

BETA-THALASSEMİA MAJORDA TROMBOSİT FONKSİYONLARINA YENİ BİR YAKLAŞIM†

Mehtap Pasin* • Hakan Fıçıcılar* • Demet Tekin* • Mustafa Tekin** • Sema Yavuzer*
Nejat Akar** • Sabri Kemahlı** • Ayten Arcasoy**

ÖZET

Beta-Thalassemia Majorlu olgularda tromboembolik olaylara eğilimin arttığı şeklindeki klinik gözlemler ve otopsi bulgularına karşın, bugüne dek tümü trombosit zengin plazma örneklerinde gerçekleştirilmiş olan az sayıda araştırmada bu olgularda trombosit agregasyon yanıtında azalma saptandığı bildirilmektedir. Sunulan araştırmada trombosit agregasyon ve ATP sekresyonu yanıtları, Beta-Thalassemia Majorlu 21 olgu ve aynı yaş grubundan 13 sağlıklı bireyden alınan tam kan örneklerinde 3 farklı agonist (kollajen, ADP ve trombin) kullanılarak incelenmiştir. Maksimum agregasyon hızı ve maksimum agregasyon büyüklüğü açısından değerlendirilen trombosit agregasyonu Beta-Thalassemia Majorlu olgularda önemli oranda yüksek ($p<0.001$) bulunmuştur. Bu olgularda ADP ($p<0.05$), trombin ($p<0.05$) ve kollajen ($p<0.01$) ile indüklenen trombosit ATP sekresyon yanıtları da kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar, hastalık tablosunda rastlanan tromboembolik olaylarda trombosit fonksiyonu artışının önemli role sahip olabileceğini göstermekte ve olgularda antitrombotik tedavi uygulamasının kardiyovasküler ve pulmoner komplikasyonların önlenmesi açısından yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Beta-Thalassemia Major, trombosit agregasyonu, trombosit sekresyonu, trombozis

SUMMARY

A new approach to platelet functions in beta-thalassemia major

In spite of clinical observations that indicate increased frequency of thromboembolic events and autopsy findings in patients with Beta-Thalassemia Major, several studies all of which were performed in platelet rich plasma samples have reported that response of platelet aggregation to agonists is reduced in these cases. In the present study, responses of platelet aggregation and secretion were examined in the whole blood samples from 21 patients with Beta-Thalassemia Major and 13 age-matched healthy individuals using 3 different agonists (collagen, ADP and thrombin). Platelet aggregation that was evaluated as maximal rate of aggregation and maximal extent of aggregation was significantly higher ($p<0.001$) in the cases with Beta-Thalassemia Major. It was also determined that ADP ($p<0.05$), thrombin ($p<0.001$) and collagen ($p<0.01$) induced platelet responses of secretion were significantly higher in the patient group. These findings indicate that, platelets may play a role in the pathogenesis of thrombotic complications in Beta-Thalassemia Major and suggest that anti-thrombotic therapy may be necessary to prevent cardiovascular and pulmonary complications.

Key Words: Beta-Thalassemia Major, platelet aggregation, platelet secretion, thrombosis

Beta-Thalassemia Majorlu olgularda yapılan araştırmaların bir kısmı invitro trombosit fonksiyonlarında azalmaya dikkat çekmekle birlikte (1,2), bu hastalık grubunda tromboembolik olaylarla sık karşılaşılıyor olması ve bu komplikasyonların mortaliteyi artırdığının vurgulanması dikkat çekicidir (3,4). Geçici serebral iskemik ataklar, periferik arteriyel ve venöz trombozisin varlığı dışında, bu olgularda otopsi bulgusu olarak pulmoner arter trombüslerine ve aterosklerotik değişikliklere rastlandığı literatür bilgileri arasında yer

almaktadır (5). Tromboembolik olaylara artan bu eğilim, olgularda hiperkoagülabilite ve invivo trombosit aktivasyonuna yol açacak mekanizmalara dikkat çekmektedir. Invivo trombosit aktivasyonu ile miktarları artan ve tromboembolik ve aterosklerotik hastalıklarda trombositlerin damar duvarı ile etkileşiminde işe karışan tromboksan A2 ve prostasiklinin başlıca üriner metabolitleri 2,3-dinor-TxB2, 11-dehydro-TxB2 ve 2,3-dinor-6-keto PGF1a'nın Beta-Thalassemia Majorlu olgularda yüksek konsantrasyonlarda saptanması da bu

† Bu çalışma, A.Ü. Araştırma Fonunca 96.09.00.03 kod nolu münferit araştırma projesi ile desteklenmiştir.

* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

** Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı

düşünceyi destekler niteliktedir. Eldor ve çalışma ark. (6) b-Thalassemia Major olgularında tromboksan A2 metabolitleri düzeylerinin sağlıklı bireylere göre 8-10 kat, prostasiklin metabolitinin 4 kat kadar yüksek olduğunu saptamışlar, bu bulguları invivo trombosit aktivasyonunun kanıtları olarak yorumlamışlardır. Bu bulgular b-Thalassemia Major olgularında prostasiklin-tromboksan A2 oranının, tromboksan lehine önemli derecede yüksek olduğunu da göstermektedir. Ancak bugüne dek, trombosit agregasyonu ile ilgili olarak yapılan invitro araştırmaların trombosit fonksiyonlarının azaldığı şeklindeki bulguları bu sonuçlarla çelişmektedir. Trombosit ATP sekresyonu yanıtı ile ilgili olarak ise, herhangi bir yayına rastlanmamıştır.

Sunulan çalışma, bugüne kadar yayınlanan araştırmaların trombosit zengin plazma (PRP) örneklerinde yapıldıkları ve bu yöntemin tüm trombosit popülasyonunu incelemek konusundaki yetersizliği göz önüne alınarak, trombosit fonksiyonlarının incelenmesinde en uygun yöntem olarak kabul edilen tam kan örneklerinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla trombositlerin 3 farklı agoniste verdikleri agregasyon ve sekresyon yanıtları saptanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmaya Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Hematoloji Bilim Dalında izlenen ve Beta-Thalassemia Major tanısı konmuş düzenli desferroksamin tedavisi kullanmayan, 4-21 yaş arası (ortalama 11.5) 21 olgu ile aynı yaş grubundan 13 sağlıklı birey katılmıştır.

Çalışmaya alınacak olguların trombozis anamnezi vermemelerine, araştırma gününden iki ay öncesine dek kan transfüzyonu yapılmamış ve en az 15 gün süreyle trombosit fonksiyonlarını etkilediği bilinen herhangi bir ilaç kullanmamış olmalarına özen gösterilmiştir.

Trombosit agregasyonu, "Whole Blood Lumi-Aggregometer" cihazı (Model 560, Chrono-Log Corporation., Hovertown, PA USA) kullanılarak tam kanda elektriksel impedans yöntemi ile saptanmıştır. Cardinal ve Flower tarafından geliştirilen bu yöntem, kan örneklerine daldırılan iki platin elektrod arasındaki elektriksel rezistans değişiminin ölçümü esasına dayanmaktadır (7). Trombositlerin kollagen, ADP ve trombine verdikleri yanıtlar; maksimum agregasyon hızı (ohm/dk) ve maksimum agregasyon büyüklüğü

(ohm) açısından değerlendirilmiştir. Maksimum agregasyon büyüklüğünü belirlemek için eğrinin base-line düzeyinden sapma miktarı (maksimum impedans artışı) hesaplanmıştır. Maksimum agregasyon hızı ise agregasyon eğrisinin eğiminin en fazla olduğu bölümden eğim (eğrinin eğiminin en fazla olduğu bölümde eğriye çizilen teğet ile base-line arasındaki açının değeri) hesaplanmak sureti ile belirlenmiştir (8). Agregan ajan olarak kollagen (Chrono-par: 385) 2mg/ml, ADP (Chrono-par: 384) 10mM ve trombin (Chrono-par: 386) 1U/ml konsantrasyonlarında kullanılmıştır. Trombosit ATP sekresyonu (nmol) ise aynı agregan ajanlarla indüklenen trombositlerde bioluminesans tekniği kullanılarak saptanmıştır. Bu yöntem örneklere eklenen lusiferin-lusiferazın (Chrono-lume reagent: 395) ATP ile (Chrono-lume ATP standart: 387) reaksiyona girerek yaydığı ışık şiddetinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır (9). Bireylerin rutin hematolojik parametreleri ise standart yöntemlerle saptanmıştır.

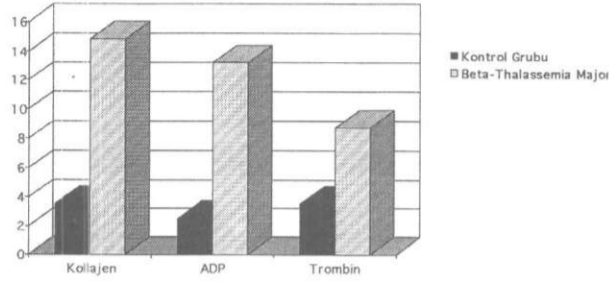
Bulgular student's t testi ile karşılaştırılmış ve değerlendirilmiştir.

BULGULAR

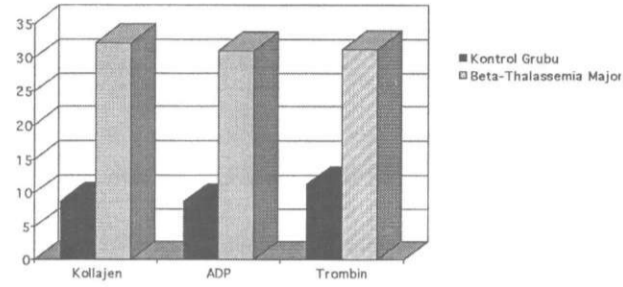
Araştırmamızdan elde edilen sonuçlar, Beta-Thalassemia Majorlu olgularda maksimum agregasyon hızı (ohm/dk), maksimum agregasyon büyüklüğü (ohm) ve trombosit ATP sekresyonu (nmol) olarak değerlendirilen trombosit fonksiyonlarının, kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek olduğunu göstermektedir.

Kontrol grubunda trombositlerin verdikleri agregasyon yanıtları maksimum agregasyon hızı açısından değerlendirildiğinde kollajen, ADP ve trombine verilen yanıtlar (ortalama \pm SD) sırasıyla 3.55 ± 1.7 , 2.56 ± 1.6 ve 3.53 ± 1.6 ohm/dk olarak saptanmıştır. Bu yanıtlar Beta-Thalassemia Majorlu olgularda ise, kollajen için 14.83 ± 7.1 ohm/dk, ADP için 13.20 ± 5.7 ohm/dk ve trombin için 8.74 ± 3.7 ohm/dk olarak kaydedilmiştir. Her 3 agregan için de hasta grubu yanıtları kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$), (Şekil 1).

Maksimum agregasyon büyüklüğü açısından değerlendirildiğinde de, yanıtların Beta-Thalassemia Majorlu olgularda belirgin derecede yüksek olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubunda kollajen ile indüklenen trombositlerin verdikleri yanıt 8.82 ± 4.3 ohm, ADP ile indüklediklerinde 8.73 ± 3.2 ohm ve trombin ile indüklediklerinde ise 11.34 ± 4.7 ohm olarak saptan-



Şekil 1. Beta-Thalassemia Major Olgularında ve Sağlıklı Bireylerde Trombosit Ortalama Maksimum Agregasyon Hızları.

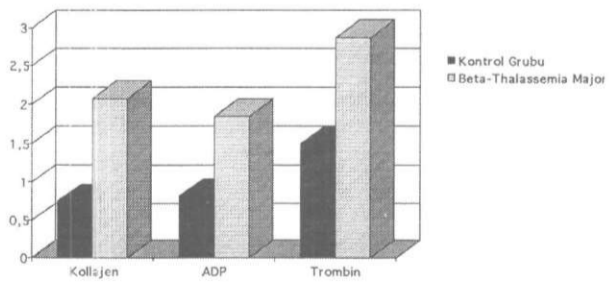


Şekil 3. Beta-Thalassemia Major Olgularında ve Sağlıklı Bireylerde Trombosit Ortalama ATP Sekresyonları

miş, Beta-Thalassemia Majorlu olgularda ise yanıtlar kollajen için 32.19 ± 9.5 ohm, ADP için 31.08 ± 10.2 ohm ve trombin için de 31.26 ± 9 ohm olarak kaydedilmiştir. Bu değerler arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$), (Şekil 2).

Trombositlerin ATP sekresyonu yanıtları da bu iki grup arasında belirgin farklılık göstermektedir. Kontrol grubunda kollajen, ADP ve trombinle indüklenen trombositlerin verdikleri yanıtlar sırasıyla 0.75 ± 0.1 , 0.82 ± 0.5 ve 1.50 ± 2.1 nmol olarak saptanmıştır. Beta-Thalassemia Majorlu olgularda ise bu yanıtlar kollajen için 2.08 ± 1.6 nmol ($p < 0.01$), ADP için 1.85 ± 1.3 nmol ($p < 0.05$) ve trombin için 2.87 ± 2.2 nmol ($p < 0.05$) olarak ve kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek bulunmuştur (Şekil 3).

Serum ortalama ferritin düzeyleri Beta-Thalassemia Majorlu olgularda 1380.5 ± 376.6 ng/ml, kontrol grubunda ise 48.8 ± 39.4 ng/ml olarak bulunmuştur. Beta-Thalassemia Majorlu olgularda ferritin düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek olduğu ($p < 0.001$) saptanmıştır.



Şekil 2. Beta-Thalassemia Major Olgularında ve Sağlıklı Bireylerde Trombosit Ortalama Maksimum Agregasyon Büyüklükleri

TARTIŞMA

Sunulan araştırma, Beta Thalassemia Majorlu olgularda trombositlerin maksimum agregasyon hızı, maksimum agregasyon büyüklüğü ve ATP sekresyonu şeklinde incelenen fonksiyonlarında, kontrol grubuna oranla önemli derecelerde artış olduğunu göstermektedir. Bugüne dek yapılan az sayıda araştırmada ise bulgularımızla çelişkili olarak invitro trombosit agregasyon yanıtının azaldığı bildirilmektedir. Invitro agregasyon yanıtının azaldığı şeklindeki bulgular, Beta-Thalassemia Majorlu olgularda tromboembolik olaylara eğilimin arttığı şeklindeki klinik gözlemler (10) ve otopsi bulguları ile de bağdaşmamaktadır (5).

Beta-Thalassemia Majorda trombosit agregasyon yanıtında azalma bildiren araştırmalar, trombositten zengin plazmada yapılmıştır. Bildirilen sonuçlar kendi içlerinde de belirgin farklılıklar göstermektedir. Bazı olgularda yalnızca bir agregana (ADP), bazılarında ise uygulanan tüm agreganlara (kollajen, ADP, trombin, ristosetin, epinefrin) birden duyarsızlık saptanmış, ancak bu duruma bir açıklama getirilememiştir (1,11).

Beta-Thalassemia Majorlu olgularda eritrositlerdeki belirgin mikrositoz (12), trombositten zengin plazma hazırlanmasını güçleştirmektedir. Mikrositer eritrositleri ortamdaki uzaklaştırabilmek için, her zamankinden daha uzun süreli bir santrifüj işlemine gereksinim vardır ve bu durum zaten yüksek ferritin ve serum demir düzeyi ile membran fragiliteleri çok artmış trombositlerin yıkımına yol açabilir (13). Ayrıca genç ve metabolik aktiviteleri yüksek olan trombositler daha yoğun hücreler oldukları için, uzun süreli santrifüjleme esnasında haraplanabilmekte (14) ve dolayısı ile tüm trombosit kitlesinin incelenmesini olanaksız hale

getirmektedir. Ayrıca Beta-Thalassemia Majorda oksidatif stresin arttığı (14) ve intrasellüler antioksidan savunmanın belirgin oranda azaldığı (15) dikkate alındığında, serbest radikallere en duyarlı hücrelerden biri olan trombositlerin haraplanma sürecinin kolaylaşacağı akla gelmektedir. Bu nedenle plazma örnekleri kullanılarak elde edilen sonuçların, invitro manipulasyonlara bağlı artefaktlar taşınması olasılığı oldukça yüksek görünmektedir.

Trombositlerin tam kanda incelenmeleri ise, tüm trombosit popülasyonunun, kanın diğer hücre ve elemanları ile etkileşimlerini de ele alabilecek şekilde gerçekleştirilmekte ve fizyolojik koşullara en yakın yöntem olarak kabul edilmektedir (8). Ayrıca son yıllarda yayınlanan çeşitli araştırma bulguları da elde ettiğimiz sonuçları kuvvetle destekler niteliktedir. Örneğin günümüzde, demirin katalizlediği reaksiyonlar sonucu oluşan serbest radikallerin de trombosit aktivasyonunda önemli rol oynadıkları ve bu yolla pek çok hastalık patogenezinin sorumlu oldukları görüşü kabul edilmektedir (16). Bu olgularda da aşırı derecede artmış ferritin, endojen ya da ekzojen redükthanlar aracılığı ile demiri serbestleştirerek trombosit aktivasyonuna aracılık edebilir (17). Yine eritrosit dışına çıkmış hemoglobinin de, serbest demir gibi davranarak hidrojen peroksit oluşumuna yol açabildiği ve bu yolla trombosit agregasyonunu indükleyebildiği gösterilmiştir (18). Ayrıca çeşitli patolojik koşullarda aktive olmuş trombositlerin, eritrositlerde hemoliz ve fragmantasyona yol açabildikleri de bilinmektedir. Böylece açığa çıkan hemoglobin, yeni trombositleri aktive

ederek kısır döngü yaratabilir. Beta-Thalassemia Majorlu hastalarda da hemoliz nedeniyle yüksek oranda serbest hemoglobin ve demir varlığı, ve bu nedenle hücrelerin karşı karşıya kaldıkları risk düşünüldüğünde (19), trombosit fonksiyonlarında gözlenen artış açıklanabilmektedir.

Sonuç olarak, Beta-Thalassemia Majorlu olgularda gözlenen tromboembolik eğilimde trombosit fonksiyonlarındaki artışın önemli role sahip olabileceği anlaşılmaktadır. Bu ise yüksek ferritin, serbest hemoglobin ve demir tarafından serbest radikal oluşumunun artırılması ve/veya eş zamanlı olarak yaptığımız araştırma bulgularının da işaret ettiği gibi bu olgularda antioksidan savunmadaki zayıflamaya bağlı olabilir. Bu nedenle, demirin non-toksik formda tutulabilmesinin, tedaviye bağlı olarak atılım süreci içinde başta eritrositler ve trombositler olmak üzere tüm organizmanın korunabilmesinin (20), ayrıca oksidan stresi nötralize edecek uygun kombine antioksidan uygulamasının tedaviye eklenmesinin bu hastaların yaşam süresi ve kalitesinin artırılabilmesi açısından gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Ek olarak, bulgularımız Beta-Thalassemia Majorlu olgularda tromboembolizm riskinin belirlenmesi ve izlenmesi yönünden trombosit fonksiyon testlerinin bu olgularda rutin incelemeler arasına alınması gerekliliğini göstermektedir.

Teşekkür: Çalışmanın istatistik değerlendirmelerini yapan Biyoistatistik Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Yasemin Yavuz'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Eldor A. Abnormal platelet function in Beta-Thalassemia. Scand J Haematol 1978; 20:447.
2. Houssain M, Hutton RA, Pavidon O ve ark. Platelet function in Beta-Thalassemia Major. J Clin Pathol 1979; 32:429.
3. Eldor A, Maclouf J, Lellouche F ve ark. A Chronic Hypercoagulable state and life-long platelet activation in Beta-Thalassemia Major. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1993; 24 Suppl 1:92-5.
4. Paolini E, Munetti VC, Gronieri E ve ark. Acute cerebrovascular insults in homozygous Beta-Thalassemia. J Neurol 1983; 230:37.
5. Sonakul D, Bacharee P, Laohapand T ve ark. Pulmonary artery obstruction in thalassemia. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1980; 11:516.
6. Eldor A, Lellouche F, Goldfarb A ve ark. In vivo platelet activation in Beta-Thalassemia Major reflected by increased platelet-thromboxane urinary metabolites. Blood 1991; 77(8):1749-53.

7. Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: A novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods* 1980; 3:135-58.
8. Galvez A, Badimon L, Badimon JJ ve ark. Electrical aggregometry in whole blood from human, pig and rabbit. *Thrombosis and Haemostasis* 1986; 56(2): 128-32.
9. Soslau G, Parker J. The bioluminescent detection of platelet released ATP: Collagen-induced release and potential errors. *Thrombosis Research* 1992; 66:15-21.
10. Chuansumrit A, Hathirat P, Isarangkura P ve ark. Thrombotic risk of children with thalassemia. *J Med Assoc Thai* 1993; 76(supp 2):80-4.
11. Visudiphian S, Ketsa-Ard K, Tumliang S ve ark. Significance of blood coagulation and platelet profiles in relation to pulmonary thrombosis in Beta-Thalassemia/Hb E. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1994; 25(3):449-56.
12. Earley A, Walman HB, Altman DG ve ark. Microcytosis, iron deficiency and thalassemia in preschool children. *Arch Dis Child* 1990; 65:610-4.
13. Reif D. Ferritin as a source of iron for oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 1992; 12:417-27.
14. Shinar E, Rachmilewitz EA. Oxidative denaturation of red blood cells in thalassemia. *Semin Hematol* 1990; 27(1):70-82.
15. Fıçıcılar H, Pasin M, Tekin D ve ark. Beta-thalassemia major ve oksidan stres. *Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 21. Ulusal Kongresi Bildiri Özetleri Kitabı 24-28 Eylül 1995 Ankara*; 55.
16. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246:501-14.
17. Pasin M, Iuliano L, Violi F: İskemik kalp hastalıklarında yeni bir risk faktörü daha: Ferritin, ferritin-trombosit fonksiyonları ilişkisi. *Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 20. Ulusal Kongresi Bildiri Özetleri Kitabı 25-29 Ekim 1994 İzmir*; 32.
18. Iuliano L, Violi F, Pedersen JZ ve ark. Free radical-mediated platelet activation by hemoglobin released from red blood cells. *Arch Biochem Biophys* 1992; 299(2):220-4.
19. Politi A, Sticca M, Galli M. Reversal of haemochromatotic cardiomyopathy in Beta-Thalassemia by chelation therapy. *Br Heart J* 1995; 73(5):486-7.
20. Başkurt OK, Yavuzer S. Some hematological effects of oxidants. In: Jerome O, Nriagu and Milagros S. Simmons, eds. *Environmental Oxidants*. ISBN-471-57928-9: John Wiley&Sons. Inc. 1994; 405-23.