

Sağlıklı genç-erişkin erkeklerde trombosit fonksiyonlarının ve epinefrine cevapsızlığın incelenmesi

Engin Sağdılek (*), Ahmet Korkmaz (**), Şükrü Öter (**), Ferit Avcu (***), Turgut Topal (**), Mehmet Özler (**), Bülent Uysal (**), Oral Nevruz (***), Cengiz Beyan (***), Kasım Özlük (*)

Özet

Trombositlerin agregometrede epinefrine karşı cevapsızlık göstermeleri ve ADP'ye karşı da azalmış yanıt vermeleri farklı topluluklarda yapılmış çalışmalarda %16-40 sıklığında bulunmuştur. Bu çalışmada sağlıklı genç-erişkin erkeklerde trombosit fonksiyonlarının incelenmesi ve epinefrine cevapsızlığın sıklığının araştırılması amaçlandı. Ondokuz-42 yaş arası, sağlıklı 52 erkek gönüllü değerlendirildi. Denekler optik agregometrede 100 µM epinefrine karşı gösterdikleri maksimum agregasyon cevaplarına göre cevapsız, yarı cevaplı ve normal olarak üç gruba ayrıldı. Yüzde 7.7 oranında cevapsız, %5.8 oranında yarı cevaplı bulundu. Epinefrine karşı agregasyon cevabının bozulmasının hem ADP hem de kollajene karşı agregasyonu azalttığı, araşidonik asid ve trombin agregasyonları ile ATP sekresyonunu etkilemediği gözlemlendi. Sonuçta her 3-6 kişiden birinde epinefrine cevabın bozuk olabileceği, bu bozukluğun diğer uyarıcı ajanları da etki-

leyebileceği, kanama yatkınlığının gözlenmemesi ve aspirin kullanımıyla benzeşmesinden yola çıkarak tromboza karşı doğal bir koruma olabileceği düşünüldü.

Anahtar kelimeler: Agregometre, epinefrin, trombosit

Summary

Evaluation of platelet function and lack of response to epinephrine in healthy young-adult men

The rate of a decreased response to ADP and a lack of response to epinephrine by platelets on the optical aggregometer is reported to be between 16% to 40% in studies on various populations. We aimed to evaluate the platelet functions and to determine the rate of lack of response to epinephrine in healthy young-adult men. A total of 52 healthy volunteers aged between 19 to 42 were evaluated. The subjects were classified into three groups as nonresponder, semiresponder and normal according to their response to 100 µM epinephrine on the optical aggregometer. The nonresponder rate was 7.7%, and the semiresponder rate was 5.8%. A decreased response to epinephrine was associated with both decreased maximum aggregation of ADP and collagen, and did not affect the aggregation of arachidonic acid and thrombin, and ATP release. In conclusion, impaired response to epinephrine may be seen in one in every 3-6 persons, and this impaired response may also affect the other stimulating agents. These properties may be protective against thrombosis since there is no bleeding tendency and have similarity to aspirin usage.

Key words: Aggregometer, epinephrine, platelet

Giriş

Trombositler hemostazda ve trombozda oldukça önemli bir yere sahiptir. Trombositlerin vasküler hasar bölgesine toplanmasında endotelin hasarlanması ile ortaya çıkan subendotelial doku, von Willebrand faktör (vWF) ve trombosit yüzeyindeki glikoprotein (GP) Ib-IX-V reseptörleri temel rol oynar. Trombositler kollajen (Col), ADP, epinefrin (Epi), trombin (Tro), tromboksan A₂ (TxA₂), trombosit aktive edici faktör (PAF), serotonin gibi uyarıcı ajanların etkisiyle şekil değiştirir, granül içeriklerini ve sentezledikleri TxA₂ ile PAF gibi maddeleri sekrete eder ve agregat oluşturur. Trombosit agregasyonu hücre membranındaki fibrinojen reseptörlerinin (GP IIb/IIIa) aktivasyonu ile gerçekleşen fibrinojen-bağımlı bir interselüler adezyondur (1,2).

Uyarıcı ajanların trombositler üzerindeki reseptörleri, çoğunlukla G protein bağlantılı reseptör ailesindedir. Reseptörlerin özgülüne bağlı olarak G proteinlerin farklı alt tipleri uyarılır. Gq proteinin uyarılması ile birlikte fosfolipaz C (PLC)'nin aktive olması, birbirinden bağımsız ama birbiriyle sinerjik etkileşen farklı iki yolağı aktive eder.

* Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD

** GATA Fizyoloji AD

***GATA Hematoloji BD

Bu çalışma, 6. Ulusal Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji Kongresi'nde (5-7 Mayıs 2006, Crown Plaza Otel, İzmir) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Ayrı basım isteği: Dr. Engin Sağdılek, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD, Görükle-16059, Antalya

E-mail: esagdılek@hotmail.com

Makalenin geliş tarihi: 27.06.2006

Kabul tarihi: 11.09.2006

Ca⁺⁺ bağımlı ve protein kinaz C (PKC) bağımlı bu yollar fibrinojen reseptör aktivasyonunun temel uyarıcılarıdır (3). Gi proteininin adenilat siklazı (AC) inhibe etmesi ve trombosit içi azalan cAMP seviyeleri tek başına fibrinojen reseptör aktivasyonuna yetememekle birlikte, Ca⁺⁺ ve PKC bağımlı yolları potansiyalize eder (4,5). Trombositlerin tam olarak aktive olabilmeleri için Gi ve Gq proteinlerinin birlikte uyarılmaları gerekir (6-9).

Epi, trombosit agregasyonunu indükleyen zayıf uyarıcı ajanlardan biridir. Aynı zamanda diğer uyarıcı ajanların agregan etkilerini potansiyalize ettiği de gösterilmiştir. Primer agregasyonu takiben gerçekleşen sekresyona bağımlı sekonder agregasyon, Epi'nin optik agregometredeki tipik bifazik agregasyon eğrisini verir (1,10). Epi trombosit yüzeyindeki α_{2A} adrenerjik reseptörleri üzerinden Gi proteininin aktif alt birimi olan Gi z proteini aktive eder ve AC inhibe olur. cAMP'nin azalması trombosit aktivasyonu için yeterli olmasa bile diğer uyarıcı ajanların düşük konsantrasyonlarda agregasyon oluşturmalarını sağlar. Epi'nin AC'yi inhibe etmesinin yanı sıra tam olarak bilinmeyen yollar üzerinden PLC'yi aktive ettiği, TxA₂ sentezini artırdığı ve granül sekresyonuna neden olduğu da gösterilmiştir (4,11,12).

Trombosit agregasyonunun değerlendirildiği agregometrede Epi'ye karşı trombositlerin agregasyon oluşturmamaları "Epinefrin cevapsızlığı" olarak bilinir. Myeloproliferatif hastalıkların bir bulgusu olabileceği gibi (13-16), sağlıklı insanlarda yapılan trombosit agregasyon çalışmalarında %16-40 gibi yüksek oranlarda gözlenen Epi cevapsızlığının AC/cAMP yolağından bağımsız, hücre içi aktivasyon mekanizmalarındaki bir bozukluktan kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Epi'ye cevapsız olanlar-

da ADP'ye karşı da agregasyon yanıtının azaldığı, Col'e karşı olan agregasyonun lag zamanının da uzadığı saptanmıştır. Epi cevapsızlığı olanlarda kanama hikâyesi veya kanamaya yatkınlık bildirilmemiştir. Aspirin tedavisinin trombositler üzerindeki etkisinin Epi cevapsızlığı ile benzeştiğini gösteren çalışmalar da vardır (17-22).

Bizim bu çalışmadaki amacımız; herhangi bir kanamalı durum veya hastalığı bulunmayan, sağlıklı, genç-erişkin erkeklerde optik agregometre ile trombosit fonksiyonlarını değerlendirmek, Epi cevapsızlığının sıklığını saptamak ve Epi cevapsızlığının diğer uyarıcı ajanların agregasyonu ve yoğun granül sekresyonu ile ilişkisini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem

Denekler ve kan örneklerinin toplanması: Çalışma 19-42 yaş arası, sağlıklı ve gönüllü 52 erkek denek üzerinde yapıldı. Deneklerin tümü GATA öğretim üye ve yardımcıları ile öğrencileri olup, çalışmamız "Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı İlaç Araştırmaları Yerel Etik Kurulu" protokollerine uygun olarak yürütüldü. Deneklerin kişisel ve aile hikâyelerinde herhangi bir kanamalı durum veya hastalık olmamasına, sigara içmemelerine, son 10 gün içinde trombositleri etkilediği bilinen herhangi bir ilaç ve alkol almamış olmalarına dikkat edildi.

Bilgilendirildikten sonra gönüllü olarak çalışmaya katılan deneklerin kan örnekleri sabah 08.00-08.30 arası açken, üst kola hafif venöz staz uygulanarak antekübital venden alındı. Sodyum sitratlı (0.129 M) tübe alınan 15 ml kan örneği agregometre çalışmalarında, EDTA'lı tübe alınan 5 ml kan örneği hemogram tayininde kullanıldı.

Optik agregometre: Optik agregometreler modifiye edilmiş spektrofotometrik aletlerdir. Trombosit-

zengin plazmanın belirli bir hızda karıştırılırken uyarıcı ajanın eklenip trombositlerin agregatlar oluşturması ile ışık geçirgenliğindeki değişikliğin ölçülmesi prensibi ile çalışır (1,10,23).

Sodyum sitratlı tüplere alınan kan örnekleri 150 G'de 10 dk santrifüj edilerek trombositten zengin plazma (PRP: Platelet Rich Plazma), 2000 G'de 15 dk daha santrifüj edilerek trombositten fakir plazma (PPP: Platelet Poor Plazma) elde edildi. PRP'nin trombosit içeriği Cell-Dyn 4000 (Abbot) hemogram cihazında değerlendirildi. PRP'nin trombosit sayısının 250.000-350.000/ μ l olmasına dikkat edildi. >350.000/ μ l değerler otolog PPP ile seyreltilti. PRP ve PPP, agregometrenin kuvvetlerinde 37 °C'de inkübe edildi.

Agregasyon testleri Chrono-Log (Chrono-log Corporation) agregometre cihazında yapıldı. Uyarıcı ajanlar olarak Epi, ADP, Col, araşidonik asid (AA), Tro ve granül sekresyonunu değerlendirmek için ATP Standart ve Chrono-Lume (Chrono-Log Corporation) kullanıldı. Test son konsantrasyonları Epi 100 μ M, ADP 10 μ M, Col 6 g/ml, AA 1 μ M, Tro 1 U/ml olarak ayarlandı. Standart ATP düzeyimiz 2 nmol'dü ve Col ile uyarılan agregasyon sırasındaki sekresyon değerlendirildi. Uyarıcı ajanlarla başlatılan agregasyon süreci 10 dk takip edildi. Dene sonuçları % maksimum agregasyon olarak ifade edildi. Agregasyon testleri kan örneklerinin toplanmasından sonra en geç bir saat içinde çalışılmaya başlandı ve üç saat içinde tamamlandı.

Elliki deneğin 40'ında Epi'ye karşı agregasyon cevabı iki kez alındı. Özellikle Epi'ye cevabı bozuk olanlarda Epi ile uyarılan agregasyon 3 kez tekrarlandı ve üçüncü deneme μ 400 M Epi son konsantrasyonuyla yapıldı.

Tam kan sayımı Cell-Dyn 4000 (Abbot) hemogram cihazında yapıldı.

İstatistiksel analiz: Tüm sonuçlar ortalama±standart sapma ve minimum-maksimum değerler olarak gösterildi. Ortalama trombosit hacminin santrifüj öncesi ve sonrası arasındaki fark Wilcoxon Sıra Toplamları testi ile değerlendirildi. p değerinin 0.05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Yaş ortalaması 22.3±5.1 (19-42) yıl olan 52 gönüllünün hemogram sonuçları normal sınırlar içinde bulundu (Tablo I). Hemogramdaki ortalama trombosit hacminin (Mean Platelet Volume, MPV) [7.73±1.14 (5.7-10.3) fl] PRP'deki MPV'ye göre [7.30±1.03 (5.0-9.8) fl] anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlendi (p<0.001). Elli deneğin 46'sında (%88.5) santrifüjden sonra trombosit hacminin azaldığı, diğerlerinde arttığı bulundu.

Tablo I. Hemogram sonuçları

Plt (x10 ³ /l)	215.08±44.87 (133-322)
MPV (fl)	7.73±1.14 (5.7-10.3)
WBC (x10 ³ /l)	6.26±1.57 (3.62-11.40)
RBC (x10 ⁶ /l)	4.99±0.37 (4.16-6.39)
Hb (gr/dl)	14.25±0.74 (13.0-17.0)
Hct (%)	42.90±2.33 (38.7-50.0)

Plt: Platelet; MPV: Mean platelet volume; WBC: White blood cell; RBC: Red blood cell; Hgb: Hemoglobin; Hct: Hematokrit

Denekler optik agregometrede Epi'ye karşı gösterdikleri % maksimum agregasyon cevaplarına göre 3 gruba ayrıldı.

1- Maksimum agregasyon cevabı %20'nin altında olanlar (Cevapsız, C).

2- Maksimum agregasyon cevabı %20-60 arası olanlar (Yarı cevaplı, Yc).

3- Maksimum agregasyon cevabı %60'ın üstünde olanlar (Normal, N).

Epi'ye cevabı araştırılan 52 deneğin 4'ünde (%7.7) Epi cevapsızlığı saptanırken, 3 denekte (%5.8) Epi yarı cevabı bulundu. Epi cevapsız, yarı cevaplı ve normal gruplarda

trombositlerin ADP, Col, AA ve Tro'e karşı verdikleri % maksimum agregasyon cevapları ve Col agregasyonunda gerçekleşen ATP sekresyonu Tablo II'de verildi.

oldukları Epi cevapsızlığının sıklığına ve sebebine ilişkin çalışmalarda 100 µM Epi'ye 6 dk izlenen agregasyon sürecinde minimum agregasyon verip sekonder agregasyon vermeyenlerin

Tablo II. Sağlıklı genç-erişkin erkeklerde agregometre ile elde edilen Epi'ye karşı farklı % maksimum agregasyon cevaplarının, diğer uyarıcı ajanların agregasyonu ve sekresyon ile ilişkisi

	N (n=45)	Epi Cevabı Yc (n=3)	C (n=4)
Epi (100 µM)	78.93±12.98 (60-108)	46.00±7.21 (40-54)	10.00±6.63 (3-19)
ADP (10 µM)	79.78±10.81 (60-102)	66.67±4.93 (61-70)	60.75±10.37 (46-70)
Col (6 µg/ml)	76.24±12.90 (50-101)	63.00±4.58 (58-67)	61.50±4.51 (55-65)
AA (1 µM)	78.31±9.29 (58-96)	66.00±5.66 (62-70)	81.00±9.90 (74-88)
Tro (1 U/ml)	Tam	Tam	Tam
ATP Skr (nmol)	2.46±1.51 (0.41-8.00)	1.48±0.57 (0.82-1.88)	3.58±3.34 (1.48-8.57)

N: Normal; Yc: Yarı cevaplı; C: Cevapsız; Epi: Epinefrin; Col: Kollajen; AA: Araşidonik asit; Tro: Trombin; Skr: Sekresyon

Elde edilen verilere göre; Epi'ye karşı agregasyon cevabının bozulmasının hem ADP hem de Col'e karşı agregasyonu azalttığı, AA ve Tro agregasyonları ile sekresyonu etkilemediği gözlemlendi, ancak bazı gruplardaki örnek büyüklüğü yeterli olmadığı için istatistiksel olarak karşılaştırılmadı.

Tartışma

Özgeçmiş veya aile hikâyesinde herhangi bir kanama yatkınlığı bulunmayan, sağlıklı kişilerin trombositlerinden Epi'ye karşı alınan cevapların oldukça geniş bir aralıkta yayılması (%3-108), öncelikle Epi'nin hemostazdaki yeri hakkında soru işaretleri uyandırmaktadır. Epi'ye cevapsızlarda kanamanın gözlenmemesi, trombositlerdeki bu defektin kanamanın durdurulmasında temel yollardan biri olmadığını düşündürmektedir.

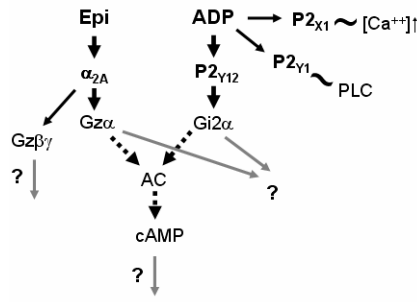
Epi cevapsızlığı ile ilgili yapılmış büyük ölçekli çalışmalardan Jong Weon Choi'nin çalışmasında 457 deneğin 97'sinde (%21.2) Epi cevapsızlığı, 44'ünde (%9.6) Epi yarı cevabı bulunmuştur (18). Bizim çalışmamız ile sınıflandırması benzer olan bu çalışmanın Epi son konsantrasyonu 300 µM'dir. Kendisi de Epi cevapsız olan Kambayashi ve ark.nın yapmış

oranını %16 (23/140) ve %16.7 (4/24) olarak bulmuşlardır (17,21). Theodoropoulos ve ark.nın çalışmasında 100 µM Epi'ye 5 dk içinde %40'ın altında agregasyon cevabı verenler %40 (12/30) olarak bulunmuştur (19). Yine Uzakdoğ'u'dan Pyo ve ark. 10 µM Epi'ye 10 dk içinde minimum agregasyon verip sekonder agregasyon vermeyenlerin oranını %20 (7/35) olarak bulmuşlardır (20). Biz daha önce Marmara Bölgesinde yaptığımız çalışmada 300 µM Epi son konsantrasyonu %14.7 (10/68) Epi cevapsız, %16.2 (11/68) Epi yarı cevaplı bulmuştuk (22). Farklı konsantrasyonlar (10-300 µM), farklı süreler (5-10 dk) ve farklı tanımlar kullanılmasına rağmen konsantrasyon ve süreden bağımsız olarak yalnızca primer agregasyonun oluşması ve sekonder agregasyonun gözlenmemesi "Epinefrin cevapsızlığı" olarak tanımlanabilir. Cevapsızlığın yaş ve cinsiyet ile ilişkili olmadığı ve Epi son konsantrasyonunun 2400 µM'a kadar çıkarılmasının bile etkili olmadığı gösterilmiştir (17,18,22). Bu çalışmamızda Epi'ye cevabı bozuk olanların toplamı %13.5 (%7.7 cevapsız, %5.8 yarı cevaplı) olarak bulunmuştur ve şu ana kadar yapılan çalışmaların içinde en düşüktür. Sağlıklı genç-erişkin erkeklerde Epi

cevapsızlığı sıklığının daha düşük olması, tanımlanan sağlık ölçütlerinin dışında farklı bir takım parametrelerin Epi'ye cevabı etkilediğini akla getirmektedir.

Epi'ye cevapsızlık gösterenlerde ADP'ye karşı da maksimum agregasyonun azalması diğer çalışmaların da ortak yanısıdır (18,21,22). Trombositlerin membranında üç farklı tip ADP reseptörü bulunmaktadır. $P2_{X1}$ reseptörleri iyonotropik reseptörler olup Ca^{++} kanalları ile bağlantılıdır. $P2_{Y}$ reseptörleri metabotropik reseptörler olup G protein bağlantılı reseptörlerdir. Bunlardan $P2_{Y1}$ reseptörleri Gq üzerinden PLC'yi aktive etmekte, $P2_{Y12}$ reseptörleri ise $Gi_{2\alpha}$ üzerinden AC'ı inhibe etmektedir (24-26). Epi'ye cevapsız olanlarda $P2_{X1}$ ve $P2_{Y1}$ reseptörleri bloke edilince ADP'ye karşı da cevap alınmadığını Kamabayashi ve ark. göstermişlerdir. Dahası Epi cevapsız ve cevaplular arasında trombosit içi azalan cAMP seviyeleri arasında da fark bulunamamıştır. Sonuçta Epi cevapsızlığı reseptörle veya AC-cAMP ile ilişkili değildir (17,21). Ya cAMP sonrasındaki yolak üzerinden, ya reseptörlerin alt birimlerindeki bir bozukluktan, ya da $Gz\alpha$ $Gi2\alpha$ 'nın AC dışındaki farklı bir aktivasyon yolağındaki bozukluktan kaynaklanabileceği üzerinde durulmaktadır (Şekil 1).

Epi cevapsızlarda Col'ün lag zamanının uzadığı fakat maksimum agregasyonun etkilenmediği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (18,22). Çalışmamızda Epi cevapsızlarda Col'e karşı maksimum agregasyonun azaldığı bulundu. Diğer çalışmalara göre (10 $\mu\text{g/ml}$) bizim çalışmamızda kullandığımız (6 $\mu\text{g/ml}$) Col son konsantrasyonunun daha düşük olması bu sonuçta etkili olabilir. AA ve Tro agregasyonları ile Epi cevapsızlığının ilişkili olmadığı daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (17,27). Kamabayashi ve ark.'nın çalışmalarında Epi ile ATP sekresyo-



Şekil 1. Trombositlerdeki Epi $\alpha2A$ adrenerejik reseptörleri Gz üzerinden AC'ı inhibe eder ve azalan cAMP ile aktivasyon gerçekleşir. $P2_{Y12}$ ADP reseptörleri de $Gi2$ üzerinden aynı yolla trombositleri aktive eder. Epi cevapsızlığında ya cAMP sonrasındaki yolakta, ya reseptörlerin alt birimlerinde, ya da $Gz/Gi2$ 'nin bilinmeyen farklı bir yolağı üzerinde bozukluk olduğu düşünülmektedir (Siyah oklar aktivasyonu, kesikli oklar inhibisyonu, gri oklar henüz bilinmeyen yolları ifade etmektedir)

nunun Epi cevapsızlarda gözlenmediği gösterilmiştir (27). Epi'e karşı zaten sekonder agregasyon oluşmadığı için sekresyon gözlenmemektedir. Biz çalışmamızda Col ile uyarılan agregasyonda ATP sekresyonunu değerlendirdik ve Epi cevapsızlarla cevaplular arasında bir fark olmadığını gözlemledik. Col'e karşı agregasyonun azalmış olmasından dolayı sekresyonun da azalmış olmasını bekleyebilirdik fakat, sekresyon sürecinin özellikle hücre içi Ca^{++} ile ilişkili olması bu düşüncüyü çürütmektedir (1,2,10). Bu durum Epi'nin sekonder agregasyonunun sekresyon ile ilişkili olduğunu desteklediği gibi, Epi cevapsızlarda genel sekresyon mekanizmalarında bir bozukluk olmadığını ortaya koymaktadır.

AA uyarıcı ajan olarak PRP'ye eklendiğinde TxA_2 'ye dönüşerek trombosit aktive eder (1,10). Epi'nin sekonder agregasyonunun oluşmasında TxA_2 sentezinin, granül sekresyonunun veya sekonder PLC aktivasyonunun (belki TxA_2 üzerinden) rolü olabileceği düşünüldüğüne (1,11) ve Epi cevapsızlarda AA agregasyonunun etkilenmediği gösterildiğine göre, Epi cevapsızlığında hücre içi olası bozukluğun AA'dan TxA_2

sentezi ve sonrasındaki yollar ile ilişkili olmadığı açıktır.

Sonuç olarak, %8-40 gibi oldukça geniş bir aralıkta gözlenebilen Epi cevapsızlığının, reseptör veya ikincil haberci sonrası bir yolağın doğumsal bozukluğu olduğu düşünülmektedir. Epi cevapsızlarda kanama yatkınlığının gözlenmemesi Epi'nin hemostazdaki yeri hakkında soru işaretleri uyandırdığı gibi, tromboza karşı doğal bir koruma olabileceğini de düşündürmektedir. Ayrıca 2A adrenerejik reseptörler ve Gz proteinleri trombositlerin yanı sıra beyin bazı bölgelerinde de bulunmaktadır (12,28). Trombositlerdeki bu defektin nöronlarda da araştırılması nörolojik hastalıklara veya davranış bozukluklarına yeni bir bakış açısı getirebilir.

Teşekkür

Agregometre deneylerinde bize yardımcı olan Hematoloji Laboratuvarı biyologları Birgül Ökmen, Yeşim Öztürk ve Serap Savaşçı'ya teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN (eds). Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott Company, 2001.
2. Brass LF. Thrombin and platelet activation. Chest 2003; 124: 18-25.
3. Quinton TM, Kim S, Dangelmaier C, et al. Protein kinase C- and calcium-regulated pathways independently synergize with Gi pathways in agonist-induced fibrinogen receptor activation. Biochem J 2002; 368: 535-543.
4. Yang J, Wu J, Jiang H, et al. Signaling through Gi family members in platelets. J Biol Chem 2002; 277: 46035-46042.
5. Maayani S, Schwarz T, Martinez R, Tagliente TM. Activation of Gi-coupled receptors releases a tonic state of inhibited platelet aggregation. Platelets 2001; 12: 94-98.
6. Jin J, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. Proc Natl Acad

- Sci USA 1998; 95: 8070-8074.
7. Paul BZS, Jin J, Kunapuli SP. Molecular mechanism of Thromboxane A₂-induced platelet aggregation. *J Biol Chem* 1999; 274: 29108-29114.
 8. Woulfe D, Yang J, Brass L. ADP and platelets: the end of the beginning. *J Clin Invest* 2001; 107: 1591-1598.
 9. Nieswandt B, Schulte V, Zywietz A, Gratacap MP, Offermanns S. Costimulation of Gi- and G12/13-mediated signaling pathways induces integrin IIb 3 activation in platelets. *J Biol Chem* 2002; 277: 39493-39498.
 10. Breddin HK. Can platelet aggregometry be standardized? *Platelets* 2005; 16: 151-158.
 11. Keularts IMLW, van Gorp RMA, Feijge MAH, Vuiist WMJ, Heemskerk JWM. α 2A-adrenergic receptor stimulation potentiates calcium release in platelets by modulating cAMP levels. *J Biol Chem* 2000; 275: 1763-1772.
 12. Yang J, Wu J, Kowalska MA, et al. Loss of signalling through the G protein, Gz, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9984-9989.
 13. Swart SS, Pearson D, Wood JK, Barnett DB. Functional significance of the platelet α 2-adrenoceptor: studies in patients with myeloproliferative disorders. *Thromb Res* 1984; 33: 531-541.
 14. Avram S, Lupu A, Angelescu S, Olteanu N, Mut-Popescu D. Abnormalities of platelet aggregation in chronic myeloproliferative disorders. *J Cell Mol Med* 2001; 5: 79-87.
 15. Kaywin P, McDonough M, Insel PA, Shattil SJ. Platelet function in essential thrombocythemia. Decreased epinephrine responsiveness associated with a deficiency of platelet α -adrenergic receptors. *N Engl J Med* 1978; 299: 505-509.
 16. Yamamoto K, Sekiguchi E, Takatani O. Abnormalities of epinephrine-induced platelet aggregation and adenine nucleotides in myeloproliferative disorders. *Thromb Haemost* 1984; 52: 292-296.
 17. Kambayashi J, Shinoki N, Nakamura T, et al. Prevalence of impaired responsiveness to epinephrine in platelets among Japanese. *Thromb Res* 1996; 81: 85-90.
 18. Choi JW. Incidence of nonresponsiveness to epinephrine in platelets from healthy humans. *Acta Haematol* 2002; 108: 106-108.
 19. Theodoropoulos I, Christopoulos C, Metcalfe P, Dimitriadou E, Economopoulos P, Loucopoulos D. The effect of human platelet alloantigen polymorphisms on the in vitro responsiveness to adrenaline and collagen. *Br J Haematol* 2001; 114: 387-393.
 20. Pyo MK, Yun-Choi HS, Hong YJ. Apparent heterogeneous responsiveness of human platelet rich plasma to catecholamines. *Platelets* 2003; 14: 171-178.
 21. Nakahashi TK, Kambayashi J, Nakamura T, et al. Platelets in nonresponders to epinephrine stimulation showed reduced response to ADP. *Thromb Res* 2001; 104: 127-135.
 22. Sağıdılek E, Büyükoşkun Nİ, Özlük K. Trombositlerin epinefrine yanıtlarının optik agregometre ve PFA-100 ile incelenmesi. *Uludağ Tıp Dergisi* (Yayımda).
 23. Storey RF, Heptinstall S. Laboratory investigation of platelet function. *Clin Lab Haem* 1999; 21: 317-329.
 24. Kunapuli SP, Dorsam RT, Kim S, Quinton TM. Platelet purinergic receptors. *Curr Opin Pharm* 2003; 3: 175-180.
 25. Cattaneo M, Gachet C. The platelet ADP receptors. *Haematologica* 2001; 86: 346-8.
 26. Dorsam RT, Kunapuli SP. Central role of the P2Y₁₂ receptor in platelet activation. *J Clin Invest* 2004; 113: 340-345.
 27. Nakamura T, Ariyoshi H, Kambayashi J, et al. Signal transduction system in epinephrine stimulated platelets; comparison between epinephrine sensitive and insensitive platelets. *Thromb Res* 1997; 85: 83-93.
 28. Meng J, Casey PJ. Activation of Gz attenuates Rap1-mediated differentiation of PC12 cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 43417-43424.