

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRÜ KULLANAN
KRONİK MYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA
TROMBOSİT FONKSİYONLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yiğit ŞENER

**Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2015**

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRÜ KULLANAN
KRONİK MYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA
TROMBOSİT FONKSİYONLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ

Yiğit ŞENER

Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Z. Günnur DİKMEN

ANKARA
2015

Anabilim Dalı : Biyokimya
 Program : Biyokimya
 Tez Başlığı : Tirozin Kinaz İnhibitörü kullanan Kronik Myeloid Lösemi hastalarında trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesi
 Öğrenci Adı-Soyadı : Yiğit ŞENER
 Savunma Sınavı Tarihi : 25.12.2015

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı ve Tez Danışmanı : Doç. Dr. Z. Günnur DİKMEN
 Hacettepe Üniversitesi
 Üye: Prof. Dr. Yasemin AKSOY
 Hacettepe Üniversitesi
 Üye: Doç. Dr. İncilay LAY
 Hacettepe Üniversitesi
 Üye: Doç. Dr. Oytun PORTAKAL
 Hacettepe Üniversitesi
 Üye: Doç. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL
 Gazi Üniversitesi

Gün
Yasemin
İncilay
Oytun
Aylin
AS

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ersin FADILLOĞLU
 Müdür

TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimim süresince bana her konuda destek olan, tezimin tamamlanmasında, bilgi ve deneyimleriyle katkıda bulunan tez danışmanım Doç. Dr. Z. Günnur DİKMEN'e,

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri, Merkez ve Acil Laboratuvarları Direktörü Prof. Dr. Filiz AKBIYIK'a,

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Anabilim Dalı'nda tez çalışmamın yürütülmesinde bilgi ve deneyimleriyle katkıda bulunan Prof. Dr. Yahya BÜYÜKAŞIK'a,

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Anabilim Dalı'nda tez çalışmama katılan hastaları bana yönlendiren, Uzman Dr. Seda AYDIN'a,

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimim boyunca teorik bilgi ve pratik uygulamalarından yararlandığım Prof. Dr. Yasemin AKSOY, Doç. Dr. Ebru BODUR'a,

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Merkez Laboratuvarı Koagülasyon biriminde çalışan teknisyenlerimiz Mustafa ÇATAK, Elife KONTAŞ ve Songül CANGÜL'e,

Son olarak beni en zor zamanlarımda destekleyip yanımda bulunan ailem Muhip ŞENER, Dilek ŞENER, Ahmet ŞENER ve Ayşe ŞENER'e ve değerli arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Şener, Y. Tirozin kinaz inhibitörü kullanan Kronik Myeloid Lösemi hastalarında trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Yüksek Lisans Tezi, Ankara 2015. Tirozin kinaz inhibitörü (TKİ) kullanan Kronik Myeloid Lösemi (KML) hastalarında zaman zaman kanama gözlenmektedir. Kanaması olan bu hastalarda trombositopeni gözlenmemesi, TKİ'nin trombosit fonksiyonlarında bozukluğa yol açabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada, TKİ kullanan KML hastalarında, trombosit fonksiyon testleri ile birlikte kanama bulgularının değerlendirilmesi ve aralarındaki korelasyonun incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma kapsamında, imatinib (n=47), dasatinib (n=15) ve nilotinib (n=6) kullanan kronik fazdaki KML hastalarına (n=68) kanama anketi yapıldı. Trombosit fonksiyonları, trombositten zengin plazma havuzu hazırlanarak ışık geçirgenlik agregometresi (Chrono-Log) ile değerlendirildi. Plazma örneklerine farklı agonistler (ADP, epinefrin, kollajen, ristosetin) eklenilerek trombosit agregasyonu *in vitro* şartlarda indüklendi ve elde edilen agregasyon yüzdesi/zaman grafikleri incelenerek trombosit fonksiyonları değerlendirildi. Yaş ortalaması 47 (18-78) olan KML hastalarında, ortalama lökosit sayısı $6,7 \pm 2,5 \times 10^3/\mu\text{L}$, hemoglobin düzeyi $13,0 \pm 1,7 \text{ g/dL}$, hematokrit $\%37,9 \pm 4,7$, trombosit sayısı $234,7 \pm 74,5 \times 10^3/\mu\text{L}$, PT (*Prothrombin Time*) $12,8 \pm 1,4 \text{ sn}$, INR (*International Normalized Ratio*) $1,0 \pm 0,1$, aPTT (*activated Partial Tromboplastin Time*) $27,6 \pm 2,8 \text{ sn}$, TT (*Thrombin Time*) $16,5 \pm 2,0 \text{ sn}$, fibrinojen $325,7 \pm 68,4 \text{ mg/dL}$ ve Faktör VIII düzeyi $\%120,8 \pm 11,2$ olarak bulundu. Kanama anketi sonucuna göre kanama skoru tüm hastalarda 3'ün altında bulundu ve *minör kanama* olarak kabul edildi. Kanama skorları ile TKİ kullanımı arasındaki ilişki incelendiğinde, İmatinib kullanan KML hastalarının $\%25,6$ 'sında, dasatinib kullanan hastalarının $\%20$ 'sinde minör kanama yakınmaları gözlemlendi. Nilotinib kullanan hastaların hiçbirinde kanama bulgusu gözlenmedi. Toplamda TKİ kullanan KML hastalarının $\%22$ 'sinde kanama saptandı, bunun $\%17,6$ 'sında kanama skoru 1 ve $\%4,4$ 'ünde kanama skoru 2 bulundu. Trombosit fonksiyon test sonuçlarına göre ADP, ristosetin, epinefrin ve kollajen ile indüklenen trombosit agregasyonunda tüm hastaların $\%26$ 'sında *sekresyon bozukluğu* ile uyumlu sonuçlar saptandı. Çalışmaya alınan hastalarda saptanan trombosit fonksiyon bozukluğu ile minör kanama bulguları arasında korelasyon izlenmedi. Sonuç olarak TKİ kullanan KML hastalarında, trombosit fonksiyon bozukluğu gözlenebilir ancak bu bozukluklar kanama eğilimi ile ilişkili değildir. TKİ'nin trombosit homeostazı üzerindeki etki mekanizmalarının aydınlatılması gereklidir.

Anahtar kelimeler: Trombosit, kronik myeloid lösemi, tirozin kinaz inhibitörleri, trombosit fonksiyonları, kanama diyatezi.

ABSTRACT

Şener, Y. Assessment of platelet functions in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors, Hacettepe University, Institute of Health Science, Biochemistry Master Thesis, Ankara 2015. Bleeding is observed time to time in chronic myeloid leukemia (CML) patients using tyrosine kinase inhibitors (TKI). It has been suggested that tyrosine kinase inhibitors can disrupt platelet functions and cause bleeding without thrombocytopenia in CML patients. In this study, we aimed to evaluate platelet functions of CML patients using tyrosine kinase inhibitors and examine in conjunction with bleeding symptoms to find out whether there is a correlation between them. In this study, bleeding surveys were performed for 68 CML patients in chronic phase receiving imatinib (n=47), dasatinib (n=15) and nilotinib (n=6). Then platelet rich plasma pool was prepared and light transmittance aggregometry (Chrono-Log) was used for the evaluation of platelet functions. Platelet aggregation was induced by different agonists (ADP, epinephrine, collagen, ristocetin) *in vitro* and the aggregation percentage / time graph was analyzed to evaluate platelet functions. The median age was found as 47 years (range, 18-78 years), white blood cell count $6.72,5 \times 10^3/\mu\text{L}$, hemoglobin $13.0 \pm 1,7$ g/dL, platelets $234.7 \pm 74,5 \times 10^3/\mu\text{L}$, PT (Prothrombin Time) $12,8 \pm 1,4$ sn, INR (International Normalized Ratio) $1,0 \pm 0,1$, aPTT (activated Partial Thromboplastin Time) $27.6 \pm 2,8$ sec, TT (Thrombin Time) $16.5 \pm 2,0$ sec, fibrinogen 325.7 mg/dL and Factor VIII activity were $120,8 \pm 11,2\%$ in KML patients. The bleeding survey results were analysed and the patients who have bleeding score below 3 were accepted as *minor bleeding*. When the relation between bleeding scores and TKI treatment were evaluated; we observed that 25,6% of the patients using imatinib and 20% of the patients who using dasatinib have minor bleeding symptoms. In Nilotinib treatment group, no bleeding symptom was observed. In total, 22% of KML patients under TKI treatment have bleeding symptoms; 17,6% with bleeding score 1 and 4,4% with bleeding score 2. In platelet function tests, when aggregation was induced by ADP, epinephrine, collagen and ristocetin, *secretion type defect* was observed in 26% of the patients. No correlation was observed between platelet function defects and minor bleeding symptoms in patients. As a result, platelet aggregation disorders can be observed in CML patients who use tyrosine kinase inhibitors. However, platelet dysfunction is not associated with bleeding disorder. Furthermore, the effect mechanism of tyrosine kinase inhibitors on platelet homeostasis warrants further investigation.

Key words: Platelets, chronic myeloid leukemia, tyrosine kinase inhibitors, platelet functions, bleeding diathesis.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER.....	xi
TABLolar	xiii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kronik Myeloid Lösemi.....	2
2.1.1. Klinik Bulgular.....	3
2.1.2. Laboratuvar Bulguları	3
2.1.3. Sitogenetik analiz	4
2.1.4. ABL gen ve proteinlerinin yapısı	4
2.1.5. BCR gen ve proteinin yapısı.....	5
2.1.6. BCR-ABL füzyon geni.....	6
2.1.7. ABL'deki kırılma noktaları	7
2.1.8. BCR'deki kırılma noktaları	8
2.1.9. BCR-ABL füzyon proteinin yapısı	8
2.1.10. BCR-ABL patogenezi ile ilgili mekanizmalar.....	9
2.1.11. KML'de uygulanan tedavi yöntemleri.....	12
2.2. Hemostaz.....	16
2.2.1. Primer Hemostaz.....	17
2.2.2. Sekonder Hemostaz	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Enstrümanlar:.....	26
3.2. Trombosit Agregasyonunun Değerlendirilmesi	28
3.3. Kullanılan Reaktifler	29
3.4. Reaktiflerin Hazırlanması.....	29

3.4.1. ADP'nin hazırlanması	29
3.4.2. Epinefrinin hazırlanması	29
3.4.3. Kollajenin hazırlanması	30
3.4.4. Ristasetinin hazırlanması	30
3.5. Kanama Anketi	30
3.6. Tam Kan Sayımı	30
3.7. Koagülasyon Testleri	31
3.8. Trombosit fonksiyon testleri	34
3.8.1. Hastaların hazırlanması	34
3.8.2. Örneklerin santrifüjü	35
3.8.3. ADP ile indüklenen agregasyonun incelenmesi	35
3.8.4. Epinefrin ile indüklenen agregasyonun incelenmesi	37
3.8.5. Kollajen ile indüklenen agregasyonun incelenmesi	37
3.8.6. Ristasetin ile indüklenen agregasyonun incelenmesi	38
4. BULGULAR	41
4.1. Trombosit Fonksiyon Testlerinin Stabilizasyon Çalışmaları	41
4.2. KML Hastalarının Değerlendirilmesi	43
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	58
KAYNAKLAR	59
EKLER	63
EK 1. Etik Kurul Onayı	63
EK 2. Sözlü Sunum (Burslu)	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABL	<i>Abelson murine leukemia</i>
ADP	Adenozin difosfat
ALL	Akut Lenfositik lösemi
AML	Akut Myeloid Lösemi
aPTT	<i>activated Partial Tromboplastin Time</i>
ATP	Adenozin trifosfat
BAD	<i>BCL-2 associated death promoter</i>
BCR	<i>Breakpoint cluster region</i>
BSS	<i>Bernard-Soulier Sendromu</i>
CHS	Chediak-Higashi sendromu
CTAP III	<i>Connective tissue activating peptide</i>
DNA	Deoksiribo nükleik asit
Epi	Epinefrin
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FISH	<i>Floresan in situ hibridizasyon</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GP	Glikoprotein
GP	Glikoprotein
GPS	Gri platelet sendromu
GTP	Guanozin trifosfat
HPS	Hermansky-Pudlak sendromu
INR	<i>International normalized ratio</i>
ISI	<i>International sensitivity index</i>
JAK	Janus Kinaz
KLL	Kronik Lenfositik lösemi
KML	Kronik Myeloid Lösemi
Kol	Kollajen
MAP	<i>Mitogen Activated Protein</i>
MCV	<i>Mean cell volume</i>
MPV	<i>Mean platelet volume</i>

m-RNA	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
NES	Nükleer Eksport Sinyali
NLS	Nükleer Lokalizasyon Sinyali
NO	Nitrik oksit
PAI-1	Plazminojen aktivatör inhibitör-1
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PF4	Platelet faktör 4
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
Ph	<i>Philadelphia</i>
PI-3K	<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
PLT	Platelet
PPP	<i>Platelet poor plasma</i>
PRP	<i>Platelet rich plasma</i>
PT	<i>Prothrombin time</i>
RDW	<i>Red cell distribution width</i>
RNA	Ribo Nükleik Asit
SS	Standart sapma
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TKİ	Tirozin Kinaz İnhibitörü
TT	<i>Thrombin time</i>
TxA ₂	Tromboksan A ₂
vWF	Von Willebrand Faktör
βTG	Beta tromboglobulin

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. KML'nin periferik yayma bulguları	3
2.2. ABL proteininin yapısı gösterilmektedir.	5
2.3. BCR proteininin yapısı.....	6
2.4. BCR/ABL genlerinin kırılma bölgeleri	7
2.5. BCR/ABL'nin farklı kırılma bölgeleriyle oluşan varyantları.....	9
2.6. Adezyonun bozulması, mitojenik aktivasyon, apoptosisin inhibisyonu	9
2.7. BCR-ABL ile aktif olan sinyal yolları	10
2.8. Tirozin kinaz inhibitörünün etki mekanizması	13
2.9. İmatinib, STI-571 (Gleevec) kimyasal yapısı	14
2.10. Dasatinib, BMS-354825 (Sprycel) kimyasal yapısı	15
2.11. Nilotinib, AMN-107 (Tasigna) kimyasal yapısı	15
2.12. Primer hemostaz ve sekonder hemostazın aşamaları.....	16
2.13. Primer hemostazın aşamaları.....	18
2.14. Trombositin yapısındaki granüllerin içeriği	20
2.15. Işık geçirgenlik agregometresi ile trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesi	21
2.16. ADP, epinefrin, kollajen ve ristosetin agonistleri ile elde edilen agregasyon grafikleri.....	22
2.17. Koagülasyon kaskadı	25
3.1. Chrono-Log (Diagnostica Stago)	27
3.2. BCS-XP (Siemens).....	27
3.3. LH 780 (Beckman Coulter).....	27
3.4. Işık geçirgenlik agregometrisi prensibi	28
3.5. Sekonder hemostazın değerlendirilmesine yönelik koagülasyon testleri.....	31
3.6. Düşük doz ADP (2 μ M) ile izlenen ve yüksek doz ADP (6 μ M) ile izlenen normal agregasyon	36
3.7. Düşük doz ADP (2 μ M) ile izlenen, yüksek doz ADP (6 μ M) ile izlenen anormal agregasyon.....	36

3.8.	Epinefrin ve kollajen ile indüklenen normal agregasyon.....	37
3.9.	Epinefrin ve kollajen ile indüklenen anormal agregasyon.....	38
3.10.	Düşük doz ristosetin ile izlenen normal agregasyon ve yüksek doz ristosetin ile izlenen anormal agregasyon.....	39
3.11.	Yüksek doz ristosetin ile izlenen normal agregasyon ve düşük doz ristosetin ile izlenen anormal agregasyon	39
4.1.	KML hastalarının yaş dağılımla	43
4.2.	KML hastalarının cinsiyete göre yaş dağılımları	44
4.3.	Kanama anketi uygulanan 68 KML hastasının kanama skorları	46
4.4.	TKİ kullanan KML hastalarında görülen sekresyon tipi trombosit fonksiyon bozukluğu	49
4.5.	İmatinib, Dasatinib ve Nilotinib kullanan hastalarda ADP, epinefrin, kollajen ve ristosetin ile indüklenen trombosit agregasyon yüzdeleri.....	50
5.1.	Tirozin kinaz inhibitörleri.....	53

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. ADP, epinefrin, kollajen ve ristosetin ile elde edilen agregasyon sonuçları	22
2.2. Pıhtılaşma Faktörleri	23
3.1. Hemoglobin, hematokrit, MCV, lökosit, trombosit, MPV ve RDW için referans aralıkları.....	31
3.2. PT, aPTT, INR, TT, Fibrinojen ve Faktör VIII testleri için referans aralıklar	33
3.3. Kanama Skorlaması	40
4.1. Oda ısısında bekletilen plazma örneklerinde 0, 2, 4 ve 8. saatlerde trombosit fonksiyonları arasındaki farkın p değeri üzerinden değerlendirilmesi.....	41
4.2. Trombosit fonksiyon testlerinde 2, 4 ve 8'inci saatlerde elde edilen yanlış negatif sonuçlar (n=20)	42
4.3. Çalışmaya katılan hastaların tam kan analiz sonuçları.....	45
4.4. Çalışmaya katılan hastaların koagülasyon testlerinin sonuçları.....	45
4.5. TKİ kullanımına göre kanama skorlarının değerlendirilmesi	47
4.6. TKİ kullanan KML hastalarında farklı agonistler ile saptanan trombosit fonksiyon bozuklukları.....	48
4.7. İmatinib kullanan KML hastalarının trombosit fonksiyonları ile kanama durumlarının karşılaştırılması	51
4.8. Dasatinib kullanan KML hastalarının trombosit fonksiyonları ile kanama durumlarının karşılaştırılması	52
4.9. Nilotinib kullanan KML hastalarının trombosit fonksiyonları ile kanama durumlarının karşılaştırılması	52

1. GİRİŞ

Kronik myeloid lösemi (KML) hastalığı, klonal myeloproliferatif bir hastalıktır. Erişkin lösemilerinin %15'ini oluşturur. İnsidansı 1-2/100.000'dir. Erkeklerde daha sık görülür ve 40-60 yaş arasında görülme sıklığı artar.

KML'de 22. Kromozomun 11q bandındaki BCR geni ile 9. kromozom q34 bandına lokalize ABL geninin füzyonu sonucu *BCR-ABL1* füzyon geni oluşur. BCR-ABL1'in transkripsiyon ürünü olan tirozin kinaz, KML hastalığının temel sebebidir (1). Tirozin kinaz, protein fosforilasyonunda ve sinyal iletiminde önemli bir role sahip bir enzimdir. Tirozin kinaz sentezinin artması; hücre proliferasyonunu artırmakta ve apoptozise direnç neden olmaktadır.

KML hastalarında görülen klinik semptomlar; anemi, splenomegali, ateş, gece terlemesi, trombosit disfonksiyonu, hiperlökositoz ve hiperviskositedir. KML tanısı anamnez, fizik muayene, tam kan sayımı, periferik yayma, koagülasyon testleri, kemik iliği aspirasyon biyopsisi ve sitogenetik inceleme ile konur.

KML tedavisinde kullanılan Tirozin Kinaz İnhibitörleri (TKİ) füzyon proteininin ATP'ye bağlanma bölgesini bloke ederek fosforilasyonu inhibe etmekte ve hücre ölümünü tetiklemektedir (1). KML tedavisinde ilk olarak birinci nesil TKİ olan imatinib kullanılmaktadır. İmatinibe direnç gösteren hastalarda kullanılmak üzere ikinci nesil TKİ'ler olarak dasatinib, nilotinib ve bosutinib geliştirilmiştir.

KML hastalarında, TKİ ilaçlarının trombosit fonksiyon bozukluklarına neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (2,3). Ancak bahsedilen bu çalışmalarda, hastaların klinik kanama semptomları hakkında yeterli bilgi verilmemektir (3).

Bu çalışmanın amacı; KML hastalarında kanama diyatezini, laboratuvar bulguları ve klinik bulgular ile birlikte incelemek ve aralarında anlamlı bir korelasyon olup olmadığını araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Myeloid Lösemi

Lösemi, kemik iliği kaynaklı bir kanser hastalığıdır. Kanser hücrelerinin etkilediği hücre tipine göre akut ve kronik olmak üzere iki gruba ayrılır. Akut lösemiler; *blast* adı verilen olgunlaşmamış hücrelerin aşırı çoğalması ve kemik iliğini kaplayarak eritrositler, granülositler ve trombositler gibi olgun myeloid hücrelerin zamanla azalması ile karakterizedir. Akut lösemiler hızlı bir seyir gösterir ve tedavi edilmediği takdirde hastayı ölüme götürür. Kronik lösemide, hücrelerdeki farklılaşma yetersiz ve düzensizdir, hastalığın seyri daha yavaştır. Lösemilerin lenfoid progenitörlerin tutulumuyla karakterize *lenfositik*, myeloid progenitörlerin tutulumuyla karakterize olan *myeloid* tipleri vardır. Çoğalan hücrenin kökenine göre akut lösemiler; akut lenfositik lösemi (ALL), akut myeloid lösemi (AML), kronik lösemiler ise kronik lenfositik lösemi (KLL) ve kronik myeloid lösemi (KML) olarak sınıflandırılırlar. Genel olarak, akut lösemiler çocuklarda ortaya çıkarken, kronik lösemiler daha çok yetişkinlerde görülme eğilimindedirler

KML, olgunlaşmamış myeloid, megakaryosit ve eritrosit hücrelerin aşırı çoğalmasıyla karakterize myeloproliferatif hastalıktır. İlk kez 1845'te araştırmacılar Craigie, Bennett, ve Virchow tarafından tanımlanmıştır. KML, tüm lösemilerin %15 kadarını oluşturur ve yıllık insidansı 100.000/1 olarak izlenmektedir. Erkeklerde daha sık rastlanır. Hastalığın yaşı ortalama 45-55 arasındadır ve bu insidans yaşla birlikte artış gösterir, hastaların %30'u 60 yaş üstündedir (4).

KML, üç fazlı bir hastalıktır; klinikopatolojik seyri kronik faz, akselere faz ve blastik faz olarak adlandırılır. Kronik fazda çoğu hasta asemptomatiktir, laboratuvar analizlerinde lökositoz saptanır, blast sayısı %15'in altındadır, bazofil sayısı %20'nin altındadır, trombosit sayısı normal veya artmıştır. Akselere fazla lökositoz izlenir, blast sayısı %15-20 arasındadır, bazofil sayısı %20'nin üzerindedir, trombosit sayısı artmış/azalmış olabilir. Blast fazında ise lökositozla eşlik eden blast artışı (>%20) görülür. Platelet ve bazofil sayısı çok azalmıştır.

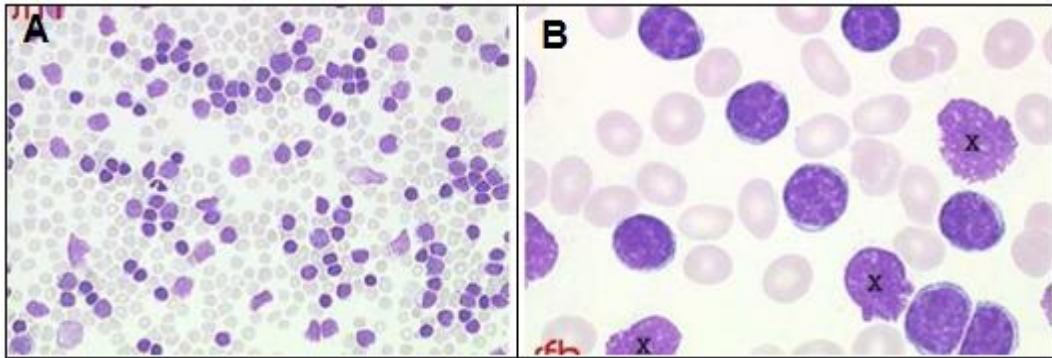
2.1.1. Klinik Bulgular

KML klinik bulguları değişkenlik gösterir. Tanı sırasında vakaların %30'u asemptomatik olabilir. KML hastalarının %10'u akselere fazda, %10'u da blastik fazda teşhis edilmektedir. Blastik fazda kilo kaybı, terleme ve kemik ağrısı görülebilir.

Semptomlar görülme sıklığına göre; yorgunluk, kanama, kilo kaybı, splenomegaliye bağlı karında şişkinlik, terleme, kemikte ağrı, enfeksiyon, baş ağrısı solunum güçlüğü, görüşte bozukluk, kuvvetsizlik, eklem ağrısı, öksürme, kırgınlık, baş dönmesi, mide bulantısı, ayak bileğinde ödem, serebrovasküler olaylar şeklindedir (5).

2.1.2. Laboratuvar Bulguları

KML hastalarının laboratuvar incelemelerinde lökosit değerleri yükselmiştir. Periferik yaymada myeloid serinin tüm hücreleri görülür; özellikle myelosit, metamyelosit, çomak ve parçalı artmıştır. Periferik yaymada trombositlerde şekil bozuklukları, periferde megakaryosit fragmanları görülebilir. Trombosit sayısı normal iken trombosit fonksiyon bozukluğu görülebilir. Hastaların çoğunda normositer normokrom anemi vardır. Bazofil sayısı belirgin şekilde artmıştır ve prognostik öneme sahiptir.



Şekil 2.1. KML'nin periferik yayma bulguları; anemi, büyük granülositler, granülositik immatürite, bazofili, trombositoz (A.1/10 büyütme, B.1/40 büyütme).

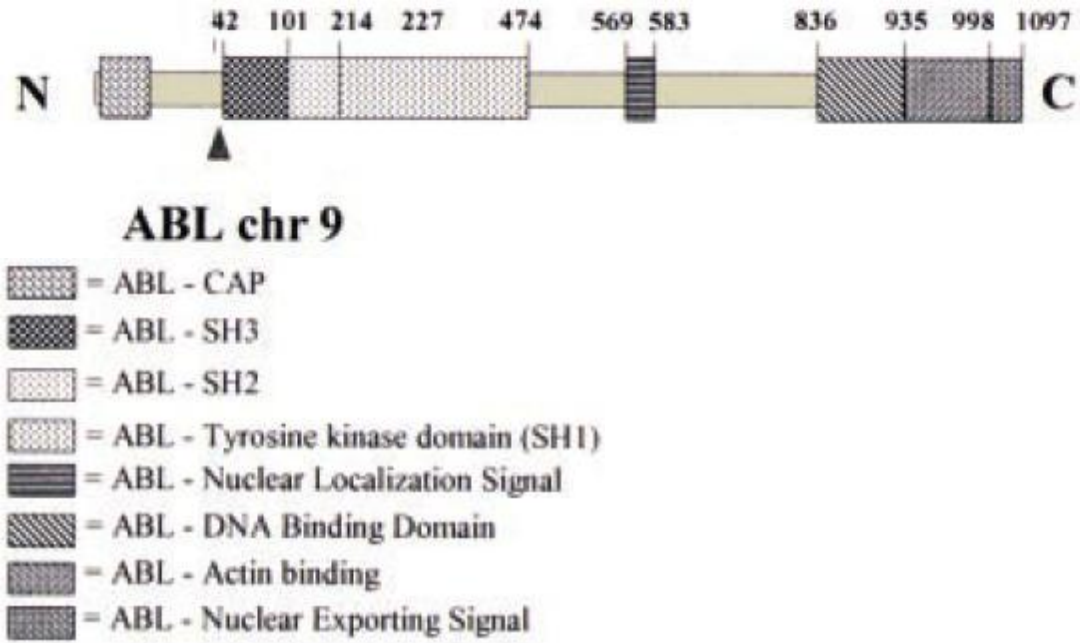
2.1.3. Sitogenetik analiz

Ph kromozomu, kanser ile ilişkisi bulunan ilk kromozom anomalisidir. Nowell ve Hungerford, ilik hücrelerinde, 22. Kromozomun kolunun bir parçası koparak kaybolduğu tanımlamış ve bu kısalmış kromozoma, keşfin yapıldığı şehir olan Philadelphia (Ph) kromozomu adı verilmiştir. Sitogenetikte uygulanan tekniklerin gelişmesiyle Rowley, 22. Kromozomun kopan bu parçasının aslında kaybolmadığını, translokasyon ile 9. kromozomun ucuna bağlandığını göstermiştir (6). Bunun sonucunda, 9. kromozom da bulunan ABL geni ile BCR geninin füzyonu ile BCR-ABL onkogeni oluşur.

Konfokal mikroskopi ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) teknikleri ile farklı hücre hatlarında yapılan araştırmalar; ABL ve BCR genlerinin arasındaki mesafenin, hücre döngüsündeki geç-S ve G2 safhalarında azaldığı ölçülmüştür. ABL ve BCR genlerinin birleşmelerinin en kritik anın hücre döngüsündeki bu periyod olduğu düşünülmektedir (7). Çalışmalarda, 22. kromozom üzerindeki BCR genine ve kromozom 9. üzerinde ABL genine çok yakın yerleşimli duplike olmuş genomik segmentler gösterilmiştir. Bu segmentlerin her iki kromozom arasındaki homolog rekombinasyonu kolaylaştırdığı düşünülmektedir (8).

2.1.4. ABL gen ve proteinlerinin yapısı

ABL geni, 230 kb uzunluğunda bir gen olup 11 ekzon içerir. 9q34'de lokalize olan ABL geni 145 kD'luk bir reseptör olmayan tirozin kinazı kodlar. ABL proteini, tirozin kinaz ailesine aittir. Çekirdekte ve sitoplazmada bulunabilir (9). ABL'nin N-terminaline doğru üç adet SH2 bölgesi içerir. Bu bölgeler ABL'in tirozin kinaz fonksiyonunu düzenler. SH1 bölgesi ABL'nin kinaz bölgesidir. SH2 ve SH3 bölgeleri ise katalitik aktiviteye sahip değildir ve tirozin kinaz aktivitesini düzenleyen diğer proteinler için bağlanma bölgesi oluşturur. ABL'nin C-terminal bölgesinde aktin filamentlerine bağlanmayı sağlayan bölgeler, DNA'ya bağlanmayı sağlayan bölgeler, 3 adet Nükleer Lokalizasyon Sinyali (NLS) bölgesi, 1 adet Nükleer Eksport Sinyali (NES) bölgesi bulunur (9,10) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. ABL proteininin yapısı gösterilmektedir. Ok işareti ile gösterilen bölge gen bölgesindeki kırılma noktasını ifade etmektedir (9)

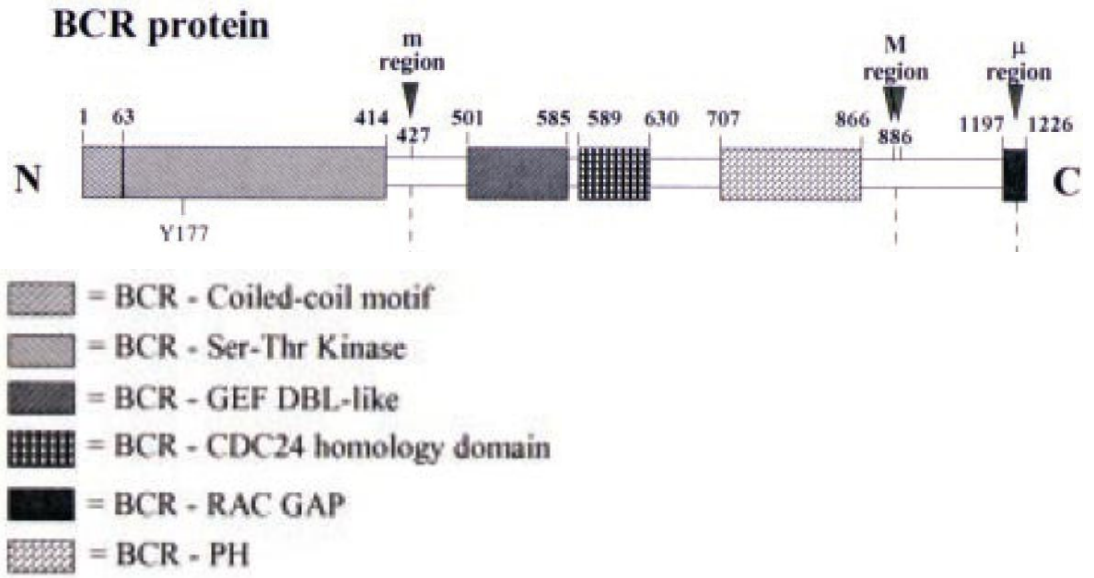
ABL'nin tirozin kinaz aktivitesi fizyolojik koşullar altında sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. SH3 bölgesi bu inhibisyon işleminde kritik rol oynar; SH3 bölgesinin delesyonu ve yer değişimi ile protein kinaz işlevi aktive olmaktadır (9).

ABL'nin çok sayıda fonksiyonu vardır. Nükleer ABL; genotoksik strese karşı p53 veya p73'ü kontrol ederek apoptozisi indükler. Hücre siklusunun G1 fazında tutulmasını sağlayarak büyümenin negatif düzenleyicisi olarak rol alır. Sitoplazmik ABL ise integrinler aracılığı ile sinyal iletiminde rol alır (10,11).

Transgenik farelerle yapılan çalışmalarda, homozigot ABL gen delesyonu taşıyan farelerin normal gelişimini tamamlayamadığı ve gelişim geriliği, lenfoid organ hiperplazisi ve adrenal yetersizlikten dolayı prenatal dönemde öldüğü gösterilmiştir (10,11).

2.1.5. BCR gen ve proteinin yapısı

BCR proteini birden fazla fonksiyonel bölge içerir ancak bu proteinin fizyolojik rolü hala tanımlanmamıştır (Şekil 2.3) (9).

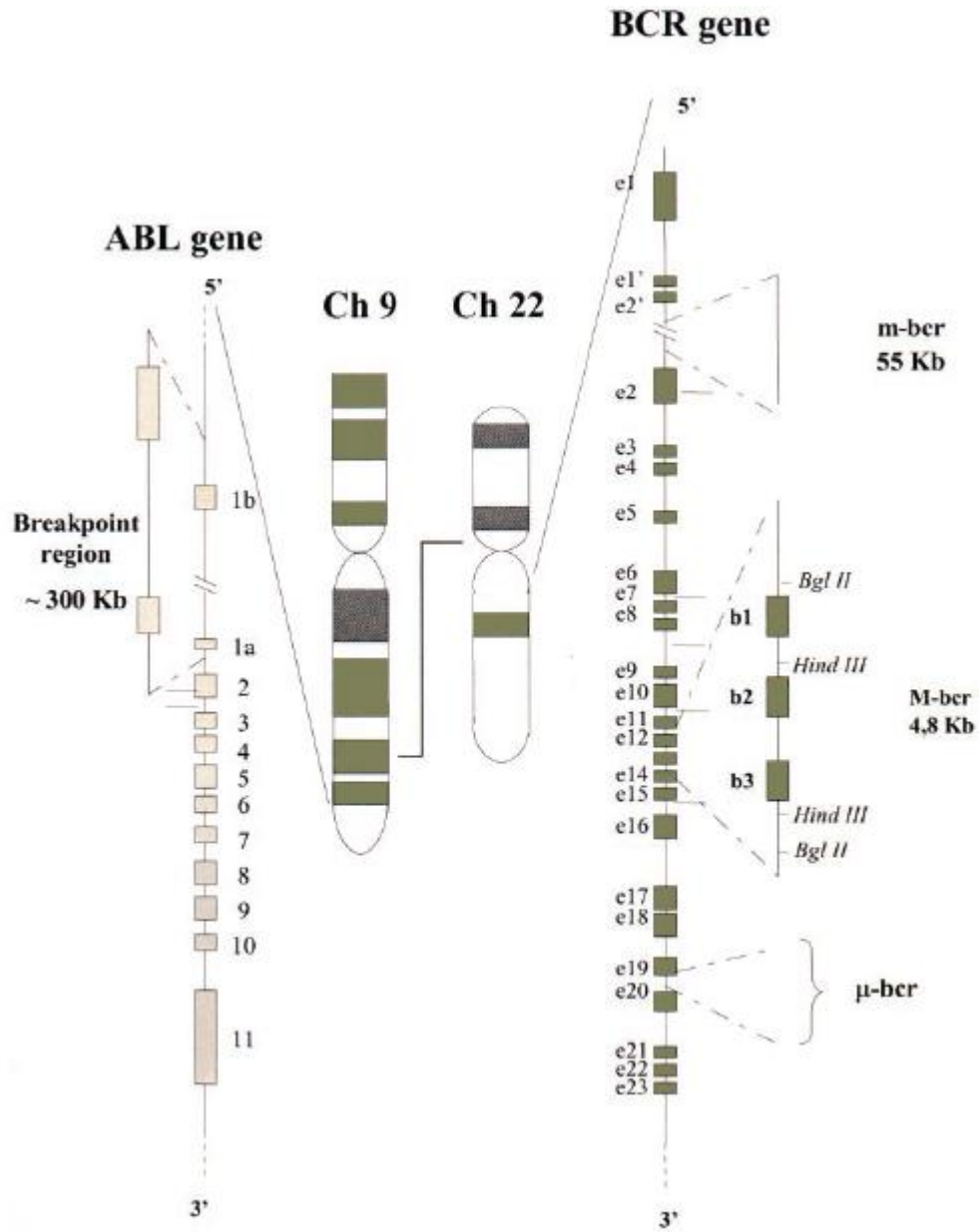


Şekil 2.3. BCR proteininin yapısı. (Ok işaretiyle gösterilen bölgeler, BCR genindeki kırılma bölgelerini göstermektedir) (9).

BCR proteininin sinyal transdüksüyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Molekülün karboksil ucu, GTPaz aktivitesi içerir. Genin kodladığı ilk büyük ekzon; oligomerizasyon bölgesi içerir ki bu “*coiled-coil*” dimerizasyonunda yer alır, bir tane serin/treonin kinaz bölgesi ve bir de SH2 bağlanma bölgesi içerir. BCR proteinin merkezinde guanidin trifosfat (GTF) ile guanidin difosfat arasındaki değişimi stimüle eden guanin nükleotid değişim faktörü (GEF) ile homoloji gösteren Rho-GEF bölgesi içerir (9).

2.1.6. BCR-ABL füzyon geni

BCR-ABL füzyon geni, 22’nci kromozomdaki BCR’nin 5’ ucunun 9’uncu kromozomdaki ABL geninin 3’ ucuyla füzyonu ile gerçekleşir. Temel olarak bulunan 3 farklı BCR-ABL geninin varyantları, BCR geninin kırılma bölgelerine göre değişiklik göstermektedir. Bu varyantların kodladığı proteinler, kırılma bölgelerine göre P190^{BCR/ABL}, P210^{BCR/ABL}, P230^{BCR/ABL} olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.4) (9).



Şekil 2.4. BCR/ABL genlerinin kırılma bölgeleri (9)

2.1.7. ABL'deki kırılma noktaları

ABL geni üzerindeki kırılma, genin üzerinde 300 Kb'dan uzun olan 5' segmentinin herhangi bir yerinde meydana gelebilmektedir. Füzyon geninin yapısı ne olursa olsun BCR-ABL mRNA'sı 1. ekzonu içermez ve BCR ekzonlarını içeren transkript direkt ABL ekzon a2'ye bağlanır (9).

2.1.8. BCR'deki kırılma noktaları

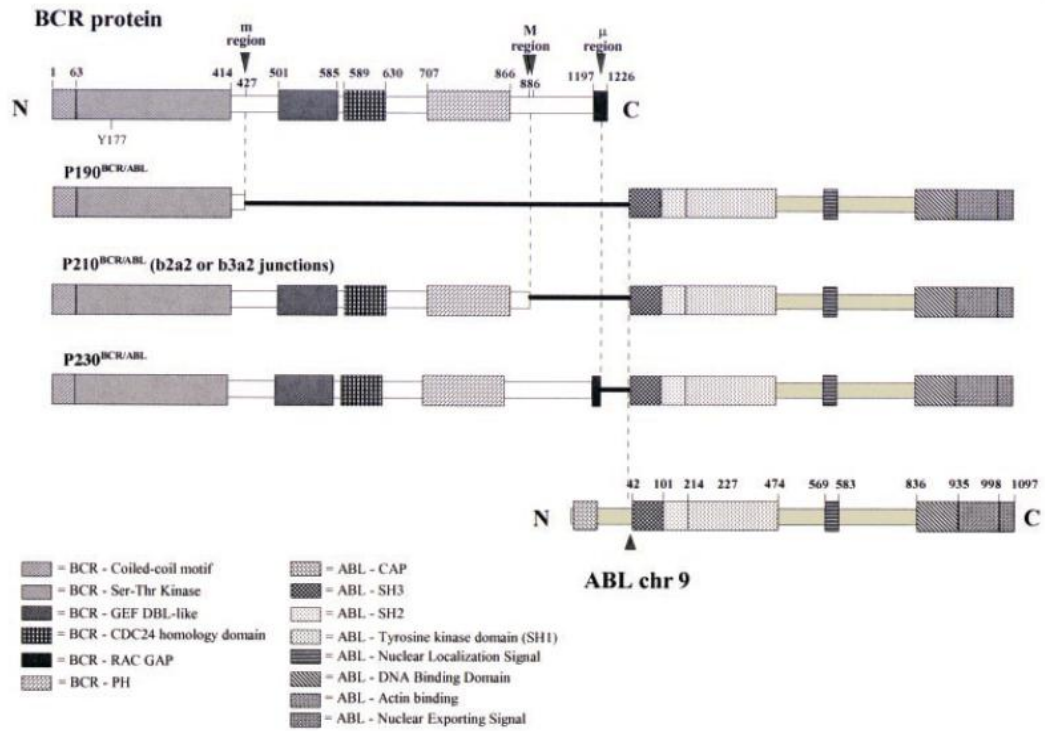
BCR geni için tanımlanmış başlıca üç kırılma bölgesi yer almaktadır. KML hastalarının %95'inde BCR geni "*Major breakpoint cluster region*" (M-BCR) adı verilen 5.8 kb'lık bölgenin içinde kısaltmaya uğrar. Bu genin transkripsiyonu P210^{BCR/ABL} proteininin oluşumunu sağlar (9).

Ph pozitif nadir KML ve AML vakalarında BCR'deki kırılma M-BCR'ın 5' bölgelerinde yer alan "*minor breakpoint cluster region*" (m-BCR) olarak adlandırılan bölgede oluşur. Bu bölge BCR geninin alternatif 2.ekzonları olan e2' ve e2 arasında yer alan 54.4 kb'lık bir introndur Bu genin transkripsiyonu P190^{BCR/ABL} proteininin oluşumunu sağlar (9).

BCR geni üzerinde tanımlanmış üçüncü kırılma bölgesi ise "*Micro Breakpoint Cluster Region*" (μ -bcr) olarak adlandırılmıştır. Bu durumda kırıklar, BCR geninin 3' ucuna yakın olan e19(c3) ve e20(c4) ekzonları arasında gerçekleşir. Hibrid geninin transkripsiyonu, 230 kD'luk bir protein olan P230^{BCR/ABL}'yi kodlayan e19a2 füzyon transkriptinin oluşumunu sağlar (9).

2.1.9. BCR-ABL füzyon proteinin yapısı

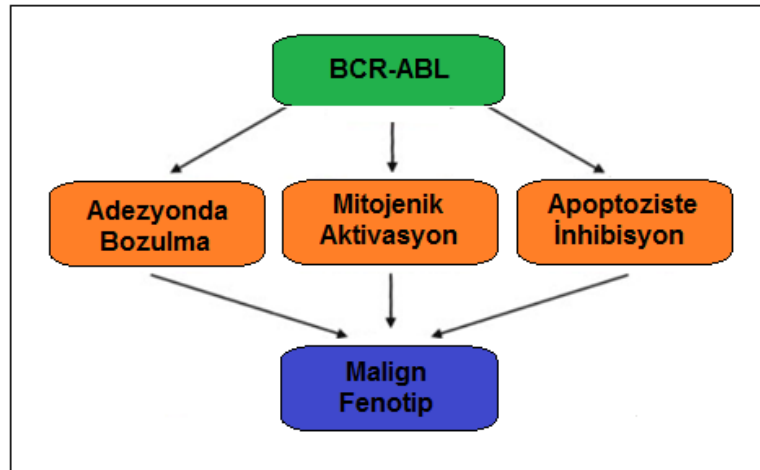
BCR-ABL proteinleri, BCR geninin farklı kırılma bölgeleriyle elde edilen genler ile ABL geninin füzyonu ile kodlanırlar. Füzyon geninde yer alan ABL içeriği değişmediğinden hastalık fenotipindeki değişkenlik BCR geni tarafından kodlanan protein dizilerinden kaynaklanmaktadır. Çalışmalar, her BCR-ABL varyantının tirozin kinaz aktivitesinin farklı olduğu göstermiştir P190^{BCR/ABL}'nin tirozin kinaz aktivitesi en fazla olmakla birlikte ardından sırasıyla P210^{BCR/ABL} ve P230^{BCR/ABL} gelmektedir (Şekil 2.5) (9).



Şekil 2.5. BCR/ABL'nin farklı kırılma bölgeleriyle oluşan varyantları

2.1.10. BCR-ABL patogenezi ile ilgili mekanizmalar

BCR-ABL'yle oluşan malign transformasyonda üç önemli mekanizma etkilenebilir (Şekil 2.6.).



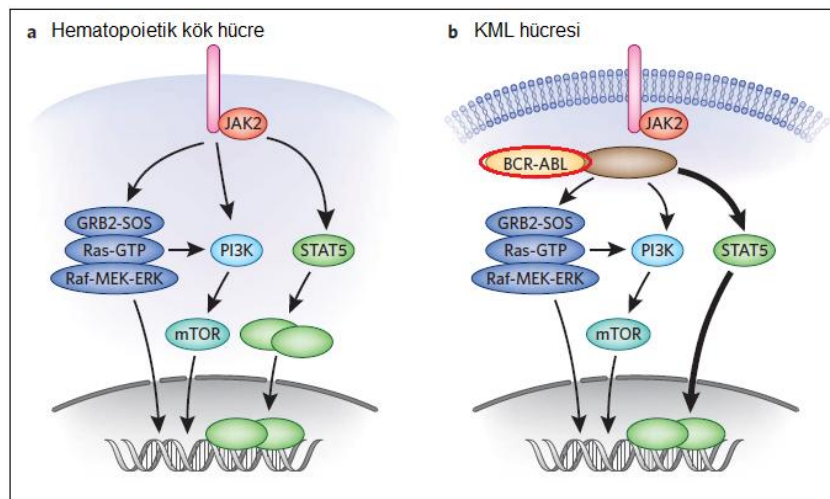
Şekil 2.6. Adezyonun bozulması, mitojenik aktivasyon ve apoptozisin inhibisyonu

Hücresel Adezyonun Bozulması

Adhezyon molekülleri; hücrelerin birbirlerini tanımalarında, hücrelerin dokulara yöneliminde bununla birlikte hücre büyümesinin, inflamasyonun ve embriyogenezin düzenlenmesinde görev alırlar. Normal hematopoezde öncül hücreler kemik iliği stroma hücrelerine ve ilgili ekstraselüler matrikse tutunur. Matriks, fibronektin gibi stromal hücrelerce sentezlenen ve öncül hücrelerin yüzeylerinde eksprese olan reseptörler için adeziv ligand fonksiyonu gören proteinlerden oluşur. Öncül hücrelerin, sitokin salgılayan hücrelerin yakınında bulunabilmesi için adezyon şarttır. Böylece hematopoetik öncüller, sitokinler ile iletilen lokal sinyalleri almak üzere bir arada tutulurlar. Aldıkları ya da alamadıkları sitokin mesajlarına göre hayatta kalır ya da apoptoza uğrarlar. KML Ph pozitif öncül hücrelerinin kemik iliği stroma hücrelerine ve ekstraselüler matrikse adezyonları azalır. Böylece bu öncül hücreler, normal adeziv progenitörlere sağlanan sinyallerden yoksun kalırlar (10).

Mitojenik Sinyal Yolaklarının Aktivasyonu

BCR-ABL mitojenik potansiyele sahip birçok sinyal yolağını aktive etmektedir (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. BCR-ABL ile aktif olan sinyal yolakları (12)

Ras ve MAP kinaz yolakları: Ras ve Raf protoonkogendir. BCR-ABL, Ras sinyal yolağını aktive eden proteinlere direkt bağlanabilir. Tirozin177 rezidüsünün otofosforilasyonu, adaptör proteini Grb-2 için bağlanma bölgesi oluşturur. Grb-2 ise SOS proteinine bağlanır. SOS proteinin inaktif GDP bağlı Ras'ı aktif GTP bağlı Ras haline getirir. İstirahat halindeki hücrelerde Ras proteinleri inaktif (Ras-GDP) halde bulunurlar. Aktive olan Ras proteinini Raf-1'e yüksek afinite ile bağlanır. Aktifleşen Raf-1 MAP kinaz sinyal kaskadını aktifleştirir (10).

Jak-Stat yolağı: Normal hücrelerde, JAK'ların (Janus kinaz) aktivasyonu ile STAT'lar (Signal transducer and activator of transcription) aktif hale gelir. Ancak BCR-ABL pozitif hücrelerde JAK'lara ihtiyaç duymadan direkt olarak fosforile ederek transformasyona yol açar. Günümüzde yedi STAT proteini tanımlanmıştır. STAT3 ve STAT5 aktivitelerinin kontrolsüz işleyişi malign transformasyonda rol oynamaktadır. Devamlı aktif olan STAT proteini antiapoptotik yolları uyararak malign süreçte etkili olabilmektedir (10).

PI-3 Kinaz yolağı: PI-3K (Fosfoinozid-3 kinaz) ailesi, büyüme ve yaşama sinyallerinin iletiminden sorumlu proteinlerdir (10). BCR-ABL pozitif hücre hatlarının ve primer hücrelerin proliferasyonu PI-3 kinaz aktivitesine bağlıdır. BCR-ABL, PI-3 kinazı Crk, Crkl, p120 aracılığıyla aktive eder. Aktive PI-3 kinaz, bir serin/treonin kinaz olan efektör Akt'yi aktive eder. Akt aktivasyonu pro-mitojeniktir. Hücre siklusunun inhibitörü olan P27'yi azaltarak düzenler (10).

Myc yolağı: Myc onkoproteininin aşırı ekspresyonu birçok insan malignitesinde gösterilmiştir. Transkripsiyon faktörü olarak davranmasının yanı sıra hedeflediği genler bilinmemektedir. Hücresel düzeyde incelenecek olursa Myc'nin proliferatif ve apoptotik sinyal oluşturabilir. Bu iki sinyal fonksiyonunda apoptotik sinyal oluşturan kısım KML hücrelerinde PI3 kinaz yolağı gibi farklı mekanizmalarla engellenebilir. Myc'nin aktivasyonu, BCR-ABL proteininin SH2 bölgesiyle ilişkilidir ancak bu ilişkiye neden olacak yolak henüz bilinmemektedir. Myc'in aktivasyonu ile BCR-ABL'nin hücresel transformasyona yol açtığı sıçan fibroblastlarında gösterilmiştir (10).

Apoptozisin İnhibisyonu

Apoptozis, olarak planlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmıştır ve belirli bir hücre klonunun genişlemesini sınırlar. Fare ve insan hücre hatlarına eksojen olarak BCR-ABL transfeksiyonu, büyüme faktörü geri çekilmesiyle indüklenen apoptozisi inhibe etmiştir. Ayrıca genotoksik ajanlara karşı apoptoza karşı da artmış direnç gözlenmiştir (10).

BCR-ABL'nin hücre hatlarında apoptozu nasıl inhibe ettiği iyi anlaşılamamıştır. Bcl-2 protein ailesinin üyeleri BCR-ABL aracılı anti-apoptoza yardımcı olabilirler. BCR-ABL, Ras ve PI-3K aracılığıyla Bcl-2 ailesi üyelerinin regülasyonunu arttırabilmektedirler. Bcl-2, Raf-1'in mitokondriye hedeflenmesinde ve böylece pro-apoptotik protein BAD'ın (*Bcl-2 associated death promoter*) inaktivasyonunda rol oynar (10).

2.1.11. KML'de uygulanan tedavi yöntemleri

KML'ye yönelik ilk tedavi, 19. yüzyılda arsenik içeren bileşiklerle yapılmıştır. 1960'larda alkileyici ajanlara geçilmiş ve busulfan verilen hastalarda hayatta kalımın arttığı gösterilmiştir. Daha sonraki yıllarda busulfanın, blast krizini tetikleyebildiği gibi her zaman kan sayımını da düzene sokamadığı görülmüştür. Günümüzde busulfan ciddi yan etkileri nedeniyle kullanılmamaktadır (1).

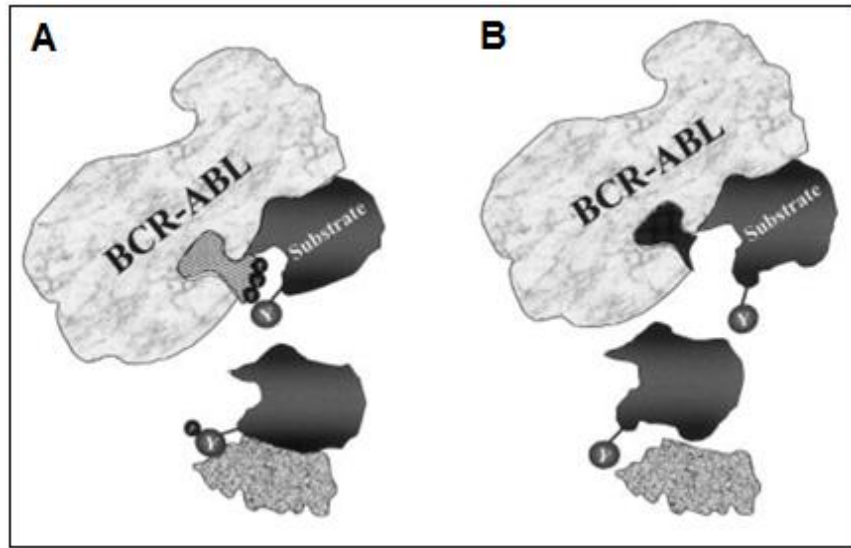
Daha sonraki yıllarda ribonükleotid redüktaz inhibitörü olan hidroksikarbamid kullanıma girmiştir. Hidroksikarbamid, lökosit sayısını hızla düşürür, ciddi bir yan etkisi yoktur, iyi tolere edilir. Hidroksikarbamid ve Busulfan tedavisi ile kan sayımında düzelme ve semptomatik olarak rahatlama sağlanmıştır ancak hastalığın ilerleyişini geciktirmemektedir (1).

1970'lerde kullanılmaya başlanan allojenik kök hücre transplantasyonunu ve interferon α , sadece Ph kromozomunda negatiflik sağlamamış aynı zamanda hayatta kalımı da arttırmıştır (1). Allojenik kök hücre transplantasyonu KML için bilinen tek tedavi edici yöntemdir. Ancak

çoğu hasta ilerlemiş yaş veya uygun kök hücre vericisinin olmamasından dolayı bu tedaviden faydalanamaz (6).

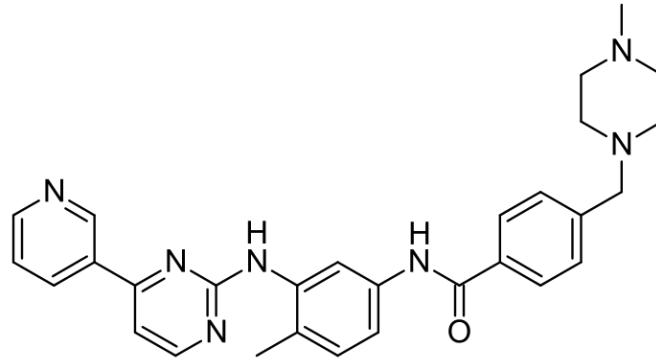
KML'nin oluşumu için BCR-ABL füzyon geninin gerekli olmasının ve ABL'nin tirozin kinaz aktivitesinin BCR-ABL'nin transformasyonu için gerekli olduğunun keşfedilmesi ABL kinazı dikkat çekici bir tedavi hedef haline getirmiştir (6).

Tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ), BCR-ABL molekülünde ATP'nin bağlandığı cebe bağlanarak substratın ATP tarafından sağlanan fosfat gruplarıyla fosforilasyonunu inhibe eder. Fosforillenmemiş substratlar, efektör moleküllere bağlanmak için gerekli konformasyon değişikliğini gösteremezler. Bu durum BCR-ABL proteininin inaktif konformasyonda kalmasına neden olur, sinyal iletim yollarını bloke ederek büyüme duraklamasına ya da apoptozise neden olur (6) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Tirozin kinaz inhibitörünün etki mekanizması. A: ATP, BCR-ABL'ye bağlanmıştır ve substratı fosforlamaktadır. B: ATP'yi taklit eden sentetik bir molekül, BCR-ABL'nin katalitik merkezine bağlanarak ATP'nin bağlanmasını engellemektedir (10).

Spesifik BCR-ABL tirozin kinaz inhibitörü olan **İmatinib Mesilat** (**Glivec, Novartis Pharmaceuticals**) 2003 yılında FDA (*Food and drug administration*) tarafından onaylanmıştır (Şekil 2.9). İmatinib, 400 mg/gün dozunda iyi tolere edilmektedir ve özellikle kronik fazda hastaların %90'ında hematolojik ve %60'ında sitogenetik remisyon sağlayabilmektedir. Akselere evrede %65, blastik evrede ise %20-30 oranında yanıt sağlamaktadır. En önemli yan etkileri göz çevresi ile bacaklarda oluşan ödem, bulantı ve bacak ağrılarıdır.



Şekil 2.9. İmatinib, STI-571 (Gleevec) kimyasal yapısı

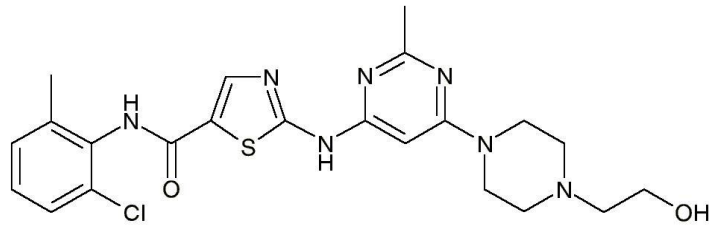
İmanitib, 2-fenil-aminopirimidin türevidir ve BCR-ABL'yi eksprese eden hücreler için seçici toksik etki gösterir. İmanitib kullanımı ile karşılaşılan en önemli sorun hastalarda belli bir süre sonra tedaviye direncin gelişmesidir. Dirence yol açan mekanizmalar, BCR-ABL amplifikasyonu, BCR-ABL'in kinaz bölgesinde meydana gelen nokta mutasyonları, yeni sitogenetik anormallikler, P-glikoproteininin aşırı ekspresyonudur. İmanitib direnci ile ilgili olarak T315I threoninin izolösine, M351T'de metioninin threonine, E255K'da glutamik asitinin lizine dönüşmesini sağlayan mutasyonlar örnek olarak verilebilir (6).

KML tedavisinde imatinib, birinci nesil ilaç olarak kullanılmaktadır. Hastanın imatinibe direnç geliştirdiği veya tedavinin başarısız olduğu durumlarda dasatinib, nilotinib ve bosutinib gibi ikinci nesil ilaçlar kullanılmaktadır (Şekil 2.10, Şekil 2.11). Bu ilaçların hangisinin seçileceği mevcut mutasyona ve ilaç toksisitesine göre belirlenir. Örneğin; imatinibe

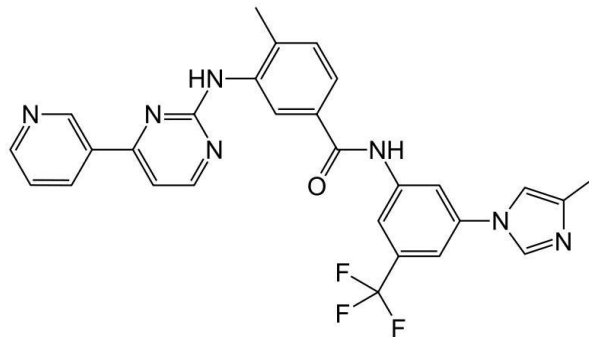
dirençli olan ve F317L/V/I/C ya da G252H mutasyonu olan hasta, ikinci nesil ilaçlardan dasatinibe diğer ilaçlara göre daha az hassastır (1).

Dasatinib (Sprycel, Bristol-Myers Squibb) ikinci jenerasyon TKİ olarak 2006'da FDA tarafından onaylanmıştır. KML hastalarında Dasatinib için önerilen günlük doz 100 mg olarak belirlenmiştir. Dasatinib tedavisi sırasında pulmoner ödem, plörezi, göğüs ağrısı, aritmi, myelosüresyon, diare gözlenebilir (1).

Nilotinib (Tasigna, Novartis Pharmaceuticals) ikinci jenerasyon TKİ olarak 2007'de FDA tarafından onaylanmıştır. Önerilen günlük toplam doz 800 mg'dır (400mg/12 sa). İmatibine benzer yan etkileri gözlenmekle birlikte Nilotinib tedavisi sırasında hiperglisemi, pankreatit, aritmi oluşabilir (1).



Şekil 2.10. Dasatinib, BMS-354825 (Sprycel) kimyasal yapısı



Şekil 2.11. Nilotinib, AMN-107 (Tasigna) kimyasal yapısı

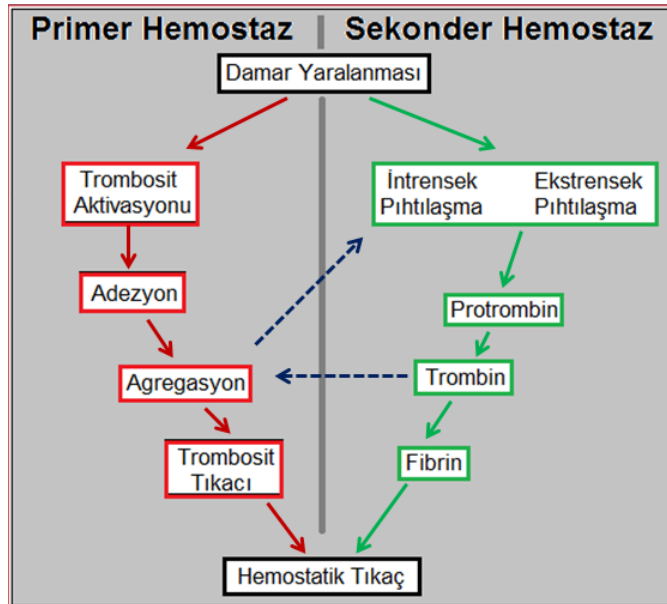
2.2. Hemostaz

Damarın hasar görmesi sonucu damar bütünlüğünün bozulması ile başlayan ve pıhtılaşma sisteminin aktive olmasıyla devam eden sürece **hemostaz** denir. Damar endotel hücreleri, doku faktörü, trombositler, von Willebrand faktör, pıhtılaşma proteinleri, fibrinolitik sistem ve antikoagülan proteinler hemostatik sistemin elemanlarıdır. Hemostaz 3 evrede incelenir:

Primer hemostaz, damar hasar gördüğünde kanamaya karşı verilen ilk yanıttır. Sinir sistemi uyarıları ile hasarlı bölgede vazokonstriksiyon ile kanın akışı yavaşlatılır. Daha sonra trombosit adezyonu, aktivasyonu ve agregasyonu ile hasarlı bölgede gevşek bir tıkaç oluşturulur ve kanama durdurulur (Şekil 2.12).

Sekonder hemostaz, koagülasyon sisteminin aktivasyonu ve fibrin oluşumu evrelerinden oluşur. Gevşek yapılı olan tıkaç koagülasyon faktörlerinin devreye girmesiyle, mekanik olarak çapraz fibrin ağlarıyla güçlü ve sıkı bir hale getirilir (Şekil 2.12).

Fibrinolizis, Pıhtılaşma evresinin son kısmıdır. Oluşan fibrin tıkaçının plazmin enzimi ile çözülmesi evresidir (13,14).



Şekil 2.12. Primer hemostaz ve sekonder hemostazın aşamaları

2.2.1. Primer Hemostaz

Primer hemostazda görev alan trombositler kemik iliğindeki megakaryositlerden sentezlenen, çekirdeksiz, yaklaşık 8-10 günlük yaşam süresine sahip ve sirkülasyonda aktif olmayan diskoid şekilli hücrelerdir. Trombositler; açık kanaliküler ve yoğun tübüler sisteme sahip internal membranlar, mikrotübül ve mikroflamentler, mitokondri, glikojen granülleri, alfa ve dense granüller, lizozom ve peroksizoma sahiptirler (16).

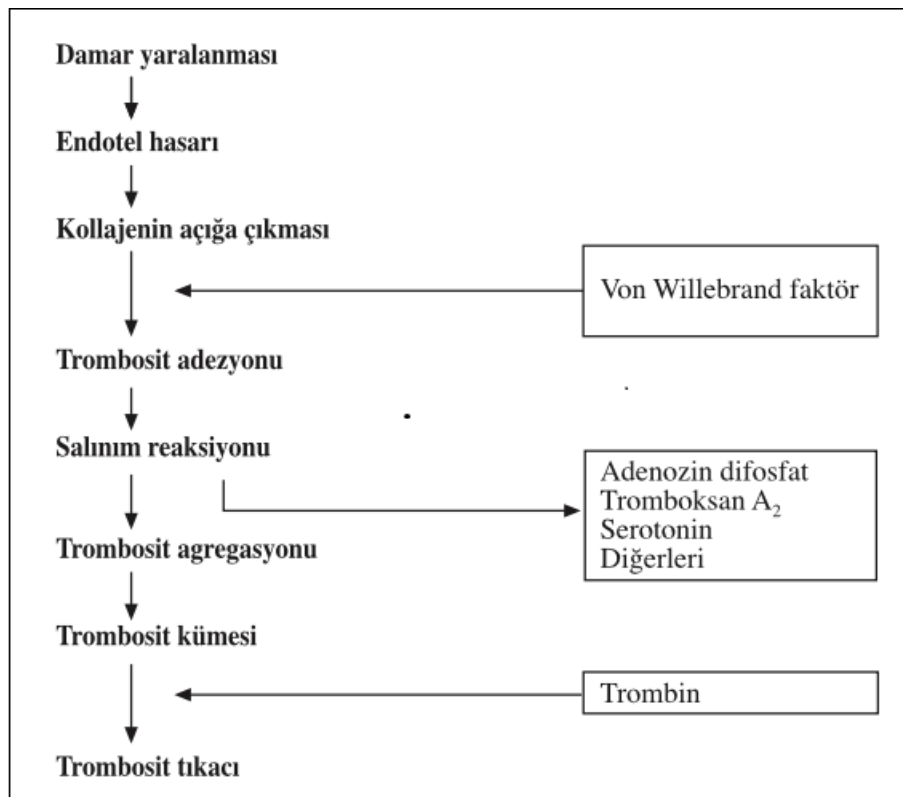
Normal koşullarda trombositler, diğer trombositler ve hücrelerle etkileşime geçme eğiliminde değildir. Aynı zamanda endotel hücreleri de prostaglandin I_2 (PGI_2), nitrik oksit (NO) sentezleyerek, trombositlerin pıhtı oluşturmalarını önleyecek bir bariyer oluşturur. Dolaşımdaki trombositlerin görevi, hasara uğramış damar duvarında geçici olarak “trombosit tıkaçı” oluşturarak kan kaybını engellemektir. Trombositlerin homeostatik fonksiyonu için adhezyon, sekresyon ve agregasyon fonksiyonları önemlidir.

2.2.1.1. Trombositlerin adhezyonu

Damar yaralanması olduğunda endotel alt tabakasından açığa çıkan kollagen, VWF (Von Willebrand Faktör) aracılığıyla trombosit yüzeyindeki GPIIb/IX reseptörlerine bağlanarak trombosit adhezyonunu sağlar. Trombositlerin tutulmasını ve yayılmasını sağlayan önemli subendotel matriks proteinleri kollajendir. Farklı damar sistemlerindeki farklı fenotipler, farklı uyarılma ve adeziv özellik gösterebilmektedirler. Aynı damarın farklı bölgelerinde dahi bu durumu görmek mümkündür. Trombositlerin adeziv özelliğini destekleyen proteinlerin dominantlığı dahi değişebilmektedir. Bunun gibi birçok durum, koagülasyonun laboratuvar ortamında çalışılmasını zorlaştırmaktadır (17-20).

Adezyonu takiben trombositlerdeki, α -granüller (PF4, β TG ve PDGF, fibrinojen,VWF) ve dense granüller (ADP, ATP, kalsiyum ve serotonin) içeriklerini kanaliküler sistem aracılığı ile sekrete ederler. ADP salınımıyla aktive olan trombositlerde şekil değişikliği izlenir; diskoid şekilli trombositler yapılarını değiştirerek uzantılı (psödöpod) sferik hücreler şekline dönüşürler. Aktive olmuş trombositler, membranlarındaki fibrinojen reseptörü GPIIb/IIIa ve fibrinojen köprüleri aracılığıyla bir araya gelerek agregre olurlar ve gevşek bir trombosit tıkaçı oluştururlar (Şekil 2.13).

Bernard-Soulier Sendromu (BSS), trombosit yüzeyinde GPIb/IX kompleksinin kalitatif veya kantitatif defekti sonucunda ortaya çıkan trombosit adezyon bozukluğudur. **Gri platelet sendromu (GPS)**, α -granüllerinde eksiklik, **Hermansky-Pudlak sendromu (HPS)** ve **Chediak-Higashi sendromu (CHS)** ise dens granül eksikliği ile karakterizedir. **Glanzman trombastenisi**, trombosit yüzeyindeki GPIIb/IIIa reseptör eksikliği veya fonksiyon bozukluğuna bağlı gelişen trombosit agregasyon bozukluğudur.



Şekil 2.13. Primer hemostazın aşamaları (21)

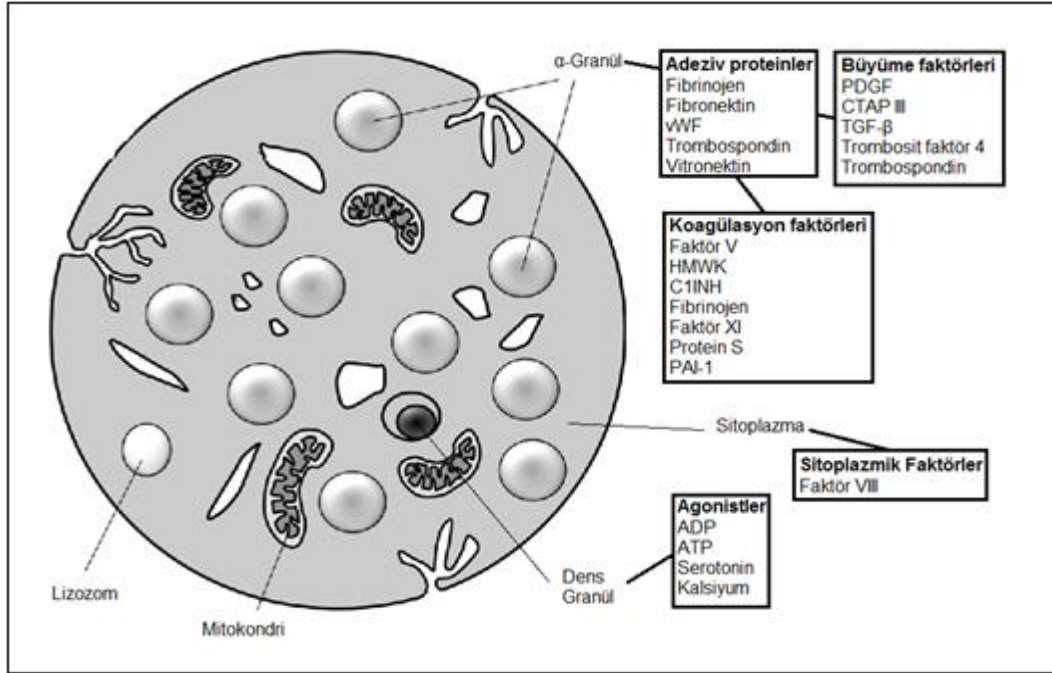
2.2.1.2. Trombositlerin sekresyon fonksiyonları

Trombositler farklı tip granüller içermektedirler; α -granüller, adeziv proteinleri içerir; dens granüller trombosit aktivasyonunu arttıran/sağlayan agonistler içermektedir, lizozomal granüllerin ise trombosit biyolojisinde fonksiyonları tam net değildir (22,23).

α -Granülleri: Hücre adezyonunda ve koagülasyonda rol oynayan plazma proteinlerinin büyük çoğunluğu trombositlerin α -granüllerinde bulunur. α -granüller, adeziv proteinler olan vWF, fibrinojen, fibronektin, vitronektin ve tromboplastin içerirler (24). Trombositte, vWF konsantre bir şekilde bulunur ve bulunan bu vWF, stoplazmada ve plazmada bulunanlara kıyasla molekülü daha büyük ve hemostatik açıdan daha efektifir (25). vWF, megakaryositte sentezlenir (26). Vitronektin, trombositlerde bulunur ancak trombosit içerisindeki konsantrasyonu, büyük olasılıkla, plazmadan pasif olarak alındığını düşündürmektedir. Plasminojen aktivator inhibitor-1 (PAI-1), vitronektine bağlanır ve bu iki protein kompleksi birlikte salınırlar (27-29). Adeziv proteinler; trombosit granüllerine ek olarak, plazmada ve matrikste de bulunabilir (24,30,31).

Platelet-derived growth factor (PDGF), damar düz kas hücrelerinin proliferasyonunda rol oynar. Trombosit factor-4 ve *connective tissue activating peptide* (CTAP III), büyüme kontrolü ve inflamasyon ile ilişkili olan büyük protein ailesinin üyesidirler (32-34). *Transforming growth factor*- β , trombositlerden ilk izole edilmiş peptittir (35), matriks moleküllerinin ve reseptörlerinin biyosentezinin etkili bir uyarıcısıdır. Trombospondin, endotel ve düz kas hücrelerinde üretilir (36,37) ve trombospondinin m-RNA'sı, büyüme faktörleriyle indüklenebilir (Ör: PDGF) (36). Trombospondin-1, düz kasların proliferasyonunu ve angiogenezi regüle etmektedir (38,39).

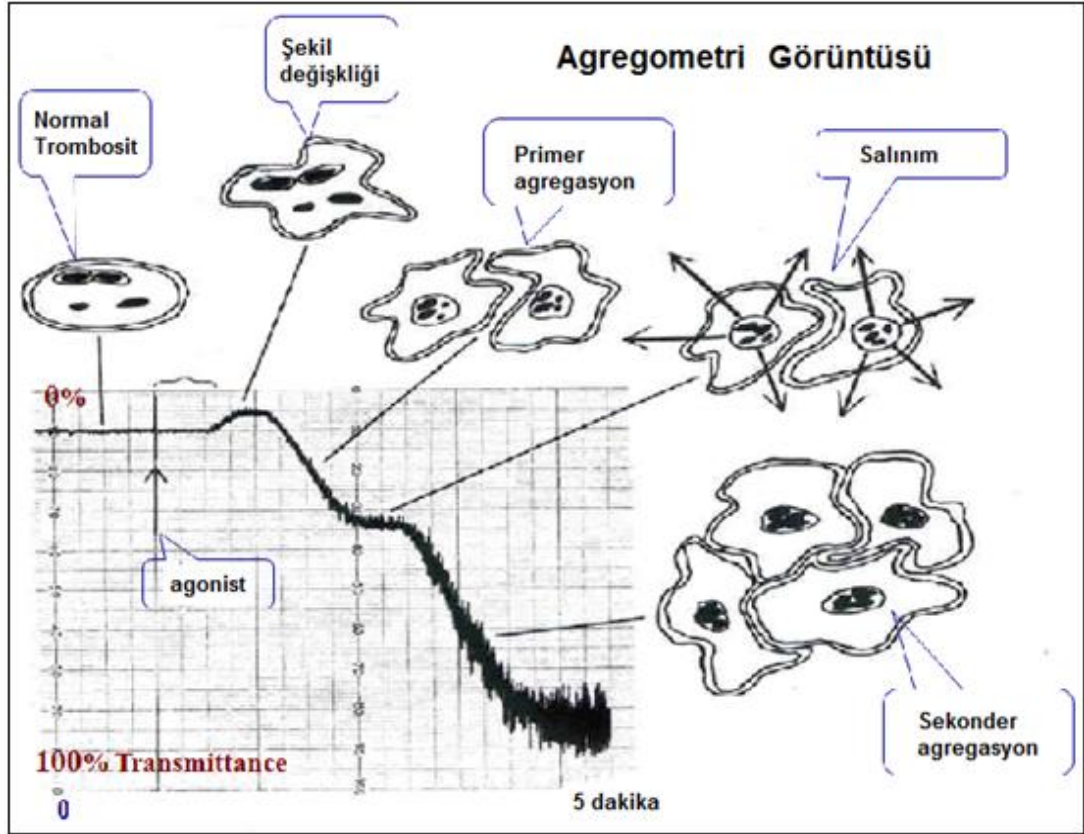
Dens granüller: ADP, ATP, serotonin ve kalsiyum gibi agonistleri içerirler ve salınımını sağlarlar. Bu agonistler, trombusdan difüzyon ile yayıldıktan sonra hızlı bir şekilde inaktif olurlar. Dolayısıyla agonistler oldukça kısa bir süre fonksiyonlarını sürdürebilirler (26) (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Trombositin yapısındaki granüllerin içeriği

2.2.1.3. Trombositlerin agregasyonu

ADP, dens granüllerde bulunan zayıf bir agonisttir ve agregasyon grafiğinde iki fazlı cevap oluşturur. ADP aracılı agregasyondan 2 tip pürinerjik (P2) reseptör sorumludur: P2Y1; trombositlerdeki şekil değişikliğinden, **primer agregasyon** dalgasının oluşumundan ve agregasyonun stabilizasyonundan sorumlu olan major ADP reseptörüdür. P2Y12 ise anti-trombosit bir ilaç olan klopidoğrel (Plavix) hedefi olan ADP reseptörüdür. ADP, 2-6 μM konsantrasyonda uygulandığında agregasyon grafiğinde iki fazlı cevap izlenir. **Sekonder agregasyon** dalgasının oluşumu için, TxA2 sentezi gereklidir ve aspirin gibi siklooksijenaz inhibitörlerinden etkilenir. ADP ile indüklenen agregasyon cevabı; salınım defektlerinde azalmıştır, Glanzman trombastenide kaybolmuştur (Tablo 2.1) (Şekil 2.15) (Şekil 2.16).



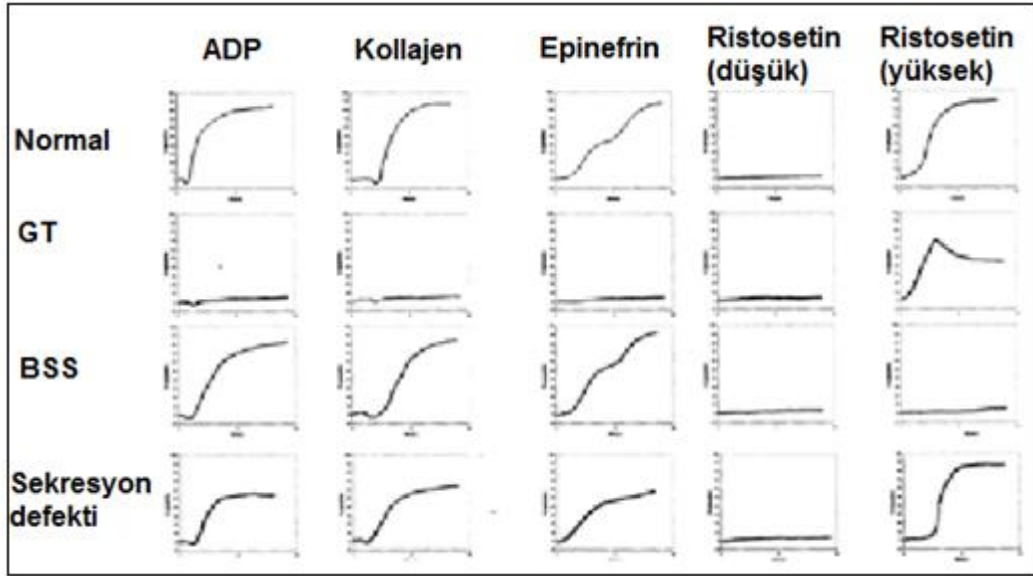
Şekil 2.15. Işık geçirgenlik agregometresi ile trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesi (40)

Epinefrin, trombosit içinde c-AMP düzeyini azaltan zayıf bir agonittir. Agregasyon grafiğinde iki fazlı cevap oluşturur. Epinefrin ile indüklenen agregasyon cevabı; depo havuzu hastalıklarında, salınım defektlerinde azalmıştır, Glanzman trombastenide kaybolmuştur (Tablo 2.1) (Şekil 2.16).

Kuvvetli bir agonist olan kollajen plazmaya eklendikten sonra, kollajenin polimerize olması nedeniyle bir lag faz izlenir, takiben tek bir agregasyon dalgası izlenir. Trombosit membranında kollajene ait 2 reseptör mevcuttur, adhezyondan sorumlu olan GPIa/IIa ve TxA1 oluşumundan sorumlu GPVI. Kollajen ile indüklenen agregasyon cevabı; depo havuzu hastalıklarında, salınım defektlerinde azalmıştır, Glanzman trombastenide kaybolmuştur (Tablo 2.1) (Şekil 2.16).

Tablo 2.1. ADP, epinefrin, kollajen ve ristosetin ile elde edilen agregasyon sonuçları (GT:Glanzman trombastenisi, BSS: Bernard-Soulier Sendromu)

	ADP (2 μ M)	ADP (6 μ M)	Epinefrin	Kollajen	Ristosetin
Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
GT	Agregasyon yok	Agregasyon yok	Agregasyon yok	Agregasyon yok	Normal
BSS	Normal	Normal	Normal	Normal	Agregasyon yok
Sekresyon defekti	Sekonder agregasyon dalgası yok	Normal	Sekonder agregasyon dalgası yok	Azalmış agregasyon	Normal



Şekil 2.16. ADP, epinefrin, kollajen ve ristosetin agonistleri ile elde edilen agregasyon grafikleri (GT:Glanzman trombastenisi, BSS: Bernard-Soulier Sendromu) (41)

2.2.2. Sekonder Hemostaz

Sekonder hemostazda rol alan koagülasyon sistemleri bir kaskat olarak kabul edilmektedir. Koagülasyon kaskatında yer alan faktörler, glikoprotein yapısında inaktif prekürsörlerdir. Aktive olduklarında serin proteaz denen enzimlere dönüşür ve kendinden sonrakini aktive ederler. Faktör III ve Faktör IV, farklı özellik gösterir; doku faktörü olan Faktör III, normalde plazmada bulunmaz, damar yaralanması durumunda açığa çıkar. Faktör IV, kalsiyum iyonudur ve koagülasyon kaskadının birçok aşamasında kofaktördür. Faktörlerin numaraları bulunuş sıralarına göre verilmiştir. Pıhtılaşma faktörleri Tablo 2.2’de gösterilmektedir.

Tablo 2.2. Pıhtılaşma Faktörleri

Faktör	Sinonim	Plazma düzeyi (U/dL)
Faktör I	Fibrinojen	200-400
Faktör II	Protrombin	50-150
Faktör III	Doku Faktörü	0
Faktör IV	Kalsiyum	50-150
Faktör V	Proakselerin	50-150
Faktör VII	Prokonvertin	50-150
Faktör VIII	Anti Hemofilik Faktör A	50-150
Faktör IX	Anti Hemofilik faktör B	50-150
Faktör X	Stuart- faktörü	50-150
Faktör XI	Plazma tromboplastin öncülü	50-150
Faktör XII	Hageman faktörü	50-150
Faktör XIII	Fibrin stabilize edici faktör	50-150
Prekallikrein		-
Yüksek molekül ağırlıklı kininojen		-

Faktör VIII'in dışında kalan diğer koagülasyon faktörlerinin başlıca yapım yeri, karaciğerin parankim hücreleridir. Faktör VIII kompleks bir moleküldür. Faktör VIII'in yalnız pıhtılaşma aktivitesi gösteren ve "Faktör VIII:koagulan protein (VIII:C)" olarak adlandırılan parçasının karaciğerde yapıldığı; diğer parçasını olan von Willibrand Faktörün ise başlıca endotel hücrelerinde ve megakaryositlerde sentez edildiği gösterilmiştir. vWF, FVIII'in stabilizasyonunu ve dolaşımda taşınmasını sağlar, trombositlerin endotel altından açığa çıkan kollajen adezyonuna yardımcı olur.

Faktör II, VII, IX, X, karaciğerde sentezleri sırasında K vitaminine ihtiyaç gösteren proteinlerdir. K vitamini bu proteinlerdeki glutamik asit rezidülerinin karboksilasyonunu sağlar. Böylece bu faktörler Ca^{+2} aracılığıyla fosfolipid yüzeylere tutunabilme yeteneği kazanırlar.

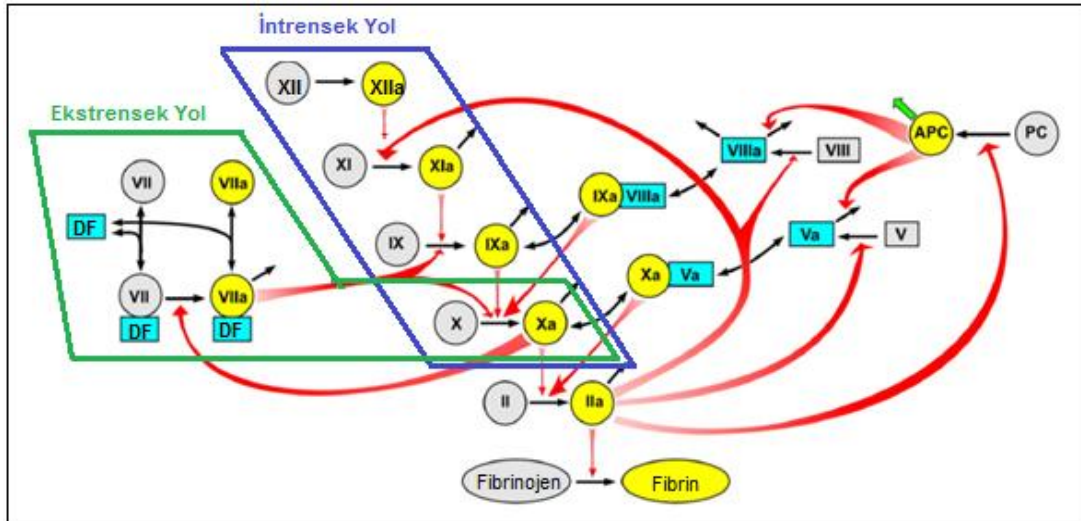
Plazmatik faktörler dışında pıhtılaşma reaksiyonları için gerekli fosfolipid yüzeyleri intrinsek pıhtılaşma yolunda trombosit faktör 13, ekstrinsek pıhtılaşma yolunda ise doku faktörü (Faktör III) tarafından sağlanır. Doku faktörü hücre membranlarının hemen tamamında bulunan glikoprotein-fosfolipid kompleksidir. Monosit ve endotel hücrelerinin inflamatuvar sitokinlerle uyarılması bu hücrelerde doku faktörünün indüklenmesine yol açar.

2.2.2.1. Ekstresek Pıhtılaşma Sistemi

Bu sistemde doku faktörü (Faktör III) önemli rol oynar. Doku faktörü normalde kanda bulunmaz, farklı dokularda bulunabilir; özellikle beyin, akciğerler ve plasentada bol bulunur. Doku faktörü, FVII ve Ca^{+2} ile birlikte FX'u direkt olarak aktive eder. Faktör X'un aktivasyonundan sonraki trombin ve fibrin oluşum evreleri intrinsek sistem ile aynıdır, bu evredeki reaksiyon dizisi için *ortak yol* terimi kullanılır. Faktör VII dışındaki tüm faktörler, intrinsek yolda da gereklidir. (Şekil 2.17). Koagülasyonda fizyolojik olarak esas önemli olan yolak, doku faktörünün açığa çıkması ile aktive olan ekstrinsek pıhtılaşma sistemidir.

2.2.2.1. İntrensek Pıhtılaşma Sistemi

Faktör XII'nin cam ve ellajik asit gibi negatif yüklü yüzeylerle teması sonrası aktive olmasıyla intrensek pıhtılaşma yolu başlar. İntinsik yolun başlangıcındaki kontakt aktivasyonda prekallikrein ve yüksek molekül ağırlıklı kininojen de yer alırlar. Faktör XII aktive olduktan sonra Faktör XI'in aktivasyonunu sağlar. Aktif Faktör XI, Faktör IX'u aktive ettikten sonra Faktör VIIIC ile birlikte Faktör X'u aktive eder. Bu reaksiyon agrege olmuş trombositlerin yüzeyinde gerçekleşir. Faktörlerin trombosit fosfolipitlerine bağlanması kalsiyum iyonu köprüleriyle sağlanır. Aktif Faktör X trombositlere bağlı Faktör Va ile oluşturduğu kompleks protrombinaz adını alır. Protrombinazın protrombini (Faktör II) enzimatik olarak parçalamasıyla trombin oluşur. Güçlü bir enzim olan trombin, fibrinojen molekülünden küçük peptitleri ayırarak fibrin monomerini oluşturur. Bu monomerler birleşerek fibrin polimerini meydana getirir. Trombin tarafından uyarılan Faktör XIII ve Ca^{+2} aracılığıyla fibrin pıhtısı mekanik olarak daha sağlam hale getirilir. Trombinin diğer etkileri ise; Faktör V ve VIII'i aktive etmek, trombosit agregasyon ve salınım reaksiyonunu uyararak protein C ve plazminojenin aktivasyonunu sağlamaktır (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. Koagülasyon kaskadı (42)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma; Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu: THD-2015-6345). Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik kurulu tarafından araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur ve tüm hastalar çalışmayla ilgili bilgilendirilmiştir (Proje no: GO 15/221).

Bu çalışmaya, kronik fazda bulunan 68 KML hastası katıldı. Hastaların 47'si imatinib, 15'i dasatinib ve 6'sı nilotinib kullanmakta idi. Hastaların hemostazı etkileyebilecek başka bir ilaç kullanmıyor olmaları ve hemostatik sistemi etkileyen kalıtsal hastalık taşımamalarına dikkat edildi. Çalışmaya katılan hastalar, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Anabilim Dalı tarafından yönlendirildi. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve ekipmanlar aşağıda listelenmiştir.

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Enstrümanlar:

1. Agregometri cihazı (Chrono-Log) (Diagnostica Stago) (Şekil 3.1)
2. BCS-XP (Siemens) (Şekil 3.2)
3. LH780 (Beckman Coulter) (Şekil 3.3)
4. Otomatik pipet (Gilson)
5. Hamilton marka CR-700-20 model pipet
6. Chrono-Log küvet
7. Manyetik karıştırma çubuğu
8. Santrifüj (NF 800) (Nüve)
9. Derin dondurucu (-20°C) (Electrolux)
10. Derin dondurucu (-80°C) (Nuaire)
11. Karıştırıcı (Coulter)
12. Na-sitrat içeren mavi kapaklı tüpler (%3.2) (Becton Dickinson)
13. K-EDTA içeren mor kapaklı tüpler (Becton Dickinson)



Şekil 3.1. Chrono-Log (Diagnostica Stago)



Şekil 3.2. BCS-XP (Siemens)

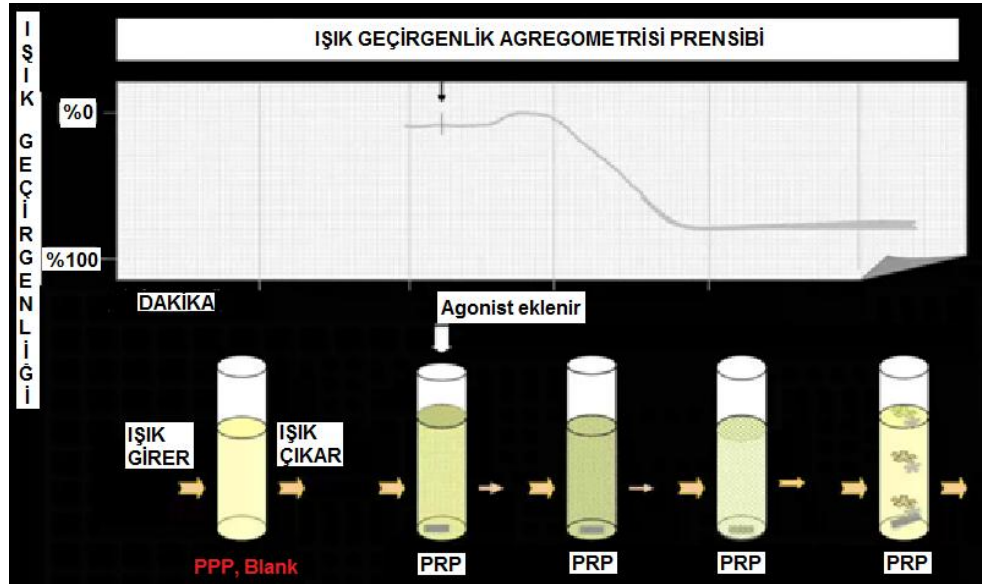


Şekil 3.3. LH 780 (Beckman Coulter)

3.2. Trombosit Agregasyonunun Değerlendirilmesi

Trombositler kanda, plazmada ya da izole edilmiş hücre popülasyonlarında birbirleriyle etkileşime geçmezler. Ortama uygun bir agonist eklenirse (ADP, kollajen, epinefrin, araşidonik asit, ristosetin vs) hücrelerde agregasyon tetiklenebilir. Chrono-Log (Diagnostics Stago), ışık transmisyon agregometri (*Light Transmittance Aggregometry, LTA*) prensibini kullanan optik bir agregometredir, *in vitro* şartlarda çeşitli agonistler ile uyarılan trombosit agregasyonunun takip edilmesini sağlar.

Işık transmisyon agregometri, klinik laboratuvarlarında trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesinde altın standart kabul edilmektedir. Bu yöntemde, trombositten zengin plazma içine agonistlerin eklenmesini takiben trombositlerin agreste olmasına bağlı olarak türbiditede azalma ve ışık transmittansında artış izlenir. Trombosit agregasyonu 5-10 dk izlenir, bu süre içinde transmittans kaydedilerek ADP, epinefrin, kollajen ve ristosetine karşı oluşan agregasyon dalgaları değerlendirilir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Işık geçirgenlik agregometrisi prensibi (43)

Trombosit agregasyonunun değerlendirilmesinde kullanılan agonistlerden ADP ve epinefrin *zayıf agonist*, kollajen ise *kuvvetli agonist* kabul edilmektedir. Kuvvetli agonistler, hem platelet agregasyonunu ve hem de granül sekresyonunu indükler. Zayıf agonistler ise granül sekresyonunu tetiklemeden sadece trombosit agregasyonunu indükler. Kuvvetli agonistler düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında zayıf agonist olarak etki edebilirler, ancak zayıf agonistler yüksek konsantrasyonlarda kullanılsalar bile kuvvetli agonist gibi etki gösteremezler (44).

3.3. Kullanılan Reaktifler

1. ADP
2. Kollajen
3. Epinefrin
4. Ristosetin

3.4. Reaktiflerin Hazırlanması

3.4.1. ADP'nin hazırlanması: ADP; 2,5 mg liyofilize toz halde gelmektedir. 5 mL salin ile çözülerek 1 mM konsantrasyonda stok elde edilir. Çözülen reaktif, -70oC'de bir yıl ya da son kullanma tarihine kadar stabildir. Günlük yapılan test miktarına göre alikotlanması tavsiye edilir. Çalışma çözeltisi; 2-8oC arasında, 8 saat stabildir.

3.4.2. Epinefrinin hazırlanması: Epinefrin; stabil edici ajanlarla birlikte, 1-epinefrin bitartarat formunda liyofilize formda gelmektedir. Liyofilize epinefrin, önce 5 mL distile suda çözülerek 10 mM stok çözelti elde edilir. 10 mM'lık çözelti, 1:10 oranında salin ile dilüe edilerek 1 mM'lık çalışma çözeltisi elde edilir. Stok, -70°C'de 3 ay saklanabilir.

3.4.3. Kollajenin hazırlanması: Kollajen; 1 mg/ml konsantrasyonda kullanıma hazır şekilde temin edilir ve 2-8°C'de son kullanma tarihine kadar stabildir.

3.4.4. Ristosetin hazırlanması: Ristosetin; liyofilize formda gelir ve 0,5 mL distile suda çözülerek 125 mg/ml stok elde edilir. Karıştırıcı üzerinde 10-15 dakika çözülmeye bırakılır. Süspanse edilen reaktif, berrak-kahverengi arasında bir renge sahip olması beklenmektedir. Stok, -20°C'de 3 ay stabildir, -70°C'de saklanmamalıdır.

3.5. Kanama Anketi

Hastalara kanama anketinin uygulanması, standardizasyon için önemlidir. Bu çalışmada hastaların kanama durumları ile ilgili bilgi elde etmek amacıyla, von Willebrand hastalığı için geliştirilmiş olan kanama anketi uygulandı.

(http://c.ymcdn.com/sites/www.isth.org/resource/resmgr/ssc/bleeding_type1_vwd.pdf).

Tablo 3.3'de 0 ila 3 arasında değişen semptom spesifik skorlama anketi verilmiştir. Semptom skorlarının toplamı ile kanama skoru (KS) elde edilmektedir. Kanama skoru sonucu 3'ün altında olanlar **negatif sonuç**, kanama skoru 3 ve üzerinde olanlar **pozitif sonuç** olarak değerlendirilmiştir.

Ankette, burun kanaması, cilt semptomları, minör yaralar, oral kavite kanamaları, gastrointestinal kanama, post-partum kanama, kas içi kanama/hemartroz, diş çekimi, cerrahi ve adet kanamaları ile ilgili semptomlar değerlendirilmiştir.

3.6. Tam Kan Sayımı

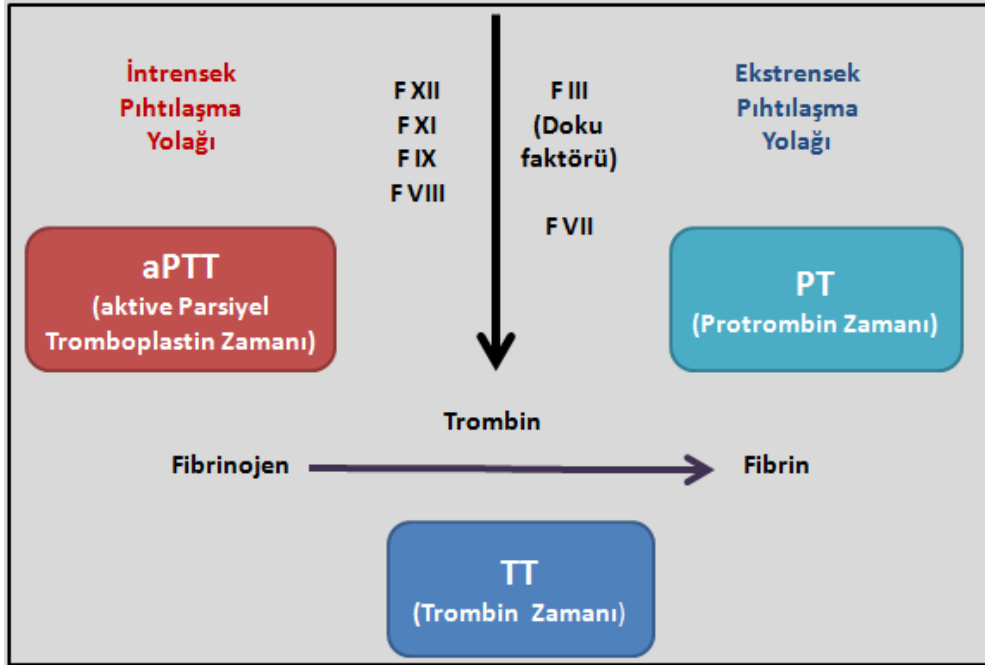
Tam kan sayımı, Coulter prensibi olarak da bilinen, akış sitometresi ve empedans ölçüm sistemlerini kullanan LH780 (Beckman Coulter) marka cihaz kullanılarak yapılmıştır. Bu yöntemle hemoglobin, hematokrit, MCV (*Mean cell volume*), lökosit, trombosit, MPV (*Mean platelet volume*) ve RDW (*Red cell distribution width*) değerleri elde edilmiştir. Tam kan sayımına ait parametreler için referans aralıkları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Hemoglobin, hematokrit, MCV, lökosit, trombosit, MPV ve RDW için referans aralıkları

	Birim	Referans Aralığı	
Hemoglobin	gr/dL	Erkek: 13,8 - 17,2	Kadın: 12,1 - 15,1
Hematokrit	%	Erkek: 40,7 - 50,3	Kadın: 36,5 - 46,3
MCV	fL	80,4 - 95,9	
Lökosit	$\times 10^3/\mu\text{L}$	4,1 - 11,2	
Trombosit	$\times 10^3/\mu\text{L}$	159 - 388	
MPV	fL	6,5 - 11,6	
RDW	%	11,7 - 14,6	

3.7. Koagülasyon Testleri

Şekil 3.5'te belirtildiği gibi sekonder hemostazın değerlendirilmesine yönelik koagülasyon testleri olan PT, INR (*International Normalized Ratio*), aPTT, TT, Fibrinojen ve Faktör VIII düzeyi BCS-XP (Siemens) cihazında çalışılmıştır.



Şekil 3.5. Sekonder hemostazın değerlendirilmesine yönelik koagülasyon testleri

PT testi koagülasyonun ekstresek yolağının değerlendirilmesi için kullanılır. Bu test ile, Faktör I, II, V, VII, X'un etkinliği değerlendirilir. Bu test için, hastadan kan örneği sodyum sitrat (%3,2) içeren kan tüplerine alınır. Örnek, santrifüj edilerek kan hücrelerinden ayrılır plazma elde edilir. Sodyum sitratın antikoagülan etkisini kaldırmak için tüpe kalsiyum eklenir. Koagülasyon mekanizmasında, ekstresek faktörü aktif etmek için, test tüpüne doku faktörü eklenir ve örnekte pıhtı oluşumu beklenir. Bu test için kullanılan doku faktörüne göre PT değeri laboratuvarlar adasında farklılık gösterebilmektedir. Sonuçların laboratuvarlar arasında standardizasyonu için **INR** (*International normalized ratio*) değeri kullanılmaktadır. **INR** değeri, hastanın PT değerinin, sağlıklı kontrol plazma PT değerine oranının **ISI** (*international sensitivity index*) kuvvetiyle hesaplanır.

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{PT}_{\text{test}}}{\text{PT}_{\text{normal}}} \right)^{\text{ISI}}$$

aPTT testi, koagülasyonun intrinsek yolağının değerlendirilmesinde kullanılır. Bu test ile Faktör I, II, V, VIII, IX, X, XI, XII'nin etkinliği değerlendirilir. Bu test için, hastadan kan örneği sodyum sitrat (%3,2) içeren kan tüplerine alınır. Örnek, santrifüj edilerek kan hücrelerinden ayrılır ve plazma elde edilir. Sodyum sitratın antikoagülan etkisini kaldırmak için tüpe kalsiyum eklenir. Koagülasyon mekanizmasında intrinsek faktörü aktive etmek için, test tüpüne aktivatör eklenir ve örnekte pıhtı oluşma süresi ölçülür.

TT testi, koagülasyonun fibrinolitik yolağının etkinliğinin ölçümünü sağlar. Bu testte, trombin kullanılarak fibrinojenin fibrine dönüşümü sağlanmaktadır. Bu test için, hastadan kan örneği sodyum sitrat (%3,2) içeren kan tüplerine alınır. Örnek, santrifüj edilerek kan hücrelerinden ayrılır ve plazma elde edilir. Elde edilen plazmaya trombin eklenilerek örneğin pıhtı oluşturma süresi takip edilir.

Fibrinojen düzeyinin belirlenmesi için modifiye edilmiş Clauss yöntemin kullanılmaktadır. Fibrinojen konsantrasyonu bilinen standart plazma (ticari), seri dilüsyona tabi tutularak farklı konsantrasyonlar elde edilir. Bu plazmalara, çok yüksek trombin konsantrasyonları eklenerek koagülasyon indüklenir ve pıhtılaşma zamanı ölçülür. Azalan fibrinojen konsantrasyonlarıyla artan pıhtılaşma zamanına göre standart grafik çizilir ve bu grafik aracılığıyla fibrinojen düzeyi ölçülür.

Faktör VIII düzeyinin tespit edilmesi, hemofili A tanısı için gereklidir. Faktör VIII gibi intrensek yolak faktörlerindeki bir eksiklik, aPTT değerinin uzamasına neden olmaktadır. Faktör VIII aktivitesi ölçümü için, standart insan plazması (ticari) imidazol tamponu ile seri dilüsyona tabi tutularak farklı konsantrasyonlarda plazmalar elde edilir ve elde edilen plazmalara Faktör VIII'i eksik olan (ticari) plazma eklenerek aPTT değeri izlenir. Azalan Faktör VIII konsantrasyonlarına karşın uzayan aPTT değerleriyle standart eğri çizilir. Bu standart eğri kullanılarak Faktör VIII aktivitesi tayin edilir.

PT (*Prothrombin Time*), INR (*International Normalized Ratio*), aPTT (*activated Partial Tromboplastin Time*), TT (*Thrombin Time*), Fibrinojen ve Faktör VIII testleri için referans aralıkları Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. PT, aPTT, INR, TT, Fibrinojen ve Faktör VIII testleri için referans aralıkları

	Birim	Referans Aralığı
PT	sn	11,3-14,7
INR	-	0,8 – 1,2
aPTT	sn	22,5 – 32
TT	sn	14 – 21
Fibrinojen	mg/dL	180 – 350
Faktör VIII	%	53-170

3.8. Trombosit fonksiyon testleri

3.8.1. Hastaların hazırlanması

Hastalardan, trombosit fonksiyon testleri için 8 adet 3 ml'lik sodyum sitratlı tüplere kan alındı ve hastalara kanama durumlarıyla ilgili bir kanama anketi yapıldı. Kanlar alındıktan sonra her tüp 5-6 kez yavaşça ters yüz edilerek sodyum sitratın kanla karışması sağlandı. Kan tüplerinde belirlenen miktarın üzerinde ya da aşağısında olan kanlar ve hemolizli örnekler çalışmaya dahil edilmedi.

Trombosit fonksiyon testleri için kan vermeden 10-14 gün önce aşağıdaki ilaçların kesilmesi önerilmektedir.

- Aspirin veya aspirin içeren preparatlar
- Non-steroid anti-inflamatuvarlar (Naproksen, ibuprofen, indometazin, mefenamik asid)
- Antibiyotikler (Penisilin, sefalosporin, nitofurantoïn, amfoterasin vs)
- Antihistaminikler
- Trisiklik antidepresanlar (İmipramin)
- Anti-trombosit ilaçlar (Klopidogrel, dipiridamol, tiklopidin, trikagrelor, prasugrel)
- Antikoagülatnlar (Heparin, vitamin K antagonistleri)
- Teofilin
- Kemoterapotikler (Vinkristin)
- Fenotiyazinler (Klorpromazin)
- Lokal ve genel anestezi (Halotan)
- Radyokontrast madde
- β -adrenerjik bloküler (Propranolol)
- Vazodilatörler (Nitroprusid, nitrogliserin)
- Diüretikler (Furosemid)
- Kalsiyum kanal blokürleri

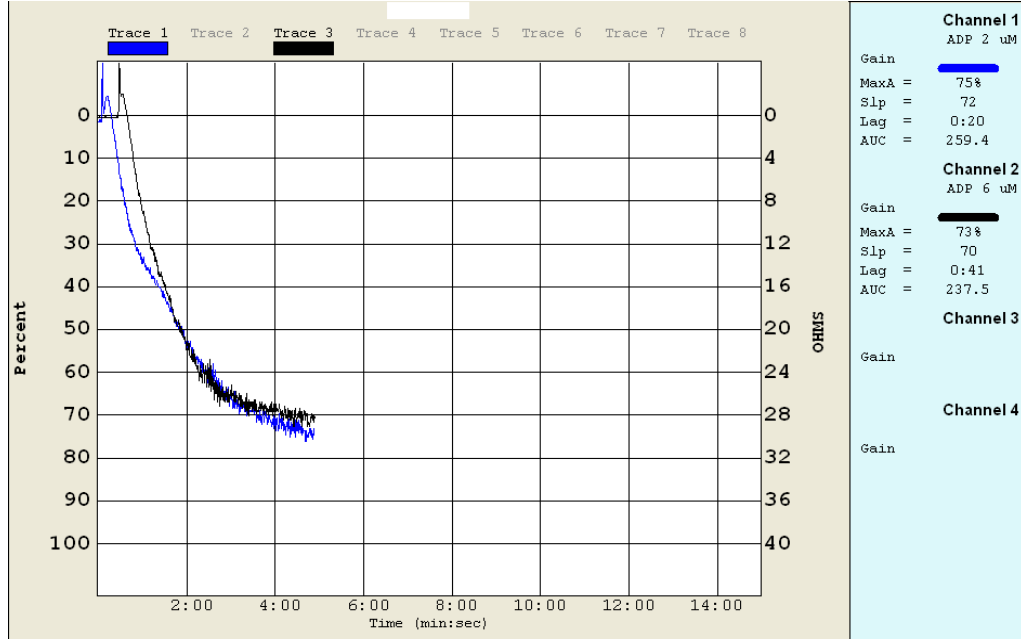
- Kan vermeden 1-2 gün önce soğan, sarımsak, zencefil, ginseng, balık yağı, vitamin C, vitamin E, alkol ve kafein alınmamalıdır.
- Kan vermeden önce 10-12 saatlik açlık gereklidir.

3.8.2. Örneklerin santrifüjü

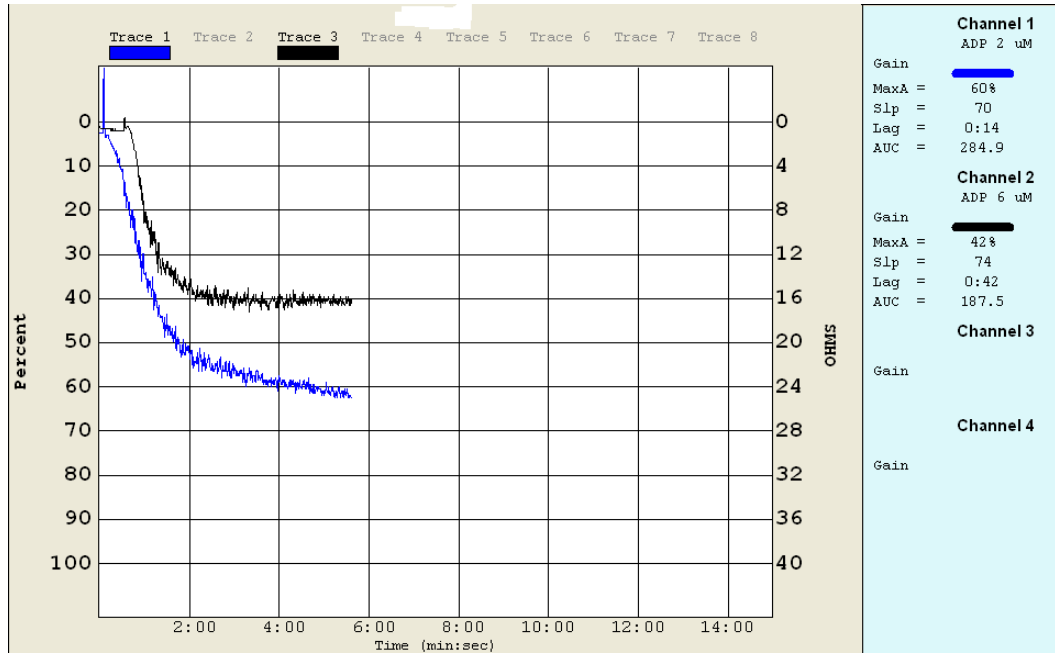
Örnekler, trombositten zengin plazma (PRP: *Platelet rich plasma*) elde etmek için, 1000xg'de 15 dakika, trombositten fakir plazma (PPP: *Platelet poor plasma*) elde etmek için 3700xg'de 7 dakika santrifüj edildi.

3.8.3. ADP ile indüklenen agregasyonun incelenmesi

ADP'nin agregasyon üzerindeki etkileri, 2 μ M ve 6 μ M olmak üzere iki farklı konsantrasyon üzerinden değerlendirildi. İçinde karıştırıcı bulunan küvete 500 μ L plazma eklenerek Chrono-Log cihazına yerleştirilir ve 37°C'ye gelmesi beklenir. Oda sıcaklığına gelen ADP reaktifinden plazma içine 3 μ L ADP eklenerek 6 μ M'lık ADP konsantrasyonu elde edilir. En az 4 dakika süresince agregasyon grafiği takip edilir. Takiben 500 μ L plazma içine 3 μ L ADP eklenerek 6 μ M'lık konsantrasyon elde edilir. Benzer şekilde en az 4 dakika süresince agregasyon grafiği takip edilir, ADP ile indüklenen agregasyon %70 ve üzerinde seyretmişse "normal", seyretmemişse "anormal" kabul edilir (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7).



Şekil 3.6. Düşük doz ADP (2 μ M) ile izlenen normal agregasyon (%75, mavi) ve yüksek doz ADP (6 μ M) ile izlenen normal agregasyon (%73, siyah)



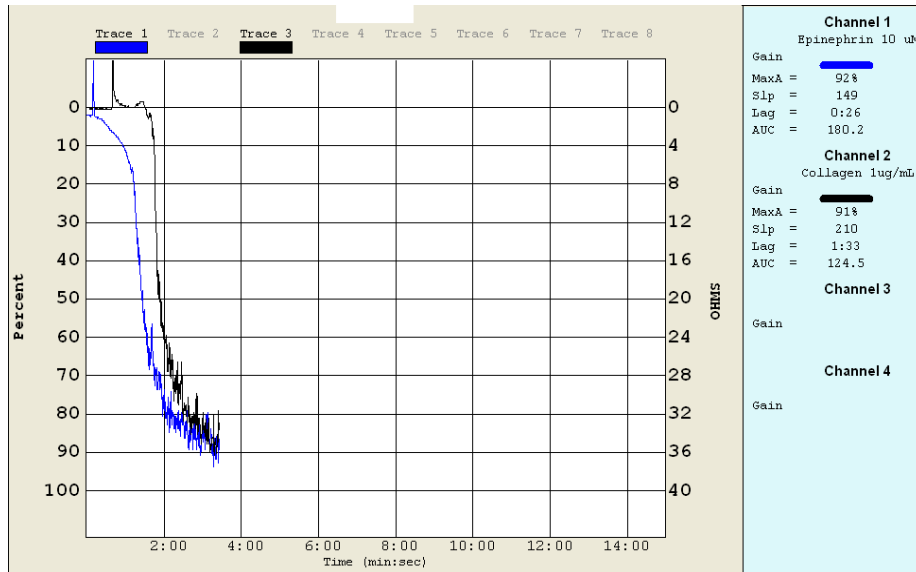
Şekil 3.7. Düşük doz ADP (2 μ M) ile izlenen anormal agregasyon (%60, mavi), yüksek doz ADP (6 μ M) ile izlenen anormal agregasyon (%42, siyah)

3.8.4. Epinefrin ile indüklenen agregasyonun incelenmesi

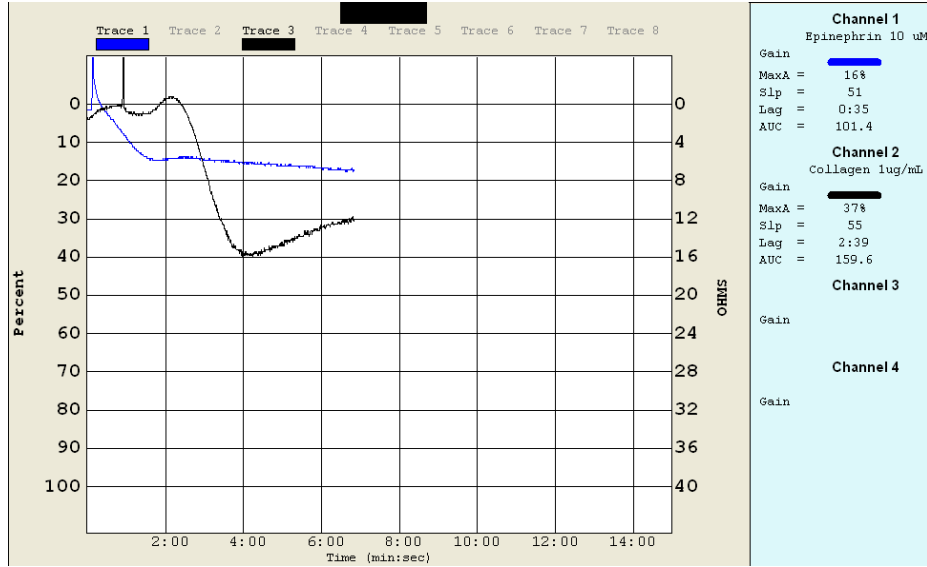
Epinefrinin agregasyon üzerindeki etkilerini değerlendirmek için, içinde karıştırıcı bulunan küvete 500 μ L plazma eklenerek Chrono-Log cihazına yerleştirilir ve 37°C'ye gelmesi beklenir. Oda sıcaklığına gelen epinefrin reaktifinden plazma içine 0,5 μ L eklenir, böylece son konsantrasyonu 1 μ M olur. 10-12 dakika süreyle agregasyon grafiği takip edilir. Epinefrin eklenmesi ile elde edilen agregasyon grafiği %70 ve üzerinde ise "normal", %70'in altında "anormal" kabul edilir (Şekil 3.8 ve 3.9).

3.8.5. Kollajen ile indüklenen agregasyonun incelenmesi

Kollajenin agregasyon üzerine olan etkilerini incelemek üzere, önce içinde karıştırıcı bulunan küvete 500 μ L plazma eklenerek Chrono-Log cihazına yerleştirilir ve 37°C'ye gelmesi beklenir. Oda sıcaklığına gelen Kollajen reaktifinden plazma içine son konsantrasyon 1 μ g/mL olacak şekilde, 500 μ L PRP'ye 0,5 μ L kollajen eklenilerek, agregasyon grafiği gözlenir. Kollajen ile elde edilen agregasyon grafiği %70 ve üzerinde seyretmişse normal, seyretmemişse "anormal" kabul edilir (Şekil 3.8 ve 3.9).



Şekil 3.8. Epinefrin ile indüklenen normal agregasyon (%92, mavi) ve kollajen ile indüklenen normal agregasyon (%91, siyah)

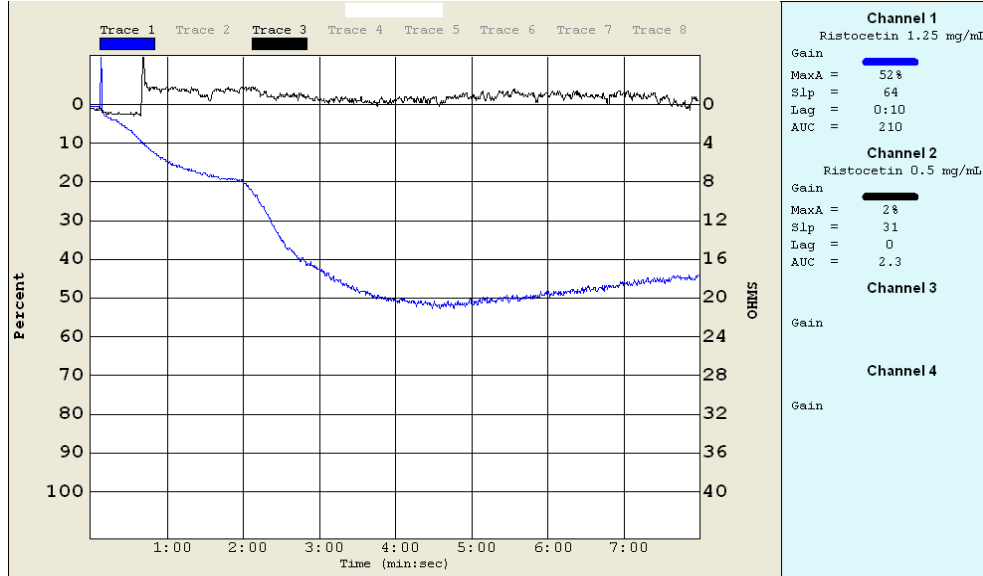


Şekil 3.9. Epinefrin ile indüklenen anormal agregasyon (%16, mavi) ve kollajen ile indüklenen anormal agregasyon (%37, siyah).

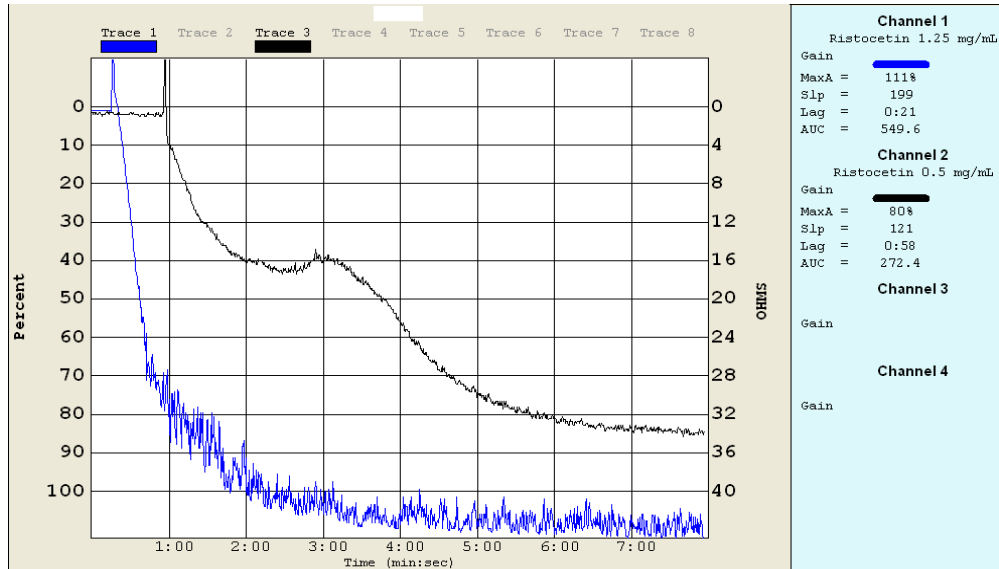
3.8.6. Ristosetin ile indüklenen agregasyonun incelenmesi

Ristosetin'in agregasyon üzerindeki etkileri, 0,5 mg/ml ve 1,25 mg/ml olmak üzere iki farklı konsantrasyon üzerinden değerlendirilmektedir. Ristosetin'in agregasyon üzerine olan etkilerini incelemek için, içinde manyetik karıştırıcı bulunan küvete 250 µL PRP agregometri cihazına konulur ve 37°C'ye gelmesi beklenir. Bu arada ristosetin'in oda sıcaklığına gelmesi beklenir. Küvetlerin içerisine 1 µL ristosetin eklenilerek 0,5 mg/mL'lik konsantrasyon elde edilir ve en az 4 dakika boyunca agregasyon grafiği takip edilir. Düşük konsantrasyonda ristosetin ile indüklenen agregasyon %10'un altında seyretmişse "normal", seyretmemişse "anormal" kabul edilir. Takiben 250 µL PRP içine 2,5 µL ristosetin eklenerek 1,25 mg/mL'lik ristosetin konsantrasyonu elde edilir. Benzer şekilde en az 4 dakika süresince agregasyon grafiği takip edilir, yüksek konsantrasyonda ristosetin ile indüklenen agregasyon %70 ve üzerinde seyretmişse "normal", seyretmemişse "anormal" kabul edilir (Şekil 3.10 ve 3.11).

Örnek hacmi, 250 μ L olduğu için, küvetin cihazın optik okuyucusuyla aynı düzeye gelmesi için tüpün altına bir destek yapıştirılarak tüpün yüksekliği artırılır.



Şekil 3.10. Düşük doz ristocetin ile izlenen normal agregasyon (%2, siyah) ve yüksek doz ristocetin ile izlenen anormal agregasyon (%52, mavi)



Şekil 3.11. Yüksek doz ristocetin ile izlenen normal agregasyon (%111, mavi) ve düşük doz ristocetin ile izlenen anormal agregasyon (%80, siyah)

Tablo 3.3. Kanama Skoruması

Semptomlar	Skorlama			
	0	1	2	3
Burun Kanaması: 5 dk'dan uzun süren ya da tıbbi destek gereken kanama	Yok ya da önemsiz	Var	Tampon, koter	Transfüzyon, replasman
Cilt Semptomları: Spontan ya da Hafif travmada >3cm	Yok ya da önemsiz	Petişi ya da ekimoz	Hematom	Tıbbi konsültasyon
Minör Yaralar: Yüzeysel kesiklerde 5dk'dan uzun süren kanama	Yok ya da önemsiz	Var (1-5 epizod/yıl)	Tıbbi bakım	Cerrahi ya da kan transfüzyonu
Oral Kavite Kanamaları: Spontan 1 dk üzerinde süren belirgin kanlı tükürük, fırçalama sonrası şiddetli kanama, dış çıkarırken doktor muayenesi gerektiren kanama, yanak-dudak-dil ısırıkları sonrası 5 dk üzerinde kanama ya da Önemli dil/ağız kanamaları	Yok ya da önemsiz	Var	Tıbbi bakım	Cerrahi ya da kan transfüzyonu
Gastrointestinal Kanama	Yok ya da önemsiz	Var	Tıbbi bakım	Cerrahi ya da kan transfüzyonu
Post-Partum Kanama	Yok ya da önemsiz	Var, demir tedavisi	Kan transfüzyonu, D&C, sütür	Histerektomi
Kas İçi Kanama/Hemartroz	Yok ya da önemsiz	Var	Tıbbi bakım	Transfüzyon, girişim
Diş çekimi (En Ağır Epizod): Diş çekiminde gecikmeye yol açan kanama veya işlem sonrası uzun süren kanama	Yok ya da önemsiz	Var	Sütür ya da tampon	Transfüzyon
Cerrahi (En Ağır Epizod): Cerraha göre uzun, taburculuğu geciktiren ya da destek gereken	Yok ya da önemsiz	Var	Sütür ya da tekrar cerrahi	Transfüzyon
Adet Kanamaları	Yok ya da önemsiz	Var	Konsültasyon, ilaç kullanımı, demir tedavisi	Transfüzyon, histerektomi, D&C, replasman tedavisi

4. BULGULAR

4.1. Trombosit Fonksiyon Testlerinin Stabilizasyon Çalışmaları

Trombosit fonksiyonlarının, zaman içerisinde nasıl etkilendiğini görmek amacıyla 20 sağlıklı gönüllü katılımcıdan (yaş aralığı: 20-45) kan alındı. Trombositten zengin plazma ve kontrol olarak da trombositlen fakir plazma kullanılarak, agregometri cihazıyla trombosit fonksiyonları 0, 2, 4 ve 8. saatlerde değerlendirildi. Oda ısısında bekletilen örneklerde zaman içinde farklı agonistler ile uyarılan trombositlerin aktivasyonlarının nasıl değiştiği incelendi. ADP (2 μ M) ile uyarılan agregasyonda 2. saatte %7 oranında bir azalma, 2. saat ile 4. saat arasında %18'lik bir azalma, 4. saat ile 8. saat arasında ise %50'lik bir azalma olduğu gözlemlendi. ADP (6 μ M) ile uyarılan agregasyonda ise 4. ve 8. saatler arasında %10 oranında düşme saptandı. Trombosit fonksiyonlarındaki azalmaların arasındaki bu fark, istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p < 0,05$) (*Paired-samples t-test; SPSS*) Elde edilen p değerleri, Tablo 4.1'de verilmiştir; $p < 0,05$ olan değerler, farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirtmektedir.

Tablo 4.1. Oda ısısında bekletilen plazma örneklerinde 0, 2, 4 ve 8. saatlerde trombosit fonksiyonları arasındaki farkın p değeri üzerinden değerlendirilmesi

	0 ve 2 sa arasındaki fark	2 ve 4 sa arasındaki fark	4 ve 8 sa arasındaki fark	0 ve 8 sa arasındaki fark
ADP (2 μ M)	0,045	0,001	0,000	0,000
ADP (6 μ M)	0,615	0,162	0,021	0,006
Epinefrin	0,644	0,269	0,261	0,162
Kollajen	0,273	0,345	0,572	0,416
Ristosetin (1,25 mg/ml)	0,351	0,362	0,083	0,015
Ristosetin (0,5 mg/ml)	0,196	0,447	0,338	0,801

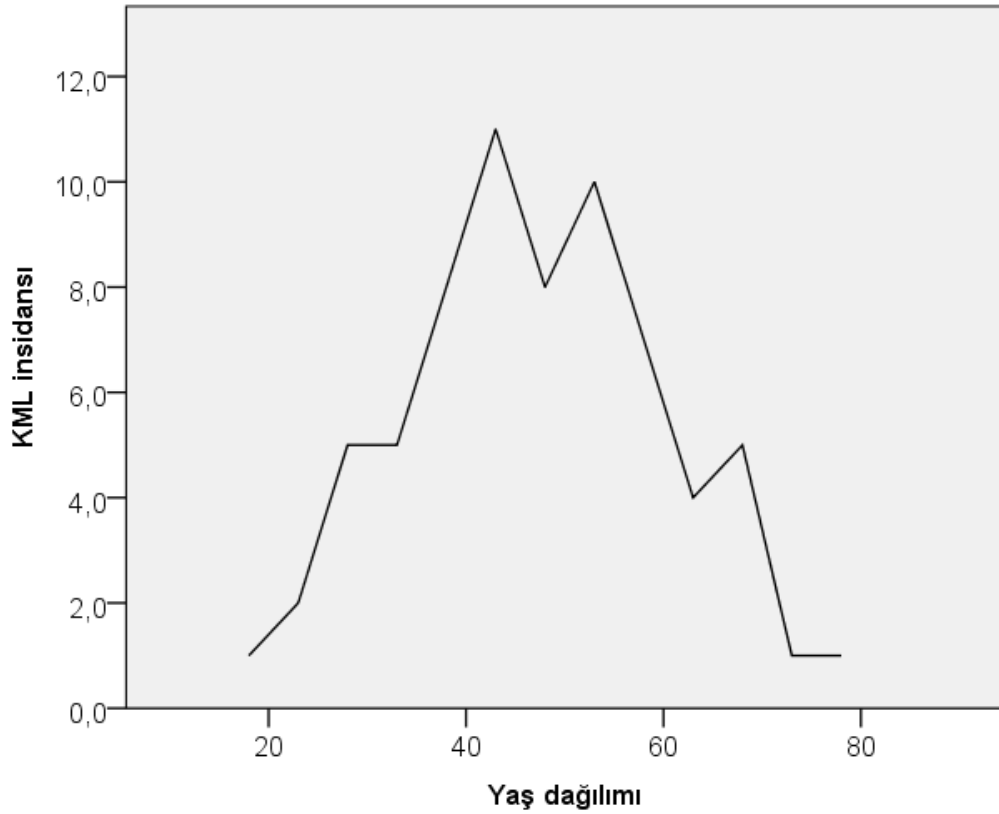
Çalışmamızda özellikle ADP (2 μ M), ADP (6 μ M) ve epinefrin ile uyarılan trombosit agregasyonunun, zaman ilerledikçe bozulduğu saptandı. Oda ısısında bekletilen örneklerde özellikle düşük doz ADP (2 μ M) ve epinefrin ile uyarılan agregasyonda 4. saatten sonra yanlış negatif sonuç alma oranının arttığı gözlemlendi. Güçlü agonist olan kollajen ve ristosetin ile uyarılan agregasyonun ise etkilenmediği tespit edildi. Çalışılan örneklerde 1. saatte elde edilen sonuçlar güvenilir kabul edilerek, 2, 4 ve 8. saatlerde kaç hastada yanlış negatif sonuç elde edildiği Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Trombosit fonksiyon testlerinde 2, 4 ve 8’inci saatlerde elde edilen yanlış negatif sonuçlar (n=20)

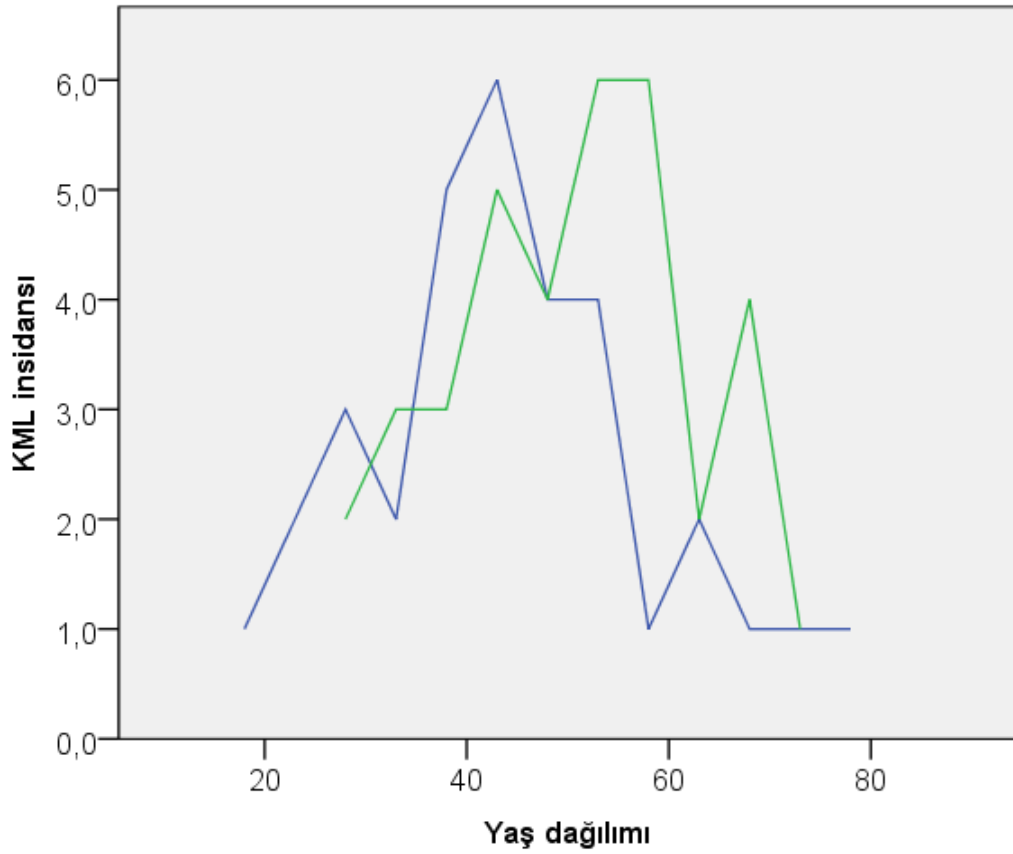
Yanlış negatif sonuç sayısı Agonistler	2. saat	4. saat	8. saat
ADP (2 μM)	1 (%5)	6 (%30)	13 (%65)
ADP (6 μM)	0	0	4 (%20)
Epinefrin	0	0	1 (%5)
Kollajen	0	0	0
Ristosetin (0,5 mg/ml)	0	0	0
Ristosetin (1,25 mg/ml)	0	0	0

4.2. KML Hastalarının Değerlendirilmesi

TKİ'nin koagülasyon testleri ve trombosit agregasyonu üzerine olan etkilerini analiz etmek için kronik fazda olan 36'sı kadın, 32'si erkek olmak üzere 68 KML çalışmaya dahil edildi. Bu hastaların 47'si imatinib, 15'i dasatinib ve 6'sı nilotinib tedavisi altında idi. Hastaların yaş ortalaması 47 (18-78 yaş) olarak bulundu. Hastaların %23,3'ü 60 yaş ve üzerinde, %10,3'ü 30 yaş ve altında yer almaktadır. Kadınlarda 45-60 yaşlarında (ortalama, 50), erkek hastalarda ise 40-50 yaş arasında insidans artışı olduğu saptandı (ortalama, 43). Kadın ve erkek hastalarının yaş ortalaması arasındaki fark anlamlı bulundu ($p<0,05$). Hastaların yaşlara ve cinsiyete göre dağılımları Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.1. KML hastalarının yaş dağılımları



Şekil 4.2. KML hastalarının cinsiyete göre yaş dağılımları (Mavi çizgi: Erkek, Yeşil Çizgi: Kadın)

TKİ kullanan kronik fazdaki KML hastalarının ait hemoglobin, hematokrit, MCV, lökosit, trombosit, MPV ve RDW değerleri Tablo 4.3'de verilmiştir. Bu hastaların %21'inde (14/68) hemoglobin, %24'ünde (16/68) hematokrit, %12'sinde trombosit (5/68) değerleri referans aralığına göre düşük bulundu. Lökosit değerleri ise hastaların %4,4'ünde (3/68) referans aralığının üzerinde idi. Bu hastaların %25'inde (17/68) MCV değerleri referans aralığının üzerinde, %4,4'ünde (3/68) referans aralığının altında bulundu. Hastaların %13,2'sinde (9/68) MPV değerleri referans aralığının altında, %44,1'inde (30/68) RDV değerleri referans aralığının üzerinde saptandı.

Tablo 4.3. Çalışmaya katılan hastaların tam kan analiz sonuçları
(Min:minimum, Maks:maksimum, SS:standart sapma)

	Min	Maks	Ortalama±SS	Referans Aralık
Yaş	18	78	47,0±13,4	-
Hemoglobin	8,9	17,9	13,0±1,7	11,7-15,5 gr/dl
Hematokrit	26,9	47,1	37,9±4,7	% 34,5-46,3
MCV	64	103	92,2±6,8	80,4-95,9 fL
Lökosit	2,1	19,5	6,7±2,5	4,1-11,2 x10 ³ /µL
PLT	103	456	234,7±74,5	159-388 x10 ³ /µL
MPV	5,3	11,3	7,5±1,1	6,5-11,6 fL
RDW	12,4	17,5	14,5±1,3	%11,7-14,6

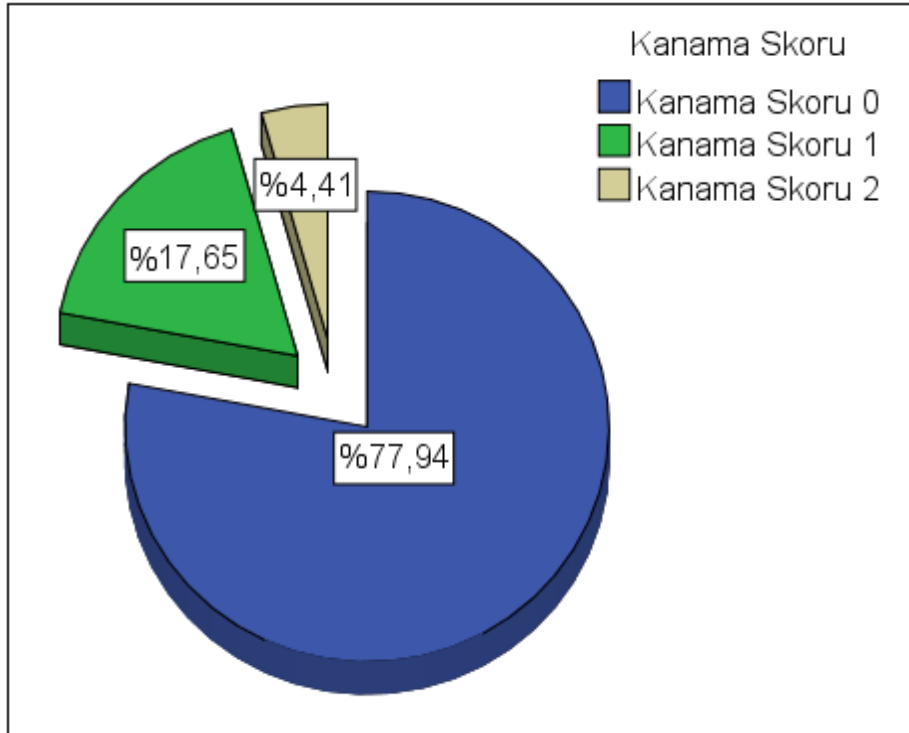
KML Hastalarına ait PT, aPTT, INR, TT, fibrinojen değerleri ve FVIII aktiviteleri Tablo 4.4’de verilmiştir. Bu hastaların %1,5’inde (1/68) PT, %3’ünde aPTT, %1.5’inde (1/68) TT değeri, referans aralığının üzerinde bulunmuştur. Bütün hastaların Faktör VIII değerleri ise normaldir.

Tablo 4.4. Çalışmaya katılan hastaların koagülasyon testlerinin sonuçları
(Min:minimum, Maks:maksimum, SS:standart sapma)

	Min	Maks	Ortalama±SS	Referans Aralık
PT	10,1	20,3	12,8±1,4	11,3-14,7 sn
INR	0,9	1,74	1,0±0,1	0,8-1,2
aPTT	20,0	33,0	27,6±2,8	22,8-32 sn
TT	10,2	22,1	16,5±2,0	14-21 sn
Fibrinojen	192	560	325,7±68,4	180-350 mg/dL
Faktör VIII	94	153	120,2±11,2	%70-150

Hastalara, von Willebrand hastalığı için kullanılan bir kanama anketi uygulandı. Hastaların; burun kanaması, cilt kanaması, minör yaraları, oral kavite kanamaları, gastrointestinal kanama, post-partum kanama, kas içi kanama/hemartroz, diş çekimi, cerrahi sonrası kanama ve adet kanama durumları incelendi. Anket sonuçlarına göre 2 burun kanaması, 5 cilt kanaması, 2 minör yara, 2 diş çekimi sonrasında uzamış kanama ve 5 uzamış adet kanaması olmak üzere toplam 16 hastada kanama saptandı (1 hastada hem burun kanama hem cilt semptomları mevcuttu).

Hastaların anket skorları toplanarak *kanama skoru* elde edildi; 15 hastanın 12'sinde (%17,65) kanama skoru 1 bulundu, 3'ünde ise (%4,41) kanama skoru 2 olarak tespit edildi. Kanama semptomu gösteren hastaların tümünde, kanama şiddeti anket pozitifliğini sağlamaya yetmeyecek düzeyde (kanama skoru<3) olduğu için "minör kanama" olarak kabul edildi. Kanama anketi sonuçları Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Kanama anketi uygulanan 68 KML hastasının kanama skorları

Kanama skorları ile TKİ kullanımı arasındaki ilişki incelendiğinde, İmatinib kullanan KML hastalarının (n=47) 12'sinde (%25.6), dasatinib kullanan KML hastalarının (n=15) 3'ünde (%20) minör kanama yakınmaları gözlemlendi. Nilotinib kullanan hastaların (n=6) hiçbirinde kanama bulgusu gözlenmedi. Toplamda TKİ kullanan 68 KML hastasının 15'inde (%22) kanama saptandı, bunun %17,6'sında kanama skoru 1 ve %4,4'ünde kanama skoru 2 bulundu (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. TKİ kullanımına göre kanama skorlarının değerlendirilmesi

			Kanama Skoru			Toplam
			0	1	2	
TKİ	İmatinib	N	35	10	2	47
		%	%74,5	%21,3	%4,3	%100,0
	Dasatinib	N	12	2	1	15
		%	%80,0	%13,3	%6,7	%100,0
	Nilotinib	N	6	0	0	6
		%	%100,0	%0,0	%0,0	%100,0
Toplam		N	53	12	3	68
		%	%77,9	%17,6	%4,4	%100,0

Çalışmamızda imatinib kullanan hastaların %29,8'inde (n=14), nilotinib kullanan hastaların %50'sinde (n=6), dasatinib kullanan hastaların %40'ında (n=3) trombosit fonksiyonları bozuk bulunmuştur. İmatinib kullanan hastalarda (n=47), ADP (2µM) ile indüklenen agregasyonda 12 kişide (%25,5) bozukluk gözlemlendi, dozun yükseltilmesiyle (ADP 6µM) agregasyon bozukluğu gösteren hastaların 9'unda (%19,1) düzelme izlenirken, 3'ünde (%6,4) düzelme gözlenmedi. Epinefrin ile indüklenen agregasyonların %17'sinde bozukluk gözlemlendi. Dasatinib kullanan hastalarda (n=15), ADP

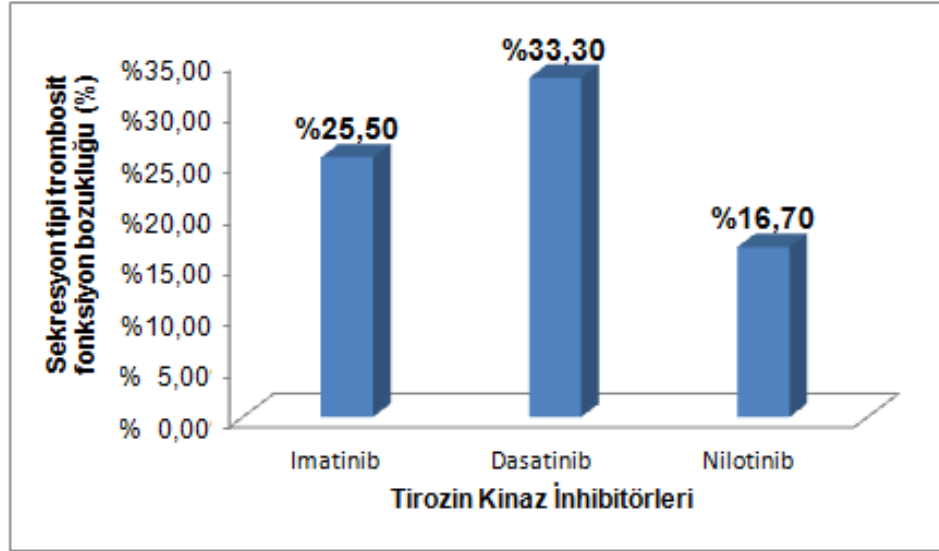
(2 μ M) ile indüklenen agregasyonda 5 kişide (%33,3) düşüklük gözlenirken, dozun yükseltilmesiyle (ADP 6 μ M) hastaların 1'inde (%6,6) düzelme gözlemlendi, 4'ünde (%26,6) ise düzelme saptanmadı. Epinefrin ile indüklenen agregasyonların %33,3'ünde agregasyon bozukluğu gözlemlendi. Nilotinib kullanan hastalarda (n=6), ADP (2 μ M) ile indüklenen agregasyonda 1 kişide (%16,6) düşük aktivite gözlenirken, ADP dozunun yükseltilmesiyle (6 μ M) agregasyon bozukluğunda bir düzelme izlenmedi. Epinefrin ile indüklenen agregasyonların %33,3'ünde agregasyon bozukluğu gözlemlendi. TKİ kullanan KML hastalarında trombosit fonksiyon testleri ile saptanan agregasyon bozuklukları Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6. TKİ kullanan KML hastalarında farklı agonistler ile saptanan trombosit fonksiyon bozuklukları (Epi:Epinefrin, Kol:Kollajen)

%	ADP (2 μ M)	ADP (6 μ M)	Epi	Kol	Ristosetin (0,6mg/ml)	Risto (1,25mg/ml)
İmatinib (n=47)	%25,5 12	%6,4 3	%17 8	%4,2 2	%0 0	%4,2 2
Dasatinib (n=15)	%33,3 5	%26,6 4	%33,3 5	%13,3 2	%6,6 1	%0 0
Nilotinib (n=6)	%16,6 1	%16,6 1	%33,3 2	%0 0	%0 0	%0 0

Elde edilen bu sonuçlar, trombosit fonksiyon bozukluk tiplerine göre incelendi ve yorumlandı. İmatinib kullanan hastaların %25,5'inde (n=12); dasatinib kullanan hastaların %33,3'ünde (n=5); nilotinib kullanan hastaların ise %16,7'sinde (n=1) *sekresyon tipi bozukluk* saptandı. Toplam olarak KML hastalarının %26'sında (18/68) *sekresyon tipi* trombosit fonksiyon bozukluğu gözlemlendi. *Sekresyon tipi bozukluk*, ADP (2 μ M) ile indüklenen agregasyonda sekonder dalga gözlenmemesi ve epinefrin ile indüklenen agregasyonda azalmış sonuç gözlenmesiyle karakterize bir fonksiyon bozukluk tipidir.

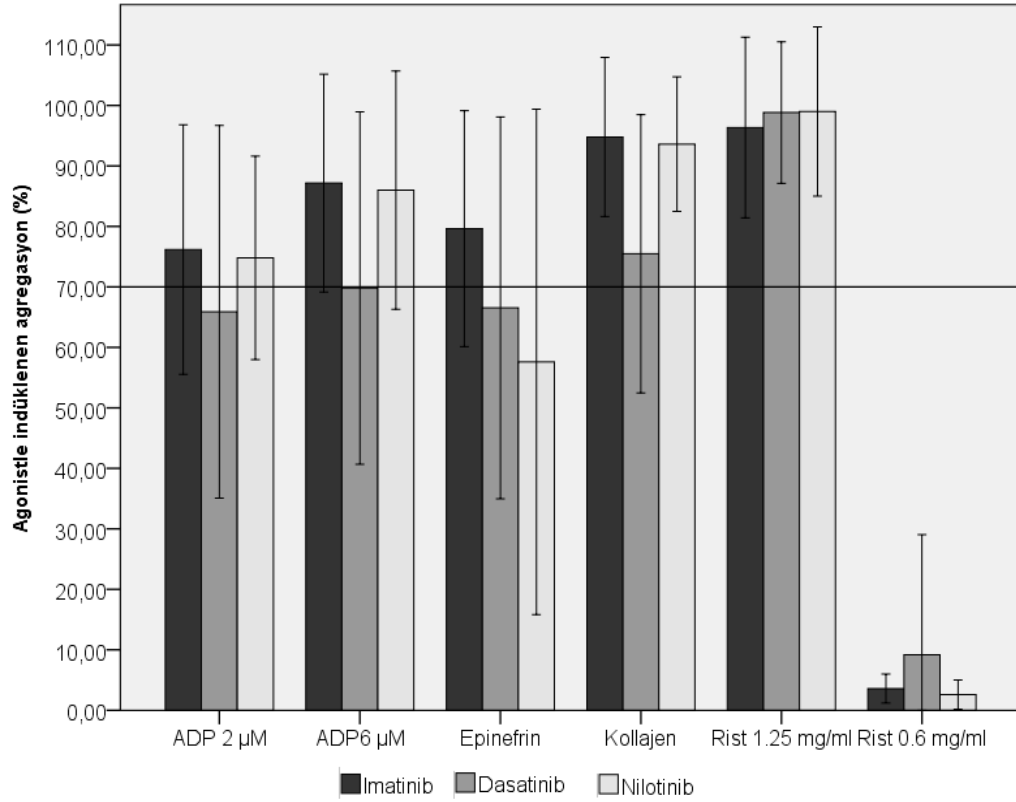
TKİ kullanımına bağlı görülen sekresyon tipi trombosit fonksiyon bozukluğu Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4. TKİ kullanan KML hastalarında görülen sekresyon tipi trombosit fonksiyon bozukluğu

TKİ'leri kendi aralarında karşılaştırıldığında; dasatinib, imatinibe göre ADP (2 ve 6 μ M), epinefrin ve kollajen ile indüklenen trombosit agregasyonunu daha fazla bozmaktadır, ancak bu fark anlamlı değildir. Nilotinib, imatinibe göre ADP, kollajen ve ristosetine yanıtı etkilememekte, sadece epinefrin ile indüklenen trombosit agregasyonunu bozmaktadır, ancak bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). İmatinib, Dasatinib ve Nilotinib kullanan hastalarda ADP, epinefrin, kollajen ve ristosetin ile indüklenen trombosit agregasyon yüzdeleri Şekil 4.5'de verilmiştir.

Tirozin kinaz inhibitörleri ile trombosit fonksiyon defektleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını anlamak için Pearson Ki-kare testi uygulandı. Farklı tirozin kinaz inhibitörleri kullanan KML hastalarının trombosit fonksiyonları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Çalışmadaki tüm hastalar birlikte değerlendirildiğinde TKİ'lerin trombosit fonksiyonlarını %26,5 oranında bozmakta olduğu saptandı.



Şekil 4.5. İmatinib, Dasatinib ve Nilotinib kullanan hastalarda ADP, epinefrin, kollajen ve ristosetin ile indüklenen trombosit agregasyon yüzdeleri

TKİ kullanan KML hastalarında zaman zaman kanama gözlenmektedir. Bu kanamanın sebebinin trombosit disfonksiyonu olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada KML hastalarının trombosit fonksiyonları ve kanama bulguları arasında ilişki olup olmadığını incelemek için korelasyon analizi yapıldı. Çalışmaya katılan bütün hastaların; trombosit fonksiyon durumlarıyla kanama bulguları arasında negatif yönde zayıf bir ilişki bulundu ($r:-0,158$). İmatinib kullanan hastalarda negatif yönde zayıf bir ilişki bulunurken ($r:-0,231$), dasatinib ve nilotinib kullanan hastalarda ilişki bulunmadı.

İmatinib kullanan hastaların kanama durumlarının trombosit fonksiyonları ile olan ilişkisi Tablo 4.7’de verilmiştir. Kanaması olan hastaların %91,7’sinin trombosit fonksiyonları normal bulunmuştur, %8,3’ünde sekresyon bozukluğu gözlenmiştir. Kanaması olmayan hastaların ise %68,6’sının trombosit fonksiyonu normal bulunmuş, %31’inde sekresyon bozukluğu gözlenmiştir. Kanaması olmayan hastalarda trombosit fonksiyon bozukluğunun oransal olarak daha fazla gözlenmiş olması, korelasyonda negatif yönde bir ilişki bulunmasına neden olmuştur ($r:-0,231$).

Tablo 4.7. İmatinib kullanan KML hastalarının trombosit fonksiyonları ile kanama durumlarının karşılaştırılması

			Kanama Durumu		Toplam
			Kanama Yok	Kanama Var	
İmatinib	Normal TFT	N	24	11	35
		%	68,6	%91,7	%74,5
	Sekresyon bozukluğu	N	11	1	12
		%	%31,4	%8,3	%25,5
Toplam		N	35	12	47
		%	%100	%100	%100

Dasatinib kullanan hastaların kanama durumlarının trombosit fonksiyonları ile olan ilişkisi Tablo 4.8’de verilmiştir. Kanaması olan hastaların %66,6’sının trombosit fonksiyonları normal bulunmuştur, %33,3’ünde sekresyon bozukluğu gözlenmiştir. Bu oranlar, kanaması olmayan hastalar için de geçerlidir. Kanaması olan hastalarla olmayan hastalar arasında bir korelasyona rastlanmamıştır ($r:0,00$).

Tablo 4.8. Dasatinib kullanan KML hastalarının trombosit fonksiyonları ile kanama durumlarının karşılaştırılması

			Kanama Durumu		Toplam
			Kanama Yok	Kanama Var	
Dasatinib	Normal	N	8	2	10
		%	%66,6	%66,6	%66,6
	Sekresyon bozukluğu	N	4	1	5
		%	%33,3	%33,3	%33,3
Toplam		N	12	3	15
		%	%100	%100	%100

Nilotinib kullanan hastaların hiç birinde kanama gözlenmedi ancak hastaların %16,6'sının trombosit fonksiyonu bozuk bulundu. Nilotinib için, kanama yakınması olan hasta olmadığından, trombosit fonksiyonu ile kanama durumu arasında da bir ilişki bulunamadı (Tablo 4.9).

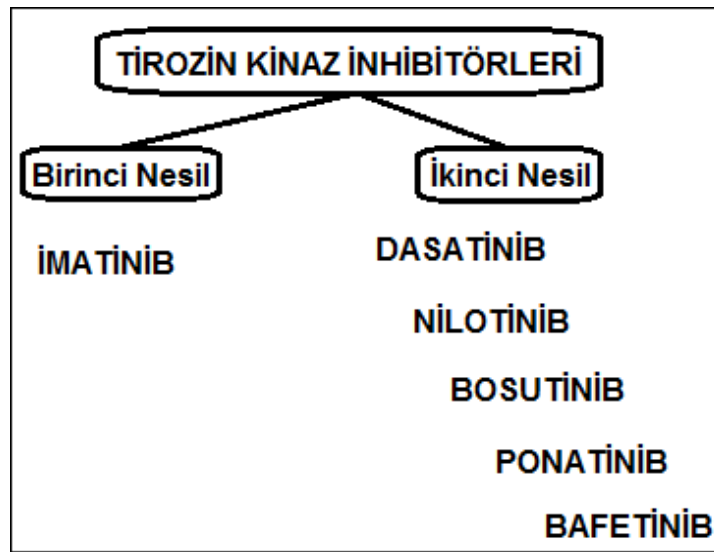
Tablo 4.9. Nilotinib kullanan KML hastalarının trombosit fonksiyonları ile kanama durumlarının karşılaştırılması

			Kanama Durumu	Toplam
			Kanama Yok	
Nilotinib	Normal TFT	N	5	5
	Sekresyon bozukluğu	N	1	1
Toplam		N	6	6

5. TARTIŞMA

Kronik miyeloid lösemi (KML), miyeloid öncül hücrelerin artmış proliferasyonu ve azalan apoptozisi ile seyreden klonal neoplastik bir hastalıktır. Hastalık gelişim ve seyrinde temel patogenetik olay Philadelphia kromozomu t(9;22) varlığıdır. KML'nin günümüzdeki tedavisi kronik tirozin kinaz inhibisyonudur (TKİ). Ülkemizde mevcut oral tirozin kinaz inhibitörleri İmatinib (Gleevec), Dasatinib (Tasigna), ve Nilotinib (Sprycel)'dir. Erken kronik faz KML'de birinci basamak imatinib tedavisine yanıtın değerlendirmesi *European Leukemia Net (ELN)* ölçütlerine göre yapılmaktadır. Birinci nesil TKİ olan imatinib tedavisine intolerans veya direnç gelişimi gözleendiğinde, ikinci nesil tirozin kinaz inhibitörlerine geçilmesi önerilmektedir. Birinci ve ikinci nesil TKİ'leri Şekil 5.1'de verilmiştir. İkinci nesil TKİ kullanımı sırasında hastanın klinik ve laboratuvar takibi yapılır ve yeterli yanıt alınmadığında uygun donör bulunan hastalar için allojenik kök hücre transplantasyonu planlanır (45).

KML tedavisinde TKİ'lerin kullanıma girmesiyle hastalıkta hayatta kalım büyük oranda artmıştır; hastalığın kronik fazı 3-5 yıldan 25 yıl ve üzerine uzamıştır. Hastaların akselere fazda kalma süresi 12-18 aydan 4-5 yıla, blastik fazda kalma süreleri 3-9 aydan 6-12 aya uzamıştır.



Şekil 5.1. Tirozin kinaz inhibitörleri

Kronik faz KML hastalarında zaman zaman görülen kanama nedeninin, TKİ'lerin yol açtığı trombosit fonksiyon bozukluğu olduğunu ileri süren az sayıda çalışma mevcuttur. Özellikle daha potent olan ikinci nesil TKİ'lerin, hematolojik toksisitesinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir (45). TKİ kullanan KML hastalarında bugüne kadar yapılan çalışmalarda TFT sonuçları ile hastaların kanama bulguları arasında bir ilişkilendirme yapılmamıştır. Bu amaçla bu tez çalışmasında, birinci ve ikinci nesil TKİ kullanan kronik faz KML hastalarında (n=68) trombosit fonksiyonlarının durumu ile kanama bulguları arasında bir ilişki olup olmadığı incelenmiştir. Bu amaçla 47 İmatinib, 15 Dasatinib ve 6 Nilotinib kullanan hasta çalışmaya alınmıştır. Birinci nesil TKİ olan İmatinibe direnç geliştiği durumlarda ikinci nesil ilaçlara geçilmesi nedeniyle Dasatinib ve Nilotinib kullanan gruptaki hastaların sayısı daha düşüktür.

Trombosit fonksiyonlarının doğru bir şekilde değerlendirilebilmesi için hastalardan alınan ve oda ısıda bekletilen kanın en geç 4 saat içerisinde test edilmesi gerektiği literatürde bildirilmektedir, ancak zaman geçtikçe hangi agonistlere yanıt olarak trombosit fonksiyonlarının bozulduğuna dair bir bilgi kaynaklarda yer almamaktadır (46). Çalışmaya başlamadan önce, sağlıklı gönüllülerden alınan kan örneklerinin ne kadar süre stabil kalabileceğini test etmek amacıyla stabilizasyon çalışmaları yapıldı. Bunun için oda sıcaklığında bekletilen kanlarda, 0, 2, 4 ve 8. saatlerde trombosit fonksiyonlarına bakıldı. Bu çalışmada, düşük doz ADP (2 μ M) ile indüklenen agregasyonun, 2. saatte %5, 4. saatte %30 ve 8. saatte %65 oranında yanlış negatif sonuç verdiği gözlemlendi. Yüksek doz ADP (6 μ M) ile sadece 8.saatte %20 oranında yanlış negatif sonuç elde edildi. Epinefrin ile indüklenen agregasyonun 2. ve 4. saatte değişmediği, 8. saatte ise %5 oranında yanlış negatif sonuca yol açtığı gözlemlendi. Kollajen ve ristosetin ile indüklenen agregasyon grafiklerinde 2., 4. ve 8. saatlerde hiçbir yanlış negatif sonuç elde edilmedi. Bu sonuçlara göre, oda ısısında bekleyen örneklerde düşük doz ADP ile indüklenen agregasyonun ilk 4 saat içinde bozulduğu, yüksek doz ADP, epinefrin, kollajen ve ristosetin ile indüklenen agregasyonun daha stabil kaldığı saptandı. Trombosit fonksiyon testlerinin 4 saat içinde yapılması ve ADP ile

indüklenen agregasyon testlerine öncelik tanınması, yanlış negatif sonuç eldesini en aza indirecektir.

KML ile ilgili yayınlar incelendiğinde, yaş dağılımı hastaların hayatta kalımı ile orantılı olarak değişkenlik göstermektedir. Bazı batı ülkelerinde KML hastalarının yaş dağılımı 50-60 yıl arasında değişebilirken, bazı doğu ülkelerinde bu yaş aralığı 35-40 yıl arasındadır (47,48). KML sıklığı incelenirken ülkeler, coğrafik bölgeler ve finansal farklılıklar göz önüne alınmalıdır. Bizim çalışmamızda hastaların yaş ortalaması 35-55 yıl arasında yoğunluk göstermektedir (ortalama 47 yıl). Cinsiyetler arasındaki yaş dağılımı incelendiğinde kadınlarda 40-60 yaşlarında (ortalama, 50), erkek hastalarda 35-50 yaş arasında yoğunluk olduğu saptanmıştır (ortalama, 43). Kadın ve erkek hastalarının yaş ortalaması arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Literatürde yer alan çalışmalarda, KML'nin erkeklerde daha sık görüldüğü saptanmakla birlikte, bizim çalışmamızda ise bunun aksine erkek/kadın oranı 0,88/1 bulunmuştur (1,5).

Çalışmaya dahil edilen hastalara, kanama durumlarının ve bu kanamaların şiddetinin anlaşılması için kanama anketi uygulandı. Kanama anketi, hastaların kanama durumlarının, bilimsel bir temelde değerlendirilmesi, verilerin standardizasyonu ve TFT sonuçları ile korelasyonunun incelenmesi için yapılmıştır.

TKİ kullanan KML hastalarına uygulanan kanama anketi sonucu, hastaların %22'sinde ($n=15$), anket pozitifliğini sağlamaya yetmeyen (kanama skoru <3), minör kanama yakınmaları gözlenmiştir. İmatinib kullanan hastaların %25,6'sında ($n=12$) ve dasatinib kullanan hastaların %20'sinde ($n=3$) minör kanama durumu gözlenmiş ancak Nilotinib kullanan hastaların hiçbirinde kanamaya rastlanmamıştır.

Quintas-Cardama ve ark. TKİ'lerin trombosit fonksiyonları üzerinde olan etkilerini incelemiş ve imatinib kullanan KML hastalarının %66,6'sında anormal trombosit fonksiyonu gözlemlenmiş, nilotinib kullananlarda ise hiçbir trombosit fonksiyon bozukluğu gözlemlenmemiştir (2). Bizim çalışmamızda ise, imatinib kullanan hastaların %29,8'inde ($n=33$), nilotinib kullanan

hastaların %50'sinde (n=3), dasatinib kullanan hastaların %40'ında (n=9) trombosit fonksiyonları anormal bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda TKİ kullanan KML hastalarının trombosit fonksiyonları incelendiğinde, imatinib grubunda %25,5, dasatinib grubunda %33,3 ve nilotinib grubunda %16,7 oranında *sekresyon tipi* trombosit fonksiyon bozukluğu gözlenmiştir. *Sekresyon tipi bozukluk*; sekonder agregasyon dalgasının düşük ADP konsantrasyonunda izlenmemesi, yüksek doz ADP uygulandığında ise yeniden gözlenmesi ile karakterizedir. *Sekresyon tipi bozukluk* gösteren bu hastaların %50'sinde epinefrin ile sekonder agregasyon kaybı izlenmiştir.

Quintas-Cardama ve ark.'nın Dasatinib kullanan 138 hastada yaptıkları çalışmada (%35 blast faz, %31 akselere faz, %12 kronik faz) %23 hastada kanama saptanmıştır, bunların %7'sinde kanama skoru 3'ün üzerinde bulunmuştur. Kanama saptanan bu hastaların %97'sinde temel koagülasyon testleri normal bulunmuştur. Kronik fazda olan bu hastaların, %37,5'inde üst gastrointestinal kanama, %62,5'inde alt gastrointestinal kanama, %12,5'inde diş eti kanaması ve %12,5'inde uzamış adet kanaması gözlenmiştir (3).

Bizim çalışmamızda kronik fazdaki 68 KML hastasının %94'ünde temel koagülasyon testleri normal bulunmuş ve hastaların %22'sinde minör kanama gözlenmiştir; %17,7'sinde kanama skoru 1, %4,4'ünde kanama skoru 2 bulunmuştur. İmatinib kullanan ve kanaması olanların (n=12); %91,7'sinde (n=11) koagülasyon testleri ve TFT sonuçları normal bulunmuştur. İmatinib kullanan ve kanama gözlenen hastalar arasında burun kanaması %16,6 (n=2), cilt kanaması %33,3 (n=4), minör yara %16,6 (n=2), diş eti kanaması %16,6 (n=2), uzamış adet kanaması %25 (n=3) oranında rastlanmıştır. Dasatinib kullanan ve kanaması olan hastaların (n=3); %66,6'sında (n=2) koagülasyon ve TFT sonuçları normal bulunmuştur. Kanama gösteren dasatinib hastalarının (n=3); %33,3'ünde (n=1) cilt semptomları, %66,6'sında (n=2) uzamış adet kanamaları saptanmıştır. Nilotinib kullananlarda ise hiç kanama semptomu gözlenmemiştir.

Bizim çalışmamızda, imatinib kullanan hastalarda düşük konsantrasyonda ADP (2 μ M) ile indüklenen agregasyonda %25,5, epinefrin ile indüklenen agregasyonda ise %17 oranında bozukluk saptanmıştır. Dasatinib kullanan hastalarda epinefrin ile indüklenen agregasyonda %33,3 oranında bir bozukluk olduğu saptadı. Quintas-Cardamave ark (2) dasatinib için, epinefrin ile indüklenen agregasyonda inhibisyonun gözlemlendiğini belirtmişlerdir (2). Dasatinib sonucumuz Quintas-Cardama'nın çalışması ile uyumludur (2). Quintas-Cardama ve ark. çalışmalarında dasatinib grubunda ADP ile ilgili bir bozukluk saptamadıkları halde biz çalışmamızda ADP (2 μ M) ile indüklenen agregasyonda %33,3 oranında bozukluk saptadık. Quintas-Cardama'nın çalışmasında trombosit fonksiyon bozukluğuna yol açmayan nilotinib (2), bizim çalışmamızda epinefrinde %33,3, ADP'de ise %16,6'lık bir oranla agregasyonda azalmaya neden olmuştur.

Araştırmacılar, kronik fazdaki KML hastalarında; koagülasyon ve kan değerlerinin normal olmasına karşın kanama gözlenmesinin, TKİ'lerin trombosit fonksiyonlarını bozmasından kaynaklanabileceğini düşünmektedirler. Bu çalışmada, TKİ'lerin trombosit fonksiyonlarını, *sekresyon tipi bozukluğa* neden olarak bozduğu doğrulanmıştır ancak kanama anketi ile elde edilen bulgular, trombosit fonksiyon sonuçlarıyla kıyaslandığında anlamlı bir korelasyona rastlanmamıştır. Sonuç olarak, tirozin kinaz inhibitörlerinin trombosit fonksiyon bozukluğuna yol açtığı saptanmış ancak bu bozuklukların kanama eğilimi ile bir ilişkisinin olmadığı görülmüştür. Klinik bir bulgu olan kanama diyatezine yalnızca laboratuvar bulguları sonuçlarıyla karar verilmesinin doğru olmadığını düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

- Kronik fazdaki 68 KML hastasının %94'ünde temel koagülasyon testleri normal iken hastaların %22'sinde minör kanama gözlenmiştir; bu hastaların %17,7'sinde kanama skoru 1, %4,4'ünde kanama skoru 2 bulunmuştur.

- İmatinib kullanan hastaların %25,6'sında ve dasatinib kullanan hastaların %20'sinde minör kanama durumu gözlenmiş ancak Nilotinib kullanan hastaların hiçbirinde kanamaya rastlanmamıştır.

- İmatinib grubunda %25,5, dasatinib grubunda %33,3 ve nilotinib grubunda %16,7 oranında *sekresyon tipi* trombosit fonksiyon bozukluğu gözlenmiştir.

- İmatinib kullanan ve kanaması olan hastaların %91,7'sinde koagülasyon testleri ve TFT sonuçları normal bulunmuştur.

- Dasatinib kullanan ve kanaması olan hastaların %66,6'sında koagülasyon ve TFT sonuçları normal bulunmuştur.

- Tirozin kinaz inhibitörleri trombosit fonksiyon bozukluğuna yol açmaktadır, bu etki özellikle ikinci jenerasyon TKİ'lerde daha belirgindir. Ancak trombosit fonksiyon bozukluğu ile hastalarda görülen kanama diyatezleri arasında korelasyon saptanamamıştır.

- Klinik bir bulgu olan kanama diyatezi tanısı için sadece laboratuvar sonuçları yeterli değildir, klinik bulgular ve kanama anketi ile birlikte değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Apperley, J.F. (2015) Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*, 385 (9976), 1447-1459.
2. Quintas-Cardama, A., Han, X., Kantarjian, H., Cortes, J. (2009) Tyrosine kinase inhibitor-induced platelet dysfunction in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*, 114 (2), 261-263.
3. Quintas-Cardama, A., Kantarjian, H., Ravandi, F., O'Brien, S., Thomas, D., Vidal-Senmache, G. ve diğerleri. (2009) Bleeding diathesis in patients with chronic myelogenous leukemia receiving dasatinib therapy. *Cancer*, 115 (11), 2482-2490.
4. Huang, X., Cortes, J., Kantarjian, H. (2012) Estimations of the increasing prevalence and plateau prevalence of chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Cancer*, 118 (12), 3123-3127.
5. Savage, D.G., Szydlo, R.M., Goldman, J. (1997) Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *British journal of haematology*, 96 (1), 111-116.
6. Litzow, M.R. (2006) Imatinib resistance: obstacles and opportunities. *Arch Pathol Lab Med*, 130 (5), 669-679.
7. Neves, H., Ramos, C., da Silva, M.G., Parreira, A., Parreira, L. (1999) The Nuclear Topography of ABL, BCR, PML, and RAR α Genes: Evidence for Gene Proximity in Specific Phases of the Cell Cycle and Stages of Hematopoietic Differentiation. *Blood*, 93 (4), 1197-1207.
8. Saglio, G., Storlazzi, C.T., Giugliano, E., Surace, C., Anelli, L., Rege-Cambrin, G. ve diğerleri. (2002) A 76-kb duplison maps close to the BCR gene on chromosome 22 and the ABL gene on chromosome 9: possible involvement in the genesis of the Philadelphia chromosome translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (15), 9882-9887.
9. Pane, F., Intrieri, M., Quintarelli, C., Izzo, B., Muccioli, G.C., Salvatore, F. (2002) BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations. *Oncogene*, 21 (56), 8652-8667.
10. Deininger, M.W., Goldman, J.M., Melo, J.V. (2000) The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96 (10), 3343-3356.
11. Saglio, G., Cilloni, D. (2004) Abl: the prototype of oncogenic fusion proteins. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 61 (23), 2897- 2911.
12. Fabbro, D. (2012) BCR-ABL signaling: a new STATUS in CML. *Nature chemical biology*, 8 (3), 228-229.
13. Lippi, G., Favaloro, E.J., Franchini, M., Guidi, G.C. (2009). Milestones and perspectives in coagulation and hemostasis [Bildiri]. *Seminars in thrombosis and hemostasis*.
14. Lippi, G., Franchini, M., Guidi, G.C. (2007) Diagnostic approach to inherited bleeding disorders. *Clinical Chemical Laboratory Medicine*, 45 (1), 2-12.

15. Engelmann, B., Massberg, S. (2013) Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13 (1), 34-45.
16. Italiano, J., Shivdasani, R. (2003) Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1 (6), 1174-1182.
17. EIGENTHALER, M., NOLTE, C., HALBRÜGGE, M., WALTER, U. (1992) Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets. *European Journal of Biochemistry*, 205 (2), 471-481.
18. Gorman, R., Fitzpatrick, F., Miller, O. (1977) Reciprocal regulation of human platelet cAMP levels by thromboxane A₂ and prostacyclin. *Advances in cyclic nucleotide research*, 9, 597-609.
19. Haslam, R.J., Dickinson, N.T., Jang, E.K. (1999) Cyclic nucleotides and phosphodiesterases in platelets. *Thromb Haemost*, 82 (2), 412-423.
20. Mills, D., Smith, J. (1971) The influence on platelet aggregation of drugs that affect the accumulation of adenosine 3': 5'-cyclic monophosphate in platelets. *Biochem. J*, 121, 185-196.
21. Engin Tutar, G.t., Sedat Öktem. (2000) *Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dergisi*.
22. Daniel, J.L., Dangelmaier, C.A., Selak, M., Smith, J.B. (1986) ADP stimulates IP₃ formation in human platelets. *FEBS letters*, 206 (2), 299-303.
23. MacKenzie, A.B., Mahaut-Smith, M.P., Sage, S.O. (1996) Activation of Receptor-operated Cation Channels via P₂ Not P Purinoceptors in Human Platelets. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (6), 2879-2881.
24. Fischer, T.H., Gatling, M., Lacal, J., White, G. (1990) rap1B, a cAMP-dependent protein kinase substrate, associates with the platelet cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, 265 (32), 19405-19408.
25. Léon, C., Hechler, B., Freund, M., Eckly, A., Vial, C., Ohlmann, P. ve diğerleri. (1999) Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P₂Y₁ receptor-null mice. *Journal of Clinical Investigation*, 104 (12), 1731.
26. Fabre, J.-E., Nguyen, M., Latour, A., Keifer, J.A., Audoly, L.P., Coffman, T.M. ve diğerleri. (1999) Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P₂Y₁-deficient mice. *Nature medicine*, 5 (10), 1199-1202.
27. Cattaneo, M., Gachet, C. (1999) ADP receptors and clinical bleeding disorders. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 19 (10), 2281-2285.
28. Cattaneo, M., Zighetti, M.L., Lombardi, R., Martinez, C., Lecchi, A., Conley, P.B. ve diğerleri. (2003) Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P₂Y₁₂ receptor of a patient with congenital bleeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (4), 1978-1983.

29. Nurden, P., Savi, P., Heilmann, E., Bihour, C., Herbert, J., Maffrand, J. ve diğerleri. (1995) An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. Its influence on glycoprotein IIb-IIIa complex function. *Journal of Clinical Investigation*, 95 (4), 1612.
30. Hallam, T., Daniel, J., Kendrick-Jones, J., Rink, T. (1985) Relationship between cytoplasmic free calcium and myosin light chain phosphorylation in intact platelets. *Biochem. J*, 232, 373-377.
31. Murata, T., Ushikubi, F., Matsuoka, T., Hirata, M., Yamasaki, A., Sugimoto, Y. ve diğerleri. (1997) Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature*, 388 (6643), 678-682.
32. Law, D.A., DeGuzman, F.R., Heiser, P., Ministri-Madrid, K., Killeen, N., Phillips, D.R. (1999) Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in $\alpha\text{IIb}\beta 3$ signalling and platelet function. *Nature*, 401 (6755), 808-811.
33. Dodelet, V.C., Pasquale, E.B. (2000) Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis to tumorigenesis. *Oncogene*, 19 (49), 5614-5619.
34. Gerety, S.S., Wang, H.U., Chen, Z.-F., Anderson, D.J. (1999) Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Molecular cell*, 4 (3), 403-414.
35. Adams, R.H., Klein, R. (2000) Eph receptors and ephrin ligands: essential mediators of vascular development. *Trends in cardiovascular medicine*, 10 (5), 183-188.
36. Holland, S.J., Gale, N.W., Gish, G.D., Roth, R.A., Songyang, Z., Cantley, L.C. ve diğerleri. (1997) Juxtamembrane tyrosine residues couple the Eph family receptor EphB2/Nuk to specific SH2 domain proteins in neuronal cells. *The EMBO journal*, 16 (13), 3877-3888.
37. Huynh-Do, U., Stein, E., Lane, A.A., Liu, H., Cerretti, D.P., Daniel, T.O. (1999) Surface densities of ephrin-B1 determine EphB1-coupled activation of cell attachment through $\alpha\text{v}\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins. *The EMBO journal*, 18 (8), 2165-2173.
38. Lin, D., Gish, G.D., Songyang, Z., Pawson, T. (1999) The carboxyl terminus of B class ephrins constitutes a PDZ domain binding motif. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (6), 3726-3733.
39. Torres, R., Firestein, B.L., Dong, H., Staudinger, J., Olson, E.N., Haganir, R.L. ve diğerleri. (1998) PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. *Neuron*, 21 (6), 1453-1463.
40. Courtesy of Kathy Jacobs, C., Inc.
41. Harrison, P., Mackie, I., Mumford, A., Briggs, C., Liesner, R., Winter, M. ve diğerleri. (2011) Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *British journal of haematology*, 155 (1), 30-44.
42. Panteleev, M.A., Dashkevich, N.M., Ataulakhanov, F.I. (2015) Hemostasis and thrombosis beyond biochemistry: roles of geometry, flow and diffusion. *Thrombosis research*, 136 (4), 699-711.

43. Born, G. (1962) Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, 194 (4832), 927-929.
44. Cattaneo, M. (2009). Light transmission aggregometry and ATP release for the diagnostic assessment of platelet function [Bildiri]. *Seminars in thrombosis and hemostasis*.
45. Haznedaroğlu, İ.C. (2012) Kronik faz kronik myeloid lösemi'de ikinci nesil tirozin kinz inhibitörlerinin kullanımı. *Türk Hematoloji Derneği*.
46. Favalaro, E.J., Lippi, G., Franchini, M. (2010) Contemporary platelet function testing. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 48 (5), 579-598.
47. Kumar, L. (2006) Chronic myelogenous leukaemia (CML): an update. *The National medical journal of India*, 19 (5), 255-263.
48. Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians*, 55 (2), 74-108.

EKLER**EK 1. Etik Kurul Onayı****EK 2. Sözlü Sunum (Burslu)**

XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi

3-6 Kasım 2015, Susesi Otel, Antalya

Bildiri başlığı: Tirozin kinaz inhibitörü kullanan KML hastalarında trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesi

EK 1. Etik Kurul Onayı



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 408

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 01.04.2015 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2015/07
Proje No : GO 15/221 (Değerlendirme Tarihi: 18.03.2015)
Karar No : GO 15/221 - 31

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç Dr. Z. Günnur DİKMEN'in sorumlu araştırmacısı olduğu, Yigit ŞENER'in yüksek lisans tezi olan, Prof.Dr. Yahya BÜYÜKAŞIK, Prof.Dr. Filiz AKBIYIK ve Uzun Dr. M. Seda AYDIN ile birlikte çalışacakları, GO 15/221 kayıt numaralı ve "*Tirozin Kinaz İnhibitörlerini Kullanan Kronik Myeloid Lösemi Hastalarında Trombosit Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | | |
|--|--|-----------------------------------|
| 1. Prof. Dr. Nürten Akarsu (Başkan) | İZİNLI | 9. Prof. Dr. Rahime Nohutçu (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken (Üye) | 10. Prof. Dr. R. Koksul Özgül (Üye) | |
| 3. Prof. Dr. M. N. N. Sara (Üye) | 11. Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye) | |
| 4. Prof. Dr. Sevdâ F. Müftüoğlu (Üye) | 12. Doç. Dr. S. Kulay Demirkan (Üye) | |
| 5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer (Üye) | İZİNLI | 13. Prof. Dr. Leyla Dinç (Üye) |
| 6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye) | 14. Prof. Dr. Hatice Doğan Buzoğlu (Üye) | |
| 7. Prof. Dr. Ali Düzova (Üye) | İZİNLI | 15. Av. Meltem Onurlu (Üye) |
| İZİNLI | | |
| 8. Yrd. Doç. Dr. H. Hüseyin Turnagöl (Üye) | | |

