

HEPARİN VE BUTAZOLIDİNİN ETKİSİ ALTINDA TROMBOSİTLERDE ULTRASTRÜKTÜREL VE FONKSİYONEL DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ

Gülera HÜSEYİNOVA^a, Ramazan KAYAPINAR^b, Gültkin AZİZOVA^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 görüldü. 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, destruktif, dejeneratif ve nekrobiotik değişiklikler izlendi. Bu değişiklikler de enzim sentezinde bozulma olduğunu göstermektedir. Trombositlerin dış membranlarının bozulması agregasyonun korunduğu, fakat nispeten azaldığını göstermektedir. Bu sonuçlara göre küçük dozların koagulasyon ve onu izleyen dönemlerde bozulmaya neden olduğu; yüksek dozların ise bu basamakları tamamen durdurduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Heparin, Butazolidin, Trombosit, Ultrastruktur.

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, Cerr. 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 necrobiotical 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 trombositer 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 dolaşımındaki diğer trombositlerde farklı yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açıp hemostazın çeşitli evrelerini etkileyebilirler.

Direkt antikoagulan heparin ve trans trombositer 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 makromoleküller mekanizmaları araştırıldı.

MATERIAL VE METOD

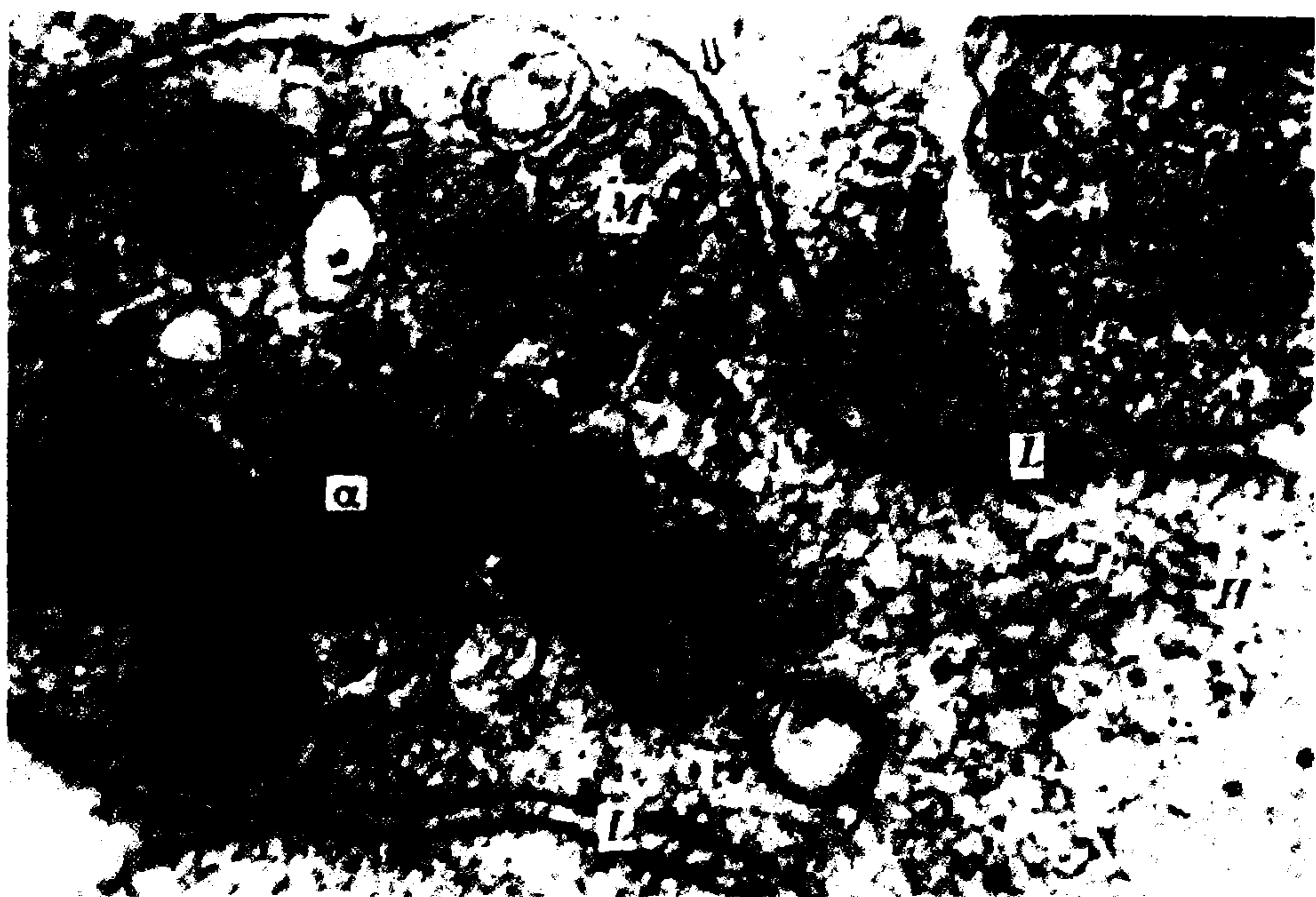
Çalışma, 25 erişkin tavşanda yapıldı. Hayvanlar 5 gruba ayrıldı.

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.



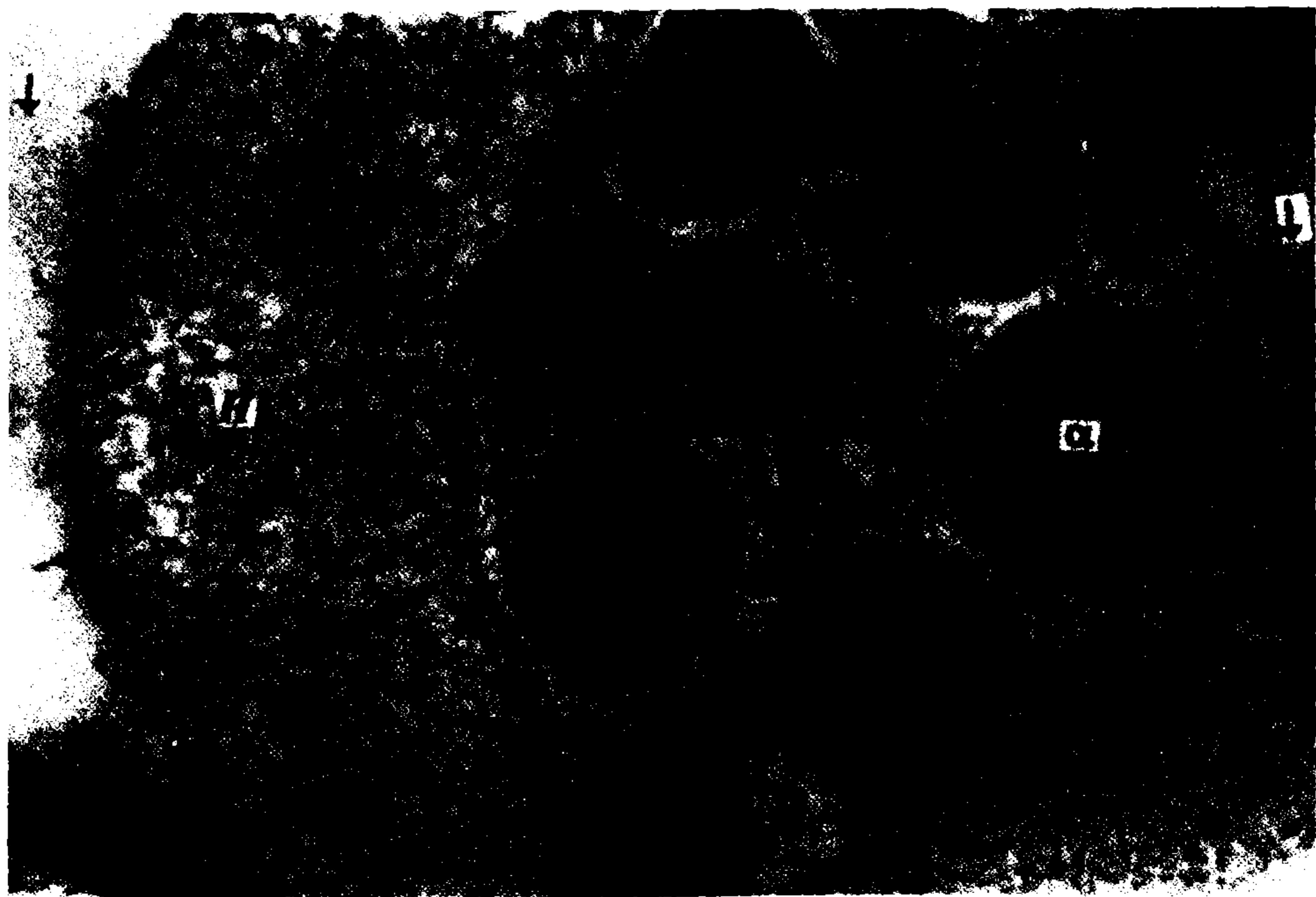
Şekil I. 500 IU/Kg heparin etkisi altında trombositler.

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

Onuncu gün sonunda tavşanların kulak marginal veninden kan alınarak trombositler ayrıldı. Trombositler %2.5'luk fosfat tamponlu glutaraldehit prefiksasyonu ve yine tamponlu %1'lük osmium tetaoksit postfixasyonundan 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 görünümdeydi. Bazları ufak çıktınlara sahipti. Dış membranlar kalınlaşmış, elektron-yoğun görünenmektedir. Trombositlerin birbirine dokunduğu yerlerde elektron-yoğun kalın dış membranlar arasında genişleme ve silikleşme tespit edildi. Agregasyon yapmış trombositlerin arasında birleştirici ara madde (lipidler) az miktardaydı. Hyalomerin yapıları korunmuş, çok belirgin olarak izlenmekteydi; lif yapıları, mikrotübüler 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, mikrovesikülerin hiperplazisi, (α) α-granüllerinin hipertrofisi. X.42000.

izlenmekteydi. Bazı α -granüllerinde hipertrofi ve hiperplazi dikkati çekmekteydi. Bunun yanısıra mitokondriler genişlemiş, matriksleri, dış membranları ve kristaller korunmactaydı. 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 bölgelerde 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 çıktıları kaybolmuştu. Dış membranlar bazlarında parçalanmış, bazlarında ise korunmuştu. Trombositlerin kümelendiği yerlerde aralıklar daralmış, bazı yerlerde ise görünmemektedi ve hialoplazmanın lipoprotein komplekslerinin lipidleri ile doldurulmuş idiler. Buna göre kümeleşmiş trombositler birbiri ile sıkıca yapışmaktadır. Hyalomer bölgelerde belirgin silikleşme dikkati

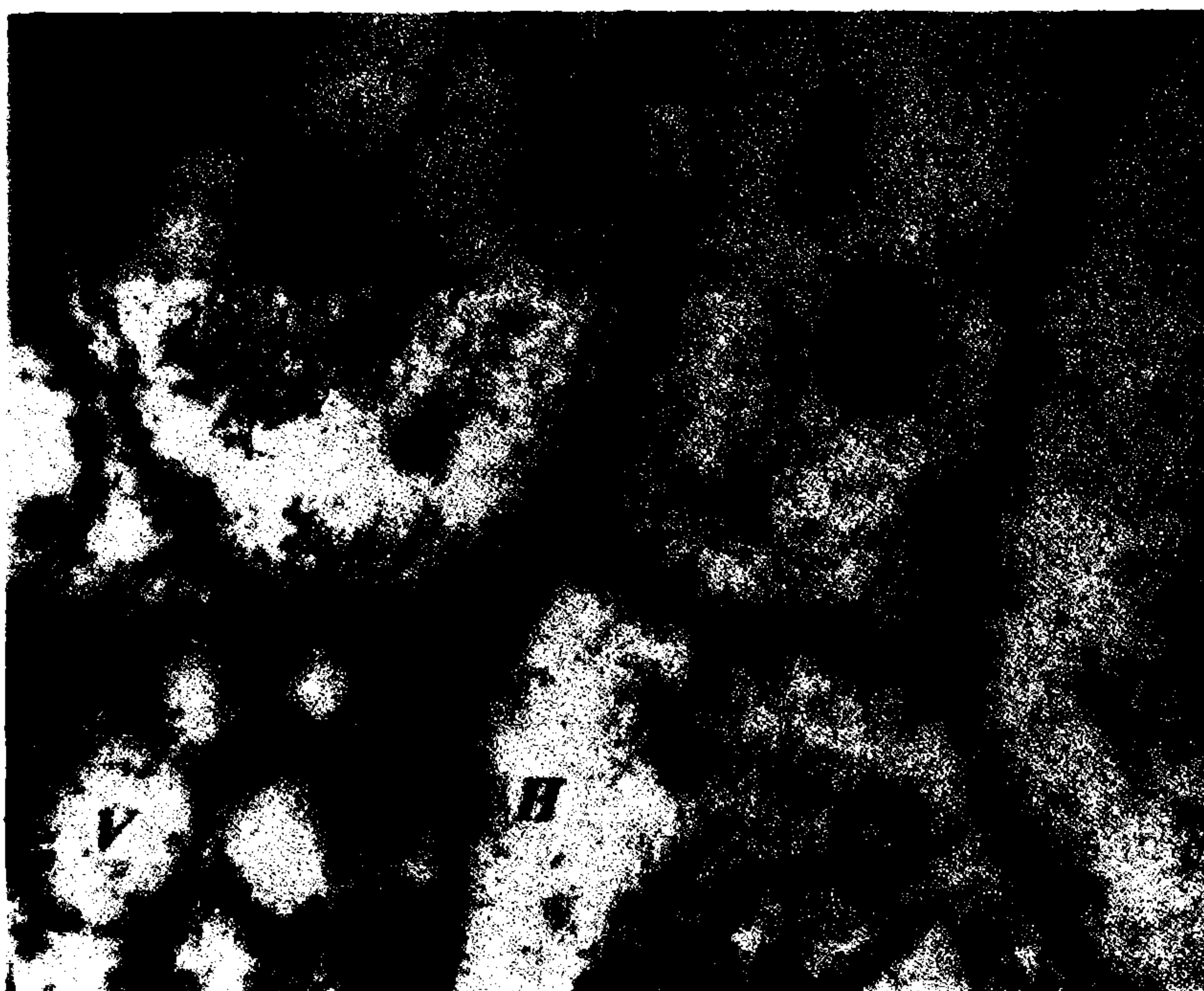


Şekil III. 1000 ü/Kg heparin etkisi altında trombositler.
(↓) Elektron-yoğun dış membranlar, (a) dev görünümülü α-granül. X.40000.

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

Dördüncü grubun elektron mikroskopik incelenmesinde; trombositlerin çoğunda derin destruktif, dejeneratif ve nekrobiyotik değişiklikler izlendi. Dış membranlar bozulmuş ve net olarak görünmemektedir. Hyalomer ve granülomer bölümlerinin yapıları parçalanmış, büyük vakuollere dönüşmüş ve dejener olmuş gibi irreversibl değişiklikler izlenmektedir (Şekil VI).

Kontrol grubundan ise; trombositler normal oval şekilliydiler ve bazlarında çıktıları vardı. Özellikle değişiklikler görünmemektedir (Şekil VII).



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

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

TARTIŞMA

Bilindiği gibi hemostaz patogenezinde 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 trombositer 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



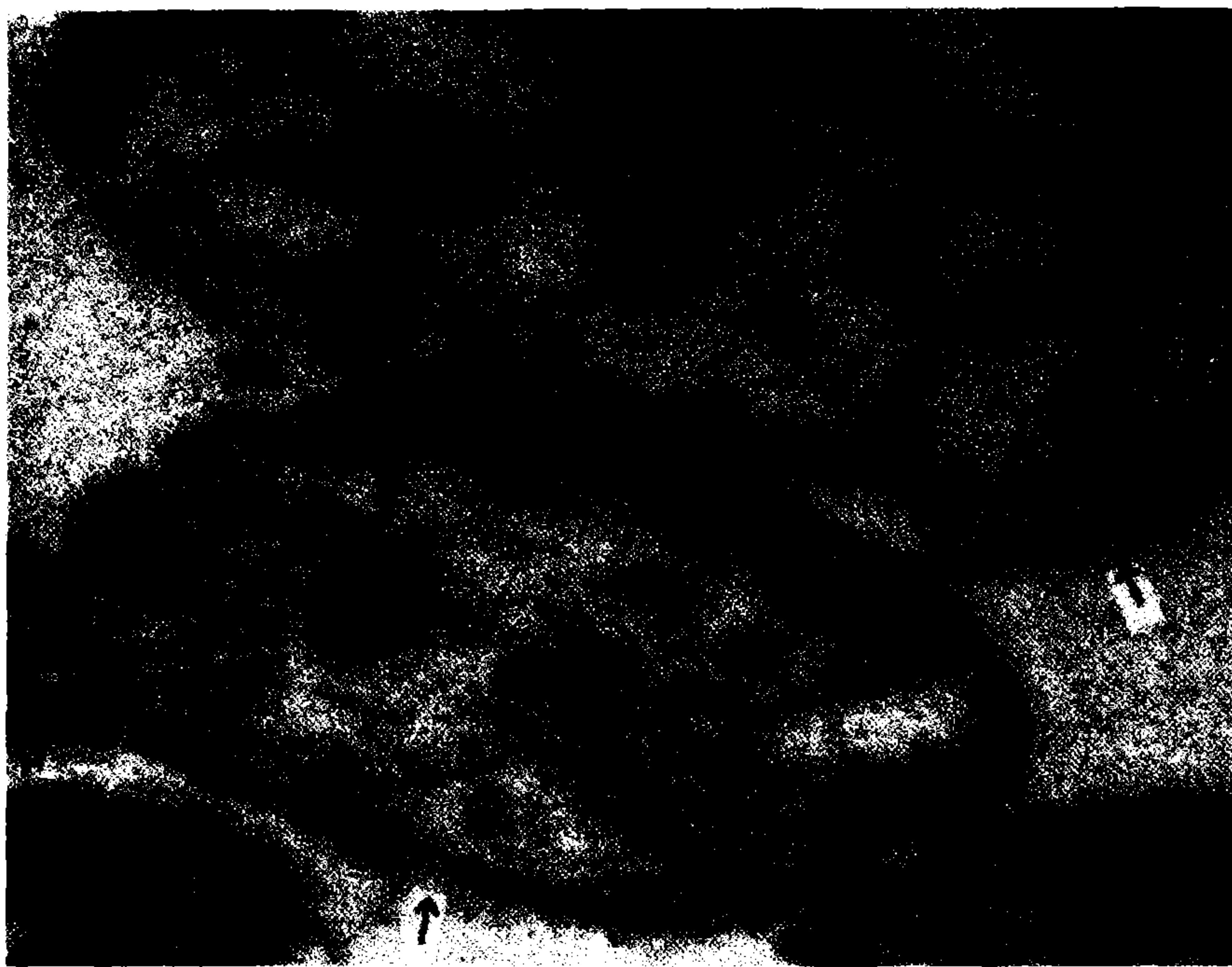
Şekil V. 0.3 mg/Kg butazolidin etkisi altında trombositler.

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

cıkmakta ve birleştirici madde gibi trombositler arasında yerleşmekteydi. Böylece agregasyon dönemi normal olarak başlamaktaydı. Bunu da granülomerde degranülasyon izlemekteydi. Fonksiyonel olarak degranülasyon ve trombositlerdeki bozukluklara göre seratonin, retraktozim, tromboplastin faktörü ve diğerleri dışarı çıkmaktaydalar ve hemostaz döneminin devamı oluşturmaktaydı.

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 kümelentiği 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 izlenmektedir. Dev α-granüllerin izlenmesi, mitokondrilerin hipertrofisi ve hiperplazisi, enzimlerin aşırı olduğunu göstermektedir. Trombositlerin



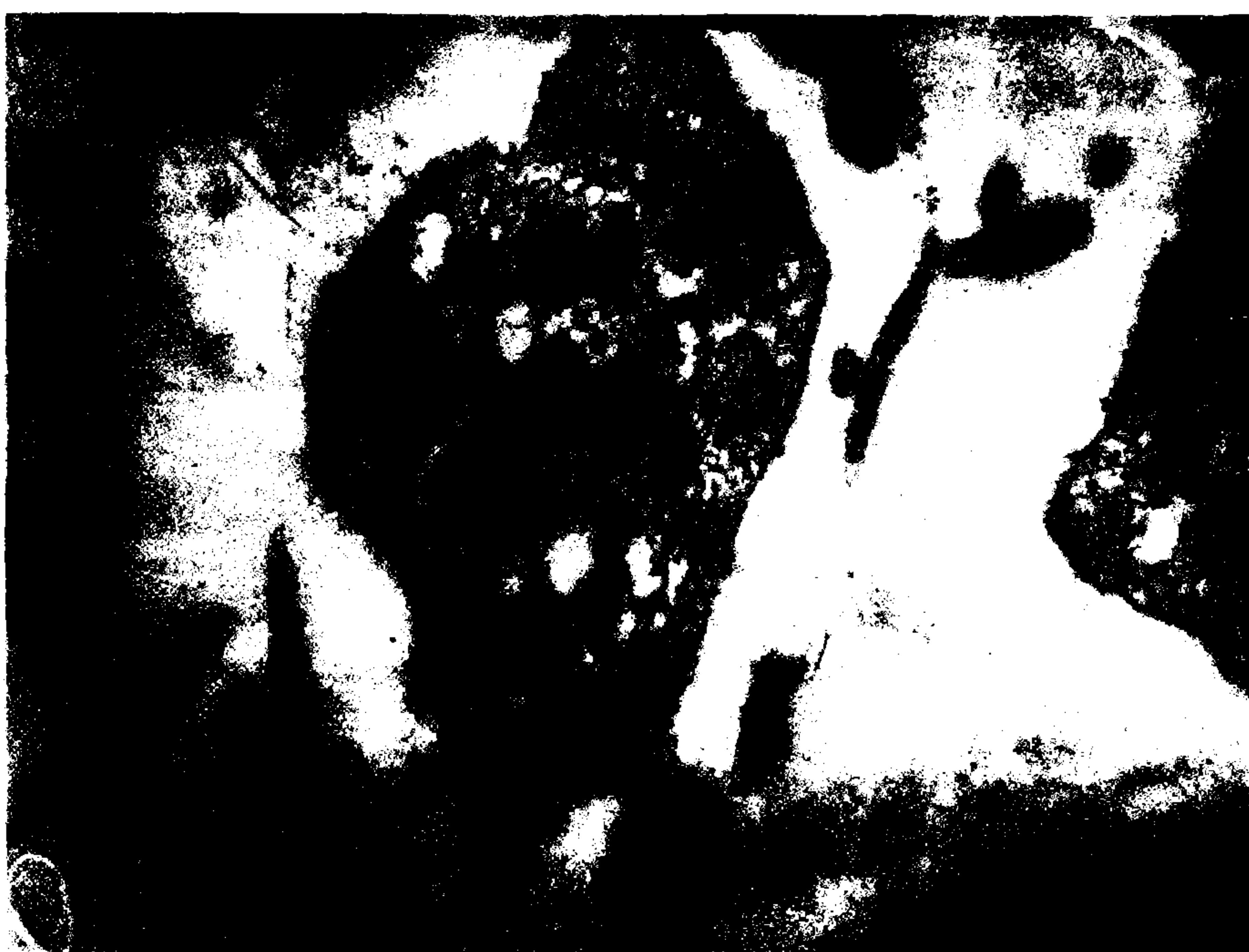
Şekil VI. 0.3 mg/Kg butazolidin etkisi altında trombositler.

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

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

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

Bizim bulgularımıza göre butazolidinin küçük dozlarının etkisi ile trombositlerde distrofik ve destruktif değişikler meydana gelmiştir. Yüksek dozlarda ise daha derin destruktif, dejeneratif ve nekrobiotik olaylar görülmüştür. Destruksiyona bağlı olarak trombositlerin çoğunun dış membranları bozulmakta, hyalomer lipidleri dışarı çıkmaktaydı. Buna bağlı olarak trombositler arası aralıklar daralarak lipidleri dolaktaydı. Büyük dozların kullanılması bu değişiklikleri daha da belirginleştir mektaydı. Demek oluyor ki butazolidinin her iki dozunda da agregasyon dönemi korunmaktadır. Bunun yanısıra granülomerde ultrastrüktürel 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-trombositer 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. Hüseyinova G, Mahmudova G. *Antikoagulanların etkisi altında trombositlerin ultrastruktürel değişiklikleri.* XI.Uluslararası Elektron Mikroskopi Kongresi, s 20-22,8-10 Eylül 1993.
3. Serov VV, Paukov VS. Ultrastruktur Patolojiya 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; Aneshenskuk 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. Dökmeçi İ. Farmakoloji, ilaç uygulamalarında temel kavramlar. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. s616-619, 1992.