

T1168

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

HEMATOLOJİ BİLİM DALI

HEMATOLOJİK MALİGNİTELERDE  
PLAZMA THROMBOSPONDİN DÜZEYLERİ

Hematoloji Uzmanlık Tezi

T1168/1-1

Dr. Erdal KURTOĞLU

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Levent Ündar

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
Merkez Kütüphanesi

ANTALYA - 2000

## TEŐEKKÜR

Tezimin hazırlanmasının her aŐamasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Levent Ünder' a ; özellikle laboratuvar çalıŐmaları sırasında sürekli olarak yardımını esirgemeyen Kim. Müh. Firuzan Öztürk' e ve Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Gülşen Yakupođlu' na teŐekkür ederim.

Dr. Erdal Kurtoğlu

## KISALTMALAR

AL	Akut lösemi
AML	Akut myeloblastik lösemi
ALL	Akut lenfoblastik lösemi
FNC	Fibronektin
HL	Hodgkin lenfoma
HCL	Hairy cell lösemi
HRGP	Histidine-rich glikoprotein
KLL	Kronik lenfositik lösemi
KML	Kronik myeloid lösemi
LPH	Lenfoproliferatif hastalık
MDS	Myelodisplastik sendrom
MM	Multiple myeloma
NHL	non-Hodgkin lenfoma
PAI	Plasminojen aktivator inhibitörü
TSP	Thrombospondin
TGF- $\beta$ 1	Transforming growth factor-beta 1
uPA	Urokinaz tip plazminojen aktivatörü

## İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Thrombospondinin tarihçesi .....	3
2.2. Thrombospondinin yapısı .....	3
2.3. Thrombospondinin görevleri .....	9
2.3.1. Heparinle etkileşim .....	10
2.3.2. Kalsiyumla etkileşim .....	12
2.3.3. Fibrinojenle etkileşim .....	13
2.3.4. Fibronektinle etkileşim .....	14
2.3.5. Kollajenle etkileşim .....	15
2.3.6. HRPNG ve plazminojenle etkileşim .....	16
2.3.7. Thrombinle etkileşim .....	16
2.4. Thrombospondin reseptörü (CD36) .....	17
2.5. Thrombospondinin hastalıklarla ilişkisi .....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	22
3.1. Denekler .....	22
3.2. Kan örneklerinin alınması .....	27
3.3. Thrombospondinin ölçümü .....	27
3.4. İstatistik .....	28

4.SONUÇLAR.....	29
5.TARTIŞMA.....	33
6.ÖZET.....	39
7.SUMMARY.....	41
8.KAYNAKLAR.....	43

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

TSP, trombositlerin  $\alpha$ -granülleri içinde bulunan adeziv bir glikoproteindir TSP' nin, trombositlerin yanı sıra birçok hücre tarafından salgılandığı bilinmektedir Herhangi bir uyarıya bağlı olarak salındığında trombositlerin agregasyonuna neden olur (1)

TSP, hücre adezyonu, hareketi ve büyümesi üzerinde etki gösterir Çevre dokunun malign hücrelerle invazyonunu stimüle ederek tümöral gelişime yardımcı olur. Tümör gelişimi ve endotel üzerindeki etkisi önemli bir tümöral büyüme ve metastaz faktörü olarak ilgi çekmesine neden olmaktadır TSP'nin , in vivo ortamda bazı tümörlerin büyümesini ve metastazını baskıladığı ve angiogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir Ancak, bu etkinin tümör tipine göre değişiklik gösterdiği de izlenmiştir. TSP' nin gösterdiği bu çelişkili davranışın altında molekülün karmaşık yapısının olabileceği akla yakın gelmektedir (2-4)

Jinekolojik ve gastrointestinal sistemlere ait solid tümörü olan hastalarda plazma TSP düzeyleri sağlıklı insanlara göre yüksek bulunmuştur (5, 6). Karaciğer metastazı olan mide ve kolorektal kanser olgularında, metastatik meme ve akciğer kanseri olgularında normalin 2 ila 3 katına ulaşan plazma TSP düzeylerine rastlanmıştır (4).

Akut lösemili olgulardaki plazma TSP düzeyini ölçmek için yapılan bir çalışmada plazma TSP düzeyi anlamlı olarak düşük bulunmuştur (7). Bu çalışma dışında diğer hematolojik malignitelerdeki plazma TSP düzeyini yansıtan başka çalışma yapılmamıştır

Biz, alışmamızda hematolojik malignitesi olan olguların plazma ISP düzeyini sağlıklı bireylerle ve tanılarına göre birbirleri ile kıyasladık

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1.Thrombospondinin tarihçesi

1971 yılında Baenziger ve arkadaşları (8) thrombinle karşılaşınca trombositler tarafından selektif olarak salgılanan 190.000 daltonluk bir polipeptid tanımladılar. Baenziger ve arkadaşları (9) bu yeni polipeptide "thrombin-sensitive protein" adını verdiler. Takip eden on yıl içinde bu proteinin yapısı, hücre içindeki lokalizasyonu hakkında daha çok bilgi elde edildi. İlk olarak tanımlanan proteinin daha büyük bir proteinin bir subüniti olduğu bulundu. Yeni tanımlanan bu büyük ana moleküle thrombine yanıt olarak salgılandığı için "thrombospondin" adı verildi

### 2.2.Thrombospondinin yapısı

TSP, trombositlerde ve diğer bazı hücrelerde bulunan homotrimerik yapıda, molekül ağırlığı 450.000 dalton olan adheziv bir glikoproteindir (1) İndirgen bir ajanın yokluğunda TSP "sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis" (SDS-PAGE) tek bir band olarak hareket eder (10,11) Genellikle; indirgen bir ajanın yokluğunda bulunan molekül ağırlığı kuşku ile karşılanırsa da, bulunan bu değer "sedimentasyon equilibrium analizi"nden elde edilen 420.000 dalton sonucuna oldukça yakındır (12).TSP' yi oluşturan polipeptid zincirlerinin molekül ağırlıklarının tek tek TSP' nininkine oranı 1:3 dür Hem SDS-PAGE hem de sedimentasyon equilibrium analizi ile aynı sonuç elde edilmiştir. Bu bulgu TSP molekülünün birbirine eşit molekül ağırlığında üç adet polipeptitten oluştuğunu göstermektedir (10,12). TSP' yi oluşturan



polipeptid zincirleri molekül ağırlığı, NH<sub>2</sub>-terminal amino asit sıralanımı ve trombin, plazmin, thermolisin, tripsin, kemotripsin gibi proteazların cleavage noktaları açısından benzerdir (13-18). Clementson ve arkadaşları (19) TSP'nin elektrik özelliklerini incelediler. TSP'yi oluşturan polipeptid zincirlerinin elektrik yükü açısından heterojen olduğu sonucuna ulaştılar. Bu polipeptid zincirlerinin izoelektrik noktalarının pH 5.2 ile 5.8 arasında değiştiği saptadılar. Mosher ve arkadaşları (20), insan umbilikal ven endotel hücreleri tarafından üretilen TSP molekülünün izoelektrik heterojenitesini tanımladılar

İndirgen bir ajanın varlığında SDS-PAGE kullanıldığında ; TSP molekül ağırlığı 142 000 ile 190.000 arasında değişen bir molekül olarak hareket eder. Elde edilen molekül ağırlığı kullanılan SDS-PAGE sistemine göre-farklılık gösterir. Laemmli'nin (21) tanımladığı jel kullanıldığında molekül ağırlığı 185.000 bulunurken; Weber ve Osborn'un (22) tanımladığı fosfat bufferlı jel kullanıldığında molekül ağırlığı 145 000 bulunmaktadır.  $\beta$ -mercaptoethanol ve guanidine-HCl ile yapılan sedimentasyon equilibrium analizinde molekül ağırlığı olarak 113 000 ile 138 000 arası değerler bulunmuştur. Bu sonuçlar da SDS-PAGE metodunda elde edilen düşük değerleri desteklemektedir (Tablo 1).

Tablo 1. Thrombospondinin yapı özellikleri

Molekül ağırlığı	420.000
Redüksiyon sonrası molekül ağırlığı	
Laemmlı SDS-PAGE	185.000
Weber-Osborn SD-PAGE	145.000
Sedimentasyon equilibriumu	133.000
Sedimentasyon coefficient	9.7S
İntrinsik viskozite	21 mL/g
Prolate elipsoid modelin aksial oranı	3.3
Ekstrinsik coefficient	10.5-11.3
Sekonder strüktür	
$\alpha$ -heliks	%11
$\beta$ -sheet	%43
random coil	%46

İmmunolojik, biyokimyasal ve elektron mikroskop çalışmalarından elde edilen bilgiler ışığında TSP'nin olası yapısını ortaya koyan modeller üretilmiştir (14,16). Bu modeller, TSP'yi oluşturan üç polipeptidin de benzer bir konformasyona sahip olduğunu

göstermiştir. Elektron mikroskopik çalışmalar TSP'nin yapı olarak dört bölgeye bölündüğünü göstermiştir:

1. Globular bölge N
2. Zincirlerin birbirlerine bağlandığı bölge
3. İnce birleşme bölgesi
4. Globular bölge C

Eldeki birçok bulgu "globular bölge N" in polipeptid zincirlerinin  $\text{NH}_2$ -terminaline karşı geldiğini göstermektedir. TSP'nin 30.000 daltonluk  $\text{NH}_2$ -terminal proteolitik fragmanına karşı yönlendirilen spesifik monoklonal antikor "globular bölge N" ye bağlanır. Thrombin, ortamda bulunan kalsiyumun da yardımı ile "globular bölge N" yi selektif olarak koparır (14). Bunlara ek olarak ; "globular bölge N" nin elektron mikroskopik çalışmalar sonucunda üç parçadan oluştuğu gösterilmiştir (14,16)

TSP'nin yapısındaki ikinci önemli bölge ise, TSP' yi oluşturan polipeptidlerin birbirleri ile bağlandıkları bölgedir. Bu bölge, "globular bölge N" ye "globular bölge C" den daha yakındır ve polipeptid zincirlerinin birbirleri ile bağlı oldukları tek bölgedir. TSP, bütün molekül boyunca dağılmış 114 tane disülfid bağı içerir (13). Elektron mikroskopik çalışmalar, bu bağların çok azının polipeptid zincirleri arasında olduğunu; buna karşın çoğunun zincir içinde bulunduğunu ortaya koymuştur.

Üçüncü bölge ise, ince bağlanma bölgesidir. Kalsiyumlu ortamda yapılan çalışmalarda bu bölgenin 160 ile 291 angström uzunluğunda olduğunu göstermiştir (14,16) Eğer örnekler işlem öncesi EDTA ile muamele edilirse, bu uzunluk 383 angströme kadar artmaktadır

TSP' yi oluşturan dördüncü ve son bölge "globular bölge C" dir. Bu bölgenin çapı yaklaşık 118 ile 170 angströndür. İnce bağlanma bölgesinin ucunda bulunur (14,16) EDTA'nın varlığında "globular bölge C" nin boyutunda küçülme olurken bağlanma bölgesinin boyutunda eş zamanlı bir artış olur. Bunun nedeni "globular bölge C" den bağlanma bölgesine olan kütle aktarımıdır (14). Eldeki veriler ve monoklonal antikor çalışmalarının ışığında ve kalsiyumlu ortamda "globular bölge C" nin molekül ağırlığının yaklaşık 70.000 dalton olduğu ve TSP molekülünün C-terminaline yalın olduğu bulunmuştur (14,16).

Aort düz kas hücreleri "platelet derived growth factor" (PDGF) gibi bir mitojenle muamele edildikleri zaman TSP seviyesi 15 dakika gibi kısa bir sürede artar. Bu artış doza bağlıdır. PDFG tarafından kontrol edilen tüm mitogeneze paralel olarak TSP miktarı artar. Cycloheximide gibi bir protein sentez inhibitörünün varlığında PDFG TSP'nin transkripsiyonunu süper indükler (18) Sonuç olarak; TSP'nin mRNA düzeyi, c-myc ve c-fos ve diğer büyümeyi kontrol edici genler gibi PDFG tarafından düzenlenir PDGF ve cycloheximide birlikte bulunduğu TSP'nin hızla eksprese olması, TSP'nin hücrelerin PDGF'ye oten mitojenik cevabını kontrol eden bir gen ailesine ait olduğunu göstermektedir (14) TSP, sentezlenip salgılandıktan sonra düz kas hücre zarına veya ekstraselüler matrikse bağlanarak büyümeyi artırıcı bir rol oynar. Örneğin; TSP ve

“epidermal growth factor” (EGF) sinerjik olarak düz kas hücrelerinde DNA sentezini stimüle ederler. EGF ile muamele edilmiş düz kas hücrelerinde, 30-saatlik DNA-labelling indeksi %7’den %20’ye kadar çıkmaktadır. Ancak, EGF ve TSP birlikte uygulandığında bu oran %47’ye çıkmaktadır. Heparin, TSP’nin EGF üzerindeki bu güçlendirici etkisini inhibe eder.

TSP, proteaz oluşumunda merkezi bir rol oynadığı için hücre migrasyonunu sağlar. Yapılan in vitro çalışmalar sonucunda; TSP’nin hem plasminojene hem de plasminojen aktivatörüne bağlandığı gösterilmiştir. Bu bağlanma sonucunda plasminojen jenerasyonunda 40 kata ulaşan bir artış olmaktadır. Buna ek olarak; oluşan plazmin TSP’ye bağlı olarak plasminojen inhibitörlerinden de korunur (20). Urokinazın da TSP ile özel bir kompleks oluşturduğu ve bu yolla plasminojen aktivatör inhibitörlerinden korunduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada urokinaz ve TSP’nin normal ve malign meme dokusunda birlikte bulunduğu gösterilmiştir. Böylece, TSP’nin ekstraselüler matriksin degradasyonunda ve remodellinginde önemli bir rol oynadığı anlaşılmıştır. Bu yolla mesenkimal ve tümör hücrelerinin çoğalması ve migrasyonu mümkün olmaktadır (21). Bu bilgiyi destekleyici birçok genetik çalışma yapılmıştır. İleri derecede invaziv, TSP cDNA antisense ekspresyon vektörü ile birlikte bol miktarda TSP üreten bir tür yassı hücre malign hücre dizisi transfekte edilmiştir. Üç tane transfekte klon saptanmıştır. “Ribonukleaz protection assay” kullanılarak yapılan incelemede bu üç klononda da, değişen oranlarda transfekte antisense transkriptin varlığı gösterilmiştir. Daha da önemlisi bu klonların hepsinde TSP düzeyinin azaldığı; bu azalma ile birlikte de malign hücrelerin

invazivliğinde azalma olduğu gösterilmiştir. Bu bulgu bize TSP'nin hücre migrasyonunda ne kadar önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (22).

Hücre migrasyonu üzerinde bu kadar önemli bir rol oynayan TSP'nin embriyogenezde de rolü olacağı düşünülebilir. İmmünohistokimyasal çalışmaların gösterdiğine göre gelişmekte olan sinir sistemi dokusunun hücre migrasyonu olan bölgelerinde bol miktarda TSP bulunmaktadır (21,22). Örneğin; serebellar korteksin histogenezi sırasında TSP'nin granül hücreleri migrasyon halinde iken hücrelerinin etrafında depolandığı saptanmıştır. *In vitro* serebellar korteks hücre kültürüne anti-TSP antikorları eklenirse doza bağlı olarak hücre migrasyonunun inhibe edildiği gösterilmiştir. Kontrol kültürlerde ise granül hücrelerinin internal hücre tabakasına doğru yöneldiği görülmektedir. Buna karşın, anti-TSP antikorlu ile karşılaşan granül hücreleri eksternal tabakada takılı kalmaktadırlar. Bu bilgiler, TSP'nin serebellar korteks histogenezinde, hücre migrasyonunu harekete geçirerek önemli bir rol oynadığını kanıtlamaktadır (23).

### 2.3. Thrombospondinin görevleri

TSP, trombositlerin  $\alpha$ -granüllerinde depolanır. Herhangi bir uyarı sonucunda  $\alpha$ -granüllerinden salgılanarak trombosit agregasyonunda rol oynar. TSP, endotel hücreleri (19,24), düz kas hücreleri (25), fibroblastlar (25,26), pnömositler (27), makrofajlar (28), monositler (28) ve tümör hücreleri (29-31) tarafından da salgılanır ve ekstraselüler matriksin önemli bir yapıtaşıdır. Melanom, fibrosarkom ve nedeni primeri bilinmeyen maligniteler gibi birçok tümör hücre dizisi TSP üretir (29). Kültür ortamında birçok hücrenin TSP'yi sentezlediği ve salgıladığı gösterilmiştir. TSP; heparin, tip V kollajen,

fibronektin, fibrinojen, kalsiyum, histidine-rich glycoprotein (HRGP), plazminojen ve plazminojen aktivatör gibi birçok liganda bağlanma özelliğine sahiptir (1) TSP'nin tümör metastazında çok önemli oynadığı murine modelinde gösterilmiştir. 30 µg kadar TSP verilen deneklerde akciğer tümörünün büyüme hızı TSP verilmeyen kontrol grubuna oranla 2.3 kat artmıştır (32)

### 2.3.1. Heparinle etkileşim

Bağlanma reaksiyonları, TSP molekülünü oluşturan ve proteazlara rezistan çeşitli domainler tarafından sağlanır. Bu domainlerden bir tanesi heparine yüksek afinite gösteren amino terminalidir. TSP'nin proteolitik fragmanlarının heparin Sepharose kromatografisine tabi tutulması sonucunda bu domain izole edilebilir. İzole edilen domain 25.000 dalton ağırlığında bir monomerik polipeptiddir. Heparine bağlanan domainin N-terminal amino asit sıralanımı TSP'ninki ile tıpatıp aynı olduğu için heparine bağlanan domainin N-terminalin en ucunda olması gerekmektedir (17). TSP cDNA'nın nükleotid sıralanımından elde edilen bilgiler ışığında, heparine bağlanan domainine ait amino asitlerin hidrofobik olduğu anlaşılmıştır. Buna ek olarak; bu amino asit sıralanımının iki grup bazik amino asit içerdiği ve bu amino asit gruplarının anyonik heparinin bağlanmasında önemli rol oynadığını gösterilmiştir (33). Elde edilen birçok bulgu heparine bağlanan domainin fizyolojik açıdan çok önemli olduğunu göstermiştir. Heparin, TSP'ye bağlanarak radyolojik olarak işaretlenmiş TSP'in izole edilmiş hücre matrislerine girmesini inhibe etmektedir. Benzer şekilde aynı mekanizmayı kullanarak yeni sentezlenmiş TSP'nin de aort düz kas hücrelerinin yüzeyine bağlanması heparin tarafından engellenmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda TSP'nin hücre yüzeyinde

bağlandığı reseptörün bir heparan sülfat proteoglikan olduğu ve heparinin bu reseptör için TSP ile yarışarak onun bağlanmasını engellediği gösterilmiştir (34,35).

Yapılan birçok çalışma TSP' nin aort düz kasının proliferasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Heparin, oldukça iyi bilinen düz kas proliferasyonunu inhibe edici bir ajandır. Heparin, bu engellemeyi TSP' nin düz kas hücrelerinin yüzeyine ve ekstraselüler matrikse bağlanmasını bloke ederek yapar. Bu olay doza bağımlı olarak gerçekleşir. Maksimum etki heparin konsantrasyonu 1 µg/ml iken görülür. Böylece, heparinin antiproliferatif etkisinin TSP' nin ekstraselüler matrikse yerleşmesinin engellenmesi ile olduğu açıkça görülmektedir. TSP üzerine yapılan birçok çalışma bu görüşü destekler niteliktedir. TSP' ye karşı geliştirilen poliklonal veya monoklonal antikorların, aort düz kasının proliferasyonunu ve migrasyonunu engellediği gösterilmiştir (36). Anti-TSP monoklonal antikor ile muamele edilen aort düz kas hücrelerinin sayısında sekizinci saatin sonunda %60 azalma olduğu gösterilmiştir. Bu hücreler kontrol hücrelerinin aynısıdır. Flow cytometry ile analiz edildiklerinde de G1 fazında takılı kaldıkları görülmüştür. Anti-TSP, monoklonal antikor benzeri heparin TSP'nin hücre yüzeyindeki ekspresyonunu inhibe eder. Bu, immunoflorasan ve metabolik labeling metodları ile gösterilmiştir. Bu çalışmalar, hücre yüzeyinde bulunan TSP'nin düz kas hücrelerinin çoğalmasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bu role en belirgin ihtiyaç duyulan evre hücre siklusunun G1 fazıdır. Heparin gibi TSP'nin düz kas hücreleri ile etkileşimini engelleyen ajanlar düz kas hücrelerinin çoğalmasını engellemektedir (36).

Yapılan çalışmalar *in vivo* olarak hasarı takiben rat karotid arterinde TSP depolanmasının arttığını göstermiştir. Balon kateter hasarını izleyen birinci saatte immün boyama ile



mediada TSP' nin varlığı gösterilmiştir. Hasarı takip eden beşinci günde intimal proliferasyon belirgin hale gelmektedir. Opere edilmeyen kontroller ile karşılaştırıldığında TSP boyanmasının en belirgin olarak neointima ve mediada olduğu görülmüştür. Bu *in vivo* veriler, TSP' in hasarı takiben arttığını ve en belirgin olarak ta düz kas hücrelerinin olduğu yerlerde depolandığını göstermiştir.

### 2.3.2. Kalsiyumla etkileşim

EDTA' nin eklenmesi ile divalent katyonlar ortamda ayrılınca TSP' nin sedimentasyon coefficient, intrinsik viskozite, sirküler dikroizm ve elektron mikroskopik görünümü tümüyle değişir (37). Kalsiyuma bağlı olarak sirküler dikroizmde çok az değişiklik gelirken, molekülün proteolize karşı direnci oldukça azalır.

Plastik tabaklara adsorbe edilen TSP insan endotel ve düz kas hücreleri ile monosit benzeri hücre dizilerinin (U937) yanı sıra rat böbrek hücrelerinin da yüzeye yapışmasını sağlar. Eğer bu işlem EDTA' nin varlığında yapılırsa, bu yapışma gerçekleşmez. TSP, EDTA' nin varlığında tabağın yüzeyine uygulanır daha sonra, hücreler eklenmeden kalsiyum içeren bufferle yıkanır ise hücrelerin yüzeye yapışması yine engellenir. Bu da bize kalsiyumun, TSP' nin yapısı ve fonksiyonu üzerindeki etkisini göstermektedir (38). TSP, solid-faz-adsorbe osteonektin ile de bağlanmaktadır. Fazla miktarda fluid-faz osteonektin kullanılırsa, solid-faz osteonektin ile TSP' in etkileşimi %81 oranında inhibe olur. TSP ile osteonektinin etkileşimi de kalsiyumuna bağlıdır. Eğer, ortama EDTA eklenirse, bu etkileşim % 50-80 oranında inhibe olur (39).

TSP, bilindiği gibi trombinle stimüle edilmiş trombositlerin yüzeyinde eksprese olur. Bu ekspresyon iki farklı mekanizma ile gerçekleşir:

1. Düşük trombosit konsantrasyonlarında ( $1 \times 10^8/\text{mL}$ ) gerçekleşen diavalant ion bağımlı düşük kapasiteli mekanizma.
2. Yüksek trombosit konsantrasyonlarında gerçekleşen diavalant ion bağımlı ve bu durumdaki tüm TSP ekspresyonunu sağlayan yüksek kapasiteli mekanizma.

Bu mekanizma, hem kalsiyum hem de magnezyum iyonlarına gereksinim duyar (40).

### 2.3.3. Fibrinojenle etkileşim

Leung ve Nachman (41), TSP' nin mikrotiter platerin yüzeyine adsorbe edildiği bir solid-faz bağlanma assayı yapmışlardır. Fibrinojen, adsorbe edilen TSP ile inkübe edilmiş ve bağlanmamış fibrinojen yıkanarak ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Bağlanmış fibrinojen ise enzymlerle-linked immunosorbent assay ile ölçülmüştür. Sonuç olarak; fibrinojenin TSP' ye  $3.4 \text{ nmol/L}$  disosiasyon sabiti ile bağlandığını bulmuşlardır. Bu etkileşim glukozamin, mannozamine ve arginin gibi trombosit lektin aktivitesini inhibe eden maddelerce kısmen engellenir (42). Lahav ve arkadaşları (43) benzer sonuçlara solid-faz ve fluid-faz fibrinojen kullanarak ulaştılar. Tuszyński ve arkadaşları (44) TSP ile fibrinojen-Sepharose arasındaki etkileşimin EDTA' nin varlığında bile gerçekleştiğini gösterdiler. Bu bulgu TSP-fibrinojen etkileşiminin kalsiyum ve magnezyum iyonlarına ihtiyaç duymadığını kanıtlamaktadır. TSP'nin, fibrinojen-Sepharose kompleksine bağlanması, bazı antikörlerle bloke edilebilir. Fibrinojenin alfa zincirinin karboksi terminalini oluşturan

cyanogen bromide cleavage fragmanına yönelik antikorlar bu birleşmeyi inhibe ederler. Fibrinojenin D ve E domainlerine yönelik antikorların bu birleşme üzerinde herhangi bir engelleyici etkileri yoktur. Trombosit ekstresine fazla miktarda fibrinojen eklenmesi (30 mg/ml) TSP' nin fibrinojen-Sepharose kompleksine bağlanmasını inhibe eder. TSP tercihan "uncross-linked" fibrinojene bağlanır. Bu durum, TSP-fibrinojen bağlanma yerinin "cross-linked" fibrinojende bu reaksiyon için uygun olmadığını göstermektedir.

#### 2.3.4. Fibronektinle etkileşim

TSP ile FNC arasındaki etkileşim Lahav ve arkadaşları (45) tarafından radioaktif cross-linking bir ajan kullanılarak tanımlanmıştır. Bu metotta; FNC, kollajen veya kullanılan kontrol proteinleri cross-linking ajanla konjuge edilerek cam yüzeylere adsorbe edilirler. Daha sonra bu substrat-bound proteinler, protein içermeyen buffer içindeki jelle filtre edilmiş trombositlerle muamele edilirler. Bağlanmamış proteinler yıkanarak ortamdan uzaklaştırılırlar. "Cross-link" sağlayıcı ise ultraviyole ile aktive edilir. Bu işlem sırasında; substrat-bound proteinlere yakın proteinler radioaktif madde ile işaretlenirler. Hem FNC hem de kollajenle kaplanmış substratlar 185.000 daltonluk bir proteini spesifik olarak işaretlerler. Ancak, bovin serum albumini ile kaplanmış kontrol substratı bu işaretleme işlemi gerçekleştirilemez. Bu işaretlenen proteinin TSP olduğu, molekülün elektroforetik mobilitesi ve anti-TSP antiserumu ile çökmesinden anlaşılmaktadır. Yapılan benzer çalışmalarda bovin aortik endotel hücre kültüründe elde edilen TSP' nin Sepharose ile konjuge edilmiş FNC ile bağlandığı görülmüştür (45).

Endotelial TSP' nin FNC' e bağlanması için iki ayrı domaini vardır. Bunlardan biri 70.000 daltonluk, trombosit TSP' ye benzer çekirdek fragman; diğeri ise, 27.000 daltonluk, endotel TSP' ye spesifik N-terminal fragmandır (46).

TSP ile FNC' in etkileşimi, saflaştırılmış ve trombositlere adsorbe edilmiş TSP ve FNC ile de çalışılmıştır. Leung ve Nachman (41) solid-faz FNC' nin substrat-bound TSP' ye olan afinitesinin fluid-faz FNC' ninkinden daha fazla olduğunu gösterdiler. Buna zıt olarak; Lahav ve arkadaşları (43) fluid-faz TSP' in hem substrat-bound fibrinojenle hem de substrat-bound FNC ile etkileştiğini kanıtladılar. İki çalışma arasındaki farklar şunlardı:

- 1 TSP' nin saflaştırılması sırasında kalsiyum ya ekleniyor ya da ortamdan uzaklaştırılıyordu.
- 2 Çalışmaların birinde TSP fluid fazda iken diğeri substrata bağlı idi.

### 2.3.5. Kollajenle etkileşim

Mumby ve arkadaşları (47) TSP' nin değişik kollajen tipleri ile olan ilişkisini incelediler. Kollajenin, mikrotiter plakelere adsorbe edilmiş veya Sepharozla cross-linked tip V kollajene bağlandığını bulmuşlardır. Bunun tam tersi olarak; TSP' nin tip I, II ve III kollajene bağlanmadığını da saptamışlardır.

### 2.3.6. HRGP ve plasminojenle etkileşim

Yapılan çalışmalar fluid-faz HRGP' in solid-faz TSP' ye 6.2 nmol/L disosiasyon sabiti ile bağlandığını göstermiştir (48). Saflaştırılmış HRPG, bir doku plasminojen aktivatörü ve plasminojen karışımı sayesinde fibrinolizi inhibe eder (49). TSP' nin plasminojene bağlanması  $\epsilon$ -amino-*n*-caproic asit tarafından inhibe edilir. Bu durum, iki molekülün bağlanması sırasında plasminojenin lysine bağlanma noktasının rolü olduğunu göstermektedir (50) TSP, HRGP ve plasminojenin bir araya gelerek üç molekülden oluşan bir kompleks oluşturdukları gösterilmiştir. Bu kompleksin heparine bağlanma özelliği bulunduğu ve bu yolla plasminojen aktivatörü için çok etkili bir aktivatör olduğu gösterilmiştir (51). Bu etkileşimler daha çok TSP düzeyinin yüksek olduğu trombosit yüzeyinde gerçekleşmektedir.

### 2.3.7. Trombinle etkileşim

TSP' nin, kalsiyumun varlığında  $\alpha$ -trombin ile etkileşimi her iki molekülün  $\text{NH}_2$ -terminalinden de 30 000 daltonluk heparin bağlanma fragmanının selektif olarak koparılmasını sağlar (13,14,37,52). Ortamdaki kalsiyum EDTA tarafından uzaklaştırıldığı zaman  $\alpha$ -trombin' in proteolizisi için ek bağlanma yerleri ortaya çıkar (14,52) Bu noktalarda gerçekleşen kopmalar 130.000, 95 000, 65 000 ve 25 000 daltonluk fragmanların ortaya çıkmasını sağlar (14,52) Bu kopmalar COOH-terminalinden oluşur (14). Takahashi ve arkadaşları (52) TSP' nin  $\gamma$ -thrombin için bir substrat olmadığını göstermişlerdir.

TSP ve radyoaktifle işaretlenmiş thrombinin oluşturduğu kompleks gösterilmiştir (53,54). Trombositler tarafından salgılanan ve  $^{125}\text{I}$ -trombin ile radyoaktif olarak işaretlenen proteinlerin crossed immunoelektroforezi TSP, albumin ve platelet factor 4 gibi proteinlerin varlığını göstermiştir (53) Danishefsky ve arkadaşları (54) TSP-thrombin kompleksinin nasıl oluştuğunu göstermişlerdir. TSP, thrombinin disülfid bağı ile reaksiyona girebilecek serbest thiol grubu içermektedir. Bu thiol-disülfid değişimi sırasında TSP ile thrombin arasında kovalent bir bağ oluşur. Bu bağ yıkanmış trombositlere  $^{125}\text{I}$ -trombin eklendikten 30 dakika sonra oluşur.

#### 2.4. Thrombospondin reseptörü (CD36)

CD36, trombositlerin major glikoproteinlerinden biridir ve GPIV olarak da bilinir (55). TSP ile etkileşime girebilen bir hücre adezyon reseptörüdür (56). Trombositlerin yanı sıra megakaryositlerde, monositlerde, kapiller endotelinde ve mammarian epitelinde de bulunur. Bu reseptör, hergün yeni bir üyenin eklendiği ve oldukça çok sayıda ligandın bağlandığı integral membran glikoprotein ailesindedir. CD 36, hemostaz, tromboz, malarya enfeksiyonu, inflamasyon, lipid metabolizması ve aterogenez gibi bir çok metabolik olayda önemli rol oynar (57). Yapılan in vitro çalışmalar CD36' nın collagen, TSP, malarya ile enfekte olmuş eritrositler ve okside olmuş LDL gibi birçok liganda bağlanma özelliği olduğunu göstermiştir. Ancak, CD36' nın bu fonksiyonlarından hangisinin in vivo ortamda hayati olduğu henüz bilinmemektedir. CD36' nın doğuştan eksik olduğu kişilerde yapılacak çalışmalar bu konuya açıklık getirecektir. Kalsiyumun bulunmadığı ortamda CD36' yı eksprese etmeyen trombositler agonist stimülasyonuna karşılık gecikmiş ve azalmış bir irreversible agregasyon sergilerler. Trombositlerin irreversible

agregasyonu, trombositler tarafından salgılanan arakidonik asidin hücre içine geri alınma ve arakidonik asidin bir metaboliti olan Eps/TxA2' ye bağlıdır. İndomethacin ve ETYA varlığında CD36' yı eksprese etmeyen trombositlere, U46619'a (TxA2 analogu) cevap olarak gelişen kalsiyum girişi normalden farklı değildir. CD36' yı eksprese etmeyen trombositlerin, kalsiyumun bulunmadığı ortamda ortaya koydukları agregasyon eksikliğinin asıl nedeninin hücre içine kalsiyum girişinden çok arakidonik asidin hücre içine alınımındaki hata olduğu bilinmektedir. Bu sonuç arakidonik asidin CD36' nın varlığında inhibitör etkisini göstermesi ile de desteklenmektedir (55).

## 2.5. Thrombospondinin hastalıklarla ilişkisi

TSP, hücre adezyonunu, hareketini ve büyümesini sağlayan bir ekstraselüler matriks glikoproteinidir. TSP, çevre dokunun malign hücrelerle invazyonunu stimüle ederek tümoral gelişime yardımcı olur. Tümör gelişimi ve endotel hücreleri üzerine olan etkisi nedeni ile önemli bir tümöral büyüme ve metastaz faktörü olarak ilgi çekmektedir. TSP' nin, in vivo ortamda bazı tümörlerin büyümesini ve metastazını baskıladığı ve angiogenezi inhibe ettiğini gösterilmiştir. Ancak, bu etki tümöral hücre tipine göre değişmektedir. TSP, bazı hücre tipleri üzerinde stimüle edici olarak etki göstermekte ve tümör gelişimini hızlandırmaktadır. TSP' nin gösterdiği bu çelişkili davranışın altında molekülün karmaşık yapısı yatıyor olabilir. TSP, heparan sulfat proteoglikanları, büyüme faktörleri ve diğer matriks proteinleri gibi birçok hücre yüzeyi reseptörü ile etkileşime girer. Birçok molekülle bağlanma özelliğinin olması, latent transforming faktörünü aktive edebilmesi ve birçok proteazı inhibe edebilmesi nedeni ile TSP' in hücre içi birçok sinyali başlatabileceği anlaşılmaktadır. Bu sinyaller tümör hücreleri, neovaskularizasyonu

sağlayan endotel hücreleri, stroma hücreleri ve bağışıklık sistemi hücreleri tarafından alınmaktadır. TSP, her hücre tipinin farklı davranışlarını düzenler. TSP' nin moleküler etkileşimlerini ortaya koyacak in vitro çalışmalar tümör gelişiminin ve metastazların engellenmesinde önemli rol oynayacak buluşlara yol açacaktır (2-4).

Jinekolojik ve gastrointestinal tümörü olan hastalarda TSP' nin plazma düzeylerinin sağlıklı insanlara oranla daha yüksek olduğu gösterilmiştir (5,6). Karaciğer metastazı olan mide ve kolorektal kanserlerde de oldukça yüksek plazma TSP düzeyleri saptanmıştır. Benzer şekilde; yapılan birçok çalışmada metastatik meme ve akciğer kanserlerinde de metastatik olmayan olgulara ve sağlıklı insanlara oranla , plazma TSP düzeyinde 2 ila 3 kata ulaşan artışlar bildirilmiştir . Malign meme dokusu yüksek oranda TSP içerirken benign meme tümörlerinin ve meme kistlerinin çok düşük miktarda TSP içerdikleri saptanmıştır (58). Bu bulgulara dayanılarak tümör yükü ile TSP düzeyi arasında bir ilişki olabileceği düşünülmüştür (4). Yapılan bazı çalışmalar bu yüksekliğin nedeninin tümör tarafından gerçekleştirilen venöz invazyon olduğunu belirtmişlerdir (59-65). Kolorektal kanserler üzerine yapılan bir çalışmada plazma TSP düzeyi ile venöz invazyonun derecesi arasında lineer bir ilişki saptanmıştır (66) Bu bulgu venöz invazyonun gösteren kolorektal kanserde saptana yüksek TSP düzeyini açıklamaktadır TSP düzeyindeki yükseklik hastalığın evresi hakkında bilgi veren bir indikatör olarak kullanılabilir.

Dawes ve arkadaşları (67) plazma TSP düzeyinin yalnızca trombositler tarafından idame edilmediğini bunun yanı sıra ekstraselüler kaynakların, özellikle de vasküler endotelin plazma TSP düzeyinin idamesine önemli katkıda bulunduğunu göstermişlerdir. Bunun



tam tersi olarak; Switaska ve arkadaşları (68) fizyolojik ortamda vasküler endotelin TSP salgılamayacağını, TSP' nin fizyolojik ortamda yalnızca trombositler tarafından salgılanacağını ileri sürdüler. Yamashita ve arkadaşları da (69) yaptıkları çalışmada, venöz invazyon gösteren kolorektal kanser olgularında, venöz invazyon göstermeyenlere oranla plazma TSP düzeyini yüksek bulmuşlardır. Bu bulgu tümörün venöz invazyon sonucunda trombositleri aktive ettiğini ve aktive olan trombositlerin de TSP salgıladığını göstermektedir (70).

Jinekolojik kanserler üzerine yapılan başka bir çalışmada plazma TSP düzeyi ile hastalığın evresi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (6). Yassı hücreli ösefagus kanserleri üzerine yapılan başka bir çalışmada TSP' nin kanserli hücrelerin gelişiminde önemli bir rol oynadığı, tümörün gelişmesine ve metastaz yapmasına katkıda bulunduğu saptanmıştır. Plazma TSP düzeyinin tümörün venöz invazyonunu ve lenf bezi tutulumunu saptamada yararlı bir indikatör olduğu bulunmuştur (69).

Ohtani ve arkadaşları (70) tarafından yapılan başka bir çalışmada, TSP' nin safra kesesi adenokarsinomlarının gelişmesinde ve metastazında önemli bir rol oynadığını bulmuşlar ve bunun venöz invazyonu ve lenf bezi tutulumunu saptamada yararlı bir indikatör olduğu belirtmişlerdir.

Clezardin ve arkadaşları (71) meme kanseri dokusunda TSP' nin fazlaca eksprese olduğunu göstermişlerdir. Ancak, meme kanserinde TSP' nin ne gibi bir rol oynadığını açıklayamamışlardır. Buna karşılık; Albo ve arkadaşları (72) TSP ve IGF-beta' nın

urokinaz plazminojen aktivatörü (uPA) ve reseptörünü (uPAR) upregüle ederek meme ve pankreas kanserinde tümörün dokuyu invaze etmesini sağladığını göstermişlerdir.

Hayashi ve arkadaşları (73) hepatoselüler karsinom dokusunu ışık ve elektron mikroskobu ile anti-human antikorunu kullanarak incelemişler ve TSP' nin hem tümör dokusunda hem de endotel ve tümörü çevreleyen fibroblastlarda sentezlendiğini bulmuşlardır. TSP'nin, yassı hücreli karsinom, gliom ve melanom hücrelerinin yayılmasını ve ulaştıkları dokulara yapışmasını sağladığı da gösterilmiştir (3,30,31,74).

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Denekler

Bu çalışma; Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı'nda yatmış ve yeni tanı alıp kemoterapi/radyoterapi uygulanmamış olan çeşitli hematolojik maligniteli 53 hasta (26 erkek, 27 kadın, ortalama yaş 49, yaş aralığı 19-77) ile bilinen herhangi bir akut veya kronik hastalığı olmayan ve ilaç kullanmayan 31 sağlıklı erişkin (17 erkek, 14 kadın, ortalama yaş 44, yaş aralığı 23-70) kontrol grubu olarak çalışmaya alındı (Tablo-2, Tablo-3).

Olguları istatistik analiz için 5 gruba (LPH, AL, MM, MDS/KML, Kontrol) ve 6 altgruba (NHL, KLL/HCL, AML, MM, MDS/KML ve Kontrol) ayrıldı. ALL ve Hodgkin altgrupları olgu sayılarının azlığı nedeniyle altgrup karşılaştırmalarına alınmadı.

Tablo-2. Hastaların tanılarına göre dağılımı

---

HASTALAR.....	53
Lenfoproliferatif Hastalık .....	19
NHL .....	10
KLL/HCL .....	6
HL .....	3
Akut Lösemi .....	17
AML .....	12
ALL .....	5
Multiple Myeloma .....	10
MDS/KML .....	7
MDS .....	4
KML .....	3
KONTROLLER.....	31

---

**Tablo-3.** Hastaların yaş, cinsiyet ve tanı özellikleri

Yaş/Cins	Tanı	Evre
30/K	NHL / Difüz büyük hücreli	IE
30/K	NHL / Difüz büyük hücreli	IVB
31/K	NHL / Difüz küçük büyük hücreli	IIIB
54/E	NHL / Difüz büyük hücreli	IVB
37/K	NHL / Difüz küçük büyük hücreli	IE
47/K	NHL / Difüz büyük hücreli	IVB
55/K	NHL / Difüz küçük büyük hücreli	IVB
57/K	NHL / Difüz küçük büyük hücreli	IVA
59/K	NHL / Difüz küçük hücreli	IVB
67/E	NHL / Difüz küçük büyük hücreli	IVB
32/K	HL / Lenfosit zengin tip	IE
33/E	HL / Mikst selüler tip	IIA
46/E	HL / Mikst selüler tip	IIB
51/E	KLL	III
75/E	KLL	III
67/K	KLL	IV
49/E	KLL	III
47/E	KLL	IV
69/E	KLL	III
73/K	AML / M2	

Tablo-3 (devam)

Yaş/Cins	Tanı	Evre
60/K	AML / M5	
26/E	AML / M5	
60/E	AML / M7	
35/E	AML / M4	
34/K	AML / M2	
32/K	AML / M4	
62/K	AML / M4	
20/E	AML / M5	
62/E	AML / M3	
33/E	AML / M2	
26/E	AML / M2	
20/E	ALL / L2	
30/K	ALL / L2	
36/K	ALL / L2	
40/E	ALL / L2	
49/K	ALL / L3	
67/E	MM / IgG-Lambda	IIA
53/K	MM / Free Kappa	IA
45/K	MM / IgG-Kappa	IIB

## Tablo-3 (devam)

Yay/Cins	Tani	Evre
43/E	MM / IgA-Lambda	IIA
50/E	MM / IgG-Lambda	IIA
58/E	MM / IgG-Kappa	IA
19/K	MM / IgG-Lambda	IIIB
58/E	MM / IgA-Kappa	IIA
60/E	MM / IgG-Kappa	IIA
51/E	MM / IgA-Lambda	IIIB
26/K	MDS / RAEB	
34/E	MDS / RAEB	
77/K	MDS / CMML	
39/K	MDS / CMML	
52/K	KML	
55/K	KML	
60/K	KML	

### 3.2 Kan örneklerinin alınması

Örneklerin alımı sırasında trombositlerin aktivasyonu ve kanın pıhtılaşmasını önlemek için azami dikkat gösterildi. Kan örnekleri venöz staz uygulanmaksızın alındı ve ilk 1-2 ml'si atıldı. Sonraki 4-5 ml'si, *in vitro* trombosit agregasyonunun ve trombosit salıverme reaksiyonunun önlenmesi için sodyum sitrat, teofilin, adenozin ve dipiridamol içeren özel tüplere alındı (Diatube-H, Diagnostica Stago, Fransa) ve hemen buzlu su banyosuna yerleştirildi. Su banyosunda en az 15 dakika bekletilen örnekler ilk 1 saat içerisinde  $+4^{\circ}\text{C}$  de 2500 g'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant plazmanın orta 1/3' ü alınarak  $-70^{\circ}\text{C}$  de çalışma zamanına dek saklandı.

### 3.3. Thrombospondinin ölçümü

TSP' nin kantitatif ölçümü, ticari hazır kit (Asserachrom, Thrombospondin, Diagnostica Stago, Asnieres, France) kullanarak ve üretici firmanın yönergesi doğrultusunda ELISA yöntemiyle gerçekleştirildi.

Plazma örnekleri, spesifik anti-human TSP antikoru ile önceden kaplanmış kuyucuklara yerleştirilerek "capture" sağlandı. Ardından "tavşan anti-TSP" peroksidaz kojugatı eklenerek "sandwich" oluşturuldu. Ortho-phenylenediamine /  $\text{H}_2\text{O}_2$  substratı eklenerek renk değişimi sağlandı. Güçlü asit solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve oluşan renk değişimi mikropalak okuyucusundan (Eurogenetics, Belçika) 492 nm'de okundu. Kitin içerisinde yer alan standart TSP solüsyonu kullanılarak log-log grafik kağıt üzerinde elde edilen kalibrasyon eğrisi ile plazma örneklerinin TSP sonuçları okundu.

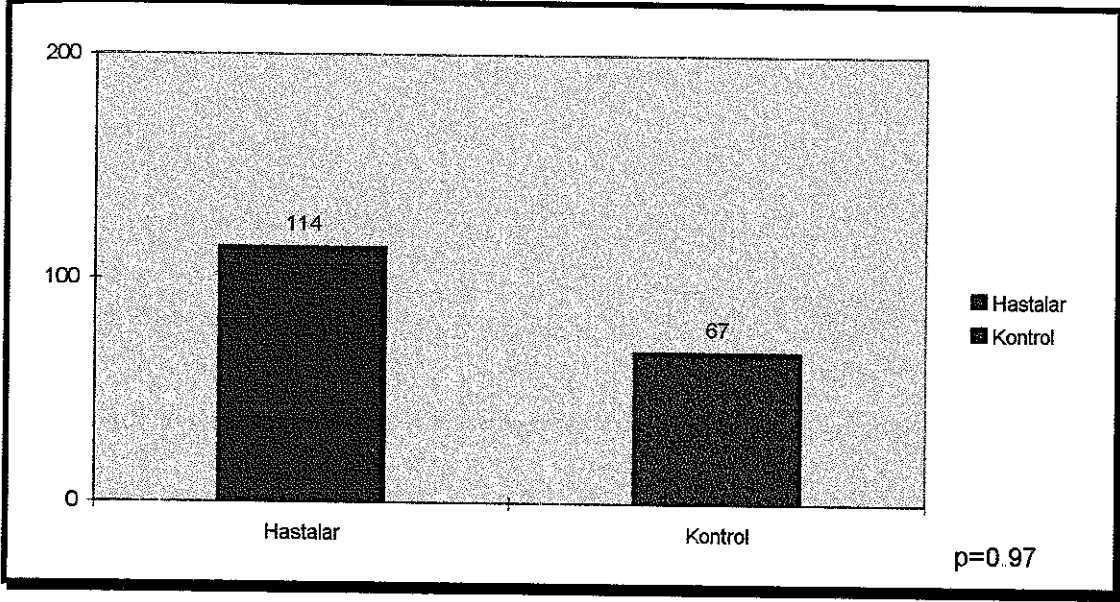


### 3.4. İstatistik

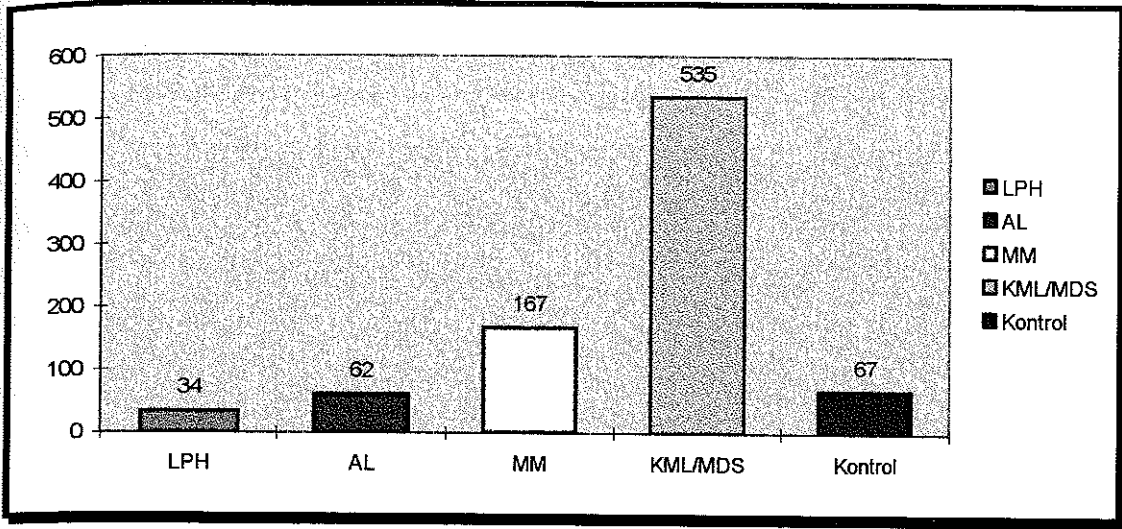
Gruplar arasında genelde bir farklılığın olup olmadığı Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. Grupların ikili karşılaştırılmaları için Mann-Whitney "U" testi kullanıldı. Plazma TSP düzeyi ile trombosit sayısı arasındaki korelasyon Spearman' s rank korelasyon testi ile analiz edildi.  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edildi. Tablo ve şekillerde değerler median (range) olarak verildi.

#### 4 SONUÇLAR

1. Trombosit sayısı ile plazma TSP düzeyi arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı (veri gösterilmedi). Bu nedenle diğer istatistik karşılaştırmalarda olguların ham TSP düzeyleri kullanıldı.
2. Tüm hastalar ele alındığında; hastaların median plazma TSP düzeyi [114 (1-1382) ng/ml] sağlıklı bireylerinkinden [67 (5-1387) ng/ml] farksız bulundu ( $p=0.97$ ) (Şekil-1).
3. Kontrol grubu da dahil olmak üzere tüm grupların genel analizi, gruplar arasında plazma TSP düzeyi açısından anlamlı bir fark olmadığını gösterdi ( $p=0.21$ ). Buna karşın grupların ikişer ikişer birbirleri ile olan kıyaslamalarında sadece MDS/KML grubunun median plazma TSP düzeyi akut lösemi grubununkinden anlamlı olarak yüksek bulundu [ sırasıyla 535 (32-1220) ve (62 (1-1007) ng/ml] ( $p=0.045$ ) (Şekil-2, Tablo-4).
4. Kontrol grubu da dahil olmak üzere tüm altgrupların analizi, gruplar arasında median plazma TSP düzeyi açısından anlamlı bir fark olduğunu gösterdi ( $p=0.0024$ ) (Şekil-3, Tablo-5).
5. NHL alt grubunun median plazma TSP düzeyi ALL dışındaki alt grupların hepsinden belirgin olarak daha düşüktü (Tablo-5).
6. Diğer alt grupların birbirleri ve sağlıklı kontrol grup ile aralarında anlamlı bir fark yoktu (Tablo-5).



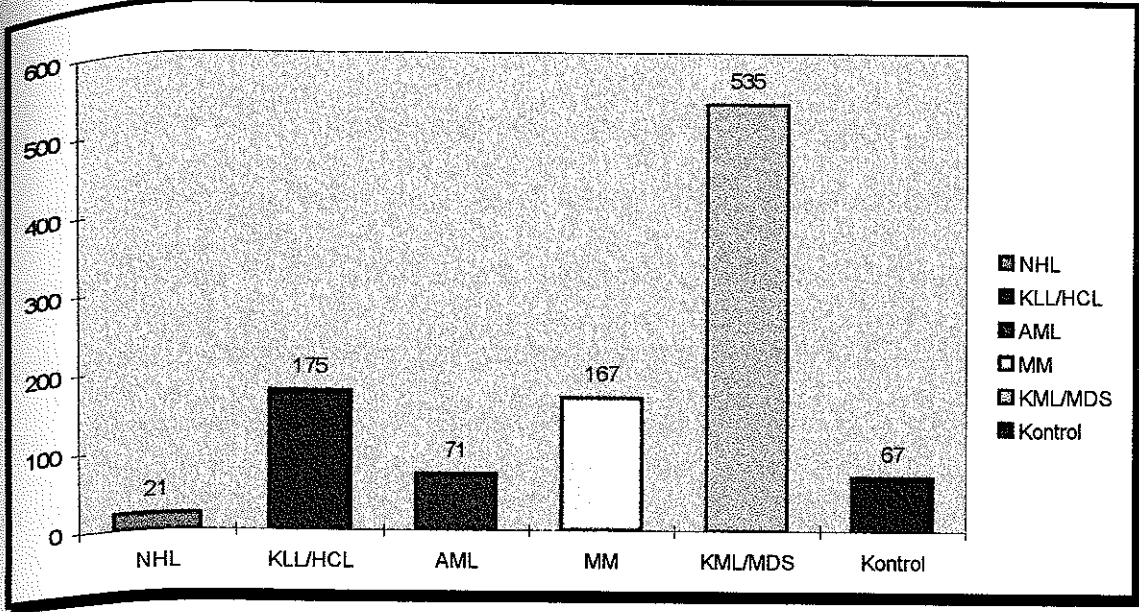
Şekil -1. Hasta ve kontrol gruplarının plazma TSP değerleri



Şekil 2. Grupların ve kontrol grubunun plazma TSP değerleri

LPH				
AL	1.0000			
MM	0.2680	0.2050		
MDS/KML	0.0880	0.0450	0.3150	
Kontrol	0.4120	0.4190	0.3640	0.0790
	LPH	AL	MM	MDS/KML

Tablo-4. Gruplara göre "p" değerleri



Şekil-3. Altgruplara göre plazma TSP düzeyleri

NHL					
KLL/HCL	0.0260				
AML	0.0250	0.1900			
MM	0.0025	0.6370	0.3200		
KML/MDS	0.0250	0.0568	0.0630	0.1200	
Kontrol	0.0011	0.2200	0.6450	0.3480	0.0798
	NHL	KLL/HCL	AML	MM	KML/MDS

Tablo-5. Altgruplara göre "p" değerleri.

## 5.TARTIŞMA

TSP, trombositlerde, megakaryositlerde, monositlerde, kapiller endotelinde ve monellilerin epitelinde bulunan, molekül ağırlığı 450.000 dalton olan adheziv bir glikoproteindir (1). TSP, hematopoetik progenitör hücrelerin de arasında bulunduğu birçok farklı, malign ve benign hücrenin adezyonunu, hareketini ve büyümesini sağlar, yavaş dokunun malign hücrelerle invazyonunu stimüle ederek tümöral gelişime yardımcı olur. Bu özellikleri ile önemli bir tümöral büyüme ve metastaz faktörü olarak ilgi görmektedir. TSP'nin, *in vivo* ortamda bazı tümörlerin büyümesini ve metastazını bastırdığı ve angiogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir. Ancak, bu etki tümöral hücre tipine göre değişmektedir. TSP, bazı hücre tipleri üzerinde ise, stimüle edici olarak etki göstermekte ve tümör gelişimini hızlandırmaktadır (2-4).

İnekolojik ve gastrointestinal tümörü olan hastalarda plazma TSP düzeylerinin sağlıklı insanlara oranla daha yüksek olduğu gösterilmiştir (5,6,68). Karaciğer metastazı olan mide ve kolorektal kanserlerde metastazı olmayan olgulara oranla oldukça yüksek plazma TSP düzeyleri saptanmıştır. Benzer şekilde; metastatik meme ve akciğer kanserlerinde de metastatik olmayan olgulara ve sağlıklı insanlara oranla plazma TSP düzeyinde 2 ila 3 kata ulaşan artışlar bildirilmiştir. Buna dayanılarak tümör yükü ile plazma TSP düzeyi arasında bir ilişki olabileceği düşünülmüştür (4). Bu yüksekliğin nedeninin tümör tarafından gerçekleştirilen venöz invazyon olduğunu sanılmaktadır (58-64). Kolorektal kanserler üzerine yapılan bir çalışmada plazma TSP düzeyi ile venöz

invazyonun derecesi arasında lineer bir ilişki saptanmış olması bu düşüncüyü desteklemektedir Yamashita ve arkadaşları da (65) yaptıkları çalışmada, venöz invazyon gösteren kolorektal kanser olgularında venöz invazyon göstermeyenlere oranla plazma TSP düzeyini yüksek bulmuşlardır. Bu bulgu tümörün venöz invazyon sonucunda trombositleri aktive ettiğini ve aktive olan trombositlerin de TSP salgıladığının bir göstergesidir (65). TSP' nin, yassı hücreli ösefagus kanserinin gelişiminde önemli bir rol oynadığı, tümörün gelişmesine ve metastaz yapmasına katkıda bulunduğu saptanmıştır. Plazma TSP düzeyinin tümörün venöz invazyonunu ve lenf bezi tutulumunu saptamada yararlı bir indikatör olduğu bulunmuştur (69)

Biz, tüm olgularımız ele alındığında TSP düzeylerini sağlıklı bireylerinkinden farksız bulduk ( $p=0.97$ ). NHL grubunun median plazma TSP düzeyi ALL dışındaki grupların hepsinden ve sağlıklı bireylerinkinden anlamlı olarak düşüktü.

Düzgün ve arkadaşları (7) AML' li hastalarda solid tümörlerden farklı olarak, plazma TSP düzeyi sağlıklı bireylere oranla anlamlı olarak düşük bulunurken, bu düşük değer çalışmaya alınan hastaların trombosit sayılarının azlığı ile açıklanmıştır. Biz; akut lösemili olgularımızı, sağlıklı bireylerle karşılaştırdığımızda plazma TSP düzeyi açısından anlamlı bir fark bulmadık. Ancak akut lösemili olgularımızın plazma TSP düzeyi MDS/KML altgrubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşüktü ( $p=0.045$ ). Akut lösemili hastalardaki endotel hasarının varlığını dikkate alarak yüksek, en azından normal değerler bulmayı beklemekteydik. Bu düşük değerlerin nedeni çalışmaya alınan hastaların trombosit değerlerindeki düşüklük olabilir (7). Bilindiği gibi TSP, trombositlerin  $\alpha$ -granüllerinde

bulunmaktadır. İnsan megakaryositik lösemi hücre dizilerinde,  $\alpha$ -granüllerinin immunohistokimyasal metodlarla boyanması sonucunda bu granüller içindeki TSP' in varlığı gösterilmiştir (75,76) Bu bulgular, AML-M7 tanısı almış olgularda saptanan yüksek plazma TSP düzeyini destekler niteliktedir (67) Buna ek olarak; megakaryositik seri lösemilerinde ve MEG-01 ve HEL gibi megakaryositik lösemi hücre dizilerinde TSP reseptörü olan CD36 antijeni hem sentezlenmekte hem de eksprese edilmektedir (77). CD36, trombositlerin yanı sıra megakaryositlerde, mositlerde, kapiller endotelinde ve memeli epitelinde de bulunan major glikoproteinlerinden biridir ve TSP ile etkileşime girebilen bir hücre adezyon reseptörüdür (55,56). CD 36, hemostaz, tromboz, malarya enfeksiyonu, inflamasyon, lipid metabolizması ve aterogenez gibi bir çok metabolik olayda önemli rol oynadığı kanıtlanmıştır (57). CD36, insan B lenfositlerince eksprese ediliyor olamamasına karşın; insan B hücre kökenli anjiotropik lenfomada da CD36 ekspresyonu gösterilmiştir CD36' nın burada lenfoblastların endotele adezyonunda rol oynadığı düşünülmüştür. KLL' de bulunan CD19 pozitif B lenfositlerinde de CD36' nın varlığı gösterilmiştir CD36 pozitif KLL olgularında tümör yayılımının daha hızlı olduğu bilinmektedir (78) MM' de plazma TSP düzeyi ile CD36 ilişkisi üzerine herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

MM, B hücre kökenli, kemik iliğinde olgun, monoklonal plazma hücreleri ile karakterize hematolojik bir malignitedir (79). MM hücrelerinin belirgin bir özelliği, bu hücrelerin hastalığın genel süreci içerisinde kemik iliğinde kalmaya olan eğilimleridir (80) MM' de her ne kadar egemen olan hücreler olgun plazma hücreleri ise de, plazma hücrelerinin öncüsü konumundaki immatür B hücreleri de oldukça fazladır İmmatür B hücreleri



hastalığın ilerleyen evrelerinde sayıca artarak dolaşımda görünür hale gelirler. Bu immatür hücrelerin hastalığın diğer dokulara yayılmasında ve "homing" üzerinde önemli rolü vardır (79,81). Bu şekildeki immatür hücrelerin dolaşımda görülmesi, bu hücrelerin endotele bağlanmasını sağlayan adezyon molekülleri ile donatıldığını göstermektedir (80). Kemik iliğindeki plazma hücreleri de stromal elmanlarla etkileşime girebilen birçok adezyon molekülünü eksprese ederler (82). Tenascin, laminin, FNC, kollajen tip I, III, V ve IV, MM' lu hastaların kemik iliği kryopresipitatlarında saptanmıştır (83). Myeloma hücre dizileri FNC' e bağlanabildikleri gibi kendileri de FNC üretebilirler. Yapılan fonksiyonel çalışmalar FNC' in myeloma hücrelerinin stromaya bağlanmasında çok az rol oynadığını esas rolün diğer adezyon moleküllerince oynandığını göstermektedir (81). Biz çalışmamızda MM' li hastalarda solid tümörlerin yayılımında önemli rolü olan TSP' nin plazma düzeyini sağlıklı kontrollerden farklı bulmadık. Bugüne kadar; MM' da TSP düzeylerini yansıtan başka bir çalışmaya da rastlamadık.

NHL, birçok adezyon molekülü eksprese ederler. Bu moleküller yalnızca lenfosit trafiğine yardımcı olmazlar aynı zamanda NHL' nin yayılmasında da önemli rol oynarlar. Kütanöz lenfosit antijeni, alfa 4 beta 7, alfa E beta 7 ve L-selektin gibi moleküller sırası ile cilt, mukoza, epitel ve lenf bezlerinde lenfositlerin yerleşmesini sağlarlar. Bu bölgelerde ortaya çıkan lenfomalar bu molekülleri kuvvetle eksprese ederler (83). Genelde; CD36 insan B-lenfositlerinde her zaman eksprese olan bir antijen değildir. Yukarıda sözü edildiği gibi yakın zamanda B hücre kökenli angiotrophic lenfoma CD36 ekspresyonu gösterilmiştir. Olasılıkla bu antijen lenfoblastların endotele olan adezyonlarını gerçekleştirmektedir. CD19 pozitif B hücre kökenli KLL olgularında eş

zamanlı olarak CD36 ekspresyonu da saptanmıştır. Bu bulgu, CD36' nın B hücre kökenli KLL olgularında tümör hücrelerinin yayılımından sorumlu olduğunu desteklemektedir (78). Biz çalışmamızda NHL'lı olgularımızın TSP düzeylerini diğer hastalık gruplarından ve sağlıklı kontrollerden bile düşük bulduk. Aslında; CD36 ile "homing" arasındaki ilişkiyi göz önüne alınca plazma TSP düzeyini yüksek beklerdik. Bunun nedeni NHL'lı hastalarımızın kemik iliği tutulumu ve buna bağlı megakaryosit ve trombosit sayılarındaki düşüklük ve sonuç olarak gelişen TSP üretimindeki azlık olabilir (67). Ancak hastalarımızın kemik iliği tutulumu olmasına karşın trombosit sayıları normaldi. Bu nedenle üretimden kaynaklanan bir plazma TSP düzeyi düşüklüğü olası görünmemektedir.

Plazmadaki TSP' nin dolaşımdan kaçışı dolayısı ile kapillary sızdırma buna neden olabilir. Bilindiği gibi tümörün mikrovasküler yapısı sağlıklı dokulara kıyasla makromoleküllere daha geçirgendir. Buna bağlı olarak da dolaşımdaki makromoleküllerin tümöral dokuya kaybı söz konusu olabilir (84). Bunu göstermek için lenfoma dokusundaki TSP düzeyinin ölçüldüğü çalışmaların yapılması gereklidir.

Fare modelinin kullanıldığı bir çalışmada TSP' nin pıhtı oluşumu ve tümör hücrelerinin adezyonunu artırarak tümör hücrelerinin yayılımını sağladığı görülmüştür. Ancak insanda aynı mekanizmanın işleyip işlemediği spekülasyona açık bir konudur (5). Bununla birlikte, yaklaşık 100 yıl önce Trousseau'nun (85) gastrointestinal malignitesi olan hastalarda gözlemlediği tromboflebit dolaylı olarak bu şekildeki bir mekanizmanın insandaki varlığı desteklemektedir. Otopsi yapılan kanser hastalarının yaklaşık %50' sinde

tromboemboliye rastlanmaktadır (86). Birçok malignitede rastlanan artmış trombosit aktivasyonu ve hiperagregabilite de TSP'nin metastaz oluşumundaki rolünü destekler (87). TSP, akciğer kanseri olgularında TGF- $\beta$ 1'i aktive ederek plazminojen aktivatör sistemini harekete geçirir. Böylece hücresele uPA ve PAI üretimi artar. TSP, üretimi artan plazminojen ve uPA'ya bağlanır (88). NHL'li olgularımızdaki plazma TSP düzeyindeki düşüklük bu bağlanma nedeni ile düşük olabilir.

Sonuç olarak; hematolojik malignitelerde solid malignitelerden farklı olarak normal ya da düşük plazma TSP düzeyleri ile karşılaşmamız sürpriz oldu. Bu durumu açıklamak için yaptığımız tüm yorumlar spekülatiftir. Daha açıklayıcı yorumlarda bulunabilmek için hasta sayısının daha çok olduğu çalışmaların yapılması gereklidir. Hasta sayısının çok olduğu çalışmalarda da plazma TSP düzeyleri yine normal ya da yüksek çıkarsa bu düşüklüğün nedenini aydınlatmak için TSP düzeyinin fibrinolitik parametrelerle ilişkisini, "kapiller leak" açısından işaretli TSP'nin doku dışına kaçıp kaçmadığının gösterilmesini ve daha genelinde de bu hastaların TSP üretim-tüketim kinetiğini gösterecek çalışmaların yapılması gerekmektedir. Aslında plazma TSP düzeylerindeki düşüklük belki de hematolojik malignitelerin biyolojilerinin solid malignitelerin biyolojilerinden farklılığının bir göstergesi olarak da ele alınabilir.

## 6.ÖZET

TSP, trombositler, megakaryositler, endotel hücreleri , düz kas hücreleri, fibroblastlar, pnömositler, makrofajlar, monositler ve tümör hücreleri tarafından salgılanan adhesiv özellik gösteren bir glikoproteindir

Melanom, fibrosarkom birçok tümör hücre dizisi TSP üretir . Kültür ortamında birçok hücrenin TSP' yi sentezlediği ve salgıladığı gösterilmiştir TSP'nin tümör metastazında çok önemli oynadığı bilinmektedir. Jinekolojik, gastrointestinal kanserlerde, karaciğer metastazı olan mide ve kolorektal kanserlerde, metastatik meme ve akciğer kanserlerinde TSP düzeyinde 2 ila 3 kata ulaşan artışlar bildirilmiştir. AML' li hastalarda solid tümörlere farklı olarak, plasma TSP düzeyi sağlıklı bireylere oranla anlamlı olarak düşük bulunurken, bu düşük değer çalışmaya alınan hastaların trombosit sayılarının azlığı ile açıklanmıştır.

Bu çalışmada 53 hematolojik maligniteli hasta ile 31 sağlıklı erişkinin plazma TSP düzeyleri "sandwich" ELİZA yöntemi ile ölçülerek kıyaslanmıştır.

Tüm hastalar ele alındığında hastaların serum TSP düzeyi sağlıklı bireylerinkinden farksız bulundu ( $p=0.97$ ) Kontrol grubu da dahil olmak üzere tüm grupların analizi, gruplar arasında TSP düzeyi açısından anlamlı bir fark olmadığını gösterdi ( $p=0.21$ ) Bununla birlikte grupların ikişer ikişer birbirleri ile olan kıyaslamalarında MDS/KML grubunun median TSP düzeyi akut lösemi grubununkinden anlamlı olarak yüksek bulundu (

p=0.045) Kontrol grubu da dahil olmak üzere tüm altgrupların analizi, altgruplar arasında TSP düzeyi açısından anlamlı bir fark olduğunu gösterdi (p=0.0024)

NHL'li hastalarda sağlıklı kontrollere ve diğer tanı gruplarına oranla düşük plazma TSP düzeyinin saptanmasının nedeni bu olgularda rastlanan kapillary sızdırma ve buna bağlı olarak gelişen PAI aktivasyonu ve TSP' nin bu moleküle bağlanarak dolaşımdan uzaklaşması olabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak; hematolojik malignitelerde solid malignitelerden farklı olarak normal ya da düşük plazma TSP düzeyleri ile karşılaşmamız sürpriz oldu. Açıklayıcı yorumlarda bulunabilmek için hasta sayısının daha çok olduğu çalışmaların yapılması gereklidir. Aslında plazma TSP düzeylerindeki düşüklük belki de hematolojik malignitelerin biyolojilerinin solid malignitelerin biyolojilerinden farklılığının bir göstergesi olarak da ele alınabilir.

## 7.SUMMARY

TSP is an adhesive glycoprotein secreted by different types of cells, namely thrombocytes, endothelial cells, smooth muscle cells, fibroblasts, macrophages, monocytes and tumor cells

Many tumor cell lines like melanoma, fibrosarcoma produce TSP. It was shown that many cells in cultures produce TSP. It is well-known that TSP plays an important role in tumor metastasis. TSP secretion increases up to 2 to 3 times in many malignancies like gynecological, gastrointestinal, stomach and colorectal tumors with liver metastasis and metastatic breast and lung tumors. Plasma levels of TSP in AML patients unlike solid tumors is significantly low in comparison to healthy controls. It is explained by low thrombocyte counts of these patients

In this study plasma TSP levels of 53 patients with hematological malignancy (10 NHL, 3 HL, 6 KLL/HCL, 12 AML, 5 ALL, 4 MDS, 3 KML) and 31 healthy controls were measured by sandwich ELISA method and then compared.

Overall plasma TSP level of patients is not different from that of healthy controls ( $p=0.97$ ). Overall analysis of all groups including controls revealed no difference of plasma TSP levels ( $p=0.21$ ). Furthermore pairwise comparison of groups showed that median plasma TSP level of MDS/KML group was significantly high in comparison to

that of acute leukemia group ( $p=0.045$ ) Overall analysis plasma TSP levels of all subgroups including controls revealed a significant difference among them ( $p=0.0024$ ).

Capillary leakage and resulting PAI activation and binding of TSP to this molecule are thought as possible mechanisms explaining significantly low plasma TSP levels in NHL patients.

As a result, we are surprised by low plasma TSP levels in hematological malignancies unlike solid malignancies. Studies holding more patients are needed. Actually low plasma levels of TSP is an indicator of difference biology between hematologic and solid malignancies.

**8.KAYNAKLAR**

1. Frazier WA. Thrombospondin: A modular adhesive glycoprotein of platelets and nucleated cells. *J Cell Biol* 1987;105:625-632.
2. Roberts DD. Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-I. *FASEB J* 1996;10(10):1183-1191.
3. Tuszynski GP, Rothman V, Murphy A, Siegler K, Smith L, et al Thrombospondin promotes cell-substratum adhesion. *Science* 1987;236:1570-1573.
4. Hosokawa T, Murasis A, Rothman VL, Papale M, Tuszynski GP. The effect of thrombospondin on invasion of fibrin gels by human A549 lung carcinoma. *Oncol Res* 1993;5:5183-5189.
5. Tuszynski GP, Smith M, Rothman VL, Capuzzi Dd, Joseph RR, Katz J. Thrombospondin levels in patients with malignancy. *Thromb Haemost* 1992;67:607-611.
6. Nathan FE, Hernandez E, Dunton CJ, Treat J, Switalska HI, Joseph RR, et al Plasma thrombospondin levels in patients with gynecologic malignancies. *Cancer* 1994;73:2853-2858.



7. Özatlı D, Koçoğlu H, Haznedaroğlu İC, Koşar A, Büyükaşık Y, Özcebe O, Kirazlı Ş, Dündar S. Circulating thrombomodulin, thrombospondin and fibronectin in acute myeloblastic leukemias *Hematologia* 1999;29(4):277-283
8. Baenziger NL, Brodie GN, Majerus PW. A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68:240-243
9. Baenziger NL, Brodie GN, Majerus PW. Isolation and properties of a thrombin-sensitive protein of human platelets *J Biol Chem* 1972;247:2723
10. Lawler JW, Slayter HS, Coligan JE. Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets *J Biol Chem* 1978;253:8609-8616
11. Lawler JW, Chao FC, Fang PH. Observation of a high molecular weight platelet protein released by thrombin *Thromb Haemost* 1977;37:355
12. Margossian SS, Lawler JW, Slayter HS. Physical characterization of platelet thrombospondin. *J Biol Chem* 1981;256:7495
13. Lawler JW, Slayter HS. The release of heparin-binding peptides from platelet thrombospondin by proteolytic action of thrombin, plasmin and trypsin *Thromb Res* 1981;22:267

14. Lawler J, Derick LH, Connolly JE, Chen JE, Chao FC The structure of human platelet thrombospondin J Biol Chem 1985;260:3762
15. Coligan JE, Slayter HS. Structure of thrombospondin J Biol Chem 1984;259:3944
16. Galvin NJ, Dixit VM, O'Rourke KM, Santoro SA, Grant GA, Fraizer WA Mapping of epitopes for monoclonal antibodies against human platelet thrombospondin with electron microscopy and high sensitivity amino acid sequencing J Cell Biol 1985;101:1434
17. Dixit VM, Grant GA, Santoro SA, Fraizer WA Isolation and characterization of a heparin-binding domain from the amino terminus of platelet thrombospondin J Biol Chem 1984;259:10100.
18. Raugi GS, Mumby SM, Ready CA, Bornstein P. Location and partial characterization of the heparin-binding fragment of platelet thrombospondin Thromb Res 1984;36:165.
19. Clementson KJ, Capitano A, Pareti FL, McGregor IL, Luscher EF Additional platelet membrane glycoprotein abnormalities in Glanzmann's thrombasthenia: A comparison with normals by high resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis Thromb Res 1980;18:797

20. Mosher DF, Doyle MF, Jaffe EA. Synthesis and secretion of thrombospondin by cultured human endothelial cells. *J Cell Biol* 1982;93:343-348
21. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680.
22. Weber K, Osborn M. Proteins and sodium dodecyl sulfate molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures, in Neurath H (ed): *The proteins*, vol 1. Orlando, Fla, Academic Press, 1975, p 179
23. O'Shea KS, Rheinheimer JST, Dixit VM. Deposition and role of thrombospondin in the histogenesis of the cerebellar cortex. *J Cell Biol* 1990;110:1275-1284
24. McPherson J, Sage H, Bornstein P. Isolation and characterization of a glycoprotein secreted by aortic endothelial cells in culture: apparent identity with platelet thrombospondin. *J Biol Chem* 1981;256:11300-11336
25. Raugi GJ, Mumby SM, Abbott-Brown D, Bornstein P. Thrombospondin synthesis and secretion by cells in culture. *J Cell Biol* 1982;95:351-354
26. Jaffe Ea, Ruggiero JT, Leung LLK, Doyle MJ, McKeown-Longo PJ, Mosher DF. Cultured human fibroblasts synthesize and secrete thrombospondin and incorporate it into extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;80:998-1002

27. Sage H, Farin FM, Striker GE, Fisher AB. Granular pneumocytes in primary culture secrete several major components of the extracellular matrix. *Biochemistry* 1983;22:2148-2155.
28. Jaffe EA, Ruggiero JT, Falcone DJ. Monocytes and macrophages synthesize and secrete thrombospondin. *Blood* 1985;65:79-84.
29. Mosher DF. Physiology of thrombospondin. *Annu Rev Med* 1990;41:85-97.
30. Riser BL, Varani J, O'Rourke K, Dixit VM. Thrombospondin binding by human squamous carcinoma and melanoma cells. *Exp Cell Res* 1988;174:319-329.
31. Varani J, Riser BL, Hughes LA, Carey TE, Fligel SEG, Dixit VM. Characterization of thrombospondin synthesis, secretion and cell surface expression by human tumor cells. *Clin Exp Met* 1989;7:265-276.
32. Tuszyński GP, Gasic TB, Rothman VL, Knudsen KA, Gasic GJ. Thrombospondin potentiates tumor cell metastasis. *Cancer Res* 1987;47:4130-4133.
33. Yabkowitz R, Love JB, Dixit VM. Expression and initial characterization of a recombinant human thrombospondin heparin binding domain. *J Biol Chem* 1989;264:10888-10896.

34. Prochownik EV, O'Rourke K, Dixit VM Expression and analysis of c-terminal deletions of the human thrombospondin molecule J Cell Biol 1989;109:843-852
35. Sun Z, Mosher DF, Rapraeger A Heparan-sulfate mediated binding of epithelial cell surface proteoglycan to thrombospondin J Biol Chem 1989;264:2885-2889
36. Majack RA, Goodman LE, Dixit VM Cell surface thrombospondin is functionally essential for vascular smooth muscle cell proliferation. J Cell Biol 1988;106:415-423
37. Lawler J, Chao FC, Cohen CM Evidence for calcium-sensitive structure in platelet thrombospondin: Isolation and partial characterization of thrombospondin in the presence of calcium. J Biol Chem 1982;257:12257
38. Lawler J, Weinstein R, Hynes RO. Cell attachment to thrombospondin; the role of ARG-GLY-ASP, calcium and integrin receptors. J Cell Biol 1988;107:2351-2361.
39. Clezaedin P, Malaval L, Ehrensperger AS, Delmas PD, Dechavanne M, McGregor JL. Complex formation of human thrombospondin with osteonectin Eur J Biochem 1988;175:275-284.
40. Aiken ML, Ginsberg MH, Plow EF. Divalent cation-dependent and independent surface expression of thrombospondin on thrombin-stimulated human platelets Blood 1987;69:58-64.

41. Leung LLK, Nachman RL. Complex formation of platelet thrombospondin with fibrinogen. *J Clin Invest* 1982;70:542-549.
42. Gartner TK, Williams DC, Minion FC. Thrombin-induced platelet aggregation is mediated by a platelet plasma membrane-bound lectin. *Science* 1978;200:1281.
43. Lahav J, Lawler J, Gimrone MA. Thrombospondin interactions with fibronectin and fibrinogen: Mutual inhibition in binding. *Eur J Biochem* 1984;145:151.
44. Tuszynski GP, Srivastava S, Switalska HI, Holt JC, Cierniewski CS, Niewiarowski S. The interaction of human platelet thrombospondin with fibrinogen. Thrombospondin purification and specificity of interaction. *J Biol Chem* 1985;260:12240-12245.
45. Lahav J, Schwartz MA, Hynes RO. Analysis of platelet adhesion with radioactive chemical crosslinking reagent: Interaction of thrombospondin with fibronectin and collagen. *Cell* 1982;31:253.
46. Dardik R, Lahav J. Multiple domains are involved in the interaction of endothelial cell thrombospondin with fibronectin. *Eur J Biochem* 1989;185:581-588.
47. Mumby SM, Raugi GJ, Bornstein P. Interactions of thrombospondin with extracellular matrix proteins: Selective binding to type V collagen. *J Cell Biol* 1984;98:646.

- 48 Leung LLK, Nachman RL, Harpel PC. Complex formation of platelet thrombospondin with-histidine rich glycoprotein. *J Clin Invest* 1984;73:5
- 49 Lijnen HR, Hoylaerts M, Collen D. Isolation and characterization of a human plasma protein with affinity for lysine binding sites in plasminogen. *J Biol Chem* 1980;225:10214
- 50 Silverstein RL, Leung LLK, Harpel PC, Nachman RL. Complex formation of platelet thrombospondin with plasminogen. Modulation of activation by tissue activation. *J Clin Invest* 1984;74:1625
- 51 Silverstein RL, Leung LLK, Harpel PC, Nachman RL. Platelet thrombospondin forms a trimolecular complex with plasminogen and histidine-rich glycoprotein. *J Clin Invest* 1985;75:2065
- 52 Takahashi K, Aiken M, Fenton JW, Walz DA. Thrombospondin fragmentation by  $\alpha$ -thrombin and resistance to  $\gamma$ -thrombin. *Biochem J* 1984;224:673
- 53 Hagen I, Gogstad GO, Brosstad F, Solum NO. Demonstration of  $^{125}\text{I}$ -labeled thrombin binding platelet proteins by use of crossed immunoelectrophoresis and autoradiography. *Biochem Biophys Acta* 1983;732:600

- 54 Danishefsky KJ, Alexander RJ, Detwiler IC Formation of a stable complex of thrombin and the secreted platelet protein glycoprotein G (thrombin-sensitive protein, thrombospondin) by thioldisulfide exchange *Biochemistry* 1984;23:4984
- 55 Ikeda H, Platelet membrane protein CD36 *Hokkaido Igaku Zasshi* 1999;74(2):99-104.
- 56 Tsuchida T, Kijima H, Tokunaga T, Oshika Y, Hatanaka H, et al Expression of the thrombospondin receptor CD36 is correlated with decreased stromal vascularisation in colon cancer. *Int J Oncol* 1999;14(1):47-51.
- 57 Daviet L, McGregor JL Vascular biology of CD36: roles of this new adhesion molecule family in different disease states *Thromb Haemost* 1997;78(1):65-69
- 58 Pratt DA, Miller WR, Dawes J Thrombospondin in malignant and non-malignant breast tissue *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989;25:343-350
- 59 Grinnel RS The lymphatic and venous spread of carcinoma of the rectum *Ann Surg* 1942;116:200-216.
- 60 Carrol SE The prognostic significance of gross venous invasion in carcinoma of the rectum *Can J Surg* 1963;6:281-288



61. Khankahnian N, Mavligit GM, Russell WO, Schimek M. Prognostic significance of vascular invasion in colorectal cancer of Dukes' B class. *Cancer* 1977;39:1195-1200.
62. Talbot IC, Ritchie S. The clinical significance of invasion of veins by rectal cancer. *Br J Surg* 1980;67:439-442.
63. Minsky BD, Mies C. The clinical significance of vascular invasion in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1989;32:794-803.
64. Krasna MJ, Flancbaum L, Cody RP, Shneibaum S, Ari GB. Vascular and neural invasion in colorectal carcinoma: incidence and prognostic significance. *Cancer* 1988;61:1018-1023.
65. Kam-Kei L, Munetomo E, Kiyoshi I. Venous permeation of colorectal carcinoma. *Jpn J Surg* 1980;10:288-289.
66. Yamashita Y, Kurohiji T, Tuszynski GP, Sakai T, Shirakusa T. Plasma thrombospondin levels in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1998;82:632-638.
67. Dawes J, Pratt DA, Dewar MS, Preston FE. Do extra-platelet sources contribute to the plasma level of thrombospondin? *Thromb Haemost* 1988;59:276-281.

- 68 Switalska HI, Niewiarowski S, Tuszyński GP, Rucinski B, Schmaier AH, Morinelli TA, et al. Radioimmunoassay of human platelet thrombospondin: different patterns of thrombospondin and  $\beta$ -thromboglobulin antigen secretion and clearance from the circulation. *J Lab Clin Med* 1985;106:690-700
- 69 Oshiba G, Kijima H, Himeno S, Kenmochi I, Kise Y, et al. Stromal thrombospondin-1 expression is correlated with progression of esophageal squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 1999;19(5C):4375-4378.
- 70 Ohtani Y, Kijima H, Dowaki S, Kashiwagi H, Tobita K, et al. Stromal expression of thrombospondin-1 is correlated with growth and metastasis of human gall bladder carcinoma. *Int J Oncol* 1999;15(3) 453-457.
- 71 Clezardin P, Bruno-Bossio G, Fontana A, Serre CM, Magnetto S, Frappart L. Thrombospondins, tumor angiogenesis and breast cancer. *Pathol Biol* 1999;47(4):368-374
- 72 Albo D, Berger DH, Tuszyński GP. The effect of thrombospondins-1 and TGF-beta 1 on pancreatic cancer cell invasion. *J Surg Res* 1998;76(1):86-90.
- 73 Hayashi K, Kurohiji I, Shirouzu K. Localization of thrombospondin in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997;25(3):569-574.

- 74 Roberts DD, Sherwood JA, Ginsburg V. Platelet thrombospondin mediates attachment and spreading of human melanoma cells. *J Cell Biol* 1987;104:131-139.
- 75 Hamamoto K, Ohga S, Nagano T, Kishimoto Y, Yasunaga K, Sato T. Expression of platelet alpha-granule proteins in a human megakaryocytic leukemia cell line (CMK 11-5). *Int J Hematol* 1993;58(1-2):105-112.
- 76 Ryo R, Yoshida A, Yamaguchi N. Megakaryocytic leukemia cell lines and megakaryocytic leukemia. *Rinsho Byori* 1999;38(5):514-523.
- 77 Imamura N, Mtasiwa DM, Inada I, Kuramoto A. Different expression of CD36 antigen molecule on the surface of megakaryocyte lineage leukemias and megakaryocyte leukemia cell lines MEG-01 and HEL. *Leukemia* 1990;4(7):525-528.
- 78 Rutella S, Rumi C, Puggioni P, Barberi T, Di Mario A, Larocca LM, Leone G. Expression of thrombospondin receptor (CD36) in B-cell chronic lymphocytic leukemia as an indicator of tumor cell dissemination. *Haematologica* 1999;84(5):419-424.
- 79 Van Riet I, Vanderkerken K, de Greef C, Van Camp B. Homing behavior of the malign cell clones in multiple myeloma. *Med Oncol* 1998;15(3):154-164.
- 80 Van Riet I. Homing mechanisms of myeloma cells. *Pathol Biol* 1999;47(2):98-108.

81. Van Camp B, Van Riet I Homing mechanism in biology of multiple myeloma *Verh K Acad Geneesk Belg* 1998;60(3):163-194.
82. Kibler C, Schermutzki F, Waller HD, Timpl R, Muller CA, Klein G Adhesive interactions of human multiple myeloma cell lines with different extracellular matrix proteins. *Cell Adhes Commun* 1998;5(4): 307-323.
83. Pals ST, Drillenburger P, Radaskiewicz T, Manten-Horst E Adhesion molecules in the dissemination of non-Hodgkin's lymphomas. *Acta Haematol* 1997;97(1-2):73-80
84. Dvorak HF. Leaky tumor vessels: consequences for tumor stroma generation and for solid tumor therapy. *Prog Clin Biol Res* 1990;354A:317-330
85. Trousseau A. Phlegmasia alba dolens *Clinique médicale de l'Hotel-Dieu de Paris*. The New Sydenham Society, London 1865;3:94
86. Edwards RL, Rickles FR. Hemostatic alterations in cancer patients. In: *Hemostatic Mechanisms and Metastasis* Honn JV, Sloane BF (eds) Martinus Nijhoff, Boston, IL 1984; p 343.
87. Yamamura T, Matsumoto H, Maruyama Y, et al. Clinical studies on platelet aggregation in patients with carcinoma of gastrointestinal tract. *Thromb Haemostas* 1981;46:31-35.

88 Arnoletti JP, Albo D, Granick MS, Solomon MP, Castiglioni A, et al  
Thrombospondin and transforming growth factor-beta 1 increase expression of  
urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in human  
MDA-MB-231 breast cancer. *Cancer* 1995;76:998-1005

ACDENIZ  
Mexico

RESISTE  
Luchana