

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Ahmet Muzaffer DEMİR

**İMMUN TROMBOSİTOPENİDE LENFOSİT
KEMOATRAKTAN DÜZEYLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Veysi ASOĞLU

EDİRNE-2018

TEŞEKKÜR

Tez konusu seçiminde ve oluşturulmasında emeği geçen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet Muzaffer Demir'e, tezimin hazırlanmasında emeği geçen Dr. Öğr. Üyesi Elif Gülsüm Ümit'e, uzmanlık eğitimime katkılarından dolayı İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hüseyin Ahmet TEZEL'e ve tüm İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri'ne, tüm çalışma arkadaşlarıma, her koşulda yanımda olan ve bugünlere gelmemde büyük emekleri olan aileme en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım. Bu tez çalışması Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje no: TÜBAP 2017/60).

İÇİNDEKİLER

• GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
• GENEL BİLGİLER.....	3
-İMMÜN TROMBOSİTOPENİ.....	3
-MEGAKARYOPOEZ VE KEMOKİNLERİN TROMBOSİT FİZYOLOJİSİNDEKİ ROLÜ.....	11
-KEMOKİNLER VE KLİNİK ÖNEMİ.....	12
• GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	17
• BULGULAR.....	19
• TARTIŞMA.....	26
• SONUÇLAR.....	30
• ÖZET.....	33
• SUMMARY.....	35
• KAYNAKLAR.....	37
• EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

AMR	:Ashwell-Morrell reseptörü
CCL	:Kemokin
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
GP	:Glikoprotein
HKH	:Hematopoietik kök hücre
IF	:İnterferon
IL	:İnterlökin
ITP	:İmmun trombositopeni
IVIG	:İntravenöz immunglobulin
MAPK	:Mitojen-aktifleştirilmiş protein kinaz
MIP-3	:Makrofaj inflamatuvar protein-3
MK	:Megakaryosit
MP	:Metilprednizolon
MPV	:Ortalama trombosit hacmi

mRNA	:Messenger ribonukeikası
NKFB	: Nükleer Faktör Kappa-B
PCR	:Polimerase zincir reaksiyonu
PARC	:Pulmoner aktivasyon düzenleyen kemokin
rhTPO	:Rekombinant insan trombopoietin
Th	:T helper hücre
TRAF-6	:Tümör nekroz faktör reseptör ilişkili faktör-6
TCR	:T Hücre Reseptörü
TPO	:Trombopoietin
TRA	:Trombopoietin reseptör agonisti

GİRİŞ VE AMAÇ

İmmün trombositopeni (İTP) trombositlere karşı oluşan otoantikörlerin trombosit yıkımını arttırması ve trombosit yaşam süresini kısaltması sonucu gelişen, trombositopeni kliniği ile seyreden edinsel bir hastalıktır (1). İTP sık görülebilen bir kanama bozukluğu olmasına rağmen patogenezi tam anlamıyla bilinmemektedir. Trombositopeniye; otoimmün yıkım, T hücre aktivasyonu, kompleman bağımlı trombolizis ve trombosit yapımında bozulma gibi mekanizmalar neden olmaktadır. İTP hastalarında trombosit yüzeyinde bulunan glikoproteinlerine karşı otoantikörler olduğu gösterilmiştir (2,3). Antikörlerle kaplı trombositler retiküloendotelial sistemde, özellikle dalakta bulunan doku makrofajları tarafından sunulan Fc γ reseptörlerine bağlanarak dolaşımdan uzaklaştırılırlar (4). İTP hastalarında otoimmün trombosit yıkımı sonucu kemik iliğinde megakaryosit yapımı artar. Ancak buna rağmen, hastaların çoğunda trombosit üretimi normalin altında seyreder. Daha enteresan bir şekilde, İTP artık Th (T-helper) hücrelerinin oligoklonal birikimi ile tanımlanan bir Th-1 hastalığı olarak düşünülmektedir (5). Th hücre aktivasyonu ve göçü karmaşık bir süreç olup burada bir dizi sitokin, kemokin ve kemokin reseptörü görev alır. Kemokinler protein yapısında küçük kemotaktik sitokinler olup anjiyogenez, hematopoez, mast hücre degranülasyonu, T hücre farklılaşması ve lökosit trafiği gibi sayısız değişik fonksiyonlarında rol alırlar.

Bugüne kadar 50'den fazla kemokin tanımlanmış ve yapısına göre dört ana alt aileye, yani CC, CXC, CX3C ve C kemokinlerine sınıflandırılmıştır (6). Bununla birlikte, bu grupların

yalnızca ikisi yaygın olarak karakterize edilmiştir (CC ve CXC kemokinleri) (7). Kemokin reseptörleri, antijenik tecrübelerine ve kutuplaşma türüne bağlı olarak, T hücresi yüzeyleri üzerinde seçici olarak ifade edilir. Kemokin reseptörleri bu hücre tipleri için özel değildir. CC alt ailesinin kemokinleri genellikle T lenfositleri, monositleri ve doğal öldürücü (NK) hücreler için kemoatraktan olmasına karşın, CXC kemokinler nötrofillerde kemotaksi ve endotel hücrelerine yapışmasını sağlarlar (8-10). Hücre istihdamındaki rollerine ek olarak, kemokinlerin, sitokin üretimi ve Th1 / Th2 hücre indüksiyonu gibi immün sistemi düzenleyici aktivitelerde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (11). Örneğin CCL10'un kemoatraktant aktivitesi; romatoid artrit (RA), sistemik lupus eritematoz (SLE), sistemik skleroz (SS), multipl skleroz (MS), tip 1 diabetes mellitus, otoimmün tiroidit ve Graves gibi hastalıklarda anlamlı derecede artmış bulunmuştur (12-17). Bununla birlikte İTP oluşum patogenezinde her geçen gün önemi artan kemokinlerin ve kemokin reseptörlerinin rolü tam olarak bilinmemektedir.

Bu çalışmada, 2016-2017 yılları arasında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji servisinde yatarak tedavi gören, polikliniğe ve hastane acil servisine ayaktan başvurarak İTP tanısı alan hastaların, önceden belirlenmiş bazı serum kemoatraktant düzeylerinin aynı yaş ve cinsiyet dağılımına sahip sağlıklı erişkinlerle karşılaştırılması amaçlandı. Elde edilen bilimsel veriler İTP hastalığının patogenezinin anlaşılmasında, uygulanacak tedavi modalitelerinin etkililiğinde, seçiminde, gelecekte tanısal yaklaşımlarımızda ve de hastalık yönetiminde katkı sağlayacaktır.

GENEL BİLGİLER

İMMÜN TROMBOSİTOPENİ

Trombosit Fizyolojisi

Trombositlerin büyük kısmı kan dolaşımında, az bir kısmı ise dalakta yer almaktadır. Yetişkinlerde trombosit sayısı ortalama 150.000-450.000/mm³ tür (1). Trombosit sayısı 100-150.000/mm³ arasında olan kişilerde herhangi bir klinik bulgu gözlenmemesi ve tedavi endikasyonu olmaması nedeniyle trombositopeni sınırı için eşik değer 100.000/mm³ olarak kabul edilmiştir (18). Trombositler hemostaz, anjiyojenez, yara iyileşmesi, inflamasyon ve bağışıklık gibi süreçler için vazgeçilmez elemanlardır. Trombositin boyutu trombosit aktivitesi ile uyumlu olup; büyük trombositlerin protrombotik potansiyeli daha yüksektir. Megakaryositler trombositlerin öncül hücresi olup, kemik iliğinin en büyük hücreleridir. Megakaryositlerin büyüme ve çoğalması karaciğer kaynaklı trombopoietin (TPO) aracılığıyla gerçekleştirilir. Megakaryosit sitoplazmasından endomiyositoz ile trombosit oluşumu meydana gelir. Megakaryositlerden trombosit oluşumu yaklaşık 5 gün olup, periferik kana geçen trombositlerin yarı ömrü ise 7-10 gündür (19).

İmmün Trombositopeni

İmmün trombositopeni, etiyolojide rol oynayan faktörlere göre primer ya da sekonder olarak iki gruba ayrılır. Sekonder İTP nedenleri arasında otoimmün hastalıklar, viral infeksiyonlar ve ilaçlar yer alır (20). Aslında sekonder İTP, primer İTP dışındaki bütün immün trombositopenileri kapsar. Trombositopenilerin patofizyolojik olarak sınıflandırılması Tablo-

1’de verilmiştir (21). İTP hastanın yaşına, hastalığın süresine ve beraberinde başka hastalıkların var olup olmamasına göre sınıflandırılır. Buna göre yeni tanı konmuş (Akut) İTP; tanıdan itibaren ilk 3 aylık dönemi, (Persistant-İnatçı) İTP; tanıdan itibaren 3-12 aylarda olup spontan remisyona girmeyen veya tedavi kesildiğinde remisyonda kalamayan olguları, kronik İTP tanımı ise 12 ay veya daha fazla süren olgular için kullanılmaktadır. Uluslararası uzlaşma raporuna göre belirlenen İTP tanımlamaları Tablo-2’de gösterilmiştir (22).

Tablo-1 Trombositopeni sınıflandırılması (21)

1)TROMBOSİT YAPIM BOZUKLUKLARI A) Kalıtsal nedenler -Konjenital amegakaryositik trombositopeni -Trombositopeni ve radius yokluğu (TAR) -Amegakaryositik trombositopeni ve radyoulnar sinostoz (ATRUS) -X’e bağlı anemi ve şiddetli trombositopeni (GATA 1 defekti) -Familiyal trombosit eksikliği/akut myeloid lösemi -Wiskott Aldrich sendromu (WAS) -MYH9 geniyle ilişkili makrotrombositopeni sendromları -Montreal trombosit sendromu -Bernard-Soulier sendromu B) Kazanılmış nedenler -Aplastik anemi (AA) -Myelodisplastik sendrom (MDS) -İnfiltratif durumlar (lösemi, lenfoma, solid tümörler) -Osteopetrozis -Nutrisyonel eksiklikler (demir, folat, vitamin B12, anoreksi)
-İlaç veya radyasyon ilişkili trombositopeniler -Neonatal hipoksi veya plasental yetmezlik 2)TROMBOSİT YIKIM FAZLALIĞI A) Primer Trombosit Tüketim Sendromları a) İmmün trombositopeniler -Akut ve kronik İTP -Otoimmün hastalıklar - Siklik trombositopeni - Otoimmün lenfoproliferatif sendrom (ALPS) - Sistemik lupus eritematozus (SLE) - Evans sendromu - Antifosfolipid antikor sendromu -Neoplazi ilişkili immün trombositopeni -HIV ilişkili trombositopeni
-Neonatal immün trombositopeni [alloimmün, otoimmün (örn: maternal İTP)] -İlaça bağlı immün trombositopeni (örn: heparin) -Post-transfüzyon purpura -Post-transplant trombositopeni -Allerji ve anafilaksi b) İmmün olmayan trombositopeniler -Enfeksiyona bağlı (bakteriyemi, fungemi, viral, protozoal enfeksiyonlar)

Tablo-1 Trombositopeni sınıflandırılması (21) (devamı)

-Trombotik mikroanjiyopatik durumlar - Hemolitik üremik sendrom (HÜS) - Trombotik trombositopenik purpura (TTP) - Kemik iliği nakli ile ilişkili mikroanjiyopati - İlaça bağlı mikroanjiyopati -Konjenital kalp hastalığı veya kalp kapağı protezine bağlı trombositopeni -Doğrudan trombositlere etkili ilaçlara bağlı (ristosetin, protamin) -Tip 2B von Willebrand hastalığı (vWH) veya trombosit tipi vWH B) Kombine trombosit ve fibrinojen tüketim sendromları a) Yaygın damar içi pıhtılaşma (DİK) b) Kasabach-Merritt sendromu c) Virüs ilişkili hemofagositik sendrom 3) SEKESTRASYON A) Hipersplenizm B) Hipotermi C) Yanık
--

Tablo-2 Uluslar arası uzlaşı raporu İTP tanımlamaları (22)

Yeni tanı	<3 ay
İsrarcı	3-12 ay
Kronik	>12 ay
Ağır	İlaç dozunu arttıracak, ek tedavi veya müdahale gerektirecek derecede klinik bulgu veren kanama
Dirençli	Splenektomi sonrası ağır İTP varlığı
Yanıtsız	Trombosit sayısının başlangıç değerinin iki katından düşük veya $<30 \times 10^9$ olması
Yanıt	7 gün araya ölçülen 2 ayrı trombosit değerinin başlangıç değerinin iki katından yüksek ve $>30 \times 10^9$ olması
Tam yanıt	7 gün araya ölçülen 2 ayrı trombosit değerinin $>100 \times 10^9$ olması

İnsidans

İTP hakkında literatürde yer alan çalışmaların farklı toplumlarda, farklı yaş gruplarında ve farklı trombosit sınır değerleri temel alınması neticesinde geniş bir insidans oranı mevcuttur. Terrel ve ark. (23) 2010 yılında yaptığı çalışmada ortalama İTP tanı yaşı 56, kadın/erkek oranı 1.7 ve yıllık insidans ise 3.2/100.000 kişi olarak belirtilmiştir. Amerika’da Maryland eyaletinde yapılan diğer bir çalışmada ise, İTP insidansı 4,5-10,5/100.000 kişi ve kadın/erkek oranı 1,9 olarak bildirilmiştir (24).

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hematoloji poliklinik ve kliniğinde 1991-2012 yılları arasında immün trombositopeni tanısı ile izlenen 216 hasta incelendiğinde, hastalarda tanı anında ortalama yaşı 42,3, kadın/erkek oranı 2,7 olarak saptanmıştır . Yıllık insidansı 2,9/100.000 olarak bulunmuştur (25).

Patofizyoloji

İTP'li hastaların kanını kendine ve sağlıklı gönüllülere enjekte ederek trombositopeni gelişebildiğini gösteren Harrington ve arkadaşları İTP hastalarının kanında trombosit yüzeyinde bulunan bazı antijenlere karşı gelişmiş otoantikörler olduğunu deneysel olarak ispatlamaya çalışmışlardır (26). Son birkaç yıldır İTP patofizyolojisine ilişkin önemli mesafeler katedilmeye başlanmıştır. İTP'nin, patolojik olarak trombositlere karşı oluşmuş antikörlerden, megakaryopoez bozulmasından ve trombositlerin T hücre aracılı yıkımından kaynaklandığı ve de her patolojik mekanizmanın her hastada değişik şekilde rol oynadığı ortaya konmuştur (27-29). İTP'li erişkinlerin çoğunda altta yatan neden bulunamamaktadır . İTP'li hastaların % 60 ile % 70'inde trombositlere özgü immünoglobülin G antikörleri bulunmuştur (30). Bu antikörlerin çoğunlukla trombosit yüzeyinde bol miktarda bulunan glikoprotein yapıdaki GPIIb/IIIa ve GP1b/IX/V reseptörlerine karşı olduğu gösterilmiştir (31). Bu otoreaktif antikörlerin hedeflediği epitop türü hastalığın seyrini etkileyebilmekte ve bazı araştırmalar bu farklı antikör tiplerinin klirens değişikliğini farklılaştırabileceğini, megakaryopoezi baskılayabildiğini veya trombosit apoptozunu indükleyebileceğini ileri sürmektedir (32-34). Antiplatelet antikörleri bulunmayan bazı hastalarda trombosit yıkımına neden olan anormal T hücreleri bulunurken, diğer hastalarda otoantikör üretimi ile sonuçlanan T hücre fonksiyon bozukluğu vardır (35,36).

Bazı İTP'li hastalarda Sitotoksik CD8 T hücrelerinin trombositleri doğrudan parçaladığı ve kemik iliğinde birikerek trombosit üretimini olumsuz etkilediği bulunmuştur (37-39). Buna ek olarak, elde edilen veriler aktif İTP'li hastalarda regülatuvar T hücre popülasyonunda azalma, anormal sitokin profili ve bozulmuş olan Th-1/Th-2 dengesinin var olduğunu göstermektedir. Bunların hepsi, altta yatan bağışıklık bozukluğuna işaret etmekte olup yeni terapiler için olası hedefler olarak gözükmektedir (40). İTP'li hastaların megakaryositleri normal olmayıp elektron mikroskopik incelemelerde; anormal apoptoz ve İTP hasta plazması ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında megakaryosit büyümesinde bozulma gösterilmiştir (41). İTP'li hastalarda serum trombopoetin düzeyleri hafif derecede yükselmiş olup thrombopoetin (TPO) reseptör agonistlerinin başarısı, bu gözlemleri bir dereceye kadar doğrulamaktadır (42). Yeni çalışmalarda karaciğerde yer alan, trombosit sayısı ile regüle olan

ve trombosit klirensini sağlayan Ashwell-Morrell reseptör (AMR) sistemi keşfedilmiştir (43). Hastalık dışında dolaşımda uzun süre bulunan yaşlanmış trombositler yüzeylerinde bulunan siyalik asiti kaybederler. Bu trombositler daha sonra AMR tarafından tanınarak dolaşımdan temizlenir. AMR tarafından yapılan bu temizleme, TPO haberci RNA üretimini uyararak megakaryopoez üzerine etkide bulunur. AMR sistemi İTP de yeni terapi hedeflerinden biri gibi görülmektedir (44).

Tanı

İTP tanısı sekonder trombositopeni nedenlerinin dışlanması ile konulur. Sekonder immün trombositopeninin başlıca sebepleri Tablo-3 de yer almaktadır (20). İTP hastalarında kanama bulguları dışında fizik muayene normaldir. Çevresel kan yaymasında lökosit ve eritrositer seriye ait patoloji saptanmaz. İzole trombositopeni mevcuttur. 2009 yılında açıklanan uluslararası uzlaşma raporunda H.pylori, HCV, HIV, direk Coombs testi ve kan grubunun dahil olduğu tetkikler önerilmiştir. Kemik iliği incelemesi yeni tanı almış 60 yaşın üzerindeki bireylerde ve olası başka patolojileri dışlamak için önerilmiştir. Ateş yüksekliği, kilo kaybı, terleme gibi semptomlar ve belirgin lenfadenomegali, hepatomegali, splenomegali gibi bulgular beklenmez. Bunların varlığında tanı yeniden gözden geçirilmeli ve lenfoproliferatif hastalıklarla ilişkili immün trombosit yıkımı gibi alternatif tanılar ön planda düşünülmelidir (45).

Tablo-3 Sekonder immün trombositopeni sebepleri (20)

Otoimmün hastalıklar: Antifosfolipid sendrom, Sistemik lupus eritematozus
İmmün yetmezlik sendromları: “Yaygın kombine immün yetersizlik” ve diğer immün yetersizlikler
İlaçlar, aşılama, Enfeksiyonlar: Sitomegalovirüs, H. Pylori, HCV, HBV, HIV, CMV, Varisella Zoster
Lenfoproliferatif hastalıklar: kronik lenfositik lösemi, lenfomalar
Kemik iliği Transplantasyonu, Solid Tümörler

H. pylori: Helikobakter Pylori; HCV: Hepatit C virus; HIV: Human Immunodeficiency Virus; CMV: Citomegalovirüs

Klinik Özellikler

Hastalık genellikle sinsi başlangıçlı olup yetişkinlerde kronik bir seyir izlemektedir. Hastaların büyük bir kısmı asemptomatik olup rutin kan tetkikleri sırasında tanı almaktadırlar. Hastalığın belirti ve bulguları trombosit sayısı ile ilişkilidir. Hastalık belirtileri arasında sıklıkla peteşi, purpura, ekimoz, epistaksis ve ağız içi büllöz kanama odakları izlenebilmektedir. Nadir de olsa hayatı tehdit eden aşikâr gastrointestinal, genitoüriner ve intrakranial kanama gözlenebilmektedir. Ağır kanama sıklığı yaş ve komorbiditelerle birlikte artabilir. Hayatı tehdit edici kanama riskleri arasında; trombositopeninin şiddeti, geçirilmiş kanama öyküsü, majör kafa travması ve kronik İTP varlığı belirtilmiştir (46).

Tedavi

İmmün trombositopeni tedavisinde hedef, hastada meydana gelebilecek majör kanamaları önleyecek güvenli trombosit düzeyine ulaşmaktır. İmmün trombositopeninin başlangıç tedavisi ile ilgili farklı literatür çalışmaları bulunmakta olup erişkinlerde tedavi başlamayı gerektirecek eşik trombosit değeri tartışmalıdır (20). Genel anlamda tedavi başlama sınırını belirleyen hastanın kanama bulguları ve kanama ciddiyetidir. Çoğunlukla tedaviye başlamak için $30.000/\text{mm}^3$ eşik değer olarak kabul edilmektedir. Trombosit değeri $>30.000/\text{mm}^3$ olan ve herhangi bir kanama bulgusu saptanmayan hastalar kanama riskini artıracak olasılıklar açısından değerlendirilmeli ve eğer bir kontrendikasyon yok ise tedavisiz izlenmelidir. Trombosit değeri $<30.000/\text{mm}^3$ olanlarda veya trombosit değeri $>30.000/\text{mm}^3$ olup anlamlı kanama bulgusu izlenen hastalarda tedaviye başlanmalıdır. İTP için tedavi kararı verilirken, ciddi kanama varlığı, tedaviye yanıt hızı ve olası yan etkiler göz önünde bulundurulmalıdır (20,47).

Birinci basamak tedavi

Birinci basamak tedavide ilk tercih ilaç kortikosteroiddir. Düşük doz (1 mg/kg metil prednizolon) ve yüksek doz (500-1000 mg metil prednizolon veya 40 mg/gün deksametazon) kortikosteroid olmak üzere iki tedavi rejimi mevcut olup bu iki rejimde cevaplar benzer bulunmuştur (48). Ne yazık ki bu ilaçların yan etkileri hızla belirginleşmekte ve önemli komplikasyon yaratmaktadırlar. Zamanla kortikoidsteroidlerin yan etkileri yararlarından daha ağır basmaktadır. En önemli komplikasyonları kilo artışı, kan şekerinde yükselme,

hipertansiyon, psikoz ve osteopenidir. Bir ay kortikosteroid tedavisi kullanan hastalarda cevap yok ise, tedavi kesilmelidir (49).

İTP tedavisinde hızlı etki gösterdikleri için, cerrahi veya doğum gibi invaziv prosedürlerden önce ya da acil durumlarda intravenöz immunglobulin (IVIG) ve Anti-Rh sıklıkla kullanılmaktadır (50). IVIG birçok merkezde 1 veya 2 gün boyunca 1 g/kg/gün verilmektedir (51). Plazmadan türetilen bir ürün olan IVIG'in kullanımıyla virus bulaşı teorik bir risktir. Hepatit C virüsünün tanımlandığı 1990 lı yıllardan bu yana HIV, Hepatit C veya varyant Creutzfeldt-Jakob hastalığının bulaşı bildirilmemiştir (52). Kortikosteroid kullanımı için kontrendikasyon bulunması halinde hasta Rh pozitif ise Anti-Rh kullanılabilir. Otoimmün hemolitik anemisi mevcut ve hemoglobin düzeyi 10gr/dL olan hastalarda intravasküler hemolize bağlı semptomatik anemi gelişme riski nedeniyle Anti-Rh kullanımı kontrendikedir.

İkinci basamak tedavi

Kortikosteroid, IVIG veya Anti-Rh gibi birinci basamak ajanlarla cevap alınamayan hastalarda tanı tekrar gözden geçirilerek trombositopeni yapabilecek diğer durumlar dışlanmalıdır. Yeni ajanların kullanıma girmesine ve tedaviye yanıt ile ilgili yeni bilgiler olmasına rağmen birinci basamak tedavi altında kanama bulguları olan, tekrarlayan veya ısrarcı İTP tanısı olan hastalar için tercih edilecek tedavi ile ilgili kanıt düzeyi yüksek bir öneri bulunmamaktadır (4,53).

Splenektomi diğer bir tedavi seçeneği olup komplikasyon oranları, çeşitli faktörlere bağlı olarak oldukça değişkendir (54,55). Splenektomi yapılmadan önce hastalar aksesuar dalak varlığı açısından araştırılmalı ve S. pneumoniae, H. influenza, N. Meningitidis gibi kapsüllü bakteri enfeksiyonlarına karşı aşılanmalıdır (56). Splenektomi sonrası erken dönemde %80 oranında yanıt varken uzun süreli yanıt oranı %66 ya düşmektedir (57). Tam remisyon sağlamasa da birçok hasta splenektomi öncesinde olduğundan daha yüksek trombosit değerine ulaşmaktadır (58).

Rituksimab romatolojik hastalıkların tedavisinde tercih edilen Anti-CD20 monoklonal antikoru olup İTP tedavisinde de tedavi tercihleri arasında yer almaktadır. 375 mg/m² veya haftalık 100 mg/4 hafta kür verilebilecek tedavi seçenekleridir (59). Hastaların %60 ı tedaviye yanıt verir, bunların %40' ı tam yanıt şeklindedir (60). Rituksimaba yanıt genellikle 1-2 hafta sonra görülür ancak bazı hastalarda yanıt son infüzyondan sonraki 2 aya kadar görülebilir (61).

Trombopoetin Reseptör Agonistleri (Trombomimetikler)

İmmün trombositopeni patogeneğinde trombosit yıkımının yanında antikor aracılı megakaryosit hasarı, kemik iliğinde efektif megakaryopoez baskılanması da trombositopeniye katkıda bulunmaktadır (62). Bu mantıkla daha önce geliştirilen rekombinant insan TPO (rhTPO) tedavisi uygulaması sonrası trombosit sayısında yükselme elde edilmesine karşın sağlıklı gönüllülerde rhTPO ya karşı antikor gelişmesi sonrası tüm klinik çalışmalar durdurulmuştur (63).

Romiplostim ve eltrombopag kronik İTP tedavisinde tercih edilebilen iki trombopoetin reseptör agonistidir (TRA). Bu ilaçların trombopoietin reseptörüne bağlanması sonrası JAK-STAT ve mitojen-aktifleştirilmiş protein kinaz (MAPK) gibi hücre içi sinyal yollarının aktiflenmesi ile trombosit üretimi artar. Bu ilaçların trombosit sayısını belirgin şekilde arttırmalarının yanında yan etkileri nedeniyle dikkatle kullanılmaları önerilmektedir (64,65).

Romiplostim; rekombinant füzyon proteini olup TPO reseptör antikorudur (66). Cilt altı enjeksiyon şeklinde uygulanır, başlangıç dozu haftada bir 1 mcg/kg dir. İstenen trombosit sayısı elde edilinceye kadar haftalık dozu maksimum 10 mcg/kg olacak şekilde 1mcg/kg şeklinde tedrici arttırılır. Şüphelenilen ciddi yan etkiler kemik iliğinde retikülin lif artışı, lösemik blast sayısının proliferasyonunda artış ve tromboz olmakla birlikte romiplostimin yan etki sıklığı düşük gibi gözükmemektedir (67-69).

Eltrombopag; TPO reseptörüne bağlanıp hücre içi JAK-STAT ve MAPK yollarını aktive ederek trombosit üretimini arttıran peptid dışı moleküldür. (65,70,71). Günde bir kez oral olarak verilmesinin, kronik İTP'li hastalarda etkili ve güvenilir olduğu bulunmuş olup dozu 25-75 mg /gün dür (72-74). Sık görülen yan etkileri hafif orta şiddette transaminaz yüksekliği ve nazofarenjit gibi üst solunum yolu enfeksiyonlarıdır (74).

Üçüncü basamak tedavi

İlk basamak tedavilere dirençli yetişkin İTP hastalarında; siklosporin A, azatiyoprin, danazol, siklofosfamid, dapson, mikofenolat mofetil ve kombine kemoterapötik ilaçlar şeklinde tedavi rejimleri bulunmaktadır. Bununla birlikte literatürde bu tedavilerle ilgili farklı merkezlerin az sayıda hasta ile ilgili klinik deneyimleri mevcuttur.

MEGAKARYOPOEZ VE KEMOKİNLERİN TROMBOSİT FİZYOLOJİSİNDEKİ ROLÜ

Trombosit üretiminde başrol oynayan hücre megakaryosit olup myeloid seriden köken almaktadır. 20. yüzyılın başlarında Wright trombositlerin, megakaryositlerden psödopodlar aracılığı ile kemik iliğine döküldüklerini bulmuş ve trombosit sayısındaki değişikliklerin megakaryosit sayısı ile ilişkili olduğunu belirtmiştir (75). Trombosit sayısı vücudun ihtiyacına göre artıp azalabilmektedir. Megakaryositlerin ortalama çapı 20-25 mikron ve hacmi 4700 ± 100 fL'dir. Her bir megakaryosit yaklaşık 1000-3000 arası bir sayıda trombosit üretebilmektedir. Erişkin megakaryosit hücreleri sıklıkla polipoid yapıdadır ve 2-32 kat fazla diploid DNA bulundurur (76,77). Bu polipoid yapı hücreye fonksiyon kazandırıcı özellikler kazandırmakta olup gen amplifikasyonu ve protein sentezi arttıkça megakaryositte de büyümeye yol açmaktadır. Megakaryosit hücrelerinin yüzey membranı trombositinki ile aynıdır. Megakaryositler seriye farklılaşmada ilk basamak megakaryosit yüzeyinde glikoprotein (GP) reseptör IIb/IIIa, GPIb ve kollajen reseptörlerinin oluşmaya başlamasıdır (78,79). Megakaryosit hücre membranı katlantılı olup trombositlerin salınım sırasında yüzey membranlarını megakaryositten alırlar (80).

Trombositler sitoplazmik özelliklerini kaynaklandığı megakaryositden köken alır. Granüler cisimcikleri ve bazı bileşenleri megakaryosit tarafından oluşturulmakta iken bazı granül bileşenleri de hem megakaryosit hem de trombositler tarafından plazmadan alınır. Trombositlerdeki bu granüllerde çeşitli trombosit proteinleri ve büyüme faktörleri yer alır. Bu granüller içinde yer alan; transforme edici faktör-beta, platelet-derive büyüme faktörü (PDGF), trombosit faktör-4 (PF4) ve von Willebrand faktörü megakaryosit tarafından sentezlenerek granüle aktarılır (81). Diğer proteinler trombosit plazmadan IIb/IIIa reseptör aracılığıyla endositoz ya da pinositoz ile geçer.

Megakaryosit farklılaşma ve olgunlaşma aşamalarının tümünde trombopoetin molekülü etkindir. Megakaryosit koloni oluşturuca ünite (Meg-CFC) hücrenin büyümesini uyarak apoptozu inhibe eder ve olgunlaşmayı sürecini sağlar. GATA-1 eritroid, megakaryosit, eozinofil ve mast hücrelerinde ekspres edilen bir transkripsiyon faktörü olup JAK2 ve STAT-1 ile ilişkili olup IF-gamma/STAT1 sinyalizasyonu ile megakaryopoezi uyardığı ve bu sebeple inflamatuvar hastalıklarda ortak bir yolla trombositoz görüldüğü düşünülmektedir (82). Stromal derive faktör 1 (SDF1/CXCL12) gibi kemoatraktanlar

megakaryositlerden metalloproteinaz üretimini indükleyerek migrasyon ve trombosit üretiminde önemli rol alırlar (83,84). Deneysel hayvan çalışmalarında TPO'nun kemokin aracılığıyla megakaryosit olgunlaşması ve trombopoez oluşumu için uygun bir mikroçevre oluşumuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Megakaryositlerin büyük fragmanları dolaşımda yıkılarak trombositleri oluşturur. Son yıllarda moleküler teknolojide kullanıma girmiş Cre-Lox rekombinasyon tekniği ile megakaryositler flouresan ile işaretlenerek hareketleri gözlemlenmiş ve akciğerlere göç ederek burada olgunlaşma sürecini tamamlayıp trombosit salınımını gerçekleştirdiği anlaşılmıştır (85).

Karaciğerden sentezlenen trombopoetin molekülü megakaryopoezi uyardıktan bir süre sonra dolaşımdan uzaklaştırılır. Rezidüel miktarda kalan TPO molekülü megakaryositlerin bazal uyarısını teşkil eder. Hayvan deneylerinde hepatosit hücresi üzerinde bulunan Ashwell-Morell reseptörleri (AMR) yaşlanmış/siyalik asidini kaybetmiş trombositleri bağlayarak lizise uğrattığı gözlemlenmiştir. AMR ile bir kez bağlandıktan sonra JAK-STAT yolu aktive olarak hepatik TPO mRNA sentezini artırır ve böylelikle TPO sentezi artar. TPO klirensini ve bazal düzeylerini dolaşımdaki trombosit c-mpl reseptör sayısı belirlemektedir. Trombosit üretimi azaldığında, trombosit sayısı ve c-mpl reseptör miktarı ve bununla korele olarak da TPO klirensi azalır. Bunun sonucu olarak da TPO konsantrasyonu artarak megakaryosit üretimi uyarılır. Bunun tam tersi olduğunda yani trombosit kitlesi arttığında c-mpl reseptör miktarı ve TPO klirensi artar, TPO konsantrasyonu düşer ve de megakaryosit üretimi azalır. Ek olarak sitotoksik T hücrelerinin doğrudan megakaryosit viabilitesini inhibe etmesi ve trombosit üretimini azaltması söz konusudur (86,87).

KEMOKİNLER VE KLİNİK ÖNEMİ

Kemokinler hücre yüzeylerinde bulunan uygun kemokin reseptörleri aracılığıyla kemotaktik aktiviteyi farklı lökosit tiplerinde uyaran ve lökosit trafiğinin düzenleyen küçük proteinlerdir. Yapısında bulunan sistein dizilimine göre CC, CXC, CX3C ve C olmak üzere 4 alt gruba ayrılmaktadır (6). Kemokinlerin hücrel görev dağılımını sağlamalarının yanında sitokin üretimi ve Th-1/Th-2 dengesini sağlayarak bağışıklık mekanizmasında da önemli rol almaktadır (88). Tablo 4'te kemokin ailesi ve reseptörleri yer almaktadır (6).

Kemokinler birden çok reseptörü uyarabilmekte ve aynı şekilde reseptörler birden çok kemokin tarafından uyarılabilmektedir. Kemokinlerin reseptörleri aktive etmesi ile birlikte

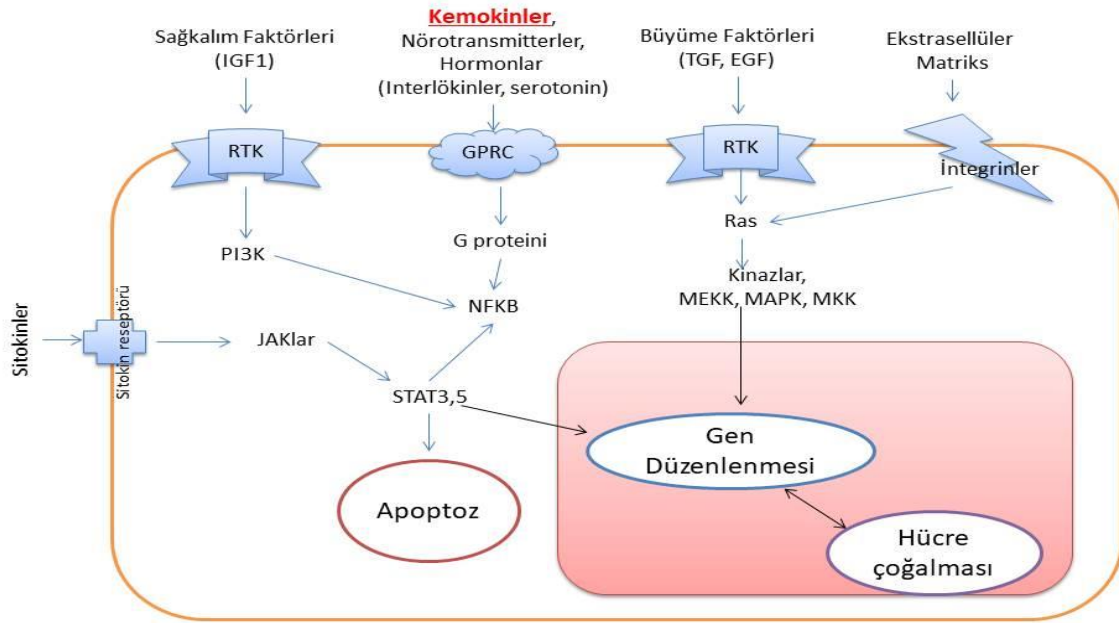
hücre içinde birbiriyle ilişkili farklı yollar hareketle geçirerek uyarılan reseptör türüne göre; protein sentezi, inflamatuvar yanıt, antijenin sunumu veya hücre kemotaksisi gerçekleşir. Şekil-1’de kemokin reseptör yolları ve uyarı mekanizmaları gösterilmiştir.

Tablo-4 Kemokin ailesi (6)

Sistemik adı	Reseptörü
CC kemokin / reseptör ailesi	CCL1(I-309) CCR8, R11 CCL2 (MCP-1, MCAF) CCR2 CCL3 (MIP-1 α /LD78 α) CCR1,R5 CCL3L1 (LD78 β) CCR5 CCL4 (MIP-1 β) CCR5 CCL4L1 CCR5 CCL4L2 CCR5 CCL5 (RANTES) CCR1, R3, R4, R5 CCL6 (C-10) CCR1, R2, R3 CCL7 (MCP-3) CCR1, R2, R3 CCL8 (MCP-2) CCR1, R2, R5, R11 CCL9 (MRP-2/MIP-1 γ) CCR1 CCL10 (MRP-2/MIP-1 γ) CCR1 CCL11 (Eotaxin) CCR3 CCL12 (MCP-5) CCR2 CCL13 (MCP-4) CCR1, R2, R3, R11 CCL14 (HCC-1) CCR1 CCL15 (HCC-2, Lkn-1) CCR1, R3 CCL16 (HCC-4, LEC) CCR1 CCL17 (TARC) CCR4 CCL18 (DC-CK1, PARC) Bilinmiyor CCL19 (MIP-3 β , ELC) CCR7, R11 CCL20 (MIP-3 α , LARC) CCR6 CCL21 (6Ckine, SLC) CCR7, R11 CCL22 (MDC, STCP-1) CCR4 CCL23 (MPIF-1) CCR1 CCL24 (MPIF-2, Eotaxin-2) CCR3 CCL25 (TECK) CCR9, R11 CCL26 (Eotaxin-3) CCR3 CCL27 (CTACK, ILC) CCR2, R3, R10 CCL28 (MEC) CCR3, R10
C kemokin / reseptör ailesi	XCL1 (Lymphotactin) XCR1 XCL2 (SCM1-b) XCR1
CXC kemokin / reseptör ailesi	CXCL1 (GRO α , MGSA- α) CXCR2N R1 CXCL2 (GRO β , MGSA β) CXCR2 CXCL3 (GRO γ , MGSA γ) CXCR2 CXCL4 (PF4) CXCR3 CXCL4L1 (PF4V1) CXCR3 CXCL5 (ENA-78) CXCR1, R2 CXCL6 (GCP-2) CXCR1, R2 CXCL7 (NAP-2) CXCR2 CXCL8 (IL-8) CXCR1, R2 CXCL9 (Mig) CXCR3 CXCL10 (IP-10) CXCR3 CXCL11 (I-TAC) CXCR3

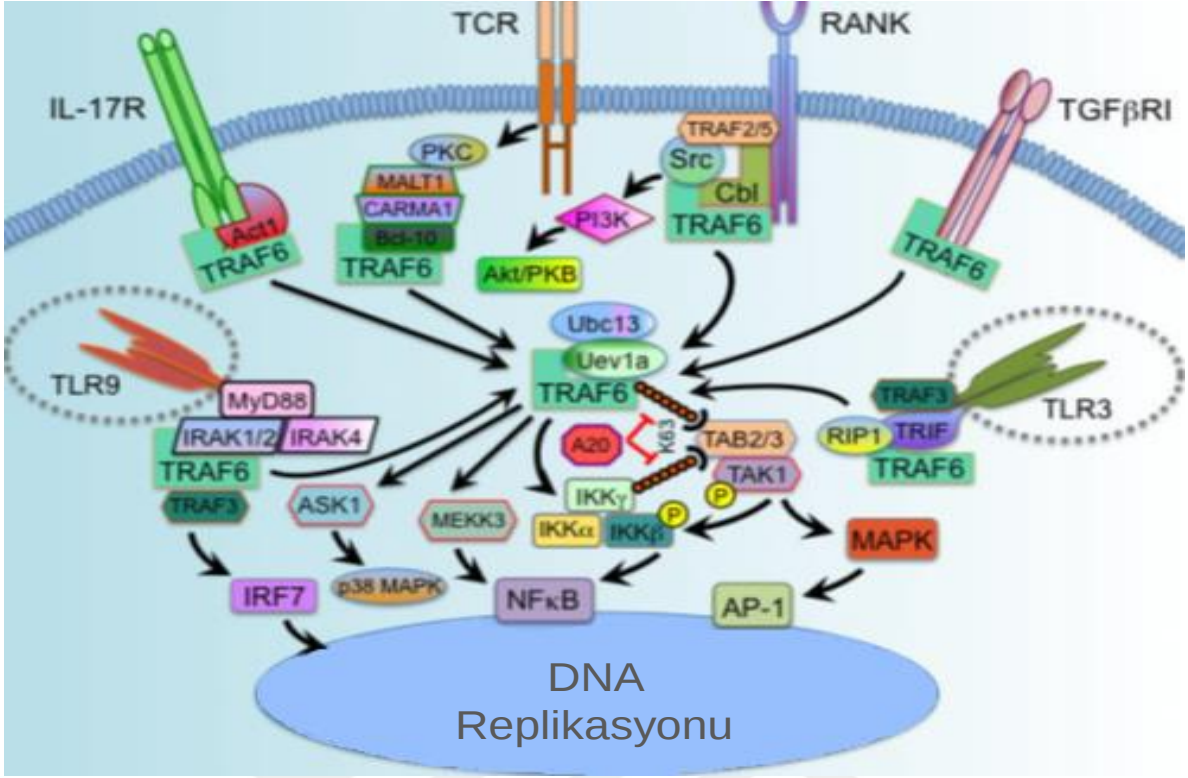
Tablo-4 Kemokin ailesi(6) (Devam)

	CXCL12 (SDF-1 α/β)	CXCR4, R7
	CXCL13 (BLC, BCA-1)	CXCR3, R5
	CXCL14 (BRAK, bolekin)	Bilinmiyor
	CXCL15	Bilinmiyor
	CXCL16 (SR-PSOX)	CXCR6
	CXCL17 (VCC1, DMC)	Bilinmiyor
CX3C kemokin/reseptör ailesi	CX3CL1 (Fractalkine)	CX3CR1



Şekil-1 Kemokin ilişkili hücre içi sinyal yolları

Tümör nekroz faktör reseptör ilişkili faktörler (TRAFs), Tümör nekrozis faktör (TNF) süper ailesi ve Toll / IL-1 reseptör (TIR) ailesi üzerinden hücre ölümü, hayatta kalma ve bağışıklık yanıtlarında belirgin biyolojik fonksiyonlara sahip adaptör moleküllerdir. Bugüne kadar TRAF aile bireyleri (TRAF1-7) tümü memelilerde tespit edilmiştir (89). Tüm TRAF'lar, yaklaşık 200 amino asit uzunluğunda, TRAF alanı adı verilen oldukça korunumlu bir C-terminal alanına sahiptir. TRAF etki alanı, reseptörlere bağlanma, homo-veya heterodimerler oluşumu ve birçok hücre içi protein ve sinyal molekülü ile etkileşime aracılık eder (90,91). TRAF-6 etki mekanizması ve hücre içi yollar Şekil-2 de gösterilmiştir (92).



Şekil-2 TRAF-6 etki mekanizması ve sinyal yolları (92)

Makrofaq inflamatuvar protein-3 alfa (MIP-3a) veya exodus-1 olarak da bilinen CCL 20 araştırmacılar tarafından biyoinformatik teknikler kullanılarak keşfedilmiştir. Kemokinler ve reseptörleri arasındaki etkileşimler çoğu zaman spesifik olmamasına rağmen istisnai olarak CCL20'ye spesifik tek bir kemokin reseptörü olarak CCR6 tanımlanmıştır. Bu CCR6-CCL20 ligand reseptör etkileşiminin selektivitesi kemokinlerin düzenlenmiş fonksiyonel rollerine işaret etmektedir (93). CCL20 ekspresyonu endotel hücreleri, nötrofiller, doğal öldürücü (NK) hücreler, Th17 hücreleri, B hücreleri gibi bağışıklık hücrelerinin yanı sıra kolon, pankreas, mide, prostat, testis, rahim serviks ve normal deri dokusunda da bulunduğu gözlenmiştir. CCL20'nin indüklenebilir dendritik hücrelerin adaptif bağışıklık yanıtında arabulucu işlev görerek immün sistemin aktivasyonunda kritik bir rol aldığı ortaya konulmuştur (94).

CCL21 ve CC kemokin reseptörü 7 (CCR7), bağışıklık ve toleransa katkıda bulunan T hücrelerini ve dendritik hücreleri lenfoid organlara yönlendirmede önemli bir rol oynamaktadır. CCR7 reseptörü, çeşitli bağışıklık hücrelerinde ve çoğu kronik olarak iltihaplı organlarda görüldükleri için inflamatuvar sitokinler olarak düşünülen CCL19 ve CCL21'e doğru hücre göçünü desteklediği düşünülmektedir (95). CCL19, CCL21 ve reseptörünün; dokulardaki lenfosit çıkışı, yüksek benzer antikor yanıtları, sekonder lenfoid organogenezisi, bellek ve T hücre düzenleyici gibi çok sayıda rolü vardır. CCR7 / CCL19 / CCL21 eksen, antijen sunan

hücreler ile antijen spesifik lenfositler arasındaki ilişkiye yardımcı olduğu ve etkili adaptif bağışıklık yanıtında önemli bir rol oynayarak gerekli anatomik mikroçevreyi kurguladığı düşünülmektedir (96).

CCL18 yaklaşık 15 yıl önce keşfedilmiş olup o dönemde pulmoner aktivasyon düzenleyen kemokin (PARC)/makrofaj enflamatuvar protein-4 (MIP-4)/dendritik hücre-kemokin 1 (DC-CK1) /alternatif makrofaj aktivasyonu ile ilişkili CC-kemokin-1 (AMAC-1) gibi farklı terminolojik isimlerle adlandırılmıştır (97). CCL18, hücre içi kalsiyum mobilizasyonu ve aktin polimerizasyonunu sağlayarak; kemotaktik yanıt, fibroblastlarda kollajen üretiminin uyarılması, monositlerde M2 fenotipine maturasyonu ve adaptif düzenleyici T hücrelerinin üretilmesi gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlara aracılık ettiği belirlenmiştir (98-101). CCL18'in dolaşımda normalde ve çeşitli hastalıklarda yüksek konsantrasyonlarda olabildiği gösterilmiştir. Bu nedenle CCL18'in homeostatik süreçlerde rol oynayabileceği düşüncesinin yanında çeşitli maligniteler, fibrotik akciğer hastalıkları ve inflamatuvar eklem ve deri hastalıkları dahil olmak üzere birçok hastalıkta da rol alabileceği düşünülmektedir (90,102,103). CCL18'in kemokin reseptörü CCR3 ile etkileşimi ve yakın zamanda CXCR4'e bağlı yanıtların azalmasına neden olduğu gösterilen kemokin benzeri reseptör, G protein reseptör 30 (GPR30) ile modülatör aktivitesi bildirilmiştir. CCL18'in CCR3 aracılığıyla CCL11 ve CCL13 ile uyarılan hücre alımı engellediği ve CCL5, CCL15 ve CCL26 gibi diğer CCR3 agonistlerinin kemotaktik yanıtlarını inhibe ettiğini bildiren gözlemler de mevcuttur. CCR3 üzerindeki moleküler etki mekanizmasını incelenerek, CCL18'in fonksiyonel analizlerde yarışmalı bir antagonist gibi davrandığını gösterilmiştir. CCL18, CCR1, CCR2, CCR4 ve CCR5 aracılı kemotaktik yanıtları çeşitli ligandları engelleyebilirken CCR7 ve CCR9 aracılı tepkilerin yanı sıra CXC reseptörleri CXCR3 ve CXCR5 üzerinde herhangi bir inhibe edici aktivite gözlenmemiştir (104).

Literatürde çokça bahsi geçen ancak günümüzde yeni yeni immünitadaki rolleri ortaya konmaya başlanan kemokin ailesinden olan CCL18, CCL20, CCL21 ve TRAF6'nın otoimmün bir hastalık olan İTP patogeneğinde bir rolleri olup olmadığını bu çalışma ile araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Tez çalışmamıza bölgesel etik kurulundan alınan onay sonrası (Ek1) 2016-2017 tarihleri arasında 85 İTP tanısı konulan hasta ve 85 bilinen hastalığı olmayan, ilaç tedavisi almayan 18 yaş üstü, benzer yaş ve cinsiyetteki gönüllüler aydınlatılmış onamları alınarak dahil edildi.

Hasta grubumuzun tedaviye olan yanıt değerlendirmesinde son güncellemesi 19/07/2011 tarihinde yapılan Uluslararası Tromboz Hemostaz Birliği (ISTH) tarafından belirlenen; tedavi sonrası 7 gün araya ölçülen 2 ayrı trombosit değerinin $>100 \times 10^9$ olması “Tam yanıtı”, 7 gün araya ölçülen 2 ayrı trombosit değerinin başlangıç değerinin iki katından yüksek veya $>30 \times 10^9$ olması “Yanıtı”, trombosit sayısının başlangıç değerinin iki katından düşük veya $<30 \times 10^9$ olması “Yanıtsız” şeklinde belirlenen tanım ve ölçütleri baz alınmıştır.

Hasta dahil edilme ve dışlama kriterleri:

Primer immün trombositopeni tanısı almış olmak. Sekonder olduğu gözlenen immün trombositopeniler (Örneğin romatolojik hastalıklar seyrinde gelişen trombositopeniler) çalışma dışında bırakılmıştır.

Akut immün trombositopeni tanısı almış olmak, kronik takipteki hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Bunun nedeni, kronik İTP tanılı hastaların kortikosteroid gibi immün düzenleyici ilaçları takip sürecinde kullanmış olmaları ve bunların kemokin düzeylerine etki edeceği düşüncesidir.

Gelişinde eritrosit sedimentasyon hızı ve akut faz reaktanlarından rutinde bakılan C-reaktif protein düzeyleri yüksek olan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Bunun nedeni, çalışmamızda kemokin düzeyleri bakıldığından bunları yükseltebilecek diğer nedenlerin dışlanması hedeflenmiştir.

ÇALIŞMA AYRINTILARI

Hastaların çalışmaya dahil edilmesi ardından kan sayımları içerisindeki parametreler kayıt edildi. Eritrosit sedimentasyon hızı ve C-reaktif protein düzeyleri not edildi. Fizik muayene bulgularından splenomegali, lenfadenomegali var ise not edildi.

Kanama değerlendirmesinde son güncellemesi 19/07/2011 tarihinde yapılan Uluslararası Tromboz Hemostaz Birliği (ISTH) tarafından belirlenen kanama değerlendirme ölçeği ile majör ve minör kanama belirlendi (105).

Hasta ve sağlıklı gönüllülerden antikoagülan madde içermeyen kuru tüpe kan alındı. 10.000 devirde 15 dakikalık soğuk santrifüj ardından ayrılan serum -86 derecede çalışma gününe dek saklandı. Kanların toplanması ardından ELISA yöntemi ile hedef moleküller olan CCL18, CCL20, CCL21 ve TRAF6 düzeyleri kitler içerisindeki çalışma prensiplerine göre ölçüldü.

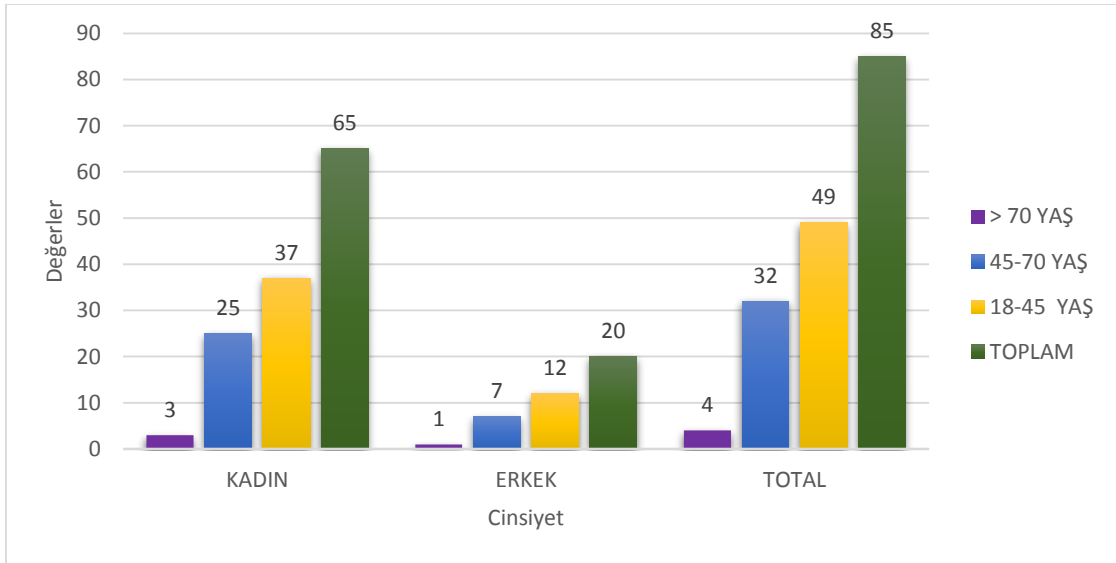
(Human MicroElisa kitleri. Marka: Sunred Bio Yöntem: Double Antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent. Elisa Okuyucu: Radim marka Alisei model cihazın okuyucusu Elisa Yıkayıcı: Radim marka Alisei model cihazın yıkayıcısı)

İSTATİSTİKSEL ÇALIŞMA

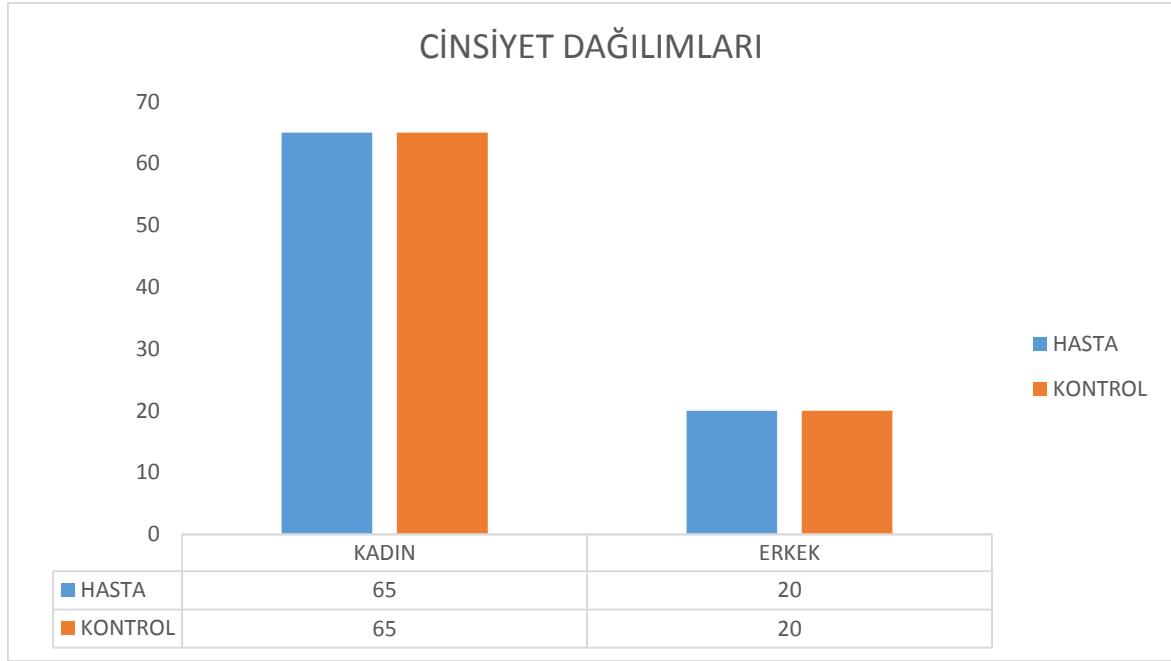
Veriler IBM SPSS programı Versiyon 20 kullanılarak değerlendirildi. Yaş, cinsiyet ve genel özellikler için tanımsal istatistik yapıldı. Sıklık ve ortanca değerlendirmeleri yapıldı. Kemokin düzeyleri yapılan Kolmogorov-Smirnov testi ile normal dağılıma uyup uymadıkları incelendi. Normal dağılıma uymadıkları tespit edildiklerinden Mann-Whitney analizi yapıldı. Pearson korelasyon ve nonparametrikler için Spearman rho kullanıldı. Anlamlılık ve korelasyon katsayıları değerlendirildi. Trombosit sayılarının alt grupları için Anova ve çoklu Post hoc analizler kullanıldı. Bunlar arasında Tukey HSD, LSD ve Bonferroni analizleri kullanıldı. Homojen alt gruplar için Tukey HSD yapıldı.

BULGULAR

Çalışmamıza 85 hasta ve yaş, cinsiyet, benzer bilinen bir kronik hastalığı olmayan ve ilaç kullanmayan 85 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Cinsiyet olarak hasta grubunda 65 kadın 20 erkek hasta var iken, kontrol grubunda da benzer şekilde 65 kadın 20 erkek bulunmakta idi. Yaş ortalaması hasta grubunda 45,72 (22-87) yıl, kontrol grubunda 47,68 (20-72) idi. Hasta grubundaki yaş ve cinsiyet dağılımı Şekil 3’de, her iki gruptaki cinsiyet dağılımı Şekil-4’de özetlenmiştir.



Şekil-3 Hasta grubundaki yaş ve cinsiyet dağılımı



Şekil-4 Çalışmadaki hasta-kontrol grubunda cinsiyet dağılımı

Hastaların geliş şikayetlerinde kanama ele alındığında, 61 hastada minör ya da majör kanama görülmüştür (%71,8). Peteşi 52 (%61,2), purpura 51 (%60), ekimoz ise 52 hastada saptanmıştır (%61,2). Mukozal kanamalara ilişkin değerlendirmede; 14 hastada diş eti kanaması (%16,5), 8 hastada burun kanaması (%9,4), 5 hastada gastrointestinal kanama (%5,9) ve 10 hastada genitoüriner sistem kanaması (%11,8) görülmüştür.

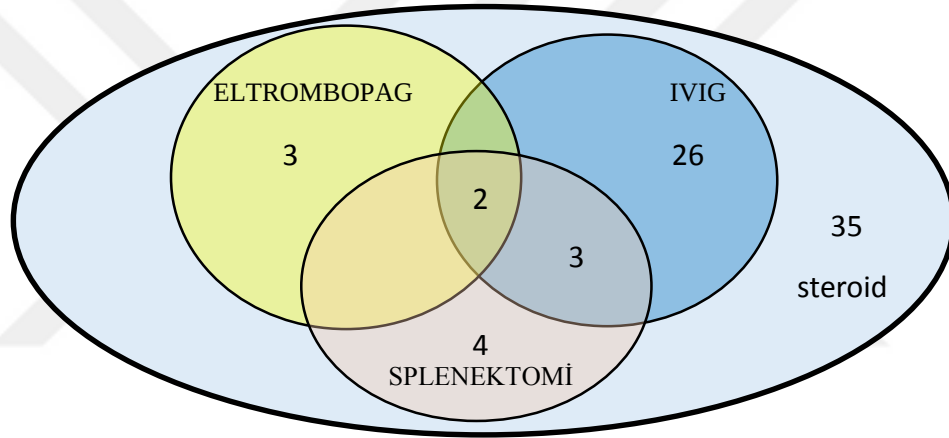
Eşlik eden kronik hastalıklar (hipertansiyon, diyabet, serebrovasküler hastalık gibi), 6 hastanın kronik hastalık öyküsü olduğu gözlenmiştir (%7,1). Bunlar içerisinde 2 hastada tip 2 diyabet, 3 hastada hipertansiyon, 2 hastada romatoid artrit, 1 hastada ise serebrovasküler tıkaçıcı hastalık olduğu gözlenmiştir.

Geliş laboratuvar değerleri ele alındığında, kan sayımında ortalama hemoglobin düzeyi 12,54 g/dL (4,4-17,4), ortalama lökosit sayısı 8708/mm³ (3470-19620), ortalama trombosit sayısı 18647/mm³ (1000-92.000) ve ortalama trombosit hacmi (MPV) ortalama değeri 10,6 (6,7-36) fL olarak izlenmiştir. Ayırıcı tanı için gerekli olan laboratuvar verileri incelendiğinde, antinükleer antikor pozitifliği 15 hastada gözlenmiştir (%17,6). Lupus antikoagulanı 2 hastada gözlenmiştir (%2,4).

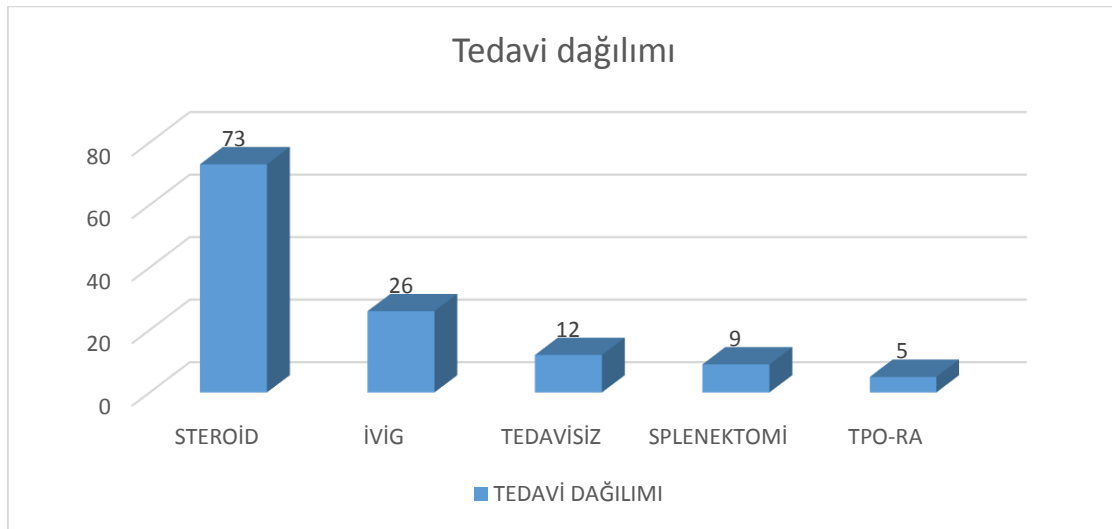
Tedaviler ele alındığında, 12 hasta tedavisiz izlenmiştir (%14,1). Gelişindeki kanama bulgusunun aciliyeti nedeni ile 26 hastaya intravenöz immünglobulin tedavisi verilmiştir (%30,6). Tedavi yanıt günlerine bakıldığında ağırlıklı olarak trombosit sayısının 50.000/mm³

üzerine çıkışı, güvenli trombosit düzeyi olarak ele alındığında ortalama 3 günde olduğu (± 2 gün) gözlenmiştir.

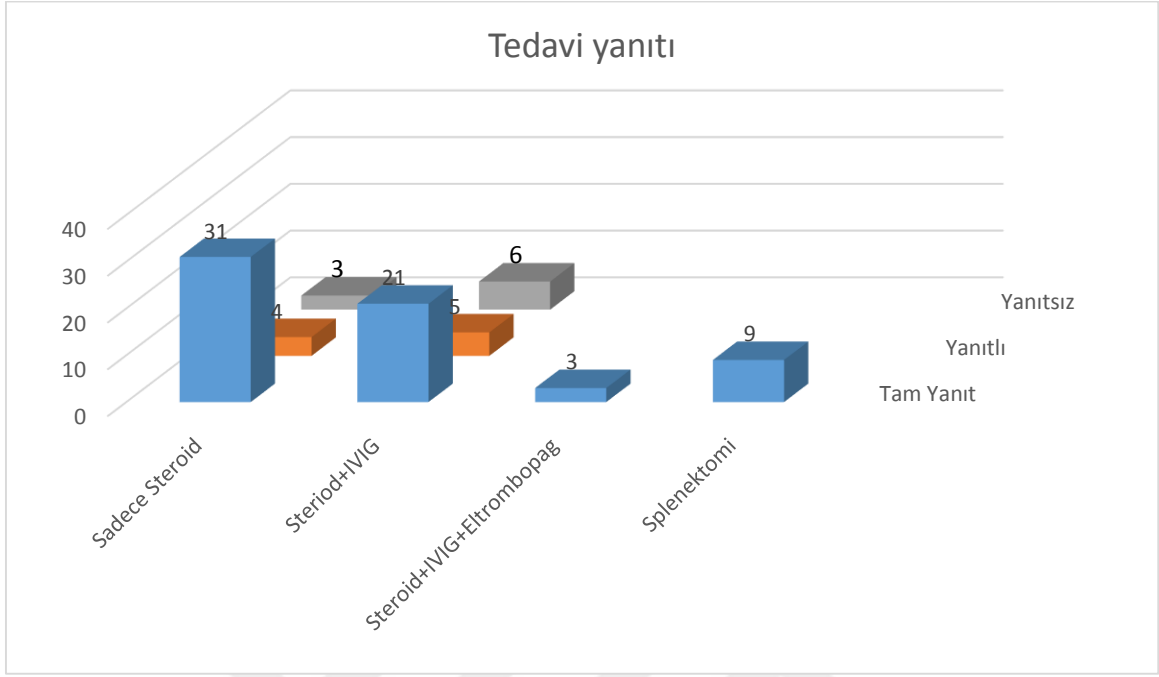
73 hastaya kortikosteroid tedavisi (1 mg/kg metilprednizolon; %85,9) verilmiştir. Bu hastaların 49'u tam yanıtı (%57,6), 12 si parsiyel yanıtı (%14,1) ve 12 si yanıtı (%14,1) izlenmiştir. 9 hastaya steroid direnci nedeni ile splenektomi uygulanmıştır (%10,6). Hastaların tedavi-dağılım kümesi Şekil-5 ve tedavi-dağılım grafiği Şekil-6'da gösterilmiştir. Splenektomi olan hastaların tanıdan splenektomiye kadar olan tedavi süresi medyan 6 ay olarak bulunmuştur. Takibinde relaps nedeni ile 5 hasta eltrombopag tedavisi almıştır (%5,9). Tedavi ve yanıt oranları Şekil 7 ve 8'de özetlenmiştir.



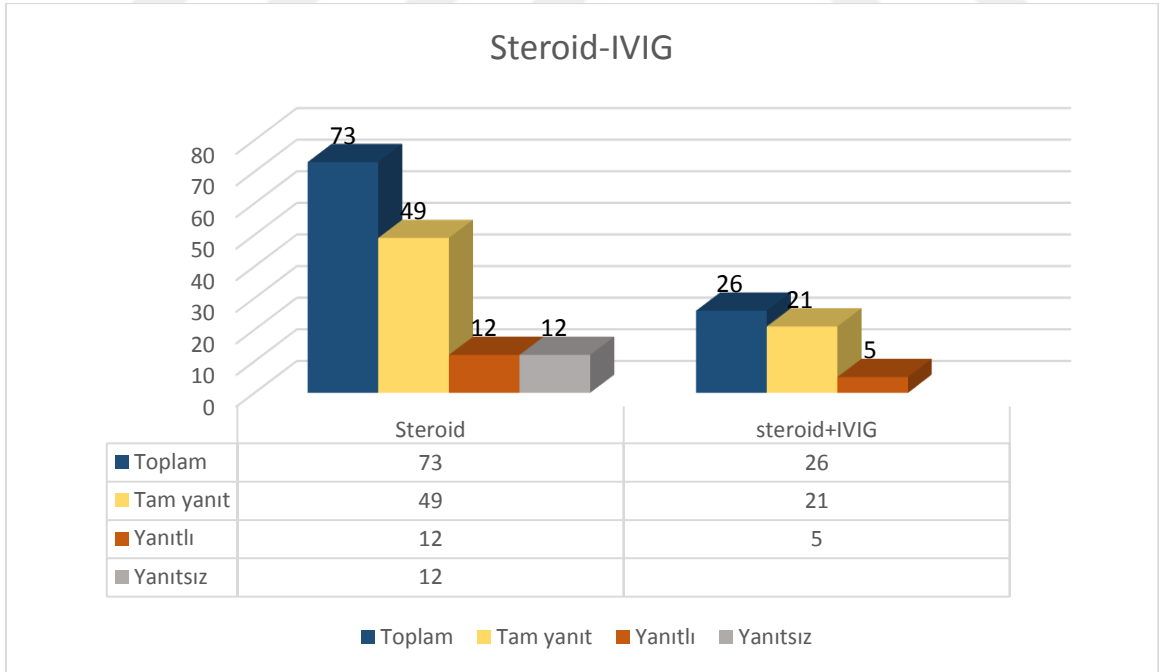
Şekil-5 Hasta tedavi-dağılım kümesi



Şekil-6 Tedavi-dağılım grafiği



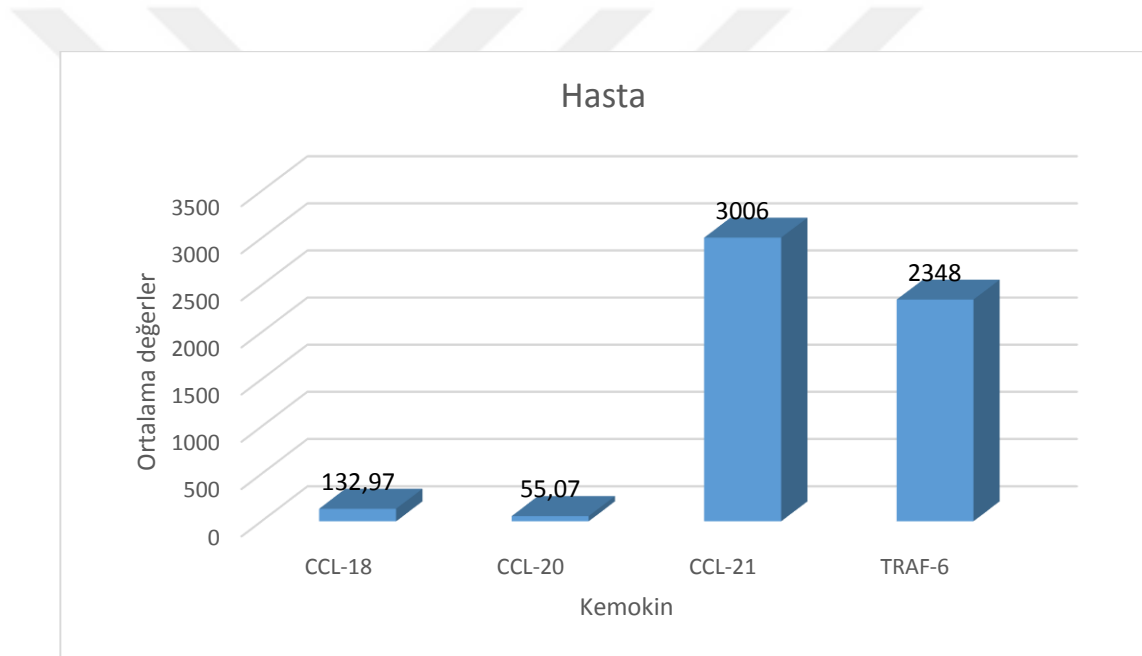
Şekil-7 Tedavi-yanıt grafiği



Şekil-8 Tedavi-yanıt verileri (steroid/steroid+ivig)

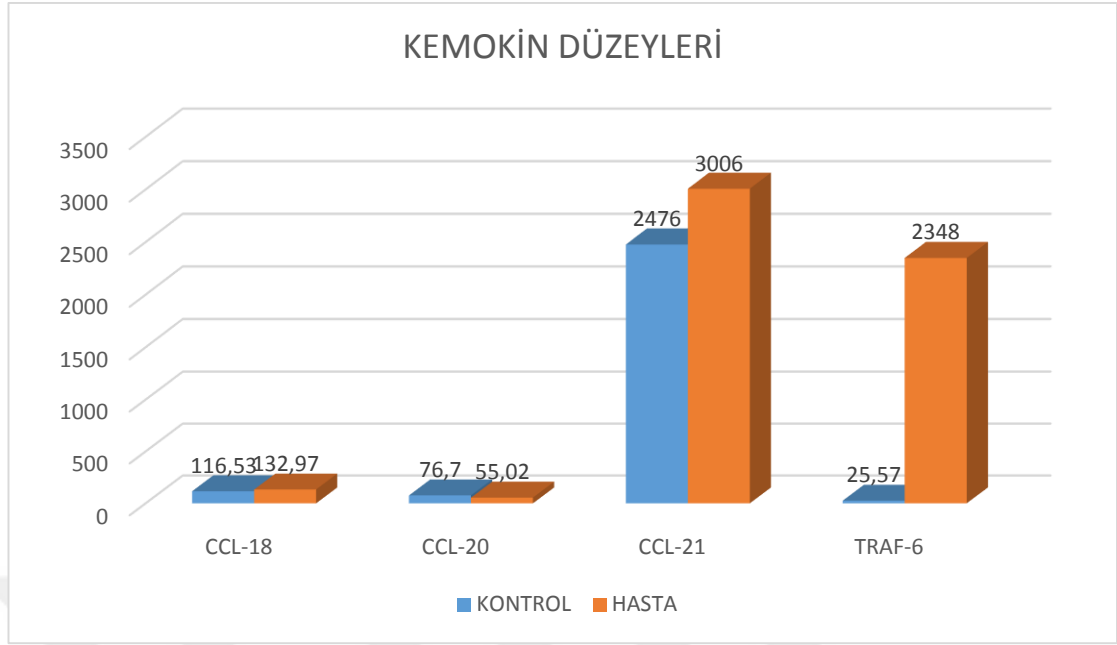
Dokuz hastada tedavi ile ilişkili komplikasyon izlenmiştir (%10,6). Bunlar arasında 4 hastada steroide bağlı miyopati, 4 hastada diyabet ve 1 hastada da psikotik nöbet geliştiği gözlenmiştir. Tedavi ile ilişkili infeksiyon 1 hastada izlenmiştir.

Hasta grubunda ortalama geliş hemoglobin düzeyi 12,5 g/dL (4,4-17,4), ortalama lökosit sayısı 8708/mm³ (3470-19620), ortalama trombosit sayısı 18640/mm³(1.000-92.000), ortalama MPV 10,6 fL (6,7-36) olarak gözlenmiştir. Hasta grubunda ortalama TRAF6 düzeyi 2348 pg/mL (522,2-6913,2), ortalama CCL18 düzeyi 132,97 ug/mL (39,23-329,64), ortalama CCL20 düzeyi 55,02 pg/mL (8,12-111,55) ve ortalama CCL21 düzeyi ise 3006,74 pg/mL (861,34-7057,64) bulunmuştur. Hasta grubu kemokin düzeyleri Şekil-9 da gösterilmiştir.



Şekil-9 Hasta grubu kemokin düzeyleri

Kontrol grubunda ortalama geliş hemoglobin düzeyi 13,37 g/dL (10,9-17,4), ortalama lökosit sayısı 8600/mm³ (4100-11200), ortalama trombosit sayısı 253.800/mm³(103.000-424.000), ortalama MPV 9,1 fL (7,3-12,4) olarak gözlenmiştir. Kontrol grubunda ortalama TRAF6 düzeyi 25,57 pg/mL (6,5-911,0), ortalama CCL18 düzeyi 116,53 ug/mL (55,81-290,61), ortalama CCL20 düzeyi 76,6 pg/mL (19,26-2428,0) ve ortalama CCL21 düzeyi ise 2476,26 pg/mL (1155,93-7889,31) bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubunun karşılatırmalı kemokin düzeyleri Şekil-10'da gösterilmiştir.



Şekil-10 Karşılaştırmalı hasta-kontrol kemokin düzeyleri

Hasta grubu ve sağlıklı gruptaki kemokin düzeyleri istatistiksel olarak Kolmogorov-Smirnov testi ile normal dağılıma uymadığından ANOVA analizi yapılmıştır. TRAF6 düzeyi hasta ve kontrol grubunda istatistiksel anlamlı olarak farklılık saptanmıştır ($p=0,000$) Geliş trombosit değeri 30 bin altında olan gruptaki TRAF6 düzeylerinin kontroller grubu güçlü anlamlı farklılık TUKEY analizi ile gösterilebilmiştir ($p=0,000$).

Kemokin düzeyleri kendi içerisinde ilişkisine yönelik yapılan korelasyon analizinde oldukça yüksek katsayı (r^2 : -,665) ile incelemeye alınan 4 kemokin birbiri ile ilişkili bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubu kemokin düzey ortalamaları Tablo-5'te gösterilmiştir.

Tablo-5 Hasta ve kontrol grubu ortalama kemokin düzeyleri

Kemokin	Hasta (n:85)	Kontrol (n:85)
TRAF6	2348 pg/mL	25,57 pg/mL
CCL18	132,97 ug/mL	116,53 ug/mL
CCL20	55,02 pg/mL	76,7 pg/mL
CCL21	3006,74 pg/mL	2476,26 pg/mL

Hasta grubunda trombosit değerlerine göre 0-25.000/mm³, 26-50.000/mm³, 51-75.000/mm³ ve 76-100.000/mm³ olarak yapılan dörtlü grupta kemokin düzeyleri arasında yapılan analizde trombosit sayısı düştükçe TRAF6 düzeyinde anlamlı bir yükseklik gözlenmiş, bu yükseklik en şiddetli olarak trombosit sayısı tedavi ihtiyacı doğuran grup olan 0-25.000 arası olan grupta izlenmiştir. TRAF6 ve diğer kemokin düzeylerinin trombosit sayıları ile olan anlamlılık düzeyleri Tablo-6’da gösterilmiştir.

Tablo-6 Kemokin düzeylerinin trombosit değerleri ile ilişkisi

			p değeri
TRAF6	>100 bin	75-100 bin	0,292
		50-75 bin	0,005
		25-50 bin	0,000
		25bin altı	0,000
CCL18	>100 bin	75-100 bin	0,890
		50-75 bin	0,923
		25-50 bin	0,953
		25bin altı	0,642
CCL20	>100 bin	75-100 bin	1,000
		50-75 bin	0,997
		25-50 bin	0,955
		25bin altı	0,996
CCL21	>100 bin	75-100 bin	0,947
		50-75 bin	1,0
		25-50 bin	0,719
		25bin altı	0,384

TARTIŞMA

İmmün trombositopeni, etyolojisi ve patogenezi henüz tam olarak aydınlatılmamış olan ve antikor aracılı trombosit yıkımının söz konusu olduğu düşünülen bir otoinflamatuvar hastalıktır. Trombosit yıkımı ile sonuçlanan bu yanıtın genetik ya da edinsel faktörler ile uyarıldığı, genellikle viral olmak üzere infeksiyonlar ve immün homeostazın bozulduğu otoimmün hastalıklar ve lenfoid malignitelerin edinsel sebepler arasında sayılabileceği bildirilmektedir. Viral infeksiyonlar seyrinde trombosit antijenleri ile çapraz reaksiyonların (moleküler benzerlik ile) İTP'ye yol açabileceği, bakteriyel infeksiyonlar seyrinde ise lipopolisakkaritler gibi bakteriyel antijenlerin trombosit yüzeyine tutunarak trombosit fagositozun hedefi haline getirdiği düşünülmektedir. Toplumda sık görülen bakteriyel infeksiyonlardan Helikobakter pylori infeksiyonunun moleküler benzerlik, immün yanıtı neden olma ya da CagA/VagA gibi bu bakteriye özgü proteinlerin adeta bir antijen gibi immün sistemi uyardığı ve böylece trombosit yıkımına neden olduğu öne sürülmektedir.

İmmün dengedeki değişiklikler, çevresel ortamda self-toleransı azaltarak self-reaktif antikorların gelişimine yol açarak İTP patogenezinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Antifosfolipid antikor sendromu, sistemik lupus eritematozus, kronik lenfosittik lösemi ve diğer düşük dereceli lenfoproliferatif hastalıklar ve otoimmün lenfoproliferatif sendrom seyrinde gözlenen immün reaksiyonlar sayılabilir. Bunun yanında, temel immünolojik çalışmalar ile T hücrelerinin İTP patogenezindeki rolü artık gündeme gelmektedir. T hücre aracılı sitotoksikite ve düzenleyici T hücrelerinin (Treg) nicelik ve niteliksel olarak farklılığı baskılayıcı özellik gösteren Treg hücrelerinin sağlıklı bireylere kıyasla İTP hastalarında daha az sayıda olduğu ve

rituksimab gibi tedaviler sonrasında klinik yanıt alınan hastalarda bu Treg hücrelerinin sayılarının normale dönmesi, bu fikri destekleyen bulgular olmuştur (106). Trombosit yüzey glikoproteinlerine karşı CD4+ helper T hücrelerince yönetilen bir antikor üretiminden, dalak makrofajlarının ise majör antijen sunan hücreler olduğu düşünülmektedir. Her ne kadar trombositlere karşı gelişen oto-antikorların patogenezdaki yeri üzerinde durulsa ve tedavide bu düşünce ile başarılı olsa dahi antikorların klinik olmadan da varolması (epifenomen olarak) nedeni ile İTP hastaların hepsinde anti-trombositler antikorlar gösterilememektedir ve bu nedenle günümüzde her hastada araştırılması önerilmemektedir (107).

Gerek immün sistemin aktive edilmesi, gerekse de baskılanması şeklinde düzenleyici fonksiyonu olan Treg'lerin immün sistemde Forkhead transcription factor FOXP3 adı verilen faktör ile immün sistemi aşırı immün yanıtta koruduğu gösterilmiştir. İmmün disregülasyon olarak adlandırılan immüdisregülasyon polieendokrinopati enteropati X'e bağlı sendromda (IPEX) Foxp3 eksikliğinin sorumlu olduğu gösterilmiştir (108).

İmmün trombositopeni etyopatogenezinde trombositlerin çeşitli nedenler ile işaretlenerek immün sisteme tanıtılması ve toleranstan ayrılması bilgilerinin yanında immün sistemde antijen sunumu, antikor sentezi ve sonrasında fagositoz ile neticelenen bu süreçte haberci moleküller olarak kemokinler karşımıza çıkmaktadır. Kemokinler daha önce de belirtildiği gibi, protein yapılı, küçük ve kemotaktik sitokinlerdir (109). İlettikleri sinyaller ile anjiogenez, hematopoez ve lökosit trafiği gibi immün sistem için her biri hayati önem arz eden yollarda rol oynamaktadır. Sinyalleri yedi transmembran G-protein eşleşmiş reseptör aracılığı ile iletilen kemokinlerin yalnızca immün sistemin aktive edilmesi değil, immün yanıtların hafifletilmesi ve inflamasyonun toparlanması gibi süreçlerde de rol oynadığı düşünülmektedir. Tablo 4'te özetlenen kemokin ailesi ile ilgili bu genel bilgiler ışığında inflamatuvar hastalıklarda sitokinler ve kemokinlerin rolü tahmin edilebilir olmak ile birlikte, bu rolün ortaya konmasına ilişkin birçok hastalıkta kemokinlerin varlığı ve fonksiyonları araştırılmaktadır (110). Örneğin, tip 1 diyabet, romatoid artrit, lupus nefriti, psöriyazis ve sistemik skleroz gibi birçok kronik, inflamatuvar ve otoimmün hastalıkta IL-1 ve IL-6'nın upregülasyonu gösterilmiş durumdadır. TNF alfa'nın da birçok inflamatuvar hastalıkta gerek hastalık patogenezi gerek ise bölgesel hastalık bulgularındaki rolü artık iyice yerleşmiştir. Biz de sistemik bir inflamatuvar tablo olan İTP'de patogeneizde trombositlerin otoimmün bir şekilde yıkıldığı, trombosit üretiminde esasen bir patoloji olmadığı bilgisi ile özellikle lenfosit kemotaksisinden sorumlu olan kemokin düzeylerinin patogeneizde rol oynayacağı hipotezi üzerinde durduk. Çalışmamızda TRAF6, CCL18, CCL20 ve CCL21 kemokinleri incelendi ve belirgin etkinin

TRAF6'da olduğu gözlemlendi. TRAF6'nın özellikle trombosit sayısı 30 bin/mm³ altında olan hastalarda, trombosit sayısı 30-100 bin/mm³ olan hastalar ile daha belirgin olarak sağlıklı kontroller arasında istatistiksel anlamlı düzeyde değiştiği gözlenmiştir (p=0,000). Tedavi ihtiyacı doğan grupta TRAF6 yüksekliğinin belirgin şekilde anlamlı izlenmesi ITP patogenezinde önemli yeri olabileceği düşüncemizi doğrulamakta ve tedavi ihtiyacını öngörebilecek bir parametre olarak karşımıza çıkmaktadır

Bir serin/treonin kinaz olan IRAK1 molekülünün TLR/IL1R'ünden bir sinyal alarak bunu NF-KB'ya ilettiği bilinmektedir. IRAK1 molekülü fosforile olarak aktive olmakta ve TRAF6 molekülüne bağlanmaktadır. Bu bağlanma neticesinde NFKB nükleer translokasyonu başlatılabilmektedir. İnflamatuvar hastalıklarda bu yolağın var olduğu ve etkin olduğu çalışmalarca gösterilmiştir (111,112). Hematolojide önemli olan ve genetik bileşenlerinin üzerinde durulduğu bir prekanseröz hastalık olan miyelodisplastik sendromda IRAK1/TRAF6 kompleksinin ilettiği yolağın aktive olduğu ve bu kompleksin inhibe edilmesinin bir tedavi hedefi olabileceği üzerinde durulmaktadır (113). TRAF6 ile aktive olan NFKB yolağının mukoza ilişkili lenfoid dokuda (MALT) T cell reseptör (TCR) yanıtında rol oynadığı bilinmektedir (114). MALT dokudaki bu TRAF6-NFKB aktivasyon ilişkisi ile hematolojide mukozal lenfoid doku ile ilişkili hastalıklarda özellikle H. pylori ilişkisinin daha ayrıntılı incelenmesinin yararlı olacağı görüşündeyiz. TRAF6'nın T hücre sinyalizasyonu dışında, B hücre sinyalizasyonunda da rol oynadığı, B hücrelerinde CD40 ve TLR9 yolağında etkin olduğu gözükmemektedir. Bunun klinik önemi, otoinflamatuvar hastalıklarda çevresel B lenfositlerde özellikle CD27 pozitif B lenfositlerde inflamasyonu artırıcı bir rol oynadığı gösterilmiştir (115). Lenfositlerden farklılaşan bir monoklonal plazma hücre hastalığı olan multipl myelomda yine TRAF6/NFKB yolağı aktif bulunmuş ve bir tedavi hedefi olabileceği üzerinde durulmuştur (116). Yine bir başka myelom-kemik hastalığı konulu çalışmada TRAF6 düzeyini azaltarak CD14 pozitif monositlerden osteoklast hücrelerine farklılaşmanın inhibe edildiği, RANKL yolunun uyarıldığı ve böylece kemik rezorpsiyonunun azaltıldığı gösterilmiştir. Hematolojik maligniteler dışında solid tümörlerde de (özofagus, mide kanseri, hepatosellüler kanser gibi) kanser TRAF6 ilişkisini inceleyen daha temel bilimsel çalışmalarda TRAF6'nın mitokondride p53 translokasyonunu, apoptozu ve tümör supresyonunu kısıtladığı, böylece bir bekçi görevi üstlendiği ve tümör gelişimi ya da ilaç direnci gibi mekanizmalarda rol oynayabileceği üzerinde durulmaktadır (117-120). Çalışmamızda sağlıklı bireylerde TRAF6 düzeyinin oldukça düşük olduğu gözlenmiş iken, trombosit sayısı azaldıkça, özellikle tedavi ihtiyacı olan 30 bin düzeyinin altında TRAF6 düzeyinin oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Bunun olası

nedenleri arasında lenfosit kemotaksisinin antikör aracılı ve hücrel immünitenin uyarılması ile bir trombosit yıkımına yol açtığı ve immün trombositopenide hemen daima aktive, büyük ve granüllü trombositlerin mevcudiyeti ile trombosit aktivasyonu ve trombositlerin immün hücreler olduğuna işaret ettiği kanaatindeyiz.

TRAF6 molekülü İTP patogeneziindeki inflamasyon-trombosit yıkımı bilgisine ek olarak trombositopenisi tedavi ihtiyacı olan hasta grubunda oldukça yüksek bulunduğu ileri çalışmaları destekliyle bir takip parametresi olarak ve TRAF6'nın inhibe edilmesi yolu ile bir tedavi hedefi de olabileceği görüşündeyiz. İTP'de düşük trombosit sayılarında dahi hayatı tehdit eden kanama beklenmemekle birlikte kanama izlenen hastalarda TRAF6 düzeyinin kanaması olmayan hastalara kıyasla oldukça az sayıda hasta ile yaptığımız çalışmamızda anlamlı olarak yüksek gözlemledik ($p=0,000$). Bu bilgi ışığında TRAF6'nın kanama ile seyreden İTP hastalarında gerek bir tedavi hedefi, gerekse de takip parametresi olacağı kanaatindeyiz. Bu gözlemimizin daha yüksek sayıda hasta ile yapılabilecek çalışmalar ile desteklenmesi ihtiyacı olduğu görüşündeyiz. Bundan sonraki basamaklarda yapılacak çalışmalar ile IVIG tedavisinin TRAF6 düzeylerine etkisi, kortikosteroid tedavisinin ve TPO-RA tedavisinin TRAF6 düzeylerine etkisinin de gözlemlenmesi ve araştırılmasının İTP kaynaklarına önemli bir katkıda bulunacağı düşüncesindeyiz.

SONUÇLAR

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji polikliniğine ve acil servise 2016-2017 yılları arasında ayaktan başvuran, İTP tanısı alan hastaların serum sitokin (CCL18, CCL20, CCL21, TRAF6) düzeylerinin aynı yaş ve cinsiyet dağılımına sahip sağlıklı erişkinlerle karşılaştırılması amaçladığımız çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar şu şekildedir;

1. 85 hasta ve 85 sağlıklı kontrol örnekleri kullanılmıştır.
2. Cinsiyetler, hasta grubunda 65 kadın, 20 erkek, kontrol grubunda ise 65 kadın 20 erkek olmak üzere benzerdir.
3. Yaş ortalaması hasta grubunda ortalama 45,72 (22-87) yıl, kontrol grubunda 47,68 (20-72) yıl idi.
4. 61 hastada minör ve major dahil olmak ile birlikte kanama gözlenmiş, bunların 22 tanesi mukozal kanama, 15 tanesi majör kanama olarak değerlendirilmiştir.
5. 15 hastada antinükleer antikor (FANA) pozitif bulunmuştur.
6. 2 hastada lupus antikoagulanı (DRVVT ve LA ile) pozitif bulunmuştur.
7. Hasta grubunda 12 hasta ilaçsız takip edilmiştir.
8. İntravenöz immünglobulin 26 hastaya uygulanmıştır.
9. Eltrombopag 5 hastaya uygulanmıştır.
10. İVİG yanıt günü ortalama 3.gün olarak gözlenmiştir. Yanıt, trombosit sayısının $50.000/mm^3$ üzerine çıkması olarak ele alınmıştır.
11. Splenektomi olan hastaların tanı anından splenektomiye kadar olan tedavi süresi medyan 6 ay olarak gözlenmiştir.

12. Geliş trombosit değeri hastalarda 30bin/mm^3 ve altı (tedavi ihtiyacı doğurması açısından) ve $100\text{bin}-30\text{bin}$ arası olmak üzere iki grup, ve sağlıklı kontroller de 3.grup olarak ele alınmıştır.
13. Hasta grubunda ortalama geliş trombosit sayısı $16.647/\text{mm}^3(1000-92.000)$, geliş MPV $10,6\text{ fL}(6,7-36)$ olarak gözlenmiştir.
14. Hasta grubunda TRAF6 ortalama düzeyi $2348\text{ pg/mL}(522,2-6913,2)$, CCL18 düzeyi $132,97\text{ ug/mL}(86,24-1280)$, CCL20 düzeyi $55,02\text{ pg/mL}(8,12-111,55)$ ve CCL21 düzeyi ise $3006,74\text{ pg/mL}(861,34-7057,64)$ olarak saptanmıştır (Şekil-8).
15. Kontrol grubunda ortalama geliş trombosit sayısı $253.800/\text{mm}^3(103.000-424.000)$, ortalama MPV $9,1\text{ fL}(7,3-12,4)$ olarak gözlenmiştir .
16. Kontrol grubunda ortalama TRAF6 düzeyi ortalama $25,57\text{ pg/dL}(6,5-911,0)$, CCL18 düzeyi $116,53\text{ pg/dL}(55,81-290,61)$, CCL20 düzeyi $76,6\text{ ng/mL}(19,26-2428,0)$, CCL21 düzeyi ise $2476,26\text{ ng/mL}(1155,93-7889,31)$ olarak bulunmuştur.
17. Hasta grubu ve sağlıklı gruptaki kemokin düzeyleri istatistiksel olarak Kolmogorov-Smirnov testi ile normal dağılıma uymadığından ANOVA analizi yapılmıştır. Bu analiz sonucunda TRAF6 düzeyi istatistiksel anlamlı olarak hasta ve kontrol grubunda farklı izlenmiştir. TRAF6 düzeyi ile ilgili TUKEY analizi ile geliş trombosit değeri 30bin/mm^3 altında olan gruptaki düzeyler sağlıklı kontroller ile anlamlı derecede farklı izlenmiştir. Bonferroni analizi ile yine TRAF6 düzeyi trombosit değeri 30bin/mm^3 altı olan hastalar ile sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlılık izlenmiştir.
18. Kemokin düzeyleri ile yapılan korelasyon analizinde yüksek korelasyon katsayısı ile incelemeye alınan 4 kemokin birbiri arasında ilişkili bulunmuştur.
19. İncelemeye alınan diğer değişkenler olarak yaş, geliş hemoglobin düzeyi, geliş lökosit düzeyi ele alındığında kemokin düzeylerinin bu değişkenlerden etkilenmediği gözlendi.
20. İmmün trombositopeni patogeneğinde lenfosit kemoatraktanlarının rolüne ilişkin yaptığımız çalışmamızda kemokinlerden TRAF6 düzeyinin yükselmesi ile trombosit sayısının düşüşü arasında anlamlı bir ilişki gözlendi ($r^2: -,665$). Diğer kemokinlerin düzeylerindeki artış ile trombosit sayısında düşüş izlenir iken bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,000$)
21. TRAF6 düzeyleri cinsiyet ile değişmemektedir.
22. B hücreli neoplazmların patogeneğinde de rolleri güncel çalışmalarda vurgulanan bu kemokinlerin tedavi ile ilişkili değişiklikleri gözlenmiş olduğundan İTP tedavisinde bu

kemokinlerin benzer immün düzenleyiciler ile (bruton kinaz inhibitörleri, fosfoinositol 3 inhibitörleri gibi) tedavi edilebileceği görüşündeyiz.

23. Tedavi seçeneklerinde trombopoetin mimetiklerin kontrendike olabileceği ya da ciddi istenmeyen etkilerin izlendiği durumlarda alternatif tedavi yöntemleri olarak immün düzenleyicilerin kullanılabileceği ve bu kemokinlerden özellikle TRAF6'nın metodolojik olarak kolay tespiti nedeni ile bir biomarker olarak kullanılabileceği görüşündeyiz.



ÖZET

İmmün trombositopeni (İTP) trombositlere karşı oluşan otoantikörlerin trombosit yıkımını arttırması, T hücre aracılı immün yıkım ve kemik iliğinde bozulmuş megakaryopoez sonucunda trombosit yaşam süresinde kısalma ve trombositopeni kliniği ile seyreden edinsel bir hastalıktır. T hücre aktivasyonu ve göçü karmaşık bir süreç olup bu süreçte bir dizi kemokin ve kemokin reseptörü görev alır. Kemokinler protein yapısında küçük kemotaktik sitokinler olup anjiyogenez, hematopoez, mast hücresi degranülasyonu, T hücre farklılaşması ve lökosit hareketliliği gibi birçok alanda rol alırlar.

Çalışmamıza 85 İTP tanılı hasta ve yaş, cinsiyet, benzer bilinen bir kronik hastalığı olmayan ve ilaç kullanmayan 85 gönüllü dahil edildi. Sekonder İTP tanısı olması, kronik İTP tanısı olması, başvuru anında yüksek ESR ve CRP düzeylerinin olması dışlama kriterleri olarak kabul edildi. Hasta ve sağlıklı gönüllülerden alınan kan örneklerinden, ELISA yöntemi ile hedef moleküller olan CCL18, CCL20, CCL21 ve TRAF6 düzeyleri kitler içerisindeki çalışma prensiplerine göre ölçüldü.

Hastaların yaş ortalaması 45,72 (22-87) yıl olup, erkek/ kadın oranı 0.30 (20/65) idi. 61 hastada majör veya minör kanama görüldü (%71,8). Hayatı tehdit edici kanama ise 5 hastada gözlemlendi (%5,9). Hasta grubunda ortalama TRAF6 düzeyi 2348 pg/mL, CCL18 düzeyi 132,97 ug/mL, CCL20 düzeyi 55,02 pg/mL, CCL21 düzeyi ise 3006,74 pg/mL, kontrol grubunda ise ortalama TRAF6 düzeyi 25,57 pg/mL, CCL18 düzeyi 116,53 ug/mL, CCL20 düzeyi 76,6 pg/mL ve CCL21 düzeyi ise 2476,26 pg/mL olarak ölçüldü.

TRAF6 düzeyinde hasta ve kontrol grubunda istatistiksel anlamlı olarak farklılık saptandı ($p=0,000$). Hasta grubunda trombosit değerlerine göre 0-25.000/mm³, 26-

50.000/mm³, 51-75.000/mm³ ve 76-100.000/mm³ olarak yapılan dörtlü grupta ile yapılan analizde trombosit sayısı düştükçe TRAF6 düzeyinde anlamlı bir yükseklik gözlendi. Bu yükseklik en şiddetli olarak trombosit sayısı tedavi ihtiyaı doğuran grup olan 0-25.000 arası olan grupta izlendi. Bu ilişkiye ilişkin korelasyon katsayısı oldukça yüksek bulundu (r^2 : -,665). İTP hastalarında tedavi ihtiyaı doğan grupta TRAF yüksekliğinin belirgin şekilde anlamlı bulunması İTP patogenezinde önemli yeri olabileceğini doğrulamakta ve tedavi ihtiyaını öngörebilecek bir parametre olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak İTP hastalarında TRAF6 düzeyinin trombosit sayısı ve hastalık seyrine etkisini gösteren daha geniş populasyonlu, çok merkezli, prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır. İncelemeye alınan diğer değişkenler olarak yaş, geliş hemoglobin düzeyi, geliş lökosit düzeyi, splenomegali varlığı ele alındığında kemokin düzeylerinin bu değişkenlerden etkilenmediği gözlendi.

Anahtar kelimeler : İTP, Lenfosit kemoatraktanları, TRAF6

EVALUATION OF LYMPHOCYTE CHEMOATTRACTANT LEVELS IN PATIENTS WITH IMMUNE THROMBOCYTOPENIA

SUMMARY

Immune thrombocytopenia (ITP) is an acquired disease characterized by thrombocyte autoantibodies leading to increased platelet destruction, T-cell mediated immunodeficiency, and impaired megakaryopoiesis. T-cell activation and migration is a complex process in which a number of chemokines and chemokine receptors are involved. Chemokines are small chemotactic cytokines with a protein structure and play a role in many essential pathways such as angiogenesis, hematopoiesis, mast cell degranulation, T cell differentiation and leukocyte mobilization.

The study included 85 patients with ITP diagnosis and 84 subjects with similar age and gender who did not use any kind of medication or have chronic diseases. Exclusion criteria were the presence of secondary of ITP, the presence of chronic ITP, and the presence of high levels of ESR and CRP at the time of admission. From the blood samples obtained from patients and healthy volunteers, the target molecules CCL18, CCL20, CCL21 and TRAF6 levels were measured by ELISA methods according to the working principles in the kit.

The mean age of the patients was 47.31 (22-87) and the male/female ratio was 0.30 (20/65). 61 patients had major or minor hemorrhage and life-threatening severe bleeding was observed in only 5 patients. In the patient group, mean TRAF6 level was 2348 pg/mL, CCL18 level 132,97 ug/mL, CCL20 level 55,02 pg/mL and CCL21 level 3006,74 pg/mL, in the control

group TRAF6 level was 25,57 pg/mL, CCL18 level 116,53 ug/mL, CCL20 level 76,6 pg/mL and CCL21 level 2476,26 pg/mL which are statistically significant.

There was a statistically significant difference between patients and control group at TRAF6 levels ($p = 0,000$). Significant increased levels of TRAF6 were observed in the patient group when the platelet count was lowered by the quartile grouping of 0-25.000 / mm³, 26-50.000 / mm³, 51-75.000 / mm³ and 76-100.000 / mm³ according to thrombocyte counts. This elevation was most severely observed in the group with the number of platelets from 0 to 25,000 which required treatment. In the treatment group of patients with ITP, the significant increase in TRAF elevation in the treatment group confirms that there may be an important role in the pathogenesis of ITP and the antagonism emerges as a parameter that can predict treatment need. However, there is a need for multicenter, prospective studies with larger cohorts regarding TRAF6 in platelets with platelet count and disease progression. When the age, arrival hemoglobin level, incident leukocyte level, splenomegaly were considered as the other variables to be examined, it was observed that the chemokine levels were not affected by these variables.

Key words: ITP, Lymphocyte chemoattractants, TRAF6

KAYNAKLAR

1. Buckley MF, James JW, Brown DE, Whyte GS, Dean MG, Chesterman CN, et al. A novel approach to the assessment of variations in the human platelet count. *Thromb Haemost* 2000;83(3):480-4.
2. Escher R, Müller D, Vogel M, Miescher S, Stadler B, Berchtold P. Recombinant human natural autoantibodies against GPIIb/IIIa inhibit binding of autoantibodies from patients with AITP. *Br J Haematol* 1998;102:820-8.
3. McMillan R. Autoantibodies and autoantigens in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 2000;37(3):239-48
4. Cines DB, Blanchette VS. Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 2002;346:995-1008.
5. Stasi R, Del Poeta G, Stipa E, Evangelista ML, Trawinska MM, Cooper N, et al. Response to B-cell-depleting therapy with rituximab reverts the abnormalities of T-cell subsets in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2007;110(8):2924-30.
6. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12(2):121-7.
7. Antonelli A, Rotondi M, Fallahi P, Ferrari SM, Paolicchi A, Romagnani P, et al. Increase of CXC chemokine CXCL10 and CC chemokine CCL2 serum levels in normal ageing. *Cytokine* 2006;34(1):32-8.
8. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;392(6676):565-8.
9. Kemp EH, Metcalfe RA, Smith KA, Woodroffe MN, Watson PF, Weetman AP. Detection and localization of chemokine gene expression in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol* 2003;59(2):207-13.

10. Luster AD. Chemokines chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;338(7):436-45.
11. Gu D, Chen Z, Zhao H, Du W, Xue F, Ge J, et al. T h 1 (CXCL10) and T h 2 (CCL2) chemokine expression in patients with immune thrombocytopenia. *Hum Immunol* 2010;71(6):586-91.
12. Antonelli A, Fallahi P, Rotondi M, Ferrari SM, Romagnani P, Grosso M, et al. Increased serum CXCL10 in Graves' disease or autoimmune thyroiditis is not associated with hyper-or hypothyroidism per se, but is specifically sustained by the autoimmune, inflammatory process. *Eur J Endocrinol* 2006;154(5):651-8.
13. Antonelli A, Ferri C, Fallahi P, Ferrari S, Giuggioli D, Colaci M, et al. CXCL10 (α) and CCL2 (β) chemokines in systemic sclerosis—a longitudinal study. *Rheumatology* 2008;47(1):45-9.
14. Hanaoka R, Kasama T, Muramatsu M, Yajima N, Shiozawa F, Miwa Y, et al. A novel mechanism for the regulation of IFN- γ inducible protein-10 expression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2003;5(2):74-81
15. Narumi S, Takeuchi T, Kobayashi Y, Konishi K. Serum levels of IFN-inducible protein-10 relating to the activity of systemic lupus erythematosus. *Cytokine* 2000;12(10):1561-5.
16. Shimada A, Morimoto J, Kodama K, Suzuki R, Oikawa Y, Funae O, et al. Elevated serum IP-10 levels observed in type 1 diabetes. *Diabetes care* 2001;24(3):510-5.
17. Sørensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA, et al. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 1999;103(6):807-15.
18. Stasi R, Amadori S, Osborn J, Newland AC, Provan D. Long-term outcome of otherwise healthy individuals with incidentally discovered borderline thrombocytopenia. *PLoS Med* 2006;3(3):e24.
19. Machlus KR, Italiano JE, Jr. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol* 2013;201(6):785-96.
20. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood* 2009;113(11):2386-93.
21. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood* 2009;113(11):2386-93.
22. Orkin SH, Nathan DG, Ginsburg D, Look AT, Fisher DE, Lux S. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood E-Book: Elsevier Health Sciences; 2008.

23. Terrell DR, Beebe LA, Vesely SK, Neas BR, Segal JB, George JN. The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: a critical review of published reports. *Am J Hematol* 2010;85(3):174-80.
24. Segal J, Powe N. Prevalence of immune thrombocytopenia: analyses of administrative data. *J Thromb Haemost* 2006;4(11):2377-83.
25. Koylu A, Pamuk GE, Uyanik MS, Demir M, Pamuk ON. Immune thrombocytopenia: epidemiological and clinical features of 216 patients in northwestern Turkey. *Ann Hematol* 2015;94(3):459-66.
26. Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, Moore CV. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med* 1951;38(1):1-10.
27. Khodadi E, Asnafi AA, Shahrabi S, Shahjehani M, Saki N. Bone marrow niche in immune thrombocytopenia: a focus on megakaryopoiesis. *Ann Hematol* 2016;95(11):1765-76.
28. Olsson B, Andersson P-O, Jernås M, Jacobsson S, Carlsson B, Carlsson LM, et al. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nat Med* 2003;9(9):1123-4.
29. Shulman NR, Marder VJ, Weinrach RS. Similarities between known antiplatelet antibodies and the factor responsible for thrombocytopenia in idiopathic purpura. Physiologic, serologic and isotopic studies. *Ann N Y Acad Sci* 1965;124(1):499-542.
30. Zhang H, Hou M, Zhang X, Guan X, Sun G. The diagnostic value of platelet glycoprotein-specific autoantibody detection in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi* 2004;12(2):204-6.
31. Cines DB, Cuker A, Semple JW. Pathogenesis of immune thrombocytopenia. *Presse Med* 2014;43(4):49-59.
32. Chang M, Nakagawa PA, Williams SA, Schwartz MR, Imfeld KL, Buzby JS, et al. Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 2003;102(3):887-95.
33. Leytin V, Mykhaylov S, Starkey AF, Allen DJ, Lau H, Ni H, et al. Intravenous immunoglobulin inhibits anti-glycoprotein IIb-induced platelet apoptosis in a murine model of immune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2006;133(1):78-82.
34. Nieswandt B, Bergmeier W, Rackebrandt K, Gessner JE, Zirngibl H. Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice. *Blood* 2000;96(7):2520-7.
35. Kuwana M, Kaburaki J, Ikeda Y. Autoreactive T cells to platelet GPIIb-IIIa in immune thrombocytopenic purpura. Role in production of anti-platelet autoantibody. *J Clin Invest* 1998;102(7):1393-402.

36. Nishimoto T, Kuwana M, editors. CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in the pathophysiology of immune thrombocytopenia. *Semin Hematol* 2013;50:43-9.
37. Olsson B, Ridell B, Carlsson L, Jacobsson S, Wadenvik H. Recruitment of T cells into bone marrow of ITP patients possibly due to elevated expression of VLA-4 and CX3CR1. *Blood* 2008;112(4):1078-84.
38. Qiu J, Liu X, Li X, Zhang X, Han P, Zhou H, et al. CD8⁺ T cells induce platelet clearance in the liver via platelet desialylation in immune thrombocytopenia. *Sci Rep* 2016;6.
39. Zhao C, Li X, Zhang F, Wang L, Peng J, Hou M. Increased cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity predominant in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura without platelet autoantibodies. *Haematologica* 2008;93(9):1428-30.
40. Nugent D, McMillan R, Nichol JL, Slichter SJ. Pathogenesis of chronic immune thrombocytopenia: increased platelet destruction and/or decreased platelet production. *Br J Haematol* 2009;146(6):585-96.
41. Malara A, Abbonante V, Di Buduo CA, Tozzi L, Currao M, Balduini A. The secret life of a megakaryocyte: emerging roles in bone marrow homeostasis control. *Cell Mol Life Sci* 2015;72(8):1517-36.
42. Makar RS, Zhukov OS, Sahud MA, Kuter DJ. Thrombopoietin levels in patients with disorders of platelet production: diagnostic potential and utility in predicting response to TPO receptor agonists. *Am J Haematol* 2013;88(12):1041-4.
43. Hoffmeister KM. The role of lectins and glycans in platelet clearance. *J Thromb Haemost* 2011;9(1):35-43.
44. Rumjantseva V, Hoffmeister KM. Novel and unexpected clearance mechanisms for cold platelets. *Transfus Apher Sci* 2010;42(1):63-70.
45. Neunert C, Lim W, Crowther M, Cohen A, Solberg L, Crowther MA. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood* 2011;117(16):4190-207.
46. Neunert C, Noroozi N, Norman G, Buchanan G, Goy J, Nazi I, et al. Severe bleeding events in adults and children with primary immune thrombocytopenia: a systematic review. *J Thromb Haemost* 2015;13(3):457-64.
47. Portielje JE, Westendorp RG, Kluin-Nelemans HC, Brand A. Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2001;97(9):2549-54.
48. Neunert C, Lim W, Crowther M, Cohen A, Solberg L. Clinical guideline update on "Immune thrombocytopenia: an evidence based practice guideline developed by the American Society of Hematology". *Blood* 2011;blood-2010-08-302984.

49. Stasi R, Stipa E, Masi M, Cecconi M, Scimò MT, Oliva F, et al. Long-term observation of 208 adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Med* 1995;98(5):436-42.
50. Cooper N. Intravenous immunoglobulin and anti-RhD therapy in the management of immune thrombocytopenia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23(6):1317-27.
51. Godeau B, Chevret S, Varet B, Lefrère F, Zini J-M, Bassompierre F, et al. Intravenous immunoglobulin or high-dose methylprednisolone, with or without oral prednisone, for adults with untreated severe autoimmune thrombocytopenic purpura: a randomised, multicentre trial. *Lancet* 2002;359(9300):23-9.
52. Pawlowsky JM, Bouvier M, Deforges L, Duval J, Bierling P, Dhumeaux D. Chronic hepatitis C after high-dose intravenous immunoglobulin. *Transfusion* 1994;34(1):86-7.
53. George JN, Woolf SH, Raskob GE, Wasser J, Aledort L, Ballem P, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* 1996;88(1):3-40.
54. Schwartz J, Leber MD, Gillis S, Giunta A, Eldor A, Bussel JB. Long term follow-up after splenectomy performed for immune thrombocytopenic purpura (ITP). *Am J Hematol* 2003;72(2):94-8.
55. Kojouri K, Vesely SK, Terrell DR, George JN. Splenectomy for adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: a systematic review to assess long-term platelet count responses, prediction of response, and surgical complications. *Blood* 2004;104(9):2623-34.
56. Provan D, Stasi R, Newland AC, Blanchette VS, Bolton-Maggs P, Bussel JB, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood* 2010;115(2):168-86.
57. Vianelli N, Galli M, de Vivo A, Intermesoli T, Giannini B, Mazzucconi MG, et al. Efficacy and safety of splenectomy in immune thrombocytopenic purpura: long-term results of 402 cases. *Haematologica* 2005;90(1):72-7.
58. Johansson E, Engervall P, Landgren O, Grimfors G, Widell S, Rezai S, et al. Response to splenectomy is durable after a certain point in time in adult patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 2006;77(1):61-6.
59. Provan D, Butler T, Evangelista ML, Amadori S, Newland AC, Stasi R. Activity and safety profile of low-dose rituximab for the treatment of autoimmune cytopenias in adults. *Haematologica* 2007;92(12):1695-8.
60. Stasi R, Stipa E, Forte V, Meo P, Amadori S. Variable patterns of response to rituximab treatment in adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2002;99(10):3872-3.
61. Cooper N, Stasi R, Cunningham-Rundles S, Feuerstein MA, Leonard JP, Amadori S, et al. The efficacy and safety of B-cell depletion with anti-CD20 monoclonal antibody in

- adults with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2004;125(2):232-9.
62. Stasi R. Pathophysiology and therapeutic options in primary immune thrombocytopenia. *Blood Transfus* 2011;9(3):262-73
 63. Kuter DJ. New thrombopoietic growth factors. *Blood* 2007;109(11):4607-16.
 64. Provan D, Newland AC. Current Management of Primary Immune Thrombocytopenia. *Adv Ther* 2015;32(10):875-87.
 65. Imbach P, Crowther M. Thrombopoietin-receptor agonists for primary immune thrombocytopenia. *N Eng J Med* 2011;365(8):734-41.
 66. Wang B, Nichol JL, Sullivan JT. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of AMG 531, a novel thrombopoietin receptor ligand. *Clin Pharmacol Ther* 2004;76(6):628-38.
 67. Dadfarnia T, Lee S. Progression of romiplostim myelofibrosis to myeloproliferative neoplasm. *Blood* 2014;123(13):1987-96.
 68. Rashidi A, Rouillet MR. Romiplostim-induced myelofibrosis. *Blood* 2013;122(12):2001.
 69. Ruggeri M, Tosi A, Palandri F, Polverelli N, Mazzucconi M, Santoro C, et al. Thrombotic risk in patients with primary immune thrombocytopenia is only mildly increased and explained by personal and treatment-related risk factors. *J Thromb Haemost* 2014;12(8):1266-73.
 70. Erickson-Miller CL, DeLorme E, Tian S-S, Hopson CB, Stark K, Giampa L, et al. Discovery and characterization of a selective, nonpeptidyl thrombopoietin receptor agonist. *Exp Hematol*. 2005;33(1):85-93.
 71. Erickson-Miller CL, Delorme E, Tian SS, Hopson CB, Landis AJ, Valoret EI, et al. Preclinical Activity of Eltrombopag (SB-497115), an Oral, Nonpeptide Thrombopoietin Receptor Agonist. *Stem Cells* 2009;27(2):424-30.
 72. Bussel JB, Cheng G, Saleh MN, Psaila B, Kovaleva L, Meddeb B, et al. Eltrombopag for the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Eng J Med* 2007;357(22):2237-47.
 73. Bussel JB, Provan D, Shamsi T, Cheng G, Psaila B, Kovaleva L, et al. Effect of eltrombopag on platelet counts and bleeding during treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2009;373(9664):641-8.
 74. Tomiyama Y, Miyakawa Y, Okamoto S, Katsutani S, Kimura A, Okoshi Y, et al. A lower starting dose of eltrombopag is efficacious in Japanese patients with previously treated chronic immune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2012;10(5):799-806.
 75. Wright JH. The histogenesis of the blood platelets. *J Morphol* 1910;21:263-278

76. Kuter DJ, Greenberg SM, Rosenberg RD. Analysis of megakaryocyte ploidy in rat bone marrow cultures. *Blood* 1989;74(6):1952-62.
77. Jackson CW, Brown LK, Somerville BC, Lyles SA, Look AT. Two-color flow cytometric measurement of DNA distributions of rat megakaryocytes in unfixed, unfractionated marrow cell suspensions. *Blood* 1984;63(4):768-78.
78. Berridge M, Ralph S, Tan A. Cell-lineage antigens of the stem cell-megakaryocyte-platelet lineage are associated with the platelet IIb-IIIa glycoprotein complex. *Blood* 1985;66(1):76-85.
79. Tomer A. Human marrow megakaryocyte differentiation: multiparameter correlative analysis identifies von Willebrand factor as a sensitive and distinctive marker for early (2N and 4N) megakaryocytes. *Blood* 2004;104(9):2722-7.
80. Schulze H, Korpai M, Hurov J, Kim S-W, Zhang J, Cantley LC, et al. Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood* 2006;107(10):3868-75.
81. Greenberg SM, Kuter DJ, Rosenberg RD. In vitro stimulation of megakaryocyte maturation by megakaryocyte stimulatory factor. *J Biol Chem* 1987;262(7):3269-77.
82. Huang Z, Richmond TD, Muntean AG, Barber DL, Weiss MJ, Crispino JD. STAT1 promotes megakaryopoiesis downstream of GATA-1 in mice. *J Clin Invest* 2007;117(12):3890-9.
83. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Kowalska MA, Vilaire G, Pan ZK, et al. Stromal-derived factor 1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis. *Blood* 2000;96(13):4142-51.
84. Lane WJ, Dias S, Hattori K, Heissig B, Choy M, Rabbany SY, et al. Stromal-derived factor 1-induced megakaryocyte migration and platelet production is dependent on matrix metalloproteinases. *Blood* 2000;96(13):4152-9.
85. Lefrançois E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* 2017;544(7648):105-109.
86. Hoffmeister KM, Falet H. Platelet clearance by the hepatic Ashwell-Morrell receptor: mechanisms and biological significance. *Thromb Res* 2016;141:68-72.
87. Jansen AG, Josefsson EC, Rumjantseva V, Liu QP, Falet H, Bergmeier W, et al. Desialylation accelerates platelet clearance after refrigeration and initiates GPIIb/IIIa metalloproteinase-mediated cleavage in mice. *Blood* 2012;119(5):1263-73.
88. Nakajima H, Fukuda K, Doi Y, Sugino M, Kimura F, Hanafusa T, et al. Expression of TH1/TH2-related chemokine receptors on peripheral T cells and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 2004;52(3):162-8.

89. Ishida T, Mizushima S-i, Azuma S, Kobayashi N, Tojo T, Suzuki K, et al. Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J Biol Chem* 1996;271(46):28745-8.
90. Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 1996;383(6599):443-6.
91. Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1994;78(4):681-92.
92. Walsh MC, Lee J, Choi Y. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system. *Immunol Rev* 2015;266(1):72-92.
93. Rossi DL, Vicari AP, Franz-Bacon K, McClanahan TK, Zlotnik A. Identification through bioinformatics of two new macrophage proinflammatory human chemokines: MIP-3alpha and MIP-3beta. *J Immunol* 1997;158(3):1033-6.
94. Dieu M-C, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon J-M, Oldham E, Aït-Yahia S, et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 1998;188(2):373-86.
95. Grant AJ, Goddard S, Ahmed-Choudhury J, Reynolds G, Jackson DG, Briskin M, et al. Hepatic expression of secondary lymphoid chemokine (CCL21) promotes the development of portal-associated lymphoid tissue in chronic inflammatory liver disease. *Am J Pathol* 2002;160(4):1445-55.
96. Comerford I, Harata-Lee Y, Bunting MD, Gregor C, Kara EE, McColl SR. A myriad of functions and complex regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 chemokine axis in the adaptive immune system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013;24(3):269-83.
97. Wells T, Peitsch MC. The chemokine information source: identification and characterization of novel chemokines using the WorldWideWeb and expressed sequence tag databases. *J Leukoc Biol* 1997;61(5):545-50.
98. Atamas SP, Luzina IG, Choi J, Tsymbalyuk N, Carbonetti NH, Singh IS, et al. Pulmonary and activation-regulated chemokine stimulates collagen production in lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29(6):743-9.
99. Chang Y, De Nadai P, Azzaoui I, Morales O, Delhem N, Vorng H, et al. The chemokine CCL18 generates adaptive regulatory T cells from memory CD4⁺ T cells of healthy but not allergic subjects. *FASEB J* 2010;24(12):5063-72.
100. Prasse A, Pechkovsky DV, Toews GB, Jungraithmayr W, Kollert F, Goldmann T, et al. A vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL18. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173(7):781-92.

101. Schraufstatter IU, Zhao M, Khaldoyanidi SK, DiScipio RG. The chemokine CCL18 causes maturation of cultured monocytes to macrophages in the M2 spectrum. *Immunology* 2012;135(4):287-98.
102. Schutyser E, Richmond A, Van Damme J. Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes. *J Leukoc Biol* 2005;78(1):14-26.
103. Struyf S, Schutyser E, Gouwy M, Gijsbers K, Proost P, Benoit Y, et al. PARC/CCL18 is a plasma CC chemokine with increased levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 2003;163(5):2065-75.
104. Krohn SC, Bonvin P, Proudfoot AE. CCL18 exhibits a regulatory role through inhibition of receptor and glycosaminoglycan binding. *PloS one*.2013;8(8):e72321.
105. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, Arnold D, Collier B, James P, et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2010;8(9):2063-5.
106. Stasi R, Cooper N, Del Poeta G, Stipa E, Evangelista ML, Abruzzese E, et al. Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B cell-depleting therapy with rituximab. *Blood* 2008;112(4):1147-50.
107. Fabris F, Scandellari R, Ruzzon E, Randi ML, Luzzatto G, Girolami A. Platelet-associated autoantibodies as detected by a solid-phase modified antigen capture ELISA test (MACE) are a useful prognostic factor in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2004;103(12):4562-4.
108. Muto G, Kotani H, Kondo T, Morita R, Tsuruta S, Kobayashi T, et al. TRAF6 is essential for maintenance of regulatory T cells that suppress Th2 type autoimmunity. *PLoS One* 2013;8(9):e74639.
109. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* 2014;1843(11):2563-82.
110. Campbell JJ, Butcher EC. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 2000;12(3):336-41.
111. Wang Z, Wesche H, Stevens T, Walker N, Yeh W-C. IRAK-4 inhibitors for inflammation. *Curr Top Med Chem* 2009;9(8):724-37.
112. Durand-Reville T, Jewell C, Hammond C, Chin D. IRAK modulators for treating an inflammatory condition, cell proliferative disorder, immune disorder. *PCT Int Appl*. 2008.
113. Rhyasen GW, Bolanos L, Fang J, Jerez A, Wunderlich M, Rigolino C, et al. Targeting IRAK1 as a therapeutic approach for myelodysplastic syndrome. *Cancer Cell* 2013;24(1):90-104.

114. Sun L, Deng L, Ea C-K, Xia Z-P, Chen ZJ. The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell* 2004;14(3):289-301.
115. Iwata S, Yamaoka K, Niino H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Wang S, Kondo M, et al. Increased Syk phosphorylation leads to overexpression of TRAF6 in peripheral B cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2015;24(7):695-704.
116. Wang X, Wang J, Liu H, Xu R, Ding R, Jiang S, et al. TRAF6 is required for BLyS-mediated NF- κ B signaling in multiple myeloma cells. *Med Oncol* 2015;32(10):239.
117. Han F, Zhang L, Qiu W, Yi X. TRAF6 promotes the invasion and metastasis and predicts a poor prognosis in gastric cancer. *Pathol Res Pract* 2016;212(1):31-7.
118. Li J-j, Luo J, Lu J-n, Liang X-n, Luo Y-h, Liu Y-r, et al. Relationship between TRAF6 and deterioration of HCC: an immunohistochemical and in vitro study. *Cancer Cell Int* 2016;16(1):76.
119. Liu X, Wang Z, Zhang G, Zhu Q, Zeng H, Wang T, et al. High TRAF6 expression is associated with esophageal carcinoma recurrence and prompts cancer cell invasion. *Oncol Res* 2017;25(4):485-93.
120. Zhang X, Li C-F, Zhang L, Wu C-Y, Han L, Jin G, et al. TRAF6 restricts p53 mitochondrial translocation, apoptosis, and tumor suppression. *Mol Cell* 2016;64(4):803-14.



EKLER

EK-1 ETİK KURUL ONAY FORMU

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARASTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2017/45	
	PROTOKOL ADI	İmmün Trombositopenide Lenfosit Kemoatraktan Düzeylerinin Değerlendirilmesi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Prof. Dr. Ahmet Muzaffer DEMİR	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 03/17	Tarih: 15.02.2017	
	Fakültemiz İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ahmet Muzaffer DEMİR'in sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Araş. Gör. Dr. Veysi ASOĞLU'nun tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödenmediği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevduatın oy birliği ile karar verilmiştir.		
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi			

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	E H	E H	
Yrd. Doç. Dr. Rugöl KÖSE ÇINAR Başkan Yardımcısı	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E H	E H	
Yrd. Doç. Dr. Ruhan Deniz TOPUZ Üye	Tıbbi Farmakoloji	T.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D.	K	E H	E H	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. Biyoistatistik A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Hasan ÜMİT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	
Öğretim. Gör. Uzm. Dr. Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	E	E H	E H	
Doç. Dr. Cafer Sadık ZORKUN Üye	Kardiyoloji	T.Ü.T.F. Kardiyoloji A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Muzaffer ESKİOCAK Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Niyazi Cenk SAYIN Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E H	E H	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	
Avukat Baki KURNAZ Üye		T.Ü. Rektörlüğü	E	E H	E H	
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye		Serbest Üye	E	E H	E H	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Ahmet TEZEL
Dekan
Dekan Yrd.

EK 2: BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bir araştırma projesine davet edilmektesiniz. Bu araştırmanın yürütülmesi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun Mart 2017 tarih ve 2017/60 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Araştırmaya katılmaya karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını anlamanız çok önemlidir.

Araştırmaya katılım tamamen gönüllülük ilkesine bağlı olup katılmayı reddetmeniz herhangi bir cezaya ya da elde edilecek herhangi bir yararın kaybedilmesine kesinlikle yol açmayacaktır.

Aynı şekilde araştırmaya katılmayı kabul ettikten sonra da araştırmanın herhangi bir yerinde hiçbir neden göstermeksizin herhangi bir zarar ya da elde edilmesi beklenen bir yarar kaybına yol açmadan araştırmadan çekilebilirsiniz.

Araştırma kapsamında yapılan işlemlerin mali giderleri araştırmacılar ya da destekleyici tarafından karşılanacak olup size ya da sosyal güvenlik kurumunuza hiçbir mali yük getirmeyecektir.

Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun ve araştırmaya katılmak isteyip istemediğinize karar vermek için lütfen biraz düşünün.

- Araştırmanın bilimsel adı:** İmmün Trombositopenide lenfosit kemoatraktan düzeylerinin değerlendirilmesi
- Araştırmanın anlaşılabilir basit adı:** Kan pulcukları eksik/düşük saptanan hastalarda bazı hücrel protein düzeylerinin değerlendirilmesi
- Sorumlu Araştırmacının adı ve görev yeri:** Prof Dr Muzaffer Demir –İç Hastalıkları, Hematoloji BD, Dr Veysi Asoğlu, İç Hastalıkları ABD
- Araştırmanın amacı:** İmmün Trombositopeni hastalarında tedaviye yönelik, tedavi etkinliğinde yenilik sağlayacak moleküller tespit etmek
- Araştırmanın niteliği (klinik, laboratuvar, epidemiyolojik, tez çalışması vb.):** Tez Çalışması
- Araştırmanın başlama tarihi ve öngörülen süresi:** Mart 2017, 6 ay
- Araştırmaya katılması beklenen gönüllü sayısı:** 85 kişi
- Araştırma sırasında uygulanacak olan invaziv yöntemler dahil olmak üzere gönüllüye uygulanacak yöntem, girişim ve tedavilerin tümü:** Gönüllülere herhangi bir girişim uygulanmayacaktır
- Araştırmanın deneysel kısımları:** Laboratuvar ortamında hasta ve gönüllü kanlarında belirli protein düzeylerine bakılacaktır.

- **Farklı uygulama ve girişimler için gönüllülerin araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığı:** Yok
- **Katılımcının araştırmaya dahil edilme nedeni:** Otoimmün hastalıkları bulunmamaları ve çalışma için gönüllü olmaları
- **Araştırmadan doğrudan gönüllü için beklenen yarar:** Bulunmamaktadır
- **Gönüllünün sorumlulukları:** Bulunmamaktadır
- **Gönüllünün (araştırma hamilelerde veya lohusalarda yapılacaksa ise embriyo, fetüs veya süt çocuklarının da) maruz kalabilecekleri riskler veya rahatsızlıklar:** Hayır, gebeler çalışmaya dahil edilmeyecektir.
- **Risklere karşı alınan önlemler:** Herhangi bir risk bulunmamaktadır
- **Gönüllüye alternatif olarak uygulanabilecek olan diğer yöntemler ve bunların olası yarar ve zararları:** Herhangi bir zarar bulunmamaktadır
- **Araştırmaya bağlı olarak bir zarar oluştuğunda verilecek tazminat ve sağlanacak tedaviler:** Herhangi bir invaziv girişim yapılmayacağından zarar beklenmemektedir
- **Gönüllülere yapılacak ulaşım, yemek gibi masraflara ilişkin ödemeler:** Gönüllü kişilerin rutin hastaneye olan kontrollerinde rutin tahliller için alınan kanlar kullanılacak olup gönüllü kişilere herhangi bir mali külfet yüklenmeyecek veya ekstra bir ödeme, yemek yardımı, vs yapılmayacaktır.
- **Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler:** Çalışmaya katılmayı istememesi halinde çalışmaya alınmayacaktır.
- **Araştırma sonunda gönüllülere bilgi verilecek mi?:** Yapılan çalışma bir tez çalışması olup gönüllülere yönelik herhangi bir laboratuvar tetkiki/araştırma yapılmayacak olduğundan sonuç verilmeyecektir.
- **Gönüllülerin araştırma hakkında, kendileri hakkında ya da araştırmayla ilgili herhangi bir beklenmedik olay hakkında daha fazla bilgi edinebilmesi için temasa geçebileceği kişi ve kendisine günün 24 saatinde erişebileceği telefon numarası:** Gönüllülerin rutin kontrollerinde alınmış laboratuvar çalışılmış olup çöpe atılacak olan kanları çalışmada kullanılacaktır. Herhangi bir beklenmedik olay beklenmemektedir
- **Gönüllülerden elde edilecek olan biyolojik materyallerin hangi amaçlarla kullanılacağı:** Çöpe atılacak kan numuneleri söz konusu tezde kullanılacak olup artan miktarlar çöpe atılacaktır.
- **Gönüllülerden elde edilecek biyolojik materyaller üzerinde genetik araştırma yapılabilmesi için onay:** Herhangi bir genetik çalışma yapılmayacaktır.

“İmmün Trombositopeni tanılı hastalarda lenfosit kemoatraktan düzeylerinin değerlendirilmesi ” araştırması kapsamında alınan biyolojik örneklerimin (kan);

☐

Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.

☐

İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.

☐

Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

Yukarıda açıkça tanımlanan çalışmanın ne amaçla, kimler tarafından ve nasıl gerçekleştirileceği anlayabileceğim bir ifade ile bana anlatıldı.

Bu araştırmadan elde edilen bilgilerin bana ve başka insanlara sağlayacağı yararlar bana anlatıldı.

Araştırma sırasında meydana gelebilecek riskler ve rahatsızlıklar bana anlayabileceğim bir dille anlatıldı.

Araştırma sırasında oluşabilecek zarar durumunda gerçekleştirilecek işlemler bana anlatıldı.

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ve haklarım konusunda 24 saat bilgi alabileceğim bir yetkilinin adı ve telefonu bana verildi.

Araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik ve testler ile tıbbi bakım hizmetleri için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyeceği bana anlatıldı.

Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.

Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.

Sorumlu araştırmacı / hekime haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.

Bu çalışmaya katılmayı reddetmem ya da sonradan çekilmem halinde hiçbir sorumluluk altına girmediğimi ve bu durumun şimdi ya da gelecekte gereksinim duyduğum tıbbi bakımı hiçbir biçimde etkilemeyeceğini biliyorum.

Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı / hekim ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmali nedeniyle, benim onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabileceğini biliyorum.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun gerekli gördüğünde, gizliliğimin korunması ilkesine uygun olarak, araştırma konusuyla ilişkili orijinal tıbbi kayıtlarıma doğrudan erişimde bulunabileceğini biliyorum

İlgili yasal düzenlemeler gereğince kimliğimi ortaya çıkaracak kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanmayacağı; araştırma sonuçlarının bilimsel toplantılarda sunulabileceği ya da yayınlanabileceği, ancak, bu tür durumlarda kimliğimin kesin olarak gizli tutulacağı bana açıklandı.

Araştırma konusuyla ilgili olarak, çalışmaya devam etme isteğimi etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde bana ya da yasal temsilcime zamanında bilgilendirme yapılacağı bana açıklandı.

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu adlı metni kendi anadilimde okudum.

Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım.

Yukarıda konusu belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı.

Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu'nun tam imzalı bir kopyasını aldım.

- **Gönüllünün; (El yazısı ile)**

Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya faks numarası):

Tarih:

- **Açıklamaları yapan araştırmacının**

Unvanı, Adı- Soyadı: (El yazısı ile)

Görev yaptığı bölüm:

İmzası:

Tarih: