

Trombosit-lökosit fonksiyonel etkileşiminin in-vitro koşullarda incelenmesi

In-vitro evaluation of platelet-leucocyte functional interaction

Ali Yakaryılmaz

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı
Ankara

Amaç: Trombositler ve nötrofiller hemostatik ve inflamatuvar cevapların önemli hücreleridir. Nötrofillerin serbest oksijen radikalleri aracılığı ile doku faktörü üretimi ve trombosit aktivasyonunu düzenleyerek ateroskleroz ve tromboz patogeneğinde önemli rol oynayabileceği vurgulanmaktadır. Diğer yandan trombositlerin de inflamasyonda rolü olabileceği düşünülmektedir. Sunulan çalışmada sağlıklı genç erişkinlerden alınan kan örneklerinde trombosit-nötrofil fonksiyonel etkileşiminin in-vitro koşullarda araştırılması planlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 19 ile 26 yaşları arasında, sağlıklı 14 erkek gönüllü çalışmaya alındı. Çalışmanın ilk aşamasında trombositten zengin plazmaya eklenen nötrofil süspansiyonunun impedans tekniği ile ölçülen hücreler arası agregasyona etkisi araştırıldı. İkinci aşamada trombinle inkübe edilen trombositlerden elde edilen süpernatantın nötrofil süspansiyonunda agregasyona ve kemiluminesansa etkisi araştırıldı. İmpedans tekniği kullanılarak değerlendirilen nötrofil agregasyonu ve lumi-agregometre kullanılarak nötrofil kemiluminesansı ölçüldü. Üçüncü aşamada N-formyl-L-methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanine (FMLP) ile uyarılan nötrofillerden elde edilen süpernatantın trombosit süspansiyonunda agregasyon ve ATP sekresyonu üzerine etkisi araştırıldı.

Bulgular: Çalışmanın ilk aşamasında yüzeye (elektrodlara) tutunmuş trombositlere nötrofil eklenmesinin agregasyon şiddeti üzerine etki göstermediği gözlemlendi. İkinci aşamada trombinle inkübe edilen trombositlerin sekretuar ürünlerinin nötrofil agregasyonunu azalttığı ($p<0.05$), oysa nötrofil kemiluminesansını artırdığı ($p<0.05$) saptandı. Çalışmanın üçüncü aşamasında FMLP ile uyarılan nötrofillerden elde edilen süpernatantın trombosit agregasyonu ve ATP sekresyonu üzerine etkisinin olmadığı saptandı.

Sonuç: Sunulan çalışma trombosit kökenli ürünlerin nötrofil fonksiyonlarını etkilediğini gösterdi. Çok basamaklı ve karmaşık bir süreç olan nötrofil aktivasyonunda bu ürünlerin rollerinin ayrı ayrı incelenmesi gerektiği sonucuna varıldı.

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

Aim: Platelets and neutrophils are effector cells of inflammation and hemostasis. It is emphasized that neutrophils regulate platelet activation in atherosclerosis and thrombosis pathogenesis by tissue factor and free oxygen radicals. On the other hand, platelets can play a role in inflammatory responses. In this study, we aimed to investigate the functional interaction between platelet and neutrophil.

Materials and Methods: 19 and 26 years old volunteer healthy men joined to the study. Platelet aggregation was measured by impedance technique and ATP secretion was measured by bioluminescence technique. In the first stage, the effect of neutrophil suspension added to platelet rich plasma on aggregation measured by impedance technique was investigated. In the second stage, neutrophil aggregation and chemiluminescence with the supernatant of thrombin pretreated-platelets are investigated. In third stage, platelet aggregation and ATP secretion with the supernatant of N-formyl-L-methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanine FMLP pretreated-neutrophils were investigated.

Results: No alteration in intensity of aggregation was observed in the first stage. Platelet supernatant increased neutrophil chemiluminescence ($p<0.05$), but decreased neutrophil aggregation in the second stage ($p<0.05$). Neutrophil supernatant had no effect on platelet aggregation and secretion in the third stage.

Conclusion: The present study demonstrated that platelet supernatant decreases neutrophil aggregation and increases chemiluminescence. The individual effect of all platelet products on neutrophil activation, which is a multi-step and complicated process, must be examined to understand the mechanisms.

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

*Dr. Ali Yakaryılmaz'ın uzmanlık tez çalışmasının özetidir. AÜ Araştırma Fonu 2001.08.09.064 kod nolu proje ile desteklenmiştir.

Geliş tarihi: 21.03.2005 • Kabul tarihi: 11.05.2005

Yazışma adresi

Ali Yakaryılmaz

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Tel : 0 533 6229884

E-mail : aliyakaryilmaz@yahoo.com

Trombositler ve nötrofiller doku yaralanmasındaki hemostatik ve inflamatuvar cevapların önemli hücreleridir. Miyokard infarktüsü, “stroke” ve Akut Respiratuvar Distres Sendromu (ARDS) gibi damar bozukluklarını içeren hemostatik ve inflamatuvar süreçlerde birlikte yer alırlar (1). Nötrofillerin serbest oksijen radikalleri aracılığı ile doku faktörü üretimi ve trombosit aktivasyonunu düzenleyerek ateroskleroz ve tromboz patogeneğinde önemli rol oynayabileceği vurgulanmaktadır (2,3). Diğer yandan trombositler inflamatuvar yanıtta rol alan araçlarından biri olarak kabul edilir. Trombosit kökenli çeşitli mediatörlerin (PF4, (TG) nötrofil kemotaksis ve fagositozunu indüklediği veya regüle ettiği öne sürülmektedir (4,5). Nötrofil-trombosit etkileşiminde çeşitli kimyasal araçların yanısıra kontakt faktörlerin de rol oynayabileceği öne sürülmektedir (6,7, 8,9). 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.

Gereç 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. 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. Bu değerler ve tam kanda ADP ile indüklenen trombosit agregasyon değerleri normal sınırlarda olan kanla çalışıldı. Trombosit İzolasyonu: Trombositten zengin plazma (PRP) elde etmek için, kan 24 °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, Na₂HPO₄ 0.34 mM, KH₂PO₄ 0.44 mM, Glukuz 5.5 mM, NaHCO₃ 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 (10).

Nötrofil İzolasyonu: PRP alındıktan sonra kalan kan 50 ml’lik tüplere konup üzerine, her 8 cc kan için 1 ml “Varihes” (Hidroksietil nişasta (HES) 450/0.7, %6’lık çözelti) eklendi. +4 °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 °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 °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 trombosit fazla bulaş varsa, pellet yine 5 cc mHBSS eklenerek +4 °C’de 500 rpm’de santrifüj edildi. Nötrofillerin sayısı trombositlerin sayısının 40’da biri olacak şekilde mHBSS ile resüspansiyonu yapıldı (7,11). Nötrofillerin canlılığının testi için, trypan blue kullanıldı. 0.1 g trypan 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 x1-00’lük büyütmede değerlendirildi (12).

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 (13). 900 µl PRP ya da trombosit süspansiyonu 1000 µl’lik silikonize küvetlere alındı. Örnekler 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 indükledi.

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+O₂ lusiferaz+Mg AM-P+PP+CO₂+oksilusiferin+ışık). Ortaya çıkan ışığın şiddeti ile orantılı olarak cihaz tarafından üretilen voltaj kaydedilir (14). Trombin ile indüklenen trombosit agregasyonunu takiben örnekler 100µl lusiferin eklendi. Aktif trombositlerden sekrete edilen ATP ile kaydedilen voltaj, örneğe (900µl PRP ya da trombosit süspansiyonu) bilinen miktar ATP (2nM) eklenerek elde edilen standart ile karşılaştırılarak hesaplandı.

Nötrofil agregasyonu: N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (FMLP) (5x10⁻⁷M 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 (15).

Nötrofil kemiluminesansı: FMLP ile uyarılan nötrofil agregasyonu ile eş zamanlı kemiluminesans ölçümü amacı ile örnekler 500µM/ml final konsantrasyonunda luminol eklendi. Cihazın biyoluminesan kanalı kullanılarak nötrofil kaynaklı kemiluminesan kaydedildi (15,16).

Deney protokolü

Çalışmanın ilk aşamasında trombosit ve nötrofilin kontakt etkileşimini değerlendirmek için:

1. 900 µl PRP üzerine 100 µl mHBSS eklenerek hazırlanan örnekler 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 süspansiyonu Eppendorf mikrosantrifüj ile 10.000rpm'de 3 dakika süre ile santrifüj edilerek trombosit süpernatantı 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 süspansiyonu Eppendorf mikrosantrifüj ile 10000rpm'de 3 dakika süre ile santrifüj edilerek nötrofil süpernatantı 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.

Bulgular

Deney grubunun trombosit sayısı ortalama 184900±34100/mm³, nötrofil sayısı 6200±1290/mm³ olarak saptandı. Çalışmanın ilk aşamasında, trombin ile aktive edilen PRP'da agregasyon şiddeti ile trombinle inkübe edilen nötrofil süspansiyonu+PRP'da ölçülen agregasyon şiddeti arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptandı (p>0.05). Agregasyon şiddeti değerleri Tablo-1'de verilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında değerlendirilen; FMLP ile indüklenen nötrofiller ile aktif trombosit süpernatantı eklenen ve FMLP ile indüklenen nötrofillerde agregasyon

Tablo 1. 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)	19.5455 ±12.3079	20.9318 ± 11.2656	p>0.05

Tablo 2. 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

Tablo 3. 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

şiddeti ve kemiluminesan değerleri Tablo 2'de verilmiştir. Trombosit süpernatantının eklenmesi ile nötrofil agregasyonunun istatistiksel olarak önemli derecede azaldığı (p=0.046), nötrofil kemiluminesansının ise arttığı (p=0.048) saptanmıştır. 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 3'de verilmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark olmadığı gözlenmiştir (p=0.86, p=0.7).

Tartışma

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 kullanılabilir (17). 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 (18). Trombosit sekresyon fonksiyonu çeşitli yöntemlerle değerlendirilebilir. Trombosit kökenli proteinlerin (PF4, (TG) 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 (19). 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, luminol bağımlı kemiluminesan önemli bir yöntem haline gelmiştir (9,20). İmpedans tekniği ile nötrofil agregasyonunun incelenmesi ise, nötrofil aktivasyonu ve adezyon fonksiyonlarının in vitro değerlendirilmesi bakımından duyarlı bir yöntemdir (21). 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 (8,22). Ancak bazı araştırmacılar tarafından trombosit ile indüklenen nötrofil adezyonunun yüksek makaslama koşullarında etkin olduğu ve P-selektin aracılı adezyonun hızlı ve geçici olduğu vurgulanmaktadır (22,23). 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. Maschio ve arkadaşları (24) aktif trombositlerin nötrofil lizozomal enzim salınımını artırdığını ancak trombosit süpernatantlarının degranülasyona etkisi olmadığını göstermiştir. Drabikova ve arkadaşları (25) trombositlerin lüminol bağımlı nötrofil kemiluminesansını azalttığını ileri sürerken, birçok araştırmacı trombosit ürünleri ile nötrofil kemiluminesansının arttığını belirtmektedir (8,9,26). Trombositten salınan Trombosit faktör 4 (PF4) ve ATP'nin, nötrofil içi kalsiyum düzeyini artırarak trombosit ile tetiklenen nötrofil kemiluminesansına aracılık ettiği öne sürülmektedir (7,27,28). Sunulan çalışmanın ikinci aşamasında trombosit sekretuar 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 uyumlu olarak kemiluminesansın arttığı ancak, agregasyonun azaldığı gözlemlendi. 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 (29) 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 (1,30). Aktif nötrofillerden salınan katepsin G ve serbest radikallerin trombositleri aktive ettiği öne sürülmektedir (31,32). Ancak serbest oksijen radikallerinin trombosit aktivasyonundaki rolü açık değildir ve doz bağımlıdır (33). Bu çalışmada nötrofil süpernatantının trombosit agregasyonu ve sekresyonunu etkilemediği gözlemlendi. Evangelista ve arkadaşları (30) 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 nötrofillerle indüklenen trombosit agregasyonunun değerlendirilmesi için aktif nötrofil ve trombositlerin doğrudan temasını sağlayan koşullarda incelenmesi gerektiğini düşündürmektedir. Diğer yandan Aziz ve arkadaşları (34) 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 araçlar ve mekanizmalar konusunda ileri düzeyde gerçekleştirilecek sonuçlarla birlikte trombosit ve nötrofillerin birlikte yer aldığı hemostaz ve inflamasyon gibi fizyolojik mekanizmaların yanısıra, miyokard infarktüsü, 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.

Kaynaklar

1. Maschio D, Dejena E, Bazzoni G. Bidirectional modulation of platelet and polymorphonuclear leukocyte activities. *Ann Hematol* 1993; 67:23-31.
2. Cadrey Y, Dupovy D, Boneu B et al. Polymorphonuclear leukocytes modulate tissue factor production by mononuclear cells: role of reactive oxygen species. *J Immunol* 2000; 164:3822-3828.
3. Klebanoffs CRA. Neutrophil-platelet interaction mediated by myeloperoxidase and hydrogen peroxidase. *J Immunol* 1980; 124:399.
4. Brandt E et al. The (TG and PF4; blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation. *Leukoc Biol* 2000; 67:471-478.
5. Ehlert JE et al. Down-regulation of neutrophil functions by the ELR(+) CXC chemokine platelet basic protein. *Blood* 2000; 96:2965-2972.
6. Napota K et al. Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils P-selectin. *J Immunol* 1993; 151:3267-3273.
7. Ruf A. et al. Contact-induced neutrophil activation by platelets in human cell suspensions and whole blood. *The American Society of Hematology* 1992; 80:1238-46.
8. Ruf A. et al. Platelet-induced neutrophil activation: platelet-expressed fibrinogen induces the oxidative burst in neutrophils by an interaction with CD11c/CD18. *Br J Haematol*, 1995; 90:791-96.
9. Aziz KA, Cawley JC, Zuzel M. Platelets prime PNL via released PF4. mechanism of priming and synergy with GM-CSF. *British Journal of Haematology* 1995; 91:846-853.
10. Packham MA, Kinlough-Rathbone RL, Mustard JF. Thromboxane A2 Causes Feedback Amplification Involving Extensive Thromboxane A2 Formation on Close Contact of Human Platelets in Media With a Low Concentration of Ionized Calcium. *Blood* 1987; 70:647-51.
11. Boyum A. Separation of lymphocytes, granulocytes, and monocytes from human blood using iodinated density gradient media. *Methods In Enzymology* . 1984; 108:88-102.
12. Krajian A. In: Frankel S, Reitman S. Editors. *Tissue Staining Methods In Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*. Eds Sixth Edition Volum 2. London: The C. V. Mosby Company; 1963; pp1691.
13. Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: A novel device for assesing platelet behaviour in blood. *J Pharmacol Met* 1980; 3:135-158.
14. Phillips DR, Jennings LK, Edwards HH. Identification of membran proteins mediating the interaction of human platelets. *J Cell Biol* 1980; 86:77-86.
15. Bednar, MM, Gross CE. Simple Whole Blood Procedure for Neutrophil Aggregation & Chemiluminescence with the Chrono-Log Whole Blood Lumi-Aggregometer. *Chrono-Log Corporation News*, 2001; 2-5.
16. Allen R. Phagocytic Leukocyte Oxygenation Activities and Chemiluminescence: A Kinetic Approach to Analysis. *Methods In Enzymology* 1986; 133:449-93.
17. Sweeney JD, Labuzetta JW, Michielson CE et al. Whole Blood Aggregation Using Impedance and Particle Counter Methods. *Am J Clin Pathol* 1989; 92:794-7.
18. Williams W, Beutler E, Erslew A, et al. Platelet morphology and function. In *Heamatology*, 4th Edition. USA McGraw-Hill Book Company; 1991; 1172.
19. Wojenski C, Silver MJ. A Quick Method for screening platelet Dysfunctions Using the Whole Blood Lumi- aggregometer. *Thromb Haemostas* 1984; 5:154-156.
20. DeChalet LR, Long GD, Shirly PS et al. Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. *J Immunol* 1982; 129:1589-1593.
21. Simon SI, Rochon YP, Lynam EB et al. (2-Integrin and L-Selectin are Obligatory Receptors In Neutrophil Aggregation. *Blood* 1993; 82:1097-1106.
22. Ostrovsky L, King AJ, Bond S et al. Juxtacrine Mechanism for Neutrophil Adhesion on Platelets InvolvesPlatelet-Activating Factor and a Selectin-Dependent Activation Process. *The American Society of Hematology* 1998; 91:3028-36.
23. Kuijper PHM, Torres HI, Van der Linden J AM et al. Platelet-Dependent Primary Hemostasis Promotes Selectin-and Integrin-Mediated Neutrophil Adhesion to Damaged Endothelium Under Flow Conditions. *Blood* 1996; 87:3271-81.
24. Maschio AD, Corvazier E, Mailliet F et al. Platelet-dependent Induction and Amplification of Polymorphonuclear Leucocyte Lysosomal Enzyme Release. *Br J Haematol* 1989; 72:329-35.
25. Drabikova K, Jancinova V, Nosal R, et al. Human Blood Platelets, PNL Leukocytes and Their Interaction In Vitro. Responses to Selective and Non-selective Stimuli. *Gen Physiol Biophys* 2000; 19:393-404.
26. Nagata K, Tsuji T, Todoroki N et al. Activated Platelets Induce Superoxide Anion Release by Monocytes Neutrophils Through P-Selectin (CD62). *J Immunol* 1993; 151:3267-73.
27. Peterson F, Bock L, Flad HD et al. Platelet Factor 4-Induced Neutrophil-Endothelial Cell Interaction: Involvement of Mechanims and Functional Consequences Different From Those Elicited by Interleukin-8. *Blood* 1999; 94:4020-28.
28. Petersen F, Ludwing A, Flad HD et al. TNF-(Renders Human Neutrophils Responsive to Platelet Factor 4 (Comparison of PF-4 and IL-8 Reveals Different Activity Profiles of the Two Chemokines). *J of Immunol* 1996; 156:1954-62.
29. Iwabuchi K, Yamashita T. Platelet-Derived Neutrophil Adherence-Inhibiting Factor In Humans. *Blood* 1990; 76:2368-73.
30. Evangelista V, Rajtar G, Gaetano G et al. Platelet Activation by FMLP-Stimulated Polymorphonuclear Leukocytes: The Activity of Catepsin G is not Prevented by Antiproteinases. *Blood* 1991; 77:2379-88.
31. Yan Z, Zhang J, Holt JC, et al. Structural Requirements of Platelet Chemokines for Neutrophil Activation. *Blood* 1994; 84:2329-39.
32. Renesto P, Tahar MS, Chignard M. Modulation by superoxide anions of neutrophil-mediated platelet activation. *Biochem Pharmacol* 1994; 47:1401-1404.
33. Ersöz G, Ocakçioğlu B, Baştuğ M et al. Platelet Agregation and Release Function in Hyperbaric Oxygenation. *Undersea and Hyperbaric Medical Society* 1998; 229-32.
34. Aziz KA, Cawley JC, Kamiguti AS et al. Degradation of Platelet Glycoprotein Ib by Elastase Released from Primed Neutrophils. *Br J Haematol* 1995; 91:46-54.