

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İDİOPATİK TROMBOSİTOPENİK PURPURA (ITP)
HASTALIĞINDA, TROMBOSİT YÜZEYİ VE SERUMDA
OTOANTİKOR VARLIĞININ KLİNİK İLE İLİŞKİSİ

123720

Bio. Mehtap ERDOĞAN

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
HEMATOLOJİ BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

123720

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hamdi AKAN

TC YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

2002 - ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Hematodiagnostik Yüksek Lisans Programı

Çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından

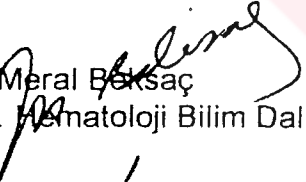
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

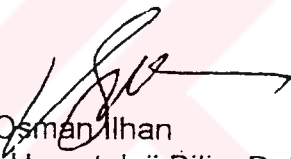
Tez Savunma Tarihi : 17.09. 2002


Prof. Dr. Hamdi Akan

A.Ü.Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı

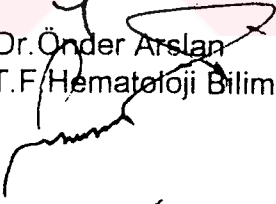
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Meral Bektaş
A.Ü.T.F. Hematoloji Bilim Dalı


Prof. Dr. Osman İlhan
A.Ü.T.F. Hematoloji Bilim Dalı


Prof. Dr. Onur Onaran
A.Ü.T.F. Biyofizik A.B.D.

Farmakoloji


Doç. Dr. Önder Arslan
A.Ü.T.F. Hematoloji Bilim Dalı

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında, araştırmanın planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında bana bilimsel katkılarıyla destek olan tez hocam sayın Prof.Dr. Hamdi AKAN'a , bu alanda yetişmemde büyük katkısı olan, desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Hematoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi ve Laboratuvar Sorumlusu hocam sayın Prof.Dr. Meral BEKSAÇ'a, laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen hocam Prof.Dr. Ogun ONARMAN ve Moleküler Biyoloji ve Teknolojileri Araştırma ve Geliştirme Birimi çalışanlarına, yine laboratuvar çalışmasında fikirlerinden yararlandığım sayın Uzm.Dr.Klara Dalva'ya, çalışma arkadaşlarıma ve de manevi yönden destek olan aileme teşekkür ederim.

Biyolog Mehtap ERDOĞAN

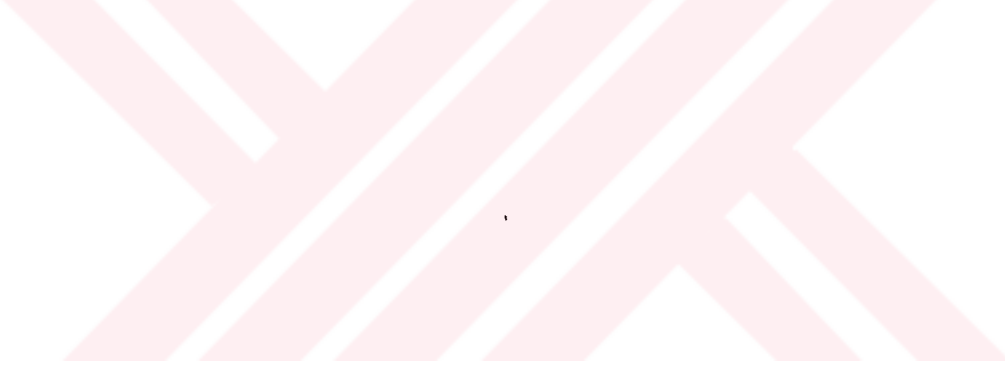
02.07.2002

İÇİNDEKİLER

Kabul ve onay	ii
Teşekkür	iii
İçindekiler	iv
Tablolar	v
Şekiller	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3. BULGULAR	24
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	38
ÖZET	46
SUMMARY	48
KAYNAKLAR	50

TABLÖLAR

2.1. ELISA çalışma şeması	22
3.1. Hasta sonuçları	24
3.2. Hastaların FCM sonuçları	25
3.3. Hastalarla ilgili klinik parametreler	28, 29



ŞEKİLLER

2.1. Akım sitometrisi şeması	18
2.2. Normal trombosit sayısına sahip bireyde akım sitometrisinde volüme karşı granülarite (FSC-SSC) görüntüsü	19
2.3. Trombositopenili bir hastanın akım sitometrisinde volüme karşı granülarite (FSC-SSC) görüntüsü	19
3.1. Anti trombosit antikoru negatif olan bir hastanın FCM dot blot analizi	26
3.2. Anti trombosit antikoru pozitif olan bir hastanın FCM dot blot analizi	27
3.3. Hastalarda trombosit sayısı dağılımı ($\times 10^9/L$)	30
3.4. ITP hastalarında cinsiyet dağılımı	30
3.5. ITP hastalarında akım sitometrisi sonuçlarının dağılımı	33
3.6. Kadınlarda akım sitometrisi sonuçlarının dağılımı	33
3.7. Erkeklerde akım sitometrisi sonuçlarının dağılımı	34
3.8. ITP hastalarında ELISA (havuz) sonuçlarının dağılımı	34
3.9. ITP hastalarında ELISA (tek verici) sonuçlarının dağılımı	35
3.10 Kadınlarda ELISA (havuz) sonuçlarının dağılımı	35
3.11. Kadınlarda ELISA (tek verici) sonuçlarının dağılımı	36
3.12. Erkeklerde ELISA (havuz) sonuçlarının dağılımı	36
3.13. Erkeklerde ELISA (tek verici) sonuçlarının dağılımı	37

1. GİRİŞ

Trombositler kanın, dolaşım sistemi dışına çıkması durumunda pıhtı oluşturmakla görevli, kemik iliğinin en büyük hücresi olan megakaryositlerden pulcuklanma yoluyla oluşan, hücre çekirdeği içermeyen, çapları 1 μ olan en küçük kan hücreleridir. Normal yaşam süreleri 8 – 10 gündür.

Periferik kanda $150 - 400 \times 10^9/L$ olan trombosit sayısının $150 \times 10^9/L$ 'nin altına düşmesi trombositopeni olarak adlandırılır. Bu durum başlangıçta belirti vermese de trombosit sayısı $50 \times 10^9/L$ 'nin altına düştüğünde cilt ve mukoza kanamaları başlar. Trombosit sayısı $20 \times 10^9/L$ 'nin altında ise spontan kanama başlar. Bu düzeyin altındaki trombositopeniye ciddi trombositopeni adı verilir (KARAYALÇIN Ü,1984). Trombosit sayısının azalmasının çeşitli nedenleri vardır. Bu nedenler üç alt başlıkta toplanabilir:

a) Trombosit yapımında azalma

Çoğunlukla trombosit yaşam süresi ve dolaşımdaki oranı normal düzeydedir. Bu grup hastalıklarda patoloji kemik iliğinde görülmektedir. Genellikle kemik iliğindeki megakaryositlerin sayısı azalmıştır, ayrıca eritrositer ve lökositler seride de bir bozukluk mevcuttur. Tek başına trombosit yapım eksikliği çok nadir görülmektedir.

Trombosit yapım eksikliği nedenleri şunlardır:

- a) Kemoterapi ve radyoterapiye bağlı kemik iliği trombosit üretiminin baskılanması
- b) Kemik iliğinin malign hücreler ile invazyonu

c) Megaloblastik anemi (Burada gerçek anlamda üretim baskılanması yoktur ancak hatalı trombosit yapımı söz konusudur).

d) Aplastik anemi (Konjenital ve edinsel)

b) Trombosit yıkımında artma

Trombosit yaşam süresi azalmıştır. Artan trombosit yıkımı immünolojik veya immünolojik olmayan mekanizmalara bağlı olabilir. Bu durumda immünolojik hastalıklar ve idiopatik trombositopenik purpura (ITP) oluşur.

c) Trombosit dağılım bozuklukları

Dolaşımdaki trombosit oranı azalmıştır, ancak yaşam süresi normaldir.

1.1. İdiopatik Trombositopenik Purpura

İdiopatik (sebebi belirsiz) Trombositopenik Purpura (ITP); otoantikörler tarafından trombositlerin duyarlı hale gelmesine bağlı olarak gerçekleşen, artan trombosit yıkımı ile karakterize bir kan bozukluğudur. Anti trombosit faktörün hasta plazmasında bulunması Harrington ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. (STOCKHELBURG D, 1996). Trombositopenik terimi düşük trombosit sayım tablosu, purpura ise ciltteki mor lekeler anlamına gelmektedir. Normalde, vücudun enfeksiyona karşı immünolojik savunma mekanizmasının bir parçası olan antikörler, bu hastalıkta trombositlere yönelirler ve kanamayı durdurmakla görevli olan trombositlerin yüzey antijenlerine bağlanarak onların yıkımına neden olurlar.

ITP, tanı ve tedavi farklılığı nedeniyle yaşa bağımlı olarak yetişkinlerde ve çocuklarda ayrı ayrı değerlendirilir. Hastalığın seyrine göre ise akut ve kronik (klinik

form) olmak üzere iki gruba ayrılır. İnsidansı hakkında güvenilir epidemiyolojik verilerin olmamasına karşın her yıl bir milyon kişiden (çocuk ve yetişkin) 10 ila 125'inde geliştiği tahmin edilmektedir. Çoğunlukla kadınların yaşam evrelerinin 2. ve 3. dönemlerinde görülür, ancak rahatsızlık her iki cinsiyette de ve her iki yaş grubunda da olabilir. Yetişkin hastaların tedavisinde başlangıçta çoğunlukla steroid tedavisi uygulandığı için hastalığın tedavisiz doğal seyri hakkında yeterli bilgi yoktur. Yetişkinlerde çeşitli tedaviler sonrasında dahi yaklaşık % 35 – 40'ında trombositopeni kalıcıdır. Erişkinlerde, çocuklardan farklı olarak trombositopeniye neden olan ilaçların kullanımı daha sık olduğundan ilaca bağlı trombositopeni daha yaygındır ve bunun ekarte edilebilmesi güç olabilir. Çocuklarda ITP, yetişkinlerdekinin aksine farklı bir tablo sergileyebilir. En sık 2-6 yaş grubunda görülür. Çocuklarda bu rahatsızlığın düzelmesi ve hastanın sağlıklı günlerine dönme şansı yüksektir. Tanı için, öykü ve fizik muayesinin yanı sıra tam kan sayımı ve periferik yayma incelenmesi gereklidir. Bunların ITP ile tamamen uyumlu olması tanı için yeterlidir (MATTIA D, 2000). Fakat ITP'de genelde görülmeyen bir bulgunun ortaya çıkması ve steroid tedavisinin planlanması kemik iliği incelenmesini gerekli kılmaktadır. Ergenlik çağında ITP'nin karakteristik özellikleri yetişkinlerdekine daha çok benzer (ERTEM M, 1997).

Akut ITP çoğunlukla gençlik çağındaki çocuklarda görülür ve “pediatrik ITP” olarak adlandırılır. Genellikle bir viral enfeksiyon sonrası aniden gelişen, ağır fakat kendiliğinden düzelen trombositopeni ile karakterizedir. Kızlar ve erkekler eşit oranda etkilenirler. Çoğunlukla semptomlara rastlanır ve hastalık viral bir enfeksiyonu takip eder. Çocukların % 85'i bir yıl içinde düzelir ve hastalık tekrarlamaz. Trombositopenik purpura altıncı aydan sonra “kronik” olarak değerlendirilir.

Hastalığın oluşması herhangi bir yaşta olabilir. Bayanlar erkeklere oranla 2 – 3 kat daha fazla risk altındadır (KARAYALÇIN Ü, 1984).

ITP benzeri bir tablo bazı ilaçlar (kinidin, kinin veya sulfa benzeri ilaçlar, heparin) ile meydana gelebilir ve sistemik lupus eritematosus (SLE), lenfoproliferatif hastalıklar (non-Hodgkin lenfoma) veya enfeksiyon (HIV, cytomegalovirus enfeksiyonu veya hepatit) gibi ikincil immün trombositopenik rahatsızlıklara bağlı olarak da gelişebilir. Akut ve kronik ITP için tanı ve tedaviye yönelik yaklaşımlar farklıdır. Bu nedenle ITP'nin farklı otoimmün hastalıklar sırasında veya ilaç kullanımı ile bağlantılı olarak gelişen ikincil immün trombositopenilerden kesin olarak ayrımının yapılması gerekmektedir (ERTEM M, 1997).

Sistemik Lupus Eritematosus (SLE)

İdiopatik trombositopenik purpura (ITP) ile benzer bir klinik tablo çizse de kötü prognozludur. Tromboz riski çoktur. Bazı hastalarda megakaryositik trombositopeni görülür. ITP teşhisi konup splenektomi yapılan hastalarda dalağın mikroskopik incelenmesi ile SLE tanısı konan hastalar bulunmaktadır. SLE'deki trombosit yıkım artışının immünolojik mekanizmalar ile ITP'dekine benzer bir şekilde olduğu düşünülmektedir. Bazı araştırmacılar SLE'de antitrombosit antikorlar saptamışlardır. SLE tanısı konan ve artmış trombosit yıkımı olan hastalar aynı ITP'de olduğu gibi splenektomi, steroid ve immünsupresif ilaçlarla remisyona girebilirler. Bu da ITP ve SLE'deki trombosit yıkım artışının aynı mekanizmayla olduğunu gösteren önemli bir bulgudur. Genellikle 30 yaşın üstünde kadınlarda ITP tanısı konarken bu hastaların

SLE ile ilgili şikayetleri olup olmadığına dikkat edilmeli ve gerekiyorsa SLE ile ilgili tetkiklerin istenmesi gerekmektedir (BUSSEL J, 2000).

Bazı rahatsızlıklar kronik ITP ile karıştırılabilir. Kullanılan ilaçların bazıları düşük trombosit sayımına neden olabilirler. Bu ilaçlar genellikle kinidin, kinin, sulfa benzeri ilaçlar ve heparindir. Diğer bazı ilaçlar da çeşitli hastalarda trombositopeniye neden olabilir. Eğer bir hasta trombositopeniye neden olan bir ilaç kullanıyorsa, ilaç kesilmeli ve trombosit sayısı ölçülmelidir. Eğer sebep kullanılan ilaç ise trombosit sayısı 2-3 haftada normale dönecektir. Bunun dışında bazı durumlarda da trombositopeni görülebilir (örneğin romatoid artritli hastalarda uygulanan altın tedavisine bağlı gelişen trombositopeni). Aplastik anemi, akut lösemi vs. gibi hastalıklar da trombositopeniye neden olabilir. Bu karışıklıklar kan sayımı ve kemik iliği değerlendirmeleri ile önlenabilir. ITP'de trombositopeninin nedeni trombositlerin antikorlar nedeni ile kemik iliği dışında yıkılması iken, bu hastalıklarda trombositopeni nedeni kemik iliğinde trombositlerin yapımındaki bozukluk ve azalmadır.

ITP hastalarının başlangıçta semptomları gözlenmeyebilir ama rutin kan sayımlarında düşük trombosit sayımı görülebilir ($30 \times 10^9/L$ – $100 \times 10^9/L$) Trombositler normalden daha büyüktür (KELTON JG, 1983), buna rağmen kemik iliği normaldir. Bazı hastalarda megakaryositlerin sayısında artma olabilir. Bazen de kronik kanamaya bağlı olarak demir eksikliği görülebilir. Megakaryositlerde de bazı yapısal değişiklikler olabilir. Bu değişiklikler kemik iliğinin, periferdeki trombosit yıkımına cevabı olup hiçbir şekilde ITP için spesifik değildir. Buna karşın hastaların çoğu, küçük nokta şeklinde lekelerin birleşmesiyle oluşan peteşiler nedeniyle; daha azı

burun, dişeti ve nadiren mide, barsak veya genital kanamalar nedeni ile doktora giderler. Kadınlarda uzun yada ağır seyreden menstrual kanamalar görülebılır. Semptomlar kullanılan aspirin, ibuprofen gibi ilaçların trombosit fonksiyonları bozmasıyla artabilir. Kan sayım tablosunda sadece trombosit sayısı düşüktür.

Tam kan sayımı ve periferik yayma incelenmesi ITP tanısı için en önemli laboratuvar testleridir. Hastanın öyküsü, fizik muayenesi, tam kan ve periferik yayma incelemeleri ITP ile uyumlu görülüp diğer trombositopeni nedenleri ekarte edilebiliyorsa; tanı için kemik iliğı incelenmesine ve diğer laboratuvar tetkiklerine neden yoktur. Fakat bazı durumlarda bu laboratuvar testlerinin yapılması gerekli olabilir (ERTEM M, 1997).

Bazı hastalarda, trombosit sayısı spontan olarak ilk haftada düzelir. Bu hastalar viral hastalıklar gibi bazı nedenlerle trombositopenik olabilirler. Diğer kronik ITP vakaları (% 5 - 10 civarı) $30 \times 10^9/L$ – $100 \times 10^9/L$ arasında trombosit sayımı ile seyreden, aylar hatta yıllar süren ve tedavi gerektiren bir seyir izler. Trombosit sayısı $25 \times 10^9/L$ - $30 \times 10^9/L$ 'den az olan bazı hastalar (yaklaşık % 75'i) kortikosteroidlerle (kortizon) yada splenektomi (dalaklarının alınması) ile iyileşirler. Kalan hastaların çoğı da kontrol edilir ve değişik tedavi şekilleriyle iyileşirler. ITP'de mortalitenin en önemli nedeni intrakraniyal kanamadır.

Doktor hastanın hikayesini alır ve fiziksel muayene yapar. Doktor hastanın ilaç kullanıp kullanmadığına dikkat etmelidir (bazı ilaçlar trombositopeniye neden olabilir). Tam kan sayımı yapılır. Düşük kan sayımı trombositopenik olabilir. Bundan sonra

yapılacak işlem kemik iliği incelemesidir. Kemik iliğinde trombosit oluşturan hücre varlığı (megakaryosit), metastatik kanser (kemik iliğine sıçramış kanser) ve kan hücrelerinin kanseri olan lösemi araştırılır.

Günümüzde ITP ile ilgili tartışmalı, çözüm bekleyen pek çok konu vardır. Bunların başlıcaları; tanı için kemik iliği incelenmesinin gerekliliği, tanı anındaki trombosit sayısı ile prognozu belirleyen intrakraniyal kanama arasındaki ilişki ve buna bağlı olarak trombosit sayısının mı yoksa kanama semptomlarının mı tedavi edilmesi gerektiği, kronikleşmenin tanımı, çocuklarda intrakraniyal kanamayı veya kronik ITP gelişimini belirleyen faktörlerin neler olduğu, halen kullanılmakta olan tedavi yöntemlerinin trombosit sayısından öte intrakraniyal kanama ve mortalite gibi klinik olarak önemli sonuçlar açısından karşılaştırılması, splenektominin tedavideki rolü ve zamanlanması ve farklı tedavilerin maliyet ve etkinlik yönüyle incelenmesidir (ERTEM M, 1997).

ITP'de tedavi sadece trombosit sayısını $25 \times 10^9/L$ - $30 \times 10^9/L$ 'in üzerine çıkamayan hastalarda planlanır. Tedavinin etkinliği yaklaşık olarak bütün çalışmalarda klinik açıdan önemli olan kanama ve mortalite gibi sonuçlar yerine trombosit sayısındaki artış ile değerlendirildiği için indirekt verilere dayanır. Amerikalı araştırmacıların çoğu trombosit sayısı ile klinik açıdan önemli kanamalar arasında yakın ilişkinin varlığını kabul ederek tedavinin gerekliliği ve tedavinin etkinliğini değerlendirmede trombosit sayısını temel alma taraftarıdır. Fakat trombosit sayısı ile kanama bulguları arasındaki ilişkiyi destekleyen veriler genelde ITP dışındaki olgulara dayandığı için bu konuda yeterli verilerin olduğu söylenemez (GMUR J, 1991).

ITP'de trombosit sayısını mı yoksa semptomları mı tedavi etmek gerektiği konusunda bir fikir birliği olmamakla birlikte bazı öneriler verilebilir.

Düşük trombosit sayısı olan hastalar aspirin veya non-steroidal anti - inflamatuvar ilaçlardan (ibuprofen gibi) trombosit fonksiyonu ve kanaması düzelinceye kadar kaçınmalıdır Bazı sporlardan uzak durulması yararlı olur (futbol, kayma). Kan transfüzyonları bu hastalarda pek yararlı olmadığı için az uygulanır.

Önerilen Bazı Tedavi Şekilleri :

1 – Hospitalizasyon

Hastanın hastanede yatırılarak izlenmesi veya tedavi edilmesinin gerekli olduğu durumlar:

- a) Trombosit sayısından bağımsız olarak hayatı tehdit edici kanamanın varlığı
- b) Trombosit sayısı $20 \times 10^9/L$ 'den düşük olduğunda müdahale gerektiren mukozal bir kanamanın varlığı
- c) Gerekliğinde hastaneye ulaşım güçlüğünün olması veya ailenin istemesi

2 – Steroid Tedavisi

Tedavi için ilk olarak steroidler kullanılır. Steroid tedavisi ile trombosit sayısının tedavi almayanlara göre daha hızlı yükseldiği gösterilmiştir (BUCHANAN GR, 1984). Yüksek doz methyprednisolone tedavisinin trombosit sayısını standart doz oral

prednisone tedavisinden daha hızla yükselttiği gösterilmişse de bunun klinik açıdan önemi belirsizdir (GODEAU B, 1998).

3– Splenektomi (dalağın çıkartılması)

Erişkinlerde splenektominin şu durumlarda uygulanması önerilir.

- a) Tanıdan sonra altı ay geçmiş, steroid tedavisine yanıtı ve trombosit sayısı $10 \times 10^9/L$ ’den düşük hastalarda
- b) Tanıdan sonra üç ay geçmiş, başlangıç tedavisine yanıt ve trombosit sayısı $30 \times 10^9/L$ ’den düşük hastalarda

Tanıdan sonra altı aydan fazla zaman geçmiş ve trombosit sayısı genelde $50 \times 10^9/L$ üzerinde seyreden ITP hastalarında splenektominin uygulanması uygun değildir. Ayrıca ciddi mukozal bir kanama bile olsa splenektomi başlangıç tedavisi olarak kullanılmamalıdır. Splenektomide hastaların yaklaşık üçte ikisi yeterli trombosit sayısına ulaşırlar ve daha başka tedavi gerektirmezler. Splenektomi sonrası trombosit sayısı $10 \times 10^9/L$ ’den düşük seyreden hastalar kanama semptomlarına bakılmaksızın ve trombosit sayısı $10 \times 10^9/L$ ila $30 \times 10^9/L$ arasında olan hastalar ise klinik açıdan önemli kanamaların diğer tedavi yöntemleriyle tedavi edilmeye çalışılmalıdır.

4- İntravenöz İmmünglobulin (IVIg) Tedavisi

IVIg tedavisi erişkinlerde daha çok steroid dirençli hastalar için kullanılmıştır. IVIg tedavisine kronik ITP’de alınan yanıt sıklıkla geçici olup trombosit sayısı genellikle 3 – 4 hafta içerisinde tedavi öncesi değerlere döner. Trombosit sayısının $30 \times 10^9/L$ ’den yüksek olduğu ve klinik olarak ciddi bir kanamanın olmadığı hastalarda IVIg

tedavisinin kullanılması kesinlikle uygun değildir. Kronik ITP hastalarında splenektomi yapıldıktan sonra intravenöz anti-D'ye karşı minimal bir yanıt alınabilmiş yada hiç alınamamıştır (SCORADAVOU A, 1997).

ITP'de trombosit yıkımına neden olan antitrombosit antikorlar otoantikorlar, alloantikorlar ve ilaca bağlı antikorlar olmak üzere üçe ayrılır. Otoantikorlar ITP'de ve ikincil olarak immün fonksiyonu etkileyen hastalıklarda (örneğin malignite yada takip eden rubella, infeksiyöz mononukleaz gibi viral bir enfeksiyon) artarlar. Bunlar çoğunlukla IgG sınıfındandır ve kompleman aktivasyonuna yol açmazlar. Bunlar glikoproteinler üzerinde yer alan trombosit antijenlerine yönelirler. Bu antikorlar sadece hasta değil normal insan trombositleriyle de reaksiyon verirler. Trombosit sayısını olduğu gibi, trombosit işlevlerini de etkileyerek kanmaya yol açabilirler (BLASCZYK R, 1998). Ig M veya Ig G tipinde olan alloantikorlar kan ürünü transfüzyonlarının bir sonucu olarak gelişirler yada gebelik boyunca anne, fetal trombosit tarafından immünize edilince ve plasentaya karşı antikor oluşunca gelişir. İlaça bağlı otoantikorlar sadece etken ilaçlarda aktivite gösterirler. İlaçlar çoğunlukla kinidin, digitoksin, kinin, sulfanomid ve altın bileşikleridir. Trombosit antikorlarına bağlı olan trombositopeni genellikle kullanılan ilaç uzaklaştırılınca ortadan kalkar.

Harrington'un ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan sonra ITP'ye neden olan antikorları belirlemek için çeşitli metodlar gelişmiştir. Bu çalışmalar trombosit bağı antikorları (PAIg) ölçmeye dayalı testlerdir. Hasta trombositlerini kullanarak direkt test, hastanın serumunu kullanarak indirekt test ve özel antikorları belirlemek için ELISA (Enzyme – Linked Immunosorbant Assay) metodu kullanılır (OLEE T, 1997).

Bu test mikrotiter tabakalarda yapılır ve kantitatif sonuçlar verir (SCHIFFER CA, 1983). Otoantikorlar için iki tane fonksiyonel serum testi yapılır. Eğer antikor var ise antikorun ne kadar fonksiyonel ve güçlü olduğunu gösterir. İkinci metod trombosit agregasyonunu ölçmektir. Bu metod indirekt serum metodundan daha duyarlı ama daha az spesifiktir. Kronik ITP hastalarında bulunan plazma antikorlarını belirlemek önemlidir, bu antikorlar trombositlere bağlanan antikorlardan farklılık gösterirler. GP IIIa'nın c-terminus ucuna bağlanan antikorlar şiddetli hastalık geçiren kişilerde bulunurlar.

Trombosit özgü antijenler alloantikorlar için çeşitli trombosit glikoproteinlerine karşı ELISA metoduyla ölçülebilir (GP Ib/IX, IIb/IIIa, Ia/IIa ve HLA Class I içerirler). Ayrıca akım sitometrisi normal kişilerde ve ITP hastalarında PAIg'leri tanımlamak için kullanılır (ROMERO L, 2000). Çeşitli çalışmalar akım sitometrisi metodunun ITP tanısı koymada önemini göstermiştir. MAIPA (Monoclonal Antibody – specific Immobilization of Platelet Antigens) testi de trombosit otoantikorlarını belirlemede kullanılır ve bu testin ITP hastalarının çoğunda pozitif çıktığı saptanmıştır (JOUTSI L, 1996).

MAIPA, trombosit glikoproteinlerine özgü bir enzim testidir. Trombosit yüzeyindeki epitoplara için spesifik olan monoklonal antikorları kullanarak, bu epitoplara yakalamakta ve onları işaretli ligand ile gösterilebilen insan antikorlarına karşı belirleyebilmektedir. Hedef trombositler aynı zamanda insan serumu ile daha sonra glikoproteine özgü bir monoklonal (anti Gp IIb/ IIIa) ile inkübe edilmektedir (1. Basamak). Duyarlı hale gelmiş trombositler daha sonra yıkanır ve deterjan ile

solubilize edilir (2. Basamak). Oluşan kompleks (insan trombosit, monoklonal antikor ve membran glikoproteinleri içeren) daha sonra mikrotiter tabakalar içine poliklonal anti mouse antikor kullanılarak solid faza fikse edilir. Son olarak, diğer epitoplara bağlanan insan antikorları aynı glikoproteinler üzerinde peroksidaz işaretli antiglobulin serum ile belirlenir (BLASCZYK, 1998).

ELISA, hasta ya da verici serumu bilinen trombosit fenotipinin trombositlerinin glikoproteinleri ile kaplanmış mikrotiter tabakalarda inkübe edilir. Eğer antikor var ise bağlanma gerçekleşir, bağlanmayan Ig 'ler ise yıkama işlemi ile ortamdan uzaklaştırılır. Alkaline fosfataz işaretli antihuman globulin (Anti IgG/ IgA/IgM) kuyucuklara eklenir. İnkübasyondan sonra mikrotiter kuyucuklar tekrar yıkanır ve bağlanmayan antihuman globulin' ler (Anti IgG/ IgA/IgM) ortamdan uzaklaşır. Enzim substratı PNPP (P-nitrofenil fosfat eklenir. Kısa bir inkübasyondan sonra reaksiyon sodyum hidroksit solusyonu ile durdurulur ve ELISA okuyucusunda 405-410 nm' de renk ölçümü yapılır.

Klinik bilgiler ile pozitif veya negatif sonuçlar birlikte değerlendirilmelidir. AITP' de olduğu gibi otoantikorlar terapiye bağlı olarak düşük seviyelerde bulunabilirler. Bu çalışma sadece trombosit Gp IIb/ IIIa, Gp Ib/ IX, Gp Ia/ Iia otoantikorlarını belirleyebilir. İnsan anti-mouse antikorları da belirlenebilir ama yanlış pozitif sonuçlar elde edilebilir. Transfüzyon yapılmış bir hastadan örnek hemen alınmamalıdır, ancak 4 gün beklendikten sonra çalışma yapılmalıdır. Steroid ve IVIG tedavisi ELISA çalışmasının sonuçlarını etkilemektedir.

FCM teknolojisi monoklonal antikörler ile hücre popülasyonlarını tanımlamaya dayalı bir yöntemdir. Hematopoetik sistemi oluşturan farklı hücre popülasyonları olgunlaşma süreçlerinin farklı zamanlarında değişik antikörleri içerebilirler. Flow sitometri bu antikörlerin belirlenmesinde, otoantikör tayininde, DNA analizinde, kromozom analizinde kullanılan modern bir yöntemdir. Bu teknikte öncelikle cihazın kalibre edilmesi, örneğin toplanması, antikörün eklenmesi ve ölçümün yapılması esastır. Bir örneğin FCM analizini yapabilmek için incelenecek olan materyalin mutlaka süspansiyon haline getirilmesi gerekir (periferik kan, kemik iliği, lenf nodu vb.). İşaretli monoklonal antikörler ile inkübe edilen örnek eritrositlerin parçalanma işlemi ve bazı yıkama işlemlerinden geçerek okunmaya hazır hale gelir. Örnek, FCM aletinin içindeki akış sisteminin içinde ilerler. Kullanılan florokromların bazıları FITC (530 nm), PE (572 nm), PCY5 (680 nm)'dir. 480 nm 'deki argon lazerinin önünde, saçtıkları dalga boylarına göre hücreler ileriye ve yana saçılıma uğrarlar. Böylece büyüklüklerine, granül içeriklerine ve eksprese ettikleri antijenlere göre hücre popülasyonlarının ayrımı yapılır. Elde edilen bilgiler özel bir yazılım programı ile analiz edilir. Monoklonal antikora ait pozitiflikler hesaplanırken non spesifik bir bağlanmanın ekarte edilebilmesi için kontrol tüpünün değerlendirilmesi esastır.

Eğer ilaca bağlı antitrombosit antikordan şüpheleniliyorsa iki indirekt serum metodu ilacın varlığında ve yokluğunda yapılır.

Bu testlerde yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar olabilir. Bu yüzden ITP tanısı genellikle klinik bilgilerle konur.

Sebebi belli olmayan trombosit düşüklüğünün araştırılmasında uygun rutin metodun belirlenmesi ve klinik bulgular ile korelasyonun tespiti bu vakaların tedavisinde önemli aşamalardan birini oluşturmaktadır. İbn-i Sina Hastanesi Hematoloji Laboratuvarında Anti Trombosit Antikor (ATA) çalışması istenen hastalarda trombosit yüzeyindeki ve hasta plazmasındaki otoantikorlar, Akım Sitometrisi yöntemiyle indirekt olarak tespit edilmektedir. Bu araştırmada ise bu çalışmaya ek olarak, otoantikorlar serumda ELISA yöntemi ile tespit edilip, 2 çalışmanın sonucu karşılaştırılacaktır. Ortaya çıkan sonuçlar hastanın klinik bulgularıyla beraber değerlendirilerek, bu testlerin tanısal değeri incelenecektir. Çünkü tanı ve tedavi yaklaşımları netlik kazanmadığı için, bu çalışma ile hasta bakım kalitesi artırılacak ve gereksiz harcamaları önlenecektir. Böylece ITP tanısı için yapılan testlerin önemi ve değeri anlaşılacak, tanının doğru bir biçimde konulabilmesi için gerekli olan yöntem uygulanmaya başlanacaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya yeni ve eski tanı idiopatik trombositopenik purpura (ITP) hastaları alınmıştır. Materyal olarak akım sitometrisi (flow sitometri) ile yapılan immünofenotiplendirme için 4 cc'lik EDTA'lı tam kan tüpüne alınmış periferik kan; ELISA testi için ise 10 cc'lik biyokimya tüpüne alınan kanın serumu kullanıldı. Materyallerin en geç yarım saat içinde laboratuara gelmesine dikkat edildi.

Örnekler rotorda kısa bir süre döndükten sonra hemen trombositten zengin plazma (TZP) elde etmek üzere 300 - 400 devirde 30 dk santrifüj edildi. 30 dk sonunda tüplerin üst kısmında kalan TZP'den 100 µL (hastanın trombosit sayısı düştükçe bu miktar artabilir), başka bir tüpün içerisinde bulunan 1 ml soğuk cell-fix'e pipetlendi. En az 2 saat +4 derecede fikse olmaları beklendi. Fiksasyonu takiben buzdolabından alınan hücreler 3000 devirde 5 dk santrifüj edilip üstü atıldı. Tüpün dibinde kalan trombositler , 2 ml PBS ile iki kez yıkandı. Son yıkamadan sonra trombositler 500 µL PBS ile dilüe edildi. Böylece hasta trombosit (HT) elde edildi. Trombositten zengin plazmanın 3000 devirde 5 dk çevrilip üst kısmının alınmasıyla hasta plazması (HP) elde edildi. Çalışmada kullandığımız normal trombositler (NT) ve normal plazma (NP) sağlıklı O kan gruplu bir kişiden bu metod kullanılarak hazırlandı. Çeşitli porsiyonlara ayrılıp saklandı. Her bir çalışma için 6 tüp hazırlandı.

- 1- Birinci tüpe 50 µl HT ve trombositler için belirleyici bir antijen olan CD 42a'a özgü antikordan (anti CD42a) 10 µl pipetlendi.

- 2- İkinci tüpe 50 µl HT ve 10 µl AB serumu pipetlendi.
- 3- Üçüncü tüpe 50 µl HT ve 10 µl HP pipetlendi.
- 4- Dördüncü tüpe 50 µl HT ve 10 µl NP (normal plazma) pipetlendi.
- 5- Beşinci tüpe 50 µl NT ve 10 µl HP pipetlendi.
6. Altıncı tüpe 50 µl NT ve 10 µl NP pipetlendi.

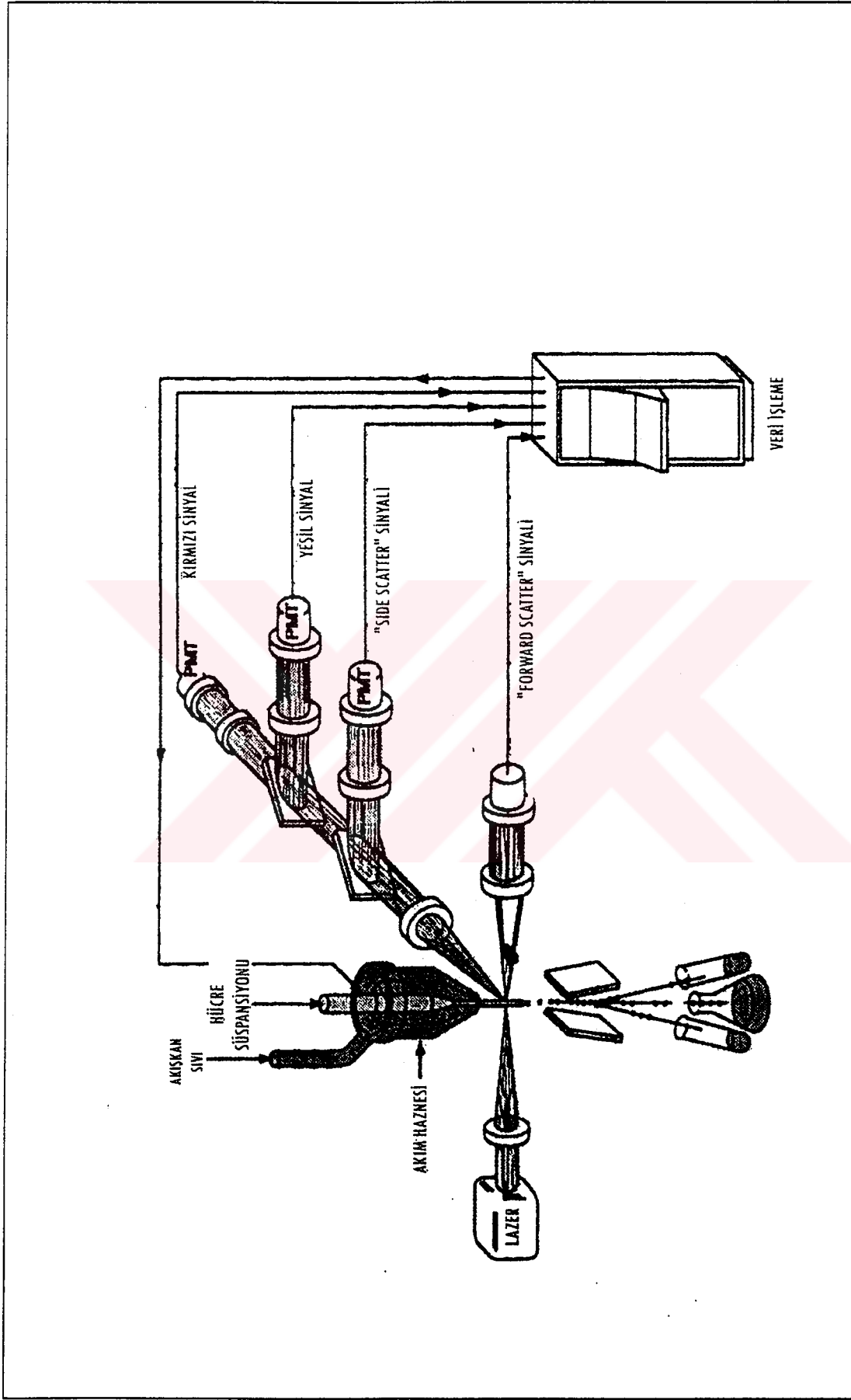
Pipetleme işlemi bittikten sonra yarım saat oda ısısında, karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon bittikten sonra ikinci, üçüncü, dördüncü, beşinci ve altıncı tüplere anti human immünglobulin (Ig)G, IgA ve IgM'den eşit hacimlerde karıştırılarak hazırlanan GAM (IgG, IgA ve IgM) kokteylden 10 µl pipetlendi ve 15 dk oda ısısında, karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Bundan sonra yine aynı tüplere GAM işaretleyicisi eklendi ve yine 15 dk oda ısısında, karanlıkta inkübasyona bırakıldı. 15 dk bitiminde her tüpe iki ml FACS.yada izotonik sodyum klorür (yıkama solüsyonu) eklenerek 5 dk 3000 devirde santrifüj edilerek yıkandı. Bu işlemden sonra tüplerin üzerindeki süpernatant dikkatli bir şekilde pipetle alınarak atıldı. Dipte kalan pellet 500µl cell fix ile dilüe edildikten sonra 24 saat içerisinde akım sitometrisi cihazında, 488 nm'de argon iyonu kullanılarak (FACSort, Beckton – Dickinson, Amerika) okundu (ŞEKİL 2.1). Okuma sırasında FSC'ye karşı SSC dot plotunda logaritmik olarak yapılan sayımda, görülen dağılımdan yararlanılarak trombositleri içerecek şekilde gate alındı ve alınan bu gate'de 10,000 hücre/tüp sayıldı. Normal sayıda trombosit içeren hastanın FSC-SSC dağılımı ile trombositopenili hastanın FSC-SSC dağılımı Şekil 2.2 ve Şekil 2.3'de görülmektedir. İmmünofloresan bilgileri bilgisayara kaydedildi. Diğer analizler alınan gate içinde yapıldı. İlk tüpdeki CD 42 a içeren hücrelerin yüzdesine bakarak alınan gate'in doğruluk derecesini saptama

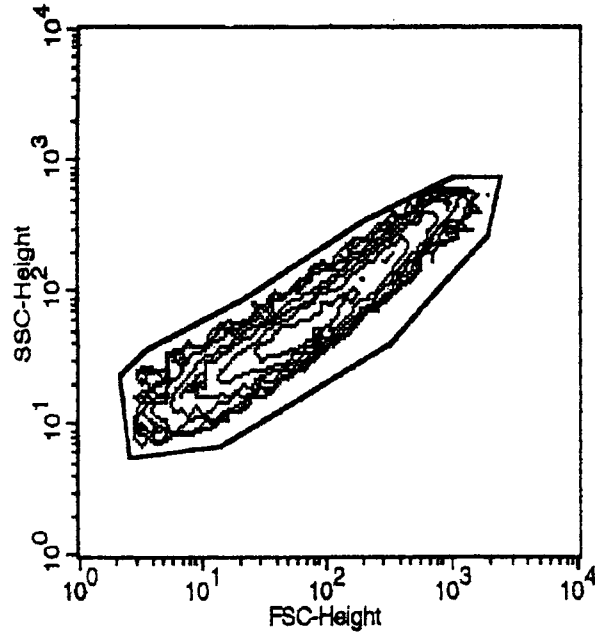
imkanımız oldu. İzotipik kontrol olan altıncı tüpden (NT+NP) nonspesifik bir bağlanma olup olmadığı kontrol edildi ve diğer tüpler de değerlendirildi.

ELISA çalışması için ise Thrombomatch EIA kiti kullanıldı. Kit içeriği:

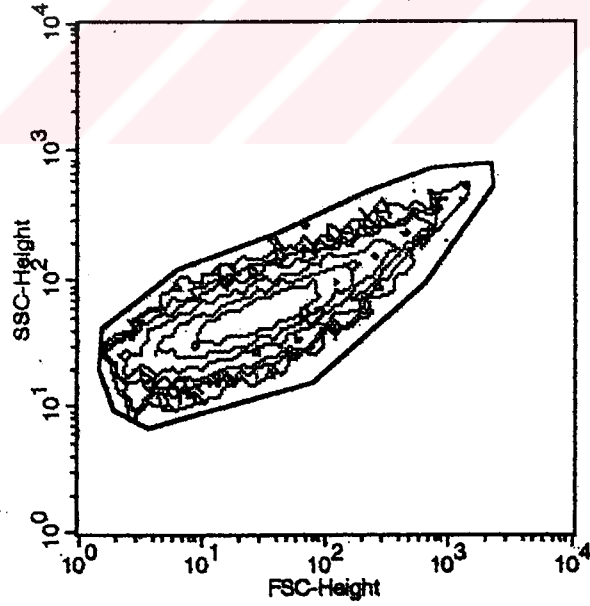
- 1- Mikroplak: Herbiri 16 kuyucuklu (6 çift kaplı ve aliminyum folyo ile tıkalı strip)
- 2- Negatif kontrol: 3 ml, liyofilize, koruyucu, % 0,1 sodyum azid, liyofilize
- 3- Pozitif kontrol: 2* 0,2 ml, liyofilize, koruyucu, % 0,1 sodyum azid
- 4- Konjugat konsantrasyonu: 0,2 ml horse-radish peroksidaz ile konjuge monoklonal antihuman Ig G antikoru (fare), koruyucu, % 0,025 penisilin V, 0,025 streptomisin ve % 0,01 kloreksin diglukonat
- 5- Konjugat dilüsyonu: 12 ml, koruyucu, % 0,025 penisilin V, %0,025 streptomisin ve % 0,01 kloreksin diglukonat
- 6- Substrat buffer: 50 ml, 0,1 M fosfat sitrat buffer solüsyonu kullanıma hazırdır. (Ph: 5,5), % 0,02 H₂O₂ içeriyor, koruyucu, % 0,01 thiomersel içeriyor.
- 7- Kromojen: Herbiri 10 mg orto - fenilendiamin hidroklorid içeren 8 tablet (OPD)
- 8- Yıkama buffer: 2* 50 ml kullanıma hazır, koruyucu, % 0,01 thiomersel
- 9-Yapışkan film: Kendiliğinden yapışkan, mikroplak kuyucuklarını inkübasyon ve santrifüj sırasında kaplamak için hazırlanmış transparan film.

ŞEKİL 2.1. AKIM SİTOMETRİ ŞEMASI





ŞEKİL 2.2: Normal trombosit sayısına sahip bireyde akım sitometresinde volüme karşı granülarite (FSC-SSC) görüntüsü



ŞEKİL 2.3: Trombositopenili bir hastada akım sitometresinde volüme karşı granülarite (FSC-SSC) görüntüsü

Bütün reaktifler 2 - 8 derecede depolandı. Reaktifler kullanılmadan önce oda ısısına getirildi. Pozitif kontrol 0,2 ml distile su ile sulandırıldı. Negatif kontrol 3 ml distile su ile sulandırıldı. Konjugat konsantresi 1/101 oranında konjuge dilüenti kullanılarak sulandırıldı (Örneğin 1 çift strip, 20 konjugat konsantrasyonu 2 ml dilüent ile sulandırıldı).

Trombositlerin hazırlanması:

Trombosit süspansiyonunu hazırlamak için 4 ml EDTA'lı kan 300 - 400 devirde 30 dk santrifüj edildi. Trombositten zengin plazma (TZP) bir tüpe alındı ve 670 devirde 30 sn eritrositden arındırmak için santrifüj edildi. Santrifüjasyon pelletin tamamen eritrositden arınmasına kadar devam etti. Eritrositden yoksun trombosit içeren süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı ve trombositler fizyolojik salin ile şu şekilde yıkandı.

- 1- Trombosit süspansiyonu 5 dk/3000 devirde santrifüj edildi. Trombosit miktarı şöyle hesaplandı.
- 2- Süpernatant atıldı ve aynı miktardaki fizyolojik salinin içine trombositler kondu ve trombosit sayımı yapıldı (sayı/mikrolitre). Gerekli trombosit miktarı şöyle hesaplandı. $5 \times 10^9 / L$ trombosit/ trombosit sayımı/ $\mu l = x \mu l$ trombosit süspansiyonu

Not: x her mikropalak kuyucuğuna pipetlenecek olan miktarı gösterir. Değeri 10 - 50 μl arasında olmalıdır.

Yöntem:

- 1- Öncelikle 30 µl trombosit süspansiyonu pipetleme şemasına göre pipetlendi.
(Tablo 1. 1).
- 2- 50 µl hasta plazması eklendi. Plazma eritrositden serbestti ve hiçbir madde içermiyordu.
- 3- Çift stripler film ile kaplandı.
- 4- 30 dk 37 derecede inkübatörde bekledi.
- 5- 5000 devirde 2 dk santrifüj edildi.
- 6- Film uzaklaştırıldı.
- 7- Süpernatant aspirasyon manifoldu kullanılarak uzaklaştırıldı.
- 8- 100 µl yıkama solüsyonu eklendi ve pipetle resüspanse edildi.
- 9- Film ile kaplandı.

Yıkama basamakları tekrarlandı.

Not: Cross kontaminasyonu önlemek için aspirasyon manifoldu fizyolojik salin ile her işlem后会 sonra yıkandı.

- 10- 2 dk 5000 devirde santrifüj edildi.
- 11- Film uzaklaştırıldı ve aspirasyon ile wash buffer uzaklaştırıldı.

TABLO 2.1. ELISA ÇALIŞMA ŞEMASI

A	TH + neg. kontrol		TH + H14	TH + H22	TH + K1	TV + neg. kontrol	TV + H7	TV + H15	TV + H23	TV + K1
B	TH + poz. kontrol	TH + H7	TH + H15	TH + H23	TH + K2	TV + poz. kontrol	TV + H8	TV + H16	TV + H24	TV + K2
C	TH + H1	TH + H8	TH + H16	TH + H24	TH + K3	TV + H1	TV + H9	TV + H17	TV + H25	TV + K3
D	TH + H2	TH + H9	TH + H17	TH + H25	TH + K4	TV + H2	TV + H10	TV + H18	TV + H26	TV + K4
E	TH + H3	TH + H10	TH + H18	TH + H26	TH + K5	TV + H3	TV + H11	TV + H19	TV + H27	TV + K5
F	TH + H4	TH + H11	TH + H19	TH + H27	TH + K6	TV + H4	TV + H12	TV + H20	TV + H28	TV + K6
G	TH + H5	TH + H12	TH + H20	TH + H28	TH + K7	TV + H5	TV + H13	TV + H21	TV + H29	TV + K7

* TH : Trombosit havuzu

* TV : Tek verici

12- 100 µl temiz olarak hazırlanmış konjugat her kuyucuğa eklendi ve pipet ile trombositler resüspanse edildi.

13- 30 dk 37 derecede inkübatörde beklenildi.

14- 2 kere yıkama işlemleri tekrarlandı.

15- 5000 devirde 2 dk santrifüj edildi.

16- Son santrifüj sırasında 10 OPD tabletini (10 mg) 4 ml substrat bufferda (2 double strip için gerekli) çözüldü.

17- Film uzaklaştırıldı ve aspirasyon ile wash buffer uzaklaştırıldı.

18- 100 µl substratdan her kuyucuga eklendi ve resüspanse edildi.

19- 10 dk oda ısısında, karanlıkta inkübe edildi.

20- 100 µl durdurma solösyonu (0,5 N sülfirik asid) eklendi.

21- 492 / 620 nm'de (Spectromax Plus, Molecular Devices, Amerika) 2 saatin içinde okundu.

Ig G moleküllerinin bağlanma derecelerini gösteren negatif kontrol içeren kuyucukların hasta örneklerini içeren kuyucuklardan çıkarılmasıyla hesaplandı.

Fark > 0,100 ise örnek (+)

Fark < 0,100 ise örnek (-)

Not: (+) kontrol en az 0,600 idi.

3. BULGULAR

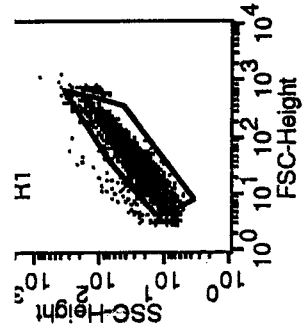
22 yeni tanı almış yada tedavi sonrası izlenen idiopatik trombositopenik purpura (ITP) ve 7 yeni tanı almış yada tedavi sonrası izlenen sistemik lupus eritematosus (SLE) hastalarından alınan örnekler çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya alınan hastaların ortalama yaşları 47 (19-75) idi, ortalama trombosit sayıları ise $75 \times 10^9/L$ ($9 \times 10^9/L$ – $200 \times 10^9/L$) idi. Hastaların %17'sinin trombosit sayıları mm^3 'de $0-30 \times 10^9/L$ arasında, %32'sinin $30 \times 10^9/L$ – $60 \times 10^9/L$ arasında, %17'sinin $60 \times 10^9/L$ – $90 \times 10^9/L$ arasında, %10'unun $90 \times 10^9/L$ – $120 \times 10^9/L$ arasında, %24 'ünün ise $120 \times 10^9/L$ ve üzeriydi (Şekil 3.3). Hastaların %27'si erkek, % 73'ü kadındı (Şekil 3.5). Bu hastalarla ilgili diğer klinik parametreler Tablo 3.3'de görülmektedir. Bu hastalardan alınan periferik kanlardan elde edilen hasta trombositleri ve hasta plazmaları akım sitometrisi (FCM) yöntemiyle hemen çalışmaya alınırken; hastalardan elde edilen serum ise –80 derecede thrombomatch EIA kiti ile çalışılmak üzere saklanmıştır. Hastaların akım sitometrisi ve ELISA testi sonuçları Tablo 3.1 'de görülmektedir.

TABLO 3.1. HASTA SONUÇLARI

Hastalık	Havuz ile +	Verici ile +	Havuz ve Verici ile +	Negatif	Flow ile +
ITP (22)	2	3	9	8	11
SLE (7)	1	0	1	5	5
KONTROL (8)	2	1	0	5	0

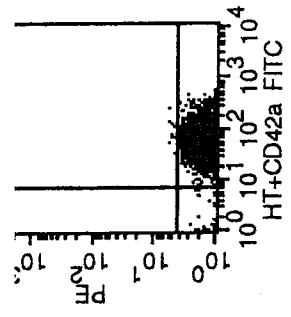
TABLO 3.2: HASTALARIN FCM SONUÇLARI

	TANI	Trombosit Yüzeyi	Hasta Plazması		TANI	Trombosit Yüzeyi	Hasta Plazması
1	İTP	% 1	% 1	16	İTP	% 0	% 0
2	İTP	% 2	% 22	17	İTP	% 18	% 4
3	İTP	% 1	% 0	18	İTP	% 25	% 40
4	İTP	% 13	% 57	19	İTP	% 11	% 20
5	İTP	% 6	% 3	20	İTP	% 1	% 1
6	İTP	% 5	% 3	21	İTP	% 0	% 1
7	İTP	% 0	% 0	22	İTP	% 1	% 0
8	İTP	% 5	% 5	23	SLE	% 12	% 8
9	İTP	% 0	% 0	24	SLE	% 0	% 0
10	İTP	% 17	% 11	25	SLE	% 1	% 1
11	İTP	% 1	% 1	26	SLE	% 21	% 16
12	İTP	% 0	% 0	27	SLE	% 10	% 15
13	İTP	% 15	% 4	28	SLE	% 7	% 9
14	İTP	% 1	% 0	29	SLE	% 22	% 31
15	İTP	% 9	% 22		Ortalama	% 7.4	% 9.5



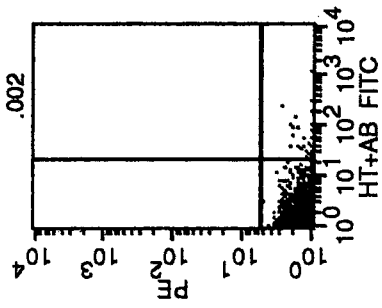
KAPI: KAPI YOK

BÖLGE %
R1 97.22



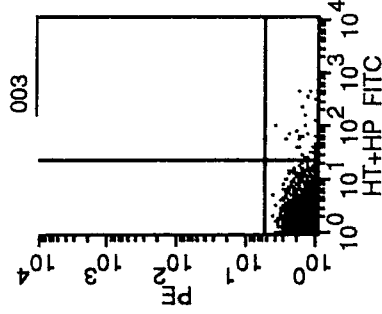
KAPI G1

BÖLGE %
UL 0.00
UR 0.24
LL 0.35
LR 99.41



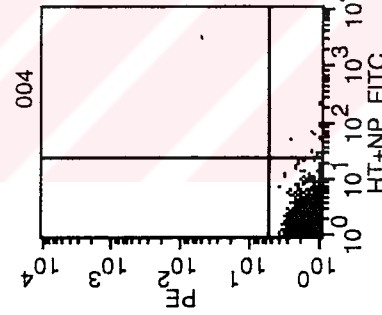
KAPI G1

BÖLGE %
UL 0.00
UR 0.00
LL 99.71
LR 0.29



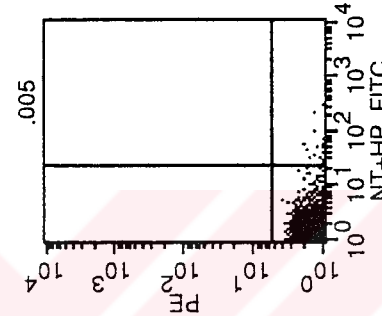
KAPI G1

BÖLGE %
UL 0.00
UR 0.00
LL 99.52
LR 0.48



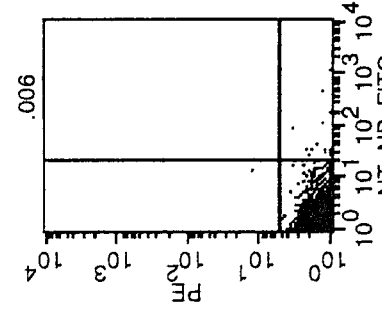
KAPI G1

BÖLGE %
UL 0.00
UR 0.00
LL 99.82
LR 0.18



KAPI G1

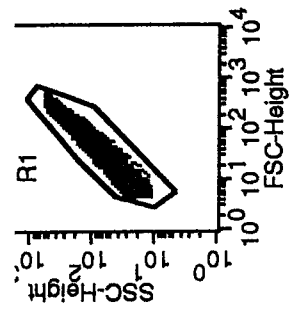
BÖLGE %
UL 0.00
UR 0.00
LL 99.79
LR 0.21



KAPI G1

BÖLGE %
UL 0.01
UR 0.00
LL 99.82
LR 0.17

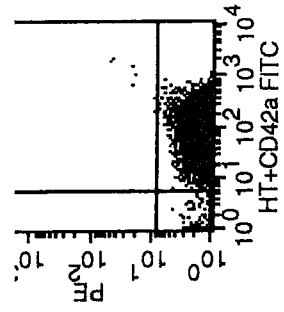
SEKIL 3.1. Antitrombositantikoru negatif olan bir hastanın FCM dot plot analizi



KAPI: KAPI YOK

BÖLGE %

R1 100.00



KAPI 31

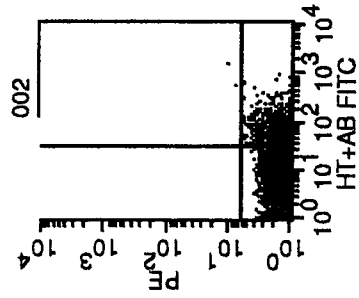
BÖLGE %

UL 0.00

UR 0.07

LL 2.51

LR 97.42



KAPI 31

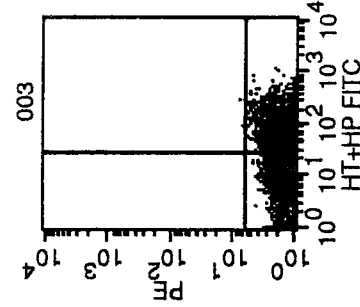
BÖLGE %

UL 0.00

UR 0.02

LL 84.79

LR 15.19



KAPI G1

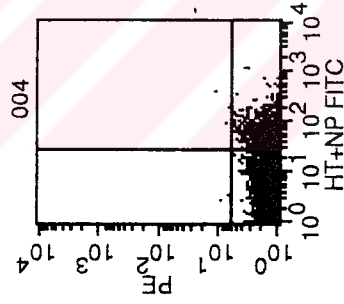
BÖLGE %

UL 0.00

UR 0.02

LL 65.64

LR 34.34



KAPI G1

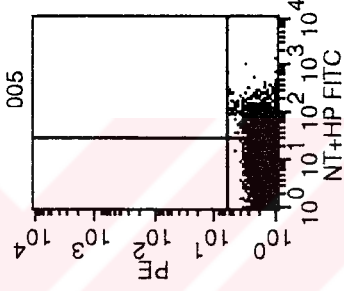
BÖLGE %

UL 0.02

UR 0.03

LL 86.01

LR 13.94



KAPI 31

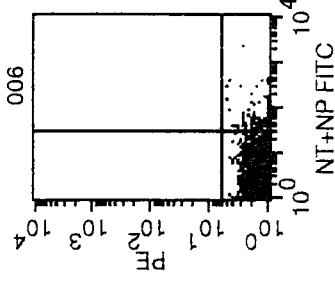
BÖLGE %

UL 0.00

UR 0.04

LL 82.23

LR 17.73



KAPI G1

BÖLGE %

UL 0.00

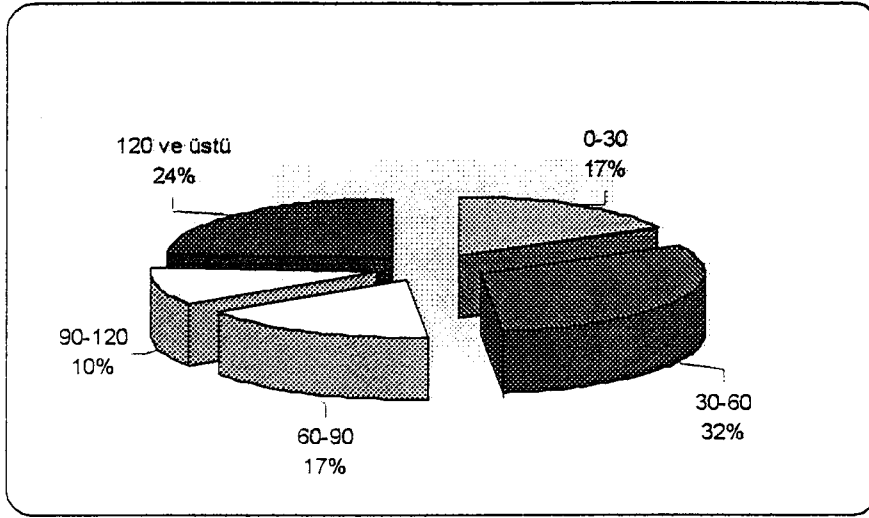
UR 0.00

LL 98.59

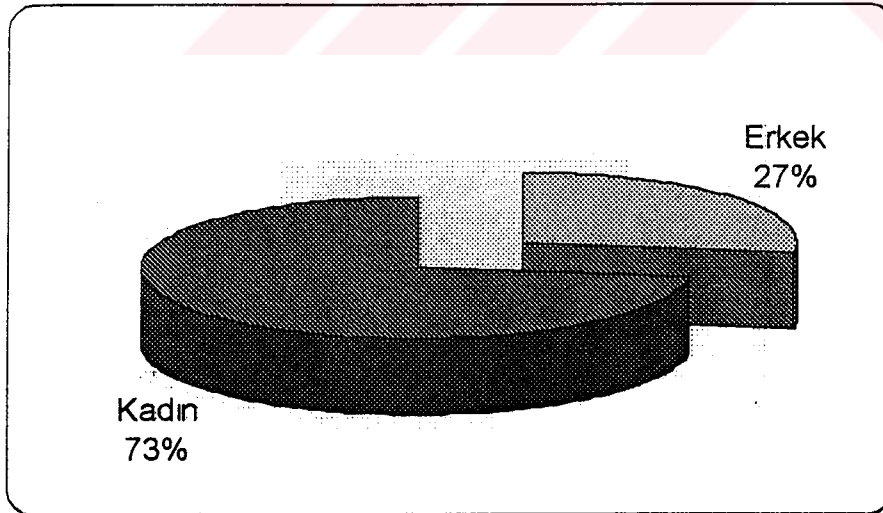
LR 1.41

SEKIL3.2. Antitrombositantikor pozitif bir hastanın FCM dot plot analizi

No	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Tedavi durumu	Trombosit sayısı	Eşlik eden hastalık	Transfüzyon (ünite)	IgG, IgA, IgM	ANA, Anti-DNA	Steroid	Splenektomi
1	25	K	SLE	ilaç td	122	mix bağ doku hst + HT	-	-	ANA ++, Anti-DNA ++	-	-
2	55	K	Kronik ITP	ilaç td	48	HT	+	IgG +	-	-	+
3	71	K	Akut ITP	ilaç td	71	Primer osteoporoz + hiperkolesitemi + tiroidektomi	-	-	ANA +, Anti-DNA -	-	-
4	26	K	SLE	Plazmaferaz + hemodiyaliz	9	-	4	IgG +	ANA -, Anti-DNA +	-	-
5	19	K	Akut ITP	ilaç td	40	-	-	IgG +	-	+	-
6	63	E	Kronik ITP	takipde	10	OSA	6	-	ANA +, Anti-DNA -	-	-
7	74	K	Kronik ITP	ilaç td	56	HT	-	-	ANA +	+	+
8	47	K	Akut ITP	ilaç td	77	Hidatik kist	+	-	-	+	+
9	56	E	Akut ITP	ivig td.	37	-	-	-	-	-	+
10	40	K	Kronik ITP	ilaç td	88	-	-	-	-	-	-
11	75	K	Kronik ITP	takipde	65	HT	-	-	-	-	-
12	26	K	Kronik ITP	ilaç td	75	-	-	-	-	+	+
13	67	K	Kronik ITP	ilaç td	19	-	-	IgG +	-	+	-
14	49	K	Kronik ITP	ilaç td	200	-	-	IgG +	-	+	-
15	39	K	SLE	ilaç td	127	HT + Antifosfolipid send	+	IgM, IgG +	-	+	+



Şekil 3.3: Hastalarda trombosit sayısı dağılımı (x10⁹/L)



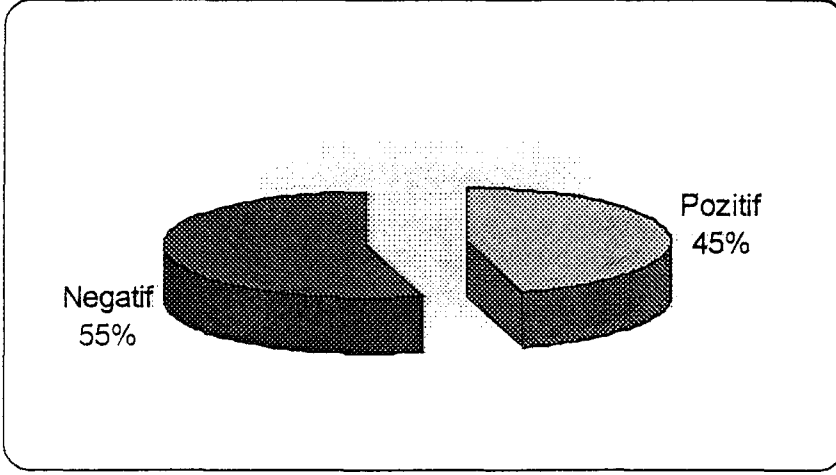
Şekil 3.4: ITP hastalarında cinsiyet dağılımı

Antitrombosit antikor (ATA) test sonucunu pozitif olarak kabul etmemiz için kesin bir değer verilememekle birlikte, bu çalışmada %1'den yüksek olan sonuçları pozitif olarak kabul edildi. Toplam hastaların %45'inin sonucu FCM ile pozitif, %55'i ise negatif olarak bulundu (şekil 3.5). Çalışmaya alınan kadınların %50'sinin FCM sonucu pozitif, %50'sinin negatif olarak bulundu (şekil 3.6). Erkeklerde ise pozitif bulunan hasta %33, negatif bulunan hasta ise %67 bulundu (şekil 3.7).

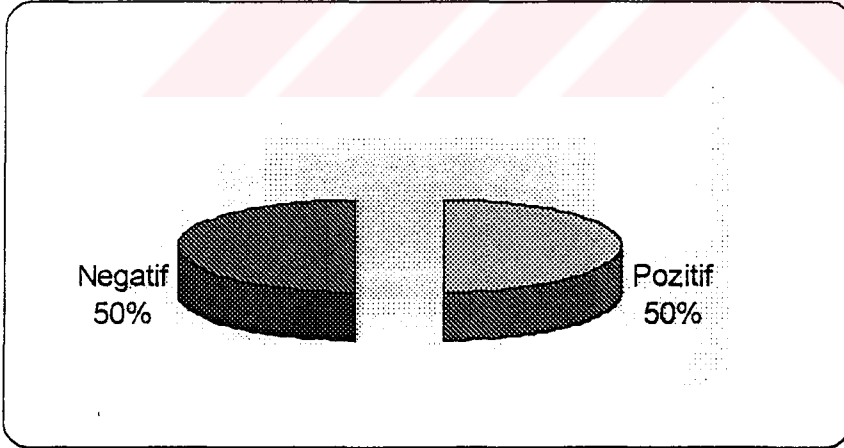
ELISA çalışmasında hem tek bir sağlıklı verici trombosit ile, hem de çeşitli kan gruplarından karıştırılarak hazırlanan trombosit havuzundaki trombositlerle çalışıldı. Tek bir vericiyle alışılmadaki dezavantaj o vericinin bazı antijenleri iermemesiydi. Havuz kullandığımız zaman tek bir vericiye ait olan trombositleri kullandığımızda ortaya çıkabilecek bazı antijen eksiklikleri ortadan kalkacağı için, bir vericinin eksprese etmediğı antijeni diğer verici karşılamış olur. Çalışmaya alınan hastaların %50'sinin ELISA sonucu (trombosit havuz kullanılarak çalışılan) pozitif, %50'sinin sonucu negatif bulunmuştur (şekil 3.8). Trombosit için tek bir verici kullanılarak alışılanlarda ise %55'inin ELISA sonucu pozitif, %45'inin sonucu negatif bulunmuştur (şekil 3.9). Yapılan değerlendirmede kadınlarda ELISA (havuz) sonuçlarının %50'sinin pozitif, %50'sinin negatif olduğunu; tek bir verici ile çalışıldığında pozitif oranının %44'e indiğini, negatif oranın ise %56'ya çıktığı görülmektedir (şekil 3.10, 3.11).

Erkeklerde yapılan değerlendirmede ise ELISA (trombosit havuzu) sonuçlarının %50'sinin pozitif, %50'sinin negatif olduğunu; tek bir verici ile çalışıldığında sonucun aynı olduğu görüldü (şekil 3.12, 3.13).

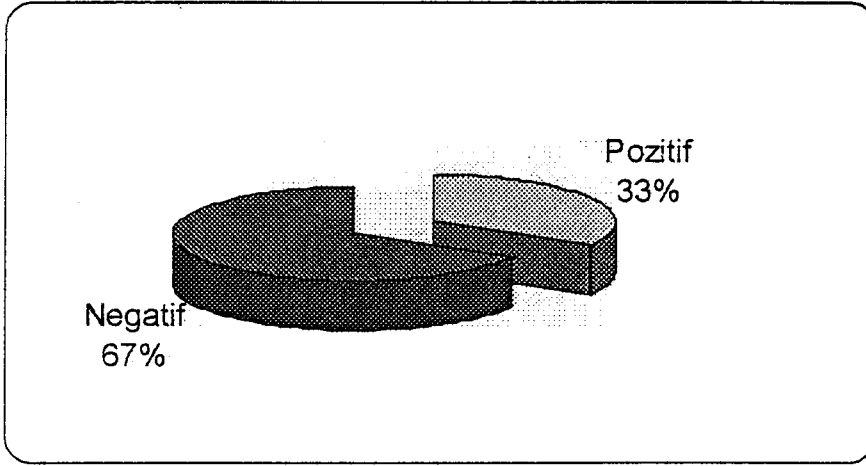




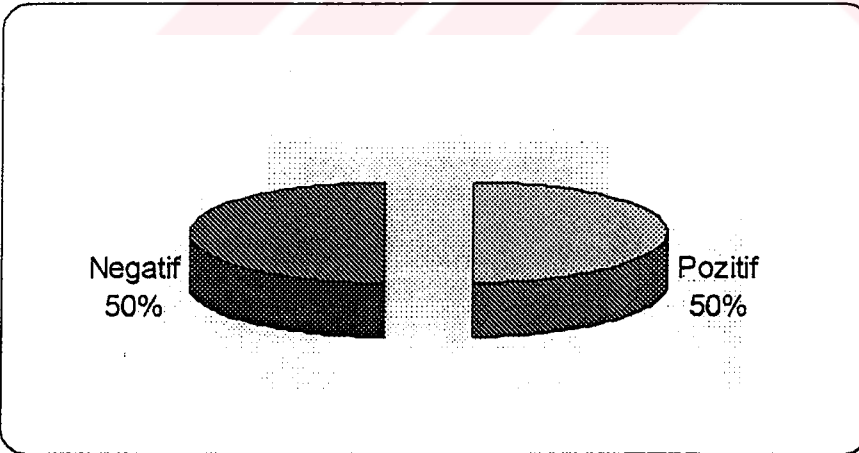
Şekil 3.5: ITP hastalarında akım sitometrisi sonuçlarının dağılımı



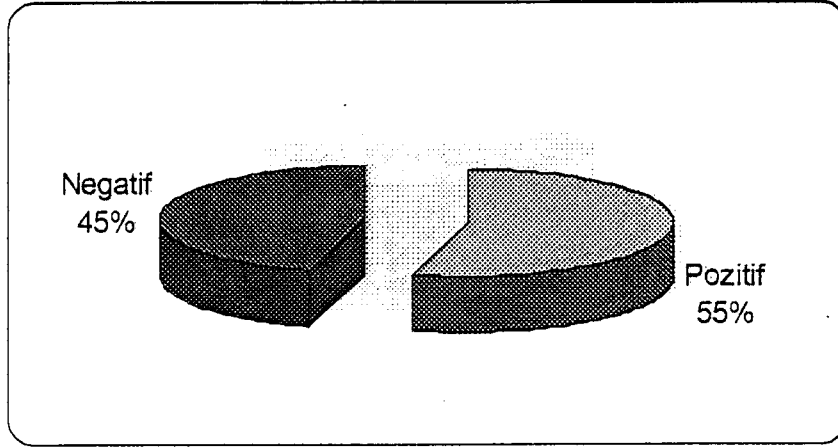
Şekil 3.6: Kadınlarda akım sitometri sonuçlarının dağılımı



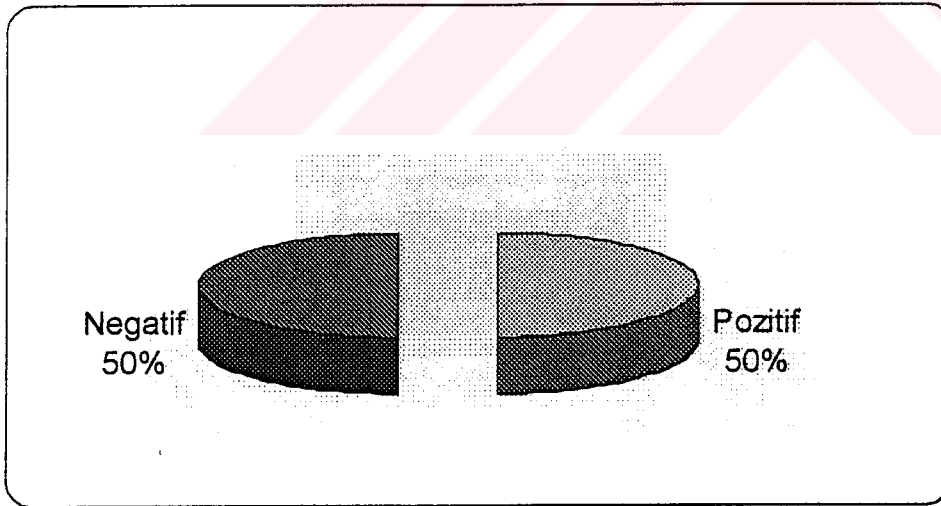
Şekil 3.7: Erkeklerde akım sitometrisi sonuçlarının dağılımı



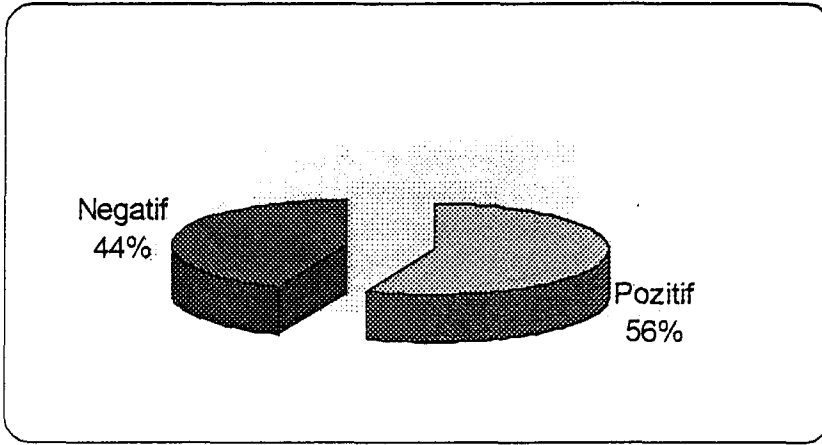
Şekil 3.8: ITP hastalarında ELISA (havuz) sonuçlarının dağılımı



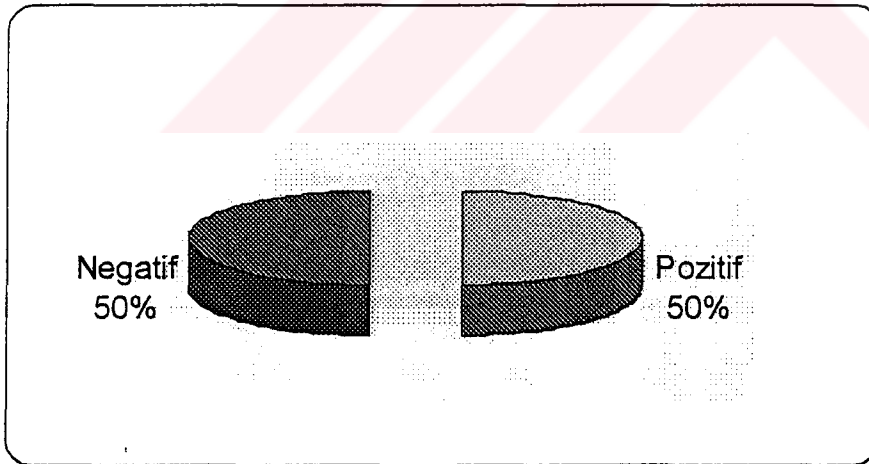
Şekil 3.9: ITP hastalarında ELISA (tek verici) sonuçlarının dağılımı



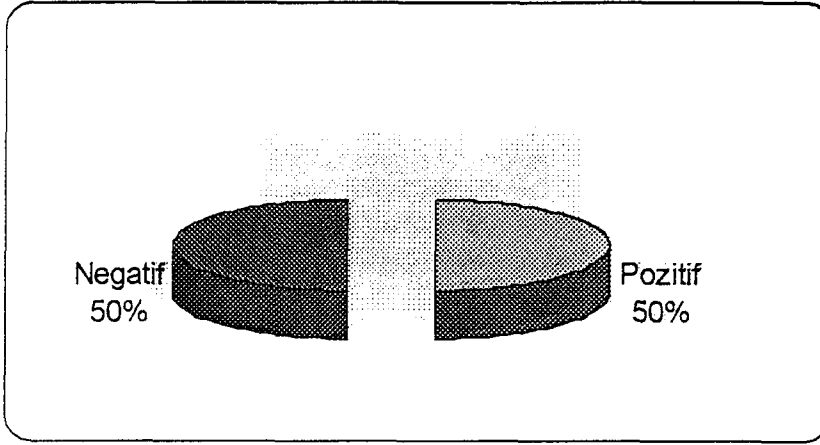
Şekil 3.10: Kadınlarda ELISA (havuz) sonuçlarının dağılımı



Şekil 3.11: Kadınlarda ELISA (tek bir verici) sonuçlarının dağılımı



Şekil 3.12: Erkeklerde ELISA (havuz) sonuçlarının dağılımı



Şekil 3.13: Erkeklerde ELISA (tek bir verici) sonuçlarının dağılımı

Bu çalışmaya ITP hastalarına ek olarak ikincil bir trombositopeni olan SLE'li hastalarda alınmıştır. Toplam olarak çalışmaya alınan 7 SLE hastasının %14'ün ELISA (havuz) ile pozitif, %14'ünün hem tek bir verici ile yapılan ELISA çalışmasında, hem de havuz ile yapılanda pozitif çıktığı, verici ile pozitif çıkan hiç hasta bulunmadığı görülmüştür. Hastaların %71'inin sonucu ELISA ile negatif çıkmıştır. FCM ile yapılan çalışmada ise hastaların %71'i pozitif bulunmuştur, %28'inin negatif çıktığı görülmüştür.

Sensitivite ve Spesifite ölçümleri

Yapılan akım sitometrisi çalışmasında kontrollerde esas alınarak yapılan değerlendirmede sensitivite değeri %66,6, spesifite değeri ise %100 olarak bulundu. Buna karşın ELISA çalışmasının sensitivite değeri %61 bulunurken spesifite değeri %72 bulundu.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Trombositlere bağlı otoantikör varlığının ITP hastalığında önemi yapılan çeşitli çalışmalarla incelenmiştir. Anti trombosit antikörleri (ATA) saptamak için çeşitli metotlar kullanılmıştır. Bu metodlardan bazıları elektroimmünoassay, ve diğer immüdiffüzyon yöntemleri, akım sitometresi, jel, ELISA, MAIPA ve antijen capture (ELISA-MACE)'dır. Biz yaptığımız bu çalışmada sadece ELISA ve akım sitometresi kullandık. Diğer yöntemler ise pratik olmamaları ve duyarlılıklarının az olması nedeni ile kullanılmadı.

Bir çalışmada, GP IIIa'ya bağlanacak antikörü saptamak için sıçan yumurtaları kullanılmıştır. Plazmadaki ve trombosit yüzeyine bağlanacak antikörü saptamak için plazmadaki ve trombosit yüzeyindeki antikörler bu hücrelerin de kullanıldığı GP IIb ve GPIIIa 'nın da bulunduğu özel bir antijen yakalama ortamında test edilmiştir. Fikse ve lize edilmiş trombositlerin adsorbsiyonu karşılaştırıldığında yıkanan fikse trombositte GPIII'aya epitopunun bağlanmaya izin vermediği görülmüştür. Plazma antikörlerinin kronik ITP'de öneminin belirsiz olduğu, trombosit bağlı antikörlerin tesbit edilmesinin tanısal olarak daha önemli olduğu görülmüştür (FUJISAWA K, 1992). Bizim yaptığımız çalışmada sadece fikse antikörler kullanıldı.

Ayrıca bu otoantikörlerin varlığı elektroimmünoassay yöntemi ile de tesbit edilmiştir. Bunun için Triton X ile çözülebilen proteinler yıkanan trombositlerde elde edilmiş ve karbometilat rabbit anti human IgG içeren agaroz jelde elektroforez edilerek oluşan roket presipitasyon ile sonuçlar alınmış ve aktif ITP hastalarının büyük çoğunluğunda PAIg pozitif saptanmış, çok düşük trombosit sayısı ile çalışılabilmesi, kısa sürede sonuç alınabilmesi ve tutarlı sonuç elde edilmesi bakımından kullanışlı bir metot olduğu düşünülmüştür (KUNICKI TJ, 1982).

Yine BS Morse ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise kullanılan radial immüdifüzyon yöntemiyle ITP'li hastaların çoğunda PAIg değerleri yüksek çıkmıştır. Ayrıca serumda Ig G seviyesi yüksek olan hastaların %100'ünde PAIg değeri yüksek çıkmıştır (MORSE BS, 1981). Bizim yaptığımız çalışmada ise hastaların 10/29'unda IgG (+), 5/29'unda negatif, 14/29'unda ise bilinmemektedir .

Trombosit üretimi ile yıkımı arasındaki ilişkiyi saptamak için yapılan bir çalışmada ise ITP'li hastaların çoğunda (trombosit sayısı $35 \times 10^9/L$ 'den yüksek olan) trombosit üretiminin artmadığı görülmüştür (STOLL D, 1985).

Yapılan bu çalışmada ise hastaların yaş ortalamaları 19 ila 75 arasındaydı. Trombosit otoantikörlerinde akut trombositopenik purpura'lı çocuklarda farklı bir patolojik mekanizma izlediği, PAIg'lerin kronik ITP'li olan çocuklarda düzeyinin daha yüksek olduğu yapılan bir çalışmada anlaşılmış (BERCHTOLD P, 1989). Bizim yaptığımız çalışmada ise yetişkin hastalar kullanıldı.

Jel filtreli trombositlerle yapılan başka bir çalışmada ise trombositlere bağlı PAIg'lerin direkt ölçümünün tanıda önemli bir yeri olduğu gösterilmiştir (LUIKEN GA, 1977).

MAIPA yönteminde ise yüksek oranda spesifik bir antikora özgü glikoproteinler tanımlanır. Trombosit ile HLA antikorlarını ayırır. Duyarlılığı düşüktür, ayrıca çok monoklonal antikor kullanılması gereklidir. Monoklonal antikorlar trombosit glikoproteinlerine özgü değildir. Tanımlanacak antikor monoklonal antikorun aynı epitopuna karşıdır ve yanlış negatif sonuçlar verebilir. MAIPA sadece AITP'li hastaların %50'sinde hastalığa neden olan antikoru saptar. Daha birçok test serumdaki trombosit antikorlarını saptamak için kullanılmaktadır ama MAIPA daha pratik ve sensitiftir (BLASCZYK R, 1998).

Trombosit bağı otoantikorların varlığı cinsiyete, trombosit sayımına, hastanın steroid alıp almamasına göre değişmemektedir (DİZ R, 2001). Ayrıca ITP'li ve ATA (+) hastalarda Anti Fosfolipid Sendrom (APS) gelişmektedir. ITP 'li hastalarda ATA varlığının APS için risk oluşturduğu görülmektedir.

CA Schifferin ve V Young'ın yaptığı çalışmada ise ELISA yöntemiyle trombositleri çevreleyen ve trombosit yüzeyine bağlı immünoglobulinler (PAIg) test edilmiş. Hastaların büyük çoğunluğunda PAIg saptanmış. HLA ve trombosit özgü antijenler (anti-PIA) çeşitli HLA-typing sera kullanılarak bulunmuş (SCHIFFER CA, 1983). Yapılan bu çalışmada ise ELISA sonuçlarının çoğu klinik ile uyumlu çıkmadı.

Yapılan diğ er bir çalışmada radial imm unoassay (RI) ile akım sitometrisi (FCM) yöntemi karşılaştırılmış ve FCM'nin sonuçlarının anormal olduğu görülmüş. Fakat FCM'nin daha spesifik olduğu anlaşılmış. Böylece elde edilen sonuçlardan RI yönteminin trombopoez hakkında iyi bilgi verdiği anlaşılmış. Aktif ve remisyonunda olan ITP fazlarının ayırt edilmesinde kullanılması gerektiği anlaşılmış (FARIAS C, 2000). Bizim yaptığımız çalışmada da FCM yönteminin sensitivite değeri %66,6, spesifite değeri ise %100 olarak, yani daha spesifik bulundu. Uygulanan ELISA yönteminin de spesifite değeri %72 olarak bulunurken sensitivite değeri %61 bulunmuştur. Böylece spesifite bakımından FCM metodunun daha duyarlı, sensitivite açısından ise ELISA metodunun daha duyarlı olduğu g r lm ştur.

Yapılan diğ er bir çalışmada kullanılan ELISA yönteminin sensitivitesi %90,3, spesifitesi ise %39,3 olarak bulunmuştur, aynı hastalara uygulanan FCM metodunun ise sensitif fakat spesifik olmadığı g r lm ştur. Cut-off değeri %15 olarak kabul edilmesine rağmen, çalışmamızda ise %1 olarak kabul edilmiştir. FCM'de %58 oranında yanlış pozitiflik varken, bu değer ELISA'da %18'e inmiştir (ROMERO L, 2000).

PAIg'lerin varlığı sistemik kan hastalıkları, lösemi, lenfoma gibi başka hastalıklarda da olabileceği için uygulanan testin spesifitesi önemlidir. Özellikle otoimmün trombositopeninin tanısında uygulanan FCM metodunun spesifitesi şüpheli bulunmuştur. ITP hastalarının %75-90'ında ATA (+) olarak bulunmuştur (JOUTSI L, 1986).

ATA varlığını tesbit etmek için üç metodun aynı hastalara uygulandığı bir çalışmada ise sonuçların hiçbirisinin birbiri ile tutarlı çıkmadığı görülmüş. ELISA ve FCM metodları için tam trombosit kullanıldı. Üçüncü yöntemde ise antijene özgü modifiye edilmiş antijen capture (ELISA – MACE) yöntemi kullanıldı. Tam trombositin kullanıldığı iki yöntem ile son yöntem arasında zayıf bir ilişki bulunmuş. Böylece bu tetkiklerin birbiri ile ilişkili çıkmaması, ITP tanısını koymada bu tetkiklerin herbirinin tek başına değil, hastanın kliniği ile birlikte değerlendirilmesini gerekli kılmıştır.

Trombosite özgü otoantikorları belirlemede en sık kullanılan yöntemler arasında yeralan MAIPA, FCM ve ELISA yöntemleri birbirleriyle karşılaştırıldığında bazı avantajlarının ve dezavantajlarının olduğu görülmektedir. ELISA yöntemi diğer metodlara göre sensitif iken, spesifik olan ve spesifik olmayan antikorları ya da HLA ve trombosit antikorlarını birbirinden ayıramaz. Alkalen fosfataz işaretli antiglobulin serumun güçlü pozitif reaksiyon vermesi için optimal konsantrasyonda kullanılmasına dikkat edilmelidir (pozitif kontrol). Negatif kontrolde de reaksiyon vermemesine dikkat edilmelidir. MAIPA yöntemi diğer yöntemlere göre daha spesifiktir ve antikora özgü glikoproteinler direkt olarak tanımlanır. Ayrıca bu metod trombosit ve HLA antikorlarının ayırt edilebilmesi yönünden çok önemlidir. Çeşitli monoklonal antikorlar tanımlama yapılabilmesi için kullanılmak zorundadır. Bunun yanında monoklonal antikorlar tüm trombosit glikoproteinlerine karşı uygun değildir, eğer tanımlanacak antikor aynı epitopa karşı ise test yanlış negatif sonuçlar verebilir. Fakat MAIPA yapılan tetkikler içinde en duyarlı ve pratik olanıdır (BLASCZYK R, 1998).

FCM yönteminde de ELISA yönteminde olduğu gibi trombosit antijenleri ile HLA antijenleri birbirinden ayrılamaz. Ayrıca FCM yönteminde non spesifik bağlanmalar yalancı pozitifliklere sebep olmaktadır. FCM metodu ile trombositler saçılım özelliklerine göre belirli bir bölge içine alınabilmekte ve analiz edilebilmektedir. Pozitiflikler yüzde olarak elde edilebilmektedir. Buna rağmen ELISA ve MAIPA yönteminde sonuçlar oluşan presipitasyonlar ile pozitif ya da negatif şeklinde değerlendirilebilmektedir.

OLEE ve arkadaşlarının 1996 yılında yaptıkları FCM metodunda örnekler ACD'li tüplere alınmış ve daha sonra 12g' de 15dk. örnekler çevrilerek trombositten zengin plazma elde edilmiş. Elde edilen TZP üç kere 1200g 'de TBS ile yıkanmış. Trombosit süspansiyonu sayımı yapılmış. PE bağlı anti trombosit GP Ib antikoru (AP-1) bağlanıp buzda 10 dk. HBSS/ BSA varlığında bekletilmiş. PE ile bağlanan antijenler diğer küçük patiküllerden ayrılmış. Hücre süspansiyonu 50 µ G1 natikoru içeren buffer içimde ya da negatif kontrol ile inkübe edilip, karanlıkta bir saat bekletilmiş. Daha sonra FITC ile kpnfuge edilmiş goat anti human Ig G ile reaksiyona sokulmuş ve yine karanlıkta, buzda bir saat bekletilmiş. Bekleme işlemi sonrası trombositler iki kere yıkanmış , bir ml yıkama solusyonu içinde resüspanse edilmiş, ve floresn ölçümleri yapılmış.

STOCKELBERG ve arkadaşlarının 1996 yılında yaptığı FCM çalışmada ise , 0 kan grubu olan vericiden kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınarak farklı bir santrifüj hızında trombositden zengin plazma elde edilmiş. TZP iki kere yıkanmış ve trombosit sayısı $500 \times 10^9/L$ olacak şekilde konsantre edilmiş. Yıkanmış trombosit

süspansiyonundan 100 µl ependorf tüpüne pipetlenmiş, 100 µl serum eklenmiş . Oda ısısında bir saat bekletilen trombositler iki kere PBS-EDTA ile yıkanmış ve 100µl FITC konjugeli goat antihuman Ig (ikincil antikor) ile 30 dk karanlıkta bekletilmiş. Trombositlerin inkübasyonundan sonra bir ml PBS-EDTA'nın içinde resüspane edilmiş. Ardından hemen FCM cihazında (FACScan, Becton Dickinson) analiz edilmiş. FSC-SSC plotuna göre alınan trombosit kapısı içerisinde 10,000 hücre okunmuş. İTP hastalarının % 89'u bu metod ile pozitif çıkmış.

TERESA ve arkadaşlarının 1996 yılında yaptığı bir çalışmada ise EDTA'lı tüpe 5-10 ml tam kan alınmış. Örnekler 200g'de 10 dk santrifüj edildikten sonra TZP elde edilmiş ve trombosit peleti 800g'de üç kere PBS-EDTA ile yıkanmış. Daha sonra PBS-EDTA'nın içinde %2'lik formaldehit ile 10dk fikse edilmiş. Fikse edilen trombositler yıkanarak $5 \times 10^9/L$ olacak şekilde konsantre edilmiş. 200µl trombosit sôspansiyonu 30µl %5'lik Bovine albumin ile kaplanmış polistern tüplere eklenmiş. Fab2 PAIg'leri belirlemek için kullanılmış CD41 monoklonal antikoruna ise trombosit popülasyonunu belirlemek, non spesifik bağlanmaları ekarte edebilmek için kullanılmış. FCM cihazında okunma yapılırken alınan trombosit kapısında 10,000 hücre okunmuş. Bu metodla yapılan çalışmada İTP hastalarının %45'i pozitif bulunmuş.

Görüldüğü üzere literatürde farklı testlerin farklı duyarlılıkları olduğu, aynı testin ise farklı çalışmalarda farklı pozitifliklere sahip olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada literatürde ilk kez ELISA ve FCM tabanlı iki yöntem karşılaştırılmaktadır. Bizim çalışmamızda kullanılan FCM yöntemi ise literatürdeki üç FCM çalışmasının

metodları ile farklılık göstermektedir. Bizim yöntemimizde MAIPA ile benzer olarak fiksasyon ve nonspesifik bağlanmaları ekarte ettirecek normal trombosit ve normal plazma kombinasyonları kullanılmıştır. Bu da sonuçlarımızın spesifitesini arttırmıştır.

Sonuç olarak, uygulanan iki metodun sonuçları arasında bir uyum saptanmamıştır. ITP hastalığının tanısının büyük ölçüde hastanın klinik bilgileriyle konulabileceği, yapılan bu testlerin tanı koymada minimal bir etki gösterdiği anlaşılmıştır.



ÖZET

İdiopatik trombositopenik purpura hastalığında (ITP), trombosit yüzeyi ve serumda otoantikör varlığının klinik ile ilişkisi

Bu çalışmanın amacı sebebi belli olmayan trombosit düşüklüğünün araştırılmasında uygun metodun belirlenmesi ve klinik bulgular ile korelasyonun tespitidir. Anti Trombosit Antikör (ATA) çalışması yapılan hastalarda trombosit yüzeyindeki ve hasta plazmasındaki otoantikörler, Akım Sitometrisi yöntemiyle indirekt olarak tespit edilmektedir. Bu araştırmada ise bu çalışmaya ek olarak, otoantikörler serumda ELISA yöntemi ile tespit edilip, 2 çalışmanın sonucu karşılaştırılmıştır. Ortaya çıkan sonuçlar hastanın klinik bulgularıyla beraber değerlendirilerek, bu testlerin tanısal değeri incelenmiştir. Böylece ITP tanısı için yapılan testlerin önemi ve değeri anlaşılmıştır.

22 yeni tanı almış yada tedavi sonrası izlenen idiopatik trombositopenik purpura (ITP) ve 7 yeni tanı almış yada tedavi sonrası izlenen sistemik lupus eritematosus (SLE) hastalarından alınan örnekler çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya alınan hastaların ortalama yaşları 47 (19-75) idi, ortalama trombosit sayıları ise $75 \times 10^9/L$ ($9 \times 10^9/L$ - $200 \times 10^9/L$) idi. Hastaların %17'sinin trombosit sayıları mm^3 'de $0-30 \times 10^9/L$ arasında, %32'sinin $30 \times 10^9/L$ - $60 \times 10^9/L$ arasında, %17'sinin $60 \times 10^9/L$ - $90 \times 10^9/L$ arasında, %10'unun $90 \times 10^9/L$ - $120 \times 10^9/L$ arasında, %24'ünün ise $120 \times 10^9/L$ ve üzeriydi. Hastaların %27'si erkek, %73'ü kadındı. Antitrombosit antikör (ATA) test sonucunu pozitif olarak kabul etmemiz için kesin bir değer verilememekle birlikte, bu çalışmada %1'den yüksek olan sonuçları pozitif olarak kabul edildi. Toplam hastaların %45'inin sonucu FCM ile pozitif, %55'i ise negatif olarak bulundu. Çalışmaya alınan kadınların %50'sinin FCM sonucu pozitif, %50'sinin negatif olarak bulundu. Erkeklerde ise pozitif bulunan hasta %33, negatif bulunan hasta ise %67 bulundu.

Çalışmaya alınan hastaların %50'sinin ELISA sonucu (trombosit havuz kullanılarak çalışılan) pozitif, %50'sinin sonucu negatif bulunmuştur. %55'inin ELISA sonucu (trombosit tek bir verici kullanılarak çalışılan) pozitif, %45'inin sonucu negatif bulunmuştur. Yapılan değerlendirmede kadınlarda ELISA (havuz)

sonuçlarının %50'sinin pozitif, %50'sinin negatif olduğunu; tek bir verici ile çalışıldığında pozitif oranının %44'e indiğini, negatif oranın ise %56'ya çıktığı görülmektedir.

Erkeklerde yapılan değerlendirmede ise ELISA (havuz) sonuçlarının %50'sinin pozitif, %50'sinin negatif olduğunu; tek bir verici ile çalışıldığında sonucun aynı olduğu görülmektedir.

Bu çalışmaya ITP hastalarına ek olarak ikincil bir trombositopeni olan SLE'li hastalarda alınmıştır. Toplam olarak çalışmaya alınan 7 SLE hastasının %14'ün ELISA (havuz) ile pozitif, %14'ünün hem tek bir verici ile yapılan ELISA çalışmasında, hem de havuz ile yapılanda pozitif çıktığı, verici ile pozitif çıkan hiç hasta bulunmadığı görülmüştür. Hastaların %71'inin sonucu ELISA ile negatif çıkmıştır. FCM ile yapılan çalışmada ise hastaların %71'i pozitif, %29'i negatif bulunmuştur.

Yapılan akım sitometrisi çalışmasında kontrollerde esas alınarak yapılan değerlendirmede sensitivite değeri %66,6, spesifite değeri ise %100 olarak bulundu. Buna karşın ELISA çalışmasının sensitivite değeri %61 bulunurken spesifite değeri %72 bulundu.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarla ITP tanısının uygulanan metodların hiçbirisiyle tekbaşına konamadığı, tanının hastanın kliniği ile birlikte değerlendirilerek konması gerektiği anlaşılmıştır.

Anahtar sözcükler: otoantikör, antijen, trombosit, akım sitometrisi, ELISA

SUMMARY

The relationship of the presence of auto antibody on platelet surface and in serum, with the clinic of the patient in patients with ITP

The aim of this study is to determine the appropriate method to diagnose idiopathic thrombocytopenic purpura and to determine the correlation with clinical findings. Autoantibodies on platelet surface and patient serum were determined with flow cytometry (FCM) and autoantibodies in patient serum were determined by ELISA and results of these two methods were compared. Results were correlated with clinical findings, and the diagnostic value of these tests were investigated.

Twenty-two new diagnosed or treated ITP patients and seven patients with Sistemik Lupus Eritematosus were accepted to this study. The mean age of the patients were 47 (19-75), the mean platelet count was $75 \times 10^9/L$ ($9 \times 10^9/L$ - $200 \times 10^9/L$). The platelet count of the 17% of the patients were $0-30 \times 10^9/L$ in mm^3 , in 32% of the patients were $30 \times 10^9/L$ - $60 \times 10^9/L$, 17% of the patients were $60 \times 10^9/L$ - $90 \times 10^9/L$, 10% of the patients were $90 \times 10^9/L$ - $120 \times 10^9/L$, 24% of the patients were $120 \times 10^9/L$ or higher. 6 of the patients were male, and 16% were female. We accepted the results that were higher than 1% as positive. The FCM results of 45% of all the patients were positive, and 55% were negative. Fifty percent of the women that were taken to this study gave positive FCM results, and 50% were negative. In males, 33% of them were positive, and 67% were negative.

50% of the patients had positive ELISA results, (studied with platelet pool), and 50% were negative. 55% of the patients had positive ELISA results (studied with only a donor), and 45% were negative. In females, 50% were positive and 50% were

negative with ELISA pool, if the study was performed with a donor, the positive value decreased to 44%, and the negative value increased to 56%.

In males, the ELISA (pool) results were 50% positive, and 50% were negative. When we analyzed only with a donor, the results were the same.

In addition, patients who had secondary thrombocytopenia (SLE) were evaluated. 14% of the total SLE patients, were positive by ELISA (pool) and 14% of them were positive either by pool or by a donor. 71% of the patients were negative by ELISA. 71% of the patients were positive by flow cytometry.

FCM study revealed that the sensitivity value 66,6%, and specificity value was 100%. In ELISA study, the sensitivity was 61% and specificity was 72%.

As a result, we demonstrated that to diagnose ITP, none of these methods are satisfactory and clinical findings are still the main clue in diagnosing ITP.

Key words: autoantibodies, antigen, platelet, flow cytometry, ELISA

KAYNAKLAR

- BERCHTOLD P., MCMILLAN R., TANI P., SOMMERVILLE- NIELSEN S. and BLANCHETTE VS. Autoantibodies against platelet membrane glycoproteins in children with acute and chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 74 (5): 1600-1602, 1989.
- BETZ SA., FOUCAR K., HEAD D., CHEN I. and WILLMANN C. False – positive flow cytometric platelet glycoprotein II b/ III a expression in myeloid leukemias secondary to platelet adherence to blasts. *Blood* 79 (9): 2399- 2403, 1992.
- BLASCZYK R., FONATSCH C., HUHND., MEYER O., NEGEL S., NEUBAUER A., OERTEL J., SALOMA A., SERKE S., STREUBAL B., THIEDE C. *New Diagnostic Methods in Oncology and Haematology*, s.:213-229, 1998.
- BROX A.G, HAWSON JK, FAUSER AA. The treatment of immune thrombocytopenic purpura with ascorbate. *British Journal of Haematology* 70: 341-344, 1998.
- BUCHANAN GR, HOLTKAMP CA. Prednisone therapy for children with newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura –a randomized clinical trial. *American Journal of Pediatric Hematology Oncology* 6: 355, 1984.
- BUSSEL J. and CIRES D. Immune thrombocytopenic purpura, neonatal alloimmune thrombocytopenia and posttransfusion purpura. *Haematology Basic Principles and Practice*, 3rd ed: 2096- 2105, 2000.
- DECKMYN H., ZHANG J. , HOUTTE E. and VERMYLEN J. Production and nucleotide sequence of an inhibitory human Ig M autoantibody directed against platelet glycoprotein Ia / II2a : *Blood* 84 (6) : 584- 588, 1985.
- DİZ- KÜÇÜKKAYA R., HACIHANEFİOĞLU A., YENEREL M., TURGUT M., KESKİN H., NALÇACI M. and İNANÇ M. Antiphospholipid antibodies and antiphospholipid syndrome in patients presenting with immune thrombocytopenic purpura: a prospective short study. *Blood* 98 (6): 1760- 1764, 2001.
- ERTEM M.: İmmün trombositopenik purpura için tanı ve tedavi kılavuzu, *II. Mezuniyet sonrası eğitim kursu*, 25:17- 24, 1997.
- FARIAS C., KEMPFER A., LUCEROS S., SILAF MARÍA R, CARBOLLO GONZALO A, LAZZARI MARÍA A. Comparison between radial immunodiffusion and flow cytometry techniques for detecting antiplatelet antibodies, *Haematologica* 85: 107- 109, 2000.
- FREDERIKSEN H. and SCHMIDT K. The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults increases with age. *Blood* 94 (3): 909- 913, 1999.
- FUJISAWA K., TANI P., TOOLE T., GINSBERG M. and MCMILLAN R. Different specificities of platelet- associated and plasma autoantibodies to platelet GPII b- III a in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 79 (6): 441- 446, 1992.
- GMUR J., BURGER J., SCHANZ U., FEHR J., SCHAFFRER A. Safety of stringent prophylactic platelet transfusion policy for patients with acute leukemia. *Lancet* 338:1223, 1991.

GODEAU B, ZINI J-M, schaeffer a ET AL. High dose methylprednisolone or high dose intravenous gamaglobulin for autoimmune thrombocytopenia. *Br Med J* 296: 249, 1998.

JOHANNA E., PORTIELJE A., RUDI G., WESTENDORP J., C. LUIN-NELEMANS H. and BRAND A. Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 97 (9): 2549-2554, 2001.

JOUTSI L. and KEKOMÄKI R. Comparison of the direct platelet immunofluorescence test (direct PIFT) with a modified direct monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (direct MAIPA) in detection of platelet-associated IgG. *British Journal of Haematology* 96: 204- 209, 1996.

KELTON JG and STEEVES K. The amount of platelet- bound albumin parallels the amount of Ig G on washed platelets from patients with immune thrombocytopenia. *Blood* 62 (4) : 924- 927, 1983.

KUNICKI TJ., KOENIG M., KRISTOPEIT S. and ASTER R. Direct quantitation of platelet- associated Ig G by electroimmunoassay. *Blood* 60 (1): 54-58, 1982.

LUIKEN GA., MCMILLAN R., LIGHTSEY AL., GORDON P., ZEVELY S., SCHULMAN I., GRIBBLE TJ., LONGMIRE RL. Platelet-associated IgG in immune thrombocytopenic purpura. . *Blood* 50 (2): 317-325, 1977.

MATTIA D., PRINCIPE D., GIOVANNI C. JANKOVIC M., ARRIGHINI A., GIORDANO P., MENICHELLI A., MORI P., ZECCA M., PERSION A. and The AIEOP ITP study group. Acute childhood idiopathic thrombocytopenic purpura: AIEOP Consensus guidelines for diagnosis and treatment. *Haematologica* 85 (4): 420- 424, 2000.

MCMILLAN R., Therapy of adults with refractory chronic immune thrombocytopenic purpura, *Annals of International Medicine* 126: 307-314, 1997.

MORSE BS, GIULIANI D and NUSSBAUM M. Quantitation of platelet- associated Ig G by radial immunodiffusion. *Blood* 57 (4): 809- 811, 1981.

KARAYALÇIN Ü., Klinik Hematoloji kitabı, Ed: V. AKIN UYSAL, Fidan Kitabevi ANKARA, 1984.

OLEE T., EN J., CHUNG- JENG L., MO L., SOO CHO C., WEI X., XIAO- FEN W., WOODSJ., CHEN J and P. Generation and analysis of a Ig G anti- platelet autoantibody reveals unusual molecular features. *British Journal of Haematology* 96: 836- 845, 1997.

ROMERO- GUZMÁN L., LÓPEZ- KARPOVITCH X., PAREDES G., BARRALES- BENITEZ O., PIEDRAS J. Detection of platelet-associated immunoglobulins by flow cytometry for the diagnosis of immune thrombocytopenia; a prospective study and critical review. *Haematologica* 85 (6): 627- 631, 2000.

SCHIFFER CA and YOUNG V. Detection of platelet antibodies using a micro-enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA). *Blood* 61 (2): 311- 317, 1983.

SCHMIDT EE. , MACDONALD IC and GROOM AC.. Changes in splenic microcirculatory pathways in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 8(6): 1485- 1489, 1991.

SCORADAVOU A, WOO B, WOLOSKI BM, CUNNINGHAM- RUNDLES S, ETTINGER LJ, ALENDORT LM and BUSSEL. Intravenous anti- D treatment of immune thrombocytopenic purpura: experience in 272 patients. *Blood* 89 (8): 2689- 2700, 1997.

STOCKELBERG D, HOU M, JACOBSSON S, KUTTI J and WADENVIK H. Detection of platelet antibodies in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura

(ITP). A comparative study using flow cytometry, a whole platelet ELISA, and an antigen capture ELISA. *Eur J Haematology* **56**: 72-77, 1996.

STOLL D., CINES DB., ASTER RH. and MURPHY S. Platelet kinetics in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and moderate thrombocytopenia. *Blood* **65** (3) : 584- 588, 1985.

WOODS VL., OH E MASON D. and MCMILLAN R. Autoantibodies against the platelet glycoprotein II b/ III a complex in patients with chronic ITP. *Blood* **63** (2): 368-375, 1984.

