

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**TROMBOSİT AFEREZİNİN DONÖR KOAGÜLASYON
SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Fatih TAŞTEKİN

İç Hastalıkları Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR

2016

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TROMBOSİT AFEREZİNİN DONÖR KOAGÜLASYON
SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Fatih TAŞTEKİN

İç Hastalıkları Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI
Doç. Dr. Eren GÜNDÜZ

ESKİŞEHİR

2016

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI**T.C.****ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ****TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĐI'NA**

Dr. Fatih TAŞTEKİN'e ait "Trombosit aferezinin donör koagölasyon sistemi üzerine etkisi" isimli çalışma jürimiz tarafından İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: .. / .. /

Jüri Başkanı

Doç. Dr. Eren GÜNDÜZ

İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Üye

Doç. Dr. Hava ÜSKÜDAR TEKE

İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Üye

Doç. Dr. Fahri ŞAHİN

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun/...../.....

Tarih ve/..... Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Enver İHTİYAR

Dekan

TEŞEKKÜR

Uzmanlık tezimi hazırlama sürecinde bilgi ve deneyimi ile bana yol gösteren tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Eren GÜNDÜZ'e, katkılarından dolayı, Prof. Dr. Olga Meltem AKAY'a, Doç. Dr. Hava ÜSKÜDAR TEKE'ye, Doç. Dr. Fahri ŞAHİN'e, istatistiksel değerlendirmeleri yapan Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Ertuğrul ÇOLAK'a, trombosit agregasyon çalışmalarını yapan kimyager Gülseren TOĞRAL'a, yardımlarını esirgemeyen flow ünitesi personeli ve özellikle teknisyen Ahmet CAN olmak üzere tüm aferez ünitesi personeline teşekkür ederim.

ÖZET

Taştekin,F. Trombosit aferezinin donör koagülasyon sistemi üzerine etkisi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2016. Aferez trombosit süspansiyonu; daha az lökosit içermesi, daha az sayıda donör gerektirdiğinden enfeksiyon riskinin az olması, havuzlama yapılmadığından bakteriyel kontaminasyon riskinin az olması, yeterli miktarda konsantre ürün elde edilmesi ve febril non-hemolitik transfüzyon reaksiyonlarını azaltmasıyla güvenli bir yöntemdir. Aferez donasyonu genel olarak güvenli bir işlem olarak kabul edilmekle birlikte işlemin koagülasyon, fibrinolizis ve trombosit aregasyonu üzerine etkileri net değildir. Ekstrakorporal dolaşımın olduğu hemodiyaliz ve açık kalp cerrahisinde olduğu gibi aferez donörlerinde de donör kanının yapay yüzeyler ile teması ve santrifüj sırasında eksternal kuvvetlere maruz kalması trombosit ve/veya lökositleri aktive edebilir. Çalışmamızda trombosit aferezi yapılan sağlıklı donörlerde işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1 gün sonra ve 1 hafta sonra olmak üzere trombosit-nötrofil, trombosit-monosit, trombosit-lenfosit agregat düzeyleri, trombosit aktivasyon göstergesi olarak CD62P (P-selektin) düzeyleri ve hemostatik sistemin aktivasyon göstergesi olarak protrombin fragman 1+2 düzeyleri çalışılarak aferez işleminin donörlerde ortaya çıkaracağı koagülasyon sistem değişikliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda trombosit-granülosit, trombosit-lenfosit ve trombosit-monosit agregat düzeylerinde trombosit aferezi sonrası azalmayı takiben 1. gün ile 1. hafta sonunda tekrar istatistiksel olarak anlamlı bir artış olması işlemin donörlerde prokoagulan bir duruma yol açtığını düşündürmektedir. Hemostatik aktivasyonun in vivo moleküler göstergesi olan protrombin fragman 1+2 ve trombosit aktivasyon göstergesi olan P-selektin düzeylerinde trombosit aferezi sonrasında azalma saptanmış, daha sonra ise artış olmakla birlikte bazal değere ulaşamamış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Sonuç olarak, trombosit aferezi sonrası trombosit-granülosit, trombosit-lenfosit ve trombosit-monosit agregat düzeylerinde saptanan artış donörlerdeki hiperkagülabl durumu desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Trombosit aferez, trombosit-nötrofil agregat, P-selektin, protrombin fragman 1+2

ABSTRACT

Taştekin,F **The effect of plateletpheresis on coagulation system of healthy donors. Eskisehir Osmangazi University, Faculty of Medicine Department of Internal Medicine Speciality in Medicine Thesis, Eskisehir,2015.** Apheresis platelet suspension is safer compared to platelet suspension, due to containing less leukocyte, low risk of infection because of being taken from single donor, low risk of bacterial infection because of not being pooled, obtaining a sufficient amount of concentrated product and causing less febrile nonhemolytic transfusion reaction. As plateletpheresis donation is commonly accepted as a safe procedure, the effect on the coagulation system, fibrinolysis and platelet aggregation is not known well. Similar to hemodialysis and open heart surgery procedure including extracorporeal blood flow, the contact of blood with artificial surfaces and also external forces during centrifugation may activate platelets and/or leukocytes. In our study we examined the effects of plateletpheresis on the coagulation system of donors, before, immediately after, 1 day after and 1 week after the process by evaluating the levels of platelet-lymphocyte, platelet-monocyte, platelet-neutrophil aggregates, CD62P (P selectin) levels as thrombosis activation indicator and prothrombin fragment levels as the hemostatic system activation indicator. In our study, there was a reduction in the platelet-granulocyte, platelet-monocyte, platelet-lymphocyte aggregate levels after plateletpheresis, there was also a statistically significant increase on 1 day and 1 week later, suggesting that the process causes a procoagulant state in the donors. There was a reduction in the prothrombin fragment levels, as an in vivo molecular indicator of the hemostatic activation and P-selectin levels, as a platelet activation indicator, after plateletpheresis. Although there was an increase shown later, the values did not reach the basal levels and was not statistically significant. As a result the increase detected in the platelet-granulocyte, platelet-monocyte, platelet-lymphocyte aggregate levels after plateletpheresis support a hypercoagulable state in donors.

Key Words: Plateletpheresis, platelet-neutrophil aggregate, P-selectin, prothrombin fragment.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLOLAR DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Aferez	2
2.1.1. Aferezin Tarihçesi	2
2.1.2. Trombosit aferezi	3
2.1.3 Trombosit aferezi Teknikleri	3
2.1.4 Donör Aferezi Komplikasyonları	4
2.2. Hemostaz	10
2.2.1.Primer Hemostaz	10
2.2.2.Sekonder Hemostaz	13
2.2.3. Fibrinolitik Sistem	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM	17
3.1. Etik Kurul ve Proje Destek Onayı Bilgileri	17
3.2. Hasta Seçimi ve Hasta Grubu Materyalleri	17
3.3. İstatistiksel Değerlendirme	19
4.BULGULAR	20
5.TARTIŞMA	30
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	36
KAYNAKLAR	37

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP	Adenozin difosfat
aPC	Aktive Protein C
aPTT	Aktive parsiyel tromboplastin zamanı
ASA	Asetilsalisilik asit
AT	Protein antitrombin
BK	Beyaz küre
BTG	Beta tromboglobulin
CD62	P-selektin
EGF	Endotelial hücre büyüme faktörü
EIA	Enzim immünassay
ESOGÜTF	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
PRP	Platelet Rich Plazma
Faktör I	Trombin fibrinojen
FP A	Fibrinopeptid A
FP B	Fibrinopeptid B
FS	Fosfatidil serin
Gp	Glikoprotein
Hb	Hemoglobin
HPLC	Yüksek performanslı likit kromatografi
IL-6	İnterlökin 6
INR	İnternational Normalize Ratio
NSAII	Nonsteroidal anti inflamatuvar ilaç
PAF	Platelet aktive edici faktör
pAI-1	Plazminojen aktivator inhibitör-1

PDGF	Trombosit Growth Faktör β
PECAM I	Platelet endoteliyal hücre adezyon molekülü I
PF IV	Platelet faktör IV
S	Solubl
TF	Doku faktör
TFPI	Doku faktör yolu inhibitörü
t-pA	Doku plazminojen aktivatörünün
TxA2	Tromboksan A2
u-pA	Ürokinaz tipi plazminojen
VEGF	Vasküler endoteliyal büyüme faktörü
vWF	Von Willebrand faktör

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1 Trombosit ve içerdđđ granüller	12
2.2 Fibrin pıhtısı oluşumu	14
2.3 Koagülasyon kaskadının alt birimleri	15
2.4 Fibrinolitik yolun ana bileşenleri	16

TABLÖLAR

	Sayfa
2.1 Donör aferezi komplikasyonları	9
4.1. Trombosit aferezi yapılan donörlerin işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1 gün sonra ve 1 hafta sonraki hematolojik parametrelerinin karşılaştırılması	21
4.2. Trombosit aferezi yapılan hastaların işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1 gün sonra ve 1 hafta sonraki lenfosit + trombosit agregatı (CD41 FITC+ ve CD45 PerCP+ granülositler içindeki yüzde değeri) düzeylerinin karşılaştırılması	22
4.3. Trombosit aferezi yapılan hastaların işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1 gün sonra ve 1 hafta sonraki monosit + trombosit agregatı olarak değerlendirilen (CD41 FITC+ ve CD45 PerCP+) lökositler içindeki yüzde değerlerinin karşılaştırılması	24
4.4. Trombosit aferezi yapılan hastaların işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1 gün sonra ve 1 hafta sonraki granülosit + trombosit agregatı olarak değerlendirilen (CD41 FITC+ ve CD45 PerCP+) granülositler içindeki yüzde değerlerinin Karşılaştırması	25
4.5. Trombosit aferezi yapılan hastaların işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1 gün sonra ve 1 hafta sonraki P-selektin olarak değerlendirilen CD62 değerlerinin karşılaştırılması	27
4.6. Trombosit aferezi yapılan hastaların işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1 gün sonra ve 1 hafta sonraki protrombin fragman 1+2 değerlerinin karşılaştırılması	28

1. GİRİŞ

Trombosit transfüzyonu trombositopenisi ya da trombosit fonksiyon bozukluğu olan ve kemoterapi alan hastalarda hayati önem taşımaktadır ve trombosit transfüzyon ihtiyacı gün geçtikçe artmaktadır. Aferez trombosit süspansiyonu, daha az lökosit içermesi, daha az sayıda donör gerektirdiğinden enfeksiyon riskinin az olması, havuzlama yapılmadığından bakteriyel kontaminasyon riskinin az olması, yeterli miktarda konsantre ürün elde edilmesi ve febril nonhemolitik transfüzyon reaksiyonlarını azaltmasıyla güvenli bir üründür. Aferez donasyonu genel olarak güvenli bir işlem olarak kabul edilmekle birlikte işlemin koagülasyon, fibrinolizis ve trombosit agregasyonu üzerine etkileri net değildir. Ektrakorporel dolaşımın olduğu hemodiyaliz ve açık kalp cerrahisinde olduğu gibi aferez donörlerinde de donör kanının yapay yüzeyler ile teması ve santrifüj sırasında eksternal kuvvetlere maruz kalması trombosit ve/veya lökositleri aktive edebilir.

Tromboz ve inflamasyon birbiriyle yakın ilişkili patofizyolojik süreçlerdir ve trombosit-lökositler karşılıklı kompleks etkisini içermektedir. Son çalışmalarda trombosit P-selektin ve lökosit B2-integrinleri aracılığıyla trombositlerin lökositler ile heterotipik agregatlar oluşturduğu gösterilmiştir. Bu karşılıklı etkiler, tromboz ve inflamasyonun rol aldığı iskemik vasküler ve kalp hastalığı olan olgulardan alınan kan örneklerinde in vitro olarak gösterilmiştir.

Çalışmamızda trombosit aferezi yapılan sağlıklı donörlerde işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1 gün sonra ve 1 hafta sonra olmak üzere trombosit-nötrofil, trombosit-monosit, trombosit-lenfosit agregat düzeyleri, trombosit aktivasyon göstergesi olarak CD62P (P-selektin) düzeyleri ve hemostatik sistemin aktivasyon göstergesi olarak protrombin fragman 1+2 düzeyleri çalışılması planlanmıştır. Böylece trombosit aferezi yapılan sağlıklı donörlerde aferez işleminin ortaya çıkaracağı koagülasyon sistem değişikliklerini araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Aferez

Aferezis yunanca kökenli bir kelime olup ayrıştırmak, uzaklaştırmak anlamına gelir. Aferez günümüzde tam kanın uzaklaştırılması, çeşitli bileşenlere ayrılması, bir veya daha fazla bileşenin toplanması ve/veya değiştirilmesini içeren pek çok sayıdaki işlemde söz etmek için kullanılır. Sitaferaz işlemi ise kanın hücresel elemanlarının ayrılıp, geriye kalanın hastaya ya da donöre verilmesidir. Ayrılan hücre ya da komponent aferez kelimesinin başına getirilerek (lökaferaz, eritrositaferaz, plazmaferaz gibi) yapılan işlemler tanımlanır (1, 2).

2.1.1. Aferezin Tarihçesi

İlk deneysel aferez 1660 yılında Dr. Richard Lower tarafından Oxford'da köpekler kullanılarak manuel yöntemle denenmiştir. 1914 yılında Abel ve ekibi santrifüjleme yoluyla kan bileşenlerinin ayrılmasının ilk uygulamasını yapmıştır. Bu araştırmacılar üremik köpeklerde hayatta kalma üzerine plazma değişimi işleminin ardışık flebotomi oluşturarak olumlu etkisi olabileceğini gösterdiler. Daha sonraları santrifüj yöntemi ile kan komponentleri ayrılmaya başlandı. 1962 yılında hemaferaz makineleri gelişmeye başladı. Bu makinelerde donör ya da hastanın kanı pompa yardımıyla alınıp makine içinde santrifüjleme metoduyla tam kanın ayrımı yapılıyordu. Aynı yıllarda Soloman ve Fahey hiperviskozite sendromu olan bir hastada terapötik plazmaferaz uyguladılar ve tıp dünyasında terapötik aferez dönemini başlattılar. 1966'da gerekli plastik kan torbalarının ve bağlantı sistemlerin geliştirilmesi ve santrifüjlemenin kullanılması ile tek oturumda komponent ayrımı sağlandı. 1971 yılında Dr. Cohn ve ekibi tarafından ilk otomatik trombosit aferezi, bir yıl sonra da Mr. Judson tarafından ilk lökoferez işlemi yapıldı. Yine aynı yıl Haemonetics (intermitant akım), Cobe ve Fenwall (devamlı akım) tarafından aferez cihazları piyasaya çıkmıştır. 1979'da ise bu cihazların daha gelişmiş modelleri olan ve bilgisayar programları desteğinde çalışan aferez cihazları kullanılmaya başlandı. 1980'lerin son yarısı boyunca ve 2000'lere doğru devamlı yeni teknolojiler tanıtıldı. Lipid aferezi için kullanılan aferez cihazları, fotoferez için ekstrakorporeal

fotoimmünoterapi cihazı, immünoadsorbsiyon uygulamaları için excorim, prosorba, immünosorba cihazları geliştirildi ve halen yeni cihazlar geliştirilmektedir (2, 3).

2.1.2. Trombosit aferezi

Trombosit aferezi, gönüllü donörden trombositlerin kandan otomatik hücre ayırıcı makine ile ayrılması işlemidir. Hücreler antikoagulan solüsyon içinde donörden ayrılarak santrifüj ile yoğunluk ve diğer filtrasyon parametrelerine göre ayrılır ve seçilen ürün ayrıldıktan sonra diğer kan ürünleri dolaşıma geri verilir. Ortalama 1 ile 2 saat sürer (4).

Kanın komponentlere ayrılması kan hücrelerinin büyüklük ya da yoğunluklarının farklı özellikte olması esasına dayanılarak yapılır. Aferez üç temel işlem basamağından oluşur: 1) Kan komponentlerinin ayrılması, 2) Hedeflenen komponentlerin ayrılması 3) Geriye kalan komponentlerin donör ya da hastaya geri verilmesi. Kan komponentlerini birbirinden ayırmak amacıyla çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Günümüzde kullanılan üç teknik mevcuttur (5, 6, 7).

2.1.3 Trombosit aferezi Teknikleri

Santrifüj ile Ayırma

Bu teknikte kan komponentleri özgül ağırlıklarına göre birbirinden ayrılırlar. Bu işlem manuel olarak yapılabildiği gibi, aferez cihazlarında olduğu üzere otomatik olarak da yapılabilmektedir. Bir tüp içinde kan santrifüj edilecek olursa özgül ağırlıklarına göre hafiften ağıra doğru plazma, trombosit, mononükleer hücreler, granülosit ve eritrosit olarak sıralanır. Bu şekilde aferez cihazında santrifügasyon sonrasında ayrıştırılan kan komponentlerinden arzu edilen komponent plastik torbada toplanır, kalan komponent donöre ya da hastaya geri verilir. Santrifügasyonla ayırım yapan cihazlar, aralıklı akım ve devamlı akımla çalışanlar olarak iki grupta toplanır. Aralıklı akım prensibi ile çalışan cihazlarda yüksek hacimde kan (400 – 700 ml) santrifüj bölümüne alınarak işlenir, istenen komponent ayrıldıktan sonra geri kalanı geri verilir. Bu şekilde kanın alınıp işlenip tekrar geri verilmesi sikluslar şeklinde tekrarlanır. Tek damar yolu ile çalışan bu cihazlar hasta/donör açısından avantajlı olmakla beraber aynı damar yolunun hem alış hem de dönüş yolu olarak kullanılması

nedeni ile işlem süresi uzamaktadır. Küçük ve taşınabilir özelliği olan bu cihazlarda geniş hacimde kan vücut dışına çıkarıldığı için volüm değişikliğine bağlı kardiyovasküler yan etkiler sıkizlenmektedir. Devamlı akım prensibi ile çalışan cihazlar biri alış diğeri dönüş olan iki damar yolu ile çalışırlar. Alınan kanın işlenip geri verilmesi süreklilik gösterir. Bu cihazlar ile işlem süreleri daha kısa olmakta ve vücut dışı kan hacimleri daha düşük olduğu için kardiyovasküler yan etkiler daha az izlenmektedir (5, 6, 7).

Filtrasyon ile Ayırma

Bu teknikte kan komponentleri büyüklüklerine göre birbirinden ayrılmaktadır. En küçük komponentleri (genellikle plazma) daha büyük komponentlerden(genellikle hücresel komponentler) ayırmak amacı ile içinde küçük delikler bulunduran yarı geçirgen membran kullanılır. Tam kan belirli basınç akımı ile belirli büyüklükte delikleri olan membrandan geçer, deliklerden daha küçük çapa sahip olan komponent membranın diğere tarafına geçmekte, çapı büyük olanlar ise iç kısımda kalarak ayrılma işlemi gerçekleşmektedir (6, 7).

Adsorbsiyon ile Ayırma

Tam kan ya da plazmadaki hastalığa yol açan patolojik yapıların uzaklaştırılmasıdır. Santrifüj ve filtrasyon yöntemlerine affinite kromotografi prensibi eklenerek spesifik zararlı yapılar vücut dışına alınır. Bu sistemde bir matriks içinde bulunan antijen, antikor, dekstran sülfat ya da heparin gibi maddeler kandaki spesifik yapıları bağlayarak uzaklaştırır (6,7).

2.1.4 Donör Aferezi Komplikasyonları

Aferez genellikle güvenilir bir işlem olarak kabul edilmekle birlikte, donörlerde akut reaksiyon gözlenme oranı çok merkezli bir çalışmada (8) %2.18 olarak bildirilirken, tek merkezli bir çalışmada (9) trombosit aferez işlemlerinin %0.81'inde yan etki rapor edilmiştir. Ven giriş yeri ile ilgili reaksiyonlar iki çalışmada da komplikasyonların başında sıralanmıştır.

Aferez ve kan donasyonu sırasında yan etki sıklığının birlikte değerlendirildiği bir diğer tek merkezli çalışmada ise, plazmaferez donasyonunda %1.1, trombosit aferez donasyonunda %2.6 olan yan etki oranları homolog (allojeneik) kan donasyonunda %1.8, otolog kan donasyonunda %2.0 olarak saptanmıştır. En sık vazovagal reaksiyon gözlenirken; ilk kez donör olanlar, gençler, vücut ağırlığı ve donasyon öncesi kan basıncı düşük olanlarda reaksiyonlar daha sık ortaya çıkmıştır (10).

Sitrat Toksisitesi

Hipokalsemi

Sitrat donör aferez işlemlerinde antikoagülasyon amacıyla standart olarak kullanılmaktadır.

Sitratın antikoagülan etkisi kalsiyum iyonu şelasyonu ile oluşur; iyonize kalsiyumda azalma kalsiyum bağımlı koagülasyon reaksiyonlarını bloke eder (11).

Donör trombosit aferezinde iyonize kalsiyum düzeyi başlangıç seviyesine göre ortalama %33 azalmaktadır (12). İyonize kalsiyum azalması sinir hücresi zarlarının uyarılmasını artırarak spontan depolarizasyona yol açar. Bu durum sitrat toksisitesinin bulguları olan perioral ve ekstremitte uçlarında parestezi, titreme, baş dönmesi, kas seyirmesi, tremor ve daha az sıklıkla bulantı ve kusmaya neden olur. İyonize kalsiyumun daha fazla düşmesi durumunda karpopedal spazm, tetani, grand mal nöbet ve ölümcül laringospazm gözlenebilir. Belirtilen semptomların yanı sıra elektrokardiyogramda QT mesafesinde uzama ve ölümcül aritmiler bildirilmiştir (11).

Donör ve terapötik aferez uygulamalarında sitrat reaksiyonu riskini artıran faktörler hiperventilasyona bağlı alkaloz, ACD-A yerine ACD-B kullanımı, sitrat infüzyon hızı, infüze edilen sitrat miktarı, toplama işlemi başlangıcı öncesi donörün serum albumin düzeyi, sürekli akım yerine aralıklı akımla çalışan cihaz kullanımı ve cihazın antikoagülan dozunu hesaplama metodu olarak belirlenmiştir (11).

Sitrat reaksiyonunun tedavisinde infüzyon hızının azaltılması, donör kan sitrat oranının yükseltilmesi, oral ve intravenöz kalsiyum verilmesi önerilmektedir. Donör trombosit aferezi yapılan olgularda 2 gr kalsiyum karbonat uygulaması

parestezi şiddetinde anlamlı azalma sağlamaktadır (13). Kalsiyum glukonat veya kalsiyum klor formunda intravenöz kalsiyum hematopoetik kök hücre vericileri hariç diğer donör işlemlerinde genellikle gerekli olmamaktadır; bu nedenle profilaktik kullanılmamalıdır. Şiddetli reaksiyonlarda 10 ml % 10'luk kalsiyum glukonat 10-15 dakika içinde infüze edilebilir (11).

Hipomagnezemi

Magnezyum da kalsiyum gibi iki değerlikli bir katyondur ve sitrat tarafından bağlanır. Magnezyum düşmesi kalsiyum düşmesinden daha hızlı, tekrar normale gelmesi ise daha yavaştır. Hipomagnezemi de; hipokalsemi bulgularına benzer şekilde kas spazmları, kas güçsüzlüğü, vasküler tonüste azalma ve kardiyak kontraktilitede azalmaya sebep olur (11). Ayrıca ciddi hipomagnezemi, paratiroid hormon salınımını inhibe ederek kalsiyum ve potasyum dengesini de bozabilir (14).

Diğer Akut Etkiler

Sitrat metabolizması hidrojen iyonlarını tüketir ve aferez trombosit donörlerinde kan pH'sının yükselmesine neden olur. Bikarbonat atılımının yetersiz olduğu renal yetmezlikli hastalar ve taze donmuş plazma gibi sitrat içeren replasman sıvıları uygulanan hastalarda terapötik aferez uygulamaları sırasında metabolik alkaloz rapor edilmiştir (15,16). Donörlerde renal fonksiyonlar normal olup yüksek sitrat yüklemesi de yapılmadığından belirgin metabolik alkaloz beklenmemektedir.

Metabolik alkaloz ile görülen kan pH artışı, hidrojen iyonlarının kompanseuar olarak hücre içinden dışarı yer değiştirmesine yol açar. Bu durum, hücre içi elektriksel dengeyi sağlamak için potasyumun hücre içine geçişini artırır ve sonuçta aferez trombosit vericilerinde serum potasyum düzeyinde %6 azalma ile sonuçlanır (11).

Hipotansif Reaksiyonlar

Aferez işlemi sırasında hipotansiyon; intravasküler volüm kaybı ve vazovagal reaksiyonlar başta olmak üzere sitrat toksisitesi, ciddi alerjik reaksiyon, hava embolisi gibi birden fazla nedenle gelişebilmektedir.

İntravasküler volüm kaybında, kanın ekstrakorporeal dolaşıma uzaklaşması ile hipotansiyon gelişir. Sempatik sinir sisteminin kompanse edici mekanizmaları ile tipik olarak kardiyak output ve vasküler tonus artar (17). Kardiyak output artışı kalp hızı ve kontraktilesinde artış ile sağlanır. Donörlerde çarpıntı, soğuk terleme ve fenalık hissine sebep olur. Hemaferaz donörlerinde, özellikle modern cihazlardaki düzenleyici kısıtlamalar ile ekstrakorporeal hacim 10.5ml/kg ile sınırlı olduğundan bu reaksiyonlar sık değildir (17).

Vazovagal reaksiyonda hipovolemi kan basıncında azalma ile tetiklenir. Parasempatik tonus artışına bağlı vazovagal reaksiyon sırasında kalp hızı ve vasküler tonus azalır. Donörlerde solukluk, soğuk terleme, fenalık hissi ve bradikardi gelişir (18).

Hipovolemik ve vazovagal reaksiyonlar benzer şekilde tedavi edilirler. İşlem geçici olarak durdurulmalı ve hızlı sıvı replasmanı yapılmalıdır. Vazovagal reaksiyonda ayrıca kişinin Trendelenburg pozisyona getirilmesi, kollara ve boyuna soğuk kompres uygulanması yararlı olur (11).

Alerjik Reaksiyonlar

Alerjik reaksiyonlar trombosit, plazma ve granülosit donörlerinde ortaya çıkmaktadır. Hafif ürtikeryal döküntüden hayatı tehdit eden anafilaktik reaksiyona kadar geniş bir yelpazede yer alırlar. Kaşıntı, ürtiker, eritem, yüzde kızarıklık, anjiyoödem, üst ve alt hava yolu obstrüksiyonu, hipotansiyon, şok, bulantı, kusma ve ishal görülebilir.

Trombosit ve plazma donörlerinde tek kullanımlık setlerin sterilizasyonunda kullanılan etilen oksit alerjik reaksiyonlardan sorumlu tutulmaktadır. Özellikle birden fazla vericilik yapanlarda, plastikteki etilen oksitin işlem sırasında plazmadaki bir proteine bağlanıp hapten görevi yaparak IgE antikor yapımına neden olduğu ileri sürülmektedir.

Granülosit donörlerinde etilen oksitle oluşan alerjik reaksiyonlara ek olarak hidroksi etil nişastaya (HES) bağlı alerjik reaksiyon oluşabilir. Eritrosit sedimentasyonunu artırmak için kullanılan HES alternatif yoldan kompleman aktivasyonu ile bu reaksiyona sebep olmaktadır.

Alerjik reaksiyonlarda işlem durdurulmalıdır. Ürtiker gibi basit reaksiyonlar oral antihistaminikler ile tedavi edilebilir. Anafilaktik tipte reaksiyonlarda damar yolundan izotonik sodyum klorür (NaCl) infüzyonu başlanır. Eğer reaksiyon hafifse 0.3-0.5 mg epinefrin subkutan verilmelidir; bu doz 20-30 dakikada bir 3 kez tekrarlanabilir. Ek olarak bronkospazmı olanlarda aminofilin 6 mg/kg yükleme dozundan sonra 0.5-1 mg/kg dozunda infüze edilir. Hipotansiyon için izotonik veya ringer laktat solusyonu verilebilir. Solunum sıkıntısı olanlarda oksijen tedavisine başlanır. Şiddetli anafilaktik reaksiyonlarda ise 0.5mg epinefrin intravenöz olarak verilir; bu doz 5-10 dakikada bir tekrarlanabilir. Sıvı infüzyonu ile hipotansiyonu düzelmeyenlerde dopamin infüzyonuna başlanır. Hava yolu açık tutulmalıdır; bazı olgularda entübasyon gerekebilir (11).

Kanama

Trombositopeni

Trombosit aferez işleminden sonra donör trombosit sayısında %20-29 akut bir azalma izlenmektedir (11). Fresenius AS.TEC 204 ile merkezimizde yaptığımız bir çalışmada donör trombosit aferez işlemi öncesi 235 000/mm³ olan ortalama donör trombosit sayısının işlem sonrasında 172 000/mm³'e düştüğü saptanmıştır (19). Trombosit aferez işlemi sonrası sık vericilik yapanlarda dahi trombosit sayısının hızla normale döndüğü ve ciddi kanama komplikasyonlarının donörlerde nadir geliştiği bildirilmektedir. Toplama işlemi sırasında dalaktaki trombositlerin çevre kanına geçmesi ve işlem sonrası kan trombopoetin düzeyinde artış olması bunun nedenleridir (20,21).

Her bir granülosit toplama işleminden sonra hematokrit düzeyinde %7 ve trombosit sayısında %22 azalma bildirilmektedir. Bu azalma, ürün içinde bu hücrelerin kaybına ve işlem sırasında volüm genişletici olarak kullanılan HES'in dilüsyonel etkisine bağlanmaktadır (11).

Hidroksietil Nişasta

Volüm genişletici veya eritrosit sedimentasyonunu artırmak için kullanılan HES koagülasyon faktör düzeylerinde değişikliklere yol açmaktadır. Yüksek moleküler ağırlıklı HES, faktör VIII aktivitesi, faktör VIII antijen ve von Willebrand antijen düzeylerini azaltır ve kanama zamanını uzatır. Yüksek ve düşük moleküler ağırlıklı HES ise, parsiyel tromboplastin zamanında (PTT) uzama ve fibrinojen düzeyinde azalmaya neden olabilmektedir (22).

Plazma donörlerinde teorik olarak donasyonu takiben faktör eksikliği gelişebileceği düşünülebilirse de pratikte bu konuda sorun yaşanmaz. Sitratın indükleyebileceği kanama ile ilgili olarak da klinik sorun ortaya çıkmaz; çünkü antikoagulan etki oluşturabilen kalsiyum düşüklüğü donörde değil, aferez cihazı içinde elde edilmektedir (11).

Donör aferezi komplikasyonları Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Donör Aferezi Komplikasyonları (2, 11, 23-26)

1. Hipovolemi
a. Senkop
b. Diaforez (aşırı terleme)
c. Bulantı-kusma
d. Hipotansiyon
2. Vazovagal Etkiler
a. Senkop
b. Bradikardi
c. Diaforez
d. Solukluk
3. Venöz Giriş Yeri
a. Hematom
b. Sinir hasarı
c. Lokal enfeksiyon
d. Tromboflebit
4. Sitrat Toksisitesi
5. Mekanik Hemoliz
6. Hava Embolisi
7. Trombosit sayısında azalma
8. Lenfosit sayısında azalma
9. Koagülopati

2.2. Hemostaz

Hemostaz, kanın dolaşımında sıvı halde kalmasını sağlayan fizyolojik mekanizmadır. Damar hasarı sonrası kan pıhtısı oluşumu ve daha sonra aynı damarın fonksiyonunu devam ettirmesi için damarın pıhtıdan temizlenerek açıldığı işlemdir (27). Hemostazın üç önemli komponenti koagülasyon sistemi, trombositler ve fibrinolitik sistemdir.

Normal hemostaz üç faza ayrılır.

2.2.1. Primer Hemostaz

Travmadan sonraki 1-2 saniye içinde refleks olarak zedelenen damarda oluşan vazokonstriksiyon o damarda akımın yavaşlamasına neden olur. Sirkülasyondaki trombositler endoteldeki hasarı reseptörleri aracılığı ile fark eder ve zedelenen endotele yapışırlar (28).

Trombositler von Willebrand faktör (vWF) aracılığı ile kollajene yapışıp şekil değiştirirler, fibriller boyunca yayılıp tromboksan A2 (TxA2), adenzin difosfat (ADP) ve serotonin salarak yeni trombositlerin aktivasyonunu sağlarlar. Trombositler TxA2 ve ADP ile aktivasyon sonrası pıhtıya katılırlar. Bu fibrin ile trombositlerin yüzeyindeki glikoprotein IIb-IIIa'nın simetrik köprü oluşturması ile oluşur. Damar hasarı ile ortaya çıkan doku faktörü ile FVII kompleks oluşturarak trombin oluşturur ki bu da potent bir trombosit aktivatörüdür. Çeşitli yollar ile oluşan ADP, trombin ve platelet aktive edici faktör (PAF) trombositleri aktive eder. PAF lökosit aktivasyonunda da görev almaktadır (29, 30).

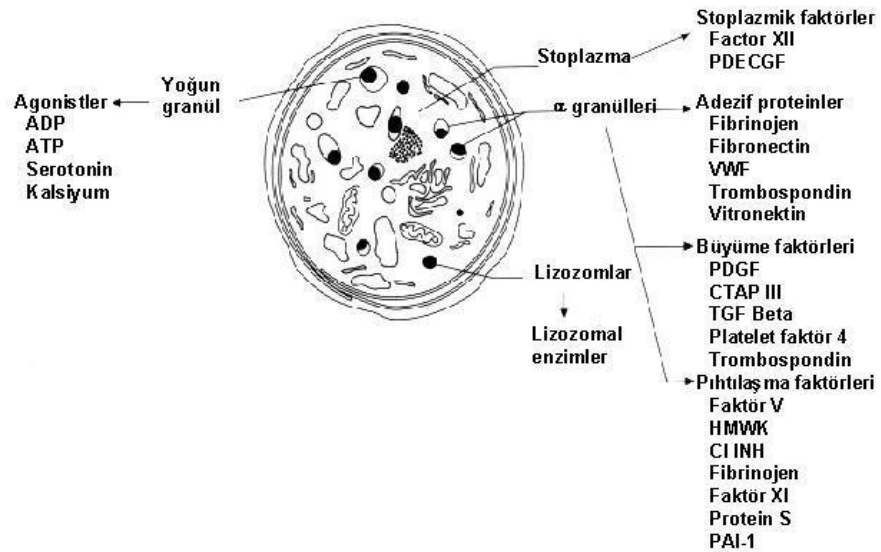
Trombositler primer hemostazda görev alan en önemli kan hücreleridir. Kemik iliğindeki megakaryositlerden köken alan trombositler 2 mikron çapında, gri-mavi sitoplazmalı, çekirdeksiz, granül içeren disk yapısında kan hücreleridir. Üretimleri trombopoetin, GM-CSF, IL-6 ve IL-11 tarafından kontrol edilir. Trombositlerin fonksiyonlarını sürdürmesinde trombositlerde bulunan granüller ve organeller önemlidir. Trombositlerde yoğun (dense) cisimcikler, alfa granüller ve lizozomlar bulunmaktadır. Alfa granül membranında P selektin, glikoprotein IIb/IIIa, granül membran protein 33, platelet endotelial hücre adhezyon molekülü I (PECAM I), glikoprotein Ib-V-IX ve osteonektin bulunur. Alfa granüllerde pıhtılaştırma

faktörlerinden faktör I, faktör V, faktör VIII, platelet faktör IV (PFIV), beta tromboglobulin (BTG), heparin nötralizan protein, trombospondin, von Willebrand faktör (VWF), trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), TGF β , endotelial hücre büyüme faktörü(EGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi anjiogenik faktörler ve plazminojen aktivator inhibitörü, α -2 plazmin inhibitörü gibi fibrinolitik inhibitörler yer alır. Yoğun cisimciklerin membranında P selektin ve granülofizinin yer alır. Yoğun cisimciklerde adenin nükleotidleri, guanin nükleotidleri, fosfoinozitol fosfat, kalsiyum ve magnezyum bulunur (31-33). Trombosit ve içerdiği granüller Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

Endotel hasarı sonucu kanın subendoteldeki kollajen ile karşılaşmasıyla trombositlerdeki glikoprotein Ia VWF aracılığıyla hasar bölgesine yapışır. Bu olaya adezyon denir. Aktive olan trombositler şekil değiştirir ve hacmi artar. Trombosit aktivasyonu hücre membranı ile yoğun granüllerin ATP bağımlı füzyonuna neden olur. Sonuçta granüler içerik salınır ve membran proteinleri hücre yüzeyinde eksprese edilir. Trombositler serotonin, TxA₂, PAF, PDGF gibi vazokonstriktör etkili granüler içeriklerini salgırlar. Bu enzimler trombositlerin daha aktif hale gelmesini sağlayarak fibrinojen yardımıyla yüzey glikoproteinlerinin (glikoprotein 2b/3a) birbirine bağlanmasına neden olur. Bu olaya da agregasyon denir. Trombosit aktivasyonunun son basamağı agregasyondur (31-33).

Trombosit aktivasyonu sırasında hücre yüzeyinde değişiklikler ortaya çıkar. Membran reseptörlerine önce agonistler bağlanarak aktivasyon olayını başlatmaktadırlar. Trombin, kollajen gibi fizyolojik agonistlerle aktivasyon sonrasında trombositler spesifik yapı kazanırlar ve granüllerinden tromboglobulin salınımıyla eş zamanlı olarak trombosit yüzeyinde P-selektin (Glikoprotein140=PADGEM proteini=CD62) ekspresyonu da başlar. Selektin ailesinden adezyon molekülü olan P-selektin trombositlerin alfa granüllerinde ve Weibel-Palade cisimciği adı verilen endotel hücresi depo granüllerinde depolanmaktadır. Endotel hücresinin trombosit ve histamin gibi maddeler tarafından uyarılması sonucu saniyeler içinde Weibel-Palade cisimlerinden ekzositoz yoluyla dolaşıma verilmektedir. Benzer şekilde uyarı sonrası alfa granülü üzerinde trombosit yüzeyine taşınan P-selektin, endotel kaynaklı P-selektinden farklı olarak hücre yüzeyinde iken hücresel adezyonu yönlendirebilmektedir. Trombositlerin birçok

dokuda sağlam endotel tabakası üzerinde yuvarlanma işlemi ve lökositlerle agregat oluşturmalarının P-selektin bağımlı olarak gerçekleştiği gösterilmiştir. Trombositlerde kriptalar içinde depolanmış haldeki CD40L, uyarı sonrası hücre yüzeyinde eksprese edilir. Sonraki aşamada aktif formu olan sCD40L'yi oluşturacak şekilde hücre membranından ayrılır. Dolaşımdaki sCD40L'nin yaklaşık %95'i trombosit kaynaklıdır. CD40-CD40L etkileşimi lökosit adezyon ve migrasyonu, kemokin ve sitokinlerin üretiminde artış ile fibroblastların aktivasyonu gibi birçok inflamatuvar süreçle ilişkilidir. Aktive trombositlerdeki P-selektin, trombositlerin lökositlerle özellikle de monositlerle etkileşimini başlatır. P-selektin aktive trombositler ile aktive endotel hücreleri tarafından eksprese edilmekte ve s (solübl) P-selektin sıklıkla trombosit aktivasyonunun bir belirteci olarak kullanılmaktadır. Lökosit ve trombositlerin endotel hücreleri ile ilişkilerini düzenlemektedir (34-41).



Şekil 2.1 Trombosit Ve İçerdiği Granüller

2.2.2.Sekonder Hemostaz

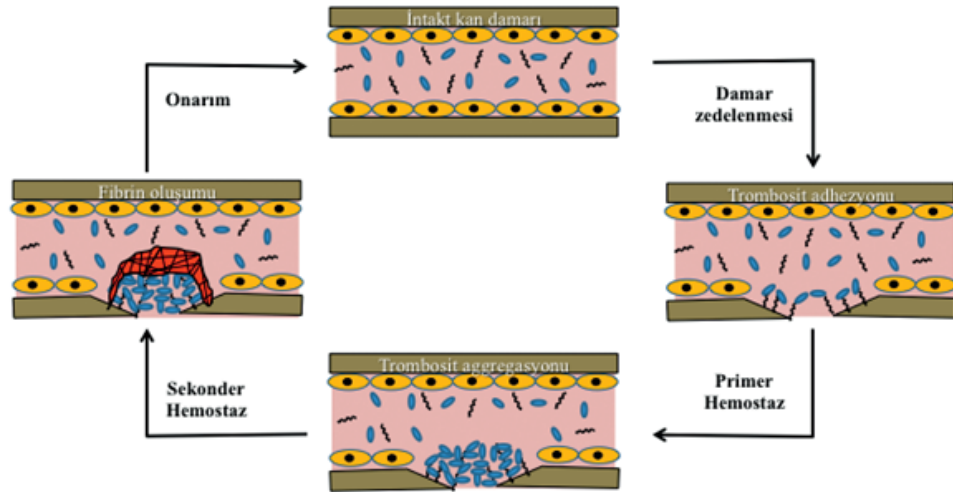
Koagülasyon mekanizması endotel hücre bütünlüğünün kaybolmasıyla kanla temas eden doku faktörünün FVII'yi aktive etmesiyle başlamaktadır (ekstrinsik yol).

Doku faktörü (TF) diğer adıyla tromboplastin, FVII/VIIa ile çok güçlü bir bağ oluşturur. FVII plazmada inaktif enzim (zimojen) olarak dolaşırken TF'e bağlandığında FVII proteoliz ile FVIIa'ya dönüşür. Faktör VIIa+TF kompleksinin enzimatik aktivitesi yüksektir ve membran yüzeyine yapışır. Böylece koagülasyonun lokal olarak aktivasyonu gerçekleşir. Sınırlı proteoliz ile FIX'u, aktive ederken (FIXa) diğer bir yoldan doğrudan doğruya FX'u FXa'ya dönüştürür. İster FIXa, FVIIIa- trombosit yüzeyindeki fosfatidil serin (FS) aracılığı ile olsun ister FVIIa +TF yoluyla oluşmuş olsun neticede aktive olan FX (FXa); FVa, FII (Trombin), FS hep birlikte protrombinaz adı verilen kompleksi oluşturur ve protrombinin trombine (FIIa) dönüşümü sağlanır. Trombin fibrinojen (faktör I) molekülünden önce fibrinopeptid A (FP A), fibrinopeptid B (FP B) parçalarını kopararak fibrin monomerlerini daha sonra monomerlerin bir araya gelmesi ile fibrin polimerlerini oluşturur. Trombin aynı zamanda FXIII'ü (fibrin stabilize eden faktör) aktive ederek fibrin polimerlerinin çapraz bağlarının oluşması ve güçlü fibrin pıhtısının meydana gelmesini sağlar. Koagülasyon sisteminde ekstrinsik yol (TF) aracılığıyla başlayan ve az miktarda fibrin oluşumu ile sonlanan ilk koagülasyon aktivasyonu endotelden salınan doku faktörü yolu inhibitörü (TFPI) aracılığı ile bloke edilir. Bu nedenle devreye intrinsik yol girer. İntrinsik yolun trombin aracılığıyla FXI'in aktive edilmesiyle devreye girdiği, aktive FXI (FXIa)'in FIX'u aktive ettiği (FIX a) ve neticede FIX, kofaktör olarak bulunan FVIII, FX ve trombosit FS'in tenase kompleksini oluşturarak FX'u FXa'ya dönüştürdüğü görülür. Bundan sonraki aşamada yine yukarıda ifade edilen protrombinaz kompleksi aracılığı ile protrombinin trombine dönüşümü ve fibrinojenden çok daha fazla fibrin oluşumu ile arzulanan düzeyde koagulumun meydana geldiği görülür. İntrinsik yolun aktivasyonu ile birlikte yeterli fibrin oluşumunun sağlandığı bu faza gelişme fazı adı verilir (42).

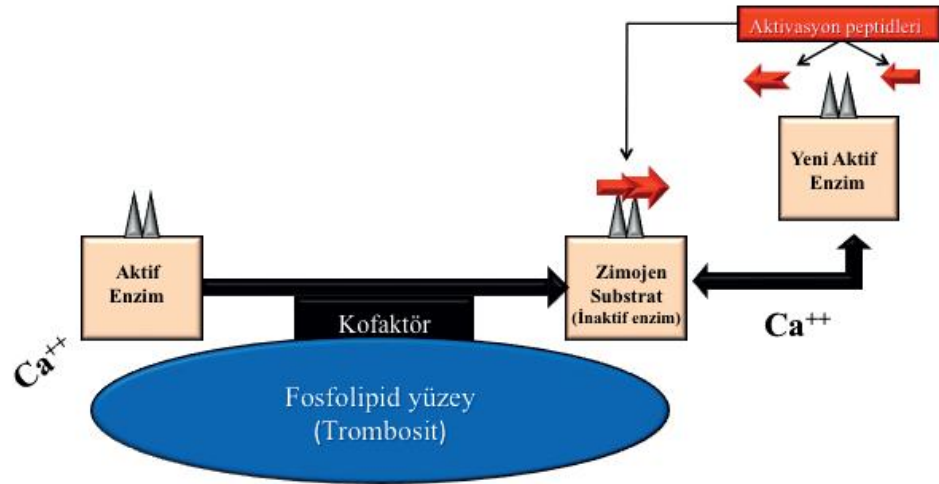
Koagülasyonu aktive eden her yol aynı seviyede bir inhibitör sistemle kontrol altında tutulmaktadır. Hemostatik mekanizmanın sadece hasar bölgesinde aktive olması bu inhibitör sistem sayesinde olur. Hasarlı damar tamir süreci tamamlanır

tamamlanmaz dolaşıma açılmaktadır. İnhibitör mekanizmalarından önemli biri TF ve FVIIa aracılığı ile başlayan koagülasyonun aktivasyonunun doku faktörü yolu inhibitörü (TFPI) aracılığı ile inhibe edilmesidir. TFPI primer olarak endotelde sentez edilir. Heparin TFPI düzeyini artırır. TFPI yegane fizyolojik TF:FVIIa kompleksi inhibitörüdür. Koagülasyonu sınırlayan ve karaciğerde sentez edilen bir diğer protein antitrombin (AT)'dir. AT öncelikle serbest dolaşan enzimleri inhibe eder. Busayede koagülasyon sürecinin vasküler hasarın olduğu yerle sınırlı kalması sağlanır. AT efektif bir serin proteaz inhibitörüdür. Heparin benzeri moleküllerle aktivitesi belirgin artar. AT; faktör XIa, IXa, Xa, IIa'yı öncelikle inaktive eder. Protein C antikoagülan sistemi ise K vitamini bağımlı protein olup FVIIIa ve Va'yı inaktive eder. Trombinin endotelde bulunan trombomodulin ile birleşmesi ile aktive olmakta ve aktive Protein C (aPC) FVII ve FV'i inhibe ederek koagülasyon sistemini inaktive edebilmektedir. Protein C'nin aktivasyonunda trombositlerin aktivasyonu arttırıcı rol oynadıkları gösterilmiştir (43).

Fibrin pıhtısı oluşumu Şekil 2.2'de ve koagülasyon kaskadının alt birimleri şekil 2.3'te gösterilmiştir.



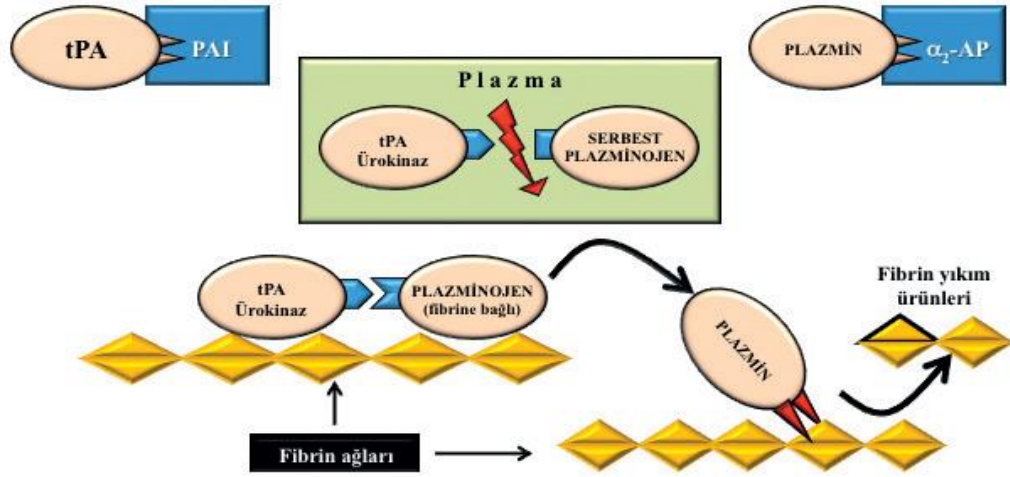
Şekil 2.2 Fibrin Pıhtısı Oluşumu



Şekil 2.3 Koagülasyon Kaskadının Alt Birimleri

2.2.3. Fibrinolitik Sistem

Trombüs içindeki fibrin, doku plazminojen aktivatörünün (t-pA) aktivasyonu için en önemli uyarıdır. t-pA trombüs varlığı ile aktive olunca inaktif enzim olan ve karaciğerde sentez edilen plazminojen aktif enzim olan plazmine dönüşür. Ürokinaz tipi plazminojen (u-pA) ise fibrinden bağımsız bir şekilde aktive olur. t-pA ve u-pA endotel hücreleri ve aktive trombositlerden salınan plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) tarafından inhibe edilebilmektedir. PAI-2 ise u-pA'yı t-pA'dan daha fazla inhibe edebilmektedir. Aktif enzim olan plazmin fibrine bağlandığında majör inhibitörü olan alfa2 antiplazminin inhibe edici etkisinden kurtulabilmektedir. Fibrine bağlı plazmin çapraz bağları olan fibrini parçalayarak fibrin yıkım ürünlerini oluşturur. Fibrinolitik sistemi (plazminojen) aktive etme potansiyeli olan daha zayıf aktivatörler ise kallikrein, faktör XI (XIa), FXII (FXIIa)'dir. Endotel duvarında tıpkı monositler ve makrofajlarda olduğu gibi u-pA ve aneksin II reseptörü ihtiva ederler. Bu şekilde plazmin jenerasyonunun etkinliğini arttırırlar. Plazminin prekürsör molekülü olan plazminojen fibrin ve iki plazminojen aktivatörün birine bağlanır. Bu üçlü kompleks proenzim olan plazminojeni inaktive edip proteolitik plazmine dönüşümünü sağlar. Plazmin, fibrini parçalayıp fibrin yıkım ürünlerini oluşturur. Fibrin yıkım ürünlerinin önemlilerinden biri D-dimerdir. Plazmin geniş substrat spesifitesine sahiptir. Fibrinojen ve bazı plazma proteinleri ile pıhtılaşma faktörlerini yıkar (43). Fibrinolitik yolun ana bileşenleri Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4 Fibrinolitik Yolun Ana Bileşenleri

2.3. Amaç

Aferez donasyonu genel olarak güvenli bir işlem olarak kabul edilmekle birlikte donör kanının yapay yüzeylerle teması sonucu ortaya çıkan donör güvenliği sorusu halen güncelliğini korumaktadır. Ekstrakorporel dolaşım sırasında pıhtılaşma faktörlerinin adsorpsiyonu, trombosit adezyon ve agregasyonu ile hücre ayırıcının yüzeyine bağlanması trombosit aferez donörlerinde hiperkoagulabl bir duruma yol açmaktadır. Bu bilgiler göz önüne alındığında; çalışmamızda trombosit aferezi yapılan sağlıklı donörlerde aferez işleminin ortaya çıkaracağı koagülasyon sistem değişikliklerini araştırmayı hedefledik. Bu amaçla, donörlerden, işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1 gün sonra ve 1 hafta sonra olmak üzere trombosit-nötrofil, trombosit-monosit, trombosit-lenfosit agregat düzeyleri, trombosit aktivasyon göstergesi olarak CD62P (P-selektin) düzeyleri ve hemostatik sistemin aktivasyon göstergesi olarak protrombin fragman 1+2 düzeyleri çalışılmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Etik Kurul ve Proje Destek Onayı Bilgileri

Bu tez çalışması 12.06.2014 tarihinde 11 karar numarası ile Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi (ESOGÜTF) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı tarafından değerlendirmeye alınarak yazılı olarak onaylanmış, 18.04.2014 tarihinde 2014-258 Proje numarası ile Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından desteklenmesi uygun bulunmuştur. Çalışma Helsinki Bildirgesi ilkelerine uygun olarak tamamlanmıştır.

3.2. Hasta Seçimi ve Hasta Grubu Materyalleri

Bu araştırma, Şubat 2014-Kasım 2014 tarihleri arasında ESOGÜTF Hematoji Bilim Dalı'nda yürütülmüştür.

Çalışmaya Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Aferez Ünitesinde trombosit aferezi yapılan donörler dahil edilmiştir. Donörler; çalışma hakkında bilgilendirildikten ve onam formunu imzaladıktan sonra çalışma grubuna dahil edilmişlerdir.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri: (i) Erişkin yaş grubunda olmak (18 yaş üzeri), (ii) Trombosit aferez verme kriterlerine uygun olmak, (iii) Çalışma bilgilendirilmiş onam formunu imzalayarak çalışmaya katılmaya rıza göstermiş olmak şeklinde seçilmiştir.

Çalışma dışı bırakılma kriterleri olarak: (i) Çalışmaya katılmaya rıza göstermemiş olmak (ii) Son 10 gün içinde asetilsalisilik asit (ASA) ve nonsteroidal anti inflamatuvar ilaç (NSAII) kullanımı olmak seçilmiştir.

Çalışmaya Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Aferez Ünitesinde trombosit aferezi yapılan 30 sağlıklı donör dahil edildi.

Çalışma grubuna ait periferik kan örneklerinden; hemogram, PT, aPTT, INR, fibrinojen ve D-dimer düzeyleri ESOGÜTF Hematoloji Laboratuvarında ilgili parametre ile ilgili kitler kullanılarak standart yöntemle çalışılmıştır. Hemogram

Beckman Coulter LH770 cihazı kullanılarak çalışılmıştır. PT, aPTT, INR, fibrinogen and D-Dimer Siemens BSC XP cihazı kullanılarak çalışılmıştır. PT Thromborel s kit ile çalışılmıştır. APTT Pathromtin sl kiti ile çalışılmıştır. Fibrinojen Multifibren U kiti ile çalışılmıştır. D-Dimer Innovance kiti ile çalışılmıştır.

Hastalardan hematolojik parametreler için gereken kan örnekleri plastik enjektörler kullanılarak antekubital venden EDTA ve sitratlı tüplere alınmıştır. Akım sitometri değerlendirmesi BECTON DICKINSON FACSCalibur cihazında yapılmıştır. Antikor kitleri eBioscience marka olarak kullanıldı. Trombosit aktivasyon ve agregatlarının akım sitometri ile değerlendirilmesi için alınan kan örneği PBS ile 10 kat dilüe edildi (10x). İki tüpün birine izotipik kontrollerden (Mouse IgG2b FITC/ Mouse IgG1PE/CD45 PerCp) konuldu. Diğer tüpe (CD41 FITC/ CD62P-PE/ CD45 PerCp) konuldu. 10 kat dilüe kandan 2 tüpe 25'er µl konuldu. Oda ısısında, karanlıkta 15 dk inkübe edildi. 500 µl soğuk PBS konuldu, BD Facs Calibur cihazında Cellquest programında okutuldu. Önce trombosit kapısı alınıp, trombositlerdeki aktivasyona bakıldı. Elde edilen veriler ile FSC-SSC grafiği kullanılarak trombosit kapısında aktive trombositlerin (CD41 FITC+ ve CD62P PE+) trombositler içindeki yüzdesi bulundu. Daha sonra CD45PerCP-SSC grafiği kullanılarak lenfosit kapısında lenfosit + trombosit agregatı olarak değerlendirilen (CD41 FITC+ ve CD45 PerCP+) lenfositler içindeki yüzdesi bulundu. Ardından CD45PerCP-SSC grafiği kullanılarak monosit kapısında monosit + trombosit agregatı olarak değerlendirilen (CD41 FITC+ ve CD45 PerCP+) monositler içindeki yüzdesi bulundu. Ardından CD45PerCP-SSC grafiği kullanılarak nötrofil kapısında nötrofil + trombosit agregatı olarak değerlendirilen (CD41 FITC+ ve CD45 PerCP+) nötrofil içindeki yüzdesi bulundu.

Serumda protrombin fragman 1+2 ölçümü USCNK marka Human Prothrombin Fragment 1+2 (F1+2) ELISA kiti ile yapıldı (Uscn Life Science Inc, Wuhan, Hubei, PRC).Absorbans okuması ChemWell 2910 marka ELISA okuyucu cihazda yapıldı. (AwarenessTechnology, Inc. Martin Hwy. Palm City, USA). Sonuçlar ng/ml olarak verildi.

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Tüm veri analizleri SPSS 21.0 paket programları ile yapılmıştır. Sürekli nicel veriler; n, ortalama ve standart sapma olarak, nitel veriler ise n, ortanca değer ve 25'inci ve 75'inci yüzdilik değerler olarak ifade edilmiştir. Normal dağılım gösteren sürekli veriler T Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks ile analiz edilmiş olup normal dağılım göstermeyen skor değişkenlerinden oluşan veriler ise One Way Repeated Measures Analysis of Variance ile analiz edildi. Gruplar arası çoklu karşılaştırmada Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test) testi uygulanmıştır. $p < 0.05$ olasılık değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

Çalışmamızda 30 donörden trombosit aferezi öncesi (0), işlemden hemen sonra (1), 1 gün sonra (2) ve 1 hafta sonra (3) kan örnekleri alınmıştır. Alınan bu örnekler hematolojik parametreler, trombosit-lenfosit, trombosit-monosit, trombosit-granulosit agregatları, CD62P ve protrombin fragman 1-2 değişimi yönünden değerlendirilmiştir.

Trombosit aferezi uygulanan donörlerin hematolojik parametre sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir. Hematolojik parametre sonuçları değerlendirildiğinde; hemoglobin değerinin işlemden hemen sonra işlem öncesine göre azaldığı ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p = 0,002$).

Lökosit değerinin işlemden hemen sonra işlem öncesine göre azaldığı ancak işlemden 1 gün sonra ve 1 hafta sonra işlem öncesine göre arttığı ve farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p = <0,001$).

Trombosit değerinin işlemden hemen sonra işlem öncesine göre azaldığı ancak işlemden 1 gün sonra ve 1 hafta sonra işlem sonrasına göre arttığı ve farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p = <0,001$).

PT değerinin işlemden hemen sonra işlem öncesine göre arttığı ancak işlemden 1 hafta sonra işlem öncesine göre azaldığı ve farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p = 0,001$).

APTT değerinin işlemden hemen sonra işlem öncesine göre arttığı fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ayrıca işlemden 1 hafta sonra işlem öncesine göre azaldığı ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p = 0,027$).

Fibrinojen değerinin işlemden hemen sonra işlem öncesine göre azaldığı ancak işlemden 1 hafta sonra işlem öncesine göre arttığı ve farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. ($p = <0,001$)

D-dimer değerinin işlemden hemen sonra işlem öncesine göre arttığı fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.

Tablo 4.1. Trombosit aferezi yapılan donörlerin işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1 gün sonra ve 1 hafta sonraki hematolojik parametrelerinin karşılaştırılması

	0	1	2	3	p Değeri *
Hemoglobin (g/dl)	15.7 (14.9-16.2)	15.4 (14.7-15.9)	15.4 (15.0-16.0)	15.5 (14.8-16.3)	=0,002
Lökosit ($\times 10^9/l$)	6.0 (5.5-6.9)	5.8 (5.2-6.5)	6.8 (5.8-7.8)	6.6 (5.3-7.8)	<0,001
Trombosit ($\times 10^9/l$)	231 (200-267)	182 (142-204)	207 (168-231)	232 (197-275)	<0,001
PT (s)	12.0 (11.2-12.5)	12.3 (11.8-13.1)	12.0 (11.5-12.3)	11.9 (11.3-12.3)	=0,001
APTT (s)	29.3 (28.0-31.7)	30.2 (27.3-33.6)	28.9 (27.5-30.5)	28.5 (27.1-31.1)	=0,027
INR	1.07 (1.01-1.11)	1.10 (1.05-1.17)	1.08 (1.03-1.11)	1.07 (1.02-1.10)	<0,001
Fibrinogen (mg/dl)	261.5 (235.0-319.2)	236.5 (203.7-265.2)	240.5 (213.7-285.2)	259.0 (228.7-301.0)	<0,001
D-dimer (mg/dl)	0.17 (0.17-0.22)	0.22 (0.17*0.32)	0.17 (0.17-0.23)	0.17 (0.17-0.23)	=0,073

*: Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks

**: One Way Repeated Measures Analysis of Variance

	p<0.05 ***
Hemoglobin	1-0
Lökosit	1-2, 1-0, 1-3
Trombosit	1-0, 1-2, 1-3, 0-2, 2-3
PT	1-0,1-3
APTT	1-3
INR	1-0, 1-3
Fibrinojen	1-0, 1-3, 0-2, 2-3

***Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test)

Trombosit aferezi yapılan hastaların işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1 gün sonra ve 1 hafta sonraki lenfosit + trombosit agregatı (CD41 FITC+ ve CD45 PerCP+ granüositler içindeki yüzde değeri) düzeylerinin karşılaştırılması Tablo 4.2'de verilmiştir.

Lenfosit-trombosit agregat düzeyleri işlemden sonrası azalma göstermiş sonrasında 1. gün ve 1. hafta sonunda tekrar artış göstermiştir fakat yapılan istatistiki analizde trombosit aferezi sonrası azalma ve 1. gündeki artış anlamlı olmayıp 1. hafta sonundaki artış anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

Tablo 4.2. Trombosit aferezi yapılan hastaların işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1 gün sonra ve 1 hafta sonraki lenfosit + trombosit agregatı (CD41 FITC+ ve CD45 PerCP+ granülositler içindeki yüzde değeri) düzeylerinin karşılaştırılması

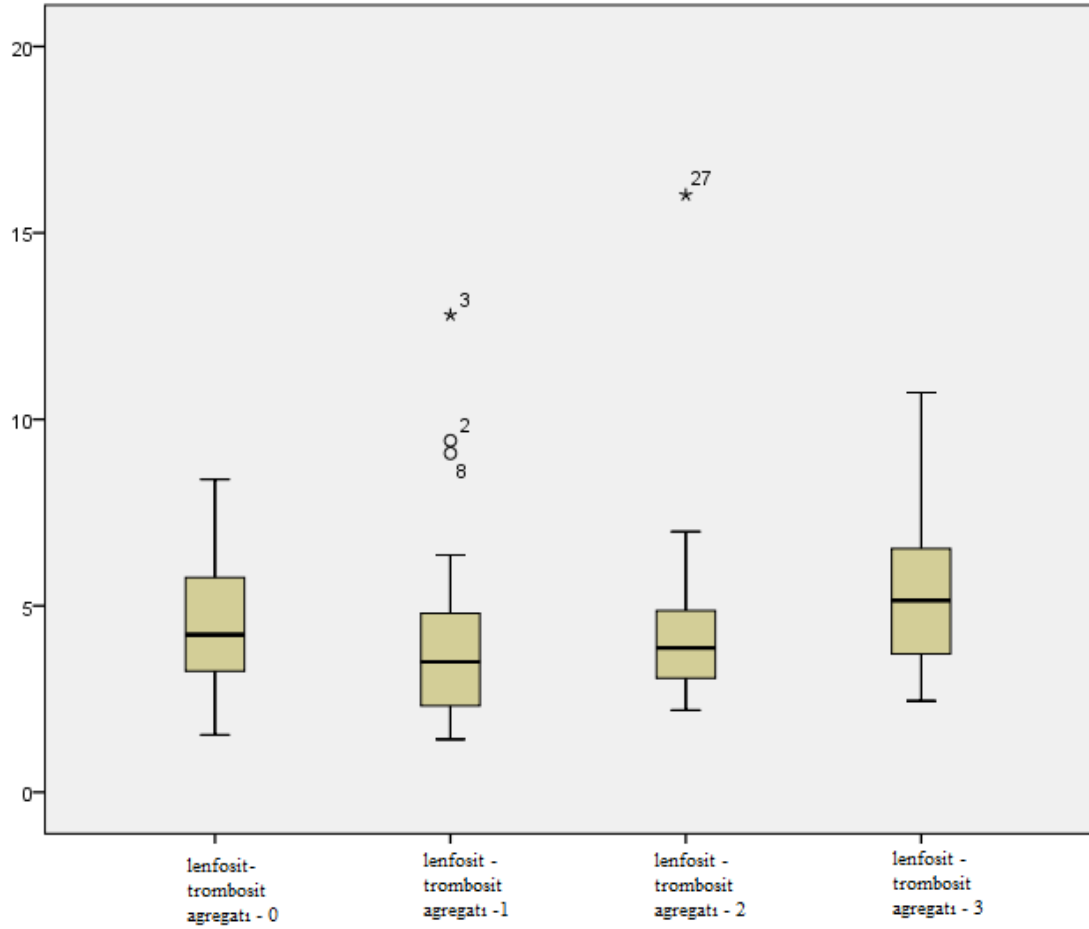
Lenfosit+trombosit agregatı	Medyan	%25	%75	P *
0	4.22	3.17	5.94	=0.012
1	3.49	2.28	4.88	
2	3.87	3.02	4.90	
3	5.14	3.69	6.56	

*: Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks

** : One Way Repeated Measures Analysis of Variance

0-1	$p > 0.05$
0-2	$p > 0.05$
0-3	$p > 0.05$
3-1	$p < 0.05$
3-2	$p > 0.05$
2-1	$p > 0.05$

Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test)



*: Aşırı sapan değerler
o: Sapan değerler

Trombosit aferezi yapılan hastaların işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1 gün sonra ve 1 hafta sonraki monosit + trombosit agregatı (CD41 FITC+ ve CD45 PerCP+granülositler içindeki yüzde değeri) düzeylerinin karşılaştırılması Tablo 4.3'te verilmiştir.

Monosit-trombosit agregat düzeyleri işlemden hemen sonra işlem öncesine göre azalma göstermekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Ancak monosit-trombosit agregat düzeyleri işlemden 1 hafta sonra işlemden hemen sonrası ve işlemden 1 gün sonrasına göre istatistiksel olarak anlamlı artma göstermiştir ($P < 0.05$).

Tablo 4.3. Trombosit aferezi yapılan hastaların işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1 gün sonra ve 1 hafta sonraki monosit + trombosit agregatı (CD41 FITC+ ve CD45 PerCP+ granülositler içindeki yüzde değeri) düzeylerinin karşılaştırılması.

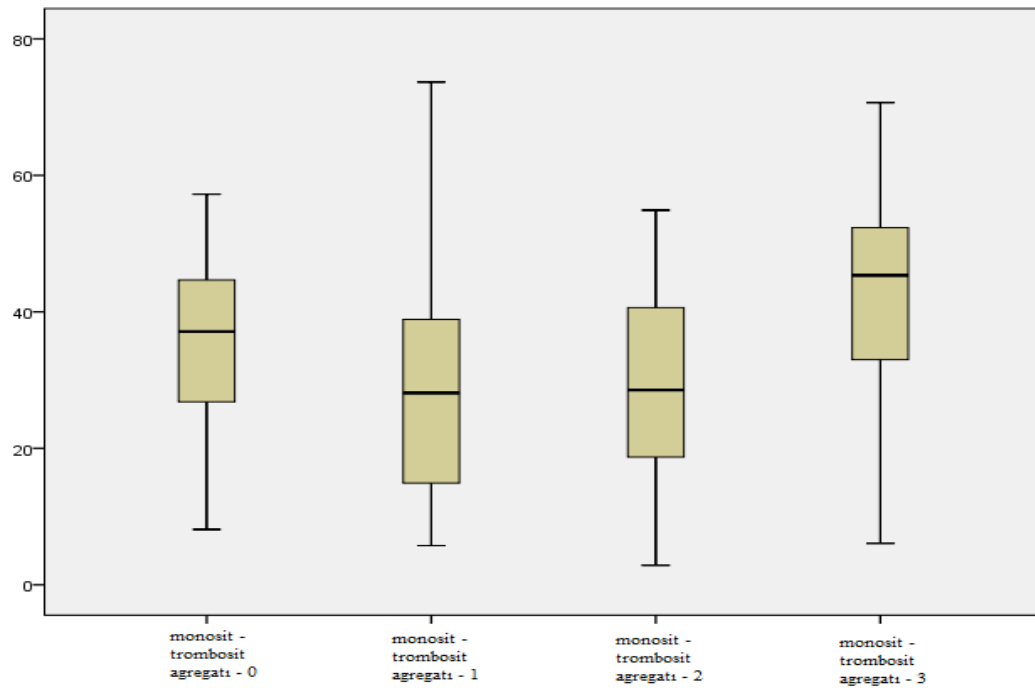
Monosit+trombosit	Medyan	%25	%75	P **
0	37.12	26.50	46.01	<0.001
1	28.11	14.78	39.06	
2	28.55	17.84	41.34	
3	45.36	30.67	52.57	

*: Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks

** : One Way Repeated Measures Analysis of Variance

0-1	p>0.05
0-2	p>0.05
0-3	p>0.05
3-1	p<0.05
3-2	p<0.05
2-1	p>0.05

Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test)



*: Aşırı sapan değerler

o: Sapan değerler

Trombosit aferezi yapılan hastaların işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1 gün sonra ve 1 hafta sonraki nötrofil + trombosit agregatı (CD41 FITC+ ve CD45 PerCP+ granüositler içindeki yüzde değeri) düzeylerinin karşılaştırılması Tablo 4.4'te verilmiştir.

Nötrofil-trombosit agregat düzeylerinin işlemden hemen sonra işlem öncesine göre azalma göstermekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Ancak işlemden 1 hafta sonra işlemden 1 gün sonrasına göre istatistiksel olarak anlamlı artma göstermiştir ($p<0.05$).

Tablo 4.4. Trombosit aferezi yapılan hastaların işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1 gün sonra ve 1 hafta sonraki nötrofil + trombosit agregatı (CD41 FITC+ ve CD45 PerCP+ granüositler içindeki yüzde değeri) düzeylerinin karşılaştırılması

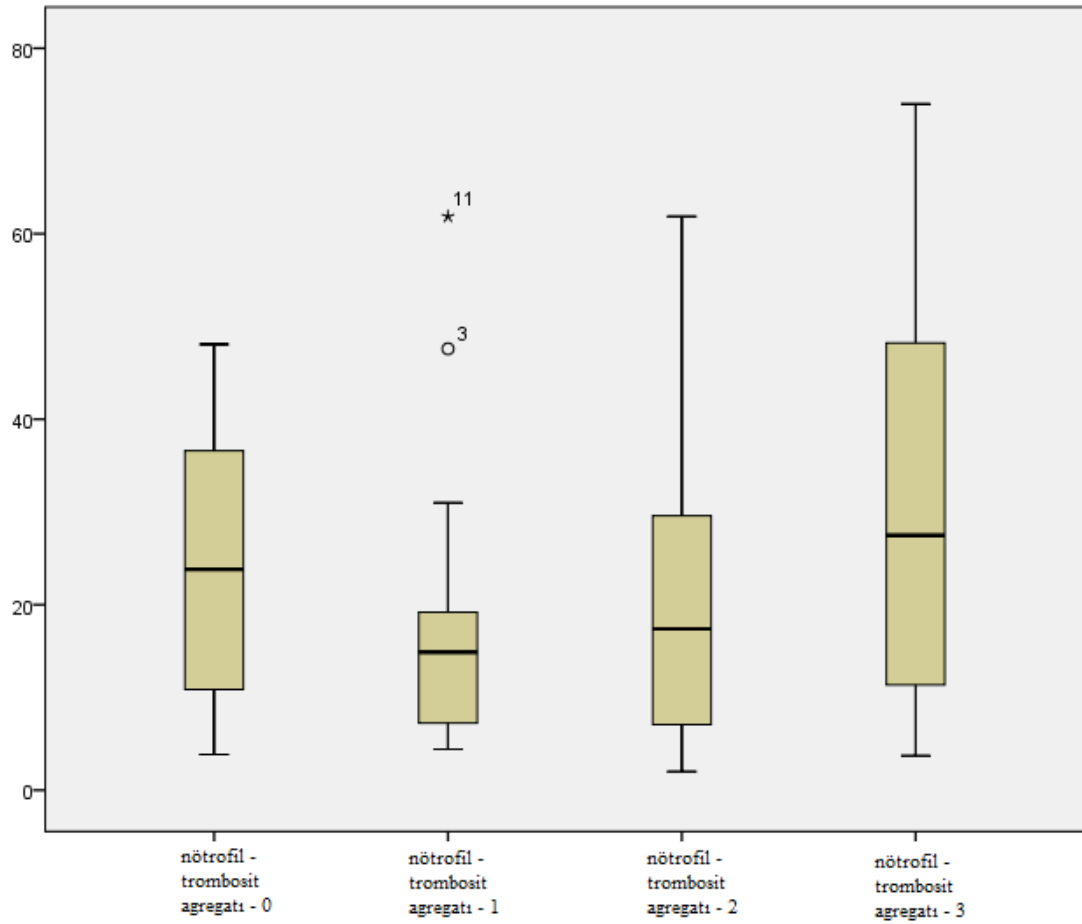
Nötrofil+trombosit agregatı	Medyan	%25	%75	p *
0	23.81	10.58	36.65	=0.006
1	14.88	7.23	19.49	
2	17.40	6.95	30.02	
3	27.48	10.92	48.66	

*: Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks

** : One Way Repeated Measures Analysis of Variance

0-1	$p>0.05$
0-2	$p>0.05$
0-3	$p>0.05$
3-1	$p<0.05$
3-2	$p>0.05$
2-1	$p>0.05$

Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test)



*: Aşırı sapan değerler
o: Sapan değerler

Trombosit aferezi yapılan hastaların işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1 gün sonra ve 1 hafta sonraki CD62P değerlerinin karşılaştırılması Tablo 4.5'de verilmiştir

CD62P (P-selektin) değerleri işlemden hemen sonra işlem öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterirken ($p < 0.05$), işlemden 1 gün ve 1 hafta sonra işlemden hemen sonrasına göre artma gösterse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Tablo 4.5. Trombosit aferezi yapılan hastaların işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1 gün sonra ve 1 hafta sonraki CD62P değerlerinin karşılaştırılması

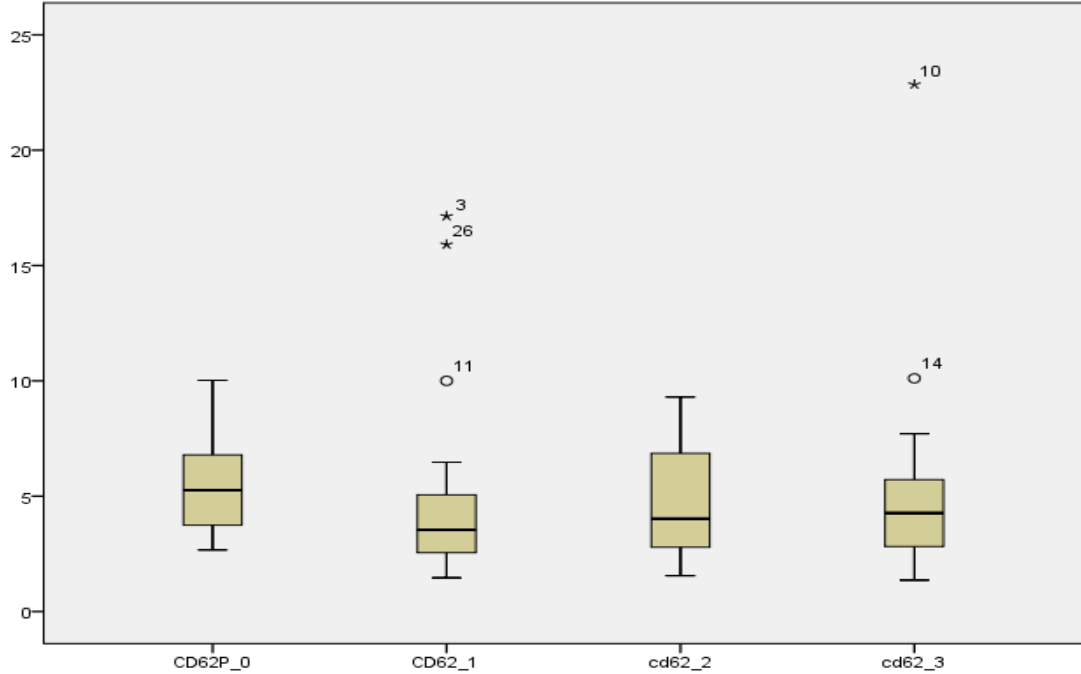
CD62P	Medyan	%25	%75	p *
0	5.26	3.63	6.84	=0.008
1	3.54	2.53	5.06	
2	4.02	2.69	6.86	
3	4.27	2.80	5.77	

*: Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks

** : One Way Repeated Measures Analysis of Variance

0-1	p<0.05
0-2	p>0.05
0-3	p>0.05
3-1	p>0.05
3-2	p>0.05
2-1	p>0.05

Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test)



*: Aşırı sapan değerler

o: Sapan değerler

Trombosit aferezi yapılan hastaların işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1 gün sonra ve 1 hafta sonraki protrombin fragman 1+2 (PF 1+2) değerlerinin karşılaştırılması Tablo 4.6'da verilmiştir.

PF 1+2 değerleri işlemden hemen sonra işlem öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterirken ($p<0,05$), işlemden 1 gün ve 1 hafta sonra işlemden hemen sonrasına göre artma gösterse de bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.6. Trombosit aferezi yapılan hastaların işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1 gün sonra ve 1 hafta sonraki PF 1+2 değerlerinin karşılaştırılması

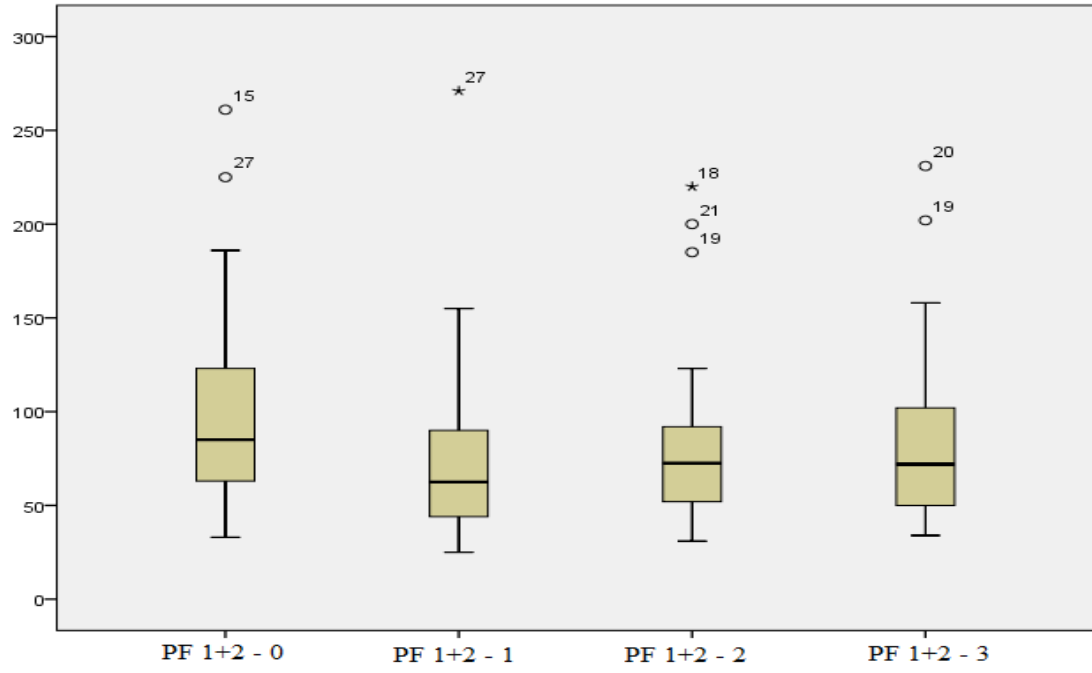
PF 1+2	Medyan	%25	%75	P *
0	85.00	62.25	128.00	=0.049
1	62.50	43.75	91.25	
2	72.50	51.75	94.75	
3	72.00	49.75	104.00	

*: Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks

** : One Way Repeated Measures Analysis of Variance

0-1	$p<0.05$
0-2	$p>0.05$
0-3	$p>0.05$
3-1	$p>0.05$
3-2	$p>0.05$
2-1	$p>0.05$

Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test)



*: Aşırı sapan değerler
o: Sapan değerler

5.TARTIŞMA

Trombositler kanın ana sellüler elemanlarından biridir ve hemostazda merkezi bir role sahiptir. Trombosit süspansiyonları, modern tıpta trombositopenik hastaların tedavi ve profilaksisinde yaygın olarak ve daha az sıklıkta da trombosit fonksiyon bozukluklarında kullanılmaktadır. 1970'lerde trombosit süspansiyonlarının etkinliğinin anlaşılması ve aferez yöntemi ile elde edilmesi sonrası rutin kullanıma girmiştir. Son 15-20 yılda kullanımı giderek artmaktadır. Yoğun kemoterapi ve kemik iliği transplantasyonu uygulamaları, komplike kardiyovasküler cerrahi işlemler bu artışın en önemli nedenleridir. Artan bu ihtiyaçla birlikte trombosit donasyonu teknikleri de gelişmektedir.

Aferez trombosit süspansiyonu, daha az lökosit içermesi, daha az sayıda donör gerektirdiğinden enfeksiyon riskinin az olması, havuzlama yapılmadığından bakteriyel kontaminasyon riskinin az olması, yeterli miktarda konsantre ürün elde edilmesi ve febril nonhemolitik transfüzyon reaksiyonlarını azaltmasıyla güvenli bir yöntemdir. Ancak aferez donasyonu genel olarak güvenli bir işlem olarak kabul edilmekle birlikte donör kanının yapay yüzeylerle teması sonucu ortaya çıkan donör güvenliği sorusu halen güncelliğini korumaktadır. Ekstrakorporel dolaşım sırasında pıhtılaşma faktörlerinin adsorbsiyonu, trombosit adezyon ve agregasyonu ve hücre ayırıcının yüzeyine bağlanması trombosit aferez donörlerinde hiperkoagulabl bir duruma yol açmaktadır. Bu bilgiler göz önüne alındığında; çalışmamızda trombosit aferezi yapılan sağlıklı donörlerde aferez işleminin ortaya çıkaracağı koagülasyon sistem değişikliklerini araştırmayı hedefledik. Bu amaçla, donörlerden, işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1 gün sonra ve 1 hafta sonra olmak üzere trombosit-nötrofil, trombosit-monosit, trombosit-lenfosit agregat düzeyleri, trombosit aktivasyon göstergesi olarak CD62P (P-selektin) düzeyleri ve hemostatik sistemin aktivasyon göstergesi olarak protrombin fragman 1+2 düzeyleri çalışılmıştır.

Çalışmamızda, trombosit aferezi yapılan donörlerin işlem öncesi ve sonrası hematolojik parametreleri karşılaştırıldığında, donörlerin hemoglobin düzeylerinde işlemden hemen sonra azalma yönünde anlamlı bir değişiklik görülmüştür. Stohlawetz ve arkadaşlarının trombosit aferezinin koagülasyon, fibrinolizis ve nötrofil aktivasyonu ve nötrofil-trombosit agregat oluşumu üzerine etkilerini

inceleyen çalışmasında trombosit aferezi ile hemogloblin değerlerinde anlamlı olarak azalma yönünde hafif bir değişiklik saptanmıştır (44).

Çalışmamızda, trombosit aferezi sonrasında donörlerin lökosit sayısında anlamlı bir düşüş görülmüş, 1 gün ve 1 hafta sonrasında ise işlem sonrasına göre tekrar anlamlı bir artış saptanmıştır. 1 gün sonraki ve 1 hafta sonraki değerler başlangıç düzeylerine göre daha yüksek olarak saptanmıştır. Stohlawetz ve arkadaşlarının çalışmasında, cihazın ekstrakorporel dolaşımında mononükleer hücrelerde %80'e yakın düşme, dolaşan lenfosit ve monosit sayılarında anlamlı bir düşme görülmekle birlikte nötrofil ve eozinofil sayılarında anlamlı bir değişiklik olmamıştır (44). Bilgin ve arkadaşlarının sürekli ve aralıklı akım cihazları ile yapılan çift doz trombosit aferezinin nötrofil adezyon molekülleri ekspresyonu ve trombosit-nötrofil kompleks oluşumunu akım sitometrik yöntem ile araştırdıkları çalışmalarında, trombosit aferezi sonrası lökosit sayılarında anlamlı değişiklik saptanmamıştır (45).

Çalışmamızda trombosit aferezi sonrası donörlerin trombosit sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş saptanmıştır. 1 gün ve 1 hafta sonra işlem sonrasına göre trombosit sayılarında anlamlı bir artış saptanmış ve 1 hafta sonunda trombosit sayıları başlangıç değerlerine ulaşmıştır. Bilgin ve arkadaşlarının çalışmasında trombosit aferezi sonrası trombosit sayılarında anlamlı bir düşüş saptanmış, 1 gün ve 1 hafta sonra trombosit sayılarında artış saptansa da başlangıca göre yine de düşük olduğu görülmüştür (45). Nadiah ve arkadaşlarının Malezya Kuala Lumpur'daki sağlıklı donörlerde trombosit aferezinin koagülasyon parametreleri üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmasında trombosit aferezi sonrası trombosit sayılarında anlamlı düşüş olmuştur (46).

Sonuçlarımız trombosit aferezi sırasında donörlerin hematolojik parametrelerindeki değişikliklerin kısa sürede düzeldiğini göstermektedir. Trombosit sayısındaki düşüş donörde trombopoezi aktive etmektedir. Dalağın da katkısıyla trombosit aferezi sonrası donör trombosit sayıları tekrar yükselmektedir. Hematolojik parametrelerdeki değişikliklerin hiçbir zaman fizyolojik olmayan değerlere ulaşmadığı ve böylece donör güvenliğinin işlem süresince sağlandığını söyleyebiliriz.

Çalışmamızda PT değerinin işlemden hemen sonra işlem öncesine göre uzadığı ancak işlemden 1 hafta sonra işlem öncesine göre kısaldığı ve farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. aPTT değerinin istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte işlemden hemen sonra işlem öncesine göre uzadığı ve işlemden 1 hafta sonra işlem öncesine göre kısaldığı ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Nadiah ve arkadaşlarına ait çalışmada da PT ve aPTT değerlerinin işlem sonrası uzadığı fakat bu artışın bizim çalışmamızdaki gibi normal değerlerde kaldığı saptanmıştır (46). Biz, trombosit aferezi sonrası hemostaz testlerindeki bu artışın işlemde kullanılan ACD-A solusyonundaki sitrata bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Sitratin kısa in vivo yarı ömrü (36 ± 18 dakika) göz önüne alındığında donörün koagülasyon sistemi üzerinde sistemik bir etki oluşturmadığını söyleyebiliriz.

Çalışmamızda fibrin yıkım ürünü olan D-dimer düzeyinde işlem sonrası artma olmakla birlikte işlemden 1 gün ve 1 hafta sonra işlem sonrasına göre azalma izlenmiş ancak farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Fibrinojen düzeyinde ise trombosit aferezi sonrası ve 1 gün sonra işlem öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı olarak azalma görülmüştür. Stohlawetz ve arkadaşlarının çalışmasında da trombosit aferezi uygulanan donörlerin D-dimer ve fibrinojen düzeylerinin azaldığı görülmüştür (44). Biz bu değişiklikleri trombosit aferezi sırasında fibrinolizisin aktivasyonunun sistemik olarak azalması veya aktivasyonun artmasına rağmen temizlenmesinde artış olması ile açıklıyoruz.

Tromboz ve inflamasyon birbirine yakın patofizyolojik süreçlerdir. Polimorfonükleer hücrelerin aktive olmasıyla açığa çıkan mediatörler, intrasellüler proteazlar ve oksijen radikalleri sayesinde endotel hücreleri ve trombositlerde çeşitli aktivasyonlar gelişerek prokoagulan bir durum oluşabilmektedir. Tromboz ve inflamasyon kompleks trombosit lökosit etkileşimini içerir. Son çalışmalara göre trombositler lökositler ile heterotopik agregat oluşturmaktadır. Bu ilişki tromboz ve inflamasyonun olduğu iskemik vasküler ve kalp hastalıklarında gösterilmiştir. Yapılan in vitro çalışmalarda trombositlerin inflamatuvar olaylarda önemli rol aldıkları görülmüştür. Astımlı hastaların atak anında bronşiyal biyopsi örneklerinde artmış intravasküler agregasyon saptanması ve hasarlanmış epitel yüzeyinde

trombositlerin toplanması bu hücrelerin inflamasyonda rollerinin olduğunu desteklemektedir (48).

Bizim çalışmamızda lenfosit-trombosit, monosit-trombosit ve nötrofil-trombosit agregat düzeylerine bakılmıştır. Lenfosit-trombosit düzeyleri trombosit aferezi sonrası azalma göstermiş, 1. gün ve 1. hafta sonunda tekrar artış göstermiştir fakat yapılan istatistiksel analizde trombosit aferezi sonraki azalma ve 1. gündeki artış anlamlı olmayıp 1. hafta sonundaki artış anlamlı bulunmuştur. Monosit-trombosit agregat düzeyleri işlemde hemen sonra işlem öncesine göre azalma göstermekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak monosit-trombosit agregat düzeyleri işlemde 1 hafta sonra işlemde hemen sonrası ve işlemde 1 gün sonrasına göre istatistiksel olarak anlamlı artma göstermiştir. Nötrofil-trombosit agregat düzeylerine bakıldığında lenfosit-trombosit agregat düzeylerindeki değişimlere benzer olarak trombosit aferezi sonrası azalma göstermiş, 1. gün ve 1. hafta sonunda tekrar artış göstermiştir fakat yapılan istatistiksel analizde trombosit aferezi sonraki azalma ve 1. gündeki artış anlamlı olmayıp 1. hafta sonundaki artış anlamlı bulunmuştur.

Trombosit nötrofil agregatlarında artış çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda gösterilmiştir. Furman ve arkadaşlarının stabil koroner arter hastalarında trombosit reaktivitesi ve monosit-trombosit agregatlarını inceledikleri çalışmaya 19 hasta ve 19 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Hasta grubunda, dolaşan aktive trombositler, dolaşan monosit-trombosit agregatları, artmış trombosit reaktivitesi ve artmış monosit-trombosit agregatları oluşturma eğilimi saptanmıştır (48). Yine Furman ve arkadaşlarına ait 2001 yılında yapılan başka bir çalışmada, akut miyokard infarktüsü hastalarında monosit-trombosit agregatlarının erken belirteç olarak kullanılması araştırılmıştır. Akut miyokard infarktüsü tanısı alan 61 hastada, 151 kontrol ile karşılaştırıldığında, dolaşan monosit-trombosit agregat düzeyi anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. Semptom başlangıcının ilk 4 saati içinde başvuran hastalarda monosit-trombosit agregat düzeyi, semptom başlangıcından 4 saat ve 8 saat sonra başvuran hastalardan daha yüksek bulunmuştur. Yazarlar dolaşan monosit-trombosit agregatlarının akut miyokard infarktüsünün erken belirleyicisi olduğu sonucuna varmışlardır (49). Sarma ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da, akut koroner sendromda dolaşan monosit-trombosit agregatları incelenmiştir. Kardiak olmayan

göğüs ağrılı hastalara göre, akut miyokard infarktüsü veya unstabil anjinası olan hastalarda monosit-trombosit agregat düzeyleri artmış olarak saptanmış ve vasküler hastalıkların duyarlı bir belirteci olarak değerlendirilmiştir (50).

Stohlawetz ve arkadaşlarına ait olan trombosit aferezinin koagülasyon, fibrinolizis ve nötrofil aktivasyonu ve nötrofil-trombosit agregat oluşumu üzerine etkilerini inceleyen çalışmada, nötrofil-trombosit agregatları trombosit aferezi sonrası istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır (44). Bilgin ve arkadaşlarının sürekli ve aralıklı akım cihazları ile yapılan çift doz trombosit aferezinin nötrofil adezyon molekülleri ekspresyonu ve trombosit-nötrofil kompleks oluşumunu akım sitometrik yöntem ile araştırdıkları çalışmada, trombosit aferezi sonrası trombosit-nötrofil kompleks sayısında üç kat kadar anlamlı bir artış saptanmıştır. Birinci günün sonunda trombosit-nötrofil kompleks sayısı halen bazal değerlerin hafifçe üstünde saptanmıştır. Bu donörlerde protrombotik bir durum geliştiğini gösterdiği lehine yorumlanmıştır (45). Benzer şekilde Gutensohn ve arkadaşlarına ait çalışmada da trombosit aferezi işlemi sırasında trombositlerin monosit ve nötrofilik granüositlere bağlanmasında artma olduğunu saptamıştır (51). Bernard ve arkadaşlarına ait trombosit aferezi donörlerinde yapılan çalışmada ise trombosi-nötrofil agregatlarında trombosit aferezi sonrası anlamlı değişiklik saptanmamıştır (35).

Bizim çalışmamızda da, trombosit-granüosit, trombosit-lenfosit ve trombosit-monosit agregat düzeylerinde trombosit aferezi sonrası azalmayı takiben 1. gün ile 1. hafta sonunda tekrar artış olması işlemin donörlerde prokoagulan bir duruma yol açtığını düşündürmektedir. Özellikle tekrarlayan trombosit aferezi uygulanan ve/veya ek trombofilik risk faktörü olan donörlerde aferez işleminin protrombotik riski indükleyebileceğini düşünmekteyiz.

L-selektin düzeyinde artış nötrofil aktivasyonunun göstergesidir. Literatürde Stohlawetz ve arkadaşlarının çalışmada trombosit aferezinin L-selektin düzeyini azaltmadığı ve nötrofil aktivasyonunu tetiklemediği görülmüştür (44). Bilgin ve arkadaşlarına ait çalışmada ise aferez ile L-selektin düzeylerinde anlamlı bir azalma görülüp 1. günün sonunda halen aferez öncesi seviyeye göre düşüklük olup 1 hafta sonunda bazal değerlere tekrar ulaştığı görülmüştür. Bununla birlikte hafif bir nötrofil aktivasyonu yaptığı saptanmıştır (45). Western ve arkadaşlarının yaptığı

çalışmada ise L-selektin düzeylerinde artma olup nötrofil aktivasyonunda hafif artış saptanmıştır (52).

Bernard ve arkadaşlarının yaptığı, trombosit aferezi esnasında trombosit yüzey P-selektin, trombosit-lökosit agregatları ve plazma solubl P-selektin düzeylerinin araştırıldığı çalışmada da trombosit aferezi sonrası donör periferik kanında yüzey P-selektin ekspresyonu ile belirlenen aktive trombositler saptanmamıştır (35). Gutensohn ve arkadaşlarının çalışmasında aferez sonrası P-selektin yüzey ekspresyonunda artma saptanmıştır (51). Bizim çalışmamızda ise P-selektin düzeylerinde trombosit aferezi sonrasında azalma saptanmıştır. Daha sonra ise artma olmakla birlikte bazal değere ulaşamamış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durumu, aktive trombositlerin dilüsyon veya donöre dönen kandan hızla temizlenmesi ile açıklayabiliriz.

Çalışmamızda, protrombin fragman1+2 değerleri işlemden hemen sonra işlem öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterirken işlemden 1 gün ve 1 hafta sonra işlemden hemen sonrasına göre artma gösterse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Literatürde Stohlawetz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, trombosit aferezi uygulanan donörlerde protrombin fragman 1+2 düzeylerinde artış olmadığı görülmüş ve trombosit aferezinin koagülasyona yatkınlık oluşturmadığı belirtilmiştir (44). Kobayashi ve arkadaşlarına ait bir diğer çalışmada ise, trombosit aferezi sonrası protrombin fragman 1+2 düzeyinde 3 kata yakın artış saptanmış ve ekstrakorporal dolaşıma giren kanın prokoagulan bir durum oluşturduğu düşünülmüştür (53). Bizim çalışmamızda da, işlem sonrası 1. gün ve 1. hafta sonunda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, hemostatik aktivasyonun in vivo moleküler göstergesi olan protrombin 1+2'nin artış göstermesi aferez donörlerinde ortaya çıkan prokoagulan durumu desteklemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1) Sonuçlarımız trombosit aferezi sırasında donörlerin hematolojik parametrelerindeki değişikliklerin kısa sürede düzeldiğini göstermektedir. Hematolojik parametrelerdeki değişikliklerin hiçbir zaman fizyolojik olmayan değerlere ulaşmadığı ve böylece donör güvenliğinin işlem süresince sağlandığını söyleyebiliriz.
- 2) Çalışmamızda trombosit aferezi sonrası PT ve aPTT düzeylerinde uzama olup 1 gün ve 1 hafta sorasında normal değerlere geri döndüğü görülmüştür. Trombosit aferezi sonrası hemostaz testlerindeki bu artışın işlemde kullanılan ACD-A solusyonundaki sitrata bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Sitratin kısa in vivo yarı ömrü (36 ± 18 dakika) göz önüne alındığında donörün koagülasyon sistemi üzerinde sistemik bir etki oluşturmadığını söyleyebiliriz.
- 3) Çalışmamızda fibrin yıkım ürünü olan D-dimer düzeyinde işlem sonrası artma olmakla birlikte işlemden 1 gün ve 1 hafta sonra işlem sonrasına göre azalma izlenmiştir. Fibrinojen düzeyinde ise trombosit aferezi sonrası ve 1 gün sonra işlem öncesine göre azalma görülmüştür. Bu değişiklikleri trombosit aferezi sırasında fibrinolizisin aktivasyonunun sistemik olarak azalması veya aktivasyonun artmasına rağmen temizlenmesinde artış olması ile açıklıyoruz.
- 4) Çalışmamızda trombosit-granülosit, trombosit-lenfosit ve trombosit-monosit agregat düzeylerinde trombosit aferezi sonrası azalmayı takiben 1. gün ile 1. hafta sonunda tekrar artış olması işlemin donörlerde prokoagulan bir duruma yol açtığını düşündürmektedir. Özellikle tekrarlayan trombosit aferezi uygulanan ve/veya ek trombofilik risk faktörü olan donörlerde aferez işleminin protrombotik riski indükleyebileceğini düşünmekteyiz.
- 5) Çalışmamızda P-selektin düzeylerinde trombosit aferezi sonrasında azalma saptanmıştır. Bu durumu, aktive trombositlerin dilüsyon veya donöre dönen kandan hızla temizlenmesi ile açıklayabiliriz.
- 6) Çalışmamızda işlem sonrası 1. gün ve 1. hafta sonunda hemostatik aktivasyonun in vivo moleküler göstergesi olan protrombin 1+2 nin artış göstermesi aferez donörlerinde ortaya çıkan prokoagulan durumu desteklemektedir.

KAYNAKLAR

1. Öngören Ş. Terapötik Aferez Uygulamaları. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Herkes İçin Transfüzyon Tıbbı Sempozyum Dizisi. 2005; 44: 189-201
2. Eşkazan E. Aferez Komplikasyonları. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Herkes İçin Transfüzyon Tıbbı Sempozyum Dizisi. 2005; 44: 203-218
3. Oral M, Yılmaz AA. Plazmaferez. J Turk Soc Intens Care 2008; 6: 19-24
4. Jang CS, Kim SI, Kim HK, Kweon CO, Kim BW, Dong-Chan Kim, Yoon Suk Kim, Ki-Jong Rhee and Jae-Ki Ryu. Plateletpheresis: the Process, Devices, and Indicators of Product Quality. Journal of Life Science 2014; 24 (9): 1030~1038
5. McLeod BC. Apheresis, Principles and Practice, 2nd Edition, AABB Press, Bethesda, Maryland, 2003.
6. Giraud CG, Korach JM, Andreu G, et al. Principles of separating blood elements. Transfus Clin Biol 2002; 9: 179-185.
7. Ayyıldız E, Arat M. Aferez Prensipleri ve Cihazları. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci 2005; 1(19): 3-8
8. McLeod BC, Price TH, Owen H, et al. Frequency of immediate adverse effects associated with apheresis donation. Transfusion 1998; 38: 938-43.
9. Despotis GJ, Goodnough L, Dynis M, et al. Adverse events in platelet apheresis donors: A multivariate analysis in a hospital-based program. Vox Sang 1999; 77: 24-32.
10. Franchini M, Gandini G, Gandini AR, et al. Frequency of adverse events during blood and apheresis donations. Infus Ther Trans Med 2002; 29: 200-5.
11. Winters JL. Complications of donor apheresis. J Clin Apheresis 2006; 21: 132-41.
12. Bolan CD, Greer SE, Cecco SA, et al. Comprehensive analysis of citrate effects during plateletpheresis in normal donors. Transfusion 2001;41:1165-71.

13. Bolan CD, Wesley RA, Yau YY, et al. Randomized placebo-controlled study of oral calcium carbonate administration in plateletpheresis: I. Association with donor symptoms. *Transfusion* 2003; 43: 1403-13.
14. Mercan D, Bastin G, Lambermont M, et al. Importance of ionized magnesium measurement for monitoring of citrate-anticoagulated plateletpheresis. *Transfusion* 1997; 37: 418-22.
15. Kelleher SP, Schulman G. Severe metabolic alkalosis complicating regional citrate hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 1987; 9: 235-6.
16. Dzik WH, Kirkley S. Citrate toxicity during massive blood transfusion. *Transfus Med Rev* 1988; 2: 76-94.
17. Standards Committee of the American Association of Blood Banks. Standards for blood banks and transfusion services, 22nd ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 2003.
18. Özkalemtaş F. Donör aferezi komplikasyonları: Kısa ve uzun dönem etkiler. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2007; 3: 143-52.
19. Akay OM, Mutlu G, Akın E, Gülbaş Z. Effects of Thrombocytapheresis on Donor's Platelet Function and Coagulation System. 15th Congress of the Interdisciplinary European Society for Haemapheresis and Haemotherapy. (Antalya) 2005: 33; 211.
20. Heyns A, Badenhorst P, Lotter M, et al. Kinetics and mobilization from the spleen of Indium-111-labeled platelets during platelet apheresis. *Transfusion* 1985; 25: 215-8.
21. Dettke M, Hlousek M, Kurz M, et al. Increase in endogenous trombopoietin in healthy donors after automated plateletpheresis. *Transfusion* 1998; 38: 449-53.
22. Strauss RG, Stansfield C, Henriksen RA, et al. Pentastarch may cause fewer effects on coagulation than hetastarch. *Transfusion* 1998; 28: 257-60.
23. Kurtoğlu E, Özkaya E. Tromboferez işlemi sırasında karşılaşılan komplikasyonlar: Meram Tıp Fakültesi Aferez Ünitesi deneyimi. *Genel Tıp Derg* 2004;14(3) :109-111
24. Crocco I, Franchini M, Garozzo G, Gandini AR, Gandini G, Bonomo P, Aprili G. Adverse reactions in blood and apheresis donors: experience from two Italian transfusion centres. *Blood Transfus* 2009; 7: 35-8

25. Yuan S, Ziman A, Smeltzer B, Lu Q, Goldfinger D. Moderate and severe adverse events associated with apheresis donations: incidences and risk factors. *Transfusion*. 2010; 50(2): 478-86.
26. Bilgen H. Donör aferez komplikasyonları. XXXVII. Ulusal Hematoloji Kongresi 19-22 Ekim 2011, Ankara
27. Li N, Goodall AH, Hjendahl P. A sensitive flow cytometric assay for circulating platelet-leucocyte aggregates. *Br J Haematol*. 1997; 99: 808-816.
28. Shattil SJ, Ginsberg MH, Brugge JS. Adhesive signaling in platelets. *Curr Opin Cell Biol*. 1994; 6: 695-704.
29. Lane DA, Philippou H, Huntington JA. Directing thrombin. *Blood*. 2005; 106: 2605-2612.
30. Kolev K, Machovich R. Molecular and cellular modulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost*. 2003; 89: 610-621.
31. Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev* 2007; 21(2): 99-111.
32. Yakarıılmaz A. Trombosit-lökosit fonksiyonel etkileşiminin in-vitro koşullarda incelenmesi In-vitro evaluation of platelet-leucocyte functional interaction. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2005; 58(2): 51-56
33. Wagner DD, Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(12): 2131-7.
34. Walter-Croneck A, Belniak-Legieć E, Janicka L, Madro E, Krawczyk P. Expression of platelet activation markers--selectin P and glycoprotein CD63 during hemodialysis. *Pol Arch Med Wewn*. 1997; 98(11): 424-30.
35. Barnard MR, MacGregor H, Mercier R, Ragno G, Pivacek LE, Hechtman HB, Michelson AD, Valeri CR. Platelet surface p-selectin, platelet-granulocyte heterotypic aggregates, and plasma-soluble p-selectin during plateletpheresis. *Transfusion* 1999; 39: 735-741.
36. Béla Nagy Jr, Ildikó Beke Debreceni, János Kappelmayer. Flow cytometric investigation of classical and alternative platelet activation markers. *EJIFCC* 2012; 23(4): 124-134

37. Zietkowski Z, Skiepkowski R, Tomasiak MM, et al. Soluble CD40 ligand and soluble P-selectin in allergic asthma patients during exercise-induced bronchoconstriction. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2008; 18(4): 272-8.
38. Bakry R, Sayed D, Galal H, Sanaa Shaker S. Platelet Function, Activation and Apoptosis During and After Apheresis Therapeutic Apheresis and Dialysis 2010; 14(5): 457–464
39. Polgar J, Matuskova J, Wagner DD. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb Haemost* 2005; 3(8): 1590-6
40. Ludwig RJ, Schön MP, Boehncke WH. P-selectin: a common therapeutic target for cardiovascular disorders, inflammation and tumour metastasis. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11(8): 1103-17.
41. Danese S, Fiocchi C. Platelet activation and the CD40/CD40 ligand pathway: mechanisms and implications for human disease. *Crit Rev Immunol* 2005; 25(2): 103-21.
42. Lane DA, Philippou H, Huntington JA. Directing thrombin. *Blood*. 2005; 106: 2605-2612.
43. Kolev K, Machovich R. Molecular and cellular modulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost* 2003; 89(4): 610-21.
44. Stohlawetz P, Kapiotis S, Seidl D, Hergovich N, Zellner M, Eichler HG, Stiegler G, Leitner G, Hockey P, Jilma B. Safety issues of plateletpheresis: comparison of the effects of two cell separators on the activation of coagulation, fibrinolysis, and neutrophils and on the formation of neutrophil-platelet aggregates. *Transfusion* 1999; 39: 420-427
45. Bilgin AU, Karadogan I, Gencay Yilmaz F, Undar L. Double dose plateletpheresis by continuous and intermittent flow devices increases platelet-neutrophil complex formation in healthy donors without noticeable neutrophil activation. *Transfusion and Apheresis Science* 2007; 36: 31–37
46. Nadiah S, Asiah MN, Syimah ATN, Normi M, Anza E, Aini AN, Mohd TH, et al. Effects of plateletpheresis on blood coagulation parameters in healthy donors at National Blood Centre, Kuala Lumpur, Malaysia A.K. *Transfusion and Apheresis Science* 2013; 49: 507–510

47. Benton AS, Kumar N, Lerner J, et al. Airway platelet activation is associated with airway eosinophilic inflammation in asthma. *Journal of Investigative Medicine* 2010; 58(8): 987.
48. Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC, et al. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *Am Coll Cardiol* 1998; 31(2): 352-8.
49. Sarma J, Laan CA, Alam S, Jha A, Fox KA, Dransfield I. Increased platelet binding to circulating monocytes in acute coronary syndromes. *Circulation* 2002; 105(18): 2166-71.
50. Furman MI, Barnard MR, Krueger LA, Fox ML, Shilale EA, Lessard DM, et al. Circulating monocyte-platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38(4): 1002-6.
51. Gutensohna K, Alischa A, Kruegerb W, Kroegerb N, Kuehnl P. Extracorporeal Plateletpheresis Induces the Interaction of Activated Platelets with White Blood Cells. *Vox Sang* 2000; 78: 101–105
52. Western KH, Videm V. Donor neutrophil function after plateletpheresis. *Transfusion* 2000; 40(11): 1414–8.
53. Kobayashi I, Hamaoka S, Ozawa H, Ihno M, Tamura K, Tanaka Y, Sakamoto Y, Nakamura A, Ueno A. Hypercoagulable state induced by thrombocytapheresis. *J. Clin. Apheresis* 1993; 8: 147–152

