

Heparin ve Düşük Moleküler Ağırlıklı Heparin Fraksiyonlarının Trombosit Agregasyonuna Etkileri

Naciye İŞBİL*
Behzat NOYAN*
Kasım ÖZLÜK*
Orhan N. ULUTİN**

ÖZET

Kollagen ve ADP ile oluşturulan trombosit agregasyonu üzerine heparin (liquemin) ve CY 216 ile CY 222 kodlu düşük moleküler ağırlıklı heparin fraksiyonlarının etkileri araştırıldı. Liquemin, trombosit agregasyonunu artırırken CY 216 ve CY 222 kodlu düşük moleküler ağırlıklı heparin fraksiyonlarının trombosit agregasyonunu azaltıcı yönde etkileri olduğu, deneylerde gözlemlendi.

SUMMARY

The Effect of Heparin and Low Molecular Weight Heparin Fractions on Platelet Aggregation

The effect of heparin (liquemine) and CY 216 with CY 222 coded low molecular weight heparin fractions on platelet aggregations formed by collagen and ADP was investigated. It was observed from the experimental results that while liquemine

* U.Ü. Tıp Fak. Fizioloji Anabilim Dalı.

** İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. İç Hastalıkları Anabilim Dalı.

was increasing the platelet aggregations, Cy 216 and CY 222 coded low molecular weight heparin fractions were decreasing the platelet aggregations.

Trombositler hemostazdaki etkinlikleri için üç fonksiyona sahiptir. Bunlar adezyon, agregasyon ve sekresyondur. Agregasyon, trombositlerde çeşitli ajanların etkisiyle veya adezyonu takiben oluşur¹. Bir seri yapısal ve biyokimyasal değişimlerle birlikte şekil değişikliği sonucu gelişir. Agregan ajanların başında ADP, kollagen, adrenalin, trombin, serotonin vs. gelmektedir^{1,2}. ADP, agregasyon olayında esas faktördür^{1,3}. Bütün diğer ajanlarla oluşan agregasyonun da ADP aracılığıyla olduğuna inanılmaktadır^{1,2}.

İn vitro olarak trombositin zengin plazmaya ADP ilave edildiği zaman trombositlerde ilk görülen değişiklik, şekil değişikliğidir². Bunu primer agregasyon takip eder. Eğer ADP çok düşük konsantrasyonda (0.1-0.4 μM) ise bu faz reversibildir. Eğer ADP konsantrasyonu orta değerde (0.4-1.5 μM) ise primer agregasyonu irreversible olan bir sekonder agregasyon dalgası takip eder. Bu dalga, primer trombosit agregatlarından salınan ADP ile oluşturulur. ADP'nin daha yüksek konsantrasyonları ile primer ve sekonder dalgalar karışıp birleşirler^{1,2}.

Trombositin zengin plazmaya kollagen ilave edildiği zaman primer dalga oluşmaz, kollagen liflerine trombositlerin adhere olması ile salınan ADP nedeniyle sadece sekonder dalga oluşur. Tipik bir kollagen kurbu agregasyon başlamadan önce bir lag faz ile karakterizedir¹. Bu lag faz, kollagen liflerinin trombositlere adhere olması ve ADP salınımını stimüle etmesi için zamana ihtiyaçları olması yüzünden olabilir.

ADP ile oluşturulan trombosit agregasyonunda maksimum amplitüdün artması agregasyonun artışını, azalması ise agregasyonun azalmasını gösterir. Kollagen ile oluşturulan agregasyonda da maksimum amplitüdün değerlendirilişi aynıdır. Ayrıca, lag fazın kısalması agregasyonun hızlandığını, uzaması ise agregasyonun yavaşladığını gösterir.

Klinikte 40-45 yıldan beri terapötik bir ajan olarak kullanılan heparinin, trombositlerde agregasyona sebep olduğunu kanıtlayan çalışmalar vardır^{4,7}. Heparinin en önemli komplikasyonu, vücudun çeşitli yerlerinde kanamalar meydana getirmesidir⁸⁻¹¹. Aynı zamanda seyrek de olsa agregasyon nedeniyle trombositopeni^{4,6,7,12,13} ve arterial tromboza neden olduğu da bildirilmektedir^{4,13}.

Heparin, moleküler ağırlığı 3000 ile 40000 Dalton arasında olan, yüksek derecede asidik, polisakkarit yapısında bir maddedir^{14,15}. Çeşitli büyüklükteki polisakkaritlerin karışımından ibarettir. Bu karışımı oluşturan öğelerin antikoagülan etkinlikleri de farklıdır^{9,16}. Heparinin çeşitli komplikasyonları olması nedeniyle, değişik kromatografi ve presipitasyon metodları ile düşük moleküler ağırlıklı ve yüksek moleküler ağırlıklı fraksiyonlar elde edilmiştir. Moleküler ağırlığı 8000 Daltonun altında olan heparin fraksiyonları, düşük moleküler ağırlıklı hepain (LMWH) olarak kabul edilmektedir¹⁷. Moleküler ağırlığı 8000 Daltonun

üzerinde olanlar ise yüksek moleküler ağırlıklı heparin (HMWH) olarak kabul edilmektedir. Farklı moleküler ağırlığa sahip heparin fraksiyonlarının farklı etki ve risk özelliklerine sahip olduklarını ispatlayan çalışmalar bulunmaktadır.

Biz çalışmamızda heparin (liquemin) ile molekül ağırlığı 4500 Dalton olan CY 216 ve molekül ağırlığı 2500 Dalton olan CY 222 kodlu düşük moleküler ağırlıklı heparin fraksiyonlarının trombosit agregasyonuna etkilerini karşılaştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Deneylerimizde sağlıklı 7 kişiden kan alındı. Kan alma işleminde deneklerin aç olmalarına, bir hafta öncesine kadar antiagregan ilaçlar almamış ve kan alma işleminden 8 saat öncesine kadar sigara içmemiş olmalarına dikkat edildi. Alınan kan 1/10 oranında % 3.8'liksodyum sitrat ile antikoagülanlandı. 5 dakika 2000 rpm'de santrifüjlenerek elde edilen trombositten zengin plazma (PRP) plastik bir tübe alındı. Geri kalan çökelti tekrar 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi ve trombositten fakir plazma (PPP) elde edildi. PPP, agregometrenin kalibrasyonunda kullanıldı, PRP'deki trombosit sayısının 250.000-300.000 olmasına dikkat edildi. Bu sayı istenen değerde olmadığına PPP ile ayarlandı.

Agregasyon kurbları, Payton agregometresi (800 B) ile çizdirildi. Agregan ajan olarak ADP ve kollagen (Stago) kullanıldı. Agregasyona etkileri incelenecek olan liquemin piyasadan, CY 216 ve CY 222 kodlu LMWH fraksiyonları Choay Enstitüsünden temin edildi.

Trombosit agregasyonu ADP ve kollagen ile ayrı ayrı oluşturulduğundan deneyler 2 grup altında yapıldı.

Grup I: Liquemin, CY 216 ve CY 222'nin ADP ile oluşturulan agregasyona etkilerinin araştırıldığı grup.

Bir tüpe 450 µl PRP üzerine 50 µl Owren buffer ilave edilerek 37°C'de 10 dakika aletin inkübatöründe bekletildi. Daha sonra 50 µl ADP (1 µg/ml) ilave edilerek agregasyon oluşturuldu. Bu şekilde Owren buffer eklenerek oluşturulan agregasyon, kontrol grubudur. Diğer tüplerde de aynı işlemler yapıldı, sadece Owren buffer yerine liquemin (1 µg/ml), CY 216 (1 µg/ml) ve CY 222 (1 µg/ml) eklendi. Bu grupta çizdirilen agregasyon kurblarının maksimum amplitüdüleri ölçülerek değerlendirme yapıldı.

Grup II: Liquemin, CY 216 ve CY 222'nin kollagen ile oluşturulan agregasyona etkilerinin araştırıldığı grup.

Yine kontrol olarak bir tüpe 450 µl PRP üzerine 50 µl Owren buffer eklenerek 10 dakika 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra 50 µl kollagen (5 µg/ml) ilave edilerek agregasyon çizdirildi. Diğer tüplere Owren buffer yerine liquemin (1 µg/ml), CY 216 (1 µg/ml) ve CY 222 (1 µg/ml) ilave edildi. Bu grupta çizdirilen agregasyon kurblarının maksimum amplitüdüleri ve lag fazları ölçülerek değerlendirme yapıldı.

BULGULAR

Grup I: ADP ile oluşturulan trombosit agregasyonunda kontrol grubunun maksimum amplitüdü ortalama 12 ± 0.6 cm olarak bulundu. Liquemin ilavesi ile çizdirilen agregasyon kurplarının maksimum amplitüdü ise ortalama 13.6 ± 0.6 cm idi. Liqueminin, trombosit agregasyon kurburnun maksimum amplitüdünü, kontrol grubuna oranla arttırdığı gözlemlendi.

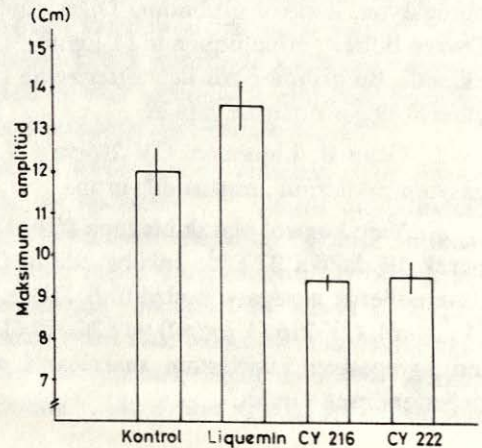
CY 216 kodlu LMWH fraksiyonunun ilavesi ile çizdirilen agregasyon kurburnun maksimum amplitüdü ise ortalama 9.4 ± 0.2 cm bulundu. Bu grupta ölçülen maksimum amplitüd değerleri kontrol grubundan daha düşüktü. CY 222 kodlu LMWH fraksiyonunun etkisi incelendiğinde ise maksimum amplitüd ortalama 9.5 ± 0.4 cm idi. CY 222 kodlu fraksiyon da, CY 216 kodlu fraksiyon gibi maksimum amplitüdü kontrol grubunkine oranla azaltmıştı (Tablo: I, Şekil: 1)

Tablo: I- Liquemin ve CY 216, CY 222 Kodlu LMWH Fraksiyonlarının ADP İle Oluşturulan Agregasyona Etkilerinin Maksimum Amplitüd İle Gösterilmesi

Deney No	Kontrol	Liquemin	CY 216	CY 222
1	15.9	17	11.6	12.4
2	13.4	15	10	10.5
3	10.5	15.2	7.6	7.9
4	11.7	12.3	9.8	9
5	11.5	12.6	9.5	9.6
6	9.1	10.4	8	7.2
7	12	13	9.5	9.9
X	12	13.6	9.4	9.5
SH	0.6	0.6	0.2	0.4
P		$P < 0.05^*$	$P < 0.001^*$	$P < 0.001^*$

* Kontrol grubuna göre anlamlılık düzeyleri.

Şekil: 1
Liquemin ve CY 216, CY 222 kodlu LMWH fraksiyonlarının ADP ile oluşturulan agregasyona etkilerinin maksimum amplitüd ile gösterilmesi.



Liquemin, ADP ile oluşturulan trombosit agregasyonunu arttırıcı yönde, CY 216 ve CY 222 kodlu LMWH fraksiyonları ise agregasyonu azaltıcı yönde etkili olmaktadır.

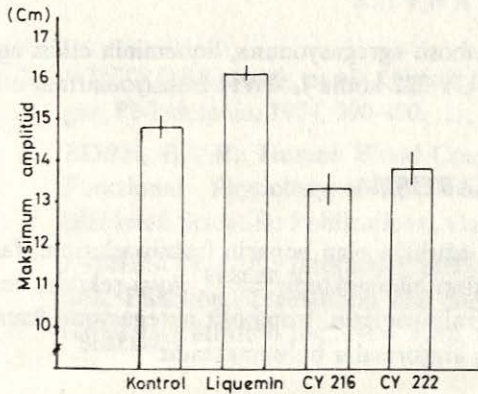
Grup II: Kollagen ile oluşturulan trombosit agregasyonunda kontrol grubunun maksimum amplitüdü ortalama 14.8 ± 0.3 cm, lag faz ise 1.5 ± 0.04 cm değerindeydi. Liquemin ilave edilen grupta maksimum amplitüd ortalama 16.1 ± 0.2 cm'ye yükselirken, lag faz 1.1 ± 0.04 cm'ye kısalmıştı.

CY 216 kodlu LMWH fraksiyonunun ilave edildiği grupta maksimum amplitüd ortalama 13.3 ± 0.4 cm, lag faz 2.6 ± 0.05 cm'dir. CY 222 kodlu fraksiyonun trombosit agregasyonuna etkisi incelendiğinde, agregasyon kurbanun maksimum amplitüdü ortalama 13.8 ± 0.4 cm, lag fazın ise 2.5 ± 0.04 cm ölçüldü (Tablo: II, III, Şekil: 2, 3).

Tablo: II- Liquemin ve CY 216, CY 222 Kodlu LMWH Fraksiyonlarının Kollagen İle Oluşturulan Agregasyona Etkilerinin Maksimum Amplitüd İle Gösterilmesi

Deney No	Kontrol	Liquemin	CY 216	CY 222
1	16.4	17.5	14.7	16
2	16	17.4	15	15.2
3	15.3	16.6	14.5	14.8
4	13.8	14.5	12	12.5
5	14.3	15.9	12.5	12.9
6	12.2	14	10.1	11
7	15.9	17	14.1	14.5
X	14.8	16.1	13.3	13.8
SH	0.3	0.2	0.4	0.4
P		P < 0.001*	P < 0.001*	P < 0.001*

* Kontrol grubuna göre anlamlılık düzeyleri.

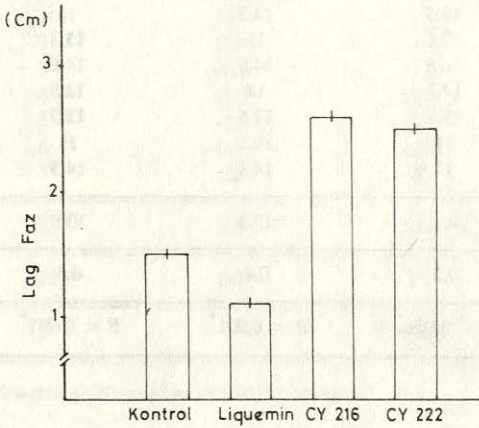


Şekil: 2
Liquemin ve CY 216, CY 222 kodlu LMWH fraksiyonlarının kollagen ile oluşturulan agregasyona etkilerinin maksimum amplitüd ile gösterilmesi.

Tablo: III- Liquemin ve CY 216, CY 222 Kodlu LMWH Fraksiyonlarının Kollagen İle Oluşturulan Agregasyona Etkilerinin Lag Faz İle Gösterilmesi

Deney No	Kontrol	Liquemin	CY 216	CY 222
1	0.8	0.5	1.6	1.6
2	1.3	1	2.1	2
3	2	1.6	3.4	3.1
4	1.4	0.5	2.5	2.3
5	1.4	1.1	2.7	2.6
6	2.4	2	3.1	3
7	1.5	1.2	2.9	2.6
X	1.5	1.1	2.6	2.5
SH	0.04	0.04	0.05	0.04
P		P < 0.005*	P < 0.001*	P < 0.001*

* Kontrol grubuna göre anlamlılık düzeyleri.



Şekil: 3
Liquemin ve CY 216, CY 222 kodlu LMWH fraksiyonlarının kollagen ile oluşturulan agregasyona etkilerinin lag faz ile gösterilmesi.

Kollagen ile oluşturulan trombosit agregasyonuna, liqueminin etkisi agregasyonu arttırıcı yönde, CY 216 ve CY 222 kodlu LMWH fraksiyonlarının etkisi ise azaltıcı yönde olmaktadır.

TARTIŞMA

Heparin ve farklı moleküler ağırlıkta olan heparin fraksiyonlarının, farklı antikoagülan aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir^{16,18,19}. Aynı şekilde, heparin ve farklı moleküler ağırlıktaki fraksiyonların, trombosit agregasyonu üzerine farklı etkilerde olduğunu ileri süren araştırmalar bulunmaktadır^{4-7,12,18}.

Bizim çalışmalarımız, liqueminin ADP ve kollagen ile oluşturulan agregasyonu kuvvetlendirdiğini gösterdi. Diğer araştırmacılar da unfraksiyone heparin preparatlarının trombosit agregasyonunu önemli derecede arttırdığını göstermişlerdir⁴⁻⁷. Bu durum, unfraksiyone heparinde yüksek moleküler ağırlıklı heparinin bulunması ile açıklanabilmektedir. Ticari heparinlerde düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı fraksiyonlar içerirler. Bu yüzden liqueminin de agregasyonu arttırıcı etkisi, içerdiği yüksek moleküler ağırlıklı heparin fraksiyonu nedeniyle¹⁸.

Daha önce yapılan bir kısım çalışmada, LMWH fraksiyonlarının agregasyona neden olduğu, fakat bunların unfraksiyone heparine göre çok daha az etkili oldukları belirtilmiştir^{4,5}. Bazı araştırmacılar, LMWH fraksiyonlarının agregasyonu arttırıcı etkisi olmadığını⁶, bazıları ise agregasyonu azaltıcı etkisi olduğunu bildirmişlerdir^{12,18}.

Bizim deneylerimizde, CY 216 ve CY 222 kodlu LMWH'in ADP ve kollagen ile oluşturulan agregasyonu azalttığı gözlemlendi. Sonuçlarımız LMWH fraksiyonlarının, zayıf bir etki de olsa, agregasyon oluşturuca etkisi olduğunu ileri süren literatürlerle^{4,5} uygunluk göstermemektedir. Buna karşın, agregasyonu inhibe ettiğini ileri süren literatürlerle paraleldir^{7,12,18}.

Deneyler sonucunda gözlenen liqueminin agregasyonu arttırıcı yönde etkili olması, LMWH fraksiyonlarının ise azaltıcı yönde etkili olması durumunun nedeni tam olarak aydınlığa kavuşmamıştır. Fakat bazı çalışmalar bu farklı etkilerin, trombosit prostaglandinlerinin sentezini heparin ve fraksiyonlarının farklı şekilde etkilemesi sonucu olduğunu ortaya koymuşlardır^{6,7,18}. Ayrıca farklı moleküler ağırlıktaki fraksiyonlar AT III için düşük ya da yüksek affiniteye sahiptir^{7,16}. Bu durumun agregasyonla ilişkili olup olmadığı konusu bazı araştırmacılar tarafından incelenmiş olmasına rağmen kesin bir sonuca varılamamıştır^{4,7}.

Bu in vitro çalışmaların ışığında liquemin, trombosit agregasyonuna bağlı olarak trombozun gelişmesinde risk faktörü olabilir. Diğer yandan LMWH ise risk faktörü değildir.

KAYNAKLAR

1. WINTROBE, M.M., et al.: Clinical Hematology. 7th edition, Lea and Febiger, Philadelphia, 1974, 390-400.
2. BORN, G.V.R.: Human Blood Coagulation, Haemostasis and Trombosis. Functional Physiology of Platelets. (Ed; Rosemary Biggs), 2nd edition, Blackwell Scientific Publications., Oxford, 1976, 168-185.
3. JAMIESON, G.A.: Interaction of Platelets and Collagen. Platelets Production, Function, Transfusion and Storage. (Ed: Baldini, M.G., Ebbe, S.), Grune and Stratton Inc., New York, 1974, 171-175.

4. BRACE, L.D., FAREED, J.: Heparin induced platelet aggregation: Dose/response relationships for a low molecular weight heparin derivative (PK 10169) and its subfractions. *Thrombosis Research.*, 42: 769-782, 1986.
5. WESTWICK, J., SCULLY, M.F., POLL, C., KAKKAR, V.V.: Comparison of the effects of low molecular weight heparin and unfractionated heparin on activation of human platelets in vitro. *Thrombosis Research.*, 42: 435-447, 1986.
6. BARRADAS, M.A., MIKHAILIDIS, D.P., et al.: Comparison of the platelet pro-aggregatory effect of conventional unfractionated heparins and a low molecular weight heparin fraction (CY 222). *British Journal of Haematology.*, 67 (4): 451-457, 1987.
7. HEINRICH, D., GÖRG, T., SCHULZ, M.: Effects of unfractionated and fractionate heparin on platelet function. *Haemostasis.*, 18: Suppl. 3, 48-54, 1988.
8. DOUTREMEPUICH, C., CASTRIOTO, T., et al.: What is the best plas-matic activity which could be correlated with the antitrombotic effect of heparin and a low molecular weight heparin fragment? *Thromb. Res.*, 48: 245-251, 1987.
9. MÜFTÜOĞLU, E.: Klinik Hematoloji. Dicle Üniversitesi Basımevi Müdürlüğü., Diyarbakır, 1986, 525-533.
10. BRATT, G., TORNEBOHM, E., GRANAVIST, S., ABERG, W., LOCKNER, D.: A Comporison between low molecular weight heparin (KABI 2165) and standart heparin in the intravenous treatment of deep venous thrombosis. *Thromb. Haemost.*, 54(4): 813-817, 1985.
11. STOSSEN, J.M., JUHAN-VAGUE, I., ALESSI, M.C., DE COCK, F., COLLEN, D.: Potentiation by heparin fragments of thrombolysis induced with activator or human single-chain urokinase-type plasminogen activator. *Thromb. Haemost.*, 58(3): 947-950, 1987.
12. VITOUX, J.F., MATHIEU, J.F., et al.: Heparin-associated thrombocyto-penia treatment with low molecular weight heparin. *Thrombosis and Hae-mostatis.*, 55(1): 37-39, 1986.
13. RANKIN, J.A.: Heparin-induced trombosis (white clot syndrome) secondary to proplactic subcutaneous administration of heparin. *The Canadian Journal of Surgery.* 31(1): 31-32, 1988.
14. MESSMORE, H.L.: Clinical use of heparin fractions, fragments and heparinoids. *Semin. Thromb. Haemost.*, 11(2): 208-211, 1985.
15. BARROWCLIFFE, T.W., MERTON, R.E., HAVERCROFT, S.J., THUNBERG, L., LINDAHL, U., THOMA, D.P.: Low-Affinity heparin potentiates the action of high-affinity heparin oligosaccharides. *Thromb. Res.*, 34: 125-133, 1984.

16. SCULLY, M.F.: The use of an automated analyzer in the evaluation of antithrombin III and heparin. *Semin. Thromb. Hemost.*, 9(4): 303-311, 1983.
17. VINAZZER, H., WOLER, M.: A new low molecular weight heparin fragment (PK 10169): In vitro and in vivo studies. *Thromb. Res.*, 40: 135-146, 1985.
18. ÇİZMECİ, G., AYTİŞ, Ş., ULUTİN, O.N.: The effect of low molecular weight (LMW) and high molecular weight (HMW) heparin fractions on platelet functions. *Thrombosis and Hemorrhagic Diseases* (Ed: Ulutin, O.N., Vinazzar). Gözlem Printing and Publishing Co., İstanbul, 1986, 118-124.
19. ÖZLÜK, K., NOYAN, B., ULUTİN, O.N., İŞBİL, N.: Venöz tromboz oluşturan tavşanlarda heparin ve heparin fraksiyonlarının antitrombotik etkilerinin karşılaştırılması, *U.Ü. Tıp Fak. Dergisi*, 2(15): 227-234, 1988.

Araş. Gör. Naciye İŞBİL
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
BURSA