

HEPARİN VE BUTAZOLİDİNİN ETKİSİ ALTINDA TROMBOSİTLERDE ULTRASTRÜKTÜREL VE FONKSİYONEL DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ

Gülara HÜSEYİNOVA^a, Ramazan KAYAPINAR^b, Gültekin AZIZOVA^c

ÖZET

Bu çalışmada, heparin ve butazolidinin küçük ve büyük dozlarının etkisiyle trombositlerde ultrastrüktürel ve fonksiyonel değişikliklerin makromoleküler mekanizmalarının incelenmesi amaçlandı.

Heparinin farklı dozlarda trombosit organellerinde hipertrofi ve hiperplaziye neden olduğu, fonksiyonel olarak ise enzim sentezini aktive ettiği, ancak trombosit dış membranlarında kalınlaşma ve organellerde degranülasyon bulunmaması nedeniyle enzim salınımında belirgin azalmaya ya da durmaya neden olduğu gözlemlendi. Buna paralel olarak küçük dozların (500 Ü/Kg) agregasyonda azalmaya, büyük dozların (1000 mg/Kg) ise agregasyonda durmaya neden olduğu saptandı.

Butazolidinin küçük (0,03 mg/Kg) ve büyük dozlarının (0,3mg/Kg) etkisi ile, genellikle trombositlerin organellerinde distrofik, destrüktif, dejeneratif ve nekrobiotik değişiklikler izlendi. Bu değişiklikler de enzim sentezinde bozulma olduğunu göstermektedir. Trombositlerin dış membranlarının bozulması agregasyonun korunduğunu, fakat nispeten azaldığını göstermektedir. Bu sonuçlara göre küçük dozların koagülasyon ve onu izleyen dönemlerde bozulmaya neden olduğu; yüksek dozların ise bu basamakları tamamen durdurduğunu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Heparin, Butazolidin, Trombosit, Ultrastrüktür.

SUMMARY

INVESTIGATION OF FUNCTIONAL AND ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN PLATELETS UNDER THE EFFECTS OF HEPARIN AND BUTAZOLIDIN

In this study, macromolecular mechanisms regarding the functional and ultrastructural changes in platelets effected by either low or high doses of heparin and butazolidin were investigated.

Heparin in different doses proved to induce hypertrophy or hyperplasia in the organelles of the platelets and it also activated enzyme synthesis functionally. The integrity of the outer

^a Uzm. Dr., Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD, EDİRNE

^b Yrd. Doç. Dr., Trakya Üniversitesi Sağlık Hizm. Meslek YO, EDİRNE

^c Uzm. Dr., Bakü, Cer. Klinik ve Araştırma Ens.-AZERBAYCAN

membranes of the platelets or their thickening and lack of degranulation in the organelles resulted in a decrease or a cease in enzyme release. In a parallel fashion, the low doses (500 U/Kg) caused a decrease in aggregation while the high doses (1000 U/Kg) proved to prevent the aggregation.

Butazolidin in either low or high doses induced dystrophic, destructive or necrobiological changes in the organelles of the platelets. It was observed that these changes also deteriorated the enzyme synthesis. Deterioration of the outer membranes of the platelets did cause a relative decrease in aggregation but did not stop it completely. According to these results it was concluded that the low doses of butazolidin interfere with coagulation and the following periods while the high doses prevent it.

Key Words: Heparin, butazolidin, platelet, ultrastructure

GİRİŞ

Hemostaz sürecinde hem damarsal hem de trombosit mekanizmalar rol oynar. Sonuçta; vazospazm, adezyon, agregasyon, koagulasyon ve fibrinoliz olayları gerçekleşir (1). Hemostaz sürecinde trombosit membranı ve enzim sentezi yapan organelleri çok önemlidir. Trombositlerin yapı ve fonksiyonları değişik şekillerde etkilenebilir. Antikoagulan maddeler; hem hemostaz sürecine katılmış olan trombositlerde hem de dolaşımdaki diğer trombositlerde farklı yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açıp hemostazın çeşitli evrelerini etkileyebilirler.

Direkt antikoagulan heparin ve trans trombositler butazolidinin (phenylbutazone) küçük dozlarının trombositler üzerindeki ultrastrüktürel etkileri ile ilgili ön çalışmamızın sonuçlarını 1993 yılında sunmuştuk (2). Bu çalışmada ise; küçük ve büyük dozlarda heparin ve butazolidinin trombosit yapı ve fonksiyonlarına etkileri ve bu etkilerin makromoleküler mekanizmaları araştırıldı.

MATERYAL VE METOD

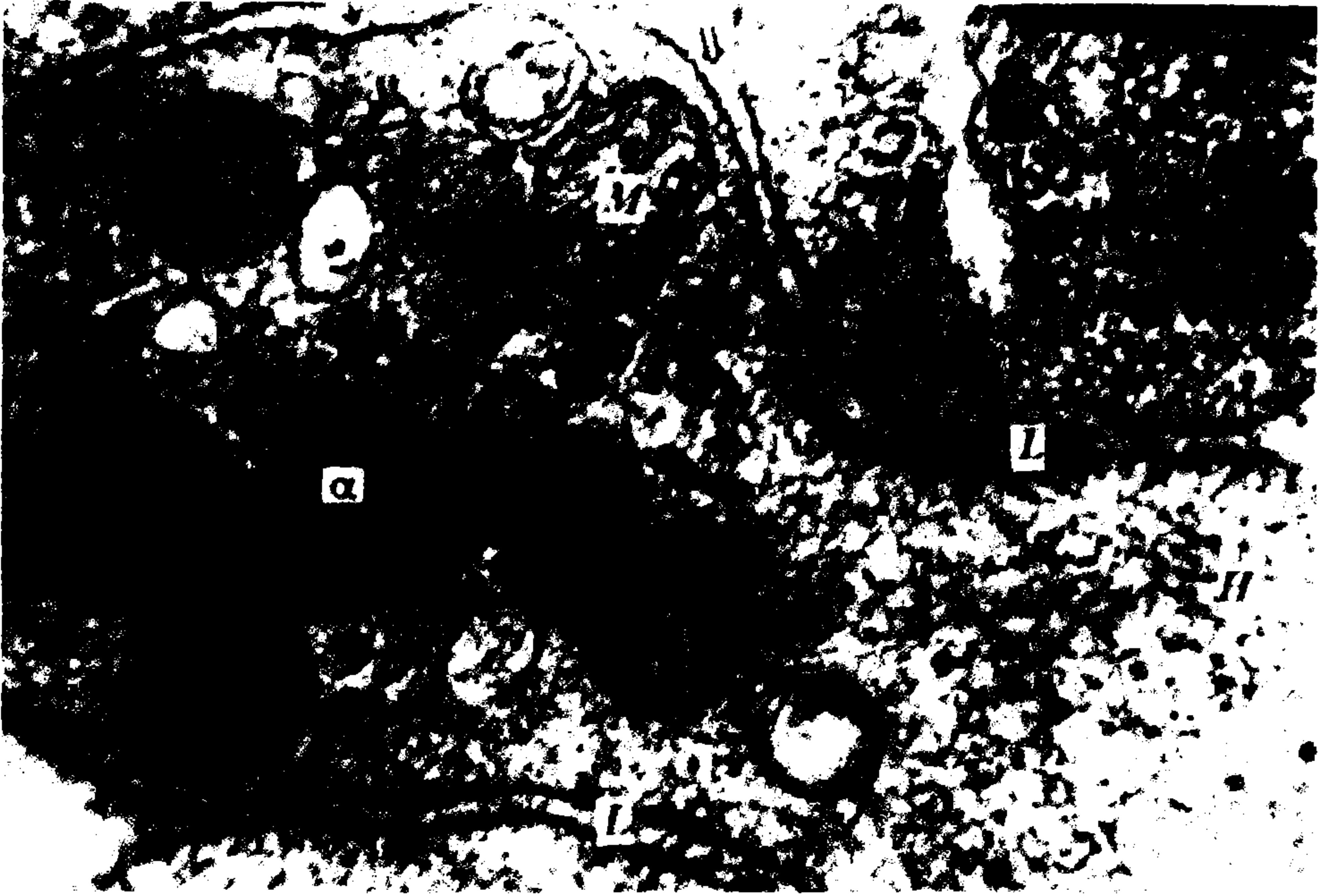
Çalışma, 25 erişkin tavşanda yapıldı. Hayvanlar 5 gruba ayrıldı.

1.grup:5 tavşana 10 gün 500 Ü/kg dozunda (küçük doz) heparin kas içine enjekte edildi.

2.grup:5 tavşana 10 gün 1000 Ü/kg dozunda (büyük doz) heparin kas içine enjekte edildi.

3.grup:5 tavşana 10 gün 0,03 mg/kg dozunda (küçük doz) butazolidin nazogastrik sonda ile mideye verildi.

4.grup:5 tavşana 10 gün 0,3 mg/kg dozunda (büyük doz) butazolidin nazogastrik sonda ile mideye verildi. 5.grup:kontrol olarak değerlendirildi.



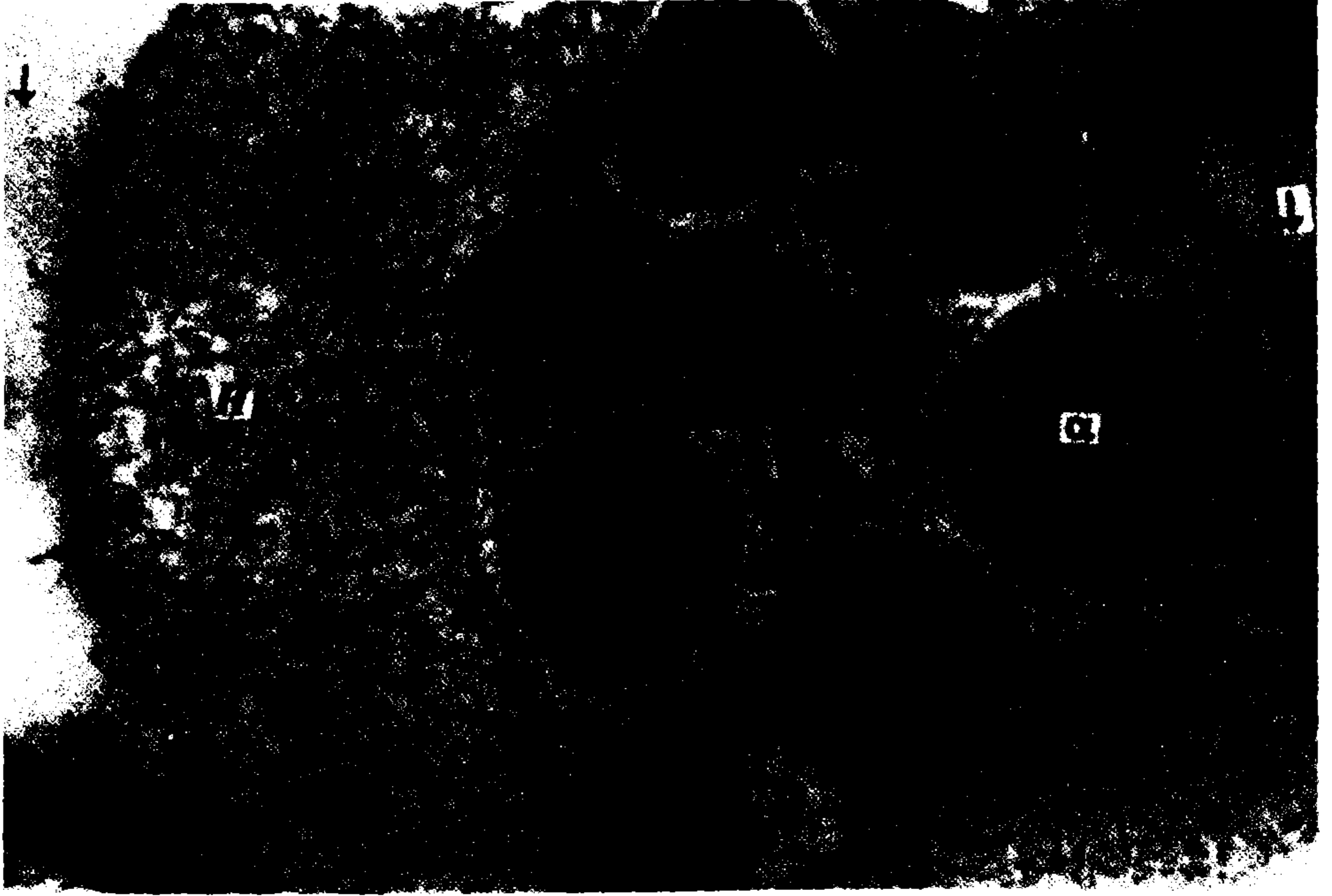
Şekil I. 500 ü/Kg heparin etkisi altında trombositler.

(↓) Elektron-yoğun dış membran, (↓) genişlemiş aralıklar, (L) lipidler (az miktarda), (H) hyalomer yapılarında hiperplazi, (α) α-granüllerin hipertrofisi, (M) normal görünümlü mitokondriler. X.40000.

Onuncu gün sonunda tavşanların kulak marginal veninden kan alınarak trombositler ayrıldı. Trombositler %2.5'lük fosfat tamponlu glutaraldehit prefiksasyonu ve yine tamponlu %1'lik osmium tetraoksit postfiksasyonundan sonra, dehidratasyon yapıldı. Örnekler Epon 812 ile bloklandı, kesitler uranil asetatla ve Reynold'un kurşun boyası ile kontrastlandırılarak JEM-100"B" elektron mikroskobuyla incelendi.

BULGULAR

Birinci grubun elektron mikroskopik incelenmesinde; trombositler genellikle oval ve yuvarlak görünümdeydiler. Bazıları ufak çıkıntılara sahipti. Dış membranlar kalınlaşmış, elektron-yoğun görünmekteydiler. Trombositlerin birbirine dokunduğu yerlerde elektron-yoğun kalın dış membranlar arasında genişleme ve silikleşme tespit edildi. Agregasyon yapmış trombositlerin aralarında birleştirici ara madde (lipidler) az miktardaydı. Hyalomerin yapısı korunmuş, çok belirgin olarak izlenmekteydi; lif yapılar, mikrotübüller ve mikroveziküllerde hiperplazi vardı. Granülomerin α-granülleri genişlemiş, dış membranları ve içindeki mikrogranüller net olarak



Şekil II. 1000 ü/Kg heparin etkisi altında trombositler.

(↓) Aralıkların genişlemesi, (H) hyalomer bölgelerde liflerin, mikrotübüllerin, mikrovesiküllerin hiperplazisi, (α) α-granüllerinin hipertrofisi. X.42000.

izlenmekteydi. Bazı α-granüllerinde hipertrofi ve hiperplazi dikkati çekmekteydi. Bunun yanısıra mitokondriler genişlemiş, matriksleri, dış membranları ve kristalleri korunmaktaydı. Bazı mitokondrilerde ise krista dezorganizasyonu ve fragmentasyonu şeklinde reversibl değişiklikler izlenmekteydi (şekil I).

İkinci grubun elektron mikroskopik incelenmesinde; trombositler genellikle oval şekilli ve genişlemiş idiler. Dış membranların daha fazla kalınlaşmış olduğu net olarak izlenmekteydi. Trombositler arasında genişleme artmış, birleştirici ara madde kaybolmuştu. Hyalomer ve granülomer bölümlerde çok belirgin aktivasyon dikkati çekmekteydi, hipertrofi ve hiperplazi olayları artmıştı (Şekil II). Bazı trombositlerde dev görünümlü α-granüller dikkati çekmekteydi (Şekil III).

Üçüncü grubun elektron mikroskopik incelenmesinde; trombositler genellikle oval ve yuvarlak görünümde ve çıkıntılar kaybolmuştu. Dış membranlar bazılarında parçalanmış, bazılarında ise korunmuştu. Trombositlerin kümelendiği yerlerde aralıklar daralmış, bazı yerlerde ise görünmemekteydi ve hiyaloplazmanın lipoprotein komplekslerinin lipidleri ile doldurulmuş idiler. Buna göre kümeleşmiş trombositler birbiri ile sıkıca yapışmaktaydılar. Hyalomer bölümlerde belirgin silikleşme dikkati

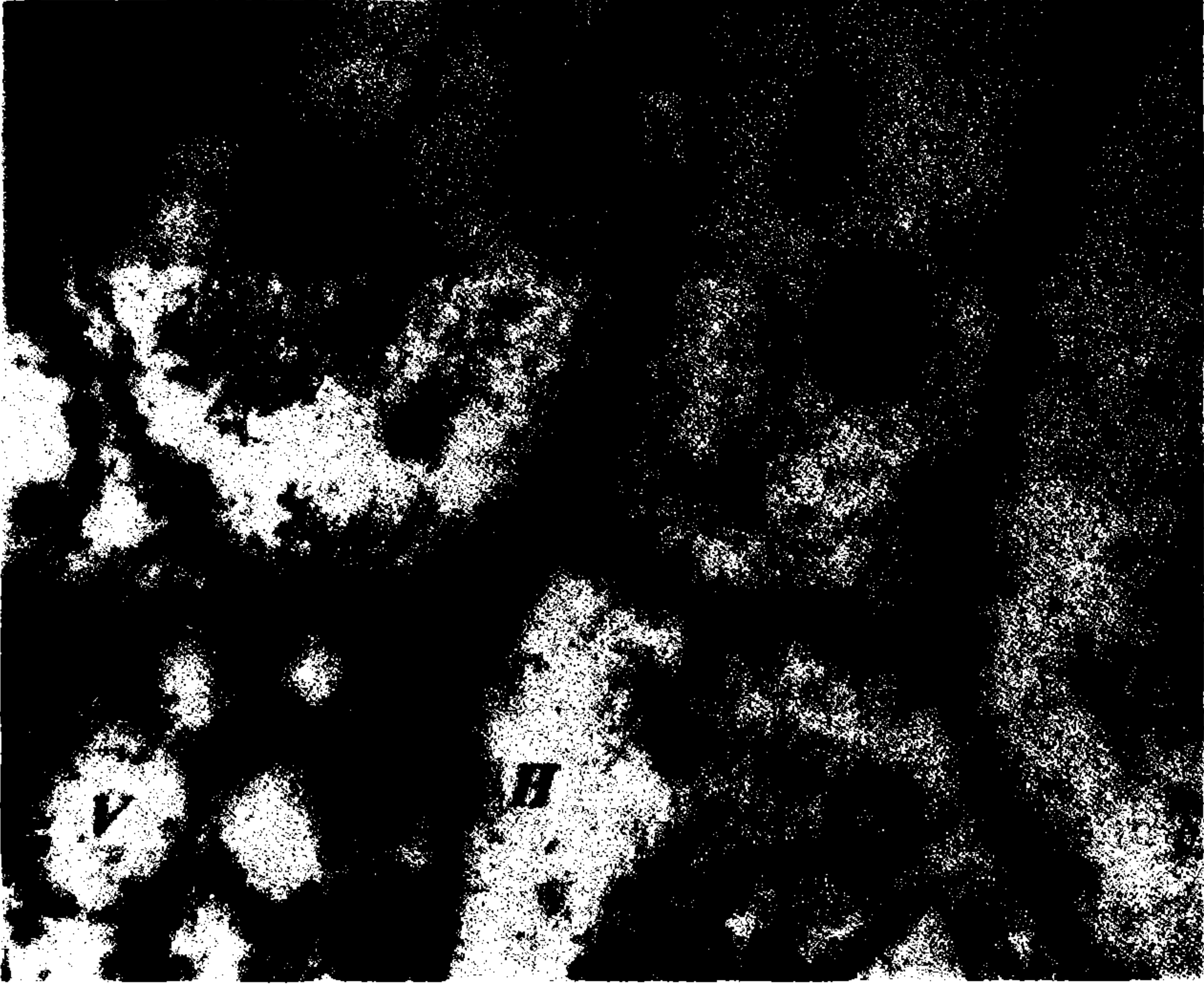


Şekil III. 1000 ü/Kg heparin etkisi altında trombositler.
(↓) Elektron-yoğun dış membranlar, (α) dev görünümlü α-granül. X.40000.

çekmekteydi. Hyalomer maddelerin fragmentasyonu sonucu parçalanmış lifler mevcuttu. Granülomerde bazı α-granüllerin parçalanmış olduğu saptandı. Çoğunun dış membranlarında destrüksiyon, matrikslerinde silikleşme ve mikrogranüllerin kaybolması dikkati çekmekteydi. Bazı trombositlerin merkez granülomer bölümlerinde distrofik değişiklikleri karakterize eden büyük vakuoller gözlemlendi. Bunun yanısıra bu trombositlerde mitokondrilerin matriksleri silikleşmiş, kristalar destrüksiyona ve dezorganizasyona uğramış, bazılarında ise kaybolmuştu (Şekil IV-V).

Dördüncü grubun elektron mikroskopik incelenmesinde; trombositlerin çoğunda derin destrüktif, dejeneratif ve nekrobiyotik değişiklikler izlendi. Dış membranlar bozulmuş ve net olarak görünmemekteydiler. Hyalomer ve granülomer bölümlerin yapıları parçalanmış, büyük vakuollere dönüşmüş ve dejenere olmuş gibi irreversibl değişiklikler izlenmekteydi (Şekil VI).

Kontrol grubunda ise; trombositler normal oval şekilliydiler ve bazılarında çıkıntılar vardı. Özellikle değişiklikler görünmemekteydi (Şekil VII).



Şekil IV. 0,03 mg/Kg butazolidin etkisi altında trombositler.

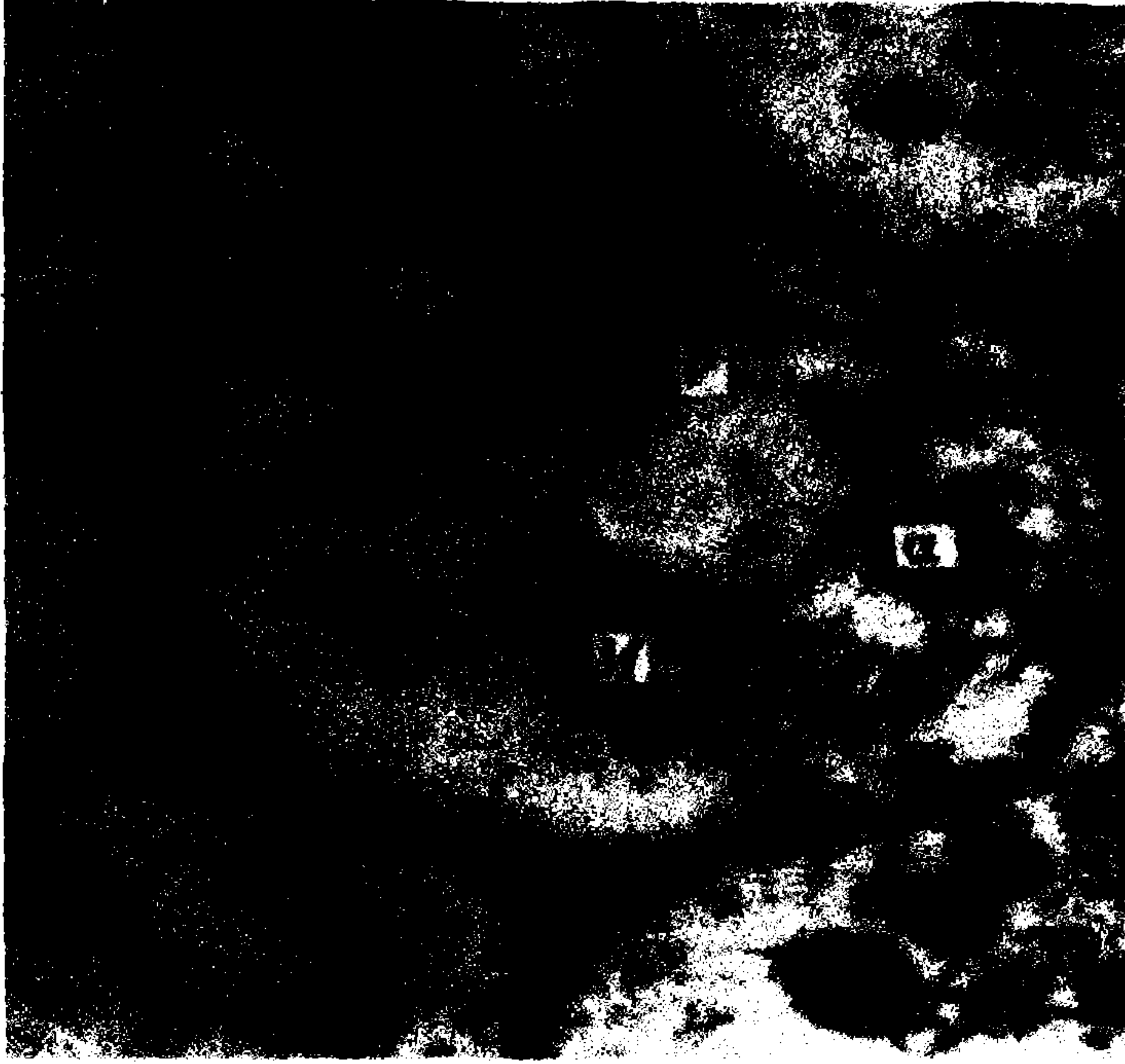
(↓) Aralıklar daralmış ve lipidlerle dolmuş, (H) hyalomer bölgelerde silikleşme, yapıların parçalanması ve kaybolması, (V) granülomer bölgelerde vakuoller.X.25000.

TARTIŞMA

Bilindiği gibi hemostaz patogeneğinde damar zedelenmesiyle beraber trombositlerin içindeki olayların da rolü çok önemlidir (1, 3). Bazı faktörlerin etkisiyle trombositlerde meydana gelen değişiklikler hemostaz dönemlerini değiştirmektedir (4, 5).

Bizim ultrastrüktürel bulgularımız; küçük ve büyük dozda direkt heparin ve trans trombositler butazolidinin etkisi altında trombositlerde meydana gelen değişikliklerin makromoleküler mekanizmalarını göstermektedir ve ultrastrüktürel değişiklikleri fonksiyonel değişikliklerle ilişkilendirmektedir.

Kontrol grubunun incelenmesiyle, trombositlerde normal fizyolojik olaylar görüldü. Trombositlerin hyalomerinden lipoprotein komplekslerin lipidleri dışarı



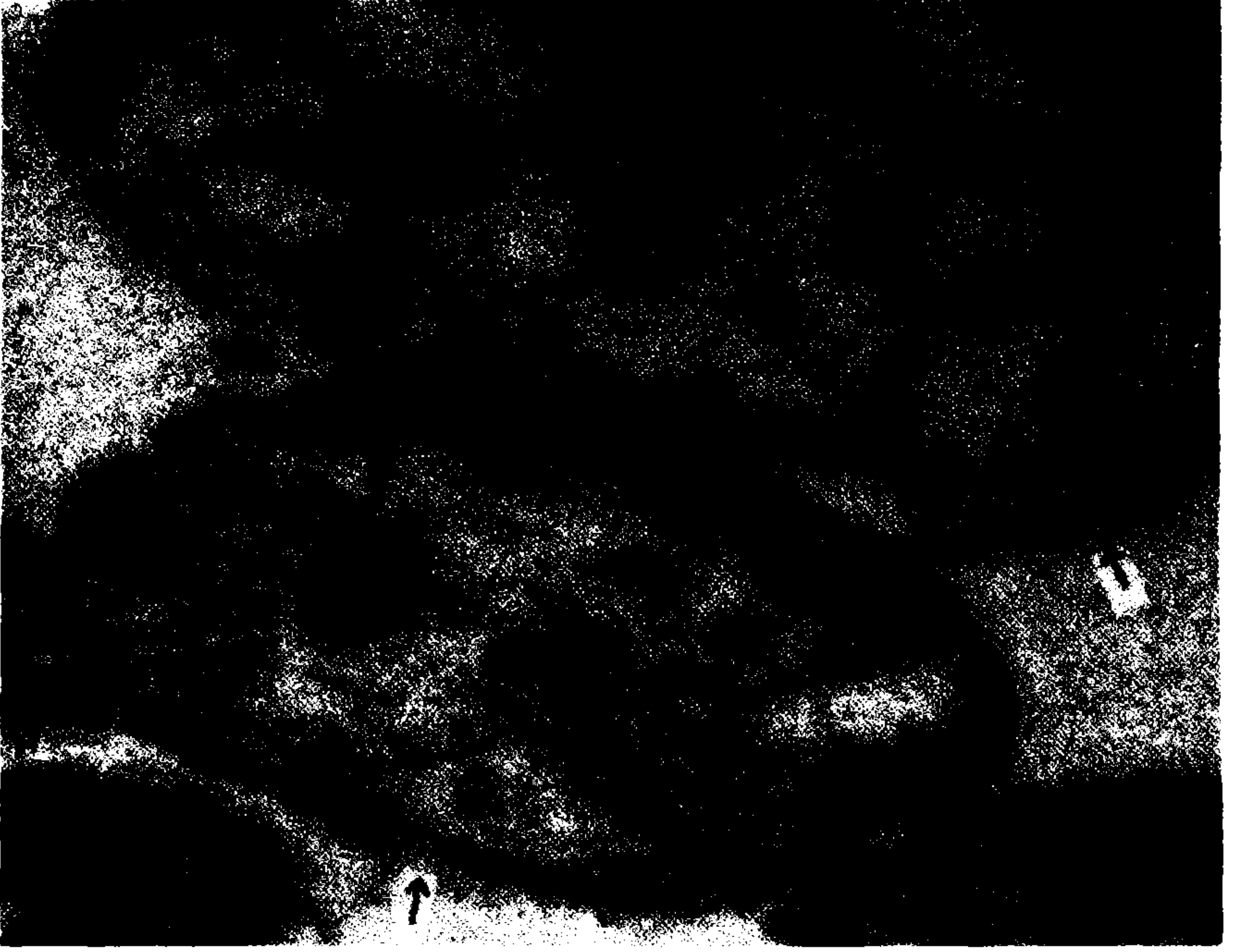
Şekil V. 0.3 mg/Kg butazolidin etkisi altında trombositler.

(↓) Aralıklar kaybolmuş, (M) mitokondrilerde ve (α) α-granüllerde dejeneratif değişiklikler, (V) vakuol. X.28000.

çıkarmakta ve birleştirici madde gibi trombositler arasına yerleşmekteydi. Böylece agregasyon dönemi normal olarak başlamaktaydı. Bunu da granülomerde degranulasyon izlemekteydi. Fonksiyonel olarak degranulasyon ve trombositlerdeki bozukluklara göre serotonin, retraktozim, tromboplastin faktörü ve diğerleri dışarı çıkmaktaydılar ve hemostaz dönemlerinin devamı oluşmaktaydı.

Heparinin küçük dozunun etkisi altında trombositlerin aktivasyonu artmaktadır. Yani hyalomer ve granülomerde oluşan hiperplazi ve hipertrofi olayları fonksiyonel olarak lipoprotein, serotonin, retraktozim, diğer enzimler ve ATP nin artmasını göstermektedir. Fakat trombositlerin dış membranlarının kalınlaşmasına bakılırsa bu enzimler dışarı daha az miktarda çıkmaktadır. Trombositlerin kümeleştiği yerlerde trombositler arası aralıklar genişlemekte ve aralıklarda birleştirici madde azalmaktadır. Demek ki agregasyon bozulmaktadır.

Heparinin büyük dozunun etkisi altında hyalomer ve granülomerde aktivasyonun daha fazla olduğu izlenmekteydi. Dev α-granüllerin izlenmesi, mitokondrilerin hipertrofisi ve hiperplazisi, enzimlerin aşırı olduğunu göstermekteydi. Trombositlerin



Şekil VI. 0.3 mg/Kg butazolidin etkisi altında trombositler.

(↓) Bozulmuş dış membranlar net olarak görülmektedir; hyalomer ve granülomer bölümlerde belirgin olarak derin destrüktif ve dejeneratif değişiklikler. X.25000.

dış membran bütünlüğünün korunması, kalınlaşması, trombositler arası aralıkların genişlemesi ve lipidlerin kaybolması agregasyon döneminin de kaybolduğunu göstermektedir.

Pyrazolon türevi, antiinflamatuvar ilaçlardan biri olan Butazolidinin lökopeni trombopeni ve anemi gibi hematolojik bozukluklar meydana getirdiği bildirilmektedir (6, 7). Butazolidinin direkt antikoagulanlarla kullanılması hemoraji komplikasyonunu artırabilir. Buna göre butazolidinin trombositlere etkisinin incelenmesi çok önemlidir.

Bizim bulgularımıza göre butazolidinin küçük dozlarının etkisi ile trombositlerde distrofik ve destrüktif değişiklikler meydana gelmişti. Yüksek dozlarda ise daha derin destrüktif, dejeneratif ve nekrobiotik olaylar görülmüştü. Destruksiyona bağlı olarak trombositlerin çoğunun dış membranları bozulmakta, hyalomer lipidleri dışarı çıkmaktaydı. Buna bağlı olarak trombositler arası aralıklar daralarak lipidlerle dolaktaydı. Büyük dozların kullanılması bu değişiklikleri daha da belirginleştirmekteydi. Demek oluyor ki butazolidinin her iki dozunda da agregasyon dönemi korunmaktadır. Bunun yanısıra granülomerde ultrastürüktürel izlenen distrofik



Şekil VII. Kontrol grubunda adezyon durumunda normal trombositler. X.12000.

destruktif, dejeneratif değişiklikler fonksiyonel olarak enzimlerin aktivitesini küçük dozlarda azaltmakta, büyük dozlarda ise yok etmektedir. Bize göre enzimlerin oluşmasının azalması ve kaybolmasına bağlı olarak agregasyon dönemini takiben diğer dönemler bozulmaktadır.

Sonuç olarak; ultrastrüktürel düzeyde direkt heparinin etkisi altında hemostaz sürecinde trombosit agregasyonu başlamamaktadır. Trans-trombositler butazolidinin etkisiyle ise agregasyonun başladığı, fakat serotonin, tromboplastin faktörü, retraktozim ve ATP sentezinin azalmasına yada bozulmasına bağlı olarak devam etmediği saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Cotran RS, Kumar V, Robbins LS. Robbins Pathologic basis of disease. 4th edit. Philadelphia, WB Saunders Company pp 93-99 1989.

2. Hüseynova G, Mahmudova G. *Antikoagulanların etkisi altında trombositlerin ultrastrüktürel değişiklikleri*. XI.Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, s 20-22,8-10 Eylül 1993.
3. Serov VV, Paukov VS. *Ultrastrukturmaya Patologiya Moskva Izdatelstvo "Medizina". pp73-84, 1975.*
4. Kinlough-Rathbone, RL; Packham MA; Perry DW. *Lack of stability of aggregates after, thrombin-induced reaggregation of thrombin-degranulated platelets*. Thromb-Haemost 67 (4):pp 453-457, 1992.
5. Belitzer NV; Aneshekuk MG. *Role of exogenous fibrinogen in the processes of degranulation of thrombocytes stimulated with thrombin. Ultrastructural study using. Fibrinogen labeled with colloidal gold*. Tsitol-Genet 26 (1):pp3-8 1992.
6. Insel PA. *Analgesic-antipyretics and antiinflammatory agents; Drugs employed in the treatment of rheumatoid arthritis and gout*. In: Goodman and Gilman's, eds. *The pharmacological basis of therapeutics*, Vol 1, chapter 26. 8th int. edit. Mc Graw-Hill Book Company. pp 654-655, 1992.
7. Dökmeci İ. *Farmakoloji, ilaç uygulamalarında temel kavramlar*. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. s616-619, 1992.