

Derleme-Review

<http://dx.doi.org/10.7197/1305-0028.597>

Trombosit fonksiyon testlerini etkileyen faktörler

The factors effecting thrombocyte function tests

Şermin Tetik*, Koray Ak, Kevser Turay Yardımcı

Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı (Doç. Dr. Ş. Tetik, Prof. Dr. K. T. Yardımcı), Uluslararası Kıbrıs Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Lefkoşa Kuzey Kıbrıs, Mersin 10, Türkiye
Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı (Uzm. Dr. K. Ak), Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, TR-34662 İstanbul

Özet

Fizyolojik koşullarda sirkülasyondaki trombositlerin görevi bir damar hasarı oluştuğunda kan kaybını engellemektir. Subendotele trombosit-trombosit adezyonunu sağlayan ve hasara uğramış damar duvarında geçici olarak “trombosit tıkaçı” oluşturan bu sistem ateroskleroz veya arterial tromboz gibi patolojik şartlarda ise lokal iskemiye veya aterosklerotik lezyona sebep olmaktadır. Klinik çalışmalarda temel alınan trombosit fonksiyon testleri trombositlerin agonistlere olan duyarlılığı ve oluşan trombosit cevabındaki spesifiklik açısından öneme sahiptir. Bu çalışmada trombosit fonksiyon testlerini etkileyen parametreler, yapılmış çalışmalarla karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Anahtar sözcükler: Trombosit, trombosit fonksiyonu, agonist

Abstract

Under physiological conditions the function of thrombocytes in circulation is to inhibit the blood loss upon endothelial damage. This system which establishes thrombocyte adhesion to sub-endothelium and forms temporary thrombocyte plug at the damaged endothelial wall causes ischemia or atherosclerotic lesions under pathological conditions such as atherosclerosis and arterial thrombosis. The thrombocyte function tests which are taken as basis for clinical studies, are important in determining the sensitivity of thrombocytes to agonists and specificity of thrombocyte answer. In this study, the parameters affecting thrombocyte function tests are examined comparatively with literature results.

Keywords: Thrombocyte, thrombocyte function, agonist

Geliş tarihi/Received: 04 Ekim 2010; **Kabul tarihi/Accepted:** 17 Mart 2011

***İletişim adresi:**

Dr. Şermin Tetik, Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Uluslararası Kıbrıs Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Lefkoşa Kuzey Kıbrıs, Mersin 10, Türkiye. E-posta: stetik@ciu.edu.tr, stetik@marmara.edu.tr

Giriş

1. Normal trombosit fonksiyonu

1.1. Trombosit fizyolojisi

Trombositler kemik iliğindeki megakaryositlerden sentezlenen, çekirdeksiz, yaklaşık 8-10 günlük yaşam süresine sahip ve sirkülasyonda aktif olmayan diskoid şekilli hücrelerdir [1, 2]. Megakaryositlerden gerçekleşen trombosit sentezinin nitrik oksit (NO) ile uyarıldığı son dönemde bildirilmiştir [3]. Trombositlerin plazma membranı açık kanaliküler ve yoğun tübülere sisteme sahip internal membranlar, mikrotübül ve mikrofilament içeren sitoskeleton, mitokondri, glikojen granülleri, alfa ve yoğun granüller içeren depo granülleri, lizozom ve peroksizoma sahiptirler [4].

Trombosit membranında yüzeyle bağlantılı kanaliküler sistem trombosit yüzey alanına katkı yapmaktadır. Yine trombosit membranında bulunan fosfolipidler, glikoprotein

IIb/IIIa (GpIIb/IIIa) gibi trombositlerin aktivasyon ve inhibisyonuna katkıda bulunan ajanlarla bağlantılı glikoproteinler taşır. Yoğun tübüler sistem ise prostaglandin sentezine katılan enzimlerin lokalizasyonunu ve kalsiyumun büyük kısmını barındırır. Granüller ise trombosit faktör-4, beta-tromboglobulin, trombosit türevli büyüme faktörü, fibrinojen, fibronektin, trombospondin, plazminojen aktivatör inhibitör-1 ve von Willebrand faktörü içerir. Yoğun granüller serotonin, adenosin difosfat (ADP) ve kalsiyumdan zengindir [5].

Trombositlerin diskoid şekilleri trombosit aktivasyonuna bağlı olarak sferik hale gelir ve psödopot halini alırlar. Organeller trombosit merkezine hareket ederken mikrotübül ve mikrofilamentlerin toplandığı bir yapı oluşur ve organeller içerdikleri yapıları sekrete etmeye başlarlar. Sekresyon sırasında granül membranları yüzey ilişkili kanaliküler sistemle P-selektin gibi internal granül membran proteinlerinin plazma membranına difüze olmasıyla birleşirler. Granüllerin serbestleşmesi için yüksek oranda agonist konsantrasyonuna ihtiyaç olmasına karşın yoğun granül içerikleri kolayca sekrete edilmektedir. Trombositler aktivasyon ve agregasyon sırasında sekretuar granüllerde barındırdıkları içeriklere ek olarak tromboksan-A2 ve trombosit aktivatör faktör gibi farmakolojik olarak aktif moleküller de üretmektedir [6].

1.2. Trombosit aktivasyonunun mekanizması

Trombositler birçok fizyolojik (trombin, kollajen, adenosin difosfat, epinefrin, vazopresin, serotonin) ve fizyolojik olmayan (divalent katyonlar, siklik endoperoksid analogları) gibi moleküllerle aktive olabilirler. Aktivasyon bu moleküllerle üretilirken trombositlerde bir seri cevap meydana getirir: (a) şekil değişikliği, (b) agregasyon, (c) üç sekresyon prosesi, (d) arasıdonik asidin serbestleşmesi. Endotel hasarından veya plak oluşumundan sonra, trombositler von Willebrand Faktöre ve kollajene adere olurlar ve doku faktörleri tarafından sentezlenen trombine maruz kalırlar. Böylece trombosit sinyal yolları aktive olur, sitoskeletona G-proteinleri aracılığı ile ulaştırılan bilgilerle trombosit sekresyonu başlar. Fibrinojen ve diğer ligandların aktive GpIIb/IIIa reseptörüne bağlanmasıyla agregasyon başlar. Lökositlerden doku faktörünün salıverilmesinde ve inflamasyonda önemli olan mikropartiküller trombositlerden serbest bırakılırlar. Nihai olarak, koagülasyon faktörleri aktive trombositlerin yüzeyinde toplanır ve endojen antikoagülan yollar tarafından trombositler inhibe edilirler [6, 7].

2. Trombosit fonksiyonlarını etkileyen faktörler

Trombosit membranda bulunan çok sayıda reseptör bu agonistleri spesifik olarak bağlar ve fizyolojik trombosit cevabı oluşur. Bir agonist-reseptör ilişkisi ile oluşan trombosit aktivasyonu sonunda kalsiyum, diasilgliserol (DAG) ve inozitol 1, 4, 5-trifosfat olarak bilinen sinyal molekülleri hızla mobilize olurlar ve şekil değişikliği ve agregasyon için yeterli cevap oluşturulur. Bu moleküllerin düşük konsantrasyonları yoğun granül sekresyonuna ve arasıdonik asit salınımına neden olur. ADP ve prostaglandin endoperoksitleri tromboksan oluşumuna yol açarken daha fazla sinyal molekülünün serbestleşmesine yol açar. Trombosit türevli bu agonistler sinerji yaratırlar ve bu uyarı granül sekresyonunun tamamlanmasına yardımcı olur. Agregasyon ise hücre ilişkisine neden olarak “pozitif feedback” mekanizması oluşturur. Trombin ve kollajen gibi bazı agonistlerin yüksek konsantrasyonu pozitif feedback olmadan sinyal moleküllerinin mobilizasyonuna yeterli olacaktır. Bu agonistler “güçlü agonistler” dir. Diğer fizyolojik agonistler ise yalnızca trombosit sinyal moleküllerinin zayıf bir miktarının mobilizasyonuna sebep olur ve bunlara “zayıf agonistler” denir. Güçlü agonistler düşük konsantrasyonda “zayıf agonist” olarak davranmaktadırlar [7-9]. Değişken parametrelili trombosit fonksiyonlarının klinik takibi farklı laboratuvarlarda farklı sonuçlar oluşturabilmektedir. Sonuçların optimize edilebildiği, tekrarlanabilirlik ve uygulanabilirlik koşullarının maksimize edildiği yöntemler önem taşımaktadır. Klinik laboratuvarlarda uygulanan trombosit fonksiyon testleri çeşitli olsa da trombositlerde gelişen tüm biyolojik olayların hepsini birden ölçebileceğimiz bir laboratuvar testine bugün için sahip değiliz. Ayrıca trombosit fonksiyon testlerini etkileyen faktörleri bilmek günümüzde kullanılan metodların sağlıklı uygulanması için gereklidir.

2.1. Kullanılan antikoagülanın özelliği

Sitrat, kan örneği toplanmasında yaygın olarak kullanılan bir antikoagülandır ve koagülasyon-protein sisteminde iyonize kalsiyumun önemini gösteren bir ajandır. Sitratin antikoagülan olarak kullanılması ile farmakodinamik olarak bireysel tayinler yapılabilirse de, trombosit agregasyon sonuçlarını etkilediği bilinmektedir [10]. Antikoagülan olarak sitratin kullanıldığı çalışmalarda trombosit yüzeyinde P-selektin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [11]. Bu farklılığı açıklarken, örnekler arasında farklı sitrat konsantrasyonları kullanılmış olması ihtimalinden söz edilebilir. Ancak antikoagülanlara bireylerin verdiği cevapların farklı olmasını açıklamak mümkün olmamaktadır.

Sitrat ve farklı antikoagülanların etkisinin karşılaştırılması GpIIb/IIIa antagonisti olan eptifibatidin ex vivo trombosit agregasyonuna etkisi sitratlı kanda ve D-fenilalanil-prolil-arginin klorometil keton (PPACK, nonşelatör antikoagülan) ortamında değerlendirilmiştir [12]. ADP uyarımına trombosit agregasyonunun inhibisyonu PPACK-antikoagülan örneklerle karşı sitratlı örneklerde yüksek bulunmuştur. Labarthe ve ark. [13]'ün yaptığı çalışmada ise 12 hasta ve 20 kontrolde sitratlı ve PPACK'li örneklerde clopidogrel cevabı ölçülmüş, sonucun PPACK ile daha iyi değerlendirildiği bildirilmiştir. Buna karşın, PCI'a (perkütan koroner girişim) giden hastalara, 300-600 mg clopidogrel yükleme dozu verilmiş, maksimum agregasyon ve final agregasyonun ilaca direnç gösterenlerle aynı oranda değiştiği gösterilmiştir [14].

2.2. Kullanılan agonistin özelliği

Agonist konsantrasyonu ve çeşidi, trombosit fonksiyonlarının ölçülmesini etkileyen en önemli faktörlerdendir. Örneğin aspirine trombosit cevabı ölçüldüğünde, aspirinin primer hedefi olan sikooksijenaz-1 (COX-1)'in inhibisyonu hedef alınır, bunun için arasıdonik asit (AA) uygun bir agonisttir [15]. Eğer kullanılan agonist, trombosit agregasyonuna yol açan yolları uyarıyorsa aspirin cevabı için AA kullanılan yöntemlerle karşılaştırma yapılmayabilir. Clopidogrel için, ADP-indüklü cevabın ölçülmesi için yapısal dönüşüm gerekmektedir. Çünkü ADP, trombosit yüzeyindeki P2Y12 ve P2Y1 reseptörleriyle ilişkidir. Bu nedenle bu reseptörler üzerine ADP'nin biyolojik etkisi test edilecektir. P2Y12 reseptörü üzerine clopidogrel etkisinin tayini, reseptörden iletilen intraselüler sinyal mekanizmasının ölçülmesi ile yapılabilir (örneğin, vazodilatör uyarımlı fosfoprotein (VASP) fosforilasyonunun kantitasyonu) [16, 17].

2.3. Trombin ve trombosit miktarının etkisi

Şelatör olmayan antikoagülanlarla yapılan çalışmalar, pıhtılaşmada trombositlerin trombin aktivasyonundan, özellikle de G-proteaz activated receptor (PAR-1) yolundan etkilendiğini göstermiştir. Tam kan, corn tripsin ile antikoagüle edilip, doku faktörü ortama eklendiğinde meydana gelen trombosit aktivasyonu genellikle trombin oluşumunu tetikler [18]. Bu reaksiyon trombinin nihai üretilme miktarının %1'inden küçük olduğunda başlar. Böylece trombositler, özellikle trombin aracılı aktivasyona duyarlı olurlar ve trombin oluşumu Faktör Va, Xa, VIIIa ve IXa için reseptör yüzeyi sağlar. Trombosit sayısı, pıhtılaşma zamanını ve trombositten zengin plazmada (PRP) ölçülen agregasyonu etkileyebilir. Sağlıklı gönüllülerde ve kemoterapi alan bireylerde yapılan çalışmada corn tripsin ve doku faktörü kullanılmış ve pıhtılaşma zamanının 50,000 mm³'den düşük trombosit sayısından etkilendiği gösterilmiştir [19]. Aynı etki <100,000 mm³ olan trombosit sayısında total trombin oluşumu etkilerinde de gözlenmiştir. Sistemdeki trombositlerin sayısı artıyorsa, trombin oluşumu ve pıhtılaşma zamanı normal değerlerine dönmektedir. Son dönemde yapılan çalışmalarda trombosit sayıları yeterli olsa da artifakt inhibisyona bağlı olarak final trombosit agregasyonunun etkilendiği bildirilmiştir [20]. Aspirin kullanımı trombin oluşumunu tam olarak etkilememektedir. Aspirin kullanan bazı bireylerde doku faktörle uyarıya bağlı olarak yüksek oranda trombin oluşumu görülmüştür [21, 22].

GpIIb/IIIa antagonistlerinin, koagülasyon mekanizmasındaki rolü corn tripsin inhibitör-doku faktörü modeliyle test edilmiştir. Reaktiflerin en düşük konsantrasyonunda,

eptifibatide ve abciximab trombin oluşumunu engellemiştir [22, 23]. Ancak yüksek konsantrasyonlarda, reaksiyon sisteminin kinetiği engel olduğundan bu etki ölçülememiştir. Benzer bulgular prostaglandin E1 kullanılan sistemlerde de ileri sürülmüştür [22, 24]. Bu nedenle ilaç-etkili antitrombotik aktiviteyi ölçecek sistemin gücü, in vitro modellerde büyük ölçüde kullanılan uyarının (agonistin) etkisine bağlıdır.

Trombosit fonksiyonlarının veya uygulanan ilaç tedavisinde görülen fonksiyon farklılığının ölçülmesinde klinikte kullanılan testlerde görülen temel problem, klinik sonuçlarla fonksiyon testlerinden elde edilen veriler arasında kurulan korelasyondaki zayıflıktır. Trombosit fonksiyon testlerinin kullanımında, trombosit fizyolojisini etkileyen faktörleri bilmek, kullanılan metodların sağlıklı uygulanması için gereklidir.

Kaynaklar

1. Chan ER, Lavender H, Li G, Haviernik P, Bunting KD, Adams MD. An ENU-induced recessive mutation in Mpl leads to thrombocytopenia with overdominance. *Exp Hematology* 2009; 37: 276-84.
2. Youssefian T, Drouin A, Massé JM, J Guichard J, Cramer EM. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and Staphylococcus aureus occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood* 2002; 99: 4021-9.
3. Battinelli E, Willoughby SR, Foxall T, Valeri CR, Loscalzo J. Induction of platelet formation from megakaryocytoid cells by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 14458-63.
4. Bendayan M, Rasio EA. Evidence of a tubular system for transendothelial transport in arterial capillaries of the rete mirabile. *J Histochem Cytochem* 1997; 45: 1365-78.
5. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004; 91: 4-15.
6. Mannaioni PF, Di Bello MG, Masini E. Platelets and inflammation: Role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflamm Res* 1997; 46: 4-18.
7. Willoughby S, Holmes A, Loscalzo J. Platelets and cardiovascular disease. *Eur J Cardiovasc Nurs* 2002; 1: 273-88.
8. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 403-12.
9. Morrell Craig N, Maggirwar SB. Recently recognized platelet agonists. *Curr Opin Hematol*. 2011; 18: 309-14.
10. Davi G, Catalano I, Aversa M, Notarbartolo A, Strano A, Ciabattini G, Patrono C. Thromboxane biosynthesis and platelet function in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1990; 322: 1769-74.
11. Schneider DJ, Tracy PB, Mann KG, Sobel BE. Differential effects of anticoagulants on the activation of platelets ex vivo. *Circulation* 1997; 96: 2877-83.
12. Tardiff BE, Jennings LK, Harrington RA, Gretler D, Potthoff RF, Vorchheimer DA, Eisenberg PR, Lincoff AM, Labinaz M, Joseph DM, McDougal MF, Kleiman NS; PERIGEE Investigators. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of eptifibatide in patients with acute coronary syndromes: prospective analysis from PURSUIT. *Circulation* 2001; 104: 399-405.
13. Labarthe B, Theroux P, Angioi M, Ghitescu M. Matching the evaluation of the clinical efficacy of clopidogrel to platelet function tests relevant to the biological properties of the drug. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 638-45.
14. Gurbel PA, Bliden KP, Etherington A, Tantry US. Assessment of clopidogrel responsiveness: measurements of maximum platelet aggregation, final platelet aggregation and their correlation with vasodilator-stimulated phosphoprotein in

- resistant patients. *Thromb Res* 2007; 121: 107-15.
15. Sanioglu S, Tetik S, Sokullu O, Deniz H, Aydemir N, Yılmaz M, Arslan IY, Bilgen F. Aspirin resistance after CABG. *Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 57: 281-5.
 16. Özşavcı D, Şener A, Oba R, Yanıkkaya-Demirel G, Uras F, Yardımcı KT. New in vitro effects of clopidogrel on platelets in hyperlipidemic and healthy subjects. *Türk J Hemotol* 2010; 27: 99-108.
 17. Tetik Ş, Ak K, İşbir S, Ekşioğlu-Demiralp E, Arsan S, Iqbal O, Yardımcı T. Clopidogrel provides significantly greater inhibition of platelet activity than aspirin when combined with atorvastatin after coronary artery bypass grafting: a prospective randomized study. *Thromb Hemos Clin Appl* 2010; 16: 189-98.
 18. de Padua Mansur A, Caramelli B, Vianna CB, Chamone D, Ramires JA. Smoking and lipoprotein abnormalities on platelet aggregation in coronary heart disease. *Int J Cardiol* 1997; 62: 151-4.
 19. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1149-55.
 20. Brattstrom LE, Hardebo JE, Hultberg BL. Moderate homocysteinemia-a possible risk factor for arteriosclerotic cerebrovascular disease. *Stroke* 1984; 15: 1012-6.
 21. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, Singel D, Loscalzo J. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 1993; 91: 308-18.
 22. Puddu PE, Schiariti M, Bugiardini R. Glycoprotein IIb/IIIa Antagonists in Acute Coronary Syndromes Undergoing PCI: A Long Way to Select Optimal Agent and Route. *ISRN Vascular Medicine* 2011 ID 141430, p 9
 23. Tetik Ş, Ak K. Kardiyovasküler hastalıklarda trombosit fonksiyon testleri: patofizyolojiden klinik yaklaşıma. *Cumhuriyet tıp dergisi* 2010; 32: 264-74.
 24. Nurden A, Nurden P. Advances in our understanding of the molecular basis of disorders of platelet function. *J Thromb Haemost* 2011; 9 Suppl 1: 76-91.