

Agregometrede Plazma Örneğinin Altan Karıştırılması Yerine Üstten Karıştırılmasının Agregasyon Üzerindeki Beklenmedik Etkileri*

Engin SAĞDİLEK^{1,2}, Oğuz SEBİK^{1,3}, Gürbüz ÇELEBİ¹

¹ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İzmir.

² Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Bursa.

³ Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

ÖZET

Agregometreler, trombosit agregasyonunun "Altın Standart" olarak değerlendirildiği cihazlardır. Plazma örneğini alttan karıştıran standart manyetik sistem yerine, üstten karıştıran mekanik bir sistemle elde edilen agregasyon eğrilerinde gözlenen farklılıklar bu çalışmada değerlendirildi. Sağlıklı gönüllülerden alınan kan örnekleri sitratla (n=27) veya heparinle (n=26) antikoagüle edildi. Aynı anda, aynı uyarıcı ajanla, aynı plazmadan alınan iki örnek üzerinde, agregometrenin bir kanalında standart agregasyon ölçümü yapılırken diğer kanalında mekanik karıştırıcının üstten karıştırdığı agregasyon ölçümü yapıldı. Elde edilen agregasyon eğrilerinin eğimleri, maksimum değerleri ve lag zamanları ölçüldü. Plazma örneğinin mekanik karıştırıcı bir sistemle üstten karıştırılması, agregaların dibe çökmesini engelleyerek maksimum agregasyonun daha düşük olmasına, kollajen ile uyarılan agregasyonun lag zamanının kışalmasına ve epinefrin ile uyarılan agregasyon eğrilerinin monofazik olmalarına sebep oldu. ADP ve kollajen ile uyarılan agregasyon eğrilerinin eğimleri azaldı. Trombositlerin agregasyon fonksiyonunun ölçümünde kullanılan klasik bir yöntemde yapılan basit bir değişikliğin beklenmedik sonuçları, agregasyona ve agregometrelere farklı bir gözle bakmamızı gerektirmektedir.

Anahtar Kelimeler: Trombosit. Agregometre. ADP. Kollajen. Epinefrin.

The Unforeseen Effects of Stirring Plasma Samples From the Top Rather Than the Bottom on Aggregation in the Aggregometer

ABSTRACT

Aggregometry are considered the "golden standard" in assessing platelet aggregation. This study evaluates the differences observed when the plasma sample in the aggregometer was stirred from the top using a mechanical system compared to conventional method of stirring from the bottom of the plasma sample. Blood from healthy volunteers were anticoagulated using citrate (n=27) or heparin (n=26). Using the same stimulating agent, two samples from the same plasma were evaluated simultaneously in the two channels of the aggregometer; in one channel the plasma sample was stirred conventionally from the bottom, in the other channel the sample was stirred from the top using a mechanical stirrer. The maximum values, lag times and slopes of the resulting aggregation curves were measured. Stirring the plasma sample from the top using a mechanical stirrer resulted in a smaller value for maximum aggregation, preventing the aggregates to settle at the bottom. It also resulted in shorter lag times for collagen induced aggregations, and monophasic aggregation curves for epinephrine induced aggregations. The slopes of the aggregation curves for ADP and collagen induced aggregations were also lowered. The unforeseen effects of a simple modification of the classical method of aggregometry used for evaluating the aggregation process of platelets highlight the need to evaluate results from aggregometry in a different light.

Key Words: Platelet. Aggregometry. ADP. Collagen. Epinephrine.

* Bu çalışma, 23. Ulusal Biyofizik Kongresinde (13-16 Eylül 2011, Edirne) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi: 05 Aralık 2013
Kabul Tarihi: 21 Ocak 2014

Dr. Engin SAĞDİLEK
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Biyofizik Anabilim Dalı, Bursa
Tel: 0 224 2954045
e-posta: esagdilek@uludag.edu.tr

Trombositler, fizyolojik olarak kanamanın durdurulmasında primer rol oynayan kan hücreleridir. İnsan vücudundaki hemen hemen en küçük hücreler olup, çekirdekleri yoktur.^{1,2} Trombositler nicelik olarak basit bir hemogram testiyle değerlendirilebilirler. Test sonucuna göre trombosit sayısının düşük olması kanama yatkınlığı hakkında, fazla olması tromboz yatkınlığı hakkında fikir verir.³ Trombositlerin nitelik olarak değerlendirilmesi ise biraz daha zordur. Adhezyon, agregasyon, sekresyon gibi birçok farklı fonksi-

yonu bulunan trombositler, hemograma göre daha ileri test yöntemleri ile fonksiyonel olarak değerlendirilebilirler.⁴

Trombosit agregasyonunun değerlendirildiği optik agregometreler, yirminci yüzyılın son çeyreğinden beri trombosit fonksiyon testlerinin “Altın Standardı” olarak kabul edilmektedir.⁵⁻⁷ Optik agregometre bir çeşit spektrofotometredir. Trombositçe zengin plazma örneği bir test tüpünde belli bir hızda karıştırılırken örneğe uyarıcı ajan ilave edilir. Uyarıcı ajanın etkisiyle trombositler aktive olur ve birbirlerine yapışarak agregalar oluştururlar. Oluşan agregalar çöker ve sonuç olarak ortamın ışık geçirgenliği artar. Işık geçirgenliğindeki değişiklik trombosit agregasyonunun ölçüsüdür.⁸

Önceki çalışmalarımızda^{9,10}, manyetik alanların trombosit agregasyonu üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla, örnek karıştırma mekanizması değiştirilmiş bir optik agregometre kullanmıştık. Bu değişiklik manyetik karıştırıcıyı elimine etmek amacıyla yapılmıştı. Normal bir agregometrede trombositçe zengin plazma örneği agregasyon tüpünün dibinde dönen küçük bir çubuk mıknatısla karıştırılır. Bu çalışmalar için yapılan değişiklikte, örneğin tüpe üstten daldırılan bir mil ucunda dönen, orijinal çubuk mıknatıs boyutlarında bir metal parçası ile karıştırılması sağlanmıştır. Bu çalışmalarda, üstten karıştırma ile elde edilen agregasyon eğrilerinin, standart agregometreden elde edilenlere göre bazı farklılıklar gösterdiği gözlenmiştir.

Bu makalede, standart optik agregometrede yapılan ve farklı bir etki oluşturması beklenmeyen söz konusu değişikliğin, agregasyon eğrilerinde ne gibi değişikliklere yol açtığı tartışılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma, Ege üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu onayı alınarak, protokollere uygun olarak yürütüldü. Deneyler, 2009 Ocak-Nisan ayları arasında, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Laboratuvarlarında yapıldı.

Denekler

Deneyler, 22–51 yaşları arasında, sağlıklı ve gönüllü 53 denekten alınan kan örnekleri üzerinde yapıldı. Kişisel ve aile hikâyesinde herhangi bir kanamalı durum veya hastalık olanlar, sigara içenler, son 10 gün içinde trombositleri etkilediği bilinen herhangi bir ilaç veya alkol almış olanlar çalışmaya dâhil edilmedi.

Kan Örneklerinin Alınması

Gönüllü olarak çalışmaya katılan deneğin kan örneği, sabah 08.30–10.00 arası, aç karnına, kan almadan görevli hemşire tarafından, üst kola hafif venöz staz uygulanarak *antecubital* venden 21 G iğne kullanıla-

rak alındı. İki adet 10’ar ml’lik tüpe alınan yaklaşık 20 ml kan örneği, heparinli tüplerde 5 U/ml heparinle, sitratlı tüplerde 0.0106 M sitratla (sitrat/kan: 1/9) antikoagüle edildi. Her deney gününde, tek bir denekten, bir çeşit antikoagülanla alınan kan örneği üzerinde çalışıldı.

Trombositçe Zengin ve Fakir Plazmaların Hazırlanması

Denekten alınan 2 tüp antikoagüle kan, 10 dk süre ile 200 G’de santrifuj edildi. Her tüpte üstte kalan trombositçe zengin plazma (TZP) kısımları pipetle çekilerek tek bir tüpte toplandı. Tüp alt üst edilerek TZP’nin homojen olması sağlandı. TZP’ler alındıktan sonra altta kalan sediment 2000 G’de 15 dk daha santrifuj edildi. Bu kez üstte kalan plazma trombositçe fakir plazma (TFP) olup, agregometre kalibrasyonunda kullanılmak üzere ayrı bir tüp içine alındı.

Agregometrede Yapılan Değişiklik ve Agregasyon Ölçümleri

Çalışmamızda, Platelet Aggregation Profiler PAP-4CD (Bio/Data, PA, USA) 4 kanallı optik agregometre cihazı kullanıldı.

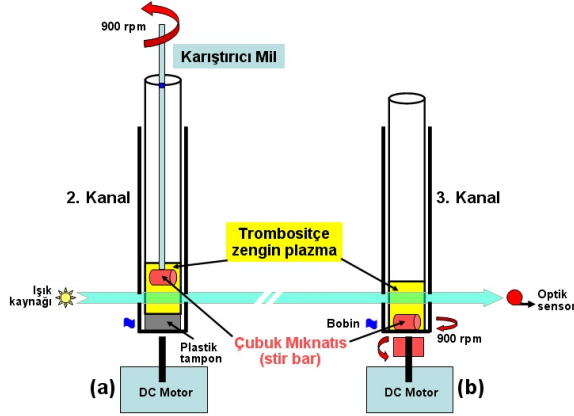
Optik agregometrelerde çok küçük miktarlardaki uyarıcı ajanın (5–25 µl) TZP içinde (475–495 µl) dağılması ve trombositlerin birbirleriyle temas edebilmeleri için TZP’nin karıştırılması gerekir. Bu işlem hemen hemen tüm agregometrelerde manyetik bir düzenek ile gerçekleşir. TZP tüpünün içine, laboratuvarlarda balık olarak adlandırılan küçük bir çubuk mıknatıs veya metal parçacık (stir bar) konur. Küvetin altında bir DC motora monte edilmiş ikinci bir mıknatıs vardır. Bu mıknatıs döndükçe tüpün dibindeki çubuk mıknatısı da döndürür. Dönen çubuk mıknatıs TZP örneğini karıştırır (Şekil 1/b).^{5,8}

Önceki çalışmalarımız için^{9,10}, bu manyetik karıştırma düzeneğini devre dışı bırakmak amacıyla mekanik bir karıştırıcı yapılmıştı. Bu mekanik karıştırıcı BAU Otomasyon Şirketi (İzmir) ile ortak çalışmalarla yapıldı. Agregometre üzerine hem yatay hem düşey doğrultuda hareket edebilen bir platform monte edildi. Platform üzerine iki mil yatağı sabitlendi. Mil yatakları ince lastik bir kayışla, hızı ayarlanabilen bir DC motor miline kenetlendi. Mil yataklarından birinin dönen parçasına bir optik sayaç yerleştirilerek, milin dakikadaki devir sayısı sürekli olarak LCD ekranda görüntülendi.

Miller Ege Üniversitesi atölyelerinde imal edildi. Bu çalışma için bir milin ucu eğer biçiminde şekillendirilerek, buraya agregometre cihazının orijinal çubuk mıknatısı yapıştırıldı. Sonra, milin ucu ve standart ölçümün yapılacağı diğer kanala konulacak olan çubuk mıknatıslar saydam koruyucu kaplama spreyi (1601, 3M Scotch, Germany) ile kaplandı.

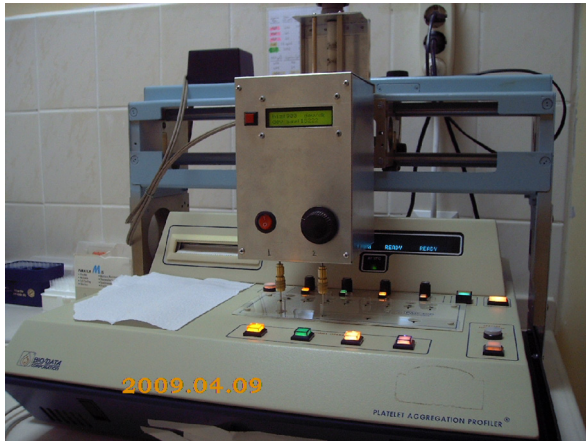
Agregometredeki Değişikliğin Beklenmedik Sonuçları

Karıştırıcı milin örnek küvetine gelen ışığı kesmemesi için, mil küvet içine belli bir derinliğe kadar batırıldı. Ayrıca, aynı amaçla örnek tüpü agregometre tabanına yerleştirilen plastik bir tamponla 4 mm yükseltildi. Modifiye edilmiş agregometrenin şematik çizimleri ve fotoğrafı, Şekil 1/a ve Şekil 2'de gösterildi.



Şekil 1:

Standart agregometre ve mekanik üstten karıştırıcılı sistemin şematik çizimi.



Şekil 2:

Mekanik üstten karıştırıcılı modifiye optik agregometrenin fotoğrafı.

Standart optik agregometrede TZP örneğinin içinde stir bar bulunmadığında cihaz ölçüm moduna geçmez. Çünkü bu durumda cihaz hem çubuk mıknatısın varlığı hem de gönderdiği açılal hız bilgisinden yoksun kalır. Mekanik karıştırıcıyı kullandığımız kanalda bu sorunu çözmek için sisteme, çubuk mıknatısın karşısına rast gelen bobinde üretilen sinyali taklit edip devreye veren bir fonksiyon jeneratörü ilave edildi (PCGU 1000, 2 MHz USB PC Function Generator, Velleman Instruments, Gavare, Belgium). Böylelikle cihaz tekrar ölçüm moduna geçer duruma getirildi.

Bu çalışmamızda aynı anda aynı uyarıcı ajanla, 2. kanalda mekanik karıştırıcı ile üstten karıştırarak (**Karıştırıcı**), 3. kanalda standart çubuk mıknatıs ile alttan karıştırarak (**Standart**) agregasyon ölçümleri yapıldı.

Agregasyon testlerine başlarken, önce karıştırıcı mil yatağına takıldı. Sonra karıştırıcı çalıştırılıp 900 devir/dk'lık açılal hıza ayarlandı ve hızın sabitleşmesi beklendi. TFP ile ışık geçirgenliği %100'e kalibre edildi. Kullanılacak uyarıcı ajanın son konsantrasyonuna uygun miktarda TZP agregasyon tüplerine konup, 2. ve 3. kanaldaki agregometre küvetlerine yerleştirildi. Karıştırıcı milin gireceği 2. kanal ölçüm moduna getirildi. Uyarıcı ajan önce standart ölçümün yapılacağı 3. kanala ardından mekanik karıştırıcı ile ölçümün yapılacağı 2. kanala eklendi. Daha sonra karıştırıcı mil TZP tüpünün içine milin işaretli yerine kadar dikkatlice indirildi. Agregasyon süreci, agregometrenin bilgisayardaki yazılımından izlendi.

Agregasyon eğrisi maksimuma erişip, belirli bir süre düz çizdikten sonra karıştırıcı 2. kanaldan çıkarıldı. Hemen ardından ince bir tel ile 3. kanaldaki çubuk mıknatıs da çıkarıldı. Agregasyon eğrilerinin tekrar düzleşmesi ile birlikte test sonlandırıldı.

Uyarıcı ajan olarak ADP, kollajen ve epinefrin (Bio/Data, PA, USA) kullanıldı. Test son konsantrasyonları ADP için 4 µM, epinefrin için 20 µM, kollajen için heparin grubunda 38 µg/ml, sitrat grubunda 95 µg/ml olarak ayarlandı. Her denek için Standart x Karıştırıcı karşılaştırması sırasıyla önce ADP, sonra kollajen, en son da epinefrin kullanılarak yapıldı.

Agregasyon ölçümlerinde değerlendirilen parametreler Şekil 3 ve 4'te gösterildi. Parametre değerleri, agregometreye ait bilgisayar yazılımı kullanılarak hesaplandı. Agregasyon eğrisinin **eğimi** %10–20 agregasyon değerleri arasındaki bölüme ölçüldü. **Maksimum agregasyon** (%), agregasyon eğrisinin maksimuma ulaşmış, en az 1 dk bu seviyede kaldığı aralıkta ölçüldü. Bifazik eğri gözlenen agregasyonlarda **primer agregasyon** (%), ve **eğim-2** (%30–40 arası) ayrıca ölçüldü. Karıştırıcı ve çubuk mıknatıs kanallarından çıkarıldıktan sonra meydana gelen agregasyon artışı **çökme** (%) olarak adlandırıldı. Maksimum agregasyon ile çökme'nin toplamından oluşan **toplam agregasyon** (%) hesaplandı.

Standart agregasyon ölçümlerinde ADP ve epinefrinin verilmesiyle birlikte agregasyon eğrisi oluşmaya başladı. Mekanik karıştırıcı ile yapılan ölçümlerde ise ADP ve epinefrin verildikten sonra karıştırıcının TZP içine girinceye kadar geçen süre [**Karıştırıcının iniş süresi**, sn] ölçüldü. Kollajen ile uyarılan standart agregasyon ölçümlerinde kollajen verildikten sonra agregasyon eğrisinin gözlenmeye başlamasına kadar geçen süre (**lag zamanı**, sn) ölçüldü. Kollajen ile uyarılan mekanik karıştırıcı ölçümlerinde bu süre **Karıştırıcının iniş süresi + Lag zamanı** olarak değerlendirildi.

Deney süreci, denekten kan alınmasını takiben en geç 1 saat içinde tamamlandı. (TZP örneklerinin hazırlanması: 30 dk, agregasyon ölçümü: 30 dk).

İstatistiksel Analiz

Kategorik değişkenlerin karşılaştırması Yates düzeltmeli Ki-kare testi ile yapıldı. Değerlendirilen parametrelerden normal dağılım gösterenler tablolarda ortalama \pm standart sapma ve minimum-maksimum değerler olarak, normal dağılım göstermeyenler medyan ve minimum-maksimum değerler olarak gösterildi. Standart ve karıştırıcı agregasyon ölçümlerinin grup içi karşılaştırmaları Eşleştirilmiş t-test ya da Wilcoxon sıra toplamları testi ile yapıldı. Gruplar arası bağımsız çift örneklemelerin karşılaştırması t test veya Mann Whitney U test ile yapıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edildi.

Bulgular

Kullanılan iki ayrı antikoagülana bağlı olarak oluşturulan heparin ve sitrat gruplarının yaş dağılımı ($p=0.195$) ve kadın/erkek oranları ($p=0.880$) birbirine benzerdir (Tablo I).

Tablo I- Grupların yaş dağılımı ve kadın/erkek oranları.

	Heparin	Sitrat	Toplam
Denek sayısı (n)	26	27	53
Kadın/Erkek	15 / 11	14 / 13	29 / 24
Yaş (ort \pm ss) (min-mak)	36.7 \pm 7.7 (22-50)	34.0 \pm 6.8 (24-51)	35.3 \pm 7.3 (22-51)

Değerlendirilen parametrelerin standart ve karıştırıcı agregasyon ölçümleri arasındaki karşılaştırmaları Tablo II ve III'te verildi.

ADP ile uyarılan agregasyonlar heparin grubunda tamamen monofazikken, sitrat grubunda yaklaşık 2/3 oranında monofazik, 1/3 oranında bifazik olarak gözlemlendi. Kollajen ile uyarılan agregasyonlar her iki grupta da monofazik olarak gözlemlendi. Epinefrin ile uyarılan agregasyonlar sitrat grubunda standart ölçümlerin hepsinde bifazikken, karıştırıcı ile yapılan ölçümlerin hepsinde monofazik olarak gözlemlendi. Heparin grubunda ise standart ölçüm ağırlıklı olarak bifazikken, karıştırıcı ile yapılan ölçümler yaklaşık yarı yarıya monofazik olarak gözlemlendi.

Her iki antikoagülan grubunda ve tüm uyarıcı ajanlarda (toplam 6 alt grup) çok açık bir şekilde göze çarpan durum, karıştırıcı ile yapılan ölçümlere göre standart ölçümlerde, maksimum agregasyonun anlamlı olarak yüksek ($p < 0.001$ [6 alt grup]), çökmenin anlamlı olarak düşük çıkmasıydı ($p < 0.001$ [5 alt grup], $p=0.030$ [1 alt grup]). Toplam agregasyonda ise 4 alt grupta fark ortadan kalkıyordu (Şekil 3 ve 4).

Kollajenin uyarıcı ajan olarak kullanıldığı standart agregasyon ölçümlerinde, kollajenin TZP'ye verilmesinden sonra agregasyonun başlamasına kadar geçen süre (lag zamanı), heparin grubuna göre sitrat grubunda bariz bir şekilde uzun bulundu ($p < 0.001$) (medyan:

28 [19-50]; medyan: 109 [75-213]). Uyarıcı ajan olarak ADP ve epinefrinin kullanıldığı agregasyon ölçümlerinde karıştırıcının iniş süresi yaklaşık olarak ortalama 21 sn hesaplandı. Kollajenin uyarıcı ajan olarak kullanıldığı karıştırıcı ile yapılan agregasyon ölçümlerinde [karıştırıcının iniş süresi + lag zamanı] olarak ölçülen değerlerden 21 sn çıkartılarak elde edilen sonuçlar lag zamanı olarak değerlendirildi. Hem heparin hem de sitrat grubunda karıştırıcının anlamlı olarak kollajenin lag zamanını kısalttığı bulundu ($p=0.014$, $p < 0.001$).

Tablo II- Heparin grubunda her üç uyarıcı ajanla elde edilen agregasyon eğrilerinde, değerlendirilen parametrelerin standart ve karıştırıcı grupları arasında karşılaştırılması.

(Normal dağılıma uyan değerler ortalama \pm standart sapma ve minimum-maksimum değerler şeklinde, normal dağılıma uymayan değerler median ve minimum-maksimum şeklinde verildi.)

Heparin (n=26)				
		Standart	Karıştırıcı	p
ADP 4 μ M		26/26 monofazik		
	Karıştırıcının iniş süresi (sn)		20.5 (12-38)	
	Eğim	39.4 \pm 18.0 (14-86)	39.4 \pm 16.9 (15-83)	1.000
	Maksimum Agregasyon (%)	42.4 \pm 12.2 (22.2-70.4)	38.3 \pm 10.8 (19.2-58.2)	<0.001
	Çökme (%)	5.4 \pm 3.0 (0.6-12.2)	10.6 \pm 6.0 (0-22.8)	<0.001
	Toplam Agregasyon (%)	47.3 \pm 13.6 (24.6-75.2)	46.4 \pm 15.6 (19.2-77.0)	0.493
Kol 38 μ g/ml		26/26 monofazik		
	Lag / Karıştırıcının iniş süresi + Lag (sn)	28.0 (19-50)	39.5 (23-83)	<0.001
	Lag / [Karıştırıcının iniş süresi + Lag] - 21 (sn) [min 21]	28.0 (19-50)	21.0 (21-62)	0.014
	Eğim	34.0 (12-82)	25.5 (12-49)	<0.001
	Maksimum Agregasyon (%)	50.7 \pm 16.1 (26.8-83.8)	42.8 \pm 12.3 (23.4-66.4)	<0.001
	Çökme (%)	4.6 (0-9.2)	11.2 (0-21.6)	<0.001
Toplam Agregasyon (%)	54.9 \pm 16.8 (26.8-86.2)	54.6 \pm 17.2 (27.2-86.2)	0.527	
Epi 20 μ M		2/24 monofazik 22/24 bifazik	11/24 monofazik 13/24 bifazik	
	Karıştırıcının iniş süresi (sn)		22.0 (14-56)	
	Eğim (ps)	10.3 \pm 4.0 (4-18)	20.8 \pm 8.5 (4-45)	<0.001
	Primer Agregasyon (%)	15.5 \pm 6.0 (6.4-27.4)	21.6 \pm 6.0 (13.4-33.8)	0.005
	Eğim-2 (ss)	5.0 (2-12)	3.0 (1-14)	0.006
	Maksimum Agregasyon (%)	48.7 \pm 16.9 (25.0-89.6)	37.3 \pm 13.4 (12.8-67.0)	<0.001
	Çökme (%)	3.0 (0-12.8)	13.6 (0-24.0)	0.030
	Toplam Agregasyon (%)	53.4 \pm 19.0 (25.0-91.4)	47.3 \pm 21.2 (12.8-86.8)	0.048

Agregometredeki Değişikliğin Beklenmedik Sonuçları

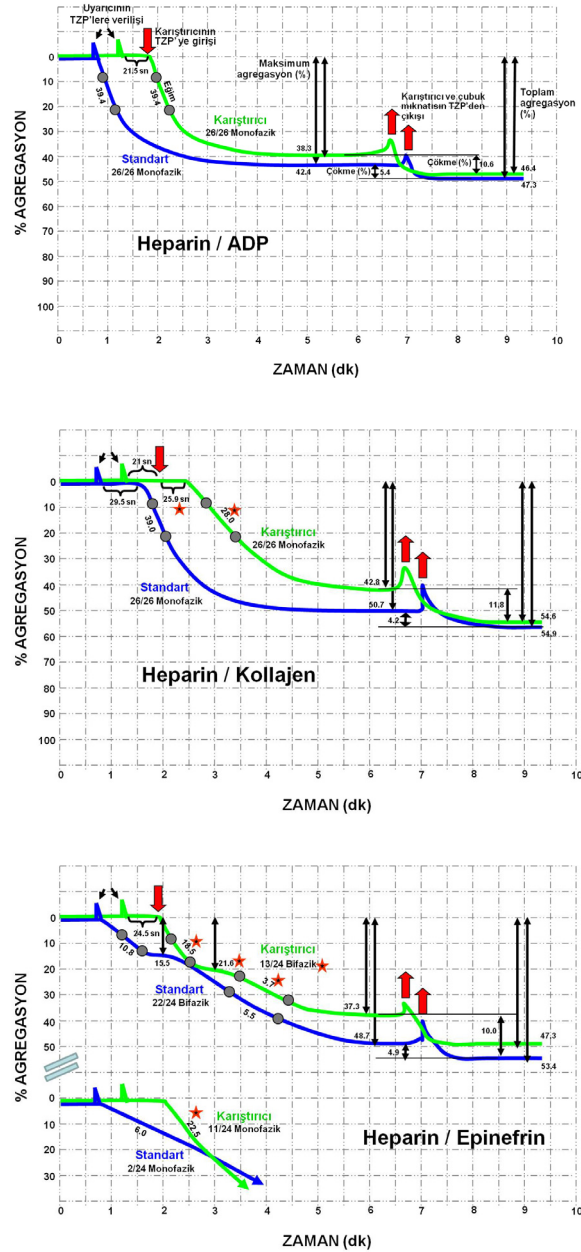
Tablo III- Sitrata grubunda her üç uyarıcı ajanla elde edilen agregasyon eğrilerinde, değerlendirilen parametrelerin standart ve karıştırıcı grupları arasında karşılaştırılması.

(Normal dağılıma uyan değerler ortalama \pm standart sapma ve minimum-maksimum değerler şeklinde, normal dağılıma uymayan değerler median ve minimum-maksimum şeklinde verildi.)

Sitrata (n=27)				
		Standart	Karıştırıcı	p
ADP 4 μ M		18/27 monofazik 9/27 bifazik	20/27 monofazik 7/27 bifazik	/
	Karıştırıcının iniş süresi (sn)	/	15.0 (12-26)	/
	Eğim	31.0 (15-69)	24.0 (14-63)	<0.001
	Primer Agregasyon (%)	32.8 \pm 6.7 (20.4-42.0)	29.8 \pm 3.6 (22.8-34.4)	0.043
	Eğim-2	4.1 \pm 1.4 (2-6)	2.9 \pm 1.1 (1-4)	0.039
	Maksimum Agregasyon (%)	47.5 \pm 14.5 (15.8-72.8)	40.1 \pm 12.9 (12.2-62.4)	<0.001
	Çökme (%)	4.8 \pm 3.4 (0-12.8)	10.4 \pm 6.0 (0-24.0)	<0.001
	Toplam Agregasyon (%)	52.4 \pm 16.9 (15.8-83.8)	50.5 \pm 18.3 (12.2-80.4)	0.016
Kol 95 μ g/ml		27/27 monofazik		/
	Lag / Karıştırıcının iniş süresi + Lag (sn)	109.0 (75-213)	52.5 (22-110)	<0.001
	Lag / [Karıştırıcının iniş süresi + Lag] - 21 (sn) [min 21]	109.0 (75-213)	31.5 (21-89)	<0.001
	Eğim	32.0 \pm 10.2 (10-50)	32.9 \pm 11.0 (11-54)	0.471
	Maksimum Agregasyon (%)	48.7 \pm 13.6 (18.2-79.2)	45.9 \pm 12.3 (17.6-71.0)	<0.001
	Çökme (%)	6.8 \pm 2.9 (1.0-13.4)	10.5 \pm 4.0 (2.8-21.0)	<0.001
Toplam Agregasyon (%)	55.6 \pm 15.0 (19.2-84.4)	56.4 \pm 15.6 (20.4-87.4)	0.116	
Epi 20 μ M		27/27 bifazik	27/27 monofazik	/
	Karıştırıcının iniş süresi (sn)	/	20.5 \pm 5.0 (13-32)	/
	Eğim (ps)	8.0 (2-17)	32.0 (15-43)	<0.001
	Primer Agregasyon (%)	10.7 \pm 4.4 (3.6-22.8)	/	/
	Eğim-2 (ss)	14.4 \pm 5.7 (3-26)	/	/
	Maksimum Agregasyon (%)	49.2 \pm 13.4 (18.6-76.2)	45.3 \pm 11.4 (21.0-65.8)	<0.001
	Çökme (%)	6.7 \pm 3.1 (0.6-13.4)	10.8 \pm 5.1 (0-25.0)	<0.001
	Toplam Agregasyon (%)	55.6 \pm 13.4 (20.0-85.6)	56.2 \pm 14.5 (21.0-89.0)	0.191

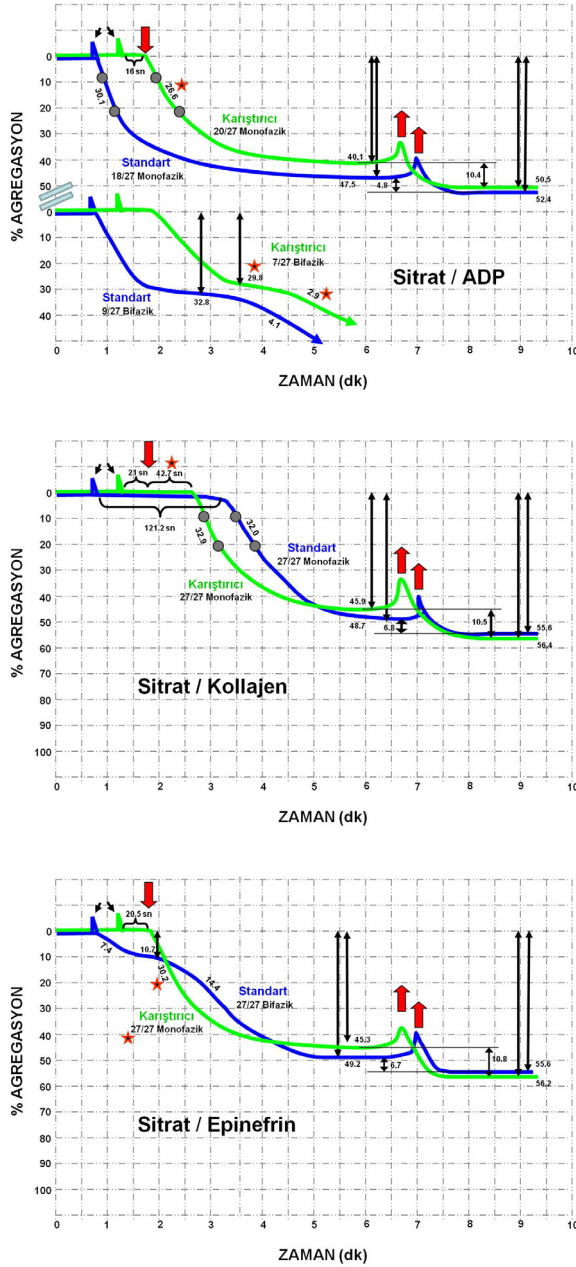
Heparin grubunda karıştırıcının kollajen ile uyarılan agregasyonun eğimini anlamlı olarak azalttığı ($p < 0.001$), epinefrin ile uyarılan agregasyonun eğimini ve primer agregasyonunu anlamlı olarak artırırken ($p < 0.001$, $p = 0.005$), eğim-2'yi anlamlı olarak azalttığı ($p = 0.006$) gözlemlendi.

Sitrata grubunda karıştırıcının ADP ile uyarılan agregasyonun eğimini, primer agregasyonunu ve eğim-2'sini anlamlı olarak azalttığı ($p < 0.001$, $p = 0.043$, $p = 0.039$) ve epinefrin ile uyarılan agregasyonun eğimini anlamlı olarak arttırdığı gözlemlendi ($p < 0.001$).



Şekil 3:

Heparin grubunda ADP, kollajen ve epinefrin ile uyarılmış trombositçe zengin plazma örneklerinden elde edilen agregasyon eğrilerinin, değerlendirilen parametrelerin ortalama değerlerine göre şematik çizimi. Yıldızlar, karıştırıcı ile elde edilen agregasyon eğrilerinin, standart agregasyon eğrilerine göre farklı olduğu yerleri göstermektedir.



Şekil 4:

Sitrat grubunda kollajen, epinefrin ve ADP, ile uyarılmış trombositçe zengin plazma örneklerinden elde edilen agregasyon eğrilerinin, değerlendirilen parametrelerin ortalama değerlerine göre şematik çizimi. Yıldızlar, karıştırıcı ile elde edilen agregasyon eğrilerinin standart agregasyon eğrilerine göre farklı olduğu yerleri göstermektedir.

Özetle; karıştırıcı, standart agregasyona göre:

Her iki antikoagülan grubunda, üç uyarıcı ajanla da uyarılan agregasyon eğrilerinde;

- Maksimum agregasyonu azalttı,
- Çökme arttı,
- Toplam agregasyonda fark ortadan kalktı.

Her iki antikoagülan grubunda kollajen ile uyarılan agregasyon eğrilerinde;

— Lag zamanını kısalttı.

Epinefrin ile uyarılan agregasyon eğrilerinde;

— Sitrat grubunu tamamen monofazik yaparken,

— Heparin grubunda monofazik olma eğilimini arttırdı.

Heparin grubunda;

— Kollajenle uyarılan agregasyon eğrilerinin eğimini azalttı,

— Epinefrinle uyarılan agregasyon eğrilerinin eğimini ve primer agregasyonunu arttırırken, eğim-2'sini azalttı.

Sitrat grubunda;

— ADP ile uyarılan agregasyon eğrilerinin eğimini, primer agregasyonunu ve eğim-2'sini azalttı.

— Epinefrin ile uyarılan agregasyon eğrilerinin eğimini arttırdı.

(Şekil 3 ve 4).

Tartışma

Çalışmamızda, farklı bir amaç için standart optik agregometre üzerinde yapılan basit bir değişikliğin, agregasyon üzerindeki etkileri araştırıldı. Standart optik agregometrede olduğu gibi trombositçe zengin plazmayı bir çubuk mıknaatısla dipten karıştırmak yerine, mekanik bir karıştırıcı ile üstten karıştırmak, agregasyon eğrilerinde beklenmedik değişikliklere yol açmıştır.

Her iki antikoagülan grubunda üç uyarıcı ajan için, mekanik karıştırıcı ile elde edilen agregasyon eğrilerindeki maksimum agregasyonların standart agregasyon eğrilerine göre daha düşük, karıştırıcı çıktıktan sonraki çökmenin daha fazla ve toplam agregasyonun standart agregasyon eğrilerine çok benzer oluşu, karışmanın gerçekleştiği yerle ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Mekanik karıştırıcı oluşan agregaların dibe çökmesine izin vermemektedir. Büyük olasılıkla agregalar, milin çevresindeki merkezkaç kuvvetinden kurtulup dibe çökemedikleri için ışık yolunu engellemeye devam etmektedirler. Standart yöntemde karışma zaten tüpün dibinde olduğu için oluşan agregalar dipte kalarak ışık yolunun nispeten uzağında yer alırlar. Karıştırıcı mil ve çubuk mıknaatı çıkarıldıktan sonra, çökmenin mekanik karıştırıcı da daha fazla olması bu düşüncüyü desteklemektedir. Sonuçta toplam agregasyonun çok benzer olması, mekanik karıştırıcının agregasyon fonksiyonunun sonucunu değiştirmedğini göstermektedir.

Karıştırıcının en belirgin etkisi, epinefrin ile uyarılan agregasyonların monofazik olma oranını arttırmasıdır. Klasik bilgilere göre, sitratla antikoagüle edilmiş plazma örnekleri epinefrin ile uyarıldıklarında agregasyonları bifazik eğriler gösterir.^{5,8,11,12} Çalışmamızda sitrat grubundaki standart agregasyon eğrilerinin

Agregometredeki Değişikliğin Beklenmedik Sonuçları

tümü bifazik iken, mekanik karıştırıcı ile elde edilen agregasyon eğrilerinin tümü monofaziktir. Heparin grubunda da monofazik olma oranı 5.5 kat artmıştır (2/24, 11/24). ADP ile uyarılan agregasyonlar hakkındaki klasik bilgi, düşük konsantrasyonlarda epinefrin gibi bifazik eğriler vermeleri, yüksek konsantrasyonlarda monofazik eğriler vermeleridir. ADP'nin düşük konsantrasyonlarında görülen sekresyona bağlı sekonder agregasyon, konsantrasyon artışı ile birlikte primer agregasyonun içine gömülmekte ve bir adımda esas agregasyon eğrisini oluşturmaktadır.^{5,8,11,12} Bizim çalışmamızda, epinefrin ile uyarılan agregasyonlarda, karıştırıcı ile gözlenen bifazik eğrilerin tümünün monofazik forma dönmesi, toplam agregasyonda ise farka yol açmaması, mekanik karıştırıcının sanki doz artışı gibi, agregasyonu farklı bir şekilde aktive ettiğini veya aktive olan sistem üzerine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. Bunu test etmek amacı ile, hiçbir uyarıcı ajanın ilave edilmediği, trombositçe zengin plazma örneğinin sadece mekanik karıştırıcı ile karıştırıldığı spontan agregasyon deneyleri yapıldı. Bu koşullarda beş kişilik bir grupta hiçbir spontan agregasyon gözlenmedi (veriler verilmedi). Sonuç olarak mekanik karıştırıcının tek başına agregasyonu aktive etmediği, ancak mevcut aktivasyona katkıda bulunduğu düşünüldü.

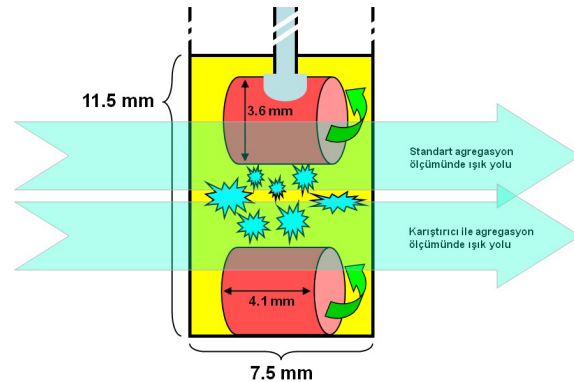
Karıştırıcının bir diğer ilginç etkisi kollajen ile uyarılan agregasyonlarda lag zamanını kısaltmasıdır. Lag zamanı, trombositler kollajen ile uyarıldıktan sonra trombositlerin şekil değiştirerek ışık geçirgenliğini daha da azaltmalarından sonra agregasyonun başlamasına kadar geçen süredir. Lag zamanı, kollajenle uyarılan trombositlerin aktivasyon yolağındaki farklılık kaynaklı klasik bir parametredir.^{5,8,11} Karıştırıcının heparin grubunda ortalama 3.6 sn (% 12) sitrat grubunda ortalama 78.5 sn (% 65) lag zamanını kısaltması açıklanması zor bir gözlemdir. Sitrat grubunda standart agregasyon eğrilerinin lag zamanı zaten çok uzun olduğu için (ort 121.2 sn) lag zamanındaki kısalma çok daha dikkat çekicidir. Kollajenin ortalama 21 sn gibi bir süre trombositçe zengin plazma içinde beklemesi ve sonrasında karıştırılması, trombositleri daha çabuk aktive etmektedir. Bu bekleme süreci, kollajenin etkisini hızlandırmaktadır.

Heparin grubunda kollajenle, sitrat grubunda ADP ile uyarılan agregasyon eğrilerinde eğimlerin yaklaşık sırasıyla % 28 ve % 12 oranlarında azalması, trombositlerin daha yavaş aktive oldukları anlamına gelir. Karıştırıcının nasıl böyle bir etkiye sahip olduğu açıklanması gereken sorulardan biridir.

Trombosit aktivasyonu ve agregasyonu oldukça karmaşık bir olaydır. Agregometrede trombositler her hangi bir uyarıcı ajanla uyarıldıktan sonra, ilk aktivasyon o uyarıcı ajanın etkisiyle başlar. Uyarıcı ajan reseptörüne bağlanır ve kendi yolağı üzerinden aktivasyonu başlatır. Trombosit bir kez aktive olduktan sonra granüllerin salınması, hücre içinde membran

fosfolipitlerinden vazoaktif ajanların sentezlenmesi ve salınması, koagulan faktörlerin aktive olması gibi birçok süreç olaya karışır. Trombosit bir kez aktive olduktan sonra zincirleme bir olaylar dizisi başlar. Bu açıdan agregometrede elde edilen agregasyon eğrileri tüm bu sürece oldukça genel bir yaklaşımdır.^{1-4,8,13}

Sonuç olarak; 500 µl plazmanın, yaklaşık 12 mm sıvı sütunu yüksekliğine ulaştığı bir tüp içinde, dipteki 1/3'lik kesim yerine üst yarısından karıştırılması agregasyon eğrilerinde hiç beklenmedik etkiler oluşturdu (Şekil 5). Standart optik agregometrede plazma örneğini dipten karıştıran çubuk mıknatıs yerine, mekanik karıştırıcı bir sistemle üstten karıştırılması, agregaların dibeye çökmesini engelleyerek maksimum agregasyonun daha düşük olmasına, kollajen ile uyarılan agregasyonun lag zamanının kısaltılmasına ve epinefrin ile uyarılan agregasyon eğrilerinin monofazik olarak gözlenmelerine sebep oldu. ADP ve kollajen ile uyarılan agregasyon eğrilerinin eğimleri azaldı. Trombositlerin bir dizi kompleks zincirleme sürecini yansıtan agregasyon fonksiyonunun ölçümünde klasik bir yöntem olan standart optik agregometrede yapılan bu basit değişikliğin beklenmedik sonuçları, gerek agregasyon süreci, gerekse de optik agregometreler hakkında bilinenlere daha farklı bir gözle bakmayı gerektirmektedir.



Şekil 5:

Standart optik agregometre ve mekanik üstten karıştırıcı sistemde trombositten zengin plazma örneği içinden geçen ışık yolları, karıştırmanın gerçekleştiği yerler ve oluşan agregaların şematik olarak gösterimi.

Teşekkür

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (T-2008/47) ve Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (2008-TIP-013) tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Colman RW, Clowes AW, Goldhaber SZ, Marder VJ, George JN, (eds). Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
2. George JN. Platelets. *Lancet* 2000;355:1531–39.
3. Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Reviews* 2005;19:111–23.
4. Gibbins JM, Mahaut-Smith MP, (eds). Platelets and Megakaryocytes: Volume 1, Functional Assays. New Jersey:Humana Press Inc; 2004.
5. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost* 2013;11:1183–9.
6. Braunwald E, Angiolillo D, Bates E, et al. Assessing the Current Role of Platelet Function Testing. *Clin Cardiol* 2008;31(3):10-6.
7. Harrison P. Assessment of platelet function in the laboratory. *Hämostaseologie* 2009;29:25–31.
8. Jarvis GE. Platelet Aggregation: Turbidimetric Measurements. In: Gibbins JM, Mahaut-Smith MP, editors. Platelets and Megakaryocytes: Volume 1, Functional Assays. New Jersey: Humana Press Inc; 2004. pp. 65-76.
9. Sağdilek E, Sebik O, Çelebi G. Investigation of the effects of 50 Hz magnetic fields on platelet aggregation using a modified aggregometer. *Electromagn Biol Med* 2012;31(4):382–93.
10. Sağdilek E, Sebik O, Çelebi G. Does the magnetic field of a magnetic stirrer in an optical aggregometer affect concurrent platelet aggregation? *Bioelectromagnetics* 2013;34(5):349-57.
11. Breddin HK. Can platelet aggregometry be standardized? *Platelets* 2005;16(3/4):151–8.
12. Lawrie AS, Kobayashi K, Lane PJ, Mackie IJ, Machin SJ. The automation of routine light transmission platelet aggregation. *Int Jnl Lab Hem*; doi:10.1111/ijlh.12161.
13. Michelson AD. Methods for the Measurement of Platelet Function. *Am J Cardiol* 2009;103:20–6.