

# Eritrosit Membranında Fibrinolitik Aktivitenin Araştırılması

Kasım ÖZLÜK\*  
Orhan N. ULUTİN\*\*

## ÖZET

Çalışmamızda pıhtılaşma mekanizmasına katkısı olan eritrositlerin, fibrinolitik aktivitesinin araştırılması amaçlandı. Eritrositler distile su ile patlatılarak, distile su ile iyice yıkandı. Çöken eritrosit membranları owren tamponu ile süspanسیون şekline getirildi. Eritrosit membranları 30 saniye aralıkla toplam 60 saniye buz içinde sonik ossilasyona tabi tutularak membranları parçalandı. Membran parçacıkları owren tamponu ile çözüldü. Membran fibrinolitik aktiviteleri E.E.Z. (Euglobulin Erime Zamanı) ve fibrin plak yöntemiyle ölçüldü. Her iki yöntemle de anlamlı bir aktivite görüldü.

## SUMMARY

### Investigation of the Fibrinolytic Activity in the Erythrocytes Membrane

*In this study, fibrinolytic activity of erythrocytes which have an influence on the coagulation mechanism, has been investigated. Erythrocytes were washed thoroughly and burst in distilled water. The solution was prepared by adding owren buffer on the precipitated erythrocyte membranes. Erythrocyte membranes are operated by sonic oscillation in ice for 60 seconds each cell for 30 seconds consecutively. The membrane particules were solved in owren buffer. Membrane fibrinolytic activity were used to measure by E.L.T. (Euglobulin Lysis Time) and fibrin plate methods. With both method reasonable activities were seen.*

\* Biyolog Uzm. Dr., U.Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji Ana Bilim Dalı Araştırma Görevlisi

\*\* Prof. Dr., İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi

Çeşitli faktörlerin etkisiyle oluşan kan pıhtısının parçalanma ve eritilmesine "fibrinolizis" denir.

Ulutin'in belirttiği gibi; 1893 de Destre bekletilen bir kan pıhtısının eriyebileceğini görmüştür. Fibrinin kendiliğinden parçalandığını düşünerek bu olaya ilk defa fibrinolizis demiştir. 1906 da Morawitz ani ölen kişilerin kanının pıhtılaşmadığını gözlemiş ve bu kanı normal bir kana ilave ettiğinde pıhtılaşmanın olmadığını görmüştür <sup>1</sup>. 1945 de Christensen <sup>2</sup> yaptıkları deneylere dayanarak insan plazmasının globulin fraksiyonunda bir litik faktörün ön maddesinin bulunduğunu öne sürmüştür. Bu litik faktörün ön maddesini plazminojen, plazminojeni aktive eden maddeyi aktivatör ve meydana gelen maddeyi plazmin diye isimlendirmiştir. Bu isimlendirme günümüzde de kullanılmaktadır.

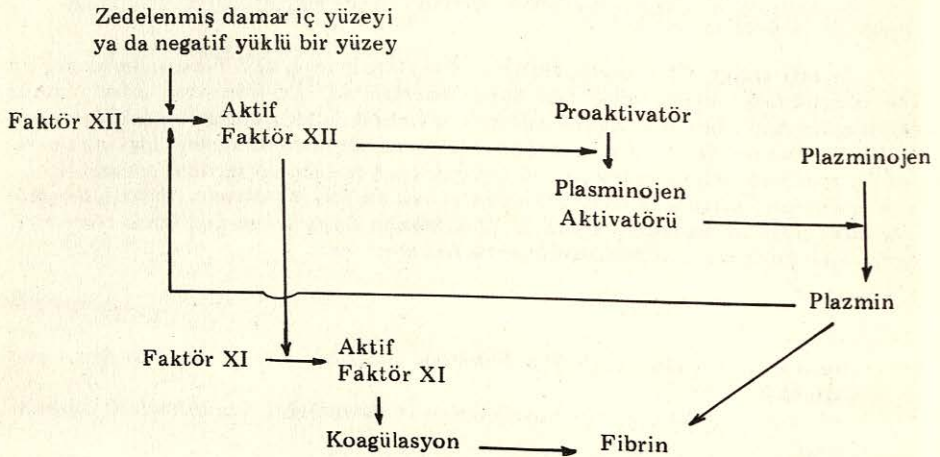
Fibrinolizis özel proteolitik reaksiyonlar sonucu oluşur. Bu sistemin aktif enzimi plazmindir. Plazmin kanda aktif şekilde bulunmaz. İnaktif bir şekli olan plazminojen şeklinde bulunur. Spesifik aktivatörlerle süratle oluşur, fizyolojik işlevlerinin tamamlanmasından sonra inhibitörlerle ortamdan kaldırılırlar. Aktivatör ve inhibitörlerin tam bir dengesi fibrinolitik sistemin fizyolojik fonksiyonlarının temelidir.

Plazmin proteolitik enziminin en iyi substratı fibrindir. Fibrinden başka fibrinojen, faktör 11, faktör X, faktör VII, faktör V gibi pıhtılaşma faktörlerini ve jelatin, kazein, glukagon ve somatotropini parçalar.

Fibrinolitik enzim olan plazminin, onun inaktif öncü maddesi olan plazminojenden aktive olması da proteolitik bir olaydır. Plazminojen molekülündeki Arginine-Valine peptid bağlarının hidrolizle parçalanması plazminojene aktivasyon kazandırarak plazmin şekline dönüştürür <sup>3</sup>.

Plazminojen aktivasyonu iki yolla olur.

1. İntrinsik Plazminojen Aktivasyonu: Faktör XII nin aktivasyonu ile olur <sup>4</sup>. Faktör XII'nin aktivasyonu ile bir taraftan koagülasyon mekanizması aktive olurken, diğer taraftan fibrinolitik sistem aktive olmaktadır.



2. Ekstrinsik Plazminojen Aktivasyonu: Aktivatörler yoluyla plazminojenin aktivasyon şeklidir. Aktivatörler plazminojendeki peptid bağlarını hidrolize eden, özel proteolitik enzimlerdir. Plazminojen aktivatörleri doğal olarak;

- a) Dolanan kanda "kan aktivatörleri" şeklinde bulunur. Bu aktivatörlerin kaynağının damar endoteli olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle bu aktivatörlere damar duvarı aktivatörleri de denmektedir <sup>5</sup>.
- b) İnsan ve hayvanların değişik dokularında "doku aktivatörleri" şeklinde bulunurlar. Dokuların damarlanma özelliğine göre değişik dokularda değişik konsantrasyonda doku aktivatörleri bulunmuştur. İnsan karaciğer, dalak ve testisleri düşük aktivatör düzeyine sahiptir. Uterus, suprarenal bezler, lenf nodları, prostat, tiroid, akciğerler ve ovaryumlar aktivatörlerce zengin organlardır <sup>6</sup>.
- c) İdrarda böbrek epitel hücreleri tarafından salgılanan aktivatörler bulunmuştur. Bunlara "Ürokinaz" adı verilir. Bu aktivatör nedeniyle idrar fibrinolitik aktiviteye sahiptir <sup>7</sup>.
- d) Streptokok ve stafilokok'larda "streptokinaze" veya "fibrinalizin" adı verilen aktivatörler bulunmuştur.
- e) Ayrıca çeşitli salgılarda ve salgı kanallarının duvarlarında plazminojen aktivatörleri bulunmuştur (süt, gözyaşı, semen, safra).

Canlı organizma normal fizyolojik dengeyi korumak eğilimindedir. Fibrinolitikteki ve koagülasyondaki artmayı reddeder. Plazmada aktivasyon mekanizmalarını çeşitli noktalarda tıkayan inhibitörler bulunmuştur <sup>8</sup>. Karaciğerin antiplazmin ve inhibitörleri üretmek ve aktivatör ve inhibitörleri elimine etmek gibi fibrinolitik sisteme katkısı vardır. Ayrıca plazminojenlerin kaynağının karaciğer olduğu ve eosinofilik granüositlerin de ikinci derecede plazminojen ürettikleri gösterilmiştir.

Hücre membranlarının birçok fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları vardır. Koagülasyon mekanizmasında ikinci derecede rol oynayan eritrositlerin fibrinolitik aktiviteye etkilerinin araştırılması amacıyla eritrosit membranlarında plazminojen aktivatörlerinin varlığının araştırılması amaçlandı.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Eritrosit membranı ayrılacak kan 1/9 oranında EDTA (0.077 M) lı alındı. Fibrinolytic testlerinde kullanılacak test plazması 1/9 oranında sitratlı olarak sağlıklı insanlardan alındı. 3 veya 4 farklı insan plazması karıştırılarak test plazması hazırlandı.

Deneyle ilgili değişik aşamalarında kullanılan tampon çözeltiler:

Eritrositleri yıkamak ve membranları homojen süspansiyon yapmak için kullanılan tampon; Owren tamponu: 0.28 M Barbitol, 0.814 M NaCl, 215 cc. 1 N HCl, distile su ile 1 lt. ye tamamlanır (Tampon - 1).

E.E.Z. tamponu: 0.25 gr. asit borik. 4 gr. boraks, 2.20 gr. NaCl tartılıp distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır (Tampon - 2).

İmidazol buffer: 90 ml N/10 HCl, 1.75 gr. imidazol ile karıştırılıp distile su ile 100 cc'ye tamamlanır. pH 7.2-7.4 (Tampon - 3).

1/9 oranında EDTA'lı alınan kandan eritrositler santrifüjle ayrılır. Distile su ile patlatılarak 12.000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek membranları çöktürülür.

Membran Parçacıklarının Eldesi: Eritrosit membran parçacıkları George ve arkadaşlarının önerdiği yönteme göre yapıldı<sup>9</sup>. Çöken eritrosit membranı (gost) owren tamponunda süspanse edilir. Membran süspanسیونuna, 30 saniye aralıkla toplam 60 saniye olmak üzere buz içinde sonik ossilasyon yapılır. Sonik ossilasyondan sonra membran süspanسیونu soğukta 12.000 devirde sorvay ultrasantrifüjüyle 20 dakika çevrilir. Santrifüjden elde edilen çökelti parçalanmamış membranları içerir. Çökelti üzerindeki membran parçacıklarını içeren sıvı alınarak 58.000 devirde 90 dakika soğukta ultrasantrifüjle çevrilerek çöktürülür. Bu membran parçacıkları tampon 1 ile çözülür ve gerekli testler yapılır.

Membranların fibrinolitik aktivitesi protein konsantrasyonundaki aktivite olarak ölçüldü. Protein konsantrasyonu Lowry yöntemi ile ölçüldü<sup>10</sup>. Fibrinolitik aktiviteleri ise iki yöntemle yapıldı.

1- E.E.Z. (Euglobulin Erime Zamanı)<sup>11,12</sup>:

0.45 ml. test plazması, 0.05 ml. membran çözeltisi karıştırılarak 37°C'da 5 dakika bekletilir. Üzerine 9.5 ml. 16/100.000'lık asetik asit çözeltisi ilave edilir. Bu karışım 10 dakika 2000 devirde santrifüj edilerek çöktürülür. Çöken kısım öglobulin fraksiyonudur. Üst kısım atılır. Çökelti temiz bir bagetle iyice ezilerek üzerine 0.25 ml. E.E.Z. tamponu (Tampon - 2) ilave edilir. Çökelti tampon içinde bagetle iyice çözülür. Öglobulin çözeltisi elde edilir. Üzerine 0.25 ml. M/40 M CaCl<sub>2</sub> ilave edilir. Hafifçe sallayarak karışması sağlanır. Karışım 37°C da su havuzuna konur. 1-3 dakikada tüpün içinde pıhtı oluşur. Pıhtı belirli bir zaman sonra erir. Pıhtının oluşumu ile, erimesi arasındaki zaman bize E.E.Z.'yi verir.

Kontrol grubu olarak 0.45 ml. test plazmasına 0.05 ml. membranı çözdüğümüz tampon çözeltiden konarak E.E.Z.'sine bakılır.

2- Fibrin Plak Yöntemi<sup>13</sup>:

- 9 ml. imidazol buffer (Tampon - 3), 1 ml, % 12'lik fibrinojen ile karıştırılır.
- 0.2 ml. 100 ünite trombin, 0.8 ml. imidazol buffer ve 1 ml. 50 mM CaCl<sub>2</sub> ile karıştırılır.
- Trombin, imidazol buffer ve 50 mM CaCl<sub>2</sub> bulunduran karışımdan 0.5 ml. alınıp petrinin bir tarafına konur.
- Fibrinojen, imidazol buffer karışımından 8 ml. alınıp petrinin diğer tarafına konur. 8-10 saniye bu iki karışım petri içinde düzgün bir yüzey üzerinde sallayarak homojen bir şekilde dağılması sağlanır. Düz bir yüzeye bırakılır. Hazırlanan fibrin plak 3-5 dakika içinde pıhtılaşacaktır. Plak yarım saat sonra kullanılabilir.

Burada fibrin meydana getirmek için kullanılan fibrinojen sığır fibrinojeni, Trombin; trombin topical (parke devis) dir.

Fibrin Palağa Tatbik Edeceğimiz Örnek:

E.E.Z. yöntemiyle elde ettiğimiz öglobulin çözeltisi aynı şekilde elde edilir. Fibrin plakta oluşturduğumuz standart pıhtı üzerine bu öglobulin çözeltisinden 0.03 ml. tatbik edilir. 37 derecelik etüvde 24 saat bekletilir. Oluşan erime alanı ölçülerek mm<sup>2</sup> olarak proteolitik etki alanı hesaplanır. Kontrol grubu olarak test plazmasına, membran çözeltisi yerine kullanılan tampon çözeltiden aynı oranda (0.05 ml.) konularak sonuçlar karşılaştırılır.

## BULGULAR

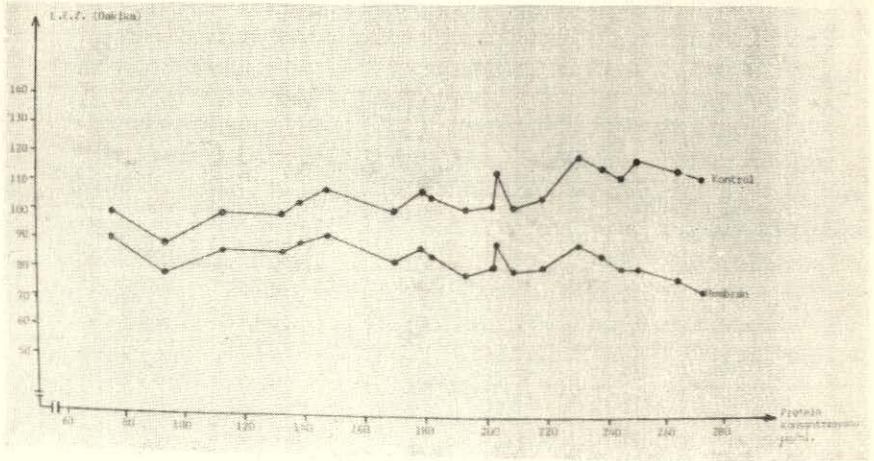
Eritrosit membranı, E.E.Z. yöntemiyle ölçülen fibrinolitik aktivitede anlamlı bir artışa neden oldu. Farklı protein konsantrasyonlarındaki membranların E.E.Z. yöntemiyle yüzde aktivite değerleri Tablo: 1 de görülmektedir. Kontrol grubunda ortalama E.E.Z. 105 ± 7.60 dakika, membran eklenmesiyle ortalama E.E.Z değeri ise 82.8 ± 5.08 dakikadır. Buradaki % 21.42'lik aktivite artışı istatistik açıdan anlamlıdır (p < 0.001).

**Tablo: I**  
**Eritrosit Membranında E.E.Z. ve Fibrin Plak Yöntemiyle**  
**Fibrinolitik Aktivite**

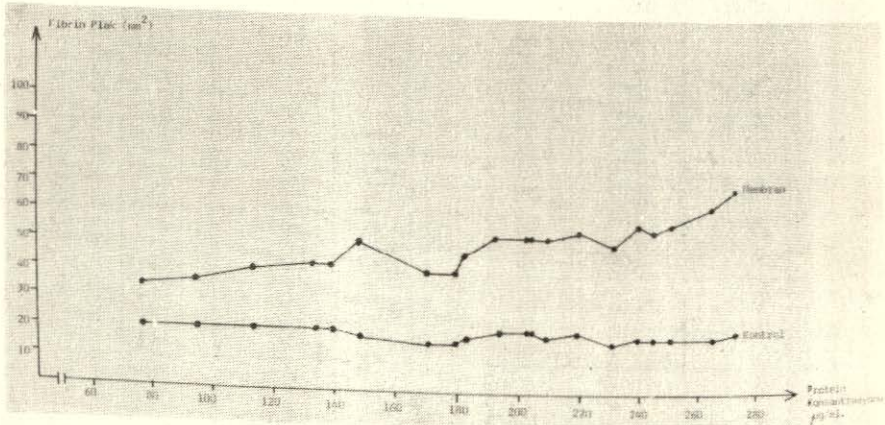
Deney No.	Protein Konsant. µg/ml.	E.E.Z. (Dakika)			Fibrin Plak (mm <sup>2</sup> )		
		Kontrol	Membran	Aktivite %	Kontrol	Membran	Aktivite %
1	230	118	88	25.42	16	49	206
2	250	117	80	31.62	18	56	211.11
3	244	110	80	27.27	18	54	200
4	238	114	84	26.31	18	56	211.11
5	203	113	88	22.12	20	52	160
6	179	106	87	17.92	16	40	150
7	182	104	84	19.23	18	46	155.55
8	170	99	82	17.17	16	40	150
9	193	100	78	22.00	20	52	160
10	218	103	80	22.33	20	54	170
11	264	113	76	32.74	18	62	244.44
12	202	101	80	20.79	20	52	160
13	76	99	90	9.09	20	34	70
14	133	98	85	13.26	20	42	110
15	208	100	79	21	18	52	188.88
16	113	99	86	13.13	20	40	100
17	148	106	91	14.15	18	50	122.22
18	139	102	88	13.72	20	42	110
19	94	88	78	11.36	20	36	80
20	272	110	72	34.54	20	68	240
x	187.8	105	82.8	21.42	18.7	48.85	161.22
SD		7.60	5.08		1.49	8.76	
SE		1.70	1.13		0.33	1.95	
t		10.855			15.188		
p		p < 0.001			p < 0.001		

Protein konsantrasyonu ile, E.E.Z yöntemi ile ölçülen aktivite değerleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Konsantrasyon arttıkça aktivite de artmaktadır (Şekil: 1) (Korrelasyon katsayısı  $r = -0,541$ ,  $p < 0.01$ ).

Eritrosit membranında fibrin plak yöntemiyle ölçtüğümüz fibrinolitik aktivitede de kontrole göre anlamlı bir artış saptanmıştır (Tablo: 1,  $p < 0.001$ ). Kontrol grubunda ortalama erime alanı  $18.7 \pm 0.33 \text{ mm}^2$ , membran eklenmesiyle ortalama  $48.85 \pm 1.95 \text{ mm}^2$  dir. Fibrin plakda erime alanında % 161.22'lik bir artış olmuştur. Fibrin plak yöntemiyle eritrosit membranında da protein konsantrasyonu ile, aktivite artışı arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Protein konsantrasyonu arttıkça aktivite de artmaktadır (Şekil: 2, Korrelasyon katsayısı:  $r = 0.904$ ,  $P < 0.001$ ).



Şekil: 1  
Eritrosit Membranında, E.E.Z. Yöntemiyle, Protein Konsantrasyonu ve Fibrinolitik Aktivite Arasındaki İlişki (Korrelasyon Katsayısı;  $r = -0,541$ ,  $P < 0.01$ )



Şekil: 2  
Eritrosit Membranında, Fibrin Plak Yöntemiyle, Protein Konsantrasyonu ve Fibrinolitik Aktivite Arasındaki İlişki (Korrelasyon Katsayısı;  $r = 0.904$ ,  $P < 0.001$ )

## TARTIŞMA

Tarayabildiğimiz literatürlerde bu konuda yapılmış pek fazla bir araştırmaya rastlanılmadı. Künzer<sup>14</sup> yaptığı çalışmada, eritrositleri dondurup çözme yöntemiyle patlatarak, stromasında ve hemolizatında fibrinolitik aktiviteyi fibrin plak yöntemiyle araştırmıştır. Hemolizden hemen sonra stromada güçlü bir fibrinolitik aktivitenin varlığını göstermiştir. Fakat hemolizatta aktivite bulamamıştır.

Bu çalışma, bizim bulgularımızı destekler niteliktedir. Çünkü eritrosit stroması membrandan başka bir şey değildir. Bizim bulgularımızda her iki yöntemle de gösterdiğimiz sonuçlar birbirini doğrular niteliktedir. Bulgularımızda fibrin plak yöntemiyle gösterilen yüzde aktivite değerlerinin E.E.Z. yöntemiyle gösterilen yüzde aktivite değerlerinden daha yüksektir. Bu yöntem farkından ileri gelmektedir.

Eritrositlerin insan organizmasında hemostaz yönünden ilginç etkileri vardır. Hellem ve arkadaşlarının gösterdiği gibi<sup>15</sup> pıhtı oluşumunda, eritrositlerden açığa çıkan ADP nin, diğer yerlerden gelen ADP ile birlikte trombosit agregasyonunda önemli bir rolü olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca invitro ve invivo çalışmalarda eritrosit hemolizatlarının, trombosit faktör III'e benzer tromboplastik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bunlar pıhtı oluşumuna yardımcı olmaktadır. Diğer taraftan, oluşan pıhtının erimesini sağlayan fibrinolitik sistemin, çalışmamızda da gösterdiğimiz gibi parçalanmış eritrositler tarafından aktive edilmiş olmasıdır. Yani eritrositler bir taraftan pıhtı oluşumunu sağlarken, diğer taraftan pıhtının erimesine yardımcı olarak fizyolojik dengenin sağlanmasında rol alırlar.

## KAYNAKLAR

1. ULUTIN, Ş.B.: Normal ve Sirozlu Şahıslarda Karaciğerin Fibrinolitik Mekanizmayı Düzenleyici Rolü Üzerinde Bir Çalışma. Kağıt ve Basım İşleri A.Ş. İstanbul 1970, s. 2.
2. CHRISTENSEN, L.R.: Streptococcal Fibrinolysin; proteolytic reaction due to serum enzyme activated by streptococcal fibrinolysin. J Gen Physiol, 28: 363, 1945.
3. WIMAN, B.: Primary structure of peptides released during activation of human plasminogen by urokinase. Europ J Biochem, 39: 1, 1973.
4. CHESTERMAN, C.N.: The fibrinolytic system and haemostasis. Thromb Diath Haemorrh, 34: 368, 1975.
5. CHAKRABARTI, R., BIRKS, P.M., FEARNLEY, G.R.: Origin of blood fibrinolytic activity from veins and its bearing on the fate of the venous thrombi. Lancet, 1: 1288, 1963.
6. PERMIN, P.M.: The fibrinolytic activator in animal tissue. Acta Physiol Scand, 21: 1959, 1950.
7. CELANDER, D.R., GUEST, M.M.: The biochemistry and physiology of urokinase. Amer J Cardiol, 6: 409, 1960.
8. SCHWICK, H.G., HEIMBURGER, N., NAUPT, H.: Purification and chemical-physical properties of some proteinase inhibitors of plazma. Thromb Diath Haemorrh, 18: 302, 1967.

9. GEORGE, J.N., MORGAN, R.K., LEWIS, P.C.: Studies on platelet plasma membrane IV. Quantitative analysis of platelet membrane glycoproteins by (1251) diazotised di iodosulfanilic acid labelling and SDP-Polyacrylamide gel electrophoresis. *J Clin Med*, 92: 430, 1978.
10. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265, 1951.
11. COPLEY, A.E., NIEWIAROWSKI, S., MARSCHAL, J.: A micro method of euglobulin fibronolysis in plasma of human subjects and laboratory animals. *J Clin Med*, 53: 468, 1959.
12. CHAKRABARTI, R., BIELAWIEC, M., EVANS, J.F., FEARNLEY, G.R.: Methodological study on a recommended technique for determining the euglobulin lysis time. *J Clin Path*, 21: 698, 1968.
13. ASTRUP, T., MULLERTZ, S.: The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem*, 40: 346, 1952.
14. KUNZER, W., HABERHAUSEN, A.: Fibrinolytic activity of human erythrocytes. *Nature*, 198: 396, 1962.
15. HELLEM, A.J., BORCHGRAVINK, C.F., AMES, S.B.: The role of red cells in haematocrit, bleeding time and platelet adhesiveness. *Brit J Haemat*, 7: 42, 1961.

Uzm. Dr. Kasım ÖZLÜK  
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı  
BURSA