

İDİOPATİK TROMBOSİTOPENİK PURPURALI HASTALARDA RETİKÜLOTROMBOSİT SAYISININ TEDAVİ CEVABI İLE İLİŞKİSİ

THE ASSOCIATION OF RETICULATED THROMBOCYTE COUNT WITH TREATMENT RESPONSE IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA

Ayşe Serra ARTAN¹ , Meliha NALÇACI² 

¹Bezmialem Vakıf Üniversitesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID IDs of the authors: A.S.A. 0000-0002-6461-3178; M.N. 0000-0002-2555-5024

Cite this article as: Artan AS, Nalcaci M. The association of reticulated thrombocyte count with treatment response in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. J Ist Faculty Med. Published online August 28, 2019. doi: 10.26650/IUITFD.2018.0042

ÖZET

Amaç: İdiyopatik trombositopenik purpura (İTP) otoantikörler ile kaplanmış trombositlerin yıkımı sonucunda trombositopeni oluşumuna sebep olur. Retikülotrombositler (RT) rezidüel, mesajcı ribonükleik asit (mRNA) ve ribosomal ribonükleik asit (rRNA) içeren genç trombositlerdir. Retikülotrombositlerin ölçümü İTP'li ve diğer trombositopenik hastalarda trombopoetik aktivite ile ilişkili bilgi verir.

Bu çalışmada, yeni tanı konan ve refrakter İTP'li hastalarda RT yüzdesinin ve mutlak sayısının belirlenmesi ve tedavi cevabı ile ilişkisinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışma, çeşitli tedavilere refrakter 16 hasta, yeni tanı konan 15 hasta ve 20 sağlıklı kontrol ile yapıldı. Trombosit sayısı ve ortalama trombosit hacmi belirlendi. RT'ler akım sitometrik yöntem ile ölçüldü.

Bulgular: Olguların 35'i (%68,6) kadın, 16'sı (%31,4) erkekti. Olguların yaşları 20-75 arasında değişmekte olup ortalama 39,15±13,04'tü. Refrakter hastalar "Grup 1" (n=16), yeni tanıli hastalar "Grup 2" (n=15) ve kontrol grubu olguları "Grup 3" (n=20) olarak adlandırıldı.

Retikülotrombositler yüzdesi Grup 1'de %21,7, Grup 2'de %36,2 ve Grup 3'te %3,2 bulundu. Grup 3 ile Grup 1 ve 2 arasında anlamlı fark bulundu (p:0,001). Mutlak RT sayıları açısından anlamlı fark bulunmadı.

Sonuç: Retikülotrombosit yüzdesi ölçümü ile, refrakter ve yeni tanıli İTP hastaları arasında fark saptanmamıştır. Retikülotrombosit yüzdesi ölçümünün tedaviye yanıtı göstermediği sonucuna varılmıştır. Refrakter hastalarda RT yüzdesinin yüksek bulunması tedaviye devam edilmesi gerektiğini gösterebilir.

ABSTRACT

Objective: Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) causes thrombocytopenia via the premature destruction of autoantibody covered thrombocytes. It is diagnosed by exclusion of other diseases which cause thrombocytopenia. Reticulothrombocytes (RT) are young thrombocytes containing messenger ribonucleic acid (mRNA) and ribosomal ribonucleic acid (rRNA). Measurement of RT with flow cytometry is reported to reflect thrombopoetic activity in thrombocytopenic patients.

The aim of this study is to measure the percentage and absolute number of RT's in newly diagnosed and refractory ITP patients and to investigate the association between RT percentage and number with response to treatment.

Material and Method: The study group consisted of 16 former ITP patients who were refractory to various treatments, 15 newly diagnosed patients and 20 healthy controls.

Thrombocyte counts and mean thrombocyte volume were measured with blood count. RT counts were measured via flow cytometry. Reticulocyte counts of the refractory patients, new patients and healthy controls were compared to each other.

Results: Thirty five (68.6%) of the 51 patients were female. The patients were between 25 and 75 years old with a mean age of 39.15 years and standard deviation of 13.04 years. The refractory ITP patients and newly diagnosed ITP patients were grouped into Group 1 (n=16) and Group 2 (n=15) respectively. The control group was referred to as Group 3 (n=20).

The platelet count of Group 3 was found to be significantly higher than the platelet counts of Groups 1 and 2 (p:0.001) and there was no difference between Groups 1 and 2. The RT percentage was found 21.7% in Group 1, 36.2% in Group 2 and 3.2%

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: ayseserra@gmail.com

Başvuru/Submitted: 26.12.2018 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 12.03.2019 •

Son Revizyon/Last Revision Received: 02.04.2019 • **Kabul/Accepted:** 01.07.2019 • **Online Yayın/Published Online:** 28.08.2019

©Telif Hakkı 2019 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2019 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

Anahtar Kelimeler: Akım sitometrisi, idiopatik trombositopenik purpura, retikülotrombosit

in Group 3. The RT percentage of Group 3 was calculated to be significantly lower than the RT percentages of Groups 1 and 2 (p:0.001). There was no difference between Groups 1 and 2. The absolute RT count was insignificant between all groups.

Conclusion: The RT percentage count was not statistically different between refractory and newly diagnosed ITP patients. This finding indicates that RT percentage measurement is not helpful in the evaluation of the response to the treatment. The finding of a high RT percentage count in refractory patients suggests that the medical treatment should be continued.

Keywords: Flow cytometry, idiopathic thrombocytopenic purpura, reticulated thrombocytes

GİRİŞ

İdiopatik trombositopenik purpura (İTP) otoantikorlar ile kaplanmış trombositlerin erken yıkımı sonucunda, trombositopeni oluşumu ve mukokutanöz kanama ile ortaya çıkan bir hastalıktır (1). Trombositler, başta dalak olmak üzere retiküloendotelial sistemde hızla yıkılır (2). İdiopatik trombositopenik purpurada ana problem artmış trombosit yıkımı olsa da, 1980'li yıllarda yapılan çalışmalarda kronik İTP'li bazı hastalarda muhtemelen megakaryositlere karşı oluşan otoantikorlara bağlı olarak megakaryosit matürasyonu ve trombosit üretiminin de bozuk olabileceği gösterilmiştir (3).

İdiopatik trombositopenik purpura tanısı; trombositopeniye sebep olan, multisistemik otoimmün hastalıklar, lenfoproliferatif hastalıklar, ilaca bağlı trombositopeni, enfeksiyonlar ve myelodisplastik sendrom gibi hastalıkların dışlanması ile konur. Glikoprotein 2b/3a ve 1b/9, 4 ve 5 spesifitesi olan trombosit ilişkili ve plazmada serbest bulunan antikorları ölçebilen teknikler bulunsun da yetersiz sensitivite nedeniyle tanı değerleri düşüktür (2,4). İdiopatik trombositopenik purpura tanısında hastanın hikayesi, fizik muayene bulguları, tam kan sayımı ve periferik yayma temel alınmaktadır. HIV ve HCV testleri yapılmalıdır. Ek olarak, tiroid fonksiyon testleri, anti nükleer antikor (ANA), Helicobacter pylori testi ve koagülasyon testleri yapılabilir (5). Kemik iliği örneklemesi 60 yaşın üzerindeki, başka sitopenileri olan ve splenektomi planlanan hastalara yapılabilir (1).

İdiopatik trombositopenik purpurada kemik iliği örneklemesinde selülarite normal, megakaryosit sayısı yüksek veya normal, eritropoez ve myelopoez normal bulunur (6).

Kesin bir tanı yöntemi olmaması nedeniyle, muhtemel diğer hastalıkların dışlanması ile tanıya varılan İTP'de son yıllarda, noninvazif yeni bir tanı metodu olarak retikülotrombositlerin (RT) akım sitometrik yöntemle ölçümü araştırılmaktadır.

Granüllü endoplazmik retikulum ve mesajcı ribonükleik asit (mRNA) içeren ve az miktarda protein üretebilen genç trombositlere retikülotrombosit adı verilmektedir

(7,8). Retikülotrombositler kemik iliğinden dolaşıma yeni çıkan trombositlerdir ve eritrosit retikülositlerinin analoğu olarak kabul edilirler (9-11). Retikülotrombositler ilk olarak 1969'da yeni bir metilen mavi boya kullanılarak granüllü endoplazmik retikulumun boyanması ile periferik kanda direk bakı ile gösterilmişlerdir (12).

Kienast ve Schmitz trombositopenili hastalarda, tiazol orange (TO) floresan boya kullanarak RNA'ları boyanan RT'lerin akım sitometrik analizinin tanısal değeri hakkındaki ilk makaleyi yayımlamışlardır (8). Normal trombosit sayısına sahip kişilerde RT oranı %8,6 ($\pm 2,8$) olarak saptanmışken İTP gibi periferik yıkımın arttığı trombositopenik hastalarda RT oranı %26,9 ($\pm 10,9$) olarak tespit edilmiştir. Bu makaleden sonra, trombositopenik hastalıklarda akım sitometrik RT analizi birçok klinik çalışmaya konu olmuştur. Bu teknik Chavda ve arkadaşları tarafından anti-glikoprotein 1b antikorunu kullanarak trombositlerin işaretlenmesi ve TO ile trombosit içerisindeki mRNA'nın boyanması ile çift renk akım sitometrisi kullanılarak geliştirilmiştir (4). Bir başka çalışmada, İTP'li, esansiyel trombositemili ve reaktif trombositozlu hastalarda RT ölçümleri yapılmıştır. İTP'li ve esansiyel trombositozlu hastalarda RT sayısı istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmış olarak bulunmuştur. Reaktif trombositozlu hastalarda ise normal kontrollere göre fark görülmemiştir (10).

Başka bir çalışmada, İTP'li ve myelodisplastik sendromlu hastalarda RT oranı sağlıklı kontroller ile karşılaştırılmıştır. İdiopatik trombositopenik purpuralı hastalarda, sağlıklı kontroller ve myelodisplastik sendromlu hastalara göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuş ve RT'lerin akım sitometrik ölçümünün İTP ve myelodisplastik sendrom tanısında yararlı olabileceği tespit edilmiştir (13). Tazopridin çalışmalarda, RT'lerin İTP tanısının yanında, steroid ve splenektomi ile yapılan tedavi cevabı ile de ilişkili olabileceği gösterilmiştir (14,15).

Günümüzde, tedavi başlanan hastalarda, tedavi cevabını önceden belirleyecek bir bulgu yoktur.

Çeşitli çalışmalarda trombosit sayısı devamlı olarak $<30 \times 10^9/l$ olan hastaların hayatı tehdit edici kanama ris-

kinin olduğu gösterilmiştir (16,17). Genelde çoğu klinisyen trombosit sayısı bu sınırın altına düştüğünde tedaviye başlamaktadır (18,19). Aktif kanamanın olduğu acil durumda intravenöz immunglobulin (IVIg), intravenöz metilprenizolon kullanılır ve trombosit transfüzyonu yapılabilir (4,20). Akut kanaması olmayan hastada birinci sıra tedaviler IVIG, glukokortikoidler ve anti-D'dir.

Birinci sıra tedavilere yeterli yanıt alınamadığında, ikinci sıra tedaviler olarak splenektomi, rituksimab, trombopoietin reseptör agonistleri (TPO-RAs), veya immunosuppressif tedaviler kullanılabilir (1,21).

Hastaların tedavisine başlarken, tedavi cevabını belirleyecek bir laboratuvar kriterinin olması, yan etkisi çok olan bu tedavilerin seçiminde hekimi yönlendirebilir.

Bu çalışmanın amacı, İTP'li hastalarda RT oranı ile tedaviye cevap arasındaki ilişkiyi göstermektir. Akut ve refrakter İTP'li hastalarda RT'lerin yüzde ve mutlak sayısının belirlenmesi ve tedavi cevabı ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya, hasta grubu olarak, Haziran 2009-Mayıs 2010 tarihleri arasında İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji Polikliniği'ne yeni başvuran ve yeni İTP tanısı konan, 18-70 yaş arası, 15 hasta (Grup 2) ve polikliniğimizde halen takip edilen, 18-75 yaş arası, çeşitli tedaviler uygulanmış refrakter İTP'li 16 hasta (Grup 1) dahil edildi. Kontrol grubu olarak 18-70 yaş arası, hasta grubu ile yaş ve cinsiyet uyumu olan 20 sağlıklı erişkin alındı. Kontrol grubu Grup 3 olarak adlandırıldı. Bunların 4'ü erkek, 16'sı kadındı. Çalışmaya alınan tüm hastalar yeniden değerlendirildi. Anamnez, ilaç kullanım öyküsü alındı. Hepsine dahili sistem muayenesi yapıldı. Tüm hastaların periferik kan yayması yapılarak trombosit görünümü değerlendirildi. İTP ile karışabilen diğer hastalıkların dışlanması amacı ile yeni tanı konan hastalardan, 12 hastada anti-HIV, 11 hastada ANA, 9 hastada antikardiyolipin antikor IgM ve IgG kontrolü yapıldı.

Akım Sitometrik Analiz

Kan örnekleri: Hastalardan ve kontrol amaçlı sağlıklı erişkinlerden alınan kan örnekleri bekletilmeden aynı gün çalışıldı. Bu amaçla 2mL'lik ethylenediamine tetraacetate (EDTA) içeren tüpe venöz kan örnekleri alındı.

Thiazol orange ile boyama: Becton Dickinson tarafından pazarlanan TO'nın (ReticCOUNTM) metanolde hazırlanmış stok solüsyonu (1mg/1mL) kullanıldı. Birinci tüpte 1 mL stok solüsyon TO kullanıldı. Boyasız kontrol tüpü olarak kullanılmak üzere 1mL fosfatlı tuz tamponu (phosphate buffered saline-PBS) ile ikinci bir tüp hazırlandı.

Monoklonal antikor ile işaretleme: İnceleme sırasında trombositleri belirlemek amacıyla trombositlere özel

yüzey belirteçlerinden olan ve CD61 olarak bilinen Glikoprotein 3a'ya özgü monoklonal antikorlar (MoAb) kullanıldı. Floresan özelliği TO'dan farklı olabilmesi için R-phycocerythrin (RPE) ile konjuge olanı seçildi (CD61- RPE, Becton Dickinson). İnceleme için 1 mL PBS ve 20uL CD 61 MoAb ile hazırlanan kontrol ve 1 mL TO ve 20uL CD 61 MoAb ile hazırlanan test tüplerine yeni alınmış, 5 uL EDTA'lı tam kan örnekleri eklenerek 30 dakika süreyle, karanlıkta, oda ısısında inkübe edildi ve inkübasyon sonrası bekletilmeden akım sitometriyle çalışıldı. Verilerin sağlanması ve değerlendirilmesi sırasında CellQuest software'i kullanılarak dar açıda (forward side scatter (FSC)) ve dik açıda (side scatter (SSC)) ışık saçılımının ölçüldüğü nokta grafikleri üzerinde CD61 (+) trombositler çerçeve içine alınıp 50.000 sinyal sayıldı. Analiz sırasında önce monoklonal antikor kullanılmaksızın sadece fosfatlı tuz tamponu ile "boş" olarak hazırlanan örnek tüpünün verileri kullanılarak trombositlerin otofloresansı belirlendi ardından boyalı tüpün verileriyle elde edilen histogram grafiği üzerine aynı alan işaretlenerek alınan floresans yoğunluk RT oranı olarak kaydedildi.

Trombosit sayımları ve trombosit hacim ölçümleri:

Trombosit sayımı ve hacim ölçümleri EDTA'lı venöz taze tam kan örnekleri kullanılarak Cell-DYN C1600 (Abbott) kan sayım aletiyle yapıldı.

İstatistiksel analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007&PASS 2008 Statistical Software (Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Oneway Anova testi ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Tukey HDS testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Mann Whitney U test kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen parametrelerin iki grup arası karşılaştırmalarında Mann Whitney U test kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi kullanıldı. Normal dağılıma uygunluk göstermeyen parametreler arasındaki ilişkilerin incelenmesinde Spearman's rho korelasyon analizi kullanıldı. Anlamlılık p<0,05 düzeyinde değerlendirildi.

BULGULAR

Bu çalışmada 51 olgu değerlendirilmiştir. Kontrol grubu sağlıklı yetişkinlerden; hasta grupları, yeni tanı konan İTP'li hastalar ve İTP tanısı bilinen ve poliklinikte izlenen hastalardan oluşmaktadır. İdiyopatik trombositopenik purpura tanısı bilinen hastalar, çeşitli tedavilere refrakter hastalardan seçilmiştir. Olguların 35'i (%68,6) kadın ve 16'sı (%31,4) erkektir. Yaşları 20 ile 75 arasında değişmekte

olup, yaş ortalaması $39,15 \pm 13,04$ 'tür. Refrakter İTP'li hastalar "Grup 1", yeni tanı İTP'li hastalar "Grup 2" ve kontrol grubu olguları "Grup 3" olarak adlandırılmıştır.

Grup 1'de toplam 16 hasta mevcuttur. Grup 1 steroid tedavisi ve splenektomiye refrakter 16 hastadan oluşmaktaydı. Bu gruptan 14 hasta splenektomiye ek olarak ikincil tedavilerden en az birini kullanmıştı. On bir hastanın tanısı merkezimizde yapılan kemik iliği biyopsi ve aspirasyonu ile doğrulanmıştı. Beş hasta daha önce İTP tanısı konan hastalar olup splenektomi sonrası merkezimize başvurmıştı. Hastaların 13'ü kadın, 3'ü erkekti. Bu hastalara 5-37 (medyan:18,5) yıl önce İTP tanısı konmuş ve halen bu tanı ile izlenmekteydiler. İlk başvuru sırasında 4 hastaya yeni İTP tanısı konulurken, 12 hasta bir süredir kronik İTP tanısı ile izlenmekte oldukları başka merkezlerden gelmekteydiler. Tanı sırasında bu hastalardaki yaş dağılımı 7-66 (medyan:25) bulundu (Tablo 1). Tanı sırasındaki trombosit sayısı $5-65 \times 10^9/l$ (medyan $18,5 \times 10^9/l$) idi. Çalışma sırasında yaş dağılımı 22-75 (medyan:44 ortalama:44,37), trombosit sayısı $2-148 \times 10^9/l$ (medyan $31,5 \times 10^9/l$, ortalama: $50,18 \times 10^9/l$) bulundu.

Grup 2'de 6'sı kadın, 9'u erkek 15 hasta mevcuttu. Tanı, kan sayımı ve periferik yaymada azalmış ve iri trombositlerin görülmesi ile konuldu. İdiyopatik trombositopenik purpura ile karışabilen diğer hastalıkların dışlanması amacı ile 12 hastada anti-HIV, 11 hastada ANA, 9 hastada antikardiyolipin antikor IgM ve IgG kontrolü yapıldı ve tüm hastalarda negatif bulundu. Yaş dağılımı 20-58 (medyan: 31, ortalama:32,40) idi (Tablo 1). Trombosit sayısı aralığı $2-103 \times 10^9/l$ (medyan $13 \times 10^9/l$, ortalama: $36,2 \times 10^9/l$) şeklinde idi. Hastaların 11'i yeni İTP semptomları ile, 4'ü refrakter İTP şeklinde kabul edilen klinik tabloyla başvurmuştu.

Grup 3 sağlıklı kontrol grubu olarak seçilmiş, trombositopeniye yol açacak bilinen bir hastalığı ve ilaç kullanım öyküsü olmayan 16'sı kadın, 4'ü erkek toplam 20 kişiden oluşmaktaydı. Yaş dağılımı 23-66 (medyan:38,5, ortalama 40,05) (Tablo 1) ve trombosit aralığı $184-305 \times 10^9/l$ (medyan: $295 \times 10^9/l$, ortalama: $283,95 \times 10^9/l$) idi.

Çalışmaya alınan tüm hastalar yeniden değerlendirildi. Anamnez, ilaç kullanım öyküsü alındı. Hepsine dahili sistem muayenesi yapıldı. Hastaların 18'inde aktif kanamanın öyküsü ve/veya muayene bulgusu vardı. Hastalarda gözlemlenen kanamalar peteşiyal döküntüler, purpura, diş eti ve burun kanaması, kadın hastalarda menoraji idi. Hastaların hiçbirinde tanı sırasında ve takiplerinde hayatı tehdit eden kanama olmadı. Rutin kan sayımı yapıldı. Trombosit sayısı ve MPV yanı sıra hemoglobin değeri ve lökosit sayısı kaydedildi. Hastaların 10'unda anemi saptandı. Anemisi olan tüm hastalar demir eksikliği anemisi olarak kabul edilerek 9'una oral, birine parenteral demir tedavisi başlandı. Tüm hastaların periferik kan yayması yapılarak trombosit görünümü değerlendirildi.

Hastaların ve kontrol grubunun demografik özellikleri, refrakter hastaların ilk tanı sırasındaki yaş ortalamaları ve çalışma sırasındaki yaş ortalamaları dikkate alınarak iki ayrı tablo ile değerlendirildi (Tablo 2 ve 3).

Grup 1'deki hastaların çalışma sırasındaki yaş ortalamalarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktaydı ($p:0,032$). İstatistiksel açıdan anlamlı farklılık Grup 1'den kaynaklanmaktaydı (Tablo 2).

Grup 1'deki refrakter hastaların tanı sırasındaki yaş ortala-

Tablo 1: Kontrol ve Hasta Gruplarının Sayı, Yaş ve Cinsiyet Özellikleri ve Trombosit Sayı Aralığı

Grup	Sayı	Ortalama Yaş	Cinsiyet (K/E)	Trombosit Aralığı
Kontrol	20	40.05 (23-66)	16/4	$184-405 \times 10^9/l$
Grup 1*	16	44.37 (22-75)	13/3	$2-148 \times 10^9/l$
Grup 1**	16	25.94 (7-66)	13/3	$5-65 \times 10^9/l$
Grup 2	15	32.40 (20-58)	6/9	$2-103 \times 10^9/l$

*Çalışma sırasındaki bulgular, **Tanı sırasındaki bulgular

Tablo 2: Demografik Özelliklere Göre Grupların Değerlendirilmesi

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	*p
	Ortalama±standart sapma	Ortalama±standart sapma	Ortalama±standart sapma	
Yaş	$44,37 \pm 13,10$	$32,40 \pm 11,65$	$40,05 \pm 12,32$	0,032 ^a
Cinsiyet	n (%)	n (%)	n (%)	**p
Kadın	13 (%81,3)	6 (%40,0)	16 (%80,0)	0,017*
Erkek	3 (%18,7)	9 (%60,0)	4 (%20,0)	

*Oneway ANOVA Test, **Ki-kare Test, * $p < 0,05$, ^aÇalışma sırasındaki yaş ortalamaları

Tablo 3: Demografik Özelliklere Göre Grupların Değerlendirilmesi

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	*p
	Ortalama±standart sapma	Ortalama±standart sapma	Ortalama±standart sapma	
Yaş	25,93±14,73	32,40±11,65	40,05±12,32	0,008 ^{AA}
Cinsiyet	n (%)	n (%)	n (%)	**p
Kadın	13 (%81,3)	6 (%40,0)	16 (%80,0)	0,017*
Erkek	3 (%18,7)	9 (%60,0)	4 (%20,0)	

*Oneway ANOVA Test, **Ki-kare Test, *p<0,05, **p<0,01, ^{AA}Tanı sırasındaki yaş ortalamaları

Tablo 4: Gruplara İlişkin Değerlendirmeler

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	p	Post Hoc
	Ortalama±standart sapma (Medyan)	Ortalama±standart sapma (Medyan)	Ortalama±standart sapma (Medyan)		
+Trombosit Sayısı (x10⁹/L)	50,18±46,82 (31,5)	36,20±37,43 (13)	283,95±66,74 (295)	0,001**	III>I, II**
+ % RT	31,24±18,85 (21,7)	38,28±26,18 (36,2)	3,84±1,96 (3,2)	0,001**	III<I, II**
+Mutlak RT sayısı (x10⁹/L)	10,33±7,72 (9,5)	6,83±5,01 (7,5)	10,89±6,25 (8,5)	0,143	
++MPV	10,74±1,89	10,27±2,04	8,72±1,04	0,002**	III<I**, II*

*Kruskal Wallis Test ve post hoc değerlendirmelerde Mann Whitney U test kullanıldı

**Oneway ANOVA Test ve post hoc değerlendirmelerde Tukey HSD test kullanıldı

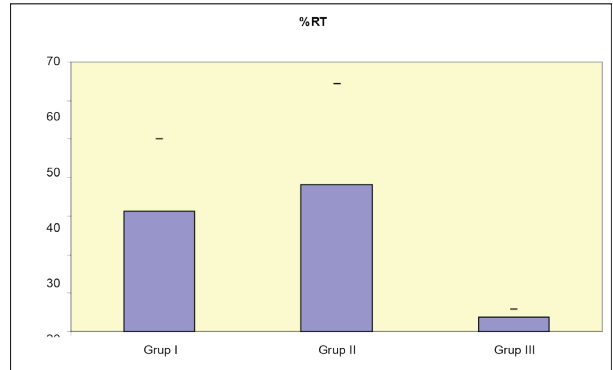
*p<0,05, **p<0,01

malarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktaydı (p:0,008) (Tablo 3).

Cinsiyet dağılımına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktaydı. Grup 2'de erkek olgu oranı yüksekken, Grup 1 ve Grup 3'te kadın olgu oranı anlamlı şekilde yüksekti (p:0,017) (Tablo 2,3).

Olguların trombosit sayılarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktaydı. Grup 3'teki olguların trombosit sayıları, Grup 1 (p:0,001) ve Grup 2'deki (p:0,001) olguların trombosit sayılarından anlamlı şekilde yüksekti. Grup 1 ve Grup 2'deki olguların trombosit sayıları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktaydı (Tablo 4).

Olguların %RT düzeylerine göre gruplar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktaydı. Grup 3'teki olguların %RT düzeyleri, Grup 1 (p:0,001) ve Grup 2'deki (p:0,001) olguların %RT düzeylerinden anlamlı şekilde düşüktü. Grup 2'deki olguların ortalama %RT düzeyleri Grup 1'deki olgulara göre daha yüksek bulunmasına karşın, olguların %RT düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktaydı. Mutlak RT sayısına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktaydı (Tablo 4, Şekil 1).



Şekil 1: Gruplara göre % RT dağılımı.

Olguların MPV düzeylerine göre gruplar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktaydı (p:0,002). Grup 3'teki olguların MPV düzeyleri, Grup 1 ve Grup 2'deki olguların MPV düzeylerinden anlamlı şekilde düşüktü. Grup 1 ve Grup 2'deki olguların MPV düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktaydı (Tablo 4).

Kadın olguların trombosit sayıları, erkeklerin trombosit sayılarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti (p:0,026). Kadın olguların %RT düzeyleri, erkeklerin %RT düzeylerinden daha düşük olmakla birlikte, bu farklılık

Tablo 5: Cinsiyete Göre Trombosit Sayısı ve % RT Değerlendirilmesi

	Kadın Ortalama±Standart Sapma (Medyan)	Erkek Ortalama±Standart Sapma (Medyan)	p
Trombosit Sayısı (x10⁹/L)	160,03±130,47 (103)	89,00±117,69 (16,5)	0,026*
% RT	18,07±20,73 (11,1)	32,40±25,89 (35,3)	0,068

*Mann Whitney U Test, *p<0,05

anlamlılığa yakın ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo 5). Yaş ile trombosit sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı. Yaş ile % RT düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada tam kanda TO ve CD61 MoAb kullanılarak akım sitometrik yöntemle RT yüzde ve mutlak sayısı, sağlıklı kontroller (Grup 3), yeni tanı konan İTP'li hastalar (Grup 2) ve refrakter İTP'li hastalarda (Grup 1) ölçüldü. Gruplar arasında trombosit sayısı, MPV, yaş ve cinsiyet değerleri ve bu değerlerin RT yüzde ve mutlak sayısı ile ilişkisi incelendi.

Grupların yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu (p<0,05). Grup 1'deki olguların çalışma sırasındaki yaş ortalamaları Grup 2'deki olgulardan anlamlı derecede yüksekti. Refrakter hastalardan oluşan Grup 1'deki olguların hastalık yaşlarının yüksek olmasının (5-37yıl, median 18,5 yıl) iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı yaş farkının bulunmasına sebep olduğu düşünüldü. Bu gruptaki hastaların tanı sırasındaki yaşları ile Grup 2'deki olgu yaşları karşılaştırıldığında arada anlamlı bir fark olmadığı görüldü.

Olgularımızda cinsiyetler açısından fark gözlemlendi. Grup 2'de erkek olgu oranı yüksekken Grup 1 ve Grup 3'te kadın olgu oranı anlamlı şekilde yüksekti. Grup 1'deki hastalar refrakter seyirli hastalığı olan hastalar olup bu grupta kadın oranı literatürde bildirilene uygun olarak fazla idi (22). Grup 2'deki hastalar içinde akut İTP tanısı konan hasta sayısı daha fazla olup bu grupta erkek hasta oranı Grup 1'den daha fazla bulundu.

Gruplar arası trombosit sayıları karşılaştırıldığında sağlıklı kontrol grubu olan Grup 3'teki olguların trombosit sayılarının Grup 1 ve Grup 2'deki olguların trombosit sayılarından anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi (p<0,01).

Tam kanda TO kullanılarak akım sitometrik yöntemle retikülotrombosit sayımını ilk gerçekleştirenler Kienast ve Schmitz'dir. Azalmış trombosit üretimi olan trombositopenik hastalarda ve trombositozu olan hastalarda RT oranının artmadığını göstermişlerdir. Bu bulgular ile RT'lerin, trombosit üretimi arttığında artan, azaldığında ise azalan, yeni üretilen trombositleri gösterdiği ve trombopoezin hızı ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Yaptıkları çalışmada

sağlıklı kişilerde %RT oranını %8,6±%2,8 olarak bulmuşlardır (8). Daha sonra bir çok araştırmacı ölçümü tekrarlamıştır. Monteagudo ve arkadaşlarına ait çalışmada, trombositopeniler normal veya azalmış trombopoetik aktiviteli ve artmış trombopoetik aktiviteli olarak ayrılmıştır. Akut veya kronik lenfoproliferatif hastalıklar, multipl myelom, akut lösemi, aplastik anemi ve kemik iliğinin solid organ tümörleri ile invazyonunda trombopoetik aktivite azalmış veya normaldir; İTP, dissemine intravasküler koagülasyonda (DİK) ise artmıştır. Kontrol grubu normal trombosit sayısına sahip sağlıklı erişkinler ve trombositozu olan erişkinler ile oluşturulmuştur. Trombopoetik aktivitesi artmış grupta RT oranı istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Seri ölçümlerde İTP'li hastalarda iyileşme sırasında trombosit sayısı arttıkça TO pozitif RT yüzdesinin hızla azalarak normale döndüğü gözlenmiştir. %RT Monteagudo ve ark. tarafından %1,33 (%1,12-1,54) olarak bulunmuştur (7). Hacıhanefioğlu tarafından %3,85±1,99, Chavda ve ark. tarafından %11,61 (%3,19-20,01), Abe ve ark. tarafından kadınlarda %0,48±%0,32, erkeklerde %0,48± %0,26, Salvagno ve ark. tarafından %6,13±%3,09 ve Briggs ve ark. tarafından %3,4 (%1,1-6,1) bulunmuştur (9,11,23-25).

Çalışmamızda sağlıklı kontrollerde %RT %3,84±1,96 (median:%3,2) bulundu. Bu değer yukarıda belirtilen çalışmalar ile benzerdi.

Kienast ve Schmitz'in çalışmasında İTP'li hastalarda %RT %27,1±%11,1 olarak bulunmuştur (8). Chavda ve ark. %23,5±%13,04, Monteagudo ve ark. %33,13 (%26,44-39,82), Thomas-Kaskel ve ark. %23 (%5-58) bulmuştur (7,9,15). Hacıhanefioğlu'nun çalışmasında kemik iliğinde normal veya artmış megakaryosit bulunan 24 İTP'li ve 3 hipersplenizmi hastada %RT %16,93±%12,3 bulunmuştur (23). Salvagno ve ark. ve Briggs ve ark. çalışmalarında %RT oranının sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğunu saptamışlardır (11,25).

Çalışmamızda %RT Grup 1'de %31,24±%18,85 (median %21,7), Grup 2'de %38,28±%26,18 (median %36,2) bulundu. Grup 1 ve Grup 2'nin %RT oranları kontrol grubu olan Grup 3'e göre anlamlı olarak yüksekti (p<0,01). Bu sonuçlar daha önce bildirilen çalışmalarla uyumlu bulundu.

Mutlak RT hastanın trombosit sayısı X %RT formülü ile bulunur. Chavda ve ark. çalışmasında İTP'de mutlak RT normal kontrollerden hafifçe az bulunmuştur (9).

Çalışmamızda mutlak RT sayısına göre gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadı.

İTP'li hastalarda MPV hakkında çatışmalı sonuçlar vardır Salvagno ve ark.'nın çalışmasında İTP'li hastada MPV sağlıklı kontrollere göre daha yüksek bulunmuştur ve %RT ile MPV arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (11). Kienast ve Schmitz'in çalışmasında da %RT ve MPV ilişkili bulunmuştur (8). Hacıhanefioğlu'nun çalışmasında %RT değeri ve MPV arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır (23). Çalışmamızda Grup 1'de ortalama MPV $10,74 \pm 1,89$ fL, Grup 2'de $10,27 \pm 2,04$ fL ve Grup 3'te $8,72 \pm 1,04$ fL bulunmuştur. Grup 3'teki olguların MPV düzeyleri Grup 1 ($p:0,002$) ve Grup 2'deki ($p:0,024$) olguların MPV değerlerinden anlamlı olarak düşüktü.

Çalışmamızda daha önce bildirilen çalışmalarla uyumlu olacak şekilde %RT ile yaş ve cinsiyet arasında ilişki bulunmamıştır (8,23).

Retikülotrombositler kemik iliğindeki tromboetik aktivite ile ilişkilidir. Thomas-Kaskel ve arkadaşlarının 2007 senesinde yaptığı çalışmada RT oranının %15'in üzerinde olduğu İTP'li hastalarda steroid veya splenektomi ile yapılan tedaviye majör cevap gözlenirken, RT oranının %15'in altında olduğu hastalarda minör cevap görüldüğü ya da tedaviye cevapsız kaldıkları gözlenmiştir (15). Çeşitli yayınlarda, İTP seyri sırasında trombopetik aktiviteye göre %RT ölçümlerinin değişim göstermesi, %RT ölçümünün tedavi yanıtı ile ilişkili olabileceği düşüncesini oluşturmuştur (8,24,25).

Bu çalışmada, İTP'li hastalarda %RT düzeyinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu bulgu daha önceki çalışmalar ile uygunluk göstermektedir.

Grup 1 olarak gösterilen refrakter İTP'li hastalar ile Grup 2 olarak belirtilen yeni tanı konan İTP'li hastaların %RT düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmadı. Grup 1'deki 16 hasta steroid, splenektomi ve üçüncül tedavilerden en az birini kullanmıştır. Refrakter hastaların şimdiye dek uygulanan tüm tedavilere dirençli oldukları halde %RT düzeylerinin yüksek seyrettiği ve yeni tanıli hastalarımız ile aralarında istatistiksel anlamlı fark olmadığı bulunmuştur.

Refrakter hastalarda birçok değişik tedaviye dirence rağmen %RT düzeyinin yüksek seyretmesi İTP tedavisine devam etme endikasyonu olarak yorumlandı. İdiyopatik trombositopenik purpura nedeniyle tedavi gören hastalarda tedavi cevabı değerlendirilirken trombosit sayısının en az $6 \times 10^9/l$ 'nin üzerinde olması majör cevap olarak kabul edilmektedir. Minör cevap, trombosit sayısının 6 aydan kısa süre $50 \times 10^9/l$ 'nin üzerinde olması ya da en az 3 ay süre ile $30-50 \times 10^9/l$ arasında bulunmasıdır (15). Trombosit sayısının $100 \times 10^9/l$ 'nin üzerinde olması tam remisyon olarak adlandırılmaktadır. Bu hastalarda retiküle trombosit oranı normal bulunmaktadır (24). Bu nedenle, %RT İTP tanısı ve iyileşme fazını belirlemede önemlidir. Ancak, çalışmamızın

sonuçlarına göre, hastalığın refrakter olacağını tedavi öncesi %RT ölçümü ile tanımak mümkün gözükmemektedir.

Bir çok çalışmada %RT düzeyinin kemik iliğinde artmış trombopoetik hastada yüksek bulunduğu tespit edilmiştir. Trombopoetik aktivitesi artmış hasta gruplarını kendi içlerinde karşılaştıran bir veri mevcut değildir. Bu nedenle %RT ölçümünün trombositopenik hastaya yaklaşımda ilk uygulanacak laboratuvar tetkiklerinden biri olduğu söylenilirse de (25) bu ölçüm İTP'li hastalara spesifik değildir.

Kemik iliği aktivitesini artıran durumlarda %RT oranında artma görülür ama farklı hastalıklarda yüzde oranların farklı olup olmadığını araştıran bir çalışma mevcut değildir. Daha kapsamlı çalışmalar ile İTP'li hastalarda %RT ölçümünde belli bir değer aralığının belirlenmesi ve standardize edilmesi mümkün olabilir.

Çalışmanın en önemli sınırlamaları, yeni tanı konan hastalarda tedavi seyri sırasında seri %RT ölçümleri yapılarak, aynı hastada tedavi yanıtına göre %RT değişiminin araştırılmaması ve refrakter hastaların, tanı konulduğu zamana ait %RT ölçümlerinin bulunmamasıdır.

Sonuçta, çalışmamızda refrakter İTP'li hastalar ve yeni hastalarda %RT ölçümleri yapılmıştır. Her iki grupta da %RT sağlıklı kontrollere göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Yeni ve refrakter hastalar arasında fark bulunmamıştır. Refrakter hastalarda %RT ölçümlerinin tedaviyi sürdürme kararı açısından yararlı olabileceği söylenebilir. %RT ölçümünün anlamlı olarak yüksek bulunması tedaviyi sürdürme endikasyonu oluşturmaktadır.

Retikülotrombosit yüzdesinin ölçümü, İTP'nin akut veya refrakter olmasını birbirinden ayırt edememektedir. Refrakter ve akut hastalar arasında %RT açısından bir fark görülse de istatistiki anlamlılığa ulaşmamıştır. Retikülotrombosit yüzdesinin ölçümü yeni tanı konan hastalarda trombositopeni etiyolojisini araştırmaya yönelik bir ek araştırma yöntemi olabilir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre, %RT ölçümünün klinikte trombositopeni ve İTP tetkikinden noninvazif yardımcı yöntem haline gelmesinin faydalı olacağını tahmin etmekteyiz.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulundan alınmıştır. (No. 3819)

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- M.N.; Veri Toplama- A.S.A.; Veri Analizi/Yorumlama- M.N.; Yazı Taslağı- A.S.A.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- M.N.; Son Onay ve Sorumluluk- A.S.A., M.N.; Malzeme ve Teknik Destek- A.S.A.; Süpervizyon- M.N.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma ve Proje Birimi tarafından desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the Istanbul Faculty of Medicine Ethics Committee. (No. 3819)

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- M.N.; Data Acquisition- A.S.A.; Data Analysis/Interpretation- M.N.; Drafting Manuscript- A.S.A.; Critical Revision of Manuscript- M.N.; Final Approval and Accountability- A.S.A., M.N.; Technical or Material Support- A.S.A.; Supervision- M.N.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: This study was supported by Scientific Research and Project Unit of Istanbul Medical Faculty.

KAYNAKLAR

1. Stevens W, Koene H, Zwazinga JJ, Vreugdenhil G. Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: present strategy, guidelines and new insights. *Neth J Med* 2006;64(10):356-63.
2. Cines DB, Blanchette VS. Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 2002;346(13):995-1008. [CrossRef]
3. McMillan R, Wang L, Tomer A, Nichol J, Pistollo J. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood* 2004;103(4):1364-9. [CrossRef]
4. British Committee for Standards in Haematology General Haematology Task Force. Guidelines in the investigation and management of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults, children and in pregnancy. *Br J Haematol* 2003;120(4):574-96. [CrossRef]
5. Provan D, Stasi R, Newland AC, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood* 2010;115(2):168-86. [CrossRef]
6. Jubelirer SJ, Harpold R. The role of the bone marrow examination in the diagnosis of immune thrombocytopenic purpura: case series and literature review. *Clin Appl Thromb Hemost* 2002;8(1):73-6. [CrossRef]
7. Monteagudo M, Amengual MJ, Munoz L, Soler JN, Roig I, Tolosa C. Reticulated platelets as a screening test to identify thrombocytopenia aetiology. *QJM* 2008;101(7):549-55. [CrossRef]
8. Kienast J, Schmitz G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood* 1990;75(1):116-21.
9. Chavda N, Mackie IJ, Porter JB, Harrison P, Patterson K, Machin SJ. Rapid flow cytometric quantitation of reticulated platelets in whole blood. *Platelets*. 1996;7(4):189-94. [CrossRef]
10. Harrison P, Robinson MSC, Mackie IJ, Machin SJ. Reticulated platelets. *Platelets* 1997;8(6):379-83. [CrossRef]
11. Salvagno GL, Montagnana M, Degan M, Marradi PL, Ricetti MM, Riolfi P, Poli G, Minuz P, Santonastaso CL, Guidi GC. Evaluation of platelet turnover by flow cytometry. *Platelets* 2006;17(3):170-7. [CrossRef]
12. Ingram M, Coopersmith A. Reticulated platelets following acute blood loss. *Br J Haematol* 1969;17(3):225-9. [CrossRef]
13. Van Karaij MGJ, Kok KF, Penings A, Verbruggen HW, Novakova IRO. Higher reticulated platelet counts and enhanced expression of P-selectin in patients with immune thrombocytopenic purpura compared to patients with myelodysplastic syndromes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2003;1(suppl 1):12-8.
14. Saxon BR, Blanchette VS, Butchart S, Lim-Yin J, Poon AO. Reticulated platelet counts in the diagnosis of acute immune thrombocytopenic purpura. *J Ped Hematol Oncol* 1998;20(1):44-8. [CrossRef]
15. Thomas-Kaskel AK, Mattern D, Köhler G, Finke J, Behringer D. Reticulated platelet counts correlate with treatment response in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and help identify the complex causes of thrombocytopenia in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72(4):241-8. [CrossRef]
16. Portielle JEA, Westendorp RGJ, Kluin-Nelemans HC, Brand A. Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2001;97(9):2549-54. [CrossRef]
17. Cohen YC, Djulbegovic B, Shama-Lubovitz O, Mozes B. The bleeding risk and natural history of idiopathic thrombocytopenic purpura in patients with persistent low platelet counts. *Arch Intern Med* 2000;160(11):1630-8. [CrossRef]
18. Diagnosis and treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura: recommendations of the American Society of Hematology. *Ann Intern Med* 1997;126(4):319-26. [CrossRef]
19. Blanchette V, Freedman J, Garry B. Management of chronic immune thrombocytopenic purpura in children and adults. *Semin Hematol* 1998;35(1 suppl 1):36-51.
20. George JN, Woolf SH, Raskob GE, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a guideline developed by explicit methods for the American Society of Haematology. *Blood*. 1996;88(1):3-40.
21. Stasi R, Provan D. Management of immune thrombocytopenic purpura in adults. *Mayo Clinic Proc* 2004;79(4):504-22. [CrossRef]
22. Thienett CD, Calverley DC. Thrombocytopenia Caused by Immunologic Platelet Destruction. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 12th ed. Lippincott Williams&Wilkins;2009:1749-83.
23. Hachanefioğlu A. Trombositopenili hastalarda trombopoezi değerlendirmede flow-sitometrik yöntemle TO+ (retikülotrombosit) sayımlarının yeri. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı. 1999.
24. Abe Y, Wada H, Sakakura M, Nishioka J, Tomatsu H, Hamaguchi Y, Oguni S, Shiku H, Nobori T. Usefulness of Fully Automated Measurement of Reticulated Platelets Using Whole Blood. *Clin Appl Thromb Hemost* 2005;11(3):263-70. [CrossRef]
25. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2004;126(1):93-9. [CrossRef]