bu konudaki literatür bilgileri de çelişkilidir. Sonuçlarımız Hagen ve arkadaşları ile Schoene ve arkadaşlarının çalışmaları(64) ile uyum göstermemekte, Subbaro ve arkadaşlarının (67) araştırmalarını teyid etmektedir. Kanama ve koagülasyon zamanının vasküler nedenler, trombositopeni, trombositlerin fonksiyonel yetersizliği(kalitatif bozukluklar) ve koagülasyon faktörlerinin eksikliğine bağlı olarak uzadığı bilinmektedir. Vitamin B6'nın vasküler bozukluklara ve trombositopeniye yol açtığı gösterilmiş değildir. Kaldığı vitamin B6 eksikliğinde damarın elastik lifleri sentezlenememektedir(49). Çalışmamızda vitamin B6 alan deneklerde peteşi ve ekimoz şeklinde hemorajik belirtilerin görülmeşi kanama zamanındaki artışın vasküler nedene bağlı olamayacağını gösterir kanısındayız. Bununla birlikte vitamin B6'nın trombositopeniye yol açmadığı sonuçlarımızdan anlaşılmaktadır. Klinik deneyler trombositlerin agregasyon yetersizliğinde kanama zamanının uzadığını göstermiştir(31). Literatürden edindiğimiz bilgileri ve bulgularımızı dikkate alarak vitamin B6'nın kanama zamanını arttırıcı

etkisinin trombositlerin agregasyon ve subendotelyuma yapışma (addezyon) yeteneklerini azaltmasına bağlı olabileceğini söylemek mümkündür.

Plazma lipidlerinin düzeyi ve bileşimi trombositlerin fonksiyonlarını etkiler(19). Hiperkolesterolemik kişilerde özellikle plazma total kolesterol / HDL-kolesterol oranı artmış olanlarda trombositlerin agonistlere duyarlılığı artar(16). Bunun tersi de doğrudur. HDL-kolesterol düzeyinin artması ve total kolesterol düzeyinin azalması trombosit agregasyonuna azaltıcı yönde etki eder(19). Çalışmamızda vitamin B6 alan kişilerin plazma total lipid ve total kolesterol düzeyleri anlamlı olarak azalırken HDL-kolesterol düzeyinde önemli artış görüldü(Tablo III). Aynı kişilerde trombositlerin ADP ve epinefrine duyarlılığının azalmış olması bulgularımızın birbiriyle uyum içinde olduğunu göstermektedir.

Çinko iyonlarının trombositlerde salgı reaksiyonu ve agregasyonu inhibe ettiği Chvapil ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir(14). Esansiyel bir iz element olan çinkonun biyolojik membranları stabilize ettiği dolayısıyla hücrenin fonksiyonlarını etkilediği pek çok çalışma ile gösterilmiştir(13,15). Bu çalışmada vitamin B6'nın serum çinkosunu önemli ölçüde arttırdığı gözlemlendi. Vitamin B6'nın çinko metabolizmasına etkisi oldukça yeni bir araştırma konusudur. Son yıllarda yapılan bir kaç çalışmanın sonuçlarına bakılacak olursa çelişkiler görülür. Bir kısım araştırmacılara göre vitamin B6 plazma çinkosunu ve çinkonun dokulara girişini arttırmakta(21) diğerlerine göre idrar ve feçes yolu ile çinko atılımını arttırarak plazma çinkosunu düşürmektedir.

Her iki durumda da trombosit fonksiyonlarında değişiklik olabileceği bir gerçektir.

Plazma inko düzeyindeki artışın trombosit agregasyonunu inhibe .  
edeceği dikkate alınırrsa vitamin B6'nın dolaylı yoldan trombosit  
agregasyonunu etkiliyebileceği ortaya çıkar. Araştırmamızın sonuç-  
ları bu düşünceyi destekler niteliktedir.

Sonuç olarak diyebiliriz ki plazma total kolesterol düzeyini  
azaltan, HDL-kolesterol ve plazma çinko düzeyini arttıran, dolaylı  
olarak trombosit agregasyonunu inhibe eden, kanama ve koagülasyon  
zamanını fizyolojik sınırlar içinde arttıran vitamin B6, trombosit  
agregasyonunda fizyolojik bir inhibitör olabilir.





## ÖZET

Bu çalışmada vitamin B6'nın trombosit agregasyonuna etkisi araştırıldı. Yaşları 19-24 arasında değişen 24 sağlıklı erkek denek eşit sayıda iki guruba ayrıldı. Deney gurubuna 5mg/kg/gün vitamin B6 tek doz halinde oral olarak 4 hafta süreyle uygulandı. Kontrol gurubuna plasebo verildi.

ADP ile oluşan trombosit agregasyonuna kontrol gurubunda plasebonun herhangi bir etkisi görülmedi. Vitamin B6 uygulanan deney gurubunda ise trombositlerin ADP'ye cevabı %48 oranında azaldığı belirlendi ( $P < 0,001$ ).

Vitamin B6 tedavisi trombositlerin epinefrine cevabını da etkiledi. Kontrol gurubunda tedavi öncesi ve sonrasında trombositlerin epinefrine duyarlılığı önemli bir değişiklik göstermediği halde deney gurubunda tedavi sonrası trombositlerin epinefrine karşı agregasyon cevabı %41 oranında azaldı ( $P < 0,001$ ).

Kanama ve pıhtılaşma zamanı vitamin B6 tedavisinden etkilendi. Kontrol gurubunda kanama zamanı plasebo uygulanmadan önce  $78,75 \pm 9,32$  saniye, plasebo uygulandıktan sonra  $80,00 \pm 9,77$  saniye olarak belirlendi. Deney gurubunda tedavi öncesi  $79,58 \pm 10,13$  saniye olan kanama zamanı tedavi sonrasında  $110,00 \pm 6,26$  saniye olarak belirlendi. Bu bulgular 4 haftalık vitamin B6 tedavisinin kanama zamanını önemli ölçüde artırdığını göstermektedir. ( $P < 0,001$ ).

Kontrol ve deney gurubları arasında trombosit sayıları yönünden önemli bir farklılık bulunmadı. Böylece vitamin B6'nın trombosit sayısını etkilemeden agregasyonu azaltarak kanama zamanını uzattığı kanısındayız. Bununla birlikte pıhtılaşma zamanının

vitamin B6 tedavisi ile anlamlı olarak uzadığı deney gurubu sonuçlarından anlaşılmaktadır.

Serum total lipid ve total kolesterol düzeylerinin farmakolojik dozda vitamin B6 ile önemli ölçüde azaldığı, HDL-Kolesterol düzeyinin ise anlamlı olarak yükseldiği belirlendi( $P < 0,001$ ).

Çalışmamızda vitamin B6'nın serum çinkosunu etkilediği görüldü. Vitamin B6 alan deney gurubunda serum çinko düzeyi önemli ölçüde arttı( $P < 0,001$ ).

Sonuç olarak vitamin B6'nın trombosit agregasyonunu inhibe edici nitelikte olduğu ve bu etkisini trombosit fonksiyonlarını doğrudan ilgilendiren plazma lipidleri ile plazma çinkosunun düzeyini değiştirerek gösterdiği kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

- 1- Asatoor, AM.: The effect of pyridoxine deficiency on intestinal absorbtion of amino acids and peptides in the rat. Br. J. Nutr. 28: 417, 1972.
- 2- Audet, A., Lupien, PJ.: Triglyceride metabolism in pyridoxine-deficient rats. J. Nutr. 104: 91-100, 1974.
- 3- Avery, MD., Lupien, PJ.: Cholesterol metabolism and vitamin B6 IV. synthesis of cholic acid conjugates in vitamin B6-deficient rats. Canadian Journal of Biochemistry. 49: 1026-1030, 1971.
- 4- Baginski, ES., Epstein, E., Zak, B.: Lipids and lipoproteins in Grandwhal's clinical laboratory methods and diagnosis. 1: Ed. bys; AC. Sonnen-Wirth and L. Jarret, 8 th Ed, St. louis, The C.V. Mosby comp. pp:272-304, 1980.
- 5- Baker, EM. et al: Vitamin B6 requirement for adult men. Am. J. Clin. Nutr. 15: 59, 1964.
- 6- Bennett, JS. and Vilaire, G.: Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. J. Clin. Invest. 64: 1393, 1979.
- 7- Bettger, WJ., Fish, TJ. and O'Dell, BL.: Effects of copper and zinc status of rats on erythrocyte stability and superoxide dismutase activity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 279-282, 1978.

- 8- Bettger, WJ., Fernandez, MS. and O'Dell, BL.: Effect of zinc deficiency on the zinc content of rat red cell membranes. Fed. Proc. 39: 3307, 1980.
- 9- Bettger, WJ. and O'Dell, BL.: A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. Life Science, 28(13): 1438-1452, 1982.
- 10- Born, GVR.: Aggregation of blood platelets by ADP and its reversal. Nature(London), 194: 927, 1962.
- 11- Bressler, NM., Brockman, MJ. and Marcus, AJ.: Concurrent studies of oxygen consumption and aggregation in stimulated human platelets. Blood, 53: 167, 1979.
- 12- Buss, DB., Hamm, MW., Mehansho, H., Henderson, LM.: Transport and metabolism of pyridoxine in the perfused small intestine and the hind limb of the rat. J. Nutr., 110: 1655-1663, 1980.
- 13- Chvapil, M.: New aspects in the biological role of zinc. A stabilizer of macromolecules and biological membranes. Life Science, 19(8): 1041-1043, 1973.
- 14- Chvapil, M., Weldy, PL., Stankova, L., Clark, DS., Zukoski, CF. Inhibitory effect of zinc ions on platelet aggregation and serotonin release reaction. Life Science, 16: 561-572, 1975.
- 15- Chvapil, M.: Effect of zinc on cells and biomembranes. Medical Clinics of North America, 60: 4, 1976.
- 16- Cooper, RA.: Abnormalities of cell membrane fluidity in the pathogenesis of disease. N. Eng. J. Med. 297(7): 371-378, 1987.
- 17- Cornish, HH.: The role of vitamin B6 in the toxicity of hydrazines. Ann. NY Acad. Sci. 166: 136-145, 1969.

- 18- Dempsey, WB., Christensen, HN.: The specific binding of pyridoxal 5-phosphate to bovine plasma albumin. *J. Biol. chem.* 237: 1113-1120, 1962.
- 19- Desai, K., Bagget, C., Bellawy, MF., Mistry, P., Burroughs, AK., Owen, J.: Inhibition of platelet aggregation by abnormal HDL particles in plasma from patients with hepatic cirrhosis. *The Lancet*, April 1: 693-695, 1989.
- 20- Dewel, RA., De Kruyft, B.: The function of sterols in membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 457: 109-132, 1976.
- 21- Evans, GW. and Johnson, EC.: Effect of iron, vitamin B6 and picolinic acid on zinc absorption in the rat. *J. Nutr.* 111: 68-75, 1981.
- 22- Fasella, P.: Pyridoxal phosphate. *Annu. Rev. Biochem.* 36: 185-210, 1967.
- 23- Ganong, WF.: *Review of Medical Physiology*, Thirteenth edition, Apleton and Lange, Norwalk, Connecticut/Los Altos, California, 1987.
- 24- Gerrard, JM. and White, JG.: Prostaglandins and thromboxane: "middlemen" modulating platelet functions in hemostasis and thrombosis. *Prog. Hemost. Thromb.* 4: 87, 1978.
- 25- Gerrard, JM.: Platelet aggregation: cellular regulation and physiologic role. *Hospital Practice*, 15: 89-108, 1988.
- 26- Goswami, A., Sahu, DP.: Polyenoic acid in hypercholesterolaemia induced by pyridoxine deficiency in rats. *Nature*, 187: 786-788, 1960.

- 27- Gökhan, N., Çavuşoğlu, H., Kayserilioğlu, A.: İnsan Fizyolojisi, Sermet Matbaası, İstanbul, 1983.
- 28- Guyton, AC.: Textbook of Medical Physiology, seventh edition, W.B. Saunders company, Philadelphia, London, Toronto, 1986.
- 29- Haut, MJ.: "Thrombogenesis" in Diseases of Blood Vessels.: Horwitz, O., McCombs, P., Roberts, B., Lea and Febiger, pp: 22-58, Philadelphia, 1985.
- 30- Hinse, CM. and Lupien, PJ.: Cholesterol metabolism and vitamin B6. III. The Stimulation of hepatic cholesterologenesis in the vitamin B6-deficient rat. Canadian J. of Biochemistry, 49: 933-935, 1975.
- 31- Holmsen, H.: Physiological functions of platelets. Annals of Medicine, 21: 23-30, 1989.
- 32- Hut, V., Klör, HU., Wechsler, JG. and Ditschuneit, H.: Three different methods for estimating high density lipoprotein cholesterol. Clinica Chimica Acta. 128: 173-176, 1983.
- 33- Jaffe, IA.: The antivitamin B6 effect of penicillamine: clinical and immunological implications. Adv. Biochem. Psychopharmacol. 4: 217-226, 1972.
- 34- Junqueira, LC., Carneiro, J., Long, JA.: Basic Histology, fifth edition, Lange Medical Publications / Los Altos, California, pp: 285-286, 1986.
- 35- Kaplan, KL., et al.: Platelet x-granule proteins: studies on release and subcellular localization. Blood, 53: 604, 1979.
- 36- Korytnyk, W., Fricke, G., Paul, B.: Pyridoxine chemistry. Anal. Biochem. 17: 66, 1966.

- 37- Kornecki, E., Feinberg, H.: Pyridoxal phosphate inhibition of platelet function. *Am. J. Physiol.* 238: H54-H60, 1980.
- 38- Kozik, A., McCormick, DB.: Mecanism of pyridoxine uptake by isolated rat liver cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 229: 187-193, 1984.
- 39- Kruckeberg, WC. and Bewer, GJ.: Zinc inhibition of human erythrocyt membrane ATPase. *Clin. Res.* 25: 578 A, 1977.
- 40- Lam, SC-T., Harfenist, EJ., Packham, MA., Mustard, JF.: Investigation of possible mechanisms of pyridoxal phosphate inhibition of platelet reactions. *Throm. Res.* 20: 633-645, 1980.
- 41- Lee, HH., Prasad, AS., Brewer, GJ., Owyang, C.: Zinc absorbtion in human small intestine. *American Journal of Physiology*, 256: G87-G91, 1989.
- 42- Leeson, TS., Leeson, CR. and Paparo, AA.: Text / Atlas of Histology, W.B.,Saunders company, pp: 211-213, Philadelphia, London, Toronto, 1988.
- 43- Lehninger, AL.: *Biochemistry*, Ed 2. New York, Worth, 1975.
- 44- Loo, G. and Smith, JT.: Effect of pyridoxine deficiency on phospholipid metylation in rat liver microsomes. *Lipids*, 21: 409-412, 1986.
- 45- Lopaciuk, S., et al.: Subcellular distribution of fibrinogen and factor XIII in human blood platelets. *Thromb. Res.* 8: 453, 1976.
- 46- Major, LF. and Goyer, PF.: Effects of disulfiram and pyridoxine on serum cholesterol. *Annals of Internal Medicine*, 88: 53-56, 1978.

- 47- Marguerie, G., Ginsberg, MH., Plow, EF.: Glycoproteins: The fibrinogen receptor. in: Holmsen H, ed. Platelet responses and metabolism, vol III. Boca Raton: CRC Press, pp: 285-296, 1986.
- 48- Mc Cully, KS., Wilson, RB.: Homocystine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis*, 22: 215-217, 1975.
- 49- Merrill, AH., Henderson, JM.: Diseases associated with defects in vitamin B6 metabolism or utilization. *Ann. Rev. Nutr.* 7: 137-156, 1987.
- 50- Nachman, RL., Jaffe, EA. and Weksler, BB.: Immunoinhibition of ristocetin-induced platelet aggregation. *J. Clin. Invest.* 59: 143, 1977.
- 51- Nachmias, VT.: Cytoskeleton of human platelets at rest and after spreading. *J. Cell. Biol.* 86: 795, 1980.
- 52- O'Brien, JR.: Platelet aggregation. *J. Clin. Path.* 15: 446, 1962.
- 53- Özer, A.: Pratik Hematoloji laboratuvar, klinik ve tedavi sh: 129-130, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova-İzmir, 1980.
- 54- Packman, MA. et al.: Release of 14 C-serotonin during initial platelet changes induced by thrombin, collagen, or A23187. *Blood*, 50: 915, 1977.
- 55- Packman, MA., Lam, SCT.: Vitamin B6 as an antithrombotic agent. *Lancet* ii: 809-810, 1981.
- 56- Pal, B.: Oral contraceptives: Metabolic and nutritional effects. *J. Appl. Nutr.* 26: 33, 1974.



- 57- Park, JHY., Grandjean, CJ., Antonson, DL., Vanderhoof, JA.: Effects of isolated zinc deficiency on the composition of skeletal muscle, liver and bone during growth in rats. *J. Nutr.* 116: 610-617, 1986.
- 58- Parker, CJ., Stone, OL., White, VF., Bernshaw, NJ.: Vitronectin (S protein) is associated with platelets. *British Journal of Hematology*, 71: 245-252, 1989.
- 59- Paulose, CS., Dakshinamurti, K., Packer, S. and Stephens, NL.: Sympathetic stimulation and hypertension in the pyridoxine-deficient adult rat. *Hypertension* 11: 387-391, 1988.
- 60- Philips, DR.: An evaluation of membrane glycoproteins in platelet adhesion and aggregation. *Prog. Hemost. Thromb.* 5: 81, 1980.
- 61- Rinehart, JF., Greenberg, LD.: Arteriosclerotic lesions in pyridoxine deficient monkeys. *Am. Pathol.* 25: 481-496, 1949.
- 62- Rippa, M. and Pontremoli, S.: Pyridoxal 5'-phosphate as a specific photosensitizer for histidine residues at the active site of 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 103: 112-118, 1969.
- 63- Schick, PK., Kurica, KB. and Gacko, GK.: Location of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the human platelet plasma membrane. *J. Clin. Invest.* 57: 1221, 1976.
- 64- Schoene, NW., Chanmusgam, P., Reynolds, RD.: Effect of oral vitamin B6 supplementation on in vitro platelet aggregation. *Am. J. Clin. Nutr.* 43: 823-830, 1986.
- 65- Shideler, CE.: Vitamin B6 : An overview. *American Journal of Medical Technology*, 49(1): 17-22, 1983.

- 66- Sies, W.: Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiological Reviews*, 69(1): 58-178, 1989.
- 67- Subaro, K., Kuchibotla, J., Kakkar, VV.: Pyridoxal 5'-phosphate -A new physiological inhibitor of blood coagulation and platelet function. *Biochemical pharmacology*, 28: 531-534, 1978.
- 68- Turrito, VT.: Blood viscosity, mass transport, and thrombogenesis. *Prog. Hemost. Thromb.* 6: 139, 1982.
- 69- Vilter, RW.: The effect of vitamin B6 deficiency induced by desoxy pyridoxine in human beings. *J. Lab. Clin. Med.* 42: 335, 1953.
- 70- Weiss, HJ., de Witte, L., Kaplan, KL. et al.: Heterogeneity in storage pool deficiency: Studies on granule -bound substances in 18 patients including variants deficient in  $\alpha$ -granules, platelet factor 4, B-thromboglobulin and platelet derived growth factor. *Blood*, 54: 1296, 1979.
- 71- White, JG.: Is the canalicular system the equivalent of the muscle sarcoplasmic reticulum? *Haemostasis*, 4: 185, 1975.
- 72- Wolf, H. and Brown, RR.: The effect of tryptophan load and vitamin B6 supplementation on urinary excretion of tryptophan metabolites in human male subjects. *Clinical Science*, 41: 237-248, 1971.
- 73- Zak, B., Epstein, E. and Baginski, EJ.: Lipids and lipoproteins in Grandwhol's clinical laboratory methods and diagnosis. Vol: 1. Ed. by; AC. Sonnen-Wirth and L. Jarret, 8 th ed, St. Louis, The CV. Mosby comp. pp: 272-304, 1980.