

ORJİNAL YAZI

## İki Farklı Hücre Ayırıcı ile Toplanan Trombositlerin Akım Sitometrik Yöntemle İn Vitro Aktivasyon Markırlarına Etkisinin İncelenmesi\*

Vildan ÖZKOCAMAN\*\*, Fahir ÖZKALEMKAŞ\*\*, Ferah BUDAK\*\*\*,  
Tülay ÖZÇELİK\*\*, Rıdvan ALİ\*\*, Ahmet TUNALI\*\*

\*\* Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Bursa.

\*\*\* Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmünoloji Laboratuvarı, Bursa.

### ÖZET

Bu çalışmanın amacı, iki farklı hücre ayırıcı Cobe Spectra ve CS3000 Plus cihazlarıyla toplanan trombosit süspansiyonlarının optimal şartlarda saklanarak, 0. ve 3. günlerdeki in vitro aktivasyon markırlarını (trombosit membran yüzey glikoprotein ekspresyonları) akım sitometrik yöntemle bakarak, değişik cihazlarda hazırlanan trombosit süspansiyonlarını karşılaştırmak, saklama zamanı ile trombosit aktivasyonu arasındaki ilişkiyi saptamaktır. Çalışmamız, Aferez Ünitesi'ne başvuran, aferez şartlarını taşıyan, ilk kez trombosit donörü olarak işleme alınan, yaşları 20-49 arasında değişen 5'i kadın, 45'i erkek (yaş ortalaması 33.4±8.7) olmak üzere, toplam 50 donör ile gerçekleştirildi. Örneklerden 0. günde bekletmeden oda ısısında, ajitatorde bekleterek 3. günde olmak üzere iki kez, akım sitometrik yöntemle in vitro trombosit aktivasyon markırları değerlendirildi. İki farklı hücre ayırıcıda da depolamanın 3. gününde CD62 ve CD63 ekspresyonu yüzdesi yüksek bulundu.

**Anahtar Kelimeler:** Trombosit Aktivasyonu. Hücre Ayırıcı. Akım Sitometri.

### Flow Cytometric Analysis Of In Vitro Activation Markers Of Platelets Collected With Two Different Cell Separators

### ABSTRACT

The aim of this study was to compare in vitro activation markers of platelets collected with two different cell separators (Cobe Spectra and CS3000 plus) analysed by flow cytometry on day 0 and 3, to determine the relationship between platelet activation and storage time. 50 donor (5 women 45 men) aged between 20-49 (median age 33.4±8.7) who were good candidate for apheresis and who admitted to apheresis for the first time were selected for the study. The platelet activation markers of collections were assessed on day 0 and on day 3 by flow cytometry. The 0. day analysis was performed without time delay as soon as the concentrate was collected and 3. day analysis was performed on the product which was stored on ajitator. CD62 and CD63 expression percentage were high on the third day of storage in both collections of two cell separators Cobe Spectra and CS3000 plus.

**Key Words:** Platelet Activation. Cell Separators. Flow Cytometri.

Trombosit saklanması sırasında gelişen olaylar dizisinden trombosit aktivasyonunun ya da stimülasyonunun sorumlu olduğu çalışmalarla gösterilmiştir<sup>1,2</sup>. Trombositler, fiziksel veya kimyasal uyarılarla uyarıldığında biyokimyasal ve morfolojik

değişikliklere uğramakta ve bu reaksiyonlar zinciri "trombosit aktivasyonu" olarak adlandırılmaktadır<sup>3</sup>. Prostoglandin E<sub>1</sub>, teofilin gibi trombosit aktivasyon inhibitörleri, in vitro ortamlara konulduğunda, trombosit aktivasyonlarında gerileme tespit edilmektedir<sup>4,5</sup>.

Trombosit aktivasyonu sırasında hücre yüzeyinde değişiklikler ortaya çıkar. Membran reseptörlerine önce agonistler bağlanarak aktivasyon olayını başlatılmaktadır<sup>6</sup>. Trombin, kollajen gibi fizyolojik agonistlerle aktivasyon sonrasında trombositler spesifik yapı kazanırlar ve α-granüllerinden β-tromboglobulin salınımıyla eş zamanlı olarak trombosit yüzeyinde P-selektin (Glikoprotein 140=PADGEM proteini=CD62) ekspresyonu da başlar<sup>7,8</sup>. P-selektin stimüle olmuş trombositlerin nötrofil, monosit ve endotelial hücrelere bağlanma-

Geliş Tarihi: 08.10.2004

Kabul Tarihi: 19.11.2004

\* Çalışma, American Society of Hematology Forty-First Annual Meeting December 3-7 1999 New Orleans LA USA, Blood, November 15 1999 Vol 94 No: 10, Supplement 1 Abstract 3449, p66 b'de poster olarak yayınlanmıştır.

Dr. Vildan ÖZKOCAMAN  
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
İç Hastalıkları ABD Hematoloji BD  
Görükle, Bursa  
Tel: 0224 442 84 00 /1087  
Fax: 0224 442 80 60  
Mobil Tel: 0532 678 92 09  
e-mail: vildanoz@uludag.edu.tr

sında rol alan selektin ailesinden bir adezyon molekülüdür. Trombositler yüzeylerinde P-selektin ekspresyon ettiklerinde, retikuloendotelial sistemin makrofaj ve monositleri tarafından dolaşımdan temizlenmektedirler<sup>9,10</sup>.

Yapılan çalışmalarla; trombosit konsantreleri uygun koşullarda saklandığında, saklama zamanı ile uyumlu olarak trombosit morfolojilerinde değişiklikler oluştuğu saptanmıştır<sup>7</sup>. Saklanan trombosit süspansiyonlarında trombosit yüzeyinde gözlenen P-selektin ekspresyonu artışı da hücrenin canlılığını yitirmesi ile birliktedir<sup>10,11</sup>.

Saklanan trombositlerde transfüze edilmeden önce akım sitometri cihazı ile trombosit yüzey ekspresyonları saptanabilir. Değişik yöntemlerle aktivasyonun direkt kanıtlarının elde edilmesi mümkün olabilmektedir<sup>12,13</sup>. Akım sitometrik yöntem ile trombositlerin yüzey glikoprotein antijen ekspresyonları tayin edilerek; fonksiyonları, aktive olup olmadıkları, depolama koşullarının sağlanıp sağlanmadığı belirlenebilmektedir. Akım sitometrik yöntem, saklanan trombosit konsantrelerinin kalite kontrollerinin yapılması için kullanılabilirliğinden, diğer yöntemlere göre daha güvenilir olarak kabul edilmektedir<sup>10,14</sup>.

Saklanmaları sırasında trombosit fonksiyonlarının durumu tam bilinmemekle birlikte, laktat birikiminin trombositin metabolik aktivitesine engel oluşturduğu genel olarak kabul edilen bir görüştür. Saklanan trombositlerin, trombosit konsantrisi olarak hazırlanmaları ve işlenmeleri sırasında aktive olduklarına dair kanıtlar mevcuttur. Bunlar trombositler üzerindeki yüzey glikoproteinlerindeki değişikliklerle açıklanabilir. Trombosit konsantreleri hazırlanırken trombosit aktivasyon inhibitörleri kullanıldığında trombositlerin fonksiyon ve bütünlüklerini daha iyi korudukları saptanmıştır. Normalde uzun süreli depolanmaları sırasında trombositlerin yüzey glikoproteinini Ib'nin düzeyi azalmaktadır. Ancak ortamda aktivasyon inhibitörleri varken glikoprotein Ib'nin düzeyi iyi bir şekilde korunmaktadır<sup>2</sup>.

Aferez trombositlerinin uygun şartlar sağlandığında kabul edilebilir bir in vivo viabilite ile 5 gün depolanabildiği bildirilmiştir. Bunun için ideal ısının sürdürülmesi, ajitasyon uygulanması ve uygun plastik torbalarda depolama gereklidir<sup>16</sup>.

Bu çalışma, iki farklı hücre ayırıcı (Cobe Spectra ve CS3000 Plus) tarafından toplanan trombosit süspansiyonlarının 0. ve 3. günlerdeki in vitro aktivasyon markırlarını akım sitometrik yöntemle bakarak, değişik cihazlarda hazırlanan trombosit süspansiyonlarını karşılaştırmak ve saklama zamanı ile trombosit aktivasyonu arasındaki ilişkiyi saptamak amacıyla planlanmıştır. Aynı zamanda mevcut saklama torbalarıyla oda ısısı ve linear ajitator ile optimal depolama koşullarının sağlanıp, sağlanamayacağı da değerlendirilmiştir.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmaya, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Aferez Ünitesi'ne başvuran, aferez şartları taşıyan, ilk kez trombosit donörü olan, yaşları 20 ile 49 arasında değişen, 5'i kadın, 45'i erkek toplam 50 olgu alındı. Tromboferez işlemi Cobe Spectra ve CS3000 Plus cihazları kullanıldı. Olgular randomize edilerek 25 donörden Cobe Spectra (version 4.0), 25 donörden de CS-3000 Plus hücre ayırıcı ile trombositler ayrıldı. Trombosit süspansiyonlarından örnekler PL-3014 polyolefin plastik trombosit saklama torbalarına alındı.

Trombosit süspansiyonlarında lökosit ve trombosit sayımı işleminden hemen sonra (Coulter Max M otomatik hücre sayıcı ile, yüksek trombosit değerlerinde dilüsyonlar yapılarak) değerlendirildi. Aynı örnek trombosit süspansiyonu, oda ısısında 22°C de ajitator üzerinde dakikada 60 rotasyonla 3 gün bekletildi. Bu amaçla, Linear ajitator (Melco, Linear Platelet Reciprocator, model LPR -3A) kullanıldı.

Trombositler aferez işleminin bitiminden hemen sonra hiç bekletilmeden (0. Gün) immunoloji laboratuvarına ulaştırıldı. Örneklerde trombosit aktivasyonu hem 0. gün hem de 3. günde saklama sonrası, monoklonal antikor işaretleme tekniği ile akım sitometride incelendi.

Aferezle ayrılan trombosit konsantrelerinden hazırlanan örnek, immunoloji laboratuvarında bekletilmeden çalışmaya alındı. Örnek hazırlanması sırasında trombosit aktivasyonuna neden olan yıkama, karıştırma, santrifüj işlemleri yapılmadı<sup>28</sup>. Örnekler bekletilmeden çalışıldığı için paraformaldehit ile tespit edilmedi. Trombosit kümeleşmesini en aza indirmek ve çalışma konsantrasyonunu sağlamak için dilüsyonlar yapıldı. Dilüsyonlar için Thyrod's buffer kullanıldı. Thyrod's buffer: 137 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 12mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.4mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, %0.35 bovine serum albumin, 10mM HEPES, 5.5 mM glukoz, pH: 7.4 olacak şekilde hazırlandı<sup>3,17-19</sup>.

Çalışmada kullanılan tüm solüsyonlar 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek hazırlandı. Her monoklonal antikor için ayrı ayrı hazırlanan polipropilen tüplere 100.000/µL trombosit süspansiyonundan 100 µL konuldu. Üzerine Immunotech-Coulter firmasından temin edilmiş FITC ile konjüge;

- \* CD41(GPIIb) (IM 0649 FITC 100 T) COULTER
- \* CD62P(P-selektin) (IM 1164 FITC 100 T) COULTER
- \* CD63(Lizozomal protein) (IM 1165 FITC 100 T) COULTER

## Trombositlerin İn Vitro Aktivasyon Markırlarına Etkisi

monoklonal antikorlar ve immunglobulin G<sub>1</sub> izotipik kontrolden 10 µL ilave edildi. 15 dakika, oda ısısında, karanlıkta enkübe edildi. Enkübasyondan sonra 0.5ml Thyrod's buffer ilave edilerek akım sitometri (EPICS-XL-COULTER) cihazında hemen değerlendirme yapıldı.

Kullanılan akım sitometri, 200 mW gücünde, 15 mW argon iyon laseri ile çalışmaktaydı. 525nm.deki FITC floresans filtresinden geçirilerek örnekler değerlendirildi.

Trombositler light scatter (ışık saçılım) paternlerine göre idantifiye edildi. Forward scatter (öne saçılım parametresi; hücrelerin boyutu hakkında bilgi veren parametre) ve side scatter (yana saçılım parametresi; hücrelerin granül içeriği hakkında bilgi veren parametre) dahil tüm parametreler logoritmik modda düzenlendi. CD41 (GPIIb) trombosit spesifik monoklonal antikor olarak kullanıldı. LFS/LSS histogramında trombosit oldukları düşünülen bölgeye kapı alındıktan sonra CD41(GPIIb) pozitiflik yüzdesi ile alınan kapının uygunluğu tespit edildi. Tespit edilen kapıda %90-98 oranında trombositlerin bulunmasına özen gösterildi. İn vitro trombosit aktivasyonunu belirlemek için CD62 (P-selektin) ve CD63 (lizozomal protein) monoklonal antikorları kullanıldı. Sonuçlar, antikor pozitif trombosit yüzdesi olarak verildi.

Bütün sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda t testi, grup içi karşılaştırmalarda ise eşleştirilmiş t testi ve kategorik verilerin karşılaştırmalarında da Fisher'in kesin ki-kare testi kullanıldı. Ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel analizi student's t testi kullanılarak yapıldı.

### Bulgular

Çalışma, aferez ünitesine başvuran ilk kez trombosit donörü olan, donör şartları taşıyan 5'i kadın, 45'i erkek toplam 50 donör ile yapıldı. 2'si kadın, 23'ü erkek olmak üzere, 25 donörden Cobe Spectra ile, 3'ü kadın 23'ü erkek olmak üzere 25 donörden de CS3000 Plus hücre ayırıcı ile trombositler ayrıldı.

Cobe Spectra ile ayrılan donörlerin yaşları 20-46 arasında değişmekte olup, yaş ortalamaları 32.8±7.8, CS3000 Plus grubundaki donörlerin yaşları 20-49 arasında değişmekte olup, yaş ortalamaları 34.0±9.6 idi. Her iki grubun yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (Tablo I).

Cobe Spectra ile toplanan süspansiyonlarda CD62 ortalama ekspresyon değeri, 0. ve 3.günlerde sırası ile %23.4±15.2 ve %70.5±16.3 olarak saptandı. CS3000 Plus için aynı değerler %17.6±13.4 ve %67.8±20.9 bulundu (Tablo V, IX). Ortalamalar

Cobe Spectra grubunda 0. günde %0.2-%47.3, 3. günde %39.8-%92.4 aralığında tesbit edildi. CS3000 Plus için aynı değerler 0. günde %9-%45.3 ve 3. günde %30.6-%94.5 aralığında saptandı. Depolamanın 3. gününde CD62 ekspresyonunda her iki cihazda da anlamlı farklılık saptandı (p<0.0001) (Tablo IX).

Cobe Spectra ile toplanan süspansiyonlarda CD62 ekspresyonu 0. ve 3 günler % artış farkı ortalama değeri %48.5±19.0 olarak saptandı. CS3000 Plus için bu değer %50.9 bulundu. Her iki cihazda da CD62 0. ve 3.gün % artış farkı ortalama değerinde anlamlı farklılık saptanmadı.

Cobe Spectra ile toplanan süspansiyonlarda CD63 ortalama ekspresyon değeri 0. ve 3. günlerde %11.4±11.4 ve %43.5±22.1 olarak saptandı. CS3000 Plus için ise sırasıyla %10.5±8.7 ve %38.9±23.2 değerleri tesbit edildi (Tablo VI, IX). Ortalamalar Cobe Spectra grubunda 0. günde %0-%43.5, 3. günde %8.8-%81.8 aralığında bulundu. CS3000 Plus için aynı değerler 0. günde %6-%30.9, 3. günde %6.1-%86.7 aralığında bulundu. Depolamanın 3. gününde CD63 ekspresyonunda her iki cihazda da anlamlı farklılık saptandı (p<0.0001) (Tablo IX). Cobe Spectra ile toplanan süspansiyonlarda CD63 ekspresyonu 0. ve 3. günler % artış farkları ortalama değeri %32.5±21.4 olarak saptandı. CS3000 Plus için bu değer %28.8±21.5 bulundu. Bu bakımdan da her iki cihaz arasında anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo IX).

CD41 ortalama ekspresyon değerleri Cobe Spectra ile toplanan süspansiyonlarda 0. ve 3. günlerde sırasıyla %97.0±4.6 ve %97.3±3.9 olarak gözlemlendi. CS3000 Plus için aynı günlerde saptanan değerler %98.7±2.2 ve %98.3±2.8 bulundu (Tablo IV). Her iki cihazda toplanan süspansiyonlarda CD41 ekspresyonları arasında farklılık saptanmadı (Tablo IX).

Ortalama lökosit konsantrasyonları Cobe Spectra ile toplanan süspansiyonlarda  $0.32 \pm 0.15 \times 10^3 / \mu\text{L}$ , CS3000 Plus ile ayrılan üründe ise  $0.15 \pm 0.16 \times 10^3 / \mu\text{L}$  olarak belirlendi. Her iki cihazda toplanan süspansiyonlarda lökosit konsantrasyonları arasında anlamlı farklılık gözlenmedi (Tablo X).

Süspansiyonlardaki lökosit konsantrasyonları ile CD62 ve CD63 % ekspresyon farkları arasında korelasyon saptanmadı (Tablo VII, VIII). Dolayısı ile her iki cihaz in vitro aktivasyon markırları yönünden benzer bulundu. Toplanan trombosit konsantrasyonunda ürün trombosit değerleri Cobe Spectra ile elde edilen üründe ortalama olarak  $8.60 \pm 1.65 \times 10^{11}$ , CS3000 Plus ile elde edilen üründe  $8.50 \pm 3.04 \times 10^{11}$  olarak belirlendi (Tablo II, III, X). Her iki cihazda toplanan süspansiyonların ürün trombosit sayıları arasında anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo X).

**Tablo I-** Donörlerin Cobe Spectra ve CS3000 Plus gruplarında cinsiyet ve yaş ortalamalarına göre dağılımı.

	COBE SPECTRA	CS3000 PLUS	Anlamlılık
Kadın/Erkek oranı	2/23	3/22	p>0,05
Yaş ortalaması	32.8±7.8	34.0±9.6	p>0,05

**Tablo II-** Cobe Spectra grubundaki donörlerin yaş, cins, üründeki trombosit ve lökosit sayıları

Donör no	Adı Soyadı	Yaş	Cins	Üründeki Trombosit sayısı	Üründeki Lökosit sayısı
1	YT	31	E	7.16 X 10 <sup>11</sup>	0.10 X 10 <sup>3</sup> /L
2	Kİ	36	E	7.36 X 10 <sup>11</sup>	0.31 X 10 <sup>3</sup> /L
3	HŞ	23	E	7.44 X 10 <sup>11</sup>	0.58 X 10 <sup>3</sup> /L
4	HK	28	E	6.91 X 10 <sup>11</sup>	0.38 X 10 <sup>3</sup> /L
5	YT	45	E	11.20 X 10 <sup>11</sup>	0.56 X 10 <sup>3</sup> /L
6	OÇ	30	E	7.00 X 10 <sup>11</sup>	0.40 X 10 <sup>3</sup> /L
7	NT	41	E	6.00 X 10 <sup>11</sup>	0.40 X 10 <sup>3</sup> /L
8	İK	32	E	7.98 X 10 <sup>11</sup>	0.30 X 10 <sup>3</sup> /L
9	İK	43	E	10.00 X 10 <sup>11</sup>	0.10 X 10 <sup>3</sup> /L
10	YD	33	E	9.66 X 10 <sup>11</sup>	0.40 X 10 <sup>3</sup> /L
11	MP	25	E	8.55 X 10 <sup>11</sup>	0.10 X 10 <sup>3</sup> /L
12	KC	31	E	10.50 X 10 <sup>11</sup>	0.10 X 10 <sup>3</sup> /L
13	RO	23	E	8.42 X 10 <sup>11</sup>	0.38 X 10 <sup>3</sup> /L
14	NY	45	E	9.36 X 10 <sup>11</sup>	0.56 X 10 <sup>3</sup> /L
15	MY	22	E	7.72 X 10 <sup>11</sup>	0.40 X 10 <sup>3</sup> /L
16	MÇ	30	K	7.50 X 10 <sup>11</sup>	0.31 X 10 <sup>3</sup> /L
17	AD	36	E	7.00 X 10 <sup>11</sup>	0.58 X 10 <sup>3</sup> /L
18	ŞG	31	E	7.18 X 10 <sup>11</sup>	0.40 X 10 <sup>3</sup> /L
19	AN	20	K	13.04 X 10 <sup>11</sup>	0.10 X 10 <sup>3</sup> /L
20	AÇ	40	E	10.44 X 10 <sup>11</sup>	0.30 X 10 <sup>3</sup> /L
21	TG	26	E	9.98 X 10 <sup>11</sup>	0.40 X 10 <sup>3</sup> /L
22	EÖ	26	E	9.69 X 10 <sup>11</sup>	0.30 X 10 <sup>3</sup> /L
23	MT	35	E	8.56 X 10 <sup>11</sup>	0.30 X 10 <sup>3</sup> /L
24	RK	46	E	8.52 X 10 <sup>11</sup>	0.10 X 10 <sup>3</sup> /L
25	RT	40	E	7.72 X 10 <sup>11</sup>	0.30 X 10 <sup>3</sup> /L

**Tablo III-** CS3000 Plus grubundaki donörlerin yaş, cins, üründeki trombosit ve lökosit sayıları

Donör no	Adı Soyadı	Yaş	Cins	Üründeki Trombosit sayısı	Üründeki Lökosit sayısı
1	EB	27	K	12.60 X 10 <sup>11</sup>	0.50 X 10 <sup>3</sup> /L
2	HK	24	E	6.37 X 10 <sup>11</sup>	0.10 X 10 <sup>3</sup> /L
3	NŞ	46	E	6.98 X 10 <sup>11</sup>	0.10 X 10 <sup>3</sup> /L
4	FŞ	42	K	13.64 X 10 <sup>11</sup>	0 X 10 <sup>3</sup> /L
5	ST	22	E	9.88 X 10 <sup>11</sup>	0.10 X 10 <sup>3</sup> /L
6	CÇ	21	E	6.94 X 10 <sup>11</sup>	0.10 X 10 <sup>3</sup> /L
7	ZÇ	32	E	5.91 X 10 <sup>11</sup>	0 X 10 <sup>3</sup> /L
8	GÖ	35	E	7.66 X 10 <sup>11</sup>	0.40 X 10 <sup>3</sup> /L
9	CÇ	44	E	11.00 X 10 <sup>11</sup>	0.02 X 10 <sup>3</sup> /L
10	OB	34	K	12.00 X 10 <sup>11</sup>	0 X 10 <sup>3</sup> /L
11	DM	42	E	14.88 X 10 <sup>11</sup>	0.10 X 10 <sup>3</sup> /L
12	AB	30	E	8.18 X 10 <sup>11</sup>	0.13 X 10 <sup>3</sup> /L
13	SD	25	E	5.54 X 10 <sup>11</sup>	0.05 X 10 <sup>3</sup> /L
14	TA	32	E	8.37 X 10 <sup>11</sup>	0 X 10 <sup>3</sup> /L
15	AB	38	E	3.59 X 10 <sup>11</sup>	0.05 X 10 <sup>3</sup> /L
16	TA	26	E	2.85 X 10 <sup>11</sup>	0 X 10 <sup>3</sup> /L
17	OY	30	E	9.78 X 10 <sup>11</sup>	0.10 X 10 <sup>3</sup> /L
18	ŞD	48	E	4.28 X 10 <sup>11</sup>	0.40 X 10 <sup>3</sup> /L
19	KÇ	41	E	9.46 X 10 <sup>11</sup>	0.40 X 10 <sup>3</sup> /L
20	FÜ	45	E	9.10 X 10 <sup>11</sup>	0.10 X 10 <sup>3</sup> /L
21	OK	48	E	8.38 X 10 <sup>11</sup>	0.40 X 10 <sup>3</sup> /L
22	AK	49	E	7.03 X 10 <sup>11</sup>	0.10 X 10 <sup>3</sup> /L
23	SD	20	E	6.66 X 10 <sup>11</sup>	0.10 X 10 <sup>3</sup> /L
24	OG	21	E	11.22 X 10 <sup>11</sup>	0.30 X 10 <sup>3</sup> /L
25	AD	29	E	1.01 X 10 <sup>11</sup>	0.40 X 10 <sup>3</sup> /L

**Tablo IV-** Cobe Spectra ve CS3000 Plus gruplarında üründeki trombosit spesifik markırın (CD41) % ekspresyon değerleri

COBE SPECTRA				CS3000 PLUS			
CD41 % EKSPRESYON DEĞERİ				CD41 % EKSPRESYON DEĞERİ			
Donör No:	0.gün	3.gün	Farklar	Donör No:	0.gün	3.gün	Farklar
1	97.8	83.6	-14.2	1	98.0	99.7	1.7
2	80.0	90.0	10.0	2	96.4	99.4	3.0
3	92.8	93.0	0.2	3	100.0	99.9	-0.1
4	99.4	98.2	-1.2	4	99.1	96.4	-2.7
5	98.4	99.8	1.4	5	100.0	87.1	-12.9
6	99.5	97.8	-1.7	6	99.7	99.0	0.7
7	99.5	98.1	-1.4	7	99.9	99.6	0.3
8	99.8	99.8	0	8	99.8	99.9	0.1
9	99.3	99.9	0.6	9	99.9	99.5	-0.4
10	99.8	99.6	-0.2	10	99.7	94.5	-5.2
11	99.6	99.2	-0.4	11	99.8	99.1	-0.7
12	99.4	99.7	0.3	12	98.8	95.6	-3.2
13	98.7	97.6	-1.1	13	99.8	99.2	-0.6
14	91.2	99.3	8.1	14	99.4	96.1	-3.3
15	99.5	99.2	-0.3	15	96.1	99.0	2.9
16	100.0	98.8	-1.2	16	99.6	98.7	-0.9
17	99.6	99.2	-0.4	17	99.7	100.0	0.3
18	98.3	91.6	-6.7	18	99.6	99.9	0.3
19	99.3	96.0	-3.3	19	100.0	99.4	-0.6
20	96.6	98.7	2.1	20	99.7	98.9	-0.8
21	99.5	98.9	-0.6	21	99.1	99.8	0.7
22	90.7	99.7	9.0	22	96.6	99.0	2.4
23	98.4	97.4	-1.0	23	99.7	100.0	0.3
24	92.0	99.6	7.6	24	93.0	99.0	6.0
25	97.0	97.6	0.6	25	91.9	99.9	8.0

**Tablo V-** Cobe Spectra ve CS3000 Plus gruplarında üründeki trombosit yüzey glikoprotein (CD62) % ekspresyonları

COBE SPECTRA				CS3000 PLUS			
CD62 % EKSPRESYON DEĞERİ				CD62 % EKSPRESYON DEĞERİ			
Donör No:	0.gün	3.gün	Farklar	Donör No:	0.gün	3.gün	Farklar
1	31.6	46.3	14.7	1	13.6	94.5	80.9
2	13.5	43.1	29.6	2	4.5	73.2	68.7
3	15.2	39.8	24.6	3	0.9	83.3	82.4
4	29.9	42.6	12.7	4	39.2	70.3	31.1
5	11.8	69.5	57.7	5	8.1	88.1	80.0
6	4.7	85.5	80.8	6	12.8	63.3	50.5
7	16.2	91.0	74.8	7	14.3	79.8	65.5
8	0.2	70.1	69.9	8	17.2	70.0	52.8
9	38.0	89.7	51.7	9	1.3	66.6	65.3
10	43.3	81.9	38.6	10	23.6	49.4	25.8
11	43.0	75.9	32.9	11	45.3	89.3	44.0
12	3.3	74.7	71.4	12	22.5	34.1	11.6
13	31.7	67.7	36.0	13	43.5	92.8	49.3
14	12.7	67.3	54.6	14	2.2	37.6	35.4
15	43.3	87.2	43.9	15	29.1	41.1	12.0
16	46.2	72.8	26.6	16	6.1	31.4	25.3
17	47.3	92.4	45.1	17	2.7	91.4	88.7
18	42.0	87.7	45.7	18	6.0	87.9	81.9
19	16.1	75.9	59.8	19	34.9	53.1	18.2
20	11.0	85.4	74.4	20	27.4	57.7	30.3
21	22.8	59.8	37.0	21	13.7	30.6	16.9
22	2.5	76.6	74.1	22	16.5	68.0	51.5
23	4.8	45.5	40.7	23	9.5	89.0	79.5
24	6.1	66.6	60.5	24	13.1	68.0	54.9
25	23.0	67.7	44.7	25	31.0	83.4	52.4

## Trombositlerin İn Vitro Aktivasyon Markırlarına Etkisi

**Tablo VI-** Cobe Spectra ve CS3000 Plus gruplarında üründeki trombosit yüzey glikoprotein (CD63) % ekspresyonları

COBE SPECTRA				CS3000 PLUS			
CD63 % EKSPRESYON DEĞERİ				CD63 % EKSPRESYON DEĞERİ			
Donör No:	0.gün	3.gün	Farklar	Donör No:	0.gün	3.gün	Farklar
1	10.9	19.0	8.1	1	8.9	51.2	42.3
2	3.4	8.8	5.4	2	4.1	40.2	36.1
3	7.9	9.9	2.0	3	0.6	63.9	63.3
4	3.6	18.7	15.1	4	11.6	13.5	1.9
5	9.3	70.1	60.8	5	4.5	70.3	65.8
6	2.5	45.2	42.7	6	19.0	29.7	10.7
7	9.6	81.8	72.2	7	11.0	24.9	13.9
8	0.2	10.6	10.4	8	9.6	20.5	20.9
9	10.3	50.1	49.8	9	1.2	13.3	12.1
10	43.5	47.2	3.7	10	21.4	33.0	11.6
11	9.7	30.9	21.2	11	28.1	43.4	15.3
12	1.8	52.9	51.1	12	21.4	56.7	35.3
13	11.1	62.9	51.8	13	30.9	86.7	55.8
14	2.7	35.1	32.4	14	0.8	8.4	7.6
15	43.0	57.7	14.7	15	14.0	39.3	25.3
16	27.0	59.4	32.4	16	6.7	10.6	3.9
17	14.3	73.0	58.7	17	2.1	8.5	6.4
18	14.1	51.8	37.7	18	9.9	64.1	54.2
19	16.2	32.5	16.3	19	3.5	66.5	63.0
20	6.2	21.7	15.5	20	8.3	53.7	45.4
21	17.2	69.3	52.1	21	6.1	11.9	5.8
22	4.8	59.0	54.2	22	4.8	52.8	48.0
23	0	44.0	44.0	23	3.1	6.1	3.0
24	4.3	13.3	9.0	24	9.9	52.8	42.9
25	11.0	62.9	51.9	25	21.6	51.3	29.7

**Tablo VII-** Cobe Spectra ve CS3000 Plus gruplarında ürün lökosit sayısı ve trombosit yüzey glikoprotein (CD62) % ekspresyon farkları

COBE SPECTRA			CS3000 PLUS		
Donör No:	Lökosit sayısı	CD62 ekspresyon. % (Farklar)	Donör No:	Lökosit sayısı	CD62 ekspresyon. % (Farklar)
1	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	14.7	1	0.50 x10 <sup>9</sup> /L	80.9
2	0.31 x10 <sup>9</sup> /L	29.6	2	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	68.7
3	0.58 x10 <sup>9</sup> /L	24.6	3	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	82.4
4	0.38 x10 <sup>9</sup> /L	12.7	4	0 x10 <sup>9</sup> /L	31.1
5	0.56 x10 <sup>9</sup> /L	57.7	5	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	80.0
6	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	80.8	6	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	50.5
7	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	74.8	7	0 x10 <sup>9</sup> /L	65.5
8	0.30 x10 <sup>9</sup> /L	69.9	8	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	62.8
9	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	51.7	9	0.20 x10 <sup>9</sup> /L	65.3
10	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	38.6	10	0 x10 <sup>9</sup> /L	25.8
11	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	32.9	11	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	44.0
12	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	71.4	12	0.13 x10 <sup>9</sup> /L	11.6
13	0.38 x10 <sup>9</sup> /L	36.0	13	0.05 x10 <sup>9</sup> /L	49.3
14	0.56 x10 <sup>9</sup> /L	54.6	14	0 x10 <sup>9</sup> /L	35.4
15	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	43.9	15	0.05 x10 <sup>9</sup> /L	12.0
16	0.31 x10 <sup>9</sup> /L	36.6	16	0 x10 <sup>9</sup> /L	25.3
17	0.58 x10 <sup>9</sup> /L	45.1	17	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	88.7
18	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	45.7	18	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	81.9
19	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	59.8	19	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	18.2
20	0.30 x10 <sup>9</sup> /L	74.4	20	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	30.3
21	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	37.0	21	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	26.9
22	0.30 x10 <sup>9</sup> /L	74.1	22	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	51.5
23	0.30 x10 <sup>9</sup> /L	40.7	23	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	79.5
24	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	60.5	24	0.30 x10 <sup>9</sup> /L	54.9
25	0.30 x10 <sup>9</sup> /L	44.7	25	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	52.4

**Tablo VIII-** Cobe Spectra ve CS3000 Plus gruplarında ürün lökosit sayısı ve trombosit yüzey glikoprotein (CD63) % ekspresyon farkları

COBE SPECTRA			CS3000 PLUS		
Donör No:	Lökosit sayısı	CD63 ekspresyon. % (Farklar)	Donör No:	Lökosit sayısı	CD63 ekspresyon. % (Farklar)
1	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	8.1	1	0.50 x10 <sup>9</sup> /L	42.3
2	0.31 x10 <sup>9</sup> /L	5.4	2	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	36.1
3	0.58 x10 <sup>9</sup> /L	2.0	3	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	63.3
4	0.38 x10 <sup>9</sup> /L	15.1	4	0 x10 <sup>9</sup> /L	1.9
5	0.56 x10 <sup>9</sup> /L	60.8	5	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	65.8
6	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	42.7	6	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	10.7
7	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	72.2	7	0 x10 <sup>9</sup> /L	13.9
8	0.30 x10 <sup>9</sup> /L	10.4	8	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	20.9
9	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	49.8	9	0.20 x10 <sup>9</sup> /L	12.1
10	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	3.7	10	0 x10 <sup>9</sup> /L	11.6
11	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	21.2	11	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	15.3
12	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	51.1	12	0.13 x10 <sup>9</sup> /L	35.3
13	0.38 x10 <sup>9</sup> /L	51.8	13	0.05 x10 <sup>9</sup> /L	55.8
14	0.56 x10 <sup>9</sup> /L	32.4	14	0 x10 <sup>9</sup> /L	7.6
15	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	14.7	15	0.05 x10 <sup>9</sup> /L	25.3
16	0.31 x10 <sup>9</sup> /L	32.4	16	0 x10 <sup>9</sup> /L	3.9
17	0.58 x10 <sup>9</sup> /L	58.7	17	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	6.4
18	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	37.7	18	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	54.2
19	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	16.3	19	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	63.0
20	0.30 x10 <sup>9</sup> /L	15.5	20	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	45.4
21	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	52.1	21	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	5.8
22	0.30 x10 <sup>9</sup> /L	54.2	22	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	48.0
23	0.30 x10 <sup>9</sup> /L	44.0	23	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	3.0
24	0.10 x10 <sup>9</sup> /L	9.0	24	0.30 x10 <sup>9</sup> /L	42.9
25	0.30 x10 <sup>9</sup> /L	51.9	25	0.40 x10 <sup>9</sup> /L	29.7

**Tablo IX-** Cobe Spectra ve CS3000 Plus gruplarında aktivasyon markırları (CD62, CD63) ve trombosit spesifik markırın (CD41) karşılaştırılması

	COBE SPECTRA			CS3000 PLUS			ANLAMLILIK		
	0. gün	3. gün	p <sub>1</sub>	0. gün	3. gün	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	p <sub>4</sub>	
CD41	97.0:4.6	97.3:3.9	p <sub>1</sub> >0.05	98.7:2.2	98.3:2.8	p <sub>2</sub> >0.05	p <sub>3</sub> >0.05	p <sub>4</sub> >0.05	
CD62	22.4:15.8	70.5:16.3	p <sub>1</sub> <0.0001	17.6:13.4	67.8:20.9	p <sub>2</sub> <0.0001	p <sub>3</sub> >0.05	p <sub>4</sub> >0.05	
CD63	11.4:11.4	43.5:22.1	p <sub>1</sub> <0.0001	10.5:8.7	38.9:23.2	p <sub>2</sub> <0.0001	p <sub>3</sub> >0.05	p <sub>4</sub> >0.05	

p<sub>1</sub>: Cobe Spectra 0. gün ile 3. gün karşılaştırılması

p<sub>2</sub>: CS3000 Plus 0. gün ile 3. gün karşılaştırılması

p<sub>3</sub>: Cobe Spectra 0. gün ile CS3000 Plus 0. gün karşılaştırılması

p<sub>4</sub>: Cobe Spectra 3. gün ile CS3000 Plus 3. gün karşılaştırılması

**Tablo X-** Cobe Spectra ve CS3000 Plus gruplarında ürün trombosit ve lökosit ortalamalarının karşılaştırılması

	COBE SPECTRA	CS3000 PLUS	ANLAMLILIK
ÜRÜN TROMBOSİT SAYISI	8.59:1.64x10 <sup>11</sup>	8.49:3.05x10 <sup>11</sup>	P>0.05
ÜRÜN LÖKOSİT SAYISI	0.32:0.15x10 <sup>9</sup> /L	0.15:0.16x10 <sup>9</sup> /L	P>0.05

## Tartışma

Aferez cihazları ile elde edilen üründeki trombosit sayılarının değerlendirildiği Goodnough ve arkadaşlarının 708 donör ile gerçekleştirdikleri, mevcut çalışmalar arasında en fazla sayıda donörü içeren çalışmada, 300'ü Cobe Spectra, 408'i CS3000 Plus hücre ayırıcıları karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar ortalama trombosit ürün sayısını  $4.24 \pm 1.09 \times 10^{11}$  bulmuşlardır. Cobe Spectra grubunda bu değer  $4.17 \pm 1.1$ , CS3000 Plus grubunda  $4.30 \pm 1.1$  saptanarak her iki cihaz arasında trombosit sayısı yönünden fark bulunamamıştır<sup>20</sup>. Bizim çalışmamızda da cihazlar arasında ürün trombosit sayısı yönünden fark saptanmamıştır.

Rock ve arkadaşları, 5 gün depolama sonrası random donör torbalarında saklanan trombositlerin depolama boyunca pH'nın iyi bir şekilde sürdürüldüğü, hipotonik şok cevabında çok az değişiklik olduğu, bakteriyel üremenin görülmediği, morfolojik skorlamayla iyi bir şekilde korundukları sonucuna varmışlardır<sup>21</sup>. Bizim çalışmamız, metodolojik olarak daha hassas olan akım sitometri ile yapıldığından, 3.günde trombositlerin anlamlı düzeyde aktive olduğunu daha güvenilir olarak göstermektedir.

Bizim çalışmamızda çok sayıda hücrenin spesifik karakterlerini belirleyebilme avantajı nedeni ile akım sitometrik yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemle örnek hazırlanması sırasında, kan alımından saatler ve günler sonra örnek çalışılacaksa %1 paraformaldehit (PFA) ile fiksasyon önerilmektedir<sup>6</sup>. Ancak antikor konulmadan yapılan fiksasyon işleminin stimüle olmuş trombositlere CD41/61 ve CD62 bağlanmasını belirgin olarak azaltabileceği ileri sürülmüştür<sup>3,6,22</sup>. Bu metodolojik sorunu aşabilmek için PFA ile fiksasyona gerek kalmayacak şekilde örnekler hiç bekletilmeden çalışılmıştır. Fiksasyon, akım sitometriye hemen ulaşmanın mümkün olmadığı durumlarda önerilmektedir. Çünkü daha sonra işleme bağlı olarak meydana gelebilecek in vitro trombosit aktivasyonunu önlemektedir<sup>22</sup>.

Akım sitometrik inceleme ile %0.8 oranındaki aktive olmuş trombositler bile saptanabilmektedir. Bu nedenle sensitif ve direkt bir metod olarak değerlendirilmektedir<sup>6,17</sup>. Akım sitometri ile ayrıca trombosit heterojenitesi de tesbit edilebilmektedir<sup>6</sup>.

Bir partikülün trombosit olup olmadığının belirlenmesi için kullanılan monoklonal antikorun seçiminde, en sıklıkla GP Ib, GP IIb veya IIIa spesifik olanlar tercih edilmektedir. Bu monoklonaller, aktivasyon ile ilgili olmayıp, aktivasyon derecesi saptanacak olan popülasyonun öncelikle trombosit olduğundan emin olunmasını sağlarlar. Biz de çalışmamızda bu amaçla CD41 (GP IIb) monoklonal antikorunu kullandık. CD41 ekspresyon değerlerini Cobe Spectra

grubunda  $\%97.3 \pm 3.9$ , CS3000 Plus grubunda  $\%98.3 \pm 2.8$  olarak saptadık. Bu değerlendirmemiz Leytin ve arkadaşlarının trombosit spesifik markır olarak kullandıkları çalışmada verdikleri  $\%93.5 \pm 2.9$  değerine yakındır<sup>19</sup>.

Fijnheer ve arkadaşları trombosit aktivasyonunu monoklonal antikorlar GP IIb-IIIa kompleksi (CD41/61), CD62, CD63 ile flow sitometrik olarak belirledikleri çalışmalarında trombinle aktive edilmiş trombositlere 3 kat daha fazla bağlanma olduğunu ve aktivasyona bağlı ekspresyonun %2-3'lerden %70-80'lere çıktığını bildirmişlerdir<sup>3</sup>. Aynı çalışmada trombosit konsantreleri 5 gün saklandıktan sonra aktivasyona bağlı ekspresyonlarda %8-%60 düzeylerinde artışlar saptanmıştır. LDH'da artış,  $\beta$  tromboglobulin salınımı, trombositlerin swirling (girdaplaşma) paternlerinde azalmaların olmasıyla da saklanmaları sırasında aktive oldukları desteklenmiştir<sup>12</sup>. Bizim çalışmamızda depolamanın 3.gününde hem Cobe Spectra, hem de Fenwall CS3000 Plus grubunda, CD62 ve CD63 ekspresyonlarında anlamlı artışlar ortaya konulmuştur. CD62 ekspresyonu için Cobe Spectra grubunda 0. ve 3. günler arasında artış %48.5 bulunmuştur. CS3000 Plus grubunda ise aynı değer %51 bulunarak cihazlar arası fark saptanmıştır. Cobe Spectra hücre ayırıcısında 0.günde CD62 ekspresyonları %0.2-%47.3 aralığında bulunmuş, 3 gün linear bir ajitatorde bekletildiğinde ise aktivasyonda %39.8-%92.4 aralığında, anlamlı düzeyde artış saptanmıştır. CS3000 Plus hücre ayırıcısında 0.günde CD62 ekspresyonları %9-%45.3 aralığında bulunmuş, 3 gün bekleme sonrası ise %30.6 - %94.5 aralığında bulunmuştur. Buradaki artış da anlamlı düzeydedir. Bizim çalışmamızda da gözlenen 0.gün aktivasyon yüzdelерinin geniş bir aralıkta (%5-%55 arası) değişmesi, aferez cihazlarının mekanik özellikleri, antikoagulan protokollerinin farklı olması ve donörlere ait faktörlerle ilgili olabilir.

Rinder ve arkadaşları, akım sitometrik yöntemle trombosit aktivasyon markırını olarak CD62'yi kullanarak yaptıkları çalışmalarında 5 gün depolamayla trombositlerin %10-60 oranında aktive olduğunu ortaya koymuşlardır<sup>10</sup>. Bu sonuçlar, Fijnheer ve arkadaşlarının ve bizim sonuçlarımızla da uyumludur<sup>12</sup>. Ancak bizim çalışmamızda saptanan bu düzeylerdeki artışlara 3.günde ulaşılmıştır. Trombosit konsantrelerinden optimal sonuçların elde edilebilmesi için saklama sırasında ajite edilmeleri gerekmektedir. Trombositlerin membran ve yapısal bütünlüklerinin sürdürülmesinde trombosit konsantrelerinin saklandığı torbaların ve ajitasyon tipinin önemi, George ve arkadaşlarının çalışmalarıyla ortaya konmuştur<sup>8</sup>. Trombosit konsantrelerinin depolanmasında en sık kullanılan iki tip rotatörden biri sirküler, diğeri eliptikal olan rotatörlerdir. George ve arkadaşları trombosit konsantrisini 7 gün boyunca polyolefin torbalarda (PL-732, Fenwall), oda ısısında sirküler olan rotatörle depoladıklarında, trombosit membran

## Trombositlerin İn Vitro Aktivasyon Markırlarına Etkisi

glikoproteini GP Ib'ye bağlı antikor bağlanması normal kalırken, eliptikal rotatörle trombositlerin 1/3'ünde GP Ib antikor bağlanmasının %50 azalarak trombositlerin aktive olduğunu ortaya koymuşlardır<sup>8</sup>. GP IIb'ye antikor bağlanmasında her iki rotatörde kayıp gözlenmemiş, GMP-140'a antikor bağlanmasının ise her iki rotatörde eşit olarak arttığı saptanmıştır. Tüm bu verilerle araştırmacılar eliptikal rotatörle saklamanın daha az efektif olduğu sonucuna varmışlardır<sup>8</sup>.

Çalışmamız aynı model linear rotatör kullanmamız bakımından Michelson ve arkadaşlarının çalışmasına benzemekle birlikte aktivasyonu belirlemede kullanılan monoklonaller ve aktivasyon artışının 5. değil 3.günde saptanması açısından ondan ayrılmaktadır. Ajitasyonun sirküler rotatördeki tiplerinin, eliptikal olandan ve diğerlerinden üstün olduğu vurgulanırken bu konudaki yeterli sayıda çalışmanın olmadığı dikkat çekmektedir<sup>8,23</sup>.

G.Rock ve arkadaşları CS3000 Plus hücre ayırıcı kullanarak elde edilen trombosit konsantrelerini beş gün depoladıktan sonra laktat düzeyi ve  $\beta$  tromboglobulin düzeylerine bakarak trombositlerin etkinliğini iyi bulduklarını ifade etmişlerdir<sup>24</sup>. Bu çalışmada trombositlerin ortalama yaşam süresi  $7.3 \pm 1.4$  gün bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise trombosit konsantrelerinde 3.günde anlamlı düzeyde aktivasyon saptanmıştır. Bu bulgu, G.Rock ve arkadaşlarının 7.günde trombositlerin hala efektif durumda olması sonuçlarıyla uyumsuzluk göstermektedir. Bu uyumsuzluğun aktivasyonu saptamada yöntem farklılığından kaynaklandığı düşünülebilir. Trombosit konsantrelerinin hazırlanmaları ve saklanmaları sırasında olası aktivasyonu değerlendirmede  $\beta$ -tromboglobulin, trombosit faktör 4 ve trombospodin, tromboksan B2 gibi biyokimyasal markırlar uygun metodlara ulaşabilmede önemli katkılar sağlamışlarsa da, son on yıl içinde trombosit aktivasyonunu saptamada daha hassas metodlar olan immunolojik metodların geliştirilmiş olması daha güvenilir olarak değerlendirmeyi mümkün kılmaktadır.

Cobe Spectra ile ise 17 işlemde ortalama lökosit içeriği  $0.04 \times 10^6$ 'dır. Bizim çalışmamızda ise Cobe Spectra ile toplanan süspansiyonlarda ortalama lökosit değeri  $0.32 \pm 0.15 \times 10^3 / \mu\text{L}$ , CS3000 Plus ile  $0.15 \pm 0.16 \times 10^3 / \mu\text{L}$  dir. Bu değerlerin standart düzeylerde olduğu söylenebilir. Her iki cihaz arasında bu açıdan anlamlı fark bulunamamıştır. Rock ve arkadaşlarının buldukları lökosit konsantrasyonu değeri ise  $1.4 \pm 1.1 \times 10^9 / \text{L}$  dir<sup>21</sup>. Trombosit süspansiyonlarındaki lökosit konsantrasyonları ile CD62 ve CD63 ekspresyon yüzde ortalama farkları arasında korelasyon saptanmamıştır (Tablo VII, VIII). Sonuç olarak her iki cihaz in vitro aktivasyon markırları yönünden benzer bulunmuştur.

Sonuç olarak çalışmamızda; bekleme ile trombositlerin aktive olduğu, depolama ile anlamlı düzeyde trombosit aktivasyonu ortaya çıktığı saptanmıştır. Trombosit aktivasyon belirleyicilerinden  $\alpha$ -granül membran proteini CD62'deki artışlar, lizozomal protein CD63'dekilerden daha belirgindir. Metodolojik olarak akım sitometri çok fazla sayıda hücreyi tek tek değerlendirebilmesi yönüyle hassas bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Cobe Spectra ve CS3000 Plus hücre ayırıcıları arasında, hem 0. gün hem de 3. gün aktivasyon yüzde sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmamıştır. Mevcut saklama torbaları ile optimal depolama koşullarının sağlanamadığı kanaatine varılmıştır. Akım sitometrinin depolanmış trombosit konsantrelerinin kalite kontrolünde başarılı bir şekilde kullanılabileceği düşünülmüştür. Trombosit aktivasyonunu belirlemede, donöre ait faktörler, aferez cihazları, metodolojik problemler, akım sitometrik incelemede kullanılan pahalı monoklonal antikor kitleri, trombosit toplama torbalarının hacim ve boyut ile alan farklılıkları, saklanmaları sırasında kullanılan ajitatörlerin tipi, rotasyonun şekli de etkili olmaktadır. Bu faktörlerin birarada değerlendirildiği, daha fazla donör sayısı içeren çalışmaların gerekliliği sonucuna varılmıştır.

## Kaynaklar

1. Synder EL, Hezzy A, Katz AJ, Boch J. Occurrence of the release reaction during preparation and storage of platelet concentrates. *Vox Sang* 1981; 41: 172-7.
2. Bode AP. Platelet activation may explain the storage lesion in platelet concentrates. *Blood Cells* 1990; 16: 109-26.
3. Triulzi DJ, Kickler TS, and Braine HG. Detection and significance of alpha granule membrane protein 140 expression on platelets collected by apheresis. *Transfusion* 1992; 32: 529-33.
4. Bode AP, Holme S, Heaton WA, Svenson MC. Sustained elevation of intracellular cyclic 3'-5' adenosine monophosphate is necessary for preservation of platelet integrity during long term storage at 22°C. *Blood* 1994; 83: 1235-43.
5. Peter H, Catherine MH, Theodore EW, John GK. Investigation of the mechanisms of monoclonal antibody-induced platelet activation. *Blood* 1991; 78: 1019-26.
6. Shattil SJ, Michael C, James AH. Detection of activated platelets in whole blood using activation dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 1987; 70: 307-15.
7. Michelson AD. Platelet activation by thrombin can be directly measured in whole blood though the use of the peptide GPRP and flow cytometry; methods and clinical application. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5: 12-31.
8. George JN, Pickett EB, Heinz R. Platelet membrane glycoprotein changes during the preparation and storage of platelet concentrates. *Transfusion* 1988; 28: 123-6.
9. Hamburger SA, Mclutry TM, Prescott SM. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to granulocytes. *Blood* 1990; 75: 550-4.
10. Rinder HM, Murphy M, Mitchell JG, Stocks J, Ault KA, Hillman RS. Progressive platelet activation with storage:

- evidence for shortened survival of activated platelets after transfusion. *Transfusion* 1991; 31: 409-14.
11. Holme S, Suveering JD, Sowyer S. The expression of p-selectin, during collection, processing, and storage of platelet concentrates: relationship to loss of in vivo viability. *Transfusion* 1997; 37: 12-7.
  12. Fijnher R, Modderman PW, Veldman H, Ouwehand WH, Nieuwenhuis HK, Roos D, De Korte D. Detection of platelet activation with monoclonal antibodies and flow cytometry, Changes during platelet storage. *Transfusion* 1990; 30: 20-5.
  13. Divers SG, Kannan K, Stevart RM, Betzing KW, Dempsey D, Fuhuda M, Chervenak R, Holkombe RF. Quantitation of CD62, solubl CD62, and lysosome associated membrane proteins 1 and 2 for evaluation of the quality of stored platelet concentrates. *Transfusion* 1995; 35: 292.
  14. Ault KA, Mitchell J, Hillman RS. Appearance of p-selectin (CD62) during labeling is responsibl for the majority of the variability in III labeled platelets. *Blood* 1992; 80: 496.
  15. Murphy S. Platelet function, kinetics, and metabolism: impact on quality assessment, storage, and clinical use. In: McLeod BC, Price TH, Drew MJ (eds). *Apheresis: Principles and Practice*. Bedhasta: AABB Press; 1997. 122-39.
  16. Fijnherr R, Pietersz RNI, Dekorte D, Roos D. Monitoring of platelet morphology during storage of platelet morphology during storage of platelet concentrates. *Transfusion* 1989; 29: 36-40.
  17. Michelson AD. Platelet activation by thrombin can be directly measured in whole blood through the use of the peptide GPRP and flow cytometry: methods and clinical applications. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5: 121-31.
  18. Michelson AD, Benoit SE, Furman MI, Breckwoldt WL, Rohrer MJ, Barnard MR, Loscalzo J. Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. *Am J Physiol* 1996; 270: 1640-8.
  19. Leytin V, Shapiro H, Novikov I, Radnay J. Flow cytometric analysis of the platelet surface area and surface density of glycoprotein IIb-IIIa of unactivated human platelet of various sizes. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226: 94-100.
  20. Goodnough LT, Ali S, Despotis G, Dynis M, DiPresso JF. Economic impact of donor platelet count and platelet yield in apheresis products. *Vox Sang* 1999; 76: 43-9.
  21. Rock G, Senack E, Tittley P. 5-day storage of platelets collected on a blood cell separator. *Transfusion* 1989; 29: 626-8.
  22. Michelson AD. Flow Cytometry: A clinical test of platelet function. *Blood* 1996; 87: 4925-36.
  23. Michelson AD, Adelman B, Barnard MR, Carroll E, Handin RI. Platelet storage results in a redistribution of glycoprotein Ib molecules, evidence for a large intra platelet pool of glycoprotein Ib. *J Clin Invest* 1988; 81: 1734-40.
  24. Rock G, Tittley P, Mc Combie N. 5-day storage of single-donor platelets obtained using a blood cell separator. *Transfusion* 1989; 29: 288-91.