

Trombosit Membranında Fibrinolitik Aktivitenin Araştırılması

Kasım ÖZLÜK *
Orhan N. ULUTİN **

ÖZET

Çalışmada trombosit membranında fibrinolitik aktivitenin araştırılması amaçlandı. Trombositler ultrason ile parçalanarak membran parçacıkları elde edildi. Fibrinolitik aktivitesine E.E.Z. (Euglobulin Erime Zamanı) ve Fibrin plak yöntemiyle bakıldı. Membran parçacıkları fosfat tamponu ile çözüldü. Membran çözeltisi kullanılarak ölçtüğümüz fibrinolitik aktivitede her iki yöntemle de anlamlı bir artış görüldü.

SUMMARY

Investigation of the Fibrinolytic Activity in the Platelets Membrane

In this study the fibrinolytic activity in platelets membrane was investigated. The platelets membrane particules were obtained by the ultrasonic destruction. Fibrinolytic activity were analyzed by E.L.T. (Euglobulin Lysis Time) and fibrin plate method. Membrane particules was dissolved in the phosphate buffer. The fibrinolytic activity measured by using the platelets membrane solutions, showed reasonable increase with both method.

Çeşitli faktörlerin etkisiyle oluşan kan pıhtısının parçalanma ve eritilmesine "fibrinolizis" denir. Fibrinolizis işlemi kan pıhtılaşma mekanizmasının fizyolojik devamı sayılabilir. Kan pıhtılaşmasında fibrin oluşur. Fibrinolizis ile fibrin parçalanır.

* Biyolog Uzm.Dr.; U.Ü.T.F. Fizyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi.

** Prof. Dr. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğr. Üyesi.

Kan pıhtılaşması ve pıhtının eritilmesi, özel proteolitik reaksiyonların birbirini izleyen etkileri aracılığıyla olur. Bu iki sistemin ana maddesi yani aktif enzimleri Trombin ve Plazmindir. Bu iki enzim kanda aktif şekillerinde bulunmazlar. Spesifik aktivatörlerle sıratle oluşurlar, fizyolojik işlevlerinin tamamlanmasından sonra inhibitörlerle ortamdandan kaldırılırlar.

Plazmin proteolitik enziminin en iyi substratı fibrindir. Fibrinden başka fibrinojen, faktör II, faktör VII, faktör V gibi pıhtılaşma faktörlerini ve Jelatin, kazein, glukagon ve somatotropin'i parçalar.

Fibrinolitik enzim olan plazminin, onun inaktif öncü maddesi olan plazminojenden aktive olması da proteolitik bir olaydır. Plazminojen molekülündeki Arginine-Valine peptit bağlarının hidrolizle parçalanması plazminojene aktivasyon kazandırarak plazmin şekline dönüştürür ¹.

Plazminojen aktivasyonu iki yolla olur:

1- İntrinsik Plazminojen Aktivasyonu: Faktör VII'nin aktivasyonuyla olur ².
2- Ekstrinsik Plazminojen Aktivasyonu: Aktivatörler yoluyla plazminojenin aktivasyon şeklidir. Plazminojen aktivatörleri doğal olarak;

a- Dolanan kanda "kan aktivatörleri" şeklinde bulunur. Bu aktivatörlerin kaynağının damar endoteli olduğu gösterilmiştir ³.

b- İnsan ve hayvanların değişik dokularında "doku aktivatörleri" şeklinde bulunurlar. Dokuların damarlanma özelliğine göre değişik dokularda değişik konsantrasyonda doku aktivatörleri bulunmuştur ⁴.

c- İdrarda böbrek epitel hücreleri tarafından salgılanan aktivatörler bulunmuştur. Bunlara "Ürokinaz" adı verilir ⁵.

d- Streptokok ve stafilokoklarda "streptokinaze" veya "fibrinolizin" adı verilen aktivatörler bulunmuştur.

e- Ayrıca çeşitli salgılarda ve salgı kanallarının duvarlarında plazminojen aktivatörleri bulunmuştur (süt, gözyaşı, semen, safra).

Canlı organizma normal fizyolojik dengeyi korumak eğilimindedir. Fibrinolisisteki ve koagülasyondaki artmayı reddeder. Plazmada aktivasyon mekanizmalarını çeşitli noktalarda tıkayan inhibitörler bulunmuştur ⁶. Karaciğerin antiplazmin ve inhibitörleri üretmek, aktivatör ve inhibitörleri elimine etmek gibi fibrinolitik sisteme katkısı vardır.

Hücre membranlarının birçok fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları vardır. Koagülasyon mekanizmasında birinci derecede rol oynayan trombositlerin fibrinolitik aktiviteye etkilerinin araştırılması amacıyla, trombosit membranlarında plazminojen aktivatörlerinin varlığının araştırılması amaçlandı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Trombositlerin membranı ayrılacak kan 1/9 oranında EDTA (0,077 M) lı alındı. Fibrinolytic testlerinde kullanılacak test plazması 1/9 oranında sıratlı olarak sağlıklı insanlardan alındı. 3 veya 4 farklı insan plazması karıştırılarak test plazması hazırlandı.

Deneylerin değişik aşamalarında kullanılan tampon çözeltiler:

Plazmadan ayrılan trombositlerin ilk yıkama tamponu; Owren EDTA; 0,031 M Barbital, 0,12 M NaCl, 0,044 M EDTA pH 7.4 (Tampon-1).

Yıkamış trombositleri homojen süspansiyon şekline getirmek için kullanılan tampon; Tris NaCl tamponu: 0,03 M Tris, 0,12 M NaCl, pH 7.4 (Tampon-2).

Trombosit membranlarını homojen süspansiyon yapmak için kullanılan tampon; Fosfat tamponu 0,045 M NaH₂PO₄ · 2H₂O, 0,0046 M KH₂PO₄, 0.10 M NaCl, 0.005 M EDTA pH 7 (Tampon-3).

E.E.Z. tamponu: 0.25 gr. asit borik, 4 gr. boraks, 2.20 gr. NaCl tartılıp distile su ile 1000 ml. ye tamamlanır (Tampon-4).

İmidazol buffer; 90 ml. N/10 HCl, 1.75 gr. imidazol karıştırılıp distile su ile 100 cc. ye tamamlanır. pH 7.2-7.4 (Tampon-5).

Hücrelerin Ayrılması: 1/9 oranında EDTA lı alınan kan 10 dakika bekletildikten sonra 1500 devirde 8 dakika santrifüj edilir. En üsttede trombositten zengin plazma (PRP) toplanır. Trombositten zengin plazma 4500 devirde 10 dakika çevrilir, trombosit çökeleği elde edilir.

Membran Parçacıklarının Eldesi: Trombositlerin membran parçacıkları George ve arkadaşlarının önerdiği yöntemle göre yapıldı ⁷. Trombosit çökeleği tampon 1 ile çözülüp 4500 devirde 10 dakika santrifüj edilerek çöktürülür. Çöken trombositler tampon 2 ile süspansiyon haline getirilir. Süspansiyon olan trombositler 30 saniye aralıkla toplam 60 saniye olmak üzere buz içinde sonik osilasyon yapılır. Sonra soğukta 12.000 devirde sorvay ultrasantrifüjüyle 20 dakika çevrilir. Santrifüjden elde edilen çökelti sağlam kalan trombositleri ve organelleri içerir. Çökelti üzerindeki membran parçacıklarını içeren sıvı alınarak 58.000 devirde 90 dakika soğukta ultrasantrifüjle çevrilerek çöktürülür. Bu membran parçacıkları tampon 3 ile çözülür ve gerekli testler yapılır.

Membranların fibrinolitik aktivitesi, protein konsantrasyonundaki aktivite olarak ölçüldü. Protein konsantrasyonu Lowry yöntemiyle ⁸, fibrinolitik aktivite-leri ise iki yöntemle ölçüldü.

1- E.E.Z. (Euglobulin Erime Zamanı ⁹): 0,45 ml. test plazması, 0,05 ml. membran çözeltisi karıştırılarak 37°C da 5 dakika bekletilir. Üzerine 9,5 ml. 16/100.000 lık asetik asit çözeltisi ilave edilir. Bu karışım 10 dakika 2000 devirde santrifüj edilerek çöktürülür. Çöken kısım öglobulin fraksiyonudur. Çökelti temiz bir bagetle iyice ezilir üzerine 0,25 ml. M/40 M CaCl₂ ilave edilir. Hafifçe sallayarak karışması sağlanır. Karışım 37°C de su havuzuna konur. 1-3 dakikada tüpün içinde pıhtı oluşur. Pıhtı belirli bir zaman sonra erir. Pıhtının oluşumu ile, erimesi arasındaki zaman bize E.E.Z. yi verir.

Kontrol grubu olarak 0,45 ml. test plazmasına 0,05 ml. membran süspansiyon ettiğimiz tampon çözeltiden konarak E.E.Z. sine bakılır.

2-Fibrin Plak Yöntemi ¹⁰: E.E.Z. yöntemiyle elde ettiğimiz öglobulin çözeltisi aynı şekilde elde edilir.

Fibrin plakta oluşturduğumuz standart pıhtı üzerine bu Öglobulin çözeltisinden 0,03 ml. tatbik edilir. 37 derecelik etüvde 24 saat bekletilir. Oluşan erime alanı ölçülerek mm² olarak proteolitik etki alanı hesaplanır. Kontrol grubu olarak test plazmasına, membran çözeltisi yerine kullanılan çözeltiden aynı oranda (0,05 ml) konularak sonuçlar karşılaştırılır.

BULGULAR

Trombosit membranlarının fibrinolitik aktiviteyi arttırdığı anlamlı olarak saptandı. Farklı protein konsantrasyonlarında membranların E.E.Z. yöntemiyle yüzde aktivite değerleri Tablo: 1 de görülmektedir. Kontrol plazmalarda ortalama E.E.Z. $110,2 \pm 6,08$ iken, membran eklenmesiyle ortalama E.E.Z. değeri $56,25 \pm 19,58$

Tablo: I
Trombosit Membranında E.E.Z. ve Fibrin Plak Yöntemiyle
Fibrinolitik Aktivite

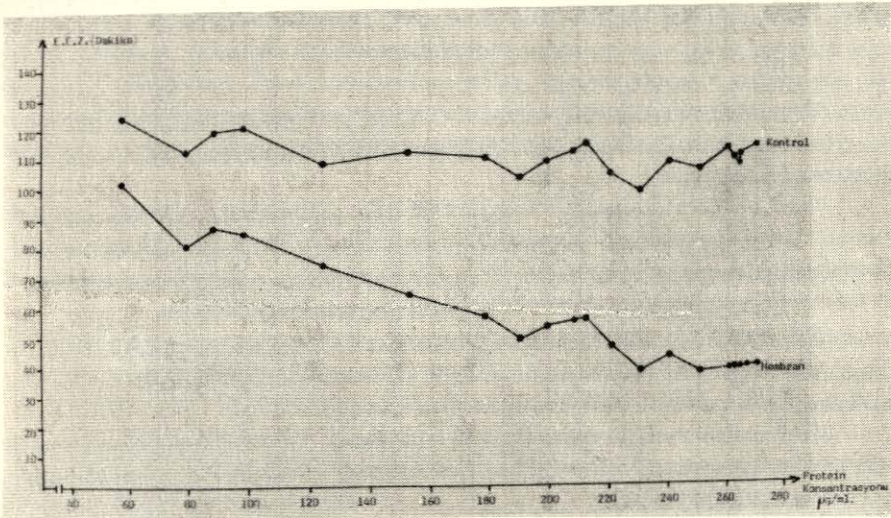
Deney No.	Protein Konsant. $\mu\text{g/ml}$	E.E.Z. (Dakika)			Fibrin Plak (mm^2)		
		Kontrol	Membran	Aktivite %	Kontrol	Membran	Aktivite %
1	190	102	49	51.96	25	81	224
2	179	109	57	47.70	20	60	200
3	240	108	43	60.18	30	110	266.66
4	266	112	40	64.28	25	110	340
5	230	98	38	61.22	25	90	260
6	250	105	38	63.80	25	99	296
7	262	109	39	64.22	25	110	340
8	220	104	46	55.76	25	90	260
9	264	110	39	64.54	25	110	340
10	199	108	53	50.92	20	68	240
11	153	111	64	41.59	30	76	153.33
12	80	112	81	27.67	30	56	86.66
13	58	124	102	17.74	25	42	68
14	264	107	39	63.55	20	99	350
15	270	113	40	64.60	20	110	240
16	208	111	55	50.45	20	72	260
17	89	119	87	26.89	20	49	104.16
18	99	120	85	29.16	30	64	113.33
19	125	108	74	31.48	30	72	140
20	212	114	56	50.87	25	81	224
x	192.9	110.2	56.25	48.95	24.95	82.45	230.82
SD		6.08	19.58		3.63	22.03	
SE		1.36	4.38		0.81	4.92	
t		11.805			3.687		
p		$p < 0,001$			$p < 0,001$		

dakikaya inmiştir. E.E.Z. nin kısalması aktivatör aktivitesinin arttığını göstermektedir. Buradaki % 48.95 lik aktivite artışı istatistik açıdan çok anlamlıdır ($p < 0.001$).

Protein konsantrasyonu ile, E.E.Z. yöntemi ile ölçülen aktivite değerleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Konsantrasyon arttıkça aktivitede artmaktadır (Şekil: 1) (korrelasyon katsayısı: $r = -0.973$, $p < 0.001$).

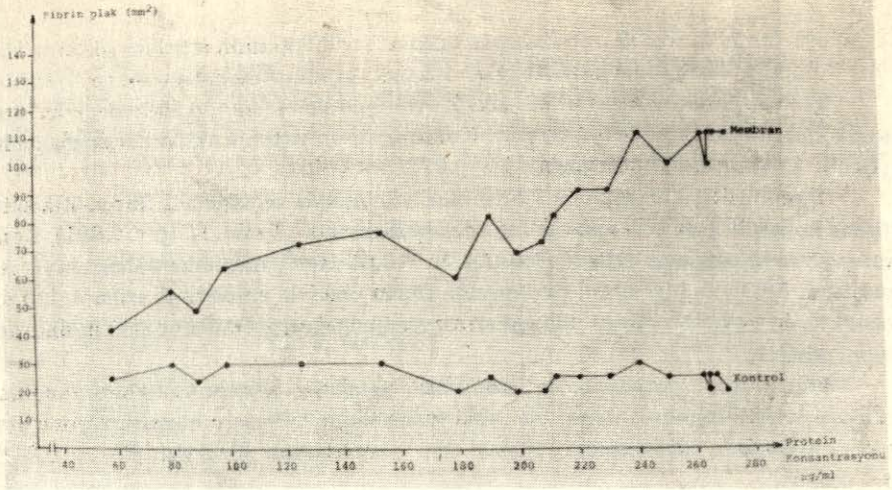
Trombosit membranında fibrin plak yöntemiyle ölçtüğümüz fibrinolitik aktivitede kontrole göre çok anlamlı bir artış saptanmıştır (Tablo: I). ($p < 0.001$). Kontrol grubunda ortalama eritme alanı $24.95 \pm 3.63 \text{ mm}^2$, membran eklenmesiyle ise ortalama $82.24 \pm 4.92 \text{ mm}^2$ dir. Burada fibrin plaktaki erime alanı artışı % 230.82 olarak bulunmuştur. Fibrin plak da erime alanındaki artış aktivatör aktivitesinin arttığını gösterir.

Fibrin plak yöntemiyle de, trombosit membranı protein konsantrasyonu ile, aktivite artışı arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Protein konsantrasyonu arttıkça, aktivitede artmaktadır (Şekil: 1), (korrelasyon katsayısı; $r = +0.951$, $p < 0.001$).



Şekil: 1

Trombosit Membranında, E.E.Z. Yöntemiyle, Protein Konsantrasyonu ve Fibrinolitik Aktivite Arasındaki İlişki. (Korrelasyon Katsayısı; $r = -0.973$, $p < 0.001$)



Şekil: 2
Trombosit Membranında, Fibrin Plak Yöntemiyle, Protein Konsantrasyonu ve Fibrinolitik Aktivite Arasındaki İlişki (Korrelasyon Katsayısı; $r = 0,951$, $p < 0,001$)

TARTIŞMA

Fibrinolitik sistemle ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda, aktivasyon basamakları, plazminojen aktivatör aktivitesi ya da plazmin aktivitesi ölçülerek gösterilmiştir.

Trombositlerin fibrinolitik aktivitesi ile ilgili çalışmalarda daha çok antifibrinolitik etkileri araştırılmış, trombosit membranlarında, konsantre trombosit antiplazminin varlığı gösterilmiştir ^{11, 12, 13}. Ulutin ve Aktulga yaptıkları çalışmalarında trombosit antiplazminin sekrete edilebildiğini göstermişlerdir ¹⁴.

Alkjaersig ¹⁵ trombositten zengin plazma ile oluşturduğu pıhtının, trombositten fakir plazma ile oluşan pıhtıdan daha yavaş eridiğini gözlemiştir. Trombositlerin antifibrinolitik etkilerinin olduğunu ileri sürmüştür.

Bizim çalışmamızda bulgulardan da anlaşılacağı gibi trombosit membranında plazminojen aktivatörleri bulunmuştur. Her iki yöntemle de bulunan sonuçlar birbirini destekler niteliktedir.

Trombositlerin hemostazdaki rolü, bu mekanizmaya pasif olarak katılan eritrositlere göre farklı bulunmaktadır. Trombositler agregasyon, adezyon ve sekresyon yoluyla özellikle arteriyel alanda pıhtıda bir kilit ödevi görürler ¹¹. Trombositler oluşturdukları adacıklarla fibrin ağında artikülasyonlar oluşturmakta, yaralanma esnasında yaptıkları agregasyonla bir tıkaç ödevi görmektedirler. Bu çeşitli fonksiyonlar yanında, konumuzla ilgili olarak sahip oldukları ve salgıladıkları maddeler vardır. Trombosit Faktör III'ü pıhtılaşma olayının değişik noktalarında reaksiyonlara katılmaktadır. Diğer taraftan trombositlerin sahip oldukları trombosit Faktör IV. (anti-heparin faktör) ortamdaki antiheparin III'ü aktive eden heparini nötralize etmekte

ve böylece pıhtı oluşumunu kolaylaştırmaktadır. Trombositlerde ayrıca, salgılanabilir trombinin nötralize eden anti trombin III. ün varlığı gösterilmiş bulunmaktadır¹¹. Trombositler sahip oldukları trombosit fibrinojeni sayesinde, fibrin ağıyla bağ kurabilmekte ve fibrinojen retraksiyonunun yapılabilmesinde görev almaktadır. Bu arada bizim çalışmamızla bağlantı kurabileceğimiz bir bulgu olarak trombositlerde antiplazmin mevcudiyeti gösterilmiştir^{12.13.14}. Salgılanabilen bu faktör pıhtıda, fibrin ağının fibrinolitik sistem tarafından eritilmesini, aynı zamanda aktivatörler tarafından, plazminojenin plazmine çevrilmesiyle oluşan plazmini nötralize etmektedir. Diğer taraftan bizim trombosit membranında göstermiş olduğumuz doku aktivatörü niteliğinde olan plazminojen aktivatörleri, plazminojeni plazmine çevirerek etki etmektedir. Böylece fibrin ağında aynı hücrede birbirine zıt etki eden iki mekanizmanın mevcudiyeti, fizyolojik dengenin devamını sağlamaktadır. Eğer trombosit antiplazminleri azalırse fibrinolitik aktivite etkin olmakta ve pıhtı erimesi kolaylaşmaktadır. Diğer taraftan arteriosklerozda olduğu gibi trombosit antiplazminlerinin artmasıyla pıhtı erimesi güçleşmektedir. Bu bakımdan trombosit membranlarında tesbit ettiğimiz doku aktivatörlerinin, fizyolojik rolü yanında patolojik olaylarda da rolü olmaktadır. Son zamanlarda sadece tromboembolizmde değil, lösemi ve kanser hücrelerinde prokoagülanlar yanında doku aktivatörlerinin varlığı gittikçe önem kazanmaktadır. Bu çalışmalara göre kanserli hücrelerin etrafında pıhtı oluşarak hücreleri bir arada tutmaktadır. Daha sonra pıhtı eritilerek ortama salınan yıkım ürünleri dolaşım sistemiyle diğer dokulara yayılmakta ve oralarda da metastaz yapmaktadır. Fibrinolitik sistem bir taraftan pıhtıyı eriterek kanserin yayılmasına neden olurken, diğer taraftan da yayıldığı dokulardaki aktivatörler pıhtı oluşumunu engelleyerek kanser oluşumunun yayılmasını önlemektedir.

KAYNAKLAR

1. ROBBINS, K.C., SUMMARIA, L., HSIEH, B., SHAH, R.J.: The peptide chains of human plasmin. Mechanism of activation of human plasminogen to plasmin. J Biol Chem, 242: 2333, 1967.
2. CHESTERMAN, C.N.: The fibrinolytic system and haemostasis. Thromb Diath Haemorrh, 34: 368, 1975.
3. TODD, A.S.: The Histological Localization of fibrinolysin activator. J Path Bact, 78: 281, 1959.
4. ALBRECHTSEN, O.K.: The fibrinolytic activity of human tissues. Acta physiol Scand, 39: 284, 1957 b.
5. KJELDGAARD, N.O., PLOUG, J.: Urokinase an activator of plasminogen from human urine. II. Mechanism of plasminogen activation. Biochim Biophys Acta, 24: 289, 1957.
6. RATNOF, O.D., PENSKY, J., OGSTON, D., NOFF, G.B.: The inhibition of plasmin, plasma kalikrein, plasma permeability factor, on the C₁ esterase inhibitor. J Exp Med, 129: 315, 1969.
7. GEORGE, J.N., MORGAN, R.K., LEWIS, P.C.: Studies on platelet plasma membrane IV. Quantitative analysis of platelet membrane glycoproteins by (125_i) diazotised di iodosulfanilic acid Labelling and SDP-Polyacrylamide gel electrophoresis. J Clin Med, 92: 430, 1978.

8. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265, 1951.
9. CHAKRABARTI, R., BIELAWIEC, M., EVANS, J.F., FEARNLEY, G.R.: Metodological Study an a recommended technique for determining the euglobulin lysis time. *J Clin Path*, 21: 698, 1968.
10. ASTRUP, T., MULLERTZ, S.: The fibrin plate metod for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem*, 40: 346, 1952.
11. ULUTİN, O.N.: The Plateletes. Fundamental and clinical applications, Kağıt ve Basım İşleri A.Ş. İstanbul, 1976: 37.
12. KWAAN, H.C.: Inhibitors of fibrinolysis *Throm Res*, 2: 31, 1973.
13. HUME, R.: An inhibitory effect of platelets on fibrinolysis. *Scot Med J*. 3: 479, 1958.
14. ULUTİN, Ş.B., AKTUĞLU, G.: The release of platelet antiplasmin. *New İstanbul Contrib Clin Sci*, 11: 24, 1974.
15. ALKJAERSIG, N.: The antifibrinolytic activity of platelet. *Blood platelet. Henry Ford Hosp. Internat. Symp.* (Ed. Johnson, S.A., Monto, R.W., Horn, R.C., Little, J.R.), Brown Co., Boston 1061: 329-336.

Uzm. Dr. Kasım ÖZLÜK
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
BURSA