

T.C.
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

142452

**FARKLI MOLEKÜL AĞIRLIĞINDAKİ HİDROKSİETİL
STARCH VE
% 0,9 İZOTONİK NaCl SOLÜZYONLARIN
TROMBOSİT AGREGASYON FONKSİYONLARI ÜZERİNE
İN VİTRO ETKİSİ**

TEZ ÇALIŞMASI
Dr. ANT UZAY
İSTANBUL-2005

Çalışmamda bana her zaman ve her koşulda desteğini esirgemeyen, büyük sabır ve nezaket örneği gösteren, bana bilimsel çalışmanın ne olduğunu öğreten tez hocam Marmara Üniversitesi Hematoloji bölümü bilim dalı başkanı sayın Prof. Dr. Mahmut Bayık'a;

Çok değerli katkılarından ve bana agregometre ile ilgili herşeyi öğretilerinden dolayı, sevgili ağabeylerim Doç Dr. Muzaffer Demir'e ve Uz. Dr. Cafer Adıgüzel'e;

Bana verdikleri manevi destek için Hematoloji bilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Tülin Fıratlı Tuğlular'a ve Yrd.Doç.Dr. Musatafa Çetiner'e;

Laboratuar çalışması aşamasında benimle beraber çalışan ve beni her zorluktan kurtaran tüm laboratuar teknisyenlerine

Kan bankasında bana her türlü kolaylığı sağlayan Uz.Dr. Meral Sönmezoğlu'na;

İç hastalıkları ihtisasım süresince bana rehberlik eden ve eğitimime büyük katkısı olan Marmara Üniversitesi İç Hastalıkları ABD saygıdeğer öğretim üyelerin her birine;

Tezin hazır hale gelmesinde verdikleri eşsiz katkılarından dolayı, dostlarım Uz.Dr. Sibel Aydın'a ve Dr. Gökhan Gönenli'ye;

Bugünlere gelmemde ve hayatımın her döneminde bana verdikleri destekten dolayı, sevgili eşime ve aileme, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ant Uzay

Şubat 2005

ÖZET

Preoperatif ve intraoperatif dönemde, dokuları hipoperfüzyondan korumak amacıyla, kristaloid ve kolloid özellikler taşıyan bir çok farklı solüsyon kullanılmaktadır. Son yirmi yıl içinde klinikte kullanılan bu solüsyonların, pıhtılaşma üzerinde bir çok farklı etkileri tanımlanmıştır. İzotonik NaCl ve Ringer Laktat gibi kristaloidler hiperkoagülasyona neden olurken, özellikle Hidroksietil starch (HES) gibi koloidlerin pıhtılaşma zamanını uzattığı ve dolayısıyla opeasyon geçiren hastalarda artmış kanama komplikasyonlarına neden olabileceği ileri sürülmüştür.

HES 'in pıhtılaşma üzerindeki etkileri, bir çok in vitro ve in vivo çalışmada incelenmiştir. Bu çalışmaların sonucunda, HES'in özellikle yüksek molekül ağırlığındaki (>200kd) solüsyonları, plazma vWF'nü azaltarak, von Willebrand hastalığına neden oldukları bildirilmiştir. Ayrıca son dönemde yapılan araştırmalarda , platelet function analyser (PFA) yöntemi kullanarak, HES'in trombosit fonksiyonlarını olumsuz etkilediği bildirilmiştir. Saptanan anti-trombositik etkinin, trombosit agregasyon inhibisyonu olabileceği ileri sürülmüştür.

Yapılan tüm çalışmalarda koagülasyonu ve primer hemostazı bir bütün olarak inceleyen yöntemler kullanılmış olması nedeniyle, HES 'in trombosit agregasyonu üzerindeki etkisi bugüne dek, net bir şekilde tanımlanmamıştır. Trombosit agregasyonu, kanamanın durdurulmasında ve yara iyileşmesinde çok önemli basamak olması nedeniyle, perioperatif dönemde kullanılan sıvıların, trombosit agregasyonu üzerindeki etkileri tüm boyutları ile araştırmak ve tanımlamak önem kazanmaktadır.

Günümüzde trombosit agregasyon fonksiyonları agregometre yöntemi ile araştırılmaktadır. Agregometre yöntemi trombosit agregasyon fonksiyonları hakkında en fazla bilgi veren yöntemdir.

Çalışmamızda, agregometre yöntemi yardımı ile, farklı molekül ağırlığında HES ve %0,9 İzotonik NaCl ile %20 oranında dilüe edilen sağlıklı 20 donör kanındaki trombosit agregasyon fonksiyonlarında meydana gelen değişiklikler incelenmiştir.

Agregasyon parametreleri olarak, maksimal agregasyon değeri ve agregasyon eğim değeri olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın sonucunda, agregasyon eğim değerlerinin hiç bir dilüsyon molekülünden etkilenmediği saptanmıştır. Bunun yanı sıra, düşük moleküler ağırlığındaki HES ve İzotonik NaCl'ün maksimal agregasyon değerini etkilemezken, yüksek molekül ağırlığındaki HES

solüsyonunun maksimal agregasyon değerini yükselterek hiperagregasyona neden olduğu bulunmuştur. Yüksek molekül ağırlığındaki HES 'in bu hiperagregasyon etkisi ilk defa tanımlanmaktadır. Yapılan önceki çalışmaların sonuçlarına dayanarak, bu etkinin HES'in trombosit yüzeyini kaplayarak, agregasyonun erken döneminde hızlı bir şekilde vWF'nü ve fibrinojeni bağlayarak , trombosit agregasyonunu arttırması şeklinde gerçekleştiği kanısındayız. Daha önce tarif edilen anti-trombositik etkinin de , meydana gelen prematür trombosit agregasyonu nedeniyle engellenmiş trombosit adezyonu olduğu düşünmekteyiz. Çalışmamızın sonuçları, trombosit agregasyonun dış faktörlerden etkilenme mekanizmaları konusunda aydınlatıcı bilgiler verdiği inancındayız. Bu bilgiler ışığında, bir çok laboratuvar yöntemini bir arada kullanarak yapılacak yeni çalışmalarla, klinikte kullanılan reperfüzyon sıvılarının, pıhtılaşma üzerindeki etkileri ve kullanım güvenliği hakkında daha kapsamlı veriler elde edileceğini umuyoruz.



SUMMARY

Various solutions with crystalloid and colloid properties are used during preoperative and intraoperative period in order to avoid major organ hypoperfusion. In the past twenty years of clinical practice, many of these solutions have been reported to cause different alterations over the blood coagulation. Isotonic saline and lactated ringer solution are known to cause mild hypercoagulation, whereas colloids like Hydroxyethyl starch (HES) demonstrate inhibition of coagulation and are considered hazardous regarding bleeding complications in patients undergoing elective operation.

The effects of HES on coagulation have been studied in many in vitro and in vivo trials. Most of the results have revealed that especially high molecular weight (>200kd) HES solutions decrease plasma vWF and cause acquired von Willebrand disease. In recent studies, investigating the effect of HES on primary hemostasis with the use of platelet function analyser (PFA), it has been shown that HES has an anti-platelet effect, which is considered to be inhibition of platelet aggregation.

Until now, all of the investigators have studied the effects of HES on coagulation using methods that measure parameters of the global coagulation. This is one of the reasons why, we still don't know the exact effect of HES on platelet aggregation. Because platelet aggregation is a major phase in hemostasis and wound healing, understanding the effects of the solutions used in clinical practice, over platelet aggregation, remains crucial.

At present, platelet aggregation functions are investigated with the use of the aggregometry device. Aggregometry is the the method that gives the best information about platelet aggregation.

In our study, twenty healthy donors have donated blood samples which were diluted in a %20 ratio using HES solutions with different molecular weights and %0,9 saline respectively. After the preparation of the dilutions, changes in platelet aggregations were investigated and recorded using the aggregometry method. Maximal aggregation value and aggregation slope value were taken as parameters of

the platelet aggregation.

Results showed that aggregation slope values were not affected by any solution. We also found that low molecular weight HES and saline did not affect maximal aggregation values too, but high molecular weight HES caused increment of maximal aggregation values,

resulting in hyperaggregation, which in turn, as far as we are concerned is being described for the first time.

Regarding the results of the previous studies, we suggest that this hyperaggregation effect is due to early binding and consumption of ligands like vWF and fibrinogen, by HES molecules which are adherent excessively on the platelet surface. The resulting premature aggregation actually occurs before, or at the time of platelet adhesion, which can lead to impairment of the whole adhesion process - possible explanation of the anti-platelet effect described previously by other investigators.

We believe that this study adds knowledge about how external factors affect platelet aggregation. New trials, combining different methods that investigate possible effects of commonly used solutions over platelet function, should provide more profound data about the safety of these solutions.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. Giriş ve Amaç	1
2. Genel Bilgiler	3
2.1 Trombositlerin Yapısı ve Hemostazdaki Yeri	3
2.2 Trombosit Agregasyon Basamakları	9
2.3 Trombosit Agregasyonunda Görev Alan Trombosit Agonistleri	16
2.4 Trombositlerin Koagülasyondaki Yerleri	19
3. Trombosit Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi:	
Agregometre ve diğer yöntemler	20
3.1 Değişkenler	22
3.2 Kanın Trombosit Agregasyonu İçin Hazırlanması	30
3.3 Trombosit Agregasyonun ve Sekresyonun Değerlendirilmesi	31
3.4 Trombosit Fonksiyonların Değerlendirilmesinde Kullanılan Diğer Yöntemler	39
4. Trombosit Fonksiyon Bozuklukları	40
4.1 Depo Havuz Hastalıkları (SPD) ve Salınım Kusurları	40
4.2 Glanzmann Trombastenisi (GT)	41
4.3 von Willebrand Hastalığı	41
4.4 Bernard – Soulier Sendromu (BSS)	42
4.5 Uzamış Kanama Zamanına Yaklaşım	46
5. Hydroxyethyl Starch'ın (HES) Hemostaz Üzerindeki Etkisi	47
6. %0,9 İzotonik NaCl'ün Koagülasyon Üzerindeki Etkileri	50
7. Gereç ve Yöntem	51
7.1 Araştırmanın Genel Özellikleri	51
7.2 Örneklerin Seçilmesi	51
7.3 Çalışmaya Katılanların Özellikleri	52

7.4 Araştırmanın Yöntemi	53
7.5 Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler	55
7.6 İstatiksel Yöntemler	55
8. Sonuçlar	56
9. Tartışma	62
10. Referanslar	70



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Trombositler hemostaz, yara iyileşmesi ve enflamasyon gibi bir çok süreçte başrol oynamaktadır. Trombositlerin esas görevleri, kanama veya enflamasyonda, agregasyon süreci ardından endotele yapışıp tıkaç veya trombüs oluşturmaktır. Bu esnada hümmoral immünitede yardımcı rol oynayan moleküllerin, trombosit granüllerinden salgılanması da devam eder. Kanamanın durdurulmasında başrol oynayan trombositler hemostaz süreci esnasında bir çok dış faktörden etkilenirler (1). Kanamalı hastaların sıvı replasman tedavisinde, majör organları hipoperfüzyondan korumak amacıyla günümüzde farklı yapılarda sıvılar kullanılmaktadır. Kullanılan sıvılar, kristaloidler ve kolloidler olarak ikiye ayrılırlar:

Binde dokuzluk izotonik solüsyonu ve ringer laktat gibi kristaloidler, plazma ozmolaritesinde olup volüm genişletici olarak yüksek miktarlarda kullanılırlar ve hemodilüsyon yaparak koagülasyon kaskadında değişikliklere neden olurlar (2,3). Bu değişiklikler ilk olarak 1950'lerin sonunda Monkhouse ve Tocantins tarafından tarif edilmiştir (4,5).

Kolloidler (albumin, kolajen, HES vb) ise volüm genişletici olarak daha nadir ve daha düşük dozlarda kullanılırlar. Hemodilüsyona neden olmazlar ancak yüksek molekül ağırlıkları nedeniyle koagülasyon molekülleri ile etkileşime girip hemostazı bozma eğilimindedirler (6,7).

Albümin ve jelatinin daha pahalı olmaları nedeniyle, son yıllarda bunların yerine Hydroxyethyl starch'ın (HES) farklı molekül ağırlığındaki bileşikleri kullanıma girmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda HES bileşiklerinin, von Willebrand hastalığına benzer bir tabloya sebep oldukları gösterilmiştir (8,9). Bu çalışmalarda trombelastografi (TEG) yöntemi kullanarak, trombosit fonksiyonlarının da olumsuz olarak etkilendiği saptanmıştır (10). TEG yöntemi koagülasyonu bir bütün olarak inceler; bu yüzden koagülasyon basamaklarının her biri ne şekilde etkilendiği hakkında net bilgi elde etmek zordur (11,12). Bu nedenden dolayı son yıllarda yapılan bazı araştırmalar, HES in sadece primer hemostaz üzerindeki etkilerini irdelemiştir (13). Günümüzde primer hemostazı araştıran tekniklerden en yaygın kullanılanı PFA (platelet function analyser) dir . Bu yöntem, primer hemostazı genel olarak incelediğinden, trombosit agregasyon fonksiyonu hakkında

kesin bilgi vermez. Trombositlerin HES'ten etkilendiği bildirilmiş olmasına rağmen, agregasyon fonksiyonları üzerindeki etkisi halen bilinmemektedir.

Yapılan son çalışmalarda, trombosit agregasyonunun dolaylı belirteci olan GP IIb-IIIa ekspresyonu, in vivo şartlarda, HES in etkisi ile azaldığı gösterilmiştir (14-16). Buna rağmen, klasik agregometre çalışması yapılmadığından, çalışmanın verileri, trombosit agregasyonunun HES ten olumsuz etkilendiği şeklinde, kesin olarak yorumlanamaz.

HES solüsyonlarının, elektif ve acil operasyonlardaki kullanım güvenilirliği konusundaki tartışmalar devam etmektedir. Koagülasyonu uzattığını gösteren çalışmalar olmasına rağmen, bir çok in vivo çalışmada HES in koagülasyon üzerindeki etkileri klinik olarak anlamlı bulunmamıştır (17). Yine de HES in klinikte güvenle kullanılabilmesi için, son yıllarda bu bileşiğin farklı moleküler ağırlığındaki formları arasında, koagülasyon üzerindeki etkileri açısından, farkı araştıran çalışmalar yapılmıştır ve sonuçta yüksek moleküler ağırlığındaki bileşiklerin koagülasyonu daha fazla uzattığı tespit edilmiştir (18,19).

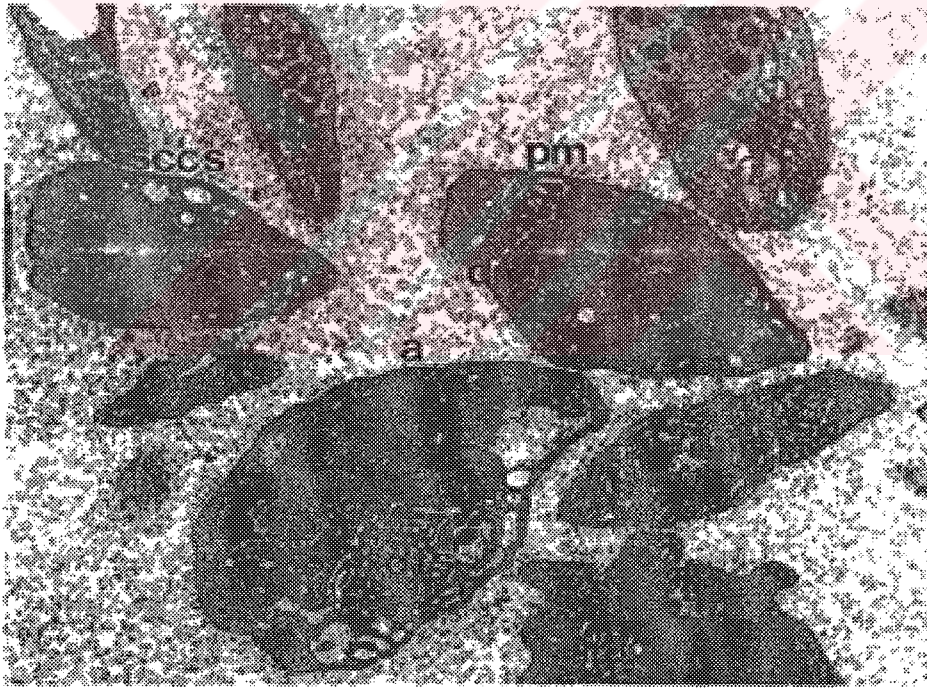
Trombosit agregasyonu, primer hemostazın ve yara iyileşmesinin en önemli basamaklarından. Bu nedenle, agregasyonu olumsuz etkileyebilecek farklı HES solüsyonların, kanama riski altında olan hastalarda kullanmadan önce bu bileşiklerin trombosit fonksiyonları üzerindeki etkileri tüm ayrıntıları ile araştırılmalıdır.

Mevcut çalışmada, sağlıklı kişilerden alınan kanlardan elde edilen trombositler, HES'in farklı molekül ağırlığındaki bileşikleri ve izotonik ile %20 oranında dilüe edildikten sonra, agregasyon fonksiyonlarındaki değişiklikler agregometre yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmanın diğer bir amacı da, agregasyon fonksiyonlarındaki olası değişikliklerin HES'in molekül ağırlığına göre değişip değişmediğini tespit etmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Trombositlerin Yapısı ve Hemostazdaki Yerleri:

Trombositler, kemik iliğindeki megakaryositlerden meydana gelen, çekirdeksiz, sitoplazmik fragmanlardır ve hemostaz, tromboz, enflamasyon, yeni doku oluşumu gibi süreçlerde önemli rolleri vardır. Dolaşımdaki insan trombositleri diskoid şekilde olup göreceli olarak pürüzsüz hücre yüzeyine sahiptirler. Normal bir trombositin yapısında ilk göze çarpan, plazma membranı (pm) ve dense tubuler sistemden (dts) uzanan, kesintisiz bir membran sistemi olan yüzey bağlantılı kanaliküler sistemdir (surface connected canalicular system – SCCS) (şekil 2.1).

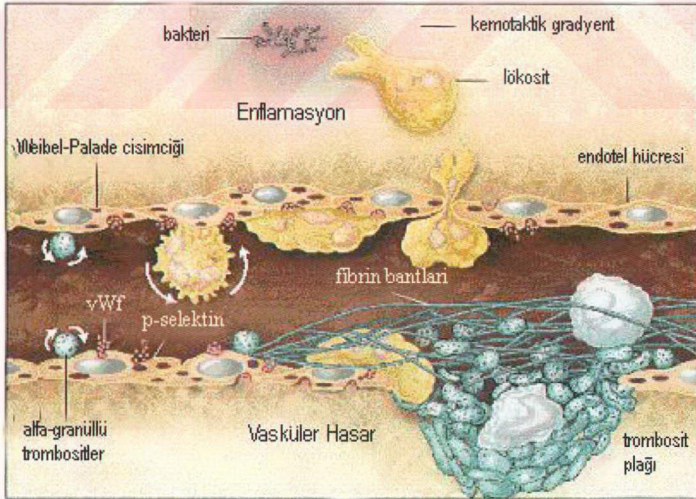


Şekil 2.1 İstirahat halindeki trombositlerin elektron mikroskop görüntüsü (x15000). Plazma membranı (pm), dense tubuler system (dts), yüzey bağlantılı kanaliküler system (sccs), dense granülleri (d), alfa granülleri (a)

Plazma membranı, trombosit aktivasyon cevabını başlatan agonist reseptörleri ve trombosit adezyonu ve agregasyonuna aracılık eden adhezif molekülleri gibi birçok protein içermektedir. Yüzeyle bağlantılı kanalliküler sistem, plazma bileşenlerine ve trombosit aktivasyonu sonucunda salgılanan maddelere geçiş yolu sağlamaktadır. Trombositler içerikleri aktivasyon esnasında dışarıya boşalan, iki tip depo granülü (d ve a) içermektedirler. Dense tubuler sistem kalsiyumun salgılandığı bölgedir. Buradan kalsiyum salgılanması sonucunda kalsiyuma bağımlı aktivasyon enzimleri tetiklenir ve trombosit aktivasyon cevabındaki kontraktıl süreçler başlar (1,20,21).

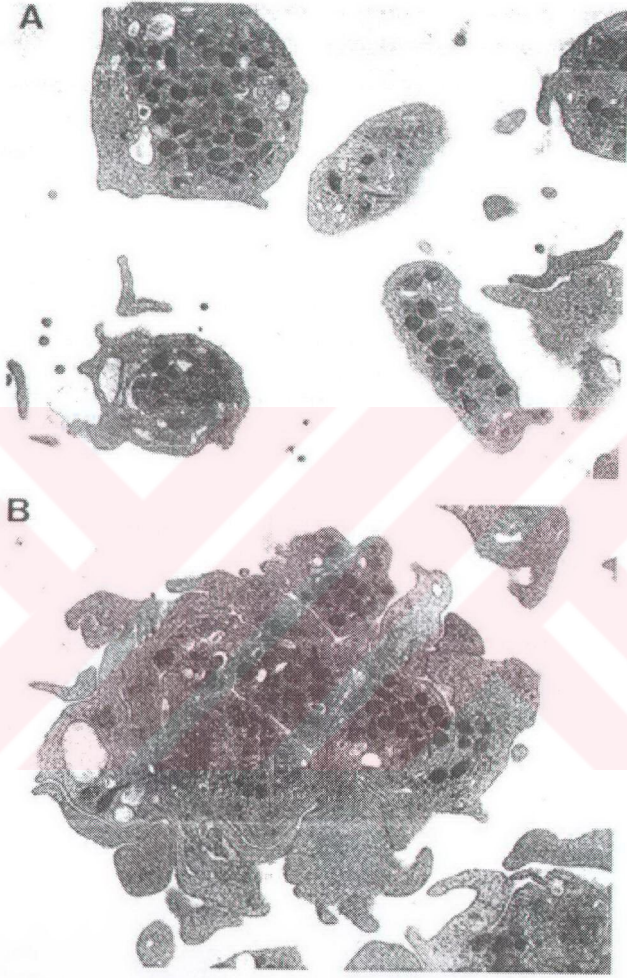
2.1.1. Trombositlerin hemostazdaki yerleri:

Vasküler endotel hasar sonucunda subendotelial tabaka ortaya çıkmaktadır. Bu olay trombosit adezyonunu tetikler (1). Adezyon süreci, primer olarak Glikoprotein Ib-IX-V reseptörü aracılığıyla başlatılır. Subendotelial tabakaya yapışmış olan trombositler aktive olur ve çevresel dolaşımdaki yakında bulunan diğer trombositleri kendilerine doğru çeker, böylece agregat oluşumu başlar (şekil 2.2).



Şekil 2.2. Damar hasarı sonucunda oluşan trombosit tıkaçı. Oluşan damar hasarı sonucunda açığa çıkan subendotel tabakaya yapışan trombositler aktive olur, agregasyon süreci başlar ve trombosit tıkaçı oluşur.

Trombosit agregatı veya trombüs oluşumu, Glikoprotein IIb-IIIa aktivasyonu ve komşu trombositlerin yüzeyleri ile çapraz bağ oluşturan fibrinojen ve von Willebrand faktörü gibi multivalan adhezif ligandların bağlanması ile olur (1,5) (şekil 2.3). Agregat, yüzlerce trombositlerden oluşan şekilsiz bir kitledir (şekil 2.3B).



Şekil 2.3. A – İstirahat halindeki trombositler, B – Trombosit agregatı. Elektron mikroskopisi

Süreci başlatan agonist ne kadar güçlü ise meydana gelen agregat kitlesi o kadar büyüktür. Trombositler istirahat halindeyken GP IIb-IIIa düşük afinitededir ve çözünebilir fibrinojene bağlanamamaktadır. Aktive GP IIb-IIIa'ya ligand bağlanması trombosit aktivasyonu ile regüle edilir. Trombosit aktivasyonu esnasında GP IIb-IIIa şekilsel olarak değişime uğrar ve böylece fibrinojenin bağlanmasına olanak tanır (1,21). Fibrinojenin en az üç adet trombosit tanıma bölgesi içerdiği bilinmektedir. Bunlar Arg-Gly-Asp-Phe (RGDF), A alfa daki Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) ve gama 400-411 deki dodekapeptid dizinleridir (HHLGGAKQAGDV). Fibrinojen molekülünün iki adet RGDX dizini olmasına rağmen, fibrinojenin trombositte bağlanması dodekapeptid dizini üzerinden gerçekleşmektedir (22). Küçük boyutlarından dolayı bu üç dizinin sentetik peptidleri, aktivasyon durumuna bakmaksızın GP IIb-IIIa'ya bağlanabilmektedirler. Bu peptid dizinlerle yapılan deneylerin sonucunda, fibrinojenin çoklu bağlanma alanları içermesinin trombositlerin adezyonu ve agregasyonunda ne kadar önemli rol aldığı gösterilmiştir (23,24).

2.1.2. Membran yüzey proteinleri: (tablo 2.1)

GP Ib-IX-V - İnsan trombositlerinde, trombosit adezyonundan sorumlu olan primer reseptör GP Ib-IX'dur. GP Ib-IX büyük boyutta ve sadece trombositlerde bulunan, heterodimerik yapıda bir yüzey proteindir. Diğer bir yüzey proteini olan GP V, GPIb-IX ile 1:2 molar oranında kompleks oluşturmaktadır. Her trombosit üzerinde yaklaşık 25000 adet GP Ib-IX-V kompleksi bulunmaktadır. GP Ib, iki adet disülfid bağ içeren zincirden oluşmaktadır – GP Ib alfa ve GP Ib beta – diğer yandan GP IX ve GP V non kovalent bağ aracılığı ile bağlanmıştır. Bu kompleksin her alt birimi lösenden zengin tekrar bölgeleri içermektedir. Kompleks, trombosit yüzeyindeki majör sialoglikoproteini oluşturmaktadır ve trombosit membranının negatif yükünden sorumludur (25). GP Ib-IX-V, trombositlerin subendotel tabakaya yapışması için gereklidir. Bunu açığındaki subendotelium üzerindeki hareketsiz vWF ne bağlanmak sureti ile gerçekleştirir (26). Ek olarak GP Ib-IX-V üzerinde trombin bağlama bölgesi de bulunmaktadır; bu özelliği düşük trombin konsantrasyonlu durumlarda trombositlerin agregasyon cevabını arttırmada ön plana çıkmaktadır. Trombositleri GP Ib-IX-V'den yoksun olan veya az miktarda bulunan kişilerde Bernard-Soulier

sendromu adında bir kanama bozukluğu görülmektedir. Bu kişilerin trombositleri genellikle büyüktür ve vWF ne bağlanamamakta, böylece etkili bir hemostatik tıkaç oluşturamamaktadır (27).

GP IIb-IIIa- Trombositler arası etkileşimlerde ve agregasyonda anahtar rol oynayan ve trombosit üzerindeki fibrinojenin primer bağlanma reseptörü olan molekül GP IIb-IIIa'dır (21). GP IIb-IIIa'nın esas görevi trombosit agregasyonu sağlamak olmasına rağmen, yüksek hacimli kan kaybı durumlarda GP Ib ile birlikte GP IIb-IIIa da, trombosit adezyonunda yer alır (28). Trombosit agregasyonunda GP IIb-IIIa'nın önemi ilk kez Glanzmann trombastenisi olan hastalar üzerinde yapılan araştırmalarda fark edilmiştir. Bu hastalarda GP IIb-IIIa yoktur ya da işlevsizdir. Bu trombositler tüm agregasyon agonistlerine karşı yanıtızdırlar; çünkü GP IIb-IIIa trombosit agregasyonunda son ortak yolak konumundadır. Glanzmann trombastenisi tanısı alan hastaların trombosit boyutları ve sayıları tamamen normaldir (29).

GP IIb-IIIa, kalsiyuma bağımlı bir heterodimerdir ve her trombosit üzerinde ortalama 40.000 – 80.000 adet bulunmaktadır (21,30,31). GP IIb-IIIa moleküllerinin büyük çoğunluğu dış membran yüzeyinde bulunmasına rağmen, son çalışmalarda alfa granüllerde ve membran ağına açılan kanaliküler sistemde de bulunduğunu gösterilmiştir (32). Trombosit içinde bulunan GP IIb-IIIa molekülleri ancak aktivasyon esnasında ortaya çıkmaktadırlar. Bu moleküllerin membran yüzeyine ulaşma hızı ve yüzdesi agregasyon agonistinin gücüne bağlıdır (33,34). Trombosit agregasyonunu, ve bir dereceye kadar trombosit adezyonunu düzenlemesinin yanı sıra, GP IIb-IIIa pıhtı retraksiyonu sürecinde de önemli rol oynar (21,35). Bu süreçte, pıhtı katı hale gelmektedir. GP IIb-IIIa ve trombositin hücre iskeleti arasındaki etkileşim sayesinde, üzerlerinde bağlı halde fibrinojen ve fibrin bulunan trombositler, fibrin iplikleri boyunca kasılırlar ve böylece pıhtıyı sertleştirirler (35).

GP IV – GP IV (CD 36, GP IIIb), insan hücrelerinde yaygın bulunan bir membran glikoproteinidir. CD 36'nın, trombosit adezyonunun erken evrelerinde aracı molekül olarak görev yaptığı ve trombospodin (TS-1) reseptörlerinden biri olduğu düşünülmektedir (36,37). Aynı zamanda CD 36'nın , birçok hastalık patogenezinde de rol oynadığı bilinmektedir. Örneğin, miyeloproliferatif hastalıklarda CD 36

ekspresyonu artmaktadır; ayrıca bu molekül Plasmodium falciparum için eritrositlere bağlanma yeridir (38,39). Bazı araştırmalarda, CD 36 ligandlarının trombosit aktivasyonunu tetiklediği gösterilmiştir. Tarif edilen aktivasyon Fc gamma RII reseptörlerinden bağımsızdır ve src ailesinin sitozolik protein kinazları ile CD 36' nın sitoplazmik uzantısı arasındaki etkileşim üzerinden olabileceği ileri srlmştir (40).

CD 9 Trombositler ve diğer bir çok hücre yüzeyinde bulunan CD 9, yeni tanımlanan bir protein ailesi olan tetraspaninlere aittir. Tetraspaninler,iki adet hidrofobik transmembran bölgesi ve iki adet ekstraselüler dirsekten oluşmaktadırlar (21). Trombosit araştırmalarında CD 9'un sinyal iletiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Mab 7 gibi, monoklonal anti-CD 9 antikoru ile karşılaştıklarında trombositler aktive olur. Mab 7 ile başlatılan trombosit aktivasyonunda, fosfatidilinositol 4,5 bifosfat döngüsü , kalsiyum akımı ve protein fosforilasyonu artmakta, böylece fosfolipaz C aracılı aktivasyon başlamaktadır (41).

Trombosit membran proteini	Reseptör görevi
GP Ia-IIa	Kolajen bağlanması
GP Ib-IX-V	vWf ve trombin bağlanması
GP Ic-IIa	Fibronektin bağlanması
GP IIb-IIIa	Fibrinojen, vWf, fibronektin ve vitronektin bağlanması
VnR	Fibrinojen, vWf, fibronektin ve vitronektin bağlanması
GP IV	Fibrinojen, vWf, fibronektin ve vitronektin bağlanması
GP VI	Kolajen bağlanması
CD 9	Fibronektin bağlanması

Tablo 2.1: Başlıca trombosit membran yüzey proteinleri ve ligantları.

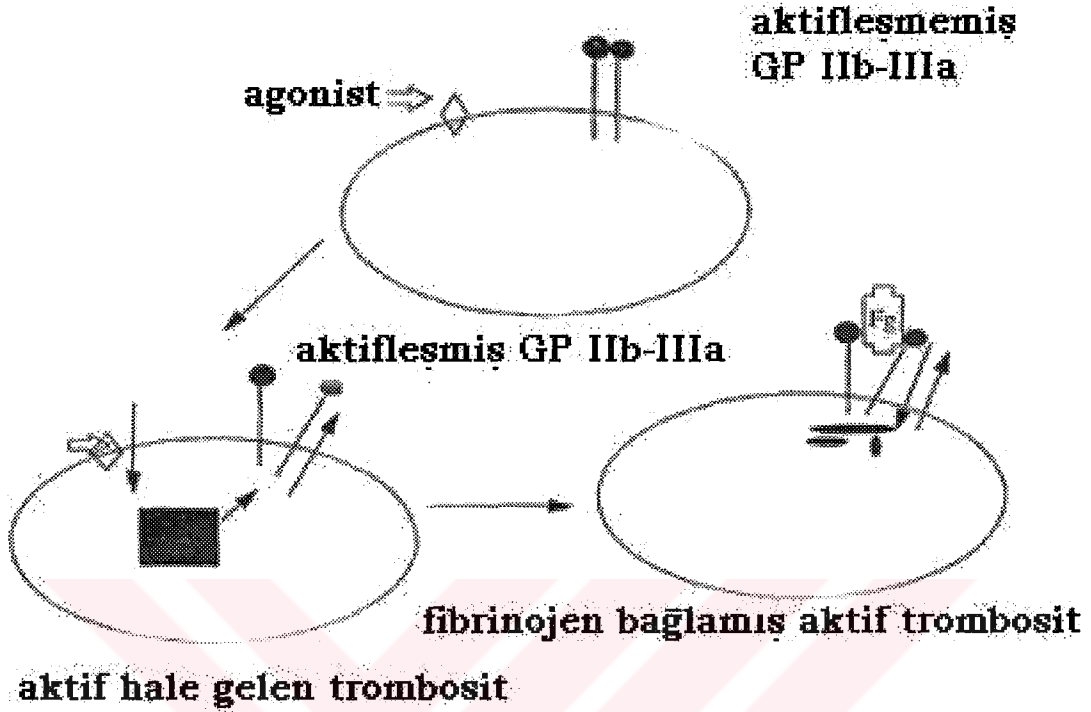
2.2. Trombosit Agregasyon Basamakları

2.2.1. GP II b- IIIa sinyalizasyonu:

GP IIb-IIIa, trombosit plazma membranındaki iki yönlü iletişimde görev almaktadır (şekil 2.4). Agonistlerin kendi reseptörleri ile etkileşime girmesi, hücre içi iletişim ve aktivasyon yollarını etkinleştirir. Bunun sonucunda GP IIb-IIIa reseptörü de etkin hale gelir ve fibrinojen ile vWF ün bağlanmasını mümkün kılar (34). Bu ligandların bağlanması ile birbirilerine komşu olan aktif trombositler arasında köprü şeklinde bağlar kurulur ve böylece trombosit agregatı meydana gelir. Bağlanma süreci esnasında GP IIb-IIIa'da da, şekle duyarlı antikorlarla (m Ab D3) tespit edilebilen bir şekil değişikliği meydana gelmektedir. Bu değişiklikle birlikte, trombosit fonksiyonunu düzenleyen ileti yollarında görev alan, bazı proteinlerin fosforilasyonu da gerçekleşir (33,42).

G IIb-IIIa'nın aktivasyonu trombin, tromboksan A2, ADP veya serotonin gibi çözümlenebilen agonistlerin birikimi ve salınımının ardından gerçekleşir. Bu ajanların direkt olarak G IIb-IIIa üzerinde etkileri yoktur. Trombosit üzerindeki reseptörlere bağlanarak klasik sinyal iletim yollarını etkin hale getirirler (43-45). Oluşan sinyaller genellikle G proteinleri ve tirozin kinazlar tarafından iletilir. Bunun sonucunda fosfolipaz C aktivasyonu, sitoplazmik kalsiyumda kinetik değişiklikler ve hücre protein kinazların aktivasyonu gerçekleşir (33,46,47). Hücre içinden hücre dışına doğru olan sinyal iletiminin, agonistlerce başlatılan hücre içine doğru olan iletim reaksiyonuna cevap olarak etkin konuma geçen GP IIb-IIIa'nın sitoplazmik kısımları üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir (48). Son araştırmalarda bu olaylara aracılık eden moleküllerin kalretikülin, serin / treonin kinazlar ve R-Ras ile Rho-A olduğu bildirilmiştir (49). GP IIb-IIIa, şekilsel olarak, bağlanma açısından düşük afinite halinde bulunur(50). Sinyal ileti mekanizmaların aktif hale gelmesiyle çözümlenebilen fibrinojen ve vWF nu yüksek affinite bağlayabilecek uygun şekle girer (34,50). Sinyal ileti yollarının inhibitörleri, agonist ile oluşturulan integrinlerin yüksek afinite ligand bağlama durumlarını bozar (51,52). Fibrinojen ve vWF ün bağlanması ardından, GP IIb-IIIa bir kez daha şekilsel değişikliğe uğrar. Bu değişiklik anti-LİBS (ligand induced binding sites) denen özel monoklonal antikorlarla tespit edilebilir. D3 gibi anti-LİBS ler kullanarak GPIIb-IIIa daki ligand

bağlanması ölçülebilir. Bunları kullanarak deneysel olarak GP IIb-IIIa fonksiyonları bozulabilir veya direkt olarak aktiveleştirilebilir (şekil 2.5).

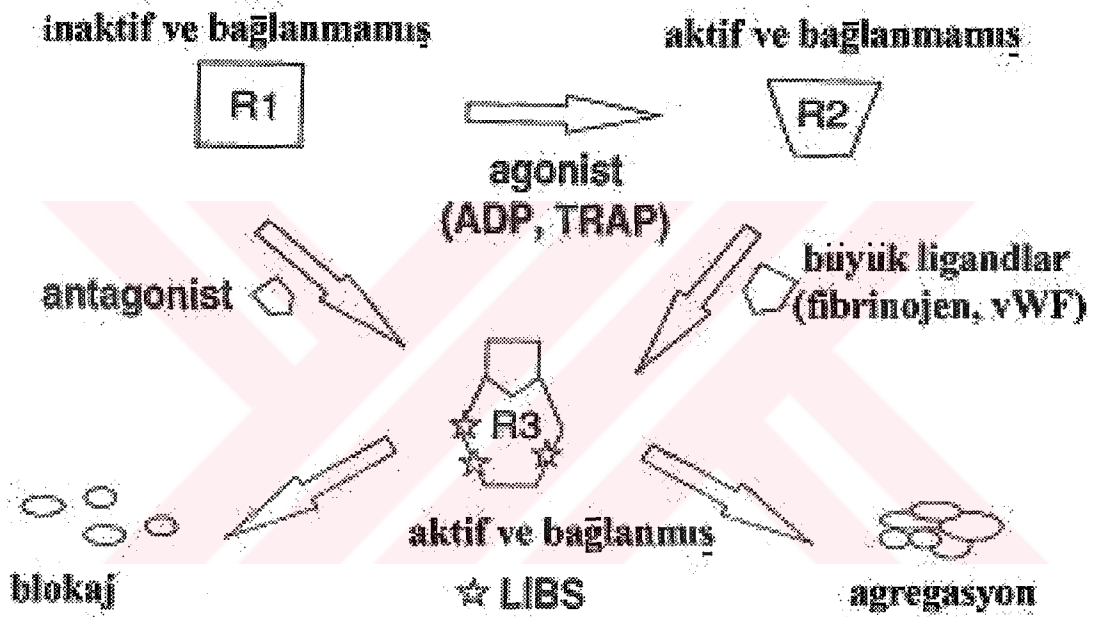


Şekil 2.4. GP IIb-IIIa'nın iki yönlü sinyal iletişimi. İstirahat halindeki trombositler üzerinde bulunan GP IIb-IIIa plazma fibrinojenine bağlanamaz. Trombosit aktivasyonunun ardından sinyal molekülleri GP IIb-IIIa'yı aktif hale getirir. Bu aşamadan sonra reseptör vWF ve fibrinojen için yüksek afinite kazanır.

Bazı anti - LİBS'ler pıhtı retraksiyonunu ve trombosit agregasyonunu tamamen veya geri dönüşümlü olarak inhibe edebilir. Bu etkiyi reseptörleri bloke ederek, hücre dışından hücre içine doğru olan iletimi engelleyerek yaparlar. LİBS'lerin integrinlerin yüksek affinite de bağlama düzeyini ne şekilde regüle ettikleri halen bilinmemektedir. Bazı çalışmalarda, ön planda GP IIIa'nın sitoplazmik uzantısının serin ve treonin kalıntılarının fosforile olduğu ve bu bölgelerin fosforilasyonunun LİBS'lerin bağlanmasını regüle edebileceği gösterilmiştir (53).

Hücre için diğer elemanları, integrinlerin sitoplazmik bölgelerine bağlanarak talin ve alfa aktinin içeren integrin aktivasyon kompleksi oluştururlar (35, 54) (Şekil 2.4). Buna örnek olarak, trombin aracılığı ile başlatılan trombosit agregasyonunda GP I-IIa'nın bu şekilde fosforile edilmesi gösterilebilir (55). Bu

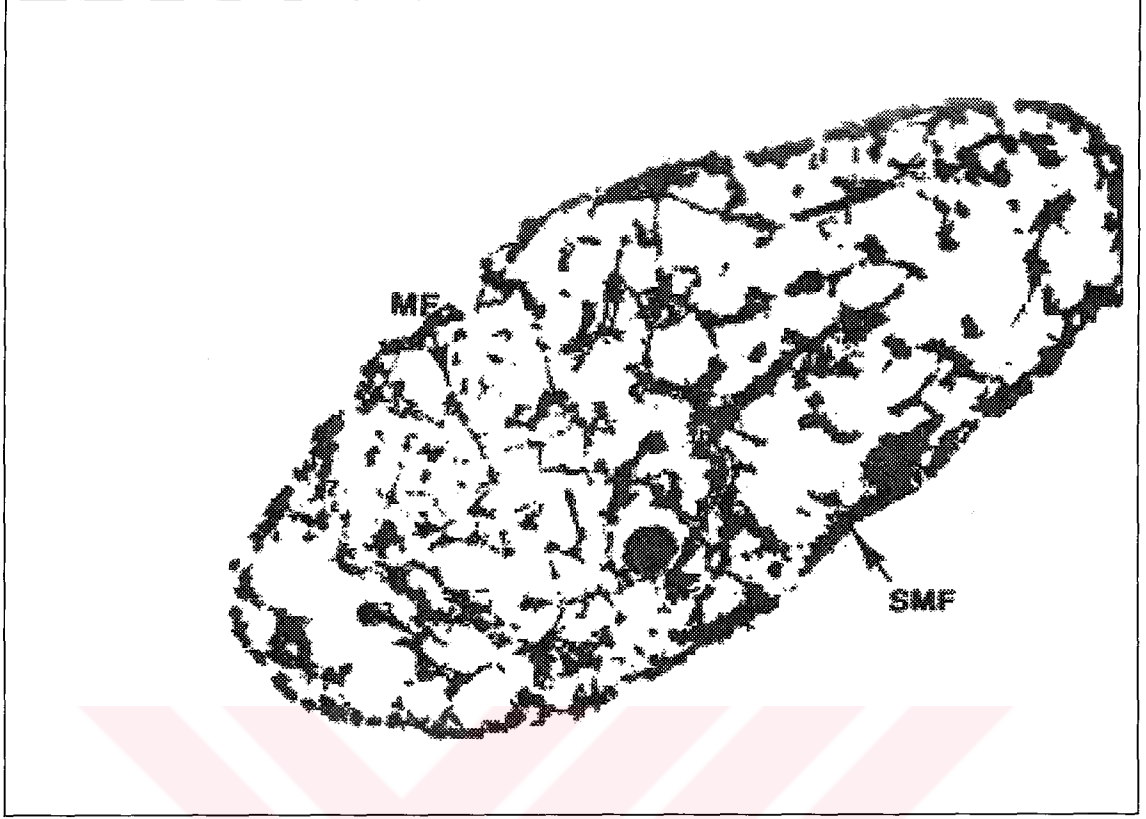
bilgiler ışığında integrinin GP IIIa alt biriminin, hücre dışından hücre içine doğru olan sinyal iletiminde anahtar rol oynadığı söylenebilir. İletim moleküllerinin integrin kompleksi üzerine olan aktivasyonu kolaylaştırıcı etkileri bu tezi destekler (33,46). Membran üzerinde meydana gelen şekilsel değişiklikler, ligand bağlanması esnasında gözlenen kalsiyum ve magnezyum gibi katyonların yer değiştirmesi ile tetiklenebilir (56). GP IIb-IIIa'nın, trombositlerin aktivasyon durumu tarafından regüle edilen ve adeziv moleküllerin bağlanmasından sorumlu olan dinamik bir protein olduğu aşikardır.



Şekil 2.5. Trombosit aktivasyonu sonrasında GP IIb-IIIa'nın geçirdiği şekilsel değişiklikler.

2.2.2. Trombosit hücre iskeletindeki değişiklikler:

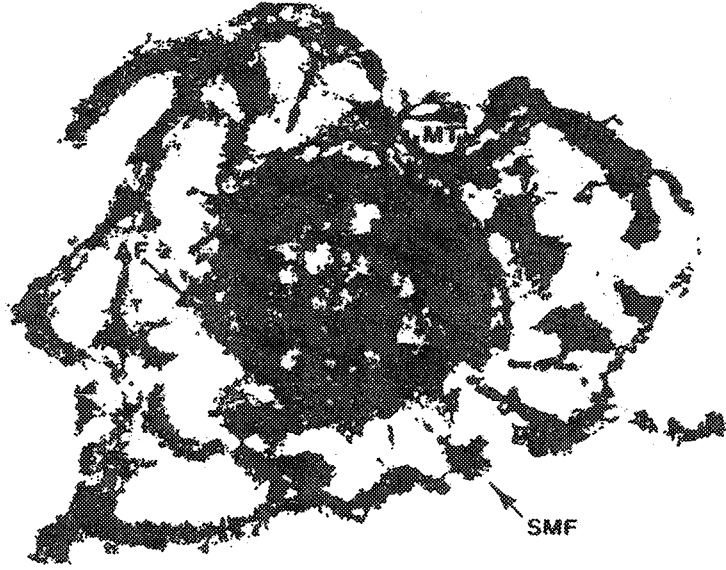
Trombosit proteinleri arasında en önemli olanlardan biri de aktindir. Trombositlerin birçok işlevi için kontraktil proteinlere gereksinim duyulmaktadır. Bu önemli işlevler sekresyon, şekil değişikliği, trombosit agregasyonu ve pıhtı retraksiyonudur. Aktin ve miyozin, bol miktarda aktin bağlayan proteinler içeren trombositin hücre iskeleti içinde devamlı olarak dinamik bir durumda bulunmaktadır. Durağan haldeki trombositlerde, hücrenin yapısal bütünlüğünü korumakla görevli olan mikrofilaman ağı ve kısa aktin filaman ağı bulunmaktadır (şekil 2.6).



Şekil 2.6. İstirahat halindeki trombositin mikrofilaman ağı. MF – mikrofilaman, SMF – submembranöz filaman

Kısa aktin filaman ağının birincil yapıtaşı GP Ib-IX kompleksidir. İkiyüzelli Kd büyüklüğünde bir dimer olan, aktin bağlayan protein, GP Ib-IX ile trombosit filamanları arasındaki bağlantıyı kurar (57,58). Trombosit aktivasyonu ardından hücre içi kalsiyum miktarı artar; bunun ardından kalpain adındaki enzim etkin hale gelir ve aktin bağlayıcı proteini ikiye böler. Bu bağın parçalanmasının ardından, trombosit membranının yapıtaşlarının hareket yeteneği artar.

Trombosit aktivasyonu süreci içinde trombositler belirgin şekil değişikliklerine uğrarlar. Diskoid şekilden, yaygın psödopodları olan irregüler yuvarlak şekle dönüşürler. Bu şekil değişikliği, trombositlerin mikrotübüllerinin ve hücre iskeletinin yeniden yapılandırılması ile ilgilidir (şekil 2.7).



Şekil 2.7. Aktif hale gelmiş trombositin hücre iskeleti yapılanması. Filamanların kalın iplikçikler haline gelmesi ve yalancı ayakçık oluşumu dikkati çeker. MT – mikrotübül, AF – aktin filamanı, SMF – submembranöz filaman

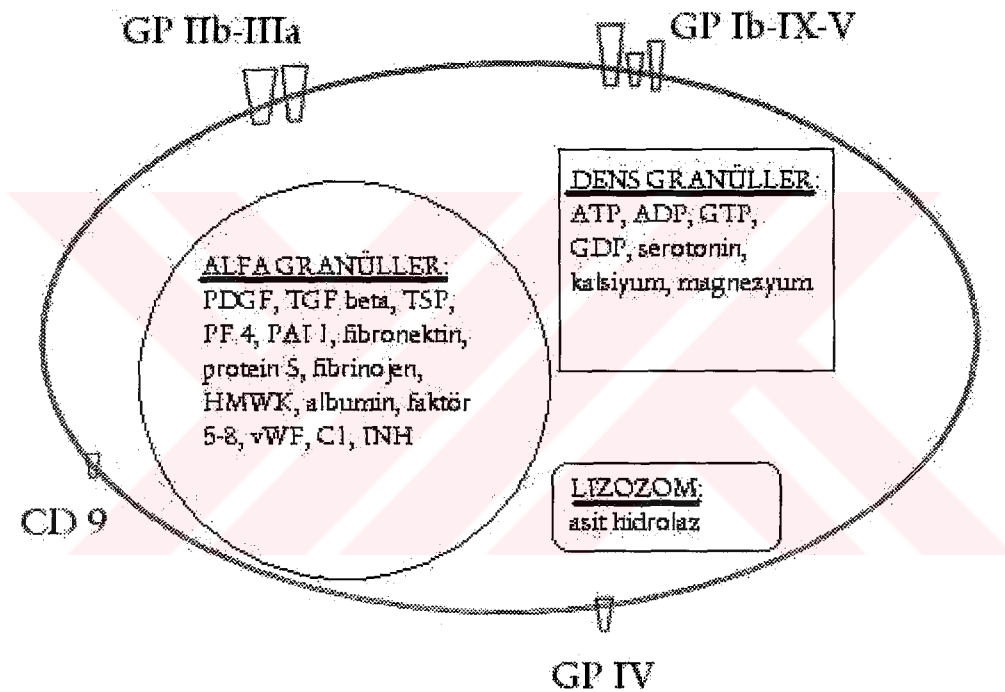
Şekil değişikliği sürecinde, F veya filamentöz aktin oranı, istirahat halindeki trombositlerde %15 iken aktif hale gelen hücrelerde %70 e kadar yükselmektedir. Trombositlerdeki miyozin de fosforile edilir ve aktin filamanlarla ilişkiye girer. Şekil değişirken hücre iskeletinin yapıtaşları, hücre yüzeyindeki GP IIb-IIIa ile yeni bağlar kurarlar. Bu bağların kurulmasıyla, trombosit agregasyonunu ve pıhtı retraksiyonunu yönlendiren iletilerin yolları oluşturulmuş olur (57).

2.2.3. Depo granülleri ve degranülasyon süreci:

Trombositlerin granülleri çok sayıda aktif madde içerir (şekil 2.8). Alfa granülleri, vWF, fibrinojen, fibronektin, vitronektin, TSP, ve faktör V gibi koagulan ve adhezif proteinler dışında, çeşitli büyüme faktörleri ve inhibitörler de içerirler (32). Trombosit faktör 4 (PF 4) ve beta TG in serbestleştirilmesi, trombosit degranülasyonunun belirtici olarak klinikte kullanılmaktadır. Aktivasyon esnasında hem trombosit yüzeyine hem de endotel yüzeyine P-selektin (CD62P, GMP140 veya PADGEM) taşınır. Bu antijenin lökosit ile trombosit arasındaki etkileşimi arttırdığı gösterilmiştir. Aynı şekilde, P-selektinin trombosit yüzeyindeki ekspresyonu da

aktivasyon belirteci olarak kullanılmaktadır. Hatta bazı araştırmacılara göre, P-selektinin plazmadaki yüksek düzeyleri trombotik hastalıkla ilişkilidir (59).

Dens granüllerde serotonin, kalsiyum, adenin-guanin nükleotidleri, divalan katyonlar ve inorganik fosfor depo edilir. Lizozomlar ise hidrolazlar, katepsin ve heparitinaz gibi hidrolitik enzimler içerirler. Son olarak da peroksizomlarda katalaz bulunur. Genelde depo organellerin içeriklerinin salınımının, trombositin maruz kaldığı uyarının gücüne bağlı olduğu düşünülür (1).

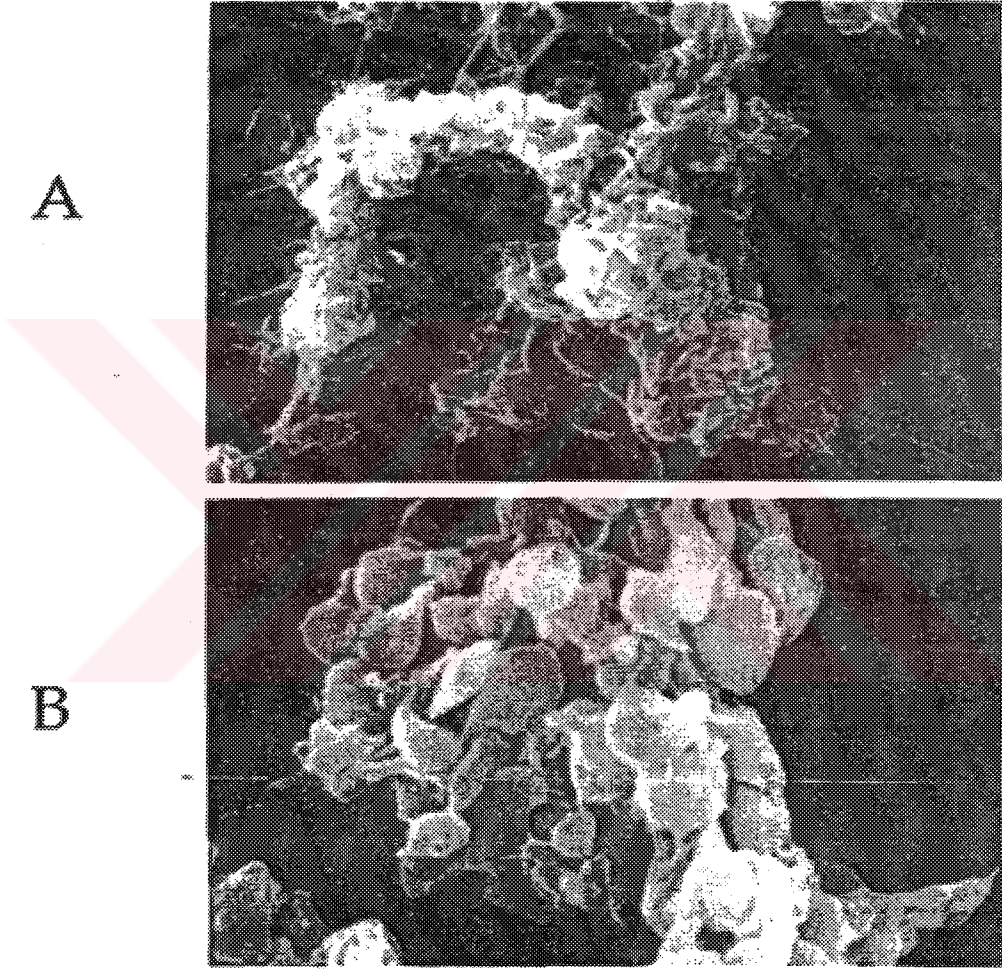


Şekil 2.8. Trombosit granül ierimini ve başlıca yüzeyi proteinlerini gösteren şema.

2.3. Trombosit Agregasyonunda Görev Alan Trombosit Agonistleri

2.3.1. Adenozin difosfat (ADP) :

ADP ye maruz kalan trombositlerde sırasıyla şekil değişikliği, GP IIb-IIIa'nın fibrinojen bağlayan bölümünün ortaya çıkması, fibrinojenin bağlanması ve agregasyon meydana gelir (şekil 2.9A).



Şekil 2.9. A– ADP ile elde edilen agregat, trombositler , yalancı ayakçık ile birbirine bağlanan amorf kitle oluştururlar. B– Epinefrin ile elde edilen agregatlar. Trombosit membranı düz yapısını korur.

ADP, sitoplazmik serbest kalsiyum miktarını ve hücre içine kalsiyum girişini artırır. Diğer özelliği de, uyarılmış adenil siklazı inhibe etmek ve trombositlerin

hücre iskeletinin yeniden yapılandırmasını düzenlemesidir. Aynı zamanda ADP, fosfolipaz C'nin zayıf bir aktivatörüdür. Bazı araştırmacılar ADP'nin, trombositleri, G proteini (G12) üzerinden aktifleştirdiğini ileri sürmektedirler. Son bulgular, trombosit üzerinde iki adet ADP reseptörü olduğunu göstermektedir. Birincisi G proteini ile eşleşmiş durumda bulunur ve trombosit agregasyonuna aracılık eder, ikincisi ise kalsiyumun hücre içine girmesinden ve şekil değişikliğinden sorumludur (43,44).

2.3.2. Epinefrin:

Epinefrin, diğer trombosit agonistlerinden, trombosit agregasyonu başlatmasına rağmen trombosit şekil değişikliğine neden olmaması ile ayrılır (şekil 2.9B). Fosfolipaz C'nin epinefrin tarafından etkinleştirilmesi, tromboksan A2 oluşumu ile direkt olarak bağlantılıdır ve bu etki aspirin tarafından inhibe edilir. Ancak tromboksan A2'nin varlığının, epinefrin ile oluşturulan trombosit agregasyonunda elzem olmadığı anlaşılmıştır (1). Deneylerde aspirin ile inhibe edilmiş trombositler epinefrin ile muamele edilince, hala GP IIb-IIIa aktivasyonu ve fibrinojen bağlanmasının oluşabildiği gözlenmiştir. Epinefrinin olası diğer etki mekanizması da trombosit membranında Na⁺/H⁺ değişim hızını etkilemesi ve böylece fosfolipaz A2 aktivasyonunu düzenlemesidir. Trombositlerin epinefrine yanıtları son derece değişkendir ve her zaman doğru agregasyon yanıtını yansıtmaz (20).

2.3.3. Kolajen:

Kolajen, aktivasyonu tetikleyen, adezyonu, granül boşaltımını ve trombosit agregasyonunu başlatabilen, çözülmeyen bir proteindir. Düşük doz kolajen ile başlatılan trombosit agregasyon süreci degranülasyon ile sonuçlanır ve aspirin inhibisyonuna son derece duyarlıdır. Trombositlerde kolajen reseptör görevi gören birden fazla protein vardır. Başlıca proteinler GP Ia/IIa (integrin $\alpha_2\beta_1$) ve GP VI'dır. GP IV'ün de kolajen bağlama özelliği olduğu ileri sürülmektedir (37). Trombin ve ADP gibi diğer aktivatörlere benzer şekilde kolajen ile uyarılma, sitoplazmik kalsiyum düzeylerinde ve fosfoinositoidlerin üretim ve döngüsünde artış ile sonuçlanmaktadır. Kan akımını taklit eden perfüzyon kamarasında yapılan deneylerde trombositlerin kolajene yapışması vWF ün trombositlerdeki GP Ib ile

etkileşime girmesine bağlıdır. Ortamdaki kolajene bağlanan vWF immobilize olur ve trombositler GP Ib aracılığı ile ona yapışırlar (34). Yapışan trombositler immobilize kolajene GP Ia/IIa ve GP IV aracılığı ile bağlanırlar. Bunun sonucunda trombositler uyarılır ve agregat oluşturmak üzere etraftaki diğer trombositler ile bir araya gelirler (recruitment) (20,60).

2.3.4. Trombin:

Trombin bilinen en güçlü trombosit agonistidir. Trombin reseptörü, 425 amino asitten oluşan ve membran çevresinde yedi kez dolaşan bir integral proteindir. Reseptörün hücre dışı kısmı oldukça büyük bir amino terminal içerir ve bu terminal, trombin tarafından Arg-41 bölgesinden ikiye bölünür. Bu amino terminalin bölünmesi sonucunda ortaya yeni bir amino terminal ortaya çıkar ve yeni terminal reseptörün diğer bölgesine yapışır (23) Trombositlerin trombin tarafından uyarılmaları fosfolipaz C ve fosfolipaz A2 üzerinden gerçekleşir. Fosfolipaz C, plazma membranı fosfolipidlerin parçalanmasını kataliz eder. Sonuçta 1,2-diaçilgliserol(DAG) ve 1,4,5- inositol trifosfat (IP3) birikimi olur. Diaçilgliserol, protein kinaz C'yi aktive ederken, IP3 hücre içi depolardan kalsiyumun serbestleşmesini sağlar. Fosfolipaz A2 , araşidonik asit yapımını artırır ve ardından da araşidonik asitten güçlü bir trombosit agonisti olan tromboksan A2 üretimi başlar. Tromboksan A2 plazma membranındaki reseptörlere bağlanır ve böylece trombositlerin uyarılmaya karşı yanıtlarını güçlendirir. Trombin etkisiyle oluşan diğer reaksiyonlar protein kinaz C aktivasyonu, fosfatidil inositol 3-kinaz aktivasyonu, aktin polimerizasyonu, miyozin hafif zincir fosforilasyonu, tirozin kinazların aktivasyonu ve GP IIb-IIIa aktivasyonudur (20, 33).

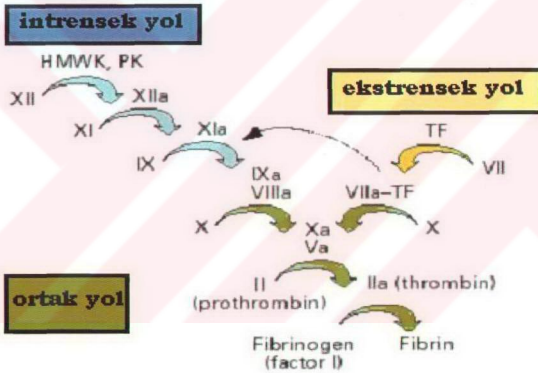
2.3.5. Trombositlerin antikor aracılığı ile aktivasyonu:

Monoklonal antikorlarla meydana gelen trombosit aktivasyonu, antikorun kendi antijeni ile olan etkileşimi, antijenler arasındaki çapraz bağlanma veya antijenin Fc reseptörü ile olan çapraz bağlanmasıyla olur. Son araştırmalarda trombosit yüzeyinde ortalama 3000 adet FcR2 reseptörü bulunduğu keşfedilmiştir. Fc reseptörün trombosit aktivasyonundaki rolü tam olarak bilinmemektedir; ancak deneylerde Fc

reseptörün ve antijen çapraz bağ oluşumu sonucunda trombine benzer güçte bir aktivasyon meydana geldiği gösterilmiştir (61).

2.4. Trombositlerin Koagülasyondaki Yerleri:

Koagülasyon kaskadının aktivasyonu, damar duvarının epitel hasarı sonucunda ortaya çıkması ve doku faktörün salgılanması ile başlar. Bunun sonucunda trombin oluşur ve fibrinden fibrinojen üretecek reaksiyonlar tetiklenirken bir taraftan da trombosit aktivasyonu başlar.



Tablo 2.2. Koagülasyon şeması

Fibrin oluşumu trombüsün sağlanması için anahtar rol oynar. Katı ve çözünmeyen fibrin iplikçikleri oluştuğunda, fibrin çatası yüksek kan akımı esnasında meydana gelen basınca direnç gösterecek yapıyı kazanır. Trombosit aktivasyonu sonucunda trombositlerin dış membranları üzerinde fosfatidil serin artışı olur ve böylece faktör Va ile VIIIa'nın bağlanma yerlerinin sayısı artar, bu durum artmış prokoagülan aktivitesine neden olur. Hemostazın doruk noktası, artmış trombin yapımıdır (1). Trombosit aktivasyonunun bir sonraki basamağında, pıhtı artırıcı

özellikleri olan trombosit mikropartikülleri oluşur. Örneğin Scott sendromunda bu mikropartiküller erken evrede dağıldığından koagülasyon duraksar ve pıhtı oluşamaz (62).

3. TROMBOSİT FONKSİYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ: AGREGOMETRE VE DİĞER YÖNTEMLER

Trombosit agregasyonu, 1970'lerin başından beri trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanılan en önemli yöntemdir. Bu zamandan günümüze ölçüm teknolojisi fazla değişmemiş olmasına rağmen günümüzde lumiagregometre gibi yöntemlerle trombositlerin nükleotid içeriğini ve salınımını daha kolay ölçülebilir. Kliniğe başvuran hastaların trombosit fonksiyonlarına bakılmadan önce detaylı fizik muayene yapılması, ilaç kullanım öyküsünün sorgulanması, kan sayımı , periferik yayma ve kanama zamanı bakılması önemlidir. Tüm bu işlemler sonucunda gerçekten trombosit fonksiyon bozukluğu düşünülürse agregometre yöntemine geçilmelidir. İlaç öyküsü önemlidir; keza aspirin, NSAİİ, beta laktam antibiotikler ve hemen her ilaç potansiyel olarak trombosit fonksiyonlarını etkileyebilir. Bu etki bir çok ilaç için ancak ileri yöntemlerle tespit edilebilir ve genellikle klinik önemi yoktur. Özellikle fosfolipaz metabolizmasını, siklooksijenaz yolunu inhibe eden aspirin, ADP antagonisti olan klopidogrel ile tiklopidin ve immün antikor yanıtı başlatabilen beta laktam antibiotikler (özellikle sefalosporinler) dikkate alınmalıdır.

Membran stabilize edici ajanlar	Trombosit reseptör antagonistleri (absiksimab,tirofiban) Beta blokerler Lokal anestetikler (prokain) Antihistaminikler Trisiklik antidepresanlar
Prostanoid sentezini etkileyen ajanlar	Aspirin ve ASA içeren ilaçlar, NSAİİ Kortikosteroidler
Antibiotikler (genelde yüksek dozda)	Penisilinler, Sefalosporinler Diğer beta-laktam türevleri
Siklik AMP düzeyini arttıran ajanlar	Dipiridamol, aminofilin, prostanoidler
Yiyecek ve içecekler	Alkol,sarımsak
Diğer	Heparin, dekstran, etanol, fenotiazin, klofibrat, papaverin

Tablo 3.1. Trombosit fonksiyonlarını etkileyen ilaçlar

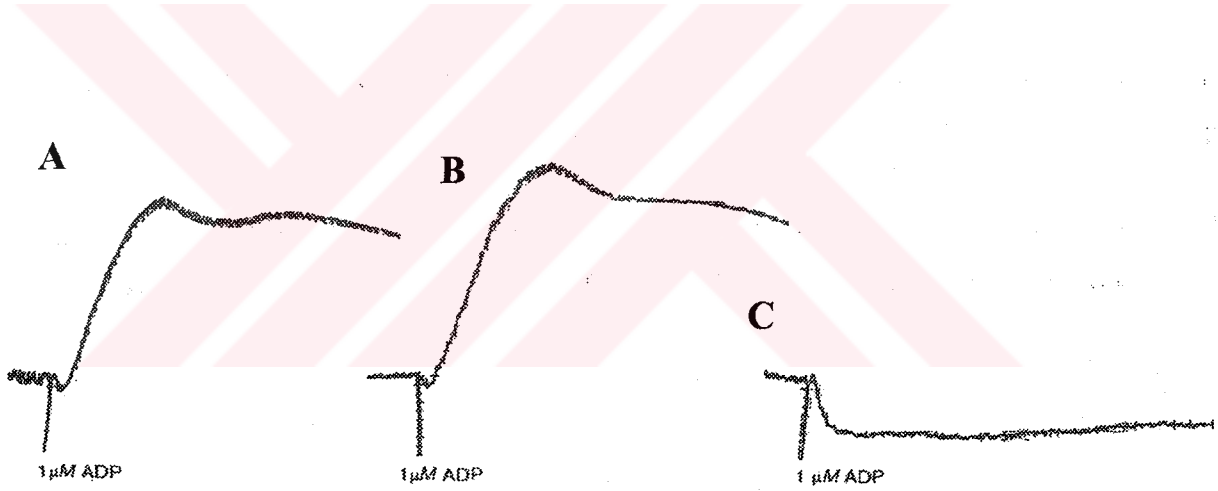
Eğer agregometre ile bozukluk tespit edilemez ise depo havuzu hastalıkları ve salınım bozuklukları araştırılmalıdır. Bunun için lumiagregometre, GP Ib, GP IIb-IIIa flow sitometrik analizi, reseptör occupancy yöntemleri günümüzde kullanılmaktadır (20).

Agregasyonu incelemeyen önce, değişkenleri belirlemek ve standardize etmek önemlidir. Aşağıda en önemli değişkenler hakkında bilgi verilmektedir.

3.1.Değişkenler

3.1.1. Kullanılan antikoagülanlar

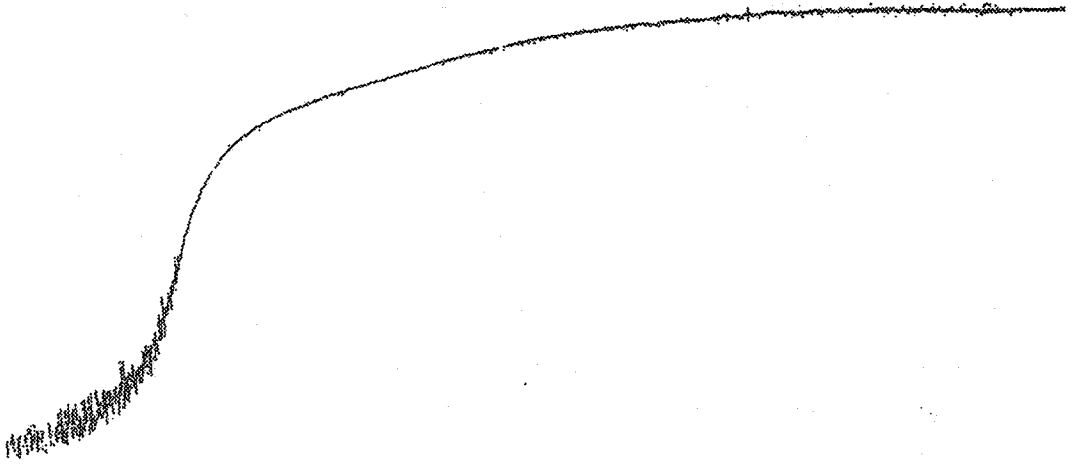
Sitrat: Trombositlerin agregasyon çalışmalarında geleneksel olarak 9:1 oranında hem 0,1 M hem de 0,129 M (tampone edilmiş ve edilmemiş) sitrat kullanılmaktadır. Kolajen, epinefrin ve ADP gibi geleneksel agonistlerle yapılan aktivasyon sonucunda kullanılan iki sitrat türü arasında fark bulunmamaktadır. ADP'nin düşük konsantrasyonlarda kullandığı durumlarda sitrat konsantrasyonu yüksek ise daha düşük agregasyon cevabı gözlenebilir. Bu durum özellikle, donör hematokritinin yüksek olup gerekli düzenlemeler yapılmadığında daha belirgin hale gelir , çünkü bu durumda sitrat-plazma oranı artmıştır. Eğer örnek 1-2 saatten fazla bekleyecekse pH'ı sabit tutacağından tamponlanmış sitrat kullanılması daha uygundur (63,64) (şekil 3.1).



Şekil 3.1. A – 0.1 M tamponlanmış sitratlı kanda ADP yanıtı. B – 0.129 M sodyum sitratla tamponlanmış kanda ADP yanıtı. C – ACD ile antikoagüle edilen kanda ADP yanıtı.

Heparin: Bazı özel durumlarda heparin trombosit testlerinde kullanılabilir. Ancak birçok kişide, sitrata oranla heparinli tüpe alınan PRP'deki (platelet rich plasma – trombosit zengin plazma) trombosit sayısı belirgin olarak daha az olacaktır. Bunun dışında nadiren de olsa, heparin ile muamele edilen trombositlerde kendiliğinden agregasyon görülebilir (şekil 3.2). Sonuç olarak heparin trombosit

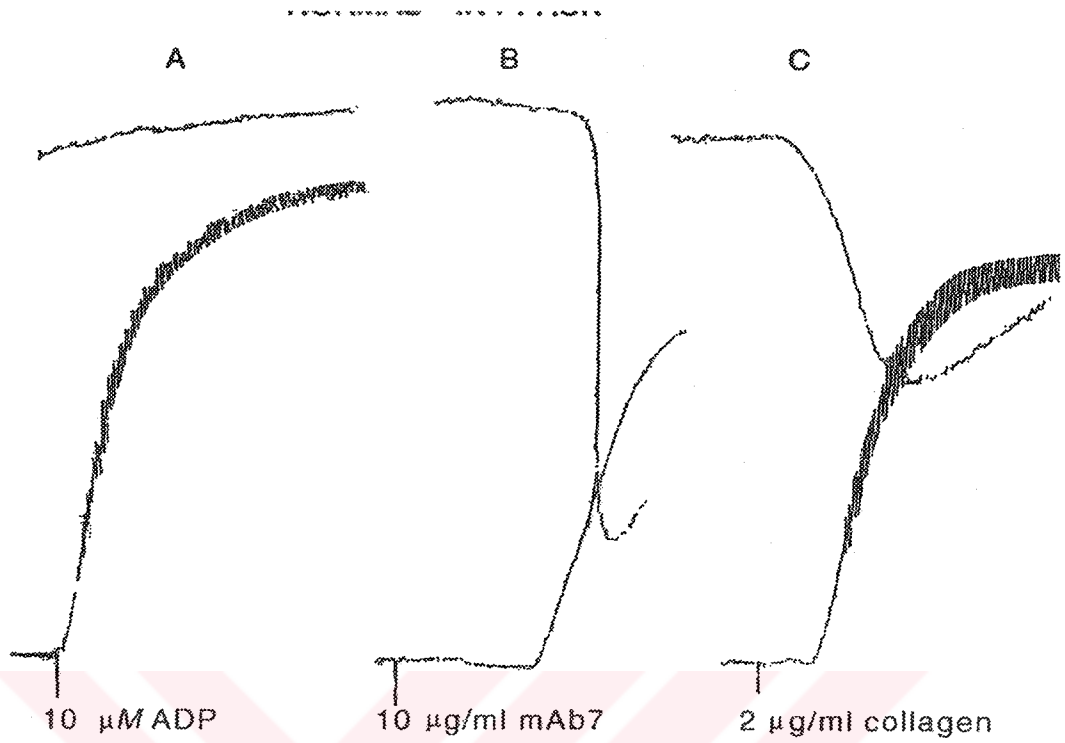
agregasyonu çalışmalarında kullanılmaması gereken bir antikoagülandır (20,65).



Şekil 3.2. Heparinli hemaodialize giren bir hastanın spontan agregasyonunu gösteren eğri.

EDTA: EDTA solüsyonu, agregasyonu sürdürecekt yeterli kalsiyum içermediğinden, uygun bir ajan değildir (65).

PPACK: (şekil 3.3) D-fenilalanin-prolin-arjinin-klorometil keton, bir antitrombindir. Bu ajan kalsiyumu bağlamadığından, kalsiyuma bağlı trombosit fonksiyonlarını bozmaz, ayrıca heparin gibi proagregan özellikler taşımaz. Akut koroner sendromlarda kullanılan bazı GP IIb-IIIa antagonistlerinin, trombosit agregasyonunun IC 50 (%50'sinin inhibe olması için gerekli konsantrasyon) inhibisyonu üzerinde plazma serbest kalsiyumunun belirleyici olduğu gösterilmiştir. Bu etkinin in vitro değerlendirilmesinde, ilaçların agregasyon inhibisyon düzeyini ölçümlerinde PPACK ile antikoagüle edilmiş kan kullanılmaktadır. Ne yazık ki PPACK, oldukça pahalıdır ve antikoagülen etkisi çok uzundur - 0,3 M de etki saatlerce devam eder, 24 saatlik etki ise 2,4 M ile elde edilir (65).



Şekil 3.3. PPACK ile antikoagüle edilen kandan hazırlanan PRP'nin farklı agonistlere karşı olan agregasyon ve sekresyon yanıtları. Üstteki eğri sekresyonu, alttaki eğri agregasyonu gösterir. Sitrata ile hazırlanan kandan farklı olarak PPACK'lı kanın trombositlerinde ADP'ye karşı sekresyon yanıtı gözlenmez –A.

ACD: Bu antikoagülan PRP pH'nı 6,5' a kadar düşürdüğünden, agregasyon deneyleri için uygun değildir. ACD ile trombosit yıkama ve jel-filtrasyon deneyleri yapılabilir (66).

ACD-A ve CPD: Bu bileşikler, PRP'nin pH'nı 7,2'de tutacak şekilde hazırlanmıştır ve agregasyon deneylerinde kullanılabilir (66).

3.1.2. Ortamın pH'ı:

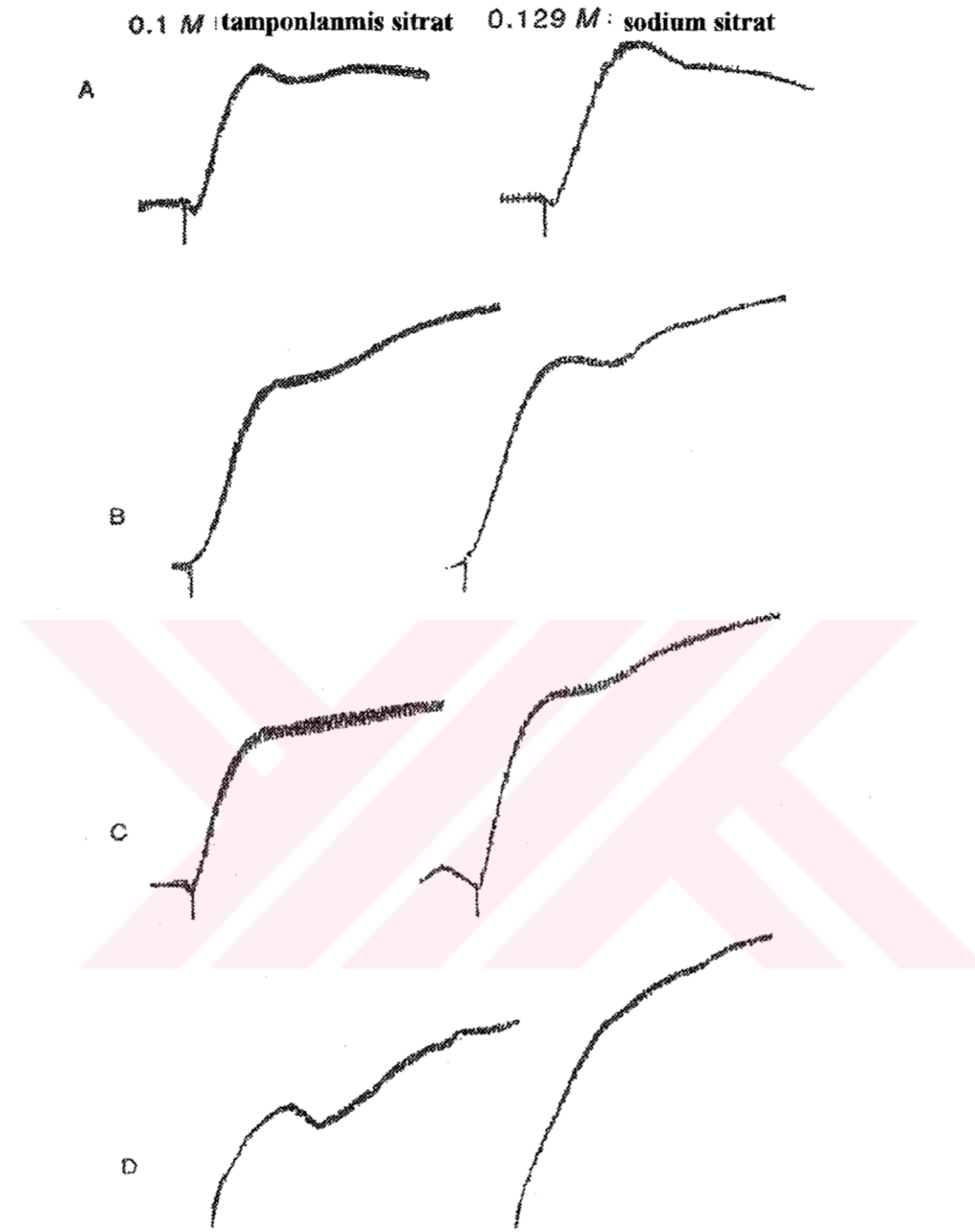
Trombosit agregasyonu testleri, pH 7,2 ile 7,4 arasındaki değerlerde yapılmalıdır. Daha düşük pH'ta trombositlerin yanıt verme yetenekleri giderek azalır ve pH 6,5'ta tamamen yanıtsız hale gelirler. Diğer yandan pH'ın artmasıyla trombositlerin agregasyon yanıtları da artar. pH'ın 8,1'den yüksek olduğu durumlarda spontan

agregasyon gözlenir. Bu durumda trombositleri içinde az hava bulunan kapaklı tüplerde saklamak daha uygun olacaktır (65) (şekil 3.5A ve 3.5B).

3.1.3. Ortamın ısısı:

Trombosit agregasyon testleri in vivo ortamı taklit ederek 37° C de yapılmalıdır. Çalışmalarda soğuk ortamda saklanan trombositlerin yeniden ısıtılıp karıştırıldıklarında spontan agregasyon geliştiği gösterilmiştir. Diğer yandan fazla ısıtılan trombositler agonistlere karşı abartılı agregasyon yanıtları gösterirler (55) (şekil 3,4 A, 3,4C, 3,4 D).





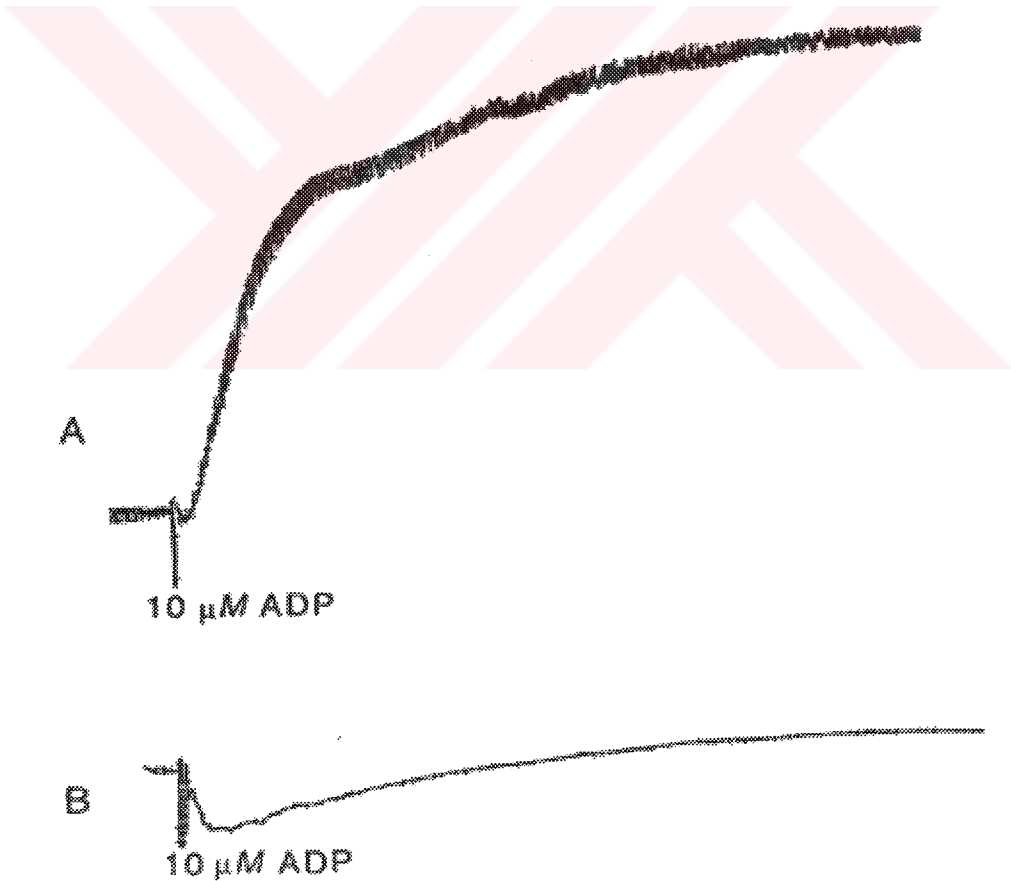
Şekil 3.4. Trombosit hazırlanması ve çevre faktörlerin agregasyon üzerindeki etkisi. A – uygun şekilde hazırlanan trombositlerin agregasyon eğrileri. B – Trombositlerin ortam pH tamponlanmış sitratta 8,0 e, sodium sitratlı kanda ise 8,5 e kadar arttırıldıktan sonra gözlenen hiperagregasyon. C – buzlu suda 15dk boyunca saklanan trombositlerde gözlenen artmış agregasyon. D – buzdolabında (4° C de) uzun süre saklanan trombositlerde spontan agregasyon.

3.1.4. Kullanılan tüpler:

Trombositler, plastik veya silikonlu cam tüplerde saklanmalıdır. Üzeri kaplanmamış cam trombositleri aktive eder. Trombosit hazırlanması ve saklanması polipropilen tüplerin polistiren ve polikarbonat tüplere göre daha güvenli olduğu gösterilmiştir (20,65).

3.1.5. Agregometrenin karıştırma hızı:

Agregasyonun gerçekleşmesi için trombositlerin birbirileri ile temasa geçmeleri gerekir. Karıştırılmamış trombositlere agonist eklenirse, mikroagregatlar oluşur ancak karıştırılmadıkları sürece görülebilen agregat oluşmaz (şekil 2,5). Herhangi bir cihaz için en uygun karıştırma hızı, PRP kolonun yüksekliği, küvetin çapı ve kullanılan karıştırma çubuğunun büyüklüğüne göre ayarlanır (65).

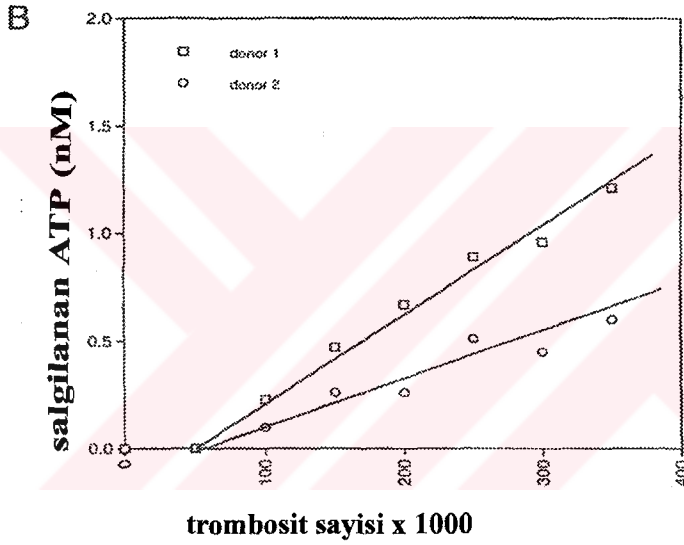
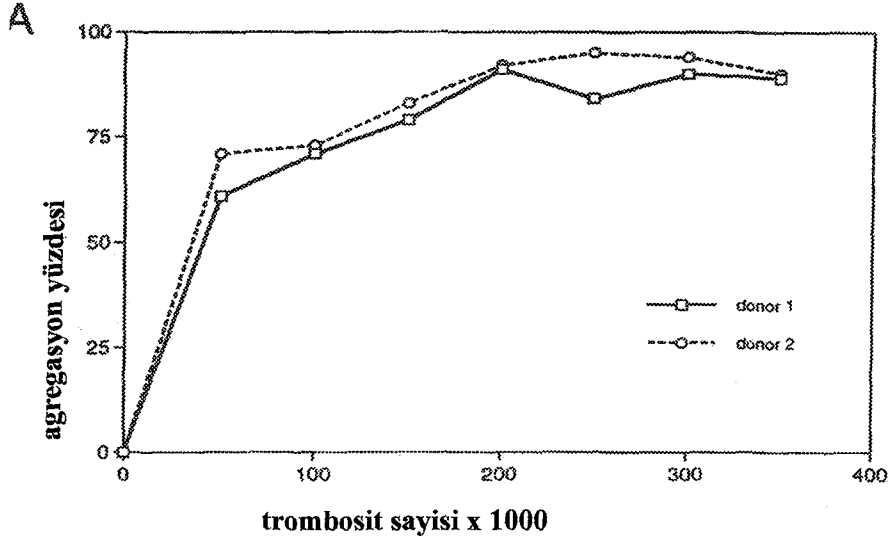


Şekil 3.5. A – karıştırılan PRP de agregasyon yanıtı. B – karıştırılmamış PRP deki agregasyon yanıtı.

3.1.6. Trombosit sayısı:

PRP hazırlanırken örnekler arası değişkenliği en aza indirmek amacıyla, PPP (platelet poor plasma) kullanarak trombosit sayıları aynı seviyeye getirilmelidir. Trombosit agregasyonu trombosit sayılarından etkilenebilir; ancak bu etkinin görülmesi için trombosit sayısının gerçekten çok düşük olması gerekir. Bunun tersi olarak nükleotid salınımı ölçümleri, trombosit sayısından belirgin olarak etkilenirler (şekil 3,6). Eğer çalışmalar düşük trombosit sayısıyla yapılıyorsa, çıkan sonuçlar normal sonuçlara göre ayarlanmalıdır. Normal bir çalışma yürütmek için trombosit sayısının 250,000 ile 300,000/mm³ arasında olması gereklidir (20,65).





Şekil 3.6. A – trombosit sayısına göre agregasyon yüzdesi. B – trombosit sayısına göre sekresyon yanıtı. 10 M ADP ile oluşturulan agregasyon eğrilerinden alınan sonuçlar.

3.1.7. Fibrinojen:

Fibrinojen, trombosit agregasyonu için elzendir. Çok düşük fibrinojen konsantrasyonları ve anormal yapıdaki fibrinojen, trombosit agregasyonunu inhibe edebilir (65).

3.1.8. Hemoliz:

Parçalanmış eritrositlerden ortaya salınan nükleotidler ADP'ye yanıtı baskılayarak, trombosit fonksiyonlarını bozabilirler (65).

3.1.9. PRP'ye eritrositlerin karışması:

PRP içinde eritrositlerin bulunması, trombosit agregatların agregometre tarafından tespit edilmesini engelleyebilir ve agregasyon yüzdesini düşük gösterebilir (65).

3.1.10. Lipemi:

PRP'de yüksek oranda lipit (özellikle trigliserit) bulunması ışık geçirgenliğini değiştirerek agregometrenin yanlış ölçüm yapmasına neden olabilir (65).

3.1.11. Kan alma tekniği:

Yapılan araştırmalarda Vacutainer ile toplanan kanlarda düşük düzeyde erken trombosit aktivasyonu gözlenmiştir. Bu şekilde toplanan kanlarda yapılan agregasyon çalışmalarında ADP'ye karşı artmış yanıt tespit edilmiştir. Agregasyon çalışmaları için kan örnekleri plastik enjektör ile fazla negatif basınç uygulamadan ve damar etrafındaki dokuları travmatize etmeden alınmalıdır (65).

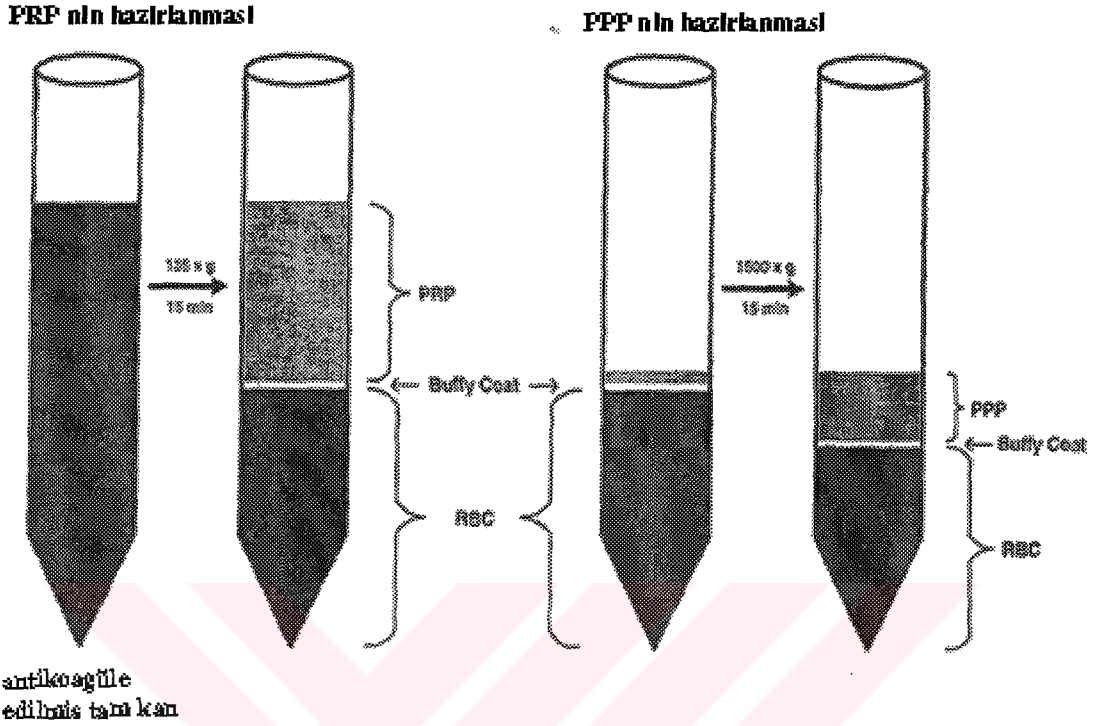
3.2. Kanın Trombosit Agregasyonu için Hazırlanması

3.2.1. Yöntem:

İdeal olarak, trombosit fonksiyon çalışmaları için toplanan kan plastik enjektör ile alındıktan sonra 1ml tamponlanmış sitrat içeren plastik tüplere konulmalı. Ardından, tüpteki kanlar bazal trombosit sayısına göre, 135 ile 800 r/min arasında bir devir hızı ile 10-15 dakika santrifüj edilir. İşlemin sonunda eritrositler, lökositlerin büyük bir kısmı ve trombositlerin az bir kısmı tüpün alt kısmına çöker. "Buffy coat"un üzerindeki kısımda trombositten zengin plazma bulunmaktadır (PRP). Mikropipet yardımı ile alttaki eritrositlerle karıştırılmadan PRP uzaklaştırılır ve ayrı bir plastik tüpe konulduktan sonra trombositler sayılır. Eğer sayı istenilenden fazla ise eldeki PRP, trombositten fakir plazma (PPP) ile formüle uygun olarak dilüe edilir.

PPP elde etmek için, PRP'si alınan santrifüj edilmiş kan bir kez daha 1500-3000 r/min hızında 15 dakikada santrifüj edilir. Bu işlemin sonunda eritrosit ve

“buffy coat” üzerinde berrak, trombositten fakir ve başka hiç bir hücre içermeyen plazma bulunur. Buna trombositten fakir plazma denir- PPP (şekil 3,7) (65,69).



Şekil 3.7. Tam kan örneğinden PRP ve PPP hazırlanması.

Hematokritin normal sınırların dışında olduğu durumlarda, uygun plazma – sitrat oranını tespit etmek için şu formül kullanılır:

$5/(1-0,Hct) = 1ml$ antikoagülana eklenmesi gereken tam kan miktarı.

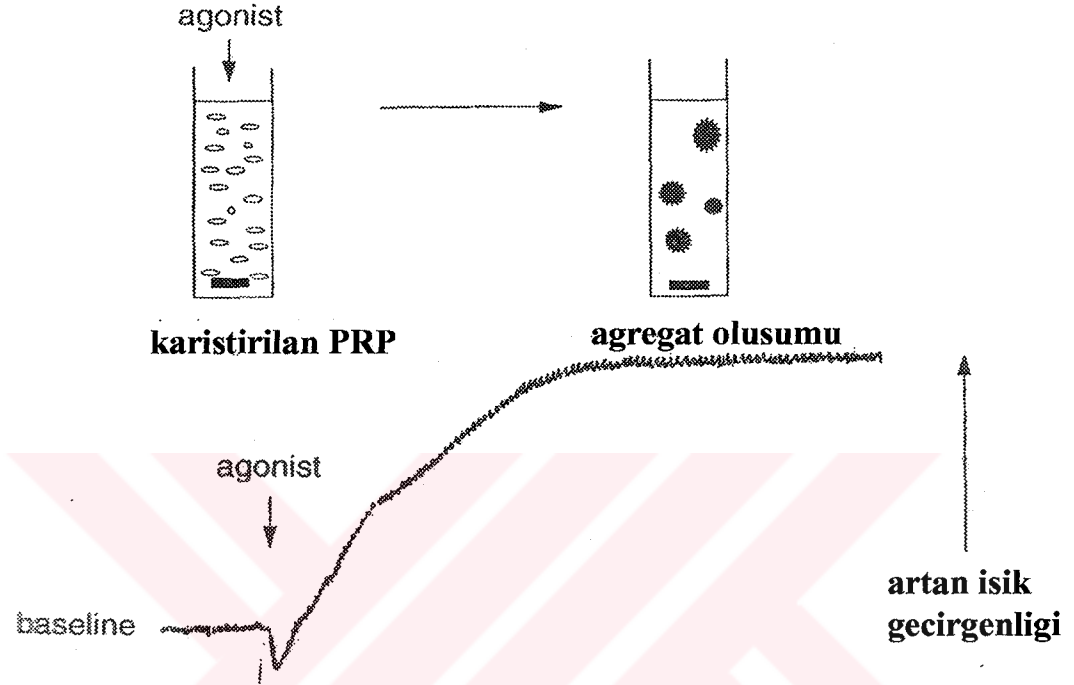
Trombositten zengin plazmanın içindeki trombosit sayısını ayarlama formülü:

İstenilen PRP sayısı / Eldeki PRP sayısı (ml) + PPP(ml) = 1ml Ayarlanmış PRP

3.3. Trombosit Agregasyonu ve Sekresyonu:

Trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesinde en sık kullanılan laboratuvar yöntemi, agregometre yöntemidir. Bu cihaz, karıştırılmakta olan trombosit süspansiyonuna dışardan agonist eklenmesi sonucunda zamana karşı gelişen ışık geçirgenliğinin artışı kaydeder (şekil 3,8). Diğer bazı cihazlar ayrıca agregasyon

oluşum hızını da ölçer. Trombosit granüllerinin içindeki maddelerin ortama salınmadan agregasyonun anormal olacağı bilinmektedir. Böyle bir durumda agregasyon eğrisinin sadece primer dalgası tespit edilir. Bu anomali olası depo havuzu hastalığı veya salınım kusurunun işaretidir ve ileri tetkiklerle araştırılmalıdır (65,68,69).



Şekil 3.8. Agregasyon eğrisi paralelinde devam eden agregat oluşumu ve artan ışık geçirgenliğini gösteren şema.

3.3.1. Trombosit agregasyon yöntemi

Daha önce tarif edilen yöntemine uygun olarak PRP hazırlanır.

Agregasyon küvetine 0,45-0,50ml PRP eklenir. Bu PRP “%0 ışık geçirgenliği”ni ifade eder.

Ayrı bir küvete 0,45-0,50ml PPP konur. PPP küveti, “%100 ışık geçirgenliği”ni ifade eder.

Her iki küvete karıştırma çubuğu eklenir ve 2 dakika ısıtılır. Küvetlerin kenarları parmak izlerinden oluşan artefaktları ortadan kaldırmak için dikkatlice silinir.

PPP içeren küvet reaksiyon kamarasına konur ve cihaz %100 ışık geçirgenliğine uygun olarak ayarlanır.(PPP = TAM GEÇİRGENLİK)

PPP küveti yerine PRP içeren küvet konur ve cihaz bu kez %0 ışık geçirgenliği noktasına göre ayarlanır (PRP = IŞIK GEÇİRGENLİĞİ YOK)

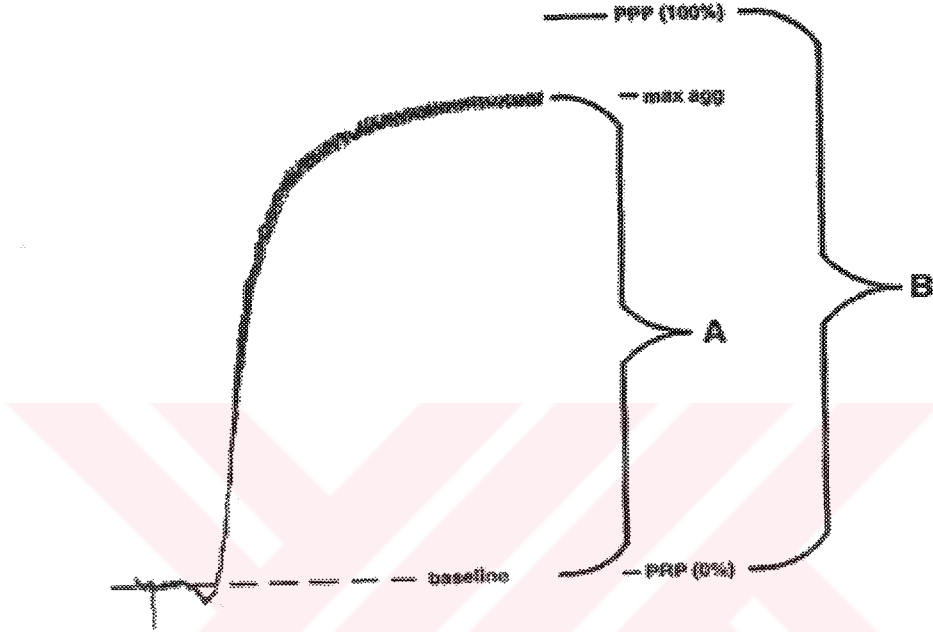
Cihaz bir kez sıfırlandıktan sonra, PRP ile 30 saniyelik bazal grafik çizilir ve ardından PRP'ye agonist ilave edilir.

Çizilen grafiğin maksimal noktasına gelmesi ve 2-3 dakika bu düzeyde değişmeden seyrettiği gözlenince test bitirilir ve sonuçlar hesaplanır (65,67-69).

3.3.2. Sonuçların hesaplanması:

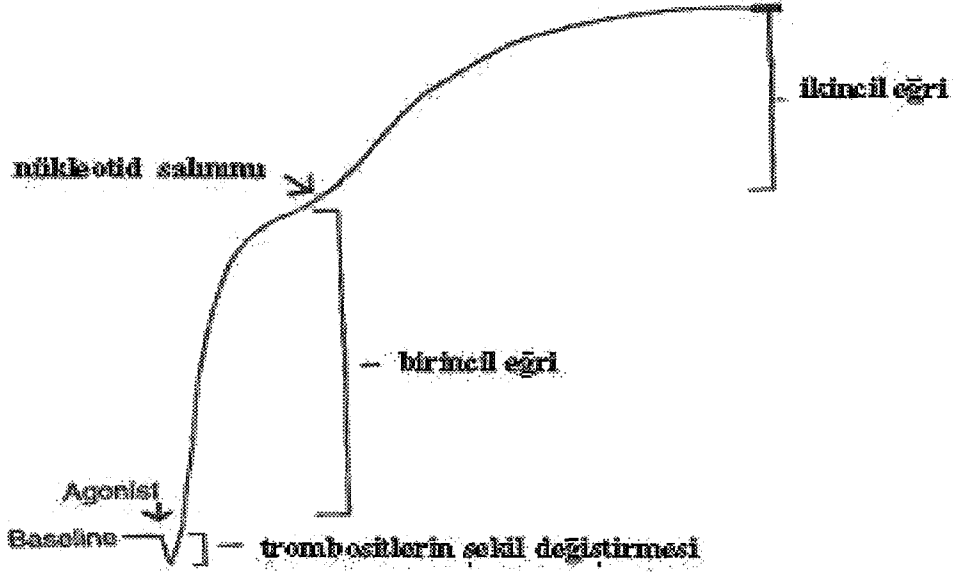
Trombosit agregometresi ile elde edilen grafikler üzerinde yapılan iki temel ölçüm vardır. Bunlardan birincisi maksimal agregasyon yüzdesi, agregasyon cevabının gücünü gösterir. Diğeri agregasyon eğimi veya agregasyon hızıdır. Bu von Willebrand faktör ristosetin kofaktör aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Her iki ölçüm de kolaylıkla cihaz kullanmaksızın yapılabilir ve be şekilde yapılması tercih edilir, çünkü otomatik ölçen cihazlar deagregasyonu ayrt edemediklerinden bazen yanlış düşük sonuçlar verebilirler (20,68,69).

Maksimal agregasyon yüzdesinin hesaplanması: Kayıt kağıdındaki bazal çizgi ile %100 noktası arasındaki kareler sayılır (B). Bazal çizgi ve eğrinin en üst noktası arasındaki kareler sayılır (A). A/B maksimal agregasyon yüzdesidir (şekil 2,9).



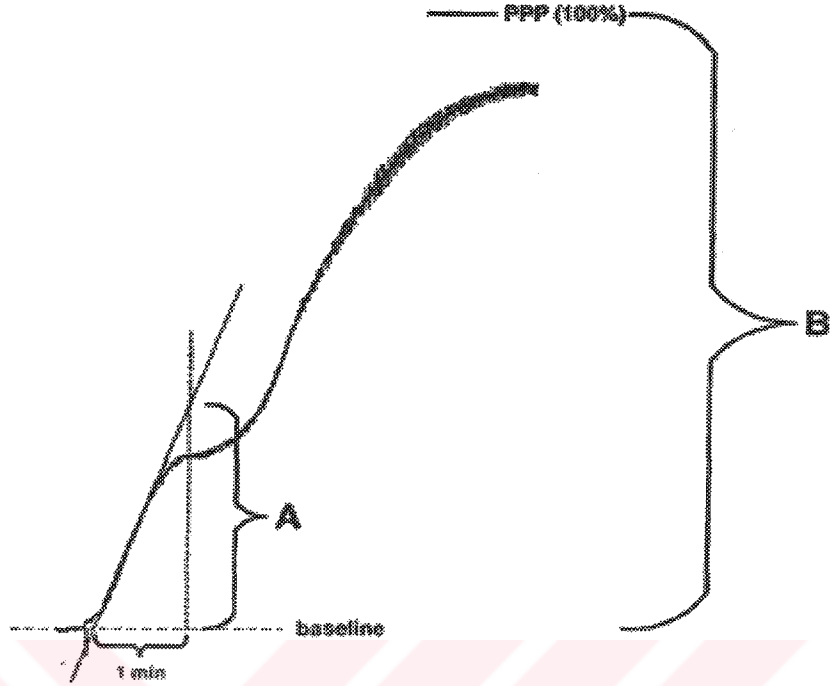
Şekil 3.9. Maksimal agregasyon yüzdesinin hesaplanması A/B

Agregasyonun sayısal değerinin hesaplanması dışında, agregasyon eğrilerin şekilleri de değerlendirilmelidir. Her agoniste karşı ayrı bir agregasyon eğrisi olduğundan eğrinin şeklinden yola çıkarak birçok bozukluk hakkında yorum yapmak mümkündür. İdeal agregasyon şekli şekil 3.10 de gösterilmektedir.



Şekil 3.10. İdeal agregasyon şekli

Eğim veya agregasyon hızının hesaplanması (şekil 3.11): Agregasyon eğrisine teğet bir doğru çizilir. Kayıt kağıdının bir dakikada kaç kare çizdiği sayılır. Bazal çizginin bir dakika mesafesinden, 90 derecelik açı ile, agregasyon eğrisine teğet olan doğru yönünde ikinci bir doğru çizilir. Her iki doğrunun kesiştiği nokta bulunur (A). Bu noktadan bazal çizgiye kadar olan kareler sayılır ve 0 ile %100 noktası arasındaki kareler toplamına bölünür. Elde edilen sonuç, agregasyon eğrisinin eğimi veya başka bir ifade ile agregasyon reaksiyonunun hızıdır (M). $M = A/B$.



Şekil 3.11. Agregasyon eğrisinin hesaplanması. $M=A/B$

3.3.3. Trombosit sekresyonu:

Trombosit sekresyonu çalışmaları agregasyon testlerine göre, trombosit fonksiyonu araştırmalarından daha ileri bir basamaktır. Bu tip tetkikler, depo havuz hastalıkları ve granül salınım defektleri sendromlarından şüphelenildiğinde kullanılır. Hastalar genelde herhangi bir ilaç öyküsü vermemektedir; ileri düzeyde kanama bozuklukları ve normal agregasyon sonuçları göstermektedirler. Aynı zamanda bu çalışmalar klinik araştırmalarda, trombosit aktivasyonu ve inhibisyonu araştırılırken de kullanılmaktadır. Trombosit sekresyonu değerlendirmesinde dört yöntem kullanılmaktadır (69,70):

Lumiagregasyon: Bu yöntemle trombosit sekresyonu ve agregasyonu eş zamanlı olarak ölçülür. Yöntemin çalışma prensibi, ateşböceği lusiferazı ile boyanan ATP'nin salınım düzeyini ölçmektir, eş zamanlı olarak agregasyon eğrisi de elde edilir (69).

C 14 Serotonin salınımı: Bu yöntemle dense granüllerin salınım kusurları değerlendirilir.

Beta tromboglobülin ve trombosit faktör 4 (PF 4) düzeyi ölçümü: PF 4 ölçümü alfa granüllerin fonksiyonları hakkında bilgi vermektedir.

Dense granüllerin uptake ve salınımının flow sitometrik yöntemlerle değerlendirilmesi (70)

3.3.4. Agregasyonun kullanılan trombosit agonistine göre değerlendirilmesi:

ADP: Trombosit agregasyonu araştırmalarında genellikle 1 M ile 10 M arasındaki konsantrasyonlar kullanılmaktadır. Yüksek konsantrasyonlar kullanıldığında genellikle monofazik eğri elde edilirken düşük konsantrasyonlarda (1 - 3M arası), monofazik veya endojen ADP salınımını gösteren bifazik eğriler elde edilebilir. Çok düşük konsantrasyonlarda, fibrinojenin bağlanması geri dönüşümsüz olmadığından deagregasyon gözlenir. ADP agregasyonu siklooksijenaz yolunu, dolayısı ile trombosit salınımını da bloke eden ASA ve diğer anti trombositik ajanlarca inhibe edilir (20,68).

Epinefrin: Genellikle 5M ile 10M rasındaki konsantrasyonlar kullanılır. Epinefrinle ilk önce kısa bir erken yanıt eğrisi, ardından da nükleotid salınımına bağlı tam yanıt eğrisi gözlenir. ADP'de olduğu gibi, epinefrinin ikicil yanıtı ASA, NSAİİ, antihistaminikler ve bazı antibiotikler tarafından inhibe edilebilir. Epinefrin, trombosit agregasyon çalışmalarında kullanılan, güvenilirliği en az olan agonisttir, bu yüzden sadece epinefrin eğrisinde bozukluk tespit edilirse trombosit agregasyon kusuru olarak değerlendirilmemelidir (20,68).

Kolajen: Kolajenin bir çok ticari formu bulunmasına rağmen en sık kullanılan at kolajenidir. Genelde 1 ile 5M konsantrasyonlarında kullanılır. Kolajen, laboratuarda kullanılan en güçlü doğal agonisttir. Elde edilen eğride ilk önce, yaklaşık bir dakika süren, negatif değerde bekleme fazı görülür. Bu bekleme fazı esnasında, trombositler kolajen iplikçiklerine yapışır, şekilsel değişikliğe uğrar ve granül salınımı meydana gelir. Görülen agregasyon eğrisi aslında salınım safhasına denk gelen ikincil eğridir. Böylece kolajenin düşük konsantrasyonlarında ASA ve diğer antitrombosit ajanlar, agregasyon yanıtını tamamen inhibe eder ve hiçbir eğri oluşmaz (20,68).

Araşidonik asit (AA): Siklooksijenaz varlığında AA, güçlü bir trombosit agregasyon agonisti olan tromboksan A₂'ye dönüşür. Dolayısı ile siklooksijenaz yolunu inhibe eden ajanlar, AA'ya karşı agregasyon cevabını bozarlar. Bu olumsuz etki salınım kusuru ve Glanzman hastalığı olan kişilerde de görülürken depo havuz hastalığı olanlarda görülmez (20,68).

Ristosetin: Bir antibiyotik olan ristosetin genelde 1,5mg/ml konsantrasyonunda kullanılır. Normal trombosit ve vWF varlığında trombosit agregasyonunu başlatır. Ristosetine yanıtızsızlık Bernard-Soulier hastalığı (GP Ib eksikliği) , von Willebrand hastalığı ve depo havuz hastalıklarında görülür. Diğer agonistlerde olduğu gibi ristosetin yanıtı da ASA ve diğer ilaçlardan etkilenir; ancak tamamen yanıtızsızlık görülmez (20,65,67,69).

Alfa Trombin: Çok güçlü bir agonist olmasına rağmen fibrinojeni ikiye ayırması sonucunda PRP içinde pıhtı oluşumuna neden olduğundan agregasyon testlerinde fazla kullanılmamaktadır. Bunun yerine zor elde edilebilen gama trombin kullanılabilir. Alfa trombin, yıkanmış ve jel filtrasyona uğramış trombositlerle yapılan çalışmalar için daha uygundur (65,68,69).

TRAP: Küçük bir peptid olan, trombin reseptör agonist peptidi (TRAP), trombin reseptöründeki N-terminal bölgesinin trombin tarafından hidrolizi sonucu oluşan "kenetlenmiş ligand" ın amino asid dizinine denk gelir. Bu peptit dizini, fibrinojen parçalanması ve pıhtı oluşumu komplikasyonları olmaksızın, trombin ile oluşan güçlü agregasyonu taklit eder. TRAP'e yanıt, Glanzmann trombastenisi olanların dışında tüm trombositlerde normaldir. Son zamanlarda TRAP, yeni antitrombosit ilaçların farmakodinamik etkilerini araştırmakta kullanılmaktadır. Genellikle 5 ile 10M arasındaki konsantrasyonlarda kullanılır (20,68,69).

m Ab7: Anti-CD9 monoklonal antikoru olan bu agonist, trombosit FC gama RII reseptörü ile CD9 arasında çapraz bağ oluşturur. Genellikle depo havuzu hastalığı ile salınım kusurlarını birbirlerinden ayırdetmek için yapılan çalışmalarda kullanılır. Depo havuzu hastalıklarında anormal yanıt alınırken salınım kusurlarında yanıt normaldir(70). Glanzmann trombastenisi olanlarda, bu agoniste karşı agregasyon cevabı bozulmuştur ancak salınım yanıtı normaldir (71,72).

D3: D3, GP IIIa'ya karşı olan monoklonal bir antikordur. Bu antikor, GP IIB-IIIa kompleksini fibrinojene bağlanması için tetikler ancak trombositleri aktive edemediğinden agregasyon eğrisinde ancak %25-%35 arasında yanıt gözlenir. Bu nedenden dolayı D3 daha çok GP IIB-IIIa'nın şekilsel değişiminin incelendiği araştırmalarda kullanılmaktadır (72).

Sonuç olarak, laboratuarda yapılan her test gibi, agregasyon ve salınım çalışmalarında kullanılan agoniste göre yanıt dağılımını gösteren normal değerler belirlenmelidir. Tablo 3,2 de en sık kullanılan agonistlerin beklenen normal yanıt değerleri gösterilmiştir.

Agonist	Agregasyon yüzdesi (%)	Salınan ATP miktarı (Nm)
10 µM ADP	71-88	0,40 – 0,64
5 µM ADP	69-88	0,41 – 0,63
1 µM ADP	13-58	0 – 0,47
0,5 µM ADP	7-23	0
2 µM /ml Kolajen	70-94	0,46 – 0,74
1 µM/ml Kolajen	26-98	0,26 – 0,76
5 µM Epinefrin	78-88	0,40 – 0,52
0,024 Ü/ml γ-Trombin	17-91	0,80 – 1,60
20 µg/ml mAb7	65-96	0,78 – 1,56
5 µM TRAP	63-96	0,78 – 1,56

Tablo 3.2. Farklı agonistlerin normal agregasyon yanıtı değerleri

3.4. Trombosit Fonksiyonlarının Değerlendirilmesinde Kullanılan Diğer Yöntemler

- Pıhtı retraksiyonu ölçülmesi:

Pıhtı retraksiyonu, tam kan veya PRP de ölçülebilir. Trombositlerin fibrinojenle etkileşime girmesine bağlıdır. Anormal pıhtı retraksiyon sonuçları anormal trombosit sayısı, glikoprotein miktarı ve yapısı, trombosit ileti mekanizması, fibrinojen düzeyi ve yapısının olduğu durumlarda gözlenir (68,73).

- Trombosit adezyonu ölçülmesi

- Trombosit yüzey proteinlerinin flow sitometrik yöntemle ölçülmesi

- Trombosit reseptörlerinin değerlendirilmesi

4. TROMBOSİT FONKSİYON BOZUKLUKLARI

Trombosit fonksiyon bozuklukları kısaca iki ana grupta değerlendirilebilir:

*Zayıf agonistlere karşı düşük trombosit yanıtı (depo havuz hastalığı, salınım kusurları ve diğer aspirin benzeri etki gözlenen durumlar).

*Tüm agonistlere karşı tam tam yanıtızsızlık (Glanzman benzeri hastalıklar – GP IIb-IIIa kusurları). Bu tip agregasyon yanıtızsızlığı, disfibrinojenemi durumunda da gözlenir (1,74).

4.1. Depo Havuz Hastalıkları (SPD) ve Salınım Kusurları:

Depo havuz hastalıkları ve salınım kusurlarında anormal veya eksik ikincil agregasyon eğrisi gözlenir. Bunun sebebi, trombositlerin depo granüllerinden nükleotid salınımında bozukluk olmasıdır. Bu tip hastalıklarda anormal kanama zamanı ve normal agregasyon maksimal yüzdesi gözlenir. Kesin tanı ancak adenin nükleotid çalışmaları ile konur (75,76).

4.1.1. Depo havuz hastalıkları (granül var, ancak anormal yapıda veya içerdiği madde anormal)

Hermansky-Pudlak sendromu (okülokütanöz albinizm)

Chediak-Higashi sendromu (parsiyel okülokütanöz albinizm)

Wiskott-Aldrich sendromu

TAR sendromu

4.1.2. Alfa/dense granül depo havuz hastalığı

4.1.3. Alfa granül yetersizliği (hiç granül yok)

Gri trombosit sendromu

4.1.4. Salınım kusurları (granül var ve normal ancak degranülasyon oluşmuyor)

Aspirin benzeri sendromlar – Siklooksijenaz eksikliği, Tromboksan A2 reseptör defekti

İlaça bağılı – ASA, NSAİİ, Antibiyotikler, Dipiridamol

Trombosit fonksiyonlarını, içerdikleri granüllerin yapısını ve madde salınımını bozan bir çok edinsel sebep vardır. Anormal trombosit fonksiyonlarına neden olan bazı hastalıklar şunlardır (1,74):

Üremi

Prelösemi ve akut lösemi

Miyeloproliferatif hastalıklar

Disproteinemiler

Karaciğer hastalıkları

Antitrombosit antikorlar – SLE, HCV enfeksiyonları, EBV, Adenovirüs, HHV 6, HHV 2, KLL, lenfomalar, Mycoplasma, Rickettsia hastalıkları

4.2. Glanzmann Trombastenisi (GT)

Glanzmann hastalarında, GP IIb-IIIa reseptör yetmezliği veya mutasyonu vardır. GP IIb-IIIa reseptörünün yokluğunu göstermek kesin tanı koydurucudur ancak, bazı genetik varyantlarda GP IIb-IIIa reseptörü mutant şekilde bulunur, bu durumda reseptörün işlevsiz olduğunu göstermek için ileri yöntemler kullanılmaktadır. Bu hastalarda agregasyon testleri uygulandığında ADP, kolajen, epinefrin ve trombine karşı yanıtsızlık gözlenir. Genellikle Glanzmann trombastenili hastalarda pıhtı retraksiyon testi de bozuktur (1,74). Trombosit şekli ve sayısı normaldir.

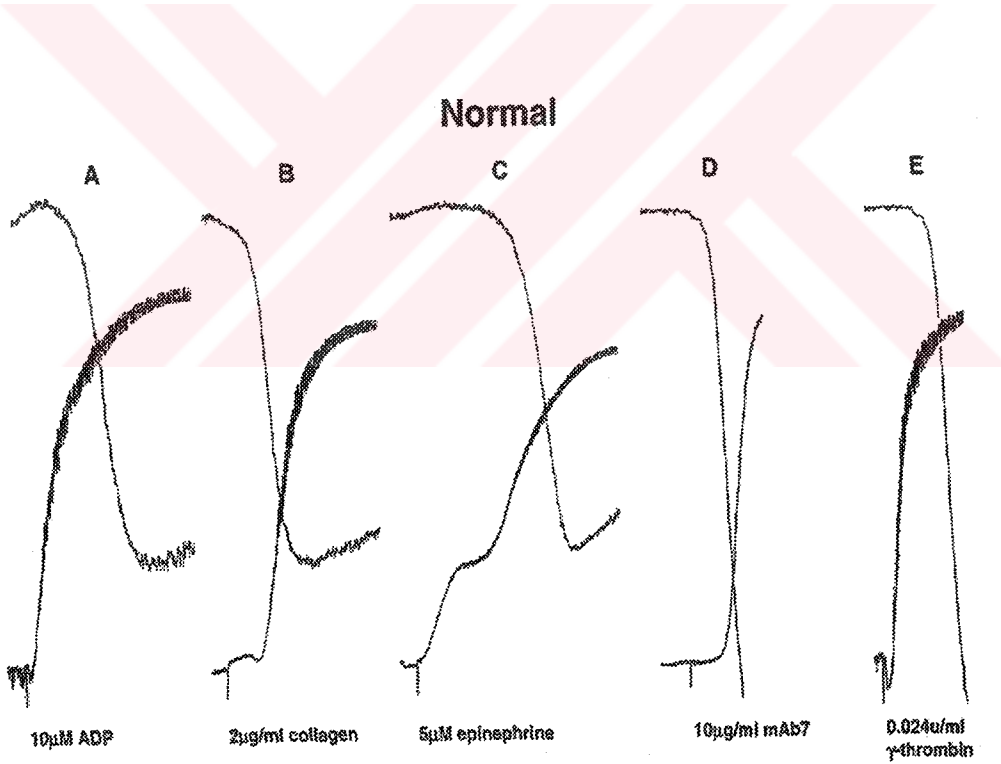
4.3. von Willebrand Hastalığı

von Willebrand hastaları, trombosit fonksiyonları bozuk olan hastalara benzer klinik ile prezente olurlar. Buna rağmen agregasyon testleri, ristosetin yanıtı hariç tamamen normaldir. Bu kişilerde trombositler tamamen normal olmasına karşın, GP Ib-IX'a bağlanarak subendotele yapışmayı sağlayan von Willebrand molekülünde eksiklik veya yapısal kusur bulunmaktadır. Bu sendromun tanısı, faktör VIII koagülasyon aktivitesi (FVIII:C), von Willebrand faktör antijen aktivitesi (vWF:Ag) ve von Willebrand ristosetin kofaktör aktivitesinin (vWF: Rco) ölçülmesiyle konur. Von Willebrand antijeninin multimerik yapısının belirlenmesi hastalığın alt tipinin tespitinde önemlidir (74,76).

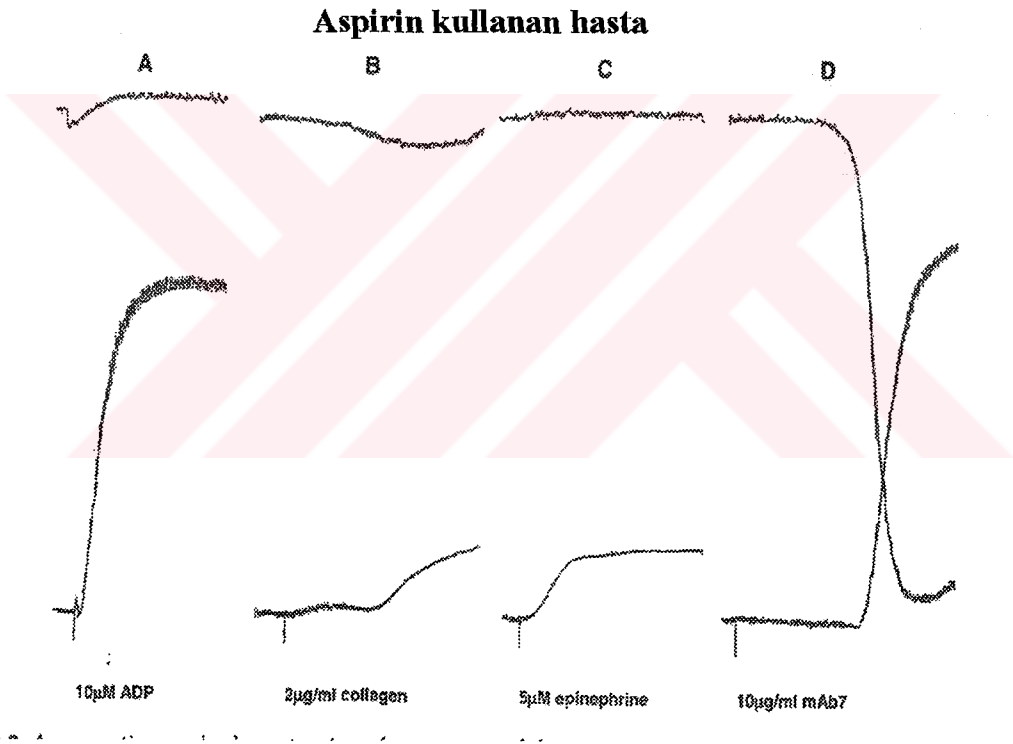
4.4. Bernard – Soulier Sendromu (BSS)

BSS hastalarında GPIb-IX-V eksikliği olduğundan, trombositleri vWF molekülü ile etkileşime giremez. Bu durumda trombositlerin endotele yapışması mümkün olmaz. Hastalar von Willebrand hastalığına benzer bir kanama diyatezi ile başvururlar. Ek olarak sınırda trombositopeni ve büyük trombositler görülür. BSS’de, ristosetin yanıtı dışında tüm agonistlere karşı agregasyon yanıtı normaldir. Bu yüzden sadece agregasyon testleri ile teşhis konmaya çalışılırsa bu hastalık von Willebrand hastalığı ile karıştırılabilir. İki hastalığı birbirinden ayırt etmek için von Willebrand hastalığının tanısında kullanılan testlerin yanı sıra, flow sitometrik yöntem ile GPIb-IX-V’in trombosit yüzey yoğunluğunun ölçümü de yapılabilir (1,74).

Normal agregasyon yanıtları ve yukarıda tarif edilen durumlardaki agregasyon yanıtlar şekil 4,1 – 4,4 te gösterilmiştir.

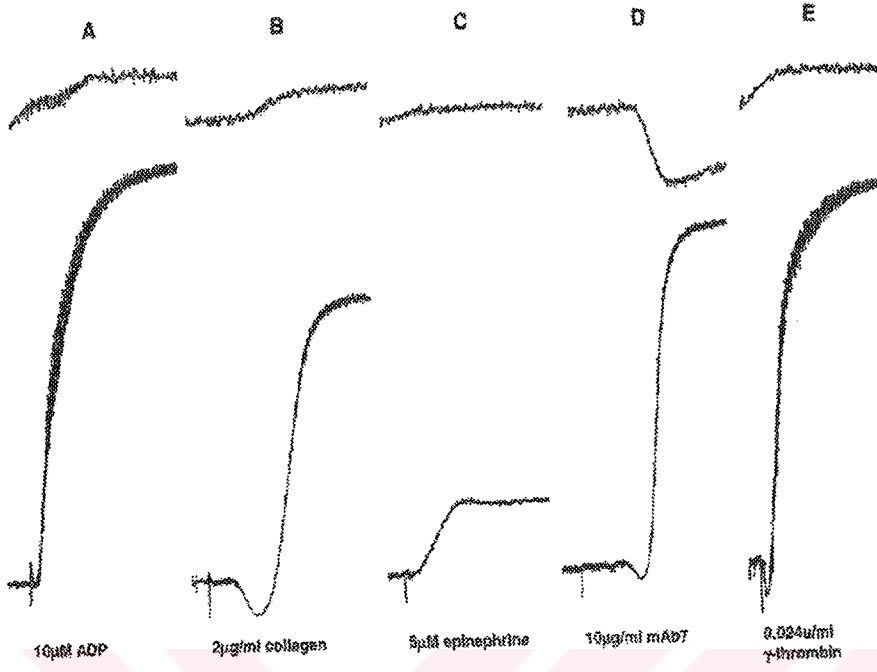


Şekil 4.1. Farklı agonistler ile oluşturulan normal agregasyon ve sekresyon eğrileri



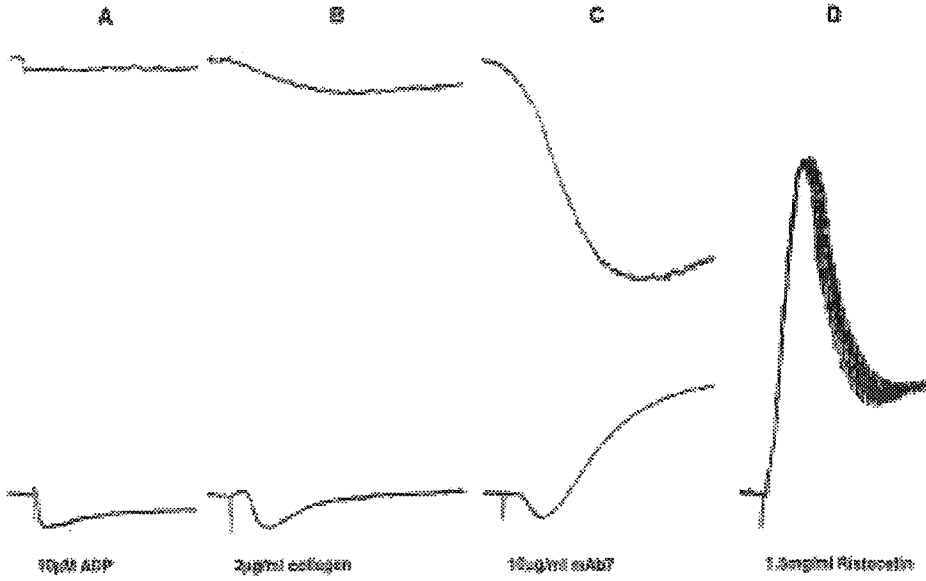
Şekil 4.2. Aspirin kullanan kişilerde farklı agonistlere karşı oluşan agregasyon (alt eğri) ve sekresyon (üst eğri) yanıtları. Siklooksijenaz yolu üzerinden etki eden agonistlere karşı yanıtızsızlık mevcut. Diğer agonistlerle oluşturulamayan sekresyon yanıtı, antikor eklenmesi ile belirgin hale gelir.

Depo havuz hastaligi



Şekil 4.3. Depo havuz hastalığı olan kişilerde gözlenen agregasyon ve sekresyon yanıtları. En güçlü agregasyon agonistlerle bile sekresyon yanıtının alınmadığı gözlenir.

Glanzmann Trombastenisi



Şekil 4.4. Glanzmann trombastenisi olan kişilerde gözlenen agregasyon ve sekresyon yanıtı. Beklendiği gibi GP IIb-IIIa kusurundan dolayı trombosit aktivasyonu gerçekleşmediğinden agregasyon ve sekresyon yanıtı oluşmaz. Antikor uyarımı sonucunda gözlenen psödoagregasyon ve psödosekresyon trombositlerin parçalanması sonucunda gözlenen bir durumdur. Ristocetin erken dönem yanıtı ise GP Ib'ye bağlanan vWF sayesinde gözlenir, ancak fibrinojen bağlanamadığından agregasyon gözlenmez.

4.5. Uzamış Kanama Zamanına Yaklaşım

Trombosit fonksiyon bozukluklarında uzamış kanama zamanı görülebilir, ancak kanama zamanının uzunluğuna bakarak oluşabilecek kanamanın ciddiyeti açısından öngöründe bulunmak yanlış olur. Genel kural olarak kanama zamanı testi, sadece gerçekten kanama diyatezi düşünülen kişilere yapılmalıdır. Hastanın trombosit sayısı 100,000/ml'den düşük olduğu durumlarda agregasyon testleri düzgün çalışmadığından bunun yerine kanama zamanı testi yapılabilir. Trombosit sayısının 10,000 ile 100,000/ml arasında olduğu durumlarda kanama zamanı ile trombosit sayısı arasında ters orantı mevcuttur. Otuz dakikayı aşan kanama zamanı genelde 10,000/ml'den düşük trombosit sayısını gösterir. Trombosit sayısına göre orantısız uzunlukta kanama zamanı trombosit fonksiyon bozukluğun bulgusu olarak değerlendirilebilir. Örneğin, trombosit sayısı 50,000 olan kişinin kanama zamanı 30 dakikadan uzun ise trombosit agregasyon kusuru düşünülüp diğer yöntemlerle araştırılmalıdır (77,78).

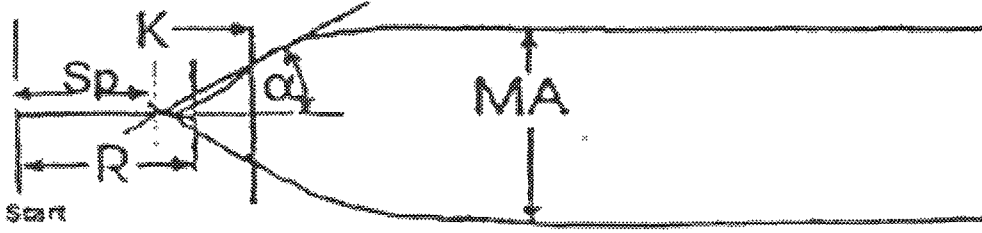
5. HYDROXYETHYL STARCH'IN (HES) HEMOSTAZ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Hydroxyethyl starch (HES), mısır unundan elde edilen, sentetik, koloidal, glikojene benzer bir polisakkarittir. HES solüsyonları, multisistem travmaya bağlı hipoperfüzyon vakaları, ağır sepsis ve dolaşım şoku ile inme gibi periferik perfüzyonun azaldığı durumlarda ve derin ven trombozu profilaksisinde, plazma volüm genişletici ajan olarak kullanılır (79).

Diğer bir çok intravenöz plazma genişletici gibi HES'in de hemostaz üzerinde bazı etkileri vardır. HES'in ilk kullanıma girdiği günlerde, özellikle ağır kanamalı hastaların agresif sıvı resüsitasyonu ardından izotonik solüsyonlara kıyasla kanamayı uzattığı ve bu vakaların kaybedildiği gözlenmiştir. Bunun gözlenmesi sonucunda 1970'li yıllardan itibaren in vitro ve in vivo olarak HES'in hemostaz ve fibrinoliz üzerindeki etkileri araştırılmıştır (7,80,81).

Yapılan araştırmalarda HES'in plazmadaki FVIII:RCo ve vWF:Ag düzeyini düşürerek von Willebrand hastalığına benzer bir kanama bozukluğuna neden olduğu gösterilmiştir (82,83). Bunun dışında son yıllarda yapılan başka araştırmalarda, ürokinaz ile uzamış aktive pıhtı lizis zamanına neden olduğu saptanmıştır. HES'in bu profibrinolitik etkisi, plazminojen aktivatörünün artması, plazminojen aktivatör-inhibitör düzeyinin azalması ve HES'in fibrine bağlanarak fibrinolizi aktifleştirmesine bağlı olduğu düşünülmektedir (7,84).

HES'in koagülasyon üzerindeki etkisini araştıran çalışmalarda, koagülasyonun tüm basamaklarını inceleme avantajına sahip olan TEG ve SONOCLOT yöntemleri kullanılmaktadır (82-84). Bu yöntemlerle yapılan çalışmalarda, K (koagülasyon) zamanının uzadığı ve alfa açısının daraldığı gözlenmiştir.



Şekil 5.1. Trombelastograf normal hemostaz eğrisi. Trombelastograf yöntemi ile trombosit – fibrin etkileşim evresinden pıhtı erime evresine kadar tüm koagülasyon süreci incelenir. Sp zamanı (split time – kesilme noktası), test başlangıcı ile ilk agregat oluşumuna kadar geçen süredir. Reaksiyon zamanı (R), test başlangıcı ile TEG'in 2 mm yüksekliğe ulaşması arasındaki süredir. R zamanı tromboplastin üretim hızını ve intrinsek koagülasyon yolunu yansıtır. Koagülasyon zamanı (K) , R, ile pıhtı sertliğinin 20mm olana kadar geçen süredir. K zamanı, intrinsek sistemin, trombositlerin ve fibrinojenin fonksiyonlarını yansıtır. Maksimum yükseklik (MA – maximum amplitude), pıhtının ulaştığı en yüksek noktadır ve pıhtı elastisitesini gösterir. Trombosit fonksiyonları, fibrinojen ve faktör XIII'ün, MA üzerinde etkileri vardır. Büyüme açısı (α), pıhtı oluşum hızıdır ve trombosit fonksiyonları ile fibrinojendeki değişikliklerden etkilenir.

Son verilere göre HES'in, koagülasyonda önemli rol alan trombositler üzerinde de etkisi olduğu açıktır ancak bu etkinin trombositlerin hangi fonksiyonları üzerine olduğu halen araştırılmaktadır . HES'in fibrinojen üzerinde de etkisi vardır. Bazı araştırmacılar, HES'in, trombosit yüzeyini kaplayarak, fibrinojeni bağlayabildiği göstermişlerdir (85).

HES'in koagülasyon ve fibrinoliz üzerindeki etkileri başlıca infüze edilen toplam miktara , HES molekülünün hidroksilasyon derecesine, C2:C6 hidroksietil oranına, kullanılan solüsyon içindeki HES konsantrasyonuna ve özellikle de HES'in molekül ağırlığına göre belirgin farklılıklar göstermektedir (83). Yapılan çalışmalarda molekül ağırlığı yüksek olan (>200kd) HES solüsyonlarının koagülasyonu daha fazla inhibe ettiği gösterilmiştir (14,83,86). Bundan dolayı üretici

şirketler koagülasyonu en az etkileyen maksimum molekül ağırlığındaki ideal HES solüsyonu tasarımı konusunda çaba sarfetmektedir.

HES in trombosit fonksiyonları üzerindeki etkileri tam olarak anlaşılabilmesi üzerine, son yıllarda PFA (platelet function analyser) yöntemi ile çalışmalar yapılmıştır. PFA yöntemi primer hemostazı global olarak inceler ancak trombosit agregasyonu hakkında bilgi vermez. PFA ile yapılan çalışmalarda primer hemostazın uzadığı, dolayısı ile HES solüsyonunun anti trombosit özelliği olduğu bildirilmiştir (13). Bu etkiyi daha ileri boyutta irdeleyen araştırmacılar, HES ile dilüe edilen kanlarda primer hemostaz esnasındaki GP IIb-IIIa molekülündeki değişiklikleri incelemiştir (14,15). Bu çalışmaların hepsinde GP IIb-IIIa'nın ekspresyonu azaldığı gösterilmiştir. Bu etkinin intraselüler ileti yolları tarafından oluşmadığı anlaşılınca, yapılan deneylerde HES molekülünün trombosit yüzeyine yapıştığı ve bu yüzden GP IIb-IIIa'nın ekstraselüler ekspresyonu azaldığı anlaşılmıştır (14-16,85). GP IIb-IIIa'nın fibrinojen bağlama reseptörü olduğu bilinmektedir bu yüzden, bu reseptörün azalmış ekspresyonu uzamış adezyon ve agregasyona neden olabileceği ileri sürülmektedir (85).

Tarif edilen etkiler dışında HES solüsyonunun, artmış fibrinojen tüketimine neden olduğu ve fibrin polimerizasyonu bozduğu bildirilmiştir (7).

HES in koagülasyon üzerindeki farklı etkileri tanımlanmış olmasına rağmen, bir çok çalışmada bu etkiler klinik olarak anlamlı bulunmadığından, günümüzde bu solüsyon preoperatif ve intraoperatif dönemde yaygın olarak kullanılmaktadır.

6. % 0,9 İZOTONİK NaCl'ün KOAGÜLASYON ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Kristaloidlerin klinikteki kullanımı uzun yıllara dayanmaktadır. En sık kullanılan kristaloidler %0,9 izotonik NaCl solüsyonu ve ringer laktat solüsyonlarıdır. Bu sıvılarla yapılan replasman tedavisi sonucunda koagülasyon kaskadında bazı değişiklikler meydana gelir. İzotonik sıvılar makromolekül içermezler, dolayısıyla koagülasyon kaskadında veya trombositlerde bulunan herhangi bir molekül ile etkileşimleri gösterilememiştir. Buna rağmen klinikte sıklıkla plazma volümünün %20'sini aşan miktarda infüzyonlar yapılmaktadır ve bunun sonucunda da hemodilüsyon meydana gelmektedir (2,3)

Hemodilüsyon tek başına sağlıklı hemostaz sürecini etkilemektedir (2). İlk bakışta hemodilüsyon esnasında pıhtılaşma faktörlerin konsantrasyonları düştüğünden, hipokoagülabilitenin gözlenmesi beklenebilir. Ancak yapılan araştırmalarda izotonik sıvılarla yapılan replasman tedavisi sonucunda klinik önemi tartışılan kısa süren bir hiperkoagülabilitate durumu saptanmıştır (2,5). Günümüzde bunu tam olarak açıklayan bir fizyolojik model tanımlanmamıştır.

Olası mekanizmalardan en çok kabul edileni hemodilüsyon esnasında AT III'ün trombine oranla beklenenden daha düşük konsantrasyonlara düşmesidir. Buna ek olarak koagülasyon inhibitörlerin konsantrasyonlarının azalması sonucunda, koagülasyon yolunun pozitif geri feedback eşiği de düşer ve ardından da normal koagülasyon sürecinden daha hızlı olan bir koagülasyon kaskadı başlar (3).

İzotonik ve ringer laktat ile yapılan bir çok in vivo ve in vitro çalışmalarda, TEG (trombelastograf) eğrisinde Sp ve R zamanında kısalma tespit edilmiştir (3,87). Bu sonuçlar genelde klinik olarak anlamlı kabul edilmese de hiperkoagülabiliteden kaçınılması gereken durumlarda (örn: inme), izotonik sıvıların yaygın olarak kullanılmamasını öneren araştırmacılar vardır (88). İzotonik NaCl ve Ringer Laktatın trombositler üzerindeki etkileri, HES ile yapılan çalışmalarda da tarif edilmiştir. Primer hemostazı PFA yöntemi ile değerlendiren deneylerde kristaloid sıvıların trombosit fonksiyonları üzerine herhangi etkisi bulunmamıştır(16).

7. GEREÇ VE YÖNTEM

7.1. Araştırmanın Genel Özellikleri

Çalışma, Ekim 2004 ile Ocak 2005 arasında, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji-İmmünoloji laboratuvarı ve hastanenin kan bankasında yürütülmüştür. Tanımlayıcı, in vitro çalışma olarak tasarlanmıştır. Çalışmada, sorumlu araştırmacılar dışında kan bankası ve laboratuvarında çalışan laborant ve teknisyenler de gönüllü yardımcı eleman olarak katılmıştır. Araştırma için hastanemiz etik kurulundan onay alınmıştır.

7.2. Örneklerin Seçilmesi

Araştırmaya kan bankamızın sağlıklı kan donörü kriterlerine uyan 20 kişi alınmıştır. Çalışmaya dahil edilme kriterleri şunlardır:

18 ile 50 yaş arasında olması,

erkeklerin 60 kg üzerinde, kadınların ise 50 kg üzerinde olması,

boyun 150 cm'den uzun olması,

kan verme öncesinde ölçülen tansiyon değerleri: Sistolik 110 – 145 mmHg,

Diastolik 70- 90mmHg olması

hematokrit değerinin % 38'den yüksek olması,

HBV, HCV, HIV, VDRL testlerin negatif olması,

bazal trombosit sayısının 120,000/ml den yüksek olması,

son bir hafta içinde herhangi bir ilaç kullanmamış olması,

ailede kanama diyatezi öyküsünün olmaması

Çoklu şüpheli cinsel ilişki öyküsü olan, özgeçmişinde uyuşturucu kullanımı olan, son iki hafta içinde solunum yolu hastalığı, döküntülü cilt hastalığı, konjonktivit ve gastroenterit öyküsü olanlar ve kendisinde veya birinci derece akrabasında bağ dokusu hastalığı olanlar, gebeler, bilinen sistemik hastalığı olanlar , son altı ay içinde majör cerrahi girişim geçiren ve son 3 ay içinde kan vermiş olanlar çalışmaya dahil edilmemiştir.

Çalışmaya, kan bankasına gönüllü olarak kan bağışi için başvuran kişiler katılmıştır. Katılan 20 kişiden 15'i erkek, 5'i kadındır. Her katılımcıya, araştırmayı yürütenler tarafından çalışma hakkında sözlü bilgi verilmiştir ve ardından onay formu okutularak, karşılıklı olarak imzalanmıştır. Çalışmaya katılanlara, çalışmanın herhangi bir aşamasında ayrılma hakkı verilmiştir.

Araştırma örnekleminin kan bankası donörlerinden seçilmesinde, çalışma için gerekli olan kan miktarının fazla olması, kan alma ve saklama yönteminin trombositler için atravmatik olması, kanın CPD'li ortamda saklama olanağının bulunması, kan tetkiklerin hemen yapılabilme olanağının varlığı ve kan bankası donör kriterlerinin çalışmamız için yüksek düzeyde eleyici olması gibi faktörler belirleyici olmuştur.

7.3. Çalışmaya Katılanların Özellikleri

Denek No.	Yaş	Cins	Hematokrit	Trombosit sayısı
1	24	E	%40	225 000 /ml
2	30	E	%45	255 000 /ml
3	49	K	%38	234 000 /ml
4	50	K	%39	306 000 /ml
5	25	E	%42	160 000 /ml
6	50	E	%37	256 000 /ml
7	22	E	%46	238 000 /ml
8	27	E	%43	166 000 /ml
9	30	E	%46	141 000 /ml
10	35	K	%38	250 000 /ml
11	32	E	%46	231 000 /ml
12	19	E	%46	253 000 /ml
13	34	K	%37	247 000 /ml
14	25	E	%41	210 000 /ml
15	26	E	%40	215 000 /ml
16	50	E	%39	234 000 /ml
17	29	K	%37	214 000 /ml
18	25	E	%42	192 000 /ml
19	37	E	%45	188 000 /ml

20	29	E		%42	201 000 /ml
Ortalama değer ve dağılım	32,4 (19-50)	E: 15	K: 5	%41,45 (37-46)	225 000/ml (141 000 – 306 000)

7.4. Araştırmanın Yöntemi

Çalışmaya katılan kişilerden, bilgi verildikten ve onay formu imzalatıldıktan sonra, kan sayımı, serolojik testler ve kan grubu tespiti için antekubital bölgeden Vacutainer yöntemi ile kan alınmıştır. Donör için uygunluk kriterleri tamamlandıktan sonra, katılımcıların tansiyonları ölçülmüştür, ardından, diğer koldan, yine antekubital bölgeden, kan torbasının iğnesi (22 G) aracılığı ile 70ml CPD içeren torbaya (Kansuk) kan toplanmıştır. Kan verme esnasında torbalar otomatik shaker içinde ajite edilmiştir, torba belirlenen 450 ml kan ile dolunca, shaker otomatik olarak durdurulmuş ve kan akımı kesilmiştir.

Bu işlemden sonra CPD'li torbanın içindeki kandan, "sterile cutting device" aracılığı ile bağlanan başka bir boş torbaya 110 ml kan aktarılmıştır. Buradaki kan çalışmada kullanılmak üzere Hematoloji-İmmünoloji laboratuvarına nakledilmiştir. Kalan 340ml donör kanı, komponentlerine ayrılmış ve klinikte kullanılmak üzere kan bankamızda muhafazaya alınmıştır.

Çalışma için ayrılan 110 ml kandan 4 adet 50cc lik Falcon plastik tüpe 20 ml, 1 tüpe 25ml aktarılmıştır. Geri kalan 5ml kan atılmıştır. 20 ml kan ile dolu olan tüplere sırasıyla HES 130, HES 200, HES 450 ve %0,9 İzotonik'ten 5'er mililitre eklenip, %20 oranında dilüsyon elde edilmiştir. Yirmibeş ml kan ile dolu olan tüp kontrol kanı olarak çalışılmıştır.

Trombosit sayısı 100,000/ml'den düşük örneklerin çalışma dışı bırakılmıştır ve ayrıca trombosit sayısına göre, PRP hazırlanırken uygulanacak santrifuj hızı önceden belirlenmiştir. Bu nedenle kontrol kanında ve dilüe edilmiş diğer dört örnekte, kan sayımı çalışılmıştır. Çalışmaya katılma kriteri olarak, en az trombosit sayısını 120,000/ml olarak belirlenmiştir , %20 lik dilüsyona ek olarak CPD'nin de getirdiği yaklaşık %8 - %12 lik dilüsyonu da göz önünde bulundurarak, dilüsyon sonrası çalışmaya alınma için kabuledilebilir trombosit sayılarının en az 100,000/ml olacağını ön görülmüştür.

Dilüsyon işlemi ve bazal kan sayımı yapıldıktan sonra, farklı molekül ağırlıklarındaki HES ve izotonik solüsyonu ile karıştırılan kanlar, 37° C deki etüvde 30 dakika boyunca bekletildi. Bunun amacı, bir makromolekül olan HES'in trombosit reseptörleri ve fibrinojen ile etkileşime girmesi için zaman tanımaktır.

Bu arada kontrol kanından, daha önce anlatılan prosedür ile PRP ve PPP hazırlandı. Çalışmada kullanılan tüm PRP'lerdeki trombosit sayısı 250,000/ml'ye en yakın değerde olacak şekilde ayarlandı. Öte yandan hazırlanan tüm PPP'lerdeki trombosit sayısı da 5000/ml den düşüktür.

Kontrol kanından hazırlanan her PPP'den 0,5ml küvete dolduruldu ve agregometrenin %100 ışık geçirgenliği temsil eden yuvasına kondu, ardından PRP'den de üç ayrı küvete ayrı ayrı 0,5ml dolduruldu ve küvetlerin içine karıştırma çubuğu konduktan sonra 2 dakika boyunca 37° C de ısıtıldı. Bu işlemin ardından, PRP küvetlerinden biri agregometrenin %0 ışık geçirgenliği temsil eden yuvasına kondu. Agregometrenin eğri çizen cihazını çalıştırdıktan sonra, grafik başlangıcı olan 0 ile 100 arasında temsil eden y eksenini çizildi. Ardından 1 dakika boyunca bazal eğri çizgisi çizdirildi. Bu noktada PRP'ye agonist eklendi ve daha sonra da agregasyon eğrisi maksimal değere ulaşmaya dek agregasyon devam ettirildi.

Çalışmamızda, değişken sonuçlar vermesinden dolayı, agonist olarak epinefrin kullanılmamıştır. Kullanılan agonistler: ADP, 5 - 15M arasında değişen konsantrasyonlarda, Ristosetin 5 – 8 mg/ml dozunda ve 1 – 3 M Kolajendir. Çalışma boyunca agonistler, (-20)° C de Eppendorf tüpleri içinde muhafaza edilmiştir. Çalışma esnasında, kullandığımız agonistler çözündürülmüştür ve soğuk zincire dikkat ederek kullanılmıştır, 6 saatten daha fazla çözülmüş halde bulunan agonistler kullanılmamıştır.

Yukarıda tarif edilen işlemler dilüe edilen kan örnekleri için ayrı ayrı olarak tekrarlanmış olup her bir örnek için ayrı agregasyon eğrileri elde edilmiştir.

Agregasyon eğrilerindeki parametreler, uluslararası kılavuzları önerdiği şekilde ölçüldükten sonra kaydedilmiştir.

7.5. Çalışmada kullanılan araç ve gereçler

HES 130 - Voluven®, HES 200 – Haes sterile®, HES 450 - Varihes®

Kan torbası - Kansuk®, WAG® sterile cutting device, Falcon® 50 cc lik tüpler,
Coulter® hemogram cihazı, Aggregometre cihazı

7.6. İstatistiksel Yöntemler

İstatistiksel analizde, İNSTAT bilgisayar yazılım programı yardımı ile elde edilen sonuçların ortalamaları arasındaki karşılaştırma “Yinelenmiş Ölçümlerim Ortalama Karşılaştırma testi” ile yapılmıştır. Elde edilen ölçümlerin ortalamaları arasındaki farklar “Student Newman Keuls Çoklu karşılaştırma testi” kullanarak değerlendirilmiştir.

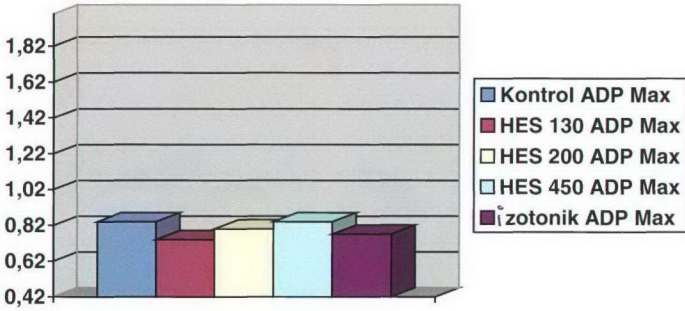


8. SONUÇLAR

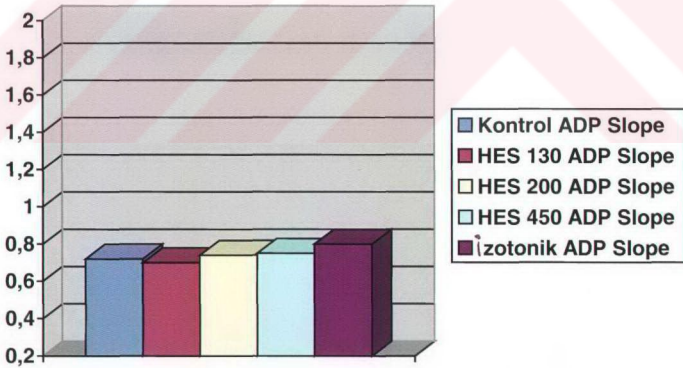
Çalışmanın sonucunda, kontrol kanları ile birlikte, HES 130, HES 200, HES 450 ve izotonik dilüsyonlarının ADP, Ristosetin ve Kolajen ile oluşturulan maksimal agregasyon değerleri ve agregasyon eğimlerin değerleri ölçülmüştür. Ortalama maksimal agregasyon değerleri her agonist için ayrı ayrı olarak dilüsyon grupları ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Aynı işlem ortalama agregasyon eğimi değerleri için de yapılmıştır.

Ortalama 10 M ADP (5-15 M) agonisti ile yapılan agregasyon çalışmasında maksimal agregasyon değerleri arasındaki karşılaştırma sonucunda hiç bir dilüsyon grubu için diğerlerine ve kontrole göre anlamlı fark saptanmamıştır. P değeri 0,2250 ($p > 0,05$) olarak hesaplanmış olup farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (şek.8.1). ADP ile yapılan agregasyon çalışmasında elde edilen değerler içinde sınırdaki agregasyon yanıtı değerleri olmasına rağmen, birbirinden farklı moleküller ile yapılan dilüsyonun sonucunda, ortalamalara bakılarak normal agregasyon yanıtının elde edildiğini söylenebilir. Neticede, HES'in farklı moleküller ağırlığındaki formları ve izotonik solüsyonunun ADP agregasyonunu etkilemediği saptanmıştır.

ADP'nin agregasyon eğimi değerleri karşılaştırıldığında, HES 130, HES 200, HES 450 ve İzotonik arasında anlamlı fark saptanmamıştır $p > 0,05$ (şek.8.2). Bu moleküllerle yapılan dilüsyonun agregasyon eğimini de etkilemediği bulunmuştur

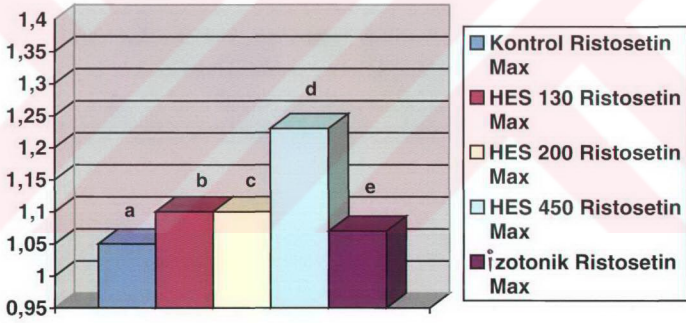


Şekil 8.1. ADP ile elde edilen maksimal agregasyon değerlerin ortalamaları. Gruplar arasındaki ortalamaların karşılaştırmasında $p > 0,05$. Ortalama standart sapma $SD: +/- 0,2159$



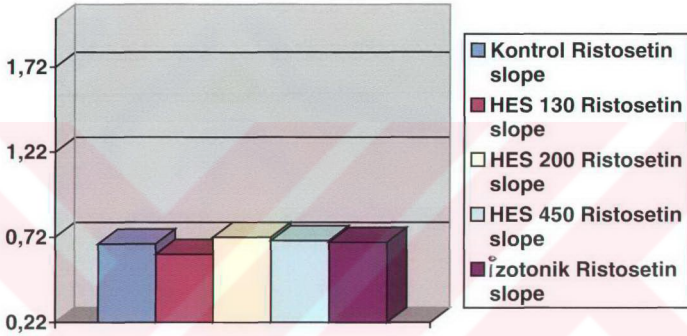
Şekil 8.2. ADP ile elde edilen ortalama agregasyon eğim değerlerinin karşılaştırması. Gruplar arasında fark saptanmamıştır $p > 0,05$. Ortalama standart sapma $SD: +/- 0,2023$

Ristosetin ile yapılan agregasyon çalışması sonucunda HES 450 dilüsyonunda, diğer gruplara ve kontrole kıyasla maksimal agregasyon değerinde, fark bulunmuştur. HES 450'nin HES 130, HES 200 ve izotonik dilüsyonlarının maksimal agregasyon değerleri karşılaştırılınca p değeri $< 0,05$ olarak hesaplanmış olup anlamlı olarak bulunmuştur. HES 450'nin ristosetin maksimal agregasyon değeri kontrol ile karşılaştırıldığında p değeri 0,0063 olarak ölçülmü olup ($p < 0,01$) bu anlamlılık istatistiksel açıdan daha da belirgin hale gelmektedir. HES 450'nin dışındaki gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. İstatistiksel anlamı olan farklar incelendiğinde, HES 450'deki ristosetine karşı oluşan maksimal agregasyon yanıtları, kontrol grubu başta olmak üzere, diğer tüm gruplardaki değerlere göre yüksek bulunmuştur. Bu durumda HES 450'de ristosetine karşı bir "hiperagregasyon" durumu gözlenmiştir (Şek. 8.3)



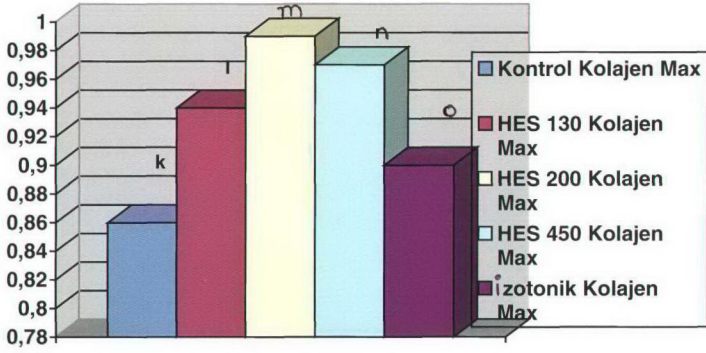
Şekil 8.3. Ristosetin ile elde edilen maksimal agregasyon değerlerinin ortalamaları. Karşılaştırmalar sonucunda; d vs a: $p < 0,01$, d vs b: $p < 0,05$, d vs c: $p < 0,05$, d vs e: $p < 0,05$ olarak hesaplanmıştır. Karşılaştırmada a, b, c ve e arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır $p > 0,05$. Ortalama standart sapma SD: $\pm 0,2263$

Ristosetin çalışmasında ölçülen agregasyon eğim değerleri arasında yapılan karşılaştırmada fark saptanmamıştır. Tüm gruplar arasında yapılan karşılaştırma sonucunda p değeri 0.5930 olarak hesaplanmıştır ($p>0,05$). Buna göre dilüsyon grupları arasında ve kontrol grubuna göre Ristosetin ile elde edilen agregasyon eğimi üzerinde, HES moleküllerinin ve izotonik solüsyonunun etkisi bulunmamıştır (Şek.8.4).



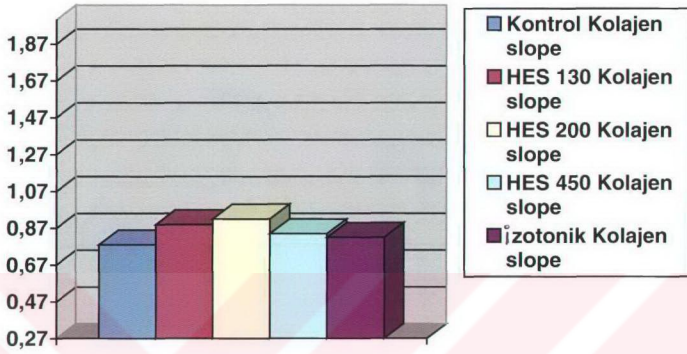
Şekil 8.4. Ristosetin ile elde edilen agregasyon eğim değerlerinin ortalamaları. Gruplar arasındaki karşılaştırmada istatistiksel fark saptanmamıştır $p>0,05$. Ortalama standart sapma $SD: +/-0,3264$.

Kolajen ile yapılan agregasyon çalışması sonucunda elde edilen maksimal agregasyon değerleri açısından, HES 200 ve HES 450 gruplarının sonuçları kontrol grubuna göre farklı olarak bulunmuştur. Ölçülen p değeri 0,0137 ($p<0,05$) olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Diğer gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). HES 200 ve HES 450 gruplarının, kontrol grubuna göre olan farkı incelendiğinde, bu gruplardaki maksimal agregasyon değerleri daha yüksek bulunmuştur. Daha önce HES 450'deki Ristosetin maksimal değerinde olduğu gibi, HES 200 ve HES 450'nin Kolajen maksimal agregasyon değerlerinde de kontrole göre yüksek agregasyon cevabı gözlenmiştir (Şek.8.5).



Şekil 8.5. Kolajen ile elde edilen maksimal agregasyon değerlerin ortalamaları .
 Yapılan karşılaştırmalarda; m vs k: $p < 0,05$, n vs k: $p < 0,05$, k vs l vs o: $p > 0,05$,
 l vs m vs n vs o: $p > 0,05$, olarak bulunmuştur. Ortalama standart sapma SD: +/-
 0,2089.

Kolajen ile yapılan agregasyon çalışmasında elde edilen agregasyon eşim değerleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Ölçülen p değeri 0,0576 olup istatistiksel anlamlılık taşımamaktadır ($p > 0,05$). Bu çalışmada, HES'in farklı formları ve izotonik Kolajen agregasyonundaki eşim üzerinde etkisi bulunmamıştır (Şek.8.6).



ekil 8.6. Kolajen ile elde edilen agragsyon eğim değerlerin ortalamaları. Gruplar aras karşılaştırma sonucunda anlamlı fark bulunmamıştır $p>0,05$. Ortalama standart sapma $SD: +/-0,2591$.

Tüm veriler değerlendirildiğinde bu çalışmanın sonuçları şöyle özetlenebilir:

1. İn vitro ortamda, HES veya izotonik ile dilüe edilen kanda, trombositlerin ADP'ye karşı agregasyon yanıtı değişmemektedir.

2. HES 450 ile dilüe edilmiş kandaki trombositlerin Ristosetin yanıtı, diğer HES moleküllerine, izotonik ve kontrole göre belirgin olarak fazladır. Daha az çarpıcı olmakla beraber, benzer bir sonuç HES 200 ve HES 450'in Kolajen maksimal agregasyon yanıtında da tespit edilmiştir. Hiperagregasyon olarak tanımlanabilecek bu etki, daha önce tanımlanmadığından, bu aşamada önemi bilinmemektedir.

3. Agregasyon eğimleri bu çalışmada kullanılmış olan HES 130, HES 200, HES 450 ve izotonikten etkilenmemiştir.

9. TARTIŞMA

Kanama riski olan hastalarda, reperfüzyon amacıyla kullanılan farklı solüsyonların, koagülasyon üzerinde farklı etkileri bildirilmiştir. Preoperatif ve intraoperatif dönemde kullanılacak perfüzyon sıvısının seçimi operasyonun kanama komplikasyonlarını en aza indirmek için önemlidir. Şu ana kadar, perioperatif dönemde kullanılan sıvılara bağlı majör kanama komplikasyonu bildirilmemiş olmasına rağmen, kristaloidlerin ve özellikle de kolloidlerin, pıhtılaşma üzerindeki etkileri gittikçe daha fazla araştırılmaktadır.

Son yıllarda , koagülasyon üzerindeki etkileri en çok araştırılan HES solüsyonudur. HES, uygun maliyet, farklı moleküler ağırlık ve farklı hidroksilasyon yüzdesinde solüsyonlar hazırlama olanağı sunduğundan, diğer bir çok kolloide daha sık kullanılmaktadır.

HES ile volüm yüklemesi yapmadan etkin ve dolaşım açısından güvenli bir şekilde plazma volümü genişletilebilir. Albumin ve Jelatine göre daha sık kullanılmasına rağmen, HES in pıhtılaşma zamanını uzattığı bilinmektedir (7). Bu etkinin fizyopatolojisi incelendiğinde, özellikle yüksek moleküler ağırlığındaki HES solüsyonlarının, FVIII:RCo, vWF:Ag ve vWF düzeyini azaltarak tip 2b von Willebrand hastalığına benzer bir tabloya sebep olduğu bulunmuştur (89). Böyle bir etki bildirilmiş olmasına rağmen klinik olarak anlamlı bulunmamıştır (17,90).

Ancak bu aşamadan sonra HES in güvenilirliği tartışılmaya açık hale gelmiştir ve pıhtılaşma üzerindeki etkisi ayrıntılı bir şekilde bir çok çalışmada irdelenmiştir. Bu araştırmalarda HES in primer hemostazı etkilediği ve anti-trombosit etkisi olduğu gösterilmiştir(13-16). Anti-trombosit etkinin hangi mekanizmayla oluştuğu halen tartışma konusudur.

Yukarıda söz edilen çalışmalarda, koagülasyonu ve primer hemostazı, global olarak inceleyen yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Bu yöntemlerle olası artmış kanama riskini önceden tahmin etmek mümkün gözükse de hastalar üzerinde yapılan çalışmalar bu öngörüü desteklememektedir. Bundan yola çıkarak HES in primer hemostaz ve trombositler üzerindeki etkisini tüm ayrıntılarıyla incelemeye devam

etmek gerektiğini söyleyebiliriz. Günümüze dek yapılan araştırmalar bir çok soru yanıtlanmış olmasına rağmen halen açıklanması gereken bazı noktalar vardır.

HES molekülünün koagülasyon üzerindeki bir çok etkisi tanımlanmış olmasına rağmen trombositlerin agregasyon fonksiyonlarının ne şekilde etkilendiği halen bilinmemektedir. HES' in GPIIb-IIIa ekspresyonu üzerindeki etkisini araştıran çalışmalar, agregasyon açısından ancak dolaylı bilgi vermektedir(13-16).

Günümüzde, trombosit agregasyon bozuklukların tanısında kullanılan altın standart niteliği taşıyan yöntem, agregometre yöntemidir (1,20). Çalışılması zahmetli ve yorumlanması zor olan bu yöntem belki de haklı bir gerekçe ile HES ile ilgili çalışmalarda şu ana kadar kullanılmamıştır.

Trombosit agregasyonu primer hemostazın en önemli basamaklarından biri olmasından dolayı, HES' in agregasyon üzerindeki etkisini agregometre yöntemi ile araştırmak ve sayısal veriler ile bu etkiyi açıklama gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Mevcut çalışmada, üç farklı molekül ağırlığında HES solüsyonu ve İzotonik ile %20 lik hemodilüsyon sağlandıktan sonra sonra trombosit agregasyon fonksiyonları, farklı agregan ajanlar kullanarak, agregometre ile araştırılmıştır. Amaçlardan birincisi trombosit agregasyonundaki değişiklikleri kesin sonuç veren bir yöntemle araştırmaktır. İkinci amaç, farklı molekül ağırlığındaki HES solüsyonları arasında, agregasyon üzerinde farklı etkilerini incelemektir. Üçüncü amaç ise, %0,9 İzotonik NaCl ile dilüe edilen kanların, trombosit agregasyon fonksiyonlarıdaki olası değişiklikleri incelemektir.

Bu çalışmada trombositlerin ADP, ristosetin ve kolajene karşı agregasyon yanıtları incelenmiştir. Yirmi sağlıklı donörden alınan kanlar ile her HES molekülü ve İzotonik için ayrı ayrı dilüsyon hazırlanmış olup, her dilüsyon grubu bu üç agonist ile aktive edildikten sonra agregasyon eğrileri elde edilmiştir. Elde edilen agregasyon eğrilerinden maksimal agregasyon oranı ve agregasyon eğrisinin eğimi hesaplanmıştır.

Ortalama 10 M ADP (5-15M) ile çalışılan agregasyon sonucunda, maksimal agregasyon oranı açısından HES 130, HES 200 , HES 450 ve İzotonik NaCl dilüsyonları ile kontrol kanı arasında yapılan karşılaştırmalarda anlamlı fark bulunmamıştır.($p>0,05$) Yine ADP çalışması sonucunda, tüm dilüsyon grupları ve kontrol için elde edilen agregasyon eğimleri karşılaştırıldığında gruplar arasında fark

saptanmamıştır. Bu bulgular neticesinde, HES in farklı molekülleri ve İzotonik NaCl'ün ADP ile uyarılmış trombosit agregasyonunu etkilemediği söylenebilir. ADP uyarımı sonucunda intrasitoplazmik serbest kalsiyum miktarı artar ve trombosit membranının şekilsel değişikliği başlar. Bizim çalışmamızın sonuçlarına dayanarak HES in, intrasitoplazmik kalsiyum miktarı üzerine etkisi olmadığı söylenebilir. Gamsjager ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptığı in vitro çalışmada (91) HES 450, HES 130, HES 70 ve İzotonik ile %20 hemodilüsyon elde ettikten sonra işaretli kalsiyum kullanarak flow sitometrik yöntem ile intrasitoplazmik kalsiyum miktarındaki değişiklikler incelenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, dilüe edilmemiş ve farklı HES solüsyonları ile dilüe edilmiş kanlardaki trombositlerin, intrasitoplazmik kalsiyum düzeyleri arasında fark saptanmamıştır. Gamsjager ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonuçları, çalışmamızın ADP agregasyonu ile ilgili sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Ristosetin (0,5-0,8 mg/dl) ile yapılan agregasyon çalışmasında, HES 450 nin, diğer HES moleküllerine, İzotonik NaCl ve kontrol kanına göre anlamlı olarak daha yüksek maksimal agregasyon değerine ulaştığı tespit edilmiştir ($p<0,01$). Bu etki hiperagregasyon olarak değerlendirilmiştir ve yüksek molekül ağırlıklı HES'in ristosetin ile hiperagregasyon oluşturma yanıtı, bu şekilde, ilk defa tanımlanmaktadır.

HES in farklı molekülleri ile yapılan çalışmalarda koagülasyon üzerinde başlıca iki etki tanımlanmaktadır. Bunlar, vWF düzeyinin ve GP IIb-IIIa ekspresyonunun azalmasıdır (8,13-16)

VWF düzeyinin azalması, bu faktörün HES varlığında, trombositler tarafından daha fazla tüketilmesi sonucunda olabileceği ileri sürülmektedir ancak bu etki henüz gösterilmemiştir.

HES 450 nin yüksek moleküler ağırlığında olması nedeniyle negatif elektriksel yükü de yüksektir. HES 450 ile dilüe edilen kanlarda trombosit üzerine yapışan HES in oluşturduğu yüksek negatif elektriksel yük vWF a karşı afiniteyi arttırabileceği ve bu şekilde trombositlerin vWF ü daha fazla ve hızla tüketmesi mümkündür. vWF, hem trombosit adezyonunda hem de agregasyonunda rol alan önemli bir ligandır. Sağlıklı trombositlerde, primer hemostaz, GP Ib-IX un vWF'na bağlanması ardından, gerçekleşen adezyon ile başlar. İkinci aşamada, fibrinojen ve

vWF ünü bağlayan GP IIb-IIIa devreye girer ve trombositler arasında bağlar kurularak agregasyon aşaması başlar. Agregasyon ile birlikte trombosit granüllerinden sekresyon süreci de devam eder. HES molekülünün trombosit üzerine yapıştığı ve fibrinojen gibi ligandları bağlayabildiği bilinmektedir (9). HES ile yapılan koagülasyon çalışmalarında, adezyon süreci tamamlanmadan, trombosit yüzeyindeki HES molekülü fibrinojen ve büyük olasılıkla vWF' nü bağladığı, bunun sonucunda prematür ve yüksek aktiviteli agregasyon başladığı düşünülebilir. Bu erken agregasyon esnasında, vWF ün trombosit yüzeyindeki HES tarafından hızla tüketilmesi nedeniyle , adezyon süresi çok uzayabilir. TEG ile yapılan çalışmalarda trombosit fonksiyonlarını yansıtan, K zamanında uzama, HES in etkisi nedeniyle, primer hemostazın uzadığı göstermektedir ve ilk bakışta bizim sonuçlarla çelişmektedir. Ancak primer hemostazın uzaması, agregasyon veya adezyon süreçlerinin her biri veya birlikte uzaması sonucunda meydana gelir. HES in vWF düzeyini düşürerek adezyonu uzattığı ve bu etkinin TEG grafiği üzerinde K zamanının uzaması şeklinde yansıdığını düşünmekteyiz. Normal şartlarda, vWF' ün eksik olduğu hastalarda ristosetine karşı yanıtızsızlık olması beklenirken bizim çalışmamızda HES 450 ile aşırı yanıt, diğer HES molekülleri ile ise normal ristosetin yanıtları elde edilmiştir. Von Willebrand hastalarında trombosit adezyonu ve agregasyonu bozuk olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda agregasyon yanıtının bozulmaması hatta artması, vWF ün düzeyi düşük olmasına rağmen gerçek anlamda von Willebrand hastalığı gelişmediği ileri sürülebilir. Eğer HES 450 vWF afinitesini arttırıyorsa, hızlı vWF mobilizasyonu sonucunda, adezyon süreci tamamlanmadan başlayan hızlı bir agregasyon süreci , adezyonun uzaması ile sonuçlanabilir bu da TEG de primer hemostazın uzamasını açıklayabilir.

Son dönemde HES in primer hemostaz üzerindeki etkileri PFA kullanılarak incelenmiştir. PFA yöntemi, aynı kanama zamanı yöntemi gibi trombositlerin tüm fonksiyonlarını eş zamanlı olarak inceler. Innerhoffer, Sögermmüller, Schaebert ve Franz ın son 4 yıldaki araştırmalarında (13,14,16), HES in PFA analizlerinde uzamaya neden olduğu tespit edilmiştir. Sögermüller ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, GP IIb-IIIa ekspresyonunun azaldığı, dolayısı ile HES molekülünün agregasyonu olumsuz etkilediği ve primer hemostazın bundan dolayı uzadığı ileri sürülmüştür (14). HES in GP IIb-IIIa yı azalttığı, Deusch ve Franz tarafından da

tespit edilmesi sonucunda bu etkinin oluşum mekanizması araştırılmıştır (15,16). Yine Deusch ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptığı çalışmada, flouresan boya ile işaretlenmiş HES 200 kullanarak HES molekülünün trombosit yüzeyine yapıştığı ve bu şekilde GP IIb-IIIa'nın üzerini kaplayarak ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Buna dayanarak, fibrinojen reseptörü olan GP IIb-IIIa'nın azalması sonucunda, agregasyon yanıtının da azalması beklenir. Diğer çalışmalarda primer hemostazın uzadığı gösterilmiş olmasına rağmen, bizim çalışmamızda agregasyonun etkilenmediği hatta HES 450 ile arttığı gözlenmiştir. Bu verilerin ışığında HES in GP IIb-IIIa ekspresyonunu azalttığı ancak agregasyonun etkilenmediği söylemek gerekir. Böyle bir etkinin mümkün olması için trombosit yüzeyinde, fibrinojeni bağlayan, GP IIb-IIIa'nın dışında başka bir molekül olması gerekmektedir. Bunu HES in kendisi ile açıklayabiliriz. HES molekülünün fibrinojenin yüksek oranda bağladığı ve neticesinde koagülasyon esnasında fibrin oluşumunu engellediği bildirilmiştir (7,9,92). Trombosit yüzeyine yapışan HES molekülüne ve geride kalan GP IIb-IIIa ya yüksek oranda fibrinojen bağlanması sonucunda, GP IIb-IIIa ekspresyonu düşük olmasına rağmen agregasyonun normal bir şekilde devam etmesi mümkün gözükmemektedir. Ayrıca, bizim hiperagregasyon saptadığımız ajan ristosetin olduğundan, ristosetine bağlı trombosit agregasyonunda, ristosetin – vWF – GP Ib ilişkisi önemlidir.

HES 450 molekülünün fibrinojeni ve vWF ünü bağlayarak erken ve hızlı agregasyon başlattığını ileri sürersek, bu etkinin neden diğer agonistlerde de aynı şekilde gözlenmediğini de açıklamamız gerekir.

Ristosetin agonisti trombositlerin vWF na bağlanmasını potansiyalize eden bir moleküldür. Çalışmamızda kullanılan diğer agonistlerin vWF ün bağlanması üzerinde bu kadar belirgin etkileri yoktur. Ristosetin vWF üzerindeki etkisinden yola çıkarak, von Willebrand hastalığı ve Bernard-Soulier sendromu tanısı koymak için, bu agonist ile agregasyon çalışmaları yapılmaktadır.

HES 450 varlığında, vWF ve fibrinojen ligandlarının artmış bağlanma hızına, ristosetin agonistinin bu reaksiyonu güçlendiren etkisini eklersek, ristosetin agregasyon eğrilerinde gözlenen yüksek maksimal yanıtların nedenini açıklayabiliriz. Ristosetin çalışmasında ölçülen agregasyon eğimleri HES molekülleri, İzotonik NaCl ve kontrol kanda benzer düzeyde olduğu ve aralarında anlamlı fark olmadığı tespit

edilmiştir ($p>0,05$). Agregasyon eğimi ortalamaları arasında anlamlı fark olmamasına rağmen, ristosetine karşı belirgin hiperagregasyon cevabı gözlenen kanlarda agregasyon eğiminin de iki katına çıktığı gözlenmiştir. Bunun sonucunda hiperagregasyonun, sadece güçlü değil aynı zamanda hızlı seyreden bir süreç olduğu söylenebilir. Agregasyon sürecinin hızlı seyretmesi agonistin gücüne ve GP IIb-IIIa gibi fibrinojen bağlayan moleküllerin yüksek düzeyde ekspresyonuna bağlıdır. GP IIb-IIIa ekspresyonunu azalttığı bilinen bir molekülün agregasyon hızının artırması, alternatif bir fibrinojen bağlama mekanizması ile açıklanabilir. Ristosetin çalışmasında hiperagregasyon cevabı olan kanların agregasyon eğimindeki yükseklik, HES moleküllerinin fibrinojeni bağlama özelliğinin agregasyon için ne kadar önemli olduğu göstermektedir. PFA ve TEG çalışmaların sonucunda gözlenen anti trombosit etkiyi, çalışmamızın sonuçlarını göz önünde bulundurarak, adezyon zamanında uzama olarak tarif edebiliriz.

Kolajen (1-3M) ile yapılan agregasyon çalışmasında, HES 200 ve HES 450 nin maksimal agregasyon değerleri kontrol kanlarına göre anlamlı olarak daha yüksek düzeyde saptanmıştır. ($p<0,05$). HES 130, HES 200, HES 450 ve İzotonik NaCl dilüsyonlarının maksimal agregasyonları arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Kolajen ile elde edilen agregasyon eğimleri arasında ise hiç bir dilüsyon grubu için kontrol kanına göre anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$).

Kolajen molekülü, trombositlerin, adezyonunu, granül sekresyonunu ve agregasyonunu aktive eden güçlü bir agonisttir. Aynı ADP de olduğu gibi, kolajen uyarımı sonucunda hücre içi kalsiyum miktarı artar ve trombositler aktive olur. Trombositlerin kolajeni bağlayan esas proteinler GPVI ve GP Ia/IIa olmasına rağmen, trombositlerin kolajene normal bir şekilde bağlanması için, vWF ile GP Ib arasında sağlıklı bir etkileşim olması gerekir. HES 450 gibi yüksek moleküler ağırlıklı bir solüsyonun fibrinojen ve vWF nü bağlayarak yüksek yanıtı agregasyona sebep olabileceğini ifade etmiştik. Kolajen yanıtı ristosetin yanıtı kadar olmasa da, vWF ne bağımlı bir yanıt olduğu bilinmektedir (20). HES 450 nin yüksek oranda ligand bağlama özelliği, kolajen uyarımı ile birlikte, kolajen agregasyon yanıtını artırabilir. Benzer etki, daha önce yüksek moleküler ağırlıklı HES 450 de ristosetin yanıtında gözlenmişti, ancak HES 200 molekülünde mevcut değildi. HES 200 ün kolajen agregasyonunu kontrol kanına oranla daha yüksek düzeyde olması, aynı HES

450 deki gibi, ligand bağlama özelliği ile açıklamak mümkündür. Ancak, vWF ne daha çok bağımlı olan ristosetin agregasyonunda böyle bir etkinin gözlenmemesi, diğer yandan vWF' ne daha az bağımlı olan kolajen agregasyonunda kontrole göre yüksek yanıt oluşturması düşündürücüdür. Hiperagregasyonun, sadece HES molekülünün artmış ligand bağlama özelliğine bağlı olduğunu söylersek, o zaman HES 200 ün ristosetin yanıtı da, kolajende olduğu gibi, daha yüksek olmasını beklerdik. Bu aşamada, HES moleküllerinin, yine molekül ağırlıklarına bağlı olarak, kolajen agregasyonunda daha farklı etkileri olduğu söylemek gerekir. Bu etki, HES molekülünün direkt olarak kolajene bağlanması ile açıklanabilir. Eğer HES molekülünün gerçekten böyle bir etkisi varsa, ristosetin agregasyonu etkilenmeyeceğinden, ristosetin eğrilerinde artma gözlenmeyecektir. Ristosetin agregasyonu vWF'nü yüksek oranda bağımlı olması nedeniyle, agregasyon cevapları sadece vWF' nün bağlanma özelliklerine göre değişecektir. Halbuki kolajen agregasyonu belirli oranda vWF' ne bağımlı olması yanı sıra, trombositlerin kolajene adezyonuna da bağımlıdır. Bu durumda trombositlerin kolajene yapışmasını arttıran bir madde, kolajen agregasyon cevabını da arttıracaktır. HES moleküllerinin böyle bir etkiye sahip oldukları hakkında bilinen bir araştırma yoktur, ancak trombosit yüzeyine, fibrinojene, fibronektine ve vWF' ne bağlanma yetenekleri düşünülürse, aynı şekilde kolajeni de bağlayabilecekleri de akla gelmektedir. Bu olasılığı araştırmak için başka çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Kolajen çalışmasında dikkati çeken başka bir sonuç daha vardır. HES 200 ,HES 450 ve İzotonik NaCl' ün kolajen ile oluşturulan agregasyonları arasında fark saptanmamıştır. Diğer taraftan da İzotoninin hiperagregasyona neden olmadığı tespit edilmiştir. Hiperagregasyona neden olmadığı bilinen bir solüsyon ile hiperagregasyon yapan başka bir solüsyon arasında kolajen agregasyonu açısından fark saptanmaması, bahsi geçen hiperagregasyonun istatistiksel olarak anlamlılık sayısını ancak aşan bir matematiksel sonuç olabileceği akla getirmektedir. Bu çelişkiyi yanıtlamak için daha fazla denek sayısı ile , kolajen agregasyonunu araştıran başka çalışmaların yapılması gerektiği inancındayız.

Mevcut çalışmanın sonucunda, HES solüsyonunun farklı moleküler ağırlığındaki bileşiklerin trombosit agregasyonunu engellemediği tespit edilmiştir. Yüksek moleküler ağırlığındaki HES 450' nin, büyük olasılıkla vWF ve fibrinojeni

bağlayarak, ristosetin çalışmasında hiperagregasyona neden olduğu bulunmuştur. Kolajen agregasyonu esnasında HES 200 ve HES 450' deki hiperagregasyon, HES' in kolajeni de bağlayabileceğini düşündürmektedir.

Diğer çalışmaların sonucunda, primer hemostazı belirgin bir şekilde uzattığı gösterilen HES in trombosit agregasyonunu etkilememesi, meydana gelen değişikliklerin, trombosit adezyonundaki yetersizliği ile açıklanabilir.

Çalışmamızda , agregasyon deneyinde kullandığımız İzotonik NaCl solüsyonunun, trombosit agregasyonu üzerinde etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda, kristaloidlerle oluşturulan hemodilüsyonun hiperkoagülasyona neden olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda hiperkoagülasyonun, trombin-antitrombin III oranının bozulması nedeniyle gerçekleştiği ileri sürülmüştür. İzotonik NaCl'ün trombosit agregasyonunu etkilememesi, vWF ve fibrinojen gibi moleküllerin üzerinde etkisi olmadığı ve bu nedenle primer hemostazı etkilemediği düşünülebilir. Bu nedenle oluşan hiperkoagülasyon, primer hemostazdan bağımsız bir etki olabileceği ileri sürülebilir.

İn vitro bir çalışma olması nedeniyle klinik etkileri öngörmek doğru olmayacaktır. Ancak trombosit adezyonunu bozan, yüksek oranda fibrinojen, vWF ve belki de kolajen bağlayan HES' in, operasyon geçiren hastaların kanama riskinin arttıracığı ve yara iyileşmesinin uzatacağı düşünülebilir.

Çalışmamızda saptanan hiperagregasyon, hiperkoagülasyon değildir ve artmış tromboz eğilimi olarak değerlendirilmemelidir. Tarif edilen hiperagregasyon, aslında atipik bir agregasyon yanıtı olduğunu ve trombosit adezyonunu olumsuz etkilediğini düşünmekteyiz.

Bilimdeki gelişmelere rağmen trombosit fonksiyonları hakkındaki bilgiler hala tam değildir. Trombositlerin değişen ortam şartlarına ne şekilde uyum sağladığı ve fonksiyonlarının ne düzeyde etkilendiği bir çok çalışma ile açıklanmaya çalışılmaktadır. Mevcut çalışmanın klinik yanı olması yanı sıra belki de en önemli tarafı trombosit fizyolojisi hakkında yaptığı katkıdır.

10. REFERANSLAR

1. Hoffmann R., Benz E.J., Shattil S.J. "Hematology: Basic principles and practice", 2nd ed. 1995. Copyright: Churchill Livingstone. New York.
2. Ruttman T.G., James MFM, Viljoen J.F. Haemodilution induces a hypercoagulable state. *British Journal of Anaesthesia*. 1996; 76 (3): 412-14
3. Ruttman T.G. Haemodilution enhances coagulation. *British Journal of Anaesthesia*. 2002; 88 (4): 470-74
4. Monkhouse FC. Relationship between antithrombin and thrombin levels in plasma and serum. *American Journal of Physiology*. 1959; 197: 984-88
5. Tocantins LM. Carroll RT. Holburn RH. The clot accelerating effect of dilution on blood and plasma. Relation to the mechanisms of coagulation of normal and haemophilic blood. *Blood*. 1951; 6: 720-39
6. Vinazzer H. Bergmann H. Zur Beeinflussung postoperativer Aenderungen der Blutgerinnung durch Hydroxyethylstaerke. *Anaesthesist*. 1975; 24: 517-20
7. Kapiotis S. Quehenberger P. Eichler HG. Effect of hydroxyethyl starch on the activity of blood coagulation and fibrinolysis in healthy volunteers: Comparison with albumin. *Critical Care Medicine*. 1994; 22 (4): 606-12
8. Stump DC. Strauss RG. Henrikssen et al. Effect of hydroxyethyl starch on coagulation, particularly on FVIII. *Transfusion*. 1985; 25: 349-54
9. Strauss RG. Stump DC. Henrikssen et al. Effects of hydroxyethyl on fibrinogen, fibrin clot formation and fibrinolysis. *Transfusion*. 1985; 25: 230-34
10. Petroianu GA. Liu J. Maleck W. The effect of in vitro Hemodilution with Gelatin, Dextran, Hydroxyethyl starch or Lactated Ringer solution on trombelastography. *Anesthesia Analgesia*. 2000; 90: 795-800

11. Hartert H. Blutgerinnungsstudien mit der thrombelastographie einen neuen untersuchungsverfahren. *Klinische Wochenschrift*. 1948; 16: 577-83
12. Mallet SV, Cox DJ. Thrombelastography. *British Journal of Anaesthesia*. 1992; 69: 307-13.
13. Schaeber G., Deusch E., Kress H.G. Inhibition of platelet function by hydroxyethyl starch solutions in chronic pain patients undergoing peridural anesthesia. *Anesthesia Analgesia*. 2004; 99 (3): 823-27.
14. Sögermüller B., Stark J., Wilschke H. The effect of hydroxyethyl starch 200Kd on platelet function. *Anesthesia Analgesia*. 2000; 91: 823-27.
15. Deusch E., Thaler U., Kozek-Langenecker S.A. The effects of high molecular weight hydroxyethyl starch solutions on platelets. *Anesthesia Analgesia*. 2004; 99 (3):665-68.
16. Franz A., Braunlich P., Gamsjager T. The effects of hydroxyethyl starches on varying molecular weights on platelet function. *Anesthesia Analgesia*. 2001; 92 (6): 1402-1407.
17. Schhierhout G., Roberts I. Fluid resuscitation with colloid or crystalloid solutions in critically ill patients: a systematic review of randomised trials. *BMJ*. 1998; 316: 961-64.
18. Treib J., Haass A., Pindur G. All medium starches are not the same: influence of the degree of hydroxyethyl substitution of hydroxyethyl starch on plasma volume. *Transfusion*. 1996; 36: 450-55.
19. Jamnicki M., Zollinger A., Burkhart S. Compromised blood coagulation: an in vitro comparison of hydroxyethyl starch 130/0,4 and hydroxyethyl starch 200/0,5 using thrombelastography. *Anesthesia Analgesia*. 1998; 87: 989-93.
20. McCabe White M, Jennings L.K. "Platelet Protocols, Research and Clinical Procedures". Copyright. 1999 by Academic Press, California
21. Rosenfeld S.L, Anderson C.L. "Platelet Immunobiology, Molecular and Clinical Aspects". Copyright 1989 by Lippincott, Philadelphia
22. Calvete J.J, Mann K, Schafer W. Proteolytic degradation of the RGD-binding and non-RGD-binding conformers of human platelet integrin glycoprotein IIb/IIIa: clues for identification of regions involved in the receptor's activation. *Biochemistry Journal*. 1994; 298:1-7

23. D'Souza S.E. Ginsberg M.H. Burke T.A. Localization of an Arg-Gly-Asp recognition site within integrin adhesion receptor. *Science*. 1988; 242: 91-93
24. Shattil S.J. Brass L.F. Induction of fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. *Journal of Biological Chemistry*. 1987; 262: 992-1000
25. Clemetson K.J. Platelet GPIb-V-IX complex. *Thrombosis and Haemostasis*. 1989; 78: 266-70.
26. Wu Y.P. van Beugel H.H. Lanhof H. Platelet adhesion to multimeric and dimeric von Willebrand factor and to collagen type III preincubated with von Willebrand factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 1996; 16: 611-20.
27. Williams M.J. Hughes P.E. O'Toole T.E. The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains. *Trends in Cellular Biology*. 1994; 4: 109-12.
28. Frelinger A.L. Lam S.C.T. Plow E.F. Occupancy of an adhesive glycoprotein receptor modulates expression of an antigenic site involved in cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*. 1988; 263: 12397-402
29. Ginsberg M.H. Lightsey A. Kunicki T.J. Divalent cation regulation of the surface orientation of platelet membrane glycoprotein IIIb: correlation with fibrinogen binding function and definition of a novel variant of Glanzmann's thrombasthenia. *Journal of Clinical Investigations*. 1986; 78: 1103-111
30. D'Souza S.E. Ginsberg M.H. Burke T.A. The ligand binding site of the platelet integrin receptor GPIIb-IIIa is proximal to the second calcium binding domain of its subunit. *Journal of Biological Chemistry*. 1990; 265: 3440-446
31. Gulino D. Boudignon C. Zhang L. Calcium binding properties of the platelet glycoprotein IIb ligand-interaction domain. *Journal of Biological Chemistry*. 1992; 267: 1001-1007.
32. Harrison P. Cramer E.M. Platelet alfa granules. *Blood Review*. 1993; 7: 52-62
33. Haimovich B. Lipfert L. Brugge J. Tyrosine phosphorylation and cytoskeletal reorganisation in platelets triggered by interaction of integrin receptors with

- their immobilized ligands. *Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268: 15868-877
34. Heath-Mondoro T. Wall D.C. White M.M. Selective induction of a glycoprotein IIIa ligand-induced binding site by fibrinogen and von Willebrand factor. *Blood*. 1996; 88: 3824-830.
 35. Horwitz A. Duggan K. Buck C. Interaction of plasma fibrinogen with talin, a transmembrane linkage. *Nature*. 1986; 320: 531-33
 36. Huang M.M. Bolen J.B. Barnwell J.W. Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the FynLyn and Yes protein-tyrosine kinases in human platelets. *Proceedings of National Academy of Science USA*. 1991; 88: 7844-848.
 37. Tandon N.N. Kralisz U. Jamieson G.A. Identification of GP IV (CD36) as a primary receptor for platelet collagen adhesion. *Journal of Biological Chemistry*. 1989; 264: 7576-583.
 38. Bolin R.B. Okumura T. Jamieson G.A. Changes in the distribution of platelet membrane glycoproteins in patients with myeloproliferative disorders. *American Journal of Hematology*. 1977; 3: 63-71
 39. Ockenhouse C.F. Tandon N.N. Magowan C. Identification of a platelet membrane glycoprotein as a *falciparum* malaria sequestration receptor. *Science*. 1989; 243:1469-471.
 40. Leung L.L.K. Li W. Mc Gregor J.L. CD 36 peptides enhances or inhibits CD 36-thrombospondin binding: a two step process of ligand-receptor interaction. *Journal of Biological Chemistry*. 1992; 267: 18244-250.
 41. Slupsky J.R. Cawley J.C. Kaplan C. Analysis of CD9, CD32 and p67 signalling: use of degranulated platelets indicates direct involvement of CD9 and p67 in integrin activation. *British Journal of Haematology*. 1997; 96: 275-86.
 42. Parise L.V. Criss A.B. Nannizzi L. Glycoprotein IIIa is phosphorylated in intact human platelets. *Blood*. 1990; 75: 2363-368.
 43. Gachet C. Cattaneo M. Ohlmann P. Purine receptors on blood platelets: further pharmacological and clinical evidence to suggest the presence of two ADP receptors. *British Journal of Haematology*. 1995; 91: 434-44.

44. Gachet C. Hechler B. Leon C. Activation of ADP receptors and platelet function. *Thrombosis and Haemostasis*. 1997; 78: 271-75.
45. Ohlmann P. Laugwitz K.L. Spicher K. The human platelet ADP receptor activates Gi proteins. *Biochemistry Journal*. 1995; 312: 775-79.
46. D'Souza S.E. Haas T.A. Piotrovicz R.S. Ligand and cation binding are dual functions of a discrete segment of the beta 3 integrin: cation displacement is involved in ligand binding. *Cell*. 1994; 70: 659-67.
47. Van Willigen G., Hers I., Gorter G. Exposure of ligand binding sites on platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ by phosphorylation of the β3 subunit. *Biochemistry Journal*. 1996; 314: 769-79.
48. Law D.A., Nannizzi-Alaimo L., Phillips D.R. Outside-in integrin signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271: 10811-815.
49. Hotchin N.A., Hall A. The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular Rho/rac GTPases. *Journal of Cellular Biology*. 1995; 131: 1857-865.
50. Kouns W.C., Wall C.D., White M.M. A conformation dependent epitope of human platelet glycoprotein IIIa. *Journal of Biological Chemistry*. 1990; 265: 20593-601.
51. O'Toole T.E., Katagiri Y., Faull R.J. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *Journal of Cellular Biology*. 1994; 124: 1047-59.
52. Sims P.J., Wiedmer T., Esmon C.T. Regulatory control complement on blood platelets: modulation of platelet procoagulant responses by a membrane inhibitor of the C5b-9 complex. *Journal of Biological Chemistry*. 1989; 264: 17049-57.
53. Jennings L.K., White M.M., Mandrell T.D. Interspecies comparison of platelet aggregation, LIBS expression and clot retraction: observed differences in GPIIb-IIIa functional activity. *Thrombosis and Haemostasis*. 1995; 74: 1551-56.
54. Irie A., Kamata T., Puzon-McLaughlin W. Critical amino acid residues for ligand binding are clustered in a predicted beta turn of the third N terminal

- repeat in the integrin alpha 4 and alpha 5 subunits. *EMBO Journal*. 1995; 14: 5550-556.
55. Vu T.K., Hung D.T., Wheaton V.I. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*. 1991; 64: 1057-68.
 56. Jennings L.K., Fox J.E.B., Edwards H.H. Changes in the cytoskeletal structure of human platelets following thrombin activation. *Journal of Biological Chemistry*. 1981; 256: 6927-934.
 57. Fox J.E.B. Identification of actin-binding protein linking the membrane cytoskeleton to glycoproteins on platelet plasma membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 1985; 260: 11970-977.
 58. Otey C.A., Vasquez G.B., Burridge K. Mapping of the alpha-actinin binding site within beta 1 integrin cytoplasmic domain. *Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268: 21193-197.
 59. Fijnheer R., Frijns C.J.M., Korteweg J. The origin of P-selectin as a circulating plasma protein. *Thrombosis and Haemostasis*. 1997; 77: 1081-85.
 60. Nieuwenhuis H.K., Akkerman J.W.N., Houdijk W.P.M. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express glycoprotein Ia. *Nature*. 1985; 264: 6017-20.
 61. Bachelot C., Saffroy R., Gandrille S. Role of FcγRIIA gene polymorphism in human platelet activation by monoclonal antibodies. *Thrombosis and Haemostasis*. 1995; 74: 1557-63.
 62. Weiss H.J., Vivic W.J., Lages B.A. Isolated deficiency of platelet procoagulation activity. *JAMA*. 1979; 67: 206-213.
 63. Check W. Goal is one citrate concentration. *CAP Today*. 1998; 12 (1): 27.
 64. Ts'ao C.H., Lo R., Raymond J. Critical importance of citrate-blood ratio in platelet aggregation studies. *American Journal of Clinical Pathology*. 1976; 65 (4): 518-22.
 65. Bowie E. J., Thompson A.R., Didsheim P. "Laboratory Manual of Hemostasis". Copyright 1971. Saunders, Philadelphia

66. Pignatelli P., Pulcinelli F.M., Ciatti F. Acid citrate dextrose (ACD) formula. A as a new anticoagulant in the measurement of in vitro platelet aggregation. *Journal of Clinical and Laboratory Analyses*. 1995; 9 (2): 138-140.
67. Abrams C.S., Ellison N., Budzynski A.Z. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood*. 1990; 75: 128-38.
68. Ault K.A., Rinder H.M., Mitchell J.G. Correlated measurement of platelet release and aggregation in whole blood. *Cytometry*. 1989; 10: 448-55.
69. White M.M., Foust J.T., Mauer A.M. Assessment of lumiaggregometry for research and clinical laboratories. *Thrombosis and Hemostasis*. 1992; 76 (5): 572-77.
70. Wall J.E., Bujis-Wilts M., Arnold J.T. A flow cytometric assay using mepacrine for the study of uptake and release of platelet dense granule contents. *British Journal of Hematology*. 1995; 89: 380.
71. Jennings L.K., Fox C.F., Kouns W.C. The activation of human platelets mediated by anti-human platelet p24/CD9 monoclonal antibodies. *Journal of Biological Chemistry*. 1990; 265 (7): 3815-822.
72. Kouns W.C., Rubenstein E., Carroll R.C. Induction of antibody-FcγRII-mediated activation through alteration of the cytoskeleton. *Circulation*. 1990; 82 (4) : 111.
73. Gresele P., Catalano M., Giammaresi C. Platelet activation markers in patients with peripheral arterial disease: a prospective comparison of different platelet function tests. *Thrombosis and Haemostasis*. 1997; 78: 1434-37.
74. Colman R.W., Hirsch J., Marder V.J. " Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and Clinical Practice ". Copyright. 1994. Lippincott, Philadelphia.
75. Israels S.J., McNicol A., Robertson C. Platelet storage pool deficiency: diagnosis in patients with prolonged bleeding times and normal platelet aggregation. *British Journal of Haematology*. 1990; 75: 118-21.
76. Nieuwenhuis H.K., Akkerman J.W.N., Sixma J.J. Patient with prolonged bleeding time and normal aggregation tests may have storage pool deficiency: studies on one hundred six patients. *Blood*. 1997; 70 (3) : 620-23.

77. Harker L.A., Slichter S.J. The bleeding time as screening test for evaluating platelet function. *New England Journal of Medicine*. 1972; 287: 155-59.
78. Sixma J.J. "Hematology: Basic principles and Practice" 2nd ed. Copyright 1995. Churchill Livingstone, New York.
79. Boldt J., Haisch G., Suttner S. Effects of a new modified, balanced hydroxyethyl starch preparation (Hextend) on means of coagulation. *British Journal of Anaesthesia*. 2002; 89 (5) : 722-28.
80. Van Gelder J., Nair C., Dhall D. Colloid determination of fibrin network permeability. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 1996; 7 : 747-60.
81. Carr M., Effect of hydroxyethyl starch on the structure of thrombin and reptilase-induced fibrin gels. *Journal of Laboratory in Clinical Medicine*. 1986; 108 : 556-61.
82. Fries D., Immerhofer P., Klingler A. The effect of the combined administration of colloids and lactated Ringer's solution on the coagulation system. An in vitro study using thrombelastographic coagulation analysis. *Anesthesia Analgesia*. 2002; 94: 1280-87.
83. Konrad C., Markl T., Schnepfer G. In vitro effects of different medium molecular hydroxyethyl starch solutions and lactated Ringer's solution on coagulation using SONOCLOT. *Anesthesia Analgesia*. 2000; 90: 274-79.
84. Konrad C., Markl T., Schnepfer G. The effects of in vitro hemodilution with gelatin, hydroxyethyl starch and lactated Ringer's solution on markers of coagulation, an analysis using SONOCLOT. *Anesthesia Analgesia*. 1999; 88: 483-88.
85. Deusch E., Gamsjager T., Kress H.G. Binding of hydroxyethyl starch molecules to the platelet surface. *Anesthesia Analgesia*. 2003; 97 (3): 680-83.
86. Jung F., Kosciovsky J., Mrowietz C. Elimination kinetics of different hydroxyethyl starch molecules and effects on blood fluidity. *Clinical Hemorrhheology*. 1994; 14: 182-202.
87. Boldt J., Haisch C., Suttner S. Are lactated Ringer's solution and normal saline equal with regard to coagulation. *Anesthesia Analgesia*. 2002; 94: 378-84.

88. Janvrin S.B., Davies G., Greenhalgh R.M. Postoperative deep vein thrombosis caused by intravenous fluids during surgery. *British Journal of Surgery*. 1980; 67: 690-93.
89. Sanfelippo M.J., Suberviola P.D., Geimer N.F. Development of a von Willebrand-like syndrome after prolonged use of hydroxyethyl starch. *American Journal of Clinical Pathology*. 1987; 88: 653-55.
90. Symington B.E. Hetastarch and bleeding complications. *Annals of Internal Medicine*. 1986; 105: 627-28.
91. Gamsjager T., Gustroff B., Kozek-Langenecker S.A. The effects of hydroxyethyl starches on intracellular calcium in platelets. *Anesthesia Analgesia*. 2002; 95 (4): 866-69.
92. Innerhofer P., Fries D., Margreiter J. The effects of perioperatively administered colloids and crystalloids on primary platelet-mediated hemostasis and clot formation. *Anesthesia Analgesia*. 2002; 95: 858-65.