

T14 99

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

HEMATOLOJİ BİLİM DALI

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

SAĞLIKLI VERİCİLERDE ÇİFT DOZ TROMBOSİT
AFEREZİNİN NÖTROFİL TROMBOSİT KOMPLEKS OLUŞUMU
VE NÖTROFİL AKTİVASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

T14 99

UZ. DR. AYNUR UĞUR BİLGİN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. İHSAN KARADOĞAN

(Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir)

ANTALYA, 2003

TEŞEKKÜR

Gerek bu tezin hazırlanışı sırasındaki katkı ve yardımları, gerekse uzmanlık eğitimim süresince bilgi, deneyim ve yol göstericiliği ile yetişmemde emeği olan tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. İhsan Karadoğan'a; engin bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Levent Ündar'a; her konuda sürekli desteğini gördüğüm Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Gülşen Yakupoğlu ve bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen Kan Merkezi ve Hematoloji Bilim Dalı Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürü borç bilirim.

Dr. Aynur Uğur Bilgin

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ii
SİMGELER KISALTMALAR DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
TABLOLAR DİZİNİ	vi
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
2 1- Nötrofiller	3
2 1 1- Köken	3
2 1 2- Hemapoetinler	4
2 1 3- Yapısı ve Fonksiyonları	5
2 1 4- Adhezyon	6
2 1 5- Kemotaksis	7
2 1 6- Sindirim	8
2 1 7- Öldürme	8
2 1 8- Adezyon Molekülleri	10
2 1 8 1- İntegrinler	10
2 1 8 2- Selektinler	12
2 1 8 3- Kaderinler	13
2 1 8 4- İmmünglobulin Super-Ailesi	14
2 1 8 5- Sınıflandırılmayan Adezyon Molekülleri	16
2 2- Trombositler	20
2 2 1- Yapı	20
2 2 1 1- Trombosit granülleri	20
2 2 1 1 1- Alfa granüller	20
2 2 1 1 2- Yoğun granüller	21
2 2 1 1 3- Lizozomlar	21
2 2 2- İşlev	21
2 2 2 1- Trombosit adezyonu	21
2 2 2 2- Trombosit salıverme (release) reaksiyonu	22
2 2 2 3- Trombosit aggregasyonu	22
2 2 2 4- Prokoagulan aktivite	22
2 2 3- Trombosit aktivasyonu	23
2 2 3 1- Trombosit aktivasyon belirteçleri	24
2 3- Akış Sitometrisi	25
2 3 1- Çalışma ilkeleri	25
2 3 2- Akış sitometrisi ile yapılan trombosit çalışmaları	26
2 3 3- Trombosit aktivasyonu sırasında oluşan trombosit membran değişikliklerinin akış sitometrik yöntemlerle gösterilmesi	27
2 3 3 1- GP-IIb-IIIa kompleksinde ve fibrinojen molekülünde olan değişiklikler	27
2 3 3 2- Alfa granül membran antijenlerinin gösterilmesi	28
2 3 3 3- Lizozom membran antijenlerinin gösterilmesi	28

2 3 3 4- Yoğun cisimcik membran antijenlerinin gösterilmesi	29
2 3 3 5- GP-Ib ekspresyonundaki azalışın saptanması	29
GEREÇ VE YÖNTEM	30
3 1- Vericiler	30
3 2- Kan örneklerinin alınması	30
3 3- Monoklonal antikorlar	31
3 4- Flow sitometrik analiz	31
3 5- İstatistik	32
SONUÇLAR	33
TARTIŞMA	45
ÖZET	51
SUMMARY	53
KAYNAKLAR	54

SİMGELER KISALTMALAR DİZİNİ

β-TG	Beta-tromboglobulin
CFC	Koloni oluşturan hücreler
G-CSF	Granülosit koloni stimüle edici faktör
GM-CSF	Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör
GP	Glikoprotein
IL	İnterlökin
LIBS	Ligand induced binding sites
(min-max)	(minimum-maksimum)
MFI	Mean fluorescence intensity
ns	İstatistik olarak anlamsız
PF-4	Platelet faktör-IV
RES	Retikülo-endoteliyal sistem
rHuG-CSF	Rekombinant human G-CSF
TAT	Trombin-antitrombin
TM	Trombomodülin
TPO	Trombopoetin
vWF	von Willebrand faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1: LFA-1 molekülünün alfa ve beta zincirlerinin şekli	11
Şekil 2.2: İmmünglobülin süper ailesine bağlı adezyon molekülleri	16
Şekil 4.1: Çift doz trombosit aferezi ile vericilerin (n=22) trombosit sayılarında çalışma dönemleri boyunca izlenen değişiklikler	36
Şekil 4.2: Çift doz trombosit aferezi ile vericilerin (n=22) nötrofil sayılarında çalışma dönemleri boyunca izlenen değişiklikler	37
Şekil 4.3: Çift doz trombosit aferezi ile vericilerin (n=22) çalışma dönemleri boyunca nötrofil integrin (CD11b ve CD18) molekül ekspresyonlarında izlenen değişiklikler	39
Şekil 4.4: Çift doz trombosit aferezi ile vericilerin (n=22) çalışma dönemleri boyunca nötrofil immünglobulin süper ailesi (CD50 ve CD54) molekül ekspresyonlarında izlenen değişiklikler	40
Şekil 4.5: Çift doz trombosit aferezi ile vericilerin (n=22) çalışma dönemleri boyunca nötrofil selektin (CD62L) molekül ekspresyonlarında izlenen değişiklikler	41
Şekil 4.6: Çift doz trombosit aferezi yapılan vericilerde trombosit antijeni (CD42b) taşıyan nötrofil yüzdesinde çalışma dönemleri boyunca izlenen değişiklikler	42
Şekil 4.7: Çift doz trombosit aferezi yapılan vericilerde trombosit ile kompleks yapmış mutlak nötrofil sayısında çalışma dönemleri boyunca izlenen değişiklikler	43
Şekil 4.8: Çift doz trombosit aferezi yapılan vericilerde nötrofillerdeki CD42b yoğunluğunda çalışma dönemleri boyunca izlenen değişiklikler	44

TABLULAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1: İntegrinler	17
Tablo 2.2: Selektinler	19
Tablo 2.3: İmmünglobulin süper ailesine ait hücre adezyon molekülleri	19
Tablo 4.1: Çift doz trombosit aferezi ile vericilerin (n=22) trombosit sayılarında çalışma dönemleri boyunca izlenen değişiklikler	36
Tablo 4.2: Çift doz trombosit aferezi ile vericilerin (n=22) nötrofil sayılarında çalışma dönemleri boyunca izlenen değişiklikler	37
Tablo 4.3: Çift doz trombosit aferezi ile vericilerin (n=22) çalışma dönemleri boyunca nötrofil adezyon molekül ekspresyonlarında izlenen değişiklikler	38
Tablo 4.4: Çift doz trombosit aferezi ile vericilerin (n=22) çalışma dönemleri boyunca nötrofil selektin (CD62L) molekül ekspresyonlarında izlenen değişiklikler	41
Tablo 4.5: Çift doz trombosit aferezi yapılan vericilerde trombosit antijeni (CD42b) taşıyan nötrofil yüzdesinde çalışma dönemleri boyunca izlenen değişiklikler	42
Tablo 4.6: Çift doz trombosit aferezi yapılan vericilerde trombosit ile kompleks yapmış mutlak nötrofil sayısında çalışma dönemleri boyunca izlenen değişiklikler	43
Tablo 4.7: Çift doz trombosit aferezi yapılan vericilerde nötrofillerdeki CD42b yoğunluğunda çalışma dönemleri boyunca izlenen değişiklikler	44

GİRİŞ VE AMAÇ

Aferez cihazları ile tek bir vericiden alınan trombosit konsantrelerinin transfüzyon desteği amacıyla trombositopenik hastalarda kullanımı, günümüz kan bankacılığında rutin uygulanan bir işlem şekline gelmiştir. Son yıllarda trombosit transfüzyonlarında ortalama %50 oranında bir artış izlenmiştir ve bu artış diğer bütün kan ürünlerinde izlenen yıllık artışların üzerinde bir orandır (1). Kemik iliği ve karaciğer transplantasyonu yapılan hastalar ile maligniteli hastalara uygulanan kemoterapiler sonrası izlenen aplazi dönemlerinde trombosit transfüzyonlarına olan gereksinim artmıştır. Son yıllarda, çift (double) doz tromboferez işlemi ile tek bir vericiden çift doz trombosit konsantrisi elde etmek mümkün hale gelmiştir. Uygun verici bulma zorluğu ve hastada karşılaşılan infeksiyöz ve immünolojik komplikasyonlar verici sayısının olabildiğince azaltılmasına ve aferez yöntemi ile tek bir vericiden elde edilen çift doz trombosit toplama işleminin giderek tercih edilen bir yöntem haline gelmesine yol açmıştır.

Hemodiyaliz ve hemoperfüzyon cihazları gibi vücut dışı dolaşımın kullanıldığı durumlarda kan elemanlarının yabancı yüzeylere teması ile koagulasyon, inflamasyon, fibrinolizis gibi hemostatik parametrelerde önemli ölçülerde değişiklikler meydana geldiği bildirilmiştir (2,3). Vücut dışı dolaşım özellikleri taşıyan aferez işlemi sırasında da verici kanı trombojenik özellikler taşıyabilecek damar dışı bir sisteme taşınmakta ve trombositlerin ve/veya nötrofillerin aktivasyonuna yol açabilecek santrifügasyon gibi dış kuvvetler uygulanmaktadır. Bu nedenle aferez işleminin hemostatik sistemde önemli değişikliklere yol açması beklenmektedir. Literatürde tromboferez işleminin vericinin hemostatik sisteminde meydana getirdiği değişiklikler hakkında az ve çelişkili bilgiler bulunmaktadır.

Dolaşım sistemindeki hücrelerin çoğu tek hücre halinde bulunurken bunların küçük bir kısmı birbirleriyle agregatlar oluşturarak gruplar halinde dolaşırlar. Bu agregatlar homotipik (trombosit-trombosit) ya da heterotipik (trombosit-lökosit) şeklinde olup özellikle trombosit-lökosit agregatlarının trombosis, lökosit infiltrasyonu ve inflamasyon da önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir (4-6). Son yıllarda iskemik vasküler ve kalp hastalıklarında trombosit-lökosit agregatlarının arttığı gözlenmiştir (7-9). Bu agregatların oluşumundaki patofizyolojik mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamakla birlikte; dinlenim halinde iken α granüllerinde bulunan ve

trombositler aktif hale geldiğinde eksprese olan CD62-P molekülünün trombosit-nötrofil agregatlarının oluşumunda anahtar rol oynadığı gösterilmiştir (10,11) Bu etkileşimde nötrofillerin rolü daha az açık olup nötrofil stimülasyonunun TLA oluşumunu her iki yönde de etkileyebileceği yönünde çalışmalar bulunmaktadır. (12-14)

Çift doz tromboferez işlemi tek bir vericiden 2 ünite trombosit konsantrisi elde edilmesi gibi önemli bir avantaja sahipken; verici kanının kimyasal, metabolik faktörlere ve ekstrakorporal dolaşıma maruz kalmasına neden olmaktadır. Bütün bunların sonucunda aferez işleminin trombosit ve lökositlerde morfolojik, fonksiyonel ve immünolojik değişiklikler meydana getirmesi ve vericide koagülasyon, inflamasyon ve tromboz gibi birtakım komplikasyonlara yol açması mümkün gibi görünmektedir. İngilizce literatürde çift doz trombosit toplama işleminin nötrofil aktivasyonu ve nötrofil-trombosit kompleks oluşumu üzerine etkisini araştıran bir yayına rastlanılamazken, tek trombosit toplama işleminin nötrofil, trombosit aktivasyonu ve nötrofil-trombosit oluşumu üzerine etkisini gösteren sınırlı sayıda çalışmalar izlenmektedir (15-18). Tek tromboferez işleminin koagülasyon, fibrinolizis ve nötrofil fonksiyonları üzerine etkisini araştıran bir çalışmada; tromboferez işleminin nötrofilleri aktiveleştirmedeği (L selektin(+)) nötrofil yüzdesinde değişiklik olmadığı, CD41(+)) nötrofil yüzdesinde ise işlem sırasında azalma olduğu saptanmıştır (15). Tromboferez sonrası vericinin nötrofil fonksiyonlarını inceleyen bir başka çalışmada ise; aferez sonrası L selektin(+)) nötrofil ekspresyonunun arttığı, buna paralel olarak oksijen radikallerinin üretiminin azaldığı, komplemanların ise aktive olmadığı bulunmuştur (16).

Bu çalışmanın amacı, vericide inflamasyon ve tromboz yönünde ek riskler oluşturabileceği düşünülen çift doz trombosit toplama işleminin, nötrofil aktivasyonu ve nötrofil-trombosit kompleks oluşumunda artmaya yol açıp açmadığının gösterilmesidir. Bu amaçla sağlıklı trombosit vericilerinde iki farklı prensip ile çalışan aferez cihazı kullanılarak yapılan çift trombosit toplama işlemleri sırasında nötrofil yüzeyinde birer adezyon molekülü olan β 2-integrin (CD11b/CD18), CD50, CD54 ve L-selektin (CD62L) moleküllerinin ekspresyonlarında izlenen değişiklikler ve trombosit-nötrofil kompleks oluşumları flow-sitometrik yöntemle saptanmaya çalışılmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1- Nötrofiller

Nötrofiller ve mononükleer monositik hücreler, konakçının doğal bağışıklık yanıtını sağlayan sistemin etkin (effektör) hücreleridir. Kemik iliğinde ortak bir öncül (progenitör) hücreden köken alan bu hücrelerin işlevi fagositozdur. Nötrofiller öncül savunma sistemi hücreleri olarak konakçıya giren patojenlere doğru hızla göç eder ve onları fagosite ederek öldürürler. Mononükleer fagositik hücreler ise patojenlerin yok edilmesi dışında doku hasarı ile oluşan artıkların dokudan ve kandan temizlenmesi, hasarlı dokunun yeniden yapılanması ve yabancı antijenik yapının bağışıklık sisteminin diğer etkin hücrelerine tanıtılması işlevlerini de üstlenmişlerdir.

2.1.1- Köken

Nötrofiller dolaşımdaki diğer hücreler gibi hematopoetik kök hücreden köken alırlar. Nötrofillerin erişkinde yapım yeri kemik iliğidir. Hematopoetik ana kök hücre kendini yenileme ve farklılaşma özelliklerini taşır. Kemik iliği mikro çevresini oluşturan stroma hücrelerinin ve koloni uyarıcı faktörler olarak (Colony Stimulating Factors-CSF) adlandırılan değişik hematopoetik büyüme faktörlerinin etkisi ile hematopoetik ana kök hücre farklılaşarak nötrofilleri oluşturur (19-22). İn vitro deneyler granulositik, eritroid, mononükleer fagositik ve megakaryositik serilerin ortak bir yönelimli kök hücreden farklılaştığını göstermiştir. Morfolojik olarak tanımlanabilen myeloid seri öncülü hücreler miyeloblastlardır. Miyeloblastlar 10-18 µm çapında, büyük oval veya yuvarlak çekirdekli, dar mavi sitoplazmalı, sitoplazmik granül içermeyen ve gevşek kromatin ağı çekirdeğinde 2-5 arasında çekirdekcik içeren hücrelerdir.

Miyeloblastlar 12-20 µm çaplı, sitoplazmik granül içeren promyelositlere farklılaşır. Granulositik seri farklılaşması özgül granüllerin oluşması, çekirdek kromatin ağının yoğunlaşması, çekirdekciklerin kaybolması ve çekirdeğin lobülasyona uğraması ile sürer. Sırasıyla miyelosit, metamiyelosit, çomak ve parçalı formları oluşur (23).

Granülositik seri hücrelerinin mitotik aktivitesi olgunlaşma süreci içinde giderek azalır ve miyelositten sonra kaybolur, hücrelerin göç etme yetenekleri ise giderek artar Olgun nötrofiller (çomak ve parçalı) 1 µm çapındaki membran porlarından geçebilirken, aynı por çapının olgunlaşmamış nötrofiller için en az 8 µm olması gereklidir Olgun nötrofillerin sitoplazmik esnekliğinin artması, metamiyelosit aşamasından itibaren kemoatretan ajanların varlığında yönelimli göç etme yeteneğinin belirmesi ve değişen stroma-yüzey molekülleri ilişkisi, granülositik serinin belli bir olgunluk seçimi yapılarak periferik kana salınmasını sağlamaktadır Miyeloid serinin mitotik aktivitesi süren, miyelositi içeren erken öncülleri mitotik bölüm olarak adlandırılırken, geç elemanları matürasyon veya depo bölümü olarak adlandırılır Günlük granülositik seri yapımı erişkinde $62-400 \times 10^7$ nötrofil/kg kadardır, miyeloid yönelimli bir kök hücreden olgun nötrofil oluşma süresi ise 8-10 gün arası değişmektedir Dolaşımdaki granülositlerin yarı ömrü 6 saat kadardır, bu sürenin dokularda birkaç günü bulunduğu bilinmektedir (24) Matürasyon bölümünden salınan nötrofiller iki yere dağılırlar: 1) Periferik kan dolaşımındaki nötrofil havuzuna ve 2) Postkapiller venüllerin duvarlarına tutundukları marjinal nötrofil havuzuna Adrenokortikoid hormonların salınımına yolaçan infeksiyon, stres, ağır egzersiz vb nedenler, endotoksinler ve epinefrin enjeksiyonu marjinal havuzdan ve matürasyon bölümünden dolaşımdaki nötrofil havuzuna akışı sağlayarak lökositöze neden olurlar (25) Uyarının ağırlığına göre parçalı ve çomak formundan daha az olgun formdaki nötrofiller de dolaşıma çıkabilir, buna sola kayma denir Mitotik bölümde ise bu uyarılara yanıt durağan hematopoezde olduğu gibi hematopoetik büyüme faktörleri tarafından düzenlenir

2.1.2- Hemapoetinler

Granulopoezi düzenleyen humoral faktörler, in vitro koşullarda öncül hematopoetik hücrelerden koloni oluşumunu uyarma özellikleri nedeniyle Koloni Uyarıcı Faktörler (Colony Stimulating Factors-CSF) olarak adlandırılırlar (19)

Bu hematopoetinler kök hücrenin kendini yenilemesini (self-renewal) ve farklılaşmasını sağlamaları açısından farklılıklar gösteren, sinerjistik etkileşimleri olan faktörlerdir Multi-CSF olarak adlandırılan IL-3 ve cikit ligand olarak bilinen Steel faktör erken hematopoezi uyarır ve kök hücre havuzunun sürekliliğini sağlar IL-3 ve

granülosit-makrofaj kolonilerini uyarıcı faktör (GM-CSF) erken ve geç öncülleri uyarak miyelopoezin tüm elemanlarına (nötrofil, eozinofil, bazofil, monosit) farklılaşmayı sağlar Granulosit kolonilerini uyarıcı faktör (G-CSF) ve monosit kolonilerini uyarıcı faktör (M-CSF) ise granülopoezde yönelimli öncül hücreleri uyaran faktörlerdir. Ayrıca bu hemapoetinlerin hücrelerin fonksiyonlarını da düzenleyici rolleri vardır Nötrofiller IL-3 reseptörü taşımazken, eozinofil ve bazofillerin IL-3 reseptörü taşıdığı gösterilmiştir (20,26-28) Aktive T-lenfositlerden salınan bu hemapoetin hücrel immun yanıtta da fizyolojik rolü olduğu düşünülmektedir G-CSF ve GM-CSF'in dolaşımdaki nötrofillerin yüzey adhezyon moleküllerini, kemotaksis reseptörlerini, kemotaksisini, süperoksit oluşumunu ve fagositoz yapma yeteneğini arttırdığı gösterilmiştir GM-CSF ayrıca nötrofillerin dolaşımdaki yarı ömrünü uzatır, mononükleer fagositlerin mikrobisidal ve antitümoral etkinliğini artırır ve TNF- α ve IL-1 salınımına neden olur (29-31)

2.1.3-Yapısı ve Fonksiyonları

Granülositik serinin dolaşımdaki en olgun formları olan nötrofiller; bölünme yetenekleri olmayan, uyarana doğru hareket etme (kemotaksis) ve mikroorganizmaları öldürme fonksiyonları olan hücrelerdir Granülositik seride miyelosit aşamasından sonra DNA-polimeraz aktivitesi giderek azalır, bazı özgül mRNA'ları sentezleme aktivitesi ise sürer. Ribonükleaz aktivitesi özellikle nötrofillerde yüksektir ve ekzojen kaynaklı nükleik asitlerin katabolizmasında önemli rol oynamaktadır Nötrofillerde diğer nükleik asit katabolizmasında rol alan enzimler de immatür granülositik elemanlara göre yüksek aktivitededir Nötrofillerin ana enerji kaynağı glikolizistir (32) Glukoz nötrofillerde %80 Embden-Meyerhoff yolu, %2-3 heksosmonofosfat yolu ve %5 Krebs döngüsü ile metabolize olur Nötrofillerde oksidatif metabolizma fagositozda, kemotaktik ajanlar, kompleman bileşikleri ve immun komplekslerle karşılaşmada artar Glikojen depoları granülositik seride miyelosit aşamasından itibaren belirir ve hücreler olgunlaştıkça artar Nötrofillerde glukoneogenez yoktur Lipit biosentezi ve lipolitik aktivite nötrofillerde fonksiyonel önem taşımaktadır Platelet aktive edici faktör (PAF), araşidonik asit metabolizmasında siklooksijenaz yolu ürünleri olan PGE₂, PGD₂, PGF₂, tromboksan A₂ ve tromboksan B₂, lipooksijenaz yolu ile olan lökotrien C₄, D₄, E₄ ve B₄

nötrofillerde sentezlenir (33,34) Bu ürünler kemotaksis ve inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde rol alırlar

Nötrofillerde hedef mikroorganizmaları öldürebilmek için, enzim ve peptidlerin bulunduğu özelleşmiş granüller mevcuttur Miyeloid serinin tanımlayıcısı olan azurofilik granüllerde (primer granüller) miyeloperoksidaz ve benzeri mikrobisidal enzimler, nötral proteazlar, proteaz inhibitörleri, asit hidrolazlar ve antibakteriyel katyonik proteinler bulunur (35,36) Bu granüllerin işlevi fagozomlara sindirim ve hidroliz enzimlerini sağlamaktır Spesifik granüller (sekonder granüller) granülositik seride gelişim sırasında daha geç beliren, peroksidaz negatif, kollagenaz, elastaz, laktoferrin, B12 bağlayan protein, kompleman aktivatörleri ve kemotaktik reseptörler içeren granüllerdir (37,38).

Endositik veziküller olduğu düşünülen sekretuar granüller ise tetranektin, latent alkalin fosfataz ve albumin içerirler (39-41) Nötrofillerin, infeksiyon ajanlarının bulunduğu, veya inflamasyonun olduğu bölgelerden gelen uyarılarla yüzey molekülleri değişir, endotele adhezyonları artar Böylece nötrofiller endoteli geçip göç eder, yönelimli göç etme yetenekleri ile mikroorganizmayı bulur, granüllerini salgılar, yabancı ajana fagosite eder ve antimikrobiyal proteinler ve oksidanlarla mikroorganizmaları öldürürler.

2.1.4- Adhezyon

Nötrofiller belli hız ve sürüklenme yeteneğine sahip kan akımı nedeniyle dolaşımda kalırlar Uyarılara doğru hareket edebilmek ve damar dışına çıkabilmek için endotel ile doğrudan ilişki kurabilmeleri gereklidir. Silia gibi hareketlilik sağlayıcı organelleri olmayan nötrofillerin hareketi yüzmek biçiminde değil, belli bir yüzeye tutunarak sürünmek (crawl) şeklinde gerçekleşir Bu tutunma işlevine endotel hücrelerinin yüzey molekülleri ve bunlara bağlanan lökosit adhezyon molekülleri yardımcı olur Endotel homeostazı koagülasyon ve inflamasyonu sınırlamakla sağlar. Lökosit-endotel etkileşmesindeki en önemli basamaklardan birinin uyarılmış endotelin yüzey moleküllerini değiştirerek inflamasyonu kodlayıcı alan adı verilen bölgeyi oluşturması olduğu düşünülmektedir (42) Histamin, trombin, oksidanlar, lipopolisakkaridler, lökörtienler ve IL-1 ve TNF- α gibi sitokinlerle uyarılan endotelin kan dolaşımına bakan yüzeyinde selektinler (P-Selektin, E-Selektin), L-Selektin ligandı ve immunglobulin benzeri adresinler belirir (43) Bu yüzey molekülleri

nötrofillerin endotel üzerinde yuvarlanmasını sağlar ama adhezyon için yeterli değildirler. İnflamasyonu kodlayıcı alan endotelinden salınan kemokinler [IL-8, Makrofaj inflamasyon proteini-1 β (MIP-1 β)] ve platelet aktive edici faktör (PAF), hasarlı dokudan gelen sitokin ve kemoatretaktan uyarıları; nötrofillerin aktivasyonuna ve adhezyonu sağlayacak integrin grubu adhezyon moleküllerinin nötrofil yüzeyinde belirmesine neden olurlar (44). Nötrofil yüzeyinde beliren β_1 , β_2 , ve β_7 integrinler (CD11/CD18 ailesi) ve bunların bağlandığı endotel yüzeyindeki immünglobulin benzeri moleküller (CD102, CD54, CD106 ve mukozal lenfoid adresin-1, MAdCAM-1) sıkı adhezyonun oluşmasını sağlarlar (45). Kemokinler ve kemoatretakların uyarısı ile adhezyona uğrayan nötrofiller transendotelial göçü gerçekleştirirler.

2.1.5- Kemotaksis

Endoteli geçen nötrofiller inflamasyon sahasından gelen, dokuya konsantrasyon gradienti yaparak dağılan kemotaktik faktörlere doğru lokal sindirim yaparak (kollajenaz) ilerler. Bu göç kemotaktik faktörlerin salındığı merkeze doğru olan yönelimli bir göçtür ve kemotaksis olarak adlandırılır.

Nötrofiller pek çok çözünebilir ve partiküllü kemotaktik faktöre yanıt verirler. Oponize partiküllerin, immün komplekslerin ve kemotaktik faktörlerin nötrofiller üzerinde özgül reseptörleri vardır. N-formil oligonükleotidler (N-formil-metiyonil-lösil-fenilalanin, N-FMLP) bakteri ürünlerinin sentetik analoglarıdır ve bakterilerin hasar görmesi sonucu ortama salınırlar. Nötrofil yüzeyinde N-FMLP bağlayan reseptörler mevcuttur ve bu reseptörlerin uyarımı nötrofillerde kemotaksise ve degranülasyona yol açar. N-FMLP reseptörleri nötrofil membranı ve depo olarak da spesifik granüllerin membranında mevcuttur. Kompleman sisteminin aktivasyonu C5'ten C5a oluşumuna yol açar. C5a nötrofillerde sadece kemotaksisi değil aynı zamanda degranülasyonu ve süperoksit oluşumunu da uyarır. Nötrofil membranı da 40-48 kD'luk molekül ağırlığına sahip, G-protein sistemi üzerinden uyarı ileten C5a reseptörü tanımlanmıştır. Kompleman kaynaklı kemotaktik faktörler olan C3b ve C3b'inin de nötrofil membranında reseptörü vardır. Uyarılmamış nötrofillerin yüzeyinde iki farklı immünoglobulin reseptörü bulunur. Fc γ RII (CD32) ve Fc γ RIII (CD16) olarak anılan bu reseptörlerden CD16, membranında glikozilfosfatidilinozitol sistemine uyarı iletir. İmmün komplekslerin ve oponize partiküllerin nötrofil

uyarımının bu yoldan olduğu düşünölmektedir. Sitokinlerle uyarılmış nötrofillerde ise bunlara ek olarak FcγRI (CD64) membranda eksprese olur. Aktive nötrofillerden salınan lökötrien B₄ bir başka güçlü kemotaktik faktördür. Aktive nötrofiller lökötrien B₄ salınımı yaparak ve spesifik granüllerde bulunan C5'i parçalayan enzimle C5a konsantrasyonunu arttırarak inflamasyon sahasına daha çok nötrofilin gelmesini sağlarlar (46).

2.1.6- Sindirim

Nötrofiller yabancı olan antijenik yapıyı konakçı antijenlerinden ayırabilen özgül hücreler değillerdir. Nötrofiller bu nedenle immün sisteme dayanarak hedeflerini seçerler. Yabancı antijenik yapıyı sindirmek için onunla temas halinde olmaları gereklidir. Plazmada bulunan immünoglobulin G (IgG) alt grubu antikorlar yabancı antijenik yapıyı tanıyarak Fab bölgelerinden bunların yüzeyine tutunurlar. Nötrofiller üzerinde bulunan Fc reseptörleri bu immünoglobulinlerin Fc bölgesine tutunur ve böylece nötrofiller yabancı antijenle temasa geçmiş olur. Aktive olan kompleman sisteminin ürünü olan C3b molekülü yabancı antijenik yapıya bağlanır ve nötrofiller üzerinde bulunan reseptörü ile nötrofillerin C3b bağlı partikülleri tanımasını sağlar. Fagositoz en fazla antikor ve komplemanın birlikte bağlanması ile oluşur. Nötrofillerin yabancı antijenleri tanımasını sağlayan bu plazma moleküllerine opsoninler denir, bunların mikroorganizmaların yüzeyine tutunmaları ise opsonizasyon olarak adlandırılır.

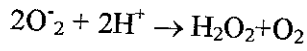
Nötrofil yüzeyine hedefin bağlanması ile oluşan sinyal, partikülün bağlandığı bölgedeki membranın invajinasyonuna ve partikülün nötrofil içine alınmasına yol açar. Partikül tümüyle nötrofil içine alınınca membran tekrar birleşir ve partikül vezikül içinde nötrofil sitoplazmasında kalır. Bu vezikül fagositik vezikül olarak adlandırılır. Fc reseptörlerine bağlanma hidrojen peroksit ve süperoksit oluşumu için uyarandır ve fagositozun öldürmeye ardışık bağlanmasını sağlar (47).

2.1.7- Öldürme

Nötrofiller mikroorganizmaları hem anaerobik hem de aerobik koşullarda öldürme özelliğine sahiptirler. Öldürme degranülasyon ve solunumsal patlama işlevlerinin gerçekleşmesi ile oluşur (48). Degranülasyon, granül membranının plazma membranı ile füzyona uğraması ve granül içeriğinin membranlar arası bölgede

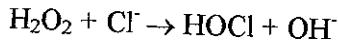
salınmasıdır Azurofilik granüllerin içeriği fagositik granüllere boşalır, bu içerik özellikle mikroorganizmalara karşı etkindir Spesifik granüllerin içeriği ise hem fagositik veziküllere hem de nötrofil dışına, dokuya salınır Spesifik granüllerin içeriği mikroorganizmalara karşı öldürme kadar nötrofillerin bağ dokusunda hareketini de sağlamaktadır

Solunumsal patlama mikrobisidal etkinliği olan oksidanların oluşmasını sağlar Fagositoz ve yüksek derişimde kemotaktik faktörler bu oksidanların oluşumunu aktive eder Plazma membranına bağlı oksidaz enzimi NADPH'ı NADP'ye indirgerken, oksijenden süperoksit (O_2^-) oluşumunu sağlar Oluşan O_2^- iyonu H^+ ile birleşerek H_2O_2 molekülünü oluşturur (48)



Oluşan H_2O_2 glutatyon ve glutatyon peroksidaz enzimi varlığında NADPH ile reaksiyona girer ve H_2O , $NADP^+$ ve H^+ oluşur. Hekzosmonofosfat yolu NADPH havuzunu yerine koyar Solunumsal patlama nötrofilde; oksijen tüketimine, O_2^- ve H_2O_2 oluşumuna ve hekzosmonofosfat yolunun aktive olmasına yol açar. O_2^- zararsız ve hidrojen peroksit ise mikroorganizmaların dirençli olduğu moleküllerdir, gerçek mikrobisidal oksidanlar bu moleküllerin girdiği reaksiyonlarla oluşur Oksijen halojenler ve oksidan radikaller bu reaksiyonların ürünleridir (48).

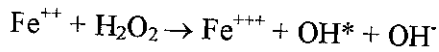
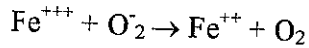
Oksidan halojenlerin hidrojen peroksitten oluşumunu azurofilik granüllerde bulunan peroksidaz enzimi katalizler



peroksidaz

HOCl molekülü ve onun aminlerle yaptığı kloraminler mikrobisidal etkinlik gösterir.

Solunumsal patlama ile çok miktarda oksidan radikaller oluşur, bunların içinde en iyi bilineni hidroksi radikalidir (OH^*) Bu grup bileşikler metallerle katalize olan Haber-Weiss reaksiyonu sonucu oluşur



Oluşan bu oksidanlar mikroorganizmaların membranlarını ve sitoplazmik yapılarını okside ederek bütünlüğünü bozarlar, bu da mikroorganizmaların ölümü ile sonuçlanır (48,49)

2.1.8- Adezyon Molekülleri

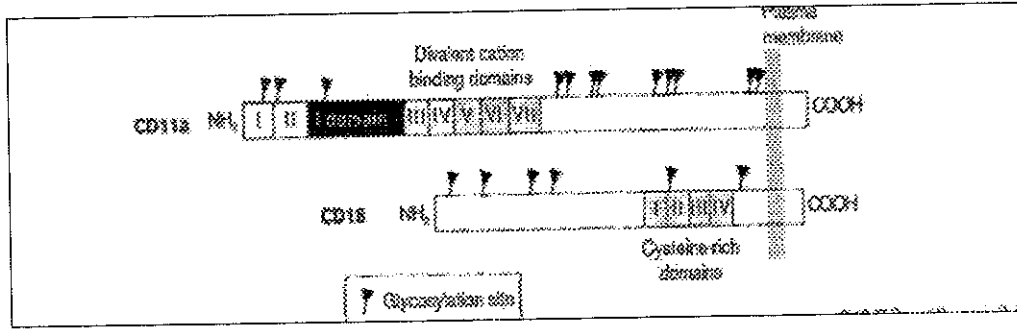
Adezyon molekülleri, hücrelerin özgün olarak farklı organ ve dokulara yönelimleri, birbirlerini tanımaları, embriyogenez, hücre büyümesi, farklılaşması ve inflamasyon gibi olguların düzenlenmesinde görev alırlar (34) Vücudu infeksiyöz ajanlardan koruma görevini üstlenmiş olan immün hücrelerin, bu görevlerini yerine getirirken, hem kan ve lenf içinde serbest bir şekilde dolaşabilmeleri, hem de dokulara tutunmuş bir vaziyette olsa bile, hareket edebilmeleri gerekir Bu hücreler, lenfoid organlarda toplanabilme, endotel ve bazal membran engelini aşarak infeksiyon alanlarına birikebilme ve yabancı antijeni taşıyan hücrelere yapışabilme yeteneklerine sahiptirler Bu olayların tümü adezyon molekülleri ile regüle edilmektedirler (50)

Adezyon molekülleri integrinler, selektinler, immünglobulin süper-ailesine dahil adezyon molekülleri, kaderinler ve sınıflandırılmayan grup olmak üzere beş sınıfta incelenmektedir (51)

2.1.8.1- İntegrinler

İntegrinler, heterodimer transmembran proteinlerdir Aktif yada inaktif halde bulunabilen integrinlerin, birbirine kovalent olmayan bağlarla bağlı, alfa ve beta alt üniteleri vardır (52) Molekülün fonksiyonel aktivitesi için her iki alt ünite gereklidir, ancak bağlanma özgülüğünün α alt ünitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (53). Gerek α ve gerekse β zincirleri büyük bir N-terminal ekstrasellüler domain, bir transmembran domain ve bir sitoplazmik domainden oluşur (54). İntegrinler, yapılarında bulundukları β alt ünitelerine göre; $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ ve $\beta 7$ integrinler olarak adlandırılırlar (tablo 2 2)(55) İntegrinlerin yapıları ve fonksiyonları iki değerli katyonlara bağımlıdır (Ca^{+2} , Mg^{+2})

Şekil 2.1: LFA-1 molekülünün alfa ve beta zincirlerinin şekli



İntegrinler dolaşımdaki lökositlerin damar endoteline tutunup, yapıştıktan sonra, inflamatuvar reaksiyonun bulunduğu alana göç etmelerinde rol alırlar Hücre dışı sinyaller aracılığı ile haberleşmeyi sağlarlar İntegrin adı, bu moleküllerin hücre-dışı matriks ve hücre iskeleti ile ilgili aktivitelere aracılık etmesinden (integre etmesi) kaynaklanır Embriolojik gelişim, hemostazis, tromboz, yara iyileşmesi, immün ve immün-olmayan savunma mekanizmaları gibi birçok fizyolojik olaylarda hücre-hücre ve hücre matriks adezyonuna katılırlar

Aktif hale geçen bir hücre sitoplazmasından sinyal iletildiğinde, integrinlerin hücre dışında kalan kısmı şekil değişimi göstererek kendi ligandına olan affinitesini artırır Bu işleme içeriden-dışa (inside-out) sinyali iletimi denir Bu işlem adezyon molekülleri arasında bir tek integrinlerde görülür İntegrinlerin ligandına bağlanması ile bu kez dışarıdan-içeriye (outside-in) sinyal mekanizması çalışır, bu da hücre içerisinde apoptozisten proliferasyona kadar birçok işlevde etkili olur (56)

İntegrinler, insan vücudunda bulunan hücrelerin hemen hemen hepsinde eksprese olurlar Aktif hale geçen bir hücre sitoplazmasından sinyal iletildiğinde, integrinlerin hücre dışında kalan kısmı şekil değişimi göstererek kendi ligandına olan afinitesini artırır, bu işleme içeriden-dışa (inside-out) sinyal iletimi denir. Bu işlem adezyon molekülleri arasında sadece integrinlerde görülür (51)

İntegrinler farklı yollardan aktive edilebilirler Forbol esterler aracılığı ile içerden dışarı doğru sinyal iletimi sağlanabilir Mg^{+2} ve Mn^{+2} ve bazı integrin bağlayan antikorlarda (MEM83, KIM127, KIM18) hücre içi sinyali olmaksızın

integrin aktivasyonu yapabilirler. Bunların yanında CD2, CD44 veya CD43'e karşı monoklonal antikörlerde CD11/CD18 aktivasyonuna neden olurlar (57).

Lökositlerin dokulara yönelmesinde adezyon moleküllerinin önemi, insanlarda rastlanan iki kalıtsal hastalıkla daha iyi anlaşılmaktadır. Lökosit adezyon eksikliği tip-1 sendromunda (LAD 1), β 2 integrin eksikliği sonucu ciddi lökositoz, deri ve mukozal alanlarda tekrarlayan infeksiyonlar ortaya çıkar. Bu hastaların lökositlerinde adezyon bozulmuş, fagositoz ve kemotaksi anomalileri ortaya çıkmıştır. Lökosit adezyon eksikliği tip-2 sendromunda (LAD 2) lökositte gelişim anormalliği vardır. Lökositler damar endoteli üzerinde yuvarlanamazlar. Bu hastalarda da tekrarlayan infeksiyonlar ve lökositoz mevcuttur. Bu grupta selektin ligandı olan fukozile karbonhidratların sentezi bozulmuştur (58).

2.1.8.2- Selektinler

Selektinler transmembran glikoproteinlerdendir. Yapılarında hücre dışı bölümünde bulunan bir lektin kısmı, bunun hemen yanında epidermal büyüme faktörüne (EGF) benzer bir bölüm ve bunun yanında da kompleman regülatuar proteinlerinde bulunan 60 aminoasitlik tekrarlayan diziler (short consensus repeats) vardır. Bunları membranı geçen kısım ve sitoplazmik kısım izler (51). Lektin kısmı ligand ile bağlanan kısımdır. EGF'ye benzer bölüm çıkarıldığı zaman selektinlerin adezyon fonksiyonu ortadan kalkar.

Selektinler, üzerinde buldukları dokulara göre isim alan üç ana grupta incelenir (Tablo 2 3)

L-selektinler, hemen hemen tüm nötrofiller ve monositlerde, T ve B lenfositlerinin büyük bir bölümünde ve doğal öldürücü hücrelerin (NK) bir alt grubunda eksprese olurlar. T ve B lenfositler üzerinde eksprese olan L-selektinler tüm naif hücrelerde bulunurken, bazı hafıza hücrelerinde eksprese olmazlar.

E-selektinler, endotel hücresi üzerinde bulunurlar ve ekspresyonları interlökin-1 (IL-1), tümör nekrozis faktörü- α (TNF- α) gibi infalamatuvar uyarılara cevaben artar.

P-selektinler, trombositler ve endotel hücreleri üzerinde bulunurlar. Bu gruptaki selektinler trombin, histamin, protein kinaz C, kompleman fragmanları gibi çeşitli mediatörlerle uyarılabilir. Ancak endotel hücrelerine özgün Weibel-Palade cisimcikleri ve trombositlerde bulunan α granüllerde P-selektinler hazır olarak da

bulunur. Böylece, bu granüllerin membrana füzyonu ile P-selektinler çok hızlı şekilde eksprese olma özelliği gösterirler.

Her üç grup selektin, lökositlerin endotele yapışarak yuvarlanmasında rol alır (59) Her selektin bu yuvarlanmaya farklı hız karakterlerinde aracılık eder. L-selektinin, akım halindeki hücrelerin yakalanmasında en etkili rol oynarken, E-selektinin durağan yuvarlanmada etkili olduğu, P-selektinin ise her ikisini de başlatıp devam ettirebildiği gösterilmiştir (60) Ancak, selektinlerin ve ligandlarının ekspresyon kinetiklerinin farklı olması nedeniyle, farklı selektinler, inflamasyonun farklı zamanlarında rol oynarlar.

2.1.8.3- Kaderinler

Kaderinler transmembran proteinlerdir, yapısal olarak birbirleri ile benzerlik gösterirler. Birçok tekrarlayan ilmiikten (domain) oluşan hücre dışı kısmı, transmembran kısmı ve üç sitoplazmik proteinle ilişkili; bunlar α , β ve δ -kaderin sitoplazmik kısımdan oluşmaktadır. Kaderinler üzerinde buldukları dokulara göre isimlendirilirler ve bugün bilinen beş kaderin grubu vardır.

E-kaderinler, epitel hücreleride eksprese olurlar. P-kaderinler, plasentada eksprese olurlar ancak belirli dönemlerde diğer dokularda da buldukları bildirilmiştir. V-kaderinler, endotel hücreleri üzerinde eksprese olurlar. N-kaderinler, nöral dokularda ve kas hücrelerinde eksprese olurlar. H-kaderinle, kalp kasında eksprese olur.

Kaderinler, yanyana hücreler arasındaki moleküler bağlantıyı sağlarlar. Yapışma kavşaklarında fermuara benzer yapılar oluştururlar. Kaderinler, birbiri ile genelde homofilik karakterde ilişkiye girerler. Karşılıklı hücrelerde bulunan aynı kaderinler birbirine bağlanarak hücre-hücre adezyonunu sağlar. Kaderinler embriyoda morfogenezden, erişkin organizmada seçici hücre tanınmasından ve yaşam boyu normal doku mimarisinden sorumlu hücre yüzey glikoproteinleridir. Tümör oluşumunda, kaderinlerin azaldığı belirlenmiştir. Tümör hücrelerinin düzensiz davranışı nedeniyle hücre-hücre ilişkisi tümörlerde bozulmuştur. Kaderinlerin hücre yüzeyinde azalması ile ortaya çıkan azalmış adezyon ve hücre ilişkilerinin neoplastik progresyola ilişkisi her geçen gün daha da belirgin hale gelmeye başlamıştır (54).

2.1.8.4- İmmünglobulin Super-Ailesi

Omurgalıların bağışıklık sisteminde adezyon, tanıma ve bağlanma fonksiyonlarına aracılık eden birçok çözünebilir molekül veya hücre yüzey molekülü vardır. Bu moleküllerin amino asit dizilerinin bir kısmı ve üçüncül yapıları ilk olarak immünglobulin hafif ve ağır zincirlerinde saptanan yapılarla homoloji gösterirler. Daha sonraları aynı özellikleri taşıyan ve bağışıklık sistemi dışında bulunan moleküllerin de benzer fonksiyonlara sahip olduğu saptanmıştır. Bu proteinler immünglobulin süper ailesinin üyeleridir. Bu ailenin üyeleri büyük olasılıkla ortak bir prekürsör genden çeşitli evrimler sonucu meydana gelmiştir (61). Bu aileye üye olan adezyon molekülleri tablo 2 4 ve şekil 2 2 de görülmektedir.

ICAM-1: İntersellüler Adezyon Molekülü-1 (ICAM-1, CD54) integral membran glikoproteinlerindedir (62). İlk olarak 1986 yılında tanımlanmıştır. ICAM ailesinden en yaygın olarak çalışılan moleküldür. Ekstrasellüler beş Ig-benzer domain, transmembran domain ve kısa sitoplazmik domainden oluşmaktadır. Koromozom 19 üzerinde p13 3-p13 2'de lokalize olmuştur. ICAM-1 geni 7 ekson içermektedir. Ekson 1 sinyal sekanslarını, ekson 2-6 sırası ile ekstrasellüler 1-5 Ig-benzer domainleri, ekson 7 ise transmembran domaini ve kısa sitoplazmik domaini kodlamaktadır (63). ICAM-1'in ligandlarına bağlanma bölgeleri N-terminal ucunda bulunmaktadır (52). Moleküler ağırlığı 90 kDa'dur (64). İntegrinlerden Lökosit Foksiyonel Antijen-1'e (LFA-1 (CD11a/CD18)), Mac-1'e (kompleman reseptör-3 (CD11b/CD18)), rhinovirüslere, CD43'e, fibrinojen ve *Plasmodium falciparum*'la enfekte eritrositlere bağlanmaktadır. LFA-1 ve fibrinojen ICAM-1'in birinci domainine bağlanırken, Mac-1 üçüncü domainine bağlanmaktadır (65,66). T hücreleri ile antijen sunan hücreler (ASH), T-hücresi ile T-hücresi, T hücreleri-hedef hücre, T-hücresi ile B-hücresi arasındaki etkileşimde ve lökositlerin aktive endotele adezyonunda görev almaktadır. LFA-1/ICAM-1 bağlanması lenfosit fonksiyonlarında kritik rol oynamaktadır. Bu bağlanma aktive lenfositlerin kapiller endotelyumuna adezyonunda, yardımcı T hücrelerinin aktif hale geçiş kemokin salgılamalarında, sitotoksik T hücrelerinin aktif hale geçiş enfekte veya abnormal hücreleri öldürmesinde önemli rol oynamaktadır (67). Bu bağlanma özellikle antijene spesifik T hücre aktivasyonunda, T hücrelerine bağlı B hücre aktivasyonunda kritik etkidir. LFA-1/ICAM-1 bağlanma blokajının T hücrelerine bağlı B hücre aktivasyonunu, sitotoksik T hücrelerinin hedef hücreyi tanıyıp ona cevap vermesini, inflamatuvar cevabın oluşmasını inhibe ettiği ve aynı zamanda

transplante edilen allojenik dokunun sağkalım süresini uzattığı görülmüştür (67-69) İnflamatuvar sitokinler (örneğin IL-1, TNF- α , interferon- γ , lipopolisakkarit), hormonlar, hücresel stres ve viral enfeksiyonlar sonucunda hücre yüzeyindeki bazal ekspresyon düzeyi artmaktadır. Bu indükleyiciler ICAM-1 molekülünün hücre düzeyindeki ekspresyonunu 8-24 saat içinde en yüksek düzeye çıkartmaktadır. Bunlara karşın glukokortikoidler ekspresyonunu inhibe etmektedirler (70). ICAM-1'in solübl formu normal insan serumunda tesbit edilmiştir ve serumdaki düzeyinin çeşitli inflamasyon ve immün hastalıklarda arttığı gözlenmiştir. Moleküler orijini tam olarak açıklanmamıştır. İki farklı mekanizma tartışılmaktadır. Birincisi bu molekülü serumun içerisinde doğal olarak var olduğu, diğeri ise preteolitik enzimler aracılığı ile hücre yüzeyindeki ICAM-1'in hücre membranından ayrılarak solübl forma geçtiği (71). Doğal ve rekombinant solübl ICAM-1'in in vitro LFA-1/ICAM-1'e bağlı hücre-hücre etkileşimini inhibe ettiği gösterilmiştir. sICAM-1 hücre yüzeyindeki ICAM-1 ile LFA-1'e bağlanmada yarışa girmektedir (68).

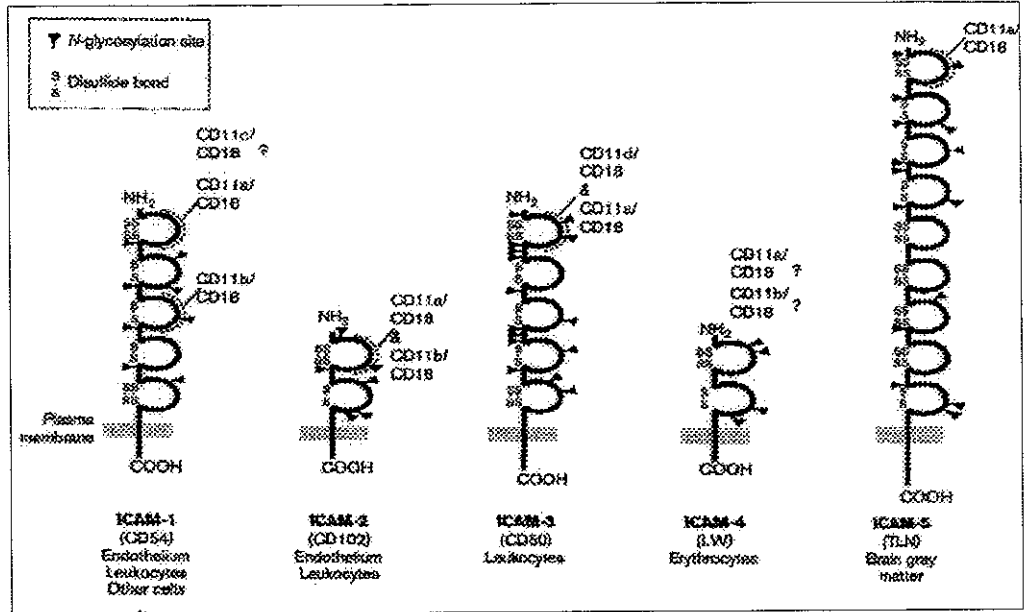
ICAM-2(CD102): ICAM-1'den farklı olarak sitokin stimülasyonu ile ekspresyonunda bir değişiklik gözlenmemektedir (54).

ICAM-3: İntersellüler Adhesion Molekülü-3 (ICAM-1, CD50) 124 kDa ağırlığında olup lökositlerde eksprese olurken; endotelial hücrelerde, trombositlerde ve eritositlerde eksprese olmazlar. ICAM-3 lökositlerin adezyonunda ve sinyal iletiminde görev almaktadır. ICAM-3 molekülü, APC üzerindeki LFA-1 ile bağlandığı zaman T-hücresi ile APC hücresi arasındaki etkileşimi stabilize ederek CD3/T hücre reseptörü (TCR) kompleksine bağlı sinyal iletimini kolaylaştırmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, ICAM-3 ile CD3 arasındaki etkileşimin T-hücrelerinin büyüklüğünü, metabolizmasını ve hücre yüzeyindeki aktivasyon belirteçleri olan CD25 ve CD69 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (70). ICAM-3 hücresel adezyonda LFA-1 ile etkileşime girmektedir. ICAM-3 molekülünün LFA-1 ile zayıf kuvvette bağlanması ICAM-1 ile LFA-1 moleküllerinin spesifik olarak bağlanmasını kolaylaştırmakta ve arttırmaktadır. ICAM-1 ile %48 oranında homoloji göstermektedir (70).

VCAM-1: vasküler hücre adezyon molekülü

NCAM (CD56): nöral hücre adezyon molekülü

Şekil 2.2: İmmünglobülin süper ailesine bağlı adezyon molekülleri



2.1.8.5. Sınıflandırılmayan Adezyon Molekülleri

Adezyon fonksiyonuna katılan ancak yukarıda bahsedilen dört grup içerisinde sınıflandırılmayan adezyon molekülleridir. Hermes (CD44), CD36, laminin, fibronektin, OX40 molekülleri bu grup içine girmektedir (51)

Tablo 2.2: İntegrinler

İntegrinler	Diğer adı	Ligandı	Dağılımı
$\alpha 1\beta 1$	VLA-1, CD49a/CD29	LN, KOL	Aktive B/T hücreleri, fibroblast
$\alpha 2\beta 1$	VLA-2, CD49b/CD29	LN, KOL	B, aktive T hücreleri, EH, trombosit, epitel
$\alpha 3\beta 1$	VLA-3, CD49c/CD29	LN, KOL, FN	Aktive T hücreleri, EH, trombosit, fibroblast
$\alpha 4\beta 1$	VLA-4, CD49d/CD29	FN, VCAM-1	Lenfosit, monosit, eozinofil, timosit, fibroblast, kas, nöral tüp
$\alpha 5\beta 1$	VLA-5, CD49e/CD29	FN	Lenfosit, monosit, timosit, fibroblast, epitel, trombosit, EH
$\alpha 6\beta 1$	VLA-6, CD49f/CD29	FN	Lökosit, timosit
$\alpha 7\beta 1$	-	LN	Melanoma
$\alpha 8\beta 1$	-	-	Epitel, sınır sistemi
$\alpha v\beta 1$	CD51/CD29	VN, FN	-
$\alpha L\beta 2$	LFA-1, CD11a/CD18	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3	Lökosit, timosit
$\alpha M\beta 2$	Mac-1, CD11b/CD18	CR3, ICAM-1, Faktor X	Myeloid, aktive B hücreleri, B lösemi hücreleri
$\alpha X\beta 2$	CD11c/CD18	iC3b, FBG	Myeloid, dentritik hücreleri, aktive B hücreleri, B lösemi hücreleri
$\alpha IIb\beta 3$	GpIIb/IIIa, CD41a/CD61	FN, FBG, vWF, VN, TS	Trombosit

$\alpha v\beta 3$	VNR, CD51/CD61	VN, FBG, vWF, FN, TS, KOL	EH, monosit, aktive B hücre, tümöral hücre
$\alpha 6\beta 4$	-	LN	Epitel
$\alpha v\beta 5$	-	VN, FN	Fibroblast, monosit, epitel, tümöral hücre
$\alpha v\beta 6$	-	FN	
$\alpha 4\beta 7$	LPAM-2	FN, MAdCAM-1	VCAM-1, Bazı lenfositler
$\alpha IEL\beta 7$	HML	E-Kaderin	Bazı lenfositler

Tablo 2.3: Selektinler

Selektinler	Diğer adı	Ligandı	Dagılımı
L-Selektin	LAM-1, CD62L	Gli-CAM MAdCAM-1	CD34, Lökosit
E-Selektin	ELAM-1, CD62E	Sialil-LewisX, Sialil-Lewis _a , CLA	EH
P-Selektin	PADGEM, GMP140, CD62P	Sialil-LewisX, PSGL	EH, trombosit

Tablo 2.4: İmmünglobulin süper ailesine ait hücre adezyon molekülleri

Ig ailesi	Diğer adı	Ligandı	Dagılımı
ICAM-1	CD54	α L β 2, CD43	Lökosit, EH, dendritik hücre, fibroblast, epitel, sinoviyal hücre
ICAM-2	CD102	α L β 2	EH, lenfosit, monosit
ICAM-3	CD50	α L β 2	Lökosit
VCAM-1	CD106	α 4 β 1, α 4 β 7	Monosit, sinoviyal hücre, aktive endotel hücre
NCAM-1	CD56	NCAM-1	Nöral hücre, NK, bazı T lenfositler
CD2	LFA-2	LFA-3	Lenfosit, timosit
CD31	PECAM-1	CD31, α v β 3	Lökosit, EH, sinoviyal hücre
LFA-3	CD58	LFA-2	Lökosit, stroma EH
MAdCAM-1	-	α 4 β 7, L-Selektin	Mukoza EH

2.2- Trombositler

2.2.1- Yapı

Trombositler megakaryositlerin fragmantasyonundan kaynaklanan 2-5 μm çapında 0,5-1 μm kalınlığında 5-7 μm^3 hacminde, nükleus içermeyen, bikonveks, yuvarlak ya da hafif oval şekilde olan hücrelerdir (72-74). Vücutta total 10^{12} düzeyinde bulunmasına karşın dolaşan kandaki trombositler yaklaşık 7 mL kadar bir hacim oluşturmaktadırlar. Dolaşan trombositler total trombosit kitlesinin 2/3' ünü oluşturmakta olup, geri kalan 1/3' ü dalakta sekestre edilir ve her iki havuz denge halindedir (74). Dolaşan trombositlerin değişim oranı günde litrede 35×10^9 düzeyinde olup ortalama yaşam süreleri 7-10 gündür (72-74). Trombositler May grönwald/Giemsas ile boyanan yaymalarda küçük, yuvarlak, bazen elonge, düzensiz parçacıklar olarak görülürler. Azurofilik mor granülasyon, yaklaşık 30 lekeden ibaret olarak mavi sitoplazmadan ayrımlanabilir. Aktivasyon başladıktan sonra granüller santralize olur ve sitoplazma homojen bir hal alır (74). Granüller elektron mikroskopunda yuvarlak şekilli, yaklaşık 300 nm boyutlarında, tek bir membranla çevrili birer yoğunluk olarak görülürler.

2.2.1.1- Trombosit granülleri

Alfa granüller, yoğun cisimcikler ve lizozomlar olmak üzere 3 tip granül tanımlanmıştır.

2.2.1.1.1- Alfa granüller

Alfa granüller trombositlerdeki azurofilik granüllerin yaklaşık %85'ini oluştururlar. Alfa granüllerin içerdiği çok sayıda substans iki grup halinde toplanabilir. İlk grup spesifik trombosit proteinlerini, ikinci grup ise plazma ya da doku moleküllerini içerir. Bunlar, ya prokoagülan etki göstererek, ya trombositlerin adezyon ve aggregasyonlarını uyararak, ya da onarım süreçlerini hızlandırarak hemostaz aktivatörü işlevi gösterirler. Bu faktörler, salıverme fazı sırasında trombositlerden çevre ortama salınırlar(74). "Grey trombosit syndrome" olarak bilinen, aggregasyon yitimi ve hemorajik diyatezle sonuçlanan tabloda trombositlerde alfa granül eksikliği söz konusudur (72-74).

2.2.1.1.2- Yoğun granüller

Tüm granüllerin %10' unu kapsar. Tipik olarak, veziküler membrandan belirgin bir halo ile ayrılan opak partiküller olarak görülürler. Merkezi partiküldeki yoğunluğun, oldukça bol miktarda kalsiyumun bulunmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Kalsiyumdan başka yoğun cisimcikler adenosin difosfat (ADP), adenosin trifosfat (ATP) ve serotonin gibi salınan çeşitli maddeleri depoladığı gibi, katekolaminler, pirofosfat ve ortofosfatlarında içerir (72-74). Yoğun cisimcikler, endojen ADP salınımına sekonder aggregasyonun olmayışı ile karakterize Hermansky Pudlak sendromunda eksiktir (72-74).

2.2.1.1.3- Lizozomlar

Daha az sayıda olup yalnızca asit fosfataz, aril sülfataz gibi sindirici enzimlerden birinin varlığında gösterilebilir. Sikatrizasyon sırasında hemostatik tıkaçın eliminasyonunda rolleri vardır (73,74).

2.2.2- İşlev

Trombositlerin en önemli işlevi damarlarda zedelenme olduğu zaman mekanik bir tıkaç oluşumunu sağlamaktır. Bunu adezyon, sekresyon, aggregasyon ve prokoagülan özellikleri ile gerçekleştirirler.

2.2.2.1- Trombosit adezyonu

Kan damarlarında oluşan hasar sonucu subendotelyal bağ dokusunun açığa çıkması ile trombositler bu bölgeye yapışırlar (adezyon). Trombositler ile damar duvarı arasında oluşan etkileşim sırasında bir çok adezyon molekülü rol alır. Von Willebrand faktör bir yandan subendotelyal mikrofibriller ile bağlanırken diğer yandan trombosit membranındaki glikoprotein Ib (GPIb) ile bağlanır. GP IIb-IIIa reseptör kompleksi de trombositlerin vWF aracılığı ile damar duvarına yapışmalarını sağlayan ikinci bir bağlanma noktasını oluşturur. Subendotelyal bölgedeki kolajen moleküllerine yapışma ise GPIa aracılığı ile olmaktadır. Trombosit adezyonu sonrası oluşan bir dizi metabolik reaksiyon ile trombositlerde salıverme, şekil değişikliği ve aggregasyon oluşumu başlamaktadır. Trombositler daha küresel bir şekil

almaktadırlar ve uzun pseudopodlar oluşturarak trombosit-trombosit ve trombosit - damar etkileşimlerini arttırmaktadırlar (73-76)

2.2.2.2- Trombosit salıverme (release) reaksiyonu

Trombositlerin kollojen ile karşılaşmaları ve/veya trombin etkisi ile granüllerde bulunan ADP, serotonin, fibrinojen, lizozomal enzimler, beta tromboglobulin (β -TG), trombosit faktör 4 (PF4) gibi maddeler salıverilirler.

Alfa granül glikoproteinleri ve bu proteinlerin salıverilişi, trombosit aktivasyonu için son derece duyarlı bir gösterge olarak kullanılmaktadır. Çünkü bu substanslar yoğun granüllerin salıverilişi için gerekli uyarıdan daha düşük uyarı ile salıverilebilirler.

Ayrıca kollajen ve trombinin etkisi ile trombosit prostoglandin sentezi artar. Protein kinaz C aracılığı ile protein fosforilasyonunu aktive eden diaçilgliserol ve intrasellüler kalsiyum iyonlarının salınımına yol açan inositol trifosfat salıverilmesi oluşturur. Ayrıca tromboksan A_2 , cAMP düzeylerini düşürerek salıverme reaksiyonunu arttırır (73-76)

2.2.2.3- Trombosit aggregasyonu

Ortama salınan ADP ve tromboksan A_2 ile hasarlı bölgede daha fazla sayıda trombositlerin aggregasyonu gerçekleşir. Yeni katılan trombositler de aktive olarak daha fazla salıverme reaksiyonuna yol açarlar ve oluşan bu pozitif geri beslenme sayesinde hasarlı endotelial alanda yeterince büyük bir plak oluşumu sağlanır (73-76).

2.2.2.4- Prokoagülan aktivite

Trombositlerin salıverme reaksiyonu ve aggregasyonu takiben açığa çıkan trombosit faktör-3 koagülasyonun iki önemli basamağında rol oynamaktadır. Aktive faktör IX ve VIII ile birlikte faktör X aktivasyonunda rol alan trombosit faktör-3, aynı zamanda aktive faktör X ve V ile birlikte protrombinin trombine dönüştürülmesi basamaklarında yer almaktadır (73-76)

2.2.3- Trombosit aktivasyonu

Damar içinde pasif olarak dolaşan trombositler, damar duvarında bir zedelenme yada yabancı bir yüzeyle temas sonucunda hızla adezyon, şekil değişikliği, salıverme ve aggregasyon göstererek lokalize bir hemostatik tıkaç oluştururlar (75). Trombosit aktivasyonu, trombosit yüzeyini etkileyebilen değişik uyarıcı ve inhibe edici sinyallerle modüle edilen dinamik bir süreçtir (75). Trombositler, bu çeşitli uyarıları algılayan spesifik membran reseptörleri taşırlar. Bu reseptörler yoluyla alınan sinyalleri hücre içinde bulunan ikincil haberciler kompleks bir biyolojik yanıtı dönüştürürler (76).

Trombosit yanıtı iki grup halinde sınıflandırılabilir (76):

1. Adezyon, şekil değişikliği ve primer aggregasyon (reversibl yanıt)
2. Salıveriş reaksiyonu ve sekonder aggregasyon (irreversibl yanıt)

Reversibl yanıt, trombositlerin endotel hücre tabakası arasındaki boşlukların kapatılması, büyüme faktörlerinin alfa granüllerinden salıverilişi ve subendoteldeki küçük defektlerin onarımı gibi fizyolojik işlevleri;

Irreversibl yanıt ise trombositlerin hemostatik işlevlerini içerir (76-78)

Uyarıya ilk fizyolojik yanıt, disk şeklinde ve düzgün olan trombositlerin adezyonu ve şekil değişikliğidir. İki-üç saniye içerisinde küre şeklini alan trombositlerde 7-8 saniye içerisinde uzun psudopodlar belirir (79-80). Trombositlerin küre şeklini alması, granüllerinin merkezileşmesi ve kontraktil hücre iskeletinin kasılması sonucu ortaya çıkar (81). Şekil değişikliği sırasında plazma membranının yüzeyi de genişlemektedir. Bu da olasılıkla yüzeyle bağlantılı "açık kanaliküler sistem" in dışı açılmasının bir sonucudur (82). Fizyolojik koşullarda şekil değişikliği, aggregasyon ve salıverilişe öncülük eder ve bir öngerekliliktir (82,83). Şekil değişikliği sırasında trombositlerin prokoagülan aktiviteleri de artmaktadır (84).

Çeşitli fizyolojik substanslar trombositleri aktive etmektedir. Bunların içinde en önemlileri, trombositlerin adezyonunu uyaran vWF ve kollajen; koagülasyon sisteminde oluşan trombin; aktive trombositlerden salıverilen endoperoksidler/TXA₂ ve ADP; dolaşımda bulunan epinefrin ve vazopressin; ve uyarılmış nötrofil ve makrofajlardan salınan trombosit aktive edici faktördür (PAF) (76).

Trombositler aktive olduklarında trombosit membranındaki lipid dağılımında değişiklikler olmakta ve negatif yüklü fosfatidilserinin büyük bir bölümü membranın dış yüzeyine çıkmaktadır (85). Aktive trombositlerin bu özelliğinin hemostatik süreçte büyük önemi vardır. Negatif yüklü fosfolipidler faktör IXa, faktör VIIIa ve kalsiyumdan oluşan bir kompleks aracılığı ile faktör X'un faktör Xa'ya ve yine faktör Xa, faktör Va ve kalsiyumdan oluşan bir kompleks aracılığı ile protrombinin trombine dönüşümünü belirgin olarak arttırmaktadır(86-88). İstirahat halindeki trombositler, membranın dış yüzeyinde fosfatidilkolin ve sfingomyelin gibi nötral fosfolipidleri içerdiklerinden faktör Xa yada trombin oluşumunu uyarma kapasiteleri düşüktür (85). Trombositlerde faktör Va için 1000-2000 adet yüksek afiniteli bağlanma bölgeleri bulunmaktadır (89). Trombositte bağlı faktör Va, faktör Xa için bir reseptördür ve trombosit başına faktör Xa için 200-3000 bağlanma bölgesi bulunmaktadır (89). Aktivasyon sırasında ayrıca, koagülasyon ve fibrinolizisde önemli rolleri olan yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HMWK), faktör XIIa, faktör XIIIa, aktive protein C ve plazminojen içinde bağlanma bölgeleri ekspres edilir (90-92).

Aktive trombositler, doku plazminojen aktivatörü (t-PA) ve ürokinazla kompleks oluşturarak bunları inaktive eden trombosit aktivatör inhibitörü (PAI-1)'i salıvermektedir (93). Alfa granüllerde bulunan PAI-1'in yalnızca %5'i aktif durumda olup geri kalan büyük bölümü latent formdadır. Aktive trombositlerden salıverilen TGF- β ise endotel ve düz kas hücrelerinde PAI-1 ekspresyonunu uyarmaktadır ve bu hücrelerde oluşan PAI-1 aktif formdadır (93).

2.2.3.1- Trombosit aktivasyon belirteçleri

Son yirmi yıl içerisinde araştırmacılar pretrombotik ya da trombotik durumun belirlenmesi amacıyla in vivo olarak aktive trombositlerin varlığını göstermeye yönelik duyarlı ve spesifik yöntemler geliştirmeye çalışmışlardır. Bunlar:

- a. Dolaşan trombosit agregatları (94-96),
- b. Aktive trombositlerden salıverilen ve plazma ya da idrarla saptanan metabolitler (PF-4, β -TG, 2,3-dinor-IXB₂, 11-dehydro-IXB₂) (97,98)
- c. İmmunolojik yöntemler (trombosit- associated FXIII, GP-IIb-IIIa, LAMP-1 ve -2, GP-53, GMP-33, GMP-140) (99,100)

Trombositler normal koşullar altında dolaşımında istirahat durumunda bulunurlar ve birçok fizyolojik agonistlerden bir veya birkaçı ile uyarıldıkları zaman trombosit adezyon ve aggregasyonuna yol açan değişikliklere uğrarlar. Bu değişiklikler in vivo koşullarda olabilecekleri gibi, in vitro koşullardan da önemli oranda etkilenmektedirler (101). Trombosit aktivasyonunun değerlendirilmesi amacıyla kullanılan PF-4, β -TG, tromboksan metabolitlerinin serum ve idrarda ölçümü gibi biokimyasal yöntemlerin çoğunluğunda uygulanan manipülasyonlar nedeni ile teknik hataların doğurduğu yanıltıcı test sonuçları ile karşılaşmak mümkündür. Bu nedenle klinik olarak yağın kullanım alanı bulamamışlardır.

Akış sitometrik yöntemlerle, trombosit aktivasyonu sırasında trombosit yüzeyinde oluşan değişikliklerin değerlendirilmesi yoluyla da trombosit aktivasyonunun monitorize edilmesi mümkündür. Özellikle tam kan yönteminin kullanıldığı durumlarda, trombositler doğal ortamları içinde analiz edilmektedirler ve santifügasyon gibi teknik nedenlerle trombosit aktivasyonuna yol açarak yanıltıcı sonuçlar doğurabilecek manipülasyonlar bulunmamaktadır. Bu nedenle trombosit aktivasyonlarının değerlendirilmesinde akış sitometrik yöntemlerin kullanılması, PF-4, β -TG, tromboksan metabolitlerinin serum ve idrarda ölçümü gibi biokimyasal yöntemler kullanıldığı analizlere göre daha doğru ve güvenilir sonuçların alınmasını sağlamaktadır (100).

2.3- Akış Sitometrisi

2.3.1- Çalışma ilkeleri

Akış sitometrisi, sıvı bir ortam içinde dağılmış olarak bulunan hücre veya partiküllerin özelliklerinin incelendiği bir tekniktir. Partikül veya hücreler tek sıra şeklinde özel bir bölmeden istenen hızda akarak geçerler. Bu sırada incelenecek olan hücrelerin üzerine belirli bir dalga boyunda laser ışığı gönderilir ve hücrelerden yansıyan ışığın özellikleri alıcılar tarafından kaydedilerek bilgisayara değerlendirmek üzere aktarılır. Alıcılardan biri hücrelerin büyüklüklerini, diğeri granüleritesini ve bir diğeri ise yansıttıkları floresans yoğunluğunu algılar. Bu bilgiler, bilgisayar yardımı ile histogramlar şeklinde korele edilerek incelenebilmektedir. Hücreler tek sıra halinde alıcıların önünden geçtiği için, çok kısa bir süre içinde binlerce hücrenin her birinin

özellikleri tek tek kaydedilmektedir. Histogramlar üzerinde büyüklük ve granüleritelerine göre değişik alanlarda toplanan hücre popülasyonlarının etrafına çizilen pencereler ile sadece istenilen popülasyonlar üzerinde değerlendirme yapmak mümkündür. Floresans ile bağlanmış monoklonal antikolar kullanılarak incelenen hücrelerin üzerindeki antijenik yapılar tanınabilmektedir. Böylece hücre yüzey işaretleri saptanarak normal veya patolojik hücrelerin tiplendirilmesi yapılabilmekte ve hastalık durumlarında tedavilere verdikleri yanıtlar monütere edilebilmektedir. Akış sitometrisi ile, süspansiyon haline getirilebilen her hücre popülasyonu üzerinde çalışma yapmak mümkündür (102)

2.3.2- Akış sitometrisi ile yapılan trombosit çalışmaları

Akış sitometrik yöntemlerin trombosit çalışmalarında kullanılması, fizyolojik ve/veya patolojik durumlarda trombositlerin davranışları konusunda birçok bilgi edinilmesini sağlamıştır. Trombositlerin yabancı ortamlar ile karşılaşmaları fizyolojilerini değiştirmektedir. Kan alımı sırasında turnike uygulanması, vene iğne ile girilmesi, enjektör içine kanın aspire edilmesi, kan örneğinin tüplere konulması ve trombositlerin diğer hücrelerden izolasyonu için uygulanan manipülasyonlar sırasında trombositlerde birçok fizyolojik değişiklik olabilmektedir (101). Bu nedenle trombositlerle çalışma yapılması zordur. Özellikle tam kan yöntemleri kullanılarak yapılan akış sitometrik çalışmalarda bu sorunlar tümüyle aşılmasa da büyük oranda azaltılabilmektedir (100). Tam kan yönteminin akış sitometrisi ile yapılan çalışmalarda birçok yönden üstünlüğü bulunmaktadır. Bu yöntemde mikrolitre düzeyindeki kan örnekleri çalışma için yeterli olacağından infant ve bebeklerde, trombositopenik hastalarda çalışmaların yapılması mümkündür. Tam kan yönteminin kullanılması sırasında trombositlerin santrifugasyonu ve yıkanmaları gerekmemektedir, bu nedenle trombositlerin aktivasyonuna yol açarak test sonuçlarını etkileyebilecek olan manipülasyon hataları en aza indirilebilmektedir. Ayrıca akış sitometrisi ile trombosit subpopülasyonlarının yanıtlarını ayrı ayrı değerlendirmek mümkündür. β -TG veya PF-4 ölçümleri ile trombosit aktivasyonlarının değerlendirilmesi bu olanağı sağlayamamaktadır. Birçok fizyolojik ve patolojik durumda akış sitometrisi ile yapılan trombosit yüzeyi üzerindeki antijenik yapılar tanınarak trombositlerin idantifikasyonu yapılabilmekte, aktivasyon durumları ve agonistler ile uyarıldıkları zaman gösterdikleri agregasyon yanıtları incelebilmektedir.

2.3.3- Trombosit aktivasyonu sırasında oluşan trombosit membran değişikliklerinin akış sitometrik yöntemlerle gösterilmesi

ADP veya epinefrin gibi zayıf bir agonist ile trombositlerin stimülasyonu trombosit GP-IIb-IIIa kompleksinde fibrinojen reseptör bölgesini açığa çıkararak fibrinojenin bağlanmasını kolaylaştıracak şekilsel bir değişikliğe yol açmaktadır ve trombosit-trombosit agregasyonu oluşmaktadır Trombositler agregate olduklarında veya trombin ya da damar duvarındaki kollajen gibi kuvvetli bir agonist ile uyarıldıklarında ise degranülasyon oluşmaktadır Degranülasyon sırasında granül membranı hücre yüzeyine taşınmaktadır ve granül membranındaki spesifik glikoproteinler neo-antijen olarak aktive trombosit membranında belirlemektedir Trombosit granüllerinden salınan proteinler bu esnada trombosit yüzeyine yapışmaktadır. Tüm bu değişikliklerin akış sitometrik yöntemlerle saptanması mümkündür (102)

2.3.3.1- GP-IIb-IIIa kompleksinde ve fibrinojen molekülünde olan değişiklikler

Trombosit aktivasyonu sırasında GP-IIb-IIIa kompleksinde olan değişiklikler birkaç yolla gösterilebilir Örneğin aktive hale gelmiş GP-IIb-IIIa kompleksine karşı geliştirilmiş olan monoklonal antikorlar (PAC-1) aracılığı ile (103) , ya da aktivasyon sonucu GP-IIb-IIIa kompleksine yapışan fibrinojen molekülü, anti-fibrinojen poliklonal veya monoklonal antikorlar ile saptanabilir (104) Aktive olmuş GP-IIb-IIIa kompleksi daha düşük afinitede olmak üzere vWF ve fibronektin için de reseptör özelliğine sahiptir Bu nedenle aktive olmuş trombositlerin taşıdıkları vWF ve fibronektinin, bu moleküllere karşı geliştirilmiş poliklonal veya monoklonal antikorlar ile gösterilmesi de mümkündür (105,106)

Aktive olmuş GP-IIb-IIIa kompleksine bağlandığı zaman fibrinojen molekülünün kendisinde de şekil değişikliği olmaktadır Bu yeni değişikliği saptayabilen monoklonal antikorların kullanılması ile aktive olmuş trombositlere yapışmış olan fibrinojenin, plazmadaki fibrinojenden bağımsız olarak görülmesi mümkündür (101)

Aktive olmuş GP-IIb-IIIa kompleksine fibrinojen molekülünün yapışması ile GP-IIb-IIIa kompleksinde yeni bir şekilsel değişiklik ortaya çıkmakta ve böylece LIBS (ligand induced binding sites) adı verilen yeni epitoplarda oluşmaktadır Bu

epitoplara karşı geliştirilen monoklonal antikorlar ile de aktive trombositlerin saptanması mümkündür (107).

2.3.3.2- Alfa granül membran antijenlerinin gösterilmesi

Trombosit aktivasyonunun gösterilmesi, degranülasyon sonucu trombosit yüzeyinde beliren granül membran antijenlerinin saptanması yoluyla da yapılabilmektedir. GMP-140 bunlar içinde ilk tanımlanan antijenlerden birisi olup PADGEM, CD62 antijen ve P-selektin olarak da adlandırılmaktadır (108-109). GMP-140 alfa granüllerin membranları üzerinde bulunmaktadır. Ayrıca yoğun granüllerin membranları üzerinde de gösterilmiştir (110). İstirahat durumunda ki trombositlerin yüzeyinde 1000 molekülden daha az sayıda iken, trombosit aktivasyonu ile hücre başına 10 000 molekülün üzerine çıkmaktadır (111-112). Selektinler ailesinin bir üyesi olan P-selektin, ELAM-1 (E-selektin) ve lenfosit homing reseptör (L-selektin) gibi bir adezyon molekülüdür (10,109-112). Nötrofiller ve monositler için yapışma yeri olan P-selektinin aktive trombositlerin RES hücreleri tarafından dolaşımdan uzaklaştırılmasında rol oynadığı düşünülmektedir (113).

Alfa granüllerin membranlarında bulunan GMP-33 de P-selektin gibi istirahat halindeki trombositlerde çok az sayıda bulunduğu halde, aktivasyonla ekspresyonu belirgin olarak artan başka bir antijendir (114).

Trombositlerdeki alfa granüllerin içinde bulunan ve aktivasyon ile ortama salınan trombospondin ve PF-4, degranülasyondan sonra trombosit üzerindeki reseptörlerine bağlanmaktadır. Bu nedenle trombosit üzerinde bulunan trombospondin de trombosit aktivasyon göstergesi olarak kullanılabilir (115).

2.3.3.3- Lizozom membran antijenlerinin gösterilmesi

Trombositlerdeki lizozomların membranlarında bulunan GP-53 veya CD63 olarak bilinen bir glikoprotein de trombosit aktivasyonu ile hücre zarında ekspresyonu artmaktadır (105,116). Fonksiyonu tam olarak bilinmeyen bu proteine diğer hücrelerde ve tümör hücrelerinde de rastlanabilmektedir (117).

Lizozomal membranlarda bulunan ve aktivasyon ile trombosit membranlarında ekspresyonu artan diğer iki protein LAMP-1 ve LAMP-2 dir (118).

2.3.3.4- Yoğun cisimcik membran antijenlerinin gösterilmesi

Granulophysin yoğun granül membranında bulunan ve trombosit aktivasyonu ile ekspresyonu artan diğer bir antijendir (110)

2.3.3.5- GP-Ib ekspresyonundaki azalışın saptanması

Trombin ile oluşan trombosit aktivasyonu sırasında, yüzeye bağlanan kanalikular sistem ve alfa granül membranlarındaki GP-IIb-IIIa kompleksinin translokasyonu nedeni ile GP-IIb-IIIa kompleks ekspresyonu artarken diğer taraftan kanaliküler sisteme sekestrasyonu nedeni ile GP-Ib ekspresyonunda azalma olmaktadır (115)

Tüm bu yöntemler, trombosit aktivasyonundaki küçük değişikliklerin duyarlı birer göstergesidirler ve bu nedenle *in vitro* koşullarda trombosit aktivasyonun gösterilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır

“

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1- Vericiler

Bu çalışma yaşları 21 ila 49 arasında değişen (ortanca: 31) 22 erkek trombosit vericisinde kesikli akım (Haemonetics MCS+, n: 12) ve devamlı akımla çalışan (Fresenius AS TEC 204, n: 10) farklı marka ve modeldeki iki aferez cihazı ile Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Aferez ve Kök Hücre Ünitesi'nde gerçekleştirildi. Tüm vericiler başlangıçta uzman bir doktor tarafından değerlendirildi, medikal öyküleri alındı ve fizik muayeneleri yapıldı. Standart verici olma özelliklerini taşıyan vericilerin tam kan sayımları, HBsAg, anti-HCV, anti-HIV ve VDRL serolojik testleri yapıldı ve çift doz tromboferez işlemi için uygun olan (trombosit sayısı $275 \times 10^9/L$ ve üzerinde olan) vericiler bilgilendirilmiş onay formları alındıktan sonra çalışmaya dahil edildi. Medikal öykülerinde sürekli ilaç kullanma anamnezi olanlar, „son bir hafta içinde hemostatik sistemi etkileyebilecek aspirin, NSAID vb bir ilaç alanlar ve menstrual sikluslar ve/veya oral kontraseptif kullanımına bağlı hormonal değişiklikler nedeniyle kadınlar bu çalışmaya alınmadı.

3.2- Kan örneklerinin alınması

Vericilerin periferik kan örnekleri, çift doz tromboferez işlemi başlamadan önce (T0), aferez işlemi tamamlandıktan hemen sonra (T1), son aferezden 24 saat (T2) ve 7 gün (T3) sonra olacak şekilde vakumlu silikonize düz, EDTA ve DIA tüplere staz yapmaksızın geniş çaplı bir ven kullanılarak alındı. EDTA içeren tüplere alınan örneklerde tam kan sayımı Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezi'nde bulunan Coulter MaxM (Beckman-Coulter, Inc, USA) otomatik kan sayım cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Nötrofil adezyon molekül ekspresyonları ve trombosit-nötrofil kompleks oluşumları Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan akış sitometresinde (Epics XL-MCL, Coulter Electronics INC, FL, USA) DIA tüp içine alınan kan örneklerinin maksimum 2 saat içinde tam kan yöntemi kullanılarak analiz edilmesi ile gösterildi.

3.3- Monoklonal antikorlar

Akış sitometresi ile yapılan ölçümlerde granülosit üzerinde yer alan adezyon moleküllerinin gösterilmesi amacıyla insan CD11b antijenine karşı geliştirilmiş olan floresan ile direk olarak bağlı mouse monoklonal antikor (anti-CD11b-FITC, Immunotech), insan CD18 antijenine karşı geliştirilmiş olan floresan ile direk olarak bağlı mouse monoklonal antikor (anti-CD18-FITC, Immunotech), insan CD50 ve CD54 antijenine karşı geliştirilmiş olan floresan ile direk olarak bağlı mouse monoklonal antikorlar (anti-CD54-FITC, anti-CD50-PE Immunotech) ve insan CD62L antijenine karşı geliştirilmiş olan floresan ile direk olarak bağlı mouse monoklonal antikor (anti-CD62L-PE, Immunotech) kullanıldı. Granülosit üzerine yapışmış olan trombositler ise insan CD42b antijenine karşı geliştirilmiş olan floresan ile direk olarak bağlı mouse monoklonal antikor (anti-CD42b-PE, Immunotech) ile gösterildi.

3.4- Flow sitometrik analiz

Flow sitometrik analizler dört renk histogram çalışma özelliğine sahip Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan akış sitometresi (Epics XL-MCL, Coulter Electronics INC, FL, USA) kullanılarak gerçekleştirildi.

Akış sitometresi ile yapılacak analizler için tam kan yöntemi kullanıldı. Kan örnekleri, vericilerden alınmalarını takiben en geç 10 dakikalık süre içinde laboratuvara ulaştırıldı ve 100 µL kan örneği üzerine 20µL direkt konjuge monoklonal antikor (anti-CD11b veya anti-CD18 veya anti-CD62L veya anti-CD42b veya negatif izotipik kontrol) konuldu. Örnekler 15 dakika süre ile karanlık bir ortamda ve oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra örnekler Coulter T Q-Prep' ten geçirilerek İmmunoprep A (formik asit 12 mlt/L, stabilizer) ile eritrositlerin lizisi, İmmunoprep B (Sodyum karbonat 60 gr/L, sodyum klorid 145 gr/L, dodyum sülfat 313 gr/L, stabilizer) ile lökositlerin stabilizasyonu, İmmunoprep C (Parafomaldehit 100 gr/L, tamponlar) ile de hücre membranının fiksasyonu sağlandı ve takiben akış sitometresi ile ölçümler yapıldı.

Akış sitometresi 15 mikron çapındaki boncuklar (Immunocheck, Coulter Electronics, Inc, FL, USA) ile kalibre edildikten sonra örnekler cihaza verildi. Parçalanmış hücre artıkları ve elektronik kirlilik ön saçının (forward scatter) üzerinde ayarlama yapılarak uzaklaştırıldı. Öncelikle granüositler büyüklük ve granüleritelerine göre hücrelerin dağılımlarını gösteren ön (forward) ve 90 derecelik yan saçının (right-angle light scatter) histogramı kullanılarak diğer hücrelerden ayrıldı ve granüositler ile ilgili analizler belirlenen bu bölge üzerinde gerçekleştirildi. Analiz bölgesindeki partiküllerden negatif izotipik kontrolün floresansından daha yoğun floresans gösterenlerin total partikül içerisindeki yüzdeleri (ilgili antijeni taşıyan hücre yüzdesi) saptandı ve hücre başına düşen ortalama antijen yoğunluğunun (molekül miktarının) gösterilmesinde indirekt bir parametre olan ortalama kanal numarası (mean fluorescence intensity, MFI) kullanıldı (Şekil 3 1)

..

3.5- İstatistik

İstatistik analizler SPSS hazır istatistik paket programı (SPSS for Windows, Version 10.0, SPSS inc., IL, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Değişik zaman dilimlerinde (T0-3) alınan örneklerdeki molekül yüzde ve ekspresyonlarının analizinde normal dağılıma uygunluk durumunda "Repeated Measure ANOVA" normal dağılımın sağlanamadığı durumlarda ise non-parametrik "Wilcoxon's sign-rank test" kullanıldı. 0.05 den küçük "p" değerleri anlamlı olarak kabul edildi. Metin içerisinde, tablo ve şekillerdeki değerler ortalama (\pm SD) ve ortanca (min-max) (minimum-maksimum) olarak verildi.

SONUÇLAR

1. Çift doz trombosit aferezi ile vericilerin trombosit ve nötrofil sayılarında izlenen değişiklikler:

Trombosit vericilerinde aferez işlemi sonrasında ortalama (min-max) trombosit sayılarında (T1; 189 (140-325) $\times 10^9/L$) başlangıca (T0; 311 (272-500) $\times 10^9/L$) göre anlamlı azalma saptandı ($p < 0.001$) Aferez sonu birinci (T2) ve yedinci günlerde (T3) oluşan artışa rağmen trombosit sayılarındaki değişimin başlangıca (T0) göre hala anlamlı olarak düşük olduğu izlendi ($p < 0.002$) Her iki cihazda da benzer değişimler izlenirken farklı olarak Haemonetics ile yapılan aferezlerde başlangıç (T0) ile yedinci gün (T3) trombosit sayılarında anlamlı değişiklik olmadığı gözlemlendi (Tablo 4.1 ve Şekil 4.1)

Vericilerin aferez öncesi (T0) ve sonrası (T1,T2,T3) ortalama (min-max) nötrofil sayılarında (T0: 4.9 (2.1-6.8), T1: 4.9 (2.3-6.9), T2: 4.6 (2.6-8.2), T3: 4.1 (2.4-7.9) $\times 10^9/L$) anlamlı bir değişiklik izlenmedi. Bu açıdan her iki aferez cihazı arasında da fark yoktu (Tablo 4.2 ve Şekil 4.2)

2. Çift doz trombosit aferezi ile vericilerin nötrofil adezyon moleküllerinde izlenen değişiklikler:

Nötrofillerde eksprese edilen adezyon moleküllerinden $\beta 2$ integrin familyasına ait olan CD11b ve CD18 molekül yoğunluklarının indirek bir göstergesi olan ortalama floresans yoğunluklarının (MFI), aferez işlemi öncesine (T0) göre aferez işlemi sonrasında (T1) hafif düzeyde arttığı sonrasında ise bu artışın başlangıç değerlerine gerilediği saptandı ancak bu değişimlerin hiçbirisi anlamlı olarak bulunmadı. Cihazlar arasında da anlamlı değişim izlenmedi (Tablo 4.3 ve Şekil 4.3)

İmmünglobulin süper ailesine ait hücre adezyon molekülleri olan CD50 ve CD54 floresans yoğunluklarında aferez işlemi ile herhangi bir değişiklik saptanmadı. Her iki cihaz açısından da bir farklılık izlenmedi (Tablo 4.3 ve Şekil 4.4)

Yine nötrofillerde eksprese edilen selektin familyasına ait CD62L (L-selektin) ortalama floresans yoğunluklarında (MFI) ise aferez öncesine (T0; 16 29 (6 97-40 80)) oranla aferez sonrasında (T1; 12 46 (6 95-22 90)) anlamlı bir azalma oluştu ($p < 0 022$) Bu azalmanın T2 döneminde alınan kan örneklerinde devam ettiği ($p < 0 046$), aferez işleminden 1 hafta sonra ise normal başlangıç düzeylerine döndüğü izlendi ($p > 0 05$) (Tablo 4 4 ve Şekil 4 5).

Fresenius cihazı ile CD62L (L-selektin) molekül yoğunluğunda aferez öncesine (T0) oranla aferez sonrasında (T1) izlenen düşme anlamlı bulunmazken, birinci (T2) ve yedinci (T3) günlerde izlenen azalmanın anlamlı olduğu saptandı ($p < 0 013$) Haemonetics cihazında ise CD62L (L-selektin) molekül yoğunluğunda aferez öncesine oranla aferez sonrasında, birinci ve yedinci günlerde anlamlı bir değişiklik olmadığı izlendi (Tablo 4 4 ve Şekil 4 5)

3. Çift doz trombosit aferezi ile vericilerin nötrofil trombosit komplekslerinde izlenen değişiklikler:

Başlangıçta (T0) ortalama (min-max) % 9 7 (2 0-20 7) oranında trombosit ile kompleks yapmış nötrofil oranının (min-max) aferez işlemi sonunda (T1) % 22 4 (2 2-48 0) düzeyine çıktığı gözlemlendi ($p < 0 0001$) Aferez sonrası birinci (T2) %15,8 (min-max) ve yedinci günde (T3) %14 8 (min-max) bu oranların azalmakla birlikte başlangıca göre anlamlı olarak yüksek devam ettiği tespit edildi ($p < 0 012$) Haemonetics cihazı ile 7 günde (T3) izlenen artış başlangıca göre anlamlılığını korurken Fresenius cihazı ile anlamlılık saptanmadı (Tablo 4 5 ve Şekil 4 6)

Benzer şekilde trombosit ile kompleks yapmış mutlak nötrofil sayıları değerlendirildiği zaman aferez öncesi ortalama $0 34 (0 08-1 14) \times 10^9/L$ olan sayının yaklaşık 3 kat artarak $1 12 (0 08-2 44) \times 10^9/L$ değerine ulaştığı ($p < 0 0001$) aferez sonu birinci ve yedinci günlerde ise başlangıç düzeyine inerek anlamlılığını yitirdiği saptandı. Trombosit ile kompleks yapmış mutlak nötrofil sayıları açısından cihazlar arasında farklılık gözlenmedi (Tablo 4 6 ve Şekil 4 7)

Nötrofillerdeki CD42b antijen yoğunluğunun da (MFI) aferez sonrası (T1) 2 05 (1.01-4 09) aferez öncesine (T0) 1 5 (0 85-2 41) göre anlamlı olarak arttığı ($p<0.007$), bu artışın yedinci günde (T3) başlangıç seviyelerine döndüğü bulundu. Fresenius cihazı ile yapılan işlemlerde başlangıca göre hemen aferez sonrasında anlamlı artış saptanırken Haemonetics cihazı ile anlamlı artışın birinci günde olduğu gözlemlendi (Tablo 4.7 ve Şekil 4.8)

Tablo 4.1: Çift doz trombosit aferezi ile vericilerin (n=22) trombosit sayılarında çalışma dönemleri boyunca izlenen değişiklikler

Trombosit x 10 ⁹ /L	T0	T1	T2	T3
Genel (n=22)				
Ortanca (min-max)	311 (272-500)	189 (140-325)	209 (153-369)	279 (190-383)
Ortalama (±SE)	319 (±10)	199 (±8 9)	222 (±9 2)	282 (±9 4)
P		0.0001	0.0001	0.002
Fresenius (n=10)				
Ortanca (min-max)	314 (281-335)	209 (140-238)	215 (153-269)	279 (190-359)
Ortalama (±SE)	319 (±4 8)	204 (±10 1)	218 (±11 2)	274 (±15 1)
P		0.005	0.005	0.019
Haemonetics				
Ortanca (min-max)	307 (272-500)	184 (144-325)	205 (189-369)	280 (215-383)
Ortalama (±SE)	323 (±18)	194 (±14 2)	226 (±14 4)	288 (±12 1)
P		0.002	0.002	ns

T0: İlk aferez öncesi

T1: Son aferez sonu 1. saat

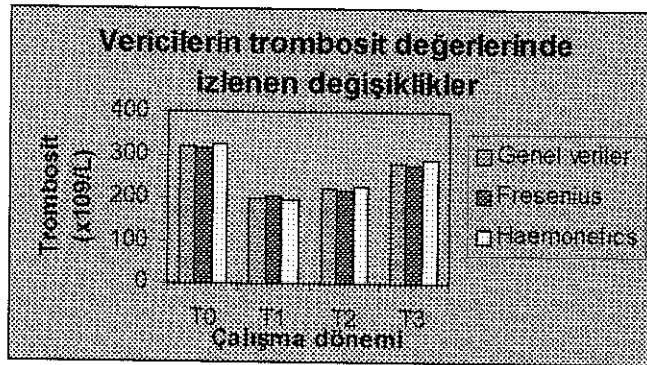
T2: Son aferez sonu 24 saat

T3: Son aferez sonu 7. gün

ns: İstatistik olarak anlamsız

p değerleri T0 sonuçları ile olan anlamlılığı göstermektedir

Şekil 4.1: Çift doz trombosit aferezi ile vericilerin (n=22) trombosit sayılarında çalışma dönemleri boyunca izlenen değişiklikler



Tablo 4.2: Çift doz trombosit aferezi ile vericilerin (n=22) nötrofil sayılarında çalışma dönemleri boyunca izlenen değişiklikler

Nötrofil x 10 ⁹ /L	T0	T1	T2	T3
Ortanca (min-max)	4,96 (2,13-6,87)	4,94 (2,33-9,3)	4,59 (2,61-8,24)	4,12 (2,42-7,92)
Ortalama (±SE)	4,7 (±1,21)	5,2 (±1,78)	4,77 (±1,43)	4,37 (±1,34)
P		ns	ns	ns

T0: İlk aferez öncesi

T1: Son aferez sonu 1 saat

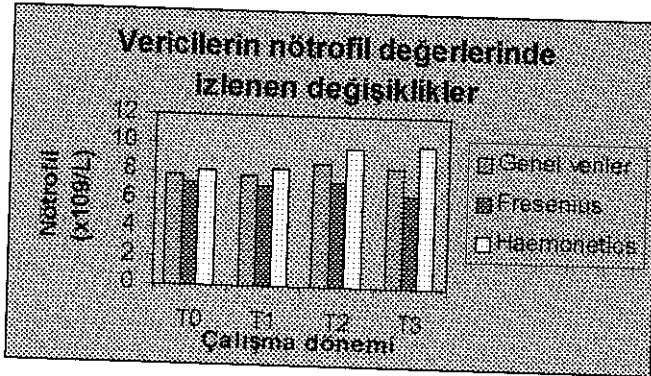
T2: Son aferez sonu 24 saat

T3: Son aferez sonu 7 gün

ns: İstatistik olarak anlamsız

p değerleri T0 sonuçları ile olan anlamlılığı göstermektedir

Şekil 4.2: Çift doz trombosit aferezi ile vericilerin (n=22) nötrofil sayılarında çalışma dönemleri boyunca izlenen değişiklikler



Tablo 4.3: Çift doz trombosit aferezi ile vericilerin (n=22) çalışma dönemleri boyunca nötrofil adezyon molekül ekspresyonlarında izlenen değişiklikler

	T0	T1	T2	T3
CD11b MFI				
Ortanca (min-max)	21.5 (13.4-44.2)	20.4 (16.0-56.8)	19.8 (14.4-43.5)	26.6 (15-47)
Ortalama (\pm SE)	24.4 (\pm 2.06)	25.3 (\pm 2.3)	22.3 (\pm 1.52)	27.1 (\pm 1.99)
<i>P</i>		ns	ns	ns
CD18 MFI				
Ortanca (min-max)	11.9 (10.6-33.1)	11.8 (10.8-41.0)	12.4 (10.9-31.6)	12.1 (10.7-37.6)
Ortalama (\pm SE)	14.7 (\pm 1.36)	15.2 (\pm 1.77)	14.7 (\pm 1.2)	15.0 (\pm 1.6)
<i>P</i>		ns	ns	ns
CD54				
Ortanca (min-max)	11.0 (8.1-13.7)	10.9 (8.1-17.7)	11.4 (9.1-14.9)	10.9 (8.7-18.1)
Ortalama	10.8	11.0	11.6	11.7
<i>P</i>		ns	ns	ns
CD50				
Ortanca (min-max)	74 (56-118)	74 (46-103)	79 (56-94)	80 (49-98)
Ortalama	76	76	78	79
<i>P</i>		ns	ns	ns

T0: İlk aferez öncesi

T1: Son aferez sonu 1. saat

T2: Son aferez sonu 24 saat

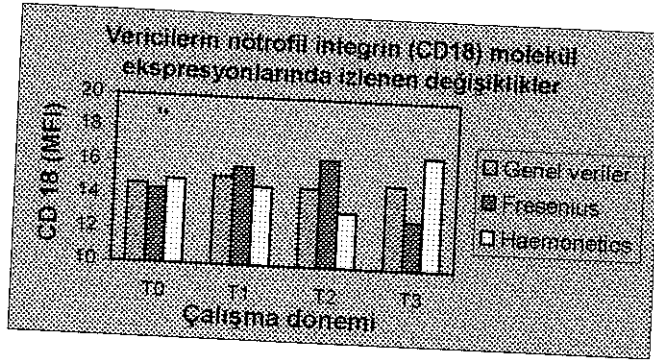
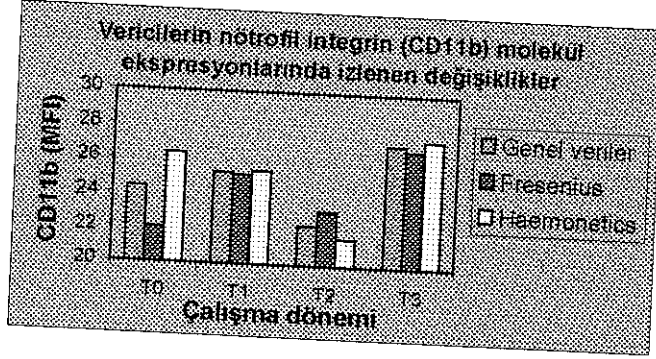
T3: Son aferez sonu 7. gün

MFI: Ortalama floresans yoğunluğu

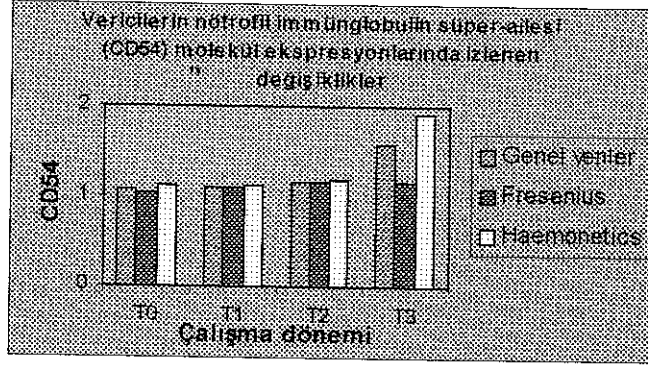
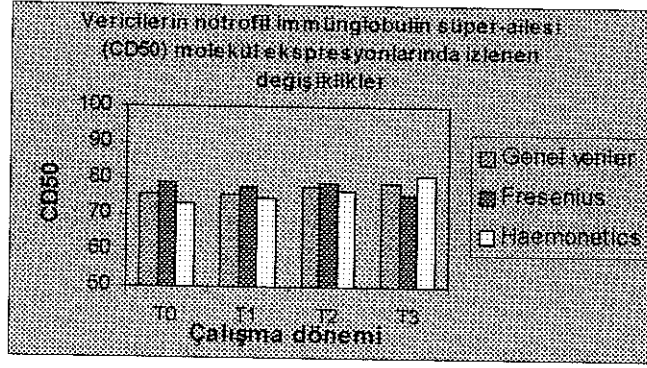
ns: İstatistik olarak anlamsız

p değerleri T0 sonuçları ile olan anlamlılığı göstermektedir

Şekil 4.3: Çift doz trombosit aferezi ile vericilerin (n=22) çalışma dönemleri boyunca nötrofil integrin (CD11b ve CD18) molekül ekspresyonlarında izlenen değişiklikler



Şekil 4.4: Çift doz trombosit aferezi ile vericilerin (n=22) çalışma dönemleri boyunca nötrofil immünglobulin süper ailesi (CD50 ve CD54) molekül ekspresyonlarında izlenen değişiklikler



Tablo 4.4: Çift doz trombosit aferezi ile vericilerin (n=22) çalışma dönemleri boyunca nötrofil selektin (CD62L) molekül ekspresyonlarında izlenen değişiklikler

CD62L MFI	T0	T1	T2	T3
Genel (n=22)				
Ortanca (min-max)	14.9 (6.9-40.8)	13.0 (6.9-22.9)	13.7 (7.0-20.5)	13.5 (7.0-33.0)
Ortalama (±SE)	16.2 (±1.54)	12.4 (±0.78)	13.5 (±0.83)	15.1 (±1.3)
<i>P</i>		0.022	0.046	ns
Fresenius (n=10)				
Ortanca (min-max)	15.8 (7.8-40.8)	12.0 (8.2-22.9)	12.9 (7.7-19.5)	13.4 (7.0-24.2)
Ortalama (±SE)	18.5 (±2.93)	12.5 (±1.45)	12.6 (±1.11)	13.5 (±1.68)
<i>P</i>		ns	0.009	0.013
Haemonetics (n=12)				
Ortanca (min-max)	13.1 (6.9-20.9)	13.0 (6.9-16.4)	15.0 (7.0-20.5)	13.9 (8.6-33.0)
Ortalama (±SE)	14.4 (±1.32)	12.3 (±0.82)	14.2 (±1.22)	16.4 (±1.91)
<i>P</i>		ns	ns	ns

T0: İlk aferez önçesi

T1: Son aferez sonu 1 saat

T2: Son aferez sonu 24 saat

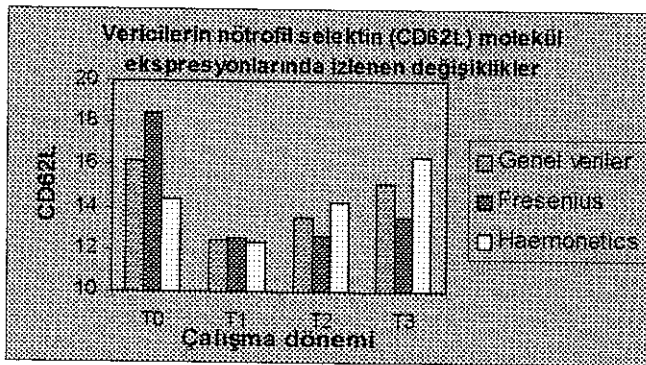
T3: Son aferez sonu 7 gün

MFI: Ortalama floresans yoğunluğu

ns: İstatistik olarak anlamsız

p değerleri T0 sonuçları ile olan anlamlılığı göstermektedir

Şekil 4.5: Çift doz trombosit aferezi ile vericilerin (n=22) çalışma dönemleri boyunca nötrofil selektin (CD62L) molekül ekspresyonlarında izlenen değişiklikler



Tablo 4.5: Çift doz trombosit aferezi yapılan vericilerde trombosit antijeni (CD42b) taşıyan nötrofil yüzdesinde çalışma dönemleri boyunca izlenen değişiklikler

CD42b %	T0	T1	T2	T3
Genel (n=22)				
Ortanca (min-max)	8 (2-20)	22 (2-48)	16 (2-30)	16 (1-29)
Ortalama (\pm SE)	9 (\pm 1)	22 (\pm 2)	15 (\pm 2)	14 (\pm 2)
<i>P</i>		0.000	0.001	0.012
Fresenius (n=10)				
Ortanca (min-max)	8 (2-20)	22 (3-48)	20 (2-30)	10 (1-29)
Ortalama (\pm SE)	10 (\pm 2)	23 (\pm 4)	17 (\pm 3)	13 (\pm 3)
<i>P</i>		0.013	0.022	ns
Haemonetics (n=12)				
Ortanca (min-max)	8 (2-16)	22 (2-41)	15 (2-24)	17 (2-25)
Ortalama (\pm SE)	9 (\pm 1)	21 (\pm 3)	14 (\pm 2)	15 (\pm 2)
<i>P</i>		0.004	0.028	0.010

T0: İlk aferez öncesi

T1: Son aferez söhü 1 saat

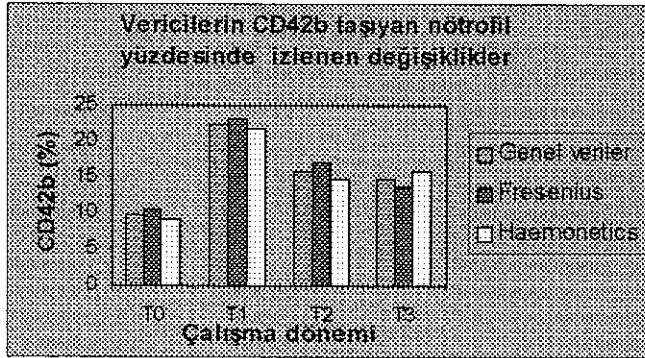
T2: Son aferez sonu 24. saat

T3: Son aferez sonu 7 gün

ns: İstatistik olarak anlamsız

p değerleri T0 sonuçları ile olan anlamlılığı göstermektedir

Şekil 4.6: Çift doz trombosit aferezi yapılan vericilerde trombosit antijeni (CD42b) taşıyan nötrofil yüzdesinde çalışma dönemleri boyunca izlenen değişiklikler



Tablo 4.6: Çift doz trombosit aferezi yapılan vericilerde trombosit ile kompleks yapmış mutlak nötrofil sayısında çalışma dönemleri boyunca izlenen değişiklikler

MTNS $\times 10^9/L$	T0	T1	T2	T3
Genel (n=22)				
Ortanca (min-max)	0 34 (0.08-1 14)	1 12 (0.08-2 44)	0 76 (0.05-3 98)	0 63 (0.05-4 87)
Ortalama (\pm SE)	0 46 (\pm 0 31)	1 14 (\pm 0 70)	0 87 (\pm 0 86)	0 80 (\pm 1 01)
<i>P</i>		0.000	0.001	0.012
Fresenius (n=10)				
Ortanca (min-max)	0 33 (0.08-1 14)	0 93 (0.16-2 44)	0 76 (0.05-1 77)	0 37 (0.06-1 23)
Ortalama (\pm SE)	0 47 (\pm 0 38)	1 12 (\pm 0 82)	0 80 (\pm 0 61)	0 51 (\pm 0 45)
<i>P</i>		0.005	0.037	ns
Haemonetics (n=12)				
Ortanca (min-max)	0 34 (0.17-0 51)	1 27 (0.08-2 01)	0 75 (0 11-3 98)	0 68 (0.08-4 87)
Ortalama (\pm SE)	0 45 (\pm 0 26)	1 16 (\pm 0 62)	0 94 (\pm 1 05)	1 04 (\pm 0 68)
<i>P</i>		0.004	ns	ns

T0: İlk aferez öncesi

T1: Son aferez sonu 1. saat

T2: Son aferez sonu 24. saat

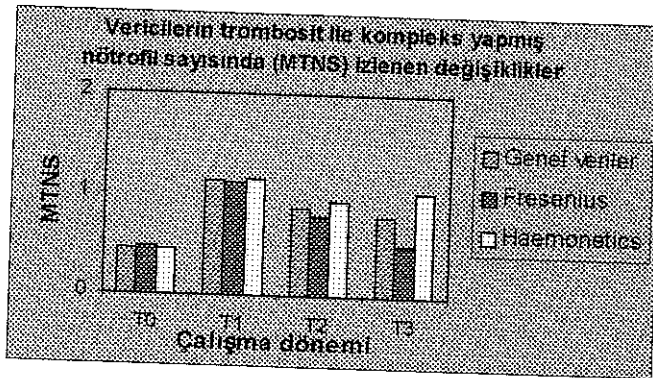
T3: Son aferez sonu 7 gün

MTNS: Trombosit ile kompleks yapmış mutlak nötrofil sayısı

ns: İstatistik olarak anlamsız

p değerleri T0 sonuçları ile olan anlamlılığı göstermektedir

Şekil 4.7: Çift doz trombosit aferezi yapılan vericilerde trombosit ile kompleks yapmış mutlak nötrofil sayısında çalışma dönemleri boyunca izlenen değişiklikler



Tablo 4.7: Çift doz trombosit aferezi yapılan vericilerde nötrofillerdeki CD42b yoğunluğunda çalışma dönemleri boyunca izlenen değişiklikler

CD42b MFI	T0	T1	T2	T3
Genel (n=22)				
Ortanca (min-max)	1 36 (0.85-2 41)	2 14 (1.01-4 09)	1 27 (0 82-1.65)	1 38 (0.76-2.31)
Ortalama (±SE)	1 52 (±0 1)	2 05 (±0 16)	1 22 (±5 402E-02)	1.41 (±8 816E-02)
<i>P</i>		0.007	0.007	ns
Fresenius (n=10)				
Ortanca (min-max)	1 29 (0.85-2 12)	1 79 (1.01-4 09)	1 09 (0.82-1.65)	1 19 (0.77-2 31)
Ortalama (±SE)	1 37 (±0 11)	2 12 (±0 32)	1 16 (±9 720E-02)	1 29 (±0 14)
<i>P</i>		0.013	ns	ns
Haemonetics (n=12)				
Ortanca (min-max)	1 56 (0 94-2 41)	2 16 (1.04-2 75)	1 32 (0 85-1.51)	1 65 (0.76-2 15)
Ortalama (±SE)	1 65 (±0 15)	2 00 (±0 15)	1 27 (±5 750E-02)	1 51 (±0 1)
<i>P</i>		ns	0.041	ns

T0: İlk aferez öncesi

T1: Son aferez sonu 1 saat

T2: Son aferez sonu 24 saat

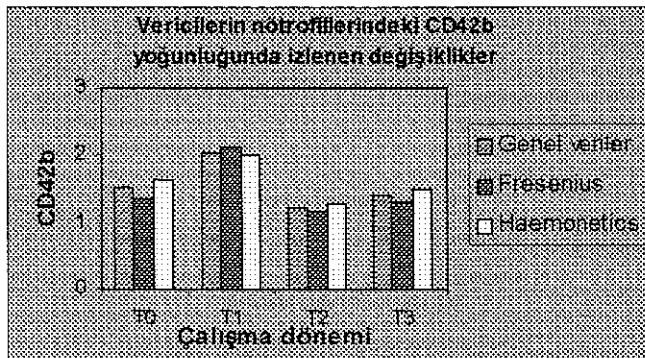
T3: Son aferez sonu 7 gün

MFI: Ortalama floresans yoğunluğu

ns: İstatistik olarak anlamsız

p değerleri T0 sonuçları ile olan anlamlılığı göstermektedir

Şekil 4.8: Çift doz trombosit aferezi yapılan vericilerde nötrofillerdeki CD42b yoğunluğunda çalışma dönemleri boyunca izlenen değişiklikler



TARTIŞMA

Normal sağlıklı kişilerin sistemik dolaşımında %25 düzeylerine varan oranlarda nötrofil-trombosit komplekslerine rastlanmakta (119) ve bu oran trombosit ve/veya nötrofil aktivasyonuna yol açan herhangi bir uyarının varlığında % 80 düzeylerine (120) kadar çıkabilmektedir. Bu komplekslerden aktive trombositlerdeki CD62P ekspresyonu ve nötrofillerdeki $\beta 2$ integrinler sorumlu tutulmakla birlikte oluşum mekanizması ve klinik önemi tam olarak anlaşılamamıştır. Aktive trombositlerin nötrofillere yapışmasının trombüs formasyonunda, aktif nötrofillere trombositlerin yapışmasının ise inflamatuvar reaksiyonların potansiyelize edilmesinde anahtar rol oynadığı ileri sürülmektedir (64). Bazı çalışmalarda $\beta 2$ integrinlerin bloke edilmesi ile nötrofil bağımlı doku hasarı ve iskeminin belirgin olarak düzeldiği gösterilmiştir (121-123). Trombositlerin lökositlerle adezyonu sonucu oluşan nötrofil-trombosit kompleksleri koagülasyon sistemi için ek trombin oluşumunu kolaylaştıran fonksiyonel doku faktörünün sentez ve ekspresyonunu indüklemektedir. Bu kompleksler aynı zamanda yüzey koagülasyon reaksiyonlarının oluşumunda katalitik bir rol oynamakta ve koagülasyonda yer alan faktörleri antikoagülan proteinlerin (aPC) etkilerinden koruyarak trombüs oluşumunu kolaylaştırmaktadır (124). Yine son yıllarda yapılan çalışmalarda iskemik vasküler hastalıklarda ve tekrar eden myokard infarktüsü varlığında artmış nötrofil sayısı ile birlikte nötrofil-trombosit komplekslerinin oranında belirgin bir yükselme olduğu tespit edilmiştir (125-127).

Aferez işlemi sırasında verici kanı trombojenik özellikler taşıyabilecek damar dışı bir sisteme taşınmakta ve trombositler ve/veya nötrofillerde morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler meydana gelmesine yol açacak santrifugasyon gibi dış kuvvetler uygulanmaktadır. İşleme bağlı hemostatik sistemde ortaya çıkabilen değişikliklerin vericide koagülasyon, inflamasyon ve tromboz gibi birtakım komplikasyonlara yol açması beklenebilir. Literatürde kardiyopulmoner bypass, hemodiyaliz, plazmaferez ve tromboferez gibi işlemler sırasında trombositlerin aktifleştiğini, koagülasyon, inflamasyon, fibrinolizis gibi hemostatik parametrelerde önemli ölçülerde değişiklikler meydana geldiğini gösteren bir çok çalışma bulunmaktadır (128-132).

Aferez işleminin hemostatik sistemde önemli rolü olan nötrofil trombosit kompleks oluşumu üzerine etkilerini inceleyen çalışmaların sayısı oldukça azdır. Stohlawetz ve arkadaşlarının 1999 yılında 2 farklı aferez cihazı ile yaptıkları bir çalışmada tek doz tromboferez işlemi ile vericilerde nötrofil trombosit kompleks oluşumunun artmadığının göstergesi olarak CD41(+) nötrofil yüzdesinde artış olmadığı saptanmış ve bu sonuçlar tromboferez sistemlerinin oldukça güvenli ve biyouyumlu olmasına ve işlem sırasında trombosit ve nötrofilleri aktiveleştirmemesine bağlanmıştır (15). S. Rinder ve arkadaşlarının yaptıkları bir başka çalışmada ise kardiyopulmoner bypass (CPB) geçiren 17 hastada monosit-trombosit komplekslerinin bypass sırasında belirgin olarak arttığı ve bu artışın sirkülasyondaki aktif trombositlerin (GMP-140) sayısı ve nötrofil yüzeyindeki CD11b ekspresyonunun varlığı ile doğru orantılı olduğu gösterilmiştir (12).

Çalışmamızda, koagülasyon ve inflamasyonda önemli yeri olan nötrofil-trombosit kompleks oluşumlarının varlığı iki farklı cihaz ile gerçekleştirilen çift doz trombosit toplama işlemi sonrasında değerlendirilmiş ve trombosit ile kompleks yapmış nötrofil yüzdesinin ve mutlak nötrofil sayısının işlem sonrasında anlamlı olarak arttığı ve bu artışın birinci ve yedinci günlerde azalmakla birlikte devam ettiği saptanmıştır. Özellikle kesikli akım sistemi ile çalışan Haemonetics MCS cihazı ile yapılan işlemlerde yedinci günde dahi anlamlılığını devam ettiren bir yükseklik bulunmuştur. Aferez sonrası her bir nötrofil üzerine yapışmış olan trombosit sayısının arttığına bir göstergesi olan nötrofil üzerindeki CD42b molekül yoğunluğunda da (MFI) anlamlı bir artış olduğu izlenmiştir ($p < 0.007$). Bu durum, vericilerde çift doz trombosit aferezi işleminin trombosit nötrofil kompleks oluşumunu kolaylaştırarak tromboembolik olaylara yatkınlığı arttıran ek bir faktör olabileceği görüşünü desteklemektedir.

Bu çalışmada çift doz tromboferez işlemi ile nötrofil-trombosit komplekslerinin yüzdesinde, trombosit ile bağlı mutlak nötrofil sayısında ve her bir nötrofile bağlanan hücre başına düşen trombositlerin sayısında anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. Bu artışta nötrofil aktivasyonunun rolüne bakıldığında, Haemonetics ile yapılan işlemlerde CD62L (L-selektin) molekül yoğunluğunda aferez öncesine oranla aferez sonrasında anlamlı bir değişiklik olmazken Fresenius cihazı ile yapılan işlemlerde CD62L (L-selektin) molekül yoğunluğunda anlamlı azalma olduğu saptanmıştır. Bu bulgular bize çift doz trombosit aferezi sırasında Haemonetics

cihazının vericilerde nötrofil aktivasyonuna yol açmadığını, Fresenius cihazının ise sadece nötrofil aktivasyonunun erken dönemlerinde izlenen selektin ekspresyonunda azalma ile karakterize sınırlı bir nötrofil aktivasyonuna yol açtığını ve nötrofil-trombosit komplekslerinin oluşmasından aktif duruma geçen nötrofillerin sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

Son yıllarda giderek tercih edilen bir yöntem haline gelen tek bir vericiden çift doz trombosit toplama işleminin vericinin nötrofil fonksiyonları ve nötrofil-trombosit kompleks oluşumu üzerine etkisini gösteren İngilizce literatürde yayımlanmış bir çalışma bildiğimiz kadarı ile bulunmamaktadır. Tek doz plateletferez sonrası donör nötrofil fonksiyonlarının 3 farklı aferez cihazı ile incelendiği bir çalışmada ise aferez sonrası CD62L ekspresyonunda CS-3000 ile belirgin, Amicus ile hafif bir artış olduğu tespit edilmiştir. CD11b ekspresyonunda 3 aferez sisteminde değişiklik bulunamazken, Amicus ve Autopheresis-C ile tromboferez sonrası oksijen radikallerinin üretimi azalmış, komplementlerin ise aktive olmadığı bulunmuştur. Sonuçlar aferez sistemlerinin donör nötrofil fonksiyonlarında hafif değişikliklere yol açtığı ve CD62L ekspresyonundaki artışın nötrofil aktivasyonunun en erken basamağının göstergesi olduğu şeklinde yorumlanmıştır (16). Giovanni ve arkadaşları tarafından 1999 yılında invitro koşullarda yapılan bir başka çalışmada ise aktifleşen nötrofillerden potent bir trombosit agonisti olan katepsin G gibi birtakım proteazların salınmasının nötrofil-trombosit komplekslerinin oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (133). Bu çalışmalarda da izlendiği gibi nötrofil aktivasyonu trombositlerde aktivasyona ve kompleks oluşumuna yol açabilmektedir.

Ancak bizim çalışmamızda sadece Fresenius cihazında nötrofil aktivasyonunda değişiklik izlenirken her iki cihazda da aferez işlemi sonrası nötrofil trombosit kompleks oranlarında artış saptanmıştır. Bu durum başka hücre-hücre ve ligand etkileşimlerini, özellikle de aktive trombositlerde artan CD62-P ekspresyonunun varlığını akla getirmektedir. Daha önceki bir çok çalışmada da aferez işleminin trombositlerin aktivasyonuna yol açarak P-selektin ekspresyonunun artmasına ve nötrofil yüzeyindeki ligandları ile etkileşerek nötrofil-trombosit komplekslerinin oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (120,134). Ancak bu çalışmada CD62-P ekspresyonu değerlendirilmemiştir.

Trombositlerin nötrofillere yapışmasında p-selektin ve nötrofil aktivasyonunun önemli rolü olduğu bilinmektedir (64). Yakın zamanda yapılan

çalışmalarda trombosit yüzeyinde eksprese olan p-selektin moleküllerinin, nötrofil yüzeyindeki farklı bağlanma noktalarını (P-selektin glikoprotein ligand-1 (PSGL-1)) tanınmasının, trombositlerin nötrofillere yapışmasında en önemli mekanizmalardan biri olduğu gösterilmiştir (135-137) Nötrofillerin trombositlere yapışmasında başka bağlanma mekanizmalarının varlığı da araştırılmış ve trombosit yüzeyinde eksprese olan fibrinojenin de nötrofil bağlayıcı bir reseptör gibi çalıştığı gösterilmiştir (138) Ayrıca nötrofillerdeki integrinler CD11b/CD18 ve CD11c/CD18 için endotel hücrelerinde bir bağlanma noktası özelliği taşıyan intersellüler adezyon molekülü-2 (ICAM-2) trombositler üzerinde de tanımlanmıştır (139)

İntegrinlerin trombosit yüzeyindeki bağlanma noktaları tam olarak saptanamamış olmalarına karşın özellikle dinamik koşullarda yapılan çalışmalarda tıpkı nötrofil endotel adezyonunda olduğu gibi trombosit nötrofil adezyonunda da nötrofil yüzeyindeki integrinlerin çok önemli rolü olduğu ileri sürülmektedir (64) Bu modelde trombosit nötrofil adezyonunun iki basamakta gerçekleştiği söylenmektedir İlk önce p-selektin aracılığı ile yeterince stabil olmayan bir tanınma gerçekleşmekte, bu aşamada nötrofillerde Ca^{2+} ve Mg^{2+} varlığında tirozin-kinaz bağımlı aktivasyon oluşmakta ve nötrofil yüzeyinde bir β -2 integrin olan CD11b/CD18 ekspresyonu artmakta ve molekül yapısında yeni bir yapılanma olmaktadır Ardından bu şekilde aktive olan nötrofiller, integrinleri aracılığı ile trombositlere olan adezyonlarını daha stabil duruma getirmekte ve inflamasyon/trombüs gelişiminde önemli rolü olan hücre-hücre etkileşimlerinin başlamasına yol açmaktadırlar (64)

Selektinler ve immünglobulin ailesine ait diğer adezyon moleküllerinin de değişik stimuluslar sonrasında oluşan nötrofil aktivasyonu, adezyonu ve hücre-hücre etkileşimlerinin değişik evrelerinde önemli rol aldıkları bilinmektedir

Çalışmamızda farklı iki yöntemle çalışan cihazlar ile yapılan çift doz trombosit aferezi işlemlerinde nötrofil aktivasyonun göstergesi olarak nötrofil yüzeyinde eksprese edilen adezyon molekülleri incelenmiş ve bir integrin olan CD11b/CD18 molekül ekspresyonunda ve immünglobulin süper ailesine ait adezyon molekülleri olan CD50 ve CD54 molekül ekspresyonlarında bir değişiklik olmadığı saptanmıştır

Bütün bu sonuçlar aferez işleminin nötrofil-trombosit komplekslerinde belirgin bir artışa ve nötrofil fonksiyonlarında hafif değişikliklere yol açtığını ancak CD11b/CD18 molekül ekspresyonlarında değişiklik olmaması inflamasyon/trombüs

gelişimi için gerekli olan nötrofil-trombosit adezyonunun daha ileri basamaklara devam edemediğini düşündürmektedir.

Aferez işlemi ile oluşan hücre aktivasyonlarının diğer bir önemi ise aktive trombositlerin toplanan komponentlerde de var olması ve transfüzyon etkinliğini olumsuz olarak değiştirebilmesidir. Bilindiği gibi özellikle intensif kemoterapi uygulanan ileri derecede trombositopenik hastalara trombosit konsantrelerinin verilmesi çok önemli bir destek tedavisi olanağı sağlamaktadır. Yapılan transfüzyonlarının etkinliği ise transfüzyon sonrası trombosit sayılarındaki artış ve klinik olarak kanamaya yatkınlığın azalması ile değerlendirilmektedir. İki farklı aferez cihazı ile hazırlanan trombosit konsantrelerinde in vitro trombosit aktivasyonu ve transfüzyonu takiben in vivo nötrofil-trombosit komplekslerinin ölçüldüğü bir çalışmada; aferez sırasında ve trombosit konsantrelerinin saklanmasında trombositlerin aktive olduğu ve aktivasyonun derecesi ile ilişkili olarak alıcıda in vivo nötrofil-trombosit kompleks oluşumunun arttığı gözlenmiştir (140). Bu ve buna benzer birçok çalışmada hazırlanan trombosit konsantrelerindeki artmış aktif trombositlerin varlığının transfüzyonun etkinliğini azalttığı ileri sürülmüştür. Bu durum bu hücrelerin sirkülasyondan hızla uzaklaştırılmasına bağlanmıştır (3,141-145). Ancak bizim çalışmamızda torbalar içindeki aktive trombosit oranları, alıcıda oluşan nötrofil trombosit kompleksleri ve transfüzyonun klinik etkinliği incelenmediği için bu görüşler test edilememiştir.

Günümüzde sıkça kullanılmaya başlanan aferez işlemleri sırasında hemostatik sistemde izlenen değişikliklerin yanısıra yanlışlıkla arterlere girilmesi, damar yırtılmaları, hematomlar, tromboz gibi lokal vasküler problemler, antikoagülasyon amacıyla kullanılan sitrata bağlı sistemik yan etkiler ve asepsiye uyulmaması nedeniyle infeksiyöz komplikasyonlar karşılaşılan problemler arasındadır (146-148). Aferez işlemine bağlı uzun dönemde de yan etkiler ortaya çıkabilmektedir. Sık sitoferez uygulanan vericilerde mutlak T ve B hücre sayılarında 8 aya dek sürebilen azalma olduğu gösterilmiştir. B hücrelerindeki düşüş daha belirgin olmaktadır. T hücre sayılarında azalma olmasına rağmen T4/T8 hücre oranında değişiklik saptanmamıştır (149). Laboratuvar olarak gösterilen immün sistemdeki bu değişikliklere bağlı klinik olarak gelişen herhangi bir komplikasyon ise henüz bildirilmemiştir (150). Bu çalışmada yer alan vericilerin hiç birinde lokal vasküler bir problem ya da işlem sırasında müdahaleyi gerektiren sistemik klinik yan etki yaşanmamıştır. Her iki cihaz

ile vericilerin lokosit sayılarında anlamlı bir değişiklik bulunamazken trombosit sayılarında klinik açıdan sorun yaratmayan anlamlı düşüşler olmuştur. Özellikle trombosit sayılarındaki düşüklüğün yedinci güne kadar devam ettiği tespit edilmiştir. Trombositlerde uzamış düşüklüğe normalden 2 kat daha fazla trombosit toplanması nedeniyle kemik iliğinin eksikliği yerine henüz tam olarak koyamaması, ayrıca işleme bağlı olarak trombositlerin aktive olması ve nötrofillerle kompleks oluşturmasının katkısı olduğu düşünölmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada Fresenius AS TEC 204 ve Haemonetics MCS+ ile gerçekleştirilen çift doz tromboferez işlemlerinin vericilerde nötrofil-trombosit kompleks oranlarında anlamlı bir artışa yol açtığı bulunmuştur. Ek olarak Fresenius AS TEC 204 cihazı nötrofil aktivasyonun göstergesi olan CD62L ekspresyonunda azalmaya yol açmıştır. Bizim ve benzeri diğer çalışmalarda hemostatik sistemde izlenen bu tür laboratuvar değişikliklerin klinik anlamı tam olarak bilinmemektedir. Ancak sağlıklı vericilerde aferez işlemi ile trombosit, nötrofil aktivasyonunda ve trombosit nötrofil kompleks oluşumunda artma gibi bulguların saptanması, aferez işlemlerinin pretrombotik bir risk oluşturabileceğini desteklemektedir. Tüm bu bulguların ışığında geçmişlerinde tromboembolik atak öyküsü, aile anamnezi ve/veya tromboemboli gelişimi açısından başka risk faktörleri taşıyan hasta veya sağlıklı vericilere aferez işlemlerini uygularken hemostatik sistemde oluşabilecek pretrombotik değişiklikler açısından dikkatli olmanın yararlı olacağını düşünmektedir. Özellikle yeterli verici bulunamadığı için tekrarlayan tromboferez yapılmak zorunda kalınan vericilerde hemostatik sistemde ne gibi değişikliklerin olduğu henüz bilinmemektedir. Ayrıca elde edilen sonuçlar daha biyolojik olarak uyumlu sistemlerin kullanılması ile trombosit konsantrelerinin etkinliğinin artacağını desteklemektedir. Bütün bunların sonucunda çift doz tromboferez işlemine bağlı hücre etkileşimlerinin ve klinik öneminin daha iyi anlaşılabilmesi için ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

ÖZET

Dolaşım sistemindeki hücrelerin küçük bir kısmı birbirleriyle kompleksler oluşturarak gruplar halinde dolaşırlar. Bu kompleksler homotipik (trombosit-trombosit) ya da heterotipik (trombosit-lökosit) şeklinde olup özellikle trombosit-lökosit komplekslerinin trombozisi, lökosit infiltrasyonu ve inflamasyon da önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir. Bu komplekslerden aktive trombositlerdeki CD62P selektin ekspresyonu ve nötrofillerdeki $\beta 2$ integrinler sorumlu tutulmakla birlikte oluşum mekanizması ve klinik önemi tam olarak anlaşılamamıştır. Literatürde kardiyopulmoner bypass, hemodiyaliz, plazmaferez ve tromboferez gibi aferez işlemleri sırasında trombositlerin aktifleştiğini, koagülasyon, inflamasyon, fibrinolitik gibi hemostatik parametrelerde önemli ölçülerde değişiklikler meydana geldiğini gösteren bir çok çalışma bulunmaktadır. Son yıllarda giderek tercih edilen bir yöntem haline gelen tek bir vericiden çift doz trombosit toplama (double tromboferez) işleminin vericinin nötrofil fonksiyonları ve nötrofil-trombosit kompleks oluşumu üzerine etkisini gösteren bir çalışma ise bildiğimiz kadarı ile yoktur.

Bu çalışmada yaşları 21 ila 49 arasında değişen (ortanca: 31) 22 erkek trombosit vericisinde kesikli akım (Haemonetics MCS+, n: 12) ve devamlı akımla çalışan (Fresenius AS TEC 204, n: 10) farklı marka ve modeldeki iki aferez cihazı ile çift doz trombosit toplama işleminin *in vivo* trombosit-nötrofil kompleksleri ve nötrofil aktivasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla donörlerin periferik kan örnekleri aferez işleminde hemen önce, sonra, 1 gün ve 7 günde alınarak nötrofil adezyon molekül ekspresyonları ve trombosit-nötrofil kompleks oluşumları tam kan yöntemi ile akış sitometresinde gösterilmiştir.

Fresenius AS TEC 204 ve Haemonetics MCS+ ile gerçekleştirilen çift doz tromboferez işlemlerinin vericilerde hem nötrofil-trombosit komplekslerinin yüzdesinde (42b+ nötrofil) hemde her bir nötrofile bağlanan trombositlerin sayısında anlamlı bir artışa neden olduğu bulunmuştur. Haemonetics ile yapılan işlemlerde CD62L (L-selektin) molekül yoğunluğunda aferez öncesine oranla aferez sonrasında, birinci ve yedinci günde anlamlı bir değişiklik olmazken Fresenius cihazı ile yapılan işlemlerde CD62L (L-selektin) molekül yoğunluğunda anlamlı azalma olduğu saptanmıştır. CD11b/CD18, CD50 ve CD54 ortalama florasan yoğunluklarında ise aferez işlemleri ile değişiklik olmadığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada Fresenius AS TEC 204 ve Haemonetics MCS+ ile gerçekleştirilen çift doz tromboferez işlemlerinin vericilerde nötrofil-trombosit kompleks oranlarında anlamlı bir artışa yol açtığı bulunmuştur. Ek olarak Fresenius AS TEC 204 cihazı nötrofil aktivasyonun göstergesi olan CD62L ekspresyonunda azalmaya yol açmıştır. Klinik önemleri tam olarak bilinmemekle birlikte daha önceki çalışmalarda iskemik vasküler hastalıklarda ve myokard infarktüsünde artmış oranlarda nötrofil-trombosit komplekslerine rastlanılmış ve bunlara yönelik tedavilerin iskemi ve doku hasarını azalttığı bulunmuştur. Şu ana kadar aferez işlemine bağlı klinik inflamasyon yada tromboz yönünde komplikasyon bildirilmemiş olmakla birlikte bizim sonuçlarımız altta yatan iskemik vasküler hastalıklar yönünden donörlerin ayrıntılı sorgulanmasının yararlı olacağını göstermektedir. Bütün bunların sonucunda çift doz tromboferez işlemine bağlı hücre etkileşimlerinin ve klinik öneminin daha iyi anlaşılabilmesi için ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır ..

SUMMARY

Platelet-neutrophil aggregates (PLA) might play an important role in thrombotic and inflammatory disease states. It has been shown that during extracorporeal circulation, like haemodialysis and cardiopulmonary bypass operations, platelets may form heterotypic aggregates with leucocytes via platelet CD62P and leucocyte β 2 integrins. There had been conflicting results and limited data on the impact of plateletpheresis procedures on the frequency of PLA and neutrophil activation. In recent years, it has been possible to collect double dose platelets by new generation devices but no study concerning the neutrophil activation and PLA of donor during double plateletpheresis (DP) had been performed up to this time.

In this study we investigated the effects of DP with two different devices (Fresenius AS 204 n= 10 and MCS Plus n=22) on the in vivo neutrophil activation and neutrophil-platelet aggregates in 22 volunteer donors. Peripheral blood samples were taken immediately before and after apheresis and on the 1st, 7th days. Changes in neutrophil activation and the frequency of PLA was determined by quantitating the amount of mean channel fluorescence intensity (MCFI) of CD62L, %42b+neutrophils, MCFI of CD42b and 11b/18 expressions using whole blood method on flow cytometry.

Statistically significant increases were found on the percentage of PLA (42b+neutrophils), neutrophil counts on the complexes and on the number of each platelets binding to neutrophils after apheresis with both of the machines. CD62L MCFI decreased significantly after apheresis with Fresenius machine on the first and seventh days but this was not seen with MCS+ Plus machine. 11b/18 MCFI, CD50 and CD54 expressions did not show any changes after apheresis with both of the machines.

In this study we showed that double dose thrombopheresis with Fresenius AS TEC 204 and Haemonetics MCS+ devices results an increase on PLA levels which has an important role on inflammation and thrombosis. Additionally, Fresenius AS TEC 204 decreases CD62L expression which is a determinant of neutrophil activation. No change on CD11b/CD18 expressions may force us to think that neutrophil-platelet adhesion which is an important component of inflammatory / thrombotic process does not continue on further stages.

KAYNAKLAR

- 1- Chernoff AI, Klein HG, Sherman LA Research opportunities in transfusion medicine Report from an American Association of Blood Banks Think Tank Transfusion 1989; 29:711-42
- 2- Rinder CS, Mathew JP, Rinder HM, Bonan J, Ault KA, Smith BR Modulation of platelet surface adhesion receptors during cardiopulmonary bypass Anesthesiology 1991;75:563-7
- 3- Corash L Measurements of platelet activation by fluorescence-activated flow cytometry. Blood Cells 1990;160:97-101
- 4- Diacovo IG, Puri KD, Warnock RA, Springer IA, von Andrian UH Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules Science 1996;273(5272):252-5
- 5- Maugeri N, Evangelista V, Celardo A, Dell'Elba G, Martelli N, Piccardoni P, de Gaetano G, Cerletti C Polymorphonuclear leukocyte-platelet interaction: role of P-selection in thromboxane B2 and leukotriene C4 cooperative synthesis. Thromb Haemost 1994;72(3):450-6
- 6- Nagata K, Tsuji T, Todoroki N, Katagiri Y, Tanoue K, Yamazaki H, Hanai N, Irimura I. Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through P-selectin (CD62) J Immunol 1993;151(6):3267-73
- 7- Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC, Hechtman HB, Michelson AD Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease J Am Coll Cardiol 1998;31(2):352-8
- 8- Gawaz M, Reininger A, Neumann FJ. Platelet function and platelet-leukocyte adhesion in symptomatic coronary heart disease Effects of intravenous magnesium Thromb Res 1996;83(5):341-9
- 9- Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schomig A Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina Circulation 1996;94(6):1239-46
- 10- Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R, Wagner DD, Furie B. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes Cell 1989;59(2):305-12
- 11- de Bruijne-Admiraal LG, Modderman PW, Von dem Borne AE, Sonnenberg A. P-selectin mediates Ca(2+)-dependent adhesion of activated platelets to many different types of leukocytes: detection by flow cytometry. Blood 1992;80(1):134-42

- 12-Rinder CS, Bonan JL, Rinder HM, Mathew J, Hines R, Smith BR
Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion *Blood*
1992;79(5):1201-5
- 13-Evangelista V, Piccardoni P, White JG, de Gaetano G, Cerletti C
Cathepsin G-dependent platelet stimulation by activated polymorphonuclear leukocytes and
its inhibition by antiproteinases: role of P-selectin-mediated cell-cell adhesion
Blood 1993;81(11):2947-57
- 14-Rinder HM, Tracey JL, Rinder CS, Leitenberg D, Smith BR
Neutrophil but not monocyte activation inhibits P-selectin-mediated platelet adhesion.
Thromb Haemost 1994;72(5):750-6
- 15-Stohlawetz P, Kapiotis S, Seidl D, Hergovich N, Zellner M, Eichler HG,
Stiegler G, Leitner G, Hocker P, Jilma B
Safety issues of plateletpheresis: comparison of the effects of two cell separators on the activation of
coagulation, fibrinolysis, and neutrophils and on the formation of neutrophil-
platelet aggregates *Transfusion* 1999;39(4):420-7
- 16-Western KH, Videm V
Donor neutrophil function after plateletpheresis
Transfusion 2000;40(11):1414-8
- 17-Gutensohn K, Alisch A, Krueger W, Kroeger N, Kuehnl P
Extracorporeal plateletpheresis induces the interaction of activated platelets with white blood
cells *Vox Sang* 2000;78(2):101-5
- 18-Barnard MR, MacGregor H, Mercier R, Ragno G, Pivacek LE, Hechtman HB,
Michelson AD, Valeri CR
Platelet surface p-selectin, platelet-granulocyte heterotypic aggregates, and plasma-soluble p-selectin during plateletpheresis
Transfusion 1999;39(7):735-41
- 19-Metcalf D
Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? *Blood*
1993;82(12):3515-23
- 20-Lieschke GJ, Burgess AW
Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (2) *N Engl J Med*
1992;327(2):99-106
- 21-Kaushansky K, Karplus PA
Hematopoietic growth factors: understanding functional diversity in structural terms. *Blood* 1993;82(11):3229-40
- 22-Groopman JE, Molina JM, Scadden DI
Hematopoietic growth factors
Biology and clinical applications *N Engl J Med* 1989;321(21):1449-59
- 23-Bainton DF, Ullyot JL, Farquhar MG
The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow *J Exp Med*
1971;134(4):907-34
- 24-Januar MP, Cronkite EP
The fate of granulocytes *Exp Hematol* 1980;8:884

- 25- Stausz I, Barcsak J, Kekes E, Szebeni A Prednisone-induced acute changes in circulating neutrophil granulocytes: I. In cases of normal granulocyte reserves *Haematologia* 1993;1:319
- 26- Welte K, Gabrilove J, Bronchud MH, Platzer E, Morstyn G Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years *Blood* 1996;88(6):1907-29
- 27- Anderlini P, Przepiorka D, Champlin R, Korbling M Biologic and clinical effects of granulocyte colony-stimulating factor in normal individuals *Blood* 1996;88(8):2819-25
- 28- Lopez AF, Williamson DJ, Gamble JR, Begley CG, Harlan JM, Klebanoff SJ, Waltersdorph A, Wong G, Clark SC, Vadas MA Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates in vitro mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression, and survival *J Clin Invest* 1986;78(5):1220-8
- 29- Munker R, Gasson J, Ogawa M, Koeffler HP Recombinant human TNF induces production of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor *Nature* 1986;323(6083):79-82
- 30- Zucali JR, Dinarello CA, Oblon DJ, Gross MA, Anderson L, Weiner RS Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E2 *J Clin Invest* 1986;77(6):1857-63
- 31- Metcalf D, Nicola NA, Mifsud S, Di Rago L Receptor clearance obscures the magnitude of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses in mice to endotoxin or local infections *Blood* 1999;93(5):1579-85
- 32- Borregaard N, Herlin T Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis *J Clin Invest* 1982;70(3):550-7
- 33- Bach MK, Brashler JR, Hammarstrom S, Samuelsson B Identification of leukotriene C-1 as a major component of slow-reacting substance from rat mononuclear cells *J Immunol* 1980;125(1):115-7
- 34- Samuelsson B, Hammarstrom S, Murphy RC, Borgeat P Leukotrienes and slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) *Allergy* 1980;35(5):375-81
- 35- Selsted ME, Harwig SS, Ganz I, Schilling JW, Lehrer RI Primary structures of three human neutrophil defensins *J Clin Invest* 1985;76(4):1436-9
- 36- Spitznagel JK Antibiotic proteins of human neutrophils *J Clin Invest* 1990;86(5):1381-6
- 37- Murphy G, Reynolds JJ, Bretz U, Baggiolini M Collagenase is a component of the specific granules of human neutrophil leucocytes *Biochem J* 1977;162(1):195-7

- 38-Matzner Y, Vlodaysky I, Bar-Ner M, Ishai-Michaeli R, Tauber AI Subcellular localization of heparanase in human neutrophils *J Leukoc Biol* 1992;51(6):519-24
- 39-Sengelov H, Kjeldsen L, Kroeze W, Berger M, Borregaard N Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils *J Immunol* 1994;153(2):804-10
- 40-Mohn H, Le Cabec V, Fischer S, Maridonneau-Parini I. The src-family protein-tyrosine kinase p59hck is located on the secretory granules in human neutrophils and translocates towards the phagosome during cell activation *Biochem J* 1995;309 (Pt 2):657-65
- 41-Morgan CP, Sengelov H, Whatmore J, Borregaard N, Cockcroft S ADP-ribosylation-factor-regulated phospholipase D activity localizes to secretory vesicles and mobilizes to the plasma membrane following N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine stimulation of human neutrophils *Biochem J* 1997;325 (Pt 3):581-5
- 42-Mrowietz U, Schroder JM, Brasch J, Christophers E Infiltrating neutrophils differ from circulating neutrophils when stimulated with C5a, NAP-1/IL-8, LTB4 and FMLP. *Scand J Immunol* 1992;35(1):71-8
- 43-Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules *Immunol Today* 1992;13(3):93-100
- 44-Lawrence MB, Springer IA Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins *Cell* 1991;65(5):859-73
- 45-Buescher ES, Gallin JJ Leukocyte transfusions in chronic granulomatous disease: persistence of transfused leukocytes in sputum *N Engl J Med* 1982;307(13):800-3
- 46-Snyderman R, Smith CD, Verghese MW Model for leukocyte regulation by chemoattractant receptors: roles of a guanine nucleotide regulatory protein and polyphosphoinositide metabolism *J Leukoc Biol* 1986;40(6):785-800
- 47-Spitznagel JK, Shafer WM. Neutrophil killing of bacteria by oxygen-independent mechanisms: a historical summary. *J Clin Invest* 1985;73:1297
- 48-Babior BM The respiratory burst of phagocytes *J Clin Invest* 1984;73(3):599-601
- 49-Babior BM Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction *Blood* 1984;64(5):959-66
- 50-Akkoç N Adezyon molekülleri. *Aktüel Tıp Dergisi* 1998;3:113-9

- 51- Güç D Adezyon molekülleri Aktüel Tıp Dergisi 1999;4:462-6
- 52- Shimizu Y, Rose DM, Ginsber MH Integrins in the immun system Advences in Immunology 1999;72:325-31
- 53- Hynes RO. Integrins, versatily, modulation and signaling in cell adhesion Cell 1992;69:11-25
- 54- Papadaki HA Cell adhesion molecules in haematology. Haema 1999;2:180-91
- 55- Carlos TM, Harlan JM Leukocyte-endothelial adhesion molecules Blood 1999;84:2068-101
- 56- Stewart M, Cabanas C, Hoog N. T cell adhesion to intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is controlled by cell spreading and activation of integrin LFA-1 J Immunol 1996;156:1810-7
- 57- Stewart M, Hoog N. Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs avidity J Cell Biochem 1996;61:554-61
- 58- Etzioni A, Doerschuk CM, Harlan JM Of man and mouse: Leukocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies Blood 1999;94:3281-8
- 59- Kansas GS Integrins and their ligands: Current concepts and controversies. Blood 1996;88:3259-87
- 60- Jung U, Ley K Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin J Immunology 1999;162:6755-62
- 61- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS: Molecular basis of T-cell antigen recognition and activation Cellular and Molecular Immunology 1994: 3th ed;138-170
- 62- Natasja K. Circulating forms of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in mice lacking membranous ICAM-1. Blood 2000;95:1350-5
- 63- Male D, Cooke A, Owen M, et al. Cell Traffic and Inflammation. Advanced Immunology; 1993: 3th ed; 14 4-14 23
- 64- Evangelista V, Manarini S, Rotondo S, Martelli N, Polischuk R, McGregor JL, de Gaetano G, Cerletti C Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions: evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the beta 2 integrin CD11b/CD18. Blood 1996;88(11):4183-94
- 65- Edwards CP, Fisher KL, Presta LG, Bodary SC Mapping the intercellular adhesion molecule-1 and -2 binding site on the inserted domain of leukocyte function-associated antigen-1. J Biol Chem 1998;273(44):28937-44

- 66-Roebuck KA, Finnegan A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression *J Leukoc Biol* 1999;66(6):876-88
- 67-Holland J, Owens T. Signaling through Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) in a B cell Lymphoma Line. *J Biol Chem* 1997;14:9108-12
- 68-Gahmberg CG. Leukocyte adhesion : CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Current Opin in Cell Biol* 1997;9:643-50
- 69-Bleijs DA, Geijtenbeek TB, Figdor CG, et al. DC-SING and FLA-1: a battle for ligand *Trends Immunol* 2001;22:457-63
- 70-Berney SM, Schann T, Alaxander JS, et al. ICAM-3 (CD50) cross-linking augments signaling in CD-3 activated peripheral human T lymphocytes *J Leukocyte Biol* 1999;65:867-74
- 71-Bleijs DA, Binnerts ME, Vliet SJ, et al. Low-affinity LFA-1/ICAM-3 interactions augment LFA-1/ICAM-1 mediated T cell adhesion and signaling by redistribution of LFA-1. *J Leukocyte Biol* 1999;61:116-20
- 72-Lee GR, Bithell TC, Foester J, et al. Platelets and megakaryocytes, In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, eds. *Wintrobe's Clinical Hematology*, Ninth edition. Lea & Febiger, Philadelphia, London 1993, pp 511-39
- 73-Ulutin O. The platelets: Fundamentals and Clinical Applications Istanbul, Turkey 1976, pp 1-6
- 74-Maurice M, Pardonge-Lavenne E, Scheiff JM, et al. Blood Platelets, In: hemostasis, Thrombosis and Atherosclerosis: Morphology, Physiology, Physiopathology and Pharmacology. Hologramme, 1988, pp 13-48
- 75-Knoll MH, Schafer AI. Biochemical mechanism of platelet activation *Blood* 1989; 74: 1181-95
- 76-Siess W. Molecular mechanism of platelet activation. *Physiol Rev* 1989; 69: 58-178
- 77-Baumgartner HR. Platelet interaction with vascular structures *Thromb Diath Haemorrh* 1972; 51 (suppl) 161-76
- 78-Page CP. The involvement of platelets in non-thrombotic processes. *Trends Pharmacol Sci* 1988; 9: 66-71
- 79-White JG. Shape change. *Thromb Diath Haemorrh* 1974; 60: 159-71
- 80-Hantgan RR. A study of the kinetics of ADP-triggered platelet shape change *Blood* 1984; 64:896-906

- 81-Carroll RC, Butler RG, Morris PA, et al Separable assembly of platelet pseudopodal and contractile cytoskeletons *Cell* 1982; 30: 385-93
- 82-White JG Electron microscopic studies of platelet secretion *Prog Hemostasis Thromb* 1974; 2: 49-98
- 83-Milton JG, Frojmovic MM Adrenaline and adenosine diphosphate-induced platelet aggregation require shape change Importance of pseudopods *J Lab Clin Med* 1984; 104: 805-815
- 84-Ehrman M, Toth E, Frojmovic MM A platelet procoagulant activity associated with platelet shape change *J Lab Clin med* 1978 ; 92 : 393-401
- 85-Bevers EM, Comfurius P, van Rijn JLML, et al Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets *Eur J Biochem* 1982; 122: 429-36
- 86-Rosing J, van Rijn JLML, Bevers EM, et al The role of activated human platelets in prothrombin and factor X activation *Blood* 1985; 2: 319-32
- 87-Walsh PN, Biggs R. The role of platelets in intrinsic factor Xa formation *Br J Haematol* 1972; 22: 743-50
- 88-Walsh PN Different requirements for intrinsic factor Xa forming activity and platelet factor 3 activity and their relationship to platelet aggregation and secretion *Br J Haematol* 1978; 40: 311-9
- 89-Tracey PB, Peterson JM, Nesheim ME, et al Interaction of coagulation factor V and factor Va with platelets. *J Biol Chem* 1979; 254:10345-9
- 90-Greengard JS, Griffin JH Receptors for high molecular weight kininogen on stimulated washed human platelets *J Biol Chem* 1984; 259: 14721-6
- 91-Sinha D, Seaman FS, Koshy A, et al Blood coagulation factor Xa binds specifically to a site on activated human platelets distinct from that for factor XI *J Clin Invest* 1984; 73: 1550-3
- 92-Greenberg CS, Shuman MA Specific binding of blood coagulation factor XIIIa to thrombin-stimulated platelets *J Biol Chem* 1984 ; 259: 14721-6
- 93-Loskutoff DJ Type I plasminogen activator inhibitor and its potential influence on thrombolytic therapy. *semin Thromb haemost* 1988; 14: 100-9
- 94-Wu KK, Hoak JC. A new method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency *Lancet* 1974; 4: 924-6
- 95-Schwartz MB, Hawiger J, Timmons S, et al Platelet aggregates in ischemic heart disease *Thromb Haemost* 1980; 43: 185-88

- 96-Undar L, Türkay C, Korkmaz L Circadian variation in circulating platelet aggregates. *Ann Med* 1989; 21: 429-33
- 97- Kaplan KL, Owen J Plasma levels of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation in vivo. *Blood* 1981; 57:199-202
- 98-Reilly IAG, Roy L, Fitzgerald GA, et al Biosynthesis of thromboxane in patients with systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon *Br Med J* 1986; 292:1037-9
- 99- Devine DV, Andestad G, Carter CJ. Platelet-associated factor XIII as a marker of in vivo platelet activation. XIIIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, amsterdam, The Netherlands, 30 June-6 July, abstract 108, pp 680
- 100- Abrams C, Shattil SJ Immunological detection of activated platelets and platelet derived microparticles in humans *Blood* 1990; 75: 128-38
- 101- Kaplan KL, Broekman MJ; Chernoff A, et al. Platelet alpha granule proteins: studies on release and subcellular localization *Blood* 1979; 53: 604-18
- 102- Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, et al: Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation *J Biol Chem* 1985;260:11107-14
- 103- Warkentin TE, Powling MJ, Hardisty RM. Measurements of fibrinogen binding to platelets in whole blood by flow cytometry: a micromethod for the detection of platelet activation *Br J Haematol* 1990;76:387-94
- 104- Cox AD, Janes SL,, Goodal AH Fibrinogen and vWF share a common binding site on GPIIb-IIIa: direct evidence in whole blood *Br J Haematol* 1991;77:104
- 105- Ejim OS, Powling MJ, Dandona P, et al A flow cytometric analysis of fibronectin binding to platelets from patients with peripheral vascular disease *Thromb Res* 1990;58:519-24
- 106- Frelinger AL, Cohen I, Plow EF Selective inhibition of integrin function by antibodies specific for ligand-occupied receptor conformers *J Biol Chem* 1990;265:6346-52
- 107- McEver RP, Martin MN A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets *J Biol Chem* 1984;259:9799-804
- 108- Bavalacqua M, Butcher E, Furie B Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell* 1991;67:233-42

- 109-Israels SJ, Gerrard JM, Jacques YV, et al Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140). *Blood* 1992;80:143-52
- 110-Sternberg PE, McEver RP, Shuman MA, et al A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* 1985;101:880-6
- 111-Berman CL, Yeo EL, Wencel-Drake JD, et al A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation: Characterization and subcellular localization of platelet-activation-dependent granule-external membrane protein. *J Clin Invest* 1986;78:130-7
- 112-Stoolman LM Adhesion molecules controlling lymphocyte migration *Cell* 1989;56:907-10
- 113-Metzelaar MJ, Heijnen HF, Sixma JJ, et al Identification of a 33-Kd protein associated with the alpha-granule membrane (GMP-33) that is expressed on the surface of activated platelets. *Blood* 1992;79:372-379
- 114-Capitanio AM, Niewiarowski S, Rucinski B Interaction of platelet factor 4 with human platelets *Biochem Biophys acta* 1985;839:161-73
- 115-Aikien MI, Ginsberg MH, Plow EF Mechanism for expression of thrombospondin on the platelet cell surface *Semin Thromb Haemost* 1987;13:307-316
- 116-Nieuwenhuis HK, van Oosterhout JIG, Rozemuller, et al Studies with monoclonal antibody against activated platelets: Evidence that a secreted 53 000- molecular weight lysosome- like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation *Blood* 1987;70:838-345
- 117-Metzelaar MJ, Clevers HJ Lysosomal membrane glycoproteins in platelets *Thromb Haemost* 1992;68:378-382
- 118-Logan LC Chapter 16, Hemostasis, In: Mazza JJ ed., *Man of Clin Hem*, Second edition Little, Brown and Company, USA, 1995, pp 349-379
- 119-Peters MJ, Heyderman RS, Hatch DJ, Klein NJ Investigation of platelet-neutrophil interactions in whole blood by flow cytometry *J Immunol Methods* 1997;209(2):125-35
- 120-Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA, Smith BR Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils *Blood* 1991;78(7):1760-9
- 121-Arfors KE, Lundberg C, Lindbom L, Lundberg K, Beatty PG, Harlan JM A monoclonal antibody to the membrane glycoprotein complex CD18 inhibits polymorphonuclear leukocyte accumulation and plasma leakage in vivo. *Blood* 1987;69(1):338-40

- 122- Vedder NB, Winn RK, Rice CL, Chi EY, Arfors KE, Harlan JM. Inhibition of leukocyte adherence by anti-CD18 monoclonal antibody attenuates reperfusion injury in the rabbit ear. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(7):2643-6
- 123- Simpson PJ, Todd RF 3rd, Fantone JC, Mickelson JK, Griffin JD, Lucchesi BR. Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mo1, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. *J Clin Invest* 1988;81(2):624-9
- 124- Bouchard BA, Tracy PB. Platelets, leukocytes, and coagulation. *Curr Opin Hematol* 2001;8(5):263-9
- 125- Ernst E, Hammerschmidt DE, Bagge U, Matrai A, Dormandy JA. Leukocytes and the risk of ischemic diseases. *JAMA* 1987;257(17):2318-24
- 126- Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA* 1998;279(18):1477-82
- 127- Lowe GD, Machado SG, Krol WF, Barton BA, Forbes CD. White blood cell count and haematocrit as predictors of coronary recurrence after myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1985;54(3):700-3
- 128- Gutensohn K, Bartsch N, Kuehnl P. Flow cytometric analysis of platelet membrane antigens during and after continuous-flow plateletpheresis. *Transfusion* 1997;37(8):809-15
- 129- Stohlawetz P, Hergovich N, Stiegler G, Eichler HG, Hocker P, Kapiotis S, Jilma B. Differential induction of P-selectin expression on platelets by two cell separators during plateletpheresis and the effect of gender on the release of soluble P-selectin. *Transfusion* 1998;38(1):24-30
- 130- Gawaz M, Bogner C. Changes in platelet membrane glycoproteins and platelet-leukocyte interaction during hemodialysis. *Clin Investig* 1994;72(6):424-9
- 131- Addonizio VP. Platelet function in cardiopulmonary bypass and artificial organs. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990;4(1):145-55
- 132- Wun T, Paglieroni T, Sazama K, Holland P. Detection of plasmapheresis-induced platelet activation using monoclonal antibodies. *Transfusion* 1992;32(6):534-40
- 133- de Gaetano G, Cerletti C, Evangelista V. Recent advances in platelet-polymorphonuclear leukocyte interaction. *Haemostasis* 1999;29(1):41-9

- 134- Jy W, Mao WW, Horstman L, Tao J, Ahn YS. Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils in vitro. *Blood Cells Mol Dis* 1995;21(3):217-31
- 135- Larsen E, Celi A, Gilbert GE, et al PADGEM protein: A receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes *Cell* 1989;59:305-12
- 136- Hamburger SA, McEver RP GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils *Blood* 1990;75:550-4
- 137- Varki A Selectin ligands *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7390-7
- 138- Spangerberg P, Redlich H, Bergmann L, et al The platelet glycoprotein IIb/IIIa complex is involved in the adhesion of activated platelets to leukocytes. *Thromb Haemost* 1993;70:514-21
- 139- Diacovo TG, deFougerolles AR, Bainton DF, et al. A functional integrin ligand on the surface of platelets: Intercellular adhesion molecule-2 *J Clin Invest* 1994;94:1243-51
- 140- Gutensohn K, Geidel K, Brockmann M, Siemensen M, Krueger W, Kroeger N, Kuehnl P Binding of activated platelets to WBCs in vivo after transfusion *Transfusion* 2002;42(10):1373-80
- 141- Rinder HM, Murphy M, Mitchell JG, Stocks J, Ault KA, Hillman RS Progressive platelet activation with storage: evidence for shortened survival of activated platelets after transfusion. *Transfusion* 1991;31(5):409-14
- 142- Snyder EL Activation during preparation and storage of platelet concentrates *Transfusion* 1992;32(6):500-2
- 143- Triulzi DJ, Kickler IS, Braine HG Detection and significance of alpha granule membrane protein 140 expression on platelets collected by apheresis *Transfusion* 1992;32(6):529-33
- 144- Ault K, Mitchell J, Hillman R Appearance of p-selectin (CD62) during labeling is responsible for the majority of the variability in recovery of In111 labeled platelets. *Blood* 1992;80:496
- 145- Ginsberg MH, Loftus JC, Plow EF Cytoadhesins, integrins, and platelets *Thromb Haemost* 1988;59(1):1-6
- 146- Huestis DW Mortality in therapeutic haemapheresis *Lancet* 1983;1(8332):1043
- 147- Huestis DW Risks and safety practices in hemapheresis procedures *Arch Pathol Lab Med* 1989;113(3):273-8

- 148- Sutton DMC, Cardella CJ, Uldall PR, Deveber GA Complications of intensive plasma exchange Plasma Ther 1981;2:19-24
- 149- Heal JM, Horan PK, Schmitt IC, Bailey G, Nusbacher J Long-term follow-up of donors cytopheresed more than 50 times Vox Sang 1983;45(1):14-24
- 150- Masui Y, Martin-Alosco S, Doenges E, et al Effect of frequent and sustained plateletpheresis on peripheral blood mononuclear cell populations and lymphocyte functions of normal volunteer donors Transfusion 1986;26:446-52

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ