

T1394

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

+
KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ OLAN
HASTALARDA HEMODİALİZ İŞLEMİNİN
TROMBOSİT AKTİVASYONU VE
AGREGASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

DR.MEHMET ARTAÇ

T 1394/4-1

Tez Danışmanı : Doç.Dr.İhsan KARADOĞAN

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ KÜTÜPHANESİ

"Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir"

Antalya,2002

Gerek bu tezin hazırlanışı sırasındaki katkı ve yardımları, gerekse asistanlık eğitimim süresince bilgi, deneyim ve yol göstericiliği ile yetişmemde emeği olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. İhsan Karadoğan'a; her konuda sürekli desteğini gördüğüm Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Gülşen Yakupoğlu ve tüm hocalarıma, ayrıca bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen Uzm.Dr.Aynur Uğur ve Hematoloji Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürü borç bilirim.

Dr. MEHMET ARTAÇ

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.ÜREMİK KANAMA PATOGENEZİ	3
2.2.ÜREMİDE TROMBOSİT DİSFONKSİYON PATOGENEZİ	6
2.3.ÜREMİK KANAMADA KLİNİK BULGULAR	7
2.4.ÜREMİDE TROMBOSİT DİSFONKSİYONUNUN TEDAVİSİ	8
2.5.TROMBOSİTLER	10
2.6.TROMBOSİT AKTİVASYONU	13
2.7.TROMBOSİT AGREGASYON ÇALIŞMALARI	16
2.8.AKIŞ SİTOMETRESİ	20
2.9.TROMBOSİT FONKSİYON ANALİZÖRÜ (PFA-100)	24
3.GEREÇ VE YÖNTEM	26
4.SONUÇLAR	30
5.TARTIŞMA	34
6.ÖZET	37
7. KAYNAKLAR	39

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Akut ve kronik böbrek yetmezliği olan hastaların hemostatik sisteminde önemli ve karmaşık değişikliklerin olduğu bilinmektedir (1-5). Özellikle kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda daha çok minör (ekimoz, burun kanaması...) veya major (subdural, retroperitoneal, plevral, perikardiyal, gastrointestinal ...) kanama yönünde bir yatkınlık olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (1-5). Diğer yandan bu hastalarda arteriyovenöz fistül tıkanması veya diyalizerde kan pıhtılaşması gibi tromboembolik olaylara yatkınlık da izlenebilmektedir (6, 7).

Üremili hastalarda trombositlerde, pıhtılaşma sisteminde yer alan proteinlerde ve damar yapılarında nicelik veya nitelik açısından birçok anormalliklerin olduğu bilinmesine rağmen bu bozuklukların patogenezi tam olarak bilinmemektedir. Olası mekanizmalardan birinin düşük molekül ağırlıklı üremik toksinlerin birikimi olduğu düşünülmektedir. Örneğin; Guanidinosuccinic acid ve phenolic acid gibi molekülerin platelet factor (PF) 3 salınımını ve adenosine diphosphate (ADP) ile indüklenen trombosit agregasyonunu azalttığı gösterilmiştir (8- 10). Diğer taraftan kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda prostoglandinlerin özellikle glomerül kapillerlerinde vazodilatasyon yapıcı etkileri yanında trombositleri aktive ettikleri ve koagülasyon yolunu indükledikleri bilinmektedir (11).

Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda bir tür ekstrakorporeal dolaşım olan hemodiyaliz işleminin kendisinin de hemostatik sistemde değişiklikler yaptığı bilinmektedir. Örneğin; hemodiyaliz hastalarında diyalizer membran yapısı ve akış sisteminin trombosit aktivasyonunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (12, 13). Ekstrakorporeal dolaşım sırasında kanın pıhtılaşmasını engellemek için kullanılan heparinin de hemostatik sistemde kanama yönünde bir yatkınlık yarattığı bilinmektedir.

Üremili hastalardaki önemli hipotezlerden biri, hematokrit değeri ile trombositlerin damar duvarına adezyonu arasında pozitif bir ilişki olduğu yönündedir. Bu nedenle dializ işlemi sırasında oluşan ani volüm değişikliklerinin

ve/veya diüretik kullanımı nedeni ile yükselen hematokrit değeri nin kan vizkozitesini arttırarak tromboemboli yönünde yatkınlığa yol açtığı ileri sürülmektedir (14, 15).

Üremili hastalarda faktör IX, XI ve XII gibi düşük molekül ağırlıklı pıhtılaşma faktörlerinde idrarla artan kayıp nedeni ile plazma düzeylerinde azalma olduğu bilinmesine rağmen, diğer faktörlerin (faktör II, V, VII, VIII, X ve XIII) arttığı gösterilmiştir (5). Bu artış daha çok hipoalbüminemi nedeni ile artmış olan sekonder hepatik senteze bağlanmaktadır. Ancak bu hastalarda klinikte faktör düzeyleri ile tromboembolik olaylar arasında direkt bir ilişki saptanamamıştır (6,7).

Üremili hastalarda trombositlerin primer hemostatik sistem içindeki rollerinde önemli bir yer tutan von Willebrand faktör (vWF) ile de ilişkili bazı anormallikler bulunmaktadır. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda ristosetin kofaktör aktivitesinde azalma, vWF antijen düzeyinde ise artma olduğu gösterilmiştir (16, 17). Bu hastalarda vWF fonksiyonel olarak antijenik düzeyinden daha az aktivite göstermektedir. Klinik olarak kriopresipitat infüzyonu veya desmopressin verilmesi ile kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda uzamış olan kanama zamanının kısalması, artmış olan kanamaya yatkınlık eğiliminde, vWF aktivitesinde azalmanın önemli rolü olduğunu düşündürmektedir.

Literatürde kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda hemostatik sistem değişiklikleri içinde önemli bir yer tutan trombositlerin aktivasyon göstergelerinin akış sitometresi ile değerlendirildiği çalışmalar bulunmaktadır. Hemodiyaliz işleminin bu konuda etkilerinin incelendiği az sayıdaki çalışmada çelişkili sonuçlar bildirilmektedir (18-20). Trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesinde ise daha çok agonistlere karşı agregasyon yanıtlarının ölçüldüğü çalışmalar yer almaktadır (21). Trombosit fonksiyonlarının klinikte değerlendirilmesinde yakın zamanda geliştirilen basit, pratik, etkili ve yeni bir yöntem olan "platelet function analyser (PFA)" kullanılarak yapılan bir çalışma henüz bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda tek bir hemodiyaliz işleminin trombosit aktivasyonu ve fonksiyonları üzerine olan etkisinin akış sitometresi ve PFA yöntemleri kullanılarak değerlendirilmesidir.

1. GENEL BİLGİLER

Böbrek yetmezliği ile kanama arasındaki ilişki ilk defa 1764 yılında Giovan Batista Morgagni tarafından farkedilmiş ve o günden beri üremenin sık görülen komplikasyonlarından biri olarak rapor edilmiştir (22). Dializ tedavisinin başladığı ilk günlerde klinik bir problem olarak karşılaşılan, aşırı gastrointestinal ve abdominal organ kanamalarından dolayı birçok hasta kaybedilmiştir (1)

Modern dializ teknikleri ve eritropoetin kullanımı ile aneminin düzeltilmesi, üremik kanama sıklığını azaltsa da, hala bu hastalarda cerrahi ve invaziv prosedürlerde kanama riski devam etmektedir...

2.1. ÜREMİK KANAMA PATOGENEZİ

Son 30 yıldır üzerinde yapılan araştırmalara ve bazı anormalliklerin tespitine rağmen, üremik kanamanın nedenlerini tam olarak ortaya çıkarmak mümkün olmamıştır. Patogenezin multifaktöriyel olduğu kabul edilmekle beraber (Tablo 1), trombositler arası ve trombosit damar duvarı arasındaki ilişkinin önemi üzerinde durulmaktadır (5, 23). Üremiklerde, idealden uzak olsada, kanama zamanının (trombositler, vasküler fonksiyon ve eritrositlerden etkilenerek) klinik kanama için hala gerçek bir prediktör olduğu kabul edilmektedir (24) .

Trombosit disfonksiyonunun doğasını araştırmak, dializin trombositler ve koagülasyon üzerine olan kompleks etkileri nedeniyle her zaman zor olmuştur (12, 18,19). Ortalama bir dializ seansından sonra, karakteristik olarak trombosit fonksiyon testlerinin bozulabileceği (20, 21) veya düzelebileceği (25, 26) gösterilmiştir İkinci dereceden kanıtlar trombositlerin dializ membranıyla aktive olduklarını ve sonraki stimulus için refrakter hale gelerek, trombosit fonksiyon testleri üzerindeki paradoksik etkilerin açıklanabileceğini göstermektedir (27).

Üremik kanamanın nedenini araştıran çalışmalarda, ADP ve serotonin düzeyinde azalma ile birlikte olan trombosit α -granüllerinde anormallikler (26, 28) ve araşidonat metabolizmasındaki defektler (29) rapor edilmişlerdir. Bununla birlikte , klinik sendromu hangisinin ön planda tetiklediği konusu tartişmalıdır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda , spesifik reseptörlerin kazanılmış defektleri sonucunda trombositlerin fibrinojene ve von Willebrand faktöre (vWF) bağlanmasındaki defektler (25) gösterilse de, üremik kanamada vWF'n rolü hala tartişmalıdır (17, 30-32).

Üremik hastalarda , 1,25-dihidroksi vitamin D₃ tedavisi ile düzeltilebilen trombosit kalsiyum içeriği artışı ve trombositlerin stimulasyonu sonrasında anormal kalsiyum mobilizasyonu bildirilmiştir (33, 34). Trombositlerin fonksiyonları için sitoplazmik veya ekstrinsik Ca²⁺ gerektiği bilindiğinden, üremik kanama ile ilişkili trombosit disfonksiyonununun bu durum sorumlu tutulmuştur (34).

Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda sekonder hiperparatiroidizmin bir sonucu olarak dolaşan parathormon (PTH) düzeyi artmıştır. Parathormonun trombosit agregasyonunu in vitro olarak inhibe ettiğinin gösterilmesiyle (35) , kanama patogenezinde bir rolünün olabileceği düşünülmüştür. Fakat kanama zamanı ile PTH fragmanları arasında bir korelasyon gösterilememesi nedeniyle (36) , üremik trombosit disfonksiyonu üzerine önemli bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Tablo 1. Üremik Kanama Nedenleri

A. Trombosit Anormallikleri

1. Azalmış yoğun granül içeriği
2. Azalmış intraselüler ADP ve serotonin
3. Trombosit α -granül proteini ve β -tromboglobulin salınımında bozulma
4. Artmış intraselüler cAMP
5. Anormal trombosit Ca^{2+} mobilizasyonu
6. Anormal trombosit araşidonik asit metabolizması
7. Anormal trombosit agregasyonu
8. Siklooksijenaz aktivitesinde bozulma
9. Aktivasyona bağlı GP IIB-IIIa aktivitesinde anormallikler
10. Üremik toksinler, özellikle paratiroid hormon

B. Anormal Trombosit- Damar Duvarı İlişkisi

1. Anormal trombosit adezyonu
2. Vasküler PGI_2 oluşumunda artma
3. Von Willebrand faktör değişikliği

C. Anemi

1. Kan reolojisi değişikliği
2. Eritropoetin eksikliği

D. Anormal nitrik oksid üretimi

E. İlaç tedavisi

1. β -Laktam antibiyotikler
2. Üçüncü jenerasyon sefalosporinler
3. Nonsteroidal anti inflamatuvar ilaçlar

2.2. ÜREMİDE TROMBOSİT DİSFONKSİYON PATOGENEZİ

Üremide trombosit disfonksiyonundan sorumlu bir çok faktörün olduğu düşünülmektedir. Özellikle üzerinde durulan üç faktör, üremik toksinler, anemi, ve nitrik oksiddir (6).

2.2.1. Üremik toksinler

Akut dializin trombosit disfonksiyonu üzerine görülen yararlı etkileri, kanama zamanını normale getirmese de, dolaşan toksinlerin önemine dikkat çekmektedir (6). Yine normal kişilerde, dietin ayarlanması ile, BUN değerinin 60 mg/dl'den 120 mg/dl 'ye çıkarılmasıyla trombosit adhesivitesinin bozulduğu ve kanama zamanının uzadığı gösterilmiştir (2). Muhtemelen ürenin tek başına en önemli trombosit toksini olmadığı düşünülmektedir. Böbrek yetmezliği olan hastalarda kanama zamanı ve BUN arasında öngörülebilecek bir korelasyon kurulamamıştır (37). Guanidinosüksinik asid, metilguanidine, hidrosifenilasetik asid, fenolik asid ve orta ağırlıktaki (mol ağırlılığı 500 ile 3000 dalton arasında olanlar) diğer moleküllerin potansiyel toksinler olduğu sanılmaktadır.

Trombosit fonksiyonlarının üremik toksinlerden nasıl etkilendiği tam olarak bilinmemektedir. Normal trombositlerin üremik serum içinde bekledildiği in vitro çalışmalarda, dializ edilebilen bir faktörün, fibrinojenin GP IIb-IIIa' ya bağlanmasını etkilediği düşünülmektedir (38).

2.2.2. Anemi

Anemi kronik böbrek yetmezliğinin sık görülen bir bulgusudur ve primer olarak böbrekte eritropoetin üretiminin azalmasına bağlıdır. Aneminin derecesi ile kanama zamanındaki uzamanın derecesi arasında korelasyon olabileceği gösterilmiştir (6). Dahası, aneminin kan transfüzyonu veya eritropoetin ile düzeltilmesi sıklıkla trombosit fonksiyonlarını düzeltmektedir.

Reolojik faktörlerin anemi ve trombosit disfonksiyonu arasındaki ilişkide önemli rol oynadıkları düşünülmektedir (6). Hemotokrit %30'un üzerindeyken, eritrositler damarın merkezinde yer alırken, trombositler endotelial yüzeye yakın bir tabaka halinde bulunurlar. Trombositlerin endotelial yüzeye yakınlıkları, onların endotelial hasar olduğunda bir araya gelerek yapışmalarını ve trombosit tıkaçı oluşturmalarını kolaylaştırmaktadır. Anemi ile birlikte, trombositlerin dağıldığı ve bununla endotelial tutunmayı azalttığı bilinmektedir.

2.2.3. Nitrik oksid

Nitrik oksid (NO; EDRF) endotelial hücreler ve trombositler tarafından üretilen bir trombosit agregasyon inhibitörüdür. Üremik hastalardaki çalışmalarda trombosit NO sentezinin arttığı ve endotelial hücre kültürlerinde ise üremik plasmanın NO sentezini simüle ettiği gösterilmiştir (39). Nitrik oksid sentezindeki artışın, bu durumda nitrik oksid için bir prekürsör olan, üremik bir toksin guanidinosüksinik asidin artmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir (22). Bu bulgular klinik olarak önemli olabilir, çünkü üremik ratlara nitrik oksid sentez inhibitörü verilmesiyle kanama zamanının normale döndüğü gösterilmiştir (40).

2.3. ÜREMİK KANAMADA KLİNİK BULGULAR

Ekimoz, purpura, epistaksis ve girişim yerlerinden kanama üreminin en sık görülen hemorajik komplikasyonlarıdır. İntrakranial veya gastrointestinal kanama gibi ağır klinik tablolara daha az sıklıkta rastlanır.

Gastrointestinal kanama akut böbrek yetmezliğinde daha çok görülsede, kronik böbrek yetmezliğinde de bulunabilir. Peptik ülser, hemorajik özofajit ve gastrik telenjektazi üst gastrointestinal kanamanın sık görülen nedenlerindedir (41, 42). Hemorajik perikarditi takiben gelişen kardiak tamponad ve hemorajik pleural effüzyon, yine dializ tedavisinin başladığı ilk yıllarda sık bildirilirken, günümüzde daha az görülmektedir. Aniden ortaya çıkan karın, sırt veya kalça ağrısıyla beraber

kan basıncında düşme spontan retroperitoneal kanamanın bir bulgusu olabilir. Retroperitoneal kanama tespitinde bilgisayarlı tomografi değerli bir yöntemdir. Karaciğerin spontan subkapsüler hematomu önemli komplikasyonlardan biridir (43). Klinik bulgular daha çok sağ üst kadranda ve epigastirumda ağrı, karaciğer üzerinde hassasiyetin olması, ateş ve hemotokrit düşüklüğü ile karakterizedir. Kronik hemodializ hastalarındaki diğer bir problemde subdural hematomdur. Klinik bulgular baş ağrısı, bulantı, nöbet, hipertansiyon, konfüzyon ve koma şeklinde görülebilir.

Günümüzde dializ teknolojisinin gelişmesi nedeniyle ,üremik kanama daha çok ekimoz ve girişim yerlerinden kanama şeklinde görülmektedir.

2.4.ÜREMİDE TROMBOSİT DİSFONKSİYONUNUN TEDAVİSİ

Asemptomatik kişilerde herhangi bir tedavi gerekli değildir. Bununla beraber, aktif olarak kanayan ve cerrahi bir girişim uygulanacak hastalarda, trombosit disfonksiyonunun düzeltilmesi gereklidir (44)

2.4.1.Aneminin Düzeltilmesi

Kronik böbrek yetmezliği olan bir çok hastada hemotokritin 30 'a kadar çıkarılmasıyla , kanama zamanının normal düzeylere yaklaştığı gösterilmiştir (14, 45). Bu bulgular trombosit agregasyonunun ve endotele trombosit adezyonunun artmasıyla ilişkili bulunmuştur (45). Hematokrit akut olarak eritrosit transfüzyonu ile düzeltilebileceği gibi (14), kronik olarak rekombinan insan eritropoetini verilerekte düzeltilebilir (45). Trombosit fonksiyonlarındaki düzelme hemotokrit değeri yükseltildiği sınırdaki müddetçe devam edecektir.

Eritropoetinin trombosit fonksiyonlarını düzeltici etkileri olabilir. Eritropoetinin trombosit membranlarındaki GPIIb-IIIa moleküllerinin sayısını arttırdığı (45) ve trombosit proteinlerinin trombin aracılı fosforilasyon bozukluğunu düzelttiği gösterilmiştir (46) .

2.4.2. Kriyopresipitat ve desmopressin

Kriyopresipitat; von Willebrand faktör, fibrinojen ve fibronektinden zengin bir plazma ürünüdür. Üremik hastalarda kriyopresipitatın kanama zamanını nasıl düzelttiği tam olarak belli değildir (47). İnfüzyonu sonrasında plazma fibrinojen ve von Willebrand faktörde hafif bir artış gösterilebilmiştir. Ancak kriyopresipitatın faydalarının muhtemelen von Willebrand faktör üzerinden olabileceğinin gösterilmiş olması nedeniyle , von Willebrand faktörün salınımını artıran sentetik antidiüretik hormon derivesi, desmopressinin etkili olabileceği bulunmuştur (48). Kriyopresipitat kullanımını infeksiyöz komplikasyon riski nedeniyle sınırlı olmuştur.

Basit ve toksisitesi az olan desmopressinin uzamış kanamanın akut tedavisinde kullanılması önerilmektedir (48, 49) . Desmopressinin en az hastaların yarısında etkili olduğu ve etkisini endotelial depolardan faktör VIII: von Willebrand faktör multimerleri salınımını arttırarak gösterdiği bulunmuştur (50). İntravenöz uygulanması halinde 50 ml serum fizyolojik içerisine 0.3 µg/kg dozunda 15 ile 30 dakikada verilmesi önerilmektedir. Alternatif olarak aynı dozda subkutan veya 3 µg/kg dozunda intranazal olarak uygulanabilir (7) . Desmopressin uygulanması ile kanama zamanındaki düzelme 1 saat içinde başlar ve 24 saat kadar devam edebilir. Desmopressin ile birlikte aneminin düzeltilmesi kanama zamanı üzerine aditif bir etki yapabilir (6) .

2.4.3.Dializ

Hemodializ veya periton dializinin her ikisinde vakaların üçte ikisinde kanama zamanını düzeltebildikleri gösterilmiştir (3, 4) . Aktif kanaması olan hastalarda dializde heparin kullanımı nedeniyle periton dializi önerilmektedir. Bununla beraber dializin kanama riskini ortadan kaldırdığını söyleyemeyiz. Kan ile dializ membranı arasındaki ilişki nedeniyle devamlı bir trombosit aktivasyonu söz konusudur ve trombosit ilişkili proteinlerin salınmasıyla , trombositlerde bir tükenme halinin ortaya çıkışı ile birlikte kanama riski artabilecektir. Düşük molekül ağırlıklı heparin uygulaması (51) ve minimal veya regional heparinli, antikoagülansız,

prostosiklinli veya regional sitratlı hemodializ modalitelerinin başarılı olabileceği gösterilmiştir (52).

2.4.4.Östrojen

Böbrek yetmezliği olan hastalarda kanamalarda östrojenlerin kullanımı , hamileliği sırasında kan östrojen düzeyi artan , Von Willebrand hastalığı olan kadınların, anormal kanamalarının azalması ile düşünülmüştür (53). Kanama zamanının daha uzun süre kontrolü hastalara konjuge östrojenler(2.5-25 mg oral, 0.6 mg/kg intravenöz 5 gün süreyle veya 50-100 µg transdermal östradiol haftada 2 kez) verilmesi ile sağlanmıştır (11, 54-56). Bu ajanların etkileri ilk gün başlar ve 5 veya 7 günde en üst seviyeye çıkarken (11, 54-56), tedavi kesildikten sonrada bir hafta kadar devam etmektedir. Östrojenlerin hangi mekanizma ile etkili oldukları tam olarak bilinmemektedir. Östrojenlerin nitrik oksid prekürsörü olan L-arginin üretimini azaltarak (57) , nitrik oksid oluşumunu azalttıkları ve bunun sonucunda trombosit reaktivitesini arttırarak etkili oldukları düşünülmektedir (11).

2.5.TROMBOSİTLER

2.5.1.Yapı

Trombositler megakaryositlerin fragmantasyonundan kaynaklanan 2-5 µm çapında 0,5-1 µm kalınlığında 5-7 µm³ hacminde, nükleus içermeyen, bikonveks, yuvarlak ya da hafif oval şekilde olan hücrelerdir (58-60). Vücutta total 10¹² 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 (60). Dolaşan trombositlerin değişim oranı günde litrede 35x10⁹ düzeyinde olup ortalama yaşam süreleri 7-10 gündür (58-60). Trombositler May grünwald/Giemsa 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 (60). Granüller elektron mikroskopunda yuvarlak şekilli, yaklaşık 300 nm boyutlarında, tek bir membranla çevrili birer yoğunluk olarak görülürler.

2.5.1.1.Trombosit granülleri

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

2.5.1.1.1.Alfa granüller

Alfa granüller trombositlerdeki azurofilik granüllerin yaklaşık %85'ini oluştururlar. Alfa granüllerin içerdiği çok sayıdaki 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(60) " Grey platelet syndrome" olarak bilinen, aggregasyon yitimi ve hemorajik diyatezle sonuçlanan tabloda trombositlerde alfa granül eksikliği söz konusudur (58-60) .

2.5.1.1.2.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 adenozin difosfat (ADP), adenozin trifosfat (ATP) ve serotonin gibi salınan çeşitli maddeleri depoladığı gibi, katekolaminler, pirofosfat ve ortofosfatlarında içerir . Yoğun cisimcikler, endojen ADP salınımına sekonder aggregasyonun olmayışı ile karakterize Hermansky Pudlak sendromunda eksiktir (58-60).

2.5.1.1.3.Lizozomlar

Daha az sayıda olup yalnızca asit fosfataz, aril sülfataz gibi sindirici enzimlerden birinin varlığında gösterilebilir. Sikatrizasyon sırasında hemostatik tıkaçın eliminasyonunda rolleri vardır (59, 60).

2.5.2.İşlev

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

2.5.2.1.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 pseudopotlar oluşturarak trombosit-trombosit ve trombosit - damar etkileşimlerini arttırmaktadırlar (59-62).

2.5.2.2.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 saliverilişi, trombosit aktivasyonu için son derece duyarlı bir gösterge olarak kullanılmaktadır. Çünkü bu substanslar yoğun granüllerin saliverilişi için gerekli uyarıdan daha düşük uyarı ile saliverilebilirler.

Ayrıca kollajen ve trombinin etkisi ile trombosit prostoglandin sentezi artar. Protein kinaz C aracılığı ile protein fosforilasyonunu aktive eden diasilgliserol ve intrasellüler kalsiyum iyonlarının salınımına yol açan inositol trifosfat saliverilmesi oluşturur. Ayrıca tromboksan A₂, cAMP düzeylerini düşürerek saliverme reaksiyonunu artırır (59-62).

2.5.2.3.Trombosit agregasyonu

Ortama salınan ADP ve tromboksan A₂ ile hasarlı bölgede daha fazla sayıda trombositlerin agregasyonu gerçekleşir. Yeni katılan trombositler de aktive olarak daha fazla saliverme reaksiyonuna yol açarlar ve oluşan bu pozitif geri beslenme sayesinde hasarlı endotelial alanda yeterince büyük bir plak oluşumu sağlanır (59-62).

2.5.2.4.Prokoagülan aktivite

Trombositlerin saliverme reaksiyonu ve agregasyonu 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 (59-62).

2.6.TROMBOSİT AKTİVASYONU

Damar içinde pasif olarak dolaşan trombositler, damar duvarında bir zedelenme yada yabancı bir yüzeyle temas sonucunda hızla adezyon, şekil değişikliği, saliverme ve agregasyon göstererek lokalize bir hemostatik tıkaç oluştururlar (61). Trombosit aktivasyonu, trombosit yüzeyini etkileyebilen değişik uyarıcı ve inhibe

edici sinyallerle modüle edilen dinamik bir süreçtir (61). Trombositler, bu çeşitli uyarıları algılayan spesifik membran reseptörleri taşırlar. Bu reseptörler yoluyla alınan sinyalleri hücre içinde bulunan ikincil haberciler kompleks bir biyolojik yanıtı dönüştürürler (62).

Trombosit yanıtı iki grup halinde sınıflandırılabilir (62):

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

1. Reversibl yanıt, trombositlerin endotel hücre tabakası arasındaki boşlukların kapatılması, büyüme faktörlerinin alfa granüllerinden salıverilişi ve subendoteldeki küçük defektlerin onarımı gibi fizyolojik işlevleri;
2. İrreversibl yanıt ise trombositlerin hemostatik işlevlerini içerir (62-64).

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 (65, 66). Trombositlerin küre şeklini alması, granüllerinin merkezileşmesi ve kontraktil hücre iskeletinin kasılması sonucu ortaya çıkar (67). Şekil değişikliği sırasında plazma membranının yüzeyi de genişlemektedir. Bu da olasılıkla yüzeye bağlantılı "açık kanaliküler sistem" in dışı açılmasının bir sonucudur (68). Fizyolojik koşullarda şekil değişikliği, agregasyon ve salıverilişe öncülük eder ve bir öngerekliliktir (10,68). Şekil değişikliği sırasında trombositlerin prokoagülan aktiviteleri de artmaktadır (69).

Çeşitli fizyolojik substanslar trombositleri aktive etmektedir. Bunların içinde en önemlileri, trombositlerin adezyonunu uyararak 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) (62).

Trombositler aktive olduklarında trombosit membranındaki lipid dağılımında değişiklikler olmakta ve negatif yüklü fosfatidilserinin büyük bir bölümü membranın dış

yüzeyine çıkmaktadır (70). 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(71-73). İstirahat halindeki trombositler, membranın dış yüzeyinde fosfatidilkolin ve sfingomyelin gibi nötral fosfolipidleri içerdiklerinden faktörXa yada trombin oluşumunu uyarma kapasiteleri düşüktür(70). Trombositlerde faktör Va için 1000-2000 adet yüksek afiniteli bağlanma bölgeleri bulunmaktadır (74). Trombositte bağlı faktör Va , faktör Xa için bir reseptördür ve trombosit başına faktör Xa için 200-3000 bağlanma bölgesi bulunmaktadır (74). 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 eksprese edilir (75-77).

Aktive trombositler , doku plazminojen aktivatörü (t-PA) ve ürokinazla kompleks oluşturarak bunları inaktive eden trombosit aktivatör inhibitörü (PAI-1)'ide salıvermektedir (78). 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 (78).

2.6.1.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 (79,80),

b.Aktive trombositlerden salıverilen ve plazma ya da idrarla saptanan metabolitler (PF-4, β -IG, 2,3-dinor-TXB₂, 11-dehydro-TXB₂) (81, 82)

c İmmunolojik yöntemler

(platelet- associated FXIII, GP-IIb-IIIa, LAMP-1 ve -2, GP-53, GMP-33, GMP-140)
(83, 84)

Trombositler normal koşullar altında dolaşımında istirahat durumunda bulunurlar ve birçok fizyolojik agonistlerden bir veya birkaçı ile uyarıldıkları zaman trombosit adezyon ve agregasyonuna yol açan değişikliklere uğrarlar. Bu değişiklikler *in vivo* koşullarda olabilecekleri gibi, *in vitro* koşullardan da önemli oranda etkilenmektedirler (85). 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 yaygın 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 (84).

2.7.TROMBOSİT AGREGASYON ÇALIŞMALARI

Trombosit agregasyonu, bir trombositin diğer bir trombositte yapışmasını tanımlayan bir terimdir. Bu olay trombositin zengin plazma veya tam kana agregan maddelerin (agonist) konulması ile indüklenebilir. Trombosit agregasyonunun 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 trombosit agregasyonunda rol almalarından kaynaklanmaktadır (61, 62)

ADP ve epinefrin trombosit organellerinde bulunan ve primer hemostatik plak oluşumu sırasında aktive olan trombositlerden salınan ve trombosit agregasyonunu arttıran maddelerdir. Kollajen ise, trombositlerde bulunmayan ancak damarlarda oluşan hasar sonrası açığa çıkan ve trombositleri aktive ederek agregasyon ve primer hemostatik plak oluşumunu sağlayan bir dizi reaksiyonun başlamasına yol açan ilk maddelerdir. Bu nedenle in vitro çalışmalarda trombositlerin 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 irreversibldir. Trombositlerin agregasyonu, fibrinojenin bağlanabileceği fibrinojen reseptörlerinin belirmesini gerektirir (62). Primer agregasyon hücre dışı ortamda kalsiyum ve/veya magnezyumun varlığında ve düşük konsantrasyondaki bir agonistin uyarımıyla gerçekleşir. Bu agregasyon ve disagregasyon, fibrinojenin reseptörüne bağlanıp ayrılmasıyla ilişkilidir. Yüksek agonist konsantrasyonundan sonra gözlenen irreversibl agregasyon ise başlıca salıverme reaksiyonunun bir sonucudur. Büyük trombosit agregatlarının oluşumuna ADP, araşidonik asitten oluşan endoperoksidler ve TXA₂, yoğun cisimciklerden salınan kalsiyum ile alfa granüllerinden salınan adezif proteinler aracılık eder. Alfa granüllerin salıverilmesi, trombosit yüzeyinde yüksek konsantrasyonda fibrinojen, fibronektin, trombospondin ve vWF sağlar (62). Alfa granül ve yoğun granül içeriklerinin salıverilmesi tüm trombosit agonistleri ile uyarıdan sonra gözlemlenebilirken, lizozomal salıveriş , yalnızca yüksek konsantrasyonda trombin ya da kollajen ile olasıdır (86). Salıverme reaksiyonu sırasında ekstrasellüler alana geçen endoperoksidler/TXA₂ 'nin oluşumunun trombosit

yanıtını reversiblden irreversible dönüşümünde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir (87-89).

Trombosit agregasyon çalışmaları günümüzde trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanılan en duyarlı in vitro testlerden biridir. Diğer bir çok teknikle tanı konulmasının mümkün olmadığı bir çok hastalıkta, hem tanısal hem de tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Trombositlerin değişik agonistlere karşı gösterdikleri yanıtlar arasındaki farklılıklar, trombasteni, Bernard-Soulier sendromu, von Willebrand hastalığı ve non-steroidal antiinflatuar ilaçların etkileri gibi konjenital veya kazanılmış bir çok fonksiyon bozukluğunun tanısında kullanılmaktadır.

Klinikte trombosit agregasyon testleri agregometre adı verilen cihazları ile yapılmaktadır. Bu cihazların iki farklı sistemle çalışan tipi bulunmaktadır. Optik sistemle çalışan agregometrelerde trombositten zengin plazma kullanılırken, impedans agregometrelerinde tam kan kullanılmaktadır.

2.7.1. Optik agregasyon testleri

İlk kez 1962 yılında Born tarafından trombositten zengin plazma örneklerinde trombosit agregasyonunun değerlendirilmesi amacıyla geliştirilen kalorimetrik bir testtir (90).

Optik agregometreler sabit dalga çalışan spektrofotometrelerdir. Örneğin konduğu 37 C 'ye ısıtılmış bir bölüm bulunmaktadır. Örneğin içine konulan metal bir çubukçuk manyetik ortamda, trombositlerin birbirine temasını arttırmak için karıştırıcı olarak kullanılmaktadır. Optik sistemle çalışan agregometreler için antikoagüle kan örneği düşük santrifüj hızında çevrilerek trombositten zengin plazma ve yüksek hızda çevrilerek trombositten fakir plazma elde edilmektedir.

Optik agregometrenin çalışma prensibi, spektrofotometredeki örnek bölümü içinden geçen ışığın transmisyonunda oluşan değişikliklerin zamana göre kaydedilmesi temeline dayanmaktadır. Örnek kabına trombositten zengin plazma konulduğu zaman trombositlerin varlığı nedeniyle ışığın bir kısmı soğrulmaktadır ve

bu değer %0 olarak kabul edilmelidir. Örnek kabına trombositler zengin plazma konulduğu zaman ortamda trombosit olmadığı için ışık minimal soğrulmaktadır ve yüksek olan bu transmisyon değeri %100 olarak kabul edilmektedir. Trombositler zengin plazma içine trombosit agregasyonuna yol ačan bir agonist eklendiği zaman trombositler agregat olmaktadır ve ışığın transmisyonu zaman içinde artan agregasyona paralel olarak artmaktadır. Zaman içinde ışığın transmisyonunda oluşan bu değişiklikler grafik olarak kaydedilmektedir. Bu şekilde oluşan agregasyon eğrilerinin eğimleri ve dakikalar içindeki oranları hesaplanarak agregasyon yanıtları değerlendirilmektedir.

2.7.2 İmpedans agregometresi ile yapılan testler

Tam kan yöntemi ile trombosit agregasyonunun impedans metodu kullanılarak değerlendirilmesi ilk kez 1980 yılında Cardinal ve Flower tarafından gerçekleştirilmiştir.

İmpedans agregometresi ile yapılan çalışmalarda antikoagüle tam kan kullanılmakta olup trombositler zengin plazma ve trombositler fakir plazma 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 daldırılmasıyla birlikte, metal tellerin üstü trombositler ile tek bir kat şeklinde kapatılmaktadır. Bu nedenle iki metal tel arasına milivolt düzeyinde elektrik yükü uygulandığı zaman bir elektriksel dirençle karşılaşılmaktadır. " Ohm " olarak ölçülen bu direnç bazal değer (0 Ohm) olarak kabul edilmektedir. Ardından ortama agonist eklenmesi ile birlikte trombositler metal tellerin üzerinde agregat olmaktadır ve iki metal tel arasındaki direnç artmaktadır. Artan direncin zaman içindeki değişimi grafik olarak çizdirilerek agregasyon 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 agregasyon yanıtı olarak değerlendirilmektedir.

İmpedans agregometresi ile yapılan ölçümler için trombositten zengin plazma ve trombositten fakir plazma hazırlanmasına gerek bulunmamaktadır. Bu nedenle tam kan örneğine trombosit aktivasyonuna yol açarak agregasyon yanıtını etkileyebilecek olan santrifügasyon gibi işlemler uygulanmamaktadır. Ayrıca trombositler kendi doğal ortamları içinde incelendikleri için , trombosit fonksiyonlarında etkili olabilecek bir çok labil faktör ve diğer hücreler ortamdan uzaklaştırılmamaktadır. Testlerin değerlendirilmesinde optik sistem kullanılmadığı için lipemik, trombositopenik veya dev trombositleri olan hastalarda da impedans agregometresi güvenle uygulanabilmektedir. Tüm bu faktörler impedans agregometresi ile yapılan çalışmaların değerini optik sisteme göre arttırmaktadır.

2.8.AKIŞ SİTOMETRESİ

2.8.1.Çalışma İlkeleri

Akış 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 granülaritelerini ve bir diğeri ise yansıtıkları floresans yoğunluğunu alırlar. 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 granülaritelerine 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 tanımlanabilmektedir. Böylece hücre yüzey işaretleri saptanarak normal veya patolojik hücrelerin tiplendirilmesi yapılabilmekte ve hastalık durumlarında tedavilere verdikleri monitorize edilebilmektedir. Akış sitometre ile, süspansiyon haline getirilebilen her hücre popülasyonu üzerinde çalışma yapmak mümkündür (91).

2.8.2. Akış sitometre 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 (86). Bu nedenle trombositler ile çalışma yapılması zordur. Özellikle tam kan yöntemleri kullanılarak yapılan akış sitometrik çalışmalarda bu sorunlar tümüyle aşılamasa da büyük oranda azaltılabilmektedir (85). Tam kan yönteminin akış sitometre ile yapılan çalışmalarda bir çok yönden üstünlüğü bulunmaktadır. Bu yöntemde mikrolitre düzeyindeki kan örnekleri çalışma için yeterli olacağından bebeklerde, trombositopenik hastalarda çalışmaların yapılması mümkündür. Tam kan yönteminin kullanılması sırasında trombositlerin santrifügasyonu ve yıkanmaları gerekmemektedir. Bu nedenle trombositlerin aktivasyonuna yol açarak test sonuçlarını etkileyebilecek olan manipülasyon hataları en aza indirilebilmektedir. Ayrıca akış sitometre ile trombosit subpopülasyonlarının yanıtlarını ayrı ayrı değerlendirmek mümkündür. B-TG veya PF-4 ölçümleri ile trombosit aktivasyonlarının değerlendirilmesi bu olanağı sağlayamamaktadır. Birçok fizyolojik ve patolojik durumda akış sitometre ile trombosit yüzeyi üzerindeki antijenik yapılar tanınarak trombositlerin idantifikasyonu yapılabilmekte, aktivasyon durumları ve agonistler ile uyarıldıkları zaman gösterdikleri aggregasyon yanıtları incelenebilmektedir.

2.8.3. 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 oluşturmaktadır. Trombositler agregelerde 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 (91).

2.8.3.1. GP IIb-IIIa kompleksinde ve fibrinojen molekülünde olan değişiklikler

Trombosit aktivasyonu sırasında GP IIb-IIIa kompleksinde olan değişiklikler bir kaç yolla gösterilebilir. Örneğin aktive hale gelmiş GP IIb-IIIa kompleksine karşı geliştirilmiş olan monoklonal antikolar (PAC-1) aracılığı ile (92), ya da aktivasyon sonucu GP IIb-IIIa kompleksine yapışan fibrinojen molekülü, anti-fibrinojen poliklonal veya monoklonal antikolar ile saptanabilir (93). 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 antikolar ile gösterilmesi de mümkündür (94, 95).

Aktive olmuş GP IIb-IIIa kompleksine bağlandığı zaman fibrinojen molekülünün kendisinde de şekil değişikliği olmaktadır. Bu yeni değişikliği saptayabilen monoklonal antikoların kullanılması ile aktive olmuş trombositlere yapışmış olan fibrinojenin, plazmadaki fibrinojenden bağımsız olarak görülmesi mümkündür (86).

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 antikolar ile de aktive trombositlerin saptanması mümkündür (95).

2.8.3.2. Alfa granül membran antijenlerinin gösterilmesi

Trombosit aktivasyonunun gösterilmesi, degranülasyon sonucu trombosit yüzeyinde beliren granül membran antijenlerinin saptanması yoluyla da yapılabilmektedir. GMP-140 (granule membrane protein) bunlar içinde ilk tanımlanan antijenlerden birisi olup PADGEM (platelet activation dependent granule external membrane), CD 62 antijen ve P-selektin olarak da adlandırılmaktadır (96,97). GMP-140 alfa granüllerin membranları üzerinde bulunmaktadır. Ayrıca yoğun granüllerin membranları üzerinde de gösterilmiştir (98) İstirahat durumundaki trombositlerin yüzeyinde 1000 molekülden daha az sayıda iken, trombosit aktivasyonu ile hücre başına 10 000 molekülün üzerine çıkmaktadır (99, 100). Selektinler ailesinin bir üyesi olan P-selektin, ELAM-1 (E-selektin) ve lenfosit homing reseptör (L-selektin) gibi bir adezyon molekülüdür (97-101). Nötrofiller ve monositler için yapışma yeri olan p-selektinin aktive trombositlerin RES hücreleri tarafından dolaşımdan uzaklaştırılmasında rol oynadığı düşünülmektedir(101).

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(101)

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 (102)

2.8.3.3. Lizozom membran antijenlerinin gösterilmesi

Trombositlerdeki lizozomların membranlarında bulunan GP-53 veya CD63 olarak bilinen bir glikoproteininde trombosit aktivasyonu ile hücre zarında ekspresyonu artmaktadır (93) Fonksiyonu tam olarak bilinmeyen bu proteine diğer hücrelerde ve tümör hücrelerinde de rastlanabilmektedir (104).

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

2.8.3.4.Yoğun cisimcik membran antijenlerinin gösterilmesi

Granulophysin yoğun granül membranında bulunan ve trombosit aktivasyonu ile ekspresyonu artan diğer bir antijendir (97).

2.8.3.5.GP-Ib ekspresyonundaki azalışın saptanması

Trombin ile oluşan trombosit aktivasyonu sırasında, yüzeye bağlanan kanaliküler 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 (103).

Tüm bu yöntemler, trombosit aktivasyonundaki küçük değişikliklerin duyarlı bir göstergesidirler ve bu nedenle in vitro koşullarda trombosit aktivasyonunun gösterilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

2.9. TROMBOSİT FONKSİYON ANALİZÖRÜ (PFA-100)

PFA -100 in vitro olarak stimüle edilen vasküler hasar sonrası oluşmuş trombosit adezyon ve agregasyonu olaylarını test eden bir alettir. PFA-100 sistemi ile kazanılmış, konjenital, veya trombositleri inhibe eden ilaçlara bağlı trombosit disfonksiyonu saptanmaya çalışılmaktadır. Trombosit disfonksiyonu ile ilişkili olan durumlar üremi, von Willebrand hastalığı (vWD), asetil salisilik asid ve benzeri ajanların kullanımına bağlı olabilir (105).

PFA-100 sistemi ile küçük volümdeki antikoagüle tam kanla trombosit fonksiyonlarının hızlı bir şekilde değerlendirilebilir PFA-100' ün tek kullanımlık kartuşlarında belli sayıda kapillerden oluşan bir yapı, kan örneğinin konulduğu bir rezervuar ve orta bölümde bir membran bulunmaktadır. Trombositler yüksek gerilim altında, kan rezervuarından kapillerlere doğru membrandan geçecek şekilde aspire

edilirler. Membran subendotelyal bir protein olan ve trombositlerin kolayca yapışabildikleri kollagen ile kaplıdır. Membrandan geçerken trombositlerin kollagene yapışması trombosit aktivasyonu için fizyolojik bir uyarı olmaktadır. Ek olarak membran, agregometre testlerinde trombositleri aktive etmek için sıklıkla kullanılan kollagenin fizyolojik agonistleri epinefrin veya ADP ile kaplıdır. PFA-100 testinin başlangıcında Trigger Solüsyon ile önce membran yıkanır. Test esnasında trombositler kollagenle kaplı membrana yapışırlar. Sonra agregometride olduğu gibi trombositler ADP veya epinefrinle karşılaşınca aktive olarak granül içeriklerini boşaltırlar ve agregatlar oluştururlar. PFA-100 sisteminde, trombositlerin agregasyonu ile membranda trombosit tıkaçı oluşur ve kan akımı giderek azalarak durur. PFA-100 cihazı, testin başlamasından membranın trombosit tıkaçı ile tıkanması arasında geçen zamanı ölçer ve bu aralığı kapanma zamanı (Closure Time) olarak bildirir. Kapanma zamanı analize edilen tam kan örneğinde trombosit fonksiyonlarının bir göstergesidir. Beklendiği gibi, PFA-100 sisteminde trombosit tıkaçı oluşumu trombosit sayısının ve/veya aktivitesinin düşüklüğünden , yetersiz plazma von Willebrand faktör aktivitesinden ve hematokritten etkilenir (106-108).

Kollagen/epinefrin (COL/EPI) test kartuşu intrinsik trombosit bozukluğu sonucu oluşan trombosit disfonksiyonunu, von Willebrand hastalığını veya trombosit inhibitörü ajanlarla karşılaşılması durumlarını tespit eden bir kartuşdur.

Kollagen/ADP (COL/ADP) test kartuşu, COL/EPI test kartuşu ile elde edilen anormal sonucun, asetil salisilik asid veya diğer medikasyonlara bağlı olup olmadığını test etmek için kullanılmaktadır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.ÇALIŞMA GRUBU

Bu çalışma Antalya Özel Olbia Dializ Merkezi'nde düzenli hemodiyaliz programında olan ve yaşları 20 ile 76 (ortanca 54/yıl) arasında değişen 21 kadın, 24 erkek toplam 45 kronik böbrek yetmezliği hastasında yapıldı. Hastalarla ilgili demografik veriler tablo-2'de gösterildi. Hastaların hiç birinde ailede kanamalı hastalık, splenektomi öyküsü ve son 10 gün içinde trombosit fonksiyonlarını etkileyecek bir ilaç kullanımı (aspirin ve NSAİ) yoktu. Son 10 gün içinde infeksiyöz veya inflamatuvar bir komplikasyon geçiren hastalar çalışma kapsamına alınmadı. Hastalarda hemodializ işlemi 3 5-5 saatlik seanslar şeklinde haftada 3 kez arteriyovenöz fistül veya kateter üzerinden ve selüloz membranlar (selüloz diasetat veya hemofan) kullanılarak yapılmakta idi. Hastaların 36 tanesi eritropoetin kullanırken, 9 tanesi kullanmıyordu. Hastalardan kan örnekleri, hemodializ işleminden hemen önce ve işlem sonrasında olmak üzere 21 gauge iğne ile turnike uygulanmaksızın, fistül veya kateter olmayan koldan 2 cc hacimli K3 EDTA ve 3 adet 1.8 cc hacimli %3 8 oranında sodyum sitrat içeren vakumlu tüplere alındı. Tüm analizler kan örneklerinin alınmasından sonra en geç 2 saat içerisinde gerçekleştirildi.

TABLO 2.Hastaların demografik verileri

Yaş (yıl) Ortanca (min-max)	54 (20-76)
Cins (erkek/kadın)	24/21
Sigara içen/içmeyen	7/38
Hemodializ süresi (ay) Ortanca (min-max)	31 (2-123)
Eritropoietin dozu (ünite/hafta) Ortalama ± SD	10777 ± 3546
PTH (pg/mL) Ortalama ± SD	279.6 ± 376.5
Ferritin (ng/mL) Ortalama ± SD	546.8 ± 486.6

3.2.TAM KAN SAYIMI

Tam kan sayımı Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda bulunan Cell-dyne 3700, Abbott otomatik tam kan sayım cihazı kullanılarak çiftli çalışma ilkeleri ile yapıldı.

3.3.TROMBOSİT FONKSİYON ANALİZÖRÜ

Hemodiyaliz işlemi öncesi ve sonrasında alınan sitratlı kan örneklerinde trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesi için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan Dade Behring marka PFA-100 cihazı (Dade Behring PFA-100, Dade Behring Inc., Newark/USA) kullanıldı. Bu amaçla aynı üretici firma tarafından hazırlanan kollogen/epinefrin (Dade PFA Collagen/Epinephrine (COL/EPI) Test Cartridge, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg/Germany) ve kollogen/ADP (Dade PFA Collagen/ADP (COL/ADP) Test Cartridge, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg/Germany) kartuşları kullanılarak kapanma zamanları (closure time) ölçüldü. Laboratuvarın normal referans değerleri COL/EPI için 85-165 sn, COL/ADP için 71-118 sn olarak kabul edildi.

3.4.MONOKLONAL ANTİKORLAR

Akış sitometresi ile yapılan ölçümlerde incelen partiküllerin trombosit olduklarının gösterilmesi amacıyla insan trombosit glikoprotein IIb-IIIa kompleksi antijenine karşı geliştirilmiş olan mouse monoklonal antikor (anti-CD41-FITC, Immunotech) kullanıldı.

Aktive trombositlerin saptanması amacıyla insan trombosit CD-62 (p-selektin) antijenine karşı geliştirilmiş olan ters renk floresan ile direkt olarak bağlı mouse monoklonal antikor (anti-CD62-PE, Immunotech) kullanıldı.

3.5.AKIŞ SİTOMETRİK ANALİZ

Trombosit aktivasyon analizleri Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan akış sitometre cihazı (Epics XL-MCL, Coulter Electronics INC., FL, USA) kullanılarak gerçekleştirildi.

Akış sitometrisi ile yapılacak analizler için tam kan yöntemi kullanıldı. Kan örnekleri, hastalardan alınmasını takiben en geç 30 dakikalık süre içinde laboratuvara ulaştırıldı ve 5µL kan örneği, 50µL HEPES-buffered saline (HPS) (0.145 mol/L NaCl, 5×10^{-3} mol/L KCL, 1×10^{-3} mol/L MgSO₄, 0.01 mol/L HEPES, pH 7.4) ve 5µL monoklonal antikor (anti-CD41-FITC veya anti-CD62-PE veya negatif izotopik 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 formaldehyde) konularak trombositler dilue ve fikse edildi. En geç 2 saat içinde akış sitometresi ile ölçümler yapıldı.

Akış sitometresi 15 mikron çapındaki boncuklar (Immunocheck, Coulter Electronics, Inc., FL, USA) ile kalibre edildikten sonra tam kan yöntemi ile hazırlanan örnekler cihaza verildi. Parçalanmış hücre artıkları ve elektronik kirlilik ön saçının (forward scatter) üzerinde ayarlama yapılarak uzaklaştırıldı. Öncelikle trombositler büyüklük ve granülaritelerine göre hücrelerin dağılımlarını gösteren ön (forward) ve 90 derecelik yan saçınım (right angle light scutter) histogramı kullanılarak, eritrosit ve lökositlerden ayrıldı ve trombositler ile ilgili analizler belirlenen bu bölge üzerinde gerçekleştirildi. Analiz bölgesindeki partiküllerin en az % 98'inin CD41 taşıdığı gösterildi (CD41 pozitif partikül yüzdesi). Aktive trombosit oranının saptanması için analiz bölgesindeki partiküllerden negatif izotopik kontrolün floresansında daha yoğun anti-CD62-PE floresans gösterenlerin total partikül içerisindeki yüzdesi (CD62 pozitif trombosit yüzdesi) saptandı. CD62 floresans yoğunluğu, yani trombosit başına düşen ortalama CD62 molekül miktarının indirekt bir göstergesi olarak ortalama kanal numarası (mean channel number) kullanıldı.

3.6.İSTATİSTİK

İstatistik analizler SPSS hazır istatistik paket programı (SPSS for Windows, Version 10.0, SPSS inch., IL, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Hemodializ öncesi ve sonrası gözlenen değişikliklerin değerlendirilmesinde non-parametrik "Wilcoxon's signed-rank test" veya "Shapiro-Wilks" testi ile normal dağılım özelliğinin sağlanması koşulunda "paired t-test" kullanıldı. Korelasyonlar için "Spearman's rank correlation coefficients" kullanıldı. 0.05'den küçük "p" değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

4.SONUÇLAR

1. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda hemodiyaliz işlemi öncesinde ortalama (\pm SD) 10.5 ± 1.6 g/dL olan hemoglobin konsantrasyonu ve 0.32 ± 0.05 olan hematokrit oranının işlem sonrasında anlamlı olarak artarak sırası ile 11.4 ± 2.1 ve 0.35 ± 0.7 düzeylerine ulaştığı saptandı ($p < 0.001$). (Tablo 3)
2. Hastaların hemodializ işlemi öncesindeki ortalama (\pm SD) trombosit sayıları ($202 \pm 61 \times 10^9/L$) ve trombosit volümleri (9.06 ± 1.78 fL) ile hemodializ işlemi sonrasındaki ortalama trombosit sayıları ($239 \pm 132 \times 10^9/L$) ve trombosit volümleri (8.85 ± 1.17 fL) karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik izlenmedi ($p > 0.05$). (Tablo 3)
3. Akış sitometri sonuçları
 - a. Trombosit yüzeyinde eksprese olan CD41 antijen yoğunluğunun indirekt bir göstergesi olan ortalama kanal numarasının hemodializ öncesi ortalama (\pm SD) 4.39 ± 1.08 olan değerden işlem sonrasında anlamlı olarak azalarak 3.95 ± 1.28 değerine düştüğü saptandı ($p < 0.005$). (Tablo.4)
 - b. Hastalarda CD62 ekspresyonunu gösteren aktive trombosit yüzdesinin de hemodializ işlemi sonrasında (0.22 ± 0.17) öncesine göre (0.30 ± 0.20) azaldığı belirlendi ($p < 0.001$). (Tablo.4)
 - c. Hastalarda hemodializ işlemi öncesindeki her bir trombosit başına düşen p-selektin molekül yoğunluğunun bir göstergesi olan CD62 ortalama kanal numaraları (1.77 ± 0.56) ile hemodializ sonrasındaki CD62 ortalama kanal numaraları (1.76 ± 0.67) karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik izlenmedi ($p = 0.870$). (Tablo.4)

4. PFA sonuçları

- a. Hastaların PFA-100 cihazı ile ölçülen hemodializ öncesindeki ortalama (\pm SD) kollogen/epinefrin kapanma zamanının (236.2 ± 60.3 sn) hemodializ sonrasında anlamlı (210.0 ± 62.9 sn) olarak azaldığı saptandı ($p=0.043$). (Tablo 5)
 - b. Hastaların hemodializ öncesindeki kollogen/ADP kapanma zamanları (179.2 ± 68.7 sn) ile hemodializ sonrası kollogen/ADP kapanma zamanları (170.0 ± 70.5 sn) karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik izlenmedi ($p=0.501$). (Tablo 5)
 - c. Hemodializ öncesinde hastaların 7 (%16) 'sinde kollogen/epinefrin kapanma zamanı normal sınırlarda iken, 38 (%84) 'inde uzun olduğu saptandı. Kapanma zamanı uzun olan 38 hastanın 10 (%26) 'unda hemodializ sonrası bu sürenin normale geldiği görüldü. Hastaların 14 (%36) 'ünde ise hemodializ sonrası kapanma zamanlarının belirgin olarak azaldığı ancak normal sınırlara inmediği görüldü.
 - d. Hemodializ öncesinde hastaların 10 (%23) unda kollogen/ADP kapanma zamanı normal sınırlarda iken, 35 (%77) 'inde uzun olduğu saptandı. Kapanma zamanı uzun olan 35 hastanın 8 (%22) 'ında hemodializ sonrası bu sürenin normale geldiği görüldü. Hastaların 14 (%40) 'ünde ise hemodializ sonrası kapanma zamanlarının belirgin olarak azaldığı ancak normal sınırlara inmediği görüldü.
5. Hemodializ işlemi öncesi ve sonrasında kollagen/epinefrin ile kollagen/ADP arasında anlamlı pozitif korelasyon olduğu saptandı ($p<0.05$) (Tablo 6).

Tablo 3. Hastaların hemodiyaliz işlemi öncesi ve sonrasındaki hemogram verileri

	Dializ öncesi Ortalama \pm SD Ortanca (min- max)	Dializ sonrası Ortalama \pm SD Ortanca (min- max)	P değeri
Hemoglobin (g/dl)	10.5 \pm 1.6 10.6(7.3-13.8)	11.4 \pm 2.1 11.4(8.1-15.4)	<0.001
Hematokrit (%)	32.4 \pm 5.1 32.2(22.2-43.2)	35.2 \pm 6.9 34.5(24.4-50.4)	<0.001
Trombosit sayısı ($\times 10^9/L$)	201 \pm 61 192 (90-420)	239 \pm 131 214(71-900)	0.116
Trombosit volumu (fL)	9.06 \pm 1.78 8.41(7-15)	8.85 \pm 1.17 8.77(6.71-11.10)	0.597

Tablo4. Hastaların hemodiyaliz işlemi öncesi ve sonrasında akış sitometresi ile ölçülen trombosit aktivasyon göstergeleri

	Dializ öncesi Ortalama \pm SD Ortanca (min- max)	Dializ sonrası Ortalama \pm SD Ortanca (min- max)	P değeri
CD41 MCN	4.39 \pm 1.08 4.71(2.26-6.42)	3.95 \pm 1.28 4.02(1.61-6.95)	0.005
CD62 (%)	0.30 \pm 0.20 0.30 (0.02-0.58)	0.22 \pm 0.17 0.20 (0.02-0.55)	0.001
CD62 MCN	1.77 \pm 0.56 1.64(1.09-3.12)	1.76 \pm 0.67 1.71(1.02-4.46)	0.870

Tablo 5. Hastaların hemodiyaliz işlemi öncesi ve sonrasında PFA ile ölçülen trombosit fonksiyon göstergeleri

Kapanma zamanı (sn)	Dializ öncesi Ortalama \pm SD Ortanca (min- max)	Dializ sonrası Ortalama \pm SD Ortanca (min- max)	P değeri
Kollogen/epinefrin (sn)	236 \pm 60 247 (96 - 300)	210 \pm 63 191 (93 - 300)	0.043
Kollogen/ADP (sn)	179 \pm 69 157 (83-300)	170 \pm 70 155 (55 - 300)	0.501

Tablo 6. Hemodializ öncesi PFA ile ölçülen kapanma zamanları arasındaki korelasyonlar

	Kollogen/ epinefrin	Kollogen/ ADP
Kollogen/ Epinefrin		r= 0.292 p= 0.05 *
Kollogen/ ADP	r= 0.292 p= 0.05 *	

Tablo 7. Hemodializ sonrası PFA ile ölçülen kapanma zamanları arasındaki korelasyonlar

	Kollogen/ epinefrin	Kollogen/ ADP
Kollogen/ Epinefrin		r= 0.298 p= 0.047 *
Kollogen/ ADP	r= 0.298 p= 0.047 *	

5.TARTIŞMA

Kronik böbrek yetmezliğinde hemostatik sistemde izlenen değişikliklerin birçok faktöre bağlı olduğu bilinmektedir (6,7). Bu anormalliklerde trombositlere ait nicel yada nitel bozuklukların önemli bir yer tuttuğu bir çok çalışmada gösterilmiştir (2,5) Bu hastaların trombosit fonksiyonlarında izlenen bozukluklardan artmış üremik toksinlerin yanısıra trombositlerin dializ işleminde yabancı yüzeylerle temas etmesi, kullanılan ilaçlar gibi birçok faktör sorumlu tutulmaktadır.

Amonyak detoksifikasyonu için alternatif bir yol tarafından üretilen guanidinosüksinik asit üremili hastalarda trombosit fonksiyonlarını bozan en önemli üremik toksinlerden biridir. Bu hastalara tedavi amacı ile uygulanan periton yada hemodializ işlemlerinin kandan guanidinosüksinik asidi uzaklaştırarak, üremik plasmanın trombositler üzerine olan inhibitör etkisini azalttıkları gösterilmiştir (8). Üremik trombositlerin, normal plazma ile inkübasyonu sonrasında fonksiyonlarının normaleştiğini gösteren in vitro çalışmaların varlığı da üremik toksinlere maruz kalma sonucunda trombosit fonksiyonlarında bozulma oluştuğu görüşünü desteklemektedir (22).

Bir tür ekstrakorporeal dolaşım olan hemodiyaliz işleminde trombositler yabancı yüzeyler ile temas etmektedir. Bu yüzeylerin biyolojik uygunluklarındaki farklılıklara bağlı olarak trombosit aktivasyonunda değişik dializ membranlarının önemli katkıları olduğu gösterilmiştir (109,110). Özellikle selülozik membranların sentetik membranlara göre daha fazla trombosit aktivasyonuna yol açtığı bildirilmektedir (111).

Trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanılan en hassas yöntemlerin başında trombositlerin agonistlere karşı gösterdikleri agregasyon yanıtlarının ve trombosit yüzeyinde eksprese edilen glikoproteinlerin saptanması yer almaktadır. Bizim çalışmamızda hemodiyaliz işleminin trombosit aktivasyonu üzerine etkisinin saptanması için diyaliz işleminin öncesi ve sonrasında akış sitometresi ile bir aktivasyon göstergesi olan trombosit yüzeyindeki CD62 molekül ekspresyonu

incelenmiştir. Trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesinde ise yeni bir yöntem olan "platelet function analyser" kullanılmıştır.

Hastalarımızda dializ işlemi öncesinde trombosit yüzeyinde eksprese edilen CD62 oranının normalden yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durum üremik toksinlerin trombositleri aktive etmesi ile açıklanabilir. Literatürde bizim bulgularımızda olduğu gibi üremik hastalarda trombosit aktivasyonunun arttığını gösteren bir çok çalışma bulunmaktadır (112). Çalışmamızda diyaliz öncesi yüksek olan CD62 oranının diyaliz sonrası anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır ($p=0.001$). Hemodiyaliz işlemi sırasında yabancı yüzeylerle temas eden trombositler yanında lökositlerin de aktive olduğu ve aktive trombositlerin lökositlere yapışarak lökosit-trombosit agregatları oluşturduğu bilinmektedir (109). Ek olarak aktive trombositlerin eritrositler ile agregatlar oluşturduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (112). Bizim çalışmamızda hemodiyaliz işlemi sonrasında aktive trombosit oranında artış saptanmaması yeni selülozik membranların daha bio-uyumlu olmaları nedeni ile trombositleri aktive etmemelerine yada aktivasyon yapıyor olsalar bile aktive trombositlerin yabancı yüzeylere, endotele ve diğer kan hücrelerine yapışmaları ve/veya RES hücreleri tarafından selektif olarak dolaşımdan uzaklaştırılmaları ile açıklanabilir. Hemodializ işlemi ile trombosit aktivasyonunun arttığını bildiren bazı çalışmalar ile sonuçlarımızın çelişiyor gibi görünmesi bu durumun daha çok yöntem farklılıklarından kaynaklandığını düşündürmektedir. Bu çalışmada akış sitometresi analizleri için tam kan yönteminin kullanılmış olması, trombositlerin olduğunca doğal ortamları içinde incelenmesine izin vermiş ve bu şekilde trombositlerin ayrıştırılarak analiz edildiği çalışmalarda izlenen yabancı aktivasyonlardan kaçınılması sağlanmıştır. Ayrıca, trombositlerin lökosit ve eritrositler ile yaptıkları agregatların analiz bölgesi dışında olmaları aktive trombosit oranının düşük olarak saptanmasına yol açmıştır. Ek olarak, trombositlerde eksprese edilen CD41 molekülünün yoğunluğunun indirekt bir göstergesi olan CD41 ortalama kanal numarasını diyaliz işlemi sonrasında azalmış olarak bulmamız da dolaşan kandaki trombositlerin aktif olmadığını desteklemektedir.

Üremik hastalarda trombosit fonksiyonlarının bozulduğunu ve bunun bir göstergesi olarak kanama zamanının uzadığını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (1,2,5,24). Bu hastalarda trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerden biri trombositlerin ADP, kollagen, trombin, epinefrin gibi

agonistlere karşı gösterdikleri agregasyon yanıtlarının optik veya impedans agregometreleri ile ölçümüne dayanmaktadır. Daha önce yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğunda üremik hastalarda agregasyon yanıtlarının bozulduğu ve bu durumun düzenli diyaliz tedavisi ile düzeldiği belirtilmektedir (21,113). Bildiğimiz kadarı ile İngilizce literatürde yayınlanmış hemodiyaliz işlemi sırasında trombosit fonksiyonlarının yeni bir yöntem olan PFA cihazında COL/EPI ve COL/ADP kartuşları ile kapanma zamanlarının ölçülerek değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. PFA yönteminin klasik agregasyon yöntemlerinden başlıca farkı uygulamanın kolay, otomatik, kısa süreli ve ekonomik olması yanında değerlendirmenin de objektif ve basit oluşundan kaynaklanmaktadır. Cihazı kullanmak için özel eğitilmiş bir kişi gerekmemektedir. Ayrıca optik agregasyon cihazlarında olduğu gibi trombosit zengin plazma hazırlanmasının gerekmemesi, trombositlerde işleme bağlı uygunsuz agregasyon yanıtlarının oluşmasını da engellemektedir. Bizim hastalarımızda da bozulmuş olan primer hemostazın bir göstergesi olarak hemodiyaliz işlemi öncesinde COL/EPI ve COL/ADP kapanma zamanlarının sırası ile % 84 ve % 77 hastada normalden uzun olduğu saptanmıştır. Hemodiyaliz işlemi sonrasında bu hastaların büyük bir çoğunluğunda uzamış olan kapanma zamanları önemli ölçüde azalmış ve yaklaşık % 25 hastada normale dönmüştür. Bu durum hemodiyaliz işlemi ile uzaklaştırılan üremik toksinlerin trombositler üzerinde oluşturduğu olumsuz etkilerin ortadan kalkmasına ve kronik aktivasyonları nedeni ile granül içeriğini yitiren tükenmiş (exhausted) aktive trombosit oranının azalmasına bağlı olabilir. Hastalarımızda hemodiyaliz işlemi sonrasında CD62 ekspresyonu olan trombosit oranının azalması ve hemokonsantrasyona rağmen trombosit sayısının artmaması, dolaşımdan selektif olarak aktive trombositlerin uzaklaştırıldığını desteklemektedir.

Sonuç olarak; yaptığımız bu çalışmada, kronik böbrek yetmezlikli hastalarda hemodializin işleminin dolaşımda aktive trombosit sayısında artışa yol açmadığı ve trombosit fonksiyonlarını düzelttiği gösterilmiştir. Ayrıca, kronik böbrek yetmezlikli hastalarda trombosit fonksiyonlarını değerlendirmek için, PFA-100 cihazının güvenli ve kolay yöntem olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir. Ancak üremik hastalarda trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesinde PFA ile birlikte diğer yöntemlerle yapılan fonksiyonel çalışmaların karşılaştırmalı olarak yapılması, PFA yönteminin yerinin belirlenmesine katkıda bulunacaktır.

6.ÖZET

Kronik böbrek yetmezliğinde hemostatik sistemde izlenen değişikliklerin birçok faktöre bağlı olduğu bilinmektedir. Bu anormalliklerde trombositlere ait nicel yada nitel bozuklukların önemli bir yer tuttuğu bir çok çalışmada gösterilmiştir. Bu hastaların trombosit fonksiyonlarında izlenen bozukluklardan artmış üremik toksinlerin yanısıra trombositlerin dializ işlemi sırasında yabancı yüzeylerle temas etmesi, kullanılan ilaçlar gibi birçok faktör sorumlu tutulmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda tek bir hemodiyaliz işleminin trombosit aktivasyonu ve fonksiyonları üzerine olan etkisinin akış sitometresi ve PFA yöntemleri kullanılarak değerlendirilmesidir. Bildiğimiz kadarı ile İngilizce literatürde yayınlanmış hemodiyaliz işlemi sırasında trombosit fonksiyonlarının yeni bir yöntem olan PFA cihazında COL/EPI ve COL/ADP kartuşları ile kapanma zamanlarının ölçülerek değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışma düzenli hemodiyaliz programında olan ve yaşları 20 ile 76 (ortanca 54/yıl) arasında değişen 21 kadın, 24 erkek toplam 45 kronik böbrek yetmezliği hastasında yapılmıştır. Hemodiyaliz öncesi ve sonrasında alınan kan örneklerinde akış sitometresi ile trombositlerin CD62 ekspresyonları ölçülmüş ve PFA cihazı ile adezyon ve agregasyon yanıtları değerlendirilmiştir. Hastalarımızda dializ işlemi öncesinde trombosit yüzeyinde eksprese edilen CD62 oranının normalden yüksek olduğu ve bu oranın diyaliz sonrası anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır ($p=0.001$). Hastalarda bozulmuş olan primer hemostazın bir göstergesi olarak hemodiyaliz işlemi öncesinde COL/EPI ve COL/ADP kapanma zamanlarının sırası ile % 84 ve % 77 oranında normalden uzun olduğu saptanmıştır. Hemodiyaliz işlemi sonrasında bu hastaların büyük bir çoğunluğunda uzamış olan kapanma zamanları önemli ölçüde azalmış ve yaklaşık % 25 hastada normale dönmüştür.

Bizim çalışmamızda hemodiyaliz işlemi sonrasında aktive trombosit oranında artış saptanmaması yeni selülozik membranların daha bio-uyumlu olmaları nedeni ile trombositleri aktive etmemelerine yada aktivasyon yapıyor olsalar bile

aktive trombositlerin yabancı yüzeylere, endotele ve diğer kan hücrelerine yapışmaları ve/veya RES hücreleri tarafından selektif olarak dolaşımdan uzaklaştırılmaları ile açıklanabilir. Ayrıca dializ öncesi uzamış olan kapanma zamanlarının dializ sonrası önemli ölçüde kısalması hemodiyaliz işlemi ile uzaklaştırılan üremik toksinlerin trombositler üzerinde oluşturduğu olumsuz etkilerin ortadan kalkmasına ve kronik aktivasyonları nedeni ile granül içeriğini yitiren tükenmiş (exhausted) aktive trombosit oranının azalmasına bağlı olabilir.

Sonuç olarak; yaptığımız bu çalışmada, kronik böbrek yetmezlikli hastalarda hemodializin işleminin dolaşımda aktive trombosit sayısında artışa yol açmadığı ve trombosit fonksiyonlarını düzelttiği gösterilmiştir. Ayrıca, kronik böbrek yetmezlikli hastalarda trombosit fonksiyonlarını değerlendirmek için, PFA-100 cihazının güvenli ve kolay yöntem olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Ancak üremik hastalarda trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesinde PFA ile birlikte diğer yöntemlerle yapılan fonksiyonel çalışmaların karşılaştırmalı olarak yapılması, PFA yönteminin yerinin belirlenmesine katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

1. Lewis JH, Zucker MB, Ferguson JH. Bleeding tendency in uremia. *Blood* 1956; 11: 1073.
2. Eknayan G, Wacksman SJ, Glueck HI, et al. Platelet function in renal failure. *N Engl J Med* 1969; 280: 677.
3. Steward JH, Castaldi PA. Uraemic bleeding: A reversible platelet defect corrected by dialysis. *Q J Med* 1967; 36: 409.
4. Nenci GG, Berrettini M, Agnelli G, et al. The effect of peritoneal dialysis, hemodialysis and kidney transplantation on blood platelet function. *Nephron* 1979; 23: 287.
5. Livio M, Benigni A, Remuzzi G. Coagulation abnormalities in uremia. *Semin Nephrol* 1985; 5: 82.
6. Eberst ME, Berkowitz LR. Hemostasis in renal disease: Pathophysiology and management. *Am J Med* 1994; 96: 168.
7. Rabelink TJ, Zwaginga JJ, Koomans HA, Sixma JJ. Thrombosis and hemostasis in renal disease. *Kidney Int* 1994; 46: 287.
8. Horowitz HI, Bronx NY. Uremic toxins and platelet function. *Arch Intern Med* 1970; 126: 823.
9. Cohen BD, Stein IM, Bonas JE. Guanidinosuccinic aciduria in uremia. *Am J Med* 1968; 45:63.
10. 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.
11. Heisteringer M, Stokenhuber F, Schneider B, et al. Effect of conjugated estrogens on platelet function and prostacyclin generation in chronic renal failure. *Kidney Int* 1990; 38: 1181.
12. Schmitt GW, Moake JL, Rudy CK, Vicks SL, et al. Alterations in hemostatic parameters during hemodialysis with dialyzers of different membrane composition and flow design. Platelet activation and factor VIII-related von Willebrand factor during hemodialysis. *Am J Med* 1987; 83: 411.

13. Ward RA Effects of haemodialysis on coagulation and platelets: are we measuring membrane biocompatibility? *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10 Suppl 10: 12-17
14. Livio M, Gotti E, Marchesi D, et al Uremic bleeding: Role of anemia and beneficial effect of red cell transfusion *Lancet* 1982; 2: 1013.
15. Fernandez F, et al. Low haematocrit and prolonged bleeding time in uraemic patients: effect of red cell transfusion *Br J Haematol* 1985; 59: 139-48.
16. Escolar G, cases A, Bastida E, et al. Uremic platelets have a functional defect affecting the interaction of von Willebrand factor with glycoprotein IIb-IIIa. *Blood* 1990; 76:1336
17. Warrell RP Jr, Hultin MB, Collier BS. Increased factor VIII/von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor activity in renal failure. *Am J Med* 1979; 66: 226
18. Deguchi N, Ohigashi I, Tazaki H, Handa M, Ikeda Y. Haemodialysis and platelet activation *Nephrol Dial Transplant* 1991; 2: 40.
19. Reverter JC, Escolar G, Sanz C, Cases A, et al. Platelet activation during hemodialysis measured through exposure of p-selectin: Analysis for flow cytometric and ultrastructural techniques. *J Lab Clin Med* 1994; 124:79.
20. Remuzzi G, Benigni A, Dodesini P, et al. Platelet function in patients on maintenance hemodialysis: Depressed or enhanced? *Clin Nephrol* 1982; 17:60.
21. Sreedhara R, Itagaki I, Lynn B, Hakim RM. Defective platelet aggregation in uremia is transiently worsened by hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 1995; 25: 555
22. Noris M, Remuzzi G Uremic bleeding: Closing the circle after 30 Years of controversies ? *Blood* 1999; 94: 2569.
23. Remuzzi G: Bleeding in renal failure. *Lancet* 1988; 1: 1205.
24. Steiner RW, Coggins C, Carvalho ACA. Bleeding time in uremia: A useful test to assess clinical bleeding. *Am J Hematol* 1979; 7: 107.
25. Benigni A, Boccardo P, Galbusera M, et al. Reversible activation defect of the platelet glycoprotein IIb-IIIa complex in patients with uremia. *Am J Kidney Dis* 1993; 22: 668.
26. Di Minno G, Martinez J, McKean M, et al Platelet dysfunction in uremia Multifaceted defect partially corrected by dialysis. *Am J Med* 1985; 79:552.
27. Himmelfarb J, Holbrook D, Mcmonagle E, Ault K. Increased reticulated platelets in dialysis patients *Kidney Int* 1997; 51: 834.

28. Eknayan G, Brown CH. Biochemical abnormalities of platelets in renal failure. Evidence for decreased platelet serotonin, adenosine diphosphate and Mg-dependent adenosine triphosphatase. *Am J Nephrol* 1981; 1: 17.
29. Remuzzi G, Benigni A, Dodesini P, et al. Reduced platelet thromboxane formation in uremia. Evidence for a functional cyclooxygenase defect. *J Clin Invest* 1983; 71: 762
30. Kazatchkine N, Sultan Y, Caen JP, et al. Bleeding in renal failure: A possible cause. *Br Med J* 1976; 2: 612
31. Remuzzi G, Livio M, Roncaglioni MC, et al. Bleeding in renal failure: is von Willebrand factor implicated? *Br Med J* 1977; 2: 359
32. Remuzzi G, Bertani T, Mecca G, et al. Factor VIII-related protein on vascular intima of patients with chronic renal failure and prolonged bleeding times. *Br Med J* 1978; 1: 70
33. Gura V, Creter D, Levi J. Elevated thrombocyte calcium content in uremia and its correction by alpha (OH) vitamin D treatment. *Nephron* 1982; 30: 237-9.
34. Ware JA, Clark BA, Smith M, Salzman EW. Abnormalities of cytoplasmic Ca^{++} in platelets from patients with uremia. *Blood* 1989; 73: 172-6
35. Remuzzi G, Benigni A, Dodesini P, et al. Parathyroid hormone inhibits human platelet function. *Lancet* 1981; ii: 1321-3.
36. Vigano G, Gotti E, Comberti E, et al. Hyperparathyroidism does not influence the abnormal primary haemostasis in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1989; 4: 971-4.
37. Steiner RW, Coggins C, Carvalho ACA. Bleeding time in uremia: A useful test to assess clinical bleeding. *Am J Hematol* 1979; 7: 107
38. Gawaz MP, Dobos G, Spath M, et al. Impaired function of platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5: 36
39. Remuzzi G, Perico N, Zoja C, et al. Role of endothelium-derived nitric oxide in the bleeding tendency of uremia. *J Clin Invest* 1990; 86: 1768.
40. Noris M, Benigni A, Boccardo P, et al. Enhanced nitric oxide synthesis in uremia: Implications for platelet dysfunction and dialysis hypotension. *Kidney Int* 1993; 44: 445.
41. Shepherd AMM, Stewart WK, Wormsly KG. Peptic ulceration in chronic renal failure. *Lancet* 1973; i: 1357-9.

42. Margolis DM, Saylor JL, Geisse G, et al. Upper gastrointestinal disease in chronic renal failure: A prospective evaluation. *Arch Internal Med* 1978; 138: 1214-17.
43. Borra S, Kleinfeld M. Subcapsular liver hematomas in a patient on chronic hemodialysis. *Ann Intern Med* 1980; 93: 574-5.
44. Rose BD. Platelet dysfunction in uremia. *Up To Date* 2000; 8: 3.
45. Cases A, Escolar G, Reverter JC, et al. Recombinant human erythropoietin treatment improves platelet function in uremic patients. *Kidney Int* 1992; 42: 668.
46. Diaz-Ricart M, Etebanell E, Cases A, et al. Erythropoietin improves signaling through tyrosine phosphorylation in platelets from uremic patients. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1312.
47. Janson PA, Jubilier SJ, Weinstein MJ, Deykin D. treatment of the bleeding tendency in uremia with cryoprecipitate. *N Eng J Med* 1980; 303: 1318-22.
48. Mannucci PM, Remuzzi G, Pusinieri F, et al. Deamino-8-d-arginine vasopressin shortens the bleeding time in uremia. *N Eng J Med* 1983; 308: 8-12.
49. Mannucci PM. Hemostatic drugs. *N Eng J Med* 1998 ; 339: 245.
50. Zeigler ZR, Megaludis A, Fraley DS. Desmopressin effects on platelet rheology and von Willebrand factor activities in uremia. *Am J Hematol* 1992; 39:90.
51. Schrader J, Stibbe W, Kandt M, et al. Low molecular weight heparin versus standart heparin. A long term study in hemodialysis and hemofiltration patients. *ASAIO Transplantation* 1990; 36: 28-32.
52. Caruana RJ, Raya RM, Bush JV, et al. Heparin free dialysis: Comparative data and results in high risk patients. *Kidney Int* 1987; 31: 1351-5.
53. Liu Y, Kosfeld R, Marcum S. treatment of uraemic bleeding with conjugated oestrogen. *Lancet* 1984; ii : 887-90.
54. Livio M, Mannucci PM, Vigano G, et al. Conjugated estrogens for the management of bleeding associated with renal failure. *N Engl J Med* 1986; 315:731.
55. Vigano G, Gaspari F, Locatelli M, et al. Dose- effect and pharmacokinetics of estrogens given to correct bleeding time in uremia. *Kidney Int* 1988; 34: 853.
56. Sloand JA, Schiff MJ. Beneficial effect of transdermal estrogen on bleeding time and clinical bleeding in uremia. *Am J Kidney Dis* 1995; 26:22.
57. Zoja C, Noris M, Corna D, et al. L-arginine, the precursor of nitric oxide, abolishes the effect of estrogen on bleeding time in experimental uremia. *Lab Invest* 1991; 65: 479.

- 58 Lee GR, Bithell IC, Foester J, et al. Platelets and megakaryocytes, In: Lee GR, Bithell IC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, eds Wintrobe's Clinical Hematology, Ninth edition. Lea & Febiger, Philadelphia, London 1993, pp 511-39.
59. Ulutin O. The platelets: Fundamentals and Clinical Applications. Istanbul, Turkey 1976, pp 1-6
60. 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.
61. Knoll MH, Schafer AI. Biochemical mechanism of platelet activation. Blood 1989; 74: 1181-95.
62. Siess W. Molecular mechanism of platelet activation. Physiol Rev 1989; 69: 58-178
63. Baumgartner HR. Platelet interaction with vascular structures. Thromb Diath Haemorrh 1972; 51 (suppl) 161-76.
64. Page CP. The involvement of platelets in non-thrombotic processes. Trends Pharmacol Sci 1988; 9: 66-71
65. White JG: Shape change. Thromb Diath Haemorrh 1974; 60: 159-171.
66. Hantgan RR. A study of the kinetics of ADP-triggered platelet shape change. Blood 1984; 64:896-906.
67. Carroll RC, Butler RG, Morris PA, et al. Separable assembly of platelet pseudopodal and contractile cytoskeletons. Cell 1982; 30: 385-93.
68. White JG. Electron microscopic studies of platelet secretion. Prog Hemostasis Thromb 1974; 2: 49-98.
69. Ehrman M, Toth E, Frojmovic MM. A platelet procoagulant activity associated with platelet shape change. J Lab Clin Med 1978 ; 92 : 393-401
70. 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.
71. 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.
72. Walsh PN, Biggs R. The role of platelets in intrinsic factor Xa formation. Br J Haematol 1972; 22: 743-50

73. 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.
74. 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.
75. Greengard JS, Griffin JH. Receptors for high molecular weight kininogen on stimulated washed human platelets. *J Biol Chem* 1984; 259: 14721-6.
76. 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.
77. Greenberg CS, Shuman MA. Specific binding of blood coagulation factor XIIIa to thrombin-stimulated platelets. *J Biol Chem* 1984; 259: 14721-6.
78. Loskutoff DJ. Type I plasminogen activator inhibitor and its potential influence on thrombolytic therapy. *Semin Thromb Haemost* 1988; 14: 100-9.
79. Wu KK, Hoak JC. A new method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency. *Lancet* 1974; 4: 924-6.
80. Ündar L, Türkay C, Korkmaz L. Circadian variation in circulating platelet aggregates. *Ann Med* 1989; 21: 429-33.
81. 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.
82. 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.
83. 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.
84. Abrams C, Shatill SJ. Immunological detection of activated platelets and platelet derived microparticles in humans. *Blood* 1990; 75: 128-38.
85. Kaplan KL, Broekman MJ, Chernoff A, et al. Platelet alpha granule proteins: studies on release and subcellular localization. *Blood* 1979; 53: 604-18.
86. Smith JB, Ingeman C, Kocsis J, et al. Formation of prostaglandins during the aggregation of human blood platelets. *J Clin Invest* 1973; 52: 965-9.

87. 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.
88. 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.
89. Born GVR. Quantitative investigations into the aggregation of blood platelet. *J Physiol Lond* 1962; 67: 162.
90. Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: A novel device for assessing platelet behaviour in blood. *J Pharmacol Meth* 3 1980; 158:135.
91. 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.
92. 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.
93. 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.
94. 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.
95. McEver RP, Martin MN. A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J Biol Chem* 1984; 259: 9799-804.
96. 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.
97. 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.
98. 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.

- 99 Stoolman LM. Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. *Cell* 1989; 56:907-10.
100. 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
101. 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; 79:372-9.
- 102 Capitanio AM, Niewiarowski S, Rucinski B. Interaction of platelet factor 4 with human platelets. *Biochem Biophys Acta* 1985;839:161-73.
103. Aikien MI, Ginsberg MH, Plow EF. Mechanism for expression of thrombospondin on the platelet cell surface. *Semin Thromb Haemost* 1987; 13: 307-16.
104. Metzelaar MJ, Clevers HJ. Lysosomal membrane glycoproteins in platelets. *Thromb Haemost* 1992; 68: 378-82.
105. Bick R. Platelet function defects: a clinical review. *Thromb Hemost* 1992; 18: 167-185.
- 106 Kratzer MAA, Born GVR. Simulation of Primary Hemostasis in Vitro. *Haemostasis* 1985; 5: 357-362.
- 107 Kratzer MAA, Bellucini S, Caen JP. Detection of abnormal platelet function with an in vitro model of primary hemostasis. *Haemostasis*. 1985; 15: 363-370.
108. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Ostgaard RA. Characterization of an in vitro platelet function analyzer, PFA-100. *Clinical Applications in Thrombosis/Hemostasis* 1996; 2: 241-249.
109. Gawaz MP, Mujais SK, Schmidt B, et al. Platelet-leukocyte aggregates during hemodialysis: effect of membrane type. *Artif Organs* 1999; 23 (1): 29-36
110. Stuard S, Bonomini M, Settefrati N, et al. Platelet-neutrophil interactions during hemodialysis: a proposed biocompatibility approach. *Int J Artif Organs* 1998; 21(2): 75-82
111. Stuard S, Carreno MP, Poignet JL, et al. A major role for CD62P/CD15s interaction in leukocyte margination during hemodialysis. *Kidney Int* 1995; 48 (1) :93-102.

112. Sirolli V, Strizzi L, Di Stante S, et al Platelet-erythrocyte aggregates in end-stage renal disease patients on hemodialysis. *Thromb Haemost* 2001; 86(3): 834-9.
113. Zwaginga JJ, Ijsseldijk MJ, de Groot PG, et al. Treatment of uremic anemia with recombinant erythropoietin also reduces the defects in platelet adhesion and aggregation caused by uremic plasma. *Thromb Haemost* 1991; 66(6): 638-47.

ARDENIZ UNIVERSITESI
REKTÖRLÜĞÜ KÜTÜPHANESİ