

# Akut Hipergliseminin Trombositlerde Oksidatif Strese ve Nitrik Oksit Biyoyaralanımına Etkisi

Azize Şener, Nazlı Gül Altındiş, Özge Doğan

Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul - Türkiye

Yazışma Adresi / Address reprint requests to: Azize Şener  
Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Tıbbiye Caddesi, Haydarpaşa, İstanbul - Türkiye  
Elektronik posta adresi / E-mail address: azizesener@hotmail.com  
Kabul tarihi / Date of acceptance: 15 Temmuz 2015 / July 15, 2015

## ÖZET

Akut hipergliseminin trombositlerde oksidatif strese ve nitrik oksit biyoyaralanımına etkisi

**Amaç:** Diyabette, trombositlerin aktivasyona ve trombus oluşumuna eğilimi artmaktadır. Nitrik oksit (NO), özellikle trombositten zengin trombuslara yeni trombositlerin katılmasını sınırlandırarak trombosit fonksiyonlarında önemli rol oynar. Ancak, NO hücrelerde oksidatif/nitrozatif stresi artırarak zararlı etki de gösterebilir. Bu çalışmada, istirahat halinde ve kollajenle uyarılmış trombositlerde akut yüksek glikozun trombosit agregasyonuna, oksidatif stres parametrelerine ve NO biyoyaralanımına etkileri araştırılmıştır. Ayrıca, kuersetin (süperoksit anyon süpürücüsü) kullanılarak yüksek glikozun NO biyoyaralanımını üzerindeki etkilerinde süperoksit üretiminin rolü incelenmiştir.

**Yöntemler:** Yıkanmış trombositler 5 mM D-glukoz (fizyolojik konsantrasyon, n:7) veya 25 mM D-glukoz (patofizyolojik konsantrasyon, n:7) veya kuersetin (10 µM) + 25 mM D-glukoz (n:7) ile 1 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonrası, trombositlerde süperoksit üretimi, lipid peroksidasyonu (LPO), NO, nitrotirozin (NT) düzeyleri ve ilerlemiş glikasyon son ürünleri (AGE) ölçüldü. Ayrıca trombosit agregasyonu da incelendi.

**Bulgular:** Dinlenme halinde ve kollajenle aktive trombositlerin yüksek glukoz ile inkübasyonu LPO, NT ve AGE düzeylerinde 5mM glukoz konsantrasyonuna göre istatistiksel olarak anlamlı artışlara neden oldu (p<0.05). Yüksek glukoz kollajenle aktive trombositlerde trombosit agregasyonunu, süperoksit oluşumunu ve NO düzeylerini anlamlı olarak artırdı (p<0.05). Yüksek glukoz ile inkübe edilen trombositlerde, kuersetin anlamlı olarak NO üretiminin ve NO biyoyaralanımının artmasına neden olurken oksidatif stresi baskıladı (p<0.05).

**Sonuç:** Yüksek glukoz istirahat halinde ve özellikle kollajen ile aktive trombositlerde oksidatif stresi artırır ve NO biyoyaralanımını azaltır. Yüksek glukoz aracılı süperoksit üretiminin bu etkiler üzerinde rolü olabilir. Bulgularımız, diyabette trombosit-ilişkili komplikasyonların önlenmesinde kuersetinin yararlı etkisi olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar sözcükler:** Hiperglisemi, kuersetin, kollajen, nitrik oksit, süperoksit anyonu, trombosit

## ABSTRACT

The effects of acute hyperglycemia on oxidative stress and nitric oxide bioavailability in platelets

**Objective:** Platelet activation and thrombus formation tendency increase in diabetes mellitus. Nitric oxide (NO) synthesized by platelets plays important role in platelet functions and limits the recruitment of new platelets to the platelet-rich thrombus. However, NO may also be deleterious by elevating oxidative/nitrosative stress in cells. The aim of the present study was to examine effects of acute high glucose in both resting and collagen-stimulated platelets on platelet aggregation, oxidative stress and NO bioavailability. In addition, we investigated the role of superoxide production on NO bioavailability using quercetin as scavengers of superoxide anion.

**Methods:** Washed platelets were incubated with 5mM D-glucose (physiological concentration, n:7) or 25mM D-glucose (pathophysiological concentration, n:7) or quercetin (10 µM) plus 25 mM D-glucose (n:7) for 1 h. Superoxide production, lipid peroxidation (LPO), NO, nitrotyrosine (NT) levels and advanced glycation end products (AGE) in platelets were measured after incubation. Platelet aggregation was also investigated.

**Results:** Incubation of resting and collagen-activated platelets with high glucose resulted in significant elevations in LPO, NT and AGE levels when compared to 5mM glucose concentration (p<0.05). High glucose significantly increased platelet aggregation, superoxide formation and NO levels in collagen-activated platelets (p<0.05). Quercetin markedly increased production and bioavailability of NO and suppressed oxidative stress in high glucose incubated platelets (p<0.05).

**Conclusion:** High glucose increases oxidative stress and reduces bioavailability of NO in resting and especially collagen activated platelets. Hyperglycemia mediated superoxide production could be taken part on these effects. These findings would be suggested that there might be beneficial effects of quercetin in the prevention of platelet-related complications in diabetes mellitus.

**Key words:** Hyperglycemia, quercetin, collagen, nitric oxide, superoxide anion, platelet

## GİRİŞ

Kardiyovasküler komplikasyonlar diyabetik hastalardaki mortalitenin yaklaşık %80'inden sorumludur. Trombosit hiperaktivasyonu ve agregasyonu da kardiyovasküler has-

talıkların gelişiminde önemli rol oynar (1). Hiperglisemi, trombosit morfolojisi ve fonksiyonlarında değişikliklere neden olabilmektedir. Yüksek glukozun trombositler üzerindeki etkisinin, reaktif oksijen türlerinin (ROT) ortamda bulunmasıyla daha güçlü olarak meydana geldiği gözlen-

miştir. Trombositlerde özellikle aktive olduklarında ROT üretebilmektedirler. Aktive trombositler, endotel hücreleri ve lökositlerle etkileşerek onlarda da oksidatif reaksiyonları tetikleyebilmektedirler (2).

Reaktif oksijen bileşikleri gibi oksidatif stres artışına neden olabilen bir diğer biyolojik molekül de nitrik oksit (NO)'dir. Çeşitli hücrelerel fonksiyonlarda NO önemli rol oynar. NO, nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-arjininden sentezlenir. Enzimin nöronal NOS (nNOS), indüklenebilir NOS (iNOS) ve endotelial NOS (eNOS) olmak üzere 3 izoformu vardır (3,4). Endotelial NOS ve nNOS'a göre iNOS daha büyük miktarlarda NO üretimine neden olur. Trombositler de NO üretirler. Trombosit kaynaklı NO'nun başlıca fonksiyonunun trombositlerin aktivasyonunu önleyerek trombus oluşumuna yeni trombositlerin katılmasını önlemek olduğu bildirilmiştir (5). Düşük konsantrasyonlarda NO önemli fizyolojik işlevlerde rol alırken yüksek konsantrasyonlarda NO hızla süperoksit radikali ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşumuna neden olur (6). Peroksinitrit sitotoksiktir. NO biyoyaralanımını azaltması yanında DNA, lipidler, proteinler ve düşük molekül ağırlıklı biyomolekülleri nitrolayabilir (7). Proteinlerin yapısındaki bazı amino asitlerin (özellikle tirozin) nitrolanması protein veya enzimin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin değişimine neden olmaktadır (8). Trombositlerde NO biyoyaralanımının azalması trombosit fonksiyonlarını etkileyerek kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynar (5). Oksidatif ve nitrozatif streste artış trombosit fonksiyonları ve yaşam süresini etkileyebilmektedir (9). Kuersetin gibi bitkisel diyetle bulunan bazı flavonoidlerin trombosit fonksiyonları üzerinde etkili olabileceği gösterilmiştir. Kuersetin ROT süpürücü etkisiyle güçlü bir antioksidandır ve trombosit agregasyonunu inhibe edici etkiye sahiptir. Ayrıca antihipertansif, antiinflamatuvar ve yararlı kardiyovasküler etkileri gözlenmiştir (10).

Yüksek glukoz proteinleri nonenzimatik olarak glikozilleyerek ilerlemiş glikozilasyon ürünlerini (AGE) oluşturabilmektedir. Oluşan AGE'ler, reseptör aracılı mekanizma ile ROT üretimini uyarabildikleri gibi, artmış ROT'lar hücre içi AGE oluşumuna katkıda bulunabilmektedirler (11). Hipergliseminin trombosit fonksiyonlarına ve biyokimyasına etkisini daha iyi incelemek için in vitro çalışmalar yapılmıştır. Ancak bu çalışmalar trombosit konsantrasyonlarının uzun süre glukoz ile depolanması üzerine yoğunlaşmıştır (12).

Bu çalışmada istirahat halinde ve kollajenle uyarılmış trombositlerde akut yüksek glukoz konsantrasyonlarının süperoksit üretimine, oksidatif strese ve NO biyoyaralanımına etkisi in vitro olarak incelenmiştir. Ayrıca süperoksit üretiminin bu parametreler üzerindeki rolü de güçlü bir antioksidan olan kuersetin kullanılarak araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda yaşları 19-25 arası değişen sağlıklı 7 kişiden alınan kanlardan elde edilen trombositler kullanıldı. Çalışmaya alınan kişilerin son 10 gün içinde trombosit fonksiyonlarını etkileyebilecek herhangi bir antiagregan ilaç kullanmamaları sağlandı. Çalışma için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik kurulundan 28.03.2013 tarihi ve 09.2013.0054 protokol numarası ile onay alınmıştır.

### Trombositlerin Ayrılması

Trombosit eldesi için sağlıklı 7 kişiden alınan 15 ml venöz kan 1:9 oranında asit sitrat dekstrozu (ACD; 85mM sodyum sitrat, 78 mM sitrik asit and 5 mM D-glukoz) içeren tüplere alındı. Tüpler oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüplerin üst kısmında oluşan trombosit zengin plazma (PRP), pipetle alınarak ependorf tüplere aktarıldı. PRP 5.000 rpm'de 10 dakika +22°C'de santrifüj edilerek üst faz ortamdaki uzaklaştırıldı ve çöken trombositler HEPES (145 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5 mM D-glukoz, 5mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.4) tamponu ile süspanse edildi ve tekrar santrifüj edilerek yıkandı.

Trombosit agregasyon çalışmalarında PRP kullanılırken diğer parametrelerin incelenmesinde yıkılmış trombositler kullanıldı.

### Trombosit inkübasyonları

Yıkılmış trombositler HEPES tamponu ile (145 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub> pH: 7.4) süspanse edilerek ependorf tüplerde 1'er ml'lik trombosit süspanسیونları hazırlandı. Çalışma için, fizyolojik glukoz konsantrasyonu olarak 5 mM, patofizyolojik glukoz konsantrasyonu olarak 25 mM ve trombosit aktivasyon ajanı olarak kollajen (4µg/ml) kullanıldı. Gruplar hem aktive

(kollajen ile) ve hem de dinlenme halindeki trombositlerde aşağıdaki şekilde oluşturuldu:

1- 5 mM glukoz grubu (n:7)

2- 25 mM glukoz grubu (n:7)

3- 25 mM glukoz +kuersetin (10 µM) grubu (n:7)

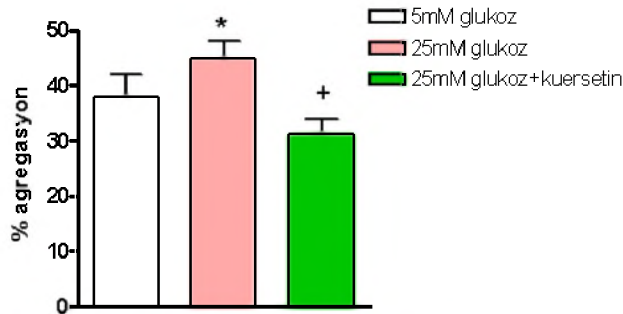
Yukarda açıklandığı şekilde hazırlanan trombosit süspansiyonları 5 ve 25 mM glukoz ile 37°C'de 1 saat inkübasyon sonrası çöktürüldü. Bir kez yıkanıp tekrar süspansiyon edilen trombositler ultrasonikatör ile patlatıldı. Lipid peroksidasyon (LPO), NO, NT ve AGE düzeyleri ölçümleri için bu lizatlar kullanıldı. Antioksidan olarak kullanılan kuersetin 10 dakika önce trombosit süspansiyonlarına ilave edildi. Tüm deneyler kan örneklerinin toplanmasından sonra 2 saat içinde tamamlandı.

### Trombosit Agregasyonu

Yüksek glukozun trombositler agregasyonu üzerine etkisini incelemek için, trombosit agregasyonu 96 kuyucuklu mikropalakalarda mikro plaka okuyucusu kullanılarak ölçüldü (13). PRP, 96 kuyucuklu mikropalakalara ilave edildi. Yukarda inkübasyonlar kısmında ifade edildiği gibi son konsantrasyonu 5 mM ve 25 mM olacak şekilde glukoz ilave edilerek karıştırılmaksızın 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonrası kollajen ilave edilerek mikropalaka okuyucusunda (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) 650 nm de optik dansiteleri 5 dakika boyunca izlendi. Sonuçlar % maksimum agregasyon olarak ifade edildi.

### Süperoksit Anyonu Tayini

Yüksek glukozun süperoksit anyonu üretimi üzerine etkisi lüsigenin kullanılarak kemilüminometrik yöntem-



Şekil 1: Kollajen ile uyarılmış trombosit agregasyonu. (\*p<0.05: 5mM glukozla göre; +p<0.05: 25mM glukozla göre)

le ölçüldü (14). Yıkanmış trombositlere glukozla inkübasyon sonrası son konsantrasyonu 0.2 mM olacak şekilde lüsigenin ilave edildi. Örneklerin lüminesans şiddetleri ölçüldü. Sonuçlar mg protein başına düşen bağıl ışık birimi (Relative Light Unit (RLU))/dak. olarak ifade edildi.

### LPO Tayini

Trombosit LPO düzeyleri Beuge ve Aust'un yöntemi ile belirlendi (15). Bu yöntem, lipid peroksidasyonu yıkım ürünlerinin asidik ortamda tiyobarbitürik asitle (TBA) reaksiyonu sonucu oluşan pembe renkli kompleksin 532 nm dalga boyunda verdiği absorbansının spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanır. Sonuçlar standart grafik kullanılarak hesaplandı ve nmol MDA/mg protein olarak ifade edildi.

### NO Tayini

Biyolojik sıvılarda NO hızla metabolitlerine (nitrit ve nitrat) dönüştüğünden NO düzeyleri metabolitlerinin konsantrasyonları üzerinden ölçülebilmektedir. NO metabolitlerinin ölçümü için kolorimetrik kit (Merck Millipore, 482650, Darmstadt, Germany) kullanıldı. Örnekler proteinsizleştirme işleminden sonra nitratın nitrite indirgenmesi için nitrat redüktaz ve NADH ile karanlıkta 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası renk reaktifleri ilave edildi. Nitrit düzeyleri 540 nm'de mikropalaka okuyucusu kullanılarak belirlendi. Sonuçlar nitrit standart grafiği kullanılarak hesaplandı ve µmol/mg protein olarak ifade edildi.

### NT Tayini

NT düzeylerinin tayini için ELISA kit (Cell Biolabs, STA303, San Diego, CA, USA) kullanıldı. Antijen-antikor reaksiyonuna dayanan bu testte monoklonal antikorlarla kaplı mikro kuyucuklara örnekteki antijenler bağlandı. Daha sonra bu antijen antikor kompleksine sırasıyla anti nitrotozin antikor ve bunu takiben HRP konjugatlı sekonder antikor eklendi. Son olarak reaksiyon durdurucu çözelti ilave edilerek reaksiyon sonlandırıldı. Örneklerin absorbansı 540 nm'de okundu. Sonuçlar standart grafik kullanılarak nmol/mg protein olarak hesaplandı.

## AGE Düzeyleri Tayini

Trombosit AGE düzeyleri ELISA yöntemi kullanılarak hazır ticari kit (Cell Biolabs, STA 317, San Diego, CA, USA) ile üretici firmanın önerdiği şekilde hiçbir değişiklik yapılmadan uygulandı. Sonuçlar standart grafik kullanılarak belirlendi ve  $\mu\text{g AGE/mg protein}$  olarak ifade edildi.

## Protein Tayini

Örneklerin protein içerikleri Bradford yöntemine göre (16) tayin edildi.

## İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme için Graphpad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) istatistik programı kullanıldı. İstatistiksel analizde ikili gruplar (5 mM glukoz ile 25 mM glukoz ve 25 mM glukoz ile 25 mM glukoz+kuersetin) arasındaki farkın karşılaştırılması için nonparametrik test, Wilcoxon Matched pairs test kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık sınırı  $p < 0.05$  olarak kabul edildi.

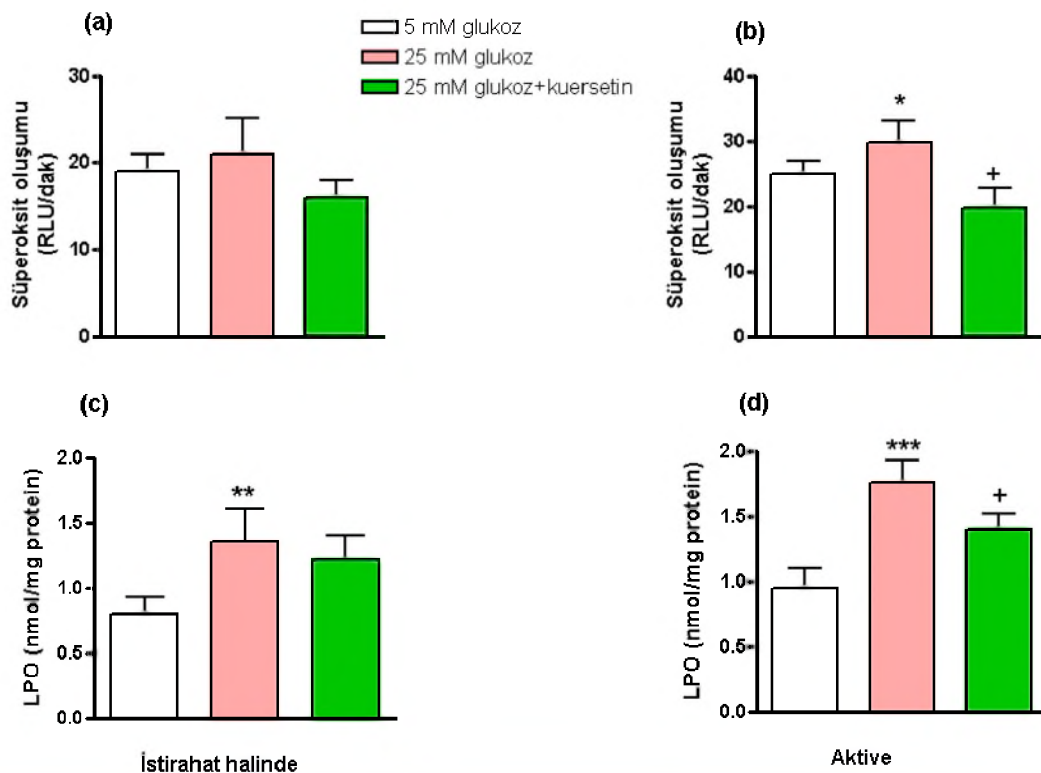
## BULGULAR

### Trombosit agregasyonu

Kollajenle uyarılan trombositlerde 25 mM glukozlu inkübasyon 5mM glukozla göre trombosit agregasyonunda anlamlı artışa ( $p < 0.05$ ) neden oldu. Kuersetin 25 mM glukozla göre trombosit agregasyonunu istatistiksel olarak anlamlı azalmasına neden oldu ( $p < 0.05$ ).

### Süperoksit Anyonu ve LPO Düzeyleri

Şekil 2'de görüldüğü gibi istirahat halindeki trombositlerin 25mM glukoz ile inkübasyonu 5 mM glukoz grubuna göre süperoksit üretiminde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte artışa neden oldu ( $p > 0.05$ ). Bu grupta kuersetin ilavesi de süperoksit üretiminde istatistiksel olarak anlamlı olmayan azalmaya neden oldu ( $p > 0.05$ ). Kollajen ile aktive edilen trombositlerde ise 25mM glukoz ile inkübasyon süperoksit üretimini 5mM glukozla göre anlamlı olarak artırırken ( $p < 0.05$ ), antioksidan 25 mM glukoz varlığında kuersetin süperoksit düzeylerinin anlamlı olarak azal-



**Şekil 2:** İstirahat halinde (a,c) ve kollajenle uyarılmış trombositlerde (b,d) süperoksit üretimi ve LPO düzeyleri. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ : 5mM glukozla göre; + $p < 0.05$ : 25mM glukozla göre)

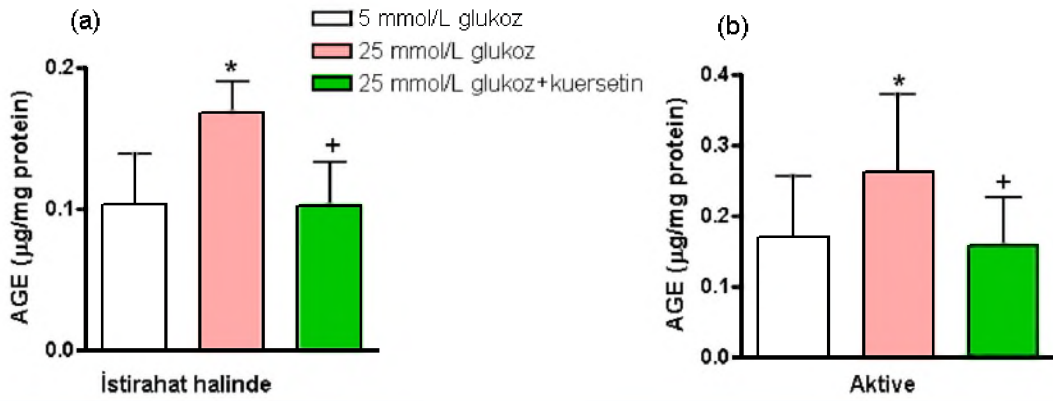
masına neden oldu ( $p<0.05$ , Şekil 2b).

İstirahat halindeki trombositlerin 25 mM glukoz ile inkübasyonu kontrol grubuna göre LPO düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olurken ( $p<0.01$ ), kuersetin ilavesi 25mM glukoz düzeylerine göre LPO düzeylerinde anlamlı olmayan azalmaya neden oldu (Şekil 2c). Kollajen ile aktivasyon sonrası da 25mM glukoz ile trombosit LPO düzeyleri 5mM glukoz göre anlamlı olarak arttı ( $p<0.001$ ). Kuersetin ilavesi aktive trombositlerde

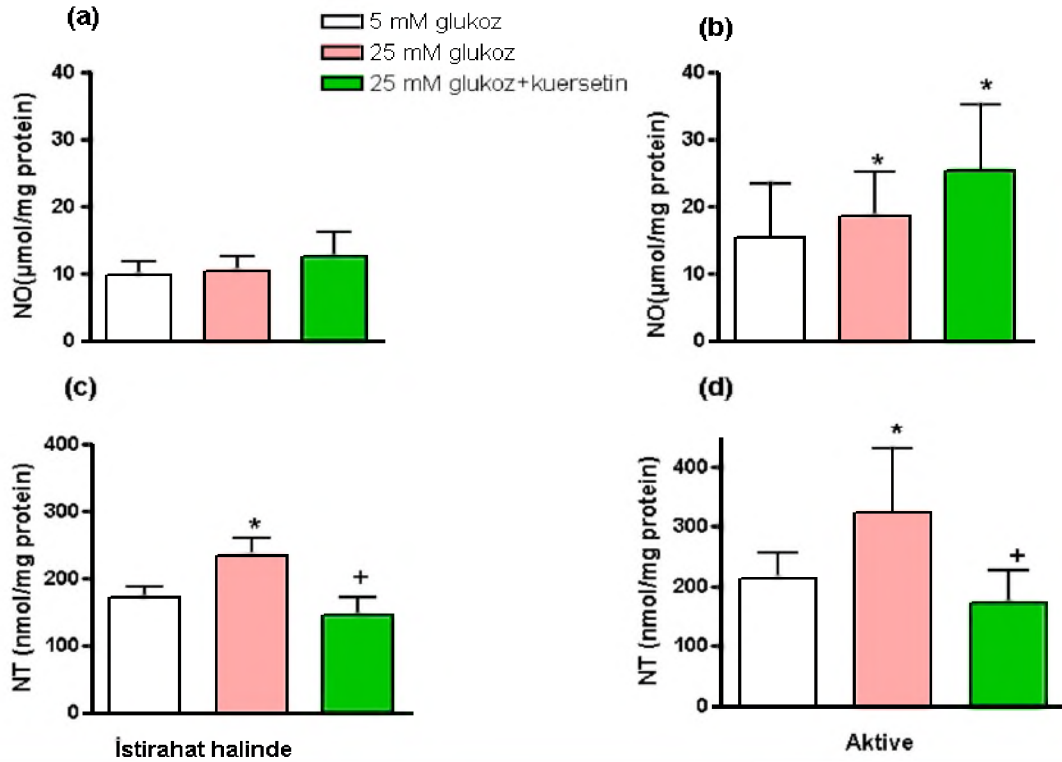
LPO düzeylerinin anlamlı olarak azalmasına neden oldu. ( $p<0.05$ , Şekil 2d).

### AGE Düzeyleri

İstirahat halindeki trombositlerin 25mM glukoz ile inkübasyonu kontrol grubuna göre AGE düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olurken ( $p<0.05$ ), kuersetin ilavesi AGE düzeylerini 25mM glukoz düzeyleri-



Şekil 3: İstirahat halinde (a) ve aktive trombositlerde (b) AGE düzeyleri. (\* $p<0.05$ : 5mM glukoz göre; † $p<0.05$ : 25mM glukoz göre)



Şekil 4: İstirahat halinde (a,c) ve kollajenle uyarılmış trombositlerde (b,d) NO ve NT düzeyleri. (\* $p<0.05$ : 5mM glukoz göre; † $p<0.05$ : 25mM glukoz göre)

ne göre anlamlı olarak azalttı ( $p<0.05$ ). Kollajen ile aktivasyon sonrası da 25mM glukoz ile trombosit AGE düzeyleri 5mM glukozla göre anlamlı olarak arttı ( $p<0.05$ ). Kuersetin ilavesi 25mM glukoz konsantrasyonunda AGE düzeylerinin anlamlı olarak azalmasına neden oldu ( $p<0.05$ ).

### NO ve NT Düzeyleri

Şekil 4a'da görüldüğü gibi istirahat halindeki trombositlerin 25mM glukoz ile inkübasyonu kontrol grubuna göre NO düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadı ( $p>0.05$ ). Kuersetin ilavesi de NO düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan artışa neden oldu ( $p>0.05$ ). Kollajen ile aktive trombositlerde (Şekil 4b), 25mM glukoz ile trombosit NO düzeyleri 5mM glukozla göre anlamlı olarak arttı ( $p<0.05$ ). Kuersetin ilavesi hem 5mM hem de 25mM glukoz konsantrasyonlarında NO düzeylerini anlamlı olarak artmasına neden oldu ( $p<0.05$ ).

İstirahat halindeki trombositlerin 25mM glukoz ile inkübasyonu kontrol grubuna göre NT düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olurken ( $p<0.05$ ), kuersetin ilavesi NT düzeylerini 25mM glukoz düzeylerine göre anlamlı olarak azalttı. Kollajen ile aktivasyon sonrası da 25mM glukoz ile trombosit NT düzeyleri anlamlı olarak arttı ( $p<0.05$ ). Kuersetin ilavesi 25mM glukoz konsantrasyonunda NT düzeylerinin anlamlı olarak azalmasına neden oldu ( $p<0.05$ ).

## TARTIŞMA

Bu çalışmada yüksek glukozun trombositlerde oksidatif strese ve NO biyoyaralanımına etkisi istirahat halinde ve aktive trombositlerde güçlü bir antioksidan olan (süperoksit anyonu süpürücüsü) kuersetin (17) kullanılarak incelenmiştir.

Çalışmamızda yüksek glukozun trombosit agregasyonuna olan etkisi yıkanmış trombositler yerine PRP'de çalışılmıştır. Yüksek glukoz tek başına trombosit agregasyonunu etkilemezken kollajen varlığında normal glukozla göre trombositlerin agregasyonunu artırdığı gözlenmiştir. Literatürde de çalışmamıza benzer bulgular elde edilmiştir (8,18). Kuersetin hiperglisemik şartlarda kollajen uyarımlı trombosit agregasyonundaki artışı baskıladı. Kuersetinin normal glukoz düzeylerinde kollajenle uyarılan trom-

bosit agregasyonunu glikoprotein VI sinyal yolu üzerinden inhibe ettiği gözlenmiştir (19).

Hipergliseminin, insan trombositlerinde ROT üretiminde artışına neden olabileceği gösterilmiştir. Hiperglisemi kaynaklı ROT üretimi artışının trombositlerin agregasyonuna neden olduğu bildirilmektedir (8). Bizim çalışmamızda bu bulguları desteklemektedir. Yüksek glukozun istirahat halinde ve aktive trombositlerde süperoksit üretimini ve LPO düzeylerini artırdığını gözlemledik. Yüksek glukozun hücrelerde serbest radikal kaynaklardan biri olan ve trombositlerde de bulunan NADPH oksidaz enzimini aktive ederek süperoksit anyonu ve  $H_2O_2$  gibi maddelerin salınmasına ve ROT üretimine yol açabildiği gösterilmiştir (8). ROT'ların LPO ve protein oksidasyonunu indüklemesi hücrelerde yapısal, fonksiyonel değişikliklere ve hücre yaşlanmaya neden olabilmektedir (9,20). Bulgularımıza göre kuersetin aktive ve istirahat halindeki trombositlerde süperoksit üretimini ve LPO oluşumunu baskılamaktadır. Kuersetinin süperoksit üretimini baskılaması NADPH oksidazın inhibisyonu kaynaklı olabilir (21,22).

Giardino ve ark. (11) endotel hücrelerinde yaptıkları çalışmalarında hücre içi AGE oluşumu ile LPO arasında sıkı bir ilişki olduğunu, LPO'nun önlenmesi ile AGE oluşumunun da önlendiğini bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda AGE ve serbest radikallerin, protein kinaz C'yi aktive ettiği gösterilmiştir. Aktive olan protein kinaz C'nin, vasküler kan akımını, damar geçirgenliğini, hücre dışı matris bileşenlerini ve hücre büyümesini etkileyerek vasküler komplikasyonların patogenezinde rol aldığı gösterilmiştir (23,24). Diyabetik kişilerin trombosit proteinlerinin non enzimatik olarak glikozillenmesi sonucu trombosit membran akışkanlığının azaldığı ve agonistlere karşı daha hassas oldukları bilinmektedir (25). Çalışmamızda in vitro olarak glukozla trombositlerin inkübasyonu kontrol grubuna göre istirahat halinde ve aktive trombositlerde AGE düzeylerinin artışına neden olmuştur. Kuersetin antioksidan etkisi ile istirahat halinde ve aktive trombositlerde hiperglisemik şartlarda AGE oluşumunu baskılamaktadır. Fenolik bileşiklerin antioksidan kapasitesi ile AGE inhibisyonu arasında korelasyon gözlenmiştir (26). Kuersetin tarafından AGE oluşumunun baskılanması AGE oluşumunda ROT'ların rolünün olduğunun göstergesidir. AGE oluşumunda özellikle süperoksit anyonunun glikolitik enzim gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenazı inhibe ederek glikozilasyonu artırdığı gözlenmiştir (27).

Endotel hücrelerinde yapılan çalışmalarda hiperglisemik şartların NO'nun biyoyaralanımını azalttığı bildirilmektedir. Benzer şekilde diyabetik kişilerde endotel bağımlı vazodilatasyonun da azaldığı bildirilmektedir. Hipergliseminin endotel hücrelerinde mitokondriyal elektron transport zinciri aracılığıyla ROT üretimini artırarak peroksinitrit üretimi üzerinden NO'yu inaktive ettiği gösterilmiştir (28).

Trombosit kaynaklı NO'nun da potansiyel önemi büyüktür. Freedman ve ark. akut koroner sendromlu kişilerin kontrollere göre daha az NO ürettiğini göstermişlerdir (29). Bir diğer çalışmada ise diyabetik kişilerin trombositlerinde bazal NO (eNOS kaynaklı) salınımının azaldığı bildirilmektedir (30). Bu azalmada diyabetik kişilerde artmış homosistein düzeylerinin rolünün olabileceği gösterilmiştir (31). İn vitro yapılan bir çalışmada ise doz bağımlı olarak yüksek glukoz konsantrasyonlarında trombositlerde NO üretiminin arttığı gösterilmiştir (32). Biz in vitro olarak yaptığımız bu çalışmamızda 25 mmol/L konsantrasyonda glukozun tek başına trombositlerde NO üretiminde anlamlı değişikliğe neden olmadığını buna karşın kollajen aktivasyon sonrası anlamlı olarak trombosit NO üretiminin artış gösterdiğini gözlemledik. Kollajen ve trombinin normal glukoz şartlarında trombosit NO düzeylerinde artışlara neden olabildiği gösterilmiştir (5). Aktive trombositlerde yüksek glukoz varlığında NO üretiminin belirgin artışı, yüksek glukozun ve kollajenin NO üretimi artırıcı etkilerinin kümülatif etkisi kaynaklı olabilir. Çalışmamızda yüksek glukoz, aktive trombositlerde NO üretiminin artırmasının yanında hem istirahat halinde hem de aktive trombositlerde peroksinitrit oluşumu göstergesi olan nitrotrozin düzeylerinde de artışa neden oldu. Literatürde yüksek glukoz düzeyleri ile trombosit nitroztatif stresi arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma yoktur. Bulgularımıza göre; peroksinitrit oluşumu için gerekli olan süperoksit radikali de yüksek glukoz etkisi ile fazla miktarda trombositlerde oluştuğu için nitrotrozin düzeylerinde artış gözlemledik. Glukozun nitrotrozin düzeylerinde artışa neden olması açığa çıkan NO'nun hızla artan süperoksit anyonu radikali

ile reaksiyona girmesi ve proteinleri nitrolamasından kaynaklanabilir.

Antioksidan olarak kullandığımız kuersetin normal glukoz ve yüksek glukoz düzeylerinde trombosit NO üretiminin artmasına neden oldu. Kuersetinin hiperglisemik şartlarda NO üretimi üzerine etkisi ile ilgili literatürde yapılmış kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak polifernollerin trombosit agregasyonunu inhibe ettiği ve bu inhibisyonda NO'nun rolünün olduğu bildirilmektedir (21,22). Pignatelli ve ark. (21) normal glukoz düzeylerinde kollajen ile aktive trombositlerde yaptıkları çalışmalarında değişen konsantrasyonlarda kuersetin, kateşin, ve kuersetin+kateşinin NO üretimini artırdığını göstermişlerdir. Ancak çalışmalarında yüksek glukoz düzeylerini kullanmamışlardır. Çalışmamızda kuersetinin NO düzeylerinde artışa neden olmasına karşın normal ve yüksek glukoz düzeylerinde trombositlerde NT oluşumunun azalmasına neden oldu. Bu azalmanın nedeni de peroksinitrit için gerekli olan süperoksit anyonu üretiminin kuersetin tarafından baskılanması olabilir.

Sonuç olarak; yüksek glukoz istirahat halinde ve aktive trombositlerde oksidatif stresi tetiklemekte ve NO biyoyaralanımını azaltmaktadır. Bu değişiklikler yüksek glukoz ve kollajenin kümülatif etkileri nedeniyle aktive trombositlerde daha belirgin olarak gözlenebilmektedir. Kuersetin tarafından yüksek glukoz kaynaklı trombosit agregasyonunun, oksidatif stres artışının baskılanması ve azalan NO biyoyaralanımının artırılması bu etkilerde süperoksit anyonunun rolü olabileceğinin göstergesidir. Kuersetin bu antitrombosit etkileri ile diyabetin trombositlerle ilişkili komplikasyonlarında önemli rol oynayan trombosit agregasyonu ve aktivasyonunun önlenmesinde yararlı etki sağlayabilir.

**Teşekkür:** Bu çalışma, Marmara Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SAG-C-YLP-150513-0151 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Coccheri S. Approaches to prevention of cardiovascular complications and events in diabetes mellitus. *Drugs*. 2007; 67(7): 997-1026.
- Krotz F, Sohn HY and Pohl U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24(11): 1988-1996.
- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992; 6(12): 3051-3064.
- Mehta JL, Chen LY, Kone BC, Mehta P, Turner P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med*. 1995; 25(3): 370-377.
- Gkaliagkousi E, Ritter J and Ferro A. Platelet-derived nitric oxide signaling and regulation. *Circ Res*. 2007; 101(7): 654-662.
- Zou MH, Shi C, Cohen RA. High glucose via peroxynitrite causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with thromboxane/prostaglandin H2 receptor-mediated apoptosis and adhesion molecule expression in cultured human aortic endothelial cells. *Diabetes*. 2002; 51(1): 198-203.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007; 87(1): 315-424.
- Yamagishi SI, Edelstein D, Du, XL Brownlee M. Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes*. 2001; 50(6): 1491-1494.
- Sener A, Egemen G, Cevik O, Yanikkaya-Demirel G, Apikoglu-Rabus S, Ozsavci D. In vitro effects of nitric oxide donors on apoptosis and oxidative/nitrative protein modifications in ADP-activated platelets. *Hum Exp Toxicol*. 2013; 32(3): 225-235.
- Mosawy S, Effect of the flavonol quercetin on human platelet function: A review. *Food and Public Health* 2015; 5(1): 1-9.
- Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. Bcl-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation end products in bovine endothelial cells. *J Clin Invest*. 1996; 97(6): 1422-1428.
- Amorini AM, Tuttobene M, Tomasello FM, Biazzo F, Gullotta S, De Pinto V, Lazzarino G, Tavazzi B. Glucose ameliorates the metabolic profile and mitochondrial function of platelet concentrates during storage in autologous plasma. *Blood Transfus*. 2013; 11(1): 61-70.
- Fratantoni JC, Poindexter BJ, Measuring platelet aggregation with microplate reader. A new technical approach to platelet aggregation studies. *Am J Clin Pathol*. 1990; 94(5): 613-617.
- Gyllenhammar H. Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. *J Immunol Methods*. 1987; 97: 209-213.
- Beuge JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978; 52: 302-311.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 7: 248-254.
- Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol*. 1988; 37(5): 837-841.
- Tang WH, Stitham J, Gleim S, Di Febbo C, Porreca E, Fava C, Tacconelli S, Capone M, Evangelista V, Levantesi G, Wen L, Martin K, Minuz P, Rade J, Patrignani P, Hwa J. Glucose and collagen regulate human platelet activity through aldose reductase induction of thromboxane. *J Clin Invest*. 2011; 121(11): 4462-4476.
- Hubbard GP, Stevens JM, Cicmil M, Sage T, Jordan PA, Williams CM, Lovegrove JA, Gibbins JM. Quercetin inhibits collagen-stimulated platelet activation through inhibition of multiple components of the glycoprotein VI signaling pathway. *J Thromb Haemost*. 2003; 1(5): 1079-1088.
- Sener A, Ozsavci D, Oba R, Demirel GY, Uras F, Yardimci KT. Do platelet apoptosis, activation, aggregation, lipid peroxidation and platelet-leukocyte aggregate formation occur simultaneously in hyperlipidemia? *Clin Biochem*. 2005; 38(12): 1081-1087.
- Pignatelli P, Di Santo S, Buchetti B, Sanguigni V, Brunelli A, Violi F. Polyphenols enhance platelet nitric oxide by inhibiting protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation: effect on platelet recruitment. *FASEB J*. 2006; 20(8): 1082-1089.
- Mosawy S, Jackson DE, Woodman OL, Linden MD. The flavonols quercetin and 3',4'-dihydroxyflavonol reduce platelet function and delay thrombus formation in a model of type 1 diabetes. *Diab Vasc Dis Res*. 2014; 11(3): 174-181.
- Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998; 47(6): 859-866.
- Way KJ, Katai N, King GL. Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabetic Medicine*. 2001; 18(12): 945-959.
- Chappey O, Dosquet C, Wautier MP, Wautier JL. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur J Clin Invest*. 1997; 27(2): 97-108.
- Harris CS. Inhibition of advanced glycation end product formation by medicinal plant extracts correlates with phenolic metabolites and antioxidant activity. *Planta Med*. 2011; 77(2): 196-204.
- Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications unifying mechanism. *Diabetes*. 2005; 54(6): 1615-1625.
- Quijano C, Castro L, Peluffo G, Valez V, Radi R. Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293(6): H3404-3414.
- Freedman J, Ting B, Hankin B, Loscalzo J, Keane JF, Vita JA. Impaired platelet production of nitric oxide predicts presence of acute coronary syndromes. *Circulation*. 1998; 98(15): 1481-1486.
- Martina V, Bruno GA, Trucco F, Zumpano E, Tagliabue M, Di Bisceglie C, Pescarmona G. Platelet cNOS activity is reduced in patients with IDDM and NIDDM. *Thromb Haemost*. 1998; 79(3): 520-522.
- Mutus B, Rabini RA, Staffolani R, Ricciotti R, Fumelli P. Homocysteine-induced inhibition of nitric oxide production in platelets: a study on healthy and diabetic subjects. *Diabetologia*. 2001; 44(8): 979-982.
- Massucco P, Mattiello L, Russo I, Traversa M, Doronzo G, Anfossi G, Trovati M. High glucose rapidly activates the nitric oxide/cyclic nucleotide pathway in human platelets via an osmotic mechanism. *Thromb Haemost*. 2005; 93(3): 517-526.