T.C
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

TROMBOSİT VE LÖKOSİTLER ARASINDA FONKSİYONEL ETKİLEŞİMİN İN VİTRO KOŞULLARDA İNCELENMESİ

Dr. Ali YAKARYILMAZ
Fizyoloji Uzmanlık Tezi

Ankara, 2001

TEŞEKKÜR

Fizyoloji Temel Tıp Bilimi Uzmanlık eğitimimde bilgi ve becerisinden yararlandığım, tezimin her aşamasıyla ilgilenen ve hoca asistan sorumluluğunun bu kadar mükemmel yapan Prof. Dr. Gülriz Ersöz' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

I. GİRİŞ ve AMAÇ 1

II. GENEL BİLGİLER 2

II.a. Trombositler 2

Morfoloji 2

Fonksiyonları 3

Trombosit Adezyonu (Moleküler Mekanizması) 4

Trombosit Sekresyonu 6

Trombositlerin Agregasyonu 9

Trombosit Aktivasyonu 14

Agonistler ve Reseptörleri 14

İntraselüler Sinyaller 17

Trombosit Aktivasyonunun Sınırlandırılması veya Engellenmesi 20

II.b. Nötrofiller 23

Morfoloji 23

Kinetik 24

Fonksiyonları 25

Endotel-Nötrofil Etkileşimi (Adezyon ve Agregasyon) 25

Nötrofil Hareketi 28

Fagositoz 31

Degranülasyon 31

Respiratuvar Patlama 34

PNL Aktivasyonu ve Modülasyonu 34

Priming 35

III. MATERYAL ve YÖNTEM 38

IV. BULGULAR 41

V. TARTIŞMA ve SONUÇ 44

VI. ÖZET 48

VII. KAYNAKLAR 52

VIII. EK 60

I. GİRİŞ ve AMAÇ

Trombositler ve nötrofiller doku yaralanmasındaki hemostatik ve inflamatuvar cevapların önemli hücreleridir. Miyokard infarktusu, stroke ve ARDS (Yetişkin solunum sıkıntı sendromu) gibi damar bozukluklarını içeren hemostatik ve inflamatuvar süreçlerde birlikte yer alırlar.

Nötrofillerin serbest oksijen radikalleri aracılığı ile doku faktörü üretimi ve trombosit aktivasyonunu düzenleyerek ateroskleroz ve tromboz patogenezinde önemli rol oynayabileceği vurgulanmaktadır. Diğer yandan trombositler inflamatuvar yanıtta rol alan aracılarından biri olarak kabul edilir. Trombosit kökenli çeşitli mediatörlerin (PF4, βTG) nötrofil kemotaksis ve fagositozunu indüklediği veya regüle ettiği öne sürülmektedir.

Nötrofil-trombosit etkileşiminde çeşitli kimyasal aracıların yanısıra kontakt faktörlerin de rol oynayabileceği öne sürülmektedir.

Sunulan araştırmanın amacı trombosit ve nötrofillerin fonksiyonel ilişkisi, buna aracılık eden mekanizmaların ve maddelerin aydınlatılmasına katkıda bulunmaktır. Bu amaçla aktif trombosit ve trombosit sekresyon ürünlerinin nötrofil agregasyonu ve kemiluminesansına etkileri ile aktif nötrofiller ve nötrofil ürünlerinin trombosit agregasyonu ve sekresyonu üzerine etkilerinin araştırılması planlanmıştır.

II.GENEL BİLGİLER

II. a. TROMBOSİTLER

Morfoloji

Trombositler, 2-3µm çaplı oval şekle ve 6-8 femtolitre ortalama hacme sahip kan hücreleridir. Periferik kanda sayıları 150-400 bin/mm^3'tür[1]. Kemik iliğinde bulunan megakaryositlerin sitoplazmalarının küçük fragmanlara ayrılması ile oluşurlar[2]. Megakaryositler üç aşamadan geçerler; prolifere olabilen progenitör hücreler, immatür megakaryositler ve postmitotik hücreler. Bu kompleks gelişimsel hiyerarşi, çok çeşitli hematopoetik büyüme faktörleri (çeşitli koloni stimüle edici faktörler, interlökinler ve trombopoetin) tarafından uyarılır[3].

Elektron mikroskobik incelemelerde, trombositlerin, üç ana yapısal bölge içerdiği gözlenmektedir:

1) Periferik bölge,

2) Sol-jel bölgesi (Hyalomer)

3) Organel bölgesi (Granülomer)

1) Periferik bölge: Bu bölge, dış kabuk, unit membran ve submembran alanı kapsar. Hücrede uyarana yanıt oluşturmak için gerekli kimyasal etkileşimler ve hücre-hücre adezyonu için uygun ortamı oluşturur[4,5]. Membran proteinlerinin sınıflandırılması poliakrilamid jel sisteminde membran proteinlerinin elektroforetik mobilitelerine dayandırılmıştır. Daha yüksek molekül ağırlıklı proteinler daha ağır hareket ederler ve bu özelliğe göre trombosit membran proteinleri glikoprotein (GP) I, II, III olarak ayrılırlar. Örneğin, GPIb çok yüksek molekül ağırlığa sahiptir. Jel sistemi daha ayırıcı hale geldiğinde GPI pozisyonunda birçok protein farkedilmiştir ve GPIa, GPIb ve GPIc şeklinde tanımlanmıştır. Membran

proteinlerinin çoğu non-kovalent kompleksler olarak trombosit yüzeyinde bulunur. Bu nedenle GPIb-IX, GPIc-IIa ve GPIIb-IIIa tek membran proteini olarak gözlenir[4,6].

2) Sol-jel bölgesi (Hyalomer): Bu bölgede mikrotübüller, mikrofilamanlar, yoğun tübüler sistem bulunur. Mikrotübül ve mikrofilamanların yer aldığı fibröz elemanlardan oluşan, organelden fakir, ancak bir iki granül içeren sol-jel bölgesi, hyaloplazma adını da alır[1,7,8]. Burada trombositlerin iki kanal sistemi gözlenir. Membran-bağlı kanallar sisteminin megakaryositin DMS (Demarkation membrane system)den türemesi olasıdır ve doğrudan veya kanaliküler membran sistemi ile yüzeye açılır. Bu kanallara madde alınması enerji gerektirir. Yoğun kanal sistemi ise kalsiyum depolanmasında rol oynar[1]

3) Organel bölgesi: Tüm trombosit organelleri megakaryositlerdeki ana yapılarını korurlar. Bunlar arasında ençok α-granüller vardır. Trombosit α-granülleri megakaryositlerdekinden daha büyük olabilir. P-Selektin (PADGEM,GMP-140, CD62) ve GP IIb/IIIa hemen hemen özel olarak granül membranı üzerinde lokalizedir[1]. Birkaç elektron opak granül bulunur ve bunlara yoğun cisimcikler denir. Adenin nükleotid, serotonin, fosfat, kalsiyum iyonu içerir ve hücrenin nonmetabolik havuzunu oluşturur. Granül içerikleri trombosit aktivasyonu sırasında salınırlar. Diğer hücrelerdeki gibi, glikojen partikülleri ve mitokondriler trombosit metabolik aktivitesine hizmet eder. Küçük veziküller lizozomal yapılardır[1].

Fonksiyonları

Dolaşımın normal koşullarında trombositler birbirlerini ve diğer hücreleri etkilemeden kan damarları içinde dolaşırlar. Damar duvarı hasarına cevap olarak trombositlerin adeziv reaksiyonu başlar. Trombositler uygun uyaranlarla karşılaştıklarında da nonadeziv durumdan adeziv duruma hızlıca geçerler. Damar endoteli tabakasının hasarlanması ile çeşitli adeziv proteinleri içeren endotel altı

matriks, çeşitli maddeler ve hücrelerle temas eder. Bu proteinler ilk olarak trombositlerin endotel altı matrikse tutunmasını destekler. Tutunma, trombosit hücre yüzeyi ve matriks arasındaki çoğul ve sıkı ilişkinin oluşmasına ve reaksiyonun yayılmasına yol açar. Bu adeziv reaksiyonlarla birlikte trombositler mikroçevrede granül sekresyonunu tetikleyen agonistlerle karşılaşır. Sekretuvar yanıtın tetiklenmesi trombositlerde depolanmış granül içeriklerinin salınımıyla sonuçlanır. Granüllerin içerdiği maddeler dolaşımdaki trombositleri uyarıp yeni adeziv özellik kazanmasına ve agregasyona yol açar. Trombosit agregasyonu boyunca, diğer hücrelerde uyarılırlar. Yaralanmış damar duvarında etkili tıkaç oluşturulur ve kan kaybı önlenir[9,10].

Trombositlerin; adezyon, yayılma, sekresyon ve agregasyon şeklindeki seri yanıtları trombositlerin hemostatik fonksiyonları için temeldir. Bununla birlikte, aynı olayların aterosklerotik plak ve zedelenmiş endotel hücrelerinde oluşması trombositten zengin trombüsün oluşumuyla sonuçlanabilir[9].

Trombosit adezyonu: İn vivo koşullarda endotel bütünlüğü bozulması ile trombositler, çeşitli substratlara adhere olabilir. Endotel, dolaşımdaki trombositlerin matriksle temasını engelleyen fiziksel bir bariyerdir. Ayrıca PGI_2, nitrik oksit, ADP parçalayan enzim salgısı ile de trombosit aktivasyonunu engeller. Trombositlerin subendotelyal matrikse tutunmasına çeşitli proteinler aracılık eder. Geniş bir spektrum oluşturan bu proteinler belli koşullarda aracı rol oynarlar. Örneğin laminin trombositlerin matrikse tutunmasını sağlarken, yayılmasını desteklemez. vWF'ün etkisi, yüksek makaslama hızı koşullarında belirgindir. Kollajen yalnız adezyonu değil, sekresyonu da tetikler. vWF, fibronektin, trombospondin gibi bazı adeziv proteinler birbirleri ile de etkileşirler. vWF, fibronektin ve trombospondin kollajene bağlanır. Bu etkileşimler matriks proteini ile trombosit arasında köprü gibi fonksiyon yapar veya özellikle matriks proteinlerinin adeziv özelliklerini modüle edebilir[9].

Adeziv proteinler, trombosit granüllerinde veya plazmada bulunabildiği gibi matrikste de bulunabilirler. vWF ve fibronektin her üç bölgede de bulunur, trombospondin, ana trombosit granül bileşimidir. Farklı kaynaklı adeziv proteinler, yapısal olarak aynı olmadıkları için, fonksiyonel olarak da farklı oldukları

düşünülmektedir. Örneğin, plazma ve matriksten elde edilen vWF ve fibronektin molekülleri arasında multimerizasyonun derecesi farklılık gösterir[9,11].

Matriks proteinleri çeşitli proteolitik enzimlerle parçalanırlar. Bu proteolitik etki, matriks proteinlerinin adezivitesini modüle edebilir. Bazı koşullarda, molekülde bulunan gizli adeziv sekanslar, trombosit adeziv resptörleri ile etkileşim sonucu açığa çıkarlar[9].

Trombosit adezyon reseptörleri: Her bir adeziv protein, spesifik trombosit yüzey reseptörü için ligand olarak fonksiyon görerek hücre ile ekileşime girer[9,12].

Trombosit yüzeyindeki birçok adeziv protein reseptörü integrin ailesinin üyesidir. İntegrinler, yapısal, immünohistokimyasal ve fonksiyonel olarak ortak özellikleri taşıyan heterodimerik (iki üniteli) hücre yüzey molekülleridir. Sekiz β alt ünite, ondört α alt ünite tanımlanmıştır. α alt ünite tek polipeptid zinciri olarak sentezlenir. Bazıları GPIIb gibi, proteolitik olarak işlenerek iki zincirli şekle dönüşür. Her bir β alt ünite adeziv protein reseptörü oluşturmak için α alt ünite ile nonkovalent kompleks oluşturur. Tek bir β alt ünite, birçok α alt üniteyle birleşebilir. Trombositler iki ana β alt ünite, β_1 ve β_3 ile daha düşük düzeyde β_2 ve beş α alt ünite eksprese eder[9,13].

İntegrin ailesinin yanı sıra, membran proteinlerinden GPIb-IX da adezyon reseptörü olarak fonksiyon görür. Hemostazda GPIb-IX'un vWF reseptörü olarak doğrudan fonksiyonu vardır. Ayrıca trombin için bağlanma bölgesi olarak da hizmet edebilir, ilaçla uyarılmış trombosit antikorları için de hedef olabilir. vWF, çoğul fonksiyonel domainlerden oluşur. İçerdiği domainler, mikrofibriller ve kollajen gibi matriks bileşenleri ve GPIb'e bağlanmasını sağlar. Böylece, vWF bileşenleri ile hücreler arasında moleküller köprüleri oluşturur. İn vitro koşullarda vWF trombositlerdeki GPIb ile doğrudan etkileşmez. Etkileşim bir antibiyotik olan ristosetin veya yılan venom peptidi botrosetinin varlığında görülür. vWF'ün değişik formları asialo-vWF ve sığır vWF'ü trombositlerle doğrudan ilişkiye girebilir. Yüksek makaslama insanlarda ristosetin veya botrosetin fizyolojik karşılığı olarak görünmektedir. Yüksek makaslama ristosetin ya da botrosetin gibi vWF veya GPIb-IX'un konformasyonunda yüksek affinite ilişkisine olanak sağlayan değişikliği

sağlar[1]. vWF için GPIb-IX'a tutunmasının önemli sonucu GPIIb/IIIa aktivasyonu ve trombosit agregasyona götüren intraselüler sinyal olaylarının tetiklenmesidir GPIb-IX'un fonksiyonunda GPIX'un rolü şüphelidir[9,14].

Hem GPIb hem de GPIX'un tam temel yapıları cDNA klonlama ile tanımlanmıştır. GPIb, bir ağır zincir (α) ve bir hafif zincir (β) (her ikisi trombosit membranında uzanır) dan meydana gelir. GPIbα trombosit içindeki iskelet ile ilişkilidir. Bu zincir, proteolize yüksek derecede hassastır ve büyük proteolitik fragman, glikokalisin, trombositopenik bozukluğu olan bazı hastaların plazmasında görülebilir. GPIX, küçük, 20.000 dalton moleküler ağırlığıyla tek-zincir polipeptitdir[9].

Trombosit sekresyonu: Trombositin bir diğer önemli fonksiyonu trombositleri veya diğer kan hücrelerini uyaran veya baskılayan, mekanik özelliklerini etkileyerek trombüs yapısını değiştirebilen, koagülasyonun regülasyonu, hücre adezyonu, damar duvarı hücrelerinin gelişimini düzenlenmesine katkıda bulunan çeşitli maddelerin salınımıdır. Bu maddeler trombositlerde önceden oluşmuş depo granüllerden ya da membran fosfolipidlerinden denovo sentezlenerek sekrete edilirler. Trombosit sitoplazmasında da damar duvarında hücre büyümesine veya trombüs yapısına etkisi olabilen bazı faktörler vardır ve hemostazda minör derece trombosit parçalanması sonucu salınırlar[9].

Yoğun cisimler ve trombosit membranı hızlı salınan ve kısa etkili bir grup mediatörün kaynağıdır. Bunlar hızlı inaktive edilir veya trombüs bölgesinden uzağa diffüze olur. Bunlar etkilerini çevre hücrelerde gösterir. Özellikle damar tonusu ile ilgili olarak trombositlerin davranışları ve damar duvarı hücrelerini modüle ederler. Trombosit yoğun cisimleri trombositlerin potent agonisti olan ADP'i saldığı gibi, diğer kan hüreleri için agonist olan ATP de salar. Serotonin gibi biyolojik aminler de salınarak damar tonusu üzerine etki gösterir. Yoğun cisimlerde zengin divalan katyonlarda vardır. Yoğun cisimlerden salınan kalsiyumun koagülasyon ve trombüs oluşumuna karışan kalsiyum-bağımlı enzimler için yeterli kalsiyum sağlamaya hizmet ettiği söylenmektedir[9].

Trombosit α-granülleri çeşitli peptidler içerir. Bunlar; fibrinojen, fibronektin, vWF, vitronektin gibi adeziv proteinlerin yanısıra, damar duvarı hücrelerinin gen ekspresyon paternlerini ve büyümelerini modüle eden aracılardır. Bu aracılardan PDGF'nin üç izoformu ve düz kas ile fibroblast yüzeyinde tanımlanmış iki reseptörü vardır. PDGF muhtemelen damar duvarı ile trombosit ilişkisi sonucu meydana gelir ve düz kas hücre proliferasyonunda önemli bir rol oynar. Reseptörleri transmembran tirozin kinaz tip reseptördür ve sinyal iletimi insülin ve epidermal büyüme faktöründe olduğu gibi, diğer tirozin kinaz reseptörlerine benzemektedir. Diğer α-granül büyüme faktörü, konnektif doku aktivatör peptid (CTAP) III'dür ve fibroblast proliferasyonunu uyarır. CTAP III muhtemelen β-tromboglobulinin prekürsörüdür ve yapısı diğer α-granül protein, PF4 ile ilişkilidir. Hem PF4 hemde CTAP III büyümenin kontrolü ve inflamasyona katılan büyük protein ailesinin üyesidir. TGFβ ilk olarak trombositlerden izole edilmiştir ve trombositler bu peptidin zengin kaynağıdır. TGFβ bazı hücre sistemlerinin uyarılmasında ve diğer sistemlerin hücresel proliferasyonunun kompleks etkileri vardır ve matriks moleküllerinin biyosentezleri için potent uyarıcıdır. Trombospondin için ana kaynak trombositlerdir ve 450 kd olan bu proteinin, TGFβ'nın aktivasyonu, anjiogenezisin regülasyonu ve trombosit agregasyonunda rol oynadığı kabul edilir(9).

Multimerin, 155kd alt üniteli yaygın disülfit bağlanmış multimerlerden oluşan yeni tanımlanmış bir trombosit granül ve endotel proteinidir. Multimerin koagülasyon faktör V ve onun aktif şekli faktör Va'yı bağlar. Trombositlerde biyolojik aktif faktör V'in tümü multimerin ile kompleksleşir. Multimerinin ekstraselüler matriks yapısında bulunan adeziv protein gibi fonksiyon görür. Trombosit adezyonunda ve trombositlerin prokoagülan aktivitesinde önemli rol oynar(9).

Trombopoez boyunca plazma proteinleri megakaryosite alınır ve α-granüllerinde depolanır. Albumin ve Ig G gibi plazma proteinlerinin konsantrasyonu plazmaya göre azdır ve önemli yapısal fark yoktur. Trombositte bulunan plazma proteinleri ile plazmada bulunan proteinler arasında açık yapı farkı gösterilememiştir. Bazı koagülasyon proteinleri de trombositlerde bulunur ve salınır. Çeşitli prokoagülan ve antikoagülan enzimler ve kofaktörler de gösterilmiştir.

Megakaryositte faktör V sentezi olduğu gösterilmiştir. Trombositlerde bulunan FV miktarı plazmadan uptake ile alınabilenin üstündedir. Megakaryositler fibrinojeni de alır. Fibrinojenin megakaryositte sentezi konusu ise çelişkilidir(9).

Trombositler protein S(Pr S) ve plazminojen aktivatör inhibitör-I (PAI-1) içerir. Pr S aktif protein C (Pr C) için kofaktördür. Trombositlerdeki miktarı ve PrC substratı olan FV'in trombosit yüzeyinde yoğunluğu dikkate alınınca trombositlerin Pr C etkisi için uygun bir yer olabileceği düşünülmektedir. Benzer şekilde trombositlerden PAI-1 in lokal salınımı, trombus çevresindeki fibrinolitik olayların modülasyonunda rol oynayabilir(9).

Trombositler periferik kanda β-amyloid prekürsör proteinin (APP) ana kaynağıdır. APP, bir α-granüler membran proteinidir ve bir proteaz inhibitörüdür. Faktör Xa, XIa ve IXa'nın inhibisyonu ile doğal antikoagülan olarak muhtemel rol biçilmektedir. Fibrinolitik proteinler ve koagülasyon spektrumunda ki etkilerinin yanısıra beyin amiloidinde birikme potansiyeli oldukça ilginçtir. APP, Alzheimer hastaların beyninde biriken amiloid prekürsörüdür(9).

P-selektin trombosit granül membran proteinidir ve trombositlerle, monosit ve nötrofillerin etkileşiminde aracıdır. Bu etkileşimler hücreler arası iletişim ile trombüse yeni lökositlerin katılması bakımından önemlidir. Trombosit P-selektinin spekülatif patojenik rollerinin bazıları, trombogeneziste ilerleme, trombosit-tümör hücre etkileşimidir. Lökositlerin trombositleri fagositozunda fizyolojik rol oynayabilir(9).

TxA_2 gibi araşidonik asitten türemiş mediatörler, membran fosfolipidlerinin hidrolizi sonucu oluşur. Trombosit ve trombosit dışı bazı hücrelerden salınan PAF'ün, trombosit aktivasyonunun yanında farklı biyolojik etkileri vardır. Muhtemelen hem aktif trombositlere yenilerin eklenmesi hem de hemostazla ilişkili vasküler fenomenlerin bazılarına katılır(9).

Trombositler enzimler salgılayan lizozomları içerir, ancak nötrofillerle karşılaştırıldığında trombositler lizozomal hidrolazların minör kaynağıdır. Trombosit heparinaz endotel hücre yüzeyinden glikozaminoglikanları parçalayacak antiproliferatif fragmanların üretimine aracılık eder(9).

Trombosit sitoplazmasının içerdiği major transglutaminaz, Faktör XIII, proteinler arasında oluşan stabil kovalent çapraz bağlanma, γ-glutamil rezidüleri ve lizinin ε-amino grupları arasında izopeptid bağlarının oluşumunu katalize eder. Fibrinin, fibronektin ve α_2-antiplazmin gibi diğer trombüs komponentlerinin çapraz bağlanması gibi, fibrinin bağlanması da FXIII'ün fonksiyonudur. Bundan başka, trombosit FXIII'ün hücre iskeleti elementlerinin stabilizasyonu ve çapraz bağlanmasında rol oynadığı ileri sürülmüştür(9).

Sekretuvar mekanizmalar: Trombosit sekresyonu trombin gibi çeşitli kuvvetli agonistlerle doğrudan tetiklenebilir. ADP gibi, zayıf agonistlerle sekresyonun indüksiyonu, agregasyon sırasında oluştuğu gibi hücrelerin yakın temas bulundukları ortamlarda oluşur. İkinci sekretuvar mekanizma, TxA_2 oluşumuna bağlıdır(9).

İnsan trombositlerinde birçok α-granüllünün sekresyon sırasında merkeze yaklaştığı görülür. Granül santralizasyonu konusunda iki hipotez vardır. 1) Trombosit merkezinin derinine plazma membranı invajinasyonu vardır ve α-granül membranları bu invajinasyonla kaynaşır sekretuvar ürünler açık kanaliküler sistem veya yüzeyle ilişkili kanaliküler sistemden geçerek hücrenin dışına hareket eder. 2) α-granülleri birbirleri ile veya diğer hücresel kompartmanlarla birleşir. Morfolojik olarak α-granüllerinden fark olan bu birleşik granül plazma membranı ile birleşir. Trombosit depo granüllerinin sınırlayıcı membranı olması nedeniyle, sekresyon olayının son basamağı ekzositozu içerir (plazma membranı ile sekretuvar granül membranı füzyonu gibi)(9).

Trombositlerin agregasyonu: Kanda, plazmada veya izole edilmiş hücre populasyonunda trombositler bir diğeriyle etkileşmezler. Uygun agonistler eklenirse, hücrelerin hızlı agregasyonu meydana gelir. Trombositten türemiş agonistler, ADP, serotonin, PAF ve araşidonat metabolitleri trombosit adezyonu ve sekresyonunu da destekleyen kollajen, koagülasyon ve trombosit ilişkisi sağlayan trombin, trombosit fonksiyonlarının hormonal regülasyonunu sağlayan epinefrin gibi fizyolojik agonistler öneme sahiptir. Bu agonistler, spesifik reseptörlerle etkileşerek trombositleri aktive eder. Reseptör aktivasyonu hücrelerde agregasyonu sağlayan ortak bir yolda birleşen kompleks hücre içi reaksiyon serilerini tetikler(9,15).

Trombosit agregasyonunun moleküler mekanizması: Trombosit agregasyonunda agonistler kalsiyum ve fibrinojen gereklidir. Ca^{+2} destek için gereklidir. Az miktarda fibrinojen uyarılmamış trombositlere bağlanır. Ancak agonistler eklenirse, zaman-bağımlı bir bağlanma gözlenir. Uyarılmış trombositler 40.000 veya daha fazla fibrinojen molekülünü hücreye bağlayabilir. Eğer sistem divalan iyonlardan (Ca^{+2}) fakirse uyarılmış trombositlere fibrinojen uzun süre bağlanmaz. Sonuçta agonistlerin rolü fibrinojen reseptörlerini uyarmaktır ve kalsiyum, fibrinojenin fibrinojen reseptörüne bağlanmasının desteklenmesi için gereklidir. Bu olaylar serisi trombosit agregasyonunun fibrinojen-bağımlı yolunu tanımlamaktadır. Trombosit agonistlerin tetiklediği ortak olay reseptör indüksiyonudur. Reseptör indüksiyonu çok hızlıdır ve hücre saniyeler içinde fibrinojene bağlanabilir hale gelir(9).

Uyarılmış trombosite fibrinojenin reversibl bağlanması tipik denge etkileşimidir. Uyarılmış trombositlerde fibrinojen için ayrışma sabiti Kd, yaklaşık 0,3µM dır. Bu değerler düşük affinite etkileşmesini gösterir. Fibrinojenin plazma konsantrasyonu Kd'yi yaklaşık 30 kat aşar. Bu ilişkiler fizyolojik durumlar altında uyarılmış trombositlerin ligandla satüre olabileceğini gösterir. Fibrinojenin trombosit reseptörüne reversibl bağlanması divalan katyon gerektirir. Milimolar konsantrasyonlarda kalsiyum ve mağnezyum bu ihtiyaçları karşılar(9).

Fibrinojenin reversibl bağlanmasından sonra etkileşim, zaman-bağımlı stabilizasyona uğrar. Bu geçiş irreversibl fibrinojen bağlanmasıyla sonuçlanır ve irreversibl trombosit agregasyonu ile yakından ilişkilidir. Agonist veya divalan iyonların uzaklaştırılması gibi koşullarda hücrelerden fibrinojen ayrılır ve trombositler disagrege olur. İrreversibl fibrinojen bağlanmasının moleküler temeli tartışmalıdır. Ya bağlı fibrinojen hücre yüzeyinde kalır, ancak değişime uğrar ya da ligand reseptör kompleksi internalize edilir. İrreversibl fibrinojen bağlanması çeşitli ajanların daha fazla trombosit aktivasyonunu engellediği mikroçevrelerde trombus oluşumu için önemlidir(1). Trombosit membran proteini GPIIb-IIIa, fibrinojen reseptörü olarak hizmet eder. Bu reseptöre fibrinojenin tutunması trombosit agregasyonu için temeldir. Trombosit membranındaki protein kütlesinin yaklaşık % 15'ni oluşturan bu protein trombosit hücre yüzey proteinlerinin çoğunluğunu

oluşturur. GPIIb-IIIa aynı zamanda trombosit α-granül membranlarının yapısında bulunur. Bu internal havuz trombosit aktivasyonu sırasında yüzeye eksprese olabilir. Dinlenimdeki trombositlerin yüzeyinde 40.000-80.000 GPIIb-IIIa kopyası vardır. Her GPIIb-IIIa bir fibrinojen molekülüne bağlanma yeteneğindedir. GPIIb-IIIa hücre adezyon reseptörlerinden integrin ailesinin üyesidir. GPIIIa, β-subüniti β_3 şeklindedir. Bu β-subünitin, vitronektin reseptör $\alpha_v\beta_3$ oluşturmak için farklı α-subünitler ile kompleks oluşturabildiği bilinmektedir. $\alpha_v\beta_3$ trombositler, megakaryositler ve endotel hücrelerini içeren çeşitli hücre tiplerinde eksprese edilir. Bu iki hemcins reseptör birçok aynı ligandı ve antagonisti bağlar, fakat özgünlükleri tanımlanmamıştır. GPIIb, α-alt birim trombosit/megakaryosit serisi hücreler için spesifiktir. Megakaryositlerde tek zincir olarak sentezlenir. Fakat hücre yüzeyine geçişi süresince proteolitik işlem sonucu iki zincir şekline gelir. İki subünit GPIIb-IIIa kompleksi oluşumu için 1:1 sitokimetrik nonkovalent etkileşir. Kompleks oluşumu tek alt ünitenin biyosentezinden sonra süratle meydana gelir ve hücre yüzey ekspresyonu için gereklidir. μM kalsiyum konsantrasyonları, kompleksteki alt ünitelerin devamlılığının sağlanması için gerekli iken, fibrinojenin bağlanması için ise mM düzeyi gereklidir. Trombosit aktivasyonu, GPIIb-IIIa değişimi için zorunludur. Bu değişimin biyokimyasal temeli bilinmemektedir. Uçlarda reseptörlerin ligand bağlanmaya uygun şekilde değişimi ile doğrudan GPIIb-IIIa da ya da onun mikroçevresinde değişimi olabilir. Her iki olasılık içinde olmakla birlikte reseptörler içinde doğrudan yapısal değişim yönünde kanıt daha çoktur. Trombosit içi sinyallerin GPIIb-IIIa'nın hücre dışı parçasına ligandın bağlanmasına uygun hale getirmesi 'inside-out' sinyal olarak tanımlanır[9,13,16].

Trombosit agregasyonunda fibrinojenin GPIIb-IIIa'ya bağlanması ile ilgili birçok mekanizma ileri sürülmüştür. Büyük olasılıkla tek fibrinojen molekülü dimerik yapısı nedeniyle komşu trombositlerdeki GPIIb-IIIa molekülüne simetrik olarak bağlanır. Her bir fibrinojen molekülünün içinde GPIIb-IIIa için multipl bağlanma bölgelerinin varlığı bu doğrudan bağlanmanın varyasyonları olarak tanımlanabilir. Bir diğer olasılık, fibrinojende bağlanma sonrası değişimlerin, trombosit agregasyonu için gerekli olduğudur. İrreversibl fibrinojen bağlanması ile GPIIb-IIIa'da oluşan konformasyonel değişim, GPIIb-IIIa kümelenmesi ve hücre

iskeletiyle reseptörün ilişkisi, tirozin ve serin/tirozin kinaz ve fosfat aktivasyonu içeren intraselüler sinyal olayları tetikler. Bu olaylar 'outside-in' sinyal olarak tanımlanır[9,16].

Trombosit agregasyonun mekanizması tamamen çözülememiş olmakla birlikte hücresel cevabın sağlanması için temel olay GPIIb-IIIa'ya ligandların bağlanmasıdır. GPIIb-IIIa antagonistleri trombüs oluşumu ve trombosit agregasyonunu bloke eder. Ligand antagonistleri monoklonal antikorlar, küçük peptid ligandlar ve nonpeptidik ligand mimetikleri kapsar[9].

GPIIb-IIIa'nın tanıma özgünlüğü: GPIIb-IIIa'nın fibrinojene özgünlüğünde iki peptid rol oynar. İlki fibrinojen γ-zincirinin son COOH-terminaliyle uyumludur. İkinci peptid dört aminoasit kadardır ve birbirini izleyen şu üç aminoasit sırası içerir: arginil-glisin-aspartik asit(RGD). RGD dizisi fibrinojenin Aα zinciri içinde iki bölgede bulunur. RGD dizileri ayrıca GPIIb-IIIa bağlayan çeşitli diğer proteinlerde bulunabilir. Ayrıca, birçok diğer integrin reseptörü ligandlarındaki RGD dizisini tanır. Böylece RGD aminoasit dizisi hücresel adeziv reaksiyonlarda yaygın tanıma kodu olarak kullanır. γ-zincir sırası ise fibrinojene özeldir ve GPIIb-IIIa ya fibrinojenin bağlanması için kritiktir. Ancak GPIIb-IIIa antagonistlerin tasarımında RGD dizisi bileşimlerinin çeşitliliği nedeni ile daha sık kullanılır[9].

GPIIb-IIIa ya bağlanan tek ligand fibrinojen değildir. Birçok diğer adeziv protein ligand olarak hizmet edebilir. Tüm bu adheziv proteinler en az bir RGD sırası içerir. Fibrinojen dışında bu ligandlar subendotelyal matrikste bulunur. GPIIb-IIIa'nın agregasyon dışında hücre-matriks etkileşimini stabilize edici rolü vardır ve bu işlev ligandlar aracılığı ile olabilir[9].

İn vitro trombosit agregasyonunun değerlendirilmesinde çeşitli yöntemler kullanılır. 1962 yılında Born tarafından geliştirilen türbidometrik (optik) yöntem bunlardan biridir[17]. $1\text{-}3\times10^{8}$/ml kan konsantrasyonunda trombosit süspansiyonu opaktır. Süspansiyona bir agonist eklendiğinde trombositler agrege olur ve bulanıklıkta görülebilir azalma meydana gelir. Trombosit süspansiyonlarında ışık geçirgenliğini ölçmek için geliştirilen cihazlar, agregometreler klinik laboratuvarlarında trombosit fonksiyonlarını değerlendirmek için yaygın olarak

kullanılır[9]. Cardinal ve Flowers tarafından geliştirilen tam kanda da agregasyon değerlendirildiği impedans yöntemi son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır[18]. Trombosit agregasyonu enerji bağımlıdır ve ristosetin veya belli trombosit antikorlarıyla uyarılmış trombosit aglütinasyonundan bu noktada ayırt edilmelidir[9].

Belli cihazlar sekresyon gibi diğer trombosit fonksiyonların ölçümünde eşzamanlılığı sağlar. Agregometre ile ulaşılmış bilgi yararlı olabilsede in vitro agregasyon, in vivo trombosit fonksiyonlarını tam olarak gereği gibi yansıtmaz. Özellikle klinik kanama ve trombosit agregasyon cevabı kesinlikle uyuşmayabilir[9].

İzole insan trombosit süspansiyonuyla elde edilen tipik agregometre izlemi üç temel bileşenle tanımlanabilir.

1) Trombosit agonisti: ADP gibi agonistler diskoitten sferik şekle trombosit şekil değişimini uyarır. Bu ışık geçirgenliğinde hafif azalma olarak agregometrede görülebilmektedir. Bu transformasyon trombosit agregasyonu için ön koşul değildir. Epinefrin trombositleri agrege eder, fakat birçok agregometrede kaydedilen şekil değişimine neden olmaz. Moleküler düzeyde şekil değişimi trombositlerin aktin iskeletinde reorganizasyonu yansıtır[9].

2) Divalan katyonlar: Kalsiyum ve mağnezyum ve bazı divalan katyonlar (hepsi değil), trombosit agregasyonunu destekler. Eser miktarda kalsiyum tüm şartlar altında trombosit agregasyonu için ön koşuldur ve divalan katyonlar GPIIb-IIIa'nın ligandları için spesifikliğini etkileyebilir[9].

3) Fibrinojen: Fibrinojen yalnız ana plazma proteini değildir, aynı zamanda trombositlerin içinde bulunur ve salınır. Fibrin oluşumu trombosit agregasyonunu destekleme kapasitesinden dolayı fibrinojen trombüs formasyonunda çifte rol oynar. Bu aktiviteler fibrinojenin kan viskozitesine katılmasının yanısıra yüksek fibrinojen düzeyinin kardiyovasküler hastalıkların risk artışı ile ilişkili olduğunu düşündürtmektedir. Trombosit agregasyonu, fibrinojen konsantrasyonuna bağımlılığıdır[9].

Belirli durumlarda, vWF, trombosit agregasyonunu desteklemede fibrinojenin yerine geçer. Yüksek makaslama zoru koşullarında vWF dominant rol oynar[9].

Trombosit Aktivasyonu

Trombosit Agonistleri ve Reseptörleri: Kollajen dışında birçok trombosit agonisti trombosit yüzeyindeki G proteinlerle-birleşik reseptörlere bağlanarak trombosit aktivasyonunu tetikleyebilir. Bu kategori içine giren reseptörler trombin, TxA_2, ADP, epinefrin, PAF ve vazopressin reseptörleridir. (Trombosit başına düşen reseptör sayısı ilk bakışta az gibi görünse de belirli bir alan içerisinde reseptör yoğunluğu insan trombositlerinde oldukça fazladır.) G proteini ile çiftleşmiş reseptörler ekstraselüler N-terminal, intraselüler C-terminal ve membranı yedi kez geçen domainli tek polipeptitten oluşur. Agonist ve antagonistler ile etkileşim reseptörün ekstraselüler ve transmembran parçasında lokalize bölgeler ile olur. Reseptörlerin sitoplazmik domainleri G proteinleri ile ilişkisini sağlar[19].

Trombosit agonistleri kuvvetli ve zayıf olarak sınıflandırılır. Bununla birlikte ayrım net değildir. Kuvvetli agonistler agregasyon engellense bile sekresyonu tetikleyebilmektedir. Trombin ve kollajen kuvvetli agonistlere örnektir. Karşıt olarak, zayıf agonistlerle ADP ve epinefrin gibi, sekresyon meydana gelmesi için agregasyon gereklidir. Kuvvetli agonistler kuvvetlice fosfoinozitid hidrolizi ve TxA_2 oluşumunu uyarır ve aspirin gibi siklooksijenaz inhibitörleri oldukça etkisizdir. Zayıf agonistlerin fosfoinozitid hidrolizi yeteneği yok veya azdır ve onların etkisi TxA_2 oluşumuna daha çok bağımlıdır[19,20].

Trombin in vivo potent bir trombosit aktivatörüdür. İn vitro trombositlere eklendiği zaman, fosfoinozitid hidrolizi, TxA_2 oluşumu, protein fosforilasyonu, sitoplazmik serbest Ca^{+2} artışı, şekil değişikliği, granül sekresyonu ve agregasyona yol açar. Bu cevaplar 0,1 nM kadar düşük trombin konsantrasyonlarında ortaya çıkabilir. Trombin trombositlerde adenil siklaz inhibisyonuyla cAMP salınımını baskılar. Trombin reseptörü proteazla aktifleşen G-proteini ile çiftleşmiş reseptörler ailesindendir. Trombin reseptörünün uzamış-N-terminali Arg41 ve Ser42 rezidüleri arasındaki bölge trombinin proteolitik etki yeridir. Bu bölgenin mutasyonu trombinin reseptör aktivasyonunu engeller. Proteolitik etki bölgesinde en az beş peptidi içeren (SFLLRN) sentetik peptidler, trombinin etkisini taklit eder. Bunlar spesifik bölgelerde proteolizle trombin reseptörünün aktifleştiğini göstermektedir. Bir kez aktifleşen reseptör kısa süre sinyal oluşturur ve reseptörün sitoplazmik parçasında

lokalize serin ve treonin rezidülerinin fosfosrilasyonuyla desensitize olur. Sorumlu kinazlar G protein reseptör kinaz (GRKs) ailesinin üyesidir [19].

Trombin reseptörü (PAR1) başlangıçta yüzeye bağlı membran sisteminde lokalizedir ve trombositler aktifleştiği zaman ortaya çıkar. İnsan trombositleri trombine bir kere yanıt verir. Buna karşın endotel hücreleri 2-3 saat sonra reseptörü yerine koyabilme yeteneğine sahiptir[19,21].

Epinefrin reseptörü (α_2-adrenerjik reseptör) aktivasyonu trombosit agregasyon ve sekresyonuna yol açar, ama sitoplazmik iskelet organizasyonuyla şekil değişikliği oluşturmaz. Epinefrin ile aktivasyon fosfolipaz C (PLC) aktivasyonu ve TxA_2 oluşuna bağlı görünmekte ve aspirinle baskılanabilmektedir. Epinefrine trombosit cevabında rol oynayan mekanizmalar açık değildir. Epinefrin trombine benzer şekilde cAMP oluşumu potent inhibitörüdür, fakat bunun yalnız başına trombosit aktivasyonunu tetikleyebilmesi olası görünmemektedir. Epinefrinin aynı zamanda trombosit plazma membranında Na/H karşıt değişim oranını artırdığı gösterilmiştir[19,22].

TxA_2, aspirin-sensitif siklooksijenaz yoluyla trombositlerde araşidonattan üretilir. Stabil endoperoksid/tromboksan analoğu, U46619 in vitro koşullarda trombositlere eklendiği zaman; şekil değişimi, agregasyon, sekresyon, fosfoinozitid hirolizi, protein fosforilasyonu ve sitozolik Ca^{+2} artışına neden olur, az miktarda cAMP oluşumuna yol açar. Benzer cevaplar, trombositler egzojen araşidonik asitle inkübe edildiği zaman da görülmektedir. Araşidonatın etkisi aspirinle inhibe edilebilir ve tromboksan oluşumu yoluyla etkili olduğu düşünülmektedir. Oluşan TxA_2 plazma membranının diğer yanına diffüze olur ve diğer trombositleri aktive eder. ADP gibi ilk uyarıyı amplifiye ederek yeni trombositlerin sürece katılmasını sağlar. Lokal etkilidir ve kısa yarılanma ömrü (30sn) nedeniyle etkisi sınırlıdır[19,23].

ADP trombositlerin yoğun granüllerinde depolanır ve trombosit aktivasyonuyla salınır. İn vitro trombositlere ADP eklendiği zaman TxA_2 oluşumu, protein fosforilasyonu, sitozolik Ca^{+2} artışı, şekil değişikliği, agregasyon ve sekresyona neden olur. ADP de G-proteininin α-subünitine GTP bağlanmasını stimüle eder ve cAMP oluşumunu inhibe eder. Bu cevaplar yaklaşık 1μM ADP

konsantrasyonu ile olur. Bununla birlikte ADP, insan trombositlerinde çok zayıf PLC aktivatörüdür ve ADP ile uyarılmış trombositlerde sitozolik Ca^{+2} artışı intraselüler depolardan Ca^{+2} salınımından çok hücre içine Ca^{+2} girişi yoluyla olur. Tek reseptör trombositlerde ADP'nin tüm etkilerini açıklamada yetersizdir. Hipotetikal reseptör, pürinerjik P_{2Y} şeklindedir. P_2 reseptörler G proteini ile birleşmiş P_{2Y} reseptörleri ve P_{2X} ligand kapılı iyon kanalları olarak ikiye ayrılır. İnsan trombositlerinde her iki reseptöründe ekspresyonu olduğu ileri sürülmekte ve P_{2X1} reseptörleri aracılığıyla Ca^{+2} influksu ve şekil değişimi, P_{2Y1} reseptörleri ile PLC aktivasyonu, adenil siklaz inhibisyonu, fibrinojen reseptörlerinin açığa çıkması ve agregasyon olduğu ileri sürülmektedir(19,24).

Kollajen trombosit aktivasyonunda az çok farklı etki gösterir. Trombosit yüzeyindeki farklı moleküller ile (GPIb/IX, $\alpha_2\beta_2$, $\alpha\text{ıı}_b\beta_3$, GPIV ve GPVI) trombositlere bağlanır. Kollajen trombositlerde şekil değişikliği, sekresyon ve agregasyona neden olur. Bu cevaplar, fosfoinozitid hidroliziyle TxA_2 oluşumu, protein fosforilasyonu ve sitozolik Ca artışı ile ilişkilidir. Trombinden farklı olarak, siklooksijenaz inhibitörleri ile cevap gecikir, fakat tamamen inhibe olmaz. İnsan kollajeninin birkaç şekli bulunmaktadır. Bunların birkaçı, konnektif doku kollajeni (tipI ve III) ve bazal membran kollajeni (tip IV ve V) trombositleri aktive eder. Tip I kollajenin fibriller yapısı vardır. 100-kd polipeptid, monomerik kollajen veya tropokollajen olarak üçlü-helikal üyesi vardır. Trombositler en azından bazı monomerik kollajen şekillerine adezyon yeteneğindedir. Fakat sekresyon ve agregasyon için polimerik kollajende bulunan kuaternal yapı gereklidir. Kollajenle ilişkili çapraz bağlanmış helikal peptidin (collagen-related cross-linked helical peptide=CRP) trombositleri aktive ettiği gösterilmiştir. Trombinle aktivasyon sürecinde, in vivo agregat oluşumuna götüren ilk basamak trombositlerin kollajene adezyonudur. Bu süreç in vitro protein kofaktör eklenmesi yoluyla da meydana gelebilir. Bununla birlikte, hızlı akım ve makaslama koşulları altında genellikle vWF subendotelyal konnektiv doku matriksine trombosit adezyonu için gereklidir. vWF trombosit yüzeyinde özellikle GPIb ile kollajen arasında köprü oluşturarak, kollajenin trombosite bağlanmasını destekler. Kollajenin $\alpha_2\beta_1$'e bağlanması dıştaki sinyali (outside-in) başlatır ve diğer integrinlere benzer. Kollajen-ilişkili peptidin

(CRP) tirozin kinaz, Syk, ve PLCγ içeren mekanizmayla $\alpha_2\beta_1$ den bağımsız olarak da trombositleri aktive etmesi dikkat çekicidir[10,19].

İntraselüler Sinyaller:

Heterotrimerik G Proteinler: G proteinler αβγ heterotrimerlerdir. İntraselüler efektörlerle hücre yüzey reseptörleri arasında aracıdır. İnaktiv durumda GDP, Gα'a bağlıdır. Aktifleşmiş reseptörler GDP'nin salınımı ve GTP'nin eklenmesine yol açar. Bu sırada Gα, konformasyonel değişime uğrar ve Gβγ'den ayrılır her ikisi de aktif olarak kalır. α-subünitinin intrensek GTPaz aktivitesi ve GTPaz-aktifleştiren proteinleri içeren ekstrensek faktörler ile GTP–Gα'dan ayırır ve GDP'ye bağlanır ve Gα, Gβγ ile birleşip reseptör aracılı yeni bir aktivasyon sürecine kadar bu şekilde kalır. Gα, G proteinler ile sinyalin özel aracısıdır. Bununla birlikte, Gβγ'nın primer rolü açık değildir. (Birkaç PLC, iyon kanalları, G-proteinleri ile çiftleşmiş reseptör kinazlar (GRKs) ve PI3-kinaz (γ)'nın oluşumu iledir) [19,21].

Ekstraselüler agonistler iki temel intraselüler sinyal yolunu tetikleyerek trombosit aktivasyonuna yol açar.

1) Fosfoinozitid hidroliz yolu; fosfolipaz C (PLC) ile membranda fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat (PIP_2)'in inozitol 1,4,5-trifosfat (IP_3) ve diaçilgliserol (DAG)'e ayrışması ile başlar ve sonuçta iki ikinci haberci meydana gelir. Birçok agonistle trombositlerin erken cevaplarından birisi PLC'nin aktivasyonudur. Trombositler bu enzimin β ve γ şekillerini içerir. β formu G proteinleri ile aktive olur. γ formu tirozin fosforilasyonuyla regüle edilir. PLCβ, trombin ve TxA_2 analogları gibi agonistlerle trombosit aktivasyonu süresince meydana gelen fosfoinozitid hidrolizinin hızlı patlamasından birincil sorumludur. Genellikle $PLC\beta_1$ ve $PLC\beta_3$, Gα ailesinin özel üyesi Gqα'ya en iyi cevap verir. Oysa $PLC\beta_2$, Gβγ'a en iyi cevap verir. PLC aktifleşince, fosfatidil inozitol 4,5 difosfat (PIP_2), DAG ve 1,4,5,-IP3'e hidrolize olur. DAG protein kinaz C'yi aktifleştirir ve protein fosforilasyonu, granül sekresyonu ve fibrinojen reseptörün açılmasına katılır. IP_3 dens tübüler sistemde reseptöre bağlanır ve Ca^{+2} salar[1]. Trombosit aktivasyonuna

sitozolik serbest Ca^{+2} konsantrasyonunda dramatik artış eşlik eder. Ca^{+2} iyonları, hücre içi ikinci haberci ve protein kinaz benzeri enzim aktiviteleri ve protein-protein ilişkileri üzerinden işlev yapar. Dinlenimdeki trombositlerde ≈0,1μM olan sitozolik serbest Ca^{+2} konsantrasyonu, trombin veya kollajen gibi kuvvetli agonistlerle ≈1μM'e artar. Zayıf agonistler özellikle epinefrin sitozolik Ca^{+2} düzeyine az etkili veya etkisizdir(19,25).

Dinlenimdeki trombositlerin düşük sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonu başlıca trombosit plazma membranı permabilitesinin sınırlandırılması yoluyla sağlanır. Ek olarak trombositler sitozolden Ca^{+2}'u ya plazma membranı dışına ya da dens tübüler sisteme (megakaryosit endoplazmik retikulumundan türer) atabilir. Yoğun tübüler sistem diğer hücrelerdeki benzer yapılar gibi plazma membranına yakın uzanır ve Ca^{+2} sekestrasyonuna izin verir. İçeriye yöneltilmiş Ca-Mg-ATPaz'a sahiptir. Dens tübüler sistemin Ca^{+2} depo kapasitesi sınırlıdır. Trombositlerde denge için Ca^{+2}'un içeriye akışı plazma membranınında dışa doğru Ca^{+2} akışı gereklidir. Diğer hücrelerdeki gibi bu ya Ca-Mg-ATPaz ya da Na/Ca^{+2} değişimi ile yapılır(19,26).

Trombositler aktifleştiği zaman membrandan içeriye doğru Ca^{+2} akışı ve dens tübüler sistemden Ca^{+2} salınımı kombinasyonu ile sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonu artar. Trombositlerde voltaj-kapılı Ca^{+2} kanalları yoktur. Ca^{+2} girişi ligand-kapılı Ca^{+2} kanallarının açılmasıyla olur(19).

Yüksek Ca^{+2} konsantrasyonu $cPLA_2$, PLC, fosforilaz kinaz ve miyozin hafif zincir kinazı gibi enzimler için optimal konsantrasyonu sağlar. Miyozin hafif zincir kinaz, miyozinin 20-kd hafif zincirini fosforile eder ve aktinle etkileşimini artırır. Ca^{+2}'da direkt olarak aktin polimerizasyonunu etkiler. Trombositlerde bulunan iki protein calpain I ve II ve Ca^{+2}'la aktifleşirler. Trombositlerin içerdiği calpain substratı actin-binding protein (aktin-bağlayıcı protein) ve P235 (talin) trombosit aktivasyonunun ileri aşamalarıdır(19).

PKC, serin ve treonin-spesifik protein kinaz ubiquitin ailesindendir. Ailenin en az sekiz üyesi tanımlanmıştır. Bunlar lipidler ve Ca^{+2}'la ilişkileri ile yapılarına göre gruplara ayrılabilir. Trombositler en azından α, β, γ şekilleri içerir. Trombositlerde de diğer hücreler gibi, PKC'nin aktivasyonu sitozolik Ca^{+2} artışı ve

DAG oluşumu ile bağlantılıdır. PKC phorbol esterleri ve sentetik membran-permabl diaçilgliserolle trombositlerde aktifleşebilir. Birkez aktifleşmiş PKC trombositlerde çeşitli cevaplara yol açar. G proteinleri, Gz, G_{12}, G_{13} , miyozin hafif zincir (P20), pleckstrin (p47), aktin bağlayıcı protein, miyozin hafif zincir kinaz ve fonksiyonu bilinmeyen transmembran glikoproteini GP180 trombosit aktivasyonu sırasında protein kinaz C ile fosforillenir. Gzα'nın fosforilasyonu onun Gβγ'dan ayrılmasına yol açar. Miyozin hafif zincir fosforilasyonu ve aktin miyozin etkileşiminde etkisi olduğu düşünülmektedir[19,27].

PKC için en iyi bilinen substrat pleckstrindir. Pleckstrin için tanımlanan hedefler Gβγ ve PIP_2'i içerir. Pleckstrinin PIP_2'e bağlanarak hücre iskeleti regülasyonunda rol oynaması olasıdır. Ayrıca agonistle uyarılmış fosfoinozitid hidrolizinin feedback inhibisyonuna katılabilir[19].

2) Trombositlerde sinyal için ikinci major yol araşidonat veya eikonosoid yoludur. Eikonozoidler, trombosit aktivasyonu boyunca PLA_2'le membran fosfolipitlerinden araşidonatın salınımıyla oluşur. PLA_2 bu süreçte hızla sınırlanır ve sıkı kontrol edilir. PLA_2'nin sitoplazmik şekli ($cPLA_2$) optimal mikromolar ve submikromolar kalsiyum konsantrasyonlarında aktive olan 85-100kd enzimdir[19,23].

Membran fosfolipitlerinden salınan araşidonat prostanoid, lökotiren ve epoksidlere metabolize olur. Bu metabolitlerden herhangi biri, herbir özel hücrede bulunan enzimlere bağlı olarak oluşur. Prostanoidler siklooksijenaz yoluyla oluşur (trombositlerde COX1) ve PG gibi tromboksanları ve endoperoksitleri içerir. Lökotrienler, lipooksijenaz yolundan geçerek oluşur; sitokrom P450 epoksijenaz yoluyla epoksitlenir. Trombositlerde araşidonat metabolizmasında ana yol TxA_2'e götürür, buna karşılık endotel hücreleri PGI_2 yapar[19].

COX1 ve tromboksan sentetaz trombosit dens tübüler sisteminde lokalizedir. COX1 aspirinle irreversibil inaktive edilir[19].

Araşidonattan lökotrien sentezi lipooksijenazla başlar. Bu enzimin üç farklı şekli tanımlanmıştır. Herbiri 5-, 12-, 15-hidroperoksieikotetraenoik asit (HPETE) üreten araşidonatın farklı bölgelerine oksijeni ekler. Trombositlerde 12-lipooksijenaz ve 15-lipooksijenaz eksprese edilir ve nötrofillere 12-hidroksieikotetraenoik asit

(HETE) geçirebilir. Trombositlerde aspirin veya indometazin maruziyetinde HPETE ve HETE oluşumu artar. Bu etkinin fizyolojik önemi açık değildir[19].

Protein Tirozin Kinazlar ve Substratları: Diğer birçok hücrede olduğu gibi insan trombositleri tirozin kinazları içerir. Reseptörleri membran üyesidir ve ligandları platelet-derived growth factor reseptörleri ve epinefrin reseptörleri gibidir. Trombosit proteinlerinin tirozin fosforilasyonunun derecesi kısmen trombosit agregasyonunun belirleyicisidir. Bazıları ise fokal adezyon kinaz (FAK) gibi, agregasyonla aktive olur. Nonreseptör tirozin kinaz Syk aktivitesi trombosit aktivasyonu ve oluşmuş agregasyonu artırır. Geçerli modele göre trombositlerde agregasyon-bağımlı kinaz aktivasyonu ve tirozin fosforilasyonunda sinyal kısmen dıştan-içe fibrinojenin $\alpha_{IIb}\beta_3$'e bağlanmasıyla iletilir. İntegrinin sitoplazmik domainin merkezi sinyal protein kompleksi içerir. Bu proteinlerin bazıları tirozin kinazlardır ve diğer kinazlar için substrattır[19,28].

Trombositlerde birçok tirozin kinazın rolü hala tam anlaşılamamıştır ve trombosit sinyal yolunda yerleri açık değildir. Trombosit aktivasyonu genistein ve tyrphostin gibi bazı geniş spesifik tirozin kinazları ile inhibe edebilir. Vanadate gibi fosfotirozin fosfotazların inhibitörleri trombosit aktivasyonunu artırır[19].

Ras Ailesi Üyeleri ve MAPK Aktivasyonu: Trombositler ayrıca Ras ailesi veya p21'in üyeleri içerir. Heterotrimerik G proteinler gibi Ras ailesi üyeleri de GTP'ye açık (aktif) durumda, GDP'ye ise kapalı (inaktif) durumda iken bağlanırlar. Aktif/inaktif Ras oranı, GDP ayrışma inhibitörleri ve GTPaz aktive eden proteinler, guanin nukleotid değişim faktörleri içeren proteinler tarafından belirlenmektedir. Ras ailesi üyelerinin bazıları; RhoA, Rac1, cdc42, Ral , Rap1 ve Rap26 trombositlerde identifiye edilmiştir. Diğer hücrelerde bu ailenin üyeleri proliferasyon, büyüme, hücre iskeleti reorganizasyonu, veziküler transport, nüklear transport, endositoz ve muhtemel integrin aktivasyon regülasyonunda rol oynar. Trombositlerde rolleri tümüyle açık değildir. Nükleer transport veya proliferasyonda rol oynayan proteinleri trombositlerde açık olmayan rolü megakaryositler için önemli olabilir[19].

Trombosit Aktivasyonunun Sınırlandırılması veya Engellenmesi: Trombosit agregasyon ve sekresyonu vasküler zedelenme bölgesinde hemostazı

sürdürmek için zorunludur. Ancak uygunsuz trombosit aktivasyonu geri dönüşsüz zedelenme nedeni olabilir. Kalpte, arteryel dolaşımda, mikrosirkülasyon ve dalakta trombositler makaslama kuvveti, türbülans ve diğer hücrelerle çarpışmaya maruz kalır. Normal koşullarda trombosit aktivasyonuna neden olmaz. Trombositler ancak vasküler zedelenmeye maruz kaldığında hızla aktive olur. Trombozun engellenmesinde önemli rol oynayan mekanizmalar:

- Trombositlerin agonistlerle minimal ilişki kurması

- Trombositin agoniste cevabında sınırlama

- Agonist reseptör aktivitesinde sınırlama

- Trombosit aktivasyonunda negatif feedback(19)

Kollajenle ilişki normal olarak endotel hücre bariyeri ile engellenmektedir. Endotel hücrelerinde üretilen PGI_2 ve NO trombositlerde cAMP ve cGMP düzeylerini artırır. Bunlar sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunda sıkı kontrolü sağlayan mekanizmalardır. Yüzeyde yeni tanımlanmış ectoADPaz (CD39) ADP ile aktivasyonu önler. Trombosit ve trombin arasındaki uzamış temas, ATIII ve proteaz nexinI gibi doğal inhibitörlerle ve kan akışı ile olan dilusyonla temizlemesi ile sınırlandırılır. TxA_2'nin etkisi kısa yarı ömrüyle sınırlandırılmıştır. Reseptör aktivitesi, fosforilasyon ve klirensle sınırlandırılmıştır(19).

cAMP: G proteini içeren trombositlerde birçok memeli dokusunda Gs ve Gi adenilat siklazlarla cAMP oluşumunu regüle ettiği bilinir. Gsα, en az 45kd şeklinde bulunur. PGI_2 gibi geleneksel ajanlar trombositte cAMP düzeylerini artırır. Oysa trombin ve epinefrin gibi agonistler cAMP oluşumunu suprese ederler. Bunların Gi ile çiftleşmesi vardır. Trombositlerin, PGI_2 veya membran permabl cAMP analoglarıyla preinkübasyonu intraselüler cAMP konsantrasyonunu etkin olarak artırır. Genel olarak cAMP etkilerine protein kinaz A olarak da bilinen cAMP-bağımlı protein kinaz aracı olarak düşünülmektedir. Bu enzim için trombosit substratları GPIb'nin 24kd β-zinciri, aktin-bağlayıcı protein ve miyozin hafif zinciri, birkaç identifiye edilmeyen protein ve Ras ilişkili protein RapIB içerir. cAMP düzeyini artırıcı ajanlar fosfoinozitid hidrolizini bozar, agoniste cevap olarak

sitozolik serbest Ca^{+2} konsantrasyonu çok az artar ve yoğun tübüler sistem içine Ca^{+2} uptake'i hızlanır. PI-4-P ve PI-4,5-P_2'ın resentezini cAMP inhibe edebilir. Çünkü trombositlerde PIP_2 havuzu oldukça küçüktür ve trombosit uyarıldığında dönüşüm hızlıdır(19,29).

Reseptör Desensitizasyonu: Trombositlerde bulunan G-protein-çiftleşmiş reseptörler genellikle birkez aktifleştiğinde hızla desensitize olur. Desensitizasyon genellikle reseptörün sitoplazmik kuyruğunda, serin ve treonin rezidülerinin fosforilasyonu yoluyladır. Fosforilasyon, G proteinle çiftleşmiş reseptör kinazlar veya rodopsin kinaz (GRK-1) ve iki β-adrenerjik kinaz (βARK-1 ve βARK-2) gibi GRKs'de denilen protein kinaz ailelerinin üyeleriyle bitirilir. G-proteinle çiftleşmiş reseptörlerin fosforilasyonu onların G proteinle bağlantısını bozar ve aynı zamanda reseptör kuyruğunun reseptörü internalizasyona götüren arrestin ailesine bağlanmasını kolaylaştırır. Birkez internalize olan G-proteinine bağlanmış reseptörler, hücre yüzeyine geri dönmeden önce defosforile edilirler(19).

Protein Kinaz C ve Negatif Feedback: Trombosit aktivasyonuna katılan PKC trombosit aktivasyonunu inhibe de edebilir. İnhibitör etki, phorbol ester veya DAG'la trombositler preinkübe edidiği zaman ortaya çıkar. Eğer agonist birkaç dakika sonra eklenirse, agoniste trombositlerin cevabında özellikle fosfoinozitid hidrolizinin ürünlerine bağımlılık ya azalmıştır ya da kalkmıştır. Bu fenomen negatif feedback şekli gösterebilir. Bu etki için birçok farklı mekanizmalar önerilmiştir. PKC, 1,4-IP_2'ı 1,4,5-IP_3 hidrolizini trombosit IP3-5'-fosfomonoesteraz enzimiyle fosforilleyerek sağlar. Fosforilasyon 1,4,5-IP3'ın oluşmasını hızlandırır ve Ca^{+2} salınımı ile sinyalin süresini sınırlayabilir. Phorbol esterleri trombosit agonistlerin fosfoinozitid hidrolozini uyarma yeteneğini bloke edebilir ve cAMP oluşumunu azaltır. PKC için hedefleri, pleckstrin ve G proteinler; $G_{2\alpha}$, $G_{12\alpha}$ ve $G_{13\alpha}$ kendi reseptörlerini içeren G-protein-bağlı reseptörlerden sinyal geçirerek etkileyebilir. Gzα'nın fosforilasyon durumu Gβγ'le onun ilişkisinin etkisini gösterir(19).

İnhibitör olarak Pleckstrin: Trombositlerde pleckstrinin etkisi hala tam anlaşılamamıştır, fakat PI3-kinaz (γ) aktivasyonu ve fosfoinozitid hidroliziyle gider. Trombosit aktivasyonunda fosforile edilmiş pleckstrinin fren olarak hareket edebildiği konusunda bazı kanıtlar vardır. COS-1 hücrelerde fazla eksprese edildiği

zaman pleckstrinin birçok farklı G-protein-bağlı reseptör ve büyüme faktör reseptörü, Trk-A, ile fosfoinozitid hidrolizini inhibe ettiği gösterilmiştir. Pleckstrin direkt PI-4,5-P_2'ta bağlanarak fosfoinozitid hidrolizini inhibe edebilir. Pleckstrinin diğer inhibitör etkisi trombosit lizatında PI3-kinaz aktivitesinin inhibisyonudur(19).

II.b.Nötrofiller

Morfoloji

Nötrofiller kanın temel granülositer hücreleridir ve dolaşan granülositer hücrelerin %90'dan fazlasını oluşturur. Çekirdeklerinin loblu olması nedeni ile polimorfonükleer hücreler olarak adlandırılırlar. Işık mikroskobunda nötrofil gelişiminin altı aşaması izlenebilir. Myeloblastlar en genç hücrelerdir. Belirgin nükleer kromatin ile bir ya da iki nukleolus göze çarpar. Sitoplazmada granül yoktur. Miyeloblast iki büyük promyelosit adı verilen hücreye bölünür. Hücre sitoplazmasında azurofil yapıda primer granüller bulunur. Promyelositler miyelositlere bölünürler. Miyelositlerin gelişimi sırasında spesifik (sekonder) granüller oluşur. Gelişimin 4. aşamasında oluşan metamiyelositler miyelositlerden küçüktür ve fasulye şeklinde çekirdekleri karekteristiktir. Band hücreler ve polimorfonüveli lökosit (PNL) miyeloid gelişimin son basamaklarıdır. Üçüncü granül alt grubunun eklenmesi ile olgunlaşma son bulur(30,31).

Olgun nötrofiller 13µm çapındadır. Sitoplazmalarında düzgün sınırlı granüller bulunur. Baskın durumda olan spesifik sekonder granüller sitoplazmada yaygındır ve sitoplazmanın pembe boyanmasına yol açarlar. Nukleus 2-5 (ort. 3) loba ayrılmıştır. Loblar ince kromatin bantlarla birbirlerine bağlıdır. Giemsa ile koyu mavi boyanırlar. Elektron mikroskobu ile heterokromatinin ökromatin kanallarla bölündüğü, kanalların nükleer porlarla devam ettiği görülür(30,31).

Granüllerin ince yapısı ışık mikroskobu ile ayırt edilemez. Ultrastrüktürel olarak yoğunluk ve büyüklük bakımından farklı oldukları göze çarpar. Peroksidaz ile boyama sitoplazmanın küçük ve peroksidaz negatif granüller (sekonder spesifik granüller) ile, daha büyük ve peroksidaz pozitif primer granüllerle dolu olduğunu

gösterir. Daha az yoğunlukta jelatinaz assay ile gösterilen üçüncül granüller ve alkalen fosfataz boyama ile gösterilen sekretuvar veziküller göze çarpar. Mitokondri ve ribozom immatür hücre formları ile karşılaştırıldığında daha azdır. Düz endoplazmik retikulum yoktur ve golgi aygıtı küçüktür. PNL'ler glikojen partiküllerinden zengindir. Membran altında yer alan mikrofilaman ağı organel bölgesini sınırlar. Nötrofillerin granül ve sekretuvar vezikül içerikleri marker enzimler kullanılarak veya matrikste ya da membranda yer alan diğer proteinler aracılığı ile saptanabilir. Sitokimyasal boyalarla kan ve kemik iliği incelenmesi ile miyeloperoksidaz-pozitif azurofil granüllerin, promiyelosit aşamasından itibaren tüm gelişim aşamalarında hücrede bulunduğu gösterilmiştir. Azurofil granüllerinin matriksi mikrobisidal proteinler (bakteri ve mantarların oksidatif-nonoksidatif öldürülmesinde yer alır) ve asit hidrolazlar içerir. Azurofil granül membranı reseptörler ve sinyal iletiminde yer alan proteinleri içerir[30,31].

Laktoferrin spesifik granüllerde lokalize olur ve bu granül alt grubunun tanımlanmasında önemlidir. Spesifik granüller matriksi ayrıca hidrolazlar, vitamin B12 bağlayan protein içerir. Membranında ise kemotaktik, opsonik proteinler, adezyon protein reseptörleri, fagositik NADPH oksidazın sitokrom b komponentlerini içerir[5]. Alkalen fosfotaz sekretuvar veziküllerin ayrılmasında kullanılır. Vezikül membranları sitokrom b ve serum opsoninleri için reseptörlerden zengindir. Yine plazminojen aktivatör reseptörü PNL vezikül membranında yer alır. Son dönemlerde tanımlanan diğer bir granül alt grubu jelatinazdan zengindir ve peroksidaz negatiftir[30,31,32].

Kinetik

PNL büyük kısmı kemik iliğindedir ($\approx 2.26\times10^9$ hücre/kg). Kanda kemik iliğinin 1/3'ü yoğunlukta bulunurlar ($\approx 0.7\times10^9$ hücre/kg). Bunun 1/2'si dolaşımda bulunurken (CGP) diğer yarısı mikrodolaşımda endotele gevşek tutunmuş olarak bulunur (MGP). Damar dışı dokularda yoğunluk gereksinime göre değişmektedir[30].

Kemik iliğinde kök hücre ya da mitotik kompartmanlarda miyeloblast, promiyelosit ve miyelositler bulunur. Yaklaşık 5.59×10^9 hücre/kg maturasyon-depo

kompartmanındadır. Maturasyon-depo kompartmanı metamiyelosit, band form ve PNL içerir. Replikasyon ve maturasyon 10 gün sürer. Miyeloblast aşaması 15 saat, promiyelosit 20 saat, miyelosit 104 saat sürer. Maturasyon için 4.5 gün gerekir. PNL 3-4 günü depo kompartmanında geçirir. PNL'lerin kemik iliğinden salınımını kontrol eden mekanizmalar kısmen anlaşılabilmiştir. Endotoksin, androjenler, glukokortikoidler, lökosit mobilize eden faktör (C3e türevi) kemik iliğinden kana PNL salınımını indükler. Endotoksin makrofaj retraksiyonunu indükler, makrofajlar endotelden uzaklaşarak PNL-endotel temasını artırır. Hücrenin endotelin luminal yüzünden sinüzoidal yüzeyine geçmesi için deforme olabilmesi gerekir. PNL ve bant hücreler 1μ çaplı porlardan kolayca geçebilirler. Metamiyelosit ve miyelositler kemoatraktana yanıt vermez, promiyelosit ve miyelositler deforme olamaz. β-2 integrin ve L-selektin lökositler için temel adheran proteinlerdir[30,31].

PNL kanda yarılanma ömrü 7 saattir. Kandan ayrılmaları rastgeledir ve dolaşıma tekrar dönmezler. Normal koşullarda mukozal yüzeylerden vücudu terkederler. Dokuya geçen PNL'ler inflamasyon bölgesinde yaşlanır ve 72 saat içinde programlı hücre ölümü (apopitozis) ile ölürler. Apoptozis morfolojik değişiklerle giden süreçtir. Hücre iskeleti tutunma, yayılma, şekil ve rastgele yer değiştirme fonksiyonlarını kaybeder. L-selektin ekspresyonu azalır. Apopitotik hücrelerde fagositoz, degranülasyon, solunum salınım patlama aktivitesi azalır. Hücreler sitotoksik ürünler oluşturup salarak dokuda ileri hasara yol açarlar. Apopitotik PNL doku makrofajları için fagositik hedef haline gelirler ve trombospondin gibi adeziv proteinler aracılığıyla makrofaj tarafından sindirilirler[30,31].

Fonksiyonları

Endotel-Nötrofil Etkileşimi (Adezyonu ve Agregasyonu): Normal kan akımında, eritrositler ve lökositler hücreden fakir plazma tabakasını endotelle temas halinde bırakarak genellikle merkezden ilerlerler. Erken inflamasyonda vasküler permeabilite artarken, sıvı vasküler lümenden çıkar ve kan akımı yavaşlar. Bunun sonucunda lökositler santral bölgeden ayrılır, damarın periferine göç eder[6]. Erken inflamatuvar yanıtlardan biri nötrofillerin endotelle gevşek etkileşimidir. Arteryel

sistemde olduğu gibi 300-1000μm/sn'lik yüksek hızlarda nötrofiller güçlü makaslama zoruna maruz kalırlar. Ancak bu hızlı akım sırasında bir grup PNL kan damarı çevresine yaklaşık iki kez daha yavaş hızda tutunur[5]. Daha sonra lökositler yol boyunca endotelyal yüzeyine geçici olarak tutunarak yuvarlanırlar. Bu sürece yuvarlanma (rolling) denir. Yuvarlanma lökosit adezyonu ve transmigrasyonda olduğu gibi endotel yüzeyleri ve lökositler üzerindeki anahtar ve kilit benzeri adezyon moleküllerinin, bağlanması ile meydana gelir[33]. "Rolling/tumbling" PNL'lerin sıkı adezyonu için ön koşuldur. Adezyon molekülleri dolaşan PNL'lerin inflamasyon bölgesine geçişinde major rol oynarlar. Lökosit geçişi; PNL-endotel arasında çeşitli adezyon molekül aileleri ve onların ligandları tarafından yönlendirilen dinamik olaylar serisini içerir. PNL ve endotel hücreleri bazal durumdan çeşitli inflamatuvar mediatörler aracılığıyla aktif duruma geçerler. Süreç 4 faza ayrılabilir:

1- İnaktif/sessiz PNL ve endotel

2- Endotel aktivasyonu ve PNL rollingi

3- PNL için aktif/priming durum (PNL adezyon molekül ekspresyonunda değişiklik, PNL'lerin endotele yapışır hale gelmesi)

4- Transmigrasyon fazı: Endotel hücre aracılıklarıyla doğru adezyon molekülleri desteği ile kayar[30].

Yuvarlanmadaki görece geçici ve gevşek adezyonlar, selektin ailesine bağlı moleküllerce sağlanır. Bu reseptörler endotel ve lökositler üzerinde dışa vururlar. Selektinler, seçilmiş bazı şekerleri bağlayan hücre dışı moleküllerdir[33]. Endotelyal selektinler normal hücrelerde tipik olarak çok düşük oranlarda bulunurlar veya hiç bulunmazlar. Yalnızca spesifik mediatörlerin uyarısından sonra oluşumları düzenlenir. Bu durum, zedelenmenin olduğu alana özgü sınırlı bağlanma sağlar. Örneğin; P-selektin endotel hücresi Weibel-Palade cisimciklerinde bazal seviyede bulunurken, histamin, trombin, PAF gibi aktive edici faktörlerle karşılaştığında birkaç dakika içinde hücre yüzeyine dağılır ve lökositlerin bağlanmasına yardımcı olur[33].

İnflamatuvar sitokinler; IL-1, TNF-α ve IFN-γ endotel hücrelerini aktive eder. Aktif endotelde E-selektin ekspresyonu (ELAM-1) ve IL-8, GM-CSF, PAF salınımı olur[30]. Endotel ve trombositte P-selektin (GMP140) ekspresyonu olur[33]. P ve E selektin belirli lökosit yüzey glikoproteinin, siyalize glikosakkarit epitoplarına bağlanırken, L-selektin endotel hücre yüzeyindeki müsin benzeri glikoproteinlerin üzerindeki artık karbonhidratlara bağlanır (GlyCAM-1 ve CD34 gibi)[33]. PNL, aktif endotel yüzeyinde SLeX ve L-selektinin E-selektine bağlanması ile yuvarlanır[30]. Adezyon büyük oranda, lökositlerin hücre yüzeylerinde bulunan çeşitli integrinlere bağlanan immünglobülin üst ailesinden endotelyal adezyon moleküllerince düzenlenir[33]. Endoteliyal sitokinler ve damar dışı kemoatraktanlar PNL yüzeyinde kemotaktik reseptöre bağlanarak CD18 β-2 integrin ekspresyonunu indükler[30]. İntegrinler membran boyunca bulunan ve ekstraselüler matriks içinde (ECM) reseptör görevi gören heterodimerik glikoproteinlerdir[33]. Bu integrinler normalde lökosit plazma membranında mevcut olmalarına karşın, lökositler kemotaktik ajanlar veya diğer uyaranlarla (sıklıkla hasar bölgesindeki endotel veya diğer hücreler tarafından oluşturulan) olmadan uygun ligandlarına bağlanmazlar. Uyarı sonrası integrinler endotelyal adezyon molküllerine yüksek bağlanma çekimini oluşturacak yapısal değişikliğe uğrar[6]. PNL'ler β-2 integrinler aracılığıyla endotelyal ICAM-1'e sıkıca bağlanır. PNL'ler ayrıca birbirlerine de bağlanırlar. PNL agregatları kan akımını yavaşlatır ve daha çok PNL toplanmasını sağlar. PNL agregasyonu Mac1-bağımlı olaydır. β-2 integrin, Mac1 (CD11b/CD18), LFA-1 (CD11a/CD18)-ICAM desteği ile PNL endotel yüzeyinde lateral hareket eder[30]. VCAM-1, VLA-4'e bağlanır[33]. Esas olarak LFA-1/Mac-1'in ICAM-1 ile endotelyal yüzeye sıkı bağlanmasını takiben lökositler hücreler arasındaki bağlantılar arasından göç ederler. Bu lökosit diapedezi (tıpkı artmış vasküler geçirgenlik gibi), özellikle sistemik damarların venüllerinde ve akciğerlerin kapillerinde oluşur. Bir hücreyi hücreye bağlayan adezyon molekülü PECAM-1 (trombosit endotelyal hücre adezyon molekülü, KCD31 de denir)'in bu olayda olası rolü vardır[33]. PNL, PECAM-1'e tutunarak endotel endotel hücre aralığına kayar. PNL'lerin subendotelyal bazal membrandan geçişleri membranın PNL granül proteazlarının aktivitesi ile sağlanır[30]. Salgıladıkları kollejenazlarla bazal membranı fokal olarak delerek

geçerler[5]. Subendotelyal kollajenin tipi PNL hareketi için önemlidir. Tip I PNL'yi aktive eder, Tip IV ise aktiviteyi azaltır[30].

Nötrofil agregasyonu hem CD18 hem de L-selektin aracılığıyla olur. Nitrik oksit nötrofilin kollajen ve endotele integrin aracılı adezyonunu azaltır ve bu nedenle agregasyona da etkilidir. FMLP ile uyarılmış nötrofiller L-arginine maruz bırakıldığında agregasyonun arttığı ve uzadığı gözlenmiş, bununla birlikte L-NAME ile hazırlanmış hücreler FMLP ile uyarıldığında kontrollerden farklı olmadığı gözlenmiştir. Böylece en az iki sinyal yolu, FMLP ile uyarılmış agregasyonda CD18 integrin aracılığı ile ilgilidir. Nitrik oksitin G-aktinin ADP ribozilasyonunu (polimerizasyonu inhibe eder) indüklendiği bilinmektedir. Muhtemelen FMLP-reseptör sinyali CD18 integrinle upregüle edilmekte ve endojen NO aktinin ADP ribozilasyonu ile agregasyonu uzatmaktadır[34].

Aktifleşmiş nötrofiller makaslama alanında, L-selektinin P-selektin glikoprotein ligand-1 (PSGL-1) e bağlanmasını izleyen, LFA-1 (CD11a/CD18)'in interselüler adezyon molekülü 3 (ICAM-3) ve karşıt reseptörü bilinmeyen Mac-1 (CD11b/CD18)'e çok kararlı bağlanması yolu ile agrege olur[35].

Göç eden lökositlerin cinsi, olayı başlatan uyarı ve inflamasyonun başlamasından sonra geçen süre ile ilgilidir. Akut inflamasyonun birçok tipinde, ilk 6-24 saat nötrofiller baskın olarak bulunurken, takiben 24-48 saatte bu tablo monositler lehine değişir. Bu tablo en iyi şekilde, farklı adezyon moleküllerinin ve kemotaktik faktörlerin sırasıyla salınımına bağlı olarak açıklanabilir. Buna ek olarak, nötrofiller daha kısa ömürlü olup kan dolaşımından çıktıktan sonra, 24-48 saat içinde apopitoza uğrarken, monositlerin doku makrofajları halinde daha uzun süre yaşayabilmesi de bir etken olabilir[33].

Nötrofil hareketi: Ekstravazasyondan sonra, lökositlerin kimyasal bir uyaranı izleyerek zedelenme bölgesine doğru göç etmesine kemotaksi denir. Hem ekzojen, hem de endojen maddeler lökositler için kemotaktik ajan olabilir. Bunlar:

1- Çözülebilen bakteriyel ürünler, özellikle N-formyl-methionin ile sonlanan peptidler,

2- Kompleman sisteminin ürünleri, özellikle C5a ,

3- Araşidonik asit (AA) metabolizmasının lipooksijenaz yolu ürünleri, özellikle lökotrien B4 (LTB4)

4- Sitokinler, özellikle kemokin ailesi (IL-8)[33].

PNL kemoatraktanlara yanıt olarak şekil değişikliği ile hareket eder[30]. Kemotaktik ajanlar lökosit hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanır ve fosfolipid metabolitlerinin intraselüler döngüsünü başlatır. Hem intraselüler depo hem de ekstraselüler içe akım ile intraselüler kalsiyum artışına yol açarlar. Artmış sitozolik kalsiyum, hareket için gerekli olan hücre iskeletindeki kontraktil elemanları tetikler[33]. Ön lamellipodların oluşması ve retraksiyonu hareketin yönünü belirler. Doğrudan kemoatraktan gradienti ile hareket ederler[30]. Hareketin yönü spesifik kemotaktik reseptör-kemotaktik ligand ilişkilerinin yüksek yoğunluğuna bağlıdır[33]. %2'lik kemoatraktan konsantrasyon farkı PNL tarafından saptanır ve PNL'ler 30μm/dk hızla hareket ederler. Lamellipodlar solubl proteinlerle dolaşır ve membran substrata tutununca kasılırlar. PNL gövdesi lameller uzantının belirlediği eksene uzanır ve uzar[30].

PNL hareketinin moleküler mekanizması Stossel tarafından tanımlanmıştır. PNL aktivasyonu kortikal jeldeki aktin ağının kontraksiyonunu indükler. Aktin filamanları aktin bağlayan proteinler aracılığı ile üç boyutlu bir ağ oluştururlar. Ağın kontraksiyonu ile yüklenen hidrostatik kuvvet membranın ileri doğru itilmesine yol açar. Sitoplazmanın göçü ile oluşan uzantı adezyon molekülleri için bir çapa fonksiyon görür. Daha sonra aktin filamanları dağılır ve siklus tekrarlanır. Gelsolin aktin filamanlarını hızla ayırır. Diğer bir capping protein CapZ aktin filamanlarının uzamasını engeller. IP3, PNL aktivasyonu sırasında oluşur ve aktin filamanlarının toplanma-dağılma siklusunu yönlendirir[30].

Kemotaktik reseptörler yedi transmembran domainine sahiptir (Tablo II.b.1). 20-25 aminoasitten oluşan α-heliks yapılar hücre içi ve dışında üç hidrofilik loba ayrılır. Transmembran kısımlar sabit aminoasitlere sahiptir. Bu bölgelerin Gi_2 proteinler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir[30].

Tablo II.b.1: PNL Kemotaktik Reseptörlerin Özellikleri: Yedi Transmembran Domain Ailesi[30].

Spesifik Reseptör	Tip	Reseptör/PNL	Yüksek Affinite kDa (nM)	Düşük Affinite kDa (nM)
FMLP	Bakteryel ürün	50.000	20	-
C5a	Kompleman Fragmantı	50.000-100.000	2	-
IL 8RI	CXC kemokin peptit	20.000	0.8	-
GRO α	CXC kemokin peptit	60.000-90.000	0.3 (%30-45)	30(%55-70)
NAP	CXC kemokin peptit	60.000-90.000	0.7 (%30-45)	30(%55-70)
PAF	CXC kemokin fosfolipit	1.000 270.000	0.2 -	- 500
LTB4	CXC kemokin fosfolipit	4.500 270.000	0.4 -	- 75

Fagositoz: İnflamasyon alanında biriken lökositlerin iki önemli fonksiyonu fagositoz ve lizozomal enzimlerin salınımıdır. Fagositoz, birbirleriyle ilişkili üç ayrı aşamadan oluşur[33]:

1- Fagositin partikülü tanıması ve ona tutunması,

2- Fagositik vakuol oluşturmak üzere kuşatması,

3- Yutulan materyalin öldürmesi ve parçalaması[33].

Dolaşım dışına göç ve inflamatuar kemoatraktanlara doğru hareket eden PNL'nin mikrobiyal enfeksiyonlara motil yanıtı opsonize mikropların fagositozla sindirimini içerir. Mikrobun hücre içine alınması geniş, düz psödopodlar aracılığıyla olur. Psödopodların mikroba doğru sarılı kolları distal membranda füzyona uğrar ve mikroorganizma membranı ile sınırlı fagositik vakuol içine alınır. Psödopotlar aktinden zengindir. Spesifik ligand reseptörlerinden kaynaklanan sitoplazmik sinyaller, aktin filamanlarını opsonize mikrobun temas bölgesine doğru yönlendirir. Psödopod reseptörleri mikrobu çevreleyen spesifik opsonik ligandlarla karşılaşır[30]. Klasik opsoninler IgG (özellikle molekülün Fc fragmanı) ve C3 (C3bi formunda stabildir)'tür. Polimerik IgA da opsonin olarak fonksiyon görür[30,33]. Çoğunlukla IgG'nin bağlanması kompleman sistemini aktive ederek hedef partikül üstünde C3b fragmanlarının birikimi ile sonuçlanır. Ancak bazı uyaranlar (mikrobiyal yüzeyler vs.) IgG'den bağımsız olarak doğrudan (alternatif yol) kompleman aktivasyonunu başlatabilir. Her iki olayda da lökosit üzerindeki ilgili reseptörler, Fc reseptörü (FcR) ve 1,2 ve 3 kompleman reseptörleridir (CR1,2 ve 3)[33], (Tablo II.b.2).

Degranülasyon: Degranülasyon fagositoz ile başlar. Granüller yer değiştirir ve membranları yeni oluşan fagositik vakuol membranına tutunur ve füzyona uğrar. Spesifik granüller içeriklerini primer granüllerden daha hızlı boşaltırlar ve içeriklerinin çoğu hücre dışına salınır. Primer azurofilik granüller lizozomların analoğu gibidir ve asit hidrolazları içerirler. Fagolizozomun asit ortamı bu enzimler

için optimal pH'ı sağlar ve asit ortam degranülasyon için esastır. Anyon kanallarının blokajı, Na^+ ve H^+ akımını ve degranülasyonunu bloke eder[30].

Degranülasyon ayrıca PNL doku yüzeyine adhere olduğunda immün kompleks, immünglobulin agregatlar, kompleman komponentleri ve bazı sitokinlere bağlandığında da gerçekleşir. Bu koşullarda granüller plazma membranına tutunur ve içeriklerini doğrudan hücre dışına bırakırlar[30].

Hücre iskeleti proteinleri degranülasyon için gereklidir. Bu proteinler granüllerin, fagolizozom ve plazma membranına doğru yer değiştirmesini kolaylaştırır. PNL aktivasyonundan 30sn sonra granüller polimerize mikrotübüllere bağlanır ve mikrotübül polimerizasyonunun inhibisyonu degranülasyonu bloke eder. Aktin polimerleri plazma membranı ile granül arasında bariyer gibi fonksiyon görür ve granül sekresyonunu inhibe eder. Fungisidal metabolit sitokalazin B granül sekresyonunu aktin mikrofilamanlarını parçalayarak hızlandırır[30].

Membran füzyonunun mekanizması bilinmemekle beraber Ca^{+2} duyarlı PLA2, PLD gibi PNL fosfolipazlarının sürece karıştığı gösterilmiştir. Bunlar granül-fagozom/granül-plazma membran temas noktalarında lipid kompozisyonunu değiştirir[30].

Primer, spesifik, tersiyer ve sekretuvar veziküller için gerekli sitozolik Ca^{+2} düzeyi farklıdır. Sekretuvar granüller çok küçük Ca^{+2} düzeyi artışına duyarlı iken primer granül için yüksek konsantrasyon gerekir[30].

Tablo II.b.2: PNL opsonik reseptörlerin özellikleri[30].

Spesifik Reseptör	Marker	Tip/MA	Opsonik Ligand	Bağlama Afinitesi(Ka)	Fonksiyon
FcγRI; IFN-γ	CD62	Tek trans-membran protein 72kDa	IgG	Yüksek 50nM	Aktivasyon Fagositoz
FcγRIIa	CD32	Tek trans-Membran glikoprotein 40kDa	IgG1	Düşük	Aktivasyon Fagositoz
FcγRIIIB; NA 1 & NA 2 allel-antijen SH antijen	CD16	GPI-bağlı glikoprotein 50-80 kDa	IgG1 komp-leks IgG3 komp-leks	Düşük 110nM Düşük 470nM	Aktivasyon İmmün- bağlı fagositoz CR1 veya FcγR2 gerektirir
FcαR	CD39 My43 IgM	Tek trans-membran glikoprotein 60 kDa	IgA1, IgA2 sekretuvar IgA1, IgA2		Aktivasyon Fagositoz
CR1	CD35 4 allel	Tek trans-membran glikoprotein 160,190,220 250 kDa	C3b & C4b dimerleri	Yüksek 0.5nM	Fagositoz
CR3	CD11b/CD18 Mac1	Heterodimerik transmembran protein	C3bi	Yüksek 0.5nM Ca^{+2}, Mg^{+2} IMF-1	Aktivasyon Fagositoz

Respiratuvar patlama: PNL aktivasyonu saniyeler içinde O_2 kullanımında dramatik artışa yol açar ve bu artış mitokondri inhibitörlerinden etkilenmez. Bu solunum patlaması NADPH oksidaz veya solunum patlaması oksidaz olarak isimlendirilen latent bir enzimin aktivasyonu ile gerçekleşir. Solunum patlamasının ürünleri bir elektronun NADPH'tan moleküler oksijene transferi ile oluşan superoksit anyonu kökenlidir. $O_2^{\cdot -}$ hızla (spontan/SOD ile) H_2O_2'e dönüşür. H_2O_2 superoksit anyonu ile reaksiyona girerek OH, klorit iyonu ile reaksiyona girerek HOCI oluşturur. $O_2^{\cdot -}$ zayıf bakterisidaldır ancak OH mikropları öldürür ve çevre dokuyu hasarlar. HOCI uzun etkili kloraminleri oluşturarak mikropların oksidatif öldürülmesine katkıda bulunur. Oksidatif ürünler ayrıca antiproteinazların inaktivasyonu, metaloproteinlerin (elastaz, kollajenaz gibi) aktivasyonuna yol açar. Düşük konsantrasyonda H_2O_2 GSH ile reaksiyona girerek GPx'in katalizörlüğünde GSSG ve suyu oluşturur. PNL'ler ayrıca askorbik asit, ∝-tokoferol, katalaz gibi başka antioksidanlarla da donanmıştır[30,36].

NADPH oksidaz çok bileşenli bir enzim sistemidir. En az 7 farklı proteinden oluşur ve proteinler dinlenimdeki PNL'nin farklı bölgelerinde lokalizedir. Bu proteinlerin bazıları PNL aktivasyonu ile yer değiştirir. PKC, bağımlı p47 phox protein fosforilasyonuna yol açarak NADPH oksidaz aktivasyonunda anahtar rol oynar[30].

PNL'lerde diğer mikrosidal yol, NOS ile reaktif nitrojen ara ürünlerinin oluşmasıdır. NO/diğer labil ara ürünlerin oluşumu PNL inflamasyon mediatörleri ile karşılaşınca oluşur. PNL primer granül ve spesifik granüllerde bulunan nonoksidatif antimikrobiyal proteinlerde bakteri öldürebilir. Bunların en önemlileri, Katepsin G ve serprosidindir[30].

PNL aktivasyonu ve modülasyonu

PNL'ler, dinlenim, aktif ve primed olmak üzere üç farklı durumda bulunabilir. Tüm inflamatuar mediatörler PNL'leri doz-bağımlı olarak stimüle edebilirler. Herbir mediator PNL membran yüzeyindeki reseptöre bağlanır ve spesifik reseptörleri aracılığıyla PNL'leri aktive ederler. Reseptörler Gi_2 protein

aracılığıyla sinyali membran boyunca iletirler. Gi_2 protein PNL'lerde şekil değişikliği, adezyon, kemotaksis, fagositoz, granül sekresyonu, solunum patlamasının başlaması gibi hücresel yanıtlara yol açan değişiklikleri tetikler. PNL CXC reseptörlerinin aktivasyonu PI-spesifik PLC aktivasyonu ile IP_3 ve DAG oluşumuna yol açar. IP_3, Ca^{+2} salınımını tetikler. Ca^{+2}, PNL degranülasyon ve superoksit anyon oluşumunu artırır(30).

PI-3 kinaz ve PLD nötrofil aktivasyonunu içeren kemoatraktan reseptör sinyal iletim yolunda temel rol oynar. Bu enzimler ikinci haberciler üretir ve bu sonrası için nötrofillerde süperoksit üretimini oluşturur(37).

PLC aktivasyonunu fosfolipaz D (PLD) aktivitesi izler. PLD fosfotidil kolinde fosfatidik asit oluşmasını katalizler ve diaçilgliseridleri oluşur. DAG, PKC aktivitesini sağlar. Diaçilgliserol, adhere PNL'de solunum patlaması aktivasyonu ve degranülasyonu için önemli rol oynar (PNL'nin fibrinojene adhezyonu solunum patlamasını geciktirir, diaçilgliserol oluşması ile solunum patlaması gerçekleşir). PKC proteinlerin serin ve treonin rezidülerini fosforile eder. Fosforilasyon proteinlerinin yük ve yapılarında belirgin değişikliklere yol açar. NADPH oksidaz bileşeni p47 phox ve MARCKS proteini içeren PNL motil cevabı ile ilgilidir. (30).

PLA_2, fosfotidik asitten sonra araşidonik asit ve lizofosfotidik asit için kaynaklık eder. Araşidonik asit ve lizofosfotidik asit lipooksijenaz ürünleri ve LTB_4, PAF'a kaynak oluşturur(30).

Proteinlerin tirozin fosforilasyonu, kemotaktik agonistlerle aktivasyonunu takiben PNL'nin endotel veya başka yüzeylere adezyonu sırasında olur(30).

Tip IV kollajenin α3(IV) zincir peptidi, cAMP-bağımlı protein kinazın aktivasyonu ve Ser/Thr protein fosfataz yoluyla uyarılmış nötrofil fonksiyonlarını modüle eder. α3(IV) peptidiyle sinyal transdüksiyonu kalsiyum içeren yolla meydana gelmektedir. Bu süreçte adenozin, adenozin A_2 reseptörleri aracılığıyla cAMP artışına neden olduğu gösterilmiştir. Ser/Thr protein fosfataz ve/veya cAMP-bağımlı PKA, α3(IV) 185-203 peptid tarafından sinyal iletimiyle ilgilidir(38).

IL-15 birçok hücre tipinde (fibroblast, keratonositler, endotel hücresi, makrofajlarda) endotoksin veya mikrobiyal enfeksiyonlara yanıt olarak üretilmiş sitokindir. IL-15 T, B lenfositler, NK, monosit, eozinofil ve dolaşan nötrofilleri içeren immün sistemin çeşitli hücrelerinde etkisi gösterilmiştir. IL-15'in hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine, fagositozun kuvvetlendirmesine, birçok hücrede protein sentezi artışına neden olduğu ve apopitozisi geciktirdiği gösterilmiştir. Nötrofillerde kemokin üretimini sağlar(39).

Priming:

Nötrofillerde priming, uygun agonistlerin spesifik reseptörlerini tetiklemesi ile başlar ve nötrofiller şiddetli solunum patlaması veya salınım yanıtı ile sonuçlanır. Priming olayını başlatan agonistler üç ana tiptir:

1- Kemotaktik inflamatuvar mediatörler (7-transmembran domain reseptöre bağlanarak)

2- Serum Ig ve kompleman opsoninleri (tek transmembran reseptöre bağlanarak)

3- İnflamatuvar sitokin ve büyüme faktörleri (spesifik tek transmembran reseptörüne bağlanarak).

Bu sinyaller sitozolik Ca^{+2} düzeyini artırmaz, ancak intraselüler proteinlerin tirozin rezidülerini fosforile eder. Süreç; PKC, PLA_2 gibi serin/treonin kinazlar ya da kalmodulin-bağımlı kinazlarla işleyen Ca^{+2} sinyal sistemi ile Ca^{+2} bağımsız tirozin kinazlar arasında hücre içi "crosstalk" sonucu gelişir. Son basamak tüm hücresel proteinlerin fosforilasyonu ve artmış hücresel yanıttır. Nötrofiller bir agonistle primed durumuna gelir ve ikinci agoniste şiddeti artmış yanıt verir(30).

III. MATERYAL VE YÖNTEM

Denekler: Çalışmaya 19 ile 26 (22,35±3,35yıl) yaşları arasında, sağlıklı 14 erkek gönüllü alındı. Deneklerin son 10 gün içinde trombosit fonksiyonlarını etkilediği bilinen bir ajana maruz kalmamış olmasına özen gösterildi. Gönüllülerin bilgilendirildiği ve onayının alındığını gösteren belge gönüllüler tarafından okunup imzalandı (EK 1).

Kan örnekleri: Hafif bir kahvaltıdan yaklaşık 2 saat sonra, saat 9-9:30 arası, deneklerin antekübital venlerinden 21G kelebek setiyle girilerek 50 cc kan 1:9 (antikoagülan:kan) oranında %3.8 Na sitrat içeren silikonize tüplere alındı. Deneklerin, lökosit, eritrosit, trombosit ve lenfosit sayıları ile hemoglobin ve hematokrit değerleri, Coulter T 890 tam kan sayımı cihazı ile değerlendirildi. Tam kanda ADP ile indüklenen trombosit agregasyonu değerlendirilerek normal sınırlarda olan kanla çalışıldı.

Trombosit İzolasyonu: Trombositten zengin plazma (PRP) elde etmek için, kan 24 ^{0}C, 300xg hızda 15 dk santrifüje edildi. Elde edilen PRP, ADP (10µM, Chronolog Reagent) ile indüklenerek trombosit agregasyonu değerlendirildi. Normal agregasyonu olan deneklerde 1000µl PRP ayrılarak 5µl asetilsalisilik asit (ASA) eklenip oda sıcaklığında bekletilmeye alındı. Kalan PRP 1000xg hızda 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen trombosit pelleti modifiye Hank's Balanced Salt Solution (mHBSS) (NaCl 137 mM, KCl 5.4 mM, Na_2HPO_4 0.34 mM, KH_2PO_4 0.44 mM, Glukuz 5.5 mM, $NaHCO_3$ 4.2 mM, Albümin 20 mg/ml, pH 7.4) ile yıkanarak trombosit sayısı fizyolojik şartlara uygun olarak nötrofillerin 40 katı olacak şekilde resuspanse edildi[(40)].

Nötrofil İzolasyonu: PRP alındıktan sonra kalan kan 50 ml'lik tüplere konup üzerine, her 8cc kan için 1 ml Varihes (Hidroksietil nişasta (HES) 450/0.7, %6'lık çözelti) eklendi. +4 ^{0}C'de 1 saat sedimentasyona bırakıldı. 1 saatin sonunda üstteki plazma toplandı. Her 8 cc plazmaya karşılık 3 cc Ficoll histopaque-1077 olacak

şekilde, tüpün dibine Ficoll ve üstüne 4 cc soğuk mHBSS eklendi. Üstüne plazma yayılarak, +4 ^{0}C 1600 rpm'de 20 dk. santrifüj edildi. İşlem sonucunda kan hücreleri dansite gradiyentine göre tabakalandı. En altta nötrofiller ve az miktarda eritrosit (eritrositlerin büyük çoğunluğu varihes sedimentasyonu ile ekarte edildi), üstünde ficoll, bunun üstünde beyaz bir tabaka şeklinde lenfositler ve en üstte ise hücreden fakir plazma tabakası yer aldı. PNL pelleti üstündeki kısım atıldı. Nötrofillerle birlikte bulunan eritrositlerin hemolizi için 3 cc distile soğuk su eklendi, 30 sn. karıştırılıp bekletildikten sonra üstüne 3 cc %3'lük NaCl eklendi ve karıştırıldı. 4ml mHBSS eklenip +4 ^{0}C'de 1600 rpm'de 20 dk. santrifüj edildi. PNL pelleti üstündeki kısım atılarak 500 µl soğuk mHBSS ile resüspanse edilip nötrofil sayıldı. Eğer PNL pelletinde trombositle fazla bulaş varsa, pellet yine 5 cc mHBSS eklenerek +4 ^{0}C'de 500 rpm'de santrifüj edildi. Nötrofillerin sayısı trombositlerin sayısının 40'da biri olacak şekilde mHBSS ile resüspansiyonu yapıldı [41,42].

Nötrofillerin canlılığının testi için, trypan blue kullanıldı.0.1 g tyrpan blue 10 ml distile suda hazırlandı. 100 µl nötrofil pelleti, 200 µl mHBSS ve 100 µl tyrpan blue ile karıştırıldı. Nötrofillerin tyrpan blue'yu fagosite etmesi için 1-3 dk. beklendikten sonra, lam üzerine yayıp kurumaya bırakıldı. Nötrofilleri daha net değerlendirebilmek için zemin giemsa ile boyandı. Mikroskopta x100'lük büyütmede değerlendirildi[43].

Trombosit agregasyonu: Agregometre cihazında (Whole-Blood Aggro-Meter Model 560 Chrono-Log Corporation, PA, USA) impedans tekniği ile bakıldı. Teknik örneğe daldırılan iki platin elektrod direncin ölçümüne dayanır. Önce iki elektrot üstüne trombositler bir tabaka halinde yapışır. Agonist madde ile aktive olan trombositler elektrodlar üzerinde tabakalaşarak kümelenir. Artan trombosit sayısı elektrodlar arasında direnci artırır [18].

900 µl PRP ya da trombosit süspansiyonu 1000 µl'lik silikonize küvetlere alındı. Örneklere konulan teflon kaplı karıştırıcılar (stir bar) 1000 rpm hızda döndürüldü. Cihaz, grafik üzerinde 8 cm 20 ohm'luk dirence karşılık gelecek şekilde ayarlandı. Elde edilen eğri üzerinde maksimum ve minimum dirençler arasındaki fark ohm cinsinden agregasyonun şiddeti olarak değerlendirildi. Trombosit agregasyonu trombin (0,8U/ml, Chronolog Reagent) ile indüklendi.

Trombosit ATP Sekresyonu: Trombosit yoğun cisimlerinden sekrete edilen ATP miktarı WB agregometre kullanılarak biyoluminesans tekniği ile ölçüldü.

Bu teknik ile ATP miktarı, PRP veya tam kana eklenen, bir tampon fosfor bileşiği olan lusiferinin ATP varlığında verdiği ışık şiddeti ölçülerek saptanır (Lusiferin+ATP+O_2 *lusiferaz+Mg* AMP+PP+CO_2+oksilusiferin+ışık). Ortaya çıkan ışığın şiddeti ile orantılı olarak cihaz tarafından üretilen voltaj kaydedilir(6).

Trombin ile indüklenen trombosit agregasyonunu takiben örneklere 100µl lusiferin eklendi. Aktif trombositlerden sekrete edilen ATP ile kaydedilen voltaj, örneğe (900µl PRP ya da trombosit suspansiyonu) bilinen miktar ATP (2nM) eklenerek elde edilen standart ile karşılaştırılarak hesaplandı.

Nötrofil agregasyonu: N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (FMLP) ($5x10^{-7}$M final konsantrasyonda)) ile uyarılan nötrofillerde agregasyon Whole-Blood Aggro-Meter (Model 560WB, Chrono-Log Corporation, PA, USA) kullanılarak impedans tekniği ile değerlendirildi. Cihaz, grafik üzerinde 16cm 20 ohm'luk dirence karşılık gelecek şekilde ayarlandı. 1000µl örnek içine 400 rpm hızla dönen manyetik karıştırıcı eklendi. Elde edilen eğri üzerinde maksimum ve minimum dirençler arasındaki fark ohm cinsinden agregasyonun şiddeti olarak değerlendirildi(44).

Nötrofil kemiluminesansı: FMLP ile uyarılan nötrofil agregasyou ile eş zamanlı kemiluminesans ölçümü amacı ile örneklere 500µM/ml final konsantrasyonunda luminol eklendi. Cihazın biyoluminesan kanalı kullanılarak nötrofil kaynaklı kemiluminesan kaydedildi (44,45).

Deney protokolü:

Çalışmanın ilk aşamasında trombosit ve nötrofilin kontakt etkileşimini değerlendirmek için:

1-900 µl PRP üzerine 100 µl mHBSS eklenerek hazırlanan örneklere 0,25 U/ml trombin eklenerek agregasyon şiddeti değerlendirildi.

2-100 µl nötrofil resüspansiyonu 0.25 U/ml trombinle 10 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, 900 µl PRP eklenip agregasyon şiddeti kaydedildi.

Çalışmanın ikinci aşamasında aktif trombositlerden elde edilen süpernatantın nötrofil agregasyon ve kemiluminesansına etkisi araştırıldı. Trombin ile 10 dakika inkübe edilen trombosit suspansiyonu Eppendorf mikrosantrifüj ile 10000rpm'de 3 dakika süre ile santrifüj edilerek trombosit supernatantı elde edildikten sonra:

1- 500µl Nötrofil süspansiyonu + 500µl mHBSS ile dilüe edilerek, 16µl luminol ve 5µl FMLP ($5x10^{-7}$ M) eklendi. 20 dakika beklenerek nötrofil agregasyonu ve kemiluminesansı değerlendirildi.

2- 500µl Nötrofil süspansiyonuna + 500µl trombosit süpernatantı eklendi. 16µl luminol ve 5µl FMLP eklenerek nötrofil agregasyon ve kemiluminesansı değerlendirildi

Çalışmanın üçüncü aşamasında aktif nötrofillerden elde edilen süpernatantın trombosit agregasyonu ve ATP sekresyonuna etkisi araştırıldı. FMLP ile 10 dakika inkübe edilen nötrofil suspansiyonu Eppendorf mikrosantrifüj ile 10000rpm'de 3 dakika süre ile santrifüj edilerek nötrofil supernatantı elde edildikten sonra:

1-500µl Trombosit süspansiyonu + 500µl mHBSS ile dilüe edilerek, trombin eklendi. Trombosit agregasyonunu takiben 25µl lusiferin eklenerek ATP sekresyonu değerlendirildi.

2-500µl Trombosit süspansiyonuna + 500µl nötrofil süpernatantı eklendi. Trombin ile indüklenen trombosit agregasyonunu takiben lusiferin eklenerek ATP ve sekresyonu değerlendirildi.

İstatistiksel değerlendirme: Gruplar arası farklar non-parametrik Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Değerler ortalama (X) ± standart sapma (SD) olarak verildi.

IV. BULGULAR

Deneklerin kan parametreleri Tablo IV.1'de verilmiştir. Lökosit, eritrosit, trombosit sayıları ile hemoglobin ve hematokrit değerleri normal sınırlardadır.

Tablo IV.1: Deneklerin kan parametreleri (Lökosit, eritrosit, trombosit sayıları ve Hb, Htc değerleri)

Hb: Hemoglobin Htc: Hematokrit PLT: Trombosit
WBC: Lökosit RBC: Eritrosit

Sıra	WBC (x1000/mm^3)	RBC (x1000000/mm^3)	HGB (g/dl)	HCT (%)	PLT (x1000/mm^3)
1	6,4	4,68	13,5	40,9	183
2	5,7	4,72	14,7	42,7	140
3	8,6	3,98	10,1	30,6	208
4	5,4	4,65	13,7	39,2	191
5	7,8	4,62	14,5	42,1	215
6	4,2	5,13	15,4	46,1	246
7	5,5	5,07	15	43	144
8	6,1	4,59	13,4	39,4	166
9	4,9	4,85	14,7	44,9	164
10	6	4,69	14,5	41,7	194
11	6,4	5,03	15,2	44,3	222
12	5,8	4,29	12,9	40,2	124
13	6,4	5,13	14,7	44,3	194
14	7,8	4,31	12,9	39,8	197

Çalışmanın ilk aşamasında, trombin ile aktive edilen PRP'da agregasyon şiddeti ile trombinle inkübe edilen nötrofil süspansiyonu+PRP'da ölçülen agregasyon şiddeti arasında istatiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptandı ($p>0.05$). Agregasyon şiddeti değerleri Tablo IV.2'de verilmiştir.

Tablo IV.2: Trombinle indüklenen PRP ve trombinle inkübe edilen nötrofil süspansiyonu eklenen PRP'da kaydedilen agregasyon şiddeti (ohm) (n=11).

	PRP *(X±SD)*	*Nötrofil+PRP* *(X±SD)*	
Agregasyon Şiddeti Ohm (Ω)	19,5455 ±12,3079	20,9318 ± 11,2656	p>0.05

Çalışmanın ikinci aşamasında değerlendirilen; FMLP ile indüklenen nötrofiller ile aktif trombosit süpernatantı eklenen ve FMLP ile indüklenen nötrofillerde agregasyon şiddeti ve kemiluminesan değerleri Tablo IV.3'de verilmiştir. Trombosit süpernatantının eklenmesi ile nötrofil agregasyonunun istatistiksel olarak önemli derecede azaldığı (p=0,046), nötrofil kemiluminesansının ise arttığı (p=0,048) saptanmıştır.

Tablo IV.3: FMLP ile indüklenen nötrofiller (nötrofil süspansiyonu) ile aktif trombosit süpernatantı eklenmiş ve FMLP ile indüklenen nötrofillerde (nötrofil süspansiyonu + trombosit süpernatantı) agregasyon şiddeti ve kemiluminesan değerleri (n=7).

	Agregasyon Şiddeti (Ohm) (X±SD)	Kemiluminesan (Ünite) (X±SD)
Nötrofil süsp.	4,95±0,599	87,88±32,07
Nötr. süsp. + Tromb. Süpernatantı	1,23±0,976	379,56±187,04
	p=0,046	p=0,048

Çalışmanın üçüncü aşamasında kaydedilen trombinle indüklenen trombositlerde ve aktif nötrofil süpernatantı eklenen ve trombinle indüklenen trombositlerde agregasyon şiddetleri ve ATP sekresyon miktarlarına ait değerler Tablo IV.4'de verilmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark olmadığı gözlenmiştir (p=0.86, p=0.7).

Tablo IV.4: Trombinle indüklenen trombositlerde (trombosit süspansiyonu) ve aktif nötrofil süpernatantı eklenen ve trombinle indüklenen trombositlerde (trombosit süspansiyonu + nötrofil süpernatantı) agregasyon şiddeti ve ATP sekresyonu (n=7).

	Agregasyon Şiddeti (Ohm) (X±SD)	ATP Sekresyonu (nM) (X±SD)
Trombosit süsp.	3,47±1,36	1,06±0,51
Tromb. süsp. + Nötr. Süpernatantı	3,53±2,03	0,90±0,54
	p=0,866	p=0,7

V. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sunulan çalışmada trombositler ve nötrofiller arasındaki fonksiyonel etkileşiminin in vitro koşullarda ortaya konması amaçlanmıştır. Trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesinde impedans tekniği kullanılarak PRP'da trombosit agregasyonu, biyoluminesan tekniği kullanılarak ATP sekresyonu değerlendirilmiştir. Trombosit agregasyonunun değerlendirilmesinde partikül sayma, optik ya da impedans tekniği kullanılabilmektedir(46). İlk iki yöntem oluşan agregatın boyutları ile ilgili bilgi vermediğinden, tam kanda da değerlendirme yapılabilen impedans yöntemi tercih edilmektedir. PRP hazırlanması sırasında daha aktif olan büyük çaplı trombositlerin kaybına bağlı farklı sonuçlar alınabileceği vurgulandığından çalışmada tam kanda ve tam kandan elde edilen PRP'da ADP ile indüklenen trombosit agregasyonu değerlendirilmiş ve normal yanıt alınan deneklerle çalışılmıştır.

Trombosit aktivasyonu ile tüm granül içeriklerinin eş zamanlı salındığı bilinmektedir(2). Trombosit sekresyon fonksiyonu çeşitli yöntemlerle değerlendirilebilir. Trombosit kökenli proteinlerin (PF4, βTG) RIA veya ELİSA ile ölçümü yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyoluminesan tekniği ile ATP salınımı agregasyonla eş zamanlı değerlendirilebilmekte ve agregasyon-sekresyon ilişkisi konusunda bilgi vermesi nedeni ile tercih edilmektedir(47).

Fagositoz sırasında nötrofillerde belirgin oksidatif metabolizma değişiklikleri olmaktadır ve nötrofil kemiluminesansı artmaktadır. Nötrofil kemiluminesansı, membran bağımlı NADPH oksidaz ve granül kökenli miyeloperoksidaz aktivitesi ile süperoksit anyonu oluşumuna bağımlıdır. Kemiluminesan yanıtını ampfiliye eden luminolün tanımlanması ile, nötrofil fonksiyonlarının incelenmesinde, lüminol bağımlı kemiluminesan önemli bir yöntem haline gelmiştir(36,48). İmpedans tekniği ile nötrofil agregasyonun incelenmesi ise, nötrofil aktivasyonu ve adezyon fonksiyonlarının in vitro değerlendirilmesi bakımından duyarlı bir yöntemdir(49).

Sunulan çalışmanın ilk aşamasında trombinle inkübe edilen PRP'da ve trombinle inkübe edilen nötrofil süspansiyonu eklenen PRP'da agregasyon şiddeti karşılaştırıldı. Çalışma koşullarında, yüzeye (elektrotlara) tutunan aktif trombositlere nötrofil eklenmesinin agregasyon şiddetinde önemli değişiklik oluşturmadığı saptandı. Dolaşımda aktif trombositler tarafından eksprese edilen (dışa vurulan) P-selektinin nötrofillerin adezyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir. P-selektin bağımlı basamağın CD11b/CD18(Mac) aracılığı ile gerçekleşen sıkı adezyon bağlantısı ile devam ettiği ve çok basamaklı olduğu gösterilmiştir(50,51). Ancak bazı araştırıcılar tarafından trombositle indüklenen nötrofil adezyonunun yüksek makaslama koşullarında etkin olduğu ve P-selektin aracılı adezyonun hızlı ve geçici olduğu vurgulanmaktadır(50,52). Çalışmada kullanılan agregometre ile hücreler makaslama kuvvetine maruz kalmamaktadır. Nötrofil süspansiyonunun eklenmesiyle agregasyon şiddetinin değişmemesi in vitro koşullarda nötrofil-trombosit hücre temasının nötrofil adezyonu üzerine etkili olmadığı gibi trombosit adezyonu ve agregasyonu üzerine de etkili olmadığını göstermiştir.

Trombositlerin ya da ürünlerinin nötrofil fonksiyonları üzerine etkileri konusunda çelişkili araştırma sonuçlarına rastlanmaktadır. İn vitro koşullarda gerçekleştirilen çalışmalarda nötrofil:trombosit oranı önem kazanmaktadır. Sunulan çalışmada fizyolojik koşullara uyacak şekilde 1:40 nötrofil:trombosit oranı kullanılmıştır. Del Maschio ve arkadaşları(53) aktif trombositlerin nötrofil lizozomal enzim salınımını artırdığını ancak trombosit süpernatantlarının degranülasyona etkisi olmadığını göstermiştir. Drabikova ve arkadaşları(54) trombositlerin lüminol bağımlı nötrofil kemiluminesansını azalttığını ileri sürerken, birçok araştırıcı trombosit ürünleri ile nötrofil kemiluminesansının arttığını belirtmektedir(48,51,55). Trombositten salınan Trombosit faktör 4 (PF4) ve ATP'nin, nötrofil içi kalsiyum düzeyini artırarak trombosit ile tetiklenen nötrofil kemiluminesansına aracılık ettiği öne sürülmektedir(41,56,57). Sunulan çalışmanın ikinci aşamasında trombosit sekretuvar ürünlerinin nötrofil agregasyonu ve kemiluminesansına etkisi araştırıldı. Trombositler 10 dakika trombinle inkübe edildikten sonra santrifüj edilerek süpernatant alındı. Trombosit süpernatantı eklenen nötrofillerde birçok araştırma sonucu ile de uyumlu olarak kemiluminesansın arttığı ancak, agregasyonun azaldığı gözlendi.

Genel bilgilerde de belirtildiği gibi nötrofil aktivasyonu çok basamaklı ve karmaşık bir süreçtir. Trombositler ve ürünlerinin sürecin farklı basamaklarında farklı etkiler oluşturması olasıdır. Aktif trombositlerin kendileri de nötrofillere adhere olmaktadır. Ancak çalışmada trombosit süpernatantının nötrofil adezyonu ve agregasyonunu baskıladığı gözlenmiştir. Nitekim Iwabuchi ve Yamashita[58] trombinle aktive olan insan trombositlerinden salınan ve tip IV kollajen reseptörleri aracılığıyla nötrofil adezyonunu engelleyen bir faktör (AIF) tanımlamışlardır.

Literatürde FMLP ile uyarılan nötrofillerin trombosit aktivasyonuna yol açtığını belirten çalışmalara rastlanmaktadır[59,60]. Aktif nötrofillerden salınan katepsin G ve serbest radikallerin trombositleri aktive ettiği öne sürülmektedir[61,62]. Ancak serbest oksijen radikallerinin trombosit aktivasyonundaki rolü açık değildir ve doz bağımlıdır[63]. Bu çalışmada nötrofil süpernatantının trombosit agregasyon ve sekresyonunu etkilemediği gözlendi. Evangelista ve arkadaşları[59] trombosit aktivasyonu için nötrofil-trombosit temasının ön koşul olduğunu, salınan katepsin G'nin yüksek konsantrasyonlarda ve inhibitörlerden korunmuş olması gerektiğini vurgulamaktadır. Sunulan çalışmanın ilk basamağında trombinle indüklenen nötrofil süspansiyonunun PRP'a eklenmesi ile agregasyon şiddetinin değişmediği gösterilmiştir. Ancak bu basamakta nötrofiller FMLP ile aktive edilmemiştir. Literatür bulguları ve sunulan çalışmanın sonuçları nötrofille indüklenen trombosit agregasyonunun değerlendirilmesi için aktif nötrofil ve trombositlerin doğrudan temasını sağlayan koşullarda incelenmesi gerektiğini düşündürmektedir.

Diğer yandan Aziz ve arkadaşları[64] nötrofiller tarafından salınan elastazın trombositlerde GPIb kaybına yol açtığını göstermiş ve bunun fizyolojik önemi olabileceğini öne sürmüştür. Trombosit aktivasyonu da karmaşık ve hala çok bilinmeyenli bir süreçtir. Gerek trombosit aktivasyonu ve gerek nötrofillerin trombosit aktivasyonuna etkileri konusunda ileri düzeyde çalışmalara gereksinim vardır.

Bu çalışma aktif trombosit ürünlerinin nötrofil kemiluminesansını artırıp agregasyonu azaltarak nötrofil fonksiyonlarını etkilediğini göstermiştir. Bu sonuç, süreçte rol oynayan aracılar ve mekanizmalar konusunda ileri düzeyde gerçekleştirilecek sonuçlarla birlikte trombosit ve nötrofillerin birlikte yer aldığı

hemostaz ve inflamasyon gibi fizyolojik mekanizmaların yanısıra, miyokard infraktüsü, stroke ve ARDS gibi patolojik süreçlerin aydınlanmasına katkıda bulunacaktır. Nötrofillerin trombositler üzerine etkisi konusunda ise hücre-hücre temasını sağlayan ve dolaşım sisteminin özelliklerine uyan koşullarda çalışmalara gereksinim olduğu sonucuna varılmıştır.

VI.ÖZET

TROMBOSİT VE LÖKOSİTLER ARASINDA FONKSİYONEL ETKİLEŞİMİN İN VİTRO KOŞULLARDA İNCELENMESİ

Trombositler ve nötrofiller doku yaralanmasındaki hemostatik ve inflamatuvar cevapların önemli hücreleridir. Miyokard infarktusu, stroke ve ARDS (Yetişkin solunum sıkıntı sendromu) gibi damar bozukluklarını içeren hemostatik ve inflamatuvar süreçlerde birlikte yer alırlar. Nötrofillerin serbest oksijen radikalleri aracılığı ile doku faktörü üretimi ve trombosit aktivasyonunu düzenleyerek ateroskleroz ve tromboz patogenezinde önemli rol oynayabileceği vurgulanmaktadır. Diğer yandan trombositlerin de inflamasyonda rolü olabileceği düşünülmektedir.

Sunulan çalışmada PRP, trombosit, nötrofil süspansiyon ve süpernatantları kullanılarak, trombosit ve nötrofillerin agregasyon ve sekresyonları değerlendirildi. İlk aşamada yüzeye (elektrodlara) tutunmuş trombositlere nötrofil eklenmesinin agregasyon şiddeti üzerine etki göstermediği gözlendi. İkinci aşamada trombinle inkübe edilen trombositlerin sekretuvar ürünlerinin nötrofil agregasyonunu azalttığı, oysa nötrofil kemiluminesansı artırdığı saptandı. Çalışmanın üçüncü aşamasında FMLP ile uyarılan nötrofillerden elde edilen süpernatantın trombosit agregasyon ve sekresyonu üzerine etkisinin olmadığı saptandı.

Sunulan çalışmada trombosit süpernatantının nötrofil agregasyonunu azaltığı ve kemiluminesansını artırdığı gösterilmiştir. Trombositten salınan PF4 ve ATP'nin nötrofil Ca^{+2} düzeyini artırarak nötrofil kemiluminesansını arttırdığı öne sürülmektedir. Çok basamaklı ve karmaşık bir süreç olan nötrofil aktivasyonunda trombosit ürünlerinin etkisini ayrı ayrı incelenerek mekanizmanın ortaya konması MI, stroke ve ARDS gibi çeşitli patolojik mekanizmaların çözümüne katkıda bulunacaktır.

Nötrofil süpernatantının ise trombosit agregasyonu ve biyolüminesansını etkilemediği, nötrofil süspansiyonunun PRP'a eklenmesi ile agregasyon şiddetinin değişmediği saptandı. Nötrofillerin trombositler üzerine etkisi konusunda hücre-hücre temasını sağlayan ve dolaşım sisteminin özelliklerine uyan koşullarda çalışmalara gereksinim olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar sözcükler: Trombosit agregasyonu, trombosit sekresyonu, nötrofil agregasyonu, nötrofil kemiluminesansı.

SUMMARY

IN VITRO EVALUATION OF PLATELET-LEUCOCYTE FUNCTIONAL INTERACTION

Platelets and neutrophils are effector cells of inflammation and hemostasis in the damaged tissues. They are involved in inflammation and hemostasis of dissease of the vessels i.e. MI, stroke and ARDS (Adult Respiratuvary Distress Syndrome).It is emphasized neutrophils regulate platelet activation in atherosclerosis and thrombosis pathogenezis by tissue factor and free oxygen radicals. One another hand, platelets can received to play a role in inflammatory responses.

In this study, we aimed to investigate the role of neuthrophil suspension and supernatant on platelet aggregation and bioluminescence, and the role of platelet suspension and supernatant on neuthrophil aggregation and chemiluminescence.

In the first stage, the effect of neutrophil suspension added to PRP on aggregation was investigated. No alteration in intensity of aggregation was observed underconditionals. In the second stage, neutrophil aggregation and chemiluminescence with the supernatant of thrombine pretreated-platelets is investigated. Platelet supernatant increased neutrophil chemiluminescence, but decreased neutrophil aggregation. In the third stage platelet aggregation and secretion with the supernatant of FMLP pretreated-neutrophils were investigated. It was observed that neuthrophil supernatant had no effect on platelet aggregation and secretion.

The present study have shown that platelet supernatant decreased neutrophil aggregation and increased chemiluminescence. It is suggested that PF4 and ATP, released from platelets, increase neutrophil chemiluminescence by increase cytoplasmic Ca^{+2} level. The effect of all of the platelet products on neutrophil

activation, which is a multi-step and complicated process, must be examined to understand the mechanisms in MI, stroke and ARDS.

No alteration was found in intensity of aggregation by adding neutrophil suspension to PRP and neutrophil supernatant did not change platelet aggregation and bioluminescence. Further studies provide cell-cell contact and under flow conditions are needed to observe the effect of neutrophils on platelets.

Key words: Platelet aggregation, platelet secretion, neutrophil aggregation, neutrophil chemiluminescence

VII. KAYNAKLAR

1) Zucher-Franklin, D.: Megakaryocyte and Platelet Structure. In Heamatology Basic Principles and Practice. Hoffman R., Benz, E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Sılberstein, L.E., McGlave, 3rd Edition ,Churchil Livingstone, USA, pp1730-1740, 2000.

2) Williams,W., Beutler, E., Erslew, A., Lichtman, M.: Platelet morphology and function. In Heamatology, 4th Edition, McGrav-Hill Book Company, USA, 1172, 1991.

3) Long, M.W., Hoffman, R.: Thrombocytopoesis. In Heamatology Basic Principles and Practice. Eds. Hoffman R., Benz, E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Sılberstein, L.E., McGlave, 3rd Edition ,Churchil Livingstone, USA, pp245-258,2000.

4) Ersöz, G.: Submaksimal Egzersizin Trombosit Fonksiyonları Üzerine Etkisi. Uzmanlık Tezi,1992, Ankara.

5) Sodeman, W., Sodeman, T.: Pathophsiology of hemostasis and thrombosis. In Sodeman's Pathologic Phsiology, 7th Edition, W.B. Saunders Company, USA, 705-759, 1985.

6) Phillips, D.R., Jennings, L.K., Edwards, H.H.: Identification of membran proteins mediating the interaction of human platelets. J Cell Biol 86: 77-86, 1980.

7) Ulutin, O.N.: Platelet morphology.In The platelets, 1st Edition, Kağıt ve Basım işleri A.Ş., Turkey, 7-36, 1976.

8) Williams, W., Beutler, E., Erslew, A., Lichtman, M.: Platelet morphology and function. In Hematology, 4th Edition, Mc Graw Hill Book Company, USA, 1121-1135, 1985.

9) Plow, E. F., Ginsberg, M.H.: The Molecular Basis for Platelet Function. In Heamatology Basic Principles and Practice. Eds Hoffman R., Benz, E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Sılberstein, L.E., McGlave, 3rd Edition ,Churchil Livingstone, USA, pp1741-1752, 2000.

10) Pacham, M.A: Role of Platelets in Thrombosis and Hemostasis. Can J Physiol 1994; 72: 278- 84.

11) Groot, P.G.: Annotation. British Journal of Haematology, 1990;75, 308-312.

12) Ginsberg MH, Loftus J, Plow EF.: Platelets and the Adhesion Receptor Superfamily. Prog Clin Biol Res 283:171, 1988.

13) Shattil, S.J., Kashiwagi, H., Pampori, N.: Integrin Signaling: The Platelet Paradigm. Blood, 1998; 91(8), pp2645-2657.

14) Ruggeri, Z.M.: Mechanisms of Shear-induced Platelet Adhesion and Aggregation. Thrombosis and Haemostasis 1993; 70(1): 119-23

15) Gerrard, J.M.: Platelet Aggregation: Cellular Regulation and Physiologic Role. Hospital Practice, 1988; January 15; 89-104.

16) Calvete, J.J.: Clues for Understanding The Structure and Function of a Prototypic Human Integrin: The Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Complex. Thrombosis and Haemostasis 1994; 72(1): 1-5.

17) Born, G.V.R.: Quantative Investigation into The Aggregation of Blood Platelets. J Physiol 162: 67-68, 1962.

18) Cardinal, D.C., Flower, R.J.: The Electronic Aggregometer: A Novel Device For Assesing Platelet Behaviour İn Blood. J Pharmacol Met 3: 135-158, 1980.

19) Brass, L.F.: The Molecular Basis for Platelet Activation. In Heamatology Basic Principles and Practice. Eds Hoffman, R., Benz, E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Sılberstein, L.E., McGlave, 3rd Edition ,Churchil Livingstone, USA, pp1753-1769, 2000.

20) Ersöz, G.: Trombosit Aktivasyonu. A.Ü. Tıp Fakültesi Mecmuası 1997; 50(3):163-172.

21) Brass L.F., Hoxie J.A., Manning D.R..: Signaling Through G Proteins and G Protein-coupled Reseptors During Platelet Activation. Thromb Haemost 1993; 70(1): 217-223.

22) Siess W. Molecular mechanisms of Platelet Activation. Physiol Rew 1989; 69(1):58.

23) Rao G.H.R., White J.G.: Influence of Phospholipase A_2 on Human Blood Platelet Alpha Adrenergic Receptor Function. Thromb Res 1989; 53: 427-34.

24) Gachet, C., Cazenave, J.P.: ADP Induced Blood Platelet Activation: A Review. Nouv Rev Fr Hematol 1994; 33:347-58.

25) Berridge, M.J.: Inositol Triphosohate and Diacylglyserol as Second Messengers. Biochem J 1984; 220: 345-60.

26) Authi, K.S.: Ca^{+2} Homeostasis and Intracellular Pools in Human Platelets.In Mechanisms of Platelet Activation and Control. Eds Authi, K.S., New York: Plenum Press, 1993: 83-104.

27) Rana, R.S., Lowell, E.H.: Phosphoinositides in Signal Transduction. 1990; 70: 121-43.

28) Bachelot, C., Cano, E., Grelac, F., et al. Functional İmplications of Tyrosine Protein Phosphorilation in Platelets. Biochem J 1992; 284:923-8.

29) Siess, W., Grünbergt, B., Luber, K.: Functional Relationship Betwen Cylic AMP-dependent Protein Phosphorylation and Platelet Inhibition. In Mechanisms of Platelet Activation and Control. Eds. Authi, K.S., New York: Plenum Press, 1993; 229-35.

30) Baehner, R.L. Normal Neutrophil Structure and Function. In Heamatology Basic Principles and Practice Hoffman, R., Benz, E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Sılberstein, L.E., McGlave, 3rd Edition ,Churchil Livingstone, USA, pp667-685, 2000.

31) Bainton, D.F., Morphology of Neutrophils In Hematology, Williams, W.J., Beutler, E., Erslev, A.J., Lichtman, M.A.,Fourth Edition, McGraw-Hill Publishing Company, USA,761- 806.

32) Roitt, I., Brostoff, J., Male, D.: Polymorphs and Mast Cells. In Immunology, Fourth Edition, Mosby, Spain, pp2.15, 1996

33) Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L., Acute and Chronic Inflammation. In Basic Pathology, Sixty Edition, W.B. Saunders Company, pp28-33, 2000.

34) Forslund, T., Nilson, HM., Sundqvist, T.: Nitric oxide regulates the aggregation of stimulated human neutrophils. Biochem Biophys Res Commun; 2000, 274(2), pp.482-7.

35) Bednar, M.M., Gross, C.E.: Sımple whole blood procedure for neutrophil aggregation & chemiluminescence with the chrono-log whole blood lumi-aggregometer. Chrono-Log Corporation News; 2001, PP.2-4.

36) DeChalet, L.R., Long, G.D., Shırley, P.S., Bass, D.A., Thomas, M.J., Henderson, F.W., Cohen, M.S.: Mecnanism of the Luminol-dependent Chemiluminescence of Human Neutrophils. The J Immunulogy 1982; 129(4): 1589-93.

37) Yasui, K., Komiyama, A.: Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase D in temporal activation of superoxide production in FMLP-stimulated human neutrophils. Cell Biochem Funct; 2001, 19(1), pp.43-50.

38) Fawzi, A.,Robinet, A., Monboisse, JC., Ziaie, Z., Kefalides, NA., Bellon, G.: A peptide of the alpha 3(IV) chain of type IV collagen modulates stimulated neutrophil function via activation of cAMP-dependent protein kinase and Ser/Thr protein phophatase. Cell Signal; 2000, 12(5), pp.327-35.

39) Cassatella MA., McDonald, PP.: Interleukin-15 and its impact on neutrophil function. Curr Opin Hematol; 2000, 7(3),pp.174-7.

40) Pacham, M.A., Kinlough-Rathbone, R.L., Mustard, J.F.: Thromboxane A_2 Causes Feedback Amplification Involving Extensive Thromboxane A_2 Formation on Close Contact of Human Platelets in Media With a Low Concentration of Ionized Calcium. Blood 1987; 70(3):647-51.

41) Ruf, A. et al. Contact-induced neutrophil activation by platelets in human cell suspensions and whole blood. The American Society of Hematology; 1992; 80(5):1238-46.

42) Boyum, A. Separation of lymphocytes, granulocytes, and monocytes from human blood using iodinated density gradient media. Methods In Enzymology ;1984, 108: 88-102.

43) Krajian, A.: Tissue Staining Methods In Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. Eds Frankel, S., Reitman, S., Sixth Edition Volum 2, The C. V. Mosby Company ,pp1691, 1963.

44) Bednar, M.M., Gross, C.E.: Simple Whole Blood Procedure for Neutrophil Aggregation & Chemiluminescence with the Chrono-Log Whole Blood Lumi-Aggregometer. Chrono-Log Corporation News,2001; 2-5.

45) Allen, R.: Phagocytic Leukocyte Oxygenation Activities and Chemiluminescence: A Kinetic Approach to Analysis. Methods In Enzymology 1986;133;449-93.

46) Sweeney, J.D., Labuzetta, J.W., Michielson, C.E., Fitzpatrick, J.E.: Whole Blood Aggregation Using Impedance and Particle Counter Methods. Am J Clin Pathol 1989; 92:794-7.

47) Wojenski, C., Silver, M.J.: A Quick Method for screening platelet Dysfunctions Using the Whole Blood Lumi- aggregometer. Thromb Haemostas 1984; 5(2): 154-156.

48) Aziz, K.A., Cawley, J.C.; Zuzel, M.: Platelets prime PNL via released PF4. mechanism of priming and synergy with GM-CSF. British Journal of Haematology 1995; 91:846-853.

49) Simon, S.I., Rochon, Y.P., Lynam, E.B., Smith, C.W., Anderson, D.C., Sklar, L.A.: β2-Integrin and L-Selectin are Obligatory Receptors In Neutrophil Aggregation. Blood 1993; 82(4):1097- 1106.

50) Ostrovsky, L., King, A.J., Bond, S., Mitchell, D., Lorant, D.E., Zimmerman, G.A., Larsen, R., Niu, X.F., Kubes, P.: A Juxtacrine Mechanism for Neutrophil Adhesion on Platelets Involves Platelet-Activating Factor and a Selectin-Dependent Activation Process. The American Society of Hematology 1998; 91(8): 3028-36.

51) Ruf, A. et al. Platelet-induced neutrophil activation: platelet-expressed fibrinogen induces the oxidative burst in neutrophils by an interaction with CD11c/CD18. British journal of Haematology, 1995; 90: 791-96.

52) Kuijper, P.H.M., Torres, H.I., van der Linden, J.A.M., Lammers, W.J., Sixma, J.J., Koenderman, L., Zwaginga, J.J.: Platelet-Dependent Primary Hemostasis Promotes Selectin- and Integrin- Mediated Neutrophil Adhesion to Damaged Endothelium Under Flow Conditions. Blood 1996; 87(8):3271-81.

53) Maschio, A.D., Corvazier, E., Maillet, F., Kazatchkine, M.D., Maclouf, J.: Platelet-dependent Induction and Amplification of Polymorphonuclear Leucocyte Lysosomal Enzyme Release. British J Haematology 1989; 72: 329-35.

54) Drabikova, K., Jancinova, V., Nosal, R., Danihelova, E.: Human Blood Platelets, PNL Leukocytes and Their Interaction In Vitro. Responses to Selective and Non-selective Stimuli. Gen Physiol Biophys 2000; 19(4): 393-404.

55) Nagata, K., Tsuji, T., Todoroki, N., Katagiri, Y., Tanoue, K., Yamazaki, H., Hanai, N., Irimura, T.: Activated Platelets Induce Superoxide Anion Release by Monocytes abd Neutrophils Through P-Selectin (CD62). The J Immunology 1993; 151(6): 3267-73.

56) Peterson, F., Bock, L., Flad, HD., Brandt, E.: Platelet Factor 4-Induced Neutrophil-Endothelial Cell Interaction: Involvement of Mechanims and Functional Consequences Different From Those Elicited by Interleukin-8. Blood 1999; 94(12): 4020-28.

57) Petersen, F., Ludwing, A., Flad, HD., Brandt, E.: TNF-α Renders Human Neutrophils Responsive to Platelet Factor 4 (Comparison of PF-4 and IL-8 Reveals Different Activity Profiles of the Two Chemokines). The Journal of Immunulogy 1996;156 :1954-62.

58) Iwabuchi, K., Yamashita, T.: Platelet-Derived Neutrophil Adherence-Inhibiting Factor In Humans. Blood 1990; 76(11):2368-73.

59) Evangelista, V., Rajtar, G., Gaetano, G., White, J.G., Cerletti, C.: Platelet Activation by FMLP- Stimulated Polymorphonuclear Leukocytes: The Activity of Catepsin G ıs not Prevented by Antiproteinases. Blood 1991; 77(11): 2379-88.

60) Maschio, D., Dejena, E., Bazzoni, G.: Bidirectional modulation of platelet and polymorphonuclear leukocyte activities. Ann Hematol, 1993; 67:23-31.

61) Yan, Z., Zhang, J., Holt, J.C., Stewart, G.J., Niewiarowski, S., Poncz, M.: Structural Requirements of Platelet Chemokines for Neutrophil Activation. Blood 1994;84(7):2329-39.

62) Renesto P, Tahar MS, Chıgnard M. Modulation by superoxide anions of neutrophil-mediated platelet activation. Biochemical Pharmacology 1994; 47(8): 1401-1404.

63) Ersöz, G., Ocakçıoğlu, B., Baştuğ, M., Fıçıcılar, H., Yavuzer, S.: Platelet Agregation and Release Function in Hyperbaric Oxygenation. Undersea and Hyperbaric Medical Society 1998;229-32.

64) Aziz, K.A., Cawley, J.C., Kamıgutı, A.S., Zuzel, M.: Degradation of Platelet Glycoprotein Ib by Elastase Released from Primed Neutrophils. British J Haematology 1995; 91:46-54.

VIII. EK

GÖNÜLLÜLERİN BİLGİLENDİRİLDİĞİ VE RIZASININ ALINDIĞINI GÖSTEREN METİNDE YERALMASI GEREKEN HUSUSLARI:

1- Araştırmanın Amacı: Yapılan çalışma trombosit (kan pulcukları) ve lökositler (akyuvar) arasındaki fonksiyonel etkileşimin mekanizmalarının in vitro (yapay) ortamda araştırmaktır.

2- Araştırma ve denekle ilgili çalışmalar: Trombosit ve lökositler doku yaralanmasındaki hemostatik (kan pıhtılaşma sistemi ile ilgili) ve inflamatuar (yangı) cevapların önemli aracı hücreleridir.MI (kalp krizi) ve stroke (inme) gibi damar bozukluklarını içeren hemostatik ve inflamatuar süreçlerde birlikte aktifleşirler ve olasılıkla bu gibi hastalıkların fizyopatolojik mekanizmalarına katılırlar.

   Yaş sınırı 20-30 olan sigara içmeyen, son bir haftada herhangi bir ilaç almamış olan sağlıklı erkek gönüllüler çalışmaya alınmaktadır. Deneklere dışardan ilaç verilmeyecektir. Denek sabah aç karınla gelecek ve 15 dakika dinlendikten sonra sağ veya sol önkoldan venöz damara (toplardamar) enjektör veya vacuteynırla girilerek 50cc kan alınacak ve bu işlem araştırma bulgularına bağlı olarak en çok iki (2) defa yapılacaktır.

   Aldığımız kan çeşitli işlemlerden geçirilerek trombosit ve lökositler ayrılır. Ayrılan bu hücreler çeşitli ajanlarla (kimyasal maddeler) uyarılıp birbirini ne yönde etkiledikleri değerlendirilir.Eğer etki saptanırsa, sonraki aşamada burda rol alan aracımaddelerle fizyomekanizmaların aydınlatılması planlanmaktadır.

3- Uygulama sırasında karşılaşabileceği rahatsızlıklar ve riskler: Kan alma sırasında ve sonrasında kan alınan bölgede ekimoz (morarma) meydana gelebilir ve bunun herhangi bir riski yoktur.

4- Kişi veya kişiler için araştırmadan beklenen tıbbi yarar: Araştırma sonucunda bulduğumuz sonuçlar MI (kalp krizi), stroke (inme), ARDS (Yetişkinin solunum

zorluğu sendromu) gibi trombotik (damar tıkanması) ve inflamatuar hastalıklarda bilim dünyasında yeni tartışmalara yol açıp, ilgili hastalıkların bilinmeyen mekanizmalarını aydınlatıp, hastalık sağaltım süreçlerinde kullanılabilecek bu araştırma süreçleri yeni tanı ve tedavi olanakları sunabilir.

5- Araştırma sırasında kan alınan önkolda hafif ekimoz (morarma) dışında başka zararlı etki yoktur ve tedavi gerektirmez.

Bilgi için ilişki kurulabilecek kişi: Adı ve Soyadı:

Telefon. ve adres:

6- Araştırmaya gönüllü olarak katılacaktır,

Araştırmaya katılmayı red etme hakkına ve araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir,

Gerektiğinde gönüllünün kendi rızasına bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma harici bırakılabilir.

7- Çalışmadaki gönüllülerin yaklaşık sayısı: 25

8- Çalışmada uygulanacak testlerle ilgili gönüllü ve sosyal güvencesini sağlayan kurum yük altına girmeyecektir.

Ben.....Yukarıda okuduğum çalışma ile ilgili bilgiler bana sözlü olarak da iletildi. Bçalışmaya gönüllü olarak kendi rızamla katılmak istiyorum.

Hasta adı soyadı: imza

Doktor adı soyadı: Doç.Dr. Gülriz Ersöz imza

Dr. Ali Yakaryılmaz imza