

YAŞLILARDA POLİMORFONÜKLEER LÖKOSİT DEFORMABİLİTESİNDE AZALMA

M.Akif KARAN*

ÖZET

Yaşlılarda enfeksiyonlar gençlerden daha siktir ve genellikle daha ciddi seyreder, çünkü muhtemelen yaşlandıkça savunma mekanizmaları bozulmaktadır. İnflamasyon sürecinde lokal kan akımı ve damarların geçirgenliği artar, polimorf nüveli nötrofiller (PNL) hızla damar inflamasyon yerine göçerler. PNL'lerin damarı terk ederek, damar duvarından inflamasyon bölgesine göçebilmesi için deforme olabilmeleri gereklidir. Bu çalışmada yaşlı PNL'lerinin deforme olabilmeye yetenekleri araştırılmıştır. Çalışma grubu yaşları 65-88 arasında değişen 21 hastadan, kontrol grubu 18-62 yaşları arasında 20 sağlıklı erişkinden oluşmaktaydı. Olgulardan alınan venöz tam kan örneği Ficoll ile santrifüj edildikten sonra, elde edilen hücre karışımı içindeki eritrositler osmotik lizise uğratıldı. PNL'lerin Ringer laktat içindeki $1 \times 10^9/l$ konsantrasyondaki çözeltisi, oda sıcaklığında (20-23°C), 0.5 ml/dak sabit hızda, 5 µm'lik gözenekli polikarbonat filtrelerden geçirildi. Daha önce, ortamın filtrasyon basıncını belirlemek için (Po), tampon sıvısı filtre edildi. Lökosit rijiditesini gösteren parametre olarak, 20- 60. saniyeler arasındaki filtrasyon basıncı-zaman eğrisinin eğimi kullanıldı. Yaşlı grubunda PNL'lerin rijiditesi kontrol grubuna göre artmıştı (sırasıyla, 0.22 ± 0.03 , 0.14 ± 0.05 , $p < 0.0001$). PNL rijiditesi ile yaş ile arasında anlamlı, orta derecede, pozitif korelasyon, PNL rijiditesi ile albümin ve trigliserid düzeyleri arasında anlamlı, zayıf, negatif korelasyon bulundu. Sonuçlar yaşla birlikte PNL'lerin rijiditesinin arttığını göstermektedir, bu yaşlılarda PNL'lerin ekstrasvaze olma yeteneğinde azalmaya yol açarak enfeksiyonlarla başa çıkamadaki yetersizliğe katkıda bulunuyor olabilir.

Anahtar kelimeler: Yaşlılık, polimorfonükleer lökosit deformabilitesi.

SUMMARY

Decreased polymorphonuclear leukocyte deformability in the elderly. Infectious diseases occur more often and are usually more severe in the elderly than in younger adults, probably because aging affects host defenses. Inflammation is characterized by increased local blood flow, increased permeability of blood vessels and rapid mobilisation of polymorphonuclear neutrophil leukocytes. In order to migrate to the site of inflammation, the PNLs pass through the vessel walls. During this process, they must alter their morphology, a property called "deformability". In this study we investigated PNL deformability in the elderly. The study group involved 21 patients (65-88 years old) and the control group 20 healthy individuals (18-62 years old). After centrifugation of whole blood on Ficoll gradient, the cell pellet (RBCs and PNLs) was subjected to osmotic lysis of the RBCs. After centrifugation were PNLs resuspended in Ringer solution at a concentration of $1 \times 10^9/l$. Cell suspensions were pumped with a constant flow rate of 0.5 ml/min at room temperature (20-23°C) through polycarbonate filters with anominal pore size of 5 µm. Prior to the filtration of a cell suspension, buffer solution alone was filtered to obtain the filtration pressure for suspending medium (Po.) The slope of the filtration pressure-time curve between 20 and 60 s after the start of pump was used as a parameter of WBC rigidity. In the study group, PNL rigidity was significantly higher than controls (0.22 ± 0.03 vs. 0.14 ± 0.05 , $p < 0.0001$). Also, we detected a moderate positive correlation between age and PNL rigidity. There was a weak negative correlation between PNL rigidity and albumin and trygliceride levels. We conclude that PNL rigidity increases with aging, which can result in impaired PNL extravasation and poor response to infection in the elderly.

Key words: Elderly, polymorphonuclear leukocyte deformability.

GİRİŞ

Yaşlılarda, enfeksiyonlar gençlere göre daha siktir ve genellikle daha ciddi seyreder (1). Bu durum, muhtemelen yaşlılıkta savunma

mekanizmalarının bozulması ile ilgilidir. Yaşlanma sürecinde hem hücresel hem de humoral immun fonksiyonlarda önemli değişiklikler meydana gelir.

İnflamasyon sürecinde lokal kan akımı ve damarların geçirgenliği artar, polimorf nüveli nötrofiller (PNL) hızla inflamasyon yerine geçerler. PNL'lerin damarı terk ederek, damar duvarından inflamasyon bölgesine geçebilmesi için, deforme olabilmeleri gereklidir (13,20). Bu çalışmada, 65 yaşın üzerindeki bireylerde PNL'lerin deforme olabilmeye yeteneklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Çalışma grubu, 65-88 yaşları arasında 21 bireyden, kontrol grubu ise 18-62 yaşları arasında 20 sağlıklı erişkinden oluşmaktaydı. Çalışma grubu ve kontrol grubunu oluşturan bireylerde diabetes mellitus, kronik böbrek hastalığı, kronik karaciğer hastalığı gibi kronik bir hastalık yoktu, en az 10 yıldır sigara içmiyorlardı.

Olgulardan alınan heparinli venöz tam kan örneği 700 x g'de Ficoll ile santrifüj edildikten sonra, elde edilen hücre karışımı içindeki eritrositler osmotik lizise uğratıldı. Nötrofillerde deformabilite, mikrofiltrasyon tekniği kullanılarak basınca karşı hücre rijiditesi (k) olarak değerlendirildi. Kan örnekleri oda sıcaklığında 5 µm çaplı milipor polikarbonat filtreden (milipor ATT PO 2500) bir infüzyon pompası aracılığıyla 2 dk/inç (6.05 ml/dk) sabit hızla geçirildi. Basınç transdüseri (TP 400 T model) yardımı ile poligrafa (Nikon Kohden RM 6000) aktarılan basınç değişiklikleri bir analog-sayısal dönüştürücü kart yardımıyla bilgisayar hard diskine kaydedildi. Hücre rijiditesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı (15).

$$K = \frac{\Delta P/t}{P_0} = \frac{(P_{60s} - P_{20s})/40_s}{P_0}$$

Eritrosit sedimentasyon hızı Westergren yöntemiyle, kolesterol, trigliserid, HDL- kolesterol, LDL- kolesterol, VLDL- kolesterol, gama globulin düzeyleri Roche modüler sistemde tayin edildi.

İstatistiksel analizler için SPSS paket programı kullanıldı. Sonuçlar "ortalama ± standart sapma" olarak ifade edildi. Gruplar student t testi ile karşılaştırıldı, korelasyon analizi için Pearson korelasyon katsayısı kullanıldı.

BULGULAR

Çalışma grubunda PNL lökositlerin rijiditesi kontrol grubuna göre artmış bulundu (sırasıyla, 0.22±0.03, 0.14± 0.05, p<0.0001) (Tablo 1).

Çalışma grubunda PNL rijiditesi ile yaş arasında pozitif, anlamlı, orta derecede korelasyon (p=0.001, r=0.55), PNL rijiditesi ile albümin arasında negatif, zayıf korelasyon saptandı (p=0.04, r=-0.37). Tüm olgulara bakıldığında PNL rijiditesi ile trigliserid düzeyleri arasında negatif, zayıf korelasyon bulundu (p=0.024, r=-0.40).

Eritrosit sedimentasyon hızı, serum albümin, globülin, kolesterol, HDL- kolesterol, lökosit, lenfosit ve PNL sayıları bakımından çalışma grubu ile kontrol grubu arasında fark bulunmadı. Çalışma ve kontrol grubundan elde edilen değerler Tablo 1'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada yaşlıların PNL'lerinin kontrol grubuna göre daha rijid olduğu, yani deforme olabilmeye yeteneklerinin azaldığı gözlenmiştir. Yaş ile PNL rijiditesi arasında pozitif bir korelasyon saptanmıştır.

Mikrosirkülasyonda kan akımını, kardiyak debi, vasküler geometri ve kanın reolojik özellikleri belirler. Kapillerlerde kan reolojisi başlıca eritrosit ve lökositlerin deformabilitesine bağlıdır. Eritrosit ve lökositler küçük çaplı kapillerlerden geçebilmek için deforme olabilmelidir (2,5). Yine PNL'lerin inflamasyon bölgesine doğru hareket edebilmek ve

Tablo 1. Olguların PNL rijiditesi ve diğer parametreleri

	Çalışma grubu	Kontrol grubu
Yaş*	73±7	43±14
Lenfosit sayısı (/mm ³)	1772±544	2175±652
PNL sayısı (/mm ³)	4791±2040	4134±1431
ESH (mm/saat)	51±33	34±31
Albümin (g/dl)	3.43±0.91	3.95±0.71
Globulin (g/dl)	3.25±0.56	3.10±0.57
Kolesterol (mg/dl)	191±48	193±40
Trigliserid (mg/dl)	130±48	220±129
HDL-kolesterol (mg/dl)	44±17	41±12
PNL rijiditesi*	0.22±0.03	0.14±0.05

*Anlamlı

PNL: Polimorfonükleer lökosit; ESH: Eritrosit sedimentasyon hızı

aktive eden uyarana doğru göç etmek için deforme olabilmeleri gerekir (13).

Akut inflamasyonun kritik bir fonksiyonu olan lökositlerin inflamasyon alanında toplanması süreci marginasyon, yuvarlanma ve endotele adhezyon aşamalarından oluşur. Lökositlerin ekstrasvazasyonu için öncelikle PNL lökositlerin kemotaktik faktörlerle uyarılması ve stimüle olmamış endotele adhezyonu şarttır (3,11). Lökosit-endotelyal adheziv etkileşim modelinde başlangıçtaki bağlanma, stabil adhezyon, yayılım ve sonunda diapedez sürecinde selektin, integrin ve Ig gen ailesine ait çok sayıda üye yer alır (19). PNL'lerin endotele bağlanması ve transendotelyal migrasyonu için *in vitro* olarak hem PNL lökositler üzerinde CD 18'e ve hem de endotel hücresi üzerinde hücreler arası yapışma molekülü-I'e (ICAM-1) gereksinim olduğu gösterilmiştir (9,10). Adhezyondan önceki yuvarlanma olayı için selektinler gereklidir (4,7,8). Bunlardan biri olan L-selektin lökositlerin çoğunda ekspresse olur. Kemik iliğindeki postmitotik havuzdaki matür PNL'lerin dolaşımdakilere oranla daha fazla miktarda L-selektin ekspresse ettiği gösterilmiştir (23). PNL lökositlerin inflamasyon ala-

nına toplanması için L-selektin gerektiğinden inflamasyon alanına öncelikle kemik iliğinden yeni salınmış PNL'ler göç etmektedir (22). PNL'ler dolaşımda yaşlandıkça L-selektinlerini kaybederler (12,21,22). Bu durumda yaşlı ve L-selektin düzeyi düşük PNL'lerin inflamasyon alanına toplanma yeteneklerinin azaldığı düşünülebilir. Çeşitli çalışmalarda yaşlanmış PNL'lerde kemotaksis, adhezyon, yayılım ve fagositoz fonksiyonlarında azalma olduğu ve sonra apoptoza uğradığı gösterilmiştir (14,17,24). Yaşlanmakta olan PNL'lerdeki değişiklikler bu hücrelerin karaciğer ve dalaktaki makrofajlar tarafından "yabancı" ya da "yaşlı" olarak tanınmasına ve dolaşımdan temizlenmelerine neden olur (16).

PNL'lerde en çok bulunan proteinlerden bir de aktindir. İki şekilde yer alır: monomerik globuler form (G-aktin) ve filamentöz form (F-aktin). PNL aktivasyonu sırasında polimerize aktin miktarı, mikrofilament ağın yapısı ve hücrenin mekaniksel davranışında hızlı ve belirgin değişiklikler olur (6,25). Kemotaktik yanıtın erken fazında G-aktin hızla F-aktine döner ve F-aktin miktarı artar. Morfolojik olarak bu safhada PNL sferik şekildedir ama çok sayıda kabarıklıklar oluşturur. Sonraki birkaç dakika içinde hücre deformabilitesi artar. Daha sonra F-aktinden zengin psödopodlar oluşur. Oldukça rijid olan psödopodların hareketi için gerekli kontraktilelemanı muhtemelen aktin-miyozin kompleksi oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda total F-aktin içeriği ile hücre deformabilitesi arasındaki güçlü korelasyon olması, PNL aktivasyonu ile ilişkili başlıca yapısal elementlerin aktin mikrofilamanları olduğunu düşündürmektedir. Aktive nötrofillerde mikro filaman ağı gel benzeri yapıya sahipken, pasif hücrelerde daha sıvı benzeri yapıya sahiptir (6).

Çalışılan yöntemle göre, periferik kandan ayrılan PNL'lerin mikrofiltrasyon esnasında

basınca karşı gösterdikleri direnç bu hücrelerin rijiditesini, yani deforme olabilme yeteneklerini ifade etmektedir. Sonuçlar değişik yaşlardaki PNL'lerin ortalama rijiditesini göstermektedir. Bununla birlikte, yaşlıların kemik iliklerinden ayrılarak dolaşıma yeni katılmış olan PNL'leri ile dolaşıma daha önceden katılmış olan daha "yaşlı" PNL'lerinin deformabilitesinin ayrı ayrı bakılması ilginç sonuçlar verebilir.

Sonuç olarak, yaşlılarda periferik kandaki PNL'lerin deforme olabilme yetenekleri azalmaktadır, bu azalma inflamasyon yanında gecikmeye yol açarak yaşlılarda infeksiyonların daha ciddi seyretmesine katkıda bulunuyor olabilir.

Teşekkür

Laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Doç.Dr. Şule Tamer'e teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

1. Abram WB, Beers MH, Berkow R: The Merck Manuals of Geriatric, Merck (Co., Inc, 3. baskı (1995), sayfa: 1085.
2. Betticher D, Keller H, Maly FE, Reinhart WH: The effect of endotoxin and tumour necrosis factor on erythrocyte and leukocyte deformability in vitro. *Br J Haematol* 83:130 (1992).
3. Harlan JM, Killen PD, Senecal FM, Schwartz BR, Yee EK, Taylor FR, Beatty PG, Price TH: The role of neutrophil membrane glycoprotein GP-150 in neutrophil adhesion to endothelium in vitro. *Blood* 66:167 (1985).
4. Clark EA, Brugge JS: Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268:233 (1995).
5. Chien S. Role of blood cells in microcirculatory regulation. *Microvascular Research*, 1985; 29: 129.
6. Frank RS: Time-dependent alterations in the deformability of human neutrophil in response to chemotactic activation. *Blood* 76:2606 (1990).
7. Lawrence MA, Springer TA: Leukocytes roll on a selectin at physiological flow-rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65:859 (1991).
8. Ley K, Gaethgens P, Fennie C, Singer MS, Lasky LA, Rosen SD: Lectin-like adhesion molecule-1 mediates leukocytes rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood* 77:2553 (1991).
9. Lichtmann MA, Weed RI: Alteration of the periphery during granulocyte maturation: relationship to cell function. *Blood* 39:301 (1972).
10. Lo SK, VanSeventer GA, Levin SM, Wright SD: Two leukocyte receptors (CD11a/CD18 and CD11b/CD18) mediate transient adhesion to endothelium by binding to different ligands. *J Immunol* 143:3325 (1989).
11. Lundberg C, Wright SD: Relation of the CD11/CD18 family of leukocyte antigens to the transient neutropenia caused by chemoattractants. *Blood* 76: 1240 (1990).
12. Matsuba KT, Van Eeden SF, Bicknell SG, Walker BAM, Hayashi H, Hogg JC: Apoptosis in circulating PMN: increased susceptibility in L-selectin-deficient PMN. *Am J Physiol* 272:2852 (1997).
13. Matsuba KT, Van Eeden SF, Saito Y, Okazawa M, Klut ME, Hayashi S, Hogg JC: Functional changes in aging polymorphonuclear leukocytes. *Circulation* 97: 91 (1998).
14. McCullough J, Wieblen BJ, Peterson PK, Quie PG. Effects of temperature on granulocyte preservation. *Blood* 52:301 (1978).
15. Reinhart WH, Usami S, Schalmazer EA, Lee MML, Chien S: Evaluation of red blood cell filterability test; influences of pore size, hematocrit level and flow rate. *J Lab Clin Med* 104:501 (1984).
16. Savill JS, Henson PM, Haslett C: Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel 'charge sensitive' recognition mechanism. *J Clin Invest* 84:1518 (1989).
17. Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C: Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation: programmed cell deaths in the neutrophil leads to its recognition. *J Clin Invest* 83:865 (1989).
18. Smith CW, Rothlein R, Hughes BJ, Mariscalco MM, Rudloff HE, Schmalstieg FC, Anderson DC: Recognition of an endothelial determinant for CD18-dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration. *J Clin Invest* 82:1746 (1988).
19. Spertini O, Luscinskas FW, Gimbrone MA Jr, Tedder TF: Monocyte attachment to activated vascular endothelium in vitro is mediated by leukocyte adhesion molecule-1(L-selectin) under non-static conditions. *J Exp Med* 17:175 (1789).
20. Spertini O, Luscinskas FW, Kansas GS, Munro JM, Griffin TD, Gimbrone MAJ, Tedder TF: Leukocyte adhesion molecule-1 interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion. *J Immunol* 147:2565 (1991).
21. Tedder TF, Steeber DA, Pizcueta P: L-selectin deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J Exp Med* 181:2259 (1995).
22. Van Eeden SF, Bicknell S, Walker BM, Hogg JC: Polymorphonuclear leukocytes L-selectin expression decreases as they age in circulation. *Am J Physiol* 272: 401 (1997).
23. Van Eeden SF, Miyagashima R, Haley L, Hogg JC: L-selectin expression on peripheral blood polymorphonuclear leukocyte during their release from the bone marrow in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 151:500 (1994).
24. Whyte MK, Meagher LC, MacDermot J, Haslett C: Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J Immunol* 150:5124 (1993).
25. Wymann MP, Kernen P, Bengtson T, Andersson T, Baggiolini T, Deranleau DA: Corresponding oscillations in neutrophil shape and filamentous actin content. *J Biol Chem* 265:619 (1990).