

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Ali Demir

**KRONİK İTP HASTALARINDA TROMBOSİT
YIKIMINDA CD5 B LENFOSİTLERİN VE KOMPLEMAN
SİSTEMİNİN ROLÜ VE TEDAVİYLE İLİŞKİSİ**

Dr. Fatma Kaya

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. İsmet Aydođdu

KONYA

2010

İÇİNDEKİLER

Kısaltmalar	ii
1. Giriş	1
2. Genel Bilgiler	2
2.1. İdiopatik (immün) trombositopenik purpura	4
2.1.1. Patogenez	6
2.1.2. Laboratuvar bulguları	10
2.1.3. Tedavi	11
3. Gereç ve Yöntem	15
4. Bulgular	18
5. Tartışma ve Sonuç	21
6. Özet	25
7. Abstract	26
8. Kaynaklar	28

Kısaltmalar

ASH: American Society of Hematology

BSH: British Society of Hematology

BD: Becton Dickinson

BAFF : B-cell activating factor

CD: Cluster of Differentiation

DAF: Decay accelerating faktör

FITC: Fluorescein isothiocyanate

Gp-IIb/IIIa: Glikoprotein IIb/IIIa

GPI: Glikofosfatidilinozitol

HRF20: Homologus restriction factor

IVIG: İntravenöz immünglobulin

MACIF: Membrane attack complex inhibitory factor

MIRL: Membrane inhibitör of reactive lysis

MPV: Mean platelet volume

PAIgG: Platelet associated IgG

PE: Pycoerythrin

PerCP : Peridinin Chlorophyll Protein Complex

PIG-A: Posfatidil İnozitol Glikan sınıf A

1. GİRİŞ

İdiopatik trombositopenik purpura (İTP, primer immun trombositopenik purpura) trombositlere karşı oluşmuş antikorlar aracılığı ile dolaşımdaki trombositlerin yıkımının artması ile karakterize otoimmün bir hastalıktır(1).

İTP'nin görülme sıklığı yılda 5,5/100 000'dir. Kadın-erkek oranı 1,7/1 olup, görülme sıklığı yaş ile orantılı olarak artmaktadır. 60 yaş üstünde 2 kat daha sık görülmektedir(1). İTP akut ve kronik olmak üzere iki klinik formda görülür. Kronik İTP 6 aydan uzun sürer, tedavi gerektirir ve erişkinlerde daha sık görülür(2).

Kronik İTP hastalarında trombositopeniye; otoimmün yıkım, komplemana bağımlı trombolizis ve trombosit yapımında bozulma gibi mekanizmalar neden olur. Trombosit üzerine yapışmış antikorlar trombositlerin mononükleer fagositer sistem tarafından dalakta temizlenmesine rol oynamaktadır(2). İmmün sistemi baskılayan ilaçlar ve splenektomiye rağmen trombositopeninin devam etmesi kronik İTP hastalığında başka mekanizmaların da sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

Son zamanlarda CD5 pozitif B kökenli lenfositlerin trombosit glikoproteinlerine özel antikorlar üreterek kronik İTP oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir. Lenfomalarda otoimmün hemolitik anemilerin ve İTP nin sık olarak görülmesinden CD5 pozitif B lenfositlerin sorumlu olduğu bilinmektedir. Ayrıca Paroksizmal notürnal hemoglobinürili (PNH) hastalarda trombositopeni ve tromboz birlikte görülmektedir. Burada ise hücrelerin yüzeyinde bulunan ve onları komplemanın lizisine karşı kruyan Decay acceleratin faktör (DAF, CD55) ve membran inhibitör reaktif lysis faktörün (CD59) eksikliği veya yetersizliği suçlanmaktadır.

Çalışmamızda kronik İTP hastalarında trombosit yıkımında CD 5 B lenfositlerin ve kompleman sisteminin rolü ve tedaviyle ilişkisi kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

Trombositler, kemik iliğinin polipoid hücreleri olan megakaryositlerin parçalanması sonucu ortaya çıkan 1-4 µm çapında, disk şeklinde sitoplazma parçaları olup pıhtılaşmada önemli rol oynarlar. Ortalama trombosit volümü (MPV) $8,9 \pm 1,5$ fl değerindedir. Çevresel kanda bulunan trombosit sayısı 150000-450000 /µl arasında değişmektedir. Trombositlerin ömrü 7-10 gündür. Kemik iliğinden çevresel kana çıkan trombositlerin 1/3 kadarı dalakta sekestre olduktan sonra geri kalan 2/3'ü 7-10 gün sonra sıklıkla dalak ve karaciğer olmak üzere retiküloendotelial sistem makrofajları tarafından ortadan kaldırılırlar. Normalde hemostaz işleminde trombosit kitlesinin küçük bir kısmı harcanır, bu yüzden trombositler yaşlanıp fagositik hücreler tarafından yıkılana kadar dolaşımda kalırlar(3).

Trombositopeni dolaşımdaki trombosit sayısının düşüklüğü olarak tanımlanmıştır. Trombositopenilerin patofizyolojik olarak sınıflandırılması tablo-1'de gösterilmiştir. Trombositopeninin ayırıcı tanısı uygulanacak tedaviyi etkileyeceğinden çok önemlidir.

Tablo 1. Trombositopeninin patofizyolojik sınıflandırılması(2)

I.Artefakt trombositopenisi

- A. Yalancı trombositopeni
- B. Trombosit satelitizmi (trombositlerin lökosit membranına yapışması)
- C. İri trombositler

II.Artmış trombosit yıkımı (kemik iliğinde normal ya da artmış megakaryositler olduğu için megakaryositik trombositopeni olarakda isimlendirilir)

A .İmmun trombositopeniler

1. İdiyopatik

- a.İmmun (idiyopatik) trombositopenik purpura

2. Sekonder

a.İnfeksiyonlar (örn; HIV,CMV, EBV, suçiçeği, kızamık, kızamıkçık, kabakulak, boğmaca, hepatit, parvovirüs B19, bakteriyel, tüberküloz, tifo)

b. İlaçlar

c. Transfüzyon sonrası purpura

d. Otoimmün hemolitik anemi (Evans sendromu)

e. Sistemik lupus eritematozus

- f. Hipertiroidizm
- g. Lenfoproliferatif hastalıklar

3. Neonatal immun trombositopeniler

B. İmmün olmayan trombositopeniler

- 1. Trombotik mikroanjyopatiler
 - a. Yaygın damar içi pıhtılaşması
 - b. Trombotik trombositopenik purpura
 - c. Hemolitik üremik sendrom
- 2. Anormal damar yüzeyine bağlı trombosit yıkımı

II. Azalmış trombosit üretimi

A. Konstitusyonel

- 1. Konjenital amegakaryositik trombositopeni
- 2. TAR sendromu
- 3. Bernard-Soulier sendromu
- 4. Gri platelet sendromu
- 5. Wiskott Aldrich sendromu
- 6. X linked trombositopeni
- 7. Mediterranean trombositopeni
- 8. MYH-9 geni ile ilişkili hastalıklar
- 9. Ailesel trombositopeniler
- 10. Paris-Trousseau sendromu
- 11. Amegakaryositik trombositopeni ile radial sinostozis

B. Kazanılmış

- 1. Kemik iliği infiltrasyonu
- 2. İnfeksiyon hastalıkları (HIV, Parvovirus, CMV ve diğerleri)
- 3. Radyoterapi ve kemoterapi sonrası
- 4. Folik asit ve B12 vitamin eksikliği
- 5. Paroksizmal nokturnal hemoglobinüri
- 6. Myelodisplastik sendromlar

III. Trombosit dağılım bozuklukları

A. Hipotermi

B. Hipersplenizm (neoplazi, konjestif, enfeksiyon, metabolik, portal hipertansiyon)

C. Aşırı depo kanı transfüzyonu (Dilüsyonel)

2.1. İDİOPATİK (İMMUN) TROMBOSİTOPENİK PURPURA

Tarihçesi; Hipokrat zamanından beri deride çok sayıda olan kanamalar purpura olarak adlandırılmıştır(4). 1557’de Amatus Lusitanus, ateşi olmayan kanamalı bir çocukta pire ısırığına benzer, koyu renkli lekeleri ‘Morbus pulicaris absque febre’ olarak adlandırarak trombositopenik purpuranın kanıt olmadan ilk klinik tanımını yapmıştır(4). 1735’de Paul Gottlieb Werlhof 16 yaşında bir kız çocukta enfeksiyon sonrası kutanöz ve mukozal kanama tarif etmiş olup bu lekeleri ‘morbus maculosus haemorrhagicus’ olarak adlandırmıştır(4). Krauss(1883) ve Denys(1887) purpuraların ortaya çıktığı ve kanamaların artması sırasında trombosit sayısının azaldığını öne sürmüşlerdir. 1895’de de bu bulguların doğruluğu Hayem tarafından teyit edilmiştir(4). 1938’de Troland ve Lee kronik İTP hastalarında dalaktan salgılanan bir madde tanımlamışlardır.

1951’de Harrington ve arkadaşları kronik İTP’li anneden doğan bir çocuğun purpura tarzı döküntüleri olduğunu ve bu döküntülerin üç hafta içinde kendiliğinden kaybolduğunu gözlemlemişlerdir. Harrington kronik İTP li hastanın plazmasını sağlıklı kişilere transfüze ederek bu kişilerin trombosit sayısının hızla düştüğünü göstermiş, böylece trombositlerin yıkımından sorumlu humoral bir faktör olan antitrombosit faktör varlığını deneysel olarak kanıtlamıştır(4).

Shulman ve ark. 1965’te trombositopeniye neden olan faktörün 7S IgG fraksiyonu ile bağlantılı olduğunu göstermişlerdir. 1982’de Van Leeuwen ve ark. İTP hastaların plazmasındaki antikörlerin trombosit yüzeyindeki Gp IIb-IIIa ‘ya bağlanarak trombositopeniye sebep olduğunu göstermişlerdir. 1987’de trombosit bağımlı ve serbest antikörlerin olduğu gösterilmiştir. Son zamanlarda İTP patogenezinde pek çok sitokin salgılayan T lenfosit aktivasyonunun rol oynadığı 1996’da Semple ve ark. tarafından gösterilmiştir(4).

İTP hastanın yaşına göre (erişkin ve çocukluk çağı), hastalığın süresine göre (akut ve kronik) ve beraberinde başka hastalıkların olmasına göre (primer ve sekonder) ve sınıflandırılabilir(1,2,5). Antikor ilişkili trombosit yıkımı; enfeksiyonlar, lenfoproliferatif hastalıklar, otoimmün hastalıklar ve ilaç kullanımı gibi durumlarda ortaya çıkabilir(1).
(tablo-2)

Tablo 2. İmmün trombositopenik purpura(1)

1. Primer (Birincil)

İdiyopatik otoimmün trombositopenik purpura

2. Sekonder (İkincil)

A. Otoimmün hastalıklar: SLE, antifosfolipid sendromu, otoimmün hepatit, otoimmün tiroidit

B. Lenfoproliferatif hastalıklar: KLL, Hodgkin lenfoma, büyük granüler lenfositik lösemi

C. Enfeksiyonlar: HIV, hepatit C, helikobakter pilori

D. Miyelodisplastik sendromlar

E. Agamaglobulinemi, hipogamaglobulinemi, immünglobulin A eksikliği

F. İlaçlar: Kinidin, altın, heparin, penisilin, prokainamid, alfa-metil dopa, sülfametoksazol

Erişkin ve çocukluk çağındaki İTP'nin klinik özellikleri birbirinden farklıdır. Çocukluk çağında görülen İTP genellikle akut başlangıçlı olup kendini sınırlar ve virüs enfeksiyonundan 2-3 hafta sonra görülür. Erişkinde görülen İTP ise sinsi başlangıçlı olup kronik seyirlidir(5). Akut ve kronik İTP'nin klinik özellikleri birbirinden farklıdır(tablo-3).

Tablo 3. Akut ve kronik İTP'nin klinik özellikleri (2)

Özellik	Akut İTP	Kronik İTP
Pik yaşı	2-6 yaş	20-40 yaş
Cinsiyet	K/E=1	K/E=3
Kanama başlangıcı	akut	sinsi
Trombosit sayısı	<20000	30000-80000
Eosinofili ve lenfositoz	sık	nadir
Süre	2-6 hafta	ay/yıllar
Remisyon	çoğunlukla kendiliğinden	kendiliğinden nadir

2.1.1. PATOGENEZ

İTP etyolojisi tam olarak anlaşılmasına rağmen meydana gelişinde antitrombosit antikörlerin rolü bilinmektedir. Trombositlere karşı meydana gelen antikörler onların yıkımına neden olmaktadır (5). 1951 yılında Harrington İTP hasta serumunu sağlıklı kişilere transfüze ederek onlarda trombositopeni geliştiğini görmüş ve trombositopeniye neden olan antirombosit faktörü tanımlamıştır. Yapılan çalışmalar İTP hastalarında hücrel ve humoral immüitenin trombositopeniye sebep olduğunu göstermiştir(6).

İTP hastalarında trombositlerin yüzeyinde bulunan membran glikoproteinlerine karşı oluşan otoantikörler %75 oranında Gp IIb-IIIa ve Gp Ib-IX kompleksine karşı oluşur. Ayrıca Gp Ia-IIa, IV ve V kompleksine karşı oluşan antikörler de tanımlanmıştır(7-8). Trombositlere karşı oluşan otoantikörlerin çoğunluğu İgG olup, İgA ve İgM antikörlerinde bulunmuştur(9,14). Antikörlerle kaplı trombositler retiküloendotelial sistemde, özellikle dalakta bulunan doku makrofajları tarafından sunulan Fc γ reseptörlerine bağlanarak dolaşımdan uzaklaştırılırlar(10). Bu olayda kompleman sisteminde rol oynadığı düşünülmektedir(11). Trombositlerin fagosite edilip yapılarının bozulmasının ardından trombosit glikoproteinlerinden yeni kriptik epitoplara ortaya çıkar ve CD4 T hücre lenfositlerinin aktivasyonunu başlatan sitokin salgırlar(10,12). Otoreaktif CD 4 T hücreleri GpIIb-IIIa üzerindeki farklı epitoplara tanırırlar ve trombosit yıkımını hızlandıran otoimmün yanıt ortaya çıkar. Otoimmün yanıtı tetikleyici neden halen bilinmemektedir(13).

İTP tanısı konulan hastaların %50-70'inde trombosit ilişkili otoantikör mevcuttur. İTP hastalarında trombosit ilişkili İgG nin pozitif öngördürücü değeri %46 olarak saptanmıştır. GpIIb-IIIa, GpIb-IX ve GpIIa-IIIa glikoprotein komplekslerine karşı oluşan antikörlerin ölçümü daha özeldir(14).

Aktive olmuş CD4+ Th hücreleri oto-reaktif B hücre yanıtını düzenler. B hücreleri de CD4+ Th hücrelerinden aldığı sinyal sonrası trombositlere karşı antikör üretimi başlatır. Bu olaya 'epitop spreading' denir. Th hücreleri tetikleyen mekanizma bilinmemektedir(13). İTP hastalarında B hücreleri tarafından Gp IIb-IIIa kompleksine karşı antikörler üretilir, buna bağlı Gp IIb-IIIa kompleksi üzerindeki epitoplara immün yanıtı sebep olurlar(6). Mizutani ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada İTP hastalarında CD5+ B hücrelerin çevresel kan ve dalakta arttığı gösterilmiştir(27). Aktif İTP hastalarında Th1/Th2 oranı, ayrıca interferon- γ ve interleukin-2 reseptör- β gen ekspresyonu arttığı gösterilmiştir(15,16). Andersson ve ark.

tarafından yapılan bir çalışmada Th3 hücreleri tarafından üretilen immünsüpresif bir sitokin olan TGF β 1'nin remisyondaki İTP hastalarında sağlıklı ve aktif İTP hastalarına göre yüksek bulunmuşlardır(17, 18).

İTP hastalarında CD3+ T lenfositlerin tümör nekrozis factor- α , perforin, granzyme A ve granzyme B gibi sitotoksik gen ekspresyonu artar(16,19). CD3+CD8+ T hücrelerin bulunduğu invitro ortamda trombositler lizis olur. CD 8+ T hücreleri kemik iliğinde megakaryositlerin apoptozunu baskılayarak trombosit üretimine zarar verirler(20). Aktif İTP hastalarında CD56+CD3- NK hücreleri ve CD56+CD3+ sitotoksik T hücrelerinin miktarının arttığı gösterilmiştir(21). Liu ve ark. (2006) yaptıkları bir çalışmada; aktif ve remisyonda olmayan İTP hastalarında CD 4+CD25+ T düzenleyici hücrelerin oranının remisyonda İTP ve kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir(23).

Meabed ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada T lenfosit üzerindeki CD4+CD154(CD40L)+ ve CD4+CD154(CD40L)/CD4+ ekspresyonu ve B lenfosit üzerindeki CD19+CD40+ ve CD19+CD40+/CD19+ ekspresyonu akut ve kronik İTP hastalarında kontrol grubuna göre belirgin olarak artmış olduğunu göstermişlerdir. CD 154 trombosit tarafından üretilen, trombosit yüzeyinde az miktarda bulunan bir molekül olup trombosit aktivasyonu durumunda ekspresyonu artmaktadır. İTP hastalarında platelet ilişkili CD154 (CD40) ekspresyonu oto reaktif B lenfosit aktivitesini arttırmış olabileceğini belirtmişlerdir(24).

İTP hastalarında otoimmün trombosit yıkımı kemik iliğinde megakaryosit yapımını artırır. Megakaryosit boyutları artmıştır. Buna rağmen İTP hastalarının çoğunda trombosit üretimi normalin altında seyreder. Chang ve ark. yaptığı bir çalışmada İTP hastalarında GpIb ve GpIIb-IIIa kompleksine karşı oluşan antikorların invitro ortamda megakaryopoezi baskıladığı gösterilmiştir(22).

İTP hastalarında trombopoietin (TPO) düzeyleri normal ya da hafif artmıştır(25). Aledort ve ark. tarafından 205 İTP'li hasta üzerinden yapılan bir çalışmaya göre TPO seviyesi ile trombosit sayısı arasında ilişki bulunmamıştır(26).

Patogeneizde Kompleman Sisteminin Rolü

Kompleman sistemi konağın savunmasında ve inflamatuvar olayların düzenlenmesinde rol alan ve birbirini etkileyen bir dizi enzimden oluşan bir sistemdir. Kompleman sisteminin birçok düzenleyicisi mevcuttur. Normal vücut hücreleri kompleman sisteminin lizisine karşı

çeşitli mekanizmalarla direnç gösterir. Bu sistem membran bağlı proteinler olan DAF(CD55), membran kofaktör protein(CD46), MIRL(membran inhibitör of reactive lysis, protektin ve CD59) tarafından oluşturulur.

Akut İTP hastalarında trombositler üzerinde CD55 ve CD 59 düzeyi bakılmış olup, CD59 eksikliği olan hasta sayısının CD55 eksikliği olan hasta sayısından fazla olduğu, ayrıca CD59 eksikliği olan hastalarda CD55 eksikliği olan hastalara göre trombositopeninin daha ciddi düzeyde olduğu saptanmıştır . Otoimmün hemolitik anemi, İTP ve lenfopenili SLE hastalarında hematopoetik hücrelerde CD55 ve/veya CD59 eksikliğinin rolü olduğu gösterilmiştir(28).

Hematolojide Akım Sitometri Kullanımı

Akım sitometri ile süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli florokromlar da olabilir(41).

Klinikte lökosit yüzey antijenlerinin analizi, lösemi ve lenfoma immüfenotiplemesi, hematolojik malignitelerin belirlenmesi, DNA içeriğinin analizi(41), immün yetmezliklerin teşhisi, otoimmün hastalıkların tanısı ve kemoterapötik gözlemlene aşamalarında kullanılmaktadır(42, 43).

Hücreler yüzeylerinde bulunan glikoprotein yapıdaki farklı tip reseptörler sayesinde organizmadaki diğer tipteki hücrelerle karşılıklı etkileşime girmektedir(44). Hücre yüzeyindeki bu moleküller antijen olarak tanımlanmakta ve bu moleküller tarafından farklı tipteki hücre varlığının ayırımları yapılabilmektedir. Hücre yüzeyindeki bu antijenik yapılar günümüzde CD (Cluster of Differentiation) farklılaşma kümeleri olarak adlandırılmaktadır(45). Sayıları günümüzde 247'e ulaşan CD yüzey antijenlerinin birçoğunun pratik kullanımda birçok yararı bulunmaktadır.

Biz bu çalışmada İTP hastalarında ve kontrol grubunda CD 5, CD19, CD55, CD59, CD41a yüzey antijenlerinin ekspresyon durumunu akım sitometri tekniği kullanarak incelemeyi amaçladık.

1. CD5: 67 kd ağırlığında, çevresel kan lenfositlerinin %70'inde ve timus T lenfositlerinin hücre yüzeyinde bulunan bir antijendir. B lenfositlerinin alt grubu olan bellek hücrelerinden B1a hücreleri tarafından dalak ve lenf nodlarında, B hücreli KLL de CD5 ekspresyonu

izlenir (34). Dalak ve lenf nodlarındaki T lenfositlerde, T hücre lösemileri ve lenfomalarda CD5 ekspresyonu izlenir (35). İnsanlarda CD5+ B hücreleri fetüs dalağı ve yenidoğan kordon kanındaki B hücrelerinin büyük çoğunluğunu oluştururlar. (Antin ve ark. 1986; Freedman ve ark 1987) Erişkinde ise dalaktaki B hücrelerin %10 dan daha az bir kısmını CD5 + B hücreleri oluşturur (Gobbi ve ark. 1983; Gadol & Auk. 1986; Kipps & Vaughan, 1987) (60).

2. CD19: 95 kd ağırlığında tip 1 transmembran glikoproteinidir. %7-%23 oranında periferik kan lenfositleri ve dalakta bulunurlar (36). B lenfosit farklılaşma ve olgunlaşma aşamalarının tümünde eksprese edilirler. T lenfosit, granülosit ve monositlerinde bulunmazlar(37). B lenfositler aktive olabilmeleri için T lenfositlere ihtiyaç duyar. T lenfosit yüzeyinde bulunan CD21 ve B lenfosit yüzeyindeki CD19 birbirine bağlanarak sinyal ileti kompleksi oluştururlar. B lenfosit aktivasyonunu artırır(38).

3. CD 55: Diğer ismiyle DAF, hücre membranına glikozilfosfatidilinozitol(GPI) ile bağlı tek zincirli yapıya sahip, 70 kd ağırlığında(32) bir protein olup, klasik yol olan C3 konvertaz enzim aktivasyonunu sınırlayarak kompleman sistemine karşı normal vücut hücre yüzeyinde koruyucu bir bariyer oluşturur(28). CD55 vücutta hematopoetik ve non-hematopoetik hücreler tarafından eksprese edilir. Fosfatidil İnozitol Glikan sınıf A (PIG-A) geni CD55 protein sentezinden sorumludur. Bu gen PIG-A gen defekti e GPI bağlı protein sentez eksikliğine yol açarak hemolitik anemiye sebep olur. Paroksizmal noktürnal hemoglobinüride(PNH) eritrositler üzerinde CD55 ve CD59 eksikliği görülür(33). CD55 eksikliği olup CD59 eksprese eden hastalarda hemoliz görülmediği gösterilmiştir(29).

4. CD59: Kompleman sistemine karşı aktivite gösterdiklerinden MACIF, MIRL, HRF20 ve protektin olarak ta adlandırılırlar. 19 kd ağırlığında, hücre yüzeyinde GPI ile bağlı tek zincirli bir hücre yüzey proteini olup tüm vücut dokularından salgılanır. Eritrositler üzerindeki ekspresyonu eritrosit ömrüyle ilişkili olduğundan önemlidir(30). CD59, hücreleri kompleman bağımlı lizisten korumak için C9'u bağlar(31).

5. CD41: 140 kd ağırlığında, alfa ve beta subunitine sahip, kalsiyum bağımlı GpIIb/IIIa kompleksi olup yalnızca platelet ve megakaryosit yüzeyinde bulunan bir antijendir. CD61 ile fibrinojen reseptörünü oluşturarak trombosit adezyon ve aktivasyonunda görev yapar. Damar hasarı durumunda von Willebrand factor, fibrinogen, fibronectin and vitronectini bağlar(39). CD41a eksikliğinde Glanzman trombositopenisi görülür.

2.1.2. LABORATUAR BULGULARI

1. Trombosit sayısı ve çevresel kan yayması: Trombositopeni, trombosit sayısının <150000/μl olması şeklinde tanımlanır. MPV ve trombosit dağılım aralığı artmıştır. Trombositlerin anizositozu İTP için tipik bir bulgudur. Trombositler anormal derecede küçük yada büyüktür. Dev trombositlerin varlığı hereditör trombosit hastalığını düşündürür(53). Elektron mikroskopunda trombositlerin yapısal özellikleri normal trombositlere benzer(54). Lökosit sayısı, hemoglobin ve hematokrit kanaması olmayan hastalarda normaldir(1). Coombs pozitif otoimmün hemolitik anemi ve trombositopeni Evans sendromu olarak bilinir(55).

2. Kemik iliği: İTP hastalarında tanı koymak için her zaman gerekli değildir. İTP hastalarında kemik iliğinde megakaryosit sayısı normal yada artmış olup, megakaryosit morfolojisi normaldir. Megakaryosit sayısının azalması İTP tanısını dışlamaz(46). Amerikan Hematoloji Birliği (ASH) 60 yaş altındaki İTP hastalarına kemik iliği aspirasyonunu başlangıç değerlendirmesinde önermemektedir(46).

3. Koagülasyon testleri: Kanama zamanı trombosit sayısı azaldığı için uzamıştır. İTP hastalarında yapılması tavsiye edilmez. Protrombin zamanı, parsiyel tromboplastin zamanı ve fibrinojen düzeyleri normaldir.

Hemoglobin konsantrasyonu ve hematokrit değeri kanaması olmayan hastalarda normaldir(1). Coombs pozitif otoimmün hemolitik anemi, retikülositoz ile birlikte görülen ITP Evans sendromu olarak adlandırılır(55).

4. Trombosit antikor ölçümü: Antitrombosit antikorları belirleyen testler geliştirildikleri döneme göre 3 gruba ayrılırlar.

a. Faz 1 testler: Hasta serumu ile sağlıklı bireyin trombositleri inkübe edilerek trombosit agregasyon, aglütinasyon ve lizisi ölçülür. Bu testler sensitif ve spesifik olmadığından tanıda yeri yoktur(46).

b. Faz 2 testler: PAIgG ve diğer trombosit bağlı antikorların ölçümü yapılır. PAIgG İTP hastalarında, sağlıklı bireylerde ve immün olmayan trombositopenide yüksek saptanabileceğinden sensitivitesi yüksek (%91) olmasına rağmen spesifitesi düşüktür(56).

c. Faz 3 testler: Trombosit glikoproteinlerine özel antikorları ölçerler. İmmunoblot, immünopresipitasyon, glikoprotein immobilizasyon teknikleri kullanılarak ölçüm yapılır. İmmün trombositopeniyi immün olmayan trombositopeniden ayırmak ve tedaviye cevabı gözlemek için bu teknik kullanılabilir. Spesifik olmasına rağmen sensitif değildir(57).

Çeşitli antitrombosit antikorlar tanımlanmış olup sensitivite ve spesifiteleri yüksek olmadığından bu testler klinikte kullanılmamaktadırlar(1).

2.1.3. TEDAVİ

İTP hastalarında hastanın yaşı, hastalığın ciddiyeti ve hastanın özgeçmiş göz önünde bulundurularak tedavi planlanmalıdır. 60 yaş üzerindeki erişkin hastalarda tehlikeli kanama riski yüksektir. Kanama riski trombosit sayısı ile ilişkilidir. Trombosit sayısı $<20000/\mu\text{l}$ yada trombosit sayısı $<50000/\mu\text{l}$ olup önemli mukozal kanama eşlik ediyorsa tedavi verilmesi gerekmektedir(2).

1.Hayatı tehdit eden kanamalarda acil tedavi

Hayatı tehdit edici kanamalar trombosit sayısı $<10000/\mu\text{l}$ iken ortaya çıkar. İntrakranial yada gastrointestinal kanama durumu olan hastalar, hematüri, internal hematom yada acil cerrahi gerektiren hastalar acil tedavi verilmesi gereken hasta gruplarıdır. Bu durumlarda hasta monitörize edilmek üzere hastanede takip edilmelidir. Bu tür hastalarda yüksek doz glukokortikoid tedavi(metil prednisolon 1g/gün 3 gün süreyle), İVİG (1g/kg/gün 2 gün süreyle) yada İVİG ve glukokortikoid birlikte uygulanabilir. İVİG 2-3 gün içinde trombosit sayısını yükseltir (46). Trombosit transfüzyonu trombosit sayısını yükseltmez, çünkü çevresel kanda hızla yıkılır. İVİG trombosit yaşam süresini uzatacağından İVİG sonrası trombosit transfüzyonu trombosit sayısını artırır. Kanamayı azaltmak için akut dönemde fibrinolizi baskılayan eden aminokaproik asit (başlangıç dozu 0.1g/kg 30 dk süreyle, $0,5-1\text{g/saat}$ sürekli infüzyon) kullanılabilir. Aminokaproik asit gastrointestinal emilimi iyi olduğundan oral yoldanda verilebilir(47).

2.Steroid tedavisi

Glukokortikoid tedavi trombosit sayısı $<20000/\mu\text{l}$ olan hastalarda ve trombosit $20000-50000/\mu\text{l}$ olup kanama tarifleyen hastalarda başlangıç tedavide oral prednizon $1-2\text{ mg/kg/gün}$ dozda önerilir. Glukokortikoidler aşağıda belirtilen mekanizmalarla trombosit sayısını yükseltirler.

1. Antikor kaplı trombositlerin makrofajlar tarafından fagositozunun baskılanması,
2. Antikor üretiminin azaltılması,
3. Kemik iliğinde trombosit üretimini arttırarak trombosit sayısını yükseltirler(48).

Kapiller stabiliteyi arttırarak kanamaya eğilimi azaltırlar. İlk üç haftada tedaviye yanıt gözlenir. Trombosit sayısı güvenli aralık seviyesine yükselene kadar tedaviye devam edilir(1). Hastaların $2/3$ ünde trombosit sayısı bir hafta içinde $50000/\mu\text{l}$ üzerine çıkar, fakat dozu

azaltılırsa trombosit sayısı azalmaktadır. Bu yüzden glukokortikoid tedaviye 1mg/kg/gün dozda 3 hafta süreyle devam edilmeli sonrasında doz azaltılmalıdır(46). Kilo artışı, hipertansiyon, diyabet, osteoporoz, katarakt, fırsatçı enfeksiyonlar, akne, aydede yüzü ve psikoz gibi yan etkilerinden dolayı tedavi süresi mümkün olduğunca kısa tutulmalıdır(46). Yapılan çalışmalara göre başlangıç tedavide kısa süreli yüksek doz glukokortikoid tedavisinin (deksametazon 40mg/gün, 4 gün süreyle) standart tedaviye göre daha tolere edilebilir ve etkili olduğu saptanmıştır(49). Buna rağmen bu tedavi halen birinci seçenek olarak kullanılmamaktadır(1).

3.Splenektomi

İlk kez Kaznelson tarafından 1916'da İTP tanılı bir hastaya yapılmış olup tedaviye yanıt alınmıştır(1). Trombosit sayısı <10000/μl olan hastalar ve trombosit sayısı <30000/μl olup 4-6 haftalık tıbbi tedavi sonrası kanama bulguları devam eden hastalarda splenektomi endikasyonu vardır. Ayrıca ilk tedavi sonrası geçici yanıtı olup trombosit sayısı üç aydan uzun süre <30000/μl olan hastalarda ve trombosit sayısını güvenli bir aralıkta tutmak için sürekli glukokortikoid tedaviye ihtiyacı olan hastalarda splenektomi önerilmektedir(46). Ameliyat öncesi trombosit sayısını arttırmak için glukokortikoid ve/veya İVİG tedavisi önerilir, ciddi trombositopenisi olan hastalarda trombosit transfüzyon ihtiyacı olabilir. Splenektomiden 2 hafta önce pnömokok, hemofilus influenza tip B ve meningokok aşılı yapılmalıdır(1).

Splenektomi yapılan hastaların 2/3 ünde trombosit sayısı normale döner. Geri kalan hastalarda 6 ay içinde nüks gözlenir (46). Splenektomiye yanıt veren çoğu vakada trombosit sayısı on gün içinde normal seviyeye ulaşır. Splenektomi sonrası trombosit sayısı >500000 /μl olan, ilk üç gün içinde trombosit sayısı normale ulaşan ve genç yaşta olan hastalar splenektomiye iyi yanıt verirler(1). Splenektomide mortalite insidansı <%1 olup, yaşlı ve başka ek hastalığı olan hastalarda bu oran artar(46). Splenektomiye dirençli hastalarda aksesuar dalak araştırılmalıdır(1). Cerrahi olarak splenektomi kontrendike olan hastalarda dalağa radyoaktif tedavi ya da splenik arter embolizasyonu tedavisi yapılır(46).

4.İVİG tedavisi

İTP hastalarının %75 inde trombosit sayısını artırır ve %50 sinde trombosit sayısını normal düzeye ulaştırır(46). İVİG tedavisinin etkisi geçici olup 3- 4 hafta sürer. Tekrarlayan İVİG infüzyonları hastayı dirençli hale getirebilir(50).

İVİG tedavisinin etki mekanizması;

- 1.Fc reseptör blokajı,
- 2.Antikor bağlı trombositlerin klirensini azaltarak,
- 3.Trombosit antikorların antiidiyotip nötralizasyonu ile trombosit seviyesini arttırmaları(51).

Önerilen total doz 2 g/kg olup 0.4 g/kg/gün 5 gün süreyle yada 1 g/kg/gün, 2 gün süreyle uygulanabilmektedir.

Tedavinin yan etkileri olarak baş ağrısı, bel ağrısı, bulantı, ateş, aseptik menenjit, hepatit C, hemolitik anemi, böbrek ve akciğer yetmezliği, tromboz, anaflaktik reaksiyonlar(özellikle İgA eksikliği olanlarda) gözlenebilir. Bu yüzden İVİG tedavisi erişkin İTP hastalarında hayati kanamalar yoksa ve dirençli İTP değilse başlangıç tedavisi olarak önerilmez(46).

5.Anti (Rh) D tedavisi

Anti D immünglobulin Rh pozitif eritrositlerdeki D antijenine bağlanırlar ve dalakta parçalanarak Fc reseptör blokajı yaparlar. Bu şekilde antikor bağlı trombositlerin klirensi azalır.

Bu tedavi Rh negatif hastalarda etkili değildir. Dalağı alınmış hastalarda tedaviye yanıt oranı düşüktür. 50- 100µg/kg dozda 3- 5 dk süreyle infüzyon yapılır(52). Etkisi 48 saat sonra başlar(2). Baş ağrısı, ateş, karın ağrısı, diyare, kusma, kasağrısı, otoimmün hemolitik anemi, tip I ve III aşırı duyarlık ve anaflaktik reaksiyonlar gibi yan etkiler görülebilir(52).

6.Diğer tedaviler

İTP hastalarının 1/3 ü splenektomiye yanıt vermez ya da kısa süreli remisyon ardından nüks ederler. Bu hastalarda tedavi için trombosit sayısından çok kanama semptomları göz önünde tutulur. Trombosit sayısı >30000/µl olan hastalar kanama riski düşük olduğundan takip edilmektedir. Trombosit sayısı <30000 olup kanama bulgusu olmayan ve ek hastalığı (hipertansiyon, peptik ülser) bulunmayan hastalar da tedavisiz izlenir(1). Splenektomiye dirençli tedavi gerektiren hastalarda vinka alkaloidleri, siklofosfamid, siklosporin, azotiopürin, danazol, interferon-α, kolşisin, aminokaproik asit, plazmaferez, rekombinant faktör VIIa ve ritüksimab kullanılabilir(46).

Amerikan Hematoloji Birliği (ASH) ve İngiliz Hematoloji Birliği (BSH) tarafından İTP hastalarında takip edilmesi gereken tedavi şeması tablo-4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. İTP hastalığında tedavi yaklaşım kılavuzlarının karşılaştırılması(58-59)

	Amerikan Hematoloji Birliği(1996)	İngilizHematoloji Birliği(2003)
1.basamak tedavi	Kortikosteroidler (Prednizon 1-2mg/kg/gün)	Oral kortikosteroidler (Prednizon/prednizolon 1 mg/kg/gün 2-4 hafta IVIG(0.4g/kg/gün 5 gün yada 1g/kg 1 gün
2.basamak tedavi	Splenektomi	Splenektomi
1.ve 2.basamak tedaviye yanıt yoksa	IVIG Kortikosteroidler Aksesuar splenektomi	Metilprednizolon(tek başına yada siklosporinle ve/veya IVIG ile kombine Aksesuar splenektomi Yüksek doz IVIG,vinka Alkaloidleri,anti-D,danazol, Azotiyopürin ve siklosporin
Acil tedavi	Metilprednizolon(1g/gün 3 gün) IVIG tek başına yada kombine Trombosit transfüzyonu	Random trombosit transfüzyonu

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alındı. Çalışmanın maliyeti Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından karşılandı (BAP proje no:1350).

Çalışmamız Kasım 2008-Temmuz 2009 tarihleri arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ve Hematoloji polikliniğinde İTP tanısı ile yatırılan ve ayaktan takip edilen erişkin yaşta 20 hasta ve 20 sağlıklı kontrol grubu olmak üzere 40 vaka üzerinde yapıldı.

İTP tanısı bazı kriterler dikkate alınarak konulmuştur. Kanama bulguları dışında normal fizik muayene bulguları ile izole trombositopenisi (trombosit sayısı $< 150000/\text{mm}^3$) olan ve yapılan periferik yayma ve kemik iliği ile trombositopeni yapan hematolojik ve diğer hastalıkların dışlandığı hastalar İTP tanısı konularak çalışmaya alınmıştır.

Hasta ve kontrol grubunun çalışmaya dahil edilme kriterleri;

1. 18 yaş üstü erişkin hasta ve sağlıklı kişiler,
2. İTP hastalarının yeni tanı almış ve daha önce tedavi almamış olması,
3. Deneklerin herhangi bir kanser hastalığına sahip olmaması çalışmaya alınma kriteri olarak belirlenmiştir.

Çalışmaya alınan hastaların tanı anındaki trombosit sayısı, tedavi alıp almadığı, tedavi verildiyse hangi tedaviler aldığı, tedaviye yanıtları incelenmiştir. Hasta ve sağlıklı kontrol grubu arasında yaş, cinsiyet, trombosit sayısı, immünolojik parametreler karşılaştırılmıştır.

Çalışmaya alınan hastaların hematolojik hastalık ve malignite tanısını dışlamak için periferik yaymaları incelendi. Ciddi trombositopenisi olan hastalara kemik iliği aspirasyonu yapıldı. Kontrol grubundaki bireylerin yaşı, herhangi bir hematolojik hastalık olup olmadığı sorgulandı. Hastalardan ve sağlıklı kontrol grubundan EDTA'lı tüpe 2 ml kan alınarak SÜMTF Hematoloji Laboratuvarında Hb, trombosit ,lökosit, ortalama trombosit hacmi (MPV) değerlerine Advia 21-20 cihazında lazer sistemi kullanılarak bakıldı. Çalışmaya alınan hasta ve kontrol grubundan EDTA'lı tüpe 3 ml kan alındı. Lökositler üzerinde CD5, CD19, eritrositler üzerinde CD55, CD59, trombositler üzerinde CD41a ekspresyonu bakılmak üzere SÜMTF Çocuk İmmünoloji Laboratuvarına gönderildi. Gönderilen örnekler Becton Dickinson(BD) Facs Calibur cihazında akım sitometri yöntemi ile analiz edildi.

Çalışmaya alınan hastaların tedavi almadan önce trombosit sayısı, lenfositler üzerinde CD5, CD19, CD5+CD19, trombositler üzerinde CD41a, eritrositler üzerinde CD55+CD59 ekspresyon oranı çalışıldı. Tedavi sonrası hasta grubunda trombosit sayısı bakıldı. Diğer parametreler tedavi sonrası değerlendirilmedi. Kontrol grubundaki sağlıklı olgularda önce trombosit sayısı, lenfositler üzerinde CD5, CD19, CD5+CD19, trombositler üzerinde CD41a, eritrositler üzerinde CD55+CD59 ekspresyon oranı çalışıldı. İki grup arasında trombosit sayısı, CD5, CD19, CD5+CD19, CD41a, CD55+CD59 ekspresyon oranları karşılaştırıldı.

Laboratuvar testleri

1. CD5; EDTA'lı tüpe alınan 100 µl venöz kan örneği üzerine flowsitometri tüpünde uygun miktarda CD5 FITC (Fluorescein isothiocyanate) monoklonal antikorlar eklendi. 15 dakika karanlıkta oda ısısında bekletildikten sonra 2 ml BD facs lizing solüsyon eklendi. Oda ısısında karanlıkta on dakika bekletildi. Bu karışım 5 dk 1800 devirde santrifuj edildikten sonra süpernatantı atıldı. Çöken kısma 3 ml BD Cell WASH eklendikten sonra tekrar 5 dk 1800 devirde santrifuj edildi. Örneğin çöken kısmına 0,5 ml BD Cell WASH eklendikten sonra dört renkli BD Facs Calibur akım sitometri cihazında analiz edildi.

2. CD19; EDTA'lı tüpe alınan 100 µl venöz kan örneği üzerine flowsitometri tüpünde uygun miktarda CD19 PE (Pycocerythrin) monoklonal antikorlar eklendi. 15 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 2ml BD facs lizing solüsyon eklendi. Oda ısısında karanlıkta 10 dakika bekletildi. Bu karışım 5 dk 1800 devirde santrifuj edildikten sonra süpernatantı atıldı. Çöken kısma 3 ml BD Cell WASH eklendikten sonra tekrar 5 dk 1800 devirde santrifuj edildi. Örneğin çöken kısmına 0,5 ml BD Cell WASH eklendikten sonra dört renkli BD Facs Calibur akım sitometri cihazında analiz edildi.

3. CD55; EDTA'lı tüpe alınan 2 µl venöz kan örneği üzerine 4 ml BD Cell WASH eklendi. Bu karışım 5 dk 1800 devirde santrifuj edildikten sonra süpernatant kısmı atıldı. Çöken kısma 200 µl BD Cell WASH eklendi. Bu çözeltinin 100 µl si üzerine uygun miktarda CD 55 PE monoklonal antikorlar eklendi. 45 dakika +4 santigrat ısıda bekletildi. Bu karışım üzerine 0,5 ml BD Cell WASH eklendi. Tekrar 5 dk 1800 devirde santrifuj edilen örneğin süpernatantı atıldı. Çöken kısma 0,5 ml BD Cell WASH eklendikten sonra dört renkli BD Facs Calibur akım sitometri cihazında analiz edildi.

4. CD59; EDTA'lı tüpe alınan 2 µl venöz kan örneği üzerine 4 ml BD Cell WASH eklendi. Bu karışım 5 dk 1800 devirde santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atıldı. Çöken kısma 200 µl BD Cell WASH eklendi. Bu çözeltinin 100 µl si üzerine uygun miktarda CD 59 PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein Complex) monoklonal antikorlar eklendi. 45 dakika +4 santigrat derecede bekletildi. Bu karışım üzerine 0,5 ml BD Cell WASH eklendi. Tekrar 5 dk 1800 devirde santrifüj edilen örneğin süpernatantı atıldı. Çöken kısma 0,5 ml BD Cell WASH eklendikten sonra dört renkli BD FACS Calibur akım sitometri cihazında analiz edildi.

5. CD41a; EDTA'lı tüpe alınan venöz kan örneği 5 dk 1800 devirde santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmın 100 µl'si flow sitometri tüpüne alındı ve üzerine uygun miktarda CD41a FITC monoklonal antikorlar eklendi. 15 dakika oda ısısında bekleyen örnek 5 dk 1800 devirde santrifüj edildi. Süpernatantı atıldı. Çöken kısma 2ml BD FACS Lizing solüsyonu eklendi. 10 dakika oda ısısında bekletilen örnek daha sonra 5 dk 1800 devirde santrifüj edildi. Santrifüj edilen örneğin süpernatant kısmı atıldı. Çöken kısım üzerine 3ml BD Cell WASH eklendi. Tekrar santrifüj işlemi yapılan örneğin çöken kısmına 0,5 ml BD Cell WASH eklendikten sonra dört renkli BD FACS Calibur akım sitometri cihazında analiz edildi.

6. Trombosit sayısı; EDTA'lı tüpe alınan venöz kan örneği SÜMTF hematoloji laboratuvarına gönderildi. Advia 21- 20 cihazında lazer sistemi kullanılarak trombosit sayımı yapıldı.

Hasta ve kontrol grubunun kan örnekleri bekletilmeden çocuk immünoloji laboratuvarına gönderildi. Hasta grubunun kan örneklerinde immünolojik parametreler tedavi almadan önce bir kez bakıldı. Tedavide ilk seçenek olarak metilprednizolon (1 mg/kg/gün) verildi. Yanıt alınamayan olgularda İVİG, azotiyopürin ve/veya splenektomi gibi tedavi seçenekleri uygulandı. Tedavi sonrası immünolojik parametreler tekrar incelenmedi. Hastalarda tedavi sonrasında ve aylık kontrollerde trombosit sayımı yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiği SÜMTF Tıbbi İstatistik bölümünde yapılmıştır. Çalışmada elde edilen veriler değerlendirilirken, istatistiksel analiz için Excel 2003 ve SPSS 15 programı kullanıldı. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapılırken ortalama±standard sapma ve yüzde(%) değer bulundu. Normal dağılıma uymayan parametreler Mann Whitney U, Wilcoxon testleri, normal dağılıma uyan parametreler ise Student T test ile değerlendirildi. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen hasta grubunun yaşları 19- 78 arasında (yaş ortalaması= 44,3±16.8) ve sağlıklı grubun yaşları 22-79 yaş arasında(yaş ortalaması= 35,9±14.29) değişmekteydi. Çalışmaya 26 kadın,14 erkek olmak üzere 40 vaka dâhil edilmiştir. Hasta grubunda 12'si kadın,8'i erkek toplam 20, kontrol grubunda ise 14 kadın,6 erkek toplam 20 hasta bulunmaktaydı.

Çalışmaya dâhil edilen hasta grubunda ciddi trombositopenisi olan (trombosit sayısı <30000) hastalara başlangıçta kemik iliği aspirasyonu yapıldı. Bu hastalarda malignite ya da diğer hematolojik hastalıklar dışlandı.

Gruplar arasında trombosit sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi (p<0.05). Hasta grubunda CD5 ekspresyon oranı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük saptandı(p= 0,04). Gruplar arasında CD19 ekspresyon oranında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi (p= 0,87). Hasta grubunda CD5+CD19 (CD5+B lenfosit) ekspresyon oranı istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (p= 0,01). CD41a ekspresyon oranı sağlıklı kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı (p= 0,001). CD55+59 ekspresyon oranı hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı (p<0.05). (Tablo 5)

Tablo 5. Gruplar arasında trombosit sayısı ve CD ekspresyon oranlarının karşılaştırılması

	Hasta grubu N=20	Kontrol grubu N=20	P değeri
Trombosit sayısı	21850±21692	227500±49852	0,00
L-CD5	%69,28±7,75	%73,62±4,61	0,04
L-CD19	%10,01±4,58	%9,2±2,55	0,87
L-CD5+CD19	%2,19±1,65	%1,27±0,75	0,01
PLT-CD41a	%44,63±35,38	%90,3±9,24	0,001
E-CD55+CD59	%98,03±1,77	%91,56±7,47	0,00

Hasta grubunda 15 olguya steroid tedavisi verildi. 5 hasta tedavi verilmeden takip edildi. Tedavi verilen grupta dört hasta steroid tedavisine cevap verdi. Sekiz hasta steroid tedavisine cevap vermedi. 3 hasta tedavi başladıktan sonra takip dışı kaldı. Steroid tedavisine cevap vermeyen hasta grubunda bir hasta splenektomiye, bir hasta da azotiyopürin tedavisine cevap verdi.

Steroid tedavisine cevap veren hasta grubu ile steroid tedavisine cevap vermeyen hasta grubu arasında CD5, CD19, CD5+CD19, CD41a ve CD55+CD59 ekspresyon oranları karşılaştırıldı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. (Tablo 6)

Tablo 6. Steroid tedavisine cevabı olan ve olmayan hasta gruplarında CD ekspresyon oranlarının karşılaştırılması

	Grup 1 N=4	Grup 2 N=8	P değeri
L-CD5	%65,25±11,03	%71,25±5,88	0,23
L-CD19	%9,0±7,96	%9,88±4,52	0,61
L-CD5+CD19	%2,5±3,79	%1,32±0,71	0,86
PLT-CD41a	%18,75±9,33	%48,0±33,18	0,13
E-CD55+CD59	%96,75±3,31	%97,75±1,04	0,86

Grup1: steroid tedavisine cevabı olan hasta grubu

Grup2: steroid tedavisine cevabı olmayan hasta grubu

Çalışmada ayrıca hasta grubundaki trombosit sayısı ile CD5, CD19, CD5+CD19, CD41a ve CD55+CD59 ekspresyon oranları arasında ilişki araştırıldı. İTP tanısı konulan hastaların başlangıç trombosit sayısı dikkate alındı. Trombosit sayısı <30000 ciddi trombositopeni olarak değerlendirildi. Trombosit sayısı <30000 olan hasta grubu (n=14) ile trombosit sayısı >30000 (n= 6) olan hastalar karşılaştırıldı. Gruplar arasında CD5, CD19, CD5+CD19 ve CD55+CD59 ekspresyon oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Yalnızca CD41a ekspresyonu trombosit sayısı >30000 olan grupta istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı(p= 0,01). (Tablo 7)

Tablo 7. Trombosit sayısına göre CD ekspresyon oranlarının karşılaştırılması

	Grup 1 N=14	Grup 2 N=6	P değeri
L-CD5	%69,36±7,73	%67,5±7,81	0,56
L-CD19	%9,93±5,09	%8,5±2,43	0,62
L-CD5+CD19	%1,71±2,02	%1,95±1,12	0,74
PLT-CD41a	%31,36±29,83	%76,66±22,78	0,01
E-CD55+CD59	%97,65±1,87	%97,17±1,72	0,80

Grup 1: Trombosit sayısı <30000

Grup 2: Trombosit sayısı >30000

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İdiyopatik trombositopenik purpura sık görülen bir hematolojik hastalıktır. Erişkin yaşta sıklıkla kronik tipte görülür. Kadınlarda erkeklere oranla iki kat daha fazla görülür. 1950 yılından bu yana İTP patofizyolojisi bilinmesine rağmen yeterli kalitede çalışmaların olmaması nedeni ile halen kanıta yönelik tedavi uygulanmamaktadır. Bu çalışmada İTP hastaları ile sağlıklı kontrol grubu arasında lenfositler, eritrositler ve trombositler üzerindeki yüzey belirteçlerinin ekspresyon oranı karşılaştırılarak tedavide nasıl bir yöntem izlenebileceği amaçlanmıştır.

B lenfositlerin B1a hücre alt grubu peritoneal ve plevral kavitede yoğun olarak bulunur ve CD5 eksprese ederler (61, 62). Çevresel kan lenfositlerinin %70 inde CD5 ekspresyonu gözlenmiştir(34). CD19 ise B lenfosit farklılaşma ve olgunlaşma aşamalarının tümünde eksprese edilir ve B lenfosit yüzey belirteçidir(37). Dolayısı ile B1a lenfositler CD19+CD5 eksprese ederler. B1a lenfositleri İgM üretiminin büyük bölümünden sorumlu olup otoimmün hastalıklarda rol oynarlar (61,62). Mizutani ve ark, 30 İTP tanılı hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre CD5+ B lenfositlerin çevresel kanda ve dalakta arttığını göstermişlerdir. Bu çalışmada ayrıca romatoid artrit ve sjögren gibi otoimmün bazı hastalıklarda CD5+ B lenfositlerin çevresel kanda arttığı gösterilmiştir. İTP hastalarında splenik CD5+ B lenfositlerin otoantikor yapımı ile ilişkili olduğu saptanmıştır (60). Van der Harst ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada İTP hastalarında CD5+B lenfosit popülasyonunun arttığı gösterilmiştir(63). Iyori ve ark. tarafından çocukluk çağındaki 29 kronik İTP tanılı hastada CD5+B lenfosit oranı ve trombosit ilişkili otoantikorlar çalışılmış ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. İki grup arasında CD5+B lenfosit oranı arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu çalışmada İTP hastalarında CD5+B lenfosit oranı ile trombosit ilişkili İgM arasında önemli bir ilişki saptanmıştır(64). Hou ve ark, İTP hastalarında splenik CD5+B lenfosit oranını, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek saptanmıştır(65). Yu ve ark, aktif İTP ve Graves hastalarında CD5+B lenfosit oranının belirgin yüksek olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada trombosit sayısı ile CD5+B lenfosit düzeyinin ters orantılı olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada yine CD5+ B lenfositlerin bazı otoimmün hastalıklarda antikor üretiminde sorumlu olabileceği sonucuna varılmıştır(66). Bizim çalışmamızda da İTP hastalarında çevresel kanda CD5+ B lenfosit oranı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı. Bugüne kadar yapılan çalışmalara dayanarak, İTP hastalarında CD5+ B lenfositleri tetikleyen mekanizma net olarak

açıklanamamış olsa da CD5+ B lenfositlerin otoantikor üretiminde sorumlu olduğu ve otoimmün yanıtı neden olabileceği sonucuna varılabilir.

Mizutani ve ark, trombosit sayısını dikkate alarak İTP hastalarında hastalığın ciddiyeti ile CD5+B lenfosit oranı arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. CD5+B lenfosit oranı ile klinik ciddiyet arasında ilişki bulunamamıştır(60). Bunun yanı sıra Maini ve Plater-Zyberg, Erhardt ve ark ve Raveche tarafından yapılan farklı çalışmalarda otoimmün bir hastalık olan Romatoid artritte CD5+B hücre oranı ile RF titresi arasında yakın bir ilişki olduğu gösterilmiştir(60).

Çalışmamızda CD5+ B lenfosit oranı ile hastalığın ciddiyeti arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Hastalığın ciddiyeti trombosit sayısı dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Trombosit sayısı <30000 olan hastalar ile trombosit sayısı >30000 üzerinde olan hastalarda CD5+B lenfosit oranı karşılaştırılmıştır. CD5+B lenfosit oranı ile hastalığın ciddiyeti arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Bunun nedeni çalışmaya dâhil edilen hasta sayısının yetersiz olması ile açıklanabilir. CD5+B lenfositlerin hastalık aktivitesi ile ilişkili olabileceğini gösteren kuvvetli kanıtlara ihtiyaç vardır. İTP tanılı hasta grubunda CD5+B lenfosit oranı ile steroid tedavisine yanıt arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

CD19 ekspresyonu B lenfosit farklılaşma ve olgunlaşma aşamalarının tümünde gözlenir. T lenfosit, granülosit ve monositlerde CD 19 ekspresyonu izlenmez (37). Zhu XJ ve ark tarafından yapılan bir çalışmada B lenfosit aktive edici faktör (BAFF) yüksekliğinin bazı otoimmün hastalıkların patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir. Laboratuvar çalışmalarında bu faktörün CD19+ ve CD8+ lenfositlerin yaşam süresini uzattığı, trombosit apoptozisini artırdığı ve İFN-gama sekresyonunu artırdığı gösterilmiştir(67). Bizim çalışmamızda İTP tanısı alan hasta grubunda CD19+ B lenfosit oranı artmış olsa da iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi. CD19+B lenfosit oranı ile trombosit sayısı ve steroid tedavisine yanıt arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi.

Etiyolojisi henüz aydınlatılmamış çeşitli nedenlerle T hücrelerinin aktivite kazandığı ve otoantikor üretiminde sorumlu olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Fakat CD5 eksprese eden T lenfositlerinin İTP hastalarında immün yanıtındaki rolü ile ilgili verilere henüz ulaşılammıştır(13). Çalışmamızda İTP tanılı hasta grubunda CD5+ lenfosit oranı anlamlı düşük saptandı. CD5 ekspresyonu çevresel kanda hem T hem de B lenfositleri tarafından eksprese edildiği bilinmektedir(34). CD5+ B lenfosit oranı hasta grubunda anlamlı yüksek saptandığından, sağlıklı grupta CD5+ lenfosit yüksekliğinin CD5 eksprese eden T lenfositlerinden kaynaklandığı düşünüldü. Çalışmamıza dayanarak CD5+ T lenfosit oranının

İTP tanılı hasta grubunda düşük olduğu sonucuna varılabilir.

Paroksizmal noktürnal hemoglobinüri(PNH) genetik bir hastalık olup CD55 ve CD59 ekspresyon eksikliği nedeni ile glikofosfatidilinozitol zincir harabiyetine yol açarak eritrosit ve lökositlerin yıkımı ile sonuçlanır(33). Son zamanlarda yapılan çalışmalara göre PNH patogenezinde hemolize yol açan esas etken CD59 eksikliğidir(69). CD55 ve CD59 ekspresyon eksikliğinde, kompleman sistemine bağlı yıkımdan eritrositler gibi trombosit ve lökositler de etkilenirler(68). Ruiz-Argüelles ve Llorente otoimmün hemolitik anemi, otoimmün trombositopeni ve SLE tanısı alan üç farklı tip sitopenisi olan hastalar üzerinde sırasıyla eritrositler, trombositler ve lenfositler üzerinde CD55 ve CD 59 ekspresyon eksikliği olup olmadığını araştırmışlardır. İTP tanısı alan 30 hasta ve 30 sağlıklı kontrol grubu arasında trombositler üzerinde CD55 ve CD59 ekspresyon oranları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada CD59 ekspresyon eksikliği ile trombositopeni ciddiyeti arasında anlamlı bir ilişki saptanmışken, CD55 ekspresyon eksikliği ile anlamlı ilişki tespit edilememiştir. CD55, CD59, ya da her ikisinin ekspresyon eksikliği ile trombosit antikorları arasında ilişki saptanmamıştır. CD55 ve/veya CD59 ekspresyon eksikliğinin otoimmün hemolitik anemi, otoimmün trombositopeni, SLE lenfopenisi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir(28). Bu çalışma ışığında CD55 ve CD59 ekspresyon eksikliğinin yalnızca PNH hastalığı ile ilişkili olmadığı, diğer otoimmün hastalıklarda da rol oynadığı sonucuna varılabilir. Bizim çalışmamızda eritrositler üzerinde CD55+CD59 ekspresyonunun İTP ile ilişkisi araştırıldı. İTP tanılı hasta grubunda CD55+CD59 eksprese eden eritrosit oranı kontrol grubuna göre anlamlı yüksek saptandı. Vakaların hiçbirinde CD55+CD59 ekspresyon eksikliği saptanmadı. Önceki çalışmada CD55+CD59 ekspresyonu trombositler üzerinde bakılmış olup bizim çalışmamızda ise CD55+CD59 ekspresyonu eritrositler üzerinde bakılmıştır. Bizim çalışmamıza göre İTP hastalarındaki otoimmün olay ile CD55+CD59 eksprese eden eritrosit oranı arasında ilişki olmadığı yada başka bir deyişle CD55+CD59 eksprese eden eritrositlerin otoimmün olaydan etkilenmediği düşünülebilir. CD59 /CD55 tek başına ya da birlikte eksprese eden hücrelerin otoimmün mekanizmaya karşı direncinden söz edebilmek için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmamızda eritrositlerdeki CD55+ 59 ekspresyonu ile trombositopeninin ciddiyeti arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. Ayrıca eritrositlerdeki CD55+ 59 ekspresyonu ile İTP hastalarında steroid tedavisine yanıt arasında ilişki saptanmamıştır.

CD41a, kalsiyum bağımlı Gp-IIb/IIIa kompleksi olup yalnızca trombosit ve megakaryosit yüzeyinde bulunan bir antijendir(39). Trombosit yüzey antijenlerine özellikle GP-IIb/IIIa kompleksine karşı oluşan antikorlar İTP patogenezinde önemli rol oynarlar(7, 8).

Kahng ve ark, 20 İTP ve 34 aplastik anemi tanısı alan hastanın trombositleri üzerinde CD41a, CD41, CD41b, CD61 ekspresyonunu sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırmışlar. CD41a ve CD41 ekspresyonu İTP hastalarında sağlıklı kontrol grubuna kıyasla anlamlı oranda azalmış olarak saptanmıştır(70). Bizim çalışmamızda da patogeneze sorumlu antikordardan ziyade antikordların bağlandığı trombosit yüzey antijeni olan CD 41a ekspresyonu araştırıldı. İTP hastalarında CD41a+ trombosit oranı sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı düşük saptandı. İTP hastalarında trombositler üzerindeki Gp-IIb/IIIa kompleksinin antikordlarla kaplı olmasının CD41a+ trombosit oranının düşük saptanmasına sebep olabileceği düşünüldü. Ayrıca trombosit sayısının az olması CD41a ekspresyon oranının düşük bulunmasına sebep olabileceği düşünüldü. İTP hastalarının hiçbirinde CD41a eksikliği saptanmadı. İTP hasta grubunda CD41a ekspresyon oranı ile trombosit sayısı arasında anlamlı bir ilişki saptandı. Ciddi trombositopenisi olan (trombosit <30000) hastalarda CD41a ekspresyon oranı trombosit sayısı >30000 olan hastalara oranla düşük bulundu. İTP hasta grubunda, steroid tedavisine cevap veren hastalar ile steroid tedavisine cevabı olmayan hastalar arasında CD41a ekspresyon oranı arasında anlamlı fark gözlenmedi.

İTP hastalarında tanı koymak için kemik iliği yapılıp yapılmamasına dair farklı görüşler bulunmaktadır. Amerikan Hematoloji Birliği sadece persistan trombositopenisi olan ve tedaviye yanıtı olmayan hastalarda kemik iliği yapılması gerektiğini belirtmişlerdir(58). İngiliz Hematoloji Birliği tarafından ise steroid tedavisinden önce kemik iliği yapılması gerektiği bildirilmiştir(59). Bizim çalışmamıza dahil edilen ciddi trombositopenisi olan (trombosit <30000) hastalara steroid tedavisine başlamadan önce kemik iliği aspirasyonu yapılarak malignite yada başka bir hematolojik hastalık olasılığı dışlanmıştır.

Çalışmamızda İTP tanısı alan hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre CD5+CD19 B lenfosit oranı kontrol grubuna göre anlamlı yüksek saptanırken, CD19+ B lenfosit oranı anlamlı olmasa da yüksek saptandı. Daha önce yapılan çalışmalara ve bizim çalışmamıza dayanarak CD19+ ve CD5+CD19 B lenfositlerin İTP hastalarında otoimmün mekanizmada rol oynadığı düşünülebilir. Tek başına CD5+ lenfosit oranının ise İTP patogenezindeki rolü net değildir. CD55+59 eksprese eden eritrosit oranı ise hasta grubunda anlamlı yüksek saptandı. Çalışmamızda ayrıca sağlıklı kontrol grubunda CD41a eksprese eden trombosit oranı İTP tanısı alan hasta grubuna kıyasla anlamlı yüksek saptandı. Çalışmamızda CD 41a ekspresyonu ile trombosit sayısı arasında anlamlı ilişki tespit edilmiş olup ciddi trombositopenisi olan hastalarda CD41 a ekspresyonu azalmış olarak bulunmuştur.

6. ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı; kronik idiyopatik trombositopenik purpura tanısı konulan hastalarda trombositlerin immün yıkımında, CD5+ B lenfositlerin ve kompleman sisteminin rolünü ve tedaviyle ilişkisini araştırmaktır.

Gereç ve yöntem: Kronik İTP tanısı konulan 20 hasta ve 20 sağlıklı kontrol grubu çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan hastaların tedavi almadan önce trombosit sayısı, lenfositler üzerinde CD5, CD19, CD5+CD19, trombositler üzerinde CD41a, eritrositler üzerinde CD55+CD59 ekspresyon oranı akım sitometri yöntemi ile analiz edildi. Tedavi sonrası hasta grubunda trombosit sayısı bakıldı. Diğer parametreler tedavi sonrası değerlendirilmedi. Kontrol grubundaki sağlıklı olgularda önce trombosit sayısı, lenfositler üzerinde CD5,CD19,CD5+CD19, trombositler üzerinde CD41a, eritrositler üzerinde CD55+CD59 ekspresyon oranı çalışıldı. İki grup arasında trombosit sayısı, CD5, CD19, CD5+CD19, CD41a, CD55+CD59 ekspresyon oranları karşılaştırıldı.

Bulgular: Çalışmamızda İTP tanısı alan hastalarda CD5+CD19 B lenfosit oranı(p= 0,01) kontrol grubuna göre anlamlı yüksek saptandı. Hasta grubunda CD5 ekspresyon oranı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük saptandı(p= 0,04). CD55+59 eksprese eden eritrosit oranı (p<0.05) ise hasta grubunda anlamlı yüksek saptandı. Kontrol grubunda CD41a eksprese eden trombosit oranı (p= 0,001) İTP tanılı hasta grubuna kıyasla anlamlı yüksek saptandı. CD 41a ekspresyonu ile trombosit sayısı arasında anlamlı ilişki tespit edilmiş olup ciddi trombositopenisi olan hastalarda CD41a ekspresyonu azalmış olarak bulunmuştur. Hasta grubunda steroid tedavisine yanıt açısından CD yüzey antijenleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

Sonuç: Çalışmamızda kronik İTP hastalarında CD5+B lenfosit oranının yüksek olduğu saptanmış olup trombositlerin immün yıkımında CD5 eksprese eden B lenfositlerin rolü olabileceği düşünüldü. Trombosit yıkımında kompleman sisteminin lizisine karşı eritrositlerdeki CD55+CD59 ekspresyonunu arasında ile ilişki olmadığı saptandı. Kronik İTP hastalarında trombosit sayısı ile CD41 a ekspresyon oranı arasında ilişki saptandı.

Anahtar kelimeler: *Kronik İTP *CD5 *CD19 * CD55 *CD59 *CD41a

7. ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to investigate the role and relation of CD 5 lymphocytes and complement system in autoimmune destruction of thrombocytes and the treatment who were diagnosed with chronic ITP.

Methods: In this study, 20 patients with chronic ITP and 20 healthy control subjects were included. Platelet count, proportion of lymphocytes bearing CD5, CD19, CD5 + CD19 and platelets bearing CD41a, red blood cells bearing CD55 + CD59 cell surface antigen were analyzed by flow cytometry method in patients with ITP before treatment and in control group. Platelet count was determined in patients with ITP after the treatment. Other parameters were not evaluated after treatment. Platelet count, proportion of CD5, CD19, CD5 + CD19, CD41a, CD55 + CD59 expressions were compared between the two groups.

Results: The percentage of CD5 + CD19 cells in peripheral blood lymphocytes was significantly increased ($p = 0.01$) in patients with ITP as compared with normal controls. The percentage of CD5+ lymphocytes significantly decreased ($p = 0.04$) in patient with ITP than the controls. The percentage of CD55 +59 red blood cells were significantly higher ($p < 0.05$) in patients group. The proportion of CD41a expression in normal controls was significantly higher ($p = 0.001$) than patient group. There was positive correlation between the percentage of CD 41a expression and platelet count. In patients with ITP, there was no significant relationship between CD surface antigen type and response to steroid therapy.

Conclusions: CD5 + B lymphocytes in patients with chronic ITP were found to be higher and CD5-B lymphocytes was thought to be responsible for immune destruction of platelets. There was no relationship between the complement system and immune destruction of platelets in this study. In patients with chronic ITP, there was no correlation between the percentage of CD41a+ platelets and platelet counts.

Keywords: *Chronic ITP *CD5 *CD19 * CD55 *CD59 *CD41a

Kaynaklar

1. Marshall Al Lichtman, Ernest Beutler, Kenneth Kaushansky, Thomas J. Kipps, Uri Seligsohn, Josef Prechal. Thrombocytopenia. Williams Hematology, Seventh Edition, 2005. 1749-1760
2. John P. Greer, John Foerster, George M. Rodgers, Frixos Paraskevas, Bertil Glader. Thrombocytopenia. Wintrobe's Clinical Hematology, Twelfth edition, Volume 2, 2008. 1289-1294
3. Anthony S. Fauci, Eugene Braunwald, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, and Joseph Loscalzo, Eds. Harrison İç Hastalıkları Prensipleri, 12. baskı, 2004; 745-749
4. Imbach P, Kuhne T, Signer E. Historical aspects and present knowledge of idiopathic thrombocytopenic purpura. British journal of Hematology, 2002; 119: 894-900
5. Stasi R, Evangelista ML, Stipa E et al. ITP in the 21st century. Hematology/ the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology 2006: 402-407
6. Terry Gernsheimer. The Oncologist Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura: Mechanisms of Pathogenesis 2009; 14: 12-21
7. McMillan R. Autoantibodies and autoantigens in chronic immune thrombocytopenic purpura. Semin Hematol 2000; 37: 239-248.
8. Escher R, Muller D, Vogel M et al. Recombinant human natural autoantibodies Against GPIIb/IIIa inhibit binding of autoantibodies from patients with AITP. Br J Haematology, 1998; 102: 820-828.
9. Kunicki TJ, Newman PJ. The molecular immunology of human platelet proteins. Blood 1992; 80: 1386-1404.
10. Cines DB, Blanchette VS. Immune thrombocytopenic purpura. New Engl J Med 2002; 346: 995-1008
11. Kravitz MS, Shoenfeld Y. Thrombocytopenic conditions—autoimmunity and hypercoagulability: Commonalities and differences in ITP, TTP, HIT, and APS. Am J Hematol 2005; 80: 232-242.
12. Roark JH, Bussel JB, Cines DB et al. Genetic analysis of autoantibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura reveals evidence of clonal expansion and somatic mutation. Blood 2002; 100: 1388-1398
13. Kuwana M, Ikeda Y. The role of autoreactive T-cells in the pathogenesis of idiopathic thrombocytopenic purpura. Int J Hematol 2005; 81: 106-112
14. Kiefel V, Freitag E, Kroll H et al. Platelet autoantibodies (IgG, IgM, IgA) against glycoproteins IIb/IIIa and Ib/IX in patients with thrombocytopenia. Ann Hematol 1996; 72: 280-285
15. Wang T, Zhao H, Ren H et al. Type 1 and type 2 T-cell profiles in idiopathic thrombocytopenic purpura. Haematologica 2005; 90: 914-923
16. Olsson B, Andersson P-O, Jernas M et al. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Nat Med 2003; 9: 1123-1124
17. Andersson PO, Stockelberg D, Jacobsson S et al. A transforming growth factor-beta1-mediated by stander immune suppression could be associated with remission of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Ann Hematol 2000; 79: 507-513
18. Per-Ola Andersson, Anna Olsson and Hans Wadenvik. Reduced transforming growth factor-β1 production by mononuclear cells from patients with active chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. British journal of haematology. 2002, vol. 116, pp. 862-867

19. Zhang F, Chu X, Wang L et al. Cell-mediated lysis of autologous platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 2006;76: 427–431
20. Li S, Wang L, Zhao C et al. CD8⁺T cells suppress autologous megakaryocyte apoptosis in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2007;139:605– 611
21. Garcia-Suarez J, Prieto A, Reyes E et al. Severe chronic autoimmune thrombocytopenic purpura is associated with an expansion of CD56⁺CD3⁻ natural killer cells subset. *Blood* 1993;82:1538 –1545
22. Chang M, Nakagawa PA, Williams SA et al. Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 2003;102:887– 895.
23. Liu B, Zhao H, Poon MC, Han Z, Gu D, Xu M, Jia H, Yang R, Han ZC Abnormality of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in idiopathic thrombocytopenic purpura, *European Journal of Haematology*, (2006), 78:139-143
24. Meabed HM, Taha GM, Mohamed SO, El-Hadidy KS. Autoimmune thrombocytopenia: Flow cytometric determination of platelet-associated CD154/CD40L and CD40 on peripheral blood T and B lymphocytes, *Hematology*, (2007), 12:4,301-307
25. Kosugi S, Kurata Y, Tomiyama Y et al. Circulating thrombopoietin level in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1996;93:704–706.
26. Aledort LM, Hayward CPM, Chen M-G et al. Prospective screening of 205 patients with ITP, including diagnosis, serological markers, and the relationship between platelet counts, endogenous thrombopoietin, and circulating antithrombopoietin antibodies. *Am J Hematol* 2004;76:205–213.
27. Mizutani H, Furubayashi T, Kashiwagi H. B cells expressing CD5 antigen are markedly increased in peripheral blood and spleen lymphocytes from patients with immune thrombocytopenic purpura *British journal of Haematology*. 1991, 78, 474-479
28. Alejandro Ruiz-Argüelles, Luis Llorente, The role of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in the pathogenesis of autoimmune hemocytopenias, *Autoimmun Rev.* 2007 Jan;6(3):155-61. Epub 2006 Oct 16. Review.
29. Telen MJ, Green AM. The Inab phenotype: characterization of the membrane protein and complement regulatory defect. *Blood* 1989;74:437–41.
30. Meri S, Waldman H, Lachmann PJ. Distribution of protecting (CD59), a complement membrane attack inhibitor, in normal human tissues. *Lab Invest* 1991;65:532–7.
31. Lachmann PJ. The control of homologous lysis. *Immunol Today* 1991;12:312–5.
32. Brodbeck WG, Kuttner-Kondo L, Mold C, Medof ME. Structure/function studies of human decay accelerating factor. *Immunology*. 2000;101:104-111
33. Besler M, Mason PJ, Hillmen P, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene. *EMBO J.* 1994;13:110-117
34. Uliveri C, Valensin S, Majolini MB, Mathews RJ, 2003. Normal B1 cell development by defective BCR signaling in *lck*^{-/-} mice. *Eur J Immunol.* 33:441-445.
35. Warnke R, Miller R, Grogan T. Immunologic phenotype in 30 patients with diffuse large cell lymphoma. *N Eng J Med.* 1980;303:293-300

- 36.Reichert T,DeBruyere M,Deneys V,et al.Lymphocyte sunset reference ranges in adult Caucasians.Clin immunol Immunopath.1991;60:190-208
- 37.Loken MR,Shah VO,Dattilio KL,Civin CI.Flowcytometric analysis of human bone marrow.II.Normal B lymphocyte development.Blood.1987;70:1316-1324.
- 38.Beyaz F,B lenfositlerin gelişimi ,fonksiyonları ve histokimyasal özellikleri,Erciyes Üniv.Vet Fak Derg 2004:67-72
39. Debili N, Robin C, Schiavon V, Letestu R, Pflumio F, Mitjavila-Garcia MT, Coulombel L, Vainchenker W: Different expression of CD41 on human lymphoid and myeloid progenitors from adults and neonates. Blood. 2001 Apr 1;97(7):2023-30
40. Dr. Klara Dalva. Hematoloji'de Akım Sitometri Kullanımı. Temel Moleküler Hematoloji Kursu. 2005
41. Keren DF, Hanson CA, Hurtubise PE. Flow cytometry and clinical diagnosis. Chicago: ASCP Press, 1994:664 pp..
42. Leucocyte Typing VI. Edition Kishimoto ve ark. Oxford University Press, 1997
- 43..Mason D ve arkCD antigens 2001.International Immunology: 2001 :1095-98
44. Essential Immunology.Ninth Edition.Ivan Roitt.Blackwell Science Publishing,1997
45. Blood .Second Edition.Principle and Practice of Hematology.2003
- 46.George JN,Woolf SH, Raskop GE:idiopathic thrombocytopenic purpura:Aguideline for diagnosis and management of children and adults.American Society of Hematology.Ann Med 30:38;1998
- 47.Baumann MA,Menitove JE, Aster RH,Anderson T:Urgent treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura with single dose gammaglobulin infusion followed by platelet transfusion.Ann Intern Med 104:808,1986
- 48.Gernsheimer T,Stratton J,Balem PJ,Slichter SJ:Mechanism of response to treatment in autoimmune thrombocytopenic purpura.N Engl J Med. 320:974,1989
- 49.Cheng Y,Wong RS,Soo YO,,et al:Initial treatment of immune thrombocytopenic purpura with high dose dexamethazone.N Engl J Med 349:831,2003
- 50.Bussel JB,Pham LC,Aledort L,Nachman R:Maintenance treatment of adults with chronic refractory immune thrombocytopenic purpura using repeated intravenous of gammaglobulin.Blood 72:121,1998
- 51.Berchtold P,Dale GL,Tani P,Mc Millian R:Inhibition of autoantibodybinding to platelet glycoprotein IIb/IIIa by anti-idiotypic antibodies in intravenous gammaglobulin.Blood 74:2414,1989
- 52.Hong F,Ruiz R,Price H,et al:Safety profile of WinRo anti-D.Semin Hematol 35:14,1998
- 53.Lopez ja,Andrews RK,Afshar-Kharghan V,BerndtMC:Bernard Soulier syndrome.Blood 91:4397,1998
- 54 .Hughes M,Webert K,Kelton jg:The use of electron microscopy in the investigation of tje ultrastructural morphology of immune thrombocytopenic purpura platelets.Semin Hematol 37:222,2000
55. Evans RS,Takahashi K,Duane RT,et al:Primary thrombocytopenic purpura and acquired hemolytic anemia;evidence for a common etiology.Arc Intern Med 87:48,1951
- 56 .Kelton JG,Murphy WG, Lucarelli A,et al:A prospective comparision of four techniques for measuring platelet associated IgG.Br J Hematol 71:97,1989
57. Chong BH,Keng TB:Advances in the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura.Semin Hematol 37:249,2000

58. George JN, Woolf SH, Raskob GE et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood*. 1996; 88:3-40.
59. British Committee for Standards in Haematology GHTF. Guidelines for the investigation and management of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults, children and in pregnancy. *Br J Haematol*. 2003; 120:574-96.
60. Mizutani H, Furubayashi T, Kashiwagi H, et al. B cells expressing CD5 antigen are markedly increased in peripheral blood and spleen lymphocytes from patients with immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1991, 78, 474-479
61. Duan B, Morel L. Role of B-1a cells in autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2006 Jul;5(6):403-8.
62. Kasaian MT, Casali P. Autoimmunity-prone B-1 (CD5⁺ B) cells, natural antibodies and self recognition. *Autoimmunity*. 1993;15(4):315-29
63. Van der Harst D, de Jong D, Limpens J, et al. Clonal B-cell populations in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 1990 Dec 1;76(11):2321-6.
64. Iyori H, Fujisawa K, Akatsuka J. Autoantibodies and CD5⁺ B cells in childhood onset immune thrombocytopenic purpura. *Acta Paediatr Jpn*. 1995 Jun;37(3):325-30.
65. Hou M, Lv B, He Q et al. Both splenic CD5⁺ B and CD5⁻ B cells produce platelet glycoprotein-specific autoantibodies in chronic ITP. *Thromb Res*. 2003 Apr 15;110(1):1-5.
66. Yu JR, Qiu ZX, Yang H. [CD5⁺ B cells and autoimmune diseases. (Article in Chinese)] *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 1994 Sep;33(9):590-2.
67. Zhu XJ, Shi Y, Peng J, Guo CS, Shan NN, Qin P, Ji XB, Hou M. The effects of BAFF and BAFF-R-Fc fusion protein in immune thrombocytopenia. *Blood*. 2009 Dec 17;114(26):5362-7. Epub 2009 Sep 30.
68. Devine DV, Siegel RS, Rosse WF: Interactions of the platelets in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with complement. Relationship to defects in the regulation of complement and to platelet survival in vivo. *J Clin Invest* 79:131, 1987
69. Yamashina M, Ueda E, Kinoshita T, et al: Inherited complete deficiency of 20-kilodalton homologous restriction factor (CD59) as a cause of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 323:1184, 1990.
70. Kahng J, Park HH, Han K, Choi BY, Lee W. Quantitative comparisons of antibody-binding sites of platelet glycoprotein IIb/IIIa in aplastic anemia and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Clin Lab Sci*. 2008 Winter;38(1):6-11.

