

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
HEMATOLOJİ BİLİM DALI

**PLATELETFEREZ İŞLEMİNİN DONÖRLERDE
PLATELET AKTİVASYONU VE AGGREGASYONU
ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. İhsan KARADOĞAN

Hematoloji Uzmanlık Tezi

T954 / 1-1

Tez danışmanı: Doç. Dr. Levent ÜNDAR

(Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir)

ANTALYA, 1996

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

254

Gerek bu tezin hazırlanışı sırasındaki katkı ve yardımları, gerekse uzmanlık eğitimim süresince bilgi, deneyim ve yol göstericiliği ile yetişmemde büyük emeği olan bilim dalı başkanımız, değerli hocam Doç. Dr. Levent Üdar'a; her konuda sürekli desteğini gördüğüm anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Gülşen Yakupoğlu'na, ve bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen bilim dahımız Özel Hematoloji Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürü borç bilirim.

Dr. İhsan KARADOĞAN

KISALTMALAR

ADP	"adenosine diphosphate"
ATP	"adenosine triphosphate"
β-TG	"beta-thromboglobulin"
cAMP	"cyclic adenosine monophosphate"
CD	"cluster of differentiation"
CMV	"cytomegalovirus"
DAP	dolaşan aktive platelet
GMP	"granule membrane protein"
GP	"glycoprotein"
HLA	"human leukocyte antigens"
HMWK	"high-molecular-weight kininogen"
LAMP	"lysosome associated membrane protein"
PADGEM	"platelet activation dependent granule external membrane"
PAF	"platelet activating factor"
PAI-1	"plasminogen activator inhibitor-1"
PDGF	"platelet derived growth factor"
PF-3	"platelet factor-3"
PF-4	"platelet factor-4"
PFP	plateletten fakir plazma
PG	"prostaglandin"
PZP	plateletten zengin plazma
RES	retikuloendotelial sistem
SD	"standard deviation"
T4	yardımcı T hücresi
T8	baskılayıcı T hücresi
TGF-β	"transforming growth factor-beta"
t-PA	"tissue-plasminogen activator"
TXA₂	"thromboxane A ₂ "
TXB₂	"thromboxane B ₂ "
vWF	"von Willebrant factor"

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. PLATELETLER	3
2.1.1. Yapı	3
2.1.1.1. Platelet granülleri	3
2.1.1.1.1. Alfa granüller	3
2.1.1.1.2. Yoğun cisimcikler	4
2.1.1.1.3. Lizozomlar	4
2.1.2. İşlev	4
2.1.2.1. Platelet adezyonu	4
2.1.2.2. Platelet salıverme (release) reaksiyonu	5
2.1.2.3. Platelet aggregasyonu	5
2.1.2.4. Prokoagülan aktivite	5
2.2. PLATELET AKTİVASYONU	7
2.2.1. Platelet aktivasyon "marker" ları	8
2.3. PLATELET AGGREGASYON ÇALIŞMALARI	9
2.3.1. Optik aggregasyon testleri	11
2.3.2. İmpedans aggregometresi ile yapılan testler	12
2.4. FLOW SİTOMETRE	13
2.4.1. Çalışma ilkeleri	13
2.4.2. Flow sitometre ile yapılan platelet çalışmaları	13
2.4.3. Platelet aktivasyonu sırasında oluşan platelet membran değişikliklerinin flow sitometrik yöntemle gösterilmesi	14
2.4.3.1. GP-IIb-IIIa kompleksinde ve fibrinojen molekülünde oluşan değişiklikler	14
2.4.3.2. Alfa granül membran antijenlerinin gösterilmesi	15
2.4.3.3. Lizozom membran antijenlerinin gösterilmesi	16

2.4.3.4. Yoğun cisimcik membran antijenlerinin gösterilmesi	16
2.4.3.5. GP-Ib ekspresyonundaki azalışın saptanması	16
2.5. TEDAVİ AMACIYLA PLATELET KONSANTRELERİNİN KULLANILMASI	17
2.5.1. Endikasyonları ve elde edilme yolları	17
2.5.2. Aferez cihazları	17
2.5.3. Plateletferez donörleri	18
2.5.4. Plateletferez ile elde edilen platelet konsantrelerinin kullanım avantajları	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. ÇALIŞMA GRUBU	20
3.2. PLATELETFEREZ İŞLEMİ	20
3.3. KAN ÖRNEKLERİ	20
3.4. PLATELET SAYIMI	21
3.5. AGGREGASYON ÇALIŞMALARI	21
3.6. MONOKLONAL ANTİKORLAR	21
3.7. FLOW SİTOMETRİK ANALİZ	22
3.8. İSTATİSTİK	23
4. SONUÇLAR	24
5. TARTIŞMA	37
6. ÖZET	41
7. KAYNAKLAR	42

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Aferez cihazları ile tek bir donörden alınan platelet konsantrelerinin transfüzyon desteği amacıyla trombositopenik hastalarda kullanımı, günümüz kan bankacılığında rutin uygulanan bir işlem şekline gelmiştir. Son 10 yıl içinde platelet transfüzyonlarında yılda ortalama % 25 oranında bir artış izlenmiştir ve bu artış diğer bütün kan ürünlerinde izlenen yıllık artışların üzerinde bir orandır (1). ABD'de 1980-1986 yılları arasında platelet donasyonu % 400 oranında artarken, eritrosit donasyonunda ise sadece % 15'lik bir artış olduğu bildirilmektedir (2). En hızlı artış ise özellikle tek bir donörden aferez yoluyla sağlanan platelet sayılarında olmuştur. Refrakter hastalar için HLA-uygun plateletlerin kullanılması, maligniteli hastalara uygulanan kemoterapiler sonrası izlenen aplazi dönemleri ile kemik iliği ve karaciğer transplantasyonu yapılan hastalarda platelet transfüzyonlarına olan gereksinimin artması, sayıları gittikçe artan kardiyovasküler operasyonlar sırasında plateletlerin yoğun olarak kullanımı, hastaların karşılaştıkları donör sayısının azaltılarak infeksiyöz ve immünolojik komplikasyonların en aza indirilmesi gibi nedenler, aferez yöntemi ile tek bir donörden elde edilen plateletlere duyulan gereksinimin giderek artmasına yol açmıştır. Ayrıca kapalı sistem aferez setlerinin geliştirilmesi de, plateletlerin 5 gün saklanabilmelerine izin vererek CMV serolojisi, HLA uygunluğu ve ürün sayılarında daha rahat davranılmasına yol açmış ve platelet transfüzyonlarının artmasına katkıda bulunmuştur.

Günümüzde sıkça kullanılmaya başlanan aferez işlemlerinin birçok olası yan etkileri söz konusudur (3). Afereze bağlı mortalite daha çok hasta kişilere tedavi amacıyla yapılan işlemler sırasında bildirilmiştir (4,5). Yüksek volümde kan akışına izin veren geniş çaplı damarlara duyulan gereksinim nedeni ile yanlışlıkla arterlere girilmesi, damar yırtılmaları, hematomlar, tromboz ve enfeksiyonlar gibi vasküler problemler sık rastlanan komplikasyonlar arasında yer almaktadır (6). Özellikle "kesikli akımla" (intermittent flow) çalışan makinalarda "devamlı akımlı" (continuous flow) makinalara göre daha yüksek oranda kan volümü damar dışına alındığı için, hipovolemik komplikasyonlar ile daha sık karşılaşılmaktadır. Damar dışına alınarak birçok büklümlü plastik tüpler ve açılıp kapanan kapakçık sistemleri ile karşılaşan ve santrifügasyon kuvvetlerine maruz kalan eritrositlerde hemoliz izlenebilmektedir. Bunların dışında antikoagülasyon için kullanılan sitrata bağlı bilinen yan etkiler yanında, asepsiye

uyulmaması nedeniyle infeksiyöz komplikasyonlar da gözlenebilmektedir. Aferezin uzun dönemde de yan etkileri ortaya çıkabilmektedir. Sık sitoferez uygulanan kan donörlerinde mutlak T ve B hücre sayılarında, 8 aya dek sürebilen azalma olduğu gösterilmiştir (7). B hücrelerindeki düşüş daha belirgin olmaktadır. T hücre sayılarında azalma olmasına rağmen T4/T8 hücre oranında değişiklik saptanmamıştır (8). Laboratuvar olarak gösterilen immün sistemdeki bu değişikliklere bağlı klinik olarak gelişen herhangi bir komplikasyon henüz bildirilmemiştir (9).

Hemodializ ve hemoperfüzyon cihazları gibi vücut dışı dolaşımın kullanıldığı durumlarda koagülasyon, fibrinolizis ve platelet fonksiyonları gibi hemostatik parametrelerin önemli ölçülerde etkilendiği bilinmektedir (10,11). Bu değişikliklerin, hastalarda izlenen kanama ve/veya tromboembolik fenomenlerin gelişimine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Vücut dışı dolaşım özellikleri taşıyan aferez işlemi sırasında da donör kanı trombojenik özellikler taşıyabilecek damar dışı bir sisteme taşınmakta ve santrifügasyon gibi plateletlerin aktivasyonuna yol açabilecek dış kuvvetler uygulanmaktadır. Bu nedenle aferez işleminin hemostatik sistemde önemli değişikliklere yol açması mümkündür. Daha önce yapılan bir çalışmada (12) otomatik plazmaferez işleminin plateletleri aktive ettikleri gösterilirken, başka bir çalışmada da plateletferez işleminin gönüllü donörlerde tromboza yatkın bir durum yarattığı bildirilmiştir (13). Plateletferez işlemi sırasında platelet fonksiyonlarında ortaya çıkabilecek değişiklikler, donörlerde tromboembolik olaylar ve/veya kanamaya yatkınlık yönünden bir risk oluşturabilecekleri gibi, ürün olarak hazırlanan plateletlerin kalitelerini etkilemeleri de söz konusu olabilir.

Bu çalışmada kesikli akımla çalışan bir aferez cihazı ile gerçekleştirilen plateletferez işleminin, gönüllü 20 erkek donörde platelet aktivasyonu ve aggregasyonu üzerine yaptığı değişikliklerin incelenmesi amaçlandı. Bu nedenle plateletferez öncesi ve sonrası alınan tam kan örneklerinde flow sitometrik yöntemle platelet aktivasyonunun bir göstergesi olarak platelet membranındaki CD62 (P-selektin) ekspresyonu ve impedans aggregometresi ile plateletlerin ADP, kollajen ve ristosetin gibi agonistlere karşı gösterdikleri aggregasyon yanıtları ölçüldü. Bildiğimiz kadarı ile donörlerde plateletferez işleminin platelet aktivasyonu üzerine olan etkilerinin incelendiği İngilizce literatürde yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. PLATELETELER

2.1.1. Yapı

Plateletler, megakaryositlerin fragmentasyonundan kaynaklanan, 2-5 μm çapında, 0.5-1 μm kalınlığında, 5-7 μm^3 hacmında, nükleus içermeyen, bikonveks, yuvarlak ya da hafif oval şekilde olan hücrelerdir (14-16). Vücutta total 10^{12} düzeyinde bulunmasına karşın dolaşan kandaki plateletler yaklaşık 7 mL'lik bir hacim oluşturmaktadırlar. Dolaşan kandaki plateletler total platelet kitlesinin 2/3 ünü oluşturmakta olup geri kalan 1/3'ü dalakta sekestre edilir ve her iki havuz denge halindedir (16). Dolaşan plateletlerin değişim oranı günde litrede 35×10^9 düzeyinde olup ortalama yaşam süreleri 7-10 gündür (14-16).

Plateletler, May Grünwald/Giemsa ile boyanan yaymalarda küçük, yuvarlak, bazan elonge, düzensiz parçacıklar olarak görülürler. Azurofilik mor granülasyon, yaklaşık 30 lekeden ibaret olarak açık mavi sitoplazmadan ayrımlanabilir. Aktivasyon başladıktan sonra granüller santralize olur ve sitoplazma homojen hal alır (16). Granüller elektron mikroskopunda yuvarlak şekilli, yaklaşık 300 nm boyutlarında, tek bir membranla çevrili birer yoğunluk olarak görülürler.

2.1.1.1. Platelet granülleri

Alfa granüller, yoğun cisimcikler ve lizozomlar olmak üzere 3 tip granül tanımlanmıştır. Bunların içerikleri ve işlevleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

2.1.1.1.1. Alfa granüller

Alfa granüller plateletlerdeki azurofilik granüllerin yaklaşık % 85'ini oluştururlar. Alfa granüllerin içerdiği çok sayıda substans iki grup halinde toplanabilir. İlk grup spesifik platelet proteinlerini, ikinci grup ise plazma ya da doku moleküllerini içerir. Bunlar, ya prokoagülan etki göstererek, ya plateletlerin adezyon ve aggregasyonlarını uyararak, ya da onarım süreçlerini hızlandırarak hemostaz aktivatörü işlevi gösterirler. Bu faktörler, salıverme fazı sırasında plateletlerden çevre ortama salınırlar (16).

"Grey platelet syndrome" olarak bilinen, aggregasyon yitimi ve hemorajik diyatezle sonuçlanan tabloda plateletlerde alfa granül eksikliği söz konusudur (14,16,17).

2.1.1.1.2. 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 topladığı kalsiyum bulunuşuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Kalsiyumdan başka yoğun cisimcikler ADP (total deponun % 64'ü), ATP ve serotonin gibi release sırasında salınan çeşitli maddeleri depoladığı gibi katekolaminler, pirofosfat ve ortofosfatları da içerir (14,16). Yoğun cisimcikler, endojen ADP salınımına sekonder aggregasyonun olmayışı ile karakterize Hermansky Pudlak sendromunda eksiktir (14,16).

2.1.1.1.3. Lizozomlar

Daha az sayıda olup yalnızca asit fosfataz, aril sülfataz gibi sindirici enzimlerden birinin varlığında gösterilebilir. Sikatrizasyon sırasında hemostatik tıkaçın eliminasyonunda rolleri vardır (16,17).

2.1.2. İşlev

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

2.1.2.1. Platelet adezyonu

Kan damarlarında oluşan hasar sonucu subendotelyal bağ dokusunun açığa çıkması ile plateletler bu bölgeye yapışırlar (adezyon). Plateletler ile damar duvarı arasında oluşan etkileşim sırasında birçok adezyon molekülü rol alır. vWF bir yandan subendotelyal mikrofibrillere bağlanırken diğer yandan platelet membranındaki GP-Ib ile bağlanır. GP-IIb-IIIa reseptör kompleksi de plateletlerin vWF aracılığı ile damar duvarına yapışmalarını sağlayan ikinci bir bağlanma noktasını oluşturur. Subendotelyal bölgedeki kollajen moleküllerine yapışma ise GP-Ia aracılığı ile olmaktadır. Platelet adezyonu sonrası oluşan bir dizi metabolik reaksiyon ile plateletlerde salıverme (release), şekil değişikliği ve aggregasyon

oluşumu başlamakta. Plateletler daha küresel bir şekil almaktadırlar ve uzun pseudopotlar oluşturarak platelet-platelet ve platelet-damar etkileşimlerini arttırmaktadırlar. (15,16,18,19)

2.1.2.2. Platelet salıverme (release) reaksiyonu

Plateletlerin kollajen ile karşılaşmaları ve/veya trombinin etkisi ile granüllerinde bulunan ADP, serotonin, fibrinojen, lizozomal enzimler, β -TG, PF-4 gibi maddeler salıverilirler.

Alfa granül glikoproteinleri ve proteinlerinin salıverilişi, platelet 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 platelet prostoglandin sentezi artar. Protein kinaz C aracılığı ile protein fosforilasyonunu aktive eden diacylglycerol ve intrasellüler kalsiyum iyonlarının salınımına yol açan inositol triphosphate salıverilmesi oluşur. Ayrıca TXA_2 , cAMP düzeylerini düşürerek salıverme reaksiyonunu artırır. (15,16,18,19)

2.1.2.3. Platelet aggregasyonu

Ortama salınan ADP ve TXA_2 ile hasarlı bölgede daha fazla sayıda plateletlerin aggregasyonu gerçekleşir. Yeni katılan plateletler 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. (15,16,18,19)

2.1.2.4. Prokoagulan aktivite

Plateletlerin salıverme reaksiyonu ve aggregasyonunu takiben açığa çıkan PF-3 koagülasyonun iki önemli basamağında rol oynamaktadır. Aktive faktör IX ve VIII ile birlikte faktör X aktivasyonunda rol alan PF-3, aynı zamanda aktive faktör X ve V ile birlikte protrombinin trombine dönüştürülmesi basamaklarında yer almaktadır. (15,16,18,19)

Tablo 1. Platelet granüllerinin içerikleri ve işlevleri**ALFA GRANÜLLER****1. Spesifik Proteinler**

PF-4	* heparinin nötralizasyonu * adezyon ve agregasyonun uyarılması * bazofillerden histamin salıverilişinin uyarılması * nötrofil, monosit ve fibroblastlar üzerine kemotaktik etki * lökosit elastazın aktivasyonu * kollajenaz inhibisyonu * çeşitli glikozaminoglikanların fiksasyonu
β-TG	* antiheparin etki * fibroblastlar üzerine kemotaktik etki (PGI ₂ sentez inhibisyonu)
PDGF	* fibroblast ve düz kas hücrelerinin çoğalmasının uyarılması * nötrofil, monosit, fibroblast ve düz kas hücrelerine kemotaktik etki
Trombospondin	* agregasyon ve fibrin oluşumu * hücre-hücre etkileşimi * hemaglütinasyon

2. Plasma ya da Doku Molekülleri

Fibrinojen	* agregasyon ve koagülasyon
Faktör V	* koagülasyon
vWF	* adezyon
Fibronektin	* adezyon
Trombospondin	* adezyon ve agregasyon
Epinefrin	* vazokonstriksiyon ve agregasyon
Plazminojen	* fibrinoliz
HMWK	* yangı, koagülasyon aktivasyonu

YOĞUN CİSİMCİKLER

ADP	* adezyon ve agregasyon
ATP	* enerji deposu
Kalsiyum	* şekil değişikliği, hareket, PG sentezinin aktivasyonu, koagülasyon
Serotonin	* vazokonstriksiyon, agregasyon
Antiplazmin	* koagülasyon

LİZOZOMLAR

Asit hidrolazlar	* sikatrizasyon sırasında hemostatik pıhtının ortadan kaldırılması
-------------------------	--

2.2. PLATELET AKTİVASYONU

Damar içinde pasif olarak dolaşan plateletler, damar duvarında bir zedelenme ya da yabancı bir yüzeyle temas sonucunda hızla adezyon, şekil değişikliği, salıverme ve aggregasyon göstererek lokalize bir hemostatik tıkaç oluştururlar (18). Platelet aktivasyonu, platelet yüzeyini etkileyebilen değişik uyarıcı ve inhibe edici sinyallerle modüle edilen dinamik bir süreçtir (18). Plateletler, bu çeşitli uyarıları algılayan spesifik membran reseptörleri taşırlar. Bu reseptörler yoluyla alınan sinyalleri hücre içinde bulunan ikincil haberciler kompleks bir biyolojik yanıtı dönüştürürler (19).

Platelet yanıtı iki grup halinde sınıflandırılabilir (19):

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

Reversibl yanıt, plateletlerin endotel hücre tabakası arasındaki boşlukların kapatılması, büyüme faktörlerinin alfa granüllerden salıverilişi ve subendoteldeki küçük defektlerin onarımı gibi fizyolojik işlevleri; irreversibl yanıt ise plateletlerin hemostatik işlevini içerir (19-21).

Uyarıya ilk fizyolojik yanıt, disk şeklinde ve düzgün olan plateletin adezyonu ve şekil değişikliğidir. İki-üç saniye içerisinde küre şeklini alan plateletlerde 7-8 saniye içerisinde uzun pseudopodlar belirir (22,23). Plateletlerin küre şeklini alması, granüllerinin merkezileşmesi ve kontraktıl hücre iskeletinin kasılması sonucu ortaya çıkar (24). Şekil değişikliği sırasında plazma membranının yüzeyi de genişlemektedir. Bu da olasılıkla yüzeyle bağlantılı "açık kanaliküler sistem" in dışa açılmasının bir sonucudur (25). Fizyolojik koşullarda şekil değişikliği, aggregasyon ve salıverilişe öncülük eder ve bir öngerekliliktir (25,26). Şekil değişikliği sırasında plateletlerin prokoagülan aktiviteleri de artmaktadır (27).

Çeşitli fizyolojik substanslar plateletleri aktive etmektedir. Bunların içinde en önemlileri, plateletlerin adezyonunu uyaran vWF ve kollajen; koagülasyon sisteminde oluşan trombin; aktive plateletlerden salıverilen endoperoksidler/TXA₂ ve ADP; dolaşımda bulunan epinefrin ve vazopressin; ve uyarılmış nötrofil ve makrofajlardan salınan PAF'dır (19).

Plateletler aktive olduğunda platelet membranındaki lipid dağılımında değişiklikler olmakta ve negatif yüklü fosfatidilserinin büyük bir bölümü membranın dış yüzeyine çıkmaktadır (28). Aktive plateletlerin bu özelliğinin hemostatik süreçte büyük önemi vardır. Negatif yüklü fosfolipidler faktör IXa, faktör VIIIa ve kalsiyumdan oluşan bir kompleks aracılığıyla faktör X'un faktör Xa'ya ve yine faktör Xa, faktör Va ve kalsiyumdan oluşan bir kompleks aracılığıyla da protrombinin trombine dönüşümünü belirgin olarak artırmaktadır (29-31). İstirahat halindeki plateletler, membranın dış yüzeyinde fosfatidilkolin ve sfingomyelin gibi nötral fosfolipidleri içerdiklerinden faktör Xa ya da trombin oluşumunu uyarma kapasiteleri düşüktür (28). Plateletlerde faktör Va için 1000-2000 adet yüksek afiniteli bağlanma bölgeleri bulunmaktadır (32). Platelete bağlı faktör Va, faktör Xa için bir reseptördür ve platelet başına faktör Xa için 200-300 bağlanma bölgesi bulunmaktadır (32). Aktivasyon sırasında ayrıca, koagülasyon ve fibrinoliziste önemli rolleri olan HMWK, faktör XIIa, faktör XIIIa, aktive protein C ve plazminojen için de bağlanma bölgeleri eksprese edilir (33-36).

Aktive plateletler, t-PA ve ürokinazla kompleks oluşturarak bunları inaktive eden PAI-1'i de salıvermektedir (37). Alfa granüllerde bulunan PAI-1'in yalnızca % 5'i aktif durumda olup geri kalan büyük bölümü latent formdadır. Aktive plateletlerden salıverilen TGF- β ise endotel ve düz kas hücrelerinde PAI-1 ekspresyonunu uyarmaktadır ve bu hücrelerde oluşan PAI-1 aktif formdadır (37).

2.2.1. Platelet aktivasyon "marker" ları

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

- a. Dolaşan platelet agregatları (38-40),
- b. Aktive plateletlerden salıverilen ve plazma ya da idrarda saptanan metabolitler
(PF-4, β -TG, 2,3-dinor-TXB₂, 11-dehydro-TXB₂) (41,42),
- c. İmmunolojik yöntemler
(platelet-associated F XIII, GP-IIb-IIIa, LAMP-1 ve -2, GP-53, GMP-33, GMP-140) (43,44).

Plateletler normal koşullar altında dolaşımında istirahat durumunda bulunurlar ve birçok fizyolojik agonistlerden bir veya birkaçı ile uyarıldıkları zaman platelet adezyon ve aggregasyonuna yol açan değişikliklere uğrarlar. Bu değişiklikler *in vivo* koşullarda olabilecekleri gibi, *in vitro* koşullardan da önemli oranda etkilenmektedirler (45). Platelet aktivasyonunun değerlendirilmesi amacıyla kullanılan PF-4, β -TG, tromboksan metabolitlerinin serum ve idrarda ölçümü gibi biyokimyasal yöntemlerin çoğunda uygulanan manüplasyonlar nedeni ile teknik hataların doğurduğu yanıltıcı test sonuçları ile karşılaşmak mümkündür. Bu nedenle klinik olarak yaygın kullanım alanı bulamamışlardır.

Flow sitometrik yöntemlerle, platelet aktivasyonu sırasında platelet yüzeyinde oluşan değişikliklerin değerlendirilmesi yoluyla da platelet aktivasyonunun monütere edilmesi mümkündür. Özellikle tam kan yönteminin kullanıldığı durumlarda, plateletler doğal ortamları içinde analiz edilmektedirler ve santrifügasyon gibi teknik nedenlerle platelet aktivasyonuna yol açarak yanıltıcı sonuçlar doğurabilecek manüplasyonlar bulunmamaktadır. Bu nedenle platelet aktivasyonlarının değerlendirilmesinde flow sitometrik yöntemlerin kullanılması, PF-4, β -TG, tromboksan metabolitlerinin serum ve idrarda ölçümü gibi biyokimyasal yöntemler kullanıldığı analizlere göre daha doğru ve güvenilir sonuçların alınmasını sağlamaktadır. (44)

2.3. PLATELET AGGREGASYON ÇALIŞMALARI

Platelet aggregasyonu, bir plateletin diğer bir platelete yapışmasını tanımlayan bir terimdir. Bu olay plateletten zengin plazma veya tam kana agregan maddelerin (agonist) konulması ile indüklenebilir. Platelet aggregasyonunun oluşabilmesi için kalsiyum, fibrinojen, plazma faktörleri ve agregan ajanlara gereksinim bulunmaktadır. Kullanılan agregan ajanın tipi ve konsantrasyonuna göre alınan yanıtlar farklı olmaktadır. ADP, epinefrin, kollajen ve ristosetin agonist olarak klinikte en sık kullanılan maddelerdir. Agonist olarak bu maddelerin kullanılmasının nedeni *in vivo* koşullarda da bu maddelerin platelet aggregasyonunda rol almalarından kaynaklanmaktadır. (18,19)

ADP ve epinefrin platelet organellerinde bulunan ve primer hemostatik plak oluşumu sırasında aktive olan plateletlerden salınan ve platelet aggregasyonunu arttıran maddelerdir. Kollajen ise,

plateletlerde bulunmayan ancak damarlarda oluşan hasar sonrası açığa çıkan ve plateletleri aktive ederek agregasyon ve primer hemostatik plak oluşumunu sağlayan bir dizi reaksiyonun başlamasına yol açan ilk maddedir. Bu nedenle *in vitro* çalışmalarda plateletlerin yanıtlarının değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Trombin, araşidonik asit, kalsiyum ionophore, ristosetin, bovine faktör VIII ve serotonin ise daha çok özel durumlarda ve deneysel çalışmalarda kullanılan agonistlerdir.

Primer ve sekonder olmak üzere *in vitro* olarak iki tip agregasyon yanıtı söz konusudur. Primer agregasyon reversibldir ve salıveriş reaksiyonu oluşmaz. Sekonder agregasyon ise salıveriş ile birlikte ve irreversibldir. Plateletlerin agregasyonu, fibrinojenin bağlanabileceği fibrinojen reseptörlerinin belirmesini gerektirir (19). Primer agregasyon hücre dışı ortamda kalsiyum ve/veya magnezyumun varlığında ve düşük konsantrasyondaki bir agonistin uyarımıyla gerçekleşir. Bu agregasyon ve disaggregasyon, fibrinojenin reseptörüne bağlanıp ayrılmasıyla ilişkilidir. Yüksek agonist konsantrasyonundan sonra gözlenen irreversibl agregasyon ise başlıca salıverme reaksiyonunun bir sonucudur. Büyük platelet agregatlarının oluşumuna ADP, araşidonik asitten oluşan endoperoksidler ve TXA_2 , yoğun cisimciklerden salınan kalsiyum ile alfa granüllerden salınan adeziv proteinler aracılık eder. Alfa granüllerin salıverilmesi, platelet yüzeyinde yüksek konsantrasyonda fibrinojen, fibronektin, trombospondin ve vWF sağlar (19). Alfa granül ve yoğun granül içeriklerinin salıverilmesi tüm platelet agonistleri ile uyarıdan sonra gözlemlenebilirken, lizozomal salıveriliş yalnızca yüksek konsantrasyonda trombin ya da kollajen ile olasıdır (46). Salıverme reaksiyonu sırasında ekstrasellüler alana geçen endoperoksidler/ TXA_2 ve ADP platelet yüzeyindeki spesifik reseptörlerine bağlanarak kalsiyumun mobilizasyonunu, protein fosforilasyonunu, inositol fosfolipid hidrolizini ve fibrinojen reseptörünün açığa çıkmasını uyarır. Böylece platelet yanıtı güçlenmiş olur. Endoperoksidler/ TXA_2 'nin oluşumunun platelet yanıtının reversiblden irreversible dönüşümünde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir (47-49).

Platelet agregasyon çalışmaları günümüzde platelet fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanılan en duyarlı *in vitro* testlerden biridir. Diğer bir çok teknikle tanı konulmasının mümkün olmadığı bir çok hastalıkta, hem tanısal hem de tedavinin etkinliğinin

değerlendirilmesi amacıyla kullanılabilir. Plateletlerin değişik agonistlere karşı gösterdikleri yanıtlar arasındaki farklılıklar, trombasteni, Bernard-Soulier sendromu, von Willebrand hastalığı ve non-steroid antiinflatuar ilaçların etkileri gibi konjenital veya kazanılmış bir çok platelet fonksiyon bozukluğunun tanısında kullanılmaktadır.

Klinikte platelet aggregasyon testleri aggregometre adı verilen cihazlar ile yapılmaktadır. Bu cihazların iki farklı sistemle çalışan tipi bulunmaktadır. Optik sistemle çalışan aggregometrelerde plateletten zengin plazma kullanılırken, impedans aggregometrelerinde tam kan kullanılmaktadır.

2.3.1. Optik aggregasyon testleri

İlk kez 1962 yılında Born tarafından plateletten zengin plazma örneklerinde platelet aggregasyonunun değerlendirilmesi amacıyla geliştirilen kolorimetrik bir testtir (50).

Optik aggregometreler sabit dalga boyunda çalışan spektrofotometrelerdir. Örneğin konduğu 37°C'ye ısıtılmış bir bölüm bulunmaktadır. Örneğin içine konulan metal bir çubukçuk manyetik ortamda, plateletlerin birbirine temasını arttırmak için karıştırıcı olarak kullanılmaktadır.

Optik sistemle çalışan aggregometreler için antikoagüle kan örneği düşük santrifüj hızında çevrilerek plateletten zengin plazma ve yüksek hızda çevrilerek plateletten fakir plazma elde edilmektedir.

Optik aggregometrenin çalışma prensibi, spektrofotometredeki örnek bölümü içinden geçen ışığın transmisyonunda oluşan değişikliklerin zamana göre kaydedilmesi temeline dayanmaktadır. Örnek kabına PZP konulduğu zaman plateletlerin varlığı nedeniyle ışığın bir kısmı soğrulmaktadır ve bu değer % 0 olarak kabul edilmektedir. Örnek kabına PFP konulduğu zaman ortamda platelet olmadığı için ışık minimal soğrulmaktadır ve yüksek olan bu transmisyon değeri % 100 olarak kabul edilmektedir. PZP içine platelet aggregasyonuna yol açan bir agonist eklendiği zaman plateletler aggregat olma ve ışığın transmisyonu zaman içinde artan aggregasyona paralel olarak artmaktadır. Zaman içinde ışığın transmisyonunda

oluşan bu değişiklikler grafik olarak kaydedilmektedir. Bu şekilde oluşan aggregasyon eğrilerinin eğimleri ve dakikalar içindeki oranları hesaplanarak aggregasyon yanıtları değerlendirilmektedir.

2.3.2. İmpedans aggregometresi ile yapılan testler

Tam kan yöntemi ile platelet aggregasyonunun impedans metodu kullanılarak değerlendirilmesi ilk kez 1980 yılında Cardinal ve Flower tarafından geliştirilmiştir (51).

İmpedans aggregometresi ile yapılan çalışmalarda antikoagüle tam kan kullanılmakta olup PZP ve PFP hazırlanmasına gerek bulunmamaktadır. Çalışma sistemi optik sisteme göre oldukça farklıdır.

Yine 37°C'ye ısıtılmış ve metal çubukçuk ile karıştırılan örnek içine elektronik bir prob konulmaktadır. Bu prob üstünde iki ince metal tel bulunmaktadır. Proben örnek içine daldırılması ile birlikte, metal tellerin üstü plateletler ile tek bir kat şeklinde kapatılmaktadır. Bu nedenle iki metal tel arasına milivolt düzeyinde elektrik yükü uygulandığı zaman bir elektriksel dirençle karşılaşmaktadır. "Ohm" olarak ölçülen bu direnç bazal değer (0 ohm) olarak kabul edilmektedir. Ardından ortama agonist eklenmesi ile birlikte plateletler metal tellerin üzerinde aggrege olmakta ve iki metal tel arasındaki direnç artmaktadır. Artan direncin zaman içindeki değişimi grafik olarak çizdirilerek aggregasyon eğrileri elde edilmektedir. Belirli bir zaman dilimi içinde oluşan direnç değişikliği, izlenen maksimum direnç değişikliği veya dakikadaki maksimum değişiklik hızı (grafığın eğimi) gibi parametreler "ohm" cinsinden aggregasyon yanıtı olarak değerlendirilmektedir.

İmpedans aggregometresi ile yapılan ölçümler için PZP ve PFP hazırlanmasına gerek bulunmamaktadır. Bu nedenle tam kan örneğine platelet aktivasyonuna yol açarak aggregasyon yanıtlarını etkileyebilecek olan santrifügasyon gibi işlemler uygulanmamaktadır. Ayrıca plateletler kendi doğal ortamları içinde incelendikleri için, platelet fonksiyonlarında etkili olabilecek birçok labil faktör ve diğer hücreler ortamdaki uzaklaştırılmamaktadır. Testlerin değerlendirilmesinde optik sistem kullanılmadığı için lipemik, trombositopenik veya dev plateletleri olan hastalarda da impedans aggregometresi güvenle uygulanabilmektedir. Tüm bu

faktörler impedans aggregometresi ile yapılan çalışmaların değerini optik sisteme göre arttırmaktadır.

2.4. FLOW SİTOMETRE

2.4.1. Çalışma ilkeleri

Flow sitometre, 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 değerlendirilmek 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 kaydedilebilmektedir. Histogramlar üzerinde büyüklük ve granüleritesine göre değişik alanlarda toplanan hücre popülasyonlarının etrafına çizilen pencereler ile sadece istenilen popülasyonlar üzerinde değerlendirme yapmak mümkündür. Floresans ile bağlanmış monoklonal antikolar kullanarak 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. Flow sitometre ile, süspansiyon haline getirilebilen her hücre popülasyonu üzerinde çalışma yapmak mümkündür. (52)

2.4.2. Flow sitometre ile yapılan platelet çalışmaları

Flow sitometrik yöntemlerin platelet çalışmalarında kullanılması, fizyolojik ve/veya patolojik durumlarda plateletlerin davranışları konusunda birçok bilgi edinilmesini sağlamıştır. Plateletlerin 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 plateletlerin diğer hücrelerden izolasyonu için uygulanan manüpülasyonlar sırasında plateletlerde birçok fizyolojik değişiklik olabilmektedir (45). Bu nedenle plateletler ile çalışma yapılması zordur. Özellikle tam kan yöntemleri kullanılarak

yapılan flow sitometrik çalışmalarda bu sorunlar tümüyle aşılmasa da büyük oranda azaltılabilmektedir (44). Tam kan yönteminin flow sitometre ile yapılan çalışmalarda birçok yönden üstünlüğü bulunmaktadır. Bu yöntemde mikrolitre düzeylerindeki kan örnekleri çalışma için yeterli olacağından infant ve bebeklerde, trombositopenik hastalarda çalışmaların yapılması mümkündür. Tam kan yönteminin kullanılması sırasında plateletlerin santirfügasyonu ve yıkanmaları gerekmemektedir, bu nedenle plateletlerin aktivasyonuna yol açarak test sonuçlarını etkileyebilecek olan manüplasyon hataları en aza indirilebilmektedir. Ayrıca flow sitometre ile platelet subpopülasyonlarının yanıtlarını ayrı ayrı değerlendirmek mümkündür. β -TG veya PF-4 ölçümleri ile platelet aktivasyonlarının değerlendirilmesi bu olanağı sağlayamamaktadır. Birçok fizyolojik ve patolojik durumda flow sitometre ile platelet yüzeyi üzerindeki antijenik yapılar tanınarak plateletlerin idantifikasyonu yapılabilmekte, aktivasyon durumları ve agonistler ile uyarıldıkları zaman gösterdikleri aggregasyon yanıtları incelenebilmektedir.

2.4.3. Platelet aktivasyonu sırasında oluşan platelet membran değişikliklerinin flow sitometrik yöntemlerle gösterilmesi

ADP veya epinefrin gibi zayıf bir agonist ile plateletlerin stimülasyonu platelet GP-IIb-IIIa kompleksinde fibrinojen reseptör bölgesini açığa çıkararak fibrinojenin bağlanmasını kolaylaştıracak şekilsel bir değişikliğe yol açmaktadır ve platelet-platelet aggregasyonu oluşmaktadır. Plateletler aggrege 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 platelet membranında belirlemektedir. Platelet granüllerinden salınan proteinler bu esnada platelet yüzeyine yapışmaktadır. Tüm bu değişikliklerin flow sitometrik yöntemlerle saptanması mümkündür. (52)

2.4.3.1. GP-IIb-IIIa kompleksinde ve fibrinojen molekülünde oluşan değişiklikler

Platelet aktivasyonu sırasında GP-IIb-IIIa kompleksinde olan değişiklikler birkaç yolla gösterilebilir. Örneğin aktive hale gelmiş GP-IIb-IIIa kompleksine karşı geliştirilmiş olan monoklonal antikolar (PAC-1) aracılığı ile (53), ya da aktivasyon sonucu GP-IIb-IIIa kompleksine yapışan fibrinojen molekülü, anti-fibrinojen poliklonal veya monoklonal

antikorlar ile saptanabilir (54). Aktive olmuş GP-IIb-IIIa kompleksi daha düşük afinite de olmak üzere vWF ve fibronektin için de reseptör özelliğine sahiptir. Bu nedenle aktive olmuş plateletlerin taşıdıkları vWF ve fibronektinin, bu moleküllere karşı geliştirilmiş poliklonal veya monoklonal antikorlar ile gösterilmesi de mümkündür (55,56).

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 plateletlere yapışmış olan fibrinojenin, plazmadaki fibrinojenden bağımsız olarak gösterilmesi mümkündür (45).

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 epitoplara oluşmaktadır. Bu epitoplara karşı geliştirilen monoklonal antikorlar ile de aktive plateletlerin saptanması mümkündür (57).

2.4.3.2. Alfa granül membran antijenlerinin gösterilmesi

Platelet aktivasyonunun gösterilmesi, degranülasyon sonucu platelet 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 (58,59). GMP-140 alfa granüllerin membranları üzerinde bulunmaktadır. Ayrıca yoğun granüllerin membranları üzerinde de gösterilmiştir (60). İstirahat durumundaki plateletlerin yüzeyinde 1000 molekülden daha az sayıda iken, platelet aktivasyonu ile hücre başına 10.000 molekülün üzerine çıkmaktadır (61,62). Selektinler ailesinin bir üyesi olan P-selektin, ELAM-1 (E-selektin) ve lenfosit homing reseptör (L-selektin) gibi bir adezyon molekülüdür (59,63). Nötrofiller ve monositler için yapışma yeri olan P-selektinin aktive plateletlerin RES hücreleri tarafından dolaşımdan uzaklaştırılmasında rol oynadığı düşünülmektedir (64).

Alfa granüllerin membranlarında bulunan GMP-33 de P-selektin gibi istirahat halindeki plateletlerde çok az sayıda bulunduğu halde, aktivasyonla ekspresyonu belirgin olarak artan başka bir antijendir (65).

Plateletlerdeki alfa granüllerin içinde bulunan ve aktivasyon ile ortama salınan trombospondin ve PF-4, degranülasyondan sonra platelet üzerindeki reseptörlerine bağlanmaktadır (66,67). Bu nedenle platelet üzerinde bulunan trombospondin de platelet aktivasyon göstergesi olarak kullanılabilir (68).

2.4.3.3. Lizozom membran antijenlerinin gösterilmesi

Plateletlerdeki lizozomların membranlarında bulunan GP-53 veya CD63 olarak bilinen bir glikoprotein de platelet aktivasyonu ile hücre zarında ekspresyonu artmaktadır (55,69). Fonksiyonu tam olarak bilinmeyen bu proteine diğer hücrelerde ve tümör hücrelerinde de rastlanabilmektedir (70).

Lizozomal membranlarda bulunan ve aktivasyon ile platelet membranlarında ekspresyonu artan diğer iki protein LAMP-1 ve LAMP-2 dir (71).

2.4.3.4. Yoğun cisimcik membran antijenlerinin gösterilmesi

Granulophysin yoğun granül membranında bulunan ve platelet aktivasyonu ile ekspresyonu artan diğer bir antijenidir (60).

2.4.3.5. GP-Ib ekspresyonundaki azalışın saptanması

Trombin ile oluşan platelet aktivasyonu sırasında, yüzeye bağlanan kanaliküler sistem ve alfa granül membranlarındaki GP-IIb-IIIa kompleksinin translokasyonu nedeniyle GP-IIb-IIIa kompleks ekspresyonu artarken diğer taraftan kanaliküler sisteme sekestrasyonu nedeni ile GP-Ib ekspresyonunda azalma olmaktadır (68).

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

2.5. TEDAVİ AMACIYLA PLATELET KONSANTRELERİNİN KULLANILMASI

2.5.1. Endikasyonları ve elde edilme yolları

Platelet transfüzyonları platelet sayısında azalma veya fonksiyonlarında bozulma nedeni ile oluşan aktif kanamaların durdurulması veya önlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Tedavi amacıyla platelet transfüzyonu yapılmasının başlıca iki endikasyonu bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, platelet sayısı $50-80 \times 10^9/L$ nin altında iken aktif kanamanın izlenmesi, ikincisi ise platelet fonksiyonları bozuk olan kişilerde aktif kanamanın varlığıdır. Profilaktik amaçlı kullanımları arasında ise genellikle hematolojik maligniteli hastalarda veya yoğun kemoterapi uygulanan kişilerde platelet sayısının $10-20 \times 10^9/L$ nin altında oluşu, platelet sayısının $50 \times 10^9/L$ veya altında olup major cerrahi operasyon veya invazif girişim planlanması, platelet sayısının $50 \times 10^9/L$ veya altında olmasına rağmen 24 saat içinde 1 üniteden fazla kan kaybının izlenmesi sayılabilir. (72)

Transfüzyon amacıyla kullanılan plateletler başlıca iki şekilde elde edilmektedir:

- a. Rastgele donör plateletler (random-donor platelets): Bir ünite tam kanın alınışından sonraki en geç 8 saat içinde plateletlerinin ayrılması ile elde edilirler. Genellikle 50 mL plazma içinde 5×10^{10} platelet içerirler. İkinci jenerasyon torbalarda 5 güne kadar saklanabilen bu ürünlerden 6-8 tanesi transfüzyon öncesi havuzlanarak kullanılırlar.
- b. Tek donör plateletler (single-donor platelets, apheresis platelets): Tek bir donörden aferez cihazlarının kullanılması ile elde edilen ürünlerdir. Genellikle 200-400 mL plazma içerisinde 3.0×10^{11} platelet içerirler. Kullanılan setin özelliğine göre 1 veya 5 gün saklanabilirler. (72)

2.5.2. Aferez cihazları

Aferez (hemaaferez) donör veya hastadan tam kanın alınarak komponentlerine ayrılması, istenen ürünün tutularak diğer ürünlerin donör veya hastaya geri verilmesi yoluyla gerçekleştirilen bir işlemdir. Aferez işlemi transfüzyon amacı ile gerekli ürünün donörden toplanması veya hastanın tedavi edilmesi için patolojik ürünün uzaklaştırılması amacıyla kullanılabilir. Yapılan aferez işlemine, toplanan ürünün niteliğine bağlı olarak plateletferez, plazmaferez veya lökoferez adları da verilebilmektedir. Hücre ayırımı anlamında ise sitoferez denmektedir.

Aferez amacı ile kullanılan makinalar "hücre ayırım cihazları (cell separators)" olarak adlandırılmaktadırlar. Bu makinalar, santrifügasyon gücü altında değişik dansitedeki kan ürünlerinin birbirinden ayrılması prensibi ile çalışmaktadır. Hücre ayırım cihazlarında her aletin kendi özelliklerine uygun olarak hazırlanmış tümü steril olan ürün torbaları, donör veya hastadan alınan kanın santrifüj edildiği özel toplayıcı kap (bowl) ve bunları birbirine bağlayan tüp sistemleri bulunmaktadır. Kesikli veya devamlı akımlı makinalar olmak üzere iki grubu bulunan hücre ayırım cihazlarında donör veya hastadan alınan kan önce santrifügasyon durumundaki kap içinde toplanmakta ve bu sırada dansitesine bağlı olarak komponentlerine ayrılmaktadır. Daha sonra bu komponentler çoğu optik sistem aracılığı ile bilgisayara bağlı olan özel kapakçık ve tüp sistemleri ile ürün torbalarına aktarılmakta, toplanacak olan ürün saklanırken geri kalan ürünler hasta veya donöre geri verilmektedir. Kesikli akımla çalışan makinalarda, kap sikluslar halinde önce doldurulup sonra boşaltıldığı için tek bir damar yolu yeterli olmaktadır. Devamlı akımla çalışan makinalarda ise kanın alınması ve eş zamanlı olarak geri verilebilmesi için iki damar yoluna gereksinim bulunmaktadır. Antikoagülasyon amacı ile kullanılan sitrat veya heparin, donörden alınan kanın akım hızına uygun bir oranda sisteme otomatik olarak eklenmektedir. Kullanılan hücre ayırım cihazlarının özelliklerine bağlı olarak işlem süresi 1-2 saat arasında değişmektedir. (73)

Plateletferez işlemi ile elde edilen ürünlerdeki platelet sayılarının, 3.2×10^{11} ile 6.1×10^{11} arasında olduğu bildirilmektedir (74-80). Ürünün verimini belirleyen parametreler arasında donörün başlangıçtaki platelet sayısı, işlenen kan miktarı ve kullanılan makinanın cinsi yer almaktadır.

2.5.3. Plateletferez donörleri

Plateletferez işleminde kullanılacak donörlerin de tam kan donörü olma koşullarını taşıması gerekmektedir. Plateletferez işlemi amacıyla donör olarak seçilen kişilerin son üç gün içinde Aspirin veya platelet fonksiyonlarını bozabilecek benzeri ilaç kullanmamış olmaları gerekmektedir. Plateletferez işlemi ile donör platelet sayılarında yaklaşık % 30 oranında bir azalma izlenmektedir. Klinik olarak anlamlı bir değişikliğe yol açmayan platelet sayılarındaki bu düşüşün başlangıç değerine ulaşabilmesi için 72 saatlik bir süreye gereksinim bulunmaktadır (81,82). Bu nedenle aynı donörden plateletferez yoluyla platelet toplanması özel

bir durum söz konusu olmadıkça en az 3 gün ara ile önerilmektedir. Bir yılda yapılabilecek toplam işlem sayısı ise AABB standartlarına göre toplam 24 olarak saptanmıştır. (83)

2.5.4. Plateletferez ile elde edilen platelet konsantrelerinin kullanım avantajları

Transfüzyon amacı ile kullanılan platelet konsantrelerinin büyük bir çoğunluğu, rutin 1 ünite tam kan donasyonu sırasında elde edilen ürünlerin 4-8 tanesinin havuzlanması ile sağlanmaktadır. Plateletferez işlemi ile aynı dozdaki ürün tek bir donörden sağlanabilmektedir. Plateletferez işleminin daha pahalı olmasına rağmen kullanımını gerekli kılan birçok avantaj söz konusudur. Bu avantajlar aşağıda belirtilen şekilde sıralanabilir:

a. Daha önce yapılan transfüzyonlar sonrasında platelet yüzey antijenlerine karşı alloantikör geliştiren hastalarda rastgele seçilen donörlerden elde edilen platelet konsantreleri ile gereken yanıt alınamayabilmektedir. Bu tür refrakter hastalarda, alıcı ile HLA uyumlu donörlerden plateletferez işlemi ile elde edilen ürünlerin kullanılması ile başarılı sonuçlar alınmaktadır (84,85). Alloimmünizasyona uzun süreli platelet gereksinimi olan hematolojik maligniteli hastalarda ve kemik iliği transplantasyonu yapılan olgularda sık rastlanmaktadır. Bu tür hasta gruplarında % 50'lere kadar alloimmünizasyon oranı yükselebilmektedir.

b. Platelet gereksiniminin elde edilen ürün sayısından fazla olduğu merkezlerde yeterli platelet sayısının sağlanabilmesi için plateletferez işlemine başvurulabilmektedir. Özellikle transplantasyonun sık yapıldığı merkezlerde hem platelet gereksinimi çok olmakta hem de az sayıda elde edilebilen CMV negatif donörlere gereksinim bulunabilmektedir.

c. Platelet transfüzyonunun rastgele donörlerden elde edilen platelet konsantreleri ile sağlanması durumunda alıcı her transfüzyon sırasında 4-8 donör ile karşılaşmaktadır. Bu nedenle hem viral geçiş hem de alloantikör gelişimi açısından plateletferez yoluyla elde edilen ürünlerin kullanılması, alıcının karşılaştığı donör sayısını azaltarak, özellikle sık transfüzyon gerektiren alıcı popülasyonunda bu tür komplikasyonların sayısını azaltabilmektedir (86,87).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA GRUBU

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezi'ne başvuran ve yaşları 26 ile 32 (ortanca 29) arasında değişen 20 erkek gönüllü platelet donörü üzerinde yapıldı. Bütün donörler kan bankalarının kabul edilen standart donör olma özelliklerini taşıyordu. Donörlerin hiçbirinde kanama anamnezi, ailede kanamalı hastalık, splenektomi öyküsü ve son 10 gün içinde Aspirin, non-steroidal anti-inflamatuar ilaç gibi platelet fonksiyonlarını etkileyebilecek ilaç kullanımı öyküsü yoktu.

3.2. PLATELETFEREZ İŞLEMİ

Plateletferez işlemi *Haemonetics V50 Plus Blood Cell Separator* (Haemonetics Corp. Massachusetts, U.S.A.) kullanılarak gerçekleştirildi. Kesikli akım prensibiyle çalışan bu cihazda, firma tarafından aferez cihazı için özel olarak üretilen tümü steril, tek kullanımlık, açık sistem setler kullanıldı. Plateletferez işlemi üretici firma tarafından önerilen şekilde toplam 8 siklus olacak şekilde uygulandı. Plateletferez işlemi sırasında antikoagülan olarak 500 mL ACD (Adenine, citrate, dextrose) solüsyonu kullanıldı.

3.3. KAN ÖRNEKLERİ

Plateletferez öncesi kan örnekleri, işlem başlamadan hemen önce, plateletferez setinin bağlanması için kullanılan geniş çaplı özel iğne ile staz yapmaksızın, ön kol üzerinde uygun çapta bir vene girilerek alındı. İlk 2 mL kan örneği EDTA içeren tüplere alınarak otomatik tam kan sayımı için kullanıldı. Daha sonraki örnekler platelet agregasyon ve aktivasyon çalışmalarında kullanılmak üzere % 3.8 oranında sodyum sitrat içeren (1 mL sitrat + 9 mL kan örneği) tüplere alındı.

Plateletferez işleminin sonunda donör setten ayrıldıktan hemen sonra 21 gauge iğne ile staz yapmaksızın diğer kol üzerindeki uygun bir vene girilerek kan örnekleri yine sırası ile EDTA ve sitrat içeren vakumlu tüplere alındı. Tüm çalışmalar, kan örneklerinin alınmasından sonra en geç 2 saat içerisinde gerçekleştirildi.

3.4. PLATELET SAYIMI

Platelet sayımı Akdeniz Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda bulunan *Coulter STKS* (Coulter Electronics Ltd. Northwell, England) marka otomatik tam kan sayım cihazı kullanılarak çiftli çalışma ilkeleri ile yapıldı.

3.5. AGGREGASYON ÇALIŞMALARI

Plateletlerin agonistlere karşı aggregasyon yanıtlarının değerlendirilmesinde Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Özel Hematoloji Laboratuvarı'nda bulunan tam kan yöntemi ile çalışan impedans aggregometresi (*Chrono-Log Whole Blood Impedance Aggregometer*, model 550, Chrono-Log, Havertown, PA, U.S.A.) kullanıldı.

Plateletlerin agonistlere (*Chrono-Log*, Havertown, PA, U.S.A.) karşı olan aggregasyon yanıtlarının değerlendirilmesi amacı ile ADP 10 $\mu\text{mol/L}$, kollajen 2 $\mu\text{mol/L}$ ve ristosetin 10 $\mu\text{mol/L}$ 'lik final konsantrasyonlarında kullanıldı.

Aggregasyon yanıtları aşağıda belirtilen şekilde değerlendirildi:

- i. Dakikalık maksimum aggregasyon hızı (ohm/dakika)
- ii. Agonistin eklenmesinden sonra 3. ve 6. dakikalardaki maksimum aggregasyon düzeyi (ohm)
- iii. Agonistin eklenmesinden sonra izlenen maksimum aggregasyon düzeyi (ohm)

3.6. MONOKLONAL ANTİKORLAR

Flow sitometre ile yapılan ölçümlerde incelenen partiküllerin platelet olduklarının gösterilmesi amacıyla insan platelet GP-IIIa (CD61) antijenine karşı geliştirilmiş olan FITC ile direkt olarak bağlı mouse monoklonal antikor (anti-CD61-FITC, *Cymbus Bioscience Ltd*, UK) kullanıldı.

Aktive plateletlerin saptanması amacıyla insan platelet CD62 (P-selektin) antijenine karşı geliştirilmiş olan FITC ile direkt olarak bağlı mouse monoklonal antikor (anti-CD62-FITC, *Cymbus Bioscience Ltd*, UK) kullanıldı.

3.7. FLOW SİTOMETRİK ANALİZ

Platelet aktivasyon analizleri Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Özel Hematoloji Laboratuvarı'nda bulunan flow sitometre cihazı (*Epics Profile II*, Coulter Electronics, Inc., FL, U.S.A.) kullanılarak gerçekleştirildi.

Flow sitometre ile yapılacak analizler için tam kan yöntemi kullanıldı. Kan örnekleri, donörlerden alınmasını takiben en geç 10 dakikalık süre içinde laboratuvara ulaştırıldı ve 5 µL kan örneği, 50 µL Heps-buffered saline (HPS)(0.145 mol/L NaCl, 5×10^{-3} mol/L KCl, 1×10^{-3} mol/L MgSO₄, 0.01 mol/L Heps, PH 7.4) ve 5 µL monoklonal antikor (anti-CD61-FITC veya anti-CD62-FITC veya negatif izotipik kontrol) içeren tüplere konuldu. Örneklerin 20 dakika süre ile karanlık bir ortamda ve oda sıcaklığında inkübasyonunu takiben 0.5 mL % 2'lik formyl saline (% 0.9 NaCl içinde % 0.2 formaldehide) konularak plateletler dilüe ve fikse edildi. En geç 2 saat içinde flow sitometre ile ölçümler yapıldı.

Flow sitometre cihazı 15 mikron çapındaki boncuklar (*Immunocheck*, Coulter Electronics, Inc., FL, U.S.A.) ile kalibre edildikten sonra tam kan yöntemi ile hazırlanan örnekler cihaza verildi. Parçalanmış hücre artıkları ve elektronik kirlilik ön saçınım (forward scatter) üzerinde ayarlama yapılarak uzaklaştırıldı. Öncelikle plateletler, büyüklük ve granüleritelerine göre hücrelerin dağılımlarını gösteren ön (forward) ve 90°'lik yan saçınım (right-angle light scatter) histogramı kullanılarak, eritrosit ve lökositlerden ayrıldı ve plateletler ile ilgili analizler belirlenen bu bölge üzerinde gerçekleştirildi. Analiz bölgesindeki partiküllerin en az % 98'inin CD61 taşıdığı gösterildi (CD61 pozitif partikül yüzdesi). Aktive platelet oranının saptanması için analiz bölgesindeki partiküllerden negatif izotipik kontrolün floresansından daha yoğun anti-CD62-FITC floresans gösterenlerin total partikül içerisindeki yüzdesi (CD62 pozitif platelet yüzdesi) saptandı.

CD62 pozitif plateletlerin yüzdesinin plateletferez işlemi sonucunda beklenen platelet sayısındaki düşmeden etkilenebileceği düşüncesiyle, bunu ortadan kaldırabilmek amacıyla kan örneklerindeki platelet sayıları CD62 pozitif platelet yüzdesi ile çarpılarak "dolaşan aktive

platelet (DAP)" sayısı hesaplandı. (DAP = CD62 pozitif platelet yüzdesi X örnekteki platelet sayısı)

CD62 floresans yoğunluğu, yani platelet başına düşen ortalama CD62 molekül miktarının göstergesi olarak ortalama kanal numarası (mean channel number) kullanıldı

3.8. İSTATİSTİK

İstatistik analizler SPSS hazır istatistik paket programı (SPSS for Windows, Version 5.0.1, SPSS Inc., IL, U.S.A.) kullanılarak gerçekleştirildi. Donörlerde plateletferez işlemi sonucunda gözlenen değişikliklerin değerlendirilmesinde non-parametrik "*Wilcoxon's signed-rank test*" kullanıldı. Yapılan "*Shapiro-Wilks*" testi ile normal dağılım özellikleri gösterdiği için ortalama kanal numarasında gözlenen değişikliklerin değerlendirilmesinde "*paired t-test*" kullanıldı. 0.05 den küçük " *p* " değerleri anlamlı olarak kabul edildi. Metin içerisinde, tablo ve şekillerdeki değerler *ortalama (SD)* ve *ortanca (min-max)* (minimum-maximum) olarak verildi.

4. SONUÇLAR

1. Plateletferez işlemi sonrasında donörlerin **hemoglobin, hematokrit ve beyaz küre** sayılarında işlem öncesine göre anlamlı bir değişiklik saptanmadı (Tablo 2).

Tablo 2. Plateletferez uygulanan donörlerde işlem öncesi ve sonrası **hemoglobin, hematokrit ve beyaz küre sayılarında** gözlenen değişiklikler.

	Plateletferez öncesi	Plateletferez sonrası	p
	ortalama (SD) ortanca (min-max)	ortalama (SD) ortanca (min-max)	
Hemoglobin (g/dL)	15.0 (1.4) 15.3 (10.8-16.7)	14.3 (1.4) 14.8 (11.0-16.3)	>0.05
Hematokrit	0.46 (0.04) 0.46 (0.34-0.54)	0.43 (0.04) 0.43 (0.33-0.51)	>0.05
Beyaz küre (10⁹/L)	7.9 (1.5) 7.9 (5.7-11.8)	7.6 (1.5) 7.4 (5.6-11.0)	>0.05

2. Yapılan plateletferez işleminin etkinliğinin bir göstergesi olarak **platelet** sayılarında işlem öncesine göre ortalama % 28.0 (± 1.7) oranında anlamlı azalma saptandı (p=0.0001) (Tablo 3).

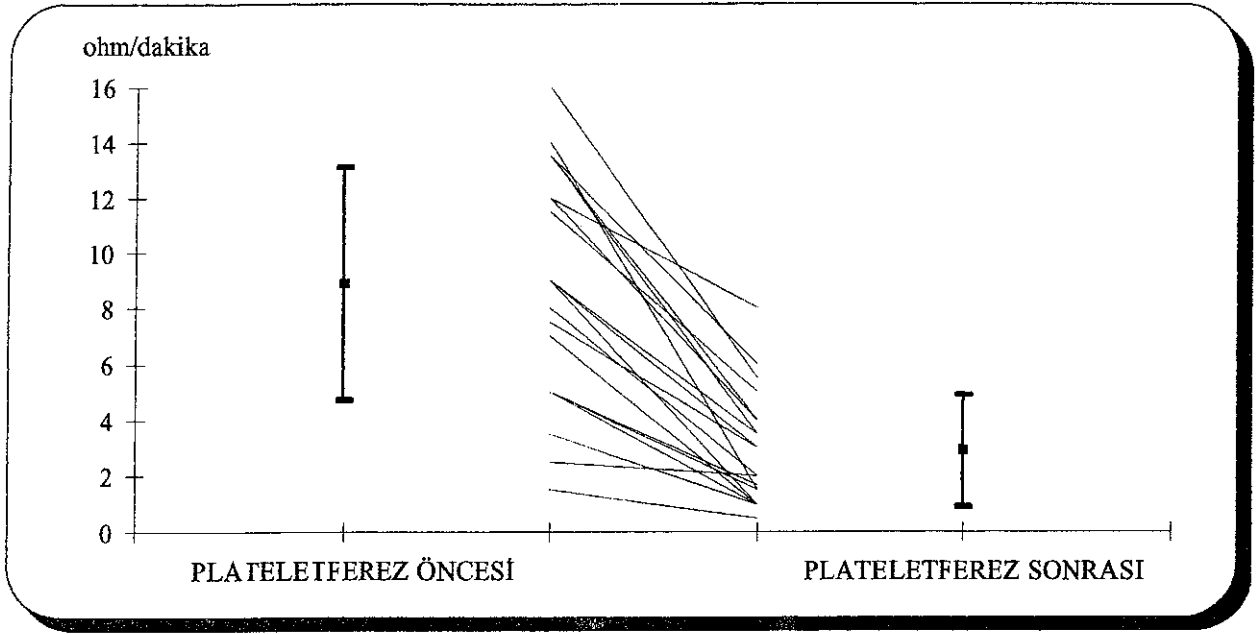
Tablo 3. Plateletferez uygulanan donörlerde işlem öncesi ve sonrası **platelet sayılarında** gözlenen değişiklikler

	Plateletferez öncesi	Plateletferez sonrası	p
	ortalama (SD) ortanca (min-max)	ortalama (SD) ortanca (min-max)	
Platelet sayısı (10⁹/L)	237.1 (47.9) 235 (123-353)	171.5 (35.7) 169 (11-274)	0.0001

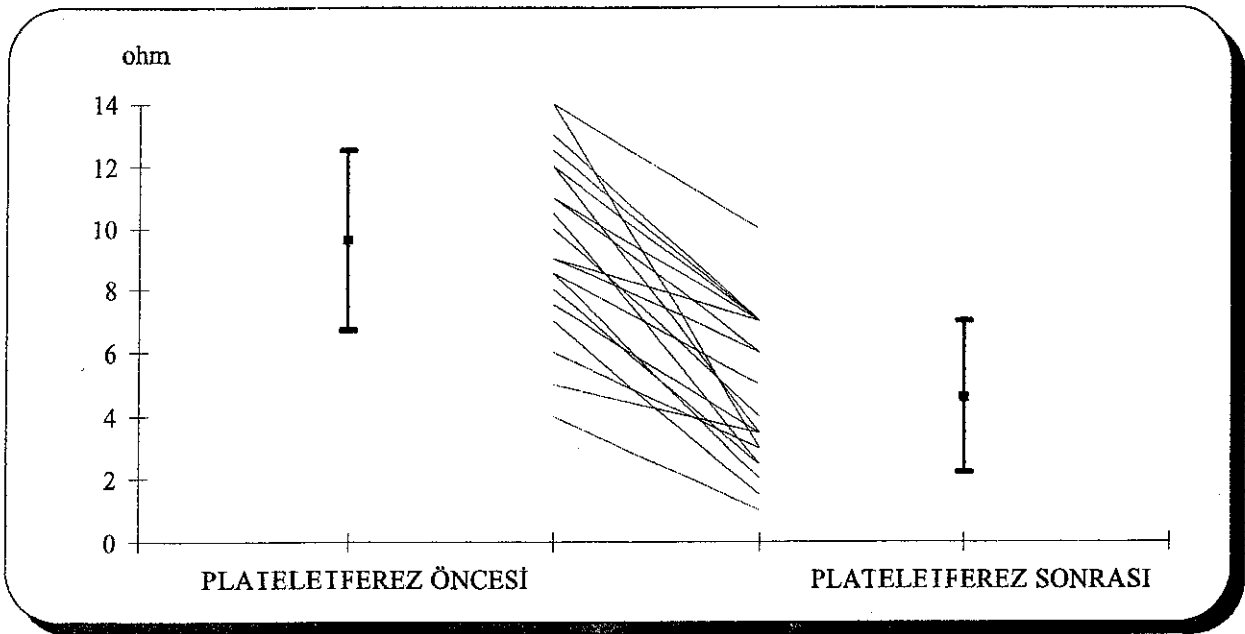
3. Plateletferez işlemi ile plateletlerin 10 $\mu\text{mol/L}$ 'lik final konsantrasyonundaki ADP'ye karşı gösterdikleri aggregasyon yanıtı anlamlı olarak azaldı (Tablo 4, Şekil 1-4)

Tablo 4. Plateletferez işlemi öncesi ve sonrasında plateletlerin ADP'ye karşı gösterdikleri aggregasyon yanıtında gözlenen değişiklikler.

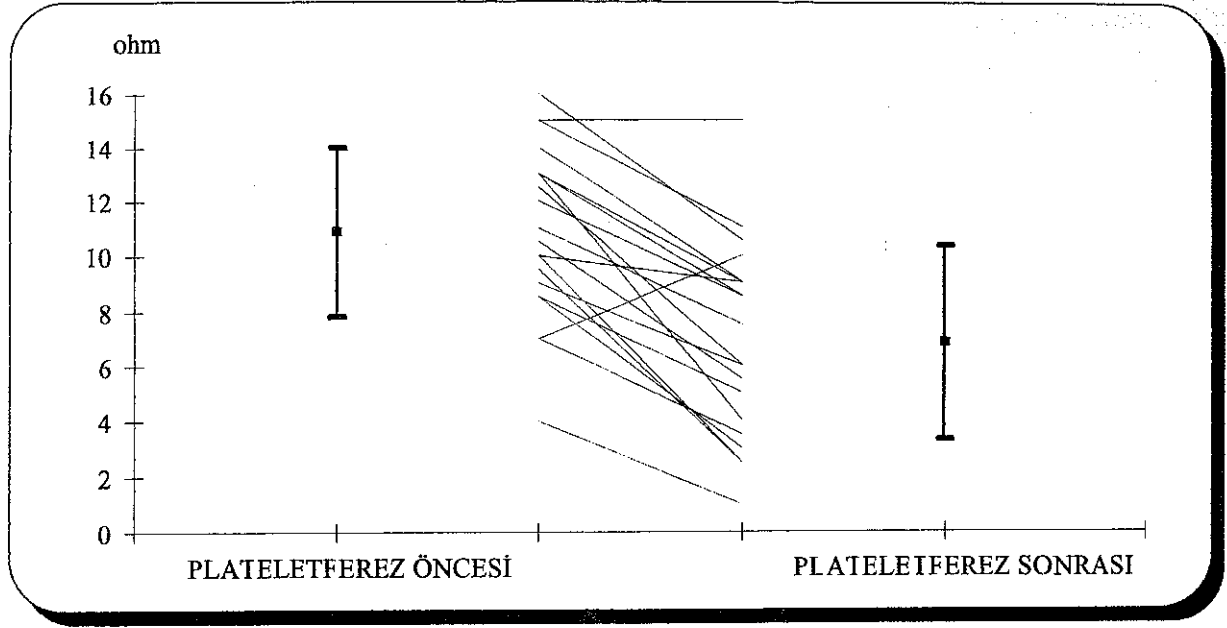
	Plateletferez öncesi	Plateletferez sonrası	P
	ortalama (SD) ortanca (min-max)	ortalama (SD) ortanca (min-max)	
Dakikadaki maksimum aggregasyon hızı (ohm/dakika)	8.9 (4.2) 9.0 (1.5-16.0)	2.9 (2.0) 2.5 (0.5-8.0)	0.0001
3. dakika sonundaki aggregasyon düzeyi (ohm)	9.6 (2.9) 9.5 (4.0-14.0)	4.6 (2.4) 3.7 (1.0-10.0)	0.0001
6. dakika sonundaki aggregasyon düzeyi (ohm)	10.9 (3.1) 10.7 (4.0-16.0)	6.8 (3.6) 6.7 (1.0-15.0)	0.0002
İzlenen maksimum aggregasyon düzeyi (ohm)	11.3 (3.3) 11.2 (4.0-16.5)	6.7 (3.4) 6.0 (1.0-15.0)	0.0001



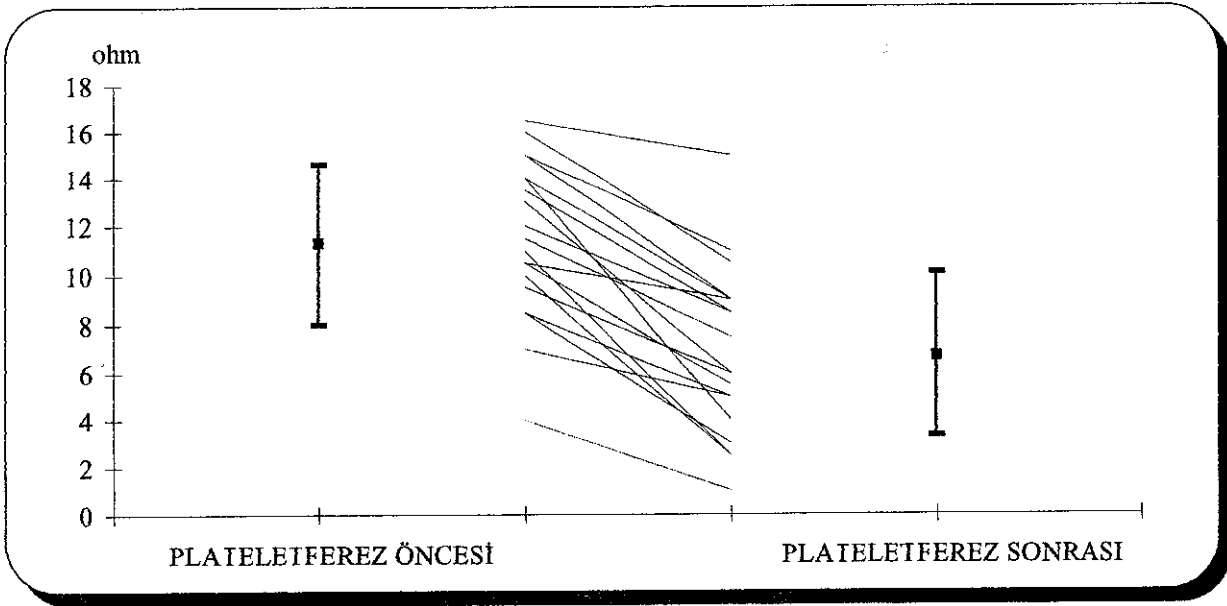
Şekil 1. Plateletferez uygulanan her bir donörde, işlem öncesi ve sonrası, plateletlerin $10 \mu\text{mol/L}$ final konsantrasyonundaki ADP'ye karşı gösterdikleri *dakikadaki maksimum agregasyon hızında* (ohm/dakika) gözlenen değişiklikler. Siyah nokta ortalama, dikine çizgiler SD değerlerini göstermektedir.



Şekil 2. Plateletferez uygulanan her bir donörde, işlem öncesi ve sonrası, plateletlerin $10 \mu\text{mol/L}$ final konsantrasyonundaki ADP'ye karşı gösterdikleri *3. dakika sonundaki agregasyon düzeylerinde* (ohm) gözlenen değişiklikler. Siyah nokta ortalama, dikine çizgiler SD değerlerini göstermektedir.



Şekil 3. Plateletferez uygulanan her bir donörde, işlem öncesi ve sonrası, plateletlerin 10 $\mu\text{mol/L}$ final konsantrasyonundaki ADP'ye karşı gösterdikleri 6. dakika sonundaki aggregasyon düzeylerinde (ohm) gözlenen değişiklikler. Siyah nokta ortalama, dikine çizgiler SD değerlerini göstermektedir.

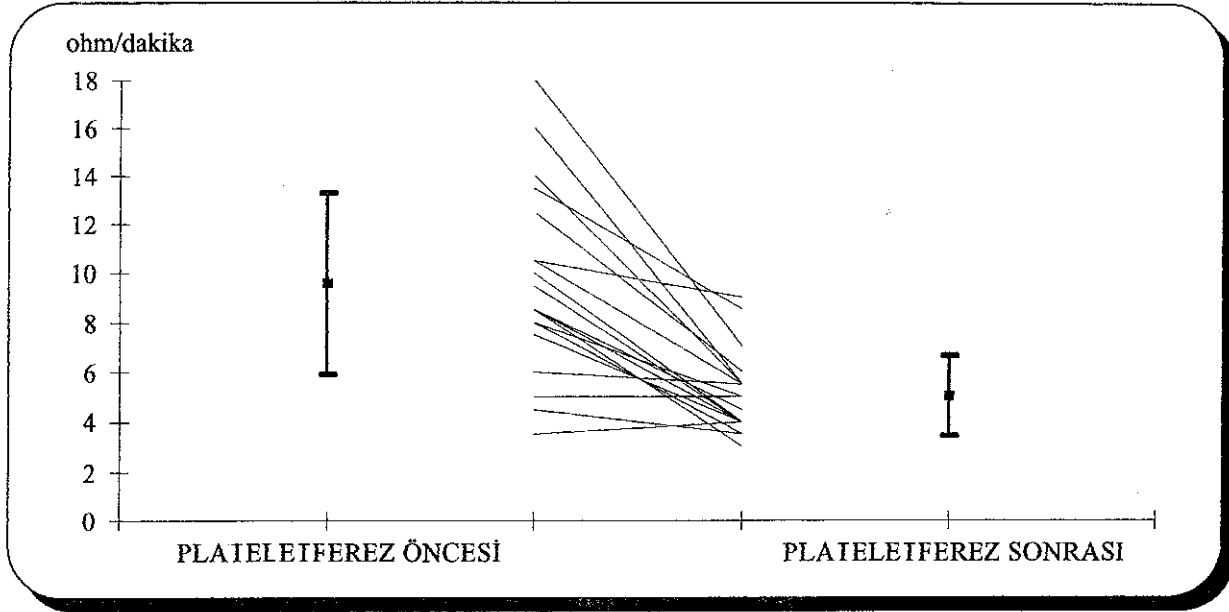


Şekil 4. Plateletferez uygulanan her bir donörde, işlem öncesi ve sonrası, plateletlerin 10 $\mu\text{mol/L}$ final konsantrasyonundaki ADP'ye karşı gösterdikleri maksimum aggregasyon düzeylerinde (ohm) gözlenen değişiklikler. Siyah nokta ortalama, dikine çizgiler SD değerlerini göstermektedir.

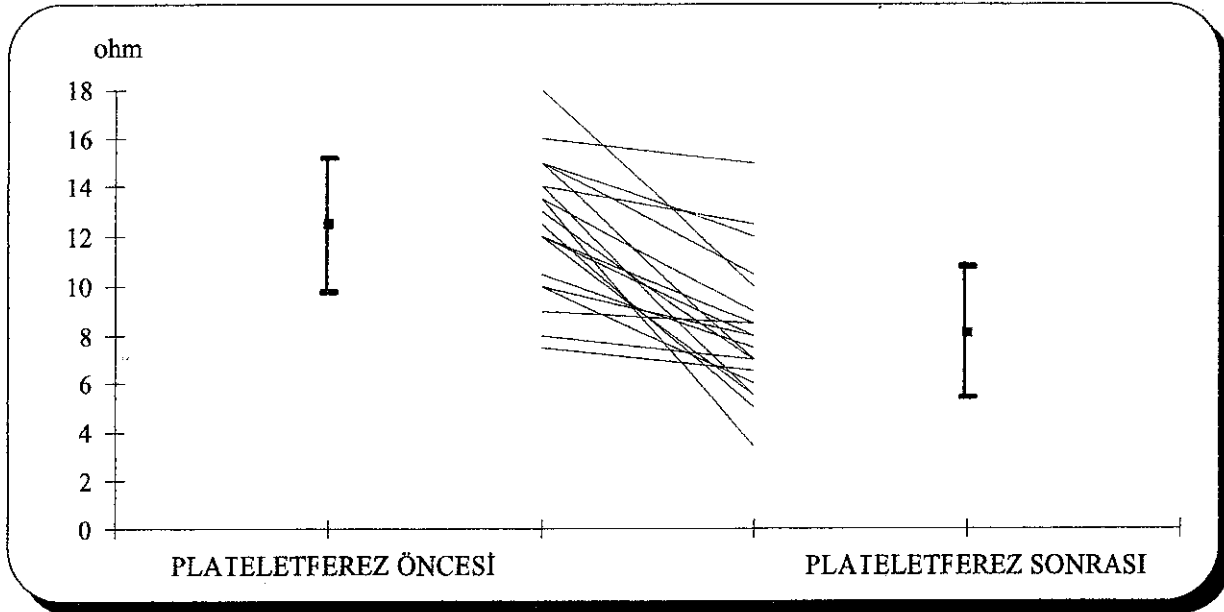
4. Plateletferez işlemi ile plateletlerin 2 $\mu\text{mol/L}$ 'lik final konsantrasyonundaki **kollajene** karşı gösterdikleri aggregasyon yanıtı anlamlı olarak azaldı (Tablo 5, Şekil 5-8).

Tablo 5. Plateletferez işlemi öncesi ve sonrasında plateletlerin **kollajene** karşı gösterdikleri **aggregasyon yanıtında** gözlenen **değişiklikler**.

	Plateletferez öncesi	Plateletferez sonrası	p
	ortalama (SD) ortanca (min-max)	ortalama (SD) ortanca (min-max)	
Dakikadaki maksimum aggregasyon hızı (ohm/dakika)	9.6 (3.7) 9.0 (3.5-18.0)	5.0 (1.6) 4.7 (3.0-9.0)	0.0002
3. dakika sonundaki aggregasyon düzeyi (ohm)	12.5 (2.7) 12.7 (7.5-18.0)	8.1 (2.7) 7.7 (3.4-15.0)	0.0001
6. dakika sonundaki aggregasyon düzeyi (ohm)	15.5 (2.8) 15 (10.0-21.0)	11.7 (2.9) 12 (6.5-18.5)	0.0003
İzlenen maksimum aggregasyon düzeyi (ohm)	16.1 (2.7) 15.5 (10.0-21.0)	12.1 (2.6) 12 (7.5-18.0)	0.0002



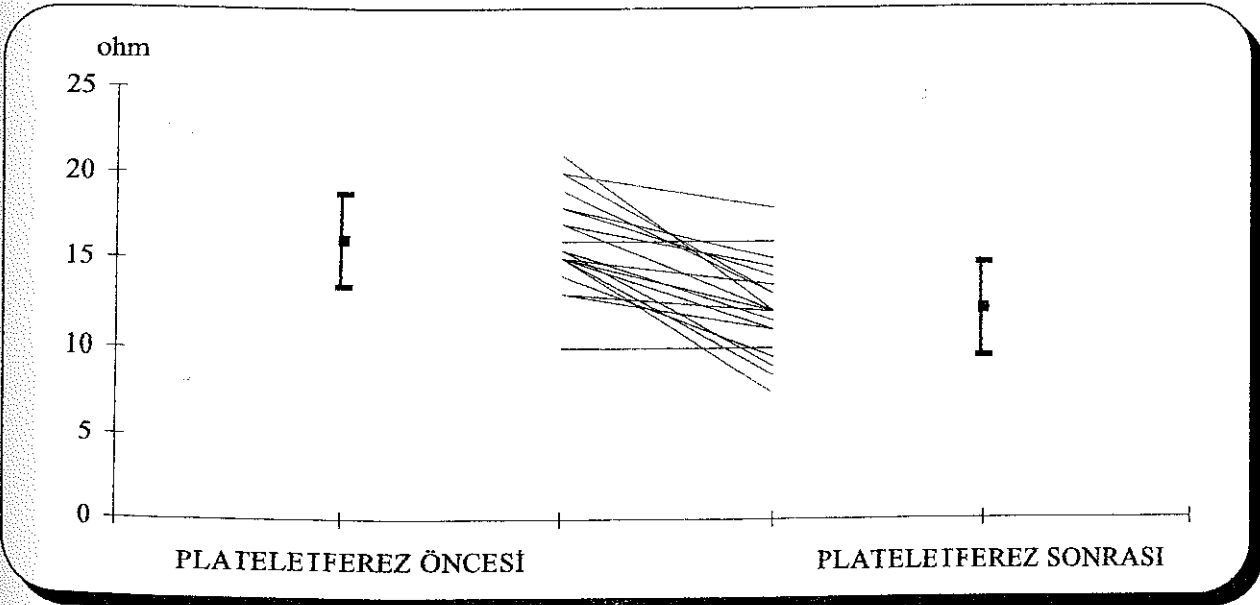
Şekil 5. Plateletferez uygulanan her bir donörde, işlem öncesi ve sonrası, plateletlerin 2 $\mu\text{mol/L}$ final konsantrasyonundaki kollajene karşı gösterdikleri dakikadaki maksimum aggregasyon hızında (ohm/dakika) gözlenen değişiklikler. Siyah nokta ortalama, dikine çizgileri SD değerlerini göstermektedir.



Şekil 6. Plateletferez uygulanan her bir donörde işlem öncesi ve sonrası, plateletlerin 2 $\mu\text{mol/L}$ final konsantrasyonundaki kollajene karşı gösterdikleri 3. dakika sonundaki aggregasyon düzeylerinde (ohm) gözlenen değişiklikler. Siyah nokta ortalama, dikine çizgileri SD değerlerini göstermektedir.



Şekil 7. Plateletferez uygulanan herbir donörde, işlem öncesi ve sonrası, plateletlerin 2 $\mu\text{mol/L}$ final konsantrasyonundaki kollajene karşı gösterdikleri 6. dakika sonundaki aggregasyon düzeylerinde (ohm) gözlenen değişiklikler. Siyah nokta ortalama, dikine çizgiler SD değerlerini göstermektedir.

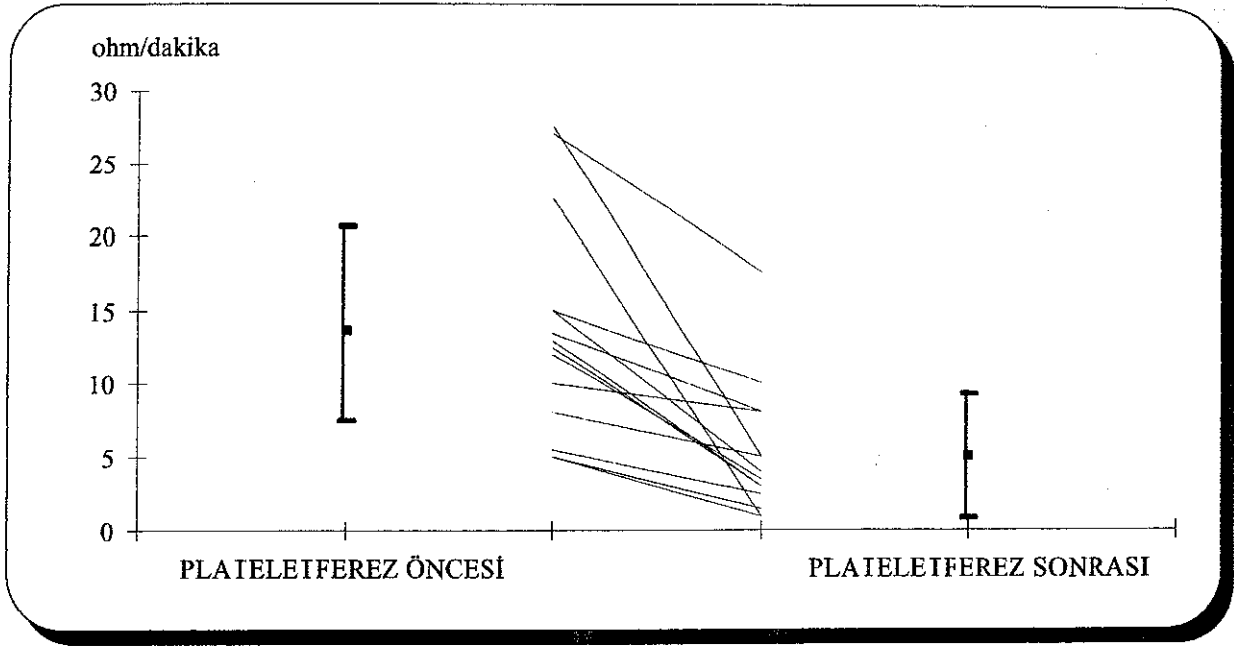


Şekil 8. Plateletferez uygulanan herbir donörde, işlem öncesi ve sonrası, plateletlerin 2 $\mu\text{mol/L}$ final konsantrasyonundaki kollajene karşı gösterdikleri maksimum aggregasyon düzeylerinde (ohm) gözlenen değişiklikler. Siyah nokta ortalama, dikine çizgiler SD değerlerini göstermektedir.

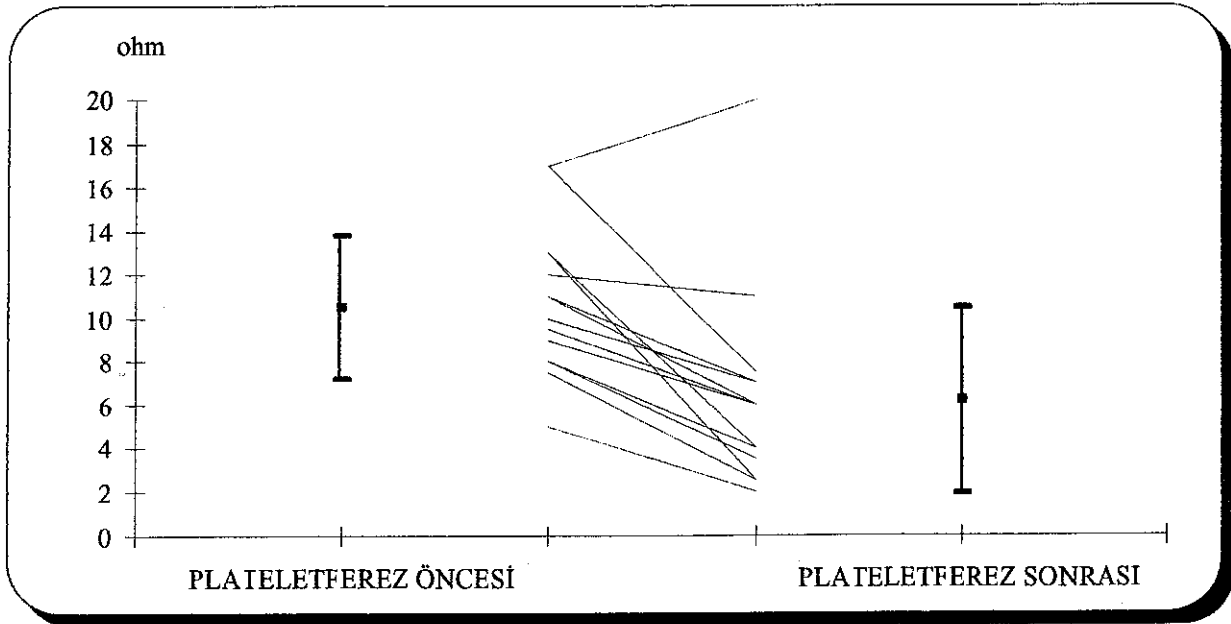
5. Plateletferez işlemi ile plateletlerin 10 $\mu\text{mol/L}$ 'lik final konsantrasyonundaki **ristosetine** karşı gösterdikleri aggregasyon yanıtı anlamlı olarak azaldı (Tablo 6, Şekil 9-12).

Tablo 6. Plateletferez işlemi öncesi ve sonrasında plateletlerin *ristosetine* karşı gösterdikleri *aggregasyon yanıtında* gözlenen değişiklikler.

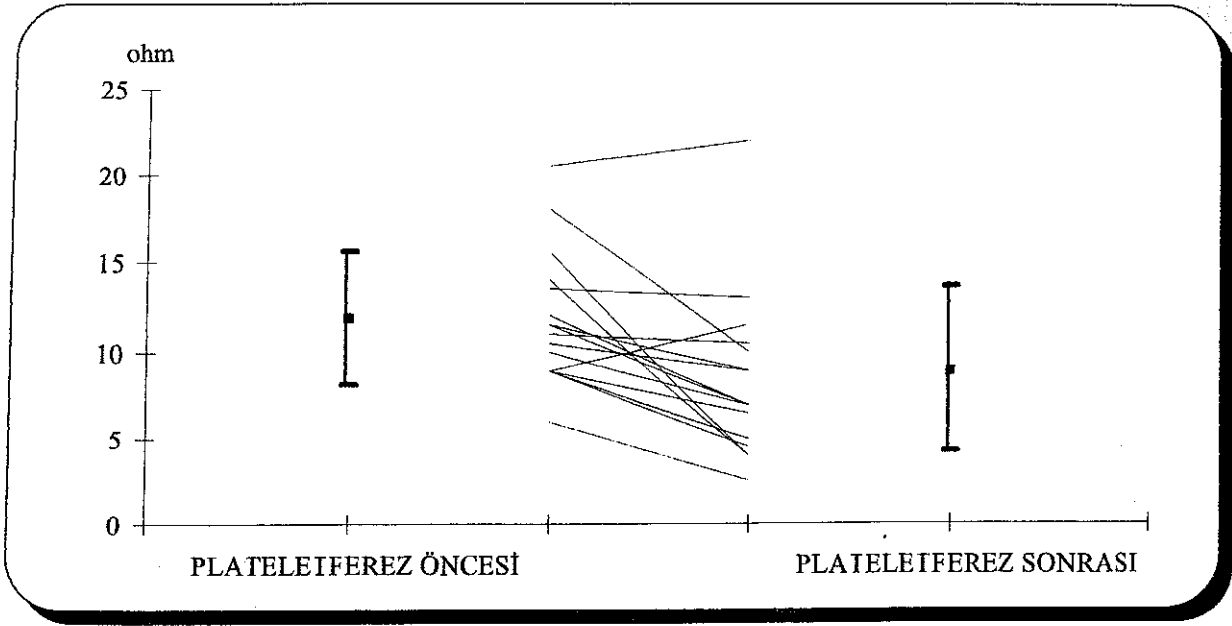
	Plateletferez öncesi	Plateletferez sonrası	p
	ortalama (SD) ortanca (min-max)	ortalama (SD) ortanca (min-max)	
Dakikadaki maksimum aggregasyon hızı (ohm/dakika)	13.7 (6.9) 12.7 (5.0-27.5)	5.0 (4.2) 3.7 (1.0-17.5)	0.0004
3. dakika sonundaki aggregasyon düzeyi (ohm)	10.5 (3.3) 9.7 (5.0-17.0)	6.2 (4.3) 6.0 (2.0-20.0)	0.0009
6. dakika sonundaki aggregasyon düzeyi (ohm)	11.9 (3.7) 11.2 (6.0-20.5)	8.3 (4.7) 7.0 (2.5-22.0)	0.0025
İzlenen maksimum aggregasyon düzeyi (ohm)	12.2 (3.8) 11.5 (6.0-20.5)	7.7 (4.7) 7.0 (2.5-22.0)	0.0006



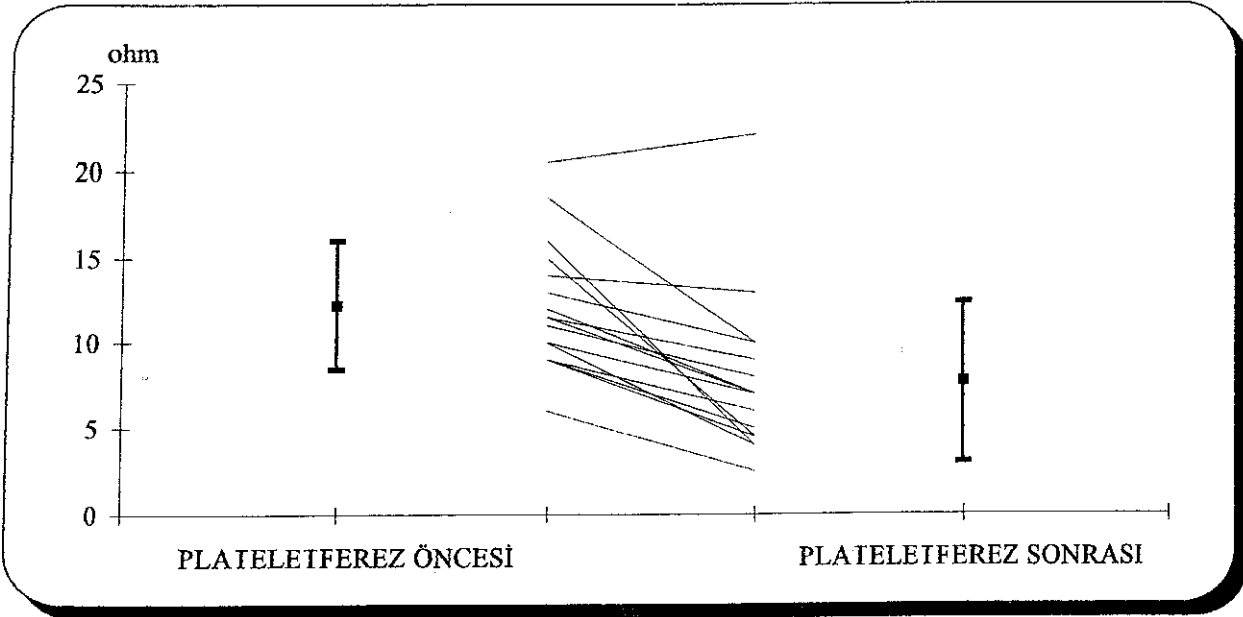
Şekil 9. Plateletferez uygulanan herbir donörde, işlem öncesi ve sonrası, plateletlerin 10 $\mu\text{mol/L}$ final konsantrasyonundaki ristosetine karşı gösterdikleri dakikadaki maksimum aggregasyon hızında (ohm/dakika) gözlenen değişiklikler. Siyah nokta ortalama, dikine çizgiler SD değerlerini göstermektedir



Şekil 10. Plateletferez uygulanan herbir donörde, işlem öncesi ve sonrası, plateletlerin 10 $\mu\text{mol/L}$ final konsantrasyonundaki ristosetine karşı gösterdikleri 3. dakika sonundaki aggregasyon düzeylerinde (ohm) gözlenen değişiklikler. Siyah nokta ortalama, dikine çizgiler SD değerlerini göstermektedir.



Şekil 11. Plateletferez uygulanan her bir donörde, işlem öncesi ve sonrası, plateletlerin $10 \mu\text{mol/L}$ final konsantrasyonundaki ristosetine karşı gösterdikleri 6. dakika sonundaki aggregasyon düzeylerinde (ohm) gözlenen değişiklikler. Siyah nokta ortalama, dikine çizgiler SD değerlerini göstermektedir.

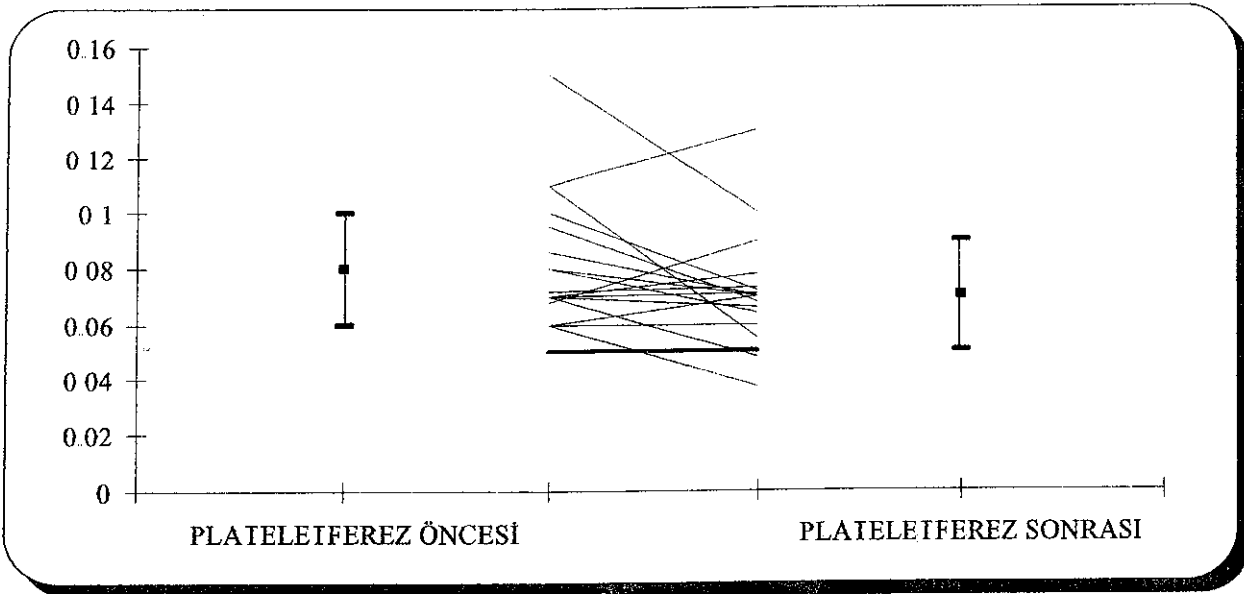


Şekil 12. Plateletferez uygulanan her bir donörde işlem öncesi ve sonrası, plateletlerin $10 \mu\text{mol/L}$ final konsantrasyonundaki ristosetine karşı gösterdikleri maksimum aggregasyon düzeylerinde (ohm) gözlenen değişiklikler. Siyah nokta ortalama, dikine çizgiler SD değerlerini göstermektedir.

6. Plateletferez işlemi sonrasında ortalama CD62 (P-selektin) pozitif platelet yüzdesi anlamlı olarak azaldı ($p=0.04$) (Tablo 7 , Şekil 13).

Tablo 7. Plateletferez işlemi öncesi ve sonrasında CD62 pozitif platelet yüzdelerinde gözlenen değişiklikler.

	Plateletferez öncesi	Plateletferez sonrası	p
	ortalama (SD) ortanca (min-max)	ortalama (SD) ortanca (min-max)	
CD62 pozitif platelet yüzdesi	0.08 (0.02) 0.07 (0.05-0.15)	0.07 (0.02) 0.07 (0.00-0.13)	0.04

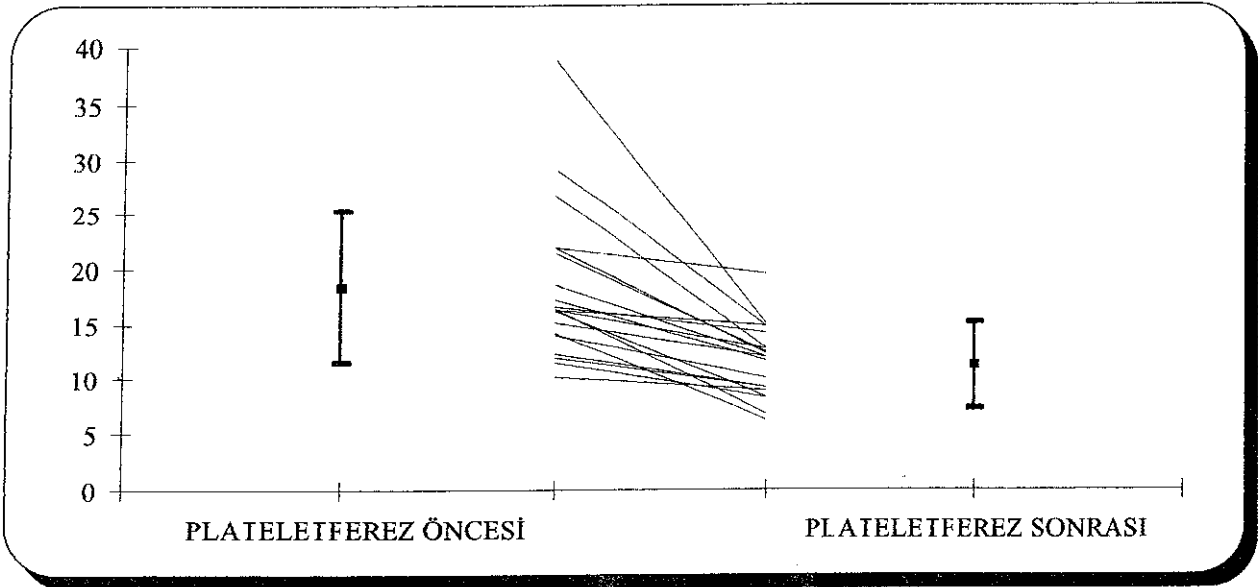


Şekil 13. Plateletferez uygulanan her bir donörde, işlem öncesi ve sonrası, CD62 pozitif platelet yüzdelerinde gözlenen değişiklikler. Siyah nokta ortalama, dikine çizgiler SD değerlerini göstermektedir.

7. **Dolaşan aktive patelet** sayılarında işlem sonrası işlem öncesine göre belirgin azalma saptandı ($p < 0.0001$) (Tablo 8, Şekil 14).

Tablo 8. *Plateletferez işlemi öncesi ve sonrasında dolaşan aktive platelet sayılarında gözlenen değişiklikler.*

	Plateletferez öncesi	Plateletferez sonrası	p
	ortalama (SD) ortanca (min-max)	ortalama (SD) ortanca (min-max)	
Dolaşan aktive platelet sayısı ($10^9/L$)	18.4 (6.9) 16.4 (10.1-38.8)	11.2 (4.0) 12.0 (8.2-19.6)	0.0001

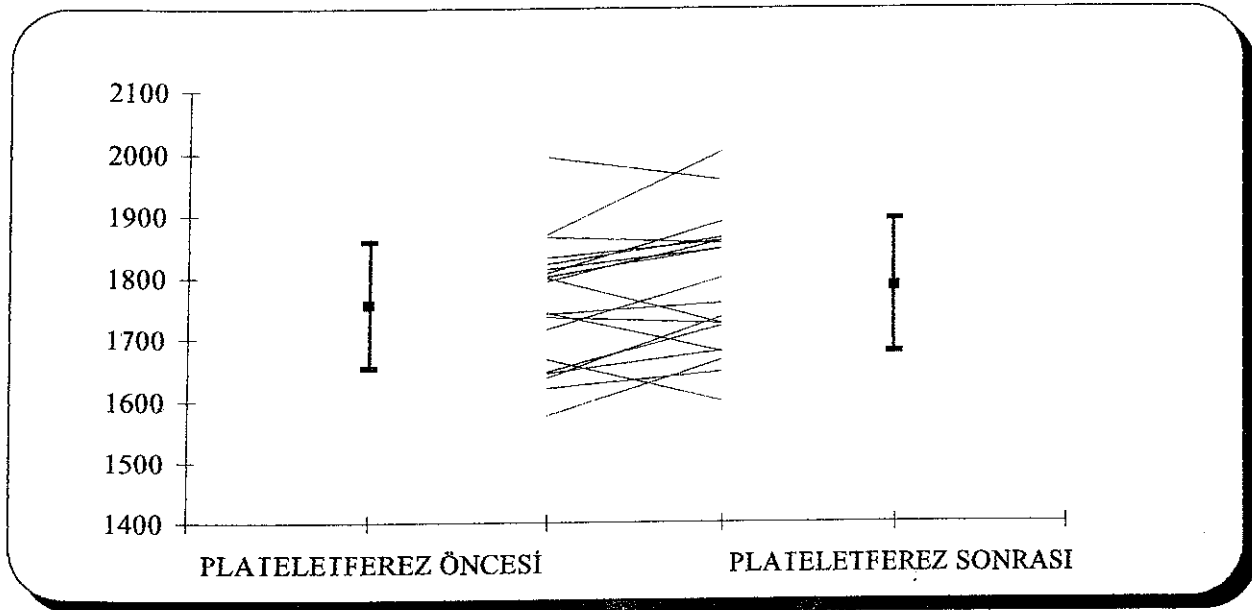


Şekil 14. *Plateletferez uygulanan her bir donörde işlem öncesi ve sonrası, dolaşan aktive platelet sayılarında gözlenen değişiklikler. Siyah nokta ortalama, dikine çizgiler SD değerlerini göstermektedir.*

8. Plateletferez işlemi sonrasında **ortalama kanal numarası** ile gösterilen plateletler üzerindeki ortalama CD62 yoğunluğu anlamlı olarak azaldı ($p=0.036$) (Tablo 9, Şekil 15).

Tablo 9. Plateletferez işlemi öncesi ve sonrasında ortalama kanal numaralarında (CD62 yoğunluğu) gözlenen değişiklikler.

	Plateletferez öncesi	Plateletferez sonrası	p
	ortalama (SD) ortanca (min-max)	ortalama (SD) ortanca (min-max)	
Ortalama kanal numarası (ortalama CD62 yoğunluğu)	1576 (103) 1769 (1577-1994)	1786 (108) 1779 (1600-2003)	0.036



Şekil 15. Plateletferez uygulanan her bir donörde işlem öncesi ve sonrası, ortalama kanal numaralarında gözlenen değişiklikler. Siyah nokta ortalama, dikine çizgiler SD değerlerini göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Hemodiyaliz cihazları ve hemoperfüzyon cihazları gibi vücut dışı dolaşımın kullanıldığı durumlarda koagülasyon, fibrinolizis ve platelet fonksiyonları gibi hemostatik parametrelerin önemli ölçülerde etkilendiği bilinmektedir. Hemodiyaliz işlemi sırasında kanın yabancı membranlar ile karşılaşması sonucu koagülasyon sistemi aktive olmaktadır. Diyalizer membranında thrombomodülin, heparan sülfat gibi endojen endotelial modülatörlerin yokluğu nedeni ile koagülasyonun defektif bir şekilde regülasyonunun yapılabildiği, fibrinolitik, antifibrinolitik sistem ve doğal antikoagülan proteinlerde hem antijenik hem de fonksiyonel çeşitli değişikliklerin izlendiği ve plateletlerin aktive oldukları bir çok çalışmada gösterilmiştir (88-90). Bu değişikliklerin hemodiyaliz uygulanan hastalarda, eş zamanlı olarak izlenebilen hem kanama hem de tromboembolik fenomenlerden sorumlu olabilecekleri düşünülmektedir. Plateletlerin yabancı yüzeyle karşılaştığı bir diğer durum olan açık kalp operasyonlarından sonra da hemostatik sistemde benzer değişiklikler izlenmekte olup plateletlerin aktive olduklarını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (10,11).

Aferez işlemi sırasında da donörden alınan kan, trombojenik özellikler taşıyabilecek damar dışı bir sisteme taşınmakta ve santrifügasyon gibi plateletlerin aktivasyonuna yol açabilecek dış kuvvetler uygulanmaktadır. Bu nedenle aferez işleminin de hemostatik sistemde önemli değişikliklere yol açması mümkündür. Nitekim Wan ve arkadaşları (12) tarafından yapılan bir çalışmada otomatik plazmaferez işleminin plateletleri aktive ettiği gösterilmiştir. Plateletferez işleminin de gönüllü donörlerde tromboza yatkın bir durum yarattığı, protrombin fragment 1+2, trombin-antitrombin kompleks, fibrinopeptid-A, protein C, protein S, antitrombin-III, C4b-bağlayıcı protein, plazminojen, α -2-antiplazmin ve koagülasyon faktörleri gibi oldukça duyarlı parametrelerin kullanıldığı detaylı bir çalışmada gösterilmiştir (13). Tüm bu bulguların ışığında plateletferez işleminin de donörlerde platelet aktivasyonuna yol açması beklenebilir.

Bizim çalışmamızda ise plateletferez işlemi sonrası donörlerde CD62 pozitif platelet yüzdesi ve DAP sayıları anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Wan ve arkadaşlarının (12), otomatik plazmaferez işleminin donörlerde platelet aktivasyonuna yol açtığını gösterdikleri çalışmada da flow sitometrik yöntemle CD62 ekspresyonuna bakılmıştır. Bu iki çalışma arasındaki farklılık

bir kaç şekilde açıklanabilir. (i) Plateletferez işlemi sonrasında donör platelet sayısında ortalama % 30'lara kadar varabilen azalma izlenmektedir. Plazmaferez işleminde ise toplanan ürün plazma olduğundan işlem sonu platelet sayısında azalma olmamaktadır. Plateletferez işlemi sırasında da aynen plazmaferez işleminde olduğu gibi platelet aktivasyonu oluyorsa bile, aktive plateletlerin ürün olarak hazırlanmakta olan platelet torbası içinde toplanmaları ve/veya platelet sayısındaki azalmaya yanıt olarak kemik iliğinde yeni üretilen veya dalak havuzundan dolaşıma verilen istirahat halindeki plateletlerin dolaşıma katılmaları sonucu DAP sayıları azalmış olarak saptanabilir. Her bir platelet başına düşen CD62 yoğunluğunun bir göstergesi olan ortalama kanal numaralarında anlamlı artış olmasına rağmen CD62 pozitif hücre yüzdesinin azalmış olması bu olasılığı desteklemektedir. (ii) Wan ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada kullanılan Autopheresis-C Plasma Collection System (Baxter-Fenwal, Deerfield, IL) setlerinin aksine bizim plateletferez işlemi için kullandığımız setler platelet aktivasyonuna yol açacak kadar trombojenik olmayabilir. (iii) Diğer bir olasılık ise selektin ailesinin bir üyesi ve adezyon molekülü olan CD62, aktive plateletlerin nötrofil ve monositlere adezyonuna yol açarak, flow sitometrik analiz sırasında aktive plateletlerin platelet analiz bölgesi dışında yer almalarına ve bu nedenle CD62 oranının olduğundan daha düşük olarak saptanmasına yol açmış olabilir.

Bu olasılıkların test edilmesi amacıyla; (i) toplanan ürün içindeki aktive platelet oranlarının ve sayılarının gösterilmesi, (ii) değişik sistem ve setlerle çalışan makinalar ile aynı dizayndaki karşılaştırmalı çalışmaların planlanması, (iii) flow sitometrik analiz sırasında iki ayrı renk floresans taşıyan antikolar kullanılarak, platelet markerı taşıyan tüm partiküllerin yani nötrofil ve monosit üzerine yapışmış olan plateletlerin de incelendiği çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Bilindiği gibi özellikle intensif kemoterapi uygulanan ileri derecede trombositopenik hastalara platelet konsantrelerinin verilmeleri çok önemli bir destek tedavisi olanağı sağlamaktadır. Yapılan platelet transfüzyonlarının etkinliği, transfüzyon sonrası platelet sayılarındaki artış ve klinik olarak kanamaya olan yatkınlığın azalması ile değerlendirilmektedir. Platelet transfüzyonlarından beklenen yanıtın alınabilmesi için konsantre halde 5 güne kadar saklanabilen plateletlerin transfüzyon sonrası normal fonksiyonlarını devam ettirebilmeleri

gerekmektedir. İkinci kuşak torbalarda bile plateletlerin 5 gün saklanmaları sonucunda önemli morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel değişikliklerin olduğu gösterilmiştir (91-95). Bu süre içerisinde plateletlerin disk yapısının küresel yapıya döndüğü ve hipotonik şok yanıtının azaldığı (96,97), plazma kalsiyum, LDH, laktat ve β -TG düzeylerinin arttığı, glukoz, pCO₂ ve hücre içi ATP düzeylerinin azaldığı (98-100), hücrelerin aggregasyon yanıtının ve serotonin verilisinin azaldığı (101), platelet yüzey glikoproteinlerinin ekspresyonlarında plateletlerin aktive olduklarını gösteren değişikliklerin olduğu bildirilmiştir (102-107). Daha önce yapılan bazı çalışmalarda plateletlerin saklanmaları sırasında artan süre ile birlikte platelet aktivasyon markerlarında da artış olduğu ve bu plateletlerin transfüzyon sonrasında etkinliklerinin azaldığı rapor edilmiştir (102,108). Bununla birlikte bu değişikliklerin plateletlerin alıcının dolaşımındaki sayısını ve yaşam sürelerini etkilemediğini bildiren *in vivo* çalışmalar da bulunmaktadır (91,109-111).

Yaptığımız bu çalışma sırasında plateletferez işleminin donörlerde platelet aktivasyonuna yol açmadığını, aksine DAP sayısında azalma olduğunu saptadık. Eğer bu azalma aktive plateletlerin selektif olarak platelet torbalarında birikimini sonucu izleniyor ise, yüksek oranda aktive platelet içeren bu ürünlerin ^{herkese} donörlere verilmesi, platelet transfüzyonlarının etkinliğini azaltabilir. Ancak çalışmamızda torbalar içindeki aktive platelet oran ve sayıları saptanmadığı için bu hipotezin doğruluğu test edilememiştir.

Yaptığımız çalışmada, plateletferez işlemi sonrası plateletlerin agonistlere karşı gösterdikleri aggregasyon yanıtlarında anlamlı azalmaların olduğunu gözledik. Bu durum vücut dışı dolaşım sırasında "hiperaktif" duruma geçtikten sonra dolaşıma katılan "yorgun" (exhausted) plateletlerin varlığına bağlı olabilir (40). Plateletlerin vücut dışı dolaşım sırasında oluşan trombin ve yabancı yüzeyler ile temasları onları aktive etmiş olabilir. Bu aktivasyon sonucu "yorgun" duruma gelen plateletler agonistlere karşı azalmış yanıt vermiş olabilirler.

Sonuç olarak; aferez işleminin uygulandığı donörlerde izlenen hemostatik anormalliklerin klinik anlamları tam olarak açıklanabilmiş değildir. Bu değişiklikler donörlerde tromboembolik olaylar ve/veya kanamaya yatkınlık yönünden bir risk oluşturabilecekleri gibi, özellikle plateletferez işleminin plateletler üzerinde yapmış olduğu değişikliklerin ürün olarak hazırlanan

plateletlerin kalitelerini etkilemeleri de olasıdır. Haemonetics V50 Plus Blood Cell Separator cihazı ile yapılan plateletferez işlemi donörlerde platelet yönünden trombofilik bir yatkınlık ortaya çıkarmamaktadır. Plateletferez işleminin platelet aktivasyonu için yeterince kuvvetli trombojenik bir prosedür olup olmadığı ve/veya aktive oluyorlar ise bu plateletlerin selektif olarak ürün torbasında toplanıp toplanmadıkları ve/veya aktive plateletlerin dolaşımdan RES hücreleri tarafından uzaklaştırılıp yerlerini kemik iliğinde yeni üretilen veya dalaktan dolaşıma salınan plateletlerin alıp almadığı hala tam olarak bilinmemektedir. Bu konuların aydınlatılması için yeni çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

6. ÖZET

Aferez cihazları ile tek bir donörden alınan platelet konsantrasyonlarının transfüzyon desteği amacıyla trombositopenik hastalarda kullanımı, günümüz kan bankacılığında rutin uygulanan bir işlem şekline gelmiştir. Hemodializ ve hemoperfüzyon cihazları gibi vücut dışı dolaşımın kullanıldığı durumlarda koagülasyon, fibrinolitik ve platelet fonksiyonları gibi hemostatik parametrelerin önemli ölçülerde etkilenmektedir. Aynı özellikleri taşıyan aferez işleminin de hemostatik sistemde önemli değişikliklere yol açması mümkündür. Platelet fonksiyonlarında ortaya çıkabilecek değişiklikler, donörlerde tromboembolik olaylar ve/veya kanamaya yatkınlık yönünden bir risk oluşturabilecekleri gibi, ürün olarak hazırlanan plateletlerin kalitelerini etkilemeleri de söz konusu olabilir.

Bu çalışmada kesikli akımla çalışan bir aferez cihazı olan Haemonetics V50 Plus Blood Cell Separator ile yapılan plateletferez işleminin, gönüllü 20 erkek donörde platelet aktivasyonu ve agregasyonu üzerine yaptığı değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır. Tam kan yöntemi kullanılarak plateletferez öncesi ve sonrası alınan kan örneklerinde flow sitometrik yöntemle platelet aktivasyonunun bir göstergesi olarak platelet membranındaki CD62 (P-selektin) ekspresyonu ve impedans aggregometresi ile ADP, kollajen ve ristosetin gibi agonistlere karşı oluşan platelet agregasyon yanıtları ölçülmüştür.

Çalışma sonunda plateletferez işleminin donörlerde platelet aktivasyonuna yol açmadığı, aksine CD62 pozitif platelet yüzdesi ve dolaşan aktive platelet sayılarında anlamlı azalma olduğu saptanmıştır. Plateletlerin agonistlere karşı gösterdikleri agregasyon yanıtlarında da belirgin azalma gözlenmiştir.

Haemonetics V50 Plus Blood Cell Separator cihazı ile yapılan plateletferez işlemi donörlerde platelet yönünden trombofilik bir yatkınlık ortaya çıkarmadığı sonucuna varılmıştır. Plateletferez işleminin platelet aktivasyonu için yeterince kuvvetli trombojenik bir prosedür olup olmadığı ve/veya aktive olurlar ise bu plateletlerin selektif olarak ürün torbasında toplanıp toplanmadıkları ve/veya aktive plateletlerin dolaşımdan RES hücreleri tarafından uzaklaştırılıp, yerlerini kemik iliğinde yeni üretilen veya dalaktan dolaşıma salınan plateletlerin alıp almadığı sorularının yanıtlanabilmesi için yeni çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

7. 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. Slichter SJ. Platelet transfusion therapy. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990;4:291-311.
3. Huestis DW. Adverse effects in donors and patients subjected to hemapheresis. *J Clin Apheresis* 1984;2:81-90.
4. Huestis DW. Mortality in therapeutic haemapheresis (letter). *Lancet* 1983;1:1043.
5. Huestis DW. Risks and safety practices in haemapheresis procedures. *Arch Pathol Lab Med* 1989;113:273-8.
6. Sutton DMC, Cardella CJ, Uldall PR, Deveber GA. Complications of intensive plasma exchange. *Plasma Ther* 1981;2:19-24.
7. Senhauser DA, Westphal RG, Bohman JE, Nefi JC. Immune system changes in cytopheresis donors. *Transfusion* 1982;22:302-4.
8. Heal JM, Horan PK, Schmitt TC, et al. Long-term followup of donors cytopheresed more than fifty times. *Vox Sang* 1983;45:14-24.
9. 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.
10. 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.
11. Corash L. Measurements of platelet activation by fluorescence-activated flow cytometry. *Blood Cells* 1990;160:97-101.
12. Wun T, Paglieroni T, Holland P. Prolonged circulation of activated platelets following plasmapheresis. *J Clin Apheresis* 1994;9:10-6.
13. Kobayashi I, Hamaoka S, Ozawa H, Ihno M, Tamura K, Tanaka Y, Sakamoto Y, Nakamura A, Ueno A. Hypercoagulable state induced by thrombocytapheresis. *J Clin Apheresis* 1993;3:147-52.

14. Lee GR, Bithell TC, Foerster 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.
15. Ulutin ON. *The platelets: Fundamentals and Clinical Applications*. Istanbul, Turkey 1976, pp 1-6.
16. 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.
17. Gogstad GO, Hagen I, Korsmo R, et al. Evidence for release of soluble, but not of membrane-integrated, proteins from human platelet alpha-granules. *Biochim Biophys Acta* 1982;702: 81-9.
18. Kroll MH, Schafer AI. Biochemical mechanism of platelet activation. *Blood* 1989;74:1181-95.
19. Siess W. Molecular mechanism of platelet activation. *Physiol Rev* 1989;69:58-178.
20. Baumgartner HR. Platelet interaction with vascular structures. *Thromb Diath Haemorrh* 1972;51 (suppl):161-76.
21. Page CP. The involvement of platelets in non-thrombotic processes. *Trends Pharmacol Sci* 1988;9:66-71.
22. White JG. Shape change. *Thromb Diath Haemorrh* 1974; 60: 159-71.
23. Hantgan RR. A study of the kinetics of ADP-triggered platelet shape change. *Blood* 1984;64:896-906.
24. Carroll RC, Butler RG, Morris PA, et al. Separable assembly of platelet pseudopodal and contractile cytoskeletons. *Cell* 1982;30:385-93.
25. White JG. Electron microscopic studies of platelet secretion. *Prog Hemostasis Thromb* 1974;2:49-98.
26. Milton JG, Frojmovic MM. Adrenaline and adenosine diphosphate-induced platelet aggregation require shape change. Importance of pseudopods. *J Lab Clin Med* 1984; 104:805-15.
27. Ehrman M, Toth E, Frojmovic MM. A platelet procoagulant activity associated with platelet shape change. *J Lab Clin Med* 1978;92:393-401.

28. 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.
29. 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.
30. Walsh PN, Biggs R. The role of platelets in intrinsic factor Xa formation. *Br J Haematol* 1972;22:743-50.
31. 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.
32. 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.
33. Greengard JS, Griffin JH. Receptors for high molecular weight kininogen on stimulated washed human platelets. *Biochemistry* 1984;23:6863-8.
34. Sinha D, Seaman FS, Koshy A, et al. Blood coagulation factor XIa binds specifically to a site on activated human platelets distinct from that for factor XI. *J Clin Invest* 1984; 73:1550-3.
35. Greenberg CS, Shuman MA. Specific binding of blood coagulation factor XIIIa to thrombin-stimulated platelets. *J Biol Chem* 1984;259:14721-6.
36. Harris KW, Esmon CT. Protein S is required for bovine platelets to support activated protein C binding and activity. *J Biol Chem* 1985;260:2007-11.
37. Loskutoff DJ. Type 1 plasminogen activator inhibitor and its potential influence on thrombolytic therapy. *Semin Thromb Hemost* 1988;14:100-9.
38. Wu KK, Hoak JC. A new method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency. *Lancet* 1974;4:924-6.
39. Schwartz MB, Hawiger J, Timmons S, et al. Platelet aggregates in ischemic heart disease. *Thromb Haemost* 1980;43:185-8.
40. Ündar L, Türkay C, Korkmaz L. Circadian variation in circulating platelet aggregates. *Ann Med* 1989;21:429-33.
41. 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.

42. 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
43. 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.
44. Abrams C, Shattil SJ. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb Haemost* 1991;65:467-73.
45. Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ, Shattil SJ. Direct detection of activated platelets and platelet derived microparticles in humans. *Blood* 1990;75:128-38.
46. Kaplan KL, Broekman MJ, Chernoff A, et al. Platelet alpha granule proteins: studies on release and subcellular localization. *Blood* 1979;53:604-18.
47. Smith JB, Ingerman C, Kocsis J, et al. Formation of prostoglandins during the aggregation of human blood platelets. *J Clin Invest* 1973;52:965-9.
48. Siess W, Bohlig B, Weber PC, et al. Prostaglandin endoperoxide analogues stimulate phospholipase C and protein phosphorylation during platelet shape change. *Blood* 1985;65:1141-8.
49. Siess W, Weber PC, Lapetina EG. Activation of phospholipase C is dissociated from arachidonate metabolism during shape change induced by thrombin or platelet activating factor. Epinephrin does not induce phospholipase C activation or platelet shape change. *J Biol Chem* 1984;259:8286-92.
50. Born GVR. Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets. *J Physiol Lond* 1962;67:162.
51. Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: A novel device for assessing platelet behaviour in blood. *J Pharmacol Meth* 3 1980;158:135.
52. Laerum OD. Introduction and general outline of hemopoiesis. In: Laerum OD, Robert B. eds., *Flow Cytometry in Hematology*. Academic Press, London 1992, pp. 3-8.
53. Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem* 1985; 260:11107-14.
54. 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.

55. Cox 1991. 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.
56. Ejim OS, Powling MJ, Dandona P, Kernoff PB, Goodall AH. A flow cytometric analysis of fibronectin binding to platelets from patients with peripheral vascular disease. *Thromb Res* 1990;58:519-24.
57. 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.
58. McEver RP, Martin MN. A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J Biol Chem* 1984;259:9799-804.
59. Bavalacqua M, Butcher E, Furie B. Selectins: A family of adhesion receptors. *Cell* 1991;67:233-42.
60. 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.
61. Sternberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* 1985;101:880-6.
62. Berman CL, Yeo EL, Wencel-Drake JD, Furie BC, Ginsberg MH, Furie B. 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.
63. Stoolman LM. Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. *Cell* 1989;56:907-10.
64. 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.
65. Metzelaar MJ, Heijnen HF, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK. 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;79:372-9.
66. Capitano AM, Niewiarowski S, Rucinski B. Interaction of platelet factor 4 with human platelets. *Biochem Biophys Acta* 1985;839:161-73.
67. Aiken ML, Ginsberg MH, Plow EF. Mechanism for expression of thrombospondin on the platelet cell surface. *Semin Thromb Haemost* 1987;13:307-16.

68. George JN, Pickett EB, Saucerman S. Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *J Clin Invest* 1986;78:340-8.
69. Nieuwenhuis HK, van Oosterhout JJG, Rozemuller E, van Iwaarden F, Sixma JJ. Studies with a 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;70:838-45.
70. Metzelaar MJ, Clevers HJ. Lysosomal membrane glycoproteins in platelets. *Thromb Haemost* 1992;68:378-82.
71. Febraio M, Silverstein RL. Identification and characterization of LAMP-1 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein. *J Biol Chem* 1990;265:18531-7.
72. Logan LC. Chapter 16, Hemostasis, In: Mazza JJ ed., *Manual of Clinical Hematology*, Second edition. Little, Brown and Company, USA, 1995, pp. 349-79.
73. Simon TL. Chapter 58, Apheresis: Principles and Practices, In: Rossi EC, Simon TL, Moss GS eds., *Principles of Transfusion Medicine*, Williams and Wilkins 1992, Baltimore, U.S.A. pp. 521-5
74. Nusbacher J, Scher ML, MacPherson JI. Plateletpheresis using the Haemonetics model 30 cell separator. *Vox Sang* 1977;33:9-15.
75. Kurtz SR, McMican A, Carciere R. Plateletpheresis experience with the Haemonetics blood processor 30, the IBM blood processor 2997, and Fenwal CS-3000 blood processor. *Vox Sang* 1981;41:212-8.
76. Katz AJ, Genco PV, Blumberg N, Snyder EL, Camp B, Morse EE. Platelet collection and transfusion using Fenwal CS-3000 cell separator. *Transfusion* 1981;21:560-2.
77. Kamin ND, Grindon AJ. Comparison of two continuous flow cell separators. *Transfusion* 1983;23:197-200.
78. Mintz PD. Comparison of plateletpheresis with two continuous flow cell separators using identical donors. *Transfusion* 1985;25:330-3.
79. Strauss RG, Halpern LN, Eckermann I. Comparisons of autosurge versus surge protocols for discontinuous-flow centrifugation plateletpheresis. *Transfusion* 1987;27:499-501.
80. Price TG, Ford SE, Northway MM. Alternate collection protocols for plateletpheresis using the Cobe Spectra. *J Clin Apheresis* 1989;5:49-52.

81. Chopek M, McCullough J. Protein and biomedical changes during plasma exchange. In: Berkman EM, Umblas J, ed. Therapeutic hemapheresis. Washington, DC: American Association of Blood Banks, 1980:24-7.
82. Westphal RG. Complications of hemapheresis. In: Westphal RG, Kasprisin DO, eds. Current status of hemapheresis: Indications, technology and complications. Arlington VA: American Association of Blood Banks, 1987:87-104.
83. Widmann FK ed. Standarts for blood banks and transfusion services. 15th edition. Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 1993.
84. Schiffer CA, Dutcher JP, Hogge DE, Aiser J. Histocompatible platelet transfusion for patients with leukemia. *Plasma Ther Transfus Techn* 1982;3:273-81.
85. Levy L, Woodfield DG. The transfusion of HLA-matched platelets to thrombocytopenic patients resistant to random donor platelets. *NA Med J* 1984;97:719-21.
86. Ferrari M, Zia S, Valbonesi M. A new technique for hemodilution preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. *Int J Artif Org* 1987;10:47-50.
87. Gmur J, von Felten A, Osterwaldr B. Delayed alloimmunization using random single donor platelet transfusion. *Blood* 1983;62:473-9.
88. Boisclair MD, Philippou H, Lane DA. Thrombogenic mechanisms in the human: fresh insights obtained by immunodiagnostic studies of coagulation markers. *Blood Coag Fibrinol* 1993;4:1007-14.
89. Reverter JC, Escolor G, Sans C, Cases A, Villamor N, Nieuwenhuis HK, Lopez J, Ordinas A. Platelet activation during hemodialysis measured through exposure of p-selectin: analysis by flow cytometric and ultrastructural techniques. *J Lab Clin Med* 1994;124:79-85.
90. Karadoğan İ, Ündar L, Sapan M, Öztürk F, Süleymanlar G, Yakupoğlu G. Natural coagulation inhibitors in patients with chronic renal failure before and after hemodialysis. XIIIth Meeting of the International Society of Haematology 3-8 September 1995; Abstract book, abstract no:678.
91. Bock M, Glaser A, Pfosser A, Schleuning M, Heim MU, Mempel W. Storage of single-donor platelet concentrates: metabolic and functional changes. *Transfusion* 1993;33:311-5.
92. Kunicki TJ, Tuccelli M, Becker GA, Aster RH. A study of variables affecting the quality of platelets stored at room temperature. *Transfusion* 1975;15:414-21.

93. Holme S, Vaidja K, Murphy S. Platelet storage at 22°C: effect of type of agitation on morphology, viability, and function in vitro. *Blood* 1978;52:425-35.
94. DiMinno G, Silver MJ, Murphy S. Stored human platelets retain full aggregation potential in response to pairs of aggregating agents. *Blood* 1982;59:563-8.
95. Fijnheer R, Pietersz RNI, de Korte D, Roos D. Monitoring of platelet morphology during storage of platelet concentrates. *Transfusion* 1989;29:36-40.
96. Holme S, Heaton WA, Courtright M. Platelet storage lesion in second generation containers: correlation with platelet ATP levels. *Vox Sang* 1987;53:214-20.
97. Siegel D, Black DM, Seeley DG, et al. Circadian variation in ventricular arrhythmias in hypertensive men. *Am J Cardiol* 1992; 69: 344-7.
98. Bode AP, Miller DT, Toffaletti J. Plasma levels of ionized and total calcium during storage of citrated platelet concentrate. *Transfusion* 1989;29:534-8.
99. Snyder EL, Stack G, Napychank P, Roberts S. Storage of pooled platelet concentrates. In vitro and in vivo analysis. *Transfusion* 1989;29:390-5.
100. Lippa S, Mores N, Aureli V, Fagiolo E. Biochemical and functional changes of platelet stored for transfusional use. *Folia Haematol* 1987;5:680-5.
101. Rock G, Senack E, Tittley P. 5-day storage of platelets collected on a blood cell separator. *Transfusion* 1989;29:626-8.
102. Rinder HM, Murphy M, Mitchell JG, Stocks J, Ault KA, Hilmann RS. Progressive platelet activation with storage: evidence for shortened survival of activated platelets after transfusion. *Transfusion* 1991;31:409-14.
103. Filip DJ, Eckstein JD, Sibley CA. The effect of platelet concentrate storage temperature on adenine nucleotide metabolism. *Blood* 1975;45:749-56.
104. Kim BK, Baldini MG. Glycolytic intermediates and adenine nucleotides of human platelets II. Effect of short term storage at 4°C. *Transfusion* 1972;12:1-8.
105. George JN. Platelet membrane glycoproteins: alteration during storage of human platelet concentrates. *Thromb Res* 1976;8:719-24.
106. Lucas RC, Lawrence J, Stracher A. On the preservation of contractile proteins during storage of human platelets. *Blood* 1981;57:1005-10.
107. Dhar A, Ganguly P. Altered expression of platelet surface glycoproteins during storage. *Br J Haematol* 1988;70:71-5.

108. Fijhneer R, Modderman PW, Veldman H. Detection of platelet activation with monoclonal antibodies and flow cytometry: changes during platelet storage. *Transfusion* 1990;30:20-5.
109. Slichter SJ. Controversies in platelet transfusion therapy. *Annu Rev Med* 1980;31:509-40.
110. Schiffer CA, Lee EJ, Ness PM, Reilly J. Clinical evaluation of platelet concentrates stored for one to five days. *Blood* 1986;67:1591-4.
111. Slichter SJ, Harker LA. Preparation and storage of platelet concentrates II. Storage variables influencing platelet viability and function. *Br J Haematol* 1976;34:403-19.