

## Adenozin difosfat ile uyarılan trombositlerde Kaspaz-3 gen anlatımı

### *Caspase-3 gene expression in adenosine diphosphate stimulated platelets*

Özge Çevik<sup>1</sup>, Zelal Adıgüzel<sup>2</sup>, Ahmet Tarık Baykal<sup>2</sup>, Azize Şener<sup>3</sup>

#### ÖZET

**Amaç:** Trombositler kemik iliğinde megakaryositlerin farklılaşması sonucunda meydana gelen, pıhtılaşmada görev alan kan hücreleri olarak bilinirler. Dolaşımında birkaç günlük ömrü olan trombositler plazmada trombin, kollagen, adenozin difosfat (ADP) ve epinefrin gibi çeşitli uyarıcılarla karşı farklı sinyaller vererek agregre olurlar. Çekirdeksiz hücre olarak bilinmelerine karşın trombositlerin apoptoza uğradıkları yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmada ADP'nin trombositler üzerindeki apoptotik etkisi araştırılmıştır.

**Gereç ve yöntem:** Trombositler 10µM ADP ile 37°C de 1 saat inkübe edilmiştir. Trombositlerde akım sitometride p-selektin bağlanması, fluorometre ile kalsiyum düzeyleri, ELISA ile sitokrom-c düzeyleri, qRT-PCR ile kaspaz-3 gen ekspresyonu, Western blot ile kaspaz-3 salınımı ölçülmüştür.

**Bulgular:** ADP ile uyarılan trombositlerde p-selektin, kalsiyum, sitokrom-c, kaspaz-3 salınımı ve gen ekspresyonu artmıştır.

**Sonuç:** Trombositler ADP ile uyarıldıkları zaman apoptotik yolda anahtar enzim olan kaspaz-3 gen anlatımını yapabilirler.

**Anahtar kelimeler:** Trombositler, kaspaz-3, qRT-PCR, P-selektin, ADP

#### GİRİŞ

Trombositler kemik iliğinin en büyük hematopoetik hücresi olan megakaryositlerin olgunlaşması sürecinde meydana gelirler.<sup>1</sup> Olgunlaşan megakaryositler yüzey olarak çok fazla yaygınlaşırlar ve parçalanma sürecine girerler. Her megakaryosit başına yaklaşık 2000-5000 trombosit serbest kalır.<sup>2</sup> Megakaryositopoez ve trombosit üretimi süreci kemik iliği mikroçevresinde bulunan kemokin ve sitokinler gibi birçok faktörün bir araya gelmesi ile oluşur.<sup>3</sup> Her gün sirkülasyonda 10<sup>11</sup> trombosit üretilir

#### ABSTRACT

**Objectives:** Platelets are known blood cells differentiated from megakaryocytes in bone marrow and they play a key role in coagulation mechanism. They live several days in blood circulation and they aggregate in respond to stimulants such as thrombin, collagen, ADP (adenosine diphosphate) and epinephrine. Although platelets are known anucleated cells, it has been reported in vivo and in vitro that they undergo to apoptosis. In this study apoptotic effects of ADP on the platelets was investigated.

**Materials and methods:** P-selectin binding with flowcytometry, calcium levels with fluorometer, cytochrome-c levels with ELISA, caspase-3 gene expression with qRT-PCR, caspase-3 releasing with western blotting were determined in platelets.

**Results:** Platelets were incubated for 1 hour at 37°C with 10µM ADP. P-selectin binding, calcium and cytochrome-c levels, caspase-3 releasing and gene expression are significantly increased compared to control in ADP stimulated platelets.

**Conclusions:** Platelets can induce caspase-3 gene expression when stimulated with ADP which is a key enzyme plays an important role in apoptotic pathway. *J Clin Exp Invest 2012; 3 (3): 372-377*

**Key words:** Platelets, caspase-3, qRT-PCR, P-selectin, ADP

ve 8-9 günde bir turnover görülür.<sup>4</sup> Trombositlerde bu farklılaşma sürecinde meydana gelen reseptör tipleri; bir çok integrin ( IIbβ3, 2β1, 5β1, 6β1, Vβ3), lösin zengin reseptörler (GpIb/IX/V), G-protein ilişkili 7 transmembran reseptörü (PAR-1, PAR-4, ADP resptörleri P2Y1 ve P2Y2, TxA2 reseptörleri TPα ve TPβ), immunglobulin ailesi proteinleri (GPVI, FcδRIIA), c-tip lektin reseptörleri (p-selektin), tirozin kinaz reseptörleri (trombopoetin reseptörü, Gas-6, ephrinler ve eph kinazlar) ve diğer reseptör tipleri (CD63, CD36, p-selektin ligand-1, TNF reseptörleri gibi) olarak bilinir.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

<sup>2</sup> TÜBİTAK, MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Gebze, Türkiye

<sup>3</sup> Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

**Correspondence:** Özge Çevik,  
Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya AD, Sivas, Türkiye Email: dagdevirenozge@gmail.com

Received: 05.05.2012, Accepted: 10.08.2012

Copyright © JCEI / Journal of Clinical and Experimental Investigations 2012, All rights reserved

Trombositler dolaşımında reseptörleri aracılığı ile ADP, kollagen, epinefrin, trombin gibi bazı uyarıcıların etkisinde agregasyona uğrayarak ve damarlarda tıkaç oluşturarak bazı hastalıkların patogenezinde önemli rol oynarlar.<sup>6</sup> Adenozin difosfat (ADP) trombositler üzerindeki reseptörlerine (P2Y1 ve P2Y12) bağlandığı zaman hücre içi bir takım sinyallerin tetiklenmesini sağlar. P2Y1 reseptörüne bağlanan ADP, G proteini aracılı fosfolipaz C aktivasyonu ile hücre içi kalsiyum depolarını harekete geçirip kalsiyumun hücre içi ve dışına hareketini sağlar. P2Y12 ise adenilat siklazı inhibe eder, inositol trifosfat ve fosfolipaz A2'nin oluşumu ile trombositlerin aktivasyonuna neden olur.<sup>7,8</sup> Hücre içinde kalsiyum düzeyleri arttığı zaman sitotoksitenin artışına bağlı apoptotik veya nekrotik hücre ölümünün gerçekleştiği bilinmektedir.<sup>9</sup> Trombositler çekirdeksiz hücre olmalarına karşın apoptozun bazı morfolojik ve biyokimyasal olayları karakterize edilir. Trombositlerde aktivasyon ve apoptoz benzer sinyal yollarını harekete geçirir, apoptozun fizyolojik şartlar altında bağımsız olarak meydana geldiği düşünülse de her ikisi de bir birinden farklıdır.<sup>10,11</sup>

Trombositlerde apoptoz genellikle intrensik mitokondriyal yolak üzerinden karakterize edilir. Bu yolak mitokondri membran potansiyelinde değişiklik ile başlayıp anti-apoptotik proteinlerin (Bcl-2 ve Bcl-xL) ekspresyonlarının azalması, fosfatidilserin ekspresyonu ve kaspaz-3 aktivasyonu ile gerçekleşir.<sup>12,13</sup> Kaspaz-3 enzimi sistein aspartik asit proteaz ailesi üyelerinden efektör kaspazlardan biridir. 32 kDa ağırlığında inaktif zimojen bir enzim olan kaspaz-3 apoptotik sinyal geldiği zaman yarılarak aspartik asit bölgesinden kesilir 12 kDa ve 17 kDa ağırlığındaki alt ünitelerine ayrılır. Bu iki alt ünite kendi arasında tetrametrik bir yapı oluşturarak kaspaz-3 enzimi aktif hale geçer.<sup>14</sup> Çekirdekli hücrelerde aktifleşen efektör kaspazlar (kaspaz-3,6,7 gibi) fodrin, aktin, lamin gibi hücrenin yapısal proteinlerini, DNA tamir mekanizmasında görev alan Poli (ADP-ribose) polimeraz enzimini, DNA fragmentasyon faktörlerini, siklin bağımlı protein kinazları ve bazı sinyal yolağı proteinleri gibi bir çok molekülün yarılmını sağlayarak hücrenin yapısal bütünlüğünün bozulmasına sebep olur.<sup>15</sup> Bu çalışmada trombositler üzerinde ADP'nin apoptotik yolakla ve kaspaz-3 ile ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Araştırmalar Ön Değerlendirme Komisyonu tarafından Etik Kurul Onayı alındı. Çalışmaya son bir hafta içinde trombosit fonksiyonlarını etkileyen bir ajana maruz kalmamış, kronik ya

da akut bir hastalığı olmayan, kalıtsal trombosit fonksiyon bozukluğu bulunmayan, trombosit sayısı 250.000-400.000/mm<sup>3</sup> arasında olan 10 sağlıklı gönüllü kişi dahil edildi.

Kanlar 1:10 oranında asit sitrat dekstroz (ACD; 85 mM sodyum sitrat, 78 mM sitrik asit and 111 mM d-glukoz) içeren tüplere alınarak trombositler elde edildi. Alınan kan örnekleri 100xg de 10 dakika santrifüj edilerek üst fazdan trombosit zengin plazma (PRP) ayrıldı. Alt kısımda 1500xg de 15 dakika santrifüj edilerek plazma elde edildi. PRP 800xg de 15 dakika çevrilerek üst faz atıldı ve çöken trombositler alındı. Trombositler HEPES tamponu ile (145 mM NaCl, 10 mM HEPES, 10 mM d-glukoz, 5 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.4) yıkandı. 1 kez 100xg de 5 dakika santrifüj edildi. Trombositler ile 10µM konsantrasyonda ADP kullanılarak 37°C'de 1 saat inkübasyon yapıldı.

## Trombositlerde akım sitometri ile P-selektin düzeyleri

Aktivasyon göstergesi olan p-selektin (CD62p) düzeyleri akım sitometride ölçülmüştür. Trombositler inkübasyon sonrasında BSA içeren PBS tamponu (137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH:7.4, %1 BSA) ile süspand edildi. Trombositlerin tespiti ve kapı alınmasında CD41 antikor ve p-selektin bağlanması için CD62p antikor kullanılarak FACS akım sitometride ölçüm yapıldı. Cellquest yazılımı kullanılarak analiz edildi.

## Trombositlerde hücre içi kalsiyum ölçümü

Hücre içi ikincil mesajcı olarak bilinen Ca<sup>+2</sup> ölçümü için floresan temelli reaktif olan Flo-8 bileşiğinin Ex/Em 490/525 dalga boylarındaki ışınları en hassas yöntemdir. Trombosit örneklerinde Ca<sup>+2</sup> ölçümü AAT Bioquest Flo-8 (36308) ticari kiti kullanılarak Ex/Em 490/525 nm de fluorometrede okunan RFU (relative fluorescence units) değerlerine göre hesaplandı.

## Trombosit sitokrom-c ölçümü

Trombositlerde sitokrom-c seviyesi, Human Cytochrome-c Platinum ELISA ticari kit (Bendermed Sytem BMS263) kullanılarak ölçüldü. Anti-insan sitokrom-c kaplı mikro plakadaki kuyucuklara 100 µl örnek/standart/kör yüklendi. Üzerine 50 µl biotin konjugatı eklenerek 2 saat inkübasyon sonrasında yıkanarak üzerine 100 µl streptavidin HRP eklendi. 100 µl TMB substrat ve 100 µl durdurma solüsyonu eklenerek 450 nm de mikro plaka okuyucusunda okundu. Sonuçlar kullanılan standart solüsyondan elde edilen grafiğe göre ng/mg protein cinsinden hesaplandı.

### Trombositlerde SYBR green ile kantitatif real time PCR (qRT-RCR)

Trombositlerden total RNA izolasyonu NucleoSpin RNA® II (740955.50, Macherey Nagel) kit kullanılarak gerçekleştirildi. Saklanan mRNA örneklerinde önce Nanodrop kullanılarak RNA miktarları tayin edildi. First Strand Synthesis Kit (Fermentas K1611) ile prosedüre uygun olarak cDNA elde edildi. Nükleaz içermeyen tüpler içerisinde 0,1-5 µg total RNA, oligo dT primer 1 µl ve random heksamer primer 1 µl konularak 65°C de 5 dakika inkübasyon yapıldı. Tüplerin üzerine reaksiyon tamponu 4 µl, 20U/µl RNaz inhibitörü, 20U/µl reverse transkriptaz eklenerek toplam hacim 20 µl ye tamamlandı. PCR reaksiyonu için 5 dakika 25°C, 60 dakika 42°C, 5 dakika 70°C olmak üzere ayarlandı. cDNA elde edildikten sonra qRT-PCR ile gen ekspresyon deneyleri kaspaz-3 forward 5' CAGTGGAGGCCGACTTCTTG 3', reverse 5' ATCCAGTCGCTTTGTGCCA 3' primeri 102 bp (denatürasyon 94°C 5 dakika, 50 döngü 94°C 30sn, 60°C 30sn, 72°C 30sn) ve GAPDH forward 5' TGCACCACCAACTGCTTAGC 3', reverse 5' GGCATGGACTGTGGTCATGAG 3' primeri 90 bp (denatürasyon 94°C 5 dakika 40 döngü 94°C 40sn, 60°C 30sn, 68°C 40sn) olarak Bio-Rad iQ™ SYBR® Green Supermix (170-8882) kit prosedürüne uygun olarak iQ™5 Optical System Software kullanılarak yapıldı. Hesaplamalarda referans gen olarak GAPDH kullanıldı. qRT-PCR'in tüm aşamalarında pozitif kontrol olarak miktarı ve CT değeri bilinen cDNA, negatif kontrol olarak da distile su kullanıldı. Analiz için Qbase programı kullanılarak sonuçlar AU (Arbitrary Units) olarak ifade edildi.

### Trombositlerde kaspaz-3 salınımının western blot yöntemi ile ölçümü

Trombositler hücre patlatma tamponu (50 mM Tris-HCl, pH 7.4: 0,15 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM

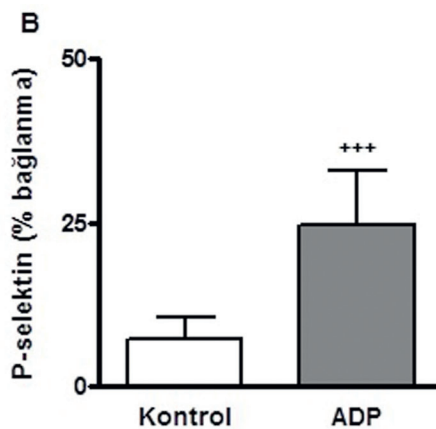
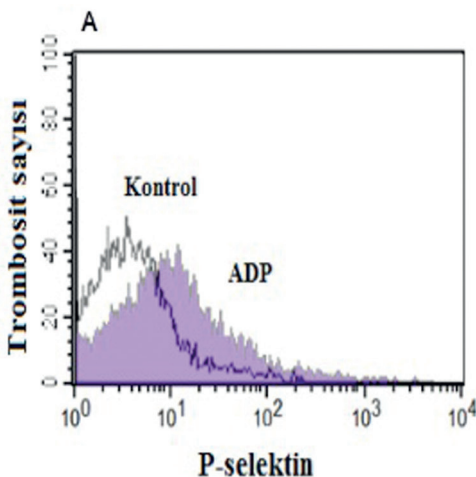
phenylmethylsulphonyl floride, 0.5% Nonidet P40, 0.25% sodyum dodesil sülfat (SDS) and 5 mg/ml leupeptin ve aprotinin) kullanılarak buz içerisinde ultrasonik homojenizatörde 15 sn sürede % 70 amplitüd ile patlatıldı. 12.000xg de 4°C de santrifüj edilerek üst fazda protein konsantrasyonları Bradford yöntemine göre hesaplandı.<sup>16</sup> Daha önce kullandığımız ölçüm yöntemine göre her kuyuda 25µg protein olacak şekilde örnekler % 12 SDS-PAGE jelinde yürütüldükten sonra nitroselüloz membrana transfer edildi.<sup>17</sup> Membran % 5 süt tozu ile bloklandı, % 0.1 Tween-20 içeren tris tuz tamponu (TBST) yıkama işlemleri yapıldı. Membran 1:500 oranında kaspaz-3 ve β-aktin primer antikor, 1:1000 oranında HRP işaretli sekonder antikor kullanılarak kemilüminesans reaktif ile elde edilen ışımaya fotoğraf filmine aktarıldı. Filmler görüntüleme sistemi kullanılarak (KODAK, DC290 USA) Image J OD programında analiz edildi.

### İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 15.0 Windows versiyonu (SPSS for Windows 11.5, Chicago, Illinois, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Normal dağılım göstermediği tespit edilen gruplar arasındaki farkın karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi yapıldı, p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### BULGULAR

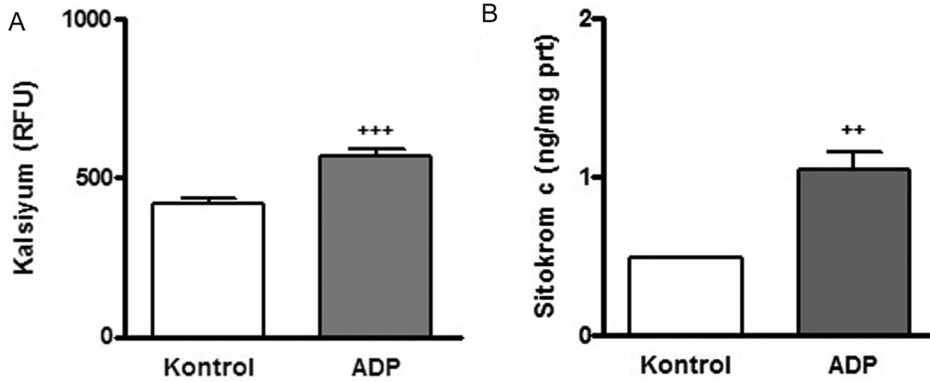
Apoptoz ve aktivasyon sürecinde önemli bir belirteç olan p-selektin bağlanması akım sitometride ölçülmüştür (Grafik 1A). ADP grubu p-selektin bağlanma yüzdeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış bulunmuştur (p<0.001) (Grafik 1B). Hücre içi kalsiyum düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ADP grubunda artış göstermiştir (p<0.001) (Grafik 2A).



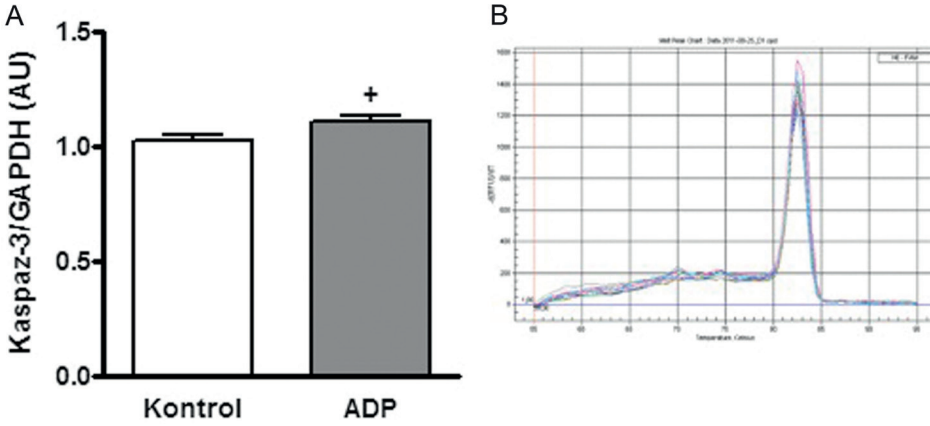
**Grafik 1. A)** Akım sitometride trombositlerin P-selektin bağlanma görüntüsü **B)** P-selektin bağlanma yüzdeleri grafiği (+++<0.001)

Apoptoz belirteci olan sitokrom-c düzeyi ADP grubunda ( $p<0.05$ ) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış görülmüştür (Grafik 2B). Grafik 3B'de qRT-PCR'da yapılan Kaspaz-3 geni için melt curve analizi görülmektedir. Grafik 3A'da görüldüğü gibi kontrol grubu ile karşılaştırılan ADP grubunda ( $p<0.05$ ) kaspaz-3 gen ekspresyonlarının arttığı belirlenmiştir.

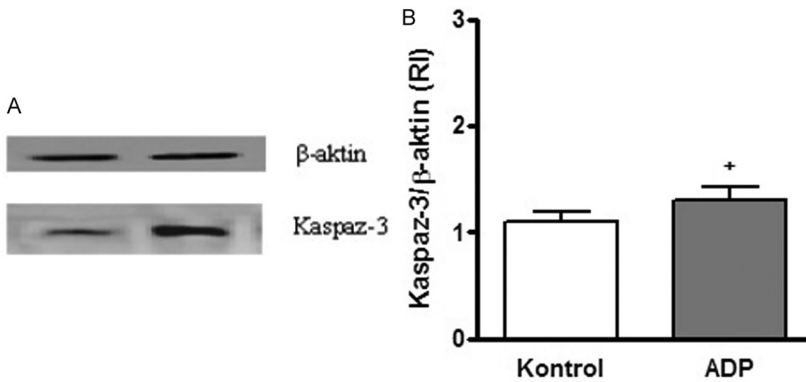
Western blotla tespit edilmiş  $\beta$ -aktin ve kaspaz-3 bantlarına ait görüntüler Grafik 4A'da gösterilmiştir. Bantların kaspaz-3/ $\beta$ -aktin oranı analiz sonuçları Grafik 4B'de görüldüğü gibi ADP grubunda bantlar yoğunlaşmış ve değişiklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ).



Grafik 2. A) Trombositlerde kalsiyum düzeyleri B) Trombositlerde sitokrom-c düzeyleri (++<0.01, +++ <0.001)



Grafik 3. A) Trombositlerde qRT-PCR ile Kaspaz-3 gen ekspresyonu düzeyleri B) Kaspaz-3 geni için qRT-PCR melt curve analizi görüntüsü



Grafik 4. A) Trombositlerde kaspaz-3 salınımı western blot batlarının görüntüsü, B) Kaspaz-3/ $\beta$ -aktin bantları oranları (+<0.05)

## TARTIŞMA

Trombositler çekirdeksiz hücre olmalarına karşın apoptozda rol oynayan apoptotik komponentlerin (kaspaz-3, kaspaz-9, Apaf-1 gibi) ekspresyonunu gerçekleştirebilirler.<sup>18-20</sup> Genel olarak apoptozun kontrol edilmesinde mitokondrinin temel rol oynadığı bilinmekle birlikte mitokondri membranındaki değişikliklere bağlı olarak bir takım apoptotik moleküllerin salınması da gerçekleşir. Öncelikle mitokondri membran porlarının permeabilitesi bozulur. Porlardan su ve 1.5 kDa büyüklüğündeki moleküllerin geçişi başlar. Açılan porlar ile mitokondriyal matriksin şişmesi ve mitokondri iç membran potansiyelinde ( $\Delta\Psi_m$ ) depolarizasyon meydana gelir. Sitokrom-c, apoptoz indükleyici faktör (Apaf-1), kaspaz-9, kaspaz-3 gibi birçok apoptotik uyarıcının salınımı gerçekleşir. Bununla birlikte apoptoz regülatör protein ailesi olan Bcl-2 ailesi proteinleri de ortama salınırlar.<sup>21-23</sup>

P-selektin trombositlerin  $\alpha$ -granüllerinde bulunur, trombositler aktifleştikleri zaman membran yüzeyine hareket ederler.<sup>24</sup> P-selektin, trombositlerin hem aktivasyonunda hem de apoptoza gidiş sürecinde önemli belirteçlerden biridir.<sup>25,26</sup> Bu çalışmada ADP ile uyarılan trombositlerde p-selektin bağlanma yüzdelerinin yüksek oranda arttığını gördük.

Hücrenin yaşamında kalsiyum önemli bir regülatör olmakla birlikte hem hücre içinde hem de hücre dışında kalsiyumun aşırı artışı bazı reseptörlerin aktivasyonuna neden olarak ölümcül mekanizmanın başlamasını veya tetiklenmesini sağlar.<sup>27</sup> Daha spesifik olarak endoplazmik retikulumdan kalsiyumun salınımı ve membrandan kalsiyum giriş çıkışının artışı apoptojenik olarak isimlendirilir. Hatta hücre içinde kalsiyumun aşırı artışının apoptoz yerine hücreyi nekroza götürdüğü de düşünülmektedir.<sup>28</sup> Glioblastoma hücre hattı (A15A5), promyelositik lösemik hücrelerde (HL60), dentritik hücrelerde ve birçok hücre ile yapılan çalışmalarda kalsiyumun kaspaz-3 aktivasyonuna neden olduğu ve kaspaz-3 benzeri proteazlarda postranslasyonel modifikasyonlara da aracılık ettiği gösterilmiştir.<sup>29,30</sup> Çalışmamızda 10  $\mu$ M ADP'nin trombositlerde kalsiyum düzeylerini arttırdığını ve mitokondriyal apoptozda önemli bir protein olan sitokrom-c salınımını gerçekleştirdiğini belirledik.

Mitokondriyal apoptoz sergilediği düşünülen trombositler çeşitli uyarıcılara karşı birçok apoptotik proteini ekspre edebilirler. Çalışmamızda trombositlerin ADP ile uyarılması sonucunda kaspaz-3 gen ekspresyonunu gerçekleştirdiğini bulduk. Leytin ve ark.<sup>22</sup> kalsiyum iyonoforu A23187 ile uyarılan trombositlerde özellikle  $\Delta\Psi_m$  depolarizasyon ile sitozol-

de kaspaz-3 aktivasyonun arttığını ve mikro partiküllerin oluştuğunu göstermişlerdir. Tip-2 diyabetli sıçanlarla yapılan bir çalışmada plazmada yüksek trombin aktivasyonu nedeniyle trombosit kaspaz-3 aktivasyonunun yüksek olduğu gösterilmiştir.<sup>31</sup> Akut immün trombositopeni görülen hastalarda ise azalan  $\Delta\Psi_m$  ile PS ekspresyonunun artışına bağlı olarak kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 düzeylerinin arttığı bulunmuştur.<sup>32</sup>

Trombin ile uyarılan trombositlerde sitozoldeki kalsiyum artışından bağımsız olarak kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesinin arttığı gösterilmiştir.<sup>33</sup> Aynı zamanda yaşam ömürleri kısa olan trombositlerin, kan bankalarında daha uzun süre saklanabilmesi için apoptoz ve aktivasyon arasındaki ilişki ile ilgili yapılan çalışmaların sayısı da artmaktadır. Cookson ve ark.<sup>34</sup> trombositlerin kan bankasında 22°C'de saklanmaları ile ilgili yaptıkları bir çalışmada trombositler zamana bağlı olarak 1-12 gün sürede apoptoz ve aktivasyon durumları takip edilmiştir. Çalışmada 5. günde kaspaz-3 aktivitesinin pik yaptığını ve sonraki günlerde mikropartikül oluşumunun arttığı gösterilmiştir. Reid ve ark.<sup>35</sup> yaptıkları benzer bir çalışmada trombositlerde ilk 5 gün pro-apoptotik olan Bak ve Bax proteinlerinin ekspresyonunun arttığı, sitokrom-c salınımı ve kaspaz-3 aktivitesinin yüksek olduğunu bulmuşlardır. Bertino ve ark.<sup>36</sup> kan bankasında yaptıkları çalışmada 37°C'de fizyolojik ortamda bekletilen trombositlerin 2. günde kaspaz-3 aktivitesinin yüksek olduğunu ve zamana bağlı olarak pH değerlerinin asidik ortama kaydığını gözlemlemişlerdir. Biz çalışmamızda yıkanmış olan trombositlerde ortama koyduğumuz 10  $\mu$ M ADP ile 37°C'de 1 saat inkübe ederek kaspaz-3 salınımının hem gen düzeyinde hem de protein düzeyinde gerçekleştiğini gördük.

Sonuç olarak trombositlerde uyarıcı ajan olan ADP'nin hem trombosit aktivasyonunda hem de trombosit apoptozu üzerinde rol oynadığı düşünülmektedir.

## Bilgilendirme

Bu makale Dr. Özge Çevik'in doktora tezinden türetilmiş olup Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu Başkanlığı (SAG-C-DRP-010710-0216) tarafından projelendirilmiş ve desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Deutsch VR, Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol* 2006;134(4):453-66.
2. Long MW. Megakaryocyte differentiation events. *Semin Hematol* 1998;35(2):192-9.
3. Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the

- bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nature Medicine* 2004;10(1): 64-71.
4. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest* 2005; 115(12):3339-47.
  5. Clemetson KJ, Clemetson JM, Michelson AD. Platelet receptors. In: Michelson AD ed. *Platelets*, 2<sup>nd</sup> edn, San Diego, CA: Elsevier/Academic Press, 2007:117-43.
  6. Yip J, Shen Y, Andrews KR. Primary platelet adhesion receptors. *Australian Biochemist* 2004;35(1):4-8.
  7. Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J Biol Chem* 1998;273(4):2030-4.
  8. Tolhurst G, Vial C, Leon C, et al. Interplay between P2Y(1), P2Y(12), and P2X(1) receptors in the activation of megakaryocyte cation influx currents by ADP: evidence that the primary megakaryocyte represents a fully functional model of platelet P2 receptor signaling. *Blood* 2005;106(5):1644-51.
  9. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(7):552-65.
  10. Zhang W, Liu J, Sun R, et al. Calpain activator dibucaine induces platelet apoptosis. *Int J Mol Sci* 2011;12(4):2125-37.
  11. Leytin V, Allen DJ, Mutlu A, et al. Platelet activation and apoptosis are different phenomena: Evidence from the sequential dynamics and the magnitude of responses during platelet storage. *Br J Haematol* 2008;142(4):480-501.
  12. Leytin V, Freedman J. Platelet apoptosis in stored platelet concentrates and other models. *Transfus Apher Sci* 2003;28(2):285-95.
  13. Vanags DM, Orrenius S, Aguilar-Santelises M. Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis. *Br J Haematol* 1997;99(7):824-31.
  14. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995;376(6535):37-43.
  15. Chang YH, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64(4):821-46.
  16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72(2):248-54.
  17. Çevik O, Oba R, Macit C, et al. Lycopene inhibits caspase-3 activity and reduces oxidative organ damage in a rat model of thermal injury. *Burns* 2012;38(6):861-71.
  18. Mason DK, Carpinelli MR, Fletcher JI, et al. Programmed nuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* 2007;128(9):1173-86.
  19. Leytin V. Apoptosis in the nucleate platelet. *Blood Rev* 2012;26(2):51-63.
  20. Shcherbina A, Remold-O'Donnell E. Role of caspase in a subset of human platelet activation responses. *Blood* 1999;93(12):4222-31.
  21. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007;87(1):99-163.
  22. Leytin V, Allen DJ, Mutlu A, Gyulkhandanyan AV, Mykhalov S, Freedman J. Mitochondrial control of platelet apoptosis: effect of cyclosporin A, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *Lab Invest* 2009;89(4):374-84.
  23. Gyulkhandanyan AV, Mutlu A, Freedman J, Leytin V. Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *J Thromb Thrombolysis* 2012;33(4):397-411.
  24. Michelson, A.D. Flow cytometry: A clinical test of platelet function. *Blood* 1996;87(12):4925-36.
  25. Sener A, Ozsavci D, Oba R, et al. Do platelet apoptosis, activation, aggregation, lipid peroxidation and platelet-leukocyte aggregate formation occur simultaneously in hyperlipidemia? *Clin Biochem* 2005;38(12):1081-7.
  26. Ozgen U, Ozerol E, Aminci M. Relationship between activation and apoptosis in platelets. *Turk J Hematol* 2007;24(2):171-6.
  27. Rizzuto R, Pinton P, Ferrari D, et al. Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene* 2003;22(24):8619-27.
  28. Nicotera P, Orrenius S. The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 1998;23(2-3):173-80.
  29. Juin P, Pelletier M, Oliver L, et al. Induction of a caspase-3-like activity by calcium in normal cytosolic extracts triggers nuclear apoptosis in a cell-free system. *J Biol Chem* 1998;273(28):17559-64.
  30. Affaticati P, Mignen O, Jambou F, et al. Sustained calcium signaling and caspase-3 activation involve NMDA receptors in thymocytes in contact with dendritic cells. *Cell Death Differ* 2011;18(1):99-108.
  31. Cohen Z, Gonzales RF, Davis-Gorman GF, Copeland JG, McDonagh PF. Thrombin activity and platelet microparticle formation are increased in type 2 diabetic platelets: a potential correlation with caspase activation. *Thromb Res* 2002;107(5):217-21.
  32. Winkler J, Kroiss S, Rand ML, et al. Platelet apoptosis in paediatric immune thrombocytopenia is ameliorated by intravenous immunoglobulin. *Br J Haematol* 2012;156(4):508-15.
  33. Amor NB, Pariente JA, Salido GM, Rosado JA, Bartegi A. Thrombin-induced caspases 3 and 9 translocation to the cytoskeleton is independent of changes in cytosolic calcium in human platelets. *Blood Cells Mol Dis* 2006;36(3):392-401.
  34. Cookson P, Sutherland J, Turner C, et al. Platelet apoptosis and activation in platelet concentrates stored for up to 12 days in plasma or additive solution. *Transfus Med* 2010;20(6):392-402.
  35. Reid S, Johnson L, Woodland N, Marks DC. Pathogen reduction treatment of buffy coat platelet concentrates in additive solution induces proapoptotic signaling. *Transfusion* 2012; doi: 10.1111/j.1537-2995.2011.03558.x.
  36. Bertino AM, Qi XQ, Li J, Xia Y, Kuter DJ. Apoptotic markers are increased in platelets stored at 37 degrees C. *Transfusion* 2003;43(7):857-66.