

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AGREGASYON ÖNCESİ VE SONRASI TROMBOSİT
PROTEİNLERİNİN 2 BOYUTLU POLİAKRİLAMİD JEL
ELEKTROFOREZİ (2D PAGE) İLE İNCELENMESİ**

Nadir GÜL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. K. TURAY YARDIMCI

İSTANBUL-2004

I. TEŞEKKÜR

Bölüme kabul edildiğim ilk günden itibaren danışmanlığımı üstlenen ve her konuda bana destek olup cesaretlendiren, tezimle ilgili yönergeleriyle doğruyu bulmamı sağlayan, hem maddi hemde manevi olarak eksiklerimi gidermeye çalışan , kahrımı çeken ve bana katlanan, en büyük güvencem değerli hocam Prof.Dr.K.Turay Yardımcı'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Beni danışmanlığını üstlendiği yüksek lisans ve doktora öğrencilerinden ayrı tutmayan ve daima iyi bir yerlerde görmeyi arzulayan ve her durumda destekleyen Prof .Dr. Fikriye Uras hocama teşekkür ederim.

Bu tezi bitirmem için elindeki bütün imkanları tereddüt etmeden sunan değerli hocam Doç.Dr. Ayşe Ogan'a teşekkür ederim .

Bir metodu oturtmanın zorluğunu bilen ve en yoğun olduğu dönemlerde bile tezimde kullandığım elektroforez metodunun inceliklerini uygulamalı olarak gösteren Doç.Dr. Ayşe Ogan hocamın öğrencisi Dr. Aslı Günel'e teşekkür ederim.

Deneyisel çalışmalarım esnasında tecrübeleri ile bana daima destek olan ve benimle beraber mesai yapan Dr. Halil Aksoy 'a teşekkür ederim.

Sıkıntılı olduğum dönemlerde bana çıkış yolu bulmak için ne gerekiyorsa yapan ablam olarak gördüğüm Dr.Şermin Tetik'e teşekkür ederim.

Laboratuvarda çalışmaya başladığım andan itibaren kendi tecrübelerini ve imkanlarını sunan, danışman hocamın yokluğunda çalışmalarım için tüm sorumluluğu tereddüt etmeden üstlenen hocam Yard.Doç.Dr. Azize Şener'e teşekkür ederim.

İki boyutlu jel elektroforezi ve proteomlar ile ilgili deneyim ve tecrübesiyle bu tezin kurgulanmasında büyük payı olan bana bu konularla ilgili bir vizyon kazandıran Aydan Salman Dilgimen'e teşekkür ederim.

Yard. Doç.Dr. Bahar Göker, Canım hocam ! Yard.Doç.Dr. Rabia Oba'ya ve Yard.Doç.Dr. Derya Özşavcı'ya samimi ve içten yaklaşımları için teşekkür ederim.

Laboratuarı beraber paylaştığım diğer yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak beni maddi ve manevi olarak destekleyen bir yerlere gelebilmem için sürekli Allaha dua eden, gurur duyduğum aileme teşekkürden fazlasını borç bilirim.

Nadir Gül

I	Teşekkürler.....	i
II	İçindekiler.....	ii
III	Kısaltmalar.....	iv
IV	Şekil ve Tabloların Listesi.....	v
	i. Şekillerin Listesi.....	v
	ii. Tabloların Listesi.....	vi

II İÇİNDEKİLER

1.	ÖZET.....	1
2.	SUMMARY.....	2
3.	GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4.	GENEL BİLGİLER.....	4
4.1	Trombositler.....	4
4.1.1	Trombosit Morfolojisi.....	4
4.1.1.1	Periferal Bölge.....	5
4.1.1.2	Yapısal Bölge	5
4.1.1.3	Organeler Bölge	5
4.1.1.4	Membran Sistemi	6
4.1.2	Trombosit Biyokimyası.....	7
4.1.3	Trombosit Fonksiyonları.....	8
4.1.3.1	Adezyon.....	9
4.1.3.2	Agregasyon.....	13
4.1.3.2.1	Trombin ve trombin indüklü agregasyon	15
4.1.3.3	Sekresyon.....	18
4.1.4	Trombosit fonksiyon testleri.....	20
4.2	İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforezi (2D PAGE).....	21
4.2.1	İzoElektrik Odaklama (IEF).....	22
4.2.2	Sodyumdodesilsülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi	23
4.2.3	2D PAGE Jellerinin Değerlendirilmesi.....	23
4.3	Trombosit Proteomiği.....	25
5.	GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	33
5.1	Cihazlar.....	33
5.2	Kimyasal maddeler.....	34
5.3	Tampon ve çözeltiler.....	36
5.4	Yöntemler.....	41
5.4.1	Trombosit eldesi.....	41
5.4.2	Trombosit agregasyonu.....	41
5.4.3	Trombosit yıkanması ve çöktürülmesi	41
5.4.4	2D PAGE için örnek hazırlanması ve örnek solublizasyonu.....	42
5.4.5	Protein miktar tayini	42
5.4.5.1	Bradford protein standart eğrisinin hazırlanması.....	42
5.4.6	IEF jel tüplerinin hazırlanması.....	43
5.4.7	Örneklerin tatbik edilmesi.....	44
5.4.8	Jel dengelenmesi.....	45
5.4.9	İkinci boyut SDS PAGE.....	46

5.4.10	Jellerin değerlendirilmesi ve referans jel seçimi	47
5.4.10.1	Coomassie brilliant blue R-250 ile boyama.....	47
5.4.11	2D PAGE yönteminin standardizasyonu ve kalibrasyonu.....	47
5.4.12	Referans Jel Seçimi	49
6.	BULGULAR.....	50
6.1	Eritrosit, lökosit, trombosit değerleri	50
6.2	Agregasyon öncesi ve sonrası trombosit hücre sayısı ve miktarları.....	51
6.3	Protein konsantrasyon sonuçları.....	52
6.4	Agregasyon öncesi ve sonrası trombosit protein miktarları	53
6.5	Grup I Agregasyon öncesi referans jel görüntüsü.....	54
6.6	Grup I Agregasyon sonrası referans jel görüntüsü.....	55
6.7	Grup II Agregasyon öncesi referans jel görüntüsü.....	56
6.8	Grup II Agregasyon sonrası referans jel görüntüsü.....	57
6.9	Grup I Karşılaştırmalı referans jel görüntüsü.....	58
6.10	Grup II Karşılaştırmalı referans jel görüntüsü.....	59
6.11	Protein spot dağılımlarının analizi	60
6.12	Grup I jellerinin karşılaştırmalı spot miktarları	63
6.13	Grup II jellerinin karşılaştırmalı spot miktarları	64
7.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	65
8.	KAYNAKLAR	68
9.	ÖZGEÇMİŞ.....	78

III. KISALTMALAR

2DE	İki boyutlu elektroforez
A	Absorbans
ADP	Adenozin difosfat
APS	Amonyumpersülfat
BSA	Sığır Serum Albumini (Bovine Serum Albumin)
CA	Taşıyıcı Amfolit (Carrier Ampholyte)
CBB G250	Coomassie Brilliant Blue G 250
CBB R250	Coomassie Brilliant Blue R 250
DTS	Yoğun Tübüler Sistem (Dense Tubuler System)
DTT	Ditiotreitol
EDA	Etilendiamin
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
GpIIb/IIIa	Glikoprotein IIb/III a
HMWK	Yüksek Molekül Ağırlıklı Kinolonlar (High Molecular Weight Kinolons)
IEF	İzoelektrik Odaklama (Isoelectric Focusing)
MS	Kütle spektrometri (Mass spectrometry)
NP 40	Nonidet P40
PAR-I	Trombin Proteazla Aktive Olan Reseptör (Protease Activated Receptor)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction)
PDA	Piperazindiakrilamid
PRP	Trombositçe Zengin Plazma (Platelet Rich Plasma)
RPM	Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions Per Minute)
OCS	Açık Kanaliküler Sistem (Open Canalicular System)
SCS	Yüzey Bağlantılı Kanaliküler Sistem (Surface Connected Canalicular System)
SDS PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilemid Jel Elektroforezi
SDS	Sodyum Dodesil (Lauryl) Sülfat
TAFI	Trombin İle Aktive Olan Fibrinoliz İnhibitörü (Thrombin activated fibrinolysis inhibitor)
TEMED	Tetrametiletilelendiamin

IV. ŞEKİL VE TABLOLARIN LİSTESİ

Şekillerin Listesi

Şekil 1: Trombositlerin ultrastruktral yapısı	(sayfa 4)
Şekil 2: Trombosit fonksiyonlarının şematik sunumu	(sayfa 9)
Şekil 3: Dinlenme durumunda ve aktive olmuş trombositler	(sayfa 11)
Şekil 4: Trombosit agregasyonu	(sayfa 13)
Şekil 5: GpIIb/IIIa'nın yapısı ve fibrinojen bağlanma bölgeleri	(sayfa 14)
Şekil 6: Koagülasyon kaskadı	(sayfa 15)
Şekil 7: Trombin ve trombin reseptörünün aktivasyonu	(sayfa 16)
Şekil 8: Fibrinoliz	(sayfa 18)
Şekil 9 : Dinlenme halindeki trombositlerin 2D PAGE jel görüntüsü ve tanımlanan protein spotları	(sayfa 26)
Şekil 10: PH 4-6 gradientleri arasındaki proteinlerin fonksiyonlarına göre dağılımları	(sayfa 27)
Şekil 11 : Bradford standart protein eğrisi	(sayfa 43)
Şekil 12: IEF jellerinin tüplere yerleştirilmesi	(sayfa 44)
Şekil 13: IEF tüpünün paylaşımı	(sayfa 45)
Şekil 14: IEF de akım yönü	(sayfa 45)
Şekil 15: SDS PAGE de akım yönü	(sayfa 46)
Şekil 16 : 2DE standart protein jel şeması	(sayfa 48)
Şekil 17: SDS PAGE standart grafiği	(sayfa 49)
Şekil 18: Trombosit süspansiyonlarında kalitatif hücre dağılım grafikleri	(sayfa 50)
Şekil 19 : Olgu I 'in Agregasyon öncesi 2D PAGE görüntüleri	(sayfa 45)
Şekil 20 : Olgu I 'in Agregasyon sonrası 2D PAGE görüntüleri	(sayfa 55)
Şekil 21: Olgu II 'nin Agregasyon öncesi 2D PAGE görüntüleri	(sayfa 56)
Şekil 22: Olgu II 'nin Agregasyon sonrası 2D PAGE görüntüleri	(sayfa 57)

Tabloların Listesi

Tablo 1: Trombosit kompozisyonu	(sayfa 7)
Tablo 2: Trombosit reseptörleri	(sayfa 12)
Tablo 3: Trombositlerdeki granüler yapıların içeriği	(sayfa 19)
Tablo 4: 2 D PAGE metodunun uygulama alanları	(sayfa 22)
Tablo 5: Boyama teknikleri ve duyarlılıkları	(sayfa 24)
Tablo 6: 2D PAGE ile tanımlanmış trombosit proteinleri	(sayfa 28)
Tablo 7: IEF Elektroforez Yürütme Protokolü	(sayfa 40)
Tablo 8: SDS PAGE Elektrofoez Yürütme Protokolü	(sayfa 40)
Tablo 9: Bradford konsantrasyon tablosu	(sayfa 42)
Tablo10 : 2D PAGE standart proteinleri	(sayfa 47)
Tablo 11: SDS PAGE standart proteinleri	(sayfa 48)
Tablo 12: Trombosit süspansiyonunda kantitatif hücre değerleri	(sayfa 50)
Tablo13:Agregasyon öncesi ve agregasyon sonrası trombosit süspansiyonunda trombosit sayısı, trombosit pellet ağırlığı ve protein miktarları	(sayfa 51)
Tablo 14: Trombosit proteinlerinin bradford protein tayin metoduyla yapılan spektrofotometrik değerleri ve protein miktarları	(sayfa 52)
Tablo 15 : Olgu I Protein miktarları	(sayfa 53)
Tablo 16 : Olgu II Protein miktarları	(sayfa 53)
Tablo 17: Olgu I Agregasyon öncesi ve sonrası trombosit protein miktarları ve dağılımları	(sayfa 60)
Tablo 18 : Olgu II Agregasyon öncesi ve sonrası trombosit protein miktarları ve dağılımları	(sayfa 61)
Tablo 19 : Agregasyon öncesi olgu I protein spot sayıları	(sayfa 62)
Tablo 20 : Agregasyon sonrası olgu I protein spot sayıları	(sayfa 62)
Tablo 21 : Agregasyon öncesi olgu II protein spot sayıları	(sayfa 63)
Tablo 22 : Agregasyon sonrası olgu II protein spot sayıları	(sayfa 63)

1. ÖZET

Bu çalışmada agregasyon öncesi ve trombin indüklü agregasyon sonrası trombosit proteinlerinin dağılım dinamiğinin incelenmesinde iki yönlü poliakrilamid jel elektroforezi (2D PAGE) tekniği başarıyla uygulandı. Proteinlerin yıkım ürünleri, sekresyon ve ekspresyon nedeniyle trombositlerde değişen eksilen, ortaya çıkan protein spotları ve spotların yoğunluk değişimleri karşılaştırmalı olarak incelendi.

Normal olgulardan tromboferezle elde edilen trombositler sonikasyonla parçalanıp NP 40 deterjanı içeren doku homojenizasyon tamponunda protein solublizasyonu sağlandı. Proteinlerin ayrılmasında izoelektrik odaklama basamağında geniş pH gradienti (pH 2-pH 10) kullanıldı. İkinci basamakta ise %15 lik akrilamid konsantrasyonunda SDS (Sodyum dodesilsülfat) PAGE uygulandı. Böylece proteinleri geniş skalada ayırma imkanı sağlandı. Her bir jele 50 µg protein tatbik edildi. Protein spotlarının görüntülenmesinde Coomassie brilliant blue R-250 (CBB-R250) kullanıldı.

Agregasyon öncesi ve trombin indüklü (1IU/mL) agregasyon sonrası her bir jelde 75 ile 80 arası protein spotu saptandı. Agregasyon sonrasında molekül ağırlıkları 97-66 kDa arasında değişen ve izoelektrik noktaları (pI) 8-10 arasında bulunan bazı proteinlerin trombositlerde miktarlarının arttığı gözlemlendi. Yine agregasyon sonrası molekül ağırlıkları 205 kDa'un üzerinde ve pI'ları 6-8 aralığında yeni sentezlenmiş trombosit proteinleri tespit edildi. Molekül ağırlığı 20,1 kDa'dan düşük trombosit proteinlerin agregasyon sonrası arttığı görüldü.

2.SUMMARY

Observation of Platelet Proteins, After Aggregation and Before Agregation, Using Two Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis (2D PAGE).

In this work we have analyzed changes and alterations involved in the dynamics of protein distribution before and after thrombin induced platelet aggregation with two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D PAGE). 2 D PAGE protein separation method offers a huge potential for the provision of comprehensive protein expression data for basal and activated platelets .This technology has the potential to identify isoforms of proteins or identification of the platelet based diseases. There are many investigations using this technique such as studies on membrane protein expression, associated proteins with cytoskeleton following cell activation, the frequency of polymorphisms in platelet proteins.

The proteins were separated by using 2 D PAGE. As the first step, protein isoelectric focusing was done in a broad range of pH gradiends (pH2-pH10) and as the second step SDS PAGE was performed at 15 % acrylamide concentration. This way it was possible to separate proteins in a wide range of isoelectric points (pIs) and molecular weights. 50 µg protein was applied to each gel and coomassie brilliant blue (CBBR -250) was used for detection of protein spots.

In each gel 75 to 80 protein spots were detected. After thrombin (1 IU/mL) induced aggregation, increased expression of some proteins having molecular weights between 66 to 95 kDa and pIs between 8-10 were detected. Also newly syntesized proteins over 205 kDa and pIs between 6 to 8 and increase in number of protein spots under 20,1 kDa and pIs between 2 to 10 were observed .

In this study, the 2D PAGE was established successfully. It was possible to detect comperatively protein spot variations in isolated platelets like disapparence and appearence of new protein spots and changes in intensity of spots caused by protein degregation, secretion and/or expression.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kemik iliğinde üretilen megakaryositlerin sitoplazmik fragmentleri nden oluşan trombositler çekirdek içermezler. Trombositler aktivasyon sonucu transformasyona uğrayarak hemostazda primer rol alırlar. Bu transformasyon 4 aşamada cereyan etmektedir. Bunlar adezyon, agregasyon, kontraksiyon ve sekresyondur. Trombositler normal şartlarda dolaşımda vasküler endotele adezyon özelliği göstermezler ancak bir damar hasarında hasarlı bölgede adezyon göstererek etkili bir hemostatik plak oluşmasına sebep olurlar. Bu etkileşim bir trombosit reseptörü olan von Willebrand faktör aracılığı ile gerçekleşir. Bu olayın ardından trombositlerin uyarılması sonucu bir başka trombosit reseptörü olan ve trombosit-trombosit etkileşimini sağlayan fibrinojen reseptörü glikoprotein IIb/IIIa aracılığı ile trombosit agregasyonu oluşur. Kontraksiyon trombositlerin aktivasyonu esnasında veya sonrasında gerçekleşir. Trombosit yapısı ve membran yapısı değişime uğrar. Bu olayı sekresyon takip eder. α , β granüllerinin ve yoğun cisimciklerin içeriklerinin sekresyonu trombositlerde kütle kaybına neden olur. Sekresyon öncesi ve sekresyon sırasında sinyal iletimi nedeni ile Ca^{++} alımı ve salınımı gerçekleşir. Bu olaylar trombosit bütünlüğünün değişimi olmaksızın gerçekleşmektedir.(1-5)

Trombositlerin agregasyon öncesi ve sonrası geçirdikleri değişimleri protein ekspresyon ve çeşitliliklerini 2 boyutlu poliakrilamid jel elektroforez (2 D PAGE) yöntemini kullanarak incelemek amacıyla bu proje oluşturulmuştur. 2 D PAGE yöntemi çok büyük bir potansiyelle bazal ve aktifleşmiş trombositlerde karşılaştırmalı ekspresyon verileri için olanak sağlar (6). Yöntemin bu kadar etkili olmasının nedeni iki ayırma tekniğinin bir arada kullanılabilecek şekilde dizayn edilmiş olmasıdır (3). Bu yöntem protein izoformlarının belirlenmesinde veya trombosit kökenli hastalıkların tanımlanmasında potansiyel öneme sahiptir (2,3) Membran protein ekspresyonları (3) hücre aktivasyonunu takiben sitoskelet ile birleşmiş proteinler (4) veya trombosit proteinlerinde sıklıkla görülen polimorfizm (6) gibi konularda literatürler mevcuttur.

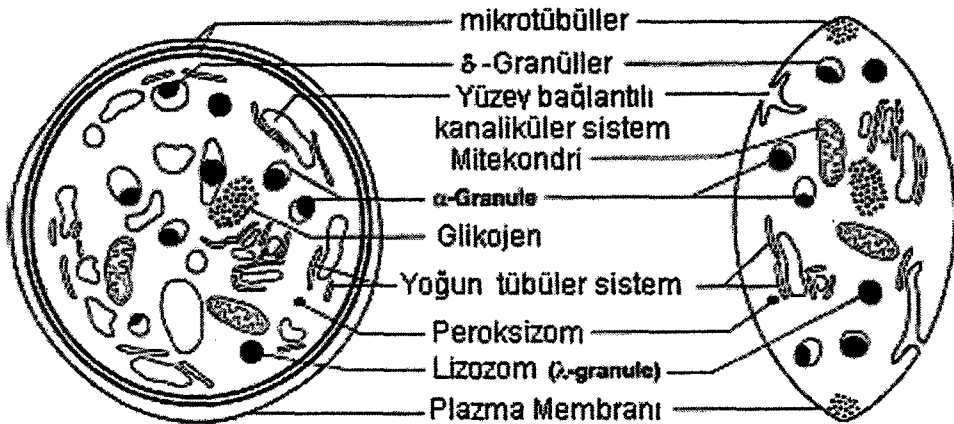
4.GENEL BİLGİLER

4.1.TROMBOSİTLER

4.1.1. TROMBOSİT MORFOLOJİSİ

Trombositler kemik iliğinde üretilen megakaryositlerin sitoplazmik fragmentleridir (1) Diskoid yapılı bu hücreler mm^3 te 140000 – 440000 arasında değişen miktarlarda dolaşımda yer alırlar (3) Wright-Giemsa ile periferik kan yayma preparatlarında boyanmış, trombositler pürüzlü bir membran ile çevrili granüler yapılı küçük hücreler olarak dikkat çekerler. Bu hücrelerin %70 kadarı dolaşımda geriye kalan %30 ise dalakta bulunmaktadır (2,5). Büyüklükleri yaklaşık olarak 2-4 μm (8) olan trombositlerin genç olanları daha büyüktürler. Stress, trombopoiesis veya bazı spesifik trombosit fonksiyon defektlerinde de trombositlerin hacmi artar (1,5,8). Aktifleşmemiş durumdaki trombositler diskoid yapıları ile yaklaşık 8 μm^2 yüzey alanına sahiptirler. Trombositlerin ADP, trombin gibi agonistlerle aktifleşmesi sonucu şekil değişimi ile yalancı kolları olan ekinosferosit bir yapıya dönüşürler bu yolla yüzey alanları 13 μm^2 'e kadar genişler (8). Trombositlerin fizyolojik yaşam süreleri dolaşımda yaklaşık olarak 7 gündür. Kemik iliği hergün dolaşımdaki miktarın %20 kadarını dolaşıma verir. Yaşamlarının sonuna gelmiş trombositler karaciğer ve dalakta yer alan retikuloendotelial sistem tarafından yıkılır .

Trombositlerin ultrastruktürel yapısı 4 morfolojik yapıya ayrılır ve her bir yapının özel bir fonksiyonu vardır (2,5,8)



Şekil 1 :Trombositlerin ultrastruktürel yapısı (2)

4.1.1.1. Periferal Bölge

Periferal bölge, glikokaliks olarak adlandırılan çeşitli glikoprotein, protein ve mukopolisakkarit içeren ince bir tabaka ile çevrilmiş sitoplazmik bir membrandan oluşmaktadır. Diğer tüm hücrelerde olduğu gibi sitoplazmik membran tipik olarak membran proteinlerini içeren polarize fosfolipid (bilayer) bir tabakadır. Fosfolipidlerin asimetrik dağılımında fosfatidilkolin ve etenolamin dışa dönük, fosfatidilinositol ve sfingomiyelin içe dönüktür . Bu asimetrik dağılım trombosit aktivasyonu esnasında plazma membranının değişiminde önemli bir faktör olarak trombosit fonksiyonunda rol alır (8-10).

Trombosit aktivasyonu esnasında plazma membranındaki fosfolipid organizasyonun değişimi ile birlikte bazı faktörler (ikincil haberci) ve arazidonik asit sinyal iletimi için serbestleşir. Plazma membranına çözülmüş agonistlerin (ADP, Trombin vs) veya adezyon proteinlerin (Fibrinojen, von Willebrand faktor vs) etkisiyle çeşitli integral proteinler eksprese olur (8,10,11).

4.1.1.2. Yapısal Bölge

Yapısal bölge tübülün ipliklerini temsil eden ve birbirleriyle bağlantı şeklinde dağılmış submukozanın içinde yer alan mikrotübülleri ihtiva eder. dinlenme halindeki trombositlerin tipik diskoid yapısından ve şekil değişiminden sorumludurlar. Hücre iskeletinin yapısal protein formları toplam protein kütlelerinin %15'lik kısmını oluşturur. Genel olarak aktin ve aktin bağlayıcı proteinleri içermektedir . Aktin, G aktin (globuler aktin) ve F aktin (fibriler aktin) formları olmak üzere iki fonksiyonel durumda bulunur. Aktin proteini sitoplazmada miyozin ile birleşir. F Aktin ve miyozin aktivasyonda rol alırlar. Bu filamentler hücre organelleri ile bağlantı halindedirler ve aktivasyon aşamaları esnasında reorganize olurlar (2,8,12).

4.1.1.3 Organeller Bölgesi

Mitokondri, glikojen depoları ve depo granüllerinin 3 formu, yoğun cisimcikler, α granüller ve lizozomlar, sitoplazma içinde yer alırlar. Organeller alan granüler proteinleri ve diğer trombosit fonksiyonları için

esansiyel maddeleri içeren depo yapılarıdır (2,8). Yoğun cisimcikler isimlerini elektron mikroskobu görüntülerinde elektron-optik yoğunluklarından almaktadırlar ve agregasyon aşamalarını yöneten ADP, AMP, Ca^{++} , serotonin gibi düşük molekül ağırlıklı bileşimleri içermektedirler (9-11).

α -Granüller sayısal olarak en çok protein içeren granüllerdir. İçerdikleri maddeler adezyon, agregasyon, kemotaksi, proliferasyon, enflamasyon ve koagülasyonda görev alırlar. Lizozomal granüller diğer hücrelerdeki lizozomlar gibi hidrolitik enzimleri içerirler (12,13)

4.1.1.4 Membran sistemi

Yüzey bağlantılı kanaliküler sistem (SCS) ve yoğun tübüler sistemden (DTS) oluşmaktadır. SCS dış yüzeydeki elementlerin trombosit içine alınmasını ve granül içeriklerinin içerden dışarıya salınımına olanak verir. Adezyon sonrası trombositlerin yayılmasında ve pseudopod oluşumunda plazma membranında artış görülür. Bu membran artışının SCS ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. SCS plazma membran glikoproteinlerinin deposu olarak da görev yapar. Örneğin belirli koşullarda, trombin ile trombosit aktivasyonunda, trombosit yüzeyinde Gplb/IX kaybı vardır. Bu durum elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar sonunda Gplb/IX'un açık kanaliküler sisteme entegre olduğu gözlenmiştir (8,14).

Yoğun tübüler sistem, megakaryositlerin endoplazmik retikulumundan köken almıştır. Yüzey bağlantılı kanaliküler sistem yoğun tübüler sistemine göre daha seyrek tir . DTS prostaglandin ve tromboksan sentezinde ana bölgeler olarak rol alırlar (15). DTS kas hücrelerinin sarkoplazmik retikulumuna benzer çünkü iyonize kalsiyum bulundurur ve trombosit aktivasyonunda içerdikleri iyonize kalsiyumu salarlar (14,15).

4.1.2. TROMBOSİT BİYOKİMYASI

Trombositlerin ağırlığının yaklaşık %77-88 'ı sudan oluşmaktadır (16,17). Protein içeriği ise kuru ağırlığının % 52-57 'sini oluşturmaktadır (tablo 1). Trombosit proteinlerinin bir grubu trombosit faktörleridir (18,19). Bunlar arasında ATPaz aktivitesine sahip, kontaktil protein trombostenin, toplam protein miktarının %15'lik bölümünü oluşturur (20). Trombosit fibrinojenise toplam protein miktarının %14 kadarını oluşturmaktadır.(9) Trombositler; albumin (%2) ve α , β , γ globulinlerini yapılarında bulundurmaktadırlar (21). IgG ve IgM' lerin varlığı da trombositlerde gösterilmiştir. Amino asitlerin hemen hepsi trombositlerde tespit edilmiş, trombosit ve plazma arasında serbest amino asit oranları bakımından fark bulunmuştur (17,22,23),Trombositler çekirdek içermedikleri halde çeşitli transport sistemleri ile yapılarına aldıkları amino asitleri kullanarak protein sentezini gerçekleştirmektedirler. 1965 de Seitz , 1967 ve 1969 yıllarında Booyse ve Rafelson ve 1967 yılında Warshow yaptıkları çalışmalarla trombositlerde protein sentezi olduğunu göstermişlerdir (24- 26) . Stabil mRNA'ların varlığı Booyse ve Rafelson tarafından bildirilmiştir (27, 28).

Tablo 1: Trombosit kompozisyonu (28).

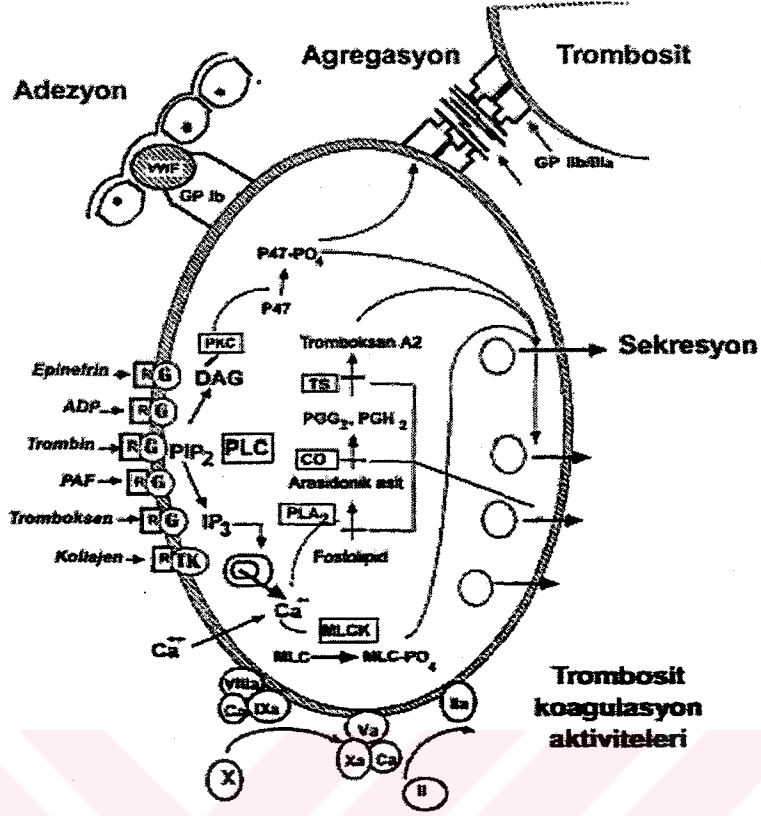
	Sıvı ağırlık %	Kuru ağırlık %
Protein	11,90-14,80	52-57
Karbonhidrat	1,10-1,94	8,47
Lipidler	3-5	17-24-7
Su	77-88	
Diğerleri	2,21-9,6	

Genç, büyük ve ağır trombositler yüksek oranda protein sentezledikleri halde Nahman ve arkadaşları diğer hüclerele yaptıkları karşılaştırmalı araştırmalarla trombositlerdeki protein sentezi miktarının çok az olduğunu bildirmişlerdir (29).Steiner'in yaptığı çalışmalarda trombositlerin agregasyon sırasında glutamik asit, aspartik asit, serin, glisin ve alanin amino asitlerinin proteinlere inkorporasyonunda artış olduğunu belirtmektedirler. (30).

1972 yılında Schneider trombositlerde protein ve nukleik asit sentezinin varlığını gösterdi (31). Ancak nukleik asit sentezi çekirdeksiz yapıdaki trombositler için şaşırtıcı bir bulgu olmasına rağmen bu olay büyük olasılıkla mitokondri tarafından kodlanan nukleik asitlerin sentezi olduğu düşünülmektedir. Yardımcı ve arkadaşları trombositlerde amino asitlerin Na^+/K^+ gradientine bağlı olarak aktif transportla taşındıklarını ve kloramfenikol ve puromisin tarafından inhibe olan protein sentezinin varlığını gösterdiler. (32-34).

4.1.3. TROMBOSİT FONKSİYONLARI

Trombositler çeşitli fonksiyonları ile hemostazda görev alırlar (35). Hemostazdaki bozukluklar çoğunlukla trombosit fonksiyonundaki değişimler sonucu oluşur. Ateroskleroz, arterial tromboz, heparinle indüklenen trombositopeni ve ameliyat gibi durumlarda trombositlerin in vivo dolaşımında aktif durumda olmaları trombotik riskin başlıca sebebidir (36-39). Damar zedelenmesi ile birlikte trombositler damar duvarına yapışırlar (adezyon). Bunu takiben trombositlerin diskoid yapısı küresel bir hal alır ve trombosit agregatları oluşturarak ilk hemostatik bariyeri oluştururlar (agregasyon) Agrege olmuş ve yapışmış trombositler depolarından ADP salarlar (sekresyon). Agregasyonu direk etkileyecek olan ve sekresyon ile ilgili olarak aktive trombositler prostaglandin ve tromboksan sentezlerler. Bu olayları trombosit faktör III aktivasyonu ile kan pıhtılaşması takip eder (8,40) (şekil 2).



Şekil 2: Trombosit fonksiyonlarının şematik sunumu (41) CO= siklo oksijenaz; DAG= diasilgliserol, G=GTP bağlanan protein, IP₃= inositol 3 fosfat, MLC=miyozin hafif zinciri, MLCK= miyozin hafif zincir kinaz, PIP₃= fosfatidilinozitol bifosfat, PKC= protein kinaz C, PLC= fosfolipaz C, PLA₂= fosfolipaz A₂, R= Reseptör, TK= tirozin kinaz, TS= tromboksan sentetaz PAF=trombosit active edici faktör.

Normal trombosit fonksiyonları; adezyon, agregasyon, sekresyon ve prokoagulan aktivitesinin oluşmasıdır. Zedelenmiş damar duvarına trombositlerin adezyonu primer hemostazda bahsedildiği gibi ilk adımdır ve primer adezyon olarak bilinmektedir (8,28,36,41).

4.1.3.1. Adezyon

Adezyon trombositlerin non-trombosit yüzeylere yapışması olayıdır. İlk olarak Ranvier ve Vulpain 1873'te trombositlerin cama yapıştığını gözlemleyerek trombositlerin adezyon özelliğini tanımladılar (42,43). Daha sonra yapılan çalışmalarda Ca^{++} , fibrinojen ve ADP nin adezyon için gerekli olduğu fark edilmesine karşın adezyon için gerekli olduğu tespit edilen esas bulgu von Willebrand defektli trombositlerin cam yüzeylere yapışmadığının gözlenmesiyle ortaya çıktı (2,15). Bir başka önemli çalışmada ise fibrinojen, ADP ve divalent etkileşimlerin adezyona ve aynı zamanda agregasyona

neden olduğu; antiagregan ajanların adezyonu etkilemediđi fakat agregasyonu inhibe ettiđi gösterildi (8,10).

Aktivasyon içeren trombosit şekil değişimi yüzey reseptörlerinin aktivasyonu ve membran fosfolipid oriyantasyonunun değişimi ile düzenlenen kompleks bir prosestir (2,8,10).

Mekanik ve biyokimyasal prosesler : Bir çok madde trombositleri aktive edebilir ve metabolik değişimi uyarırlar. Bu maddeler aktivatörlerdir (agonist). Trombositler kendi kendilerini de (otokrin) uyarabilirler. Her agonist trombosit yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanır ve sinyal iletimi faktörlerini etkilerler (ikincil mesajcılar). Sinyal iletimindeki ikincil mesajcılar bir seri metabolik hücre içi değişimi uyarırlar (10). Bu iş için Fosfolipaz C ,fosfoinozitol 4,5 bifosfat'ı (PIP_2), inozitol 1,4,5 trifosfata (IP_3) ve diaçilgilserol'e (DAG) hidroliz eder. DAG protein kinaz C 'yi aktive eder. Protein kinaz C'nin fosforilasyonu lizozomların, yoğun granuler cisimciklerin ve α granüllerin içeriklerinin dışarı salınımını (10,44) ve glikoprotein IIb/IIIa ($GpIIb/IIIa$) kompleksi üzerindeki fibrinojen bağlanma bölgelerinin açığa çıkmasını, trombosit aktivasyonunu sağlar (30).

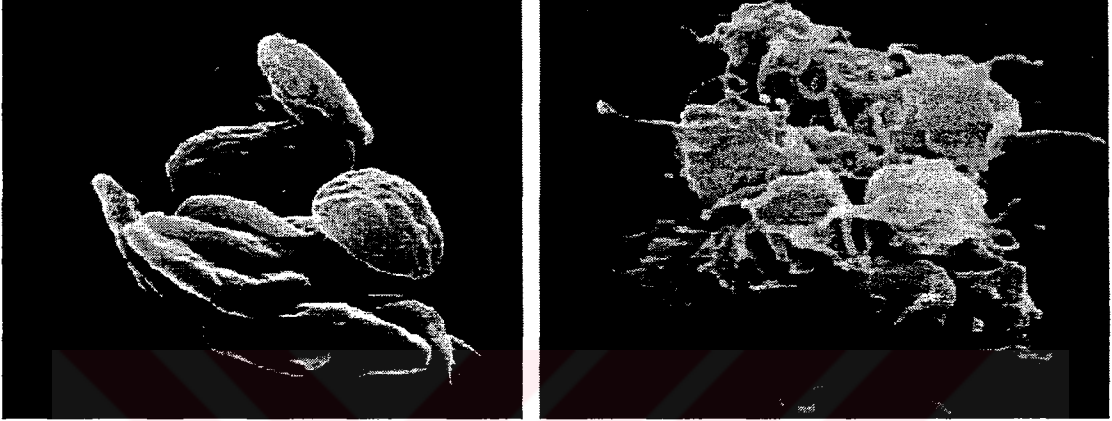
Fosfolipaz A_2 ve adenilat siklaz enzim kompleksleri ikincil mesajcılar olarak görev alırlar. Her bir enzim kompleksi aynı zamanda serbest hücre içi Ca^{++} regülasyonuna katılır. Trombosit hücre içi Ca^{++} düzeyi ve trombositlerin uyanılma dereceleri arasında paralellik vardır (8,10).

Fosfolipaz A_2 sitoplazmik Ca^{++} nın salınımıyla aktive edilir ve araşidonik asidin membran fosfolipidlerinden serbestleşmesini katalizler. Arařidonik asit tromboksan A_2 gibi bir çok eikenosoidin öncüsüdür. Adenilat siklaz, prostasiklin yada teofilin gibi trombosit aktivasyonunun antagonistleri tarafından stimüle edilir ve cAMP formasyonunda inhibitör etki gösterir (8,10,45).

Şekil Değişimi: Hücre içi Ca^{++} konsantrasyonu düştüğünde yalancı kollar (pseudopod) formasyonu ile şekil değişimi olur. Bu şekil değişimi yapısal bölgede pseudopodlardaki mikrotübüllerin uzamasını sağlayan değişimleri gerektirmektedir. Aynı zamanda G aktin polimerleri ve F aktin filament formları aktin bağlanma proteini gibi diğer membran proteinleri ile

birleşir. Bu pseudopod plazma membranının stabilizasyonunu sağlar (46,47).

Şekil değişimi yüzey alanının artmasıyla plazma faktörleri ile reaksiyon olasılığının ve trombosit etkileşiminin artmasına neden olur. (8,48,49)(şekil 3 de dinlenme durumunda ve aktive olmuş trombositlerin elektronmikrografları görülmektedir.



Şekil 3 :Dinlenme durumunda ve aktive olmuş trombositler

<http://www.akh.wien.ac.at/biomed-research/htx/platweb1.htm> "The Platelet Web Page)

Yüzey Reseptörleri: Membran proteinleri içinde integrin bir glikoprotein olarak ilk önce tanımlanmış olan GpIIb/IIIa, OCS ve α granullerin bir bileşenidir ve yalnızca trombositlere özeldir (48).

İntegrin süperaillesi içinde yer alan reseptörler arg-gly-asp dizisi bulunan ligandları bağlarlar (49). Bir fibrinojen reseptörü olan GpIIb/IIIa kompleksi trombosit aktivasyonunun ilk safhalarında rol alır. Heterotrimerik bir kompleks olan GpIIb/IIIa, yapısının bütünlüğü için kalsiyuma ihtiyaç duyar Trombosit yüzey reseptörü GpIIIa hem dinlenme durumunda hemde aktif durumda trombosit membranında bulunur Trombosit aktivasyonu ile birlikte GpIIIa, GpIIb'ye kalsiyuma bağımlı bir şekilde bağlanarak α IIbIII β kompleksini oluşturur (50-53) bu oluşumun sağlanmasında dört adet kalmodulin domainine sahip Gp IIIa transmembran bir yapı olarak membranda bulunur (50). Trombositler membrandaki bu reseptörler dinlenme halindeyken plazma fibrinojenine bağlanamazlar. Aktivasyon sonucu iki ayrı trombositteki GpIIb/IIIa reseptörleri fibrinojen'e bağlanması sonucu trombositler arası köprüler ve trombosit agregatları oluşur.

Trombositlerdeki yapısal değişim, GpIIb/IIIa'nın membran yüzeyindeki yoğunluğunun artmasına ek olarak hücre içi fibrinojen reseptör depolarının açığa çıkması ile devam eder. GpIIb ve GpIIIa'dan herhangi birinin yapısal anomaliliği veya sentez eksikliği, kompleksin çabuk degrade olmasına ve membran yüzeyinde eksprese olamamasına neden olur (54-56). Glanzmann Trombastenia hastalığında GpIIb/IIIa kompleksinin eksikliği veya disfonksiyonu söz konusudur. Bu hastalarda trombosit sayısı, büyüklüğü, vasküler subendotelyuma adezyonu şekil değişimi ve serotonin sekresyonu normal iken ADP, trombin, kollajen, adrenalin ile trombosit agregasyonu olmaz. Bu trombositler fibronektin ve fibrinojen bağlayamazlar (41,57,58) (tablo 2).

Tablo 2: Trombosit reseptörleri (59)

Reseptör	SINIFLANDIRMALAR		
	Elektroforetik	Kümesel grup	Integrin
Kollajen	GpIa-IIa	CD49b	$\alpha_{II} \beta_I$
Fibronektin	GpIc-IIa	CD49c	$\alpha_V \beta_I$
Vitronektin	—	—	$\alpha_V \beta_{III}$
Fibrinojen	GpIIb-IIIa	CD41/61	$\alpha_{IIB} \beta_{III}$
Laminin	GpIc-IIa	CD49f	$\alpha_{VI} \beta_I$
von Willebrand Faktör	GpIb-V-IX	CD42a,b,c,d	—
Trombospondin	GpIV	CD36	—

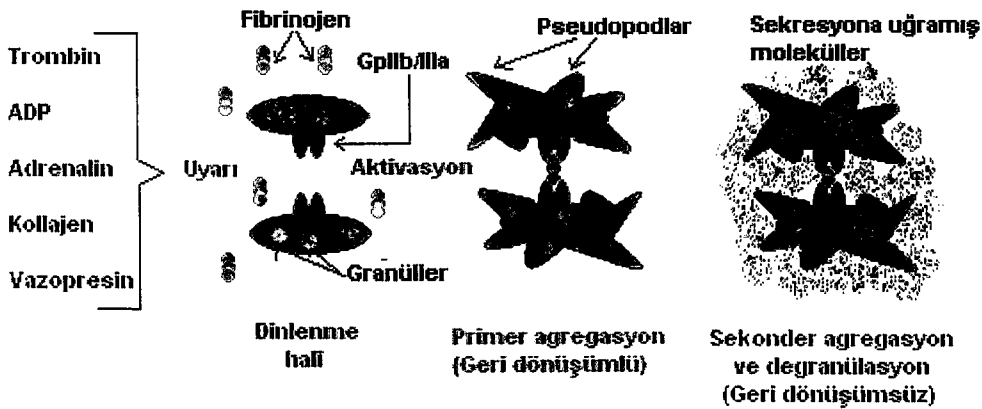
Membran Fosfolipidlerinin Dağılımı: Aktive olmuş trombositlerde membran fosfolipid dağılımının değişimi ve plazma membranının akışkanlığının değişmesi, pıhtılaşma faktörlerinin ve katalitik protrombinaz kompleksinin trombosit agregatlarının bulunduğu bölgede yerleşmesine izin verir. Bu yolla trombin formasyonu artar ve fibrin fibrin çapraz bağlarıyla hemostatik pıhtı oluşur. Kollajen ve bir seri çözünmüş agonist, trombosit membran yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanarak trombositlerin aktivasyonunu sağlarlar. Bu aktivasyon reseptörleri aktivasyon basamaklarını amplifiye eden G proteinleriyle bağlantılıdır. Bu duruma paralel olarak prostasiklin, prostaglandin gibi antagonist moleküller de spesifik reseptörlerini uyararak trombosit aktivasyonunu inhibe ederler.

Trombositleri doğrudan inhibe eden ajanlar adrenerjik ajanlar, prostasiklin prostaglandin E1 adenilat siklazı G_s proteinleri aracılığı ile stimüle ederler. Trombositlerde heterotrimerik 4 ana alt familyaya ait G proteinlerinin (G_s , G_i , G_q , G_{12} , β , γ kompleksleri) sentezini gerçekleştirir (8, 46, 60, 61).

4.1.3.2. Agregasyon

Trombositlerin birbirlerine koadezyonuna agregasyon denilmektedir. 1962'de Born ilk defa ADP'nin PRP'de agregasyona neden olduğunu geliştirdiği metodla ölçtü (62). Daha sonraları yapılan çalışmalarla ADP (63), adrenalin (64), trombin (65), yağ asitleri (66), immün komplekslerin (67), distile suyun (68) ve kollajen (69) gibi bileşiklerin trombosit agregasyonuna neden olduğu gösterildi. Burada ADP, Tromboksan A2 gibi çözülmüş agonistler trombosit yüzeyinde bulunan aktivasyon reseptörlerine bağlanarak onları indüklerler (69). (Şekil 3)

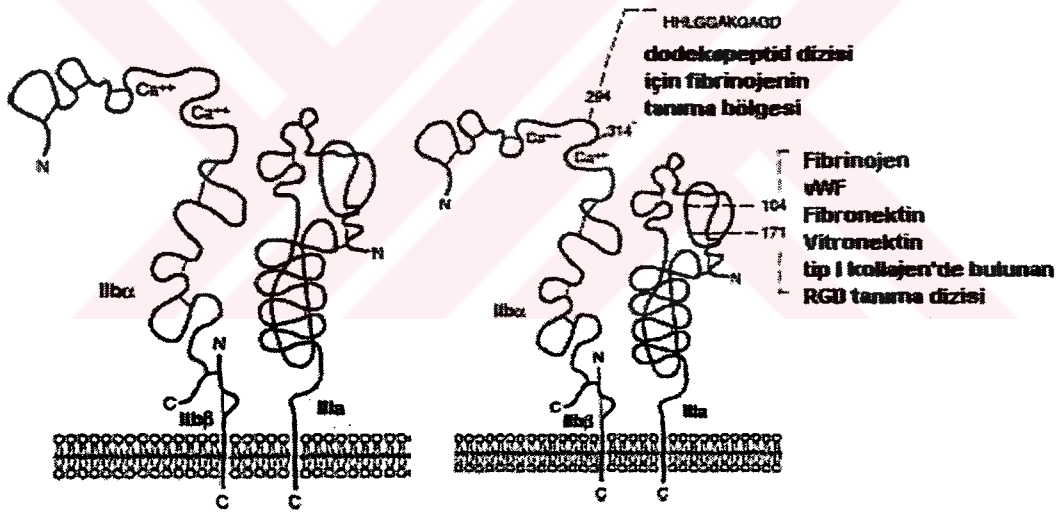
Agregasyon primer agregasyon ve sekonder agregasyon olmak üzere iki faza ayrılabilir. Primer agregasyon esnasında trombositler gevşek bir şekilde birbirlerine fibrinojen köprüleri ile bağlanırlar. Bu aşama geri dönüşümlüdür. Sekonder agregasyon bir süre sonra trombosit granüllerinin sekresyonu ile başlar ve bu aşamadan sonra agregasyon geri dönüşümsüz bir hal alır (69,70) (Şekil 4).



Şekil 4: Trombosit agregasyonu

Normal bir agregasyon prosesi için 3 durum tartışılır. Birincisi güçlerin dağılımı (shear forces) yani iki trombositin kontak kurabilme olasılığının artması, diğerleri Ca^{++} ve fibrinojendir. Bu üç komponentin biri eksik olduğunda agregasyon gerçekleşemez. Normal insan plazması agregasyon için yeterli Ca^{++} ve fibrinojeni içerir. Hem Ca^{++} hem de fibrinojen ek olarak trombosit granülleri içeriğinde de bulunurlar ve agregasyon esnasında salınarak trombosit çevresinde agregasyonun büyümesini sağlarlar. Bu yolla trombositlerce zengin bir agregasyon sağlanır (8,10)

Glikoprotein IIb/IIIa (GpIIb/IIIa) kompleksi agregasyonda merkezi bir rol oynar. Fibrinojenin bağlanma bölgesi GpIIb/IIIa kompleksinin bir bölgesinde yer alır ancak çözünmüş haldeki plazma fibrinojeni dinlenme halindeki trombosit yüzeyine bağlanamaz. Bağlanmanın olabilmesi için trombositlerin aktive olması gerekir (8,25).



Sekil 5 : GpIIb/IIIa'nın yapısı ve fibrinojen bağlanma bölgeleri (59)

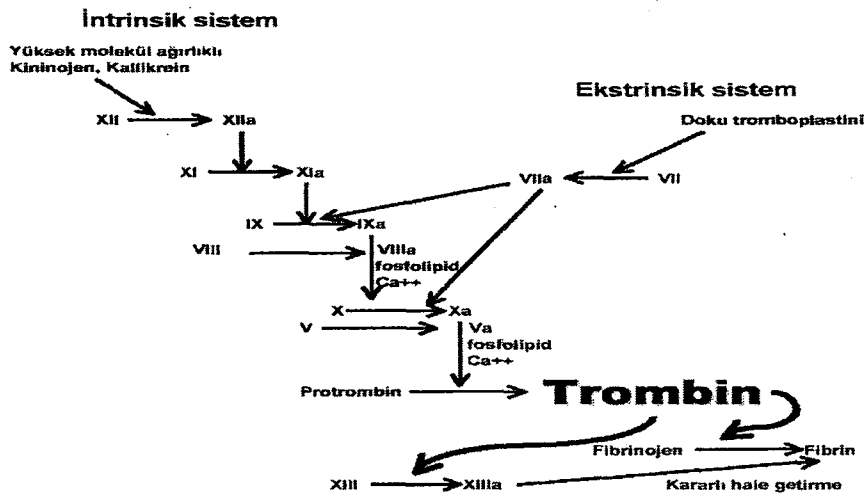
GpIIb/IIIa'nın fibrinojene bağlanması çok güçlü bir şekilde Ca^{++} konsantrasyonuna ve divalent etkileşimlere bağlıdır (70). GpIIb/IIIa'nın agregasyondaki etkisi Glanzmann trombastenili hastaların eksik yada etkisiz GpIIb/IIIa'nın reseptörleri ve kanamaya eğilimin artmasıyla belirgin bir şekilde dikkat çeker.

Fibrinojen, α , β ve γ zincirlerinin homodimer formda bulunduğu bir multivalent adezyon molekülüdür. 6 zincir merkezde (E bölgesi) birleşir. İki dış bölge D bölgesi adını alır. Spesifik bağlanma bölgesine α ve γ zincirleri ile farklı trombositlerin GpIIb/IIIa reseptörlerine bağlanır. γ zincirinin karboksi terminali ve γ zincirinin iki sinyal dizisi GpIIb/IIIa için spesifik bağlanma bölgesi olarak tanımlanır. Bir fibrinojen iki ayrı trombositte bağlanır (71-74) (şekil 5).

4.1.3.2.1. Trombin ve Trombin İndüklü Agregasyon

Çok fonksiyonlu bir protein olan trombin, hemostazın bütün basamaklarında rol oynayan anahtar bir prokoagulandır. Trombinin öncüsü protrombin, K vitaminine bağımlı bir zimojen olarak karaciğerde sentezlenen iki krinkle bölgesine sahip tek serin proteazdır (75). Protrombinin N terminal bölgesinde Gla ve krinkle bölgeleri yer alır ve biyolojik olarak fonksiyon göstermezler. Bu nedenle trombin protrombinin yarısı büyüklüktedir (trombin 39 kDa, protrombin 71,6 kDa) (76).

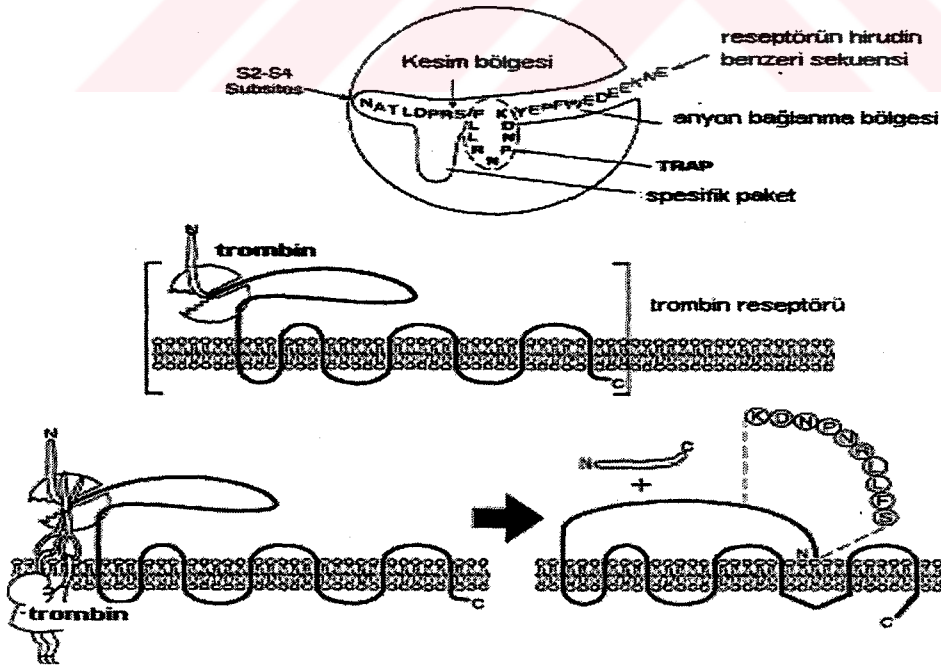
Protrombinin trombine dönüşmesinde intrinsik ve ekstrinsik sistemler rol oynarlar. Protrombinin trombine dönüşmesini tetikleyen bu koagulasyon kaskadları in vitro olarak kanın cam ve kollajen lifler gibi elektronegatif yüzeylerle karşılaşmasıyla başlar yada in vivo olarak damar zedelenmesi ile ortaya çıkan damar endoteli altında bulunan kollajenle kanın teması ile sağlanır (77) (şekil 6).



Şekil 6 : Koagulasyon kaskadı

İnsan α -Trombini disülfid köprüleriyle birbirine bağlanmış bir A bölgesi ve bir B bölgesinden oluşur. α -Trombin G protein bağlı spesifik reseptörü tanır ve reseptörün alt kısmında yer alan arjinin ve lizin'den keser. γ -Trombin ise α -Trombinin tirozin içeren bölgesinden kesilmesiyle oluşur. γ trombin prokoagulan aktivitesi gösteremezken trombositleri aktive edebilmektedir (78,79) .

Trombin reseptörü olarak dört farklı reseptör tanımlanmıştır. Bu reseptörler proteazla aktive olan reseptörler (PAR) adını alırlar PAR-1 özellikle trombositlerde bulunur ve trombositlerin aktivasyonunu sağlar (79-81). PAR reseptörleri memranı yedi defa geçen G protein bağlı reseptörlerdir. Trombin bu reseptörlerin potansiyel kesilme bölgesi olan N terminalinin 41. amino asit arjininin karboksi ucundan keser; Kesilen uç trombinin "SFLNPNDK" dizisiyle özel bir katlanma yaparak yeni bir yapı oluşturur. Şekilde 7'de görülen bu yapıya tetrahedred ligand denilmektedir (82-83). G proteinleri PAR-I ve fosfolipazlar ve iyon kanalları gibi sitoplazmik yada membran efektörleri ile etkileşime girerler ve bir çok hücre içi sinyalin oluşumuna neden olurlar (84).



Şekil 7 : trombin ve trombin reseptörünün aktivasyonu (59)

Trombinin yüksek afiniteyle bağlandığı bir başka reseptör ise Gplb dir ve aktivasyonla von Willebrand reseptörünün komponenti olan Gplb-V-IX 'a dönüşür. Ancak trombinin trombositlerde Gplb ile etkileşimi tam olarak açıklanabilmiş değildir (85-86).

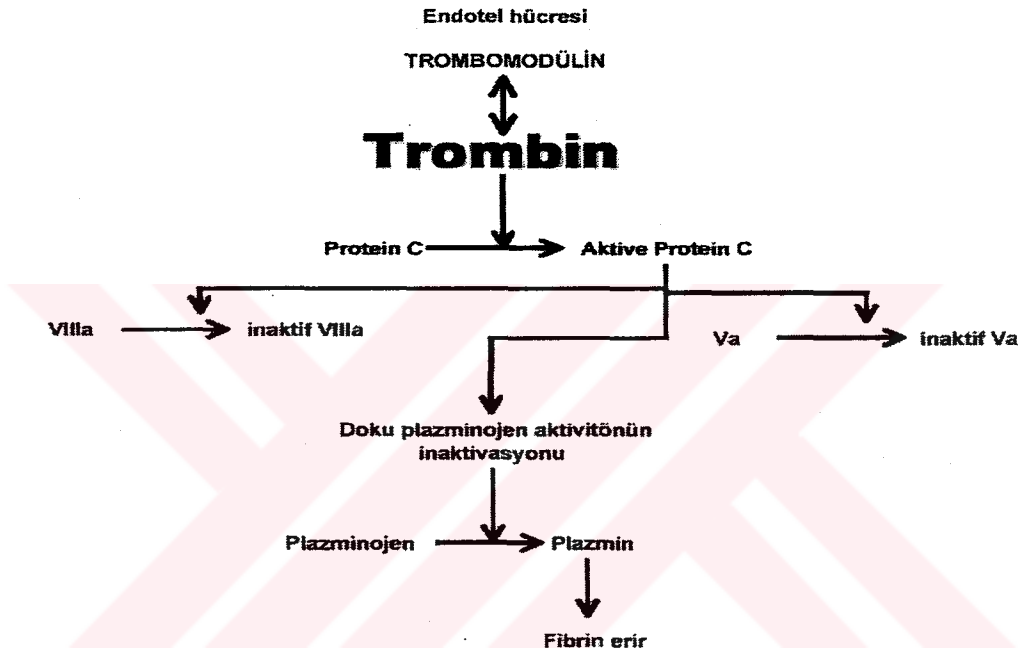
G proteinlerine bağlı reseptörler fosfoinositidin hidrolizlenmelerinden oluşan kaskadı da içerirler (87). Burada en temel yol fosfolipaz Cnin aktivasyonu ile başlar (88). Fosfolipaz C fosfatidilinozitol bifosfat'ı (PIP₂) diaçilgliserol'e (DAG) ve inositol üçfosfata böler (IP₃) (şekil 2). Bu ürünler protein kinaz C'nin aktivasyonuna ve hücre içi Ca⁺⁺ seviyesinin artmasına yardımcı olurlar. Bu yolun ötesinde trombositlerde esas önemli olan Gpllb/IIla'nın hücre içinden hücre dışına doğru aktivasyonudur. (88) Kalıcı transfeksiyonla B lenfosit hücreleri üzerinde aktarılmış Gpllb/IIla'nın aktivasyonu incelenmiş ve fosfolipaz C' nin aktivasyonu ile başlayan mekanizmanın Gpllb/IIla'nın aktivasyonunda sınırlı olduğu gösterilmiştir (89) . Bahsedilen sinyal olaylarının yanında trombin indüklü agregasyonda integrin aktivasyonu tam olarak açıklanabilmiş değildir (88). Fosfatidilinozitol üçfosfat (PIP₃) downstream efektör proteini protein kinaz B Gpllb/IIla'nın aktivasyon prosesini hazırladığı düşünülmektedir (90). Fibrinojene trombin etkisiyle oluşturulmuş fibrin trombosit üzerindeki Gpllb/IIla'ya bağlandığında fosforilasyon olaylarıyla gelişen sinyaller ile sitoskelet birleşmesi ve translokasyon olur (88). Bu fizyolojik değişimler trombositlerde degranülasyona neden olduğu gibi hemostatik plağın kontraksiyonuna neden olur. Böylece yara bölgesi kapanır (88).

Fibin / fibrinojende Gpllb/IIla'nın bağlanabileceği üç adet potansiyel bölge vardır. Bunlar karboksi terminalindeki fibrinojenin γ zincirinde yer alan Arjinin-Glisin- Asparajin (RGD) dizisidir (91) bu dizi Gpllb/IIla'ya Ca⁺⁺ bağımlı bir şekilde bağlanır ve bu şekilde başka bir trombositin Gpllb/IIla reseptörüyle birleşmesinde köprü olur.

Stabil bir pıhtı oluşumu sağlandıktan sonra fibrin pıhtısı içindeki trombin aktivitesi antitrombin III, heparin kofaktör II, α 2makroglobilin yada protein C inhibitörü ile ortadan kalkar (92-94).

Trombin endotel hücre yüzey proteini olan trombomoduline spesifik olarak bağlanıp, protein C yi aktive ederek Faktör VIII ve Faktör V 'i inaktive eder ve böylece koagulasyon kaskadını durdurur (92-94). Böylece trombin antikoagulan etkisini gösterir.

Bu iki yönlü bir olaydır trombin fibrinolizi başlattığı gibi inhibe de eder. Fibrinoliz'in inaktivasyonu, trombinle aktive edilen fibrinoliz inhibitörü (TAFI) olarak anılan bir proteinin trombin ile aktivasyonu ile gerçekleşir (96-97).



Şekil 8: Fibrinoliz

4.1.3.3. Sekresyon

Adezyon ve şekil değişimi esnasında trombositler depoladıkları substratları hücre dışına salgırlar. Bu prosese sekresyon veya degranülasyon denilmektedir. Sekresyon enerji gerektiren bir proses olarak iki yolla ilerler. Bir tarafta granüler içerik ekstrasellüler alana açık kanaliküler system ile salınır diğer tarafta ise granüler içerik eksositoz yoluyla, direkt sekresyon ile gerçekleşir. Bütün granüler komponentler, gerekli sitoplazmik Ca^{++} konsantrasyonuna ulaşıldıktan sonra, belirli bir düzen içinde salınırlar. Önce yoğun cisimcikler ardından α granüller ve en son lizozomlar salınır (14).

Sekresyonun başlaması trombositler için agregasyonun geri dönüşümsüz fazını başlatır (8,14). Granüler içeriğin sekresyonu enerji gerektiren bir olaydır ve ATP gerektirir. Sekresyon hücre içi Ca^{++} konsantrasyonuna bağlıdır. Bu nedenle granül komponentler gerekli sitoplazmik Ca^{++} konsantrasyonuna ulaşıldığında salınır (tablo 3).

Tablo 3: Trombositlerdeki granüler yapıların içerikleri (8)

Yoğun cisimcikler	α Granüller	Lizozomlar
ATP	Enzimler	α -arabinosid
ADP	α_1 -antitripsin α_2 -antiplazmin	β -galaktosidaz
Ca^{+2}	α_2 -makroglobin C1- esteraz inhibitörü	β -glukronidaz
Serotonin	Adezyon proteinleri	N-asetilglukozaminidaz
Fosfat	Fibrinojen Trombospondin	Elastaz
Guanin nükleotidi	Fibronektin Vitronektin	Kollejenaz
	von Willebrand Faktörü P-selektin	Katepsin
	Glikoprotein lib/IIla	
	Büyüme faktörleri	
	Trombositten türeyen büyüme faktörü	
	Transforming büyüme faktörü β	
	Epidermal büyüme faktörü	
	Endotelyal büyüme faktörü	
	Sitokin benzeri proteinler	
	Interlökin 1	
	CD 40 ligandı	
	Trombosit factor 7	
	β -tromboglobilin	
	Koagülasyon faktörleri	
	HMWK Faktör V	
	Plasminojen Faktör XI	
	PAI-1 Fibrinojen	
	Protein S	

4.1.4. TROMBOSİT FONKSİYON TESTLERİ

Trombosit fonksiyonlarını ölçen testler trombosit adezyon ve / veya aktivasyon kapasitelerini yansıtır. Kanama zamanı ölçümü (98) ve agrogometrede (99) agregasyon ajanlarına karşı trombosit hassasiyetinin ölçülmesinde bazı önemli sınırlamalar mevcuttur (100). Dolaşımda Trombosit hiperaktivitesinin saptanmasında plazma trombosit faktör 4, β tromboglobulin ve P-selektin başlıca belirteçlerdir (101-103). İdrarda tromboksan A2 metabolitlerinin ve dolaşımdaki trombosit agregatlarının ölçümleri de trombosit fonksiyonlarını yansıtır (104).

Trombositlerin Hiperaktivitesi ve dolaşımdaki trombositlerin aktif halde dolaşmasının saptanması kararsız anjina, akut miyokardial infarktüs, anjioplasti, kardiopulmoner bypass, felç, geçici iskemik atak, diabetes mellitus, sigara içimi, hiperlipoproteinemi, stres, aşırı egzersiz, transfüzyon için trombosit hazırlanması gibi klinik durumlarda önemlidir(36).

4.2. İKİ BOYUTLU POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ (2D PAGE)

Tüm organizmalarda ; doku , hücre ve organellerinde meydana gelen kompleks fonksiyonlar ve metabolik reaksiyonlar her bir kompartımanın yüzeyinde ve çevresindeki proteinlerce gerçekleştirilir. Bir biyolojik kompartımandaki proteinlerin sayısı fonksiyonun kompleksliliğine bağlı olarak değişir (105).

İnsan genom projesi tamamlandıktan sonraki bilimin yeni vizyonu organizmadaki doku, vücut sıvısı veya hücredeki tüm proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının belirlenmesidir (105). İnsan organizmasının gen sayısı önceden yapılan spekülasyonların (120000 gen) aksine yaklaşık 30000-40000 olarak tespit edilmiştir (106). Ancak protein sayısını gen sayısı ile sınırlamak (bir gen bir enzim teorisi) söz konusu olamaz. Alternatif “splicing” ve postranslasyonel modifikasyonlarla protein sayısı gen sayısından 10-200 kat fazla olabilmektedir. Proteom analizleri tüm bu proteinleri kıyaslamalı yapısal ve nicel bilgileri sağlayacak potansiyele sahiptir (105). Bunun yanında DNA bazlı teknikler hücre içinde cereyan eden fizyolojik ve biyokimyasal prosesler hakkında yeterli bilgi vermez. Çeşitli çalışmalarda belirtildiği gibi hücre içi mRNA miktarı ile protein miktarı çok zayıf bir korelasyon göstermektedir. Bazı durumlarda protein miktarının mRNA miktarından göreceli olarak 20 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir (89). İki boyutlu jel elektroforezi proteomik çalışmalarda anahtar metottur ve proteinlerin tüm bilgi ağının hiçbir hipoteze dayanmadan görüntülenmesine olanak sağlar (105-107).

İki boyutlu jel elektroforez tekniği kullanılarak protein ayırımı ilk kez 1956 yılında Simithies ve Poulik tarafından yapıldı (108). 1973 yılında ise Stegman tarafından IEF ve SDS PAGE kombinasyonu ilk kez uygulandı. (109). Tüm iki yönlü ayırma metodları her bir yönde farklı bir özelliğe dayalı ayırım yapacak şekilde dizayn edilmiştir (110) Polipeptid karışımlarının ayrılmasında kullanılan en yaygın metod ise birinci yönde pH gradienti oluşturarak polipeptidlerin izoelektrik noktalarına göre ayrılması (IEF) ve ikinci yönde ise moleküler ağırlığa bağımlı ayırım yapan SDS PAGE

tekniklerinin birleştigi bir metottur (111). Ayırma gücü hazırlanan jellerin ebatlarıyla paralellik gösterdiği gibi deteksiyon metoduna bağlı olarak değişmektedir. Bu özelliklerinden dolayı 2D PAGE tablo 4'de belirtilen alanlarda uygulanmaktadır:

Tablo 4 : 2D PAGE metodunun uygulama alanları (105)

Kompleks protein karışımlarının ayrılması ve tanımlanması
Hücre tipi ve suşlarının belirlenmesi ve karakterizasyonu
Protein izolasyonu (dizi analizleri ve seçimli antikor tanımlanması)
Hücre içeriğinin farklanması ve hastalık teşhisi
Translasyon sonrası protein modifikasyonun belirlenmesi
Kalite kontrolünde protein saflığının analizi
Hücre proliferasyonu, farklanma ve transformasyonun incelenmesi

4.2.1. İzoelektrik Odaklama (IEF)

Bütün fraksiyonlamalar, örnek molekülünün diferansiyel göç oranına bağlı olarak gerçekleşir. Kromatografik kolon boyunca yada elektrik alan boyunca süren elektroforezde genellikle örnek molekülleri dengede olduğu konsantrasyon bantları yada alanları olarak dağılım gösterirler. Bu dağılım transportu termodinamik esaslarına göre gerçekleşir. Bu proses esnasında entropinin eğilimi bütün gradientlerin yıkımına ve dilisyonun maksimum hale gelmesine neden olur. Entropi sıklıkla etkisini moleküllerin konsantrasyon gradientinde aşağı doğru difuzyonuna harcar ve böylece ürünler bant sınırlarını ve komponent karışımlarını oluşturur (110-112).

İzoelektrik odaklama işleminde bahsi geçen bu etkinin yanında taşıyıcı amfolit (CA) olarak tanımlanan yüksek mobiliteye sahip sentetik poliamino polikarboksilik asitlerin karışımları olan amfoterik bileşikler izo elektrik noktalarına göre en asidik olan anoda en bazik olan katoda doğru ilerleyerek jelde sıralanırlar (4). Bu şekilde ekstra bir ayırım sağlanmakta ve fraksiyonlama oranı artırılmaktadır (111).

pH gradienti çalışılmak istenen pH aralığına göre ayarlanabilmektedir. pH2-11 aralığındaki gradient jeller geniş bir aralığa sahiptir. Ancak jel uzunluğunu göz önüne aldığımızda aynı uzunluktaki jellerde örneğin pH2-11

aralığındaki bir jelin, pH 4-5 aralığındaki gradient jelden daha düşük bir ayırma gücüne sahiptir (112).

Örnekler jele uygulandıktan sonra polipeptidler elektrik alan içinde kendi izoelektrik noktalarına göç ederler ve izoelektrik noktalarına ulaştıklarında net yükleri 0 olduğundan daha fazla hareket etmezler ve o noktada odaklanırlar.

4.2.2. Sodyumdodesilsülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez

SDS PAGE elektrik alanda protein moleküllerinin moleküler büyüklüklerine göre kantitatif olarak ayırma esasına dayalı bir elektroforez yöntemidir (113). Sodyumdodesil(lauril)sülfat (SDS) anyonik bir deterjandır ve etkileşime girdiği proteinlerin net yüklerini maskeler böylece tüm proteinler negatif yüklü molekül dizileri oluşturur ve molekül ağırlıklarına göre katottan anota doğru göç ederler . Bir nörotoksik madde olan akrilamid monomerlerinin uzun zincirler ve çapraz bağlantılar oluşturacak şekilde polimerizasyonu NN'metilenbisakrilamid (bisakrilamid) veya riboflavin gibi molekülün uçlarında bulunan serbest fonksiyonel gruplar barındıran moleküller ile sağlanmaktadır. TEMED, amonyum per sülfattan serbest radikal formasyonunun oluşmasını katalizler bu nedenle TEMED reaksiyon başlatıcı olarak gerekmektedir (111-113).

4.2.3 2D PAGE Jellerinin Değerlendirilmesi

Genelde tek yönlü elektroforez için kullanılan boyama yöntemleri 2D PAGE içinde geçerlidir. Bu yöntemler ile proteinler Tablo 5'de belirtildiği gibi artan bir duyarlılıkta boyanırlar.

2DE 'de proteinlerin boyama sonrası değerlendirilmesi bir sonraki aşamadır. Değerlendirme görsel yada bilgisayar yardımıyla otomatik olarak yapılır. Görsel değerlendirmede protein spot boyama yoğunluğunun %10 'u gerçek tayin değerlerinden sapan farklanmalar gösteren doğruluğu iyi olan ve farklı jellerde ilgili spotların tanımlanmasında otomatik tarama sistemlerinden daha kolay bir yöntemdir. Ancak büyük jellerde birçok jelin birbirleri ile kıyaslanmasında tek bir spot yoğunluğunun bile belirlenmesini imkansız kılar. Burada otomatik analiz gerekir (4,105).

Tablo 5 : Boyama teknikleri ve duyarlılıkları

Protein deteksiyon duyarlılığı	Boyama tekniği
100 ng	CBB R-250
$\cong 100$ ng	Negatif Zn İmidazol
50-100 ng	Negatif Cu ⁺⁺
50-100 ng	CBB G- 250
5-10 ng	Gümüş
1-10 ng	Gümüş + Glutaraldehit
1-2 ng	SYPRO floresan boyalar
1-100 pg	Radyokimyasal

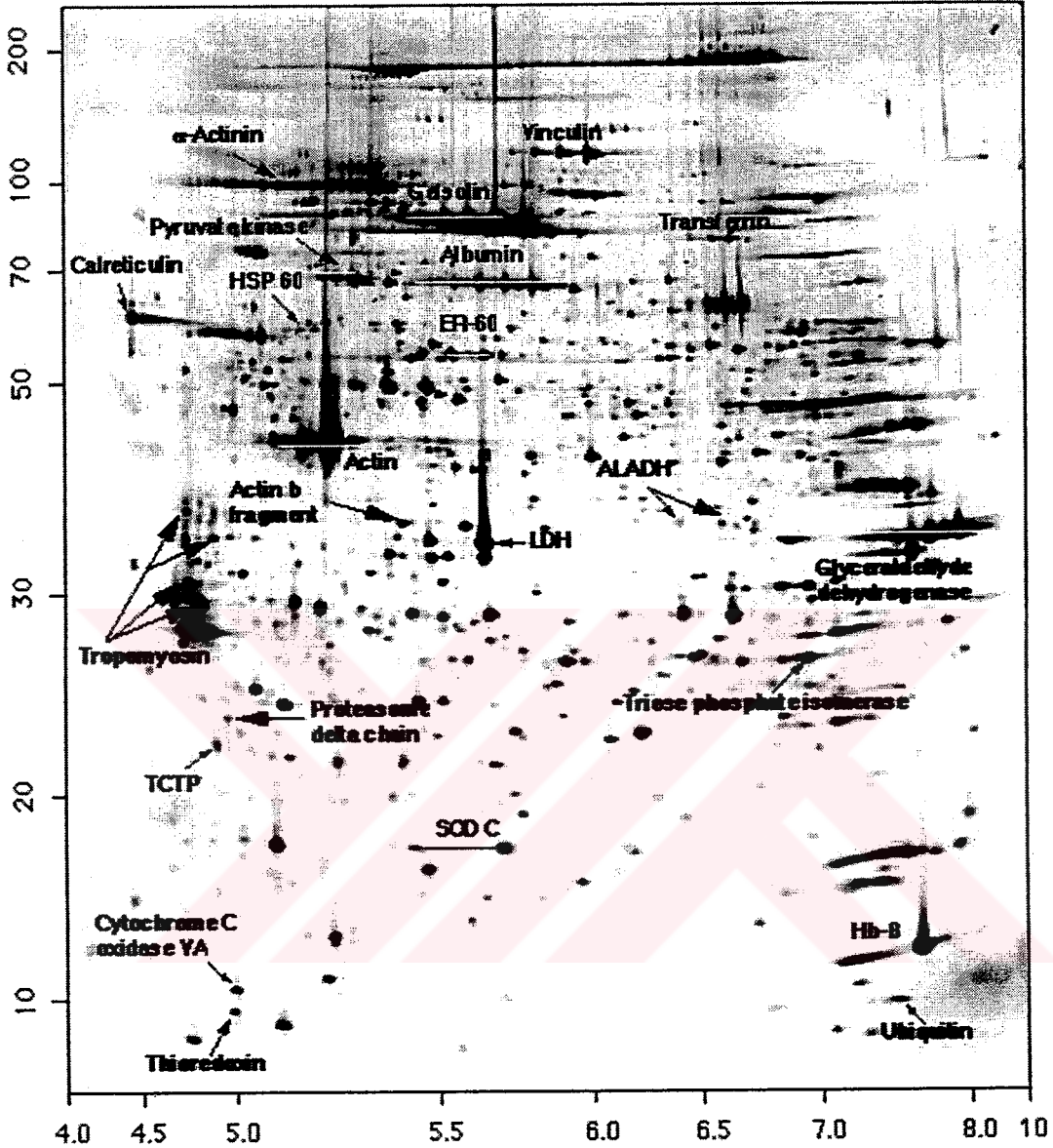
Bilgisayar destekli değerlendirmede bir tarayıcı vasıtasıyla görüntülenen jeller özel bir program sayesinde resim formatında bilgisayara kaydedilir. Bu program jeldeki bütün spotlara tek tek numara verir. Zeminden kaynaklanan gölgelenmeleri düzeltir. Program niteliği gereği yürütülmüş bütün jelleri tanımlar ve içlerinden sayıca en çok ve en ortak jeli referans jel olarak seçer. Biyoinformatik amaca yönelik data şeklide saklanır (7).

4.3. TROMBOSİT PROTEOMİĞİ

İnsan genom projesinin sonuçlandırılmasıyla birlikte gen sayısının beklenenden daha düşük çıkması bir gen bir enzim teorisinin sonu oldu. Bu sonuçlara göre fonksiyonel bir gene karşılık fizyolojik fonksiyonuna bağlı olarak hücreden hücreye 10 ila 100 kat fazla farklı protein bulunduğu ortaya çıkmaktadır. Protein çeşitliliğinin genetik materyalden bu kadar fazla olmasının nedeni ise çevre koşulları, hastalıklar, ilaç kullanımı, stres gibi dış etmenler ile regüle edilen alternatif “splicing” ve translasyon sonrası modifikasyonlardır. mRNA’nın yarılanma ömrü kısa olup fonksiyonun bitiminden sonrayıkıma uğrar. Bu nedenle hücre içindeki protein miktarıyla mRNA miktarı arasında çok zayıf bir korelasyon vardır (114). Trombosit gibi çekirdeksiz hücreler için DNA yada RNA bazlı teknikler nispeten daha kolay olmalarına rağmen hücrenin biyokimyasal prosesleri hakkında yeterli bilgiyi verememektedir (114).

Bu gerekçeler ile proteinden gene doğru giden ve hangi proteinin hangi gene ait olduğunu ortaya çıkaran yeni teknikler ön plana çıkmıştır. Bu analiz yöntemlerine genel olarak proteom analizleri adı verilir ve yöntemlerin temelinde 2D PAGE protein ayırma metodu yer alır (115). Proteom terimi ilk olarak 1994 yılında bir elektroforez kongresinde tanımlandı. Proteom, genomdan farklı olarak doku, organizma veya hücre kültüründe herhangi bir anda mevcut olan proteinlerin tamamını ifade eder. Proteomik ise değişik koşullarda eksprese edilen protein tanımlamalarını, yapısal özelliklerinin belirlenmesini fonksiyonlarının aydınlatılmasını açıklar (115).

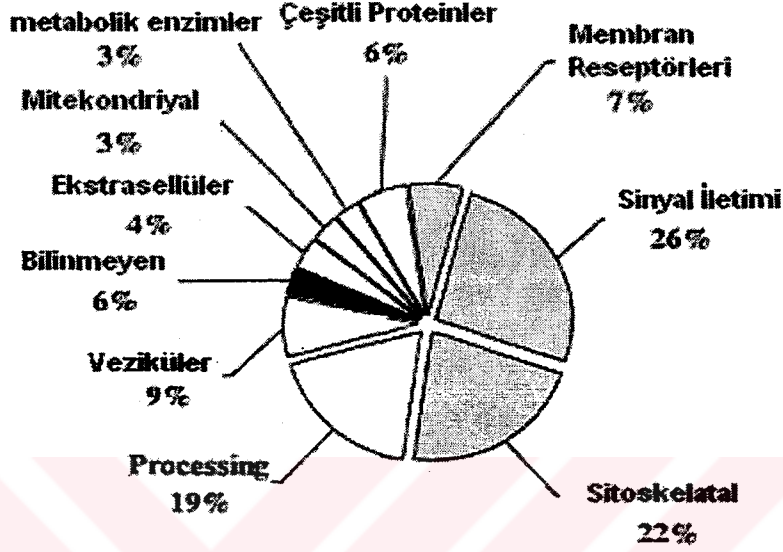
Trombosit biyolojisi 20 yıldan fazla bir süredir 2 DE metodu kullanılarak incelenmektedir (Şekil 9-10). Membran protein ekspresyonları (3), hücre aktivasyonunu takiben sitoskeletle birleşen proteinler (3-4). trombosit proteinlerindeki polimorfizm (6,116) konularıyla ilgili olarak iki yönlü elektroforez tekniği ile yapılmış çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarla elde edilen trombosit protein haritaları “swissprot”, “expassy” gibi protein data bankarında yer almaktadır (117). (tablo 6)



Şekil 9 : dinlene halindeki trombositlerin 2D PAGE jel görüntüsü ve tanımlanan protein spotları (www.expasy.org dan alınmıştır)

Proteom analizlerinde yardımcı tekniklerden maya ikili hibrit yöntemi kullanarak bazı önemli trombosit proteinlerinin hangi proteinlerle etkileştiğine yönelik çalışmalarla (89) aktivasyon ve agregasyon aşamalarında meydana gelen bir takım prosesler açıklanmaya çalışılmıştır. Transkriptom olarak bilinen ve proteom analizlerinde yardımcı teknik olarak kullanılan başka bir metotla da trombositlerdeki sekresyon proteinleri

ve atasal proteinler tanımlanmıştır (118). 2 DE ile ayrılan proteinlerin fonksiyonlarına göre sınıflandırılması şekilde gösterilmiştir.



Şekil 10: PH 4-6 gradientleri arasındaki proteinlerin fonksiyonlarına göre dağılımları (3).

Bu bilgilere rağmen hala hazırda trombositlerin aktivasyon, agregasyon ve sekresyon aşamalarında meydana gelen bazı yapısal ve fonksiyonel değişimler açıklanmayı beklemektedir.

Tablo 6: 2D PAGE ile tanımlanmış trombosit proteinleri (6)

Sitoiskelet proteinleri I				
Protein adı	Swiss prot kodu	Molekül ağırlığı	PI noktası	Fonksiyonu
a- aktin	P12814	60,300	5,01	F-aktin çapraz bağlanma proteini
α -aktin	AAC1	49,615	4,86	
Aktin b/g	P02570	girilmedi	girilmedi	Hücre iskeletinin ana komponenti ve internal hücre motilitisini sağlar
β yada γ aktin	ACTB P02571 ACTG	girilmedi	girilmedi	
Aktin H	P12718	45,607	4,82	Hücre iskeletinin ana komponenti ve internal hücre motilitisini sağlar
kaldesmon	Q05682	20,609	4,80	Aktin ve miyozin filamentleri arasında köprüyü sağlar
CKAP 1	Q99426	30,602	5,03	Tübülilin katılanmasından sorumlu
Kofilin	P23528	14563	4,96	Aktinin polimerizasyonunu kontrol eder
Dynaktin	Q14203	21,552	4,66	Aktin filamentlerin arasından organel trafiğinden sorumlu
Flamin	P21333	girilmedi	girilmedi	Membran glikoproteinleriyle sitoskelet arasında bağlantı kurar
Gelsolin	P06396	28,055	4,82	Aktin depolimerizasyon faktörü
Miyozin EN	P16475	15,839	4,42	Aktin filamentleri arasından protein trafiğini sağlar
Miyozin M	P19105	18,514	4,52	Aktin filamentleri arasından protein trafiğini sağlar
Miyozin N	P24844	19,500	4,71	Aktin filamentleri arasından protein trafiğini sağlar
Miyozin S	P24572	15,970	4,31	Aktin filamentleri arasından protein trafiğini sağlar
Talin	Q9Y490	girilmedi	girilmedi	Fokal adezyon komponenti
Tropomiyozin	PI2324	29,304 30,343 31,056 29,646	4,75 4,72 4,70 4,69	Aktin filamentlerinin stabilite faktörü
Tropomiyozin 2	P06468	37,967	4,67	Aktin filamentlerinin stabilite faktörü
Tropomiyozin 3	P09494	36,540	4,76	Aktin filamentlerinin stabilite faktörü
Tropomiyozin 4	P07226	36,860	4,67	Aktin filamentlerinin stabilite faktörü
Tropomiyozin a	P10469	28,465	4,75	Aktin filamentlerinin stabilite faktörü
Tübilin a1	P04687	18,224	4,98	Mikrotübilin yapısında
Tübilin α 1	TBA1	18,224	5,02	

Sitoiskelet proteinleri II

(Tablo 6 devam)

Protein adı	Swiss prot kodu	Molekül ağırlığı	PI noktası	Fonksiyonu
Tubilin a4	P05215	21,047	4,91	Beş farklılaşmış tübilin izoformlarından biri
Tubilin α4	TBA4	18,514	4,95	
Tubilin b1	P07437	50,725	4,92	Beta tübilin izoformu
Tubilin b2	P05217	51,047	4,94	Beta tübilin izoformu
Tubilin b3	Q13509	20,609	5	Beta tübilin izoformu
Tubilin b5	P 04350	51,047	4,86	Beta tübilin izoformu
Vimentin	P08670	25,231	4,95	Ara filamentlerin komponenti
Ziksin	Q15942	40,332	4,54	Akitinle birleşen protein

Diğer Metabolik Enzimler

a-enolaz	P06733	25,675	4,89	Glikoliz
g-enolaz	P09104	48,453	4,88	Glikoliz
glioksalaz	Q04760	21,047	4,87	Laktoglutatyon liyaz: glioksal yol
KADI	P00568	18,604	4,95	

Ekstrasellüler Fonksiyon

Antitripsin	P01009	51,402	4,86	Antiproteinaz hedefleme
Klusterin	P10909	38,500	4,55	α granüllerde ulunur apoptosisin kontrolünde rol oynar
Faktör XIII	P00488	64,826	4,85	Kan koagülasyon faktörü
IL 18	Q14116	21,270	4,44	Sitokin
IL 18 öncüsü	IL18			Sitokin öncüsü
Osteonektin	P09486	33,785	4,77	Kollajene bağlanır yara iyileşmesinde ekspresyonu artar

Mitekondri

ATP sentaz d	P30049	15,800	4,45	Enerji üretimi
Komplement P33	Q07021	31,971	4,31	Q bağlanma proteini
Sitokrom C oksidaz	COXA	15,431	4,80	Enerji üretimi
Fraksatin	Q16595	15,431	4,80	Demir hemostazi

Protein yapımı I

Kalsiyum bağımlı proteinaz	CANS	26,820	4,94	Kalpain; Ca ⁺⁺ ile active edilen nonlizozomal tiol proteinaz
Katepsin A	P10619	39,219	4,50	Lizozomal deaminaz
EF1B	P10619	29,219	4,50	Protein sentezi

Protein Yapımı II

(Tablo 6 devam)

Protein adı	Swiss prot kodu	Molekül ağırlığı	PI noktası	Fonksiyonu
Elongasyon Faktör 1D	P24534	36,530	4,88	Protein sentezi
EIF6	P56537	26,937	4,56	Ribosomal alt ünitelerin birleşmesini engeller
Endoplazmin	P14625	92,500	4,77	Şaperon
GR78	P11021	44,403	4,71	Protein komplekslerini birleştirir
HSP 71	P11142	43,453	4,89	Şaperon ve pTYR içerir
HSP 82a	P07900	86,995	4,97	Şaperon
HSP 82 b	P08238	57,222	4,81	Şaperon
IF 5a	P10159	19,655	5,04	Protein biyosentezi
Nükleer transport faktör 2	P13662	14,407	4,85	Nükleer porun birleşmesinden sorumlu olduğu sanılıyor
Disülfid izomeraz	P07237	57,000	4,72	Protein disülfid bağlarının rearajmanından sorumlu
PDI-HOM	P13667	74,623	5,03	Disülfid izomerazın homoloğu
Proteaz 7	P35998	25,280	4,70	Proteaz
Proteasom 7	P28065	21,552	4,72	Proteasom komponenti
Proteasom d	P28072	23,744	4,74	Proteasom komponenti
Proteasom Z	P28072	23,744	4,74	Proteasom komponenti
RAD 23	P54727	54,979	4,37	Ubikutin bölgesi içeren protein yıkım elemanı
Spermin sentaz	P52788	42,373	4,87	Protein yıkımı
Ubikutin 1	Q92890	26,569	4,70	Ubikutin yolunda protein yıkımını sağlar
Ubikutin E2	P27924	22,777	4,88	Ubikutin yolunda protein yıkımını sağlar
Ubikutin L3	P15374	26,587	4,75	Ubikutin yolunda protein yıkımını sağlar
Ubikutin T	Q94782	84,800	4,87	Ubikutin yolunda protein yıkımını sağlar

Sinyal İletimi I

14/3/3b/a	P31946	27490	4,627	Adaptor ptorein
14/3/3d/g	P29,312	27,717	4,71	Protein kinaz C ve Y ve M yi Ca^{++} -kalmodulin varlığında aktive eden protein kinaz II
14/3/3e	P42655	29,474	4,60	Mitokondri importu
14/3/3F	Q04917	27,410	4,72	Protein kinaz C ve Y ve M yi Ca^{++} -kalmodulin varlığında aktive eden protein kinaz II
14/3/3s	P31947			P53 regulasyon inhibitörü

Sinyal İletimi II

(Tablo 6 devam)

Protein adı	Swiss prot kodu	Molekül ağırlığı	PI noktası	Fonksiyonu
Aneksin V	P08758	31,123	4,93	Apoptozun kontrolü
BID	P55957	20,609	4,98	Apoptik yolda görevli
Kalsinörin	PO6705	16,108	4,52	Kalsiyum bağlanma proteini
Kalretikülin	P27797	56,395	4,29	Kalsiyum sinyal iletiminde görevli
Diaphonoz – HOM	060610	62,774	4,83	Sitoiskelet regulasyonunda görevli
EGFR	P42566	56,147	4,78	Tirozin kinaz substratı
Glial olgunlaştırıcı factor	060234	16,634	4,90	Olasılıkla anti kanserajanı asetin bağlanma proteini
IP3 fosfataz	Q13187	26,529	4,77	Inozitol fosfataz
RAS GTPaz	Q13576	76,432	4,78	Sitoiskelet regulasyonunda görevli
cAMP bağımlı kinaz II α	P13861	50,059	4,9	cAMP yolu
cAMP bağımlı kinaz II B zinciri	P31323	52,781	4,66	cAMP yolu
KRS I	Q13188	55,408	5,03	Apoptozis yolu
LASP I	Q14847	19,552	4,23	Sitoiskeletal regulasyon
MP I	Q9Y2Q	14,531	5,01	MAPK ve ERK bağlantı proteini
MPT I	O14974	34,080	4,80	Sitoiskeletal regulasyon
n-RAS	P01111	21,030	4,89	GTP bağlanma merkezi
Serin/treonin protein fosfataz IIa	P30153	61,772	5,00	Sitoiskeletal regulasyon
Protein fosfataz IIc	P49593	52,519	5,00	Sitoiskeletal regulasyon
RAP-IB	P09526	29,92	4,87	Küçük G proteini
Rho-GDI I	P52565	25,121	5,00	Sitoiskeletal regulasyon
Rho-GD2	P52566	25,057	5,04	Sitoiskeletal regulasyon
Skap HOM	O75563	55,042	4,50	Sitoiskeletal regulasyon
SLAP 130	O15117	25,675	4,90	Sitoiskeletal regulasyon
Tioredoksine benzeyen protein	O43396	34,579	5,00	Apoptosis yolunda görev aldığı düşünülüyor
Veziküller I				
ARF	P16587	17,458	4,18	Golgiden tohumlanan vezikül
Ca ⁺⁺ bağlanan protein	Q99653	23,262	4,93	Eksositozda yer alır

Veziküller II

(Tablo 6 devam)

Protein adı	Swiss prot kodu	Molekül ağırlığı	PI noktası	Fonksiyonu
Klatrin A	P09496	23,805	4,73	
Klatrin B	P09497	30,343	4,54	
Koatemer ϵ alt ünitesi	O14579	29,219	5,10	Golginin kalatrinle kaplanmış yüzeyiyle birleşir
RAB-27b	O00194	24,993	4,86	Membrana bağlı GTP bağlanma proteini
RAB-GDI	P31150	55,530	5,02	Vezikül aracılı hücresel transport
Serum sorumlu proteini	O95810	38,278	4,94	Fosfatidilserin bağlanma proteini
Sintaksin 7	O15400	28,548	4,90	Veziküllerin lizozomlarla trafiğinden sorumlu
Sintaksin-HOM	O95564	29,560	4,79	Veziküllerin lizozomlarla trafiğinden sorumlu
SNAP-23B	O00161	26,127	4,74	Vezikül membran füzyon proteini

Membran Reseptörleri

Glikoprotein 9	P14770	19,500	4,23	VWF komponenti
Glikoprotein IIb	P08514	112,459	Girilmedi	İntegrin α IIb proteini agregasyondan sorumlu
Glikoprotein Ib	P13224	23,683	4,50	VWF komponenti
Sitokin reseptör bağımlı protein 4	Q9Y6M	53,722	4,92	Sitokin reseptörüyle homolog
MAPR	O00264	23,622	4,50	Progesteron reseptör komponenti

Çeşitli

TCTP	P13693	22,837	4,75	Transisyonel olarak tumor proteinleri tarafından kontrol edilir
ARSA	O43681	41,765	4,84	
NAP I-HOM	P55209	51,477	4,37	Sentromer birleşmesini sağlayan proteinle homolog
TSSC	O43179	52,087	4,80	Retinoblastomada görülen protein
P 48	P50502	51,062	4,84	Progesteron sinyal iletiminden sorumlu
EB1	Q15691	31,056	5,04	Sitoiskelet regülasyonundan sorumlu
UNR I	Q9Y3F4	38,389	5,02	

5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

5.1. Cihazlar

Cihaz İsmi	Markası ve Modeli
Afarez cihazı	Abbot (ABD)
Deiyonize su cihazı	Millipore MilliQ/RG (Fransa)
Derin dondurucu (-80 °C)	Nuarie NU 6512(Fransa)
Etüv	Heraeus (Almanya)
Güç kaynağı 3000 volt	Biorad PowerPac 3000 (ABD)
Istıcılı su banyosu	Memert (Almanya)
İki yönlü Elektroforez Sistemi	Biorad Protean II (ABD)
Kan sayım aracı	Abbot Celldyne 1700 (ABD)
Manyetik Isıtıcı karıştırıcı	Ika-Werk (Almanya)
Mekanik Karıştırıcı	Ika-Werk (Almanya)
Orbital karıştırıcı	Memert(Almanya)
PH metre	Mettler Toledo MP220 (italya)
Sonikatör	IKA (Almanya)
Spektrofotometre UV/Vis	Beckman Coulter UD- 520 (ABD)
Sterilizatör	Heraeus (Almanya)
Ultrasonik Banyo	Ika verk(Almanya)
Vorteks karıştırıcı	Ika verk (Almanya)
Yüksek devirli soğutmalı santrifuj	Heraeus universal 32R (Almanya)

5.2. Kimyasal Maddeler

Kimyasal sarf maddeleri	Marka
Akrilamid	Fluka (Almanya)
Etilendiamin (EDA)	Fluka (Almanya)
Piperazin Diakrilamid (PDA)	Fluka (Almanya)
TEMED	Fluka (Almanya)
Amonyumpersülfat (APS)	Merck (Almanya)
CaCl ₂	Merck (Almanya)
Glasiyel Asetik Asit	Merck (Almanya)
HCl	Merck (Almanya)
Metanol	Merck (Almanya)
MgCl ₂	Merck (Almanya)
NaCl	Merck (Almanya)
NaH ₂ PO ₄	Merck (Almanya)
NaHCO ₃	Merck (Almanya)
Tris	Merck (Almanya)
Üre %99,9	Merck (Almanya)
Etanol	Riedel Haaen
Ortofosforik Asit (H ₃ PO ₄)	Riedel Haaen
Amfolit %40	Serva
Amfolit %40 pH3-10	Serva
Amfolit %40 pH 2-4	Serva
Amfolit %40 pH 4-6	Serva
Proteaz İnhibitör Kokteyli	Sigma (ABD)
Bisakrilamid	Sigma (ABD)
Brom Fenol Blue	Sigma (ABD)
Coomassie Brilliant Blue G 250	Sigma (ABD)
Coomassie Brilliant Blue R 250	Sigma (ABD)
Ditiotreitol (DTT)	Sigma (ABD)
Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)	Sigma (ABD)
Gliserol	Sigma (ABD)
Glisin	Sigma (ABD)

KCl	Sigma (ABD)
NP 40 (IGEPAL 40)	Sigma (ABD)
Sığır Serum Albumini (BSA)	Sigma (ABD)
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma (ABD)
2DE protein standardı	Sigma (ABD)
Benzamidin	Sigma (ABD)
D Glukoz	Sigma (ABD)
HEPES	Sigma (ABD)
Trombin	Sigma (ABD)
Üre	Teknik (Türkiye)



5.3. Tamponlar ve Çözeltiler

- **Tyrodes HEPES Trombosit Yıkama Çözeltisi**

CaCl_2 0,066 g, MgCl_2 0,025 g, KCl 0,05 g, NaCl 2 g, NaH_2PO_4 0,0125 g, D- glukoz 0,25 g, NaHCO_3 0,25 g, HEPES 0,6 g tartıldı 175 mL ACD içinde çözülür. PH 7,4 e 1 N HCl ile ayarlanır ve toplam hacim 250 mL ye bidistile su ile tamamlandı .

- **Bradford Reaktifi**

100 mg Coomassie brilliant blue G –250 (CBB G-250) 50 mL etanol içinde tamamen çözüldü. Karışımın üzerine 100 mL (%85 w / v) H_3PO_4 eklendi ve karıştırıldı (stok reaktif).

Stok reaktiftan 15 mL alındı ve üzeri bidistile su ile 100 mL ye tamamlandı. Kullanmadan önce 1,5-2 saat köpürmeden karıştırıldı ve iki defa Watmann kağıdıyla süzildükten sonra kullanıldı . Bradford çözeltisi sırlı şişede oda sıcaklığında saklandı.

- **% 1,28 lik APS Çözeltisi**

0,128 g APS tartıldı bir miktar bidistile su ile çözüldü. Çözelti bidistile su ile 10 mL ye tamamlandı her çalışma için taze hazırlandı.

- **% 0,8 lik APS Çözeltisi**

0,04 g APS bidistile su ile çözüldü ve bidistile su ile 5 mL ye tamamlandı. Bu çözelti her çalışma için taze hazırlandı.

- **100 mM Tris- HCl Tamponu (pH 7,1)**

100 mM stok Tris-HCl tamponu için 1,51 g Tris bir miktar bidistile su ile çözüldükten sonra çözeltinin pH 'sı 1 N HCl ile pH 7,1 'e getirildi ve bidistile su 250 mL ye tamamlandı. Stok tampon çözeltisi olarak buzdolabında saklandı.

- **125 mM Tris-Fosfat Tamponu (pH 6,8)**

12,11 g Tris bir miktar bidistile su ile çözüldü 1M ortofosforik asit ile pH 6,8'e ayarlandı sonra bidistile su ile hacim 100 mL ye tamamlandı Stok tampon çözeltisi olarak buzdolabında saklandı.

- **Doku Homojenizasyon Çözeltisi**

Çözelti 9 M üre (Merck), pH 2-4 %2 amfolit, 70mM DTT, pH 7,1 25 mM Tris-HCl , 50 mM KCl, 3 mM EDTA, 2,9 mM benzamidin, %2 v/v NP 40, proteaz inhibitör kokteyli (sonradan eklendi) içerir. 50 mL doku homojenizasyon tamponu için ; 27 g üre, 2,5 mL % 40 lık servalyte 2-4 amfolit, 12,5 mL Tris-HCl pH 7,1 tampon çözeltisi 0,186 g KCl , 0,023 g benzamidin, 1 mL NP 40 bir beherin içinde bidistile su ile çözüldü ve toplam hacim 50 mL ye tamamlandı. 50 mL doku homojenizasyon tamponu için 1 mL proteaz inhibitör kokteyli eklendi. Çözelti 1 mL'lik aliquatlara bölünerek -80 °C de kullanılana kadar saklandı.

- **IEF Ayırma Jel Çözeltisi**

Çözelti %4 w/v akrilamid, %0,3 w/v PDA, 9 M üre (Merck), %5 w/v gliserol, %2 pH 2-11 (2-4 , 4-6, 6-8, 3-11) amfolit içerir. 100 mL IEF ayırma jeli için ; 4 g akrilamid, 0,3 g PDA, 54 g üre , 5 g gliserol ve 1,25 mL amfolit eklendi toplam hacmi 5 mL'ye ayarlandı. Karışım bidistile su ile çözüldü ve 100 mL ye tamamlandı. 3 dakika sonikatörde degaze edildi ve 1 mL lik aliquatlara bölünerek - 80 °C de kullanılana kadar saklandı. Ayırma jeli kullanılacağı zaman 975 µL ayırma jeli için 25 µL %0,8 lik APS çözeltisi eklendi hafifçe karıştırıldı. Çözeltiye 15 µL TEMED (orjinal şişesinden) eklenerek jelin polimerleşmesi sağlandı.

- **IEF Kaplama Çözeltisi**

Çözelti %5 w/v gliserol, 5 M üre (Merck), %2 pH 2-4 amfolit içerir. 4 mL kaplama çözeltisi için 1 g gliserol 6 g üre bidistile su ile çözüldü ve hacim 12 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden 3,8 mL alındı üzerine 200 µL pH

2-4 amfolit eklendi. Çözelti 100 µL lik aliquatlara bölündü ve - 80 °C de kullanılabileceği kadar saklandı.

- **IEF Anod Çözeltisi**

Çözelti 3 M üre (Teknik) , % 7,27 w/v ortofosforik asit içerir. 400 mL anot çözeltisi için; 72 g üre, 20 mL ortofosforik asit distile su ile çözüldü ve hacim 400 mL tamamlandı. Çözelti 10 dakika degaze edildi. Bu çözelti her IEF elektroforezi için taze hazırlandı.

- **IEF Katod Çözeltisi**

Çözelti %5 Etilen diamin (EDA), 9 M üre (Teknik), %5 giserol içerir. 1,5 L katot tamponu için ; 810 g üre tartıldı bir miktar distile su ile çözüldü, 75 g gliserol çözeltiye eklendi. Çalışmanın yapılacağı gün 75 mL EDA karışıma eklendi. Toplam hacim distile su ile 1,5 L ye tamamlandı. 10 dakika havası alındı. Bu çözelti her IEF elektroforezi için taze hazırlandı.

- **IEF Jel Dengeleme Çözeltisi**

Çözelti 125 mM Tris-fosfat tamponu pH 6,8, %40 gliserol, %3 w/v SDS, %0,04 Brom fenol blue, 65 mM DTT içerir . 400 mL çözelti için 160 g gliserol , 12 g SDS, 0,04 g Brom fenol blue bidistile su ile çözüldü. Çözeltiye 50 mL Tris-fosfat tamponu eklendi ve toplam hacim bidistile su ile 400 mL ye tamamlandı. Çözelti 20 mL'lik aliquatlara ayrıldı ve -80 °C de saklandı. Çözelti kullanılmadan önce her 20 mL için 0,2 g DTT ilave edildi.

- **%15 lik SDS Poliakrilamid Jel Çözeltisi**

Çözelti %15 w/v akrilamid , %0,2 w/v bisakrilamid, %0,1 w/v SDS, 375 mM Tris -HCl pH 8,8 içerir. 1L SDS poliakrilamid jel çözeltisi hazırlamak için 150 g akrilamid, 2 g bisakrilamid bir miktar bidistile su'da çözüldü. 1 g SDS eklendi ve yavaşça karıştırıldı. 1 M pH 8,8 Tris HCl stok tamponundan 375 mL eklendi ve toplam hacim 1000 mL'ye bidistile su ile tamamlandı. Çözelti hafifçe karıştırıldıktan sonra 35 mL lik aliquatlara ayrıldı (16 x 20 cm ebadındaki elektroforez kasetleri için gereken miktar) ve -80 °C de saklandı.

Jel çözeltileri kullanılacağı zaman 2,33 mL %1,28 lik APS çözeltisi ve 35 mL jel çözeltisine eklendi. Çözelti hafifçe karıştırıldıktan sonra 15 µL TEMED (orjinal şişesinden) ilave edilerek jel polimerleşmesi başlatıldı. Çözelti jelleşmeden elektroforez kasetlerine aktarıldı. Jel polimerleşmesi esnasında jelin üst tarafından jelin üstünü kaplayacak şekilde bir miktar bidistile dalgalanma oluşturmayacak şekilde hafifçe dökülerek jelin üst kısmının düz bir satıh alması sağlandı.

- **SDS- PAGE Elektrot Tamponu**

Tampon 25 mM Tris , 192 mM glisin, %0,1 w/v SDS içerir. 2 L SDS-PAGE elektrot tamponu için ; 6,25 g Tris, 28,8 g glisin, 2g SDS distile su da çözüldü toplam hacim 2 L ye tamamlandı. Buzdolabında saklandı.

- **SDS Jel Fiksasyon Çözeltisi**

Etanol, asetik asit, bidistile su sırasıyla 5:4:1 oranlarında karıştırıldı. Oda sıcaklığında saklandı.

- **Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyama Çözeltisi**

Metanol, asetik asit , bidistile su 4:1:5 oranlarında karıştırıldı. % 0,1 lik çözelti oluşturacak kadar Coomassie brilliant blue R 250 karışıma eklenerek iyice karıştırıldı. İki defa filtre kağıdından süzildükten sonra oda sıcaklığında saklandı.

- **Boya Çıkarma Çözeltisi**

1 L boya çıkarma çözeltisi için 50 mL %98'lik metanol, 125 mL glasiyel asetik asit karıştırıldı. Toplam hacim 1 L'ye bidistile su ile tamamlandı.

- **IEF Elektroforez Yürütme Protokolü**

IEF yürütme protekolu tabloda gösterildiği gibi uygulandı. Basamak lardan geçişler elektroforez durdurulmadan sağlandı.

Tablo 7 : IEF Elektroforez Yürütme Protokolü

Uygulama sırası	Volt (V)	Amper (mA)	Süre
1	100	8	60 dakika
2	200	8	60 dakika
3	400	10	10 Saat
4	600	10	60 dakika
5	1000	14	30 dakika
6	1500	14	15 dakika

- **SDS PAGE Elektroforez Yürütme Protokolü**

SDS PAGE' de elektroforez protokolü akım (mA) üzerinden hesaplandı. Jel boyutları $16 \times 20 = 320 \text{ cm}^2$ 1 mm kalınlığındaki jellere uygulanacak akımlar tablo 7'de özetlenmiştir.

Tablo 8: SDS PAGE Elektroforez Yürütme Protokolü

Volt (V)	Amper (mA)	Süre
—	64	15 dakika
—	80	4 saat

5.4 Yöntemler

5.4.1. Trombosit Eldesi

En az 1 hafta boyunca herhangi bir ilaç kullanmamış sağlıklı donörlerden tromboferez işlemiyle taze 20 mL trombosit süspansiyonu %10 'luk ACD solusyonu içeren kan torbalarında toplandı ve agregasyon öncesi ve agregasyon sonrası örnek gruplarını oluşturmak için 10 mL' lik iki aliquota bölündü.

Kan bankasında rutin olarak kullanılan kan sayım aracı hem trombosit miktarını hem de lökosit kontaminasyonunu kantitatif olarak belirlemek amacıyla kullanıldı. Tromboferezle elde edilen trombosit süspansiyonunda 10 mL trombosit süspansiyonunda yaklaşık olarak $0,5 \times 10^9 - 1 \times 10^9$ arasında trombosit tespit edildi.

5.4.2. Trombosit Agregasyonu

Trombositlerde agregasyon trombin ile sağlandı. Bu amaçla 1 mL trombosit süspansiyonu için 1 ünite trombin kullanıldı. Agregasyon sonrası örneklerinde 160 µL trombin 10 mL trombosit süspansiyonuna ilave edildi. Agregasyon işlemi 37 °C de çalkalayıcı su banyosu içinde 20 dakika inkübe edilerek yapıldı. Trombosit kümeleşmesi gözle takip edildi. Aynı işlem agregasyon öncesi grupta 160 µL serum fizyolojik eklenerek yapıldı.

5.4.3. Trombosit Yıkanması ve Çöktürülmesi

Agregasyon öncesi ve Agregasyon sonrası trombosit örnekleri, trombosit süspansiyon örneklerinde eser miktarda bulunan eritrosit ve lökosit gibi hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla trombositler 1500 rpm de 12 dakika oda sıcaklığında santrifuj edildi. Üst faz trombosit fazından uzaklaştırıldı . Alt faz 9000 rpm' de (rotor no:1620A Heraeus) 12 dakika santrifüj edilerek trombosit pelleti elde edildi.

Trombosit pelleti plastik bir öze yardımıyla tüpün içine yayıldı. 25 mL Tyrodes-HEPES solusyonuna süspansiyon yapıldı ve tekrar 9000 rpm'de 12 dakika santrifuj edildi. Üst faz atıldı ve tekrar öze yardımıyla hücreler

tüpün içinde yayıldı. Bu yıkama işlemi üç defa tekrar edildikten sonra trombosit pelleti tartıldı ve -80°C ye kaldırıldı.

5.4.4. 2D PAGE Örnek Hazırlanması ve Örnek Solublizasyonu

– 80°C de dondurulmuş trombosit pelletlerindeki trombosit proteinlerinin denatürasyonu ve indirgenmeleri doku homojenizasyon tamponu ile sağlandı.. Trombosit pelletleri tartıldı ve üzerlerine $20\text{ }\mu\text{g}$ 'dan düşük pelletlerde $1\text{ }\mu\text{g}$ 'a karşılık $6\text{ }\mu\text{L}$, $20\text{ }\mu\text{g}$ 'dan yüksek pelletlerde $1\text{ }\mu\text{g}$ 'a karşılık $7\text{--}8\text{ }\mu\text{L}$ doku homojenizasyon tamponu eklendi. 15 dakikalık ultrasonkasyon işlemi yapıldı ve 30 dakika orbital çalkalayıcı ile örnekler hafifçe karıştırıldı. Soğutmalı santrifuj ile 4°C de 15 dakika 10000 rpm de santrifuj edildi. Santrifuj işleminin ardından üst faz ependorf tüpten alındı ve yeni bir ependorf tube aktarıldı ve -80°C 'ye kaldırıldı.

5.4.5. Protein Miktar Tayini

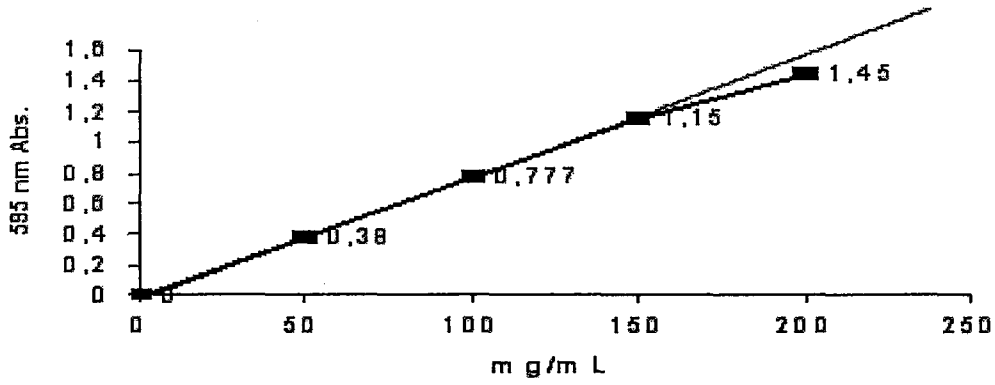
Örneklerin protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlenmiştir.

5.4.5.1. Bradford Protein Standart Eğrisinin Hazırlanması

Konsantrasyonu bilinen protein standardı oluşturmak üzere 1 mL de 1 mg BSA (Bovin Serum Albumin) stok çözeltisi hazırlanır. Örnekler çift çalışıldı. Tablo 8'de Bradford yöntemi , protokolü ve protein standart eğrisi şekil 11 de görülmektedir.

Tablo 9 : Bradford protokolü

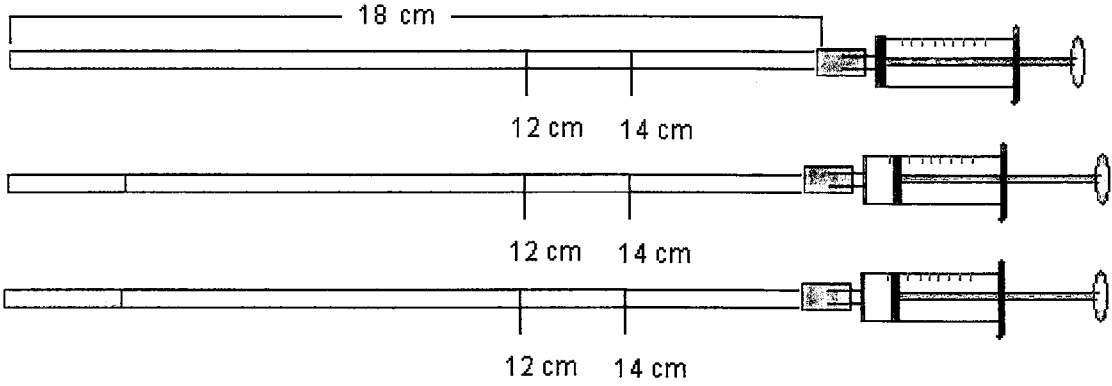
Örnek	Kör	1	2	3	4
Stok BSA (μL)	—	25	50	75	100
H ₂ O (μL)	100	75	50	25	—
Reaktif (mL)	900	900	900	900	900
O.D λ_{595}		0,38	0,777	1,15	1,45



Şekil 11: Bradford standart protein eğrisi

5.4.6. IEF Jel Tüplerinin Hazırlanması

İç çapı 1,5 mm, uzunluğu 15 cm olan IEF tüplerinin alt ucundan 11 cm ve 12 cm mesafeleri cam kalem ile işaretlendi. Tüplerin üst uçlarına ise serum lastiği ile birer enjektör eklendi. Daha önce hazırlanmış IEF ayırma jeli -80°C den çıkarıldı ve oda sıcaklığında çözöldü. 975 μL IEF ayırma jeli bir tüpe alındı ve üzerine 25 μL %0,8 lik APS eklendi. Sonikatörde 1-2 dakika degaze edildi. Polimerizasyon reaksiyonunu başlatmak üzere 15 μL TEMED akıtılarak eklendi. Tüplerin alt ucu jel çözöltisinin içine batırıldı ve üst ucunda yer alan enjektör yardımıyla alt uçtan 12 cm çizgisine kadar çekildi daha sonra tüp çözöltiden çıkarıldı ve içinde polimerleşmekte olan jel enjektör yardımıyla 14 cm çizgisine kadar çekildi. Tüpler polimerleşmenin sonuna kadar (30 dakika) dik duracak bir şekilde IEF standına yerleştirildi. (Şekil 12).



Şekil 12: IEF jellerinin tüplere yerleştirilmesi

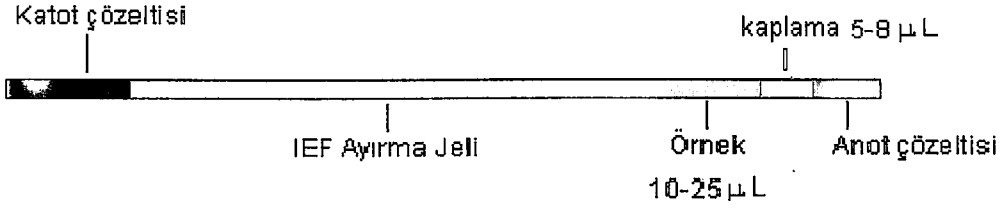
Polimerleşen jellerin kurumaması için tüplerin alt uçlarına Hamilton enjektör yardımıyla bidistile su eklendi bu şekilde bir nem çemberi oluşturuldu ve parafilmle alt uçlar kapatıldı. İleri polimerizasyon için bir gece oda sıcaklığında bekletildi. Tüp jeller oda sıcaklığında saklanırlarsa hazırlandığı günden itibaren 4 gün bozulmadan kalabilmektedirler.

5.4.7. Örneklerin Tatbik Edilmesi

Elektroforez işlemi sabah yapılacaksa anot ve katot çözeltilerinde bulunan üre 1 gün önceden hazırlanır..Katot çözeltisinde kullanılacak ürenin çözülmesi 37 °C'yi geçmeyecek şekilde bir su banyosu içinde sağlandı.

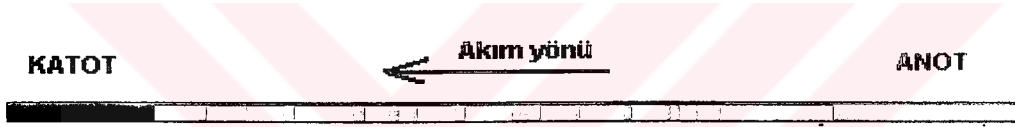
Elektroforez için kullanılan anot çözeltileri prensip olarak asit, katod çözeltileri ise alkali bileşiklerle yapılır. Elektroforez işleminden hemen önce anot çözeltisine fosforik asit katod çözeltisine ise EDA ve gliserol eklendi ve 10 dakika sonikatör ile degaze edildi. Tankın alt kısmına katod çözeltisi eklendi. Daha önce hazırladığımız tüp jellerin 14 cm hizasından µg cinsinden protein karışımı hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde 20-30 µL yüklendi.

Tüpün alt kısmına jel kurumasın diye eklediğimiz su uzaklaştırıldı. Örnek yüklemesinin ardından – 20 °C de sakladığımız kaplama (overlay) çözeltisi oda sıcaklığında çözüldükten sonra hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde protein karışımının üzerine 5-8 µL eklendi. (şekil 13)



Şekil 13: IEF tüpünün paylaşımı

Tüpün içi kapiler olduğundan ($R=1,5$ mm) kaplama çözeltisi üzerine anod çözeltisi, tüpün alt ucuna ise katot çözeltisi Hamilton enjektör yardımıyla eklendi. Tüpler elektroforez tankına yerleştirildi ve üst kısma anot çözeltisi eklenerek tablo 6'da belirtilen protokolde voltaj artan bir şekilde ayarlandı akım yönü şekil 14 de belirtilen yönde yapıldı.



Şekil 14: IEF de akım yönü

5.4.8. Jel Dengelenmesi

Dengeleme çözeltisi IEF de ayrılan jellerin net yüklerini maskeleyiği gibi SDS PAGE basamağında yığılma jelinin gördüğü işi de yapmaktadır. Dengeleme çözeltisi IEF işleminin bitmesine 1 saat kala hazırlandı. Derin dondurucudan çıkarılan 20 mL olacak şekilde aliquatlanmış dengeleme çözeltileri oda sıcaklığında çözüldü ve 20 mL için 0,2 g DTT eklendi.

Dengeleme çözeltisi 10 mL lik petrilere dağıtıldı. Aliquatlanmış her bir dengeleme çözeltisi ile iki jel dengelenebilir. Tüplere anod uçlarından bir enjektör yardımıyla su basılarak 10 mL dengeleme çözeltisi içeren petrilere kırmadan yavaşça boşaltıldı.

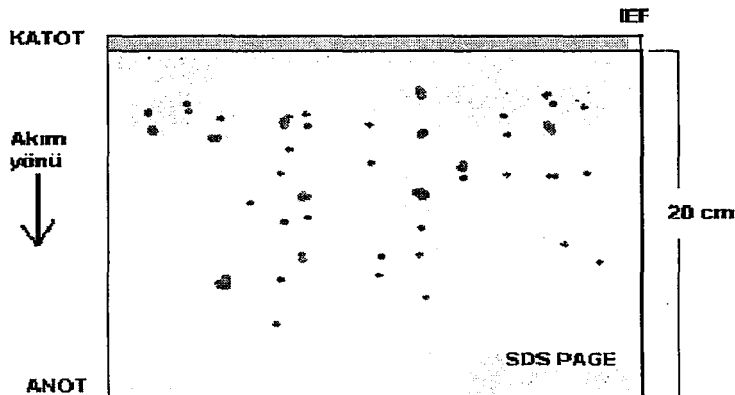
Jellerin anod katod yönü işaretlendi. Dengeleme çözeltisi içinde 10 dakika hafifçe karıştırılarak inkübe edildikten sonra çözelti enjektör yardımıyla uzaklaştırıldı. Eğer jellerin dengeleme işleminin hemen ardından SDS PAGE yapılmayacaksa petri kaplarının içinde -20°C de saklandı.

5.4.9. İkinci Boyut SDS PAGE

2 D PAGE de kullanılan poliakrilamid jeller Laemmli sistemine çok benzer ancak burada slab jel kullanılmaz. IEF jeli doğrudan SDS poliakrilamid jele tatbik edildi. SDS PAGE için hazırlanan 35 mL (16 x 20 cm ebadındaki elektroforez kasetleri için gereken miktar) %15 lik Akrilamid içeren jel çözeltine %1,28 lik APS çözeltisinden 2,33 mL aktarıldı. Hafifçe karıştırıldıktan sonra 15 µL TEMED ilave edilerek jelin polimerleşmesi sağlandı.

Jel çözeltisi kabarcık ve dalgalanma yaratmayacak şekilde elektroforez kasetlerinin içine konuldu. Polimerleşme esnasında kasetin üst tarafından jelin üstünü kaplayacak şekilde bir miktar bidistile su hafifçe damlatılarak jelin üst kısmının düz bir yüz alması sağlandı.

Elektroforez işlemine hazır olan SDS poliakrilamid jellere dengeleme çözeltisinden çıkardığımız IEF jelleri bir spatül yardımıyla altta hava kabarcığı oluşmayacak şekilde yerleştirildi. IEF jeli SDS poliakrilamid jele tatbik edildikten sonra üzerine kaplayacak şekilde bir kaç mL agaroz dökülerek katot tamponuyla teması kesildi. Tablo 7’de belirtilen aşamalarda akım uygulandı (şekil 15). Birinci yönde IEF ile izoelektrik noktalarına ayrılan polipeptidler anyonik bir deterjan olan SDS sayesinde net yükleri maskelenir. Bu şekilde negatif yüklü SDS molekülleri içeren polipeptid serileri oluşur ve polipeptidler elektrik alanında katottan anoda doğru molekül ağırlıklarına göre hareket ederler. Hafif olan moleküller hızlı bir şekilde hareket ederken ağır moleküller jel üzerinde daha yavaş ilerler. (Şekil 15)



Şekil 15: SDS PAGE de akım yönü

5.4.10. Jellerin Değerlendirilmesi ve Referans Jel Seçimi

5.4.10.1 Coomassie Brilliant Blue R-250 ile Boyama

Proteinler ikinci boyutta da yürütüldükten sonra poliakrilamid jeller elektroforez kasetlerinden çıkarıldı ve fiksasyon çözeltisi içine nazikçe yerleştirildi. Hafifçe çözelti içinde çalkalandıktan sonra bir gece SDS fiksasyon çözeltisi içinde bekletildi. Fiksasyonun ardından, jeller parçalanmadan fiksasyon tankından çıkarıldı ve boyama çözeltisine yerleştirildi. Boyanın bütün jelle temas etmesine dikkat edilerek hafifçe karıştırma suretiyle boyama çözeltisinde birkaç saat bekletildi. Proteinlere bağlanmamış jelin içinde bulunan fazla boya çıkarma solusyonu ile muamele edilerek uzaklaştırıldı. Bu amaçla boyanmış jeller parçalanmadan boyası hafifçe boyama tankına süzüldü ve boya çıkarma solusyonunun içine yatırıldı hafifçe çalkalanarak jelin çözeltiyle temas etmesi sağlandı. Spotlar farkedilir hale gelene kadar bu çözelti içinde bekletildi. Jellerin arka planında yer alan boya uzaklaştırıldıktan ve spotlar belirginleştikten sonra jellerdeki spotlar saptandı boyama çözeltisi içinde saklandı.

5.4.11. 2D PAGE Yönteminin Standardizasyonu ve Kalibrasyonu

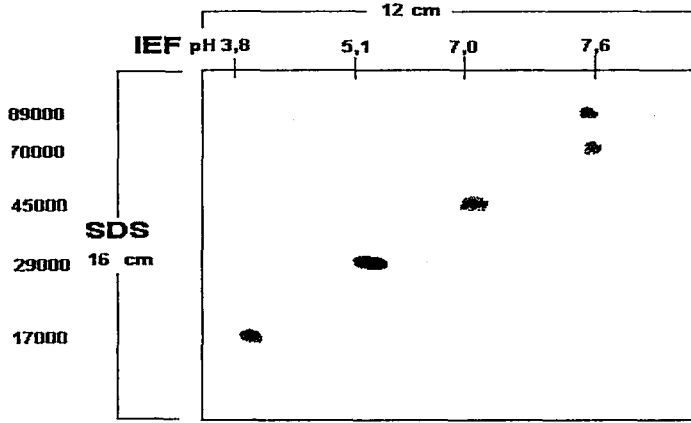
Konvansyonel jel elektrofoezinden farklı olarak 2 D PAGE de standart olarak seçilen proteinlerin molekül ağırlıkları arttıkça izoelektrik noktaları düşmektedir. (tablo 10, şekil 16).

Tablo 10 : 2D PAGE standart proteinleri

Protein	Molekül ağırlığı (MW)	İzoelektrik nokta (pI)
Amiloglukozidaz (<i>Aspergillus Niger</i>)	89000 ; 70000	3,8
Ovalbumin	45000	5,1
Karbonik anhidraz (insan eritrositi)	29000	7,0
Myoglobin (at kalbi)	17000	7,6

Tablo 10'da belirtildiği gibi molekül ağırlığı 89000 – 17000 dalton aralığında pI ları ise 3,8 ile 7,6 arasında olan proteinlerden oluşan bir karışım, önce IEF, ardından SDS PAGE yapıldı. SDS PAGE işleminin

ardından standartların ve örneklerin yürüme mesafesi bir cetvel yardımıyla ölçüldü. Bu değerlerden R_f değerleri hesaplandı.



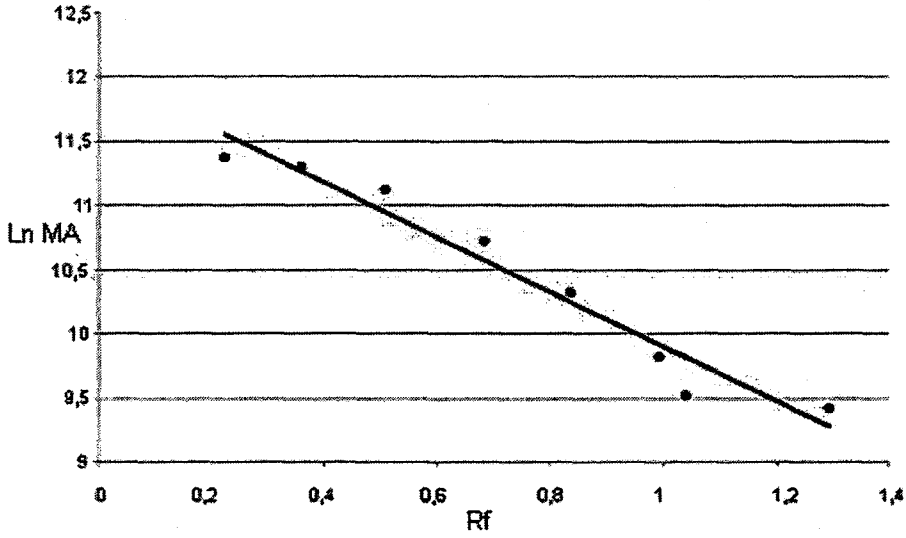
Şekil 16 : 2DE standart protein jel şeması

$$R_F = \frac{\text{Protein spotlarının yürüme mesafesi}}{\text{Standart proteinin yürüme mesafesi}}$$

Standartların R_f değerlerine karşı $\ln$ molekül ağırlığı (MA) grafiği çizilerek oluşturulan standart grafikte örneklerin R_f değerleri yerine konularak molekül ağırlıkları hesaplandı. 2D PAGE standart jelinde yer alan protein standartları çok düşük bir moleküler ağırlık aralığına sahip olduğundan dolayı bu çalışmanın moleküler ağırlıklarının hesaplanması için geniş aralıklı SDS PAGE standart protein kiti kullanıldı . Bu kitle yer alan proteinler ve molekül ağırlıkları tablo 11’de belirtilmiştir.

Tablo 11: SDS PAGE standart proteinleri

Protein	Molekül ağırlığı (dalton)
α Laktoalbumin (inek sütü)	14,200
Tripsin inhibitörü (soya)	20,100
Karbonik Anhidraz (siğir eritrositi)	29,000
Ovalbumin (tavuk yumurtası)	45,000
Albumin (siğir serumu)	66,000
Fosforilaz b (tavşan kası)	97,400
β galaktozidaz (E.coli)	116,000
Miyozin (tavşan kası)	205,000



Şekil 17: SDS Standart proteinlerinin Rf değerleri

5.4.12. Referans Jel Seçimi

İki yönlü poliakrilamid jel elektroforezinin en önemli problemi tekrarlanabilirliktir. Bu nedenle benzer jel görüntüleri elde etmek için çok fazla sayıda tekrar yapıldı. Burada agregasyon öncesi ve sonrası jellerin oluşturduğu her bir gruptan en az 7'şer adet benzer jel elde edildi. Örnek sayısı $n=2$ olmasına rağmen 4 bağımsız grupta 28 birbirine benzer jel elde etmek üzere ellinin üzerinde deneme yapıldı. Bu şekilde optimize edilen jel görüntülerinden en çok spot içeren ve her hangi iki spot arası mesafedeki değişkenlik katsayısına göre en merkezde olan jeller referans jel olarak seçildi.

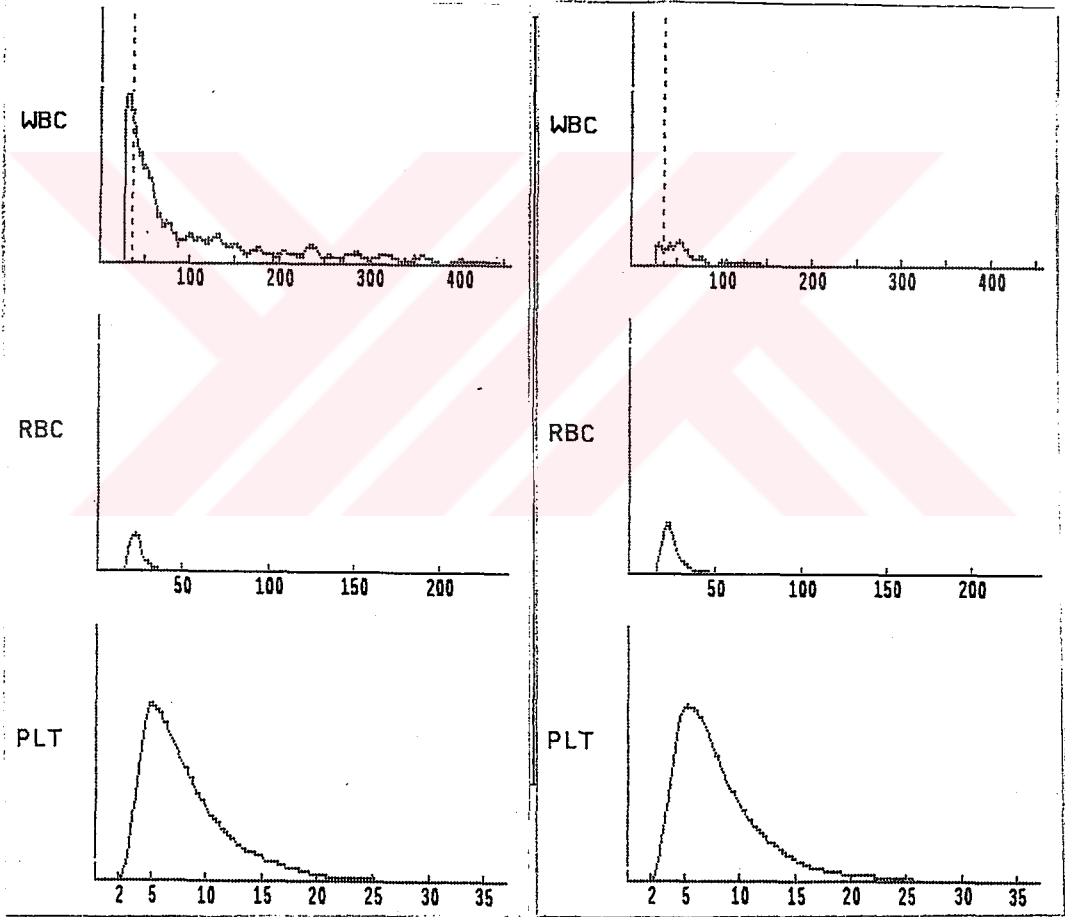
6. BULGULAR

6.1. Eritrosit, lökosit, trombosit değerleri

Haydarpaşa numune eğitim hastanesinden temin edilen Trombosit süspansiyonunda her iki örnekte de eser miktarlarda bulunan lökosit ve eritrositler yıkama işlemiyle tamamen uzaklaştırıldı. tablo 12'de hücre sayıları görülmektedir.

Tablo 12: Trombosit süspansiyonunda kantitatif hücre değerleri

	örnek I	örnek II
Eritrosit	50.000/ μL	1.0000/ μL
Lökosit	4.000/ μL	1.000/ μL
Trombosit	780.000/ μL	765.000/ μL



Şekil 18: Trombosit süspansiyonlarında kalitatif hücre dağılım grafikleri

6.2. Agregasyon öncesi ve sonrası trombosit hücre sayısı ve miktarları

Tablo 13: Agregasyon öncesi ve agregasyon sonrası Trombosit süspansiyonunda trombosit sayısı, trombosit pellet ağırlığı ve protein miktarları

	Agregasyon öncesi		Agregasyon sonrası	
	olgu I	olgu II (*)	olgu I	olgu II (*)
Trombosit sayısı	$0,768 \times 10^9$	$0,733 \times 10^9$	$0,768 \times 10^9$	$0,733 \times 10^9$
Toplam trombosit pellet ağırlığı	0,670 g	0,654 g	0,738 g	0,723 g
Trombosit protein miktarı	2,2 mg	2,04 mg	1,91 mg	1,88 mg

(*) I. olguda agregasyon 160 μ L, II. olguda 140 μ L trombin ile sağlanmıştır. Trombosit süspansiyonu 10 mL'dir.

6.3 Protein Konsantrasyon Sonuçları

Tablo 14: Trombosit proteinlerinin Bradford protein tayin metoduyla yapılan spektrofotometrik değerleri ve protein miktarları

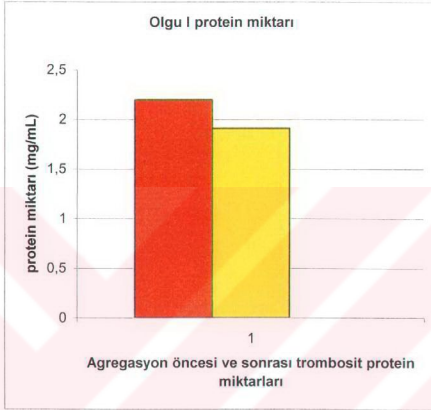
	Agregasyon Öncesi		Agregasyon Sonrası	
	Grup I	Grup II	Grup I	Grup II
Protein miktarı (*) (1 mL'de)	2200 µg	2040 µg	1910 µg	1880 µg

(*) Bradford yöntemiyle protein tayini yapıldı.

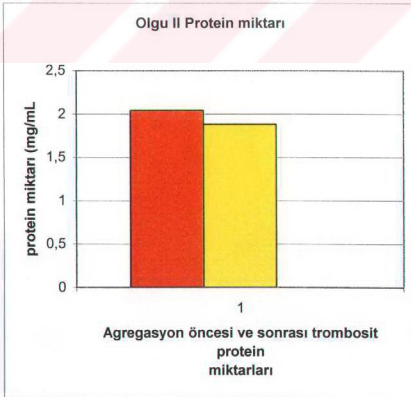
6.4. Agregasyon öncesi ve sonrası trombosit protein miktarları

Trombosit başına düşen protein miktarında Olgu 1 'de agregasyon sonrası %7 olgu 2'de ise %6,5 oranında protein miktarında azalma görüldü.

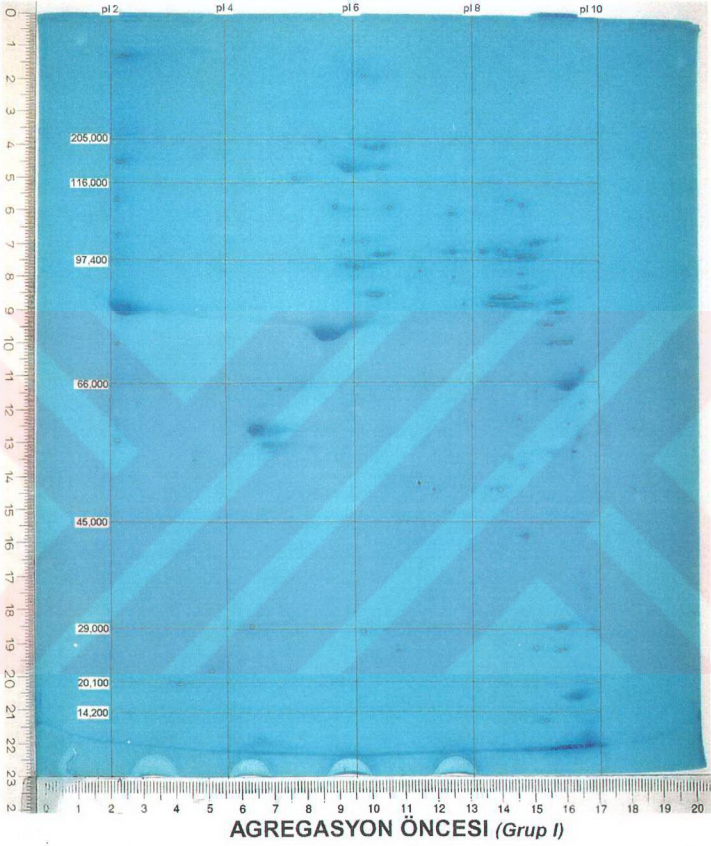
Tablo 15 : Olgu I Protein miktarları



Tablo 16: Olgu II protein miktarları

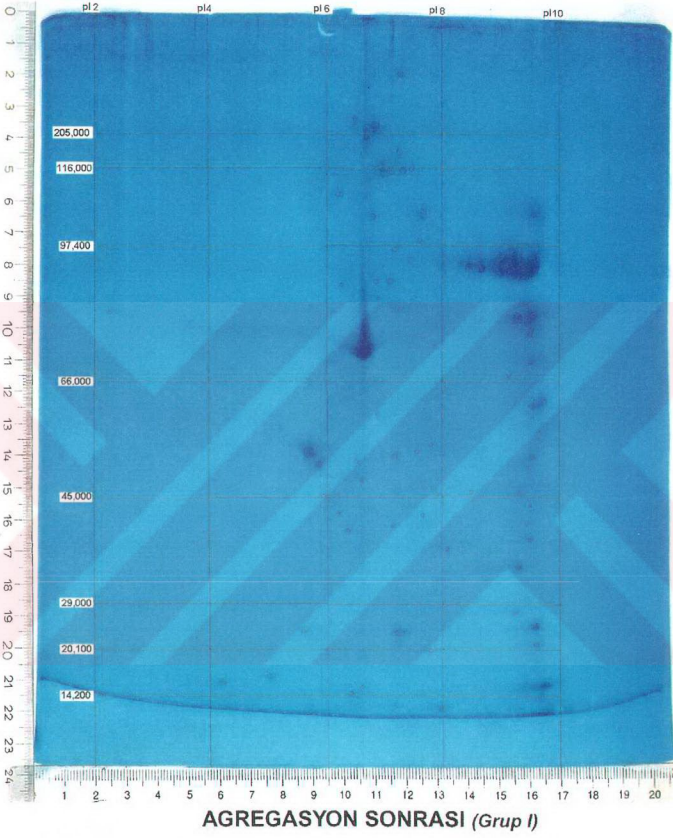


6.5. Grup I Agregasyon öncesi referans jel görüntüsü



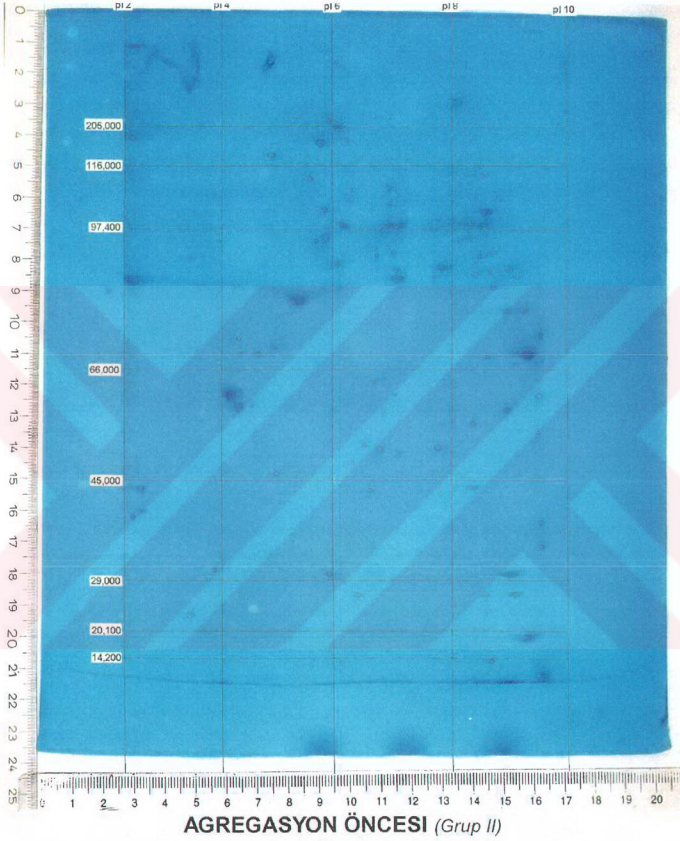
Şekil 19 : Olgu I 'in Agregasyon öncesi 2 D PAGE görüntüleri

6.6. Grup I Agregasyon sonrası referans jel görüntüsü



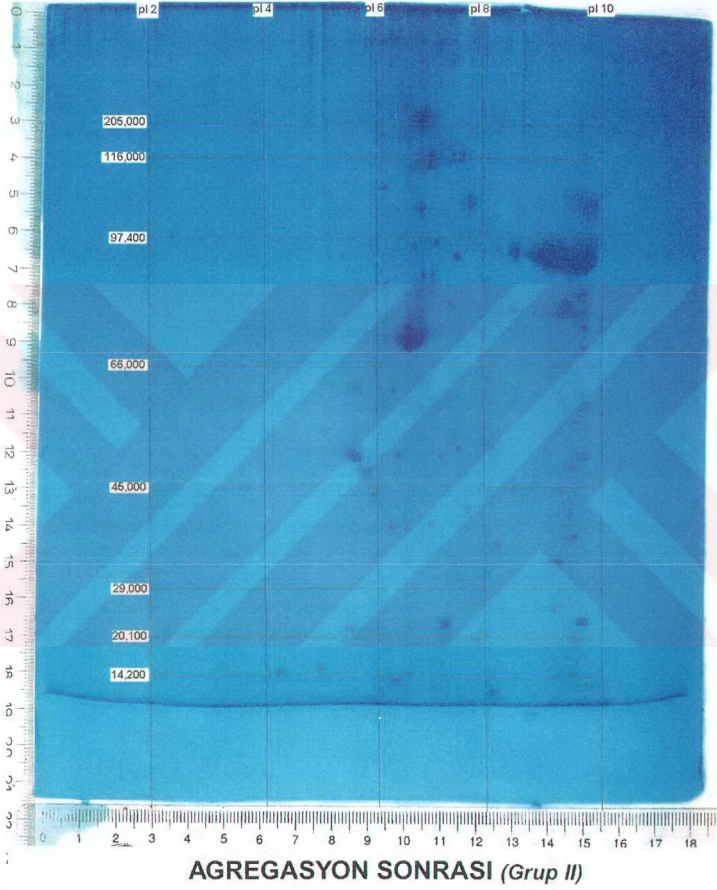
Şekil 20 : Olgu I 'in Agregasyon sonrası 2 D PAGE görüntüleri

6.7. Grup II Agregasyon öncesi referans jel görüntüsü

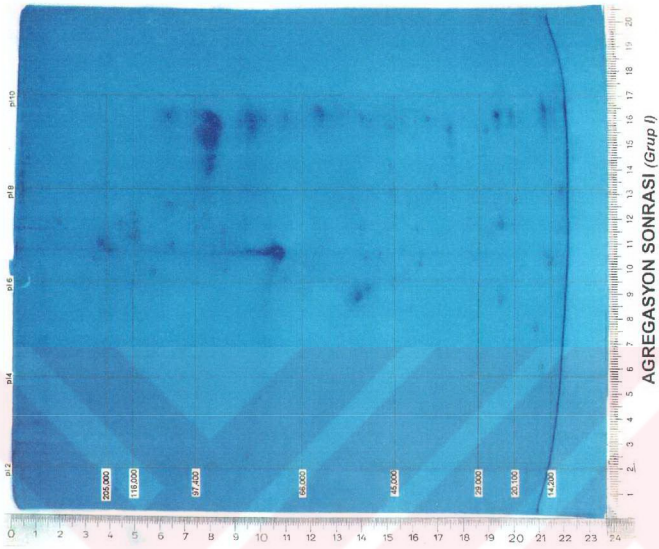
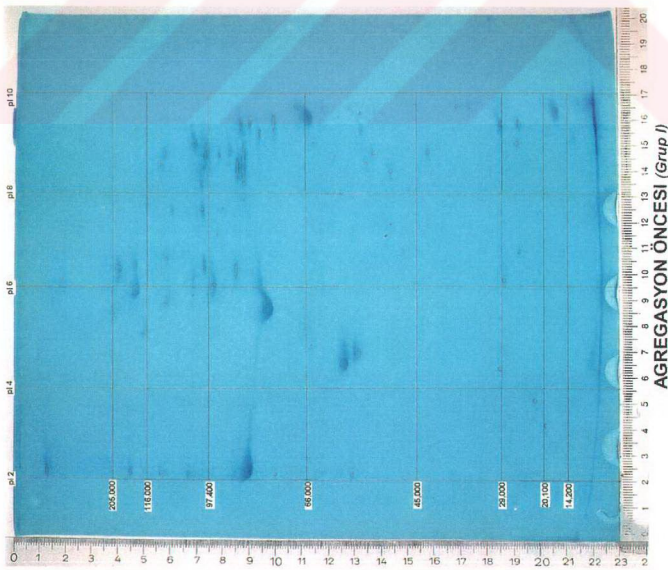


Şekil 21: Olgu II 'nin Agregasyon öncesi 2 D PAGE görüntüleri

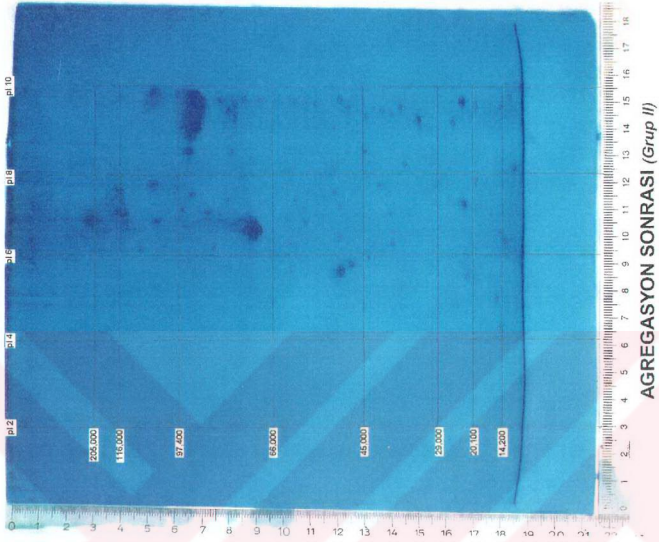
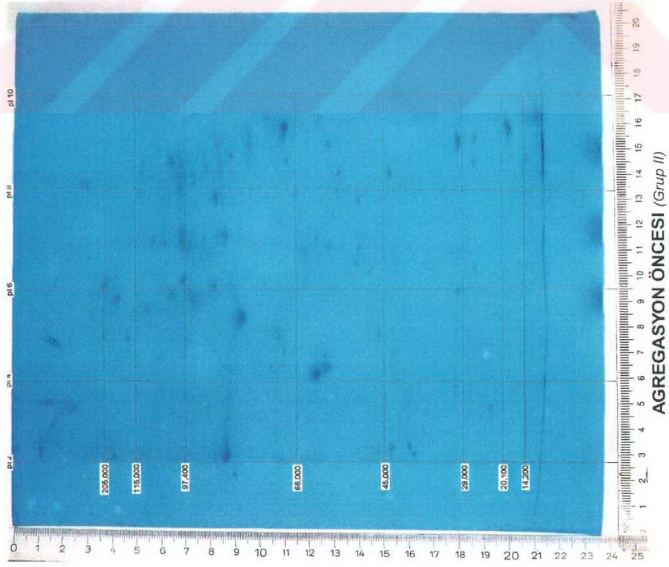
6.8. Grup II Agregasyon sonrası referans jel görüntüsü



Şekil 22: Olgu II 'nin Agregasyon sonrası 2D PAGE görüntüleri



Agregasyon öncesi ve sonrası grup I'in trombosit proteinlerinin karşılaştırmalı jel görüntüleri

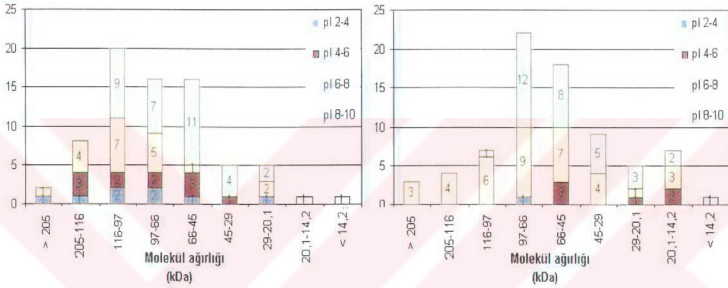


Agregasyon öncesi ve sonrası grup II'in trombosit proteinlerinin karşılaştırmalı jel görüntüleri

6.11. Protein Spot Dağılımlarının Analizi

2D PAGE sonuçları her iki olguda agregasyon öncesi ve sonrası karşılaştırıldığında değişik molekül ağırlıkları ve izoelektrik noktalarına tekabül eden spot sayılarında ve yoğunluklarında farklılıklar görüldü (şekil 23-24).

Tablo 17: Olgu 1 Agregasyon öncesi ve sonrası trombosit protein miktarları ve dağılımları



Olgu 1, pI 2- 4 aralığı: Agregasyon öncesinde molekül ağırlıkları >205-20,1 kDa arasında dağılım gösteren 8 protein spotu belirlendi (şekil 19). Agregasyon sonrasında ise 97- 66 kDa molekül ağırlığı aralığında sadece 1 protein belirlendi.

pI 4- 6 aralığı: Agregasyon öncesinde 205 –29 kDa aralığında dağılım gösteren toplam 11 protein spotu belirlendi (şekil 19). Agregasyon sonrası grupta 66-14,2 kDa aralığında dağılım gösteren toplam 6 spot belirlendi proteinler . Agregasyon öncesinde 66-45 kDa arasında belirlenen 3 protein spotunun agregasyon sonrasında da konumlarını korudukları belirlendi. Agregasyon sonrasında 29-<14,2 kDa arasında 3 yeni protein spotu belirlendi.

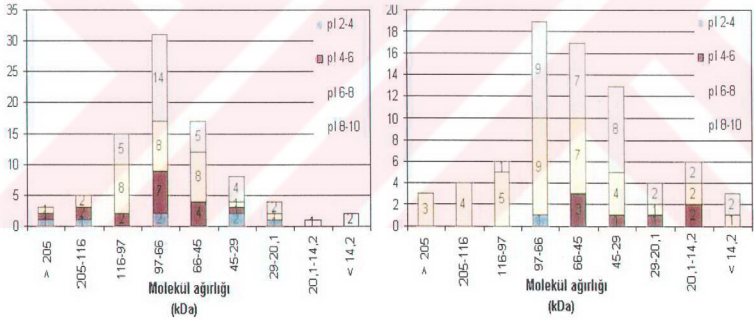
pI 6-8 aralığı: Agregasyon öncesinde 205- 20,1 kDa aralığında dağılım gösteren toplam 20 protein spotu belirlendi (şekil 19). Bu proteinler arasında >205 kDa aralığında 1, 205- 116 kDa aralığında 2, 29-20,1 aralığında ise 2 protein spotunun agregasyon sonrasında da yerlerinin sabit kaldığı tespit edildi. Agregasyon sonrasında >205 ile <14,2 kDa arasında

dağılım gösteren toplam 37 protein spotu belirlendi. Agregasyon sonrasında 20,1 ile <14,2 kDa arasında 3 yeni spot belirlendi.

pI 8-10 aralığı: Agregasyon öncesinde 116-<14,2 kDa arasında dağılım gösteren 35 protein spotu belirlendi (şekil 19).

Agregasyon sonrası 116- 14,2 kDa arasında 31 protein spotu belirlendi. Her iki durumda da molekül ağırlıkları 116- 97 kDa aralığında 1 spot sabit kaldığı agregasyon öncesi görülen diğer 8 spot ise agregasyon sonrasında görülmedi. Molekül ağırlıkları 97- 66 kDa aralığında 4, 66- 45 kDa aralığında 2 protein spotunun yerlerinin sabit kaldığı belirlendi. (Tablo 17,19,20) Bu pI aralığında agregasyon sonrası 97- 66 kDa aralığında yoğun bir protein spotu belirlendi. (Şekil 20,23,24)

Tablo 18 : Olgu 2 Agregasyon öncesi ve sonrası trombosit protein miktarları ve dağılımları



Olgu II, pI 2-4 aralığı: Agregasyon öncesinde molekül ağırlıkları >205-20,1 kDa arasında dağılım gösteren 7 protein spotu belirlendi (şekil 21). Agregasyon sonrasında ise 97- 66 kDa molekül ağırlığı aralığında sadece 1 protein belirlendi.

pI 4- 6 aralığı: Agregasyon öncesinde 205 –29 kDa aralığında dağılım gösteren toplam 17 protein spotu belirlendi (şekil 21).. Agregasyon sonrası grupta 66-14,2 kDa aralığında dağılım gösteren toplam 7 spot belirlendi proteinler. Agregasyon öncesinde >205-66 kDa arasındaki 12 protein spotuna agregasyon sonrasında rastlanmadı. 66-45 kDa arasında 2,

45-29 kDa arasında 1 protein spotunun agregasyon sonrasında da konumlarını korudukları belirlendi. 29-<14,2 kDa arasında 3 yeni protein spotu belirlendi.

pI 6-8 aralığı: Agregasyon öncesinde 205- 20,1 kDa aralığında dağılım gösteren toplam 19 protein spotu belirlendi (şekil 21).

Bu proteinler arasında >205 kDa aralığında 1, 205- 116 kDa aralığında 2, 116-97 kDa aralığında 3, 29-20,1 aralığında ise 2 protein spotunun agregasyon sonrasında da yerlerinin sabit kaldığı tespit edildi. Agregasyon sonrasında >205 ile <14,2 kDa arasında dağılım gösteren toplam 36 protein spotu belirlendi. Agregasyon sonrasında 20,1 ile <14,2 kDa arasında 3 yeni spot belirlendi.

pI 8-10 aralığı: Agregasyon öncesinde 116-<14,2 kDa arasında dağılım gösteren 33 protein spotu belirlendi. Agregasyon sonrasında 116-14,2 kDa arasında 31 protein spotu belirlendi (şekil 21). Her iki durumda da molekül ağırlıkları 116- 97 kDa aralığında 1 protein spotunun sabit kaldığı belirlendi. Agregasyon öncesi görülen diğer 8 spot ise agregasyon sonrasında görülmedi. Molekül ağırlıkları 97- 66 kDa aralığında 3, 66- 45 kDa aralığında 2 protein spotunun yerlerinin sabit kaldığı belirlendi. (Tablo 18,20,21) Bu pI aralığında agregasyon sonrası 97- 66 kDa aralığında yoğun bir protein spotu belirlendi. (Şekil 22-24)

6.12. Grup I Jellerinin karşılaştırmalı spot miktarları

Agregasyon öncesi olgu I de gözle sayılabilen protein spot sayılarının ve izoelektrik noktalarına ve moleküler ağırlığına göre dağılımları tablo 19 da görülmektedir.

Tablo 19 : Agregasyon öncesi olgu I protein spot sayıları

Ma	pI 2-4	pI 4-6	pI 6-8	pI 8-10	Toplam 74+
> 205,000	1		1		2
205,000-116,000	1	3	4		8
116,000-97,000	2	2	7	9	20
97,000-66,000	2	2	5	7+	18+
66,000-45,000	1	3	1	11	16
45,000-29,000		1		4	5
29,000-20,100	1		2	2	5
20,100-14,200				1	1
14,200<				1	1
Toplam 74+	8	11	20	35+	

Agregasyon sonrası olgu I de gözle sayılabilen protein spot sayılarının ve izoelektrik noktalarına ve moleküler ağırlığına göre dağılımları tablo 20 da görülmektedir.

Tablo 20 : Agregasyon sonrası olgu I protein spot sayıları

Ma	pI 2-4	pI 4-6	pI 6-8	pI 8-10	Toplam 75
> 205,000			3		3
205,000-116,000			4		4
116,000-97,000			6	1	7
97,000-66,000	1		9	12	22
66,000-45,000		3	7	8	18
45,000-29,000			4	5	9
29,000-20,100		1	2	3	5
20,100-14,200		2	2	2	7
14,200 <			1		1
Toplam 75	1	6	37	31	

6.11. Grup II jellerinin karşılaştırmalı spot miktarları

Agregasyon öncesi olgu I de gözle sayılabilen protein spot sayılarının ve izoelektrik noktalarına ve moleküler ağırlığına göre dağılımları tablo 19 da görülmektedir.

Tablo 21 : Agregasyon öncesi grup II protein spot sayısı dağılımı

Ma (Dalton)	pI 2-4	pI 4-6	pI 6-8	pI 8-10	Toplam 76
> 205,000	1	1	1		3
205,000-116,000	1	2	2		5
116,000-97,000		2	8	5	15
97,000-66,000	2	7	8	14	31
66,000-45,000		4	8	5	17
45,000-29,000	2	1	1	4	8
29,000-20,100	1		1	2	4
20,100-14,200				1	1
14,200<				2	2
Toplam 76	7	17	19	33	

Agregasyon sonrası olgu II de gözle sayılabilen protein spot sayılarının ve izoelektrik noktalarına ve moleküler ağırlığına göre dağılımları tablo 22 da görülmektedir.

Tablo 22 : Agregasyon sonrası grup II protein spot sayısı dağılımı

Ma	pI 2-4	pI 4-6	pI 6-8	pI 8-10	Toplam 75
> 205,000			3		3
205,000-116,000			4		4
116,000-97,000			5	1	6
97,000-66,000	1		9	9+	19+
66,000-45,000		3	7	7	17
45,000-29,000		1	4	8	13
29,000-20,100		1	1	2	4
20,100-14,200		2	2	2	6
14,200 <			1	2	3
Toplam 75+	1	7	36	31+	

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Trombositler hemostazda, yara iyileşmesinde, vasküler plak oluşumunda önemli bir rol üstlenmektedirler. İnme ve miyokard infarktüsü gibi hastalıkların temelini oluştururlar. Trombosit biyokimyasında çalışmalar büyük bir oranda protein analizlerine dayanmaktadır. Çünkü çekirdeksiz bir hücre olarak trombositler DNA ve RNA bazlı stratejiler için çok zayıf analitik hedeflerdir (6).

Geniş çaplı modern proteom analizleri büyük bir potansiyelle bazal ve aktive olmuş trombositlerde karşılaştırmalı ekspresyon datalarının oluşturulmasına imkan vermektedir. Burada 2D PAGE, diferansiyel görüntü analizleri, kütle spektrometresine dayalı yapı tayini anahtar teknoloji olarak başarılı bir şekilde binlerce proteinin analizine olanak vermektedir (6). Bu çalışmada trombosit proteinlerinin agregasyon öncesi ve sonrasındaki çeşitliliklerini ve dağılımlarını 2 yönlü elektroforez metodunun ayırım gücünü kullanarak incelenmesi amaçlanmıştır. Trombin indüklü agregasyon sonrası sekresyona uğrayan proteinlerin trombositlerde gözlenemeyeceği ve trombositlerdeki protein miktarının daha az olacağı daha önce yapılan çalışmalarda belirtilmiştir.

Trombositlerin izolasyonunu takiben doku homojenizasyonu için hazırlanan trombosit hücre lizatlarındaki başlangıç hücre sayısı aynı olmasına rağmen Agregasyon sonrası hücre lizat ağırlıklarının agregasyon öncesine göre daha fazla olduğu görüldü. Protein miktarları ise agregasyon sonrasında daha düşük bulundu. Bu durum agregasyon esnasında plazma orjinli protein ve non protein komponentlerin hücre lizat ağırlığını arttırdığını düşündürür. Doku homojenizasyonu sırasında hücre dışı ve sekresyona uğramış proteinler uzaklaştırıldığından, trombosit içi protein miktarı agregasyon sonrası grupta agregasyon öncesi grubuna göre daha az bulundu

Örneklerin protein miktarlarının belirlenmesinde Bradford metodu kullanıldı Bradford metodunda, coomassie brilliant blue G 250 proteinlerle stabil bir kompleks oluşturur ve 595 nm λ 'da maksimum absorbands gösterir. mL başına 20 μ g'dan düşük protein hassasiyetinde olan Bradford protein

tain yönteminin Lowry protein tain yönteminden avantajı hızlı ve örnek çözünürleştirme aşamasında kullanılan deterjanlardan etkilenmemesidir (113). Örnek hazırlaması esnasında kullandığımız NP 40 nedeniyle bu yöntem tercih edilmiştir.

Jellerin görüntülenmesi CBB-R250 ile sağlandı. CBB-R250 ile boyama elektroforez sonrasında proteinlerin tain edilmesinde en çok kullanılan boyama tekniklerinden biridir. Duyarlılığı gümüş boyamadan daha az olmasına rağmen pratik bir yöntem olması ve kütle spektrometresi uygulamalarında kolaylıkla proteinden uzaklaştırılabilmesi bu boyama tekiğini avantajlı kılmaktadır.

Proteinlerin karşılaştırmalı jel analiz sonuçlarında da agregasyon sonrasında agregasyon öncesine göre bazı protein spotlarının kaybolduğu gözleendi. eksik olan bu proteinlerin bir kısmı sekrete olan proteinlerdir. Mc Redmond ve arkadaşlarının yaptıkları transkriptomik çalışmalarla trombin indüklü agregasyon sonucunda 82 değişik proteinin sekrete olduğu belirlenmiş ve sekretom adı altında sekresyon proteinlerinin bulunduğu bir data bank kurulmuştur (115). Ne varki transkriptomik çalışmalar hücrenin dinamik prosesleri hakkında bir bilgi vermemektedir. Kullanılan metodların farklılığı ve konvansyonel olmasına rağmen deteksiyon duyarlılığı açısından kullandığımız CBB yönteminin yetersizliği ve dijital görüntüleme sisteminden yoksun olmamız nedeniyle tespit ettiğimiz sekresyona uğrayan protein sayısı literatüre göre daha az bulundu. Çıplak gözle yapılan karşılaştırmalı gözlemlerimizde bir başka durum ise bazı protein spotlarının her iki durumda da miktar ve konum olarak aynı kaldığıdır. Bu proteinler büyük bir olasılıkla agregasyon öncesinde ve sonrasında var olan membran integral proteinler gibi yapısal ve fonksiyonel proteinlerdir.

Agregasyon sonrası gruplarda moleköl ağırlığı 20,1 kDa'dan daha düşük proteinlerin sayısının artışı agregasyonla birlikte protein yıkımında olduğunu gösterdiği gibi bu protein yıkımına bağılı olarak apoptozisinde agregasyonla başladığı fikrini kuvvetlendirmektedir. Karşılaştırmalı jel sonuçlarına bakarak trombin indüklü agregasyon sonrasında moleköl ağırlığı 97 ile 66 kDa arasında değişen ve pI'sı 8-10 arasında bulunan bazı

proteinlerin hücre içinde miktarlarının arttığını gözlenildi (şekil 19-20). Ancak artış gösteren diğer proteinlerin yapısı daha ileri bir çalışma ile öğrenilebileceğinden bu durumu agregasyon prosesi esnasında gerekli olan proteinlerin üretilmesi olarak tanımlayabiliriz.

Önemli bir farklılık olarak agregasyon sonrasında moleköl ağırlığı 205 kDa üzerinde ve pI 6-8 aralığında yeni sentezlenmiş proteinler saptandı karşılaştırmalı tablolarında anlaşılacağı gibi bu değişim pI'ları 6-8 aralığında olmaktadır. Değişim gösteren bu proteinlerin karakterizasyonu için MS ve diferansiyel analiz yöntemlerini içeren çalışmaların yapılması gerekir.



8. KAYNAKLAR

1. Brown A.S., Erusalimsky J.D., Martin J.F.: Platelets and their factors Springer Verlag, Berlin Germany, ss 3-19, 1997.
2. Shapiro A.D.: Platelet function disorders treatment of hemophilia monography series no 19 World federation of hemophilia ,1999.
3. Hoffman R., Edward J., Benz., Sanford J., Shattill S.J.: Hematology Basic Principles And Practice Chuchill Livingstone Inc. 1991.
4. Clemetson K.J.,George J., Nurden, A.T., Phillips, D.R. (Eds.), Platelet Membrane Glycoproteins, Plenum Press, NewYork, USA, 51–85 1985.
5. White J.G.: Anatomy and structural organization of the platelets. In hemostasis and Thrombosis : Basic principles and clinical practice, 3. edt. s.397-413 Philadelphia : J.B. Lippincott Company, 1994.
6. Oneil E., Brock C.J.: Towards complete analysis of the platelet proteome proteomics, 2: 286-305, 2002 .
7. Günel A.: 6 hidroksi dopamine ile Parkinson oluşturulmuş sıçan beyinlerinden Aromatik L amino asit dekarboksilaz enziminin izolasyonu ve enziminin 2 DE ile incelenmesi M.Ü. Fen Bilimlimleri enstitüsü Doktora tezi yıl 2002.
8. Gawaz M.: Blood Platelets : Physiology, pathophysiology, membrabe receptors, antiplatelet principles and theraphy for atherotrombotic disease. George Thieme Verlag press, 2001.
9. Bithell T.C.: The physiology of primary hemostasis. In Wintrobe's Clinical Hematology 9th edn. Lee G.R, Bithell T.C.,Foerster J, Athens J.W, Lukens Jn, eds., philadelphia: Lea & Febinger, 1993.
10. Siess W.: Molecular mechanism of platelet activation. Physiol rev. 69 :50-178, 1989.
11. George J.: Platelets. Lancet; 355:1531-1539, 2000.
12. Hardwig J.H.,Barkalow K., Azim A., İtaliano J.: The elegant platelet : signals contolling actin assembly thromb haemost, 82: 392-398, 1999.
13. Isenberg W.M., Bainton D.F.: Megacaryocyte and platelet structure in Hematology: Basic prenciples and practice 2nd edn.,Hoffmann R.,Benz E.J.,Shatill S.J.,Furie B., Cohen H.J.,Silberstein L.E. (eds) New york Churchill Livingstone, 1995.

14. Holt J.C., Nieiarowsky S.: Biochemistry of α granule proteins. *Semin Hematol*, 22:151-156, 1985.
15. Williams j., Beutler E., Erselev A., Litchman M.: *Hematology*, s.1358-1407, McGraw-Hill Book company, 2001.
16. Gorstein F.,Caroll H.J., Puszkin E.: Electrolyte concentrations potassium flux kinetics and the metabolic dependence of potassium transport in human platelets *J.Lab. Clin. Med.* 70: 938, 1967.
17. Maupin B.: *Blood Platelets in man and animals Vol. 1* s.147-185, Pergamon Press, London, 1969.
18. Karpatkin S.: Heterogenity of Human Platelets. Metabolic and kinetic evidence suggestive of young and old platelets *J. Clin. Invest.* 47,1073, 1969.
19. Maupin B.: *Chimie Des Plaquettes sanguine Chimie analtique et histochimie*, Hemostase 1, 29, 1961.
20. Bettex G.M., Lüscher E.F.: Thrombostenin teh contractile protein from blood platelets and its relation to other contractile proteins, *Advan. Protein Chem.* 20, 1, 1965.
21. Bezkorovainy A.,Rafelson M.E.: Characterisation of some proteins from normal human platelets *J. Lab. Clin. Med.* 64, 212, 1964.
22. Gross R., Gerok W.: Quantitative determination of the amino acids and other ninhydirm positive substances in normal human platelets. *Thromb. Diath. Haemorrh*, 6, 462, 1961.
23. Soupart P.: Free amino acids of blood and urine in the human. *Amino Acid Pools* . Edit by J. T. Holden, Elsevier New York s 220, 1962 in: *Ulutin.O.N The Platelets : Fundamentals and clinical applications* sayfa 37 . kağıt ve basım işleri A.Ş. İstanbul, 1976.
24. Seitz I.E.: Biochemistry of normal and leukemic thrombocytes and bone marrow cells. *Advan. Cancer. Res.* 9, 303, 1965.
25. Booyse F.M., Rafelson M.E.: Invitro incorporation of amino acids into the contractile protein in human blood platelets *Nature (London)* 215: 283, 1967.
26. Booyse F.M.,Rafelson M.E.: Protein Synthesis And Platelet Function. *Diynamics Of Thrombus Formation and Dissolution*. Edit. By Johnson S.A., Guest M.M., Lippincott J.B.; Philadelphia 149-171 1969 In *Ulutin.O.N.: The Platelets : Fundamentals and clinical applications* sayfa 37 kağıt ve basım işleri A.Ş. İstanbul, 1976.

27. Booyse F.M. Rafelson M.E.: Stable mRNA in the sythesis of contractileprotein of human blood platelets. Biochim. Biophys. ACTA 145- 188, 1967.
28. Ulutin.O.N.: The Platelets : Fundamentals and clinical applications sayfa 37 , kağıt ve basım işleri A.Ş. İstanbul, 1976.
29. Nachman R.L.: Platelet Proteins The Circulating Platelet. Editby Johnson S.A. Acedemic Press Newyork 207-224 1971 in Ulutin.O.N The Platelets : Fundamentals and clinical applications sayfa 37 . kağıt ve basım işleri A.Ş. İstanbul, 1976.
30. Steiner M.: Lipid and amino acid synthesis in aggregation platelets. Ann. N.Y. Acad. Sci. 201, 92, 1972.
31. Schneider W.,Doenecke C.,Scheulen F.G.: Sythesis of proteins and nucleic acids in human blood platelets. Erythrocytes, Thrombocytes, Leukocytes s 333-340 edt by Gerlach E., Moser K., Detsch E., Wilmann W., George Thieme, Stuttgart , 1972.
32. Yardımcı T. U., Demir E., Öndikmen Ş., Ulutin O.N.: Histidin transport system in human pletelets. Platelets edt. Ulutin O.N. s.110-117, Excerpta Medica, Amsterdam American Elsevier Publish, New York, 1975.
33. Yardımcı K.T., Demir E., Ulutin O.N.: Active histidine transport in human blood platelets. XXVI. Internat. Congr. Physiol. Sci. Oct. 20-26, New Delhi India,1974.
34. Yardımcı K.T., Öndikmen, Ş., Ulutin O.N.: Histidine transport system in human platelets. Internat. Symp on blood platelets aug. 24-27,1974.
35. Yılmaz T.M.,Deniz G.: Flowcytometry ve tıpta kullanım alanı İstanbul. 1998.
36. Yardımcı K.T.:Trombosit Glikoprotein IIb/IIIa'nın Atherosklerozdaki rolü. Derleme. Ekstrasellüler matriks I. Uluslararası Katılımlı sağlıkta ve hastalıkta ekstraselluler matriks 95-110, İzmir, 1998.
37. Ulutin O.N.: Atherosclerosis and Haemostasis Semin Thromb Hemostasis 12, 156-174, 1986.
38. Ulutin O.N., Yardımcı T.U., Çizmaci G.:Some obsevation on the alteration of hemostatic mechanism in atherosclerosis and its pathogenic relations to the disease. In: Ulutin O.N., Vinazzar H. Eds. Thrombosis and Hemorrhagic Diseases. S 1-4 Gözlem Printing and Publishing Co. İstanbul, 1986.

39. Ulutin O.N.: Haemostasis and Atherosclerosis. In : Poller L. Ed. Recent Advances in Blood Coagulation s 53-78, New York Churchill Livingstone, 1991.
40. Ruggeri Z.M.: New insight into mechanism of platelet adhesion and aggregation. Semin. Hematol 31, 229-239, 1994.
41. Rao A.K.: Congenital disorders of platelet function: disorders of signal transduction and secretion Am.J.Med.Sci 316, no 2 69-76, 1998.
42. Ranvier L.A.: Du mode de formation de la fibrine dans le sang extrait des vaisseaux. C.R. Soc. Biol. 5, 46, 1873 In Ulutin.O.N The Platelets : Fundamentals and clinical applications sayfa 37 . kağıt ve basım işleri A.Ş. İstanbul, 1976.
43. Vulpain E.F.R.: Das corpuscules incolores et des leucocytes du sang C.R.Soc.Biol 5,49,1873 In: Ulutin.O.N The Platelets : Fundamentals and clinical applications sayfa 37 . kağıt ve basım işleri A.Ş. İstanbul, 1976.
44. Murray R.K., Granner D.K.: Harper's Biochemistry 22th edition Appleton & Lange medical series, 1993.
45. Moroi M., Jung M.S.: Integrin mediated Platelet adhesion. Frontier in bioscience 3, 719-728, july 23, 1998.
46. Offermanns S.: The role of heterotrimeric G proteins in platelet activation, J.Biol.Chem 381: 389-396, 2000.
47. Smith E.L., Hill R.L.: Principles of biochemistry mammalian biochemistry 7th edt. New york, Mc Graw-hill Book Company 32-3, 1983.
48. Scheerder I., Huang Y., Schatch E.: New concept for drug eluting stents. 6th Local Drug delivery Meeting and cardiovascular course on radiation and molecular strategies, Cenevre İsviçre, 2000.
49. Hawiger J.: Mechanism involved in platelet vessel wall interantion. Thromb Hemostasis (Stuttgart) 74 ;369-372 1995.
50. Charo I.F., Kieffer N., Phillips D.R.: Platelet membrane glycoproteins. In: Colman R.W., Hirsh J., Marden V.J., Salzman E.W. eds Hemostasis and thrombosis basic principles and clinical practice 3th ed. 489-507 Philadelphia Lippincott Co, 1994.
51. Clemetson K.J.: Platelet activation: Signal transduction via membrane receptors. Thrombhaemostas (Stuttgart), 74 ; 111-116, 1995.

52. Hawiger J.: Adhesive interactions of blood cells and the vascular wall. In: Colman R.W., Hirsh J., Marden V.J., Salzman E.W. eds Hemostasis and thrombosis basic principles and clinical practice 3th ed. 489-507, Philadelphia Lippincott Co, 1994.
53. Bachelot C., Rendu F., Gulino D.: Anti GpIIb/IIIa antibodies powerfull goals to investigate function and regulation of an integrin. Semin. Thromb. Hemostasis 21; 23-34 ,1995.
54. Richter G.M., Palmaz J.C., Noeldge G.: Blood Flow and thrombus formation determine the development of stent neointima J.Long Term. Eff.Med. Implants. 10; (1-2): 69-77, 2000.
55. Heidenreich R., Eisman R., Surrey S., Delgrassa K., Bennett J.S., Schwartz E., Ponez M.: Organisation of the gene for platelet glycoprotein IIb. Biochem 29: 1232-1244, 1990.
56. Zimrin A.B., Gidwitz S., Lord S., Schwartz E., Bennett J.S., White G.C. Ponez M.: The genomic organisation of platelet glycoprotein IIIa . J. Biol. Chem. 265:8590-8595, 1990.
57. Phillips D.R., Charo I.F., Parise L.V. Fitzgerald L.A.: The platlet membrane lib-IIIa complex. Blood 71: 831-841 1988.
58. George J.N., Nurten A.T.: Inherited disorders of platlet membrane : Glanzmann thrombastenia, Bernard Soulier syndrome and other disorders and in: Colman R.W., Hirsch J., Marden V.J.,Salzman E.W. eds. Hemostasis and thrombosis, Basic principles and clinical practice 3th ed. Philadelphia Lippincott Co., 652-672 1994.
59. Handin R.I.: Blood Platelets and the Vessel Wall. Haemostasis 36: 1457-1469, 2003.
60. Flier J.S., Underhill L.H.: Molecular and cellular biology of blood coagularion. N Engl J Med 326:800, 1992,
61. Brass L.F., Manning D.R., Cichowski K., Abrams C.S.: Signaling through G proteins in platelets : to the integrins and beyond. Thrombosis and haemostasis 78: 581-589, 1997.
62. Born G.V.R.: Aggregation of Blood platelets by Adenosine and its reversal Nature (London) 194,927,1962 in: Ulutin.O.N.: The Platelets : Fundamentals and clinical applications sayfa 37 . kağıt ve basım işleri A.Ş. İstanbul, 1976.
63. Gaarder A., Jansen J.;Laland S., Hellen A., Owren P.A.: ADP in red cels as a factor in the adherensiveness of human blood platelets Nature (London) 192: 531 1961 in: Ulutin.O.N.: The Platelets :

Fundamentals and clinical applications sayfa 37 . kağıt ve basım işleri
A.Ş. İstanbul 1976.

64. Mitchell J.R.A., Sharp A.A.: Platelet clumping in vitro brit, J. Haemat 10: 78, 1964.
65. Shermer R.W., Mason R.G., Wagner R.H., Brinkhous K.M.: Studies thrombin induced platelet agglutination J. Exp. Med. 114; 905, 1961.
66. Haslam R.J.: Role of ADP in the aggregation of human blood platelets by thrombin and by fatty acids Nature (London) 202, 765, 1964.
67. Mylly G.: Aggregation of human blood platelets by immun complexes in the sedimentation pattern test Scand. J. Haemat Suppl. 19-25, 1973.
68. Balkuv Ş., Ulutin O.N.: Trombosit aggregasyon defektlerini meydana çıkarmak için yeni basit bir metot. Tıp Fak. Mec. (İstanbul) 30: 431, 1967.
69. Hovig T.: Aggregation of rabbit blood platelets produced in vitro by saline "extract" of tendons. Thromb. Diath. Haemorrh. 9; 248, 1963.
70. Virmani R.: Experimental Data :Critical Perspective on Drug Eluting Stents. 7th Drug Delivery Meeting and Cardiovascular Course On Radiation And Molecular Strategies, Cenevre İsviçre, 2001.
71. Nurden A.T.:Inherited abnormalities of platelets Thromb Haemost 82:468-480, 1999.
72. Savage B. Ruggeri Z.M.: Selective recognition of adhesive sites in surface bound fibrinogen by GpIIb/IIIa on non activated platelets. J. Biol. Chem 266, 11227-11233, 1991.
73. Savage B., Shattil S.J., Ruggeri Z.M.: Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for GpIIb/IIIa mediated by fibrinogen and GpIb von Willebrand factor. J.Biol. Chem. 267, 11300-11306, 1992.
74. Gartner T.K., Amrani D.L., Derrick J.M., Kirschbaum N.E., Matsueda G.R., Taylor D.B.: Chracterisation of adhesion of resting and stimulated platelets to fibrinogen and its fragments Thromb Res. 71, 47-60, 1993.
75. Grand R.J.A., Turnell A.S., Grabham P. W.: Cellular consequences of thrombin-receptor activation Biochem. J. 313, 353-368, 1996.
76. Aronson, D. L., Ball, A. P., Franza, R. B., Hugli, T. E. and Fenton, J. W.: Thromb. Res. 20, 239-253 1980 in : Furlan M.: Sticky and

promiscuous plasma proteins maintain the equilibrium between bleeding and thrombosis. *Swiss Med. WKLY* 132:181-189, 2002.

77. Ganong F.W.: *Tıbbi fizyoloji* 19. Baskı s 572 Barış Kitapevi/ Appleton ve Lange İstanbul 1999
78. Coughlin S.R.: How the protease thrombin talks to cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11023-11027, 1999.
79. Coughlin S.R.: Thrombin signaling and protease activated receptors. *Nature* 407:258-264, 2000.
80. Connolly A.J., Ishihara H.: Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. *Nature*; 381:516. 1996.
81. Sambrano G.R., Weiss E.J, Zheng Y.W.: Role of thrombin signaling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature*; 413:74, 2001.
82. Vu T-KH, Hung D.T.: Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64: 1057, 1991.
83. Vu T-KH, Wheaton V.I.: Domains defining thrombin-receptor interaction. *Nature* 353:674, 1991.
84. Bogatcheva N.V., Garcia J.G.N., Verin A.D.: Molecular Mechanisms of Thrombin Induced Endothelial Cell Permeability. *Biochemistry Vol. 67*, No. 1 75-84, 2002.
85. Jamieson G.A.: Pathophysiology of platelet thrombin receptors 78: 242-246, 1997.
86. Siess W.: Platelet receptors; the thrombin receptor In: *Platelet and Their Factors* . Handbook of experimental pharmacology. Von Bruchhausen F., Walter U. eds.,s 101-116 Springer verlag, Heidelberg, 1997.
87. Fruman D.A., Meyers R.E., Cantley L.C.: Phosphoinositide kinases. *Annu. Rev. Biochem* 67: 481-507, 1998.
88. Parise L.V.: Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ signaling in platelet adhesion and aggregation. *Current Opinion in Cell Biology* 11:597-601, 1999.
89. Qi W, L.E., Vilaire G., Bennett J.S.: Regulation of $\text{IIb } 3$ function in a human B lymphocytes. *J Biol Chem*, 273:15271-15278, 1998.

90. Banfic H., Downes C.P., Rittenhouse S.E.: Biphasic activation of PKB (Akt) in platelets. Evidence for stimulation both by phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate, produced via a novel pathway, and by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*, 273:11630-11637. 1998.
91. Farrell D.H., Thiagarajan P., Chung D.W., Davie E.W.: Role of fibrinogen α and γ chain sites in platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10729-10732. 1992.
92. Furlan M.: Sticky and promiscuous plasma proteins maintain the equilibrium between bleeding and thrombosis. *Swiss Med. WKLY* 132:181-189, 2002.
93. Schwarz M.A., Schaller M.D., Ginsberg M.H.: Integrins emerging paradigms of signal transduction. *Annual Rev. Cell Dev. Bio.* : 11 ; 549-599, 1995.
94. Bennett J.S., Shattil S.J., Power J.W., Gardner T.K.: Interaction of fibrinogen with its platelet receptor. *J. Biol Chem.* 263; 12948-12953 , 1988.
95. Esmon C.: Regulation of blood coagulation *Biochim biophys. ACTA* 1477: 349-360, 2000.
96. Bajzar L., Manuel R., Neshim M.E.: Purification and characterisation of TAFI a Thrombin activable fibrinolysis inhibitor. *J. Biol Chem.* 270: 14477-14484, 1995.
97. Overduin M., Dbeert T.: The Clot Thickens : How Thrombin Modulates Blood Clotting. *Nature Struct. Biol.* 7: 267-269, 2000.
98. Rodgers R.P.C., Levin J.: A critical reappraisal of bleeding time. *Semin. Thromb. Haemostasis* 16; 1, 1991.
99. Kinlough R.R.L., Packham M.A., Mustard J.F.: Platelet aggregation. In Harker L.A., Zimmerman T.S., eds. *Measurement of platelet Function*. S 64 New York , Edinburg Churchill Livingstone, 1983.
100. George J.N., Shattil S.J.: The clinic importance of acquired abnormalities of platelet function. *N Engl. J. Med.* 324: 27, 1991.
101. Kaplan K.L., Owen J.: Radioimmunoassays of platelet alpha granule proteins. In: Harker L.A., Zimmerman T.S. eds: *Measurement of platelet function* s 115, Edinburg Churchill Livingstone 1983.

102. Levine S.P.: Secreted platelet proteins as markers for pathological disorders. In: Phillips D.R., Shumann M.A. eds. : Biochemistry of platelet. S 378 .Academic Press, Orlando F.L. 1986.
103. Chong B.H., Murray B., Berndt M.C.: Plasma P-Selectin is increased Thrombotic consumptive platelet disorder. Blood 83: 1535-1539, 1994.
104. Wu K.K., Hoak J.C.: Increased Platelet aggregates in patient with transient ischemic attacks, Stroke, 6; 521, 1975.
105. Telefoncu A., Salnikow J., Zihnioğlu F.: Proteom analizi metod ve uygulamaları biyokimya lisans üstü yaz okulu 4-11 ağustos Çanakkale, 2002.
106. Guttermacher A.E., Collins S.F.: Genomic medicine a premier. N. Engl. J. Med. Vol: 347 no :19, 2002.
107. Shao- En O., Pandey A.: An evaluation of the use of two dimensional gel electrophoresis in proteomics. Biomolecular engineering 18 : 195-205, 2001.
108. Smithies O., Poulik M.D.: Two dimensional electrophoresis of serum proteins. Nature, 177; 1033, 1956.
109. Stegman H., Francsen H., Macko V.: Potato proteins: genetic and physiological changes evaluated by one and two dimensional PAA-gel techniques Z. Naturforsch 28c, 722-732, 1973.
110. O'Farrell P.H.: High resolution two dimensional electrophoresis of proteins, J. Biol. Chem, 250: 4007-40021, 1975.
111. Hames B.D., Rickwood D.: Gel Electrophoresis of proteins *a practical approach* second edition pp 149-164 IRL oxford university press USA, 1996.
112. Rabilloud T.: Proteome Research : Two dimensional gel electrophoresis and identification methods Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2000.
113. Simon R.: Protein purification techniques II. edition s.38 , Oxford University Press, 2001.
114. Lockhart D.J., Dong H., Byrne M.C., Folloettie M.T., Gallo M.V.: Expression monitoring by hybridization to high density oligonucleotide arrays. Nat. Biotechnol. 14: 1675-1680, 1996.

115. Keith L.: Proteome research new frontiers in functional genomics. Ed: Wilkins M.R., Williams K.L. Appel R.D., Hochstrasser D.F. principles and practice s. 2-11 Springer Verlag Heidelberg, 1997.
116. Hanash, S. M., Neel, J.V., Baier, L.J., Rosenblum, B.B.: Am. J. Hum. Genet. 38, 352–360 1986, in: Oneil E. , Brock CJ .: Towards complete analysis of the platelet proteome proteomics, 2; 286-305. 2002.
117. Gevaert, K., Eggermont L., Demol H., Vanderkerckhove, J.: J. Biotechnol. 78, 259–269, 2000, Oneil E. , Brock C.J.: Towards complete analysis of the platelet proteome proteomics. 2; 286-305. 2002.
118. J.P.Mc Redmond, S.D. Park.; Integration of proteomics and genomics in platelet s: a profile of platelet proteins and platelet specific genes. M.C.P. 2003.



ÖZGEÇMİŞ

16 12 1974 yılında İstanbulda doğdu. İlkokulu Küçükalyı Merkez İlkokulu'nda, orta okulu Rezzan Has Lisesi'nde, liseyi Kadir Has Lisesi'nde bitirdi. 1994 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümüne girdi ve 1999 yılında mezun oldu. 2002 ekim ayında Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans öğrencisi Nadir GÜL'ün, çalışması jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak uygun görülmüştür.

İMZA

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Turay YARDIMCI
Üniversitesi : Marmara

.....

Üye : Prof.Dr.Fikriye URAS
Üniversitesi : Marmara

.....

Üye : Doç.Dr.Ayşe OGAN
Üniversitesi : Marmara

.....

ONAY

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 24 / 8 / 2004 tarih ve 07 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr.Sevim ROLLAS Y.
Müdür V.

Doç.Dr. Gül den Z. Omurtag

.....