

ORJİNAL YAZI

Trombositlerin Epinefrine Yanıtlarının Optik Agregometre ve PFA-100 İle İncelenmesi

Engin SAĞDİLEK, Naciye İŞBİL BÜYÜKCOŞKUN, Kasım ÖZLÜK

Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

ÖZET

Çalışmamızda trombositlerin epinefrine yanıtlarının optik agregometre ve PFA-100 sistemi ile incelenmesi amaçlandı. 20-76 yaş arası, sağlıklı ve gönüllü 68 kişiden alınan kan örnekleri PFA-100 sisteminde kollajen/epinefrin ve kollajen/ADP kartuşu ile kapanma zamanı ölçülerek trombosit yanıtları değerlendirildi. Agregasyon testleri için elde edilen trombosit zengin plazma (450 µl) üzerine 10 µM ADP, 10 µg/ml kollajen veya 300 µM epinefrin 50 µl ilave edilerek agregasyon süreci 10 dk takip edildi. Optik agregometrede epinefrine karşı gösterdikleri maksimum agregasyon cevaplarına göre cevapsız, yarıcevaplı ve normal olarak üç gruba ayrılan örnekler %14,7 cevapsız, %16,2 yarıcevaplı bulundu. Epinefrine azalan cevap; epinefrinle lag zamanının uzaması, ADP ile maksimum agregasyonun azalması ve maksimum agregasyona ulaşma süresinin kısalmasıyla ve kollajenle lag zamanının uzamasıyla birlikteydi. Epinefrine cevapsız ve yarıcevaplı grupta PFA-100 sistemi kollajen/epinefrin kartuşu kapanma zamanının uzadığı gözlemlendi. Bulgularımız, optik agregometre ile elde edilen sonuçlara göre trombositlerin epinefrine yanıtlarının farklı olduğunu ve bu değerlendirmenin daha yeni bir yöntem olan PFA-100 sistemi ile de yapılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Trombosit. Epinefrin. Optik Agregometre. PFA-100.

The Investigation of Platelets' Response to Epinephrine Using Optical Aggregometer and PFA-100

ABSTRACT

In this study we aimed to examine the response of platelets to epinephrine using optic aggregometer and PFA-100. Blood samples of 68 healthy and volunteered subjects, aged between 20-76, were evaluated for the epinephrine responses of platelets by using collagen/epinephrine and collagen/ADP cartridges in PFA-100 system for closure time values. The process of aggregation was observed for 10 minutes by adding 10 µM ADP, 10 µg/ml collagen or 300 µM epinephrine on platelet rich plasma (450 µl) prepared for aggregation tests. The samples were classified into three groups as nonresponder, semiresponder and normal according to their maximal responses to epinephrine: 14,7 % nonresponder, 16,2 % semiresponder were observed. A decreased response to epinephrine was associated with increased epinephrine lag duration, decreased maximum aggregation of ADP and increased collagen lag duration. The PFA-100 system collagen/epinephrine cartridge closure time values were observed to be increased in the groups with nonresponder and semiresponder. Our results acquired with optic aggregometer demonstrate that the responses of platelets to epinephrine is various, and the relatively new method of PFA-100 can also be used to evaluate this response.

Key Words: Platelet. Epinephrine. Optic Aggregometer. PFA-100.

Trombositler hemostazda ve trombozda oldukça önemli bir yere sahiptir. Vasküler endotelin hasarlanması ile ortaya çıkan subendotelial doku, trombositlerin hasar bölgesine toplanmasında temel rol oynar. Trombosit yüzeyindeki glikoprotein (GP)

Ib-IX-V reseptörlerine von Willebrand Faktör (vWF)'ün bağlanması trombositlerin vasküler hasar bölgesine yapışmasını kolaylaştırır. Trombositler kollajen (Kol), ADP, epinefrin (Epi), trombin, tromboksan A₂ (TxA₂), trombosit aktive edici faktör (PAF), serotonin gibi uyarıcı ajanların etkisiyle şekil değiştirir, granül içeriklerini ve sentezledikleri TxA₂ ile PAF gibi maddeleri sekrete eder ve agregat oluştururlar. Trombosit agregasyonu hücre membranındaki fibrinojen reseptörlerinin aktivasyonu ile gerçekleşen fibrinojen-bağımlı bir intersellüler adhezyondur^{1,2}.

Uyarıcı ajanların trombositler üzerindeki reseptörleri, çoğunlukla G protein bağlantılı reseptör ailesindedir. Reseptörlerin özgüllüğüne bağlı olarak G proteinlerin farklı alt tipleri uyarılır. Gq proteinin uyarılması ile birlikte fosfolipaz C (PLC)'nin aktive olması, biribi-

Geliş Tarihi: 22.03.2006
Kabul Tarihi: 30.05.2006

* Çalışmamız, 4. Ulusal Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji Kongresi'nde (26-28 Eylül 2003, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Edirne) Sözlü Bildiri olarak sunulmuştur.

Dr. Naciye İŞBİL BÜYÜKCOŞKUN
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı
16059 Görükle/BURSA
Tel.: 0 224 4428840
e-mail: nisbil@uludag.edu.tr

rinden bağımsız ama birbiriyle sinerjik etkileşen farklı iki yolağı aktive eder. Ca^{++} bağımlı ve protein kinaz C (PKC) bağımlı bu yollar fibrinojen reseptör aktivasyonunun temel uyarınlardır³. Gi proteinin adenilat siklazı (AC) inhibe etmesi ve trombosit içi azalan cAMP seviyeleri tek başına fibrinojen reseptör aktivasyonuna yetememekle birlikte, Ca^{++} ve PKC bağımlı yolları potansiyalize eder^{4,5}. Trombositlerin tam olarak aktive olabilmeleri için Gi ve Gq proteinlerin birlikte uyarılmaları gerekir⁶⁻⁹.

Epi trombosit agregasyonunu indükleyen zayıf uyarıcı ajanlardan biridir. Aynı zamanda diğer uyarıcı ajanların agregan etkilerini potansiyalize ettiği de gösterilmiştir. Primer agregasyonu takiben gerçekleşen sekresyona bağımlı sekonder agregasyon, Epi'in optik agregometredeki tipik bifazik agregasyon eğrisini verir^{1,10}. Epi trombosit yüzeyindeki α_{2A} adrenerjik reseptörleri üzerinden Gi proteinin aktif alt birimi olan $G_{i\alpha z}$ proteini aktive eder ve AC inhibe olur. cAMP'nin azalması trombosit aktivasyonu için yeterli olmasa bile diğer uyarıcı ajanların düşük konsantrasyonlarda agregasyon oluşturmalarını sağlar. Epi'in AC'ı inhibe etmesinin yanı sıra tam olarak bilinmeyen yollar üzerinden PLC'yi aktive ettiği, TxA_2 sentezini arttırdığı ve granül sekresyonuna neden olduğu da gösterilmiştir^{4,11,12}. Patofizyolojik şartlarda lokal olarak artan epinefrin ve norepinefrinin, trombositlerin agregasyon yanıtını arttırdığı ve trombotik riskin artışına sebep olduğu düşünülmektedir¹.

Bazı klinik durumlarda özellikle myeloproliferatif hastalıklarda, trombositlerin Epi'e karşı cevabının azaldığı bilinmektedir¹³⁻¹⁶. Sağlıklı insanlarda yapılan trombosit agregasyon çalışmalarında Epi'e karşı cevabın herkeste aynı olmadığı, cevabın azalmasının yanı sıra cevapsızlığın da olduğu gösterilmiştir. Farklı etnik topluluklarda ve ülkelerde yapılmış olan çalışmalarda her 3-6 kişiden birinde trombositlerin Epi'e cevapsız olduğu bildirilmiştir¹⁷⁻²⁰. Epi'e cevapsızlık gösterenlerin ADP'ye karşı da agregasyon yanıtlarının azaldığı gösterilmiştir^{18,21}.

Optik agregometreler, uyarıcı ajanlara karşı agregasyonu ölçerek trombosit fonksiyonlarının değerlendirildiği en eski yöntemlerden biridir^{10,22}. Son zamanlarda geliştirilen PFA-100 sistemi ile trombosit adhezyonu ve agregasyonu (primer hemostaz) daha kolay değerlendirilebilmektedir. Trombosit fonksiyonlarını araştırmak amacıyla kullanılacak rutin testlerden biri olduğu düşünülmektedir²²⁻²⁴.

Bu çalışmadaki amacımız, trombositlerin epinefrin yanıtlarının optik agregometre ve PFA-100 sistemi ile incelenmesidir. Ayrıca Epi'e cevapsızlığın oranını saptamak, trombosit fonksiyonlarını değerlendirmek için daha yeni ve kolay bir yöntem olan PFA-100 sistemi ile Epi'e cevapsızlığın saptanabilirliğini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem

Denekler

Deneylerimiz 20-76 yaş arası, sağlıklı ve gönüllü 68 kişi üzerinde yapıldı. Deneklerin çoğu Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi laboratuvar personeli, araştırma görevlisi ve öğrencisi olup, çalışmamız "U.Ü. Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu" protokollerine uygun olarak yürütüldü. Deneklerin kişisel ve aile hikâyelerinde herhangi bir kanamalı durum veya hastalık olmamasına, sigara içmemelerine ve son 10 gün içinde trombositleri etkilediği bilinen herhangi bir ilaç almamış olmalarına dikkat edildi.

Kan Örneklerinin Toplanması

Deneklerden üst kola hafif venöz staz uygulanarak antecubital venden, 0,129 M sodyum sitratlı ve EDTA'lı tüplere sırasıyla 10 ve 2,5 ml kan alındı. Sodyum sitratlı kan PFA-100 ve optik agregometre deneylerinde, EDTA'lı kan hemogram tayininde kullanıldı.

PFA-100

Primer hemostazın değerlendirildiği PFA-100 (Platelet Function Analyzer, DADE-BEHRING) sisteminin tek kullanımlık iki farklı kartuşu vardır: 1- Kollajen/Epinefrin kartuşu (Kol/Epi), 2- Kollajen/ADP kartuşu (Kol/ADP). Kılcal bir borudan yüksek kayma hızında (high shear rate: 5000-6000 sn^{-1}) emilen antikoagüle tam kan, kollajenle kaplı bir membran üzerindeki 150 μ çaplı delikten geçer. 2 μg fibriler Tip I kollajen içeren bu membran aynı zamanda Kol/Epi kartuşunda 10 μg epinefrin, Kol/ADP kartuşunda ise 50 μg ADP içerir. Trombositler delikten geçerken kollajene yapışır ve diğer uyarıcı ajanla uyarılmasıyla da aktive olur. Agregasyonun meydana gelmesi ve trombosit tıkaçının oluşmasıyla delik kapanır ve kan akımı kesilir. Kanın emilmeye başladığı andan akımın kesildiği ana kadar olan zamanı ölçen sistem, sonuçları Kapanma Zamanı (KZ) olarak verir. Üretici firmanın verdiği ve sağlıklı insanlarda yapılan birçok çalışmada KZ'nın normal sınırları Kol/Epi kartuşu için 85-165 sn, Kol/ADP kartuşu için 71-118 sn sınırları arasında bulunmuştur^{25,26}.

Optik Agregometre

Optik agregometreler modifiye edilmiş spektrofotometrik aletlerdir. Trombositten zengin plazmanın belirli bir hızda karıştırılırken uyarıcı ajanın eklenip trombositlerin agregatlar oluşturması ile ışık geçirgenliğindeki değişikliğin ölçülmesi prensibi ile çalışırlar.

PFA-100 testleri tamamlandıktan sonra kan örnekleri 150 G'de 10 dk santrifuj edilerek trombosit zengin plazma (PRP: Platelet Rich Plazma), 2000 G'de 15 dk daha santrifuj edilerek trombosit fakir plazma (PPP: Platelet Poor Plazma) elde edildi. PRP'nin

Trombositlerin Epinefrine Yanıtları

trombosit içeriği ADVIA 70 (Hematology System, BAYER) hemogram cihazında değerlendirildi. PRP'nin trombosit sayısının 250.000–350.000/μl olmasına dikkat edildi. 350.000/μl'nin üzerindeki değerler otolog PPP ile seyreltildi. PRP, PPP ve uyarıcı ajanlar agregometrenin kuvvetlerinde 37°C'de inkübe edildi.

Agregasyon testleri PACKS–4 (Platelet Aggregation Chromogenic Kinetic System, HELENA LABORATORIES) agregometre cihazında yapıldı. Uyarıcı ajan olarak ADP, Kol (Helena BioSciences) ve Epi (BİOFARMA İlaç Sanayii Ltd. Şti) kullanıldı. Test son konsantrasyonları ADP 10 μM, Kol 10 μg/ml, Epi 300 μM olarak ayarlandı.

Önce 500 μl PPP ile kalibrasyon yapıldı. Sonra içinde karıştırıcı mıknatıs parçacığı bulunan (karıştırma hızı 1000 devir/dk) 450 μl PRP'nin üzerine 50 μl uyarıcı ajan eklenerek başlatılan agregasyon süreci 10 dk takip edildi. Deney sonuçları % maksimum agregasyon, maksimum agregasyona ulaşma süresi (sn) ve lag zamanı (sn) olarak ifade edildi.

Tüm deneyler kan örneklerinin toplanmasından sonra 3 saat içinde tamamlandı^{10,22,27}.

İstatistik Analiz

Tüm sonuçlar ortalama ± standart sapma ve minimum-maksimum değerler olarak gösterildi. Değerlendirme tek yönlü varyans analizi ve Kruskal Wallis testi ile yapıldı. Gruplararası karşılaştırmalar için Bonferroni testi ve Mann Whitney U-test kullanıldı. Cinsiyet farkı ki-kare ve Fisher'in kesin ki-kare testleriyle değerlendirildi. Sonuçlar sayı ve yüzde olarak verildi. Sonuçlarda p değerinin 0,05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular ve Sonuçlar

Çalışmaya katılan 68 gönüllünün yaş ortalaması 38,8 ± 14,9 yıl ve 41'i (%60,3) bayandı. Tüm deneklerin hemogram parametreleri normal sınırlar içinde bulundu.

Denekler optik agregometrede Epi'e karşı gösterdikleri % maksimum agregasyon cevaplarına göre 3 gruba ayrıldı.

- 1- Maksimum agregasyon cevabı %20'nin altında olanlar (Cevapsız, C).
- 2- Maksimum agregasyon cevabı %20–60 arası olanlar (Yarıcevaplı, Yc).
- 3- Maksimum agregasyon cevabı %60'ın üstünde olanlar (Normal, N).

Epi'e cevabı araştırılan 68 deneğin 10'unda (%14,7) Epi cevapsızlığı, 11'inde (%16,2) Epi yarıcevabı, 47'sinde (%69,1) Epi'e maksimum agregasyon cevabı bulundu. Gruplar arası yaş ve cinsiyet farkı bulunmadı (Tablo I).

Tablo I. Trombositlerin epinefrine farklı cevaplarının optik agregometre ile değerlendirilmesi ve gruplar arasında yaş ve cinsiyet ilişkisi.

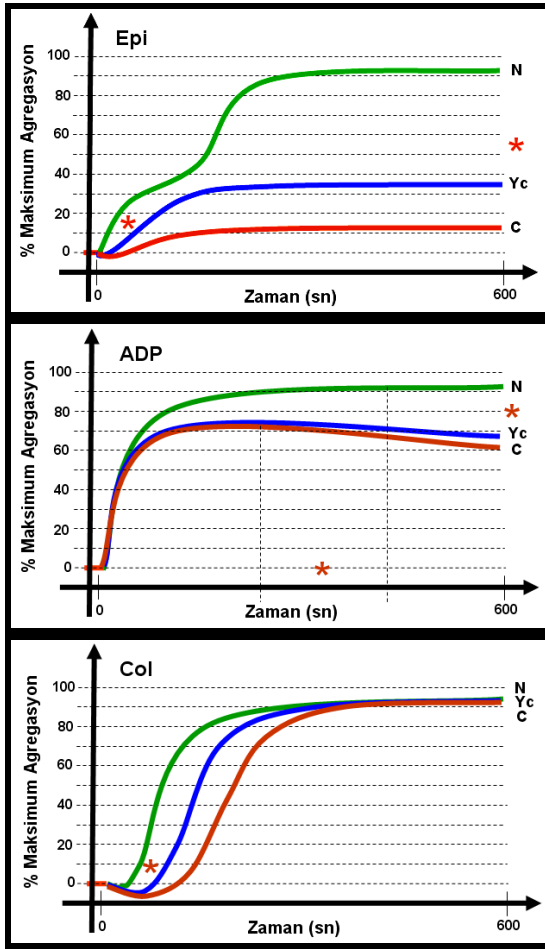
	Epinefrine Cevap			Toplam	p değeri
	Cevapsız <20	Yarıcevaplı 20–60	Normal 60<		
Sıklık (%)	10 (%14,7)	11 (%16,2)	47 (%69,1)	68	
♀ (%)	5 (%50)	5 (%45,5)	31 (%66)	41 (%60,3)	p>0,05
Yaş (yıl)	33,5±10,3	38,7 ± 14,5	39,9±15,8	38,8±14,9	p>0,05

Epi'e cevapsız, yarıcevaplı ve normal cevaplı grupların uyarıcı ajanlara karşı optik agregometrede elde edilen % maksimum agregasyon cevapları, maksimum agregasyona ulaşma süreleri ve lag zamanları Tablo II'de gösterilmiştir. Elde edilen istatistiksel olarak anlamlı verilere göre Epi'e karşı bozulan cevap Epi'e cevabın lag zamanının uzaması, ADP'ye cevapda maksimum agregasyonunun azalması ve maksimum agregasyona ulaşma süresinin kısalmasıyla ve Kol'e cevabın lag zamanının uzamasıyla birlikte idi (Şekil 1).

Tablo II. Optik agregometre ile değerlendirilen trombositlerin Epi'e farklı cevaplarının Epi, ADP ve Kol ile maksimum agregasyon, maksimum agregasyona ulaşma süreleri ve lag zamanlarına etkisi.

		Epinefrine Cevap			p değeri (C-N)	
		Cevapsız (C) <20	Yarı cevaplı 20–60	Normal (N) 60<		
OPTİK AGREGOMETRE	% Maksimum Agregasyon	Epi	12,6 ± 4,0 (5,9–19,1)	34,2 ± 9,7 (23,2–56,8)	92,3 ± 3,4 (84,1–99,9)	p=0,000
		ADP	73,0 ± 19,8 (36,4–92,3)	76,4 ± 8,3 (64,3–91,4)	91,3 ± 4,6 (74,1–96,4)	p=0,000
		Kol	93,6 ± 3,0 (90,1–97,3)	93,6 ± 3,1 (90,9–99,5)	94,3 ± 3,3 (85,1–98,2)	p>0,05
	Maksimum Agregasyona Ulaşma Zamanı (sn)	Epi	542,6 ± 48,8 (450–576)	572,6 ± 7,1 (553–579)	533,4±40,7 (410–579)	p>0,05
		ADP	273,0±182,6 (49–533)	292,3 ± 117,3 (132–498)	438,7±77,4 (271–578)	p=0,008
		Kol	434,5±100,2 (296–563)	442,6±108,1 (275–559)	472,9±59,7 (371–565)	p>0,05
	Lag Zamanı (sn)	Epi	9,2 ± 10,1 (3–36)	5,8 ± 5,1 (3–20)	3,2 ± 0,5 (3–5)	p=0,000
		Kol	40,8 ± 29,5 (3–65)	31,6 ± 21,4 (3–60)	7,9 ± 12,0 (3–49)	p=0,019

Epi: epinefrin
Kol: kollajen



Epi: epinefrin, Kol: kollajen
N; epinefrine cevabı normal, C: cevapsız, Yc: yarıcevaplı
*: İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar.

Şekil 1:

Trombositlerin Epi, ADP ve Kol'e yanıtlarının optik agregometre ile gösterilmesi.

Tablo III. Optik agregometre ile değerlendirilen Epi'e farklı cevapların PFA-100 sisteminde Kol/Epi ve Kol/ADP kartuşları Kapanma Zamanlarına (KZ) etkisi.

PFA-100	Epinefrine Cevap			p değeri	
	Cevapsız (C) <20	Yarıcevaplı (Yc) 20-60	Normal (N) 60<	(C-N)	(Yc-N)
Kol/Epi KZ (sn)	137,5 ± 26,2 (108-182)	149,4±23,6 (120-185)	120,7±17,1 (75-162)	p=0,05	p=0,000
Kol/ADP KZ (sn)	84,2 ± 13,4 (68-112)	100,7±15,6 (85-128)	90,9 ± 11,7 (67-116)	p>0,05	p>0,05

Epi: epinefrin
Kol: kollajen

Optik agregometrede elde edilen Epi'e karşı farklı cevapların PFA-100 sisteminde Kol/Epi ve Kol/ADP kartuşu KZ değerlerine etkisi Tablo III'te gösterilmiştir. Kol/Epi kartuşunda normal grup Epi'e cevapsız gruba göre tam sınırdadır, yarıcevaplı gruba göre ise anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Hem Epi'e cevapsız hem de yarıcevaplı grupta normal Kol/Epi kartuşu KZ değerinin (165 sn) üzerinde sonuçlar gözlenmiştir.

Tartışma

Özgeçmiş veya aile hikâyesinde herhangi bir kanama yatkınlığı bulunmayan, sağlıklı kişilerin trombositlerinden Epi'e karşı alınan yanıtların oldukça geniş bir aralıkta yayılması (%5,9-99,9), öncelikle Epi'in hemostazdaki yeri hakkında soru işaretleri uyandırmaktadır. Epi'e cevapsızlarda kanamanın gözlenmemesi, trombositlerdeki bu defektin kanamanın durdurulmasında temel yollardan biri olmadığını düşündürmektedir.

Epi cevapsızlığı ile ilgili yapılmış büyük ölçekli çalışmalardan Jong Weon Choi'nin çalışmasında¹⁸ 457 deneğin 97'sinde (%21,2) Epi cevapsızlığı, 44'ünde (%9,6) Epi yarıcevabı bulunmuştur. Bizim çalışmamız ile sınıflandırması ve yöntemi benzer olan bu çalışmada Epi'e normal cevap verenlerin oranı aynıdır (%69,1). Kendisi de Epi'e cevapsız olan Jun-ichi Kambayashi ve arkadaşlarının yapmış oldukları Epi cevapsızlığının sıklığına ve sebebine ilişkin çalışmalarda^{17,21} 100 µM Epi'e 6 dk izlenen agregasyon sürecinde minimum agregasyon yanıtı verip sekonder agregasyon yanıtı vermeyenlerin oranını %16 (23/140) ve %16,7 (4/24) olarak bulmuşlardır. Theodoropoulos ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada¹⁹ 100 µM Epi'e 5 dk içinde %40'ın altında agregasyon yanıtı verenler % 40 (12/30) olarak bulunmuştur. Yine Uzakdoğu'dan Pyo ve arkadaşları²⁰ 10 µM Epi'e 10 dk içinde minimum agregasyon yanıtı verip sekonder agregasyon yanıtı vermeyenlerin oranını %20 (7/35) olarak bulmuşlardır. Bizim sonuçlarımızda (%14,7 cevapsız, %16,2 yarıcevaplı) bu sonuçlarla benzer olup %14,7 ile %40 arasında Epi cevapsızlığı gözlenmektedir.

Choi çalışmasında¹⁸ Epi cevapsızlardaki Epi konsantrasyonunu 2400 µM'a kadar çıkarmış fakat herhangi bir farklılık gözlememiştir. Biz de çalışmamızda 1200 µM Epi konsantrasyonlarında cevapsızlığın değişmediğini gözledik. Bizim çalışmamızda da diğer çalışmalarda^{17,18,20} olduğu gibi Epi cevapsızlığı ile yaş ve cinsiyet arasında bir ilişki bulunmamıştır.

Epi'e cevapsızlık gösterenlerde ADP'ye karşı maksimum agregasyonun azalması diğer çalışmaların da ortak yanıtıdır^{18,21}. Trombositlerin membranında üç farklı tip ADP reseptörü bulunmaktadır. P2_{X1} reseptörleri iyonotropik reseptörler olup Ca⁺⁺ kanalları ile bağlantılıdır. P2_Y reseptörleri metabotropik reseptörlerdir.

Trombositlerin Epinefrine Yanıtları

törler olup G protein bağlantılı reseptörlerdir. Bunlardan P2_{Y1} reseptörleri Gq_α üzerinden PLC'yi aktive etmekte, P2_{Y12} reseptörleri ise Gi_{2α} üzerinden AC'ı inhibe etmektedir²⁸⁻³⁰. Epi'e cevapsız olanlarda P2_{X1} ve P2_{Y1} reseptörleri bloke edilince ADP'ye karşı cevap alınmadığını Kambayashi ve arkadaşları göstermişlerdir. Ayrıca Epi cevapsız ve cevaplılar arasında trombosit içi azalan cAMP seviyeleri arasında da fark bulunmamıştır. Sonuçta Epi cevapsızlığının reseptörle veya AC-cAMP ile ilişkili olmadığı ileri sürülmüştür²¹. Bunun nedeninin ya cAMP sonrasındaki yolak üzerinden, ya reseptörlerin βγ alt birimlerindeki bir bozukluktan, ya da Gzα/Gi2α'nın AC dışındaki farklı bir aktivasyon yolağındaki bozukluktan kaynaklanabileceği üzerinde durulmaktadır.

Epi cevapsızlarda gözlediğimiz Kol'e cevabın lag zamanının uzaması Choi'nin çalışmasında¹⁸ da gösterilmiştir. Kol'in PRP'ye eklenmesi ile birlikte trombositlerin disk şeklinden, psödopodik uzantılarını oluşturarak daha yayvan bir şekil alması ile ışık geçirgenliğinin daha da azalması agregasyon eğrisindeki gecikmeyi (lag zamanı) oluşturmaktadır^{1,10}. Trombositler şekil değişikliğinden sonra granül içeriklerinin salgılanması ile tam bir agregasyon meydana getirirler. Epi cevapsızlarda lag zamanının uzamış olması Kol'in oluşturduğu şekil değişikliği ile Epi'nin hücre içi mekanizmalarının kesiştiğini düşündürmektedir.

Aspirinin trombositler üzerindeki etkisinin Epi cevapsızlığı ile benzerlik gösterdiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Aspirinin Epi, ADP ve Kol'in maksimum agregasyonunu azalttığını, ADP ve Kol'in maksimum agregasyona ulaşma süresini kısalttığını daha önceki çalışmamızda³¹ göstermiştik. Kambayashi ve ark partikül sayma tekniği ile Epi cevapsızların ve aspirin ile inkübe edilmiş trombositlerin yalnızca ufak agregatlar oluşturduğunu ve agregasyon eğrilerinin benzer olduğunu ileri sürmüşlerdir³². Epi cevapsızlarda Kol'in lag zamanının uzaması ve aspirin kullanımında Kol'in maksimum agregasyonunun düşmesi ve maksimum agregasyona ulaşma süresinin kısalması dışında diğer veriler birbirine benzemektedir. Aspirin trombositlerdeki siklooksijenaz-1'i (COX-1) geri dönüşümsüz olarak inhibe ederek TxA₂ sentezini durdurmaktadır³³. Epi'nin sekonder agregasyonunun oluşmasında TxA₂ sentezinin, granül sekresyonunun ve sekonder PLC aktivasyonunun (belki TxA₂ üzerinden) rolü olduğu bilinmektedir^{1,11}. Bu durumda Epi cevapsızlığında hücre içi olası bozukluğun TxA₂ sentezi ile ilişkili olabileceği de düşünülebilir.

Epi'e cevapsızlarda ve yarıcevaplılarda gözlediğimiz Kol/Epi kartuşu KZ değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olması bu çalışma ile ilk kez gösterilmiştir. Epi cevapsızlar Kol/Epi kartuşu ile, üretici firmanın²⁵ ve birçok çalışmanın³⁴⁻³⁷ üst sınır olarak kabul ettiği 165 sn'nin üzerinde KZ değerleri

vermektedir. Bazı çalışmalarda^{26,38,39} 197 sn'ye kadar Kol/Epi kartuşu KZ değerlerinin normal olduğu bildirilmesine rağmen bu çalışmalarda agregometrede Epi'e karşı agregasyonların değerlendirildiğine dair bilgi bulunmamaktadır. Yine Epi cevapsızlığına benzer biçimde aspirin kullanımı da yalnızca Kol/Epi kartuşu KZ değerini uzatmakta, Kol/ADP kartuşu KZ değerine etki göstermemektedir^{26,31,39}. Fakat aspirin kullanımında Kol/Epi kartuşu KZ değerleri Epi cevapsızlığına göre daha uzundur ve aspirin direnci gelişen hastalarda aspirinin etkisiz kaldığını gösterir biçimde kısalmıştır^{31,40,41}.

Sonuç olarak, bu konuda yapılmış çalışmalarda gösterildiği gibi trombositlerin optik agregometrede bir uyarıcı ajan olan epinefrine karşı cevapsızlık ve ADP'ye karşı da azalmış yanıtlarına benzer şekilde bizim çalışmamızda da Epi cevapsızlığı saptanmıştır. Aynı zamanda epinefrine cevapsızlığın, trombosit fonksiyonlarını değerlendirmek için daha yeni ve kolay bir yöntem olan PFA-100 sistemi ile saptanabilir olduğu gösterilmiştir.

Epi cevapsızlarda kanama yatkınlığının gözlenmesi Epi'in hemostazdaki yeri hakkında soru işaretleri uyandırdığı gibi tromboza karşı doğal bir koruma olabileceğini de düşündürmektedir. Patofizyolojik şartlarda lokal olarak artan Epi'in tromboz riskini arttırdığı bilindiğine göre Epi cevapsızlarda tromboz riski artmamış olabilir. Diğer yandan koroner arter hastalıklarının primer ve sekonder korumasında kullanılan aspirinin trombositler üzerindeki etkilerinin Epi cevapsızlığı ile benzer olması "Epi cevapsız hastalarda aspirin kullanımına gerek var mı?" sorusunu düşündürmektedir. Dahası Epi cevapsız bir kişide aspirin kullanımı acaba kanama riskinde artışa yol açar mı? Aspirin kullanımına bağlı hemorajik inmelerde Epi cevapsızlığının/trombosit fonksiyon bozukluklarının rolü var mıdır? Tüm bu sorular günlük yaşamda herhangi bir probleme sebep olmayan bu bozukluğun arkasında olabilecek sorulardır. Ayrıca α_{2A} adrenerjik reseptörler ve Gz proteinleri trombositlerin yanı sıra beyin bazı bölgelerinde de bulunmaktadır^{12,42}. Trombositlerdeki bu defektin nöronlarda da araştırılması ile nörolojik hastalıklara veya davranış bozukluklarına yeni bir bakış açısı sağlanabileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, (eds). Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 4th Edition. Philadelphia: J.B.Lippincott Company; 2001.
2. Brass LF. Thrombin and platelet activation. Chest 2003; 124: 18-25.
3. Quinton TM, Kim S, Dangelmaier C, Dorsam RT, et al. Protein kinase C- and calcium-regulated pathways independently synergize with Gi pathways in agonist-induced fibrinogen receptor activation. Biochem J 2002; 368: 535-43.

4. Yang J, Wu J, Jiang H, et al. Signaling through Gi family members in platelets. *J Biol Chem* 2002; 277: 46035–42.
5. Maayani S, Schwarz T, Martinez R, Tagliente TM. Activation of Gi-coupled receptors releases a tonic state of inhibited platelet aggregation. *Platelets* 2001; 12: 94–8.
6. Jin J, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8070-74.
7. Paul BZS, Jin J, Kunapuli SP. Molecular mechanism of Thromboxane A₂-induced platelet aggregation. *J Biol Chem* 1999; 274: 29108-14.
8. Woulfe D, Yang J, Brass L. ADP and platelets: the end of the beginning. *J Clin Invest* 2001; 107: 1591-8.
9. Nieswandt B, Schulte V, Zywiets A, Gratacap MP, Offermanns S. Costimulation of G_i- and G_{12/13}-mediated signaling pathways induces integrin αIIbβ3 activation in platelets. *J Biol Chem* 2002; 277: 39493-8.
10. Breddin HK. Can platelet aggregometry be standardized? *Platelets* 2005; 16: 151-8.
11. Keularts IMLW, van Gorp RMA, Feijge MAH, Vuist WMJ, Heemskerk JWM. α_{2A}-adrenergic receptor stimulation potentiates calcium release in platelets by modulating cAMP levels. *J Biol Chem* 2000; 275: 1763–72.
12. Yang J, Wu J, Kowalska MA, et al. Loss of signalling through the G protein, G_z, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9984-89.
13. Swart SS, Pearson D, Wood JK, Barnett DB. Functional significance of the platelet alpha2-adrenoceptor: studies in patients with myeloproliferative disorders. *Thromb Res* 1984; 33: 531-41.
14. Avram S, Lupu A, Angelescu S, Olteanu N, Mut-Popescu D. Abnormalities of platelet aggregation in chronic myeloproliferative disorders. *J Cell Mol Med* 2001; 5: 79-87.
15. Kaywin P, McDonough M, Insel PA, Shattil SJ. Platelet function in essential thrombocythemia. Decreased epinephrine responsiveness associated with a deficiency of platelet alpha-adrenergic receptors. *N Engl J Med* 1978; 299: 505-9.
16. Yamamoto K, Sekiguchi E, Takatani O. Abnormalities of epinephrine-induced platelet aggregation and adenine nucleotides in myeloproliferative disorders. *Thromb Haemost* 1984; 52: 292-6.
17. Kambayashi J, Shinoki N, Nakamura T, et al. Prevalence of impaired responsiveness to epinephrine in platelets among Japanese. *Thromb Res* 1996; 81: 85–90.
18. Choi JW. Incidence of nonresponsiveness to epinephrine in platelets from healthy humans. *Acta Haematol* 2002; 108: 106-8.
19. Theodoropoulos I, Christopoulos C, Metcalfe P, Dimitriadou E, Economopoulos P, Loucopoulos D. The effect of human platelet alloantigen polymorphisms on the in vitro responsiveness to adrenaline and collagen. *Br J Haematol* 2001; 114: 387–93.
20. Pyo MK, Yun-Choi HS, Hong YJ. Apparent heterogeneous responsiveness of human platelet rich plasma to catecholamines. *Platelets* 2003; 14: 171–8.
21. Nakahashi TK, Kambayashi J, Nakamura T, et al. Platelets in nonresponders to epinephrine stimulation showed reduced response to ADP. *Thromb Res* 2001; 104: 127-35.
22. Storey RF, Heptinstall S. Laboratory investigation of platelet function. *Clin Lab Haem* 1999; 21: 317–29.
23. Harrison P, Robinson M, Liesner R, et al. The PFA–100®: a potential rapid screening tool for the assessment of platelet dysfunction. *Clin Lab Haem* 2002; 24: 225–32.
24. Franchini M. The platelet-function analyzer (PFA–100®) for evaluating primary hemostasis. *Hematology* 2005; 10: 177–81.
25. DADE BEHRING. To aid in the detection of platelet dysfunction in citrated human whole blood. 2000.
26. Emmanuel JF. Utility of the PFA-100 for assessing bleeding disorders and monitoring therapy: a review of analytical variables, benefits and limitations. *Haemophilia* 2001; 7: 170–9.
27. Helena Laboratories, PACKS-4, Operator's Manual. 1991.
28. Kunapuli SP, Dorsam RT, Kim S, Quinton TM. Platelet purinergic receptors. *Curr Opin Pharm* 2003; 3: 175–80.
29. Cattaneo M, Gachet C. The platelet ADP receptors. *Haematologica* 2001; 86: 346–8.
30. Dorsam RT, Kunapuli SP. Central role of the P2Y₁₂ receptor in platelet activation. *J Clin Invest* 2004; 113: 340–5.
31. Sağdılek E. Kardiyovasküler hastalarda antitrombotik tedaviye yanıtın optik agregometre ve PFA–100 ile incelenmesi (Uzmanlık Tezi). Bursa: Uludağ Üniversitesi; 2004.
32. Nakamura T, Ariyoshi H, Kambayashi J, et al. Signal transduction system in epinephrine stimulated platelets; comparison between epinephrine sensitive and insensitive platelets. *Thromb Res* 1997; 85: 83–93.
33. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 9. baskı. Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık; 2000; 3,45, 581–612.
34. Mammen E, Comp PC, Gosselin R, et al. PFA-100™ System: A new method for assessment of platelet dysfunction. *Thromb Haemost* 1998; 24: 195–202.
35. Posan E, McBane RD, Grill DE, Motsko CL, Nichols WL. Comparison of PFA–100 testing and bleeding time for detecting platelet hypofunction and von Willebrand disease in clinical practice. *Thromb Haemost* 2003; 90: 483–90.
36. Buyukasik Y, Karakus S, Goker H, et al. Rational use of the PFA–100 device for screening of platelet function disorders and von Willebrand disease. *Blood Coagul Fibrin* 2002; 13: 1–5.
37. Harrison P, Robinson MSC, Mackie IJ, et al. Performance of the platelet function analyser PFA–100 in testing abnormalities of primary haemostasis. *Blood Coagul Fibrin* 1999; 10: 25–31.
38. Sourav KK, Eric JH, Reynaldo S, Carmen G, Rosa MD, Roy AO. Description of an in vitro Platelet Function Analyzer - PFA–100. *Thromb Haemost* 1995; 21: 106–12.
39. Walter AW, Katharina MG, Sacha SZ, Bernhard L. Evaluation of a platelet function analyser (PFA–100) in patients with a bleeding tendency. *SwissMed Wkly* 2002; 132: 443–8.
40. Andersen K, Hurlen M, Arnesen H, Seljeflot I. Aspirin non-responsiveness as measured by PFA–100 in patients with coronary artery disease. *Thromb Res* 2003; 108: 37–42.
41. Watala C, Golanski J, Pluta J, et al. Reduced sensitivity of platelets from type 2 diabetic patients to acetylsalicylic acid (aspirin)--- its relation to metabolic control. *Thromb Res* 2004; 113: 101–13.
42. Meng J, Casey PJ. Activation of G_z attenuates Rap1-mediated differentiation of PC12 cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 43417–24.