



137 907

T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİMDALI
HEMATOLOJİ BİLİMDALI

AFEREZ YOLUYLA ELDE EDİLMİŞ TROMBOSİT SÜSPANSİYONLARININ,
LÖKOSİTTEN ARINDIRILMALARI, IŞINLANMALARI VE SAKLAMA
SÜRELERİNİN SERBEST RADİKAL OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
BOKÜMANTASYON MERKEZİ

137907

Yan Dal Uzmanlık Tezi

Dr. Dilek ARGON

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Mahmut BAYIK

İSTANBUL 2003

TEŞEKKÜR

Üç yıldır bünyesinde bulunmaktan büyük bir onur ve mutluluk duyduğum Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesinde ihtisasımı tamamlarken bilimsel ve sosyal kişilikleri ile bana sonsuz destek ve yakınlık gösteren saygıdeğer hocalarım Hematoloji Bilim Dalı Başkanı Sn Prof. Dr. Mahmut Bayık, Sn Prof. Dr. Tülin Fırathı Tuğlular, Sn Doç. Dr. Siret Ratip ve Sn Yard. Doç. Dr. Mustafa Çetiner'e ve İç Hastalıkları Ana Bilim Dalının tüm kıymetli öğretim üyelerine, Patoloji A.B.D. öğretim üyesi Sn Prof. Dr. Tülay Tecimer'e, tez çalışmam sırasında yakın desteklerini gördüğüm Sn Prof. Dr. A. Süha Yalçın, Sn Dr. Meral Yüksel, Sn Dr. Meral Sönmezoğlu ve Sn Doç. Dr. Emel Ekşioğlu Demiralp'e, birlikte çalışmaktan zevk aldığım hekim arkadaşlarım Sn Dr. Cafer Adıgüzel, Sn Dr. Işık Kaygusuz'a, İç Hastalıkları A.B.D asistanlarına, hematoloji-immunoloji laboratuvarı, KİT ünitesi ve kan bankasının tüm çalışanlarına, eşim Dr. Andaç Argon'a teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Dilek Argon

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Aferez.....	3
2.1.1. Tanım.....	3
2.1.2. İşlem.....	4
2.2. Tromboferez.....	7
2.2.1. Tromboferezin avantajları.....	7
2.2.2. Trombosit konsantresi ve tromboferez ünitesi.....	8
2.2.3. Teknik.....	8
2.2.4. Tromboferez donörü.....	10
2.2.5. Trombosit süspansiyonlarının özellikleri.....	11
2.2.6. Tromboferez yan etkileri.....	13
2.2.6.1. Donor reaksiyonları.....	13
2.2.6.2. Hasta reaksiyonları.....	14
2.2.7. Trombosit süspansiyonlarının ışınlanması ve lökosit filtrasyonu.....	14
2.3. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller.....	14
2.3.1. Bazı önemli ROT ve RAT'lar.....	15
2.3.2. Serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarı.....	17
2.3.3. Serbest oksijen ve azot türlerinin trombositler üzerindeki etkileri.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	20
3.1. Donör Seçimi.....	20
3.2. Trombosit Süspansiyonlarından Örneklerin Hazırlanması.....	20
3.3. Kemilüminesans Ölçümleri.....	22
3.3.1. Ayraçların hazırlanması.....	24
4. BULGULAR.....	25
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	33
6. ÖZET.....	38
7. SUMMARY.....	39
8. KAYNAKLAR.....	40

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Medikal tedavilerdeki gelişmelere paralel olarak kullanımı sürekli artan trombosit süspansiyonları yaşamı tehdit eden tüm trombositopenik durumlarda, doğumsal veya edinsel trombosit fonksiyon bozukluklarında etkin ve yaygın olarak kullanılmakta olan kan ürünlerindedir. 1960'lı yıllarda santrifügasyonla ayrılmaya başlanan trombositler, artık günümüzde aferez işlemi ile elde edilmekte ve tek bir vericiden 8 üniteye kadar toplanabilmektedir. Ancak trombositlerin toplanması, saklanması ve graft versus host hastalığı (GVHD) riskini azaltmak için ışınlanması süreçlerinden geçerken canlılığını ve fonksiyonlarını sürdürebilmelerine etki eden faktörlerin çok iyi bilinmesi ve gerekli önlemlerin alınması gerekmektedir. Aksi halde işlem amacına ulaşamayacaktır. Örneğin trombositlerin aferez yöntemiyle toplanması sırasında yani henüz depolanma öncesi dönemde lökosit filtrasyonuna maruz bırakılırsa CD62 ve CD63 gibi aktivasyon belirleyicilerinin ekspresyonu artabilir; bu da trombosit morfolojisini değiştirip irreversible mikropartiküllerin (agregatların) oluşmasına neden olabilir. Ayrıca bu filtre edilmiş ünitelerde C3 seviyesinden başlayarak kompleman aktivasyonu başlayabilir ki bu da pıhtılaşma veya fibrinolitik sistem aktivasyonuna yol açabilir(1). Trombositlerin saklanması ise diğer bir kritik aşamadır. Trombositler oda sıcaklığında (20-24⁰C) hafif ajitasyon altında 5 gün saklanabilir; bu sürenin sonunda trombositlerin %25'i canlılığını kaybeder(2). Trombositlerde apoptotik mekanizmaların bir çoğu bulunur. Trombosit aktivasyonundan bağımsız olarak da depolanma koşullarıyla ilişkili olarak apoptoz görülebilir(3). Trombositlerin gamma ışınlarına maruz bırakılması ve bu haliyle depolanmasının trombosit fonksiyonlarını etkileyebileceği olasılığı da diğer bir tartışma noktasıdır. Her ne kadar bu işlem en az 20 yıldan beri uygulanıyorsa da üzerinde oldukça az çalışma yapılmıştır ve daha objektif verilere gereksinim vardır(4).

Biz bu tez çalışmasında trombositlerin aferezden itibaren toplanma, depolanma ve ışınlanma aşamalarında aktivasyonuna neden olma olasılığı bulunan serbest oksijen radikallerini araştırdık. Zira trombositlerin reaktif oksijen türleri ürettiği artık kabul edilmektedir(5). Bu üretimin trombosit toplanması, saklanması ve

ışınlanması ile olan ilişkilerini araştırarak daha önce trombosit süspansiyonlarında hiç çalışılmamış bir konuya ışık tutmaya çalıştık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Aferez

2.1.1. Tanım

Aferez Latince'de "uzaklaştırma", "ayırma" anlamlarına gelen bir sözcüktür(6). Hemaferез ise tam kanın donör veya hastadan alınarak komponentlerine ayrılması, istenen komponentin tutularak geri kalan kısımların donor veya hastaya geri verilmesi işlemine verilen isimdir(7). Günümüzde aferez işlemleri gelişen teknolojiye paralel olarak bilgisayarlı otomatik cihazlar aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. Bu cihazlarla yapılan işlemler özelliklerine göre değişik isimler almaktadır. Aferez işlemi öncelikle işlemin uygulandığı kişiye göre adlandırılmakta olup eğer işlem gönüllü donörlerde kan komponentlerini gereksinimi olan hastalara vermek için gerçekleştiriliyorsa buna donör aferezi denmektedir. Eğer bu işlem hasta için zararlı olduğu düşünülen kan komponentlerinin hastadan uzaklaştırılması amacı ile gerçekleştiriliyorsa terapötik aferez adını almaktadır(8).

Diğer bir isimlendirme ise aferez sırasında uzaklaştırılan komponente göre yapılmaktadır. Ayrılması istenen kısım kanın hücresel elemanları ise genel olarak bu işlemlere sitoferez adı verilmektedir. Plateletferez (trombosit aferezi) trombositlerin toplanması ve uzaklaştırılması için yapılan aferez işlemine verilen addır(9,10). Bu işlem transfüzyon amacı ile gönüllü donörlere uygulanabileceği gibi bir grup hastada (myeloproliferatif hastalıklar) zararlı olduğu düşünülen bu komponentin uzaklaştırılması için de gerçekleştirilebilmektedir(11,12). Lökoferez donör veya hastalarda lökositlerin toplanması ve uzaklaştırılması için yapılan aferez işlemlerine verilen addır(13). Gönüllü donörlere değişik amaçlarla lökosit aferezi yapmak mümkündür. Nötropenik hastalara tedavi amacı ile verilmek üzere granülositlerin toplanması işlemine granülosit aferezi denmektedir(14,15,16). Kök hücre nakli yapmak için uygun donörlerden kök hücrelerin toplanması (allojenik nakil) için gerçekleştirilen aferez işlemlerine ise kök hücre aferezi adı verilmektedir(17). Bu işlem donörlere yapılabildiği gibi, hastaların kendi hücreleri toplanarak periferik kök hücre nakli (otolog nakil) yapılmak istenen hastalara da uygulanmaktadır. Yine bir grup hastada (kronik ve akut lösemiler) anormal olarak artan lökosit sayılarını azaltabilmek amacı ile terapötik lökoferez işlemleri yapılmaktadır(18,19,20).

Lenfositleri kandan uzaklaştırarak bağışıklık sistemlerim baskılamak için hastalara yapılan aferez işlemlerine lenfosit aferezi denmektedir(21). Uygun donörlerden daha genç ve daha fazla miktarda eritrosit toplamak için yapılan aferez işlemlerine eritrosit aferezi adı verilmektedir.Eritrosit aferezi orak hücreli anemi gibi hastalıklarda eritrosit değişimi (exchange transfüzyon) yapmak amacı ile hastalara da uygulanan bir yöntemdir(8). Aferez işlemi ile toplanması ve uzaklaştırılması planlanan kan komponenti plazma ise yapılan bu işleme plazmaferez denmektedir. Tek bir gönüllü donörden transfüzyon amacı ile diğer toplanan komponentlere ek olarak veya daha fazla miktarda plazma toplayabilmek için gerçekleştirilebileceği gibi bu işlem hastalara tedavi amacı ile de uygulanabilmektedir. Plazmalarında kendileri için zararlı olduğu düşünülen antikorlar, immün kompleksler, toksinler veya ne olduğu bilinmeyen ancak plazmada olduğu düşünülen maddeleri bulunduran hastalarda plazmanın uzaklaştırılması için gerçekleştirilen bu işlemlere terapötik plazmaferez denmektedir(9,22). Değişik yöntemler kullanarak hastaların plazmalarında bulunan ve hastalar için zararlı olduğu düşünülen bu maddeleri selektif olarak dolaşımdan uzaklaştıran yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler plazmadan uzaklaştırılan patojen (hastalık yapıcı) maddelere göre değişik isimler almaktadır, örneğin: plazmalarında bulunan patolojik antikorlar ve immün komplekslerin uzaklaştırılması için yapılan aferez işlemlerine immünadsorpsiyon aferezi, anormal olarak artmış yağların uzaklaştırılması için yapılan aferez işlemlerine LDL aferezi, bilirübinlerin plazmadan uzaklaştırılması için yapılan aferezlere ise bilirübin aferezi adları verilmektedir. Her geçen gün kanda bulunabilecek değişik patojen maddelerin uzaklaştırılması için yeni aferez yöntemleri geliştirilmekte ve uzaklaştırılan maddeye göre isimlendirilmektedir. Böbrek yetmezliği olan hastalarda kanda biriken üremik toksinlerin uzaklaştırılması amacı ile yıllardır uygulanan hemodiyaliz işlemleri de aslında bir aferez yöntemidir.

2.1.2. İşlem

Aslında kanın damardan akıtılması, hastalık yaptığı düşünülen kanın uzaklaştırılması amacı ile çok eski yıllardan beri kullanılan bir tedavi yöntemidir. Kan ve dolaşım sistemi hakkındaki bilgilerin artmasına paralel olarak plazmaferez tedavi amacı ile ilk kez 1914 yılında Abel ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır(23). Daha sonraları

santrifüj yöntemi ile kan komponentlerine ayrılmaya başlandıktan ve plastik kan torbaların üretimine geçildikten sonra donör veya terapötik hemaferez uygulamaları manuel veya yan otomatik yöntemler kullanılarak yapılmaya başlanmıştır. 1950'li yılların sonu ve 60'lı yılların başına doğru otomatik yöntemlerle kanı alıp komponentlerine ayıran santrifüj prensibi ile çalışan iki yeni sistem üretilmiştir(24).

1970 ve 80'li yıllara gelindiğinde ise gerek teknolojiye izlenen gelişmeler gerekse malignitelerin tedavileri için daha yoğun olarak uygulanmaya başlanan kemo-radyoterapilere paralel olarak aferez cihazları da önemli gelişmeler kaydetmiş ve günümüzde hasta ve donör güvenliğini esas alan. kullanımı kolay, işlem süresi kısa ve oldukça saf komponentler ayırabilen bilgisayarlı modern cihazlar geliştirilmiştir. Günümüzde en sık kullanılan aferez cihazları arasında Cobe Spectra; Fenwal CS3000 Plus, Amicus, Autopheresis C; Fresenius AS 104, AS 204; Haemonetics Model V50, MCS, MCS Plus, PCS-2 yer almaktadır(25).

Bu cihazlarda kanın komponentlerine ayrılması için başlıca santrifüj ve filtrasyon yöntemleri tek başlarına veya kombine olarak kullanılmaktadır. Santrifüj yönteminde kanın komponentlerine ayrılması santrifüj sırasında oluşan merkezkaç kuvvetinin etkisi ile özgül ağırlıkları birbirinden farklı olan kan hücreleri ve plazmanın ayrılması prensibine dayanmaktadır. Bir tüp içinde kan santrifüj edilecek olursa özgül ağırlıklarına göre hafiften ağıra doğru plazma, trombosit, mononükleer hücreler, granülosit ve eritrosit olarak sıralanmaktadır. Filtrasyon yönteminde ise kan komponentleri büyüklüklerine göre birbirinden ayrılmaktadır. Kan belirli basınç altında üzerinde belirli çapta delikler bulunan membranlardan geçerken deliklerden daha küçük çapa sahip olan komponentler membranın diğer tarafına geçmekte, çapı büyük olanlar ise iç kısımda kalarak ayrılma işlemi gerçekleşmektedir. Bu yöntem plazmanın ayrılması amacı ile daha sık kullanılan bir yöntemdir

Aferez işlemleri her biri kullanılacak olan cihaz için özel olarak üretilmiş, tümü steril, tek kullanımlık setler ile yapılmaktadır. Bu işlemler sırasında hasta veya donörün geniş çaplı bir toplar damarına girilerek kan hızı ayarlanabilen bir pompa aracılığı ile alınmakta ve bu sırada antikoagülan bir solüsyon, genellikle *acid citrate dextrose* (ACD) ile sabit bir oranda karıştırılarak aferez işlemleri sırasında kanın pıhtılaşması önlenmektedir. Daha sonra alınan bu kan, komponent ayrımının gerçekleştirileceği santrifüj bölgesine gönderilmektedir. Üretici firmaların kendi

cihazları için geliştirdikleri değişik şekillerde dizayn edilmiş santrifüj bölümleri bulunmaktadır ve cihazlara göre *bowl*, *seperation chamber*, *tubular rotor* gibi farklı isimler kullanılmaktadır. Kesikli akım prensibi ile çalışan cihazlarda santrifüj bölümüne alınan kan komponentlerine ayrıldıktan sonra istenen komponent bir torbada tutulmakta ve geri kalan komponentler hasta veya donöre geri verilmektedir. Bu şekilde boşalan santrifüj alanı tekrar kan alımı ile doldurularak kan komponentlerine ayrılmakta ve aynı işlemler sikluslar şeklinde tekrarlanmaktadır. Bu cihazlarda genelde tek bir damar yolu kullanıldığı için bu durum hasta veya donör açısından bir avantaj olmakla beraber aynı damar yolu hem alış hem de dönüş yolu olarak kullanıldığı için işlem süresi uzayabilmektedir. Ayrıca bu cihazların damar dışında bulunan (ekstrakorporal) kan hacimleri daha fazla olduğu için volüm değişikliklerine bağlı kardiyovasküler yan etkiler daha sık izlenebilmektedir. Devamlı akım prensibi ile çalışan cihazlarda ise genellikle iki damar yolu (alış ve dönüş) kullanılmaktadır. Antikoagülan solüsyonla karıştırılarak hastadan alınan kan bir yandan sürekli olarak santrifüj bölümüne pompalanırken burada merkezkaç kuvvetinin etkisi ile birbirinden ayrılan kan komponentleri belirli noktalardan sürekli olarak çekilmektedir. Böylece toplanması istenen komponent torbada tutulurken geri kalan komponentler dönüş yolundan hasta veya donörlere sürekli olarak geri verilmektedir. Bu cihazlar ile işlem süreleri daha kısa sürmekte ve damar dışı kan hacimleri daha düşük olduğu için kardiyovasküler yan etkiler daha az izlenmektedir. Hasta veya donörlere çift damar yolu açmak önemli dezavantajlarından biri olmakla birlikte çoğu cihazın tek kol prensibi ile çalışabilme özellikleri de bulunmaktadır. Bu cihazların çoğu, özellikle yeni modelleri, hasta veya donör güvenliğini esas alacak şekilde bilgisayar sistemleri ile kontrol edilen bir çok basınç, hava dedektörleri, filtreler, güvenlik kapakçıkları, izlem monitörleri ve alarm sistemleri ile donatılmıştır. Ayrıca alınan, işlenen, verilen kan ve toplanan komponent miktarları kaydedilmektedir. Santrifüj bölümlerinin özel dizaynları sayesinde birbirinden ayrılan komponentler çok daha saf olarak ayrılabilir. Cihazlara yüklenen hasta veya donör verilerine göre işlemin daha ideal koşullarda gerçekleşmesini sağlayacak veriler otomatik olarak hesaplanmakta ve gerçekleştirilmektedir. Kullanımları ise gittikçe daha rahat ve kolay uygulanabilir hale gelmiştir(25).

2.2. Tromboferez

Tromboferez, aferez tekniğinin en fazla uygulama alanı bulduğu işlemdir.

Trombosit transfüzyonu ile ilk deneyim, 1910'da Duke tarafından purpura hemorajikalı bir hastaya verilen trombosit içeren tam kan transfüzyonunun kanamayı azaltıp kanama zamanının kısalmasının bildirilmesidir (26). Trombositlerin toplanıp tanısall amaçlı transfüze edildiği 1950'lerin başına kadar çok az bilgi edinilebilmişti. Plastik torbaların kullanılmaya başlandığı 1960'lı yıllarda trombositler santrifügasyonla ayırmaya başlandı. Transfüze edilecek trombositler yorucu manuel aferez teknikleriyle veya tam kan ünitelerinden hazırlanıyordu. 1970'lerde plastik torbaların geliştirilmesiyle trombositlerin oda sıcaklığında saklanabilmesi ve ajitasyon kullanımı, bu komponentin gereğinde hazır tutulabilen bir ürün olmasını sağlamıştır. Daha sonra otomatize aferez teknolojisi ortaya çıkmıştır(9,25).

Tromboferezde trombositler periferal kandan toplanır, bu sırada ayrılan eritrositler ve plazma yeniden donöre verilir. Bazı vak'alarda aynı işlem sırasında ayrı bir komponent olarak plazma da toplanır.

2.2.1. Tromboferezin avantajları

- 1-Alloimmunize hastalar için terapötik dozlarda uygun trombositlerin toplanabilirliği sağlanır. (Bunun için ya HLA uygun donörler kullanılır veya toplanmış tromboferez ürünlerinin *cross-match*'i yapılır.)
- 2-Bir aferez ünitesi yaklaşık 4-6 *random* ünitesine karşılık geldiği için transfüzyon yoluyla geçen hastalık riski de o oranda azaltılmış olur.
- 3-Daha az donör ile daha yüksek kalitede ürün elde edilmiş olur. Hastanın trombosit ihtiyacını karşılamaya yetecek kadar tam kan bağışının yapılmadığı ünitelerde yeterli trombosit elde edilebilir.
- 4-Daha saf ürün elde edilir. Lökosit ve eritrositlerle çapraz kontaminasyon daha azdır.
- 5-Daha az donörle karşılaşılması nedeniyle HLA alloimmunizasyonu da daha az olur.
- 6-Donöre sıvı geri dönüşü olduğu için daha az donör reaksiyonu ile karşılaşılır.
- 7-Daha çok "devamlı ve sicili bilinen donör" olması avantajı vardır.
- 8-Daha ince iğne teknolojisi daha iyi donör uyumunu sağlar.

9-Tam kandan açık sistemle hazırlanan trombosit konsantrelerinin 24 saat içinde kullanılmaları gerekirken tromboferezle hazırlanan ürünler 5 gün saklanabilir(2).

2.2.2. Trombosit konsantresi ve tromboferez ünitesi

Trombosit konsantresi, donörden toplanıp plazma içinde süspanse edilmiş trombositlerdir. Bir ünite, 50-60 ml plazma içinde $45-85 \times 10^9$ (ortalama 70×10^9) trombosit içerir. Ayrıca $0,05-1 \times 10^9$ lökosit ve $0,2-1 \times 10^9$ eritrosit kontaminasyonu söz konusudur. Bir aferez ünitesi ise kullanılan metoda ve makinaya bağlı olmak üzere 200-400 ml plazma içinde $200-800 \times 10^9$ trombosit içerir. Burada da alınan önlemlere bağlı olmak üzere eritrosit ve lökosit kontaminasyonu oluşabilir(27). Kullanımda olan antikoagülanların hemen hepsi trombositlerin resüspanse olmasını sağlayacak derecede asiditeye sahiptir. Trombositler oda ısısında saklanırken eğer hücrelerin O_2 gereksinimleri karşılanmazsa glikolitik hız artar ve laktik asit birikir. Ortamın pH'sı düşmeye başlayınca trombositlerin ömürleri kısalmır(28). Ancak bu CO_2 'in O_2 ile yer değiştirmesiyle önlenebilir. $22^\circ C$ (20-24) ve ajitasyon kullanımı, trombosit için ideal saklama koşullarıdır(2,27,29). Ürünün taşınması sırasında bu koşullardan çıkması (24 saate kadar), çok az canlılık kaybı ile kabul edilebilir. Trombositler transfüzyondan hemen önce santrifüj ve 10 ml kadar az plazma içinde resüspanse edilerek yan etki ve fazla bir kayıp olmaksızın konsantre edilebilir.

2.2.3. Teknik

Aferezde temel basamaklar; on-line otomatize sistem kullanılarak santrifüj gücüyle kanın komponentlerine ayrılması ve istenen komponentin ayrılmasıdır. Santrifügasyonla, kan komponentleri özgül ağırlıklarına göre katmanlara ayrılır ve izole edilir. Santrifügasyonla olgun eritrositler en altta toplanırken plazma en üsttedir. Ortada dansite farkına göre sırasıyla olgun eritrositlerden sonra genç eritrositler, granülositler, mononükleer hücreler ve trombositler gelir. Granülosit bölümü, nötrofil, bazofil ve eozinofilleri kapsar.

Aferez tekniklerinde santrifügasyonla ayırım yapan cihazlar, aralıklı akım (intermittent flow- IFC) ve devamlı akımla (continuous flow-CFC) çalışanlar olarak iki grupta toplanır. İlk geliştirilen teknik olan IFC ile çalışan cihazlarda (Haemonetics, ABD) donörün tek kolundan alınan kan, antikoagülanla karıştıktan

sonra dönen çanak şeklindeki kapalı sisteme açısız hızla girer. Santripedal güç kanı separasyon bölümüne gönderir ve orada komponentlerine ayırır. Plazma bu bölümden, üstteki bir torbaya itilir, oradan da hastaya dönüş sistemine geçer. Trombosit ve lökositler de bu bölümden ayrılırken en altta bulunan eritrositler burada kalır. Çanak eritrositlerle dolduğunda, durur ve boşalır. Bu şekilde 6-8 döngüde işlem tamamlanır(10,25,30).

Daha sonra geliştirilen devamlı akım santrifügasyon (CFC) tekniği (COBE-Spectra, ABD) otomatize ve mikroprosesör kontrollü olup bakteriyel kontaminasyonu önlemek için steril bariyer filtreleri ve geri-dönüşsüz pompalar kullanılır. İnternal algoritmalar pompa akım hızını ayarlar ve 2400 rpm santrifüj hızı kullanarak trombosit ürün miktarını tahminen hesaplar. Bu hesaplamada donörün boyu, kilosu, hematokrit düzeyi ve trombosit miktarı yol gösterir. Donörün total kan volümü antikoagülanın akım hızını 0.9-1.3 ml/ dakika arasında tutarak kontrol eder. Donörün hematokrit düzeyi ise uygun antikoagülan oranını hesaplamada kullanılır (6:1-9:1). Standart işlem süresi 100 dakika olup değiştirilebilir. IFC'den farklı olarak ürün ayrılma ve kalan komponentlerin geri dönüşü diğer koldan ve eş zamanlı olarak yapılır(25,31).

Baxter (ABD) firması tarafından geliştirilen Fenwall CS3000 separatörü trombosit saklama için kullanılan ilk kapalı sistemdir. Çift bölme (ayırma ve toplama) kullanılan sistemde, ilkinde trombositten zengin plazma ve eritrosit ayrılır. Eritrosit donöre sürekli olarak dönerken; trombositten zengin plazma, toplama bölümüne transfer edilir ve burada 200 ml plazma içinde konsantre edilir. Optik dansiteye duyarlı ara yüz dedektörü kullanılarak birbirine kontaminasyon önlenir. Kan akım hızı 50-60 ml, tam kan-antikoagülan oranı 9:1-11:1'dir. Son ürün resüpsansiyon gerektirir(10,25,32). Bu sistemin kullanıma girdiği günden bu yana trombosit toplama odası daha da güçlendirilerek 76 dakikada yaklaşık $4,5 \times 10^{11}$ trombosit elde edilmesi sağlanmıştır. Ayrıca özel tasarlanmış bir odacıktada $7,4 \times 10^6$ lökosit toplanabilir hale getirilmiştir(33). Yine Baxter'in geliştirdiği "Autopheresis C System" denilen 2 aşamalı ve tek iğne kullanılan trombosit toplama sistemiyle de $3,5 \times 10^{11}$ trombosit elde edilebilmektedir(34).

Fresenius (Almanya) firmasının geliştirdiği AS 104 separatöründe kapalı bir döngü ve bilgisayar programı kullanır. Dört pompası (antikoagülan, tam kan, plazma

ve toplama), giriş ve dönüş kanı basınç sensörleri ve hava dedektörü vardır. Antikoagülan damla monitörü, çalışma sonuçlarının çıktısını veren küçük printer ve kan pompasının yedek bataryası bulunması gibi avantajları vardır. Boyutlarının büyük olması dezavantajıdır(25,35).

2.2.4. Tromboferez donörü

Transfüzyon tıbbında önemli olan kritik 4 maddeden (güvenlik, kalite, yasal düzenlemeler ve maliyet) güvenlik ve kalite tek donör aferezi ile karşılanmaktadır.

Tromboferez donörü, tam kan donöründe aranan tüm kriterlere uymalıdır. İşlemden önce donör, aferezin kısa ve uzun dönem etkileri hakkında bilgilendirilmeli ve yazılı izni alınmalıdır. Tromboferez donörü olarak ilk hedeflenen grup gönüllü ve sürekli tam kan donörleridir. Ancak hastaların aile üyeleri ve arkadaşları da gereksinim olduğu sürece donasyona motive edilebilir.

1. Rutin donör sorgulaması ve fizik muayenesi yapılmalıdır. Yapılacak işlemler hakkında yazılı bilgi de verilmeli ve riskler hakkında aydınlatılmalıdır. Donörlerin daha önceki donasyon bilgileri ve varsa reddedilme nedenlerine ulaşılabilecek bilgi bankası (bilgisayarlı kayıt sistemi) bulunması idealdir.
2. Serolojik tarama testleri, sık aralıklarla bağış yapan donörler için 30 gün (Amerikan Kan Bankaları Birliği-AABB veya Food and Drug Administration-FDA) aralıklarla yapılabildiği gibi her donasyonda testleri tekrarlayan merkezler de vardır(22).
3. Tromboferezde donasyon aralığı en az 48 saat olmalıdır. Bir haftada ikiden fazla, bir yılda 24'den fazla donasyon olmamalıdır. Belirli bir hasta için bağış yapan aferez donörü kan sayımı ve fizik muayenesi uygunsa 30 güne kadar daha sık afereze girebilir. Ancak haftada 25 ml'den daha fazla eritrosit kaybı olmamalıdır. Aferez sırasında donör eritrositleri geri verilememişse veya donör tam kan bağışlamışsa interval 8 haftaya çıkarılmalıdır(25). Minimal ekstra-korporeal volüm kullanan sistemlerde (CS3000 ve COBE-Spectra) tam kan donasyonundan sonra bekleme gerek olmayabilir. Ancak Haemonetics sistemi kullanılmışsa 8 hafta beklemek gerekir.
4. Bir aferez işlemi sırasında ekstra-korporeal kan volümü, donörün total kan volümünün % 15'ini geçmemelidir. Total kan volümü donörün boy ve kilosundan

hesaplanır. Tam kan donörü için gerekli olan minimum 50 kilo sınırı aferez donörü için gerekli değildir. Ancak her kan merkezinde bu konuda yazılı prosedürler olmalıdır.

5. Her aferez donasyonunda tam kan sayımı gerekmemekle beraber, son aferez bağışından sonra 4 haftadan az zaman geçmişse trombosit sayısının en az 150.000/mL olması gerekir. Yine de modern aferez cihazlarında donörden alınabilecek trombosit miktarını hesaplamada son trombosit sayısı gerekli olduğundan sayım yapmak faydalı olabilir(25).

6. Üründeki eritrosit miktarı 2 ml (FDA) veya 5 ml (AABB) üzerinde değilse trombosit transfüzyonundan önce uygunluk testi gerekli değildir. Yenidoğanlarda ise donör plazması ile hasta eritrositlerinin ABO uyumlu olması önerilir(22).

7. Tromboferez donörü son üç gün içinde aspirin ve benzeri etkide bulunan ilaçları kullanmamış olmalıdır(22,25).

2.2.5. Trombosit süspansiyonlarının özellikleri

AABB standartlarına göre bir tromboferez komponentinin en az % 90'ında 3.0×10^{11} veya daha fazla trombosit olması gerekir(22). Bu miktar, donörün trombosit sayısı kadar hematokrit düzeyi, boyu ve kilosu ile de yakın ilgilidir. Yüksek sayılara sahip donörlerden 6 veya 7×10^{11} trombosit elde edilerek bunu iki komponente bölmek mümkündür.

Eritrosit ve lökositlerle kros kontaminasyon; allo-immünizasyon, CMV bulaşı ve nonspesifik immün supresyonla ilgili olarak önemlidir(36, 37).

Tam kandan elde edilen 1 ünite trombosit konsantresi 70 kg.lık bir erişkinde transfüzyondan bir saat sonra trombosit sayısını 5.000-10.000/ml/m², 1 aferez ünitesi ise 30.000-60.000 /ml/m² kadar artırmalıdır. Hastanın transfüze edilen trombositte verdiği yanıt şu şekilde hesaplanır :

$$CCI = \frac{\text{Absolü trombosit artışı} \times \text{Vücut yüzey alanı (m}^2\text{)}}{\text{Transfüze edilen trombosit sayısı (x } 10^{11}\text{)}}$$

Absolü trombosit artışı= Transfüzyondan 1 saat sonraki trombosit sayısı –
Transfüzyondan önceki trombosit sayısı(x 10⁹)

CCI= “Corrected count increment”(düzeltilmiş sayı artışı)

CCI<5.000/µl/m² olması trombosit refrakterliğini gösterir(38,39). İmmün ya da non-immün nedenli olabilir. İlaçlar, sepsis, splenomegali ve alloantikorlar neden olabilir.

Tam kandan açık sistemle hazırlanan trombosit konsantrelerinin 24 saat içinde kullanılması gerekirken kapalı sistemle hazırlanan ürünler plastik, hava geçirgen torbalarda oda sıcaklığında (20-24°C) hafif ajitasyon altında 5 gün saklanabilir. Bu süre içerisinde ortamın pH'sı 6,8- 7,4 arasında kalmalıdır. (2, 27, 28, 40, 41).

Trombositler oda sıcaklığında saklanırken iki ana metabolik yolu kullanırlar :

- 1) Oksijen gerektirmeyen glikoliz,
- 2) Oksijen tüketen trikarboksilik asit (TCA) siklusu.

Glikolizde bir glukoz molekülü 2 laktik asit molekülüne çevrilir. Böylece üründeki laktik asit konsantrasyonu yaklaşık 2.5 mM/gün artar. Glukozdan ortaya çıkan az miktarda pirüvat, TCA siklusuna girer. Trombositlerde laktik asitin üretim hızı 1.0-1.5 mM/gün'dür. Aynı zamanda bu hücreler plazma serbest yağ asitlerini kullanarak oksijen tüketirler. Eğer hücrelerin oksijen gereksinimi karşılanamazsa glikolitik hız artar ve laktik asit birikir. Oksidatif metabolizmanın son ürünü CO₂ volatil olup plastik torbadan geçebilirken laktik asit geçemez ve sadece plazmadaki bikarbonat ile tampon olabilir. 20 mM'nin üzerindeki laktat konsantrasyonunda ürünün pH'ı 6.8'den 6.2'ye ve hatta daha fazla düşmeye başlar. Bu, trombositlerde şişme ve disk şeklinin küreye dönmesi, aglütinasyon ve lizis ile görülür. Bu nedenlerle saklama koşulları ve yeterli oksijen kaynağı trombosit canlılığıyla çok ilgilidir. Aksi halde laktik asit üretimi ve bikarbonat tüketimi ile pH düşer, trombositler canlılıklarını kaybeder. Plastik torba yüzeyi gaz geçirgenliğini sağlayacak ölçüde geniş olmalı ve içindeki trombosit miktarı O₂ miktarına göre ayarlanmış olmalıdır. Yapılan çalışmalar, ajitasyonun laktik asit üretimini azalttığını göstermiştir(2, 27, 41, 42).

2.2.6. Tromboferez yan etkileri

Tromboferez donörü ve alıcısında karşılaşılan reaksiyonlar tam kan donör ve alıcısında karşılaşılandan farklı ve fazla değildir.

2.2.6.1. Donör reaksiyonları

a-Bir ya da iki vende 1 saatten uzun süre büyük iğne varlığı nedeniyle venöz spazm, kollaps, infiltrasyon ve hematoma riski biraz daha artmıştır.

b-Birden fazla uygulanan venöz giriş, cilt temizliği iyi yapılmamışsa bakteri girişine neden olabilir. Vücut sıvılarının yer değiştirmesi ile yorgunluk, halsizlik ve kilo değişikliği olabilir.

c-Sitrat etkisi: Donöre geri verilen eritrosit ve plazması ile beraber giden sitrat, karaciğerde hızla metabolize edilse de infüzyon hızı metabolizma hızını geçerse, iyonize kalsiyum konsantrasyonunu % 25-35 oranında azaltarak nöromusküler hiperaktiviteye yol açar. Zayıf donörler daha yatkındır. Ağız çevresinde uyuşma-karıncalanma ile başlayan belirtiler, kas tonusunda artma, göğüste basınç hissi, titreme ve nadiren tetaniye kadar ilerleyebilir. EKG'de Q-T aralığı 0.08 saniye uzayabilir. Oral antiasit uygulanarak, reinfüzyon hızı azaltılıp ACD yerine bir miktar serum fizyolojik verilerek, donör ısıtılarak belirtiler ortadan kaldırılabilir veya azaltılabilir. Nadiren çok gerekli olursa kalsiyum glukonat enjeksiyonları yapılabilir(25,43).

d-Donör kan sayımında değişiklik: Tek aferez işlemi donörün trombositlerinin % 25-50'sini alır. Ancak işlemden hemen sonra alınan ölçümde dalağın aktivitesi ile çok az düşme görülür. Sayı, bazal düzeyine 4 gün sonra döner, 1-2 hafta sonra da geçer. Haftada iki defa yapılan donasyonlarda, 6-8 donasyon sonrasında sayı % 70, ürün miktarı da % 64 azalır. Daha sonra 10. donasyonda ilk düzeyine geri döner(44). Dalaktan boşaltım kısa süreli kompensasyondur. Belirgin trombositopeni nadirdir ve otoimmün trombositopenik purpura gibi altta yatan bir hastalık belirtisi olabilir.

e-Senkop: Aralıklı akım cihazlarında ekstra-korporeal kan volümünün fazlalığına bağlı olarak ve daha çok zayıf kişilerde görülen bir etkidir.

2.2.6.2. Hasta reaksiyonları

Ateş, titreme ve hipotansiyon gibi hemen ortaya çıkan etkiler lökosit ve sitokin kaynaklıdır, bunların dışında alloimmünizasyon, hastalık bulaşı, ürtiker gibi reaksiyonlar da görülür.

2.2.7. Trombosit süspansiyonlarının ışınlanması ve lökosit filtrasyonu

Trombosit süspansiyonlarının lökositlerden arındırılması ile alloimmunizasyonun önlenmesi hedeflenir. Ayrıca lökosit aracılıklı viral bulaşın engellenmesi de sağlanmış olur(36,37). Bu amaçla günümüzde en sık üçüncü kuşak filtreler kullanılmaktadır.

Kan bileşenleri içindeki lenfositlerin bölünerek çoğalmasına engel olabilecek en etkili yol ışınlamadır. Torbaların her yerine 25 Gy (513 saniye süreyle) olacak şekilde gamma irradyasyona maruz bırakılması bu amaç için yeterlidir (4). Uygulanan bu doz ile lenfositlerde DNA hasarı oluşmakta ve çoğalma yetenekleri kaybolmaktadır.

Lökosit filtresi kullanılarak transfüzyonla ilişkili GVHD gelişiminin önlenmesi rutinde kullanılan özel filtrelerle tam olarak sağlanamamaktadır. Bu nedenle riskli durumlarda ışınlama yapılması kaçınılmaz olmaktadır. Benzer şekilde, ışınlama ile lökositler yok edilemediği için ışınlanmış komponentlerde de lökosit filtrelerinin kullanılması gerekmektedir.

2.3. Oksidatif Stres Ve Serbest Radikaller

Anaerobik ortamlara uyum sağlamış organizmalar haricinde tüm canlılar yaşamlarını sürdürebilmek için oksijene gereksinim duyarlar. Canlıların enerji üretimi için çok gerekli olan oksijenin bazı türleri ise hücresel düzeyde son derece toksik etki gösterirler. Genel olarak reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılan bu grup moleküllerin önemli bir kısmını serbest radikaller oluşturur. Her oksijen atomunun eşleşmemiş bir elektronu, oksijen molekülünün (O_2) ise eşleşmemiş iki elektronu vardır. Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan moleküllerdir, çok kararsız ve kısa ömürlüdürler(45). Atomik oksijen bir serbest radikal olarak tanımlandığı halde, O_2 (serbest) bi-radikal olarak adlandırılır.

Organizmada oluşan serbest radikaller çevrelerinden elektron alma yönünde hareket ederler, radikal olmayan bileşiklerle etkileşerek yeni radikaller oluştururlar. Bu moleküller hem normal metabolizmanın yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarının yan ürünleri olarak hem de ilaçlar ve diğer zararlı kimyasal maddelerin etkisiyle oluşabilmektedirler. Aerobik organizmalarda oksijen kaynaklı serbest radikallerin oluşumu diğer serbest radikallerden çok daha fazla olmaktadır. Zira solunum zincirinde elektronlar oksijen molekülüne birer birer taşınmakta ve reaktif oksijen türleri ortaya çıkmaktadır(46). Aerobik yaşamda sıklıkla ortaya çıkan bu ürünler oksijen toksisitesine neden olmaktadır(47,48).

ROT'lerinin yanısıra reaktif azot türleri (RAT) olarak adlandırılacak ve merkezinde azot bulunan radikal veya nonradikal bileşikler de mevcuttur. Örneğin soluduğumuz havanın en büyük kısmını oluşturan azot da önemli bir radikal kaynağıdır(49). Tablo-3.1'de reaktif azot ve oksijen türleri topluca gösterilmektedir.

Reaktif Oksijen Türleri (ROT)		Reaktif Azot Türleri (RAT)	
Radikaller	Non-radikaller	Radikaller	Non-radikaller
Süperoksit,	Hidrojen peroksit	Nitrik oksit	Nitröz asit
Hidroksil	Hipoklorik asit	Nitrojen dioksit	Dinitrojen trioksit
Peroksil	Ozon		Dinitrojen tetroksit
Alkoksil	Singlet oksijen		Peroksinitrit
Hidroperoksil	Lipit peroksit		Alkoksilperoksinitrit

Tablo 3.1. Reaktif oksijen ve azot türleri

2.3.1. Bazı önemli ROT ve RAT'lar

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Moleküler oksijene bir elektron eklenmesiyle oluşan süperoksit radikali, mitokondrial elektron transport zincirinde oluşan radikal türevlerinin en önemlisidir. Günlük alınan oksijenin %1-2'si süperoksit radikaline dönüşmektedir. Nötrofil, monosit ve makrofajlarda NADPH oksidaz enzim sistemiyle de oluşmaktadır. Bununla birlikte iskemi-reperfüzyon hasarlarında aktiflenen ksantinoksidaz enzimi

aracılığı ile ve çeşitli endojen biomoleküllerin oksidasyonu sonucunda da süperoksit radikali oluşabilmektedir(45,46,47).

Singlet Oksijen (1O_2)

Moleküler oksijen büyük miktarda elektromanyetik enerji absorbladığında meydana gelmektedir.Bu nedenle doğada, bitki biyokimyasında, deri ve gözün oksidan reaksiyonlarında büyük miktarlarda oluşmaktadır(45,47).

Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

En önemli ara türlerden olup oksidasyon reaksiyonları ile veya süperoksidin dismutasyonu ile oluşmaktadır, pekçok biyolojik molekül için önemli bir oksidandır ancak eşleşmemiş elektronu olmadığı için bir radikal değildir. Süperoksit radikalin aksine biyolojik membranlardan kolaylıkla geçer ancak hasar potansiyeli düşüktür. Geçiş metalleriyle reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşumunu sağlar(45,46,47).

Hidroksil Radikali ($\cdot OH$)

Su molekülü yüksek enerjili iyonize radyasyona maruz bırakıldığında oldukça reaktif bir molekül olan hidroksil radikali oluşmaktadır. Hidrojen peroksit'in metal aracılı parçalanması sonucu da açığa çıkmaktadır. ROT'leri arasında en reaktifi olup proteinlerin, lipidlerin, karbonhidratların, DNA ve RNA moleküllerinin oksidasyonuna doğrudan neden olabilmektedir(45,46).

Nitrik oksid ($NO\cdot$)

Organizmada birbirinden farklı fizyolojik olaylarda rol oynayan, gaz yapısında önemli biyolojik mesajcı moleküldür(50). Endotel hücrelerinden salınarak damar vazodilatasyonuna, düz kas hücrelerinde gevşemeye, trombosit agregasyonunun inhibisyonuna, makrofajlarda sitotoksik aktiviteye neden olmakta, santral ve periferik sinir sisteminde nörotransmitter olarak görev yapmaktadır. Lipofilik peroksil radikalleriyle reaksiyona girerek lipit peroksidasyonuna da neden olur(49).

Peroksinitrit (ONOO⁻)

Nitrik oksit ve süperoksit radikallerinin 1:1 oranında bulunması halinde çok hızlı olarak meydana gelir. Demir- sülfür merkezli enzimleri inhibe ederek, mitokondrial elektron transport zincirini bloke etmektedir. Ortamda bulunan hidrojen iyonu ile etkileşerek hidroksil radikali oluşumuna neden olur. Ayrıca hücre zarında lipit peroksidasyonunu indüklediği de bilinmektedir(49,50).

2.3.2. Serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarı

Serbest radikaller hücrelerin lipit, protein, nükleik asitler(DNA) ve karbonhidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler(51,52). Bu etkilerden ilki hücre membranında gözlenir. Hücre zarında bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipit peroksidasyonu olarak bilinir, çok zararlıdır ve geri dönüşümsüzdür (45, 51, 52).

Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenmesi ise amino asit kompozisyonuna bağımlılık gösterir. Doymamış bağ veya sülfür içeren amino asitler serbest radikaller için önemli birer hedef oluşturarak sülfür ve karbon merkezli radikallerin oluşumuna neden olurlar. Özellikle hem proteinleri serbest radikaller için önemli birer hedeftir (45, 51).

İyonize edici radyasyon ile oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açar. Bunlardan hidroksil radikali, nükleik asit baz modifikasyonlarına ve şekerlerde (riboz ve deoksiriboz) değişikliklere yol açar (53). Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucunda hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı çeşitli hastalıkların patolojisinde önemli rol oynarlar (45, 51).

2.3.3. Serbest oksijen ve azot türlerinin trombositler üzerindeki etkileri

Trombositlerin süperoksit radikalleri üretebildiğini ilk kez 1977'de Marcus ve arkadaşları bildirmiştir(54). Bu çalışmada trombositlerce üretilen süperoksitlerin miktarı trombin ve kollajen gibi ajanlarla agregasyondan sonra artmamış sabit

kalmıştı. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda trombositlerin aynı zamanda trombin, kollajen, araşidonik asit, latex partikülleri veya zymosan gibi ajanlarla stimölasyonu ile H₂O₂ üretebildiği gösterilmiştir(55). Ancak bu mekanizmanın enzimatik yolları tam olarak bilinmemektedir. Trombositlerdeki potansiyel serbest radikal kaynakları içinde en önemli mekanizma NADH/ NADPH oksidaz sistemi gibi görünüyor. Zira NADPH- Sitokrom C redüktaz enzim aktivitesi trombositlerde mevcuttur ve onun inhibitörü difenilen iyodonyum (DPI) platelet agregasyonu ile suprese edilir. Bir başka serbest oksijen radikali kaynağı da ksantinoksidazdır. Hem vasküler hücrelerde hem de trombositlerde özellikle unstabil angina gibi durumlarda aktivitesi artmış olarak bulunur. Oksijen radikallerinin oluşumu trombosit agregasyonu için önemlidir. Gerçekten de katalaz yardımı ile H₂O₂'in sitozolik konsantrasyonunun azalması durumunda kollajenle oluşan trombosit agregasyonu inhibe olur. Bundan başka yukarıda sözü edilen DPI (NADPH-oksidad inhibitörü) oksijen radikallerinin oluşumunu önleyerek trombin ve ADP ile oluşan trombosit agregasyonunu azaltır. Oksijen radikallerini üretimi trombosit aktivasyonunun başlangıç fazlarında da önemli gibi görünüyor. Özellikle anoksia-reoksijenasyon mekanizması denilen bir yolla serbest oksijen radikalleri trombosit agregasyonunu başlatabilir(56, 57).

Oksijen radikallerinin yanısıra serbest azot türlerinin de trombosit fonksiyonlarında önemli bir yeri vardır. Öyle ki nitrik oksitin (NO) pek çok özelliği arasında ilk keşfedilenlerden biri trombositlerin trombin ve kollajen gibi fizyolojik agonistlerce aktivasyonunun inhibisyonudur(58). Artık kanıtlanmıştır ki trombositlerdeki proteinler dışarıdan peroksinitrit ilave edilmeksizin spontan olarak da azotlanabilmektedir. Proteinlerin bu azotlanması (nitrasyonu) kollajenle trombosit aktivasyonu gibi normal fizyolojik işlemlerle stimüle olabilmektedir. Ayrıca kandan hücrelerin izolasyonu gibi işlemler esnasında trombositler üzerindeki mekanik stresler de geçici bir nitrasyonu neden olabilmektedir. NO trombositlerin hem agregasyonunu hem adezyonunu inhibe eder(5). Görölmektedir ki nitrasyon çok muhtemelen platelet aktivasyon mekanizmalarının aktivitesini sınırlayıcı bir role sahiptir. Bundan dolayı hücreler uzun süre stres altında kalmadığı müddetçe nitrasyon reversible koruyucu bir mekanizmadır. Fakat patolojik hallerde aşırı nitrasyon proteolizis artışına yol açarak denatürasyona yol açabilir. Ayrıca

peroksinitrit gibi azot türleri tirozin fosforilasyonunu da etkileyerek sinyal iletiminde de sorunlara yol açabilmektedir. NO' trombosit inhibisyonu üzerinde H₂O₂ ile sinerjistik etki gösterir(5).



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Donör Seçimi

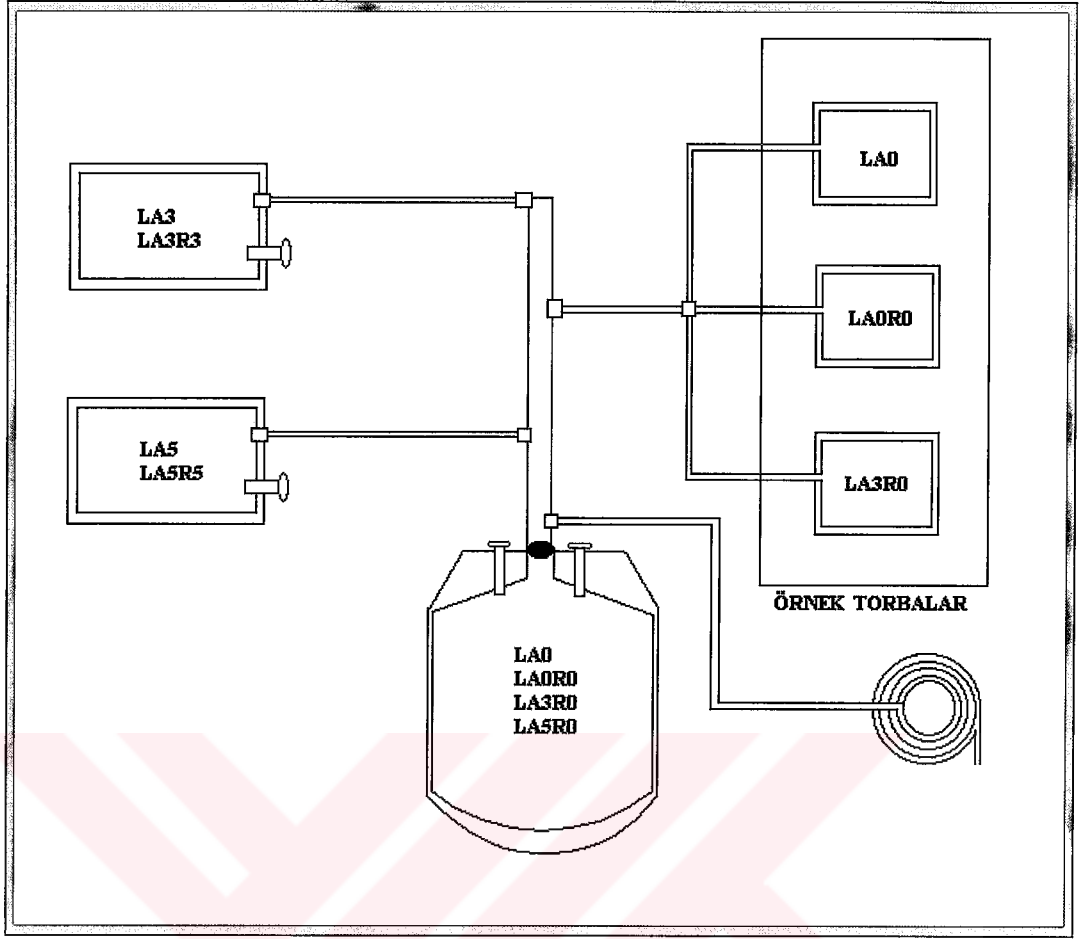
Bu çalışma 2002-2003 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Hastanesi kan merkezi, hematoloji-immunoloji ve biyokimya laboratuvarında 18 donörden elde edilen trombosit süspansiyonlarından alınan örneklerden yapıldı. Bunun için donörlere çalışma ile ilgili bilgi verilip, yazılı izinleri alındı.

3.2. Trombosit Süspansiyonlarından Örneklerin Hazırlanması

Tedavi görmekte olan hastalar için hazırlanan “tek donörden aferez” yoluyla toplanılmış trombosit süspansiyonlarından yaklaşık 80ml’si özel dizayn edilmiş saklamaya elverişli altılı torba sistemleri içinde saklanarak çalışmamız ve aynı anda planlanmış olan farklı parametrelerin araştırıldığı diğer bir çalışma gerçekleştirildi.

Trombosit aferez işlemi uygulanan donörlerden sorgulama formları dolduruldu; kan alınması için riskli kabul edilen kişiler donör olarak kullanılmadı. Son 3 gün içinde aspirin kullanmamış olmasına dikkat edildi. Fizik muayeneleri yapılarak tam kan sayımlarına bakıldı. Trombosit sayısı 150.000’in üstünde olan ve damar yolu uygun kişiler donör olarak seçildi. Serolojik tarama testlerine bakıldı ve düzenli donörlerde 15 günde bir tekrarlandı. Aferez işlemi sırasında ekstra-korporeal kan hacminin donörün total kan hacminin %15’ini geçmemesine dikkat edildi. Uygun donörlerden aferez uygulaması Baxter CS 3000+ (ABD)’de gerçekleştirildi. Tromboferez sonucunda hedef 200-400 ml plazma içinde $3.0-6.0 \times 10^{11}$ kadar trombosit toplanmaya çalışıldı. Elde edilen üründen yaklaşık 80 ml’si ayrılıp kalan miktarı ihtiyacı olduğunda hastaya kullanmak üzere 22°C de ajitatörde saklandı.

Ayrılan 80 ml trombosit süspansiyonunun 40 ml’si filtre edilmeden, bizim dizayn ettiğimiz ve trombositlerin 5 gün saklanmasına elverişli altılı torbanın ana torbasına (Şekil 3.1) Teruma Sterile Tubing (Welder SC-201 AH, Belçika) isimli bağlantı aleti (*connecting devise*) kullanılarak aktarıldı(**Lökositten zengin-LZ**). Geri kalan 40 ml’si ise yine aynı yöntemle sisteme lökosit filtresi (Imugard III-PL, Belçika) eklenerek filtre edilmek suretiyle diğer bir altılı torbanın ana torbasına aktarıldı (**Lökositten arındırılmış-LA**). Her iki üründen Coulter AC T 10(UK) ile lökosit sayısına ve trombosit sayısına bakıldı.



Şekil 3.1 Trombositlerin beş gün saklanmasına elverişli 3 torba ve sisteme dahil 3 küçük örnek torbasından oluşan özel dizayn edilen altılı torba sistemi (LA'lar için örnektir).

Lökosit zengin, 0.gün; **LZ0**

Lökosit arındırılmış, 0.gün; **LA0**

Lökosit zengin, 0. gün iradiye edilmiş; **LZ0R0**

Lökosit arındırılmış ve 0. gün iradiye edilmiş; **LA0R0**

Lökosit zengin, 3 gün saklanmış, 0. gün iradiye edilmiş; **LZ3R0**

Lökosit arındırılarak 3 gün saklanmış ve 0. gün iradiye edilmiş; **LA3R0**

Lökosit zengin, 3 gün saklanmış; **LZ3**

Lökosit arındırılarak 3 gün saklanmış; **LA3**

Lökosit zengin, 3 gün saklanmış ve 3. gün iradiye edilmiş; **LZ3R3**

Lökosit arındırılarak 3 gün saklanmış ve 3. gün iradiye edilmiş; **LA3R3**

Lökosit zengin, 5 gün saklanmış, 0. gün iradiye edilmiş; **LZ5R0**

Lökosit arındırılarak 5 gün saklanmış, 0. gün iradiye edilmiş; **LA5R0**

Lökosit zengin, 5 gün saklanmış; **LZ5**

Lökosit arındırılarak 5 gün saklanmış; **LA5**

Lökosit zengin, 5 gün saklanmış ve 5. gün iradiye edilmiş; **LZ5R5**

Lökosit arındırılarak 5 gün saklanmış ve 5. gün iradiye edilmiş; **LA5R5**

LA ve LZ her iki aferez trombosit süspansiyonundan her iki 6'lı torbanın 5 gün saklamaya uygun olan 2 torbasına 10'ar ml aktarıldı ve bu torbalar 3. ve 5. günlerde çalışılmak üzere sistemden ayrılarak ajitatöre konuldu. LA ve LZ her iki altılı torba sisteminin ana torbalarında kalan 20 ml'lik örneklerden 0. gün ışınlama yapılmadan önce 5'er ml örnek kapalı sistemde küçük örnek torbalarından birine aktarıldı ve çalışılmak üzere sistemden ayrıldı (**LZ0, LA0**). Ana torbalarda kalan 15 ml örnek 0.gün 2500 rad olacak şekilde ışınlandı (Cis-Biointernational IBL 437 C Fransa). Daha sonra 0. gün ışınlanmış bu örneklerden 5'er ml alınıp kapalı sistemle diğer bir küçük örnek torbasına aktarılarak sistemden ayrılarak çalışıldı (**LZ0R0, LA0R0**).

Sistemden ayrılan LA ve LZ 10'ar ml örnek bulunan ikişer torba ve 0. gün ışınlanan ve geriye 10ml örnek kalan LA ve LZ her iki ana torba Helmer ajitator cihazında 22 C° de saklandı ve saklamanın 3. gününde ana torbalardan 5 ml'si sisteme bağlı sonuncu küçük örnek torbasına aktarılarak çalışılmak üzere sistemden ayrıldı (**LZ3R0, LA3R0**). Saklanan 10'ar ml örnek bulunan torbalardan; 3. gün ışınlama yapılmadan önce 5'er ml'si (**LZ3, LA3**), ışınlama yapıldıktan sonrada kalan 5'er ml'si ayrılarak çalışmalarda kullanıldı (**LZ3R3, LA3R3**).

Saklamanın 5. günü; 0.gün ışınlanan ana torbalardaki son 5'er ml (**LZ5R0, LA5R0**) ve ışınlanmadan saklanan torbalardan önce 5'er ml ayrılıp (**LZ5, LA5**), sonrada kalan 5'er ml ışınlanarak (**LZ5R5, LA5R5**) çalışmalarda kullanılmak üzere hazırlandı. Alınan her bir örnekten bizim çalışmamızda kullanılmak üzere 2'şer ml ayrılarak hazırlandı.

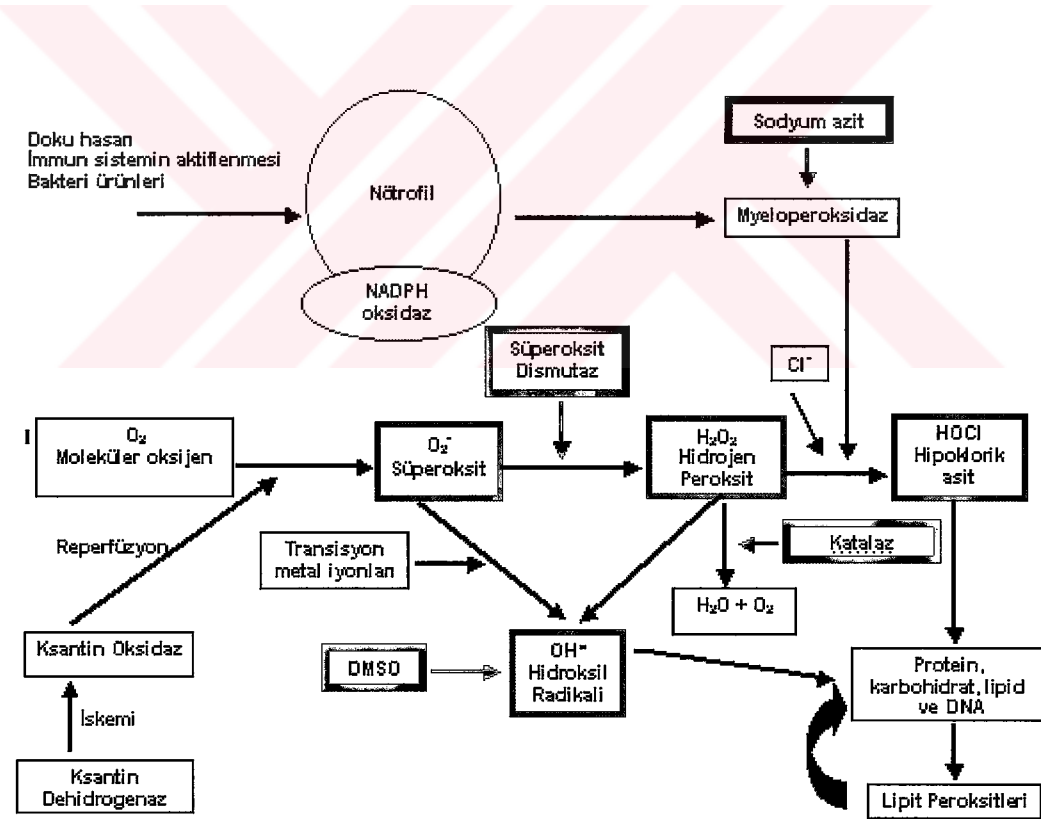
Tüm bu işlemlerden sonra toplam 18 donörden toplanan tek donör aferez trombositlerinin her birinde 0.gün **LZ0, LA0, LZ0R0, LA0R0** olmak üzere 4 örnek, 3. gün **LZ3R0, LA3R0, LZ3, LA3, LZ3R3, LA3R3** olmak üzere 6 örnek, 5. gün **LZ5R0, LA5R0, LZ5, LA5, LZ5R5, LA5R5** olmak üzere 6 örnek; toplam 16 örnek çalışıldı.

3.3. Kemilüminesans Ölçümleri

Kemilüminesans, kimyasal kaynaklardan ışık oluşumudur. Serbest radikallerin kemilüminesans oluşturdukları bilinmektedir. Çok düşük düzeydeki ışık oluşumunun verimini artırmak için luminol ve lusigenin gibi artırıcılar kullanılmaktadır. Luminol

hidroksil, peroksinitrit, hidrojen peroksit, lipid hidroperoksit ve hipoklorit gibi radikallere, lusigenin ise özellikle superoksit radikaline özgülüdür. Ölçümler luminometrelerde veya sıvı sintilasyon sayacında “single photon count” modunda yapılır.

Luminometreler kemiluminesans ölçümleri için geliştirilmiş cihazlardır. Luminometre fotonların ölçülmesinde daha fazla hassasiyet göstermekte olup özellikle dışarıdan gelebilecek ışık etkisinden tamamen korunmuştur. Ayrıca sıvı sintilasyon sayacında ölçülemeyecek kadar yüksek kemiluminesans ölçümlerinin yapılabilmesi için özel foto tüpler içermektedir. Sıvı sintilasyon sayaçlarıyla karşılaştırıldığında sıcaklığın ayarlanması daha geniş dalga boyu spektrumu, sessiz ve karanlıkta çalışması özellikleri nedeniyle tercih edilen bir cihazdır. Luminometrede sonuçlar rölatif ışık birimi (**relative light unit- rlu**) şeklinde ifade edilmektedir(60).



Şekil 3.2. Kemilüminesans ölçüm sistemi ile saptanan reaktif oksijen türleri ve kullanılan inhibitörler

Luminol aracılı kemiluminesans ile ölçülen serbest radikallerin identifikasyonu için çeşitli ayraçlardan faydalanıldı. Bu amaçla şekil 3.1'deki reaksiyonları inhibe eden veya tutan bileşikler kullanıldı. Sodyum azid (10mM) myeloperoksidaz aracılı hipoklorit asiti inhibe etmek için; DMSO %5 hidroksil radikalini saptamak için; katalaz(3000Ü/mL) H₂O₂ oranını saptamak için kullanıldı(61). Sonuçlar luminol kemiluminesansındaki değişimlere oranlanarak hesaplandı.

3.3.1. Ayraçların hazırlanması

0,2 mM luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindion): 17,7mg/mL olacak şekilde DMSO içinde çözüldü.

0,2 mM lusigenin (bis-N-metilakridinyum nitrat): 51,1 mg/mL olacak şekilde DMSO içinde çözüldü.

Bütün trombosit süspansiyonlarından işlemin yapıldığı gün (0.gün) ve takip eden 3. ve 5. günlerde örnekler alınarak serbest radikal düzeyleri kemiluminesans yöntemiyle ölçüldü.

Aferez ile elde edilmiş trombosit örnekleri (50µL) 2mL PBS + HEPES tamponu içeren sayım tüplerine aktarıldı. Kemiluminesans ölçümleri luminol ve lusigenin probları kullanılarak yapıldı. Luminol (0,2mM) ve lusigenin (0,2mM) probları eklenen sayım tüpleri luminometrede (EG & G Berthold Mini Lumat LB 9506, Almanya) bir dakika süreyle sayıldı. Sayımlar trombosit sayılarına göre düzeltilerek kullanıldı ve $rlu \times 10^{-3}$ / trombosit olarak ifade edildi. Sonuçlar ortalama \pm SD olarak gösterildi. Instat programında tek yönlü ANOVA ile student t luminol (0,2mmol) ve lusigenin (0,2mmol) testi yapılarak değerlendirildi ve $p < 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Lökositten zengin(LZ) ve lökositten arındırılmış(LA) trombosit süspansiyonlarının bekleme süreleri ve irradiye edilip edilmemeleri göz önüne alınarak luminol ve lusigenin problemleriyle elde edilen **rlu** değerleri tablo 4.1 ve 4.2’de verilmiştir.

Trombosit örnekleri	rlu x 10⁻³ / trombosit (Mean ± SD)	P değeri
LZ0 – LZ0R0	30,279 ± 17,455 vs 26,916 ± 13,886	NS
LZ0- LZ3	30,279 ± 17,455 vs 25,016 ± 12,015	NS
LZ0- LZ5	30,279 ± 17,455 vs 31,191 ± 12,256	NS
LZ3- LZ3R0	25,016 ± 12,015 vs 22,525 ± 7,362	NS
LZ3- LZ3R3	25,016 ± 12,015 vs 24,350 ± 7,958	NS
LZ5- LZ5R0	31,191 ± 12,256 vs 30,957 ± 14,139	NS
LZ5- LZ5R5	31,191 ± 12,256 vs 31,807 ± 17,118	NS
LA0- LA0R0	38,200 ± 16,465 vs 42,530 ± 22,673	NS
LA0- LA3	38,200 ± 16,465 vs 43,625 ± 14,052	NS
LA0- LA5	38,200 ± 16,465 vs 29,487 ± 11,967	NS
LA3- LA3R0	43,625 ± 14,052 vs 37,837 ± 11,721	NS
LA3- LA3R3	43,625 ± 14,052 vs 38,062 ± 8,809	NS
LA5- LA5R0	29,487 ± 11,967 vs 29,912 ± 12,797	NS
LA5- LA5R5	29,487 ± 11,967 vs 30,237 ± 11,377	NS

Tablo 4.1. 0., 3. ve 5. günlerdeki lökositten zengin(LZ), lökositten arındırılmış(LA) ve irradiye edilmiş trombosit örneklerinin luminol probu ile elde edilen kemilüminesans değerleri.

Trombosit örnekleri	rlu x 10⁻³ / trombosit (Mean ± SD)	P değeri
LZ0- LA0	30,279 ± 17,455 vs 38,200 ± 16,465	NS
LZ0R0- LA0R0	26,916 ± 13,886 vs 42,530 ± 22,673	p<0,05
LZ3- LA3	25,016 ± 12,015 vs 43,625 ± 14,052	p<0,01
LZ3R0- LA3R0	22,525 ± 7,362 vs 37,837 ± 11,721	p<0,001
LZ3R3- LA3R3	24,350 ± 7,958 vs 38,062 ± 8,809	p<0,001
LZ5- LA5	31,191 ± 12,256 vs 29,487 ± 11,967	NS
LZ5R0- LA5R0	30,957 ± 14,139 vs 29,412 ± 12,797	NS
LZ5R5- LA5R5	31,807 ± 17,118 vs 30,237 ± 11,377	NS
LZ0R0- LZ3R0	26,916 ± 13,886 vs 22,525 ± 7,362	NS
LZ0R0- LZ3R3	26,916 ± 13,886 vs 24,350 ± 7,958	NS
LZ0R0- LZ5R0	26,916 ± 13,886 vs 30,957 ± 14,139	NS
LZ0R0- LZ5R5	26,916 ± 13,886 vs 31,807 ± 17,118	NS
LZ3R0- LZ3R3	22,525 ± 7,362 vs 24,350 ± 7,958	NS
LZ3R0- LZ5R0	22,525 ± 7,362 vs 30,957 ± 14,139	p<0,05
LZ3R0- LZ5R5	22,525 ± 7,362 vs 31,807 ± 17,118	p<0,05
LZ3R3- LZ5R0	22,525 ± 7,362 vs 30,957 ± 14,139	p<0,05
LZ3R3- LZ5R5	22,525 ± 7,362 vs 31,807 ± 17,118	p<0,05
LZ5R0- LZ5R5	26,916 ± 13,886 vs 31,807 ± 17,118	NS
LA0R0- LA3R0	42,530 ± 22,673 vs 37,837 ± 11,721	NS
LA0R0- LA3R3	42,530 ± 22,673 vs 38,062 ± 8,803	NS
LA0R0- LA5R0	42,530 ± 22,673 vs 29,412 ± 12,797	NS
LA0R0- LA5R5	42,530 ± 22,673 vs 30,237 ± 11,377	NS
LA3R0- LA3R3	37,837 ± 11,721 vs 38,062 ± 8,803	NS
LA3R0- LA5R0	37,837 ± 11,721 vs 29,412 ± 12,797	NS
LA3R0- LA5R5	37,837 ± 11,721 vs 30,237 ± 11,377	NS
LA3R3- LA5R0	38,062 ± 8,803 vs 29,412 ± 12,797	NS
LA3R3- LA5R5	38,062 ± 8,803 vs 30,237 ± 11,377	NS
LA5R0- LA5R5	29,412 ± 12,797 vs 30,237 ± 11,377	NS

Tablo4.1'in devamı

Trombosit örnekleri	rlu x 10⁻³ / trombosit (Mean ± SD)	P değeri
LZ0 – LZ0R0	18,716 ± 6,028 vs 18,754 ± 6,584	NS
LZ0- LZ3	18,716 ± 6,028 vs 16,529 ± 6,660	NS
LZ0- LZ5	18,716 ± 6,028 vs 24,081 ± 8,449	p<0,05
LZ3- LZ3R0	16,529 ± 6,660 vs 16,095 ± 6,571	NS
LZ3- LZ3R3	16,529 ± 6,660 vs 18,563 ± 9,002	NS
LZ5- LZ5R0	24,081 ± 8,449 vs 21,831 ± 8,696	NS
LZ5- LZ5R5	24,081 ± 8,449 vs 22,372 ± 7,208	NS
LA0- LA0R0	24,625 ± 13,676 vs 30,125 ± 14,238	NS
LA0- LA3	24,625 ± 13,676 vs 28,762 ± 9,968	NS
LA0- LA5	24,625 ± 13,676 vs 30,212 ± 10,263	NS
LA3- LA3R0	28,762 ± 9,968 vs 28,575 ± 7,176	NS
LA3- LA3R3	28,762 ± 9,968 vs 28,475 ± 7,600	NS
LA5- LA5R0	30,212 ± 10,263 vs 34,412 ± 13,588	NS
LA5- LA5R5	30,212 ± 10,263 vs 32,212 ± 9,393	NS
LZ0- LA0	18,716 ± 6,028 vs 24,625 ± 13,676	p<0,05
LZ0R0- LA0R0	18,754 ± 6,584 vs 30,125 ± 14,238	p<0,001
LZ3- LA3	16,529 ± 6,660 vs 28,762 ± 9,968	p<0,001
LZ3R0- LA3R0	16,095 ± 6,571 vs 28,575 ± 7,176	p<0,001
LZ3R3- LA3R3	18,563 ± 9,002 vs 28,475 ± 7,600	p<0,001
LZ5- LA5	24,081 ± 8,449 vs 30,212 ± 10,263	NS
LZ5R0- LA5R0	21,831 ± 8,696 vs 34,412 ± 13,588	p<0,01
LZ5R5- LA5R5	22,372 ± 7,208 vs 32,212 ± 9,393	p<0,01

Tablo 4.2. 0., 3. ve 5. günlerdeki lökosit zengin(LZ), lökosit arındırılmış(LA) ve irradiye edilmiş trombosit örneklerinin lusigenin probu ile elde edilen kemilüminesans değerleri.

Trombosit örnekleri	rlu x 10³ / trombosit (Mean ± SD)	P değeri
LZ0R0- LZ3R0	18,754 ± 6,584 vs 16,095 ± 6,571	NS
LZ0R0- LZ3R3	18,754 ± 6,584 vs 18,563 ± 9,002	NS
LZ0R0- LZ5R0	18,754 ± 6,584 vs 21,831 ± 8,696	NS
LZ0R0- LZ5R5	18,754 ± 6,584 vs 22,372 ± 7,208	p<0,05
LZ3R0- LZ3R3	16,095 ± 6,571 vs 18,563 ± 9,002	NS
LZ3R0- LZ5R0	16,095 ± 6,571 vs 21,831 ± 8,696	p<0,05
LZ3R0- LZ5R5	16,095 ± 6,571 vs 22,372 ± 7,208	p<0,01
LZ3R3- LZ5R0	18,563 ± 9,002 vs 21,831 ± 8,696	NS
LZ3R3- LZ5R5	18,563 ± 9,002 vs 22,372 ± 7,208	NS
LZ5R0- LZ5R5	21,831 ± 8,696 vs 22,372 ± 7,208	NS
LA0R0- LA3R0	30,125 ± 14,238 vs 28,575 ± 7,176	NS
LA0R0- LA3R3	30,125 ± 14,238 vs 28,475 ± 7,600	NS
LA0R0- LA5R0	30,125 ± 14,238 vs 34,412 ± 13,588	NS
LA0R0- LA5R5	30,125 ± 14,238 vs 32,212 ± 9,393	NS
LA3R0- LA3R3	28,575 ± 7,176 vs 28,475 ± 7,600	NS
LA3R0- LA5R0	28,575 ± 7,176 vs 34,412 ± 13,588	NS
LA3R0- LA5R5	28,575 ± 7,176 vs 32,212 ± 9,393	NS
LA3R3- LA5R0	28,475 ± 7,600 vs 34,412 ± 13,588	NS
LA3R3- LA5R5	28,475 ± 7,600 vs 32,212 ± 9,393	NS
LA5R0- LA5R5	34,412 ± 13,588 vs 32,212 ± 9,393	NS

Tablo 4.2.'nin devamı

Şekil 4.1 ve 4.2'de lökositten zengin ve lökositten arındırılmış trombosit süspansiyonlarında luminol ve lusigenin problemleriyle elde edilen kemilüminesans sonuçları grafik olarak gösterilmiştir.

Şekil 4.3 ve 4.4'de ise gamma irradyasyonun trombosit luminol ve lusigenin kemilüminesansı üzerine olan etkilerini gösteren grafikler verilmiştir.

Bu çalışmanın sonucunda tablo 4.1 ve 4.2'den de anlaşılacağı üzere lökositten zengin ve irradiye edilmemiş trombosit süspansiyonlarında (LZ0-LZ3, LZ0-LZ5) 0. gün ile 3. gün arasında kemilüminesans değerleri fark göstermezken 5.gün lusigenin değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır($p<0,05$).

Lökositten arındırılan ve irradiye edilmemiş trombosit süspansiyonlarında ise(LA0-LA3, LA0-LA5) 0., 3. ve 5. günler arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Lökositten zengin ve arındırılmış irradiye edilmemiş trombosit süspansiyonları arasında ise (LZ0-LA0, LZ3-LA3, LZ5-LA5) 0.günde sadece lusigenin kemilüminensansında lökositten arındırılmış süspansiyon lehine anlamlı bir artış saptanırken, 3.günde hem luminol($p<0,01$) hem de lusigenin($p<0,001$) kemilüminensansında yine lökositten arındırılmış süspansiyon lehine anlamlı bir artış saptanmıştır. 5.günde ise her iki, grupta da serbest radikal düzeyinde anlamlı bir fark saptanmadı.

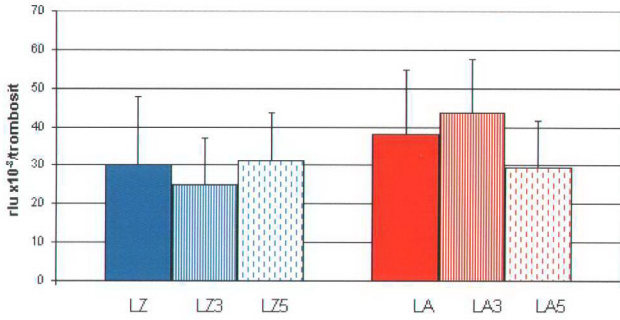
Lökositten arındırılmış trombosit süspansiyonlarında 0.gün irradiye edilenlerde (LA0R0 ve LA3R0), 0. ve 3. gün değerlerinde lökositten zengin trombosit süspansiyonlarına göre hem luminol ($p<0,05$, $p<0,001$) hem de lusigenin($p<0,001$, $p<0,001$) kemilüminensansında anlamlı olarak yükseklik saptandı. Bu grubun 5.gün değerlerinde ise (LA5R0) sadece lusigenin kemilüminensansında $p<0,01$ düzeyinde LZ5R0'a göre bir anlamlılık saptandı. 3.gün irradiye edilenler arasında (LZ3R3-LA3R3) lökositten arındırılanlar lehine luminol ve lusigenin değerleri $p<0,001$ düzeyinde bir anlamlılığa sahipken 5.gün irradiye edilenlerde (LZ5R5-LA5R5) sadece lusigenin kemilüminensansında anlamlılık saptandı($p<0,01$).

Lökositten zengin ve irradiye edilen süspansiyonlar içinde ise 5.gün lusigenin değerleri 0.güne nazaran "LZ0R0-LZ5R5" grubunda anlamlı olarak yüksek bulundu($p<0,05$). 0.gün irradiye edilenlerde 3. ve 5.gün değerleri karşılaştırıldığında hem luminol hem de lusigenin kemilüminensansında 5.gün lehine anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). Yine 5.gün irradiye edilenler 0.gün irradiye edilip 3.gün bakılanlara göre (LZ3R0-LZ5R0) luminolde $p<0,05$; lusigeninde $p<0,01$ olmak üzere anlamlı olarak yüksek bulundu. 0. gün irradiye edilip 5.gün bakılanlar ile 5.gün

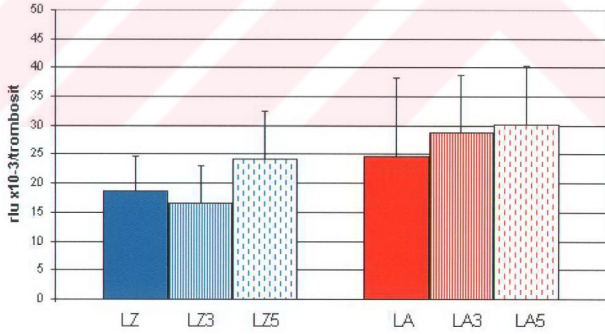
irradiye edilenlerin(LZ5R0,LZ5R5), 3.gün irradiye edilenlere göre (LZ3R3) luminol değerleri $p<0,05$ düzeyinde anlamlı olarak yüksek bulundu. 0.gün irradiye edilenler ile 5.gün irradiye edilenler arasında ise (LZ5R0-LZ5R5) istatistiksel bir anlamlılık yoktu.

Lökositten arındırılmış ve irradiye edilmiş gruplarda (LA0R0, LA3R0,LA5R0,LA3R3,LA5R5) aynı değerlendirmeler sonucunda istatistiksel bir fark saptanmadı.

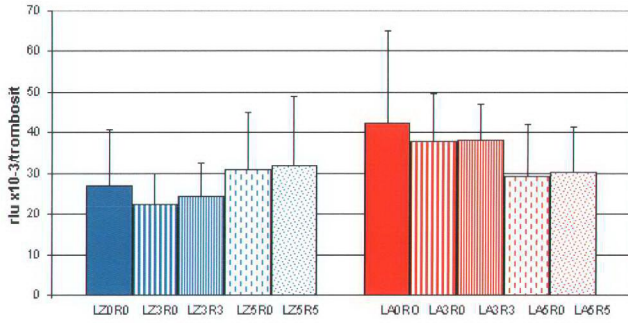




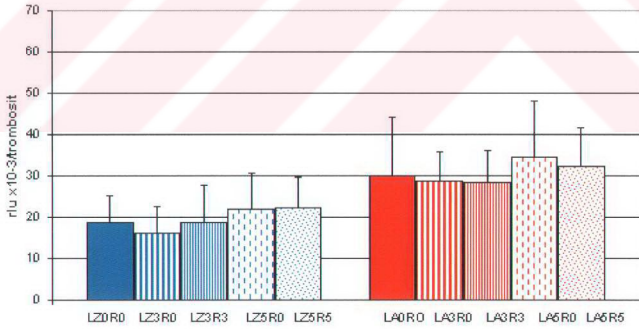
Şekil 4.1. Lökositten Zengin (LZ) ve Lökositten Arındırılmış (LA) Trombositlerde Luminol Kemiluminesansı



Şekil 4.2. Lökositten Zengin (LZ) ve Lökositten Arındırılmış (LA) Trombositlerde Lusigenin Kemiluminesansı



Şekil 4.3. Gamma Işınlamanın Trombosit Luminol Kemilüminesansı Üzerine Etkisi



Şekil 4.4. Gamma Işınlamanın Trombosit Lusigenin Kemilüminesansı Üzerine Etkisi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüz modern tıp pratiğinde gerek malign gerekse malign olmayan pek çok hastalıkta trombosit süspansiyonları artık vazgeçilmez tedavi modaliteleri haline gelmiştir. Dolayısıyla bu tedavi yönteminin en optimum koşullarda ve en yüksek verimlilikle uygulanması bir zorunluluk haline gelmiştir.

Trombositlerin donörlerden toplanması ile başlayan, depolanması, filtrasyonu ve ışınlanması süreçlerinin tümünde çeşitli nedenlerden dolayı trombositlerde çeşitli değişiklikler ve bunlara bağlı işlemin veriminde kayıplar meydana gelebilir.

Biz bu çalışmamızda aferez yoluyla toplanmış trombositlerin lökositten arındırılması ve gamma irradyasyona maruz bırakılmasının depolanma süresi de göz önüne alınarak trombositlerdeki serbest radikal oluşumuna etkilerini inceleyerek trombosit süspansiyonları için en optimum koşulları araştırdık. Zira serbest radikal oluşumunun trombositlerde aktivasyona ve aggregasyonun inhibisyonuna neden olduğuna dair çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır(5,56,57,58).

Trombositler toplanırken veya verilmenden hemen önce çoğunlukla lökosit filtrasyonuna tabi tutulurlar. Kan komponentlerinden lökosit redüksiyonu HLA class I antijenlerine karşı alloimmunizasyonu önlemek veya azaltmak, trombositlere direnç gelişimini engellemek, tansfüzyonla geçen CMV enfeksiyonlarından korunmak ve postoperatif bakteriyel enfeksiyon gelişimini önlemek gibi nedenlere dayanır(62). Ayrıca özellikle beklenmiş süspansiyonlarda lökositlerden türeyen sitokin birikimi de akut trombosit tranasfüzyon reaksiyonlarına neden olmaktadır(63). Tüm bu yararlı etkilerine karşın lökositten arındırma işleminin trombosit kalitesi, canlılığı ve sayısı üzerinde etkileri olabileceği konusunda birbirine karşıt çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. Heddle(63) ve Riggert(64) lökositten arındırmanın trombosit "CCI" değerlerine olumsuz etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Yine lökositten arındırmanın CD62 ekspresyonu tayini ile trombosit aktivasyonuna neden olmadığına dair çalışmalar da bildirilmiştir(65,66,67). Lökositten arındırılmış trombosit süspansiyonlarının in vitro kalitatif trombosit özelliklerinin değerlendirildiği bir kısım araştırmalarda da lökosit redüksiyonunun olumsuz etkisinin olmadığı gösterilmiştir(68). Özellikle geniş kapasiteli filtrelerin kullanılmasının trombosit kalitesi üzerinde olumsuz etki yaratmadığı ve verimin

arttığı da iddia edilmiştir(69). Depolanma öncesi lökositin arındırmanın ristosetin ile oluşturulan trombosit agregasyonunu minimum azalttığı da bir başka çalışmada gösterilmiştir(70). Lökositin arındırmanın zamanlaması ile ilgili olarak da Krailadsiri, minimal trombosit kaybıyla sonuçlanması için filtrasyonun 2.gün yapılmasını tavsiye ederken(71); Ferrer ve arkadaşları filtrasyon zamanlamasının bir önemi olmadığını, lökosit arındırmasının trombosit kalitesi üzerinde etkisiz olduğunu ve depolanma sonrası lökosit redüksiyonunun aksine C3a ve C4a seviyelerini azaltarak aksine yararlı olabileceğini göstermişlerdir(72).

Buna karşın lökositin arındırılma işleminin çeşitli dezavantajları olduğunu gösteren de birçok çalışma vardır. Devine ve arkadaşları depolanma öncesi lökosit redüksiyonu yapılan trombosit süspansiyonlarında mikropartikül oluşumunda artış olduğu gözleminde yola çıkarak yaptıkları bir çalışmada agregasyon oluşumuna paralel olarak CD62 ekspresyonundaki artışı göstererek trombosit aktivasyonunda da artış olduğunu buldular(1). Yine bu çalışmada negatif yüklü lökosit filtrelerine temas eden aktive olmuş trombositlerde adhezyon olduğunu da göstermişlerdir. Bu çalışmayı destekleyen, lökositin arındırma ile trombosit aktivitesinde artış, sayısında azalmanın olduğunu ve sonuç olarak lökosit redüksiyonunun ancak çok gerekli olduğunda uygulanması gerektiğini ifade eden yazarlar da olmuştur(73, 74,75,76).

Sonuç olarak lökositin arındırmanın trombosit aktivasyonu, trombosit kalitesi ve sayısı ile ilgili mevcut parametreler üzerindeki etkileriyle ilgili bugüne kadar yapılmış çalışmaların birbirleriyle çelişen sonuçlar vermesi nedeniyle kesin bir hüküm vermek olanaksız olmaktadır. Biz bu çalışmamızda lökositin arındırmanın şimdiye dek literatürde hiç bildirilmeyen bir parametre olan trombosit süspansiyonlarında serbest radikal oluşum seviyelerini inceleyip konuya değişik bir perspektiften ışık tutmaya çalıştık. Elde ettiğimiz bulgular gösteriyor ki lökositin arındırma işlemi serbest radikal seviyelerinde gerek irradiye edilmiş, gerekse de irradiye edilmemiş grupta lökositin zengin süspansiyonlara göre istatistiksel olarak anlamlı artışlara yol açmaktadır. Serbest radikal artışları ise trombosit agregasyon ve aktivasyonuna yol açarak işlemin verimini oldukça azaltmaktadır(55,77,78,79).

Çalışmanın diğer bir amacı trombosit süspansiyonlarında depolanma süresi ile serbest radikal oluşumu arasında bir ilişkinin varlığının araştırılmasıydı. Zira serbest radikal oluşumu ile "trombosit depolanma lezyonları" olarak ta bilinen ve

trombositlerin morfolojik ve fonksiyonel kapasitelerinin kaybıyla sonuçlanan lezyonlar arasında sıkı bir ilişki varlığından söz edilmektedir ve bu kuşkusuz trombositlerin saklanması en önemli sorunu oluşturmaktadır(5,55,56,57,58). Depolanma lezyonlarının oluştuğuna dair tıp literatüründe hiçbir tartışma yoktur. Ancak bu lezyonların objektif ve kantitatif gösterilmesi konusunda bir miktar anlaşmazlık devam etmektedir. Depo lezyonlarıyla kastedilen trombosit viabilitesi ve fonksiyon kaybı birbirleriyle sıkı ilişkili iki temel olgudur ve çeşitli göstergelerle tanınabilmektedir. Örneğin hücrel viabilite kaybı kendisini saklama torbasının LDH ve laktat içeriğinde artış, pH, pCO₂ ve pO₂'de değişiklikler ile gösterir(80,81). Ayrıca trombosit aktivasyonundan bağımsız olarak programlı ölüm mekanizması denilen apoptoz yoluyla da trombositler viabilitesini kaybedebilirler. Bunu da annexin V bağlanması, tetrazolium boyanmasında azalma, caspas-3 ve Bcl-2 ekspresyonu ile göstermek mümkündür(82,83). Trombosit fonksiyonlarının kaybında ise aktivasyon ve agregasyon göstergeleri kullanılabilir. Trombosit aktivasyonunu p-selektin (CD62) ve β -tromboglobulin gibi alfa granül markırlarının ekspresyonunda artışla, trombositlerin şekil değişikliklerinin ve hipotonik şok cevabının derecesiyle; agregasyonda artışı ise ADP veya ristosetinle agglutinasyon ve trombosit membran proteinlerinin (GPIb, IIb/IIIa) ekspresyonu ile göstermek mümkündür(84,85,86).

Bizim çalışmamızda depolanma süresiyle serbest radikal oluşumu arasındaki ilişki incelendiğinde irradiye edilmemiş ve lökosit zengin trombosit süspansiyonlarında 3. güne kadar serbest radikal oluşumunun artmadığı ancak 5.güne gelindiğinde istatistiksel olarak anlamlı derecede serbest radikal artışı saptandığını görmekteyiz.

Lökositten arındırılmış ve irradiye edilmemiş süspansiyonlarda ise 0., 3. ve 5. gün serbest radikal artışları arasında anlamlı fark saptanmadı.

Lökosit zengin ve arındırılmış irradiye edilmemiş süspansiyonlar karşılaştırıldığında ise 0. gün ve 3. gün serbest radikal değerleri lökositten arındırılmış süspansiyonlarda anlamlı olarak yüksekken 5. güne gelindiğinde hem lökosit zengin hem de zengin trombosit süspansiyonlarında serbest radikal değerlerindeki artış açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır.

İrradiye edilmiş trombosit süspansiyonları incelendiğinde ise lökositten arındırılmış grup ile lökositten zengin grup karşılaştırıldığında, 0.gün irradiye edilenlerinde depolanma süresi 3. ve 5. güne ulaştığında yapılan analizde serbest radikal değerlerinde 0. güne göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar saptandı.3. ve 5. gün irradiye edilenlerde de yine lökositten arındırılmış grupta serbest radikal değerlerinde anlamlı artışlar olduğu görüldü.

İrradiye edilmiş ve lökositten zengin trombosit süspansiyonları incelendiğinde yine görülmektedir ki irradiyasyondan bağımsız olarak depolanma süresiyle serbest radikal seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar olmaktadır.

Lökositten arındırılmış süspansiyonlarda ise irradiye edilmemiş süspansiyonlarda olduğu gibi irradiye edilmiş trombositlerde de depolanma süresiyle serbest radiakal oluşumu arasında anlamlı bir fark olmadığı saptandı.

Bu çalışmanın gösterdiği sonuçlardan birisi irradyasyonun tromboferez ürünleri üzerinde herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı şeklindedir. Bu sonuç literatürle de uyumludur. Transfüzyona eşlik eden graft-versus-host hastalığı özellikle immunkompromize hastalarda fatal seyredebileceğinden, bu durumu önlemek için kan ürünlerinin ışınlanmasının etkili bir yöntem olduğu 1970'lerde bildirilerek tavsiye edilmiştir(87). Önceleri 500-20.000 cGy dozlar denenmiş ve 1500 cGy'in yeterli olacağı önerilmişse de T hücre inaktivasyonu için optimum dozun 2500 cGy olması gerektiği gösterilmiştir(88,89). Ancak irradyasyonun özellikle trombosit süspansiyonlarında olumsuz etkiler yaratabileceği kuşkusuna üzerine konuyla ilgili çeşitli araştırmalar başlatılmış ve ilk sonuçlar 5000cGy'in üzerindeki dozlarda beklenen trombosit artış oranlarının belirgin düşeceği şeklinde bildirilmiştir(90). Fakat daha sonra yapılan çalışmalar gamma irradyasyonun trombosit kalitesi, yaşam süresi ve verimliliğini bozmadığını göstermiştir(91,92,93,94,95). Zimmerman ve ark. lökosit redüksiyonu yapılan trombosit süspansiyonlarında da gamma irradyasyonun olumsuz etki yapmadığını göstermiştir(4). Bizim çalışmamızda da lökosit redüksiyonu yapılan hastalarda irradyasyon serbest radikal seviyelerinde bir artışa neden olmamıştı. Lin ve ark. ise gamma irradyasyonun 5 günlük depolanma süresinin sonunda CD62, IL-1 β ve IL-8 seviyelerinde azalmaya yol açarak hatta faydalı etkilerinin dahi olduğunu iddia etmişlerdir(96).

Bizim çalışmamız gamma irradyasyona maruz bırakılan trombosit süspansiyonlarında serbest radikal seviyelerini analiz ederek trombosit aktivasyonu, aggregasyonu ve verimini daha önce literatürde hiç çalışılmamış olan bir parametre ile incelemek bakımından bir ilktir. Biz de literatürle uyumlu olarak gamma iradyasyonunun trombosit süspansiyonları üzerinde gerek lökositten arındırılmış olsun gerekse lökositten zengin olsun herhangi olumsuz bir etkisinin olmadığı sonucuna vardık.

Trombositlerde oluşan ve trombosit transfüzyonunun verimini düşürebilecek olan serbest radikallerin önlenmesi ve giderilmesi için de bazı çalışmalar yapılmıştır. Olas ve arkadaşları önce trombositleri prooksidatif dozda C vitamini ile inkübe etmişler ve daha sonra potansiyel antioksidan özelliği olan ve çoğu meyvada bulunan “resveratrol” ile muamele ettiklerinde oksidatif stresin azaldığını göstermişlerdir(97). Snyder ve ark. ise saklanan aferez trombositlerine rekombinant insan megakaryosit büyüme faktörü ilave ettiklerinde 5 günün sonunda depo lezyonlarının oluşmadığını göstermişlerdir(98). Valbonesi ise yüksek trombosit verimi almak için kısa işlem süreli, düşük lökosit kontaminasyonu sağlayan geliştirilmiş özel aparatları olan separatörlerin de etkili olduğunu göstermişlerdir(99).

Sonuç olarak, aferez yöntemiyle toplanan, saklanan ve irradiye edilen trombosit süspansiyonlarında yapılan serbest radikal analizleri sonucunda :

1. Lökositten arındırılmış trombosit süspansiyonlarında lökositten zengin süspansiyonlara nazaran serbest radikal seviyelerinde anlamlı artış olmaktadır. Dolayısıyla çok zorunlu olmadıkça lökosit redüksiyonu saklama süresince yapılmamalıdır.
2. Trombosit depolanma süresiyle serbest radikal seviyeleri orantılı olarak artmaktadır. Gerek lökositten zengin gerekse arındırılmış trombosit süspansiyonlarında depolanma süresi uzadıkça serbest radikal seviyeleri anlamlı olarak artmaktadır. Dolayısıyla aferez yoluyla elde edilen trombositlerin geciktirilmenden ve en iyisi 0-3.günler arası verilmesidir.
3. Gamma irradyasyonun aferez trombositleri üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi yoktur.

6. ÖZET

Trombosit süspansiyonları modern tıp pratiğinin vazgeçilmez unsurları arasına girmiştir. Özellikle de aferez tekniklerinin geliştirilmesi ile tek donörden büyük miktarlarda ve yoğun olarak toplanabilir hale gelen trombosit süspansiyonları aferez işleminin başlangıcından itibaren toplama, filtrasyon, saklanma ve irradiye edilme işlemlerinin her aşamasında aktivasyon ve agregasyon riski ile karşı karşıyadır. Bu durum işlemin verimliliğini doğrudan etkilemektedir.

Bugüne kadar çeşitli parametreler kullanarak aktivasyon ve agregasyonun önceden bilinmesini sağlayacak yöntemler geliştirilmiştir. Ancak gerek kullanılan parametreler gerekse de yapılan işlemlerin trombositlerin kalite ve sayıları üzerine olan etkileriyle ilgili literatürde birbiriyle örtüşmeyen birçok değişik sonuç bildirilmiştir.

Biz bu çalışmada daha önce hiç çalışılmamış bir parametre olan trombosit serbest radikal oranlarını tayin ederek aktivasyon ve agregasyonunun önemli bir nedeni kabul edilen serbest radikallerin aferez süspansiyonlarının her aşamadaki rollerini inceledik.

Sonuç olarak lökositten arındırılmış trombosit süspansiyonlarında serbest radikal oranlarının lökosit zengin süspansiyonlara nazaran anlamlı olarak daha yüksek olduğunu saptadık. Dolayısıyla çok zorunlu olmadıkça depolanma süresince lökoredüksiyonun yapılmaması kanısına ulaştık.

Ayrıca depolanma (saklanma) süresiyle de serbest radikal oluşumunun hem lökosit zengin hem de arındırılmış trombosit süspansiyonlarında anlamlı olarak arttığını gösterdik. Bu konuda da trombositlerin en optimum 0. ila 3. gün arasında verilmesinin uygun olacağı görüşünü benimsedik.

Çalışmanın bir diğer amacı ise irradyasyonun gerek lökosit zengin gerekse arındırılmış trombosit süspansiyonlarında olumsuz bir etkisinin olup olmadığının araştırılması idi. Çalışmanın sonucunda irradyasyonun herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığını, böylece transfüzyonla ilişkili GVHD riskini etkin bir şekilde azaltan irradyasyonun çekinmeden yapılabileceğini gösterdik.

7. SUMMARY

With the advent of sophisticated devices which has led to the collection and transfusion of greater number of donor platepheresis unit, the use of platelet concentrates(PCs) has increased considerably over last few years and become an inevitable therapeutic tools in modern medicine practice.

On the other hand, PCs face to a lot of risks influencing their yield at different stages beginning at collection and continuing storage, filtration and gamma irradiation. By now, a number of methods and parameters have used to recognize the activation and aggregation of platelets to predict the transfusion efficacy which is determined from the increment in the platelet count after transfusion and the impact on clinical bleeding. Nevertheless, none of all these parameters are uniformly accepted as a standard diagnostic method reflecting exactly yield of PCs.

We aimed to investigate free radicals in PCs which is belived to reflect the activation and aggregation of platelets. In this study free radical levels have determined both in leukodepleted and leukocyte-rich apheresis units with or without irradiated during storage.

We found that leukodepleted PCs have a significant increased levels of free radical compared to leukocyte rich PCs during storage. In addition, we determined that free radical levels have been increasing in both leukodepleted and leukocyte-rich PCs by the time elapses. The other finding of this study is that the gamma irradiation has no hazardous influence on PCs regardless of leukodepleted or leukocyte-rich.

In conclusion, we don't recommend leukocyte filtration of PCs during storage unless any obligation exists. We offer to transfuse the PCs at best within three days. Lastly we noted that the gamma irradiation has no influence on PCs and should not be avoided to use it because irradiation is highly effectice method against acute graft versus host disease.

8. KAYNAKLAR

1. Devine DV, Bradley AJ, Maurer E, et al. Effects of prestorage white cell reduction on platelet aggregate formation and the activation state of platelets and plasma enzyme systems. *Transfusion* 1999;39:724-734.
2. Uluhan R. Kan ve kan komponentleri: Tanımı ve özellikleri. *Klinik Gelişim* 2001; 14(2):26-30.
3. Li J, Xia Y, Bertino AM, et al. The mechanism of apoptosis in human platelets during storage. *Transfusion* 2000; 40: 1320-1329.
4. Zimmermann R, Schmidt S, Zingsem J, et al. Effect of gamma radiation on the in vitro aggregability of WBC-reduced apheresis platelets. *Transfusion* 2001; 41:236-242.
5. Sabetkar M, Low YS, Naseem KM, et al. The nitration of proteins in platelets: Significance in platelet function. *Free Radic Biol Med*, 2002; 33(6):728-736.
6. Schroeder ML. Principles and practice of transfusion medicine. In: Lee GR (eds). *Wintrobe's Clinical Hematology*, 10th ed. Williams and Wilkins, Egypt, 1999; pp:817-874.
7. Steiner S. Hemapheresis. In: Ounley ED(eds). *Immunoematology Principles and Practice*, Lippincott-Riven Publishers, 1998:22-30.
8. McLeod BC, Strauss RG, Ciavarella D, et al. Management of hematological disorders and cancer. *J Clin Apheresis* 1983;8:211-230.
9. Gilcher RO. Apheresis: principles and practices. In: Rossi EC(eds). *Principles of transfusion medicine*. 2nd ed. Baltimore, Williams and Wilkins, 1996; pp:537-546.
10. Simon TL. The collection of platelets by apheresis procedures. *Transfus Med Rev* 1994;8:132-145.
11. Goldfinger D, et al. Long-term plateletpheresis in the management of primary thrombocytosis. *Transfusion* 1979;19:336.
12. Taft EG, et al. Plateletpheresis in the management of thrombocytosis. *Blood* 1977;50:927.
13. McCullough J. Leukopheresis and granulocyte transfusion. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1979;10:275.

14. DiNubile MJ. Therapeutic role of granulocyte transfusions. *Rev Infec Dis* 1985;7:232.
15. Higby DJ, Burnet D. Granulocyte transfusion. Current status. *Blood* 1980; 55:2.
16. Strauss RG. Therapeutic granulocyte transfusions in 1993. *Blood* 1993;81:1675-1678.
17. Lasky LC, et al. Collection of pluripotential hematopoietic stem cells by cytopheresis. *Blood* 1982;59:822.
18. Buskard NA. Therapeutic cytopheresis. *Clin Oncol* 1983;2:705.
19. Lane TA. Continuous-flow leukopheresis for rapid cytoreduction leukemia. *Transfusion* 1980;20:455.
20. Lichtman MA, Rowe JM. Hyperleukocytic leukemias: Rheological, clinical and therapeutic considerations. *Blood* 1982;60:279.
21. Wright DG, Karsh J, Fauci AS, et al. Lymphocyte depletion and immunosuppression with repeated leukopheresis by continuous-flow centrifugation. *Blood* 1981;58:451-458.
22. Brecher ME, ed. Technical manual 14th ed. Bethesda, Maryland: AABB Press, 2002:127-147.
23. Abel JJ, et al. Plasma removal with return of corpuscles (plasmapheresis). *J Pharmacol Exp Ther* 1914; 5:625.
24. Schwab PJ, Fahey JL. Treatment of Waldenström's macroglobulinemia by plasmapheresis. *N Engl J Med* 1960;263:574.
25. McLeod BC, Price TH, Drew MJ, eds. *Apheresis Principles and Practice*, Bethesda, MD: AABB Press, 1997; 27-122.
26. Duke WW. The relation of blood platelets to hemorrhagic diseases. Description of a method for determining the bleeding time and the coagulation time. *JAMA* 1910; 55:1185-1192.
27. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. Recommendation No.R(95) 15 Council of Europe Publishing. 8th ed. Germany 2002; 119-129.
28. Sönmezoğlu M, Bayık M. Transfüzyonda aferez uygulamaları. *Klinik Gelişim* 2001; 14(2) 26-30.

29. Holme S, Sawyer S, Heaton A, et al. Studies on platelets exposed or stored at temperatures below 20C or above 24C. *Transfusion* 1997;37:5-11.
30. Strauss RG, Halpern RN, Eckermann I. Comparison of autosurge versus surge protocols for discontinuous-flow centrifugation plateletpheresis. *Transfusion* 1987; 27:499-501.
31. Simon TL, Sierra ER, Ferdinando B, Moore RC. Collection of platelets with a new cell separator and their storage in a citrate-plasticized container. *Transfusion* 1991,31:335-339.
32. Kurtz SR, McMican A, Carciero R, et al. Plateletpheresis experience with the Haemonetics Blood Processor 30, the IBM Blood Processor 2997, and the Fenwal CS-3000 Blood Processor. *Vox Sang* 1981;41:212-218.
33. Burgstaler EA, Pineda AA, Brecher MA. Plateletpheresis: comparison of platelet yields, processing time and white cell content with two apheresis systems. *Transfusion* 1993;33:393-398.
34. Simon TL, Lee EJ, Heaton A, et al. Storage and transfusion of platelets collected by an automated two-stage apheresis procedure. *Transfusion* 1992;32:624-628.
35. Vabonesi M, Frisoni R, Fella M, et al. Plateletpheresis with the new Fresenius AS 104 blood cell separator. *J Clin Apheresis* 1991;6:84-87.
36. Eernisse JG, Brand A. Prevention of platelet refractoriness due to HLA antibodies by administration of leukocyte-poor blood components. *Exp Hematol*1981; 9:77.
37. Bowden RA, Slichter SJ, Sayers M, et al. A comparison of filtered leukocyte-reduced and cytomegalovirus (CMV) infection after marrow transplant. *Blood* 1995;86:3598.
38. Daly PA, Schiffer CA, Aisner J, et al. Platelet transfusion therapy. *JAMA* 1980;243:435-438.
39. Gorgone BC, Andersen JW, Anderson KC. Comparison of 15 min and 1 h post-platelet counts in pediatric patients. *Transfusion* 1986;26:555.
40. Murphy S. Platelet storage for transfusion. *Semin Hematol* 1985;22:165.
41. Murphy S, Gardner FH. Platelet storage at 22° C: Role of gas transport across plastic containers in maintenance of viability. *Blood* 1975;46:209.
42. Murphy S, Gardner FH. Platelet storage at 22° C. Metabolic, morphologic, and functional studies. *J Clin Invest* 1971;50:370.

43. Olson PR, Cox C, McCullough J. laboratory and clinical effects of the infusion of ACD solution during plateletpheresis. *Vox Sang* 1987; 33: 79-87.
44. Glowitz RJ, Slichter SJ. Frequent multiunit plateletpheresis from single donors: effect on donors' blood and the platelet yield. *Transfusion* 1980; 20: 199-205.
45. Davies KJA. Oxidative stress: The paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 1995; 61: 1-31.
46. Cheeseman KH, Slater TF. Free radicals in medicine. *Brit Med Bull* 1993; 49: 479-724.
47. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Meth Enzymol* 1990; 186: 1-85.
48. Freeman BA, Cropa JD. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Inves* 1982; 47: 412-426.
49. Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Letters* 1995; 369:131-135.
50. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992; 258:1898-1902.
51. Kehrer JP, Smith CV. Free radicals in biology: source reactivities and roles in etiology of human diseases. Ed: Frei B. *Natural antioxidants in human health and disease*. Academic Press, San Diego, 1994; pp.25-62.
52. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-1828.
53. Halliwell B, Gutteridge JMC. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. *FEBS Letters* 1992; 307: 108-112.
54. Marcus AJ, Silk ST, Safier LB, et al. Superoxide production and reducing activity in human platelets. *J Clin Invest* 1977; 59: 149-158.
55. Pulcinelli FM, Pignatelli P, Violi F, et al. Platelets and oxygen radicals : Mechanisms of functional modulation. *Haematologica* 2001; 86: 31-34.
56. Salvemini D, Radziszewski W, Mollace V, et al. Diphenylene iodonium, an inhibitor of free radical formation, inhibits platelet aggregation. *Eur J Pharmacol* 1991 ; 199 : 15-18.

57. Leo R, Pratico D, Iuliano L, et al. Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelet that had undergone anoxia and than reoxygenated. *Circulation* 1997; 95: 885-891.
58. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; 2:1057-1058.
59. Hirayama A, Noronha-Dutra AA, Gorge MP, et al. S-Nitrosothiols are stored by platelets and released during platelet-neutrophil interactions. *Nitric oxide: Biol Chem* 1999; 3: 95-104.
60. Van-Dyke K, Castranova V(eds). *Cellular chemiluminescence*. CRC Press Inc, Florida 1987.
61. Davies GR, Simmonds NJ, Stevens TRJ, et al. Mucosal rective oxygen metabolite production in duodenal ulcer disease. *Gut* 1992;33: 1467-1472.
62. Sowemimo SO, Kim A, Tribble E,et al. White cell subsets in apheresis and filtered platelet concentrates. *Transfusion* 1998; 38:650-657.
63. Heddle NM, Blajchman MA, Meyer RM,et al. A randomized controlled trial comparing the frequency of acute reactions to plasma-removed platelets and prestorage WBC-reduced platelets. *Transfusion* 2002; 42:556-566.
64. Riggert J, HumpeA, Simson G, et al. Quality control in producing thrombocytapheresis preparations with minimal leukocyte contamination. *Beitr Infusionsther Transfusionmed* 1997; 34:89-94.
65. Chalandon Y, Mermillod B, Beris P,et al. Benefit of prestorage leukocyte depletion of single-donor platelet concentrates. *Vox Sang* 1999; 76(1):27-37.
66. Ogawa Y, Wakana M, Tanaka K,et al. Clinical evaluation of transfuion of prestorage-leukoreduced apheresis platelets. *Vox Sang* 1998; 75(2): 103-9.
67. Boomgaard MN, Gouwerok CW, Palfenier CH, et al. Pooled platelet concentrates prepared by the platelet-rich plasma methods and filtered with three different filters and stored for 8 days. *Vox Sang* 1995;68:82-89.
68. Ferrer F, Rivera J, Corral J, et al. Evaluation of leukocyte-depleted platelet concentrates obtained by in-line filtration. *Vox Sang* 2000; 78(4): 235-241.
69. Sweeney JD, Holme S, Heaton WA, et al. White cell-reduced platelet concentrates prepared by in-line filtration of platelet-rich plasma. *Transfusion* 1995; 35(2):131-136.

70. Garcia GI, Fitzpatrick JE, Hoering LA, et al. Effects of prestorage white cell-reduction of apheresis platelets on platelet glycoprotein Ib and von Willebrand factor. *Transfusion* 1992; 32(2):148-151.
71. Krailadsiri P, Seghatchian J. Effect of filtration, storage and platelet suspension media on platelet indices. *Transfus Sci* 1994; 15(2):179-183.
72. Ferrer F, Rivera J, Corral J, et al. Evaluation of pooled platelet concentrates using prestorage versus poststorage WBC reduction: impact of filtration timing. *Transfusion* 2000; 40(7):781-788.
73. Shiba M, Tadokoro K, Sawanobori M, et al. Activation of the contact system by filtration of platelet concentrates with a negatively charged white cell-removal filter and measurement of venous blood bradykinin level in patients who received filtered platelets. *Transfusion* 1997; 37:457-462.
74. Krailadsiri P, Seghatchian J. Are all leukodepleted platelet concentrates equivalent? Comparison of Cobe LRS Turbo, Haemonetics MCS⁺ LD, and filtered pooled buffy-coat-derived platelets. *Vox Sang* 2000; 78(3):171-175.
75. Weisbach V, Putzo A, Zingsem J, et al. Leukocyte depletion and storage of single donor platelet concentrates. *Vox Sang* 1997; 72(1): 20-25.
76. Dzik W. Leukocyte content of plateletpheresis concentrates. In: McLeod BC, Price TH, Drew MJ(eds). *Apheresis: Principles and practice*. Bethesda, MD:AABB Press,1997;pp 141-159.
77. Sttnar J, Masova L, Scheiner T, et al. Role of free radicals in blood platelet activation. *Cas Lek Cesk* 2002; 141:47-49.
78. Iuliano L, Colavita AR, Leo R, et al. Oxygen free radicals and platelet activation. *Free Radic Biol Med* 1997; 22(6):999-1006.
79. Wachowicz B, Olas B, Zbikowska HM, et al. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets* 2002; 13(3): 175-182.
80. Vucetic D, Balint B, Taseski J, et al. Biochemical changes in thrombocyte concentrates stored for 5 days. *Vojnosanit Pregl* 2000; 57(5): 29-36.
81. Xia Y, Li J, Bertino AM, et al. Thrombopoietin and the TPO receptor during platelet storage. *Transfusion* 2000; 40:976-987.
82. Li J, Xia Y, Bertino AM, et al. The mechanism of apoptosis in human platelets during storage. *Transfusion* 2000; 40: 1320-1329.

83. Kuter DJ, Phil D: Apoptosis in platelets during ex vivo storage. *Vox Sanguinis* 2002 ; 83: 311-313.
84. Wang C, Mody M, Herst R, et al. Flow cytometric analysis of platelet function in stored platelet concentrates. *Transfus Sci* 1999; 20(2): 129-139.
85. Holme S, Sweeney JD, Sawyer S, et al. The expression of p-selectin during collection, processing, and storage of platelet concentrates: relationship to loss of in vivo viability. *Transfusion* 1997; 37: 12-17.
86. Turner VS, Hawker RJ, Mitchell SG, et al. Paired in vivo and in vitro comparison of apheresis and "recovered" platelet concentrates stored for 5 days. *J Clin Apheresis* 1994; 9(3): 189-194.
87. Sprent J, Anderson RE, Miller JF. Radiosensitivity of T and B lymphocytes: Effect of radiation of response on T cells to alloantigens. *Eur J Immunol* 1974; 4 :204-210.
88. Pleszynski MM, Moroff G, Luban NL, et al. Effect of γ irradiation of red blood cell units on T-cell inactivation as assessed by limiting dilution analysis: implications for preventing transfusion –associated graft versus host disease. *Blood* 1994; 83: 1683-1689.
89. Luban NLC, Drothler D, Morrof G, et al. Irradiation of platelet components: inhibition of lymphocyte proliferation assessed by limiting dilution analysis. *Transfusion* 2000; 40: 348-352.
90. Button LN, DeWolf WC, Newburger PE, et al. The effects of irradiation on blood components. *Transfusion* 1981; 21: 419-426.
91. Sweeney JD, Holme S, Morff G. Storage of apheresis platelets after gamma radiation. *Transfusion* 1994; 34: 779-783.
92. Rock G, Adams GA, And R , et al. The effect of irradiation on platelet function. *Transfusion* 1988; 28: 451-455.
93. Fujihara M, Ikebuchi K, Wakamoto S, et al. Effects of filtration and gamma radiation on the accumulation of RANTES and TGF- β 1 in apheresis platelet concentrates during storage. *Transfusion* 1999; 39: 498-505.
94. Duguid JK, Carr R, Jenkins JA, et al. Clinical evaluation of the effects of storage time and irradiation on transfused platelets. *Vox Sang* 1991; 60:151-154.
95. Read EJ, Kodis C, Carter CS, et al. Viability of platelets following storage in the irradiated state. A pair-controlled study. *Transfusion* 1988; 28: 446-450.

96. Lin JS, Tzeng CH, Hao TC, et al. Influence of gamma irradiation and storage on apheresis. *J Formos Med Assoc* 2001; 100(2): 101-105.
97. Olas B, Wachowicz B. Resveratrol and vitamin C as antioxidants in blood platelets. *Thromb res* 2002; 106(2):143-148.
98. Snyder E, Perrotta P, Rinder H, et al. Effect of recombinant human megakaryocyte growth and development factor coupled with polyethylene glycol on the platelet storage lesion. *Transfusion* 1999; 39: 258-264.
99. Valbonesi M, Lercari G, Florio G, et al. Erythrothrombocytapheresis and plasmathrombocytapheresis with storage in T-sol of platelets collected by the new Amicus cell separator. *Int J Artif Organs* 1997; 20(5): 272-276.