

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ÇOCUK HEMATOLOJİ BİLİM DALI

AKUT VE KRONİK
İDİOPATİK TROMBOSİTOPENİK PURPURALI ÇOCUKLARDA
MEGAKARYOSİT APOPTOZU

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

107957

Yandal Uzmanlık Tezi

Uz. Dr. Canan Uçar

Tez Yöneticisi

Doç. Dr. Hale Ören

İzmir- 2001

107957

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2. 1. İDİOPATİK TROMBOSİTOPENİK PURPURA	3
2. 1. 1. PATOGENEZ	4
2. 1. 1. 1. Trombosit Antijen ve Otoantikorları	4
2. 1. 1. 2. İmmün regülasyon	6
2. 1. 2. KLİNİK ÖZELLİKLER VE TANI	7
2. 1. 3. AYIRICI TANI	10
2. 1. 4. TEDAVİ	11
2. 1. 4. 1. Glukokortikoidler	12
2. 1. 4. 2. IVIG	13
2. 1. 4. 3. Anti-Rh (D)	14
2. 1. 4. 4. Splenektomi	14
2. 1. 4. 5. Diğer alternatif tedaviler	15
2. 2. MEGAKARYOSİTOPOEZİS	16
2. 3. APOPTOZİS	22
3. HASTALAR VE YÖNTEM	28
3.1. Hastalar	28
3. 2. Yöntem	28
3. 2. 1. Gerekli araç ve malzemeler	28
3. 2. 2. Mononükleer hücre izolasyonu	29
3. 2. 3. Adherent hücre deplesyonu	30
3. 2. 4. Megakaryosit izolasyonu	30
3. 2. 5. Megakaryositlerin Fiksasyonu	31
3. 2. 6. TUNEL Tekniği ile kantitatif apoptozis analizi	31
3. 2. 6. 1. APO-DIRECT™ Kit	32
3. 2. 6. 2. Hücrelerin Boyanması	34
3. 2. 6. 3. Flowsitometrede örneklerin analizi	35
3. 3. İstatistik yöntemler	36

4. BULGULAR.....	37
5. SONUÇLAR.....	42
6. TARTIŞMA.....	45
7. ÖZET	50
8. SUMMARY	51
9. KAYNAKLAR.....	52
10.EKLER	66
10.1. Hasta veri formu	67
10.2. Hastaların klinik ve laboratuvar verileri.....	68
10.3. Hastaların flowsitometredeki apoptozis sonuçları	70



KISALTMALAR

ITP: İdiopatik trombositopenik purpura

Gp: Glikoprotein

IL: İnterlökin

IF: İnterferon

IVIG: İntravenöz İmmunglobulin

TNF: Tümör Nekrozis Faktör

RES: Retiküloendotelyal sistem

FcRs: Fc reseptörleri

TPO: Trombopoetin

EPO: Eritropoetin

DNA: Deoksinükleik asit

m RNA: Messenger Ribonükleik asit

PARP: Poli adenil riboz fosfat

d- UTP-FITC: Floresan işaretli deoksi-uridin trifosfat

PMkB: Promegakaryoblast

IAP: Apoptoz inhibitör protein

MHPP-CFC : "High proliferative potential colony forming cell"

BFU-Mk : "Burst-Forming unit-megakaryocyte"

CFC-Mk : "Colony Forming cell-megakaryocyte"

GM-CSF : "Granulocyte- Macrophage colony stimulating factor"

G-CSF : "Granulocyte colony stimulating factor"

M-CSF : "Macrophage colony- stimulating factor"

ICE: "Interleukin-1 β converting enzyme"

HIV: "Human Immundeficiency virus"

FLIP: "Flice inhibitory protein"

TRAIL: "TNF related apoptosis inducing ligand"

FADD: "Fas associated death domain"

LIF: "Leukemia inhibitory factor"

TGF- β 1: "Transforming growth factor - β 1"

TUNEL: "Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) –mediated d-UTP –biotin nick end-labeling"

FCS: Fötal calf serum

PBS: Fosfat buffer saline

PI: "Propidium iodide"

SCF: "Stem cell factor"

ASH: "American Society of Hematology"



1. GİRİŞ VE AMAÇ

İdiopatik trombositopenik purpura (primer immün trombositopenik purpura, ITP); çocuk ve erişkin yaş grubunda akkız olarak görülen, klinik bulgu olmadan sadece trombositopeni ile seyreden, diğer trombositopeni nedenlerinin ekarte edilmesiyle tanı konulabilen bir hastalıktır (1). ITP; çocukluk yaş grubunda akut trombositopeninin en sık nedenlerinden biridir (2). Çocuklarda görülme insidansı erişkinlerden fazladır, yılda milyonda 46 yeni vaka olarak bildirilmiştir (3,4).

ITP; akut, kronik veya rekürren olarak seyretmektedir. Akut formu sıklıkla çocuklarda, kronik formu ise genç erişkinlerde görülmektedir. Çocukluk çağında ITP'nin % 80-90 oranında akut seyrettiği, geçici bir kanama epizodu olduğu, bir kaç gün ile altı ay içinde düzeldiği bilinmektedir. Trombositopeni altı aydan uzun sürerse kronik ITP olarak adlandırılmaktadır. Çocuklardaki kronik ITP erişkinlerde görülen klinik özelliklere benzerlik göstermektedir. Çoğunlukla belirgin bir klinik bulgu göstermeden sinsi seyretmekte, adölesan yaşta ve kızlarda daha sık görülmektedir (5). Trombositopeni ataklarının aralıkları üç aydan daha uzun sürerse rekürren ITP olarak adlandırılmaktadır. Rekürren ITP; kronik ITP'nin bir formu olarak düşünülmekte ve ITP'li çocukların %1-4'ünde görülmektedir (5,6).

ITP'de trombositopeninin bilinen sebebi trombositlerin erken yıkılmasıdır. Trombosit yüzeyine karşı otoantikor oluşumu, bu otoantikorlarla kaplı trombositlerin retiküloendotelial sistem (RES)'in makrofajları üzerindeki Fc reseptörleri (FcRs) tarafından tanınması ve fagositoz ile ortamdan uzaklaştırılması ITP'nin bilinen temel fizyopatolojisi (2).

Yapılan çalışmalarda ITP hastalarının çoğunda plazmalarında ve trombositleri üzerinde Glikoprotein (Gp)IIb/IIIa, GpIbIX, GpIaIIa, GpV, GpIV ve diğer spesifik trombosit glikoproteinlerine karşı IgG ve/veya IgM tipinde otoantikorlar tanımlanmıştır (7-10). Ancak son yıllarda geliştirilen ileri tekniklerle bile ITP'li hastaların en az %20'sinde halen anti-trombosit antikorlar tespit edilememektedir (11). Bu durum fizyopatolojide başka mekanizmalar olduğunu düşündürmekte ve muhtemel mekanizmaları aydınlatmak için çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Ayrıca ITP patofizyolojisinde suçlanan anti-trombosit antikorların ITP için spesifik olmadığı, trombositopeni ile giden aplastik anemi ve lösemi gibi çok sayıda hastalıkta da

bulunduğu bilinmektedir (12-14). Bu nedenle ITP'nin kesin tanısında trombosit antikor testlerinin kullanılması uygun görülmemektedir.

Trombositler gibi megakaryositlerin de maturasyon sırasında yüzeylerinde GpIIb/IIIa ve GpIb eksprese ettikleri gösterilmiştir. Plazmada bu glikoproteinlere karşı bulunan antikorların megakaryositlere de bağlandığı ve in vitro şartlarda megakaryosit üretimini azalttığı gösterilmiştir (15,16). Bu antikorların megakaryositlerin çoğalmalarını ve matürasyonlarını bozabileceği, hatta kompleman aktivasyonu veya fagositoz ile erken yıkılmalarına sebep olabileceği düşünülmektedir (17).

ITP'de artmış trombosit yıkımı, megakaryopoezin stimülasyonuna neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda artmış megakaryosit koloni formasyonu gösterilmiş, ancak bazı çalışmalarda ise megakaryosit progenitörlerinin gelişiminde supresyon ve/veya maturasyon duraklaması bildirilmiştir. Bu bulgular ITP patofizyolojisinde ineffectif megakaryopoezisin de suçlu olabileceğini göstermektedir (18).

Akut ve kronik ITP'nin insidansı, prognozu ve tedavisi farklılık göstermektedir. Uzun zamandır akut ve kronik ITP'nin farklı hastalıklar olduğuna inanılmakta ve bu iki klinik tablonun bir sendromun iki spektrumu olduğu düşünmektedir (19). ITP'li hastalarda hücresel immünite ile ilişkili çok sayıda patoloji tanımlanmıştır. Kronik ITP'li hastalarda T hücre aktivasyonunu yansıtan; İnterlökin-2 (IL-2), interferon-gama (IFN- ) ve/veya IL-10'un artmış serum konsantrasyonları bildirilmiş, ancak akut ITP'li hastalarda bu durum gösterilememiştir. IFN- , IL-2 ve IL-10'un serum düzeylerindeki farklılıklar kronik ve akut ITP'nin patogenezinde farklı mekanizmaların rol oynadığını desteklemektedir (20,21).

Bu bilgiler; ITP patogenezinde henüz bilinmeyen pek çok mekanizmanın olduğunu, akut ve kronik ITP'nin farklı mekanizmalar ile meydana geldiğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada akut ve kronik ITP'li çocukların kemik iliği örneklerinde megakaryosit apoptozunun ITP patogenezindeki rolünün araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. İDİOPATİK TROMBOSİTOPENİK PURPURA

İdiopatik trombositopenik purpura (primer immün trombositopenik purpura, ITP); çocuk ve erişkin yaş grubunda akkiz olarak görülen, klinik bulgu olmadan sadece trombositopeni ile seyreden, diğer trombositopeni nedenlerinin ekarte edilmesiyle tanı konulabilen bir hastalıktır (1).

ITP'de trombositopeninin bilinen sebebi trombositlerin erken yıkılmasıdır. Trombosit yüzeyine karşı otoantikör oluşumu, bu otoantikörlerle kaplı trombositlerin RES'in makrofajları üzerindeki FcRs tarafından tanınması ve fagositoz ile ortamdan uzaklaştırılması ITP'nin bilinen temel fizyopatolojisidir (2).

ITP; çocukluk yaş grubunda en sık akut trombositopeni nedenlerinden biridir (2). Çocuklarda görülme insidansı erişkinlerden fazladır, yılda milyonda 46 yeni vaka olarak bildirilmiştir (3,4). En sık görülme yaşı 2-4 yaştır ve her iki cinsiyette de eşit oranda görülmektedir (22,23).

ITP bir grup hastalıkla birlikte görülebilmektedir. Enfeksiyonlar, kollajen doku hastalıkları, kemik iliği transplantasyonu sonrası trombositopeni, neonatal alloimmün trombositopeni, posttransfüzyon purpura, ilaca bağlı immün trombositopenik purpura seyrinde görülen ITP, sekonder ITP olarak adlandırılmaktadır (5, 19).

ITP; akut, kronik veya rekürren olarak seyretmektedir. Akut formu sıklıkla çocuklarda, kronik formu ise genç erişkinlerde bildirilmektedir. Çocukluk çağında ITP'nin % 80-90 oranında akut seyrettiği, geçici bir kanama epizotu olduğu, bir kaç gün ile altı ay içinde düzeldiği bilinmektedir. Trombositopeni altı aydan uzun sürerse kronik ITP olarak adlandırılmaktadır. Çocuklardaki kronik ITP erişkinlerde görülen klinik özelliklere benzerlik göstermektedir. Çoğunlukla belirgin bir klinik bulgu göstermeden sinsi seyretmekte, adölesan yaşta ve kızlarda daha sık görülmektedir (5). Trombositopeni ataklarının aralıkları üç aydan daha uzun sürerse rekürren ITP olarak adlandırılmaktadır. Rekürren ITP, kronik ITP'nin bir formu olarak düşünülmekte ve ITP'li çocukların %1-4'ünde görülmektedir (5,6).

2. 1. 1. PATOGENEZ

ITP'de klinik semptom ve bulguların sebebi dalak, karaciğer, kemik iliği ve akciğerde trombosit yıkım hızının artmasıdır. Trombositopeninin düzeyi, megakaryositler tarafından trombosit üretim hızı ile duyarlı trombositlerin yıkım hızları arasındaki dengeyi yansıtmaktadır (5).

Akut ITP'nin patogenezinde sıklıkla bir enfeksiyon sonrası uygunsuz immün yanıt oluşması suçlanmaktadır. Spesifik olarak trombosit membranına karşı oluşan antikorlar ve primer veya hastalığa bağlı oluşan immün kompleksler, nonspesifik olarak trombosit yüzeyine absorbe olmakta, opsonizasyona ve genç trombositlerin yıkımına neden olmaktadır. ITP'de ⁵¹Cr veya ¹¹¹İndiyum oxine ile otolog veya homolog işaretli trombositlerin ömrünün kısaldığı gösterilmiştir (24-26).

2. 1. 1. 1. Trombosit Antijen ve Otoantikorları

İlk kez 1951'de ITP'li hastaların transfer edilebilen plazma faktörüne sahip olduğu ve sağlıklı kişilere ITP'li hastaların plazması verildiğinde, onlarda da ITP gözleendiği bildirilmiştir (27). Daha sonra Shulman ve ark. serolojik testlerle bu faktörün IgG olduğunu göstermişlerdir (28). 1982 yılında van Leeuwen ve ark. kronik ITP'li hastalardan elde edilen antikorların, trombositlerinde glikoprotein (Gp) IIb/IIIa bulunmayan trombastenili hastaların trombositlerine bağlanmadığını göstermişlerdir (29). Böylece ITP'de oluşan antikorların trombosit yüzeyindeki GpIIb/IIIa'ya karşı olduğu tespit edilmiştir.

Bundan sonra yapılan çalışmalarda çoğu ITP hastasının plazmasında ve trombositleri üzerinde GpIIb/IIIa, GpIb/IX, GpIa/IIa, GpV, GpIV ve diğer spesifik trombosit glikoproteinlerine karşı IgG, IgA ve/veya IgM tipinde otoantikorlar tanımlanmıştır (7-10). Hastaların %50-85'inde IgG tipi otoantikorlar, %50'sinde sıklıkla diğer tip antikorlarla birlikte IgA tipi antikorlar, çok küçük bir grupta ise yine diğer tip otoantikorlarla birlikte IgM tipi antikorlar tanımlanmıştır. Trombosit sayısı ile en fazla korelasyon gösteren antikorlar IgM tipi antikorlardır (30,31). Trombosit üzerindeki GpIIb/IIIa veya GpIb/IX kompleksleri, ITP ile ilişkili antikorların esas bağlanma yerleridir. Ayrıca ITP'de bazı antikorların glikolipitlere de bağlanabildiği gösterilmiştir (32).

1987'de hem trombosit üzerindeki hem de plazmadaki serbest otoantikorları belirleyebilen "immunobead assay" ve "monoclonal antibody- specific immobilization of platelet antigens (MAIPA)" adında iki ölçüm yöntemi geliştirilmiştir (33,34). Ancak

bu yöntemlerle bile ITP'li hastaların en az %20'sinde halen anti-trombosit antikorlar tespit edilememektedir (11). Bu durum ITP fizyopatolojisinde başka mekanizmalar olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca ITP patofizyolojisinde suçlanan bu anti-trombosit antikorların ITP için spesifik olmadığı, trombositopeni ile giden aplastik anemi ve lösemi gibi çok sayıda hastalıkta da bulunduğu bilinmektedir (12-14). Bu nedenle ITP'nin kesin tanısında trombosit antikor testlerinin kullanılması uygun görülmemektedir.

Trombositler gibi megakaryositlerin de maturasyon sırasında yüzeylerinde GpIbIIIa ve GpIb eksprese ettikleri gösterilmiştir. Plazmada bu glikoproteinlere karşı bulunan antikorların megakaryositlere de bağlandığı ve in vitro şartlarda megakaryosit üretimini azalttığı gösterilmiştir (15,16). Bu antikorların megakaryositlerin çoğalmalarını ve matürasyonlarını bozabileceği, hatta kompleman aktivasyonu veya fagositoz ile erken yıkılmalarına sebep olabileceği düşünülmektedir (17).

Kontrollü bir laboratuvar çalışmada, çocuk ve erişkin kronik ITP'li hastaların trombosit ve plazma örneklerinde glikoprotein antikorları araştırılmıştır (35). Orta düzeyde otoantikor miktarına sahip, büyük olasılıkla spontan remisyona giren, trombosit sayısını $20-150 \times 10^9/L$ arasında tutan kompanze hastalığı olan çocukların küçük yaşta olduğu, yüksek otoantikor titresine sahip adölesan hastaların ise erişkin hastalara benzer şekilde düşük oranda spontan remisyon ve kompanzasyon gösterdiği bulunmuştur. Bu bilgiler çocukluk çağında ITP'nin farklı formlarının olduğunu göstermektedir.

Kronik ITP'de trombosit üretiminin azalması (viral enfeksiyon gibi bir nedenle) veya artmış otoantikor üretimi ve/veya trombosit tüketimi gibi faktörlerin arasındaki dengenin bozulmasıyla hastalarda rekürrens görülmektedir. Bununla beraber kompanze evredeki ITP'li bir annenin bebeğinde neonatal trombositopeni riski bulunmaktadır (5).

Trombosit yıkım mekanizmaları Şekil 1'de gösterilmektedir (36). Trombositlerin yıkımı; otoantikorların antijenik bölgeye veya immün komplekslerin trombosit yüzeyindeki FcRs'ne bağlanması sonucunda olmaktadır. Oponize olmuş bu trombositler mononükleer fagositik sistem hücreleri tarafından hızla uzaklaştırılmaktadır. Antikor titresi trombositopeninin derecesi ile korelasyon göstermektedir (37). Trombositlerin fagositozu, monoklonal anti-Fc reseptör antikorları ile RES'i bloke eden in vitro çalışmalarla gösterilmiştir (38). Komplemanın rolü trombosit ile ilişkili C4 ve C3 artışı ile ispatlanmıştır. İn vitro çalışmalar hastanın

tanımlanmıştır (41-44). HLA-DR moleküllerinin artmış serum düzeyleri gösterilmiştir (45-46). Akut ITP'de IFN- γ gibi proinflatuar sitokinler tarafından HLA-DR molekülünün yüzey ekspresyonunda geçici bir artış tespit edilmektedir. İmmün aktivasyonun sonucu olarak IL-2'nin serum düzeyinde artış, ITP gibi otoimmün hastalıklarda gözlenmektedir (20). Buna paralel olarak IL-10'un yüksek serum düzeyleri belirlenmektedir. IL-10, insan B hücreleri için güçlü bir stimulatördür. Ayrıca IL-10, T hücreleri (Th1) ve monosit/makrofajlar tarafından inflammatuar sitokinlerin üretimini azaltmaktadır (47,48). IL-2, IFN ve/veya IL-10'un artmış serum konsantrasyonları in vitro T hücre aktivasyonunu yansıtmaktadır, kronik ITP'li hastalarda gözlenmekte, akut ITP'li hastalarda gözlenmemektedir (20,21). Kronik ITP'li hastalardaki IL-2'nin artmış serum konsantrasyonları, trombositin stimüle ettiği T helper hücreleri tarafından in vitro IL-2 sekresyonu ile önemli düzeyde korelasyon göstermektedir (20).

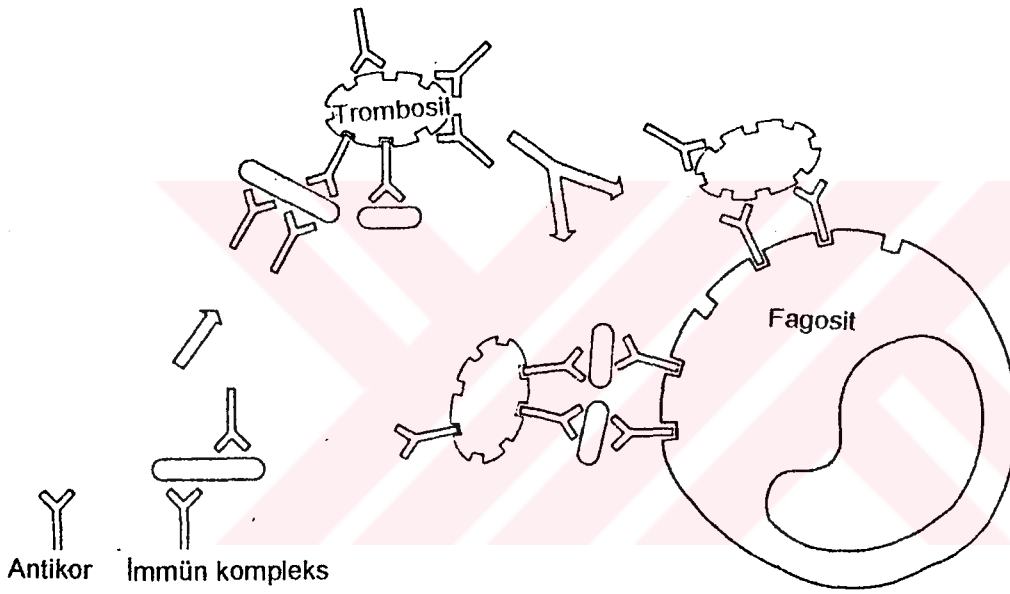
IFN- γ , IL-2 ve IL-10'un serum düzeylerindeki farklılıklar kronik ve akut ITP'nin patogenezinde farklı mekanizmaların rol oynadığını desteklemektedir. Akut ITP'nin bir enfeksiyöz ajana karşı yönlendirilmiş immün yanıtın çapraz reaktivitesi nedeniyle olduğu düşünülmektedir (49). Tersine kronik ITP'nin nedeni olarak, spesifik otoantikor üretiminin, T hücre aktivasyonunun ve sitokin üretiminin artması ile HLA-DR'nin stimüle ettiği sabit bir immün yanıt düşünülmektedir (5). Bununla beraber ITP'nin her iki formunda da immün yanıtın sonlandırılması için kritik bir feedback mekanizmanın bozukluğu varsayılmaktadır.

2. 1. 2. KLİNİK ÖZELLİKLER VE TANI

Çocukların çoğunda enfeksiyöz bir hastalıktan 1-6 hafta sonra trombositopeni görülmektedir. Çocukluk çağındaki ITP'lerde enfeksiyon öyküsü %50-65 olarak bildirilmektedir (2,5). Çoğunlukla bakteriyel veya nonspesifik viral bir ajan geçirilen üst solunum yolu veya gastrointestinal sistem enfeksiyonuna neden olmaktadır. ITP ayrıca kızamıkçık, kızamık ve suçiçeği canlı virüs aşılardan sonra da görülebilmektedir. Kanama bulguları trombositopeninin derecesine bağlıdır, sıklıkla kolay morarma ve ciltte peteşiler ilk bulgulardır ve trombosit sayısı $20 \times 10^9/L$ 'nin altında olduğu zaman gözlenmektedir. Trombosit sayısı $10 \times 10^9/L$ 'nin altında olduğu zaman ise ağır mukozal kanamalar, hematüri ve menoraji görülmektedir. İntrakranial kanama riski hastaneye yatırılan ITP'li çocukların %0.5-1'in de bildirilmiştir ve bu hastaların üçte biri kaybedilmektedir. İntrakranial kanama riski trombositopeninin ilk

plazması ve taze serumu ile trombositlerin inkübasyonundan sonra C4 ve C3 bağlanmasının trombosit lizisi ile sonuçlandığını göstermektedir (39).

ITP'de artmış trombosit yıkımı megakaryopoezis stimülasyonuna neden olmaktadır. Yapılan bir çalışmada artmış megakaryosit koloni formasyonu gösterilmiş, ancak megakaryosit progenitörlerinin gelişiminde supresyon ve/veya maturasyon duraklaması bildirilmiştir. Bu bulgular ITP patofizyolojisinde ineffectif megakaryopoezisin de suçlu olabileceğini göstermektedir (18). Başka bir çalışmada kronik ITP'de in vitro megakaryosit koloni formasyonunun azaldığı gösterilmiştir (40).



Şekil 1. ITP'de trombosit yıkım mekanizmaları.

2. 1. 1. 2. İmmün regülasyon

Normal şartlarda immün yanıt çok iyi regüle edilmektedir. Antijen sunan hücre tarafından başlatılan immün yanıt, humoral ve hücrel immünite, hücre-hücre interaksiyonları ve lenfokin üretimi ile aktive edilmektedir. Sonuçta; sitotoksik T efektör hücrelerin oluşumu ve spesifik antikor sekresyonu gerçekleşmektedir. Muhtemelen T hücre supresyonu ve anti-idiotipik antikorların oluşumu regülatuar mekanizmalar olarak spesifik stimulusa immün yanıtın süresini ve derecesini azaltmaktadır (5). ITP'de kendi kendine toleransın oluşması ve efektif immün yanıt, inflamatuvar işlemin trombosit dışında diğer hedef hücrelere yönlendirilmesi ile sağlanabilmektedir. ITP'li hastalarda hücrel immünite ile ilişkili çok sayıda patoloji

günlerinde daha fazladır, ancak ITP'nin her döneminde görülebilmektedir. Salisilat içeren ilaçların ve antihistaminiklerin kullanımı kanama riskini arttırabilmektedir (5,50). ITP'li çocuklarda en sık ölüm nedeni intrakranial kanamalar olarak bildirilmiştir. İkinci sırada ise splenektomi sonrası sepsisler yer almaktadır (5,50).

Tedaviden bağımsız olarak, çocukluk çağındaki ITP'li hastaların tam remisyon olasılığı tanıdan altı ay sonrasına kadar %80-90, tanıdan 3-37 yıl sonra ise %90'ın üzerindedir. Çocukluk çağında ITP'li hastaların %3-5'ı kronikleşme göstermektedir. Kronik ITP olan çocukların çoğunun, tanı anında yedi yaş ve üzerinde olduğu gösterilmiştir. Postenfeksiyöz ITP olanlarda kronikleşme olasılığının düşük olduğu bildirilmiştir. Tanıdan 2-4 hafta öncesinde var olan purpura öyküsü, kız cinsiyet, tanıda trombosit sayısının $20 \times 10^9/L$ 'nin üzerinde olması, tanıdan bir ay ve üç ay sonra trombosit sayısının normalin altında olması kronikleşme için riski arttıran faktörlerdir (5,51).

ITP'de hikaye, fizik muayene ve periferik kan incelemesindeki karakteristik bulgular Tablo 1'de özetlenmiştir (1). Tanı için hastalarda kanama ve trombositopeni dışında anormal fizik muayene bulgusu olmamalıdır. Tipik semptom ve bulguları olan hastalarda ITP tanısı için kemik iliği aspirasyon incelemesine gerek olmadığı bildirilmiştir (1). Bir çalışmada klinik olarak ITP tanısı almış 127 çocuğa kemik iliği aspirasyonu yapılmış ve sadece 5 (%4) hastada ITP ile uyumlu olmayan anormal sitolojik bulgular tespit edilmiştir. Bu beş hasta incelendiğinde başlangıçta atipik bulguları olduğuna dikkat çekilmiştir (52). Başka bir çalışmada tipik ITP bulguları olan 322 çocuğa kemik iliği aspirasyonu yapılmış, sadece bir vaka lösemi tanısı almıştır (53). Pediatrik Onkoloji Grubunda tanı almış 2239 akut lenfoblastik lösemili çocuk incelendiğinde, tam kan sayımı ve periferik yayma bulguları normal olan, sadece trombositopeni ile başvuran hasta olmadığı bildirilmiştir (54). ITP'de kemik iliği aspirasyon incelemesi; açıklanamayan anemi, anormal beyaz küre sayımı veya periferik yayma bulguları varlığında, hikaye ve fizik muayene ile kemik iliğini tutan hastalıklar düşünüldüğünde, steroid tedavisi verilmeden önce, intravenöz immunglobulin (IVIg) tedavisine yanıt alınamamışsa ve kronik ITP'lerde yapılmalıdır (1,2).

Tablo 1. İmmün trombositopenik purpura şüphesi olan bir çocukta hikaye, fizik muayene ve periferik kan incelemesinde dikkat edilecek noktalar (1).

Hikaye

- Kanama semptomları

Kanamamanın tipi

Kanamamanın şiddeti

Kanamamanın süresi

Daha önceki kanamaların hikayesi

- Sistemik semptomlar

Son altı hafta içinde geçirilmiş enfeksiyon veya aşılama hikayesi

İmmün yetmezliği düşündürecek tekrarlayan enfeksiyon hikayesi

Otoimmün hastalık semptomları

- İlaçlar

Heparin, sulfanamidler ve kinidin/kinin trombositopeniye sebep olabilir

Aspirin kanamayı arttırabilir

- Human immundeficiency virus (HIV) enfeksiyonu riski (Maternal HIV dahil)
- Trombositopeni veya kanama hastalıklarına yönelik aile hikayesi
- Altı aydan küçük infantlarda perinatal ve maternal öykü
- Kanama riskini arttırabilecek diğer durumlar
- Yaşam şekli (travmatik aktiviteler vs.)

Fizik muayene

- Kanama bulguları

Kanamamanın tipi (retinal kanama dahil)

Kanamamanın şiddeti

- Karaciğer, dalak ve lenf nodu palpasyonu
- Enfeksiyon bulguları
- Konjenital hastalığı destekleyen dismorfik bulguların bulunması (iskelet anomalisi)
- Spesifik konjenital sendromların ekarte edilmesi

Fanconi aplastik anemisi

TAR sendromu (thrombocytopenia with absent of radii)

Wiskott-Aldrich sendromu

Alport sendromu ve varyantları

Bernard-Soulier sendromu

May-Hegglin sendromu

Gri trombosit sendromu

Tam kan sayımı ve periferik kan incelemesi

- Trombositopeni (trombositler normal veya normalden biraz büyük hacimde olabilir, ancak eritrosit büyüklüğüne yakın dev trombositler olmamalıdır)
- Eritrosit morfolojisi normal olmalıdır.
- Retikülosit sayısı normal olmalıdır.
- Lökositoz veya lökopeni olmamalı, lökosit morfolojisi normal olmalıdır.

2. 1. 3. AYIRICI TANI

ITP'nin trombositopeni ile seyreden diğer kanama hastalıklarından ayırıcı tanısı mutlaka yapılmalıdır. Ortalama trombosit volümünün azalmış olması kemik iliğinde trombosit üretiminin azaldığını göstermektedir ve Wiskott-Aldrich sendromunun karakteristik bir bulgusudur. Anemi, lökositoz, lökopeni veya anormal lökosit morfolojisi varsa akut lösemi, aplastik anemi, myelodisplazi, lenfoma ve metastatik hastalığın ekarte edilmesi için kemik iliği aspirasyon incelemesi yapılması gereklidir. Otoimmün hemolizden şüphe ediliyorsa Coomb's testi ile desteklenmelidir. HIV enfeksiyonu için risk faktörü varsa serolojik testler yapılmalıdır. Hemoliz varlığı, mikroanjiopatik eritrosit değişiklikleri ve Coomb's testi negatifliği ile trombotik trombositopenik purpura ve hemolitik üremik sendrom tanısı konulabilir. Yaygın intravasküler koagülasyon; trombositopeni ve koagülasyon anormallikleri ile karakterizedir. Splenomegalinin bulunması ise hipersplenizmi düşündürmelidir. Sistemik lupus eritematozisli hastaların bir kısmı izole trombositopeni ile başvurmaktadır. Bu nedenle kronik ITP'lerde kollajen doku hastalıkları ekarte edilmelidir (1,2,5,11).

Kronik ITP'de ek laboratuvar tetkiklerle ayırıcı tanı yapılmalıdır. Bu durumda kemik iliği aspirasyon incelemesi, tiroid fonksiyon testleri, idrar incelemesi, batın ultrasonografisi, antinükleer antikor, anti-dsDNA, direkt Coomb's testi, lupus antikoagülanı, trombosit antijenlerine spesifik antikorlar, serum immünglobülinler ve immünglobülin G alt grupları, trombosit fonksiyon testi, koagülasyon çalışmaları, HIV, Cytomegalovirus, Epstein Barr virus, Varicella-Zoster virus, Rubella, Parvovirüs B19 ve diğer virüsler için serolojik çalışmaların mutlaka yapılması gerektiği bildirilmiştir (1,2,5,11).

2. 1. 4. TEDAVİ

Kanama bulgusu olan veya kanama riski yüksek olan ITP'li hastalarda tedavi mutlaka gereklidir. Amerikan Hematoloji Grubu (ASH)'nın 1996'da yayınladığı ITP'li çocuklarda evreleme sistemine göre tedavi önerileri Tablo 2'de özetlenmiştir (1). Trombosit sayısı $20 \times 10^9/L$ 'nin üzerinde olan ve kanama bulgusu olmayan hastalarda tedavi önerilmemektedir. Trombosit sayısı $20 \times 10^9/L$ 'nin altında olan ve mukozal kanaması olan çocuklarda tedavi gerekli görülmektedir. Trombosit sayısı $10 \times 10^9/L$ 'nin altında olan ve çok hafif kanaması olan çocuklarda da tedavi önerilmektedir. Tedavide amaç trombosit sayısını $20 \times 10^9/L$ 'nin üzerine çıkarmak ve kanamayı durdurmaktır. Trombosit sayısından bağımsız olarak şiddetli kanaması olan tüm hastalar hastaneye yatırılarak tedavi edilmelidir (5).

Tablo 2. ITP'li çocuklarda trombosit sayısı ve klinik duruma göre evreleme ve tedavi önerileri (1).

Evre	Trombosit sayısı ($\times 10^9/L$)	Semptom ve bulgular	Öneriler
1	50-150	Yok	İzlem
2	>20	Yok	Kişisel tedaviler (tedavi edici veya koruyucu)
3	>20 ve/veya <10	Mukozal kanama Minör kanama	Hospitalizasyon ve IVIg veya kortikosteroidler

ITP immünpatogeneziindeki son yıllardaki gelişmeler tedavide yeni ufuklar açmıştır. İmmün yanıtın modülasyonunu sağlamak için IVIG, anti-Rh (D) immünglobülin ve α -interferon, immün süpresif tedavi olarak da kortikosteroidler kullanılmaktadır.

ITP'de akut dönemde tedavinin gerekli olup olmadığını tartışan iki büyük serinin sonuçlarına bakıldığında; hastaların çoğunun tanı anında trombosit sayısı $50 \times 10^9/L$ 'nin altında olmasına rağmen, yaklaşık %75'inin tedavi almadığı görülmektedir. Tedavi edilmeyen 221 hastanın 2 (%0.9)'si kanama ile kaybedilirken,

191 (%87)'inin trombosit sayısı 2-8 haftada normale ulaşarak tam remisyona girdikleri gösterilmiştir (55,56). Bununla beraber tedavisiz bırakılanlara göre glukokortikoid veya IVIG verilenlerde trombosit sayısının daha hızlı düzeldiği gösterilmiş, ancak bunun morbidite ve mortalite üzerine etkisi bildirilmemiştir. Tedavi verilmesinin kronik ITP gelişim riskini azalttığı da ispat edilememiştir (5).

ITP'li çocukta yaşamı tehdit eden akut ve şiddetli kanama sırasında trombosit sayısı hızla arttırılmalıdır. Bu durumda bir kaç rejim birden uygulanmalıdır. Trombosit transfüzyonları, yüksek doz parenteral glukokortikoid (30mg/kg/gün metilprednizolon-3gün) ve IVIG (1g/kg/gün- 2gün) birlikte uygulanabilmektedir.

2. 1. 4. 1. Glukokortikoidler

ITP'de glukokortikoidlerin etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Muhtemelen glukokortikoidler antikor taşıyan trombositlerin fagositozunu inhibe etmektedirler (57). Ayrıca B lenfositlerinden antikor üretimini süprese ettiği gösterilmiştir (58,59). Kapiller integritenin sağlanması ve vasküler prostasiklin sentezinin inhibisyonu ile uzamış kanama zamanının normalize edilmesi de diğer yararlı etkilerindendir (60-63).

Randomize klinik çalışmalarda çocukluk çağı ITP vakalarında glukokortikoid tedavinin tedavi uygulanmayanlara göre trombosit sayısını daha hızlı yükselttiği gösterilmiştir (64-66). Prednizolon (4mg/kg/gün- 7gün) tedavisi ile trombosit sayısını $50 \times 10^9/L$ 'nin üzerine çıkarmak için gerekli median süre 4 gün iken, tedavisiz bu süre 16 gün bulunmuştur (66,67). Ancak glukokortikoidlerin morbidite ve mortalite üzerine etkisi gösterilememiştir. Glikokortikoidlerin uygulama rejimleri üç grupta toplanabilmektedir (5):

- 1-2mg/kg/gün veya 60mg/m²/gün prednizolon oral- 21gün
- 4mg/kg/gün prednizolon oral- 7gün
- 10-30mg/kg/gün metilprednizolon oral veya intravenöz 3-7 gün

Çok yüksek dozlarda (30-50mg/kg/gün) metilprednizolon uygulamasının trombosit sayısını IVIG kadar hızla yükselttiği gösterilmiştir (68-71).

Glukokortikoid tedavinin muhtemel yan etkiler; Cushing sendromundaki hiperkortikolizmin semptom ve bulgularıdır. Bunlar; yüzde şişlik, fazla kilo alımı, hiperglisemi, hipertansiyon, katarakt, davranış anormallikleridir. Çocuklarda büyüme geriliği riskini arttırabilmektedir. Yan etkilerin doz ve süre ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (72).

2. 1. 4. 2. IVIG

ITP'li hastalarda IVIG tedavisinin akut ve uzun dönemde görülen etkileri bulunmaktadır. IVIG immün sistem üzerindeki akut etkisini, FcRs'nin bağlandığı membranın aktivitesinde değişiklik yaparak göstermektedir. Bu hipoteze göre; IVIG, FcRs'ni bloke ederek trombositlerin fagositozla yıkımını inhibe etmektedir. FcRs bazı hücrelerin yüzeyinde eksprese edilmektedir ve trombositler gibi immünglobuline duyarlı olarak fagosit edilen hücreler için fonksiyonel önemleri vardır. Anti-Rh (D) kaplı eritrositlerin ömrünün IVIG tedavisi ile uzadığının gösterilmesi bu hipotezi desteklemektedir (5,73). IVIG tedavisi sırasında lökosit sayısında ve değişik lenfosit alt gruplarında azalma, trombosit sayısı ile ters orantılı olarak bulunmuştur (74,75). Bu çalışmalar IVIG infüzyonu ile sadece mononükleer fagositlerdeki FcRs'inin değil, diğer hücreler üzerindeki FcRs'inin de etkilendiğini göstermektedir. In vivo şartlarda humoral immün yanıt hücresel immün yanıt ile birlikte çalışmaktadır. ITP'de IL-4, IL-2, IL-10, IFN- γ ve TNF- β 'nin artmış seviyeleri çalışmalarda bildirilmiştir (76,77). IVIG'in FcRs taşıyan monosit ve lenfositlerden sitokin sentez ve serbestleşmesini etkilediği gösterilmiştir (78,79). In vitro IgG uygulaması monositlerde IL-6, IL-2, IL-10, IFN- γ , TNF- β ve aktive lenfositlerde IL-2 reseptör aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır (80,81). IVIG'in aynı zamanda kompleman aktivasyonunu inhibe edici etkisi de bildirilmiştir (82).

IVIG anti-GpIIb/IIIa'ya karşı anti-idiotipik antikorlar içermektedir. Bu anti-idiotipik antikorlar GpIIb/IIIa'ya karşı otoantikorların bağlanmasını inhibe etmektedirler (83). Anti-idiotip sistemi içindeki dengenin yeniden düzenlenmesi veya alternatif olarak anti-idiotipik antikor sekresyonunun supresyonu IVIG'in uzun dönem etkilerindendir ve ITP'nin uzun vadede düzelmesine neden olabilmektedir (84-86). Tamamlayıcı anti-idiotipik antikorlar donör havuz hacmine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (87).

Akut ITP'li çocuklarda IVIG tedavisi ile glukokortikoid tedavisi alan ve tedavi almayan çocuklara göre trombosit sayısının daha hızlı arttığı gösterilmiştir (66). IVIG tedavisi ile hastaların çoğunda trombosit sayısının arttığı ancak bir kısmında yanıt alınamadığı bildirilmiştir (88-92). Kronik ITP'li hastalarda tekrarlayan aylık IVIG uygulamaları ile trombosit sayısı $20-30 \times 10^9/L$ 'de tutularak splenektomiden kaçınılabilmektedir. Ancak akut ve kronik ITP'li hastalarda IVIG tedavisi ile mortalite

ve morbiditenin azaldığı gösterilememiştir (5). IVIG rejimleri çok farklı doz ve sürelerde uygulanabilmektedir:

- 0.4g/kg/gün- 2- 5 gün
- 1g/kg/gün- 1veya 2 gün

Son yıllarda 0.8g/kg tek doz IVIG uygulamasıyla daha ucuz maliyet ve daha az yan etki ile aynı başarı elde edildiği bildirilmiştir (67).

IVIG tedavisinin yan etkileri sıktır, ancak genel olarak hafif seyretmektedir. Baş ağrısı, sırt ağrısı, kusma ve ateş en çok görülen bulgulardır (66). Aseptik menenjit, alloimmün hemoliz, hepatit C enfeksiyonu nadiren görülebilmektedir (93-95). Viral inaktive ürünler ile hepatit C enfeksiyonu tanınlanmamıştır.

2. 1. 4. 3. Anti-Rh (D)

Anti-Rh (D)'nin monosit/fagosit sisteminde kompetitif inhibisyon yaparak etkili olduğu düşünülmektedir (5).

Akut ITP'de başlangıç tedavisi olarak Anti-Rh(D)'yi IVIG ve glukokortikoidlerle karşılaştıran bir çalışmanın sonuçlarına göre; Anti-Rh(D) ile trombosit sayısının $20 \times 10^9/L$ ve $50 \times 10^9/L$ 'nin üzerine çıkması için gerekli süre daha uzun bulunmuştur (67). Ancak Anti-Rh(D)'nin etkisini tedavi edilmeyen grupla karşılaştıran, morbidite ve mortalite üzerine etkisini araştıran bir çalışma bulunamamıştır. Yapılan çalışmalara göre Anti-Rh(D), akut ve kronik ITP'li çocukların yaklaşık %80'inde trombosit sayısını arttırmakta, ancak yanıt geçici olmaktadır (96-98). Median beş haftada bir uygulanarak splenektomi ertelenebilmektedir.

Anti-Rh(D), sadece Rh(+) hastalara uygulanabilmektedir. Klinikte görülen en önemli yan etkisi alloimmün hemolizdir. Hastaların %80'inde tedaviden sonra direkt Coomb's testinin pozitif olduğu ve hemoglobin konsantrasyonunun bir iki hafta içinde yaklaşık 0.5-2 g/dL düştüğü gösterilmiştir (97).

2. 1. 4. 4. Splenektomi

Dalağın hem antikor sentez yeri, hem de antikor bağlanmış trombositin fagositozla uzaklaştırılmasında RES'in önemli bir komponenti olması nedeniyle ITP patogenezindeki rolü büyüktür. Dolayısı ile splenektomi sonucunda hem antikor sentezi, hem de trombosit fagositozu azalmakta ve trombosit sayısı artmaktadır.

Bir yıldan uzun süren kronik ITP'li hastalarda kanama şikayeti varsa, trombosit sayısı $10 \times 10^9/L$ 'nin altında ise ve üç yaşından büyükse splenektomi önerilmektedir.

Trombosit sayısı $10-30 \times 10^9/L$ olan, kanama sikayeti bulunan ve sekiz yaşından büyük çocuklarda da splenektomi tavsiye edilmektedir. Bunların dışında primer tedaviye (glukokortikoid, IVIG ve/veya anti-D) sadece geçici olarak yanıt veren, kontrol edilemeyen kanamaları olan ve cerrahi bir kontraendikasyon olmayan hastalarda splenektomi önerilmektedir (1,5). Elektif splenektomi sonuçlarını bildiren 16 yayının sonuçlarına göre; 271 çocuktan %72'sinin tam remisyona girdiği gösterilmiştir (5). Yaşamı tehdit eden kanamalar sırasında artmış ölüm riski nedeniyle acil splenektomiden kaçınılması önerilmektedir. Elektif splenektomilerde kanama riskini azaltmak için operasyon öncesi trombosit sayısı yükseltilmelidir. Bunun için trombosit sayısı $10-X10^9/L$ 'nin altında ise IVIG, parenteral glukokortikoid ve anti-D; trombosit sayısı $10-30 \times 10^9/L$ arasında ise IVIG tavsiye edilmektedir.

Splenektominin muhtemel yan etkileri operasyon sırasında ve sonrasında kanama ve enfeksiyonlardır. Özellikle beş yaş altında, splenektomiden sonra fatal seyreden bakterial enfeksiyon riski 1/300-1000 hasta yılı'dır (99). Bu nedenle elektif splenektomiden en az iki hafta önce Hemophilus influenza tip b aşısı, iki yaş üzerinde ise polyvalent pnömokok aşısı ve quadrivalent meningokok polisakkarid aşısı uygulanmalıdır (100). Splenektomi sonrası penisilin profilaksisi uygulamasının bakterial enfeksiyon riskini önemli düzeyde azalttığı da gösterilmiştir.

Çocukluk çağında kronik ITP riskinin düşük olması, kronik ITP'li çocuklarda spontan ve tam remisyon ihtimalinin yüksek olması ve splenektominin yan etkileri nedeniyle gerçek endikasyonu olmayan vakalarda splenektomiden kaçınılmalıdır.

2. 1. 4. 5. Diğer alternatif tedaviler (101):

Siklofosamid

Vinka alkaloidleri

Plazma değişimi

Antikorların protein A immünoadsorpsiyonu

Azothioprine

Siklosporin

Danazol

Interferon- α

Askorbik asit

Kolşisin

2. MEGAKARYOSİTOPOEZİS

Megakaryositler; trombosit üreten, normal olarak kemik iliğinde tüm çekirdekli hücrelerin % 0.05- 0.1'ini oluşturan, ortalama çapları 20 -25 µm, hacimleri 4700 ± 100 fL olan poliploid hücrelerdir. Bir megakaryosit 1000- 3000 trombosit üretebilmektedir. Normal şartlarda günlük trombosit üretimi yaklaşık 2×10^{11} olarak bildirilmiştir. İhtiyaç arttığı zaman altı kat daha fazla üretim olabilmektedir (102,103).

Son 20 yılda megakaryositik progenitörlerin in vitro klonlanması, üretilen monoklonal antikörlerle megakaryositlerin spesifik olarak tanımlanması, trombopoetin (TPO)'in saflaştırılması ve yeni moleküler tekniklerin kullanımı ile megakaryosit biyolojisine ait bilgiler artmaktadır.

Matür megakaryositler poliploid'tir. Normal diploid (2N) hücrelere göre iki (4N) – 32 (64N) kat daha fazla DNA miktarı içermektedirler. İnsan megakaryositlerinin ortalama ploidi sayısı 16N'dir. Megakaryosit diferansiyasyonunda, DNA replikasyonunun olması, ancak hücre bölünmesinin olmamasıyla karakterize "endomitosis" olarak adlandırılan olay nedeniyle poliploidi görülmektedir. Endomitoziste megakaryositler mitozu girdikten sonra profaz, prometafaz, metafaz ve anafaz A evrelerinin gerçekleştiği, ancak anafaz B ve telofaz evresinin gerçekleşmediği gösterilmiştir (102).

Trombositlerin çekirdeği ve kaba endoplazmik retikulumları olmadığı için çok az sayıda protein sentezleyebilirler. Bu nedenle sitoplazmik özelliklerini megakaryositlerden almaktadırlar. Trombositler matür megakaryositlerin ürettiği değişik proteinlerin bulunduğu dört farklı granülü (alfa, kaba, lizozomal, mikroperoksizomal) içermektedirler (102-104).

Megakaryositler diğer tüm kemik iliği hücreleri gibi pluripotansiyel kök hücreden kaynaklanmaktadır. Megakaryositlerin gelişimi (megakaryositopoezis) çok kompleks bir olaydır, "megakaryositik mikroçevre" olarak bilinen hematopoietik büyüme faktörleri (değişik koloni stimulan faktörler, interleokinler, TPO), çevredeki ekstrasellüler moleküller ve hücreler tarafından kontrol edilmektedir (103).

Megakaryositik mikroçevredeki hücresel komponentler; parankimal hücreler, fibroblastlar, endotel hücreleri ve makrofajlar gibi komşu stromal hücrelerden oluşmaktadır. Bu stromal hücreler hem membran ilişkili ve solubl sitokinler (büyüme faktörleri), hem de megakaryosit fonksiyonu için önemli ekstrasellüler moleküller üretmektedirler. Şu ana kadar 25'den fazla hematopoietik büyüme faktörü tanımlanmış ve moleküler olarak klonlanmıştır. Bunlar içinde; Interleokin 1-18, G-CSF,

GM-CSF, M-CSF, LIF (leukemia inhibitory factor), c-kit ligand, EPO ve TPO yer almaktadır (103).

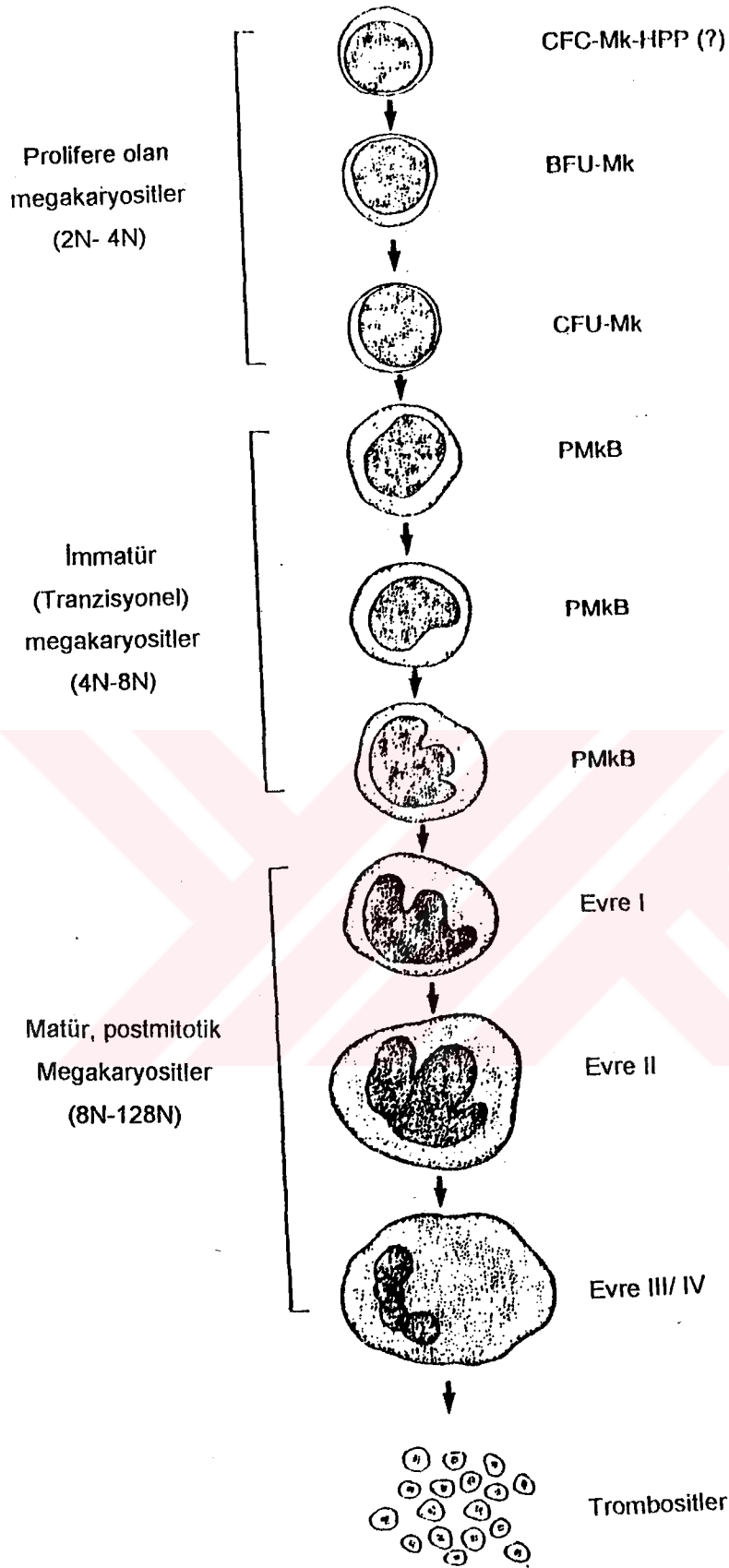
Megakaryosit gelişiminin dolayısıyla trombosit üretiminin primer yeri kemik iliği olarak bilinmektedir. Etraftaki mikroçevre uygunsa ekstramedüller dokularda da megakaryositler gelişebilmektedir. Dalak ve akciğerde megakaryositler görülmekte, trombosit üretimi olmaktadır (105,106). Bu organların total trombopoiezise katkısı sadece %7-15 olarak bildirilmiştir (106,107).

Son yıllarda megakaryopoezisin hücresele hiyerarşisi çok iyi anlaşılmıştır (Şekil 2) (103). Megakaryosit gelişimi suni olarak üç evreye bölünmektedir:

1. Progenitör hücreler
2. İmmatür megakaryositler (promegakaryoblastlar) (PMkB)
3. Matür megakaryositler

Megakaryosit progenitör hücreleri, megakaryosit sayısının artışından ve büyüme faktörlerine proliferasyon yanıtından sorumludur. PMkB'lar, progenitör hücreler ve daha matür postmitotik hücreler arasında köprü olan, geçiş aşamasında hücrelerdir. Matür megakaryositler daha fazla proliferasyon göstermezler ve trombosit üretmektedirler.

İn vitro çalışmalar, megakaryosit progenitör hücrelerin diğer serilerin progenitör hücreleri gibi gelişimleri sırasında proliferasyon potansiyelini prgressif olarak kaybettiklerini göstermiştir. Bu serinin en ilkel progenitör hücreleri "megakaryocyte high proliferative potential colony forming cell" (MHPP-CFC)'dir. Diğer progenitör hücrelerin çoğundan farklı olarak bu hücreler in vitro proliferasyon gösterirler ve bunların kolonileri makroskopik olarak görülmektedir. "Burst-forming unit-megakaryocyte" (BFU-Mk), MHPP-CFC'den daha matürdür ve daha az proliferatif potansiyele sahiptir, koloni yapan hücrelerin burst'lerini oluşturmaktadır. En matür proliferasyon kapasitesine sahip hücre "Colony-forming unit- megakaryocyte" (CFU-Mk)'dir, çok sınırlı proliferasyon kapasitesi göstermektedirler. MHPP-CFC'ler birkaç bin megakaryositten oluşan koloniler üretirler ve sekiz-on replikatif bölünmeye kadar proliferasyon potansiyelleri vardır. MHPP-CFC proliferasyon için minimum üç farklı mitojenik sinyale ihtiyaç gösterir. IL-3, protein kinaz C ve siklik adenosin monofosfat (cAMP)-aracılığıyla oluşan sinyal iletim yollarının aktivasyonunu gerektirirler (102,103).



Şekil 2. Megakaryosit gelişiminin hücresel hiyerarşisi (103).

BFU-Mk yüksek proliferasyon potansiyeline sahiptir, her biri 100-500 megakaryosit oluşturmakta ve 5-7 replikatif bölünme göstermektedir. BFU-Mk'ler IL-3 ve GM-CSF gibi büyüme faktörlerine ihtiyaç duymaktadır.

Megakaryosit progenitörlerinden en diferansiye olanı CFU-Mk'dir, sınırlı proliferasyon potansiyele sahiptir, her biri sadece 4-32 megakaryosit oluşturabilir, 2-5 bölünme göstermektedir. Bu progenitör hücreler IL-3 ve GM-CSF gibi tek bir büyüme faktörüne ihtiyaç duymaktadır (103).

Megakaryopoiesis ve trombopoiesis regülasyonunda bir takım fizyolojik prensipler tanımlanmıştır (102, 108):

1. Kişilerin trombosit sayısı fizyolojik (gebelik) ve patolojik olaylar dışında yaşamı boyunca sabit kalmaktadır.
2. Normal popülasyonda trombosit sayısı geniş bir dağılım göstermektedir ($150-400 \times 10^9/L$).
3. Normal trombosit sayısı ile ortalama trombosit hacmi arasında ters bir ilişki mevcuttur. Bu dolaşımdaki trombosit kitlesini sabit tutmaktadır (109,110).
4. Vücutta trombosit sayısı değil, toplam trombosit kitlesi sabit tutulmaya çalışılmaktadır. Normalde total trombosit kitlesinin üçte biri dalakta tutulmaktadır (111).
5. Trombosit ihtiyacına yanıt olarak megakaryositlerin sayısı, hacmi ve ploidi değişmektedir (112).
6. Akut trombositopeniye CFC-Mk yanıt vermemekte, ancak matür megakaryositler yanıt vermektedir (113).

TPO; trombosit üretiminin en güçlü stimülatörüdür. İlk kez 1994 yılında saflaştırılmış ve klonlanmıştır. Kromozom 3q27-28 bölgesine lokalize TPO geni, 353 aminoasitlik, 36 kDa ağırlığında bir öncül protein sentezlemektedir. Daha sonra 21 aminoasitlik sinyal peptit uzaklaştırılması ve glikolizasyon sonucunda 80- 90 kDa ağırlığında bir glikoprotein olarak dolaşıma verilmektedir. Matür TPO proteininin %23'ü EPO ile homoloji göstermektedir. Ancak TPO ve EPO'nin birbirlerinin reseptörlerine bağlanmadıkları gösterilmiştir (102, 103,114).

TPO megakaryosit diferansiyasyonunun ve matürasyonunun bütün evrelerinde majör etkiye sahiptir. Megakaryositlerin sayısını, hacmini ve ploidiğini arttırmaktadır. Artmış megakaryosit ploidi TPO etkisinin en duyarlı göstergesidir. Muhtemelen hücre matürasyon hızını da arttırmaktadır. TPO megakaryosit üzerindeki reseptörüne bağlandığı zaman megakaryositlerde apoptozisi önlemektedir (115,116). CD34+ kök

hücrelere verildiğinde hücrelerin çoğu megakaryositik seriye doğru farklılaşmakta ve trombosit üretimi artmaktadır (117). TPO, kök hücre ve bütün serilerin erken öncül hücrelerini sitümüle etmektedir. Ancak megakaryositlerde sadece geç matürasyonu stimüle etmektedir (118). Trombosit oluşumunun son evresinin TPO'ya bağlı olmadığı, hatta yüksek doz TPO ile inhibe olduğu gösterilmiştir (119).

TPO; karaciğer, böbrek, dalak ve akciğer gibi değişik organlar tarafından sentezlenmektedir (114, 120-124). Bu organlar tarafından TPO'nun üretiminin sabit olması nedeni ile TPO'nun serum seviyesinin trombosit ve megakaryositlerdeki TPO reseptörüne bağlanan TPO'nun absorpsiyonu ve dolaşımdan uzaklaştırılmasıyla regüle olduğu ileri sürülmektedir (sponge teorisi) (125). Trombosit üretimi azaldığı zaman TPO tüketimi azalmakta ve serum TPO düzeyi yükselmektedir. Bu feedback mekanizma başka bir hematopoietik büyüme faktöründe görülmemektedir. Son yıllarda kemik iliği stromal hücrelerinin yapısal olmadan TPO ürettiği, trombosit sayısına göre ITP 'li hastalarda normal kişilere göre daha yüksek düzeyde TPO mRNA bulunduğu ve tedavi ile yüksek seviyelerin normale döndüğü bildirilmiştir (126).

IL-3, IL-6 ve IL-11 gibi sitokinler CFC-Mk'nın büyümesini ve megakaryosit maturasyonunu stimule ettikleri, ancak endomitozisde etkilerinin olmadığı, in vitro trombosit üretimini arttırdıkları bildirilmiştir (102).

IFN- α ve IFN- β , CFC-Mk'in büyümesini inhibe ettiği, IFN- γ 'nın ise CFC-Mk'in büyümesini stimüle ettiği gösterilmiştir (102).

TGF- β 1 in vivo ve in vitro megakaryosit büyümesini ve trombosit üretimini inhibe etmektedir (127-129). Bir çalışmada TGF- β 1'in insanda megakaryopoezisin gerçek bir feedback regülatörü olduğu gösterilmiştir. TGF- β 1 diğer hematoregülatuar sitokinler içinde kemik iliği stromal hücrelerinden TPO mRNA ekspresyonunu en güçlü şekilde arttıran sitokindir. TPO, midmegakaryopoetik evrede megakaryoblastlar üzerinde TGF- β reseptörleri I ve II' i indüklemekte, böylece TGF- β 1 bu evrede CFU-Mk'lerin matürasyonunu durdurabilmektedir. ITP'li hastalarda TGF- β 1 ve stromal TPO mRNA düzeyleri birbiriyle korele olarak artmıştır ve megakaryosit maturasyon duraklaması gösterilmiştir. Bu çalışmadaki in vivo sonuçlar daha önce elde edilen in vitro sonuçları desteklemektedir (130).

ITP'de trombositlerin azalması, serum TPO düzeyinde artışa neden olmakta bu da megakaryositleri stimüle etmektedir. Bu hipotezi destekleyen çalışmalarda trombosit

Üretim hızının altı kat arttığı ve trombosit yaşam süresinin kısaldığı gösterilmiştir (107,131,132). Ancak daha sonra yapılan trombosit kinetik çalışmaları ITP'de trombosit artışını göstermemektedir. Bu çalışmalarda ineffectif trombosit üretimi ile ilgili bulgular elde edilmiştir (133).

ITP'de artmış megakaryosit koloni formasyonu gösterilmiştir, fakat bunların bir kısmında megakaryopoezis ineffectiftir. Buradaki patofizyolojik yol bilinmemektedir. Megakaryosit progenitörlerinin gelişiminde supresyon ve/veya maturasyon duraklaması olduğu düşünülmektedir (18).



3. APOPTOZİS

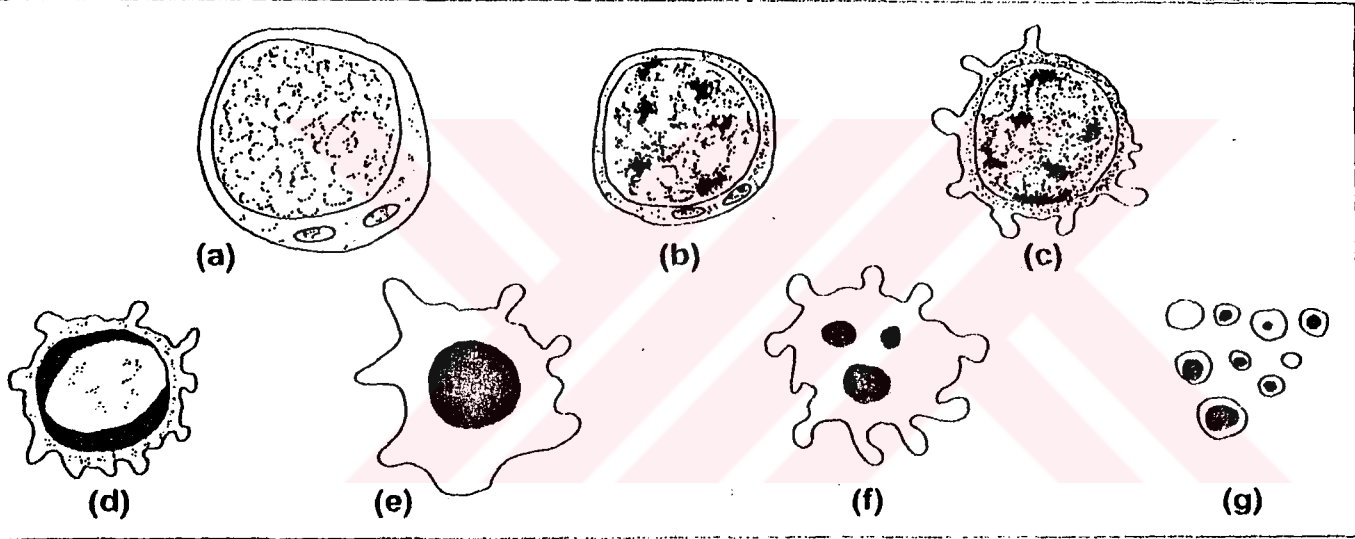
Organizmada homeostazın devamı hücre proliferasyonu ile hücre ölümünün denge halinde olmasını gerektirmektedir. Hücre ölümü başlıca, nekroz ve apoptozis olmak üzere iki şekilde meydana gelmektedir. Patolojik durumlarda, hücrenin ağır ve ani bir travma ile karşılaşması sonucu görülen nekrozisin tersine, apoptozis programlı ve fizyolojik bir ölüm şekli olması nedeni ile bu dengenin sürdürülmesinde önemli rol oynamaktadır. Yunanca bir kelime olan "apoptosis" sonbaharda yaprakların dökülmesine benzetilmiştir (134-138). Embriyonik hayatta yaygın olarak görülmesinin yanında gelişimini tamamlamış organizmalarda, özellikle immün regülasyonda kritik önemi gösterilmiştir. Lenfositlerin negatif seleksiyonu veya pozitif seleksiyona uğramamış lenfositlerin delesyonu ve immün aktivasyon sonrası gelişen klonal genişlemenin baskılanması için çok sayıda hücrenin kendini feda etmesi gerekmektedir (139). Bu fizyolojik dengenin bozularak apoptozisin azalması bazı viral enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar, lenfoproliferatif hastalıklar ve kanserlerde görülmektedir. Apoptozisin artması halinde ise dejeneratif hastalıklar ve organ zedelenmesi ortaya çıkabilmektedir. HIV ve diğer viral enfeksiyonlarda görülen akkiz immün yetmezlik tablosu da yine apoptozis artışı ile açıklanmaktadır (140-143).

Başlıca iki hücre ölüm şekli olan nekroz ve apoptozisin morfolojik olarak belirgin farklılıkları tanımlanmıştır. Ani ve ağır travma ile karşılaşan ve nekroz ile ölen hücrede şişme, membran geçirgenliğinde artma, ozmotik lizis; dokuda ise ağır enflamatuar zedelenme meydana gelmektedir. Apoptotik hücrede nekrozisin aksine en çarpıcı değişiklik nükleusta gözlenmektedir (Şekil 3) (134). Hücre küçülme, mikrovillus ve desmozomların kaybı sonucu komşu hücrelerden uzaklaşmaktadır. Hücre yüzeyinde "bleb"ler (stoplazmik çıkıntılar) meydana gelmekte, stoplazmada yoğunlaşma, asidifikasyon, kalsiyum düzeyinde artma, hücre dansitesinde artma, kromatinde yoğunlaşma ve nükleer zarf (envelop) yakınında toplanma görülmektedir. Daha sonra tüm nükleus kondanse olmakta ve DNA'nın yaklaşık 180bp multimerleri büyüklüğünde fragmentasyonu meydana gelmektedir. Hücre her biri membranla kaplı birçok apoptotik partiküle ayrılmaktadır. Apoptotik hücrelerde nekrozisin aksine membran bütünlüğü bozulmamıştır, ancak fagositozu kolaylaştıracak membran değişiklikleri erken evrede bile gösterilmiştir. Normalde plazma membranının iç yüzünde lokalize olan fosfatidil serinin dış yüze ekspanze olması hücrenin fagositler tarafından yutulması için tanımlayıcı bir sinyal oluşturmaktadır. Komşu hücreler yada

özel fagositler tarafından membran kaplı apoptotik partiküller fagosit edilecek dokudan hızla uzaklaştırıldığı için enflamatuar reaksiyon görülmemektedir. Bu nedenle apoptozis sessiz bir ölüm şeklini ifade etmektedir (134-138). Apoptotik hücrenin fagosit edilemediği bazı durumlarda ise nekrozu andıran membran değişiklikleri ve sekonder nekrozis görülebilmektedir. Bu durum in vitro hücre kültürlerinde, gland lümenine atılan epitel hücrelerinde veya fagositoz defekti olan durumlarda ortaya çıkabilmektedir (135).

Apoptozis indüksiyonu başlıca üç evreden oluşmaktadır (144):

1. Hücre ile indüksiyon sinyalinin ilişkisi
2. Ölüm sinyalinin biyokimyasal iletimi
3. Apoptozisin oluşması



Şekil 3. Hücrede apoptozis evrelerinin görüntüsü (134).

Hücrelerde apoptozisi uyaran çok sayıda fizyolojik ve fizyolojik olmayan uyarımın ulaştığı ortak nokta, hücre içinde proteolitik olaylar (katabolik enzimler) zincirini başlatmaları ve bunun sonucunda da hücrede birçok esansiyel makromolekülün parçalanmasıyla apoptozis için karakteristik biyokimyasal ve ultra-strüktürel fenotipin ortaya çıkmasıdır. Bu proteolitik olaylar sonucunda yıkıma uğrayan başlıca moleküller; hücre iskeleti ve organizasyonunda rol alan aktin, fodrin, familial poliposis proteini, DNA tamir proteinlerinden DNA-PF, poli adenil riboz fosfat (PARP), nükleer mitotik aparat proteinini olan NuMA; nükleer membran entegrasyonunu sağlayan laminler ve hücre siklusunda rol oynayan retinoblastoma proteinidir. Protein yıkımını sağlayan proteolitik olaylar zinciri interlökin- 1 β "converting" enzim (ICE) -

benzeri proteazların (sistein proteazlar) harekete geçmesiyle başlatılmaktadır. Sistein içeren aktif bölgesi olan ve dörtlü AA motifinde aspartik asit rezidüleri karboksi terminal kısmında kesen bu sistein proteazlar CASPASES (sistein içeren aspartik proteazlar) (kaspazlar) olarak isimlendirilmektedir. Halen bilinen kaspazlardan önemlileri kaspaz 1(ICE), kaspaz 3 (CPP32/YAMA) ve kaspaz 8 (FLICE/MACH)'dir. Bu kaspazlar proenzim olarak sentezlenmekte, aktive olmaları için asp-x yerlerinde proteolitik aktivasyon gerekmektedir. Böylelikle zincir reaksiyonu ile bir sonraki proteaz aktive olmakta ve son ürün (substratların) yıkımı ortaya çıkmaktadır. Kaspaz 3 (CPP32)'ün apoptozis yolunda aşağıda (downstream) ve kritik bir noktada yer aldığı, DNA tamir proteinlerinden olan PARP'ın yıkımından sorumlu olduğu gösterilmiştir (135,145-152). Böylece birçok değişik stimulusun yol açtığı terminal proteolitik olaylar hücrede, nükleer kondansasyon ve DNA fragmentasyonu ile karakterize apoptotik fenotipi ortaya çıkarmaktadır.

Apoptotik hücrelerde erken değişikliklerden biri mitokondride görülmektedir. Transmembran potansiyelde azalma sonucu mitokondrial fonksiyonda bozulma olmaktadır. Mitokondriden pro-apoptotik maddelerin (örneğin sitokrom c) salgılanması ise kaspazların aktivasyonuna katkıda bulunmaktadır (153). Apoptozise uğrayan hücrelerdeki yüzey karbonhidrat ve diğer membran değişikliklerinin fagosit reseptörleri (fosfatidil serin, trombospondin, vitronektin) ve lektinler tarafından tanınarak apoptotik hücrenin çok hızlı ve etkili bir mekanizma ile ortadan kaldırılmasıyla apoptozis işlemi sonlanmaktadır (154).

Spesifik proteaz inhibitörleri terminal kaspazları hedefleyerek hücre ölümünü bloke etmektedirler. Apoptozis inhibitör ailesinin proteinleri (IAP) kaspaz aktivitesini iptal ederek hücre ölümünü azaltabilmektedirler (155).

Apoptotik moleküller hücrelerde yaygın olarak bulunurken, aynı zamanda apoptozis inhibitörü genlerin aktive halde bulunması, apoptotik prosesi denge halinde tutmaktadır. BCL-2 protein ailesinin apoptozis regülasyonunda önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir. BCL-2 bu protein ailesinin bir prototipidir ve kendisi gibi BCL-X_L, BCL-w, MCL-1 ve A1 de anti-apoptotik özellik taşımaktadır. Tersine, artmış ekspresyonları hücre ölümüne neden olan BAX, BAK ve BAD proteinleri pro-apoptotik özellik göstermektedir. Hücrelerin apoptozise duyarlılığı pro ve anti-apoptotik BCL-2 protein ailesinin birbirine göre konsantrasyonu ile belirlenmektedir.

Ayrıca BCL-2 ve bu gruptaki diğer moleküllerin mitokondrial fonksiyon regülasyonunda rol oynadığı, sitokrom c serbestleşmesini inhibe ederek hücreyi

oksidatif zedelenmeden koruduğu ve apoptozisi engellediği de gösterilmiştir (156-161). p53 proteini; DNA zedelenmesinden sonra hücre siklusunun duraklamasında ve apoptozis indüksiyonunda önemli bir rol oynamaktadır. p53 proteini, BAX ekspresyonunu artırarak apoptozisi indüklemektedir (144).

Yakın zamanda tanımlanmış bir molekül olan FLIP (Flice inhibitor protein) ise kaspaz 8'i inhibe etmekte ve hücrede yaygın olarak bulunan proteolitik /apoptotik mekanizmanın sürekli aktivasyonunu engellemektedir (162). Hücrelerde doğal olarak bulunan bu anti-apoptotik moleküllerin dışında bazı viruslar ise proteaz inhibitörü anti-apoptotik genleri (CrmA, p35) sayesinde, enfekte ettikleri hücrelerin apoptozisini engelleyerek kendi yaşamları ve çoğalmalarını sağlayacak şartları temin etmektedirler (135,140,145).

Onkogen c-myc normal ve neoplastik hücre proliferasyonunda önemli olduğu gibi aynı zamanda apoptozisin güçlü bir indükleyicisidir. Özel durumlarda bu genin iki antagonistik etkisinden hangisini göstereceği spesifik büyüme faktörlerinin bulunmasına bağlıdır (163).

Hematopoiezis sırasında progenitör hücrelerin yaşamı, proliferasyonunu ve apoptozisi; sitokinler, büyüme faktörleri ve adezyon moleküllerinden oluşan bir kompleks tarafından pozitif veya negatif yönde regüle edilmektedir (144).

Stem cell factor (SCF), Flt ligand, TPO ve IL-3'ün apoptozisi süprese ettiği, IL-6, IL-11'in erken progenitörlerin proliferasyonunu stimüle ettiği, GM-CSF'in hem apoptozisi süprese ettiği, hem de proliferasyonu tetiklediği bildirilmiştir. TNF- α , Fas ligand, "TNF-related apoptosis inducing ligand" (TRAIL), TGF- β ve IFN- γ 'nın ise uygun reseptörleri eksprese eden hücrelerin apoptozisine yol açtığı gösterilmiştir (163). TPO'nun apoptozisi süprese etmekte diğer sitokinlere göre daha güçlü olduğu gösterilmiştir (164). Bir çalışmada in vitro olarak TPO yokluğunda immatür megakaryositlerin apoptozise gittiği gösterilmiştir (116). Sitokinler apoptozisin önlenmesinde hedef hücre açısından seçicilik göstermektedir. SCF; primitif hematopoietik hücrelerde, IL-3; daha sonraki progenitörlerde, Flt ligand; ise myeloid seriyeye giden progenitörlerde seçici olarak apoptozisi önlemektedir.

Hücrelerde apoptozisi uyaran çok sayıda fizyolojik ve fizyolojik olmayan uyarım vardır. Fas reseptör ve ligand interaksiyonu ile apoptozis indüksiyonu temel bir mekanizmayı oluşturmaktadır.

Fas ve FasL moleküllerinin etkileşimi sonucu, yüzeyinde Fas bulunan hücrede apoptozis meydana gelmektedir (165-168). Fas (Fas reseptörü; CD95; APO-1) 45

kDa ağırlığında, tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör grubuna ait tip I membran proteinidir (169). Bu gruptaki proteinlerin sisteinden zengin ekstrasellüler, transmembranöz ve intrasellüler olmak üzere üç kısmı (domain) vardır. Fas ligand (FasL; CD95L) ise Fas molekülünün doğal ligandıdır. Tip II membran proteini olup kodlama sekansı molekülün ekstrasellüler kısmında karboksi terminalindedir. Fas ligandın kendi reseptörü olan Fas ile interaksiyonu sonucu apoptozis sinyali, yüzeyinde Fas molekülü bulunan hücrenin nükleusuna iletilmekte ve Fas ekspresyonu olan hücrede apoptozis ile ölüm meydana gelmektedir. FasL/ Fas reseptör trimerizasyonu bu mesaj iletimi için gerekmektedir. Reseptör trimerizasyonundan sonra Fas molekülünün intrastoplazmik kısmında bulunan Death Domain (DD; ölüm bölgesi) intrastoplazmik bir molekül olan FADD (Fas associated death domain) ile birleşmektedir. Bundan sonra sistein proteazlardan biri olan kaspaz 8 (FLICE/ MACH) aktive olmakta ve proteolitik olaylar zinciri başlamaktadır. Aşağı noktalarda yer alan kaspaz 3 (CPP32; YAMA) aktivasyonu da apoptotik hücre için tipik sayılan PARP proteolizine ve apoptozise yol açmaktadır (135,146,147,149,152,165-168).

Bir diğer apoptozis indüksiyon yolu; perforin/ granzim sistemidir. Sitotoksik T lenfositlerle hedef hücrelerin öldürülmesi, malign ve virüs ile enfekte hücrelere karşı savunmada önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca transplant rejeksiyonu ve otoimmün hastalıklara neden olmaktadır. Sitotoksik T hücre granüllerinde bulunan perforin ve serin proteaz granzim A ve B'nin serbestleşmesinden sonra ölüm gerçekleşmektedir. Perforin; hedef hücrenin plazma membranında bir pore yaparak, granzim B'nin sitozole girmesine izin vermektedir. Granzim B ise kaspaz sistemini aktive ederek apoptozisi gerçekleştirmektedir (170-172).

Apoptozisin Değerlendirilmesi (173)

1. Apoptozis indüksiyonu için teknikler
 - Fas (CD95) aracılığı ile hücre ölümü
 - Camptothecin ile hücre ölüm indüksiyonu
2. Apoptozis olayının ölçülmesi
 - Caspase'lar
 - Annexin V ölçümü
3. DNA Fragmentasyon ölçümleri

- APO-BRDU™ Kit
 - APO-DIRECT™ Kit
4. Apoptosis ile ilişkili proteinlere karşı antikorların ölçülmesi
- Bcl-2 Homologları
 - Caspase'lar
 - CrmA
 - Sitokrom c
 - Fas Ligand
 - Sinyal molekülleri
5. RN ase Protection ölçümü



3. HASTALAR VE YÖNTEM

3.1. Hastalar

1 Eylül 2000 ile 1 Ağustos 2001 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Tepecik SSK Hastanesi ve Behçet Uz Çocuk Hastanesi'ne başvuran 1-16 yaş grubunda akut ITP tanısı alan ve bu hastanelerde kronik ITP tanısıyla izlenmekte olan hastalar çalışmaya dahil edildi. Kronik ITP tanısı alan hastalarda öykü, fizik muayene ve laboratuvar tetkikleri (idrar tetkiki, böbrek fonksiyon testleri, antinükleer antikor, anti-dsDNA, lupus antikoagülanı, Coomb's testi) ile kollajen doku hastalıkları ekarte edildi. Altı aydan uzun süredir izlenmekte olan, splenektomi yapılmamış, trombosit sayısı $150 \times 10^9/L$ 'nin altında olan kronik ITP'li hastalar çalışmaya dahil edildi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji A.B.D.'da skolyoz ameliyatı olacak, 1-16 yaş grubunda, enfeksiyon, kan hastalığı ve kronik bir hastalığı bulunmayan, tam kan sayımı ve periferik kan incelemesi normal olan ve ailelerinden onay alınan hastalar kontrol grubu olarak kabul edildi. Hasta ve kontrol grubundan ayrıntılı hikaye alındı ve fizik muayene yapıldı. Tam kan sayımı istendi, periferik yayma ve kemik iliği aspirasyon yayması incelendi. Akut ve kronik ITP'li hastaların ve kontrol grubunun en az bir aydır herhangi bir ilaç tedavisi almamış ve enfeksiyon geçirmemiş olmasına dikkat edildi. Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri, klinik bulguları, tam kan sayımları, periferik yayma ve kemik iliği aspirasyon yaymasının inceleme sonuçları, mononükleer hücre sayısı, CD61 pozitif hücre sayımı ve apoptozis analiz sonuçları kaydedildi. Hasta ve kontrol grubundan 3-5 ml kemik iliği aspirasyon örneği EDTA'lı tüpe alınarak bir saat içinde laboratuvara ulaştırıldı.

Kemik iliği aspirasyon örneklerinden; mononükleer hücre izolasyonu, CD61 microbead'lar kullanılarak immünmanyetik yöntemle megakaryosit izolasyonu, hücre fiksasyonu ve flowsitometrede TUNEL tekniği [terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) –mediated d-UTP –biotin nick end-labeling] ile kantitatif apoptozis analizi yapıldı.

3. 2. Yöntem

3. 2. 1. Gerekli araç ve malzemeler

1. Histopaque-1077, Sigma Diagnostics Inc./ Katalog no: 1077-1.
2. Polipropilen dibi konik doku kültür tüpü, Greiner Labortechnik /Katalog no: 164160.

3. Beckman J6-MI soğutmalı santrifüj, Beckman Instruments, Inc., CA 94304, USA.
4. PBS/BSA/EDTA solüsyonu; %0.1 BSA ve 2 mM EDTA ilaveli pH 7.2 fosfat buffer saline (PBS)
5. Manyetik hücre ayırıcı (MiniMACS) Miltenyi Biotec/ Katalog no: 421-02
6. CD61 Microbead, Miltenyi Biotec/ Katalog no: 511-01
7. Large cell separasyon kolonları, Miltenyi Biotec/ Katalog no: 422-02
8. 25cm² lik doku kültür flaskları, Corning/ Katalog no: 29100
9. PBS'de %1'lik paraformaldehit
10. %70'lik etil alkol
11. Fötal calf serum (FCS)/ Biochrom KG/Katalog no: S0113)
12. RPMI-1640 medium /Sigma R6504
13. Pastör pipetleri
14. %0.4'lük trypan-blue solüsyonu (canlılık boyası)
15. Mikroskop, lam, lamel ve enjektör
16. APO-DIRECT™ Kit, Pharmingen/Katalog no:6536KK
17. Flowsitometre, Becton Dickinson, FACSCalibur / Seri no: E1914
18. Distile su
19. 37°C su banyosu
20. Buzdolabı
21. Buz paketi
22. 12x75mm'lik polystrene flowsitometri test tüpleri, Falcon/ Katalog no:352052
23. Ayarlanabilir otomatik mikropipetler
24. Otomatik kan sayım cihazı, STKS-Coulter inc. /Seri no: S10180

3. 2. 2. Mononükleer hücre izolasyonu

Boyum tarafından periferik kan ve kemik iliği aspirasyonundaki mononükleer hücrelerin izolasyonu için tanımlanan yöntemle göre mononükleer hücre izolasyonu yapıldı (174). Bu yöntemde polisakkarit ve radiopak kontrast ortamın karışımları kullanılmaktadır. Histopaque-1077; polisukroz ve sodyum diatrizoat solüsyonudur. Antikoagülanlı kemik iliği aspirasyon materyali Histopaque-1077 üzerine tabakalandırılmaktadır. Santrifügasyon sırasında, eritrositler ve nötrofiller polisukroz ile agrege olarak hızla çökmektedir. Böylece mononükleer hücreler plazma ve Histopaque-1077 arasında kalmaktadır. Trombositlerin çoğu ise yıkama basamakları sırasında düşük devirde santrifügasyon ile uzaklaştırılmaktadır.

Yöntem;

1. Dibi konik santrifüj tüpüne yaklaşık 3-5 ml Histopaque-1077 konuldu. EDTA'lı tüpe alınan kemik iliği aspirasyon örneği %10 FCS içeren RPMI-1640 ortamı ile sulandırıldı. Sulandırılan kemik iliği örneği dikkatli olarak Histopaque-1077 üzerinde tabakalandırıldı.
2. 400 x g'de 20°C'de 20 dakika santrifüj edildi.
3. Opak interfazdaki mononükleer hücre tabakası dağıtılmadan pastör pipeti ile aspire edilerek toplandı ve interfazdaki hücreler dibi konik yeni bir tüpe dikkatli olarak transfer edildi. Üzerine yaklaşık 8-10 ml %10 FCS içeren RPMI-1640 ortamı ilave edildi ve karıştırıldı.
4. 300 x g'de 20°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Dikkatli olarak süpernatant uzaklaştırıldı (yıkama işlemi).
5. Yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı. Hücre pelletine 10 ml %10 FCS içeren RPMI-1640 ortamı ilave edildi ve karıştırıldı.

3. 2. 3. Adherent hücre deplesyonu

1. Elde edilen mononükleer hücrelerden adherent hücreleri (stroma hücreleri ve fibroblastları) ayırmak için hücre pelleti 25cm² lik doku kültür flaskına aktarıldı. 37°C'de, %5 CO₂ içeren nemli ortamda 1-2 saat inkübe edildi.
2. Daha sonra adherent olmayan mononükleer hücreler santrifüj tüpüne transfer edildi. 200 x g'de 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı.
3. Yıkama işlemi bir kez daha tekrar edildi. Hücreler yaklaşık 4-5 ml PBS/BSA/EDTA solüsyonunda resüspanse edildi.
4. Otomatik kan sayım cihazında hücre sayımı yapıldı.
5. Trypan-blue solüsyonu ile canlılık kontrolü yapıldı.

3. 2. 4. Megakaryosit izolasyonu (175)

1. Mononükleer hücre süspansiyonu 200 xg'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı ve 1×10^7 hücre 80 µl PBS/BSA/EDTA solüsyonunda resüspanse edildi.
2. CD61 microbead solüsyonundan 20 µl ilave edilerek karıştırıldı ve 4-8°C'deki buzdolabında 15 dakika inkübe edildi.

3. İnkübasyondan sonra 1-2 ml PBS/BSA/EDTA solüsyonu ilave edildi, 200 x g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı (yıkama işlemi).
4. 500 µl PBS/BSA/EDTA solüsyonunda resüspanse edildi. Flow cytometry'de analiz için küçük bir örnek alındı.
5. Large cell seperasyon kolonu MiniMACS manyetik alanına yerleştirildi. Kolona akım rezistörü (23 G iğne) bağlandı.
6. Kolonun üzerinden 500 µl PBS/BSA/EDTA solüsyonu ilave edildi ve kolonun içinden geçmesi beklendi.
7. CD61 microbead'larla işaretlenmiş mononükleer hücre süspansiyonu kolonun üzerinden akıtıldı. Hücre süspansiyonunun kolondan geçmesi beklendi ve sonrasında üç kez 500 µl PBS/BSA/EDTA solüsyonu ilave edildi. Kolondan akan solüsyon CD61 negatif fraksiyon olarak kabul edildi.
8. Kolon manyetik alandan kaldırıldı, akım rezistörü çıkarıldı ve kolon yeni bir toplama tüpünün üzerine yerleştirildi.
9. Kolona 1 ml PBS/BSA/EDTA solüsyonu ilave edildi ve kolonun iticisi kullanılarak basınçlı bir şekilde kolona tutunan CD61 pozitif hücreler (megakaryositler) tüpe akıtıldı.

3. 2. 5. Megakaryositlerin Fikzasyonu

1. 1-2X10⁶ CD61 pozitif hücre 0.5 ml PBS solüsyonunda resüspanse edildi.
2. Hücre süspansiyonuna 5 ml soğuk (2-8°C) %1'lik paraformaldehit ilave edildi ve 15 dakika buz üzerinde bekletildi.
1. Bu karışım 300 x g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
2. Hücreler 5 ml PBS içinde yıkandı ve daha sonra santrifügasyon ile hücreler pellet edildi. Yıkama ve santrifügasyon işlemi bir kez daha tekrarlandı.
3. Hücreler 0.5 ml PBS'de resüspanse edildi.
4. Süspansiyona 5 ml soğuk %70'lik etanol ilave edildi.
5. Hücre süspansiyonu buz üzerinde veya buzdolabında en az 30 dakika bekletildi. (Fikse edilen hücreler apoptozis değerlendirmesi için -20°C'de aylarca bekletilebilmektedir.)

3. 2. 6. TUNEL Tekniği ile kantitatif apoptozis analizi (115,116,176)

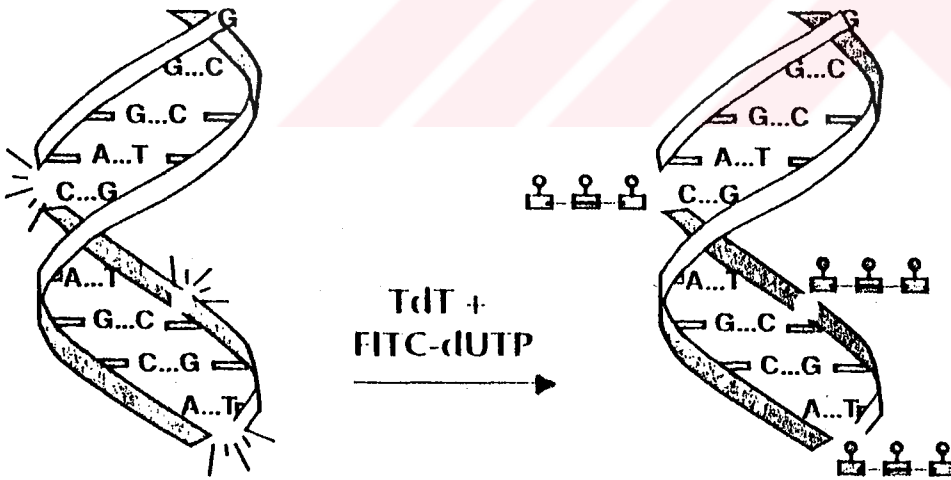
3. 2. 6. 1. APO-DIRECT™ Kit (Pharmingen, Katalog no:6536KK)

APO-DIRECT™ Kit; flow cytometry ile apoptotik hücreleri saptamak için DNA kırıklarını işaretleme yöntemini kullanan tek basamaklı bir boyama metodudur. Bu kit hücrelerdeki apoptozisi ölçmek için gerekli olan bütün reaktifleri içermektedir:

1. Reaktiflerin performansını değerlendirmek için pozitif ve negatif kontrol hücreleri
2. Testle her basamakta kullanmak üzere yıkama, reaksiyon ve yıkama tamponları
3. Terminal deoksinükleotidil transferaz (Tdt) enzimi
4. DNA kırıklarını işaretlemek için floresan işaretli deoksiuridine trifosfat nükleotidleri (d UTP- FITC)
5. Total DNA'yı boyamak için Propidium iodide (PI) /RNase solüsyonu

APO-DIRECT™ Kit ile işaretleme şematik olarak Şekil 4'de gösterilmektedir.

Tdt enzimi fikse edilmiş hücrelerdeki çift ve tek zincirli DNA'nın 3'-hidroksil uçlarına dUTP-FITC'ların bağımsız olarak eklenmesini katalize etmektedir. DNA kırık bölgeleri dUTP-FITC'lar tarafından tanımlanmaktadır.

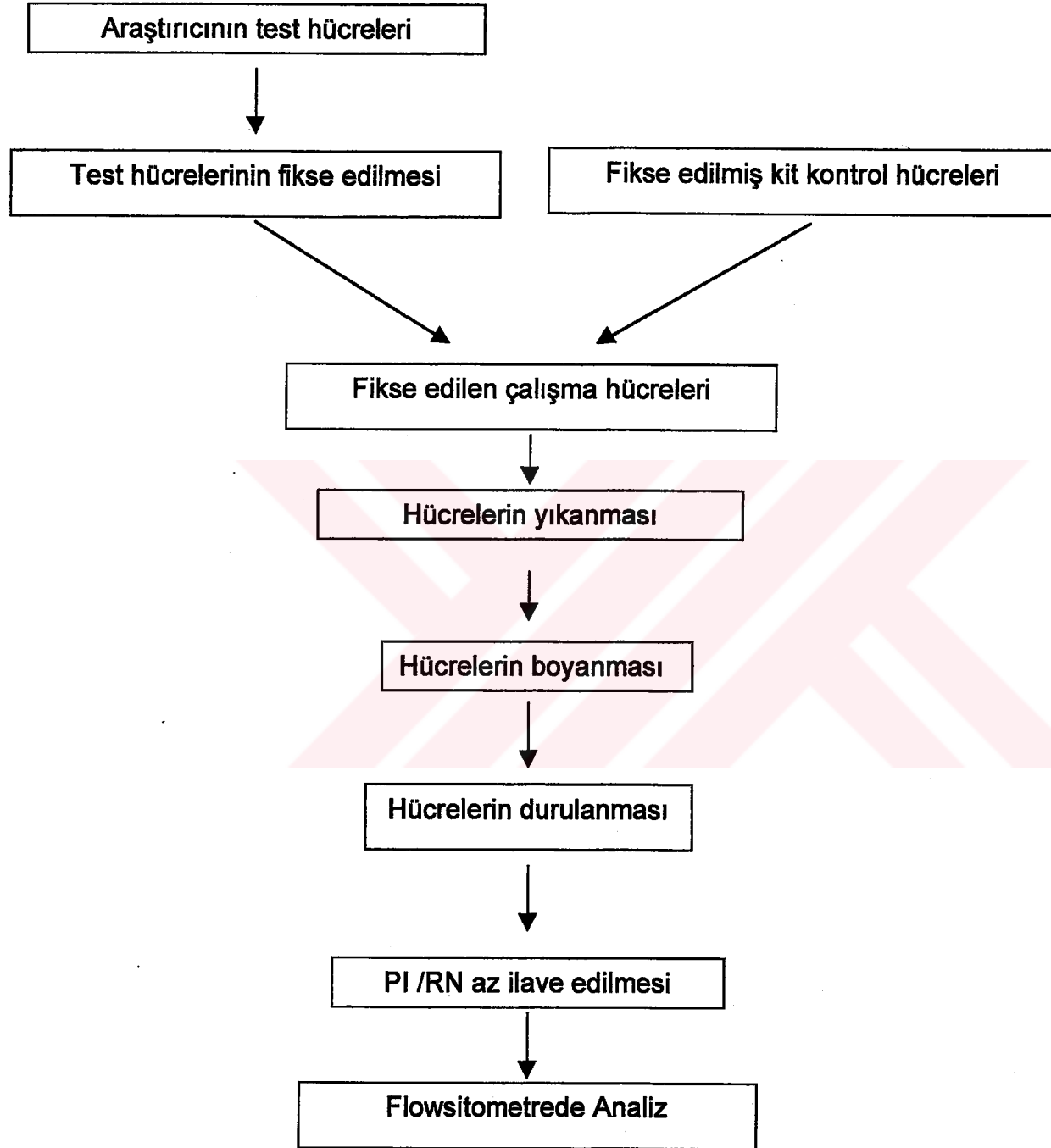


DNA zincir kırıkları

DNA'nın 3'-OH uçlarına dUTP-FITC'ların eklenmesi

Şekil 4. APO-DIREKT Kit ile işaretleme.

APO-DIRECT™ Kit ile apoptozis ölçümünde kullanılan basamakların akım şeması Şekil 5 'de gösterilmektedir.



Şekil 5. APO-DIRECT™ Kit ile apoptozis ölçümünde kullanılan basamakların akım şeması.

APO-DIRECT™ Kit'deki pozitif ve negatif kontrol hücrelerindeki apoptozisin değerlendirilmesi için aşağıdaki protokol tanımlanmaktadır. Araştırılacak olan hücre

örneklerindeki (megakaryositlerdeki) apoptozisin değerlendirilmesi için de aynı standart yöntem kullanılmaktadır

3. 2. 6. 2. Hücrelerin Boyanması:

1. Pozitif ve negatif kontrol hücre şişeleri döndürülerek resüspanse edildi. Kontrol hücre süspansiyonlarından 1 ml (1×10^6 hücre/ml) alınarak, 12X75mm santrifüj tüpüne transfer edildi. 300 x g'de 5 dakika santrifüj edilerek aspirasyonla %70'lik alkol uzaklaştırıldı. Hücre pelletinin dağılmamasına dikkat edildi.
2. Her tüpe 1ml yıkama tamponu ilave edilerek hücreler resüspanse edildi. Santrifüj edilerek süpernatant aspirasyon ile uzaklaştırıldı. Aynı işlem bir kez daha tekrar edildi.
3. Kontrol hücre pelletlerinin her biri 50 µl boyama solüsyonunda resüspanse edildi. Boyama solüsyonu aşağıda tanımlandığı şekilde hazırlandı.

Boyama solüsyonu

1Test için

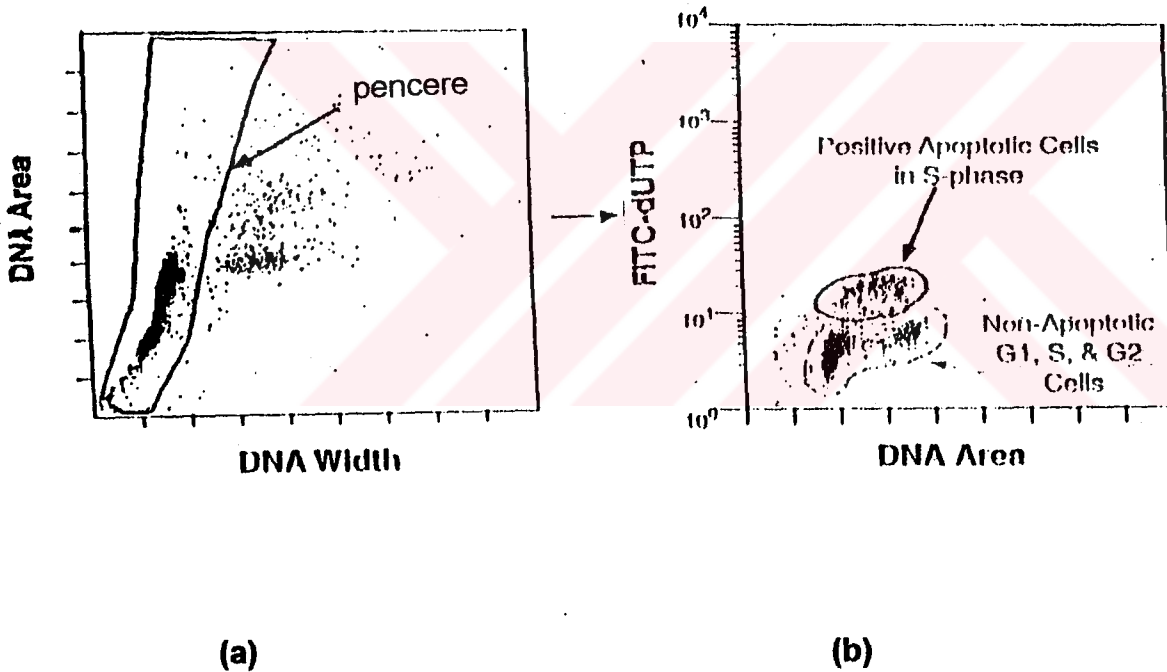
Reaksiyon tamponu	10 µl
Tdt enzimi	0.75 µl
d UTP- FITC	8 µl
Distile su	32 µl
Total hacim	50.75 µl

(Bu şekilde hazırlanan DNA işaretleme solüsyonu +4°C'de 24 saat aktif olarak kalabilmektedir.)

4. Boyama solüsyonundaki hücreler 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
5. Inkübasyon zamanının sonunda her bir tüpe 1 ml yıkama tamponu ilave edildi ve 300 x g'de 5 dakika santrifüj edildi, aspirasyon ile süpernatant atıldı.
6. Yıkama işlemi bir kez daha tekrar edildi.
7. Hücre pelleti 0.5 ml PI /RN ase solüsyonunda resüspanse edildi.
8. Hücreler oda ısısında karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildi.
9. Inkübasyondan sonra PI /RN az solüsyonundaki hücreler üç saat içinde flowsitometrede analiz edildi.

3. 2. 6. 3. Flowsitometrede örneklerin analizi:

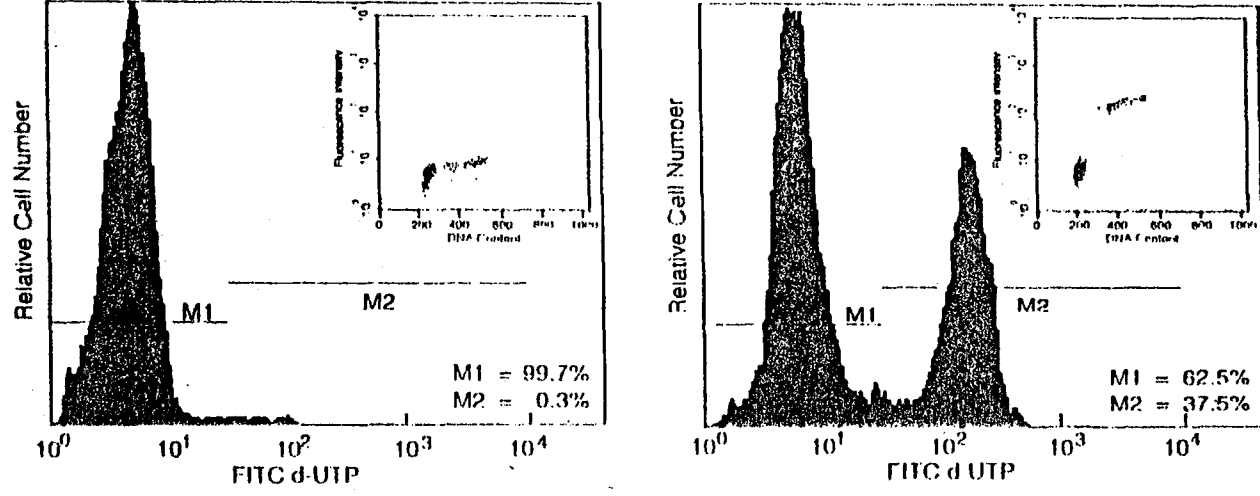
Bu testin çalışılması için ışık kaynağı olarak 488 nm argon lasere sahip bir flowsitometre cihazı gereklidir. İki boya kullanılmaktadır: PI; total DNA'yı, FITC- dUTP ise; apoptotik hücreleri boyamaktadır. PI yaklaşık 623 nm'de, FITC- dUTP ise 520 nm'de floresan vermektedir. X-ekseninde DNA-width ve y-ekseninde DNA-Area sinyalleri ile tekli ve çiftli DNA dağılımını gösteren standart görüntü elde edildi. Bu görüntüden, tekli DNA dağılımı gösteren hücreleri içeren bir pencere alındı (Şekil 6a). Pencere içine alınan tekli hücrelerin x-ekseninde DNA (lineer kırmızı floresans) ve y-ekseninde FITC-dUTP (log yeşil floresans) sinyallerinden oluşan görüntüsü oluşturuldu (Şekil 6b).



Şekil 6a ve 6b. Becton Dickinson Hardware için flowsitometrenin ayarlanması.

Apoptotik hücrelerin 3'OH DNA uçlarına bağlanan FITC- dUTP'nin yoğunluğunun hücre sayısına göre dağılımı elde edildi. M1 olarak işaretlenen pik apoptotik olmayan hücreleri, M2 olarak belirtilen pik ise FITC- dUTP ile yoğun boyanan apoptotik hücreleri göstermektedir. Pozitif ve negatif kontrol hücrelerin flowsitometredeki beklenen sonuçları Şekil 7'de gösterilmektedir.

Pozitif ve negatif kontrol hücrelerdeki ve çalışma grubunda izole edilen megakaryositlerdeki apoptozis oranları yüzde olarak tespit edildi.



Negatif kontrol

Pozitif kontrol

Şekil 7. Pozitif ve negatif kontrol hücrelerin flowsitometredeki beklenen sonuçları.

3. 3. İstatistik yöntemler

“SPSS for MS Windows Release 8.0” istatistik programı kullanılarak sayısal değişkenler için gruplar arası ikili karşılaştırmalar öncesi, farklılığın önemliliği “Kruskal-Wallis 1-way Anova” varyans analizi yöntemi ile değerlendirildi. Sonrasında ikili karşılaştırmalar “Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test” ile yapıldı. Gruplar arasındaki yüzde oranlarının karşılaştırılmasında “Pearson Q Square Test” ve beklenen değerlerden biri beşten küçük olduğunda “Fisher’s Exact Test” kullanıldı. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

1 Eylül 2000- 1 Ağustos 2001 tarihleri arasında 1-16 yaşlarında, akut ITP tanısı alan 15 hasta, kronik ITP tanısıyla izlenmekte olan 10 hasta ve kontrol grubu olarak 10 skolyozlu ancak diğer yönlerden sağlıklı çocuk çalışmaya dahil edildi. Akut ve kronik ITP'li hastalarda öykü, fizik muayene ve laboratuvar tetkikler ile diğer trombositopeni nedenleri ekarte edildi. Akut ve kronik ITP tanısı alan hastaların kemik iliği aspirasyon incelemesinde megakaryositler normal veya artmış sayıda bulundu, patolojik bulgu saptanmadı. Kontrol grubunun öykü, fizik muayene, laboratuvar tetkikleri ve kemik iliği aspirasyon incelemesinde de patolojik bulgu tespit edilmedi. Tüm olguların 17'si (%49) kız, 18'i (%51) erkekti. 25 olgu (%72) Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, beş olgu (%14) Tepecik SSK Hastanesi ve beş olgu da (%14) Behçet Uz Çocuk Hastanesi'nde izlenmekteydi. Akut, kronik ITP'li ve kontrol grubundaki tüm olguların yaşları, hemoglobin, lökosit ve trombosit değerleri Tablo 2 'de verilmektedir.

Tablo 2. Akut, kronik ITP'li ve kontrol grubundaki tüm olguların yaşları, hemoglobin, lökosit ve trombosit değerleri.

	Ortalama $\pm$ SD	Ortanca	Min-Max
n=35			
Yaş (yıl)	8.21 $\pm$ 4.50	7.30	1-16
Hemoglobin (g/dl)	12.13 $\pm$ 1.03	12.10	9.9- 14.4
Lökosit (X10 ⁹ /L)	8.10 $\pm$ 2.45	7.30	4.6-14.7
Trombosit (X10 ⁹ /L)	101.0 $\pm$ 131.0	24.00	1.0- 453.0

Akut ve kronik ITP'li hasta grubunda başvuru şikayeti olarak beş olguda (%20) döküntü, beş olguda (%20) morluklar, 15 olguda (%60) ise döküntü ve morluklar bildirildi.

Tanı anında yapılan fizik muayenede dört hastada (%16) sadece peteşiler, bir hastada (%4) ekimozlar ve 20 hastada (%80) ise peteşi ve ekimozlar tespit edildi. Bunlara ek olarak altı hastada (%24) burun veya ağız mukozasında kanama tespit edildi. Hiçbir hastada izlem sırasında intrakranial kanama gözlenmedi.

Hasta grubundan sekizine (%32) ITP tedavisi için pulse metilprednizolon, üçüne (%12) IVIG, beşine (%20) pulse metilprednizolon + IVIG, üçüne ise (%12) pulse metilprednizolon + IVIG + Anti-D verildi. Akut ITP'li altı olguya (%24) tedavi verilmedi.

Akut ITP'li bir hastada (%4) tanıdan altı ay sonra rekürrens gözlemlendi. Akut ITP grubundaki iki hastada izlem sırasında kronikleşme oldu. Kronik ITP grubundaki hastalar örneklem sırasında ortalama 14.5 ay (minimum 8, maksimum 50 ay) (ortalama 17.6 ay $\pm$ 12.0) izlenmekte idi.

Akut ITP'li, kronik ITP'li ve kontrol grubundaki hastaların yaşları, hemoglobin, lökosit ve trombosit değerleri Tablo 3'de verilmektedir.

Tablo 3. Akut ITP, kronik ITP ve kontrol grubunun yaşları, hemoglobin, lökosit ve trombosit değerleri.

	Ortalama	$\pm$ SD	Ortanca	Min-Max
Akut ITP (n=15)				
Yaş (yıl)	5.75	3.73	5.5	1-13
Hemoglobin (g/dl)	12.15	1.20	12.10	10.1-14.4
Lökosit ($\times 10^9/L$)	8.24	2.60	7.60	4.6-12.2
Trombosit ($\times 10^9/L$)	14.33	10.10	12.00	1.00-36.00
Kronik ITP (n=10)				
Yaş (yıl)	8.65	3.02	7.65	3.7-13
Hemoglobin (g/dl)	11.95	1.22	11.9	9.9-14
Lökosit ($\times 10^9/L$)	8.2	2.72	7.45	5.8-14.7
Trombosit ($\times 10^9/L$)	40.10	37.36	25.00	8.00-110.00
Kontrol (n=10)				
Yaş (yıl)	11.46	4.87	13.45	4-16
Hemoglobin (g/dl)	12.28	0.86	12.25	10.9-13.5
Lökosit ($\times 10^9/L$)	7.80	2.14	7.20	5.6-11.4
Trombosit ($\times 10^9/L$)	291.9	77.90	277.00	194.00-453.00

Akut ITP grubundaki 15 hastanın yedisi (%47) kız, sekizi (%53) erkek idi. Kronik ITP grubu beş (%50) kız, beş (%50) erkek toplam 10 hastadan oluşmaktaydı. Kontrol grubundaki 10 hastanın ise beşi (%50) kız, beşi (%50) erkek idi. Gruplar arasında cinsiyet dağılımları açısından istatistiksel bir fark bulunmadı ($p=0.981$).

Grupların örneklem sırasındaki yaş ortalamaları karşılaştırıldığında; akut ve kronik ITP grupları arasında istatistiksel bir fark bulunmadı ($p=0.071$), aynı şekilde kronik ITP ve kontrol grup arasında da fark gösterilemedi ($p=0.14$). Akut ITP grubundaki hastaların yaş ortalaması kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha küçük bulundu ($P=0.008$).

Grupların örneklem sırasındaki hemoglobin ve lökosit ortalamaları karşılaştırıldığında üç grup arasında fark bulunamadı ($p=0.795$, $p=0.835$).

Her üç grubun örneklem sırasındaki trombosit sayıları karşılaştırıldığında; akut ITP grubunda ortalama trombosit sayısı kronik ITP grubu ve kontrol grubuna göre belirgin olarak düşük bulundu ($p=0.043$, $p=0.000$). Kronik ITP grubunun ortalama trombosit sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak belirgin düşük bulundu ($p=0.000$).

Tüm vakaların kemik iliği aspirasyon örneklerinde megakaryosit izolasyonu yapıldı. Megakaryositlerde apoptozis oranı yüzde olarak bulundu.

Akut ITP, kronik ITP, kontrol grubu ve tüm olgularının megakaryosit sayısı ve megakaryositlerdeki apoptozis oranları Tablo 4'de verilmiştir.

Gruplar izole edilen megakaryosit sayılarının ortalamalarına göre karşılaştırıldığında her üç grup arasında istatistiksel bir fark bulunmadı ($p=0.851$).

Tüm olguların cinsiyetleri ile megakaryosit apoptozis oranları arasında istatistiksel bir fark bulunmadı ($p=0.391$).

Tüm olguların yaşları ile megakaryosit apoptozis oranları arasında bir korelasyon bulunmadı ($p=0.605$).

Fizik muayenesinde ağız mukozası ve/veya burun mukozasından kanama bulgusu olanlar, olmayanlar ile karşılaştırıldığında megakaryosit apoptozis oranları farklı bulunmadı ($p=0.949$).

Tablo 4. Akut ITP, kronik ITP ve kontrol gruplarının megakaryosit sayısı ve megakaryositlerdeki apoptozis oranları.

	Ortalama	$\pm$ SD	Ortanca	Min-Max
Akut ITP (n=15)				
Megakaryosit sayısı (X10 ⁶)	0.97	0.47	0.90	0.40- 2.20
Apoptozis oranı (%)	8.96	7.09	7.60	0.60- 26.23
Kronik ITP (n=10)				
Megakaryosit sayısı (X10 ⁶)	1.04	0.38	0.90	0.60- 1.60
Apoptozis oranı (%)	4.59	2.33	4.65	1.63- 8.13
Kontrol (n=10)				
Megakaryosit sayısı (X10 ⁶)	1.15	0.97	0.88	0.20- 3.60
Apoptozis oranı (%)	9.79	9.67	6.21	0.83- 27.06
Toplam (n=35)				
Megakaryosit sayısı (X10 ⁶)	1.04	0.62	0.90	0.20-3.60
Apoptozis oranı (%)	7.95	7.19	5.41	0.60-27.06

Tüm olguların örneklem sırasındaki hemoglobinleri, lökosit sayıları ve trombosit sayıları ile megakaryosit apoptozis oranları arasında korelasyon tespit edilmedi ($p=0.560$, $p=0.955$, 0.649).

Tüm olguların izole edilen megakaryosit sayısı ile megakaryosit apoptozis oranları arasında bir korelasyon saptanmadı ($p=0.174$).

Akut ITP grubunun ortalama megakaryosit apoptozis oranı, kontrol grup ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel bir fark bulunmadı ($p=0.782$).

Kronik ITP grubunun ortalama megakaryosit apoptozis oranı, kontrol grup ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel bir fark bulunmadı ($p=0.364$).

Akut ITP grubunun ortalama megakaryosit apoptozis oranı, kronik ITP grubu ile karşılaştırıldığında aralarında fark görülmekle beraber, istatistiksel bir fark bulunmadı ($p=0.052$); ancak sınırda bir değer elde edildi. Megakaryosit apoptozis oranları uç değerlerde olan iki vaka gruplardan çıkarıldıktan sonra; kronik ITP grubunun ortalama megakaryosit apoptozis oranı akut ITP grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük bulundu ($p=0.030$).

Kronik ITP'nin süresi ile megakaryosit apoptozis oranları arasında da bir korelasyon bulunmadı ($p=0.842$).

Akut ITP döneminde megakaryosit apoptozu değerlendirilen ve izlemde kronikleşen iki olgunun akut dönemde elde edilen apoptoz oranları (%8.40 ve %9.47) kronik ITP'li hastaların ortalama megakaryosit apoptoz oranına ($\%4.59 \pm 2.33$) göre yüksek bulundu. Ancak hasta sayısı az olduğu için istatistiksel değerlendirme yapılmadı.

5. SONUÇLAR

- 1 Eylül 2000- 1 Ağustos 2001 tarihleri arasında 1-16 yaşlarında, akut ITP tanısı alan 15 hasta, kronik ITP tanısıyla izlenmekte olan 10 hasta ve kontrol grubu olarak 10 skolyozlu ancak diğer yönlerden sağlıklı çocuk çalışmaya dahil edildi.
- Tüm olguların 17'si (%49) kız, 18'i (%51) erkekti. 25 olgu (%72) Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, beş olgu (%14) Tepecik SSK Hastanesi ve beş olgu da (%14) Behçet Uz Çocuk Hastanesi'nde izlenmektedir.
- Akut ve kronik ITP'li hasta grubunda başvuru şikayeti olarak beş olguda (%20) döküntü, beş olguda (%20) morluklar, 15 olguda (%60) ise döküntü ve morluklar bildirildi.
- Tanı anında yapılan fizik muayenede dört hastada (%16) sadece peteşiler, bir hastada (%4) ekimozlar ve 20 hastada (%80) ise peteşi ve ekimozlar tespit edildi. Bunlara ek olarak altı hastada (%24) burun veya ağız mukozasında kanama tespit edildi. Hiçbir hastada izlem sırasında intrakranial kanama gözlenmedi.
- Hasta grubundan sekizine (%32) ITP tedavisi için pulse metilprednizolon, üçüne (%12) IVIG, beşine (%20) pulse metilprednizolon + IVIG, üçüne ise (%12) pulse metilprednizolon + IVIG + Anti-D verildi. Akut ITP'li altı hastaya (%24) tedavi verilmedi.
- Akut ITP'li bir hastada (%4) tanıdan altı ay sonra rekürrens gözlemlendi. Akut ITP grubundaki iki hastada (%13) izlem sırasında kronikleşme oldu.
- Kronik ITP grubundaki hastalar örneklem sırasında ortanca 14.5 ay (minimum 8, maksimum 50 ay) (ortalama 17.6 ay $\pm$ 12.0) izlenmekte idi.
- Akut ITP grubundaki 15 hastanın yedisi (%47) kız, sekizi (%53) erkek idi. Kronik ITP grubu beş (%50) kız, beş (%50) erkek toplam 10 hastadan oluştu. Kontrol grubundaki 10 hastanın ise beşi (%50) kız, beşi (%50) erkek idi. Gruplar arasında cinsiyet dağılımları açısından istatistiksel bir fark bulunmadı ($p=0.981$).
- Grupların örneklem sırasındaki yaş ortalamaları karşılaştırıldığında; akut ve kronik ITP grupları arasında istatistiksel bir fark bulunmadı ($p=0.071$), aynı şekilde kronik ITP ve kontrol grup arasında da fark gösterilemedi ($p=0.14$). Akut ITP grubundaki hastaların yaş ortalaması kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha küçük bulundu ($P=0.008$).

- Grupların örneklem sırasındaki hemoglobin ve lökosit ortalamaları karşılaştırıldığında üç grup arasında fark bulunmadı ($p=0.795$, $p=0.835$).
- Her üç grubun örneklem sırasındaki trombosit sayıları karşılaştırıldığında; akut ITP grubunda ortalama trombosit sayısı kronik ITP grubu ve kontrol grubuna göre belirgin olarak düşük bulundu ($p=0.043$, $p=0.000$). Kronik ITP grubunun ortalama trombosit sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak belirgin düşük bulundu ($p=0.000$).
- Gruplar izole edilen megakaryosit sayılarının ortalamalarına göre karşılaştırıldığında her üç grup arasında istatistiksel bir fark bulunmadı ($p=0.851$).
- Tüm olguların cinsiyetleri ile megakaryosit apoptoz oranları arasında istatistiksel bir fark bulunmadı ($p=0.391$).
- Tüm olguların yaşları ile megakaryositlerdeki apoptoz oranları arasında bir korelasyon bulunmadı ($p=0.605$).
- Fizik muayenesinde ağız mukozası ve/veya burun mukozasından kanama bulgusu olanlar, olmayanlar ile karşılaştırıldığında megakaryosit apoptoz oranları farklı bulunmadı ($p=0.949$).
- Tüm vakaların örneklem sırasındaki hemoglobinleri, lökosit sayıları ve trombosit sayıları ile megakaryosit apoptoz oranları arasında korelasyon tespit edilmedi ($p=0.560$, $p=0.955$, 0.649).
- Tüm olguların izole edilen megakaryosit sayısı ile megakaryosit apoptoz oranları arasında bir korelasyon saptanmadı ($p=0.712$, $p=0.174$).
- Akut ITP grubunun ortalama megakaryosit apoptoz oranı, kontrol grup ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel bir fark bulunmadı ($p=0.782$).
- Kronik ITP grubunun ortalama megakaryosit apoptoz oranı, kontrol grup ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel bir fark bulunmadı ($p=0.364$).
- Akut ITP grubunun ortalama megakaryosit apoptoz oranı, kronik ITP grubu ile karşılaştırıldığında aralarında fark görülmekle beraber, istatistiksel bir fark bulunmadı ($p=0.052$); ancak sınırda bir değer elde edildi. Megakaryosit apoptoz oranları uç değerlerde olan iki vaka gruplardan çıkarıldıktan sonra; kronik ITP grubunun ortalama megakaryosit apoptoz oranı akut ITP grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük bulundu ($p=0.030$).
- Kronik ITP'nin süresi ile megakaryosit apoptoz oranları arasında da bir korelasyon bulunmadı ($p=0.842$).

- Akut ITP döneminde megakaryosit apoptozu değerlendirilen ve izlemde kronikleşen iki olgunun akut dönemde elde edilen apoptoz oranları (%8.40 ve %9.47) kronik ITP'li hastaların ortalama megakaryosit apoptoz oranına (%4.59 $\pm$ 2.33) göre yüksek bulundu. Ancak hasta sayısı az olduğu için istatistiksel değerlendirme yapılmadı.



6.TARTIŞMA

Akut ve kronik ITP'nin insidansı, prognozu ve tedavisi farklıdır. Uzun zamandır akut ve kronik ITP'nin farklı hastalıklar olduğuna inanılmakta ve bu iki klinik tablonun bir sendromun iki spektrumu olduğu düşünülmektedir (19,20). ITP'li hastalarda hücresele immünite ile ilişkili çok sayıda patoloji tanımlanmıştır (41-44,177,178). IFN- γ , IL-2 ve IL-10'un serum düzeylerindeki farklılıklar kronik ve akut ITP'nin patogeneğinde farklı mekanizmaların rol oynadığını desteklemektedir. Akut ITP'nin patogeneğinde sıklıkla bir enfeksiyon sonrası uygunsuz immün yanıt oluşması suçlanmaktadır (49). Tersine kronik ITP'nin nedeni olarak, spesifik otoantikor üretiminin, T hücre aktivasyonunun ve sitokin üretiminin artması ile HLA-DR'nin stimüle ettiği sabit bir immün yanıt düşünülmektedir (5).

Çocukların çoğunda enfeksiyöz bir hastalıktan 1-6 hafta sonra trombositopeni gelişmektedir. Çoğunlukla bakterial veya nonspesifik viral bir ajan enfeksiyona neden olmaktadır. Çocukluk çağındaki ITP'lerde enfeksiyon öyküsü %50-65 olarak bildirilmektedir (2,5). Bu çalışmada apoptozis oranını etkileyebileceğinden son bir ay içinde enfeksiyon öyküsü olan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. İlaç kullanımının da ITP'ye neden olabileceği bilinmektedir, ancak ilaçlar apoptozu etkileyebileceğinden, ilaç kullanımı öyküsü olan hastalar da çalışma dışı bırakılmıştır. Bu nedenle çalışmaya alınan hasta sayısı sınırlı kalmıştır.

ITP'de kanama bulguları trombositopeninin derecesine bağlıdır, sıklıkla kolay morarma ve ciltte peteşiler ilk bulgulardır (5). Bu çalışmada akut ve kronik ITP'li hastaların muayenelerinde, % 16'sında sadece peteşiler, % 4'ünde sadece ekimozlar, %80'inde ise peteşiler ve ekimozlar tespit edilmiştir. Trombosit sayısı $10 \times 10^9/L$ 'nin altında olduğu zaman ağır mukozal kanamalar, hematüri ve menoraji görülmektedir (5). Bu çalışmada % 24 vakada ağız veya burun mukozasında kanama tespit edildi, bu vakaların çoğunda trombosit sayısı $10 \times 10^9/L$ 'nin altında idi. ITP'li çocuklarda en sık ölüm nedeni intakranial kanamalardır, % 0.5-1 oranında bildirilmektedir (5,50). Bizim çalışma grubumuzda hiç bir hastada intrakranial kanama görülmemiştir.

Akut ITP'nin en sık görülme yaşı 2-4 yaştır ve her iki cinsiyette de eşit oranda görülmektedir (22,23). Bu çalışmadaki akut ITP'li hastaların ortalama yaşları 5.75

(± 3.73), ortalanca yaşları 5.5 (min 1-max 13) ve kız/ erkek oranı 7/8 olarak bulundu. Bu bulgular daha önceki yayınlarla uyumlu idi. Akut ITP'li hastaların ortalama trombosit sayısı $14.33 \times 10^9/L$ ($\pm 10.10 \times 10^9/L$), (min 1.0-max $36.0 \times 10^9/L$) idi, kronik ITP ve kontrol grubuna göre belirgin olarak düşük bulundu.

Çocukluk çağındaki ITP'li hastaların tam remisyon olasılığı tanıdan altı ay sonrasına kadar %80-90, tanıdan 3-37 yıl sonra ise %90'ın üzerindedir. Çocukluk çağındaki hastaların %3-5'i kronikleşme göstermektedir (5). Bu çalışmada akut ITP grubundaki 15 hastanın ikisinde (%13) izlem sırasında kronikleşme gözlenmiştir. Ancak hastaların bir kısmı çalışma tamamlandığında henüz altı aylık izlem süresini doldurmadıklarından bu veriler ile vakaların kesin kronikleşme oranını söylemek doğru olmayacaktır.

Kronik ITP'li hastaların çoğunun tanı anında yedi yaş ve üzerinde olduğu, tanı anındaki trombosit sayısının $20 \times 10^9/L$ 'nin üzerinde bulunduğu ve kız cinsiyetin çoğunlukta olduğu bildirilmektedir (5,51). Bu çalışmada kronik ITP'li hastaların yaş ortalaması 8.65 (± 3.02), ortalanca yaşları 7.65 (min 3.7-max 13) ve kız/ erkek oranı 5/5 olarak bulundu. Daha önceki yayınlarla uyumlu olarak, kronik ITP'li hastaların yaş ortalamaları akut ITP'li hastalardan belirgin olarak daha büyük saptandı. Kronik ITP'li hastaların ortalama trombosit sayısı $40.10 \times 10^9/L$ ($\pm 37.36 \times 10^9/L$), (min 8.0-max $110.0 \times 10^9/L$) idi. Kronik ITP'li hastaların ortalama trombosit sayıları, akut ITP grubuna göre belirgin olarak yüksek, kontrol grubuna göre ise belirgin olarak düşük bulundu.

ITP'de fizyopatolojiyi aydınlatmak için çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarda çoğu ITP hastasının plazmasında ve trombositleri üzerinde GplIbIIIa, GplbIX, GplIa, GpV, GpIV ve diğer spesifik trombosit glikoproteinlerine karşı IgG ve/veya IgM tipinde otoantikorlar tanımlanmıştır (7-10). Ancak son yıllarda geliştirilen tekniklerle bile ITP'li hastaların en az %20'sinde halen anti-trombosit antikorlar tespit edilememektedir (11,33,34). Bu durum fizyopatolojide başka mekanizmalar olduğunu düşündürmektedir.

Trombositler gibi megakaryositlerin de maturasyon sırasında yüzeylerinde GplIbIIIa ve Gplb eksprese ettikleri gösterilmiştir. Plazmada bu glikoproteinlere karşı bulunan antikorların megakaryositlere de bağlandığı ve in vitro şartlarda megakaryosit üretimini azalttığı gösterilmiştir (15,16). Bu antikorların megakaryositlerin

çoğalmalarını ve matürasyonlarını bozabileceği, hatta kompleman aktivasyonu veya fagositoz ile erken yıkılmalarına sebep olabileceği düşünülmektedir (17).

ITP'de artmış trombosit yıkımı megakaryopoezis stimülasyonuna neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda artmış megakaryosit koloni formasyonu gösterilmiş, ancak megakaryosit progenitörlerinin gelişiminde supresyon ve/veya maturasyon duraklaması bildirilmiştir. Bu bulgular, ITP patofizyolojisinde ineffectif megakaryopoezisin de etkili olduğunu göstermektedir (18). Başka bir çalışmada ise kronik ITP'de in vitro megakaryosit koloni formasyonunun azaldığı gösterilmiştir (40). ITP'li hastalarda megakaryosit apoptozunu araştıran çok az sayıda çalışma vardır. Bunlardan birinde; ITP'li ve HIV pozitif trombositopenili hastalarda ve sağlıklı kişilerde megakaryosit apoptozu çalışılmıştır. HIV pozitif trombositopenili hastalarda megakaryosit apoptozu artmış bulunurken, ITP'li hastalarda normalden farksız bulunmuştur (179). Bu çalışmada hastaların yaşları ve akut veya kronik ITP oldukları belirtilmemiştir.

Bugüne kadar akut ve kronik ITP'li çocuklarda megakaryosit apoptozunu araştıran bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle, bu çalışmada çocukluk yaş grubunda akut ITP'li, kronik ITP'li hastalarda ve skolyozlu ancak diğer yönlerden sağlıklı kontrollerde kemik iliği örneklerinde megakaryosit apoptozu araştırılmıştır.

Akut ITP tanısında; öykü, fizik muayene veya periferik kan bulguları anormal olan hastalar dışında, steroid tedavisinden önce ve IVIG tedavisine yanıt alınmamışsa kemik iliği aspirasyonu yapılması önerilmektedir (1). Bizim hastalarımızın çoğuna steroid tedavisi başlandığı için tedavi öncesi kemik iliği aspirasyonu yapılmıştır. Kronik ITP'li hastalarda ise diğer hastalıklardan ayırıcı tanısının yapılması için kemik iliği aspirasyonu gerekli görülmektedir (1). Kontrol grubunun kemik iliği örnekleri ise skolyoz operasyonu sırasında operasyon bölgesinden alınmıştır.

Bu çalışmada, kemik iliğinden izole edilen megakaryositlerdeki apoptoz oranını araştırmak için TUNEL metodu kullanılmıştır. Apoptoza bağlı endonükleazların aktivasyonu sonucunda yoğun bir şekilde DNA kırılması olmaktadır. Bu metodda, DNA kırılmaları ile açığa çıkan 3'OH uçlarına ekzojen Tdt ile katalize edilerek floresan işaretli nükleotidlerin bağlanması sağlanmaktadır. Böylece flowsitometre'de apoptotik hücre oranı tespit edilmektedir. Bu yöntem geç apoptoz bulgularını saptayan ve güvenilirliği yüksek olan bir yöntem olarak kabul edilmektedir (180).

TUNEL metodunu kullanarak megakaryosit apoptozunu araştıran çok sayıda çalışma mevcuttur (115,116).

Bu çalışmada, kronik ITP'li hastaların megakaryositlerindeki ortalama apoptoz oranı, uç değerler çıkarıldığında, akut ITP'li hastalara göre belirgin olarak düşük bulunmuştur. Bir çalışmada akut ITP'li hastalarda, kronik ITP'li hastalara göre daha fazla megakaryosit koloni formasyonu gösterilmiştir (181). Bu bulgu, akut ve kronik ITP'li hastalarda trombositopeninin farklı mekanizmalarla ortaya çıktığını düşündürmektedir.

Kronik ITP'li hastalarda megakaryosit apoptozunun azalması, patofizyolojideki diğer mekanizmalara karşı koruyucu bir mekanizma olarak düşünülebilir. Kronik ITP'de saptanan azalmış koloni formasyonu ve ineffectif megakaryopoezise karşı, apoptoz azaltılarak trombosit üretimi artırılabilir. Ancak azalmış apoptoz nedeniyle korunan bu megakaryositlerin maturasyonlarının olup olmadığı ve trombosit üretiminde etkili olup olmadıkları bu çalışmada gösterilememiştir.

ITP'de trombositlerin azalması, serum TPO düzeyinde artışa neden olmakta bu da megakaryositleri stimüle etmektedir. TPO megakaryosit üzerindeki reseptörüne bağlandığı zaman megakaryositlerde apoptozisi önlemektedir (115,116). Bir çalışmada ITP'li hastalarda in vivo olarak TGF- β 1 ve stromal TPO mRNA düzeylerinin birbiriyle korele olarak arttığı ve megakaryosit maturasyon duraklaması olduğu gösterilmiştir (130). Son yıllarda kemik iliği stromal hücrelerinin yapısal olmadan TPO ürettiği, trombosit sayısına göre ITP 'li hastalarda normal kişilere göre daha yüksek düzeyde TPO mRNA bulunduğu ve tedavi ile yüksek seviyelerin normale döndüğü bildirilmiştir (126). Bu çalışmada kronik ITP'li hastalardaki azalmış apoptozun nedeni serum TPO düzeylerindeki artışa bağlı olabilir. Ancak vakalarda serum TPO düzeyleri çalışılmadığından, megakaryosit apoptozu ile serum TPO düzeyi arasındaki ilişki gösterilememiştir.

Kronik ITP otoimmün bir hastalık olarak kabul edilmektedir (19,20). Adölesanlarda, genç erişkinlerde ve kızlarda sık görülmesi, artmış IL-2 serum düzeyleri, diğer otoimmün hastalıklar gibi kronik ITP'li hastalarda da gözlenmektedir. Fizyolojik dengenin bozularak apoptozisin azalması bazı viral enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar, lenfoproliferatif hastalıklar ve kanserlerde görülmektedir (140-143). Bu çalışmada bulunan kronik ITP'li hastalardaki megakaryosit apoptozunun azalması, kronik ITP'nin diğer bazı otoimmün hastalıklardaki trombositopeniye benzer yönleri olduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmada kronik ITP'li grubun ortalama trombosit sayısı, akut ITP'li gruba göre belirgin olarak daha yüksek bulundu. Ancak olguların apoptoz oranlarının trombosit

sayısı ile korelasyon göstermediği tespit edildi. Bu nedenle kronik ITP'li hastalarda bulunan azalmış megakaryosit apoptozunun trombosit sayısından bağımsız olarak hastalığın patogenezi ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

Megakaryosit apoptoz oranlarının hastaların yaşları, cinsiyetleri, hemoglobin düzeyleri, lökosit sayıları ve izole edilen megakaryosit sayısı ile korelasyon göstermediği bulunmuştur. Yine hastalarda bulunan megakaryosit apoptoz oranının, kronik ITP'nin süresi ile de ilişkili olmadığı gösterilmiştir.

Akut ITP döneminde örneklem yapılan iki hastanın izlem sırasında kronikleştiği görülmüştür. Bunların bunların akut dönemde bakılan megakaryosit apoptozis oranları % 8.40 ve %9.47 bulunmuştur. Bu sonuçlar kronik ITP grubunun ortalama apoptozis oranından ($\%4.59 \pm 2.33$) farklıdır. Bu nedenle tanı anındaki megakaryosit apoptozis oranlarının daha sonraki dönemde kronikleşmenin bir göstergesi olmadığı düşüncesindeyiz.

Kronik ITP'li hastalardaki azalmış megakaryosit apoptozu, kemik iliğinde megakaryositleri apoptozdan korumak için anti-apoptotik moleküllerin artmış olabileceğini düşündürmektedir. Spesifik proteaz inhibitörleri terminal kaspazları hedefleyerek hücre ölümünü bloke etmektedir. Apoptoz inhibitör ailesinin proteinleri (IAP) artarak apoptozu azaltabilirler. Anti-apoptotik özellikleri olan BCL-2 ve onun ailesinden bir protein artışı apoptozu azaltabilir. FLIP molekülü, kaspaz 8'i inhibe ederek hücrede yaygın olarak bulunan apoptotik mekanizmanın sürekli aktivasyonunu engellemektedir.

Sonuç olarak; çalışmamızda kronik ITP'li hastaların megakaryosit apoptoz oranlarının akut ITP'li olgulara göre belirgin düşük olduğu görüldü ve kronik ve akut ITP'nin patogenezlerinin farklı olabileceği düşünüldü. Bu konuda daha fazla hasta popülasyonunu kapsayan ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmanın ışığında; çocukluk çağındaki kronik ITP'li hastalarda niçin megakaryosit apoptozunun azaldığı ileri çalışmalarla araştırılmalı ve kronik ITP patogenezi daha iyi aydınlatılmalıdır.

7. ÖZET

AKUT VE KRONİK İDİOPATİK TROMBOSİTOPENİK PURPURALI ÇOCUKLARDA MEGAKARYOSİT APOPTOZU

İdiopatik trombositopenik purpura (primer immün trombositopenik purpura, ITP); çocukluk yaş grubunda akut trombositopeninin en sık nedenlerinden biridir.

ITP'de trombositopeninin bilinen sebebi trombositlerin erken yıkılmasıdır. Trombosit yüzeyine karşı otoantikor oluşumu, bu otoantikorlarla kaplı trombositlerin retiküloendotelial sistem (RES)'in makrofajları üzerindeki Fc reseptörleri (FcRs) tarafından tanınması ve fagositoz ile ortamdan uzaklaştırılması ITP'nin bilinen temel fizyopatolojisidir. Ancak ITP'li hastaların en az %20'sinde halen anti-trombosit antikorlar tespit edilememektedir. Bu durum fizyopatolojide başka mekanizmalar olduğunu düşündürmekte ve muhtemel mekanizmaları aydınlatmak için çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Son yıllarda ITP'de kemik iliği çalışmalarında ineffectif megakaryopoezis ve megakaryositlerin maturasyon duraklaması olduğu dikkat çekmiştir.

Bu çalışmada akut ve kronik ITP'li çocukların kemik iliği örneklerinde megakaryosit apoptozunun ITP patogenezindeki rolünün araştırılması amaçlandı.

Çalışmaya 1 Eylül 2000- 1 Ağustos 2001 tarihleri arasında, 1-16 yaşlarında 15 akut ITP, 10 kronik ITP ve 10 skolyozlu ancak diğer yönlerden sağlıklı çocuk dahil edildi. Hastaların öykü, fizik muayene ve periferik kan bulguları kaydedildi. Tüm vakalarda kemik iliği örneğinden CD61+ manyetik microbead'lar kullanılarak megakaryosit izolasyonu yapıldı. TUNEL metodu ile megakaryosit apoptozu çalışıldı.

Sonuç olarak; çalışmamızda kronik ITP'li hastaların megakaryosit apoptoz oranlarının akut ITP'li olgulara göre belirgin düşük olduğu görüldü ($p=0.030$) ve kronik ve akut ITP'nin patogenezinin farklı olabileceği düşünüldü. Bu konuda daha fazla hasta popülasyonunu kapsayan ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmanın ışığında çocukluk çağındaki kronik ITP'li hastalarda niçin megakaryosit apoptozunun azaldığı ileri çalışmalarla araştırılmalı ve kronik ITP patogenezi daha iyi aydınlatılmalıdır.

8. SUMMARY

INVESTIGATION OF MEGAKARYOCYTE APOPTOSIS IN CHILDREN WITH ACUTE AND CHRONIC IDIOPATHIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA

Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) is one of the most frequent causes of thrombocytopenia in children.

The cause of thrombocytopenia in ITP is the premature destruction of platelets. The widely accepted essential pathophysiological mechanism for ITP is the development of autoantibodies directed against the platelet surface. These antibody-coated circulating platelets are then recognised by the Fc receptor on the splenic macrophages which ingest and destroy them. However, with the available technological methods, anti-platelet antibodies remain undetermined at least for the 20% of ITP cases. Therefore, different mechanisms may play a role in the pathophysiology of ITP. Several studies have been performed with an aim to search the possible mechanisms.

Recently, bone marrow studies in patients with ITP demonstrated ineffective megakaryopoiesis and arrest of maturation in megakaryocytes.

The aim of this study was to investigate megakaryocyte apoptosis in bone marrow of children with acute and chronic ITP and the role of apoptosis in ITP pathophysiology.

This study was performed between September 1, 2000 and August 1, 2001. Fifteen children with acute ITP and 10 children with chronic ITP were included.

Ten children with skolyosis who have been healthy otherwise were studied to serve as a control group. Medical histories, physical examination findings and periferic blood findings of patients were recorded. In all children, megakaryocytes were isolated from bone marrow samples using CD61+ magnetic beads and megakaryocyte apoptosis was studied with TUNEL method.

In our study, the ratio of megakaryocyte apoptosis in patients with chronic ITP was significantly lower than the cases with acute ITP ($p=0.030$). This result suggested that the pathogenic mechanism for acute and chronic ITP may be different.

Further studies with a larger patient population should be performed to determine the reason for decreased megakaryocyte apoptosis in pediatric patients with chronic ITP. These future studies may also help to clarify the pathogenic mechanisms for the development of chronic ITP.

9. KAYNAKLAR

1. 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.
2. Montgomery RR, Scott JP. Hemorrhagic and thrombotic diseases. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB editors. *Nelson textbook of pediatrics*, 16th edition, W.B. Saunders Company. 2000; 1504-1525.
3. Reid MM. Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: incidence, treatment and outcome. *Arch Dis Child* 1995; 72; 125.
4. Frederiksen H, Schmidt K. The incidence of ITP in adult increase with age. *Blood* 1999; 94: 909.
5. Imbach P. Immune thrombocytopenic purpura. In: Lilleyman J, Hann I and Blanchette V, editors. *Pediatric Hematology*. Second edition, London: Churchill Livingstone, Harcourt publishers limited, 1999; 437-453.
6. Blanchette V, Carcao M. Approach to the investigation and management of immune thrombocytopenic purpura in children. *Semin Hematol* 2000; 37; 299-314.
7. Kunicki TJ, NewmanPJ. The molecular immunology of human platelet proteins. *Blood* 1992; 80: 1386.
8. Fujisawa K, McMillan R. Platelet-associated antibody to glycoprotein IIb/IIIa from chronic immune thrombocytopenic purpura patients often binds to divalent cation-dependent antigens. *Blood* 1993; 81: 1284.
9. Berchtol P, Wenger M. Autoantibodies against platelet glycoproteins in autoimmune thrombocytopenic purpura: their clinical significance and response to treatment. *Blood* 1993; 81: 1246.
10. Kiefel V, Santoso S, Kaufmann E, Mueller-Eckhardt C. Autoantibodies against glycoprotein Ib/IX: a frequent finding in autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br J Hematol* 1991; 79: 256.
11. Bussel J, Cines D. Immune thrombocytopenic purpura, neonatal alloimmune thrombocytopenia, and posttransfusion purpura. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ et al, editors. *Hematology: basic principle and practice*. Third edition, Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000; 2096-2114.

12. George JN. The origin and significance of platelet IgG. In: Kunicki TJ, George JN editors. Platelet immunobiology, Molecular and clinical aspects. Philadelphia, PA, Lippincott, 1989; 305-336.
13. Kelton JG, Murphy WG, Lucarelli A, et al. A retrospective comparison of four techniques for measuring platelet-associated IgG. Br J Hematol 1989; 97: 105.
14. Mueller-Eckhardt C, Kayser W, Mersch-Baumert K, et al. The clinical significance of platelet-associated IgG: A study of 298 patients with various disorders. Br J Hematol 1980; 46: 123-131.
15. McMillan R, Luiken GA, Levy R, et al. Antibody against megakaryocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura. JAMA 1978; 239: 2460-2462.
16. Chang M, Nakagawa PA, Schwartz M, et al. Effects of immune thrombocytopenic purpura (ITP) patient plasma on in vitro megakaryocytopoiesis. Blood 1999; 94: 646a (suppl 1, abstr).
17. Vainchenker W, Deschamps JF, Bastin JM, et al. Two monoclonal antiplatelet antibodies as markers of human megakaryocyte maturation: immunofluorescent staining and platelet peroxidase detection in megakaryocyte colonies and in in vivo cells from normal and leukemic patients. Blood 1982; 59: 514-521.
18. Podolak-Dawidziak M. Megakaryocyte progenitors in immune thrombocytopenic purpura (ITP). Thrombosis Research 1991; 62: 93-96.
19. Levine SP. Thrombocytopenia caused by immunologic platelet destruction. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM editors. Wintrobe's Clinical Hematology, Tenth edition, Egypt: Mass Publishing Co. 1999; 1583-1666.
20. Semple JW, Bruce S, Freedman J. Suppressed natural killer cell activity in patients with chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. Am J Hematol 1991; 37: 258-262.
21. Garcia-Suarez J, Prieto A, Reyes E, Manzano L, Arribalzago K, Alvarez Mon M. Abnormal γ -IFN and α TNF secretion in purified CD2+ cells from autoimmune thrombocytopenic purpura (ATP) patients: Their implication in the clinical course of the disease. Am J Hematol 1995; 49: 271.
22. Hedman A, Henter JI, Hedlund I, Elinder G. Prevalence and treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura of childhood in Sweden. Acta Paediatr 1997; 86: 226.

23. Bolton-Maggs PHB, Moon I. Assessment of UK practice for management of acute childhood idiopathic thrombocytopenic purpura against published guidelines. *Lancet* 1997; 350: 620.
24. Heyns AP, Lotter MG, Badenhorst PN, et al. Kinetics and sites of destruction of ¹¹¹indium-oxine-labeled platelets in idiopathic thrombocytopenic purpura: a quantitative study. *Am J Hematol* 1982; 12: 167-177.
25. Schmidt KG, Rasmussen JW. Kinetics and distribution in vivo of ¹¹¹In-labeled autologous platelets in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Scand J Haematol* 1985; 34: 47-56.
26. Ballem PJ, Segal GM, Stratton JR, Gernsheimer T, Adamson JW, Slinchster S. Mechanisms of thrombocytopenia in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. Evidence for both impaired platelet production and increased platelet clearance. *J Clin Invest* 1987; 80: 33-40.
27. Harrington WJ, Minnich V. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med* 1951; 38: 1-10.
28. Shulman NR, Marder VJ, Weinrach RS. Similarities between known antiplatelet antibodies and the factor responsible for thrombocytopenia in idiopathic purpura: physiologic, serologic and isotopic studies. *Ann NY Acad Sci* 1965; 124: 499-542.
29. van Leeuwen EF, van der Ven JTH, Engelfriet CP, von dem Borne AEG. Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. *Blood* 1982; 59: 23-26.
30. He BR, Reid DM, Jones CE, Shulman NR. Spectrum of Ig classes, specificities, and titers of serum antiglycoproteins in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1994; 83: 1024-1032.
31. Panahi MR, LeBlanc S, Schober O, et al. Study of platelet-associated immunoglobulins of IgG, IgM, IgA and IgE classes and platelet kinetics in 33 patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Haematol* 1994; 69: 121-128.
32. Koerner TAW, Weinfeld HM, Bullard LSB, Williams LCJ. Antibodies against platelet glycosphingolipids: detection in serum by quantitative HPTLC-autoradiography and association with autoimmune and alloimmune processes. *Blood* 1989; 74: 274-284.

33. McMillan R, Tani P, Millard F, Berchtold L, Renshaw L, Woods VL. Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. *Blood* 1987; 70: 1040-1045.
34. Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Mueller-Eckhardt C. Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood* 1987; 70: 1722-1726.
35. Impach P, Tani P, Berchtold W, et al. Different forms of chronic ITP in children defined by antiplatelet autoantibodies. *J Pediatr* 1991; 118: 535-539.
36. Impach P, Morell A. Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP): Immunomodulation by intravenous immunoglobulin. *Int Rev Immunol* 1989; 5: 181-188.
37. Kurata Y, Curd JG, Tamerius JD, McMillan R. Platelet-associated complement in chronic ITP. *Br J Haematol* 1985; 60: 723-733.
38. Clarkson SB, Bussel HB, Kimberly RB, Valinsky JE, Nachman RL, Unkeless JC. Treatment of refractory immune thrombocytopenic purpura with anti-Fcγ-receptor antibody. *N Eng J Med* 1986; 314: 1236-1239.
39. Tsubakio T, Tani P, Curd JG, McMillan R. Complement activation in vitro by antiplatelet antibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1985; 63: 293-300.
40. Abgrall JF, Berthou C, Sensebe L, Le Niger C, Escoffre M. Decreased in vitro megakaryocyte colony formation in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1993; 85: 803-804.
41. Semple JW, Freedman J. Abnormal cellular immune mechanisms associated with autoimmune thrombocytopenia. *Trans Med Rev* 1995; 4: 327-338.
42. Semple JW, Freedman J. Increased anti-platelet T-helper lymphocyte reactivity in patients with autoimmune thrombocytopenic purpura. *Blood* 1991; 78: 2619-2625.
43. Ware R, Howard TA. Elevated numbers of gamma-delta lymphocytes in children with immune thrombocytopenic purpura. *J Clin Immunol* 1994; 11: 237-247.
44. Garcia-Suarez J, Prieto A, Ryes E. Severe chronic autoimmune thrombocytopenic purpura is associated with an expansion of CD56+CD3- natural killer cell subset. *Blood* 1993; 82: 1538-1545.
45. Boshkov LK, Kelton JG, Halloran PF. HLA-DR expression by platelets in acute idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1992; 81: 552-557.

46. Semple JW, Milev Y, Cosgrave D, et al. Differences in serum cytokine levels in acute and chronic autoimmune thrombocytopenia: Relationship to platelet phenotype and antiplatelet T-cell reactivity. *Blood* 1996; 87: 4245-4254.
47. DeFrance T, Vandevilliet B, Briere F, Durand I, Rousset F, Banchereau J. Interleukin 10 and transforming growth factor β cooperate to induce anti-CD40-activated naive human Bcell to secrete immunoglobulin A. *J Exp Med* 1992; 175: 671.
48. Howard M, Muchamuel T, Audrade S, Mennon S. Anti-inflammatory effect of IL-10. *J Exp Med* 1993; 177: 1205.
49. Kaplan C, Morinet F, Carton J. Virus-induced autoimmune thrombocytopenia and neutropenia. *Semin Hematol* 1992; 1: 34.
50. Woerner SJ, Abildgaard CF, French BN. Intracranial hemorrhage in children with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Pediatrics* 1981; 67: 453.
51. Robb LG, Tiedeman K. Idiopathic thrombocytopenic purpura: predictors of chronic disease. *Arch Dis Child* 1990; 65: 502-506.
52. Halperin DS, Doyle JJ. Is bone marrow examination justified in idiopathic thrombocytopenic purpura? *Am J Dis Child* 1988; 142: 509.
53. Chu YW, Korb J, Sakamoto KM. Idiopathic thrombocytopenic purpura. *Pediatr Rev* 2000; 21: 95-103.
54. Dubansky SA, Boyett JM, Faletta J, et al. Isolated thrombocytopenia in children with acute lymphoblastic leukemia: a rare event in a pediatric oncology group study. *Pediatrics* 1989; 84: 1068-1071.
55. Lusher JM, Zuelzer WW. Idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *J Pediatr* 1966; 68: 971.
56. Lammi AT, Lovric VA. Idiopathic thrombocytopenic purpura: An epidemiologic study. *Pediatrics* 1973; 83: 31.
57. McMillan R, Longmire RL. In vitro platelet phagocytosis by splenic leucocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Eng J Med* 1974; 290: 249.
58. Dixon R, Rosse W. Platelet antibody in autoimmune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1975; 31: 129.
59. McMillan R, Longmire R. The effect of corticosteroids on human IgG synthesis. *J Immunol* 1976; 116: 1592.
60. Robson HN, Duthie JJR. Capillary resistance and adrenocortical activity. *Br J Med* 1950; 2: 971.

61. Kitchen CS, Weiss L. Amelioration of endotelial abnormalities by prednisone in experimental thrombocytopenia in the rabbit. *J Clin Invest* 1977; 60: 1129.
62. Kitchen CS, Pendergast JF. Human thrombocytopenia is associated with structural abnormalities of the endotelium that are ameliorated by glucocorticoid administration. *Blood* 1986; 67: 203.
63. Brajchman MA, Senyi AF. Shortening of the bleeding time in rabbits by hydrocortisone caused by inhibition of prostacyclin generation by the vessel wall. *J Clin Invest* 1979; 63: 1026.
64. Buchanan GR, Holtkamp CA. Prednisone therapy for children with newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura. A randomize clinical trial. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1984; 6: 355.
65. Sartorius JA. Steroid treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura in children. Preliminary results of a randomized cooperative study. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1984; 6: 165
66. Blanchette VS, Luke B, Andrew M, et al. A prospective, randomized trial of high-dose intravenous immune lobulin G therapy, oral prednisone therapy, and no therapy in childhood acute immune thrombocytopenic purpura. *J Pediatr* 1993; 123: 989.
67. Blanchette V, Imbach P, Andrew M, et al. Randomized trial of intravenous immunoglobulin G, intravenous anti-D and oral prednisone in childhood acute immune thrombocytopenic purpura. *Lancet* 1994; 344: 703.
68. Özsoylu Ş, Irken G, Karabent A. High-dose intraveous metilprednisolone for acute childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 1989; 42: 431.
69. Albayrak D, Islek I, Kalaycı AG, Gürses N. Acute immune thrombocytopenic purpura. A comparative study of very high oral doses of methylprednisolone and intravenously administered immune globulin. *J Pediatr* 1994; 125: 1004.
70. Khalifa AS, Tolba KA, El-Alfy MS, Gadallah M, Ibrahim FH. Idiopathic thrombocytopenic purpura in Egyptian children. *Acta Haematol* 1993; 90: 125.
71. Özsoylu Ş, Sayılı TR, Öztürk G. Oral megadose methylprednisolone versus intravenous immunglobulin for acute childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *Pediatr Hematol Oncol* 1993; 10: 317.
72. Morris HG, Jorgensen JR, Elrick H, Goldsmith RE. Metabolic effects of human growth hormone in corticosteroid-treated children. *J Clin Invest* 1968; 47: 436.

73. Fehr J, Hoffmann V, Kappeler U. Transient reversal of thrombocytopenia in idiopathic thrombocytopenic purpura by high-dose intravenous gamma globulin. *N Eng J Med* 1982; 306:1254-1258.
74. Dammaco F, Jodice G, Campobasso N. Treatment of adult patients with ITP with intravenous immunoglobulin effect on T cell subsets and PWM induced antibody synthesis in vitro. *Br J Haematol* 1986; 62: 125.
75. Macey MG, Newland AG. CD4 and CD8 subpopulation changes during high dose intravenous immunoglobulin treatment. *Br J Haematol* 1990; 76: 513-520.
76. Nuget D, Wang Z, Sandborg C, Berman M. Reduced levels of IL-4 in immune mediated thrombocytopenia (ITP): role of cytokine imbalanced in autoimmune disease. *Immunohematology* 1988; 2: 65A.
77. Garcia-Suarez J, Prieto A, Reyes E, et al. Abnormal IFN gamma ve TNF alpha secretion in purified CD2+ cells from autoimmune thrombocytopenic purpura (ATP) patients. Their implication in the clinical course of the disease. *Am J Hematol* 1995; 49: 271-276.
78. Leung DYM, Cotran RS, Kurf-Jones E, Burns JC, Newburger JW, Pober JS. Endothelial cell activation and high interleukin-secretion in the pathogenesis of acute Kawasaki disease. *Lancet* 1989; ii: 1298-1302
79. Ross C, Hansen MB, Schyberg T, Berk K. Autoantibodies to crude human leukocyte interferon (IFN), native human IFN, recombinant human IFN alpha 2b and human IFN gamma in healthy blood donors. *Clin Exp Immunol* 1990; 32: 695-701.
80. Andersson JP, Andersson UG. Human intravenous immunoglobulin modulates monokin production in vitro. *Immunology* 1990; 71: 372-376.
81. Andersson UG, Björk L, Skansen-Saphir U, Andersson JP. Down regulation of cytokin production and interleukin-2 receptor expression by pooled human IgG. *Immunology* 1993; 79: 211-216.
82. Basta M, Langlois PF, Marques M, et al. High dose intravenous immunoglobulin modifies complement-mediated in vivo clearance. *Blood* 1989; 74: 326-333.
83. Berchtold P, Dale GL, Tani P, McMillan R. Inhibition of autoantibody binding to platelet glycoprotein IIb/IIIa by anti-idiotypic antibodies in intravenous gammaglobulin. *Blood* 1989; 74: 2414-2417.
84. Rossi F, Kazatchkine MD. Antiidiotypes against autoantibodies in pooled normal polyspecific Ig. *J Immunol* 1989; 143: 4104-4109.

85. Dietrich G, Kazatchkine MD. Normal immunoglobulin G (IgG) for therapeutic use (intravenous Ig) contain anti-idiotypic specificities against an immunodominant, disease-associated, cross-reactive idiotype of human anti-thyroglobulin autoantibodies. *J Clin Invest* 1990; 85: 620-625.
86. Dietrich S, Kaveri SV, Kazatchkine MD. Modulation of autoimmunity by intravenous globulin through interaction with the functions of the immune/ idiotypic network. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 62: 873-881.
87. Roux KH, Tankersley DL. A view of the human idiotypic repertoire. Electron microscopic and immunologic analyses of spontaneous idiotype-anti-idiotype dimers in pooled human IgG. *J Immunol* 1990; 84: 2136-2143.
88. Impach P, d'Apuzzo V, Hirt A, et al. High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood . *Lancet* 1981; 1: 1228.
89. Bussel JB, Schulman I, Hilgartner MW, Barandun S. Intravenous use of gammaglobulin in the treatment of chronic immune thrombocytopenic purpura as a means to defer splenectomy. *J Pediatr* 1983; 103: 651.
90. Bussel JB, Goldman A, Imbach P, Schulman I, Hilgartner MW. Treatment of acute idiopathic thrombocytopenia of childhood with intravenous infusions of gammaglobulin. *J Pediatr* 1985; 106: 886.
91. Imholz B, Imbach P, Baumgartner C, et al. Intravenous IgG for previously treated acute or for chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) in childhood: A prospective multicenter study. *Blut* 1988; 56: 63.
92. Warrier IA, Lusher JM. Intravenous gammaglobulin for treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP): A two-year follow-up. *Am J Hematol* 1986; 23: 323.
93. Sekul EA, Cupler EJ, Dalakas MC. Aseptic meningitis associated with high-dose intravenous immunoglobulin therapy: Frequency and risk factors. *Ann Intern Med* 1994; 121: 259.
94. Thomas MJ, Misbah SA, Chapel HM, Jones M, Elrington G, Newsom-Davis J. Hemolysis after high-dose intravenous Ig. *Blood* 1993; 82: 3789.
95. Center for Disease Control and Prevention: Outbreak of hepatitis C associated with intravenous immunoglobulin administration- United States, October 1993-June 1994. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1994; 43: 505.

96. Bussel JB, Graziano JN, Kimberly RP, Pahwa S, Aledort LM. Intravenous anti-D treatment of immune thrombocytopenic purpura: Analysis of efficacy, toxicity and mechanism of effect. *Blood* 1991; 77: 1884.
97. Andrew M, Blanhette VS, Adams M, et al. A multicenter study of the treatment of childhood chronic idiopathic thrombocytopenic purpura with anti-D. *J Pediatr* 1992; 120: 522.
98. Borgna-Pignatti C, Battisti L, Zecca M, Locatelli F. Treatment of chronic childhood immune thrombocytopenic purpura with intra-muscular anti-D immunoglobulins. *Br J Haematol* 1994; 88: 618.
99. Lortan JE. Clinical annotation. Management of asplenic patients. *Br J Haematol* 1993; 84: 566.
100. Centers of Disease Contro and Prevention. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. Use of vaccines and immune globulins in persons with altered immuno-competence. *MMWR Morbid Mortal Wkly Rep* 1993; 42: 1.
101. George JN, Kojouri K, Perdue JJ, Vesely SK. Management of patients with chronic, refractory idiopathic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 2000; 37: 290-298.
102. Kuter D. Megakaryopoiesis and thrombopoiesis. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U editors. *Williams Hematology*, Sixth edition, McGraw-Hill Companies. 2001; 1339-1353.
103. Long MW, Hoffman R. Thrombocytopoiesis. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ et al, editors. *Hematology: basic principle and practice*. Third edition, Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000; 245-260.
104. Cramer EM. Megakaryocyte structure and function. *Curr Opin Hematol* 1999; 6: 354-361.
105. GroulsV, Helpap B. Megakaryocytopoiesis in the spleen of growing rats. *Am J Anat* 1980; 157: 429.
106. Kaufman KF, Ario R, Pollack S, et al. Origine of pulmonary megakaryocytes. *Blood* 1965; 25: 767.
107. Harker LA, Finch CA. Thrombokinetics in man. *J Clin Invest* 1969; 48:963.
108. Kuter DJ. The physiology of platelet production. *Stem Cells* 1996; 14: 88.

109. Bessman JD, Williams LJ, Gilmer PR. The inverse relation of platelet size and count in normal subjects and an artifact of other particles. *Am J Clin Pathol* 1981; 76: 289.
110. Thompson CB. From precursor to product; how do megakaryocytes produce platelets. In: RF Levine, N Williams, J Levin, B Evatt editors. *Megakaryocyte Development and Function*, Liss, New York 1986; 361.
111. Aster RH. Pooling of the platelets in spleen: role in the pathogenesis of "hypersplenic" thrombocytopenia. *J Clin Invest* 1966; 45: 645.
112. Aster RH. Studies of the mechanism of "hypersplenic" thrombocytopenia in rats. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 736.
113. Burstein SA, Adamson JW, Erb SK, Harker LA. Megakaryocytopoiesis in the mouse: response to varying platelet demand. *J Cell Physiol* 1981; 109: 333.
114. Kaushansky K. Thrombopoietin. *N Eng J Med* 1998; 339: 746-754.
115. Zauli G, Vitale M, Falcieri E et al. In vitro senescence and apoptotic cell death of human megakaryocytes. *Blood* 1997; 90: 2234-2243.
116. Osada M, Komeno T, Todokoro K, et al. Immature megakaryocytes undergo apoptosis in absence of thrombopoietin. *Exp Hematol* 1999; 27: 131-138.
117. Choi ES, Nichol JL, Hokom MM, et al. Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood* 1999;85:402.
118. Kaushansky K, Lin N, Grossmann A, et al. Thrombopoietin expands erythroid, granulocyte-macrophage and megakaryocytic progenitor cells in normal and myelosuppressed mice. *Exp Hematol* 1996; 24:265.
119. Choi ES, Hokom MM, Chen JL, et al. The role of megakaryocyte growth and development factor in terminal stages of thrombopoiesis. *Br J Hematol* 1996; 95: 227.
120. Lok S, Kaushansky K, Hooly RD, Kuijper JL, Foster DC. Cloning and expression of murine thrombopoietin c DNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* 1994; 369: 565.
121. Kaushansky K, Lok S, Holly RD, et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-mpl ligand thrombopoietin *Nature* 1994; 369: 568.
122. de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-mpl ligand. *Nature* 1994; 369: 533.

123. Wendling F, Maraskovsky E, Debili N, et al. C- mpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature* 1994; 369: 571.
124. Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor mpl. *Cell* 1994; 77: 1117.
125. Kuter D, Rosenberg RD. The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood* 1995; 85: 2720.
126. Hirayama Y, Sakamaki S, Matsunaga T, et al. Concentrations of thrombopoietin in bone marrow in normal subjects and in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura, aplastic anemia and essential thrombocythemia correlate with its mRNA expression of bone marrow stromal cells. *Blood* 1998; 92: 46.
127. Carlino JA, Higley HR, Creson JR, et al. Transforming growth factor beta 1 systemically modulates granuloid, erythroid, lymphoid, and thrombocytic cells in mice. *Exp Hematol* 1992; 20: 3607.
128. Ishibashi T, Miller SL, Burstein SA. Type beta transforming growth factor is a potent inhibitor of murine megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 1987; 69: 1737.
129. Kuter DJ, Gminski DM, Rosenberg RD. Transforming growth factor β inhibits megakaryocyte growth and endomitosis. *Blood* 1992; 79: 619.
130. Sakamaki S, Hirayama Y, Matsunaga T, et al. Transforming Growth factor- β 1 (TGF- β 1) induced thrombopoietin from bone marrow stromal cells, which stimulates the expression of TGF β receptor on megakaryocytes and in turn renders them susceptible to suppression by TGF β itself with high specificity. *Blood* 1999; 94: 1961-1970.
131. Harker LA. Kinetics of thrombopoiesis. *J Clin Invest* 1968; 47: 458.
132. Harker LA. Regulation of thrombopoiesis. *Am J Physiol* 1970; 218: 1376.
133. Ballem PJ, Segal GM, Stratton JR, et al. Mechanisms of thrombocytopenia in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. *J Clin Invest* 1987; 80: 33.
134. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14: 126-130.
135. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997; 53: 451-465.
136. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1992; 68: 251.

137. Majno C, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis: an overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-13.
138. Kane AB. Redefining cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 1-2
139. Ekert PG, Vaux DL. Apoptosis and the immune system. *Br Med Bull* 1997; 53: 591-603.
140. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.
141. Gougeon ML, Montagner L. Apoptosis in AIDS. *Science* 1993; 260: 1269-1270.
142. Pantaleo G, Fauci AS. Apoptosis in HIV infection. *Nat Med* 1995; 1: 118-120.
143. Pignata C, Fiore M, Filippo S, Cavalcanti M, Gaetaniello L, Scotese I. Apoptosis as a mechanism of peripheral blood mononuclear cell death after measles and varicella-zoster virus infections in children. *Pediatr Res* 1998; 43: 77-83.
144. Wickremasinghe RG, Hoffbrand AV. Biochemical and genetic control of apoptosis: Relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood* 1999; 93: 3587-3600.
145. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267: 1445-1449.
146. Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2239-2244.
147. Rowan S, Fisher DE. Mechanisms of apoptotic cell death. *Leukemia* 1997; 11: 457-465.
148. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirer GG, Earnshaw WC. PrICE-like protease from apoptotic cells, cleaves poly (ADP-ribose) polymerase. *Nature* 1994; 371: 346-347.
149. Thornberry NA. The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull* 1997; 53: 478-490.
150. Casciola-Rosen LA, Nicholson DW, Chong T, et al. Apopain/ CPPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic cell death. *J Exp Med* 1996; 183: 1957-1964.
151. Nicholson DW, Ambereen A, Thornberry NA, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995; 376: 37-43.

152. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85: 817-827.
153. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997; 18: 44-51.
154. Savill J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull* 1997; 53: 491-508.
155. Roy N, Devereaux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1997; 16: 6914.
156. Uçkan D. İmmün dokunulmazlık ve apoptozis. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 1998; 41: 411-423.
157. Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Trends Genet* 1995; 11: 101-105.
158. Hengartner MO. Death cycle and Swiss army knives. *Nature* 1998; 391: 441-442.
159. Ross T, Olivier R, Monney L, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 1998, 391: 496-499.
160. Cheng EHY, Kirsch DG, Clem RJ, et al. Conversion of Bcl-2 to Bax-like death effector by caspases. *Science* 1997; 278: 1966-1968.
161. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis. A discourse on the bcl-2 family. *Blood* 1996; 88: 386.
162. Irmiler M, Thome M, Hahne M, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997; 388: 190-195.
163. Gottlieb RA. Apoptosis. In: Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ, Seligsohn U editors. *Williams Hematology*, Sixth edition, McGraw-Hill Companies. 2001; 125-129.
164. Borge OJ, Ramsfjell V, Cui L, Jacobsen SE. Ability of early acting cytokines to directly promote survival and suppress apoptosis of human primitive CD34+CD38- bone marrow cells with multilineage potential at the single cell level: Key role of thrombopoietin. *Blood* 1997; 90: 2282.
165. Nagata S. Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor. *Adv Immunol* 1994; 57: 129-144.
166. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267: 1449-1455.

167. Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: ipr and gld mutations. *Immunol Today* 1995; 16: 39-43.
168. Lynch DH, Ramsdell F, Anderson MR. *Immunol Today* 1995; 16: 569-573.
169. Flier JS, Underhill LH. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996; 334: 1717-1725.
170. Berke G. The CTL's kiss of death. *Cell* 1995; 81: 9.
171. Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T cell-derived granzyme B. *Nature* 1995; 377: 446.
172. Martin SJ, Amarantes-Mendes GP, Shi L, et al. The cytotoxic cell protease granzyme B initiates apoptosis in a cell free system by proteolytic processing and activation of the ICE/CED-3 family protease CPP32 via a novel two-step mechanism. *EMBO J* 1996; 15: 2407.
173. Apoptosis, Applied reagents and technologies. Instruction manual. Pharmingen, A Becton Dickinson Company, Second edition. December 1998, p. 1-96.
174. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Invest Suppl.* 1968; 97:7.
175. Schmitz B, Radbruch A, Kummel T et al. Magnetic activated cell sorting (MACS)-a new immunomagnetic method for megakaryocyte cell isolation: comparison of different separation techniques. *Eur J Hematol.* 1994; 52: 267-275.
176. Apoptosis, Applied reagents and technologies. Instruction manual. Pharmingen, A Becton Dickinson Company, Second edition. December 1998, p. 51-60.
177. Hymes KB, Karpatkin S. In vitro suppressor T lymphocyte dysfunction in autoimmune thrombocytopenic purpura associated with a complement-fixing antibody. *Br J Haematol* 1990; 74: 330-335.
178. Ware RE, Howard TH. Phenotypic and clonal analysis of T lymphocytes in childhood immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 1993; 82: 2137-2142.
179. Zauli G, Catani L, Gibellini D, et al. Impaired survival of bone marrow GPIIb/IIIa (+)megakaryocytic cells as an additional pathogenetic mechanism of HIV-1-related thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1996; 92: 711-717.
180. Darzynkiewicz Z, Juan G, Xun L, et al. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 1997; 27: 1.
181. Abgrall JF, el-Kassar N, Berthou C, et al. In vitro megakaryocyte colony formation in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: differences between acute and chronic ITP. *Int J Cell Cloning* 1992; 10: 28-32.

10.EKLER

10.1. Hasta veri formu

10.2. Hastaların klinik ve laboratuvar verileri

10.3. Hastaların flowsitometredeki apoptoz sonuçları



**Çocukluk Çağında ITP'li Hastalarda Megakaryosit Apoptozu
Veri Formu**

Form no:

Hastanın geliş tarihi:

Hastanın Adı ve Soyadı:

Yaşı:

Hastanın izlendiği hastane:

Tanısı:

Tanı tarihi:

Adresi:

Telefonu:

Şikayeti:

Öyküde son altı hafta içinde geçirilmiş enfeksiyon:

Öyküde son altı hafta içinde aşılama:

Öyküde son altı hafta içinde ilaç kullanımı:

Fizik muayenedeki pozitif bulgular:

Hemoglobin:

Lökosit:

Trombosit:

Periferik yayma:

Kemik iliği incelemesi:

ITP tedavisi:

Rekürrens:

Kronikleşme:

Kemik iliğinden elde edilen mononükleer hücre sayısı:

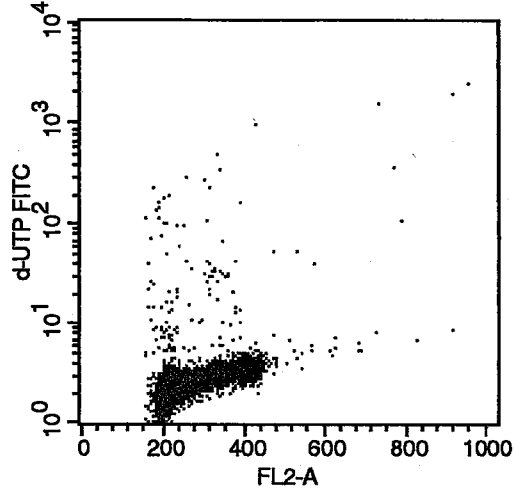
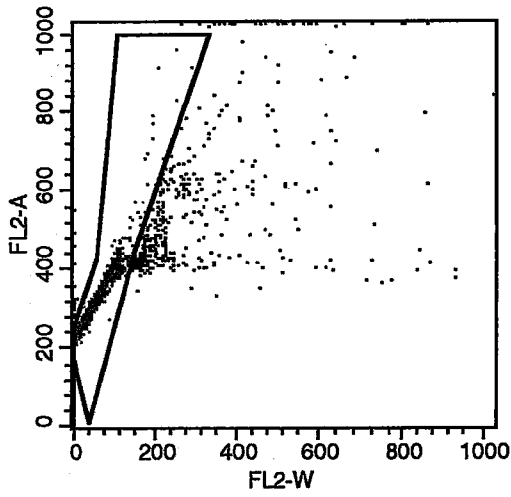
CD61+ hücre sayısı:

Apoptoz oranı:

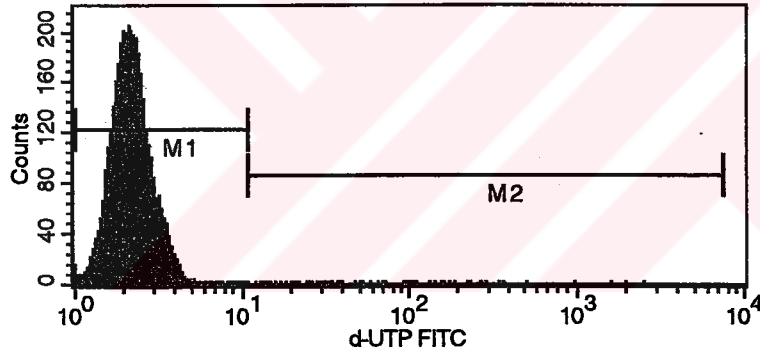
	adsoyad	yas	cins	hastane	tani	süre	yakinma	kanama	fizikbul	hb	lökosit	plt
1	BB	2.5	kız	DEU	AKUT	,	MORLUK	YOK	EKİMOZ	10.1	11,600	12,000
2	BY	7.2	kız	DEU	AKUT	12.0	MORLUK	YOK	PETEŞİ+EKİM	13.1	7,200	24,000
3	ST	3.0	kız	SSK	AKUT	,	morluk+ dökünt	YOK	PETEŞİ+EKİM	12.2	10,800	9,000
4	HK	2.5	erkek	SSK	AKUT	,	morluk+ dökünt	YOK	PETEŞİ+EKİM	11.6	11,900	30,000
5	MD	6.8	erkek	DEU	AKUT	,	morluk+ dökünt	VAR	PETEŞİ+EKİM	11.6	5,000	16,000
6	AT	13.0	erkek	DEU	AKUT	,	DÖKÜNTÜ	YOK	PETEŞİ	12.0	7,200	17,000
7	ZG	1.4	kız	DEU	AKUT	,	DÖKÜNTÜ	YOK	PETEŞİ	10.1	4,600	16,000
8	MY	8.0	erkek	BUCH	AKUT	,	morluk+ dökünt	YOK	PETEŞİ	13.2	9,500	7,000
9	MT	12.5	kız	DEU	AKUT	8.0	morluk+ dökünt	VAR	PETEŞİ+EKİM	12.1	4,900	5,000
10	EG	8.0	kız	DEU	AKUT	,	morluk+ dökünt	YOK	PETEŞİ+EKİM	13.6	6,100	7,000
11	OV	1.0	erkek	SSK	AKUT	,	DÖKÜNTÜ	YOK	PETEŞİ+EKİM	11.1	9,900	36,000
12	ÖA	7.6	kız	DEU	AKUT	,	morluk+ dökünt	VAR	PETEŞİ+EKİM	13.0	7,300	1,000
13	TT	5.5	erkek	BUCH	AKUT	,	DÖKÜNTÜ	YOK	PETEŞİ+EKİM	12.3	7,600	21,000
14	MS	3.0	erkek	SSK	AKUT	,	morluk+ dökünt	YOK	PETEŞİ+EKİM	11.8	7,800	12,000
15	AK	4.3	erkek	DEU	AKUT	,	morluk+ dökünt	VAR	PETEŞİ+EKİM	14.4	12,200	2,000
16	BG	12.2	erkek	DEU	KRONİ	18.0	morluk+ dökünt	YOK	PETEŞİ+EKİM	13.6	7,600	26,000
17	ÖK	3.7	erkek	DEU	KRONİ	15.0	morluk+ dökünt	YOK	PETEŞİ+EKİM	10.9	10,900	19,000
18	BÇ	10.0	kız	DEU	KRONİ	50.0	morluk+ dökünt	YOK	PETEŞİ+EKİM	9.9	7,300	90,000
19	TÖ	7.3	kız	DEU	KRONİ	16.0	MORLUK	YOK	PETEŞİ+EKİM	12.1	14,700	8,000
20	NŞ	13.0	erkek	DEU	KRONİ	13.0	MORLUK	YOK	PETEŞİ+EKİM	14.0	5,900	12,000
21	HA	6.4	kız	BUCH	KRONİ	14.0	morluk+ dökünt	YOK	PETEŞİ+EKİM	11.4	6,800	24,000
22	NAK	6.9	erkek	BUCH	KRONİ	12.0	DÖKÜNTÜ	YOK	PETEŞİ	12.3	5,800	110000
23	FP	12.0	erkek	BUCH	KRONİ	9.0	morluk+ dökünt	VAR	PETEŞİ+EKİM	11.7	8,600	8,000
24	GD	7.0	kız	DEU	KRONİ	21.0	MORLUK	VAR	PETEŞİ+EKİM	11.3	6,700	76,000
25	TK	8.0	kız	SSK	KRONİ	8.0	morluk+ dökünt	YOK	PETEŞİ+EKİM	12.3	7,700	28,000
26	YŞ	4.0	erkek	DEU	KONT	,	,	,	,	11.6	9,800	373000
27	AA	13.0	kız	DEU	KONT	,	,	,	,	13.2	8,100	337000
28	MC	5.0	erkek	DEU	KONT	,	,	,	,	11.4	7,200	292000
29	SÇ	16.0	kız	DEU	KONT	,	,	,	,	13.5	11,400	248000
30	HA	15.0	kız	DEU	KONT	,	,	,	,	10.9	6,000	262000
31	BÖ	5.0	kız	DEU	KONT	,	,	,	,	12.8	10,700	453000
32	CK	16.0	erkek	DEU	KONT	,	,	,	,	13.1	7,200	194000
33	AY	15.0	kız	DEU	KONT	,	,	,	,	12.3	6,300	221000
34	YI	13.9	erkek	DEU	KONT	,	,	,	,	12.2	5,600	241000
35	Oİ	11.7	erkek	DEU	KONT	,	,	,	,	11.8	5,600	298000

	tedavi	rekürren	kronikle	mncs	cd61	apoptoz
1	IVIG	yok	yok	18000000	700,000	.60
2	metil prednizol	yok	var	100000000	1500000	8.40
3	IVIG+MP	yok	yok	36000000	1400000	9.45
4	metil prednizol	yok	yok	64000000	800,000	22.59
5	verilmedi	yok	yok	25000000	1000000	7.60
6	verilmedi	yok	yok	48000000	900,000	3.24
7	verilmedi	yok	yok	52600000	500,000	9.41
8	verilmedi	yok	yok	10000000	700,000	26.23
9	IVIG+MP+Anti-	yok	var	80000000	400,000	9.47
0	metil prednizol	var	yok	14400000	500,000	7.55
1	verilmedi	yok	yok	86300000	2200000	2.45
2	metil prednizol	yok	yok	28000000	1100000	5.41
3	IVIG	yok	yok	32000000	800,000	3.93
4	metil prednizol	yok	yok	38000000	1200000	12.98
5	metil prednizol	yok	yok	16800000	900,000	5.04
6	metil prednizol	yok	var	13000000	900,000	2.33
7	IVIG+MP	yok	var	37800000	900,000	8.13
8	IVIG+MP	yok	var	16000000	1600000	4.98
9	IVIG+MP	yok	var	1,000,000	700,000	5.89
0	metil prednizol	yok	var	10500000	600,000	1.63
1	IVIG+MP+Anti-	yok	var	33000000	700,000	8.05
2	verilmedi	yok	var	40000000	1200000	5.29
3	IVIG+MP	yok	var	30000000	1600000	4.32
4	IVIG	yok	var	31600000	1400000	3.10
5	IVIG+MP+Anti-	yok	var	8,600,000	800,000	2.15
6	,	,	,	150000000	750,000	1.42
7	,	,	,	13600000	600,000	7.28
8	,	,	,	18000000	1400000	.83
9	,	,	,	5,400,000	3600000	4.79
0	,	,	,	7,600,000	1200000	5.14
1	,	,	,	6,400,000	400,000	14.08
2	,	,	,	26400000	200,000	8.44
3	,	,	,	7,600,000	1000000	26.19
4	,	,	,	10400000	700,000	27.06
5	,	,	,	8,200,000	1600000	2.67

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji Onkoloji Laboratuvari



Sample ID: APO-Direct Kit
Total Events: 15000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 20-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

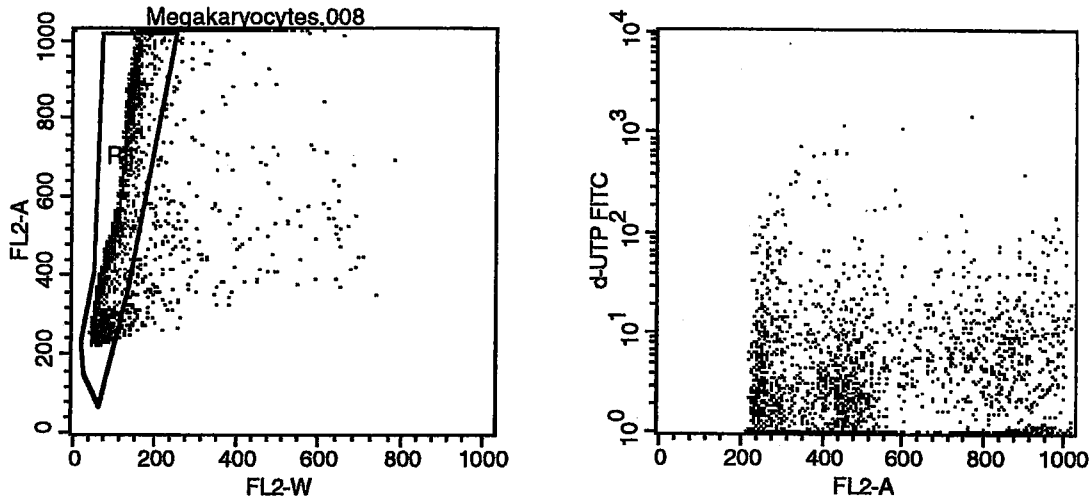
Marker	% Gated
All	100.00
M1	99.42
M2	0.58

Patient Name : B.B. -1
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 0.60

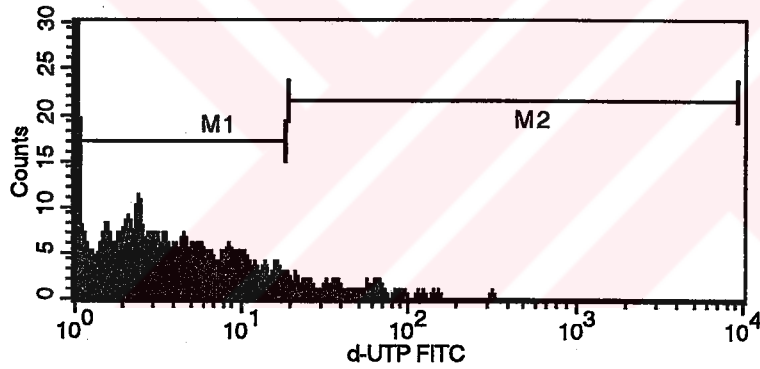
Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi

Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: Buse YUDUM

Total Events: 3525



Histogram Statistics

Acquisition Date: 4-Oct-0

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

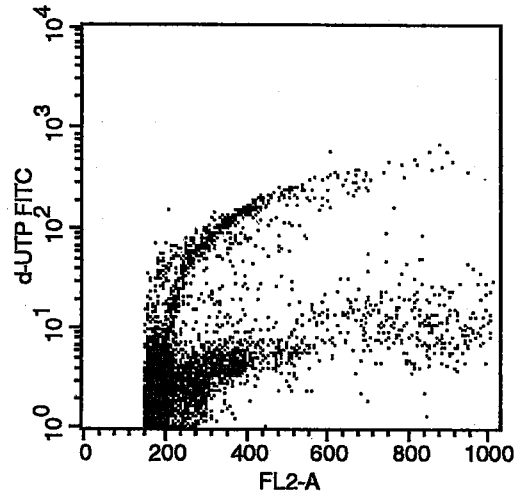
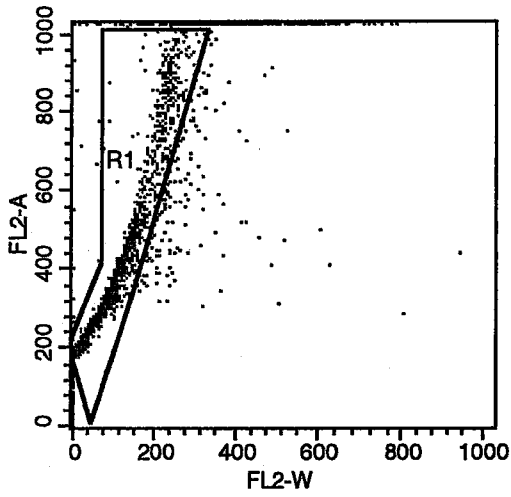
Marker	% Gated
All	100.00
M1	91.33
M2	8.30

Patient Name : 2 - B.Y.
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 8.40

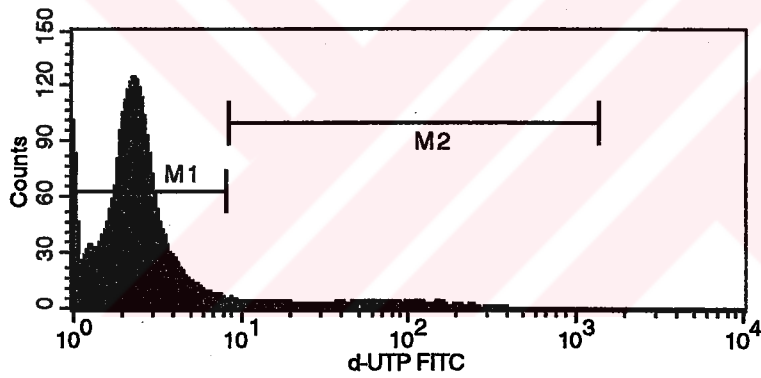
Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi

Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: CD61+ cells

Total Events: 15000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 19-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

Marker	% Gated
All	100.00
M1	90.42
M2	9.47

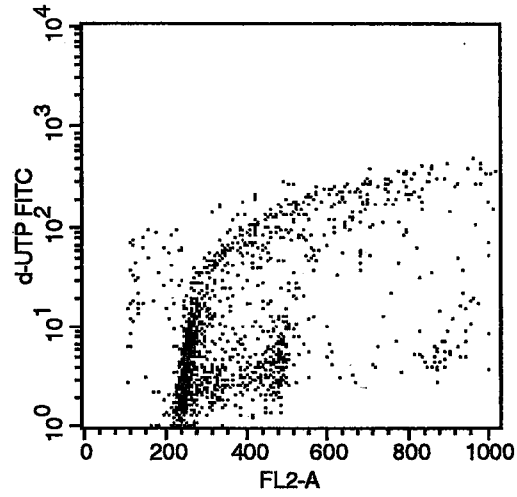
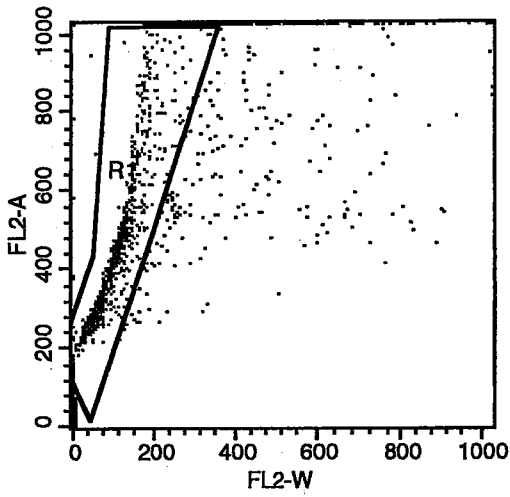
Patient Name : 3 - S.T.

Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 9.45

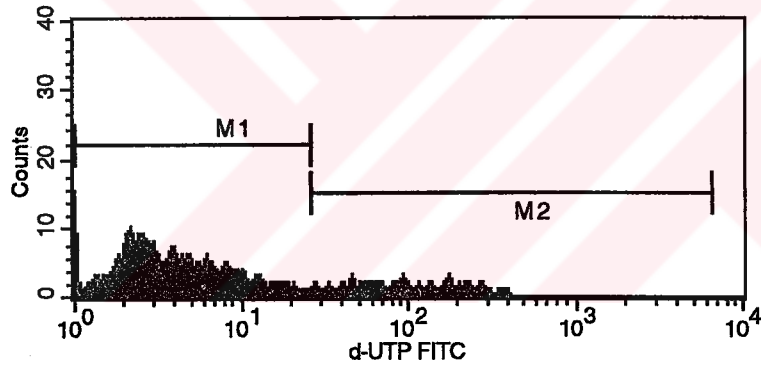
Dokuz Eylul Universitesi Tıp Fakultesi

Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: CD61+ cells

Total Events: 15000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 19-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

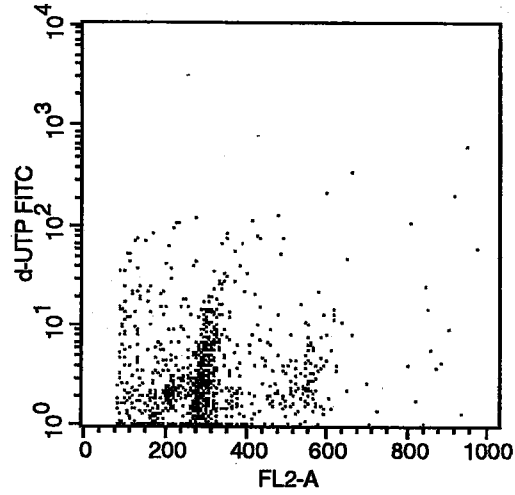
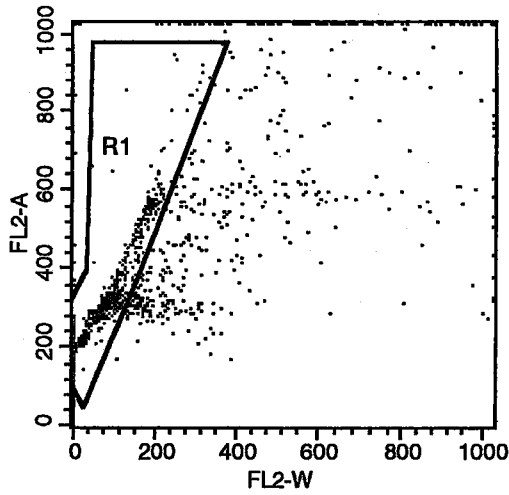
Marker	% Gated
All	100.00
M1	77.41
M2	22.59

Patient Name : 4 - H.K.

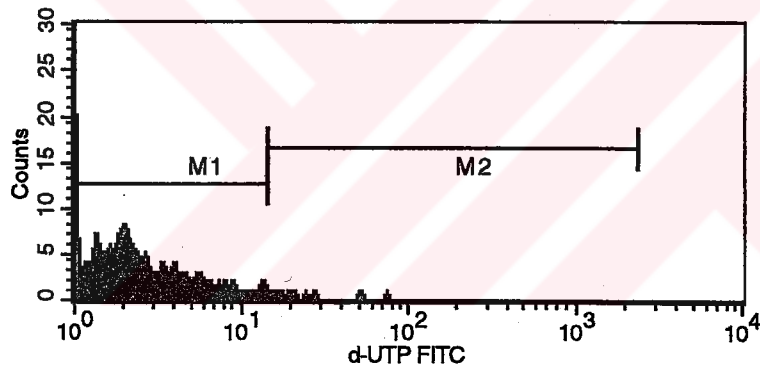
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 22.59

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: CD61+ cells
Total Events: 3000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 19-Jul-1 Gate: G1
X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

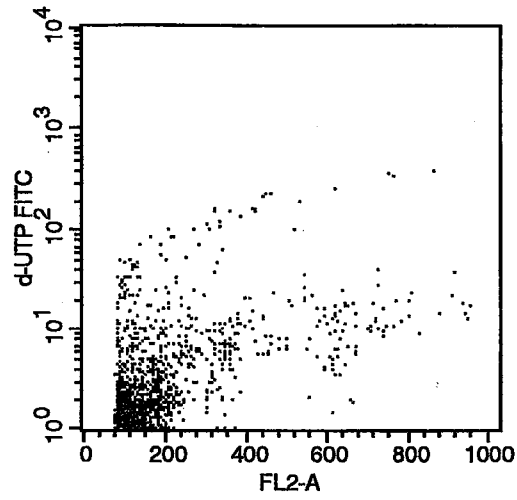
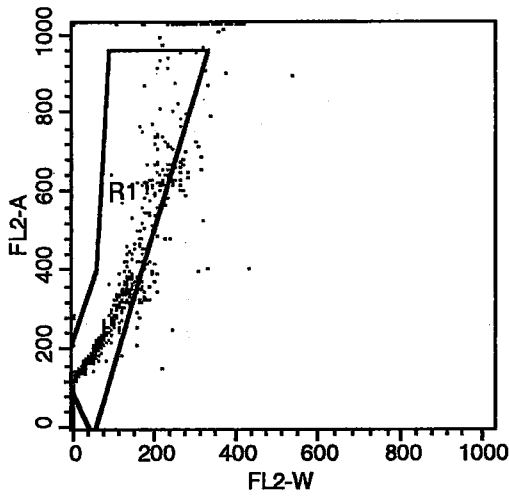
Marker	% Gated
All	100.00
M1	92.48
M2	7.52

Patient Name : 5 - M.D.
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 7.60

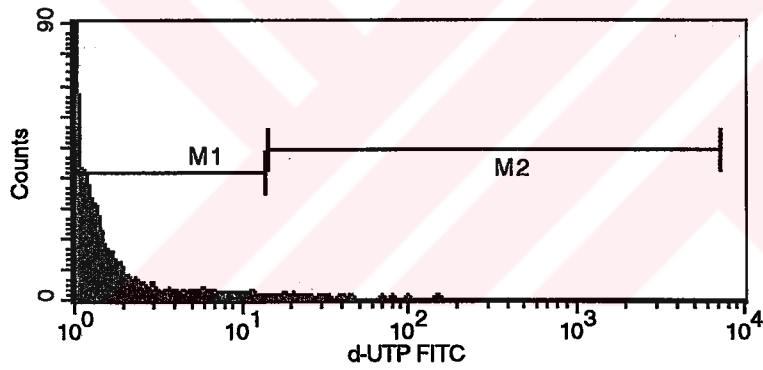
Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi

Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: CD61+ cells

Total Events: 15000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 19-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

Marker	% Gated
All	100.00
M1	96.66
M2	3.27

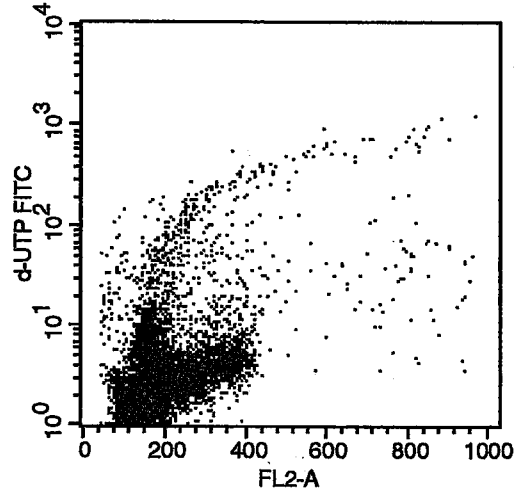
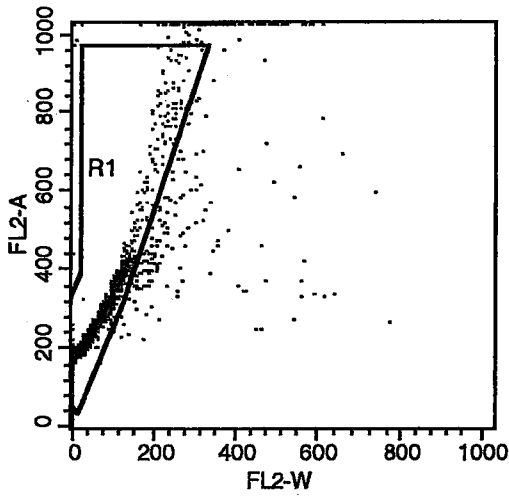
Patient Name : 6 - A.S.

Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 3.24

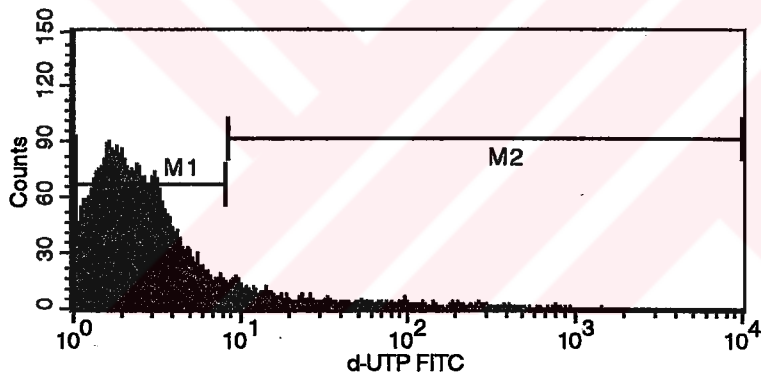
Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi

Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: CD61+ cells

Total Events: 15105



Histogram Statistics

Acquisition Date: 19-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

Marker	% Gated
All	100.00
M1	90.48
M2	9.31

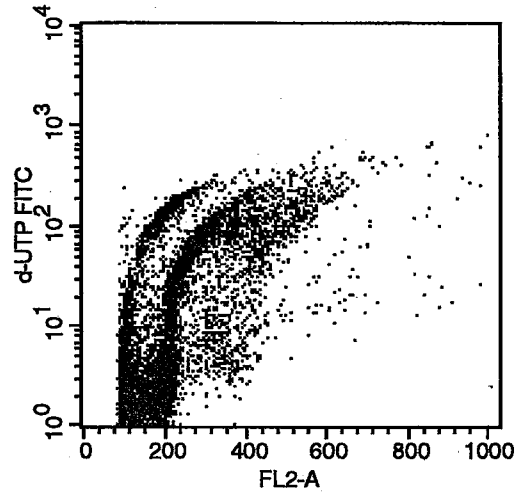
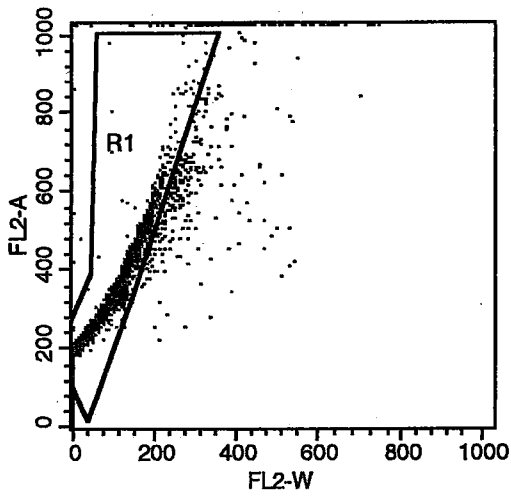
Patient Name : 7 - Z.G.

Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 9.41

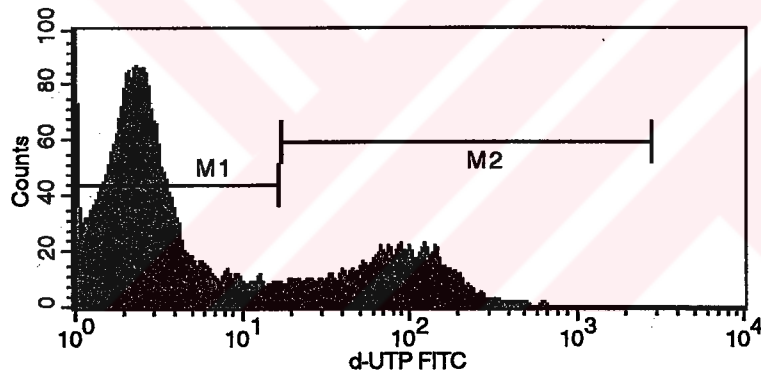
Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi

Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: CD61+ cells

Total Events: 20000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 19-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

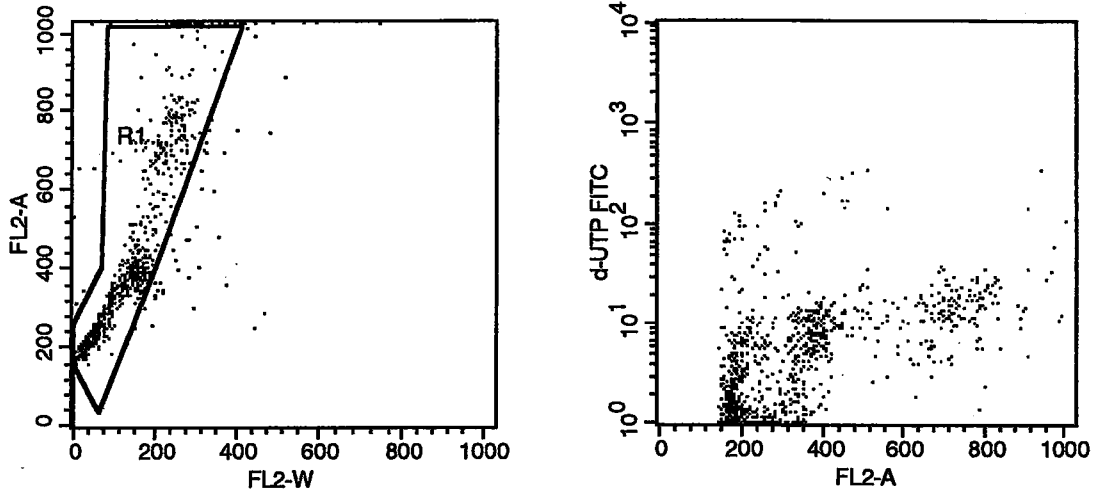
Marker	% Gated
All	100.00
M1	73.53
M2	26.27

Patient Name : 8 - M.Y.

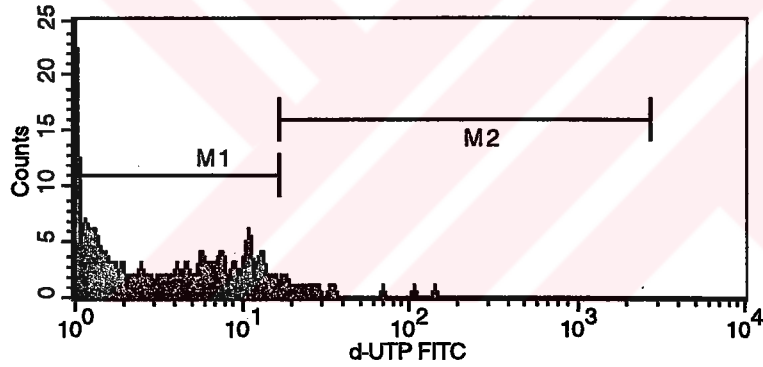
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 26.23

Dokuz Eylul Universitesi Tıp Fakultesi
Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: CD61+ cells
Total Events: 12015



Histogram Statistics

Acquisition Date: 19-Jul-1
X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)
Gate: G1

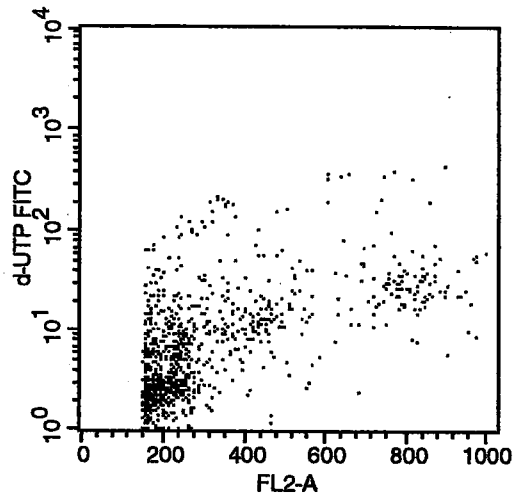
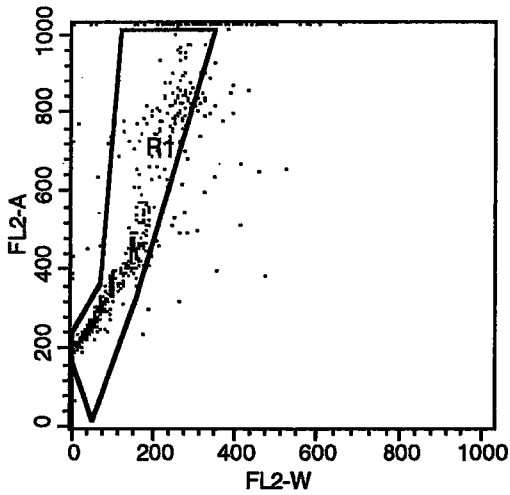
Marker	% Gated
All	100.00
M1	90.58
M2	9.42

Patient Name : 9 - M.T.
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 9.47

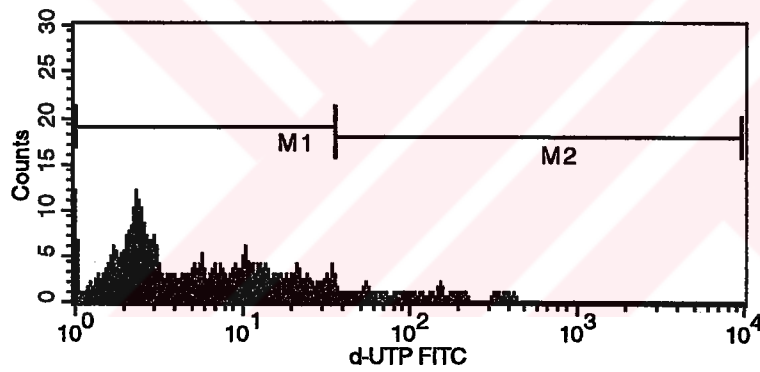
Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi

Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: CD61+ cells

Total Events: 15000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 19-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

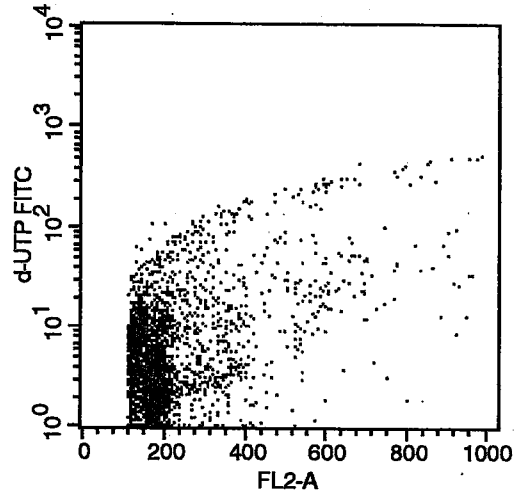
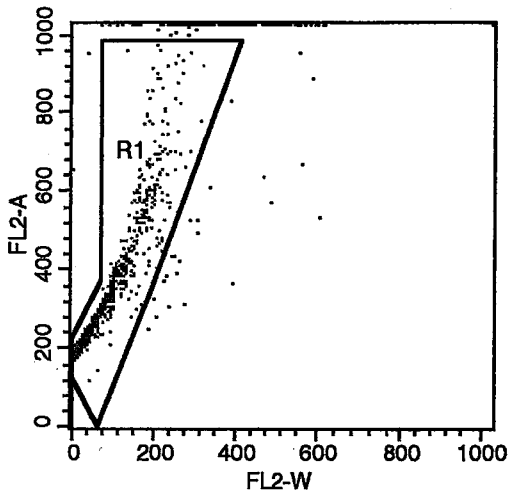
Marker	% Gated
All	100.00
M1	92.54
M2	7.46

Patient Name : 10 - E.G.

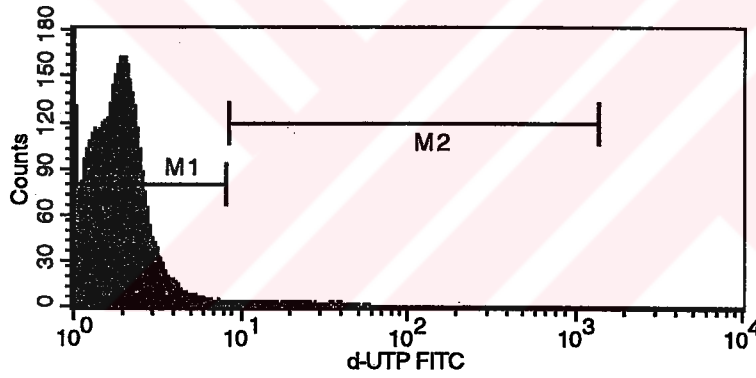
S a m p l e : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 7.55

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: CD61+ cells
Total Events: 15165



Histogram Statistics

Acquisition Date: 19-Jul-1
X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)
Gate: G1

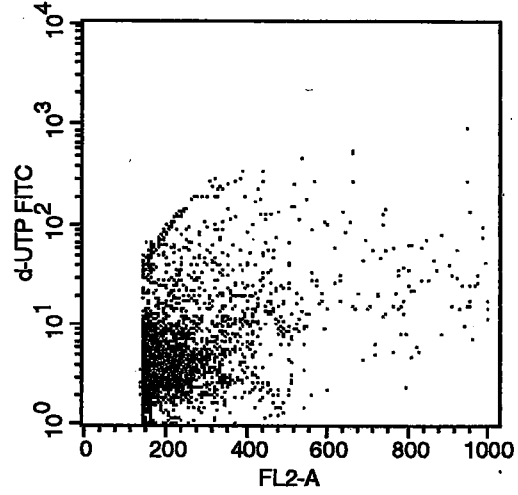
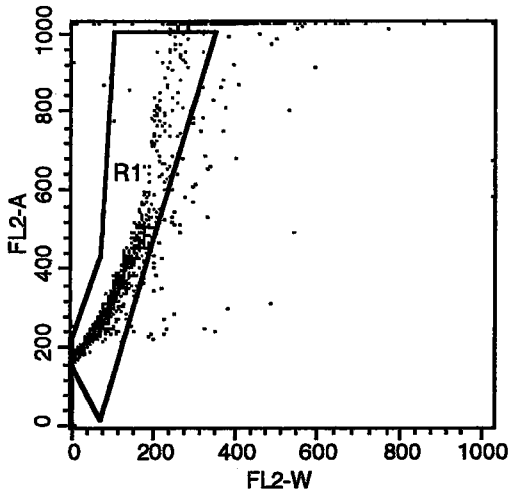
Marker	% Gated
All	100.00
M1	97.50
M2	2.44

Patient Name : 11 - O.V.
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 2.45

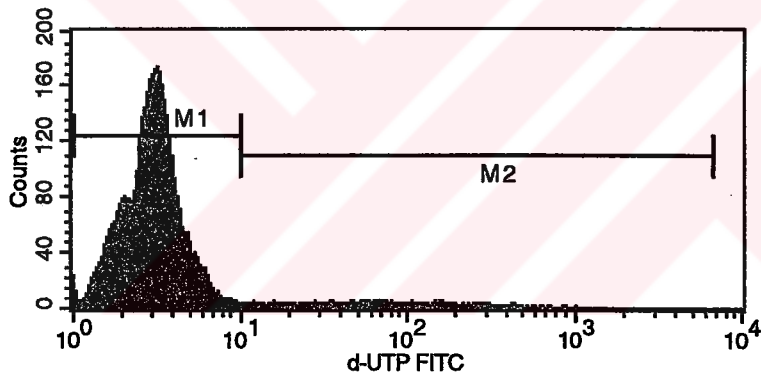
Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi

Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: APO-Direct Kit

Total Events: 20000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 20-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

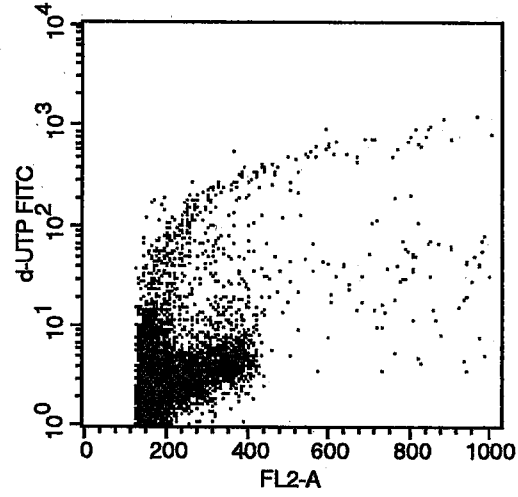
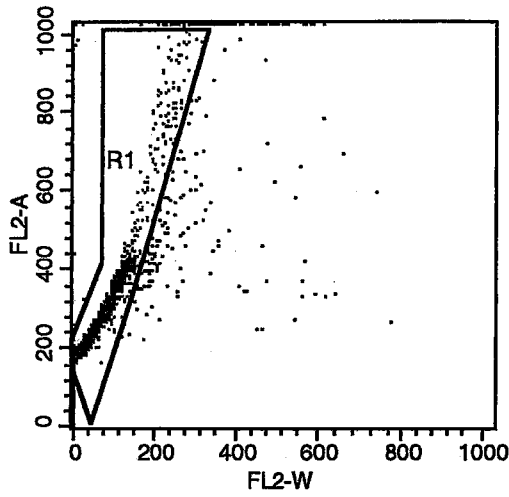
Marker	% Gated
All	100.00
M1	94.59
M2	5.42

Patient Name : 12 - O.A.
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 5.41

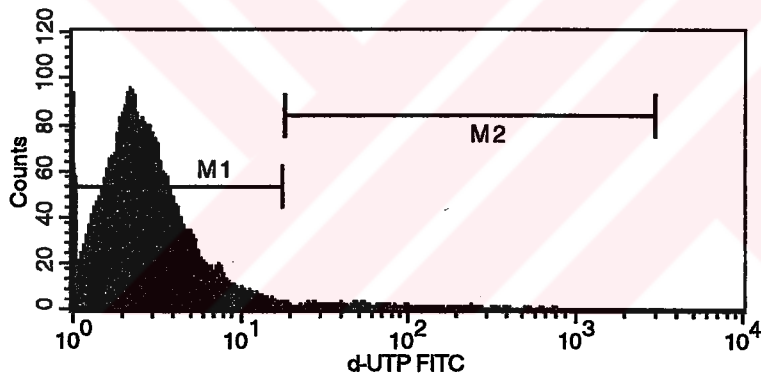
Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi

Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: CD61+ cells

Total Events: 15105



Histogram Statistics

Acquisition Date: 19-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

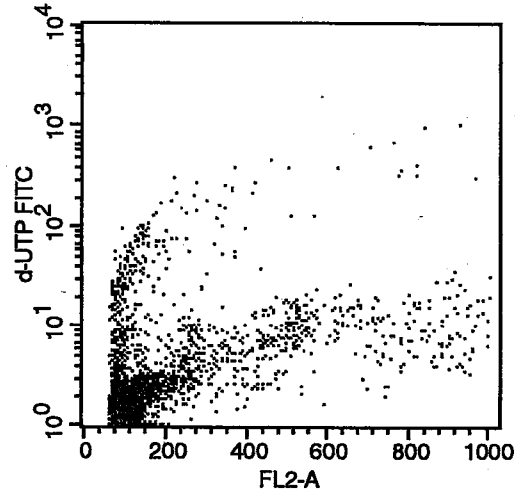
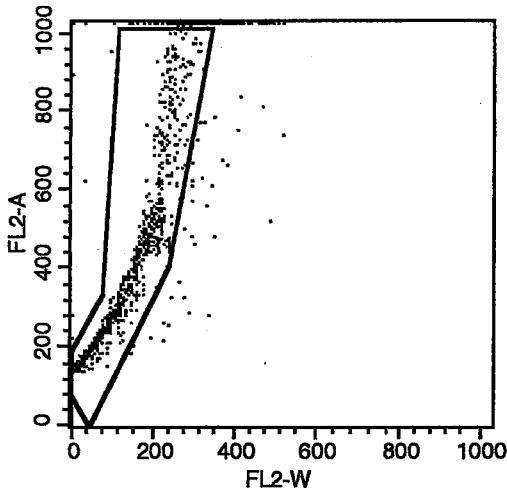
Marker	% Gated
All	100.00
M1	95.96
M2	3.98

Patient Name : 13 - T.T.
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 3.93

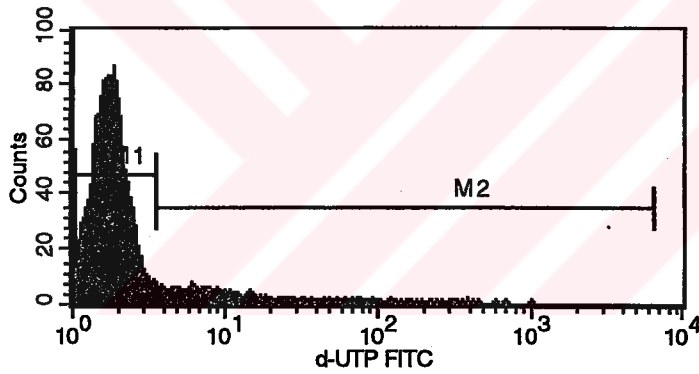
Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi

Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: Sample.4

Total Events: 15000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 18-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

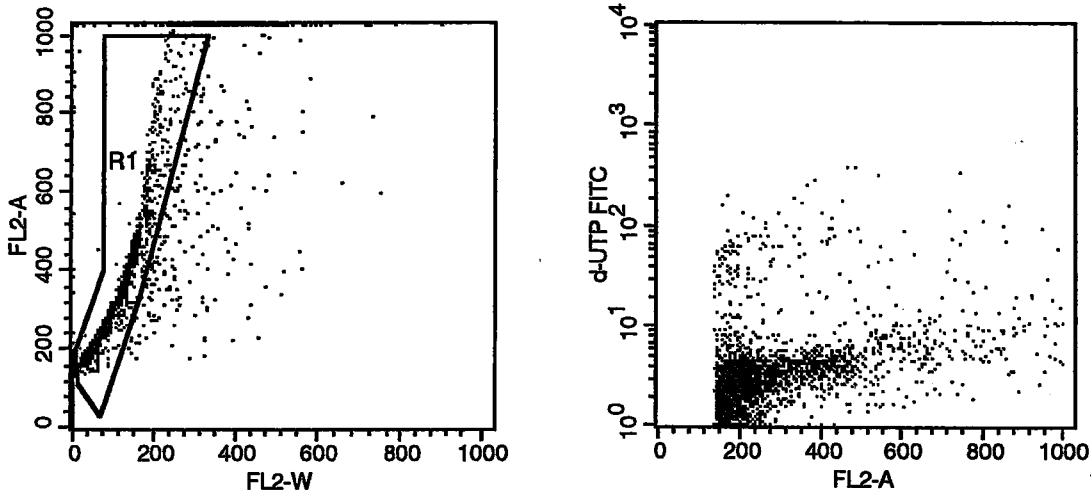
Marker	% Gated
All	100.00
M1	87.21
M2	12.95

Patient Name : 14 - M.S.

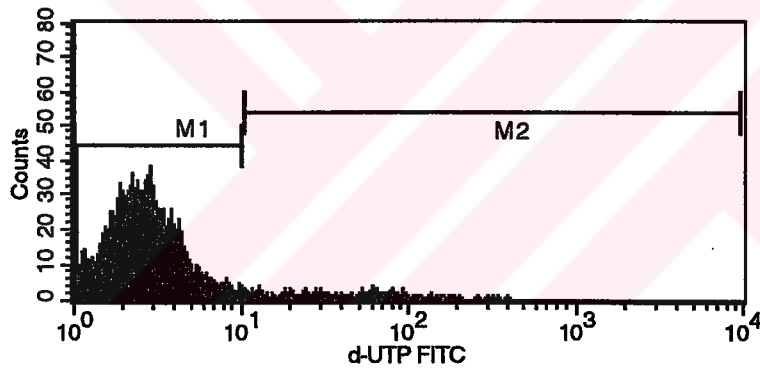
S a m p l e : CD61 (+) cells.

Apoptotic Cells :% 12.98

Dokuz Eylul Universitesi Tıp Fakultesi
Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: hasta
Total Events: 10140



Histogram Statistics

Acquisition Date: 1-Aug-1
X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)
Gate: G1

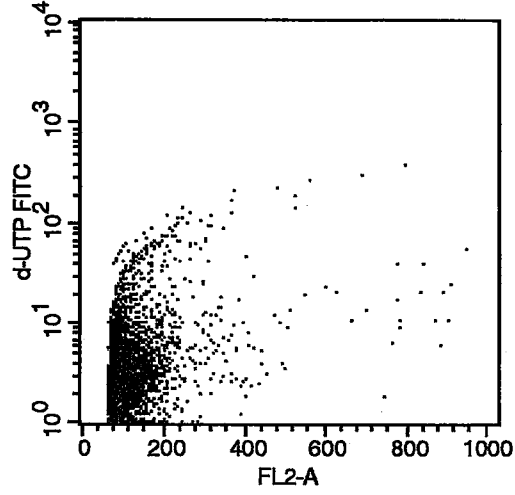
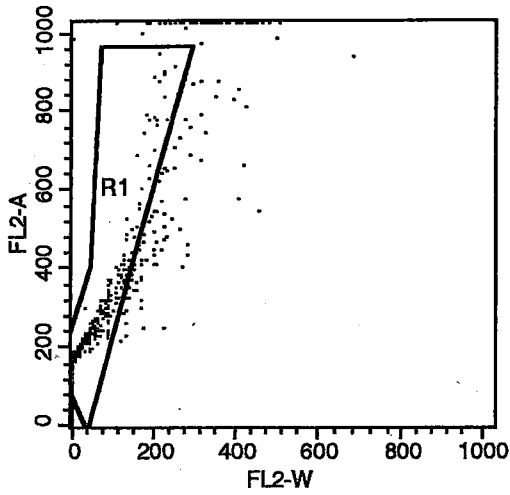
Marker	% Gated
All	100.00
M1	94.91
M2	5.01

Patient Name : 15 - A.K.
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 5.04

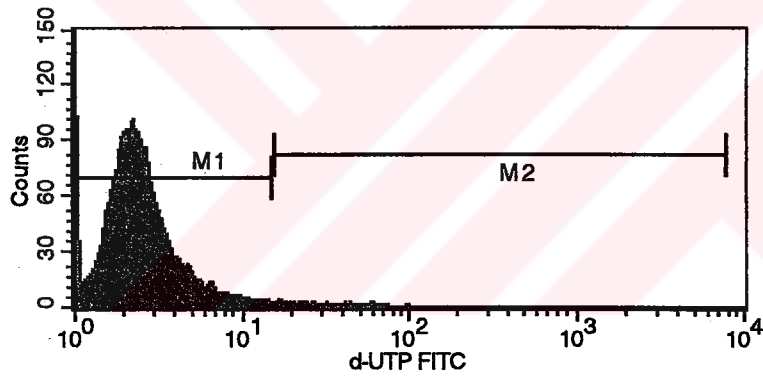
Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi

Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: CD61+ cells

Total Events: 20000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 19-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

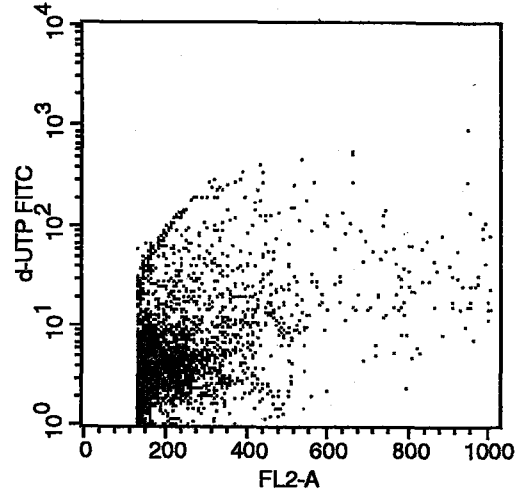
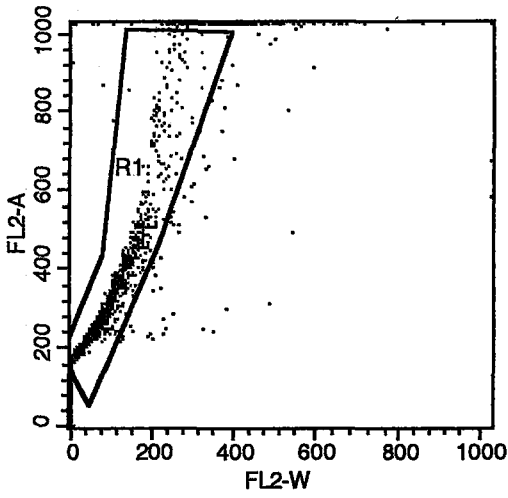
Marker	% Gated
All	100.00
M1	97.58
M2	2.37

Patient Name : 16 - B.G.

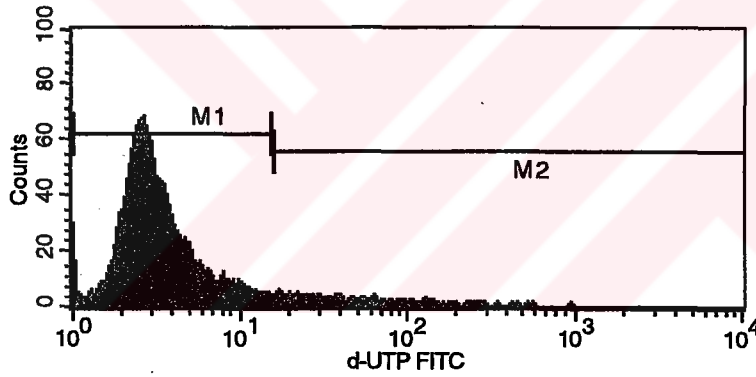
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 2.33

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: APO-Direct Kit
Total Events: 20000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 20-Jul-1 Gate: G1
X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

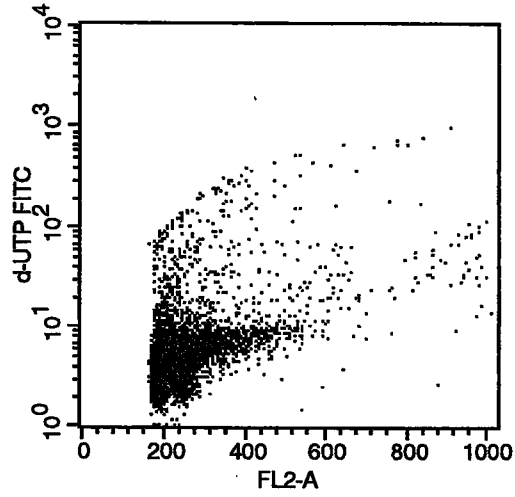
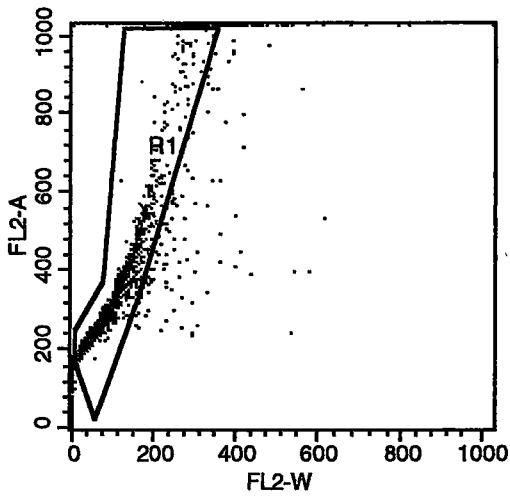
Marker	% Gated
All	100.00
M1	91.83
M2	8.08

Patient Name : 17 - O.K.
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 8.13

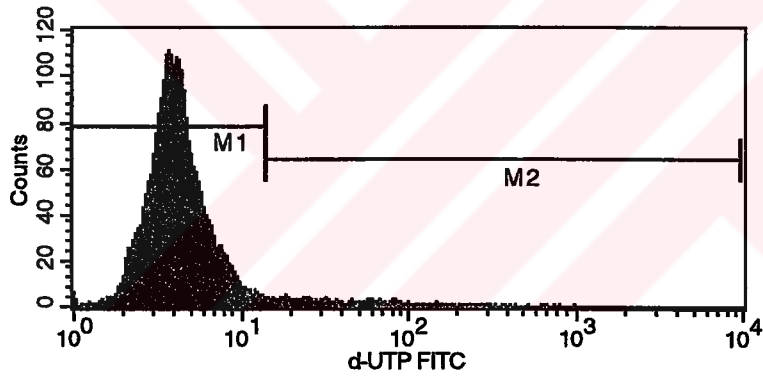
Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi

Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: APO-Direct Kit

Total Events: 20000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 20-Jul-1

Gate: G1

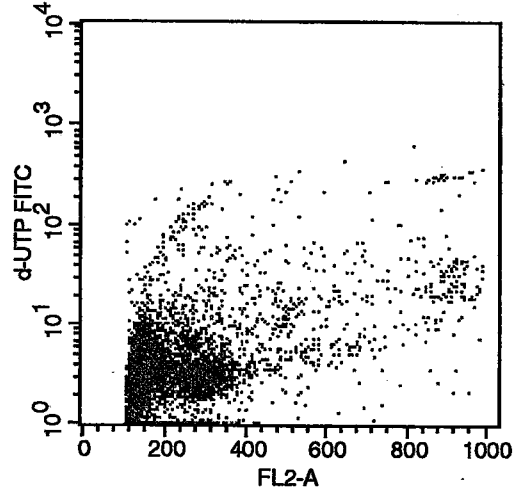
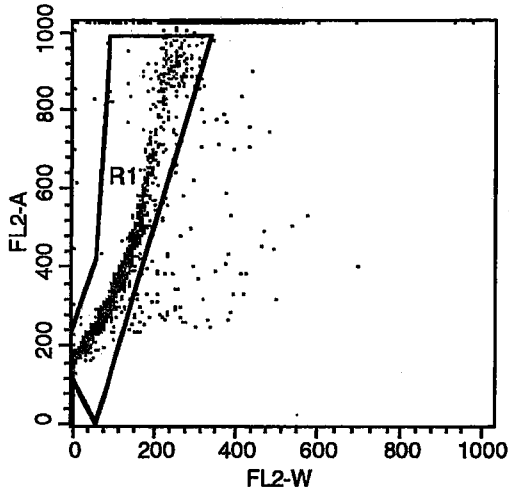
X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

Marker	% Gated
All	100.00
M1	94.97
M2	5.03

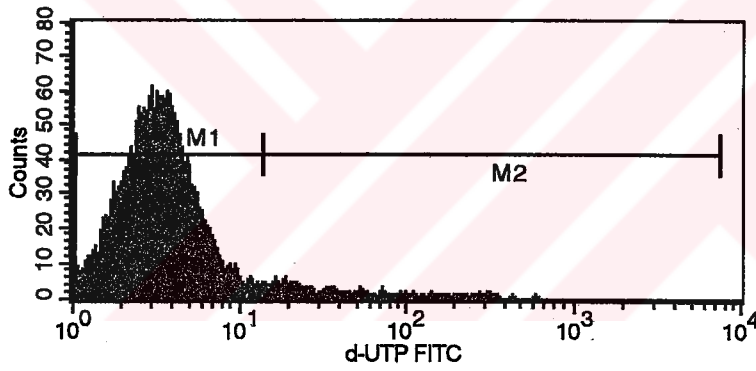
Patient Name : 18 - B.C.
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 4.98

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji Onkoloji Laboratuvari



Sample ID: APO-Direct Kit
Total Events: 20000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 20-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

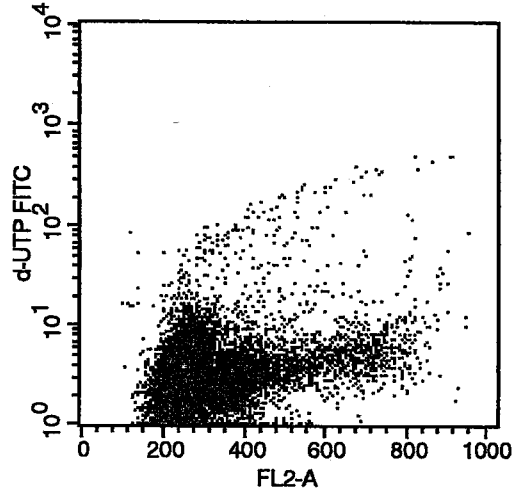
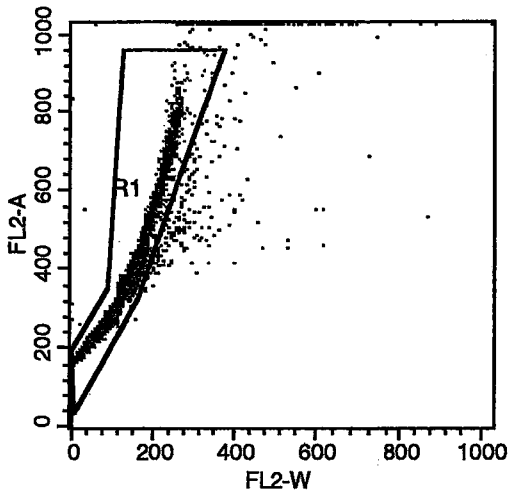
Marker	% Gated
All	100.00
M1	90.52
M2	5.86

Patient Name : 19 - T.O.
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 5.89

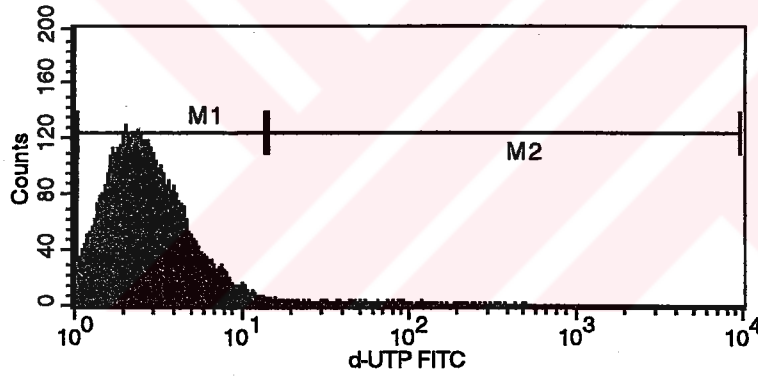
Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi

Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: APO-Direct Kit

Total Events: 20000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 20-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

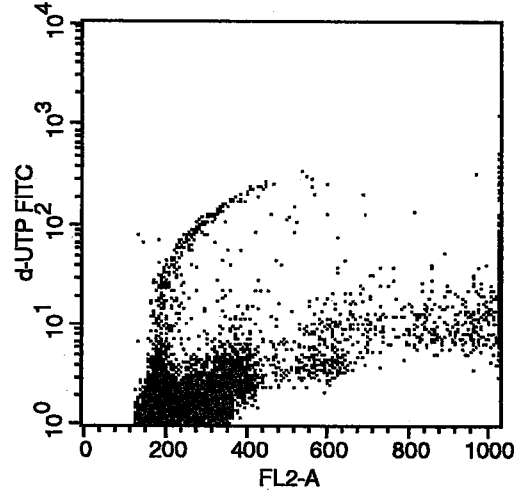
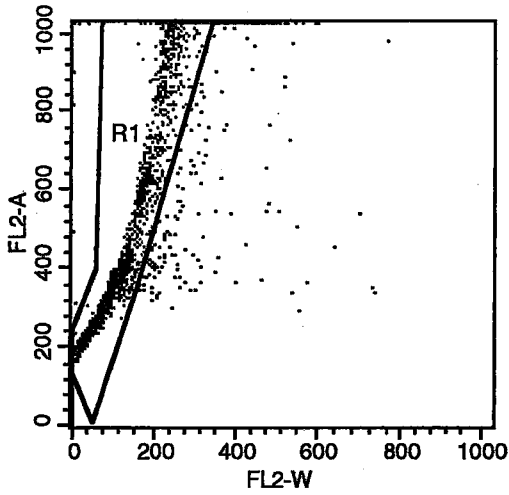
Marker	% Gated
All	100.00
M1	92.78
M2	1.62

Patient Name : 20 - N.S.
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 1.63

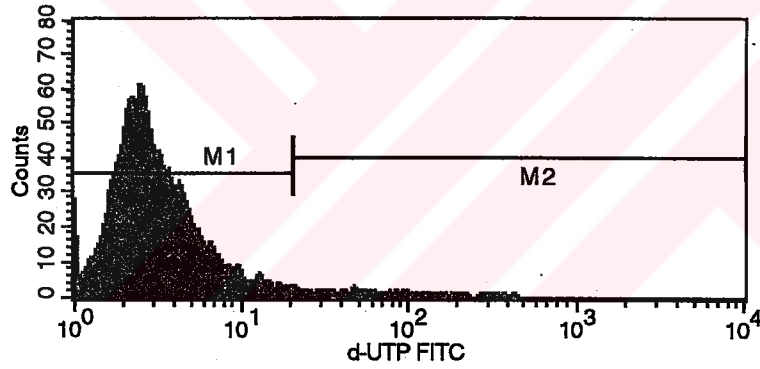
Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi

Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: CD61+ cells

Total Events: 20000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 19-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

Marker	% Gated
All	100.00
M1	94.87
M2	5.18

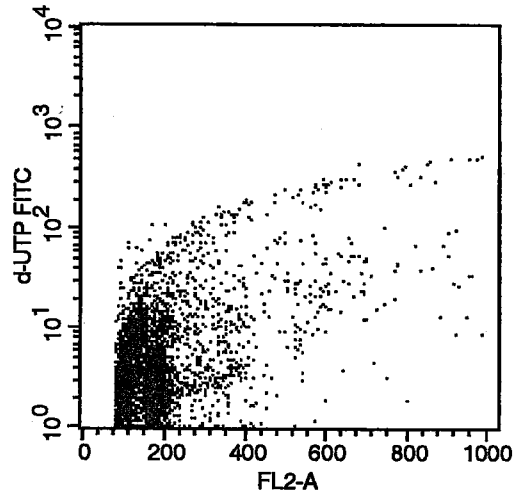
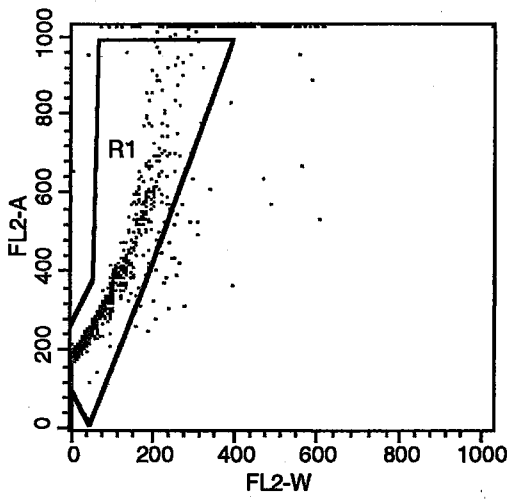
Patient Name : 21 - H.A.

Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 5.14

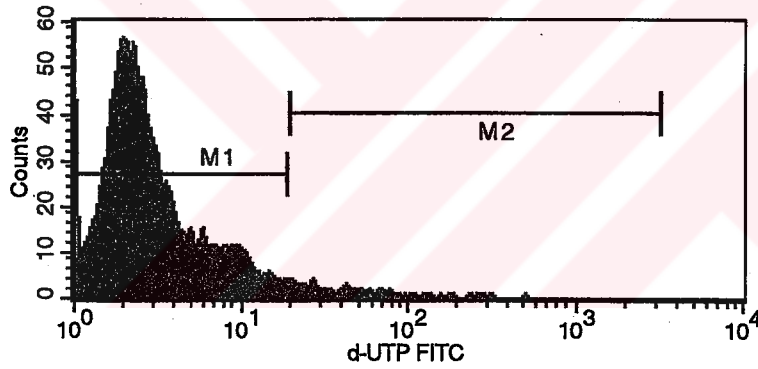
Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi

Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: CD61+ cells

Total Events: 15165



Histogram Statistics

Acquisition Date: 19-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

Marker	% Gated
All	100.00
M1	94.51
M2	5.38

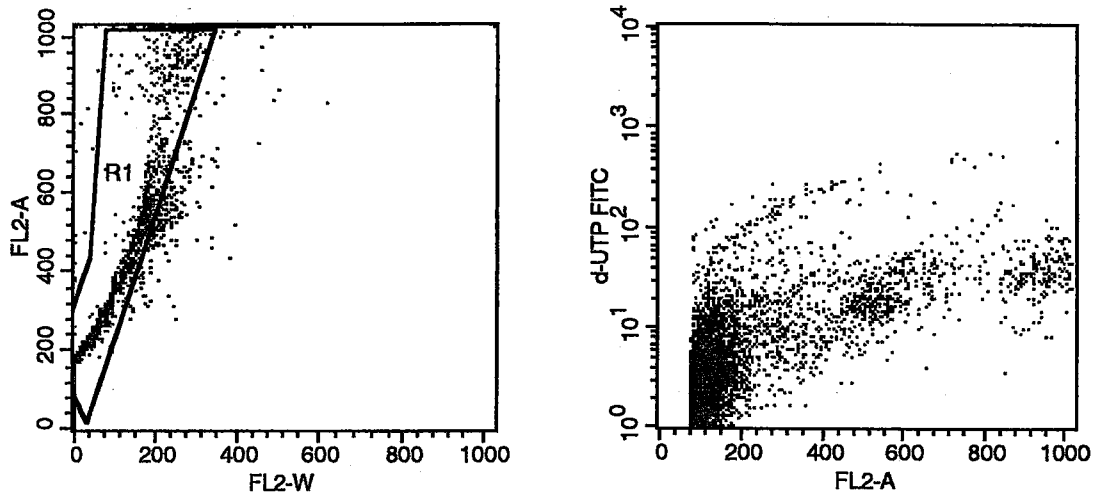
Patient Name : 22 - N.A.K.

Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 5.29

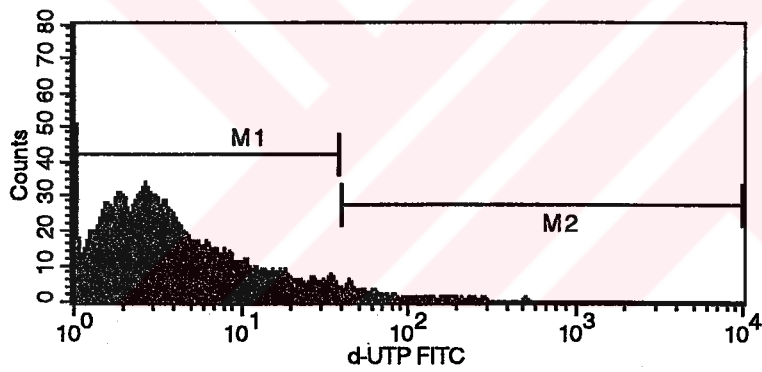
Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi

Hematoloji Onkoloji Laboratuvari



Sample ID: CD61+ cells

Total Events: 15270



Histogram Statistics

Acquisition Date: 19-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

Marker	% Gated
All	100.00
M1	95.51
M2	4.30

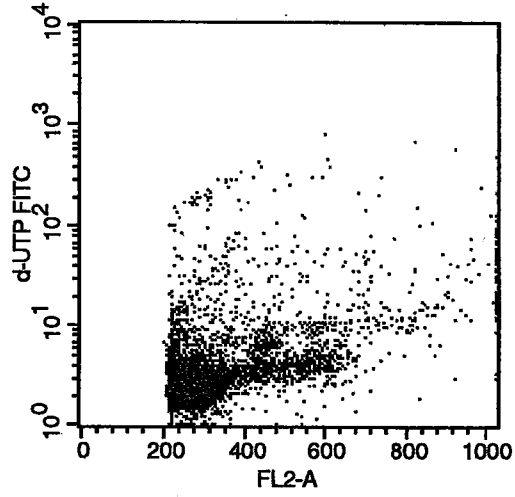
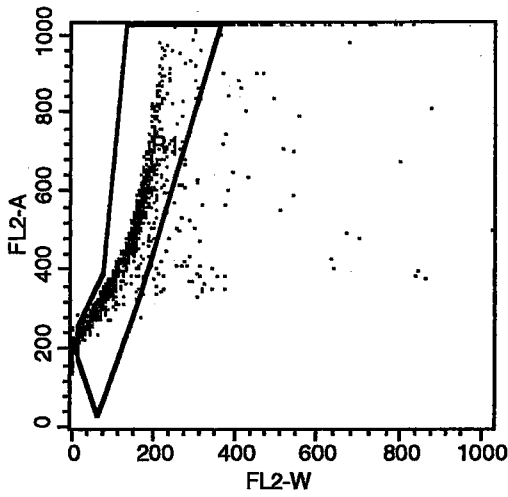
Patient Name : 23 - F.P.

Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 4.32

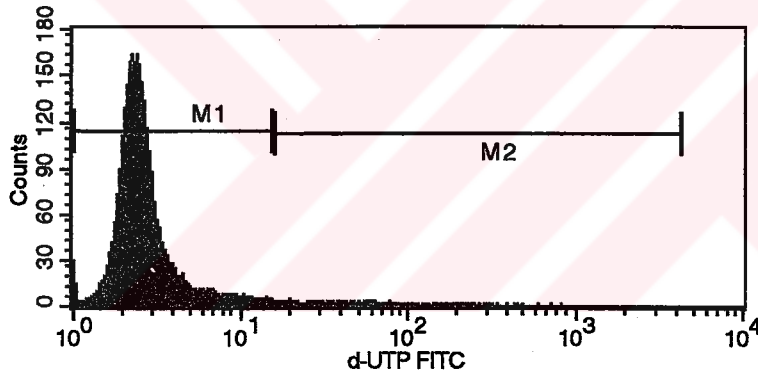
Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi

Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: APO-Direct Kit

Total Events: 15000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 20-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

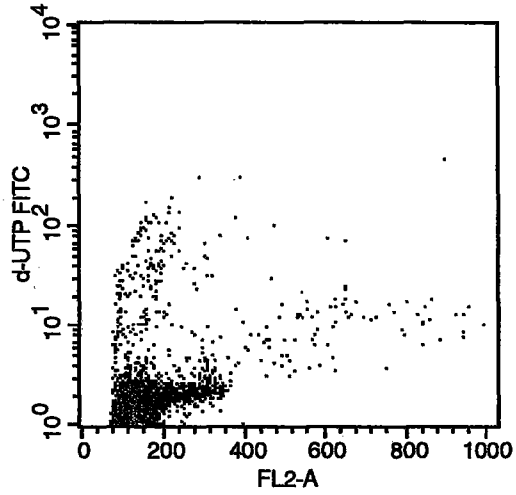
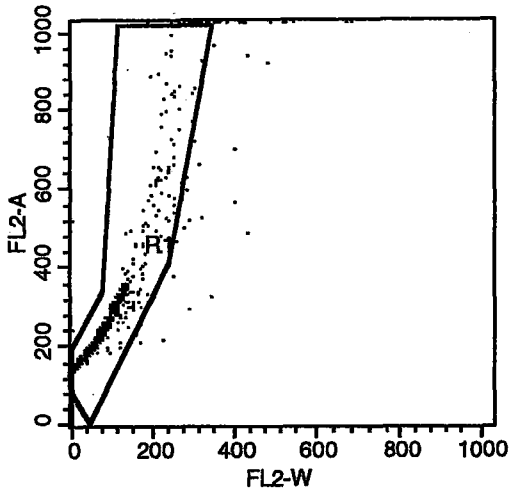
Marker	% Gated
All	100.00
M1	96.80
M2	3.16

Patient Name : G.D.D. - 24
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 3.10

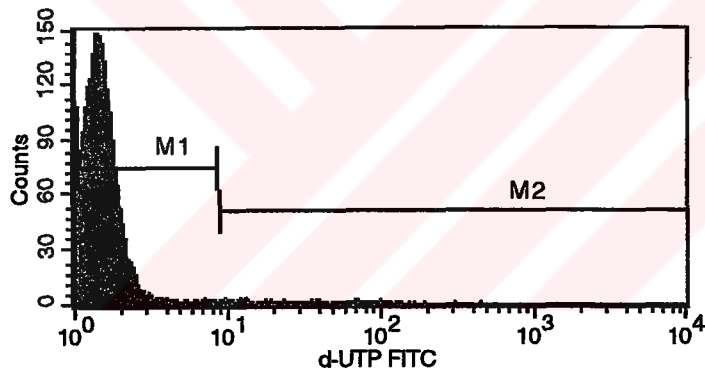
Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi

Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: Sample3

Total Events: 15000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 18-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

Marker	% Gated
All	100.00
M1	81.33
M2	2.12

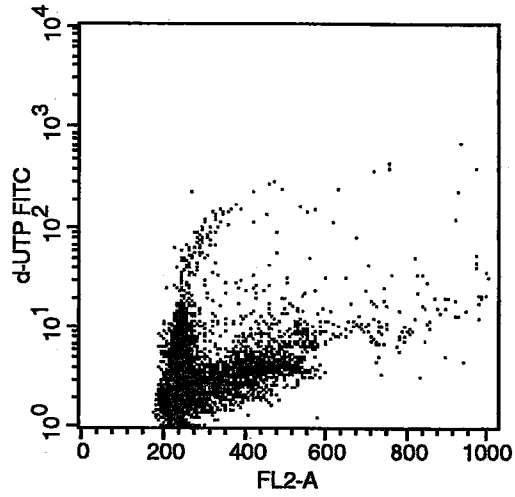
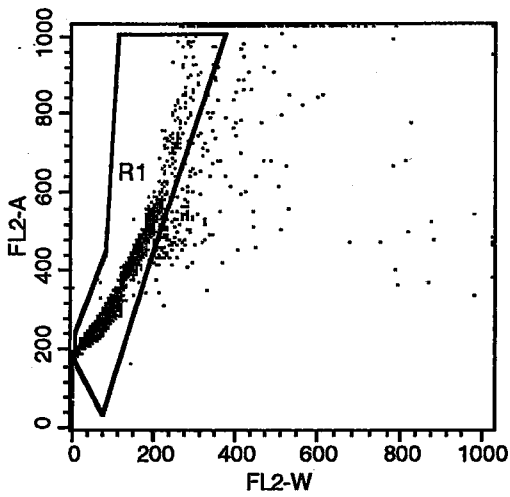
Patient Name : 25- T.K.

S a m p l e : CD61 (+) cells.

Apoptotic Cells :% 2.15

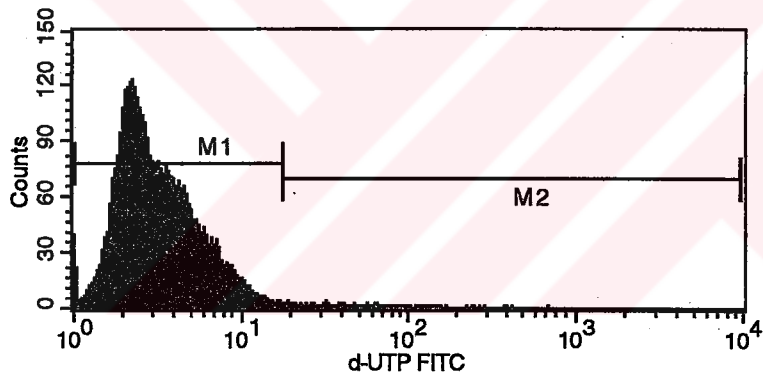
Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi

Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: APO-Direct Kit

Total Events: 15000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 20-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

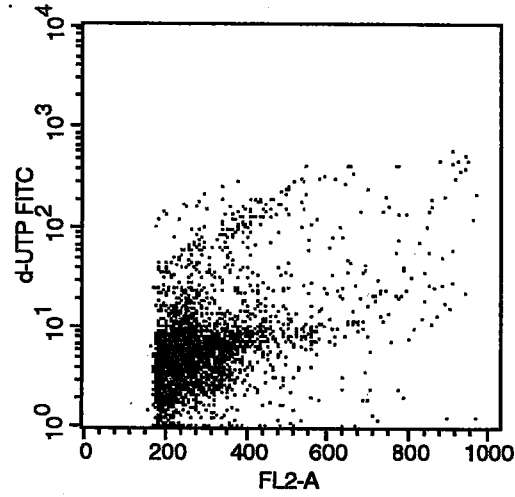
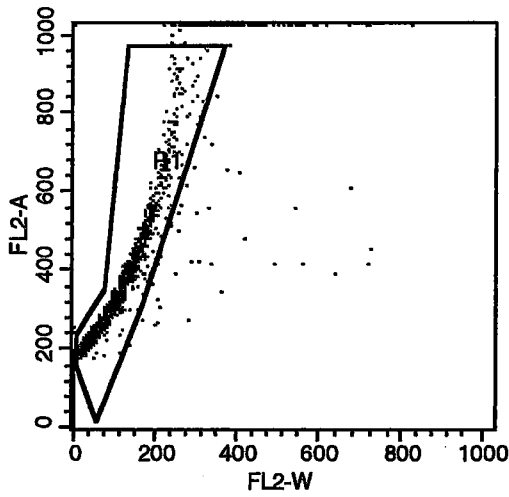
Marker	% Gated
All	100.00
M1	98.57
M2	1.44

Patient Name : 26 - Y.S.
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 1.42

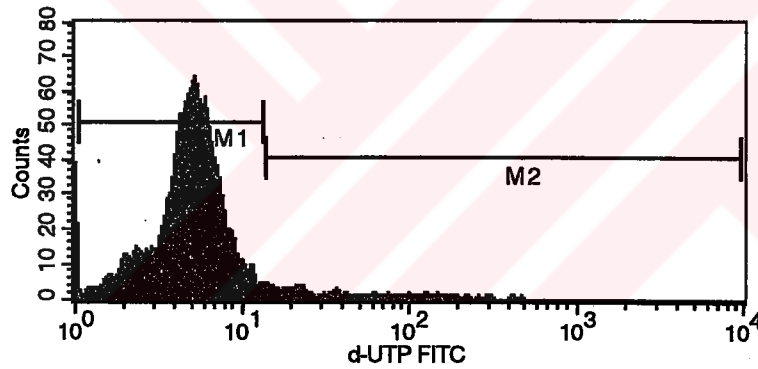
Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi

Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: APO-Direct Kit

Total Events: 20000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 20-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

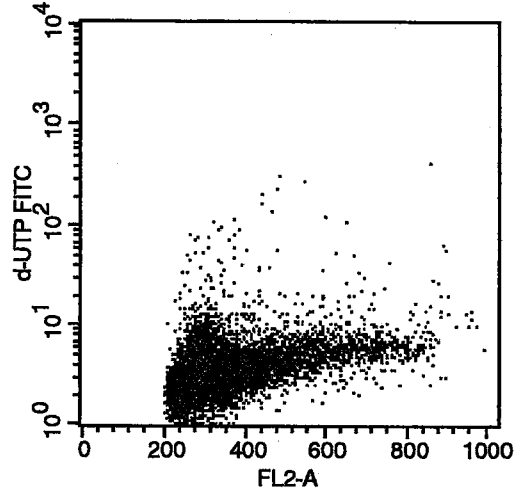
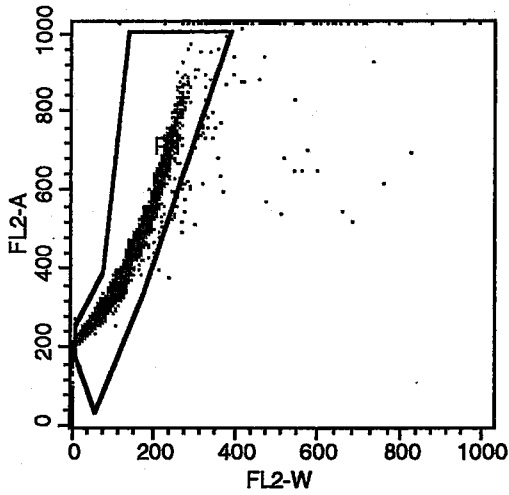
Marker	% Gated
All	100.00
M1	91.25
M2	7.31

Patient Name : 27 - A.A.

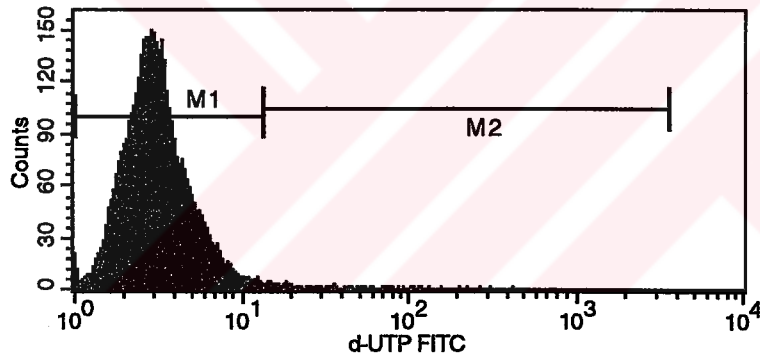
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 7.28

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: APO-Direct Kit
Total Events: 15000



Histogram Statistics

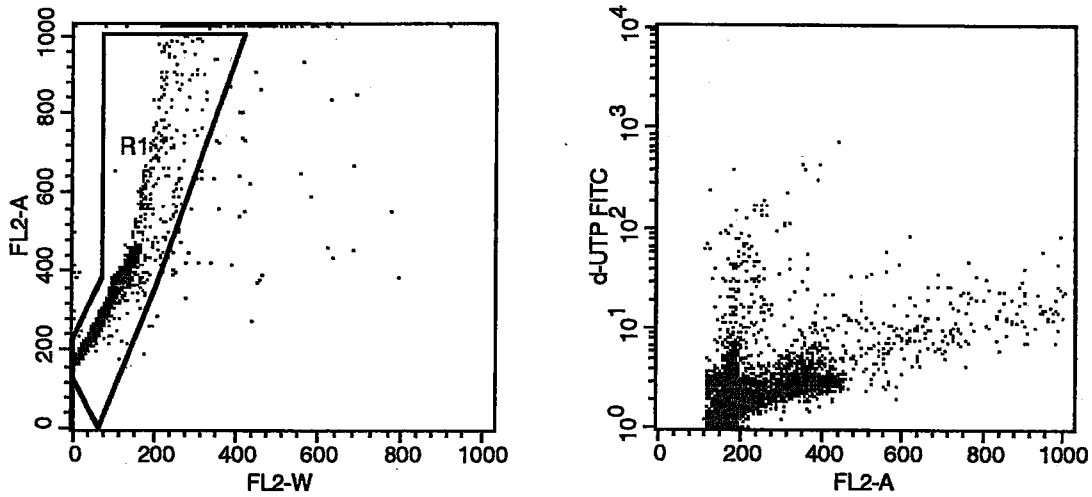
Acquisition Date: 20-Jul-1 Gate: G1
X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

Marker	% Gated
All	100.00
M1	99.11
M2	0.90

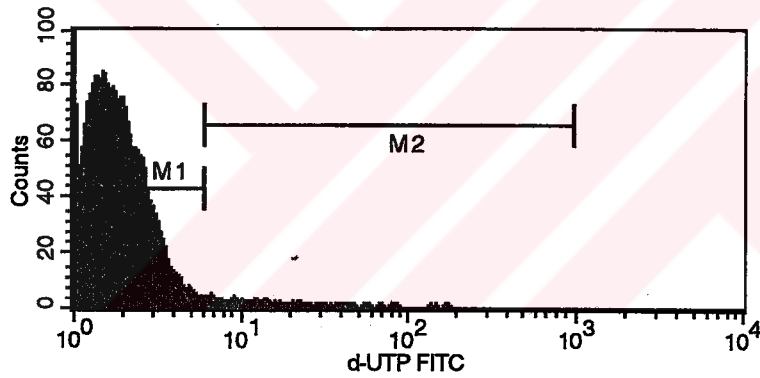
Patient Name : 28 - M.C.
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 0.83

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: CD61+ cells
Total Events: 12045



Histogram Statistics

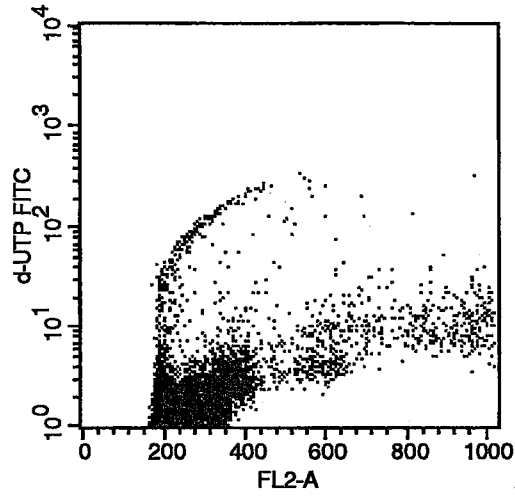
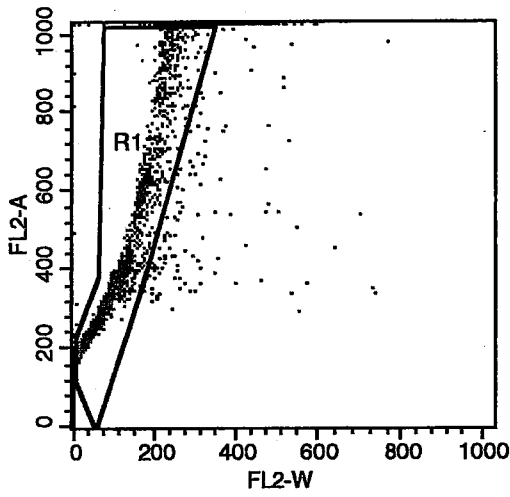
Acquisition Date: 19-Jul-1 Gate: G1
X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

Marker	% Gated
All	100.00
M1	95.33
M2	4.70

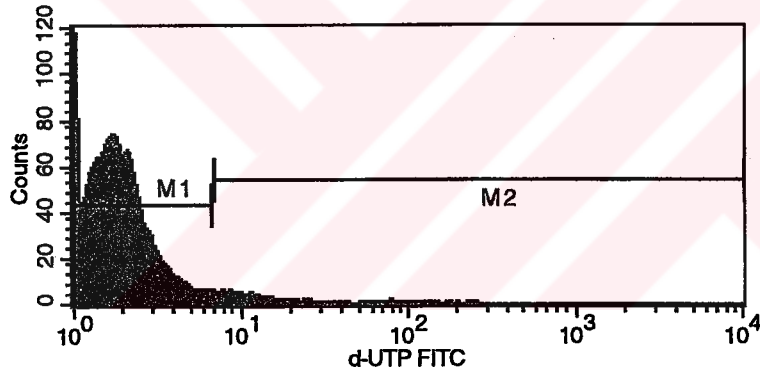
Patient Name : 29 - S.C.
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 4.79

Dokuz Eylul Universitesi Tıp Fakultesi
Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: CD61+ cells
Total Events: 20000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 19-Jul-1

Gate: G1

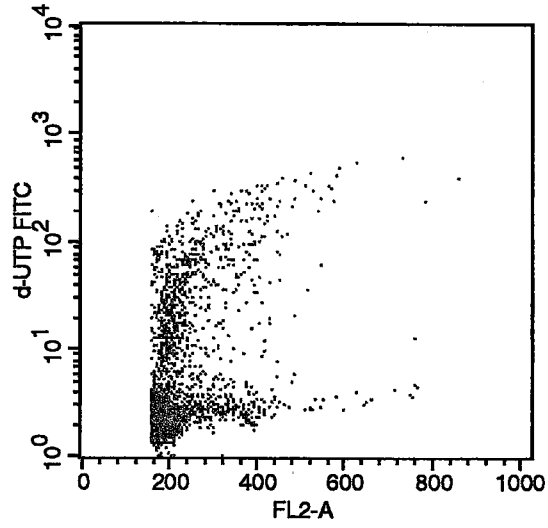
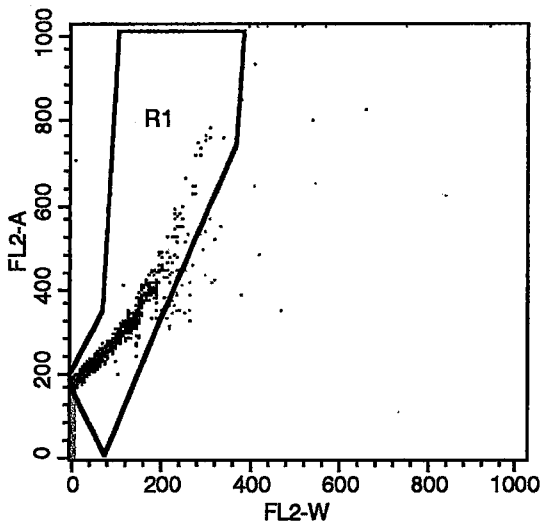
X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

Marker	% Gated
All	100.00
M1	91.59
M2	8.17

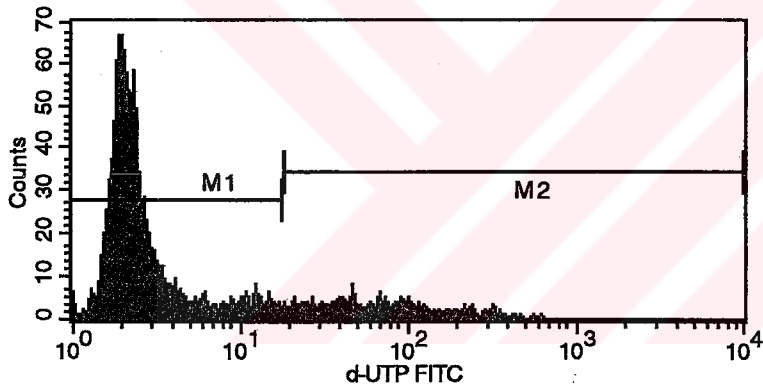
Patient Name : 30 - H.A.
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 8.05

Dokuz Eylul Universitesi Tıp Fakultesi
Hematoloji-Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: Sample.1
Total Events: 9465



Histogram Statistics

Acquisition Date: 18-Jul-1

Gate: G1

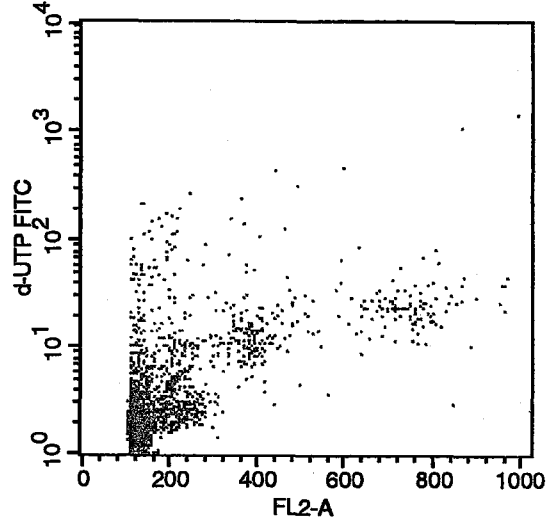
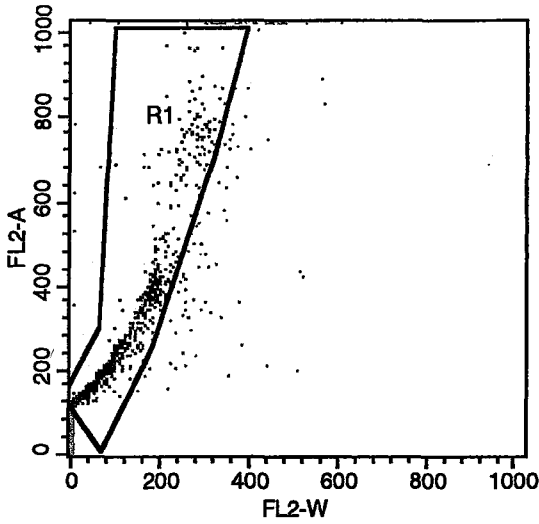
X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

Marker	% Gated
All	100.00
M1	85.78
M2	14.22

Patinet Name : 31 - B.O.
S a m p l e : CD61(+) cells.

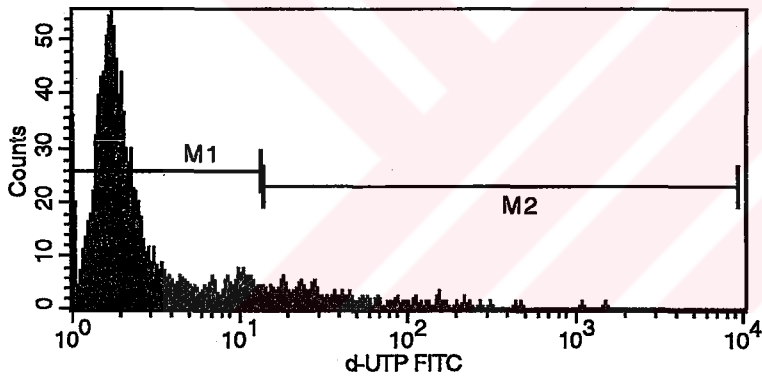
Apoptotic Cells :% 14.08

Dokuz Eylul Universitesi Tıp Fakultesi
Hematoloji-Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: Sample.2

Total Events: 15000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 18-Jul-1

Gate: G1

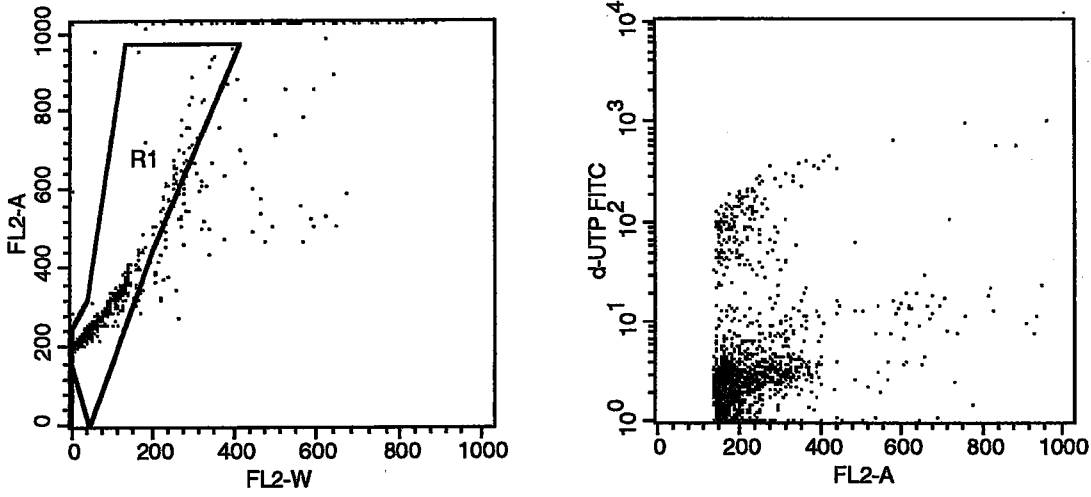
X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

Marker	% Gated
All	100.00
M1	91.24
M2	8.54

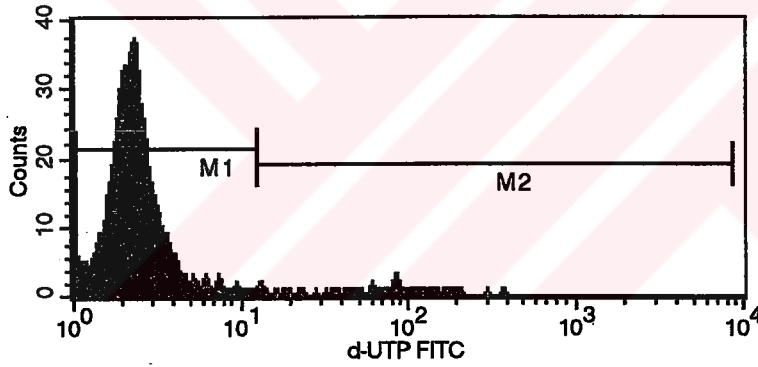
Patinet Name : 32 - C.K.
S a m p l e : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 8.44

Dokuz Eylul Universitesi Tıp Fakultesi
Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: APO-Direct Kit
Total Events: 15000



Histogram Statistics

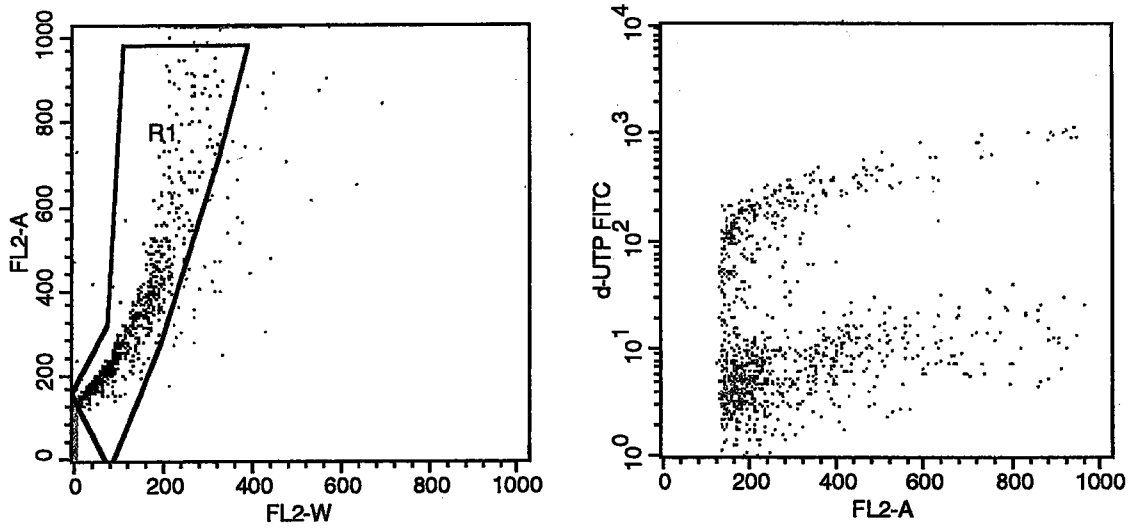
Acquisition Date: 20-Jul-1 Gate: G1
X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

Marker	% Gated
All	100.00
M1	91.87
M2	8.20

Patient Name : 33 - A.Y.
Sample : CD61(+) cells.

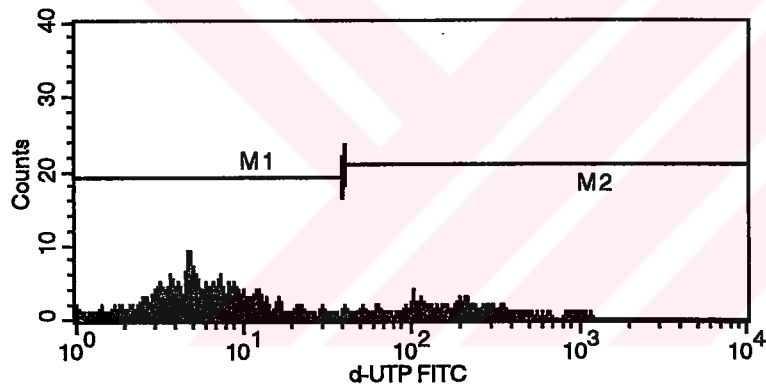
Apoptotic Cells :% 8.20

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji-Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: Sample.5

Total Events: 15000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 18-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

Marker	% Gated
All	100.00
M1	72.71
M2	27.19

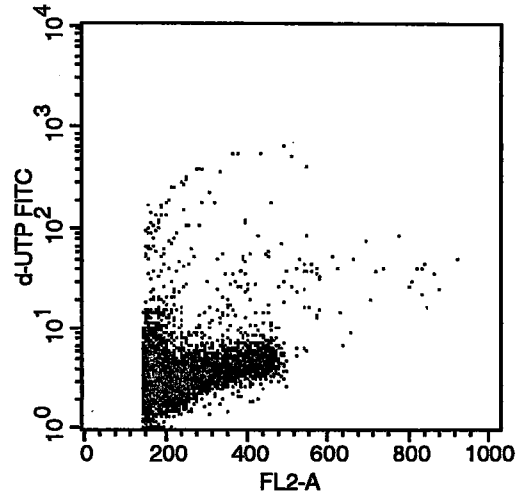
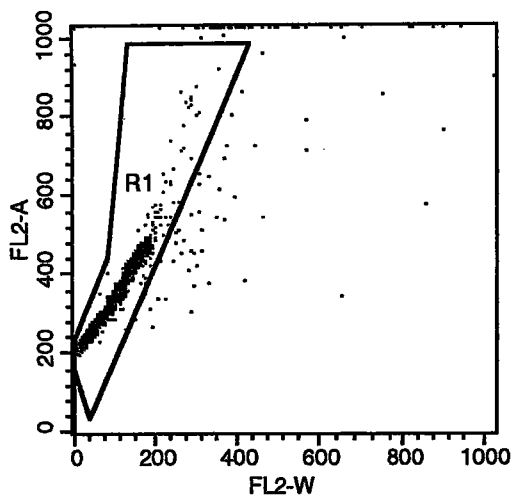
Patinet Name : 34 - Y.I.

S a m p l e : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 27.06

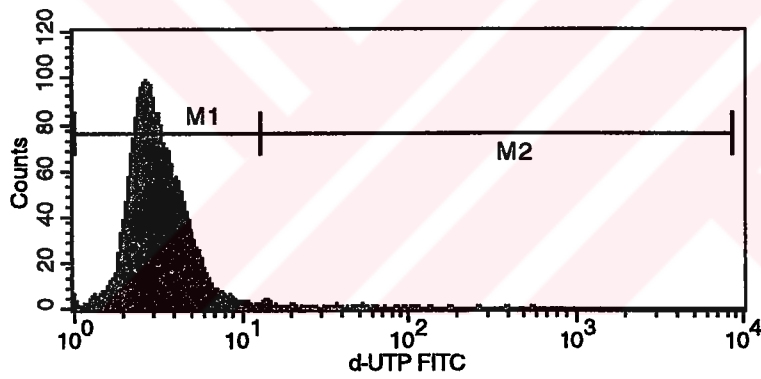
Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi

Hematoloji Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: APO-Direct Kit

Total Events: 15000



Histogram Statistics

Acquisition Date: 20-Jul-1

Gate: G1

X Parameter: FL1-H d-UTP FITC (Log)

Marker	% Gated
All	100.00
M1	97.36
M2	2.66

Patient Name : 35 - O.I.
Sample : CD61(+) cells.

Apoptotic Cells :% 2.67