



T.C.

BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKULTESİ HASTANESİ

İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Beta Talesemi Minörde Trombosit Aktivasyon Markerları

Dr. Rabia BAĞ SOYTAŞ

(Uzmanlık Tezi)

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. MEHMET ALİ ÇIKRIKÇIOĞLU

İSTANBUL 2014



T.C.

BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKULTESİ HASTANESİ

İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Beta Talesemi Minörde Trombosit
Aktivasyon Markerları

Dr. Rabia BAĞ SOYTAŞ

(Uzmanlık Tezi)

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. MEHMET ALİ ÇIKRIKÇIOĞLU

İSTANBUL 2014

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca engin bilgi ve deneyimleriyle bize yol gösteren tüm hocalarıma, başta anabilim dalı başkanımız olan son derece alçakgönüllü, asistanlığımız sürecinde bize her anlamda destek olan saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Reha ERKOÇ'a, eğitimimize çok büyük katkı sağlayan ve idealistliğiyle bizlere çok iyi örnek teşkil eden Sayın Prof. Dr. Rumeysa KAZANCIOĞLU hocama, tezime olan katkılarından dolayı Sayın Doç. Dr. Mehmet Ali ÇIKRIKÇIOĞLU hocama, bizden hiçbir zaman yardımlarını eksik etmeyen Doç. Dr. Özcan Karaman, Yrd. Doç. Dr. Güven ÇETİN, Prof. Dr. Ertuğrul TAŞAN, Prof. Dr. Hakan ŞENTÜRK, Prof. Dr. Ahmet DANALIOĞLU, Prof. Dr. Kürşad TÜRKOĞAN, Doç. Dr. Ali Tüzün İNCE, Doç. Dr. Orhan KOCAMAN, Prof. Dr. Hacı Mehmet TÜRK, Prof. Dr. Mahmut GÜMÜŞ hocalarıma sonsuz teşekkür ederim.

Yine tüm asistanlık eğitimim boyunca bana birer uzmandan çok ağabeylik ve ablalık eden yan dal asistanlarımız olan Dr. Ruhper ÇEKİN, Dr. Murat ALAY, Dr. Mahmut Muzaffer İLHAN, Dr. Mukaddes TOZLU ve Dr. Yusuf KAYAR'a, asistanlık sürecimi güzelleştiren sevgili asistan arkadaşlarıma tüm yardımları için çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca her zaman yanımda olan, uzakta olsalar da varlıklarını her zaman yanımda hissettiğim ve sevgileriyle güç bulduğum, mutlu olmam için ellerinden gelen her şeyi sonuna kadar yapan canım ailem; annem Münevver BAĞ'a, babam Yunus BAĞ'a, onlar gibi bir abim ve ablam olduğu için kendimi hep çok şanslı hissettiğim abim Enver Şerif BAĞ ve ablam Gamze ALTUNBULAT'a sonsuz teşekkürler.

Sadece iyi günlerimde değil her zor anımda da yanımda olan, kendime güvenmemi sağlayan, sevgisiyle ayakta durduğum ve her zaman olduğu gibi tezimi hazırlama sürecinde de desteklerini benden esirgemeyen sevgili eşim, hayat arkadaşım Mustafa SOYTAŞ'a çok teşekkür ederim.

Dr. Rabia BAĞ SOYTAŞ

BETA TALASEMİ MİNÖRDE TROMBOSİT AKTİVASYON MARKERLARI

ÖZET

Giriş-Amaç: Beta talasemi minörde (BTM) serebrovasküler ve kardiyovasküler iskemik olayların normal popülasyona göre daha seyrek görüldüğü tespit edilmiştir. Bunun sebebi tam olarak bilinmemektedir. Hatta bazı BTM’li hastalarda hemorajik eğilim olduğu gösterilmiştir. Bu hastaların in vitro ortamda bakılan trombosit agregasyon testlerinde azalmış trombosit fonksiyonları tespit edilmiştir. Buna dayanarak BTM’lilerde trombositlerin defektif (hipoaktif) olabileceğini bu yüzden serebrovasküler ve kardiyovasküler iskemik olayların daha seyrek görülebileceğini düşündük. Bu nedenle beta tromboglobulin (BTG), platelet faktör 4 (PF4), soluble P selektin (sPS) ve soluble CD40 ligand (sCD40L) kan düzeyini araştırdık.

Materyal-Metod: BTM hastalarından uygun olan ve gönüllü olan 37 kişi ile; yaş, cinsiyet ve vücut kitle indeksi (VKİ) bakımından benzer olan 41 kişiden oluşan kontrol grubunun karşılaştırıldığı kesitsel bir çalışma yapıldı. Bu gruplar komorbiditeler, sigara ve ilaç kullanımını açısından da karşılaştırıldı. Platelet aktivasyon markerlarını etkilediği bilinen ve etkileyebilecek olan komorbiditeler (esansiyel hipertansiyon ve tip 2 diyabetes mellitus hariç) ve ilaç kullanımları çalışmanın dışlama kriteri olarak değerlendirildi.

Bulgular: Serum sCD40L ve sPS düzeyleri BTM grubunda anlamlı olarak düşük saptandı (p:0.009, p:0.010). BTG ve PF4 ise her iki grupta benzer olarak tespit edildi (p:0.497, p:0.507). Gruplar cinsiyet, yaş, VKİ, serum lipid profili, sigara kullanımı, Tip 2 DM, esansiyel hipertansiyon ve kullanılan ilaç cinsi ve sıklığı açısından da benzer olarak saptandı.

Sonuç: Aterotrombozla ilişkisi BTG ve PF4’ten daha güçlü olduğu bilinen sCD40L ve sPS düzeylerinin BTM’li hasta grubunda daha düşük saptanması; BTM’li hastaların hipoaktif trombositlere sahip olmalarını destekleyebilir. Bu hipoaktif trombositler de serebrovasküler ve kardiyovasküler iskemik olayların BTM’li hastalarda genel popülasyona göre daha seyrek görülmesinin sebeplerinden biri olabilir.

Anahtar sözcükler: sP-Selektin, sCD40 Ligand, Beta Tromboglobulin, Platelet Faktör 4, Beta Talasemi Minör, Serebrovasküler İskemik Olay, Kardiyovasküler İskemik Olay

PLATELET ACTIVATION MARKERS IN BETA THALASSEMIA TRAIT

ABSTRACT

Background-Aim: Cerebro-vascular and cardio-vascular ischemic events are less frequently observed in patients with beta thalassemia trait (BTT) compared to general population. The reason of this is unknown. Hemorrhagic tendency in some BTT patients was reported. Reduced platelet aggregation response has been observed with *in vitro* platelet aggregation tests in these patients. On this basis, we considered that platelets of individuals with BTT could be defective or less active, resulting in less cerebral and cardiac ischemic events. We investigated blood levels of soluble CD40 ligand (sCD40L), soluble p-selectin (sPS), beta-thromboglobulin (BT), Platelet factor 4 (PF4) in BTT patients.

Method: Thirty-seven patients with BTT were compared with 41 gender-, age-, and BMI-matched controls for platelet activation markers in a cross-sectional design. The groups were also compared for comorbidities, smoking, and regular medications. Comorbidities (except essential hypertension and diabetes mellitus) and medications which affect or likely to affect platelet activation markers were considered as causes of exclusion.

Results: sCD40L and sPS were lower in the BTT group ($p=0.009$, $p=0.010$, respectively). BT and PF4 were comparable between the groups ($p=0.497$, $p=0.507$, respectively). Groups were similar in terms of gender, age, BMI, serum lipid profile, frequency of smoking, diabetes mellitus, essential hypertension, and medications used regularly.

Conclusion: Lower levels of sCD40L and sPS, for which a stronger relationship with atherothrombosis than BT and PF4 has been demonstrated, in BTT patients may suggest reduced platelet functions in BTT, which may be associated with lower incidence of cerebral and cardiac ischemic events in BTT patients.

Key words: sP-Selectin, sCD40 Ligand, Beta Thromboglobulin, Platelet Factor 4, Beta Thalassemia Trait, Cerebrovascular Ischemic Event, Cardiovascular Ischemic Event

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa No:</u> |
|---|------------------|
| TEŞEKKÜR | I |
| ÖZET | II |
| İNGİLİZCE ÖZET | III |
| İÇİNDEKİLER | IV |
| TABLolar LİSTESİ | VI |
| ŞEKİLLER LİSTESİ | VII |
| KISALTMALAR | VIII |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. HEMOGLOBİN YAPISI VE SENTEZİ..... | 3 |
| 2.1.1. Hem Yapısı..... | 3 |
| 2.1.2. Globin Yapısı..... | 4 |
| 2.2. TALASEMİ SENDROMLARI | 6 |
| 2.2.1. Alfa Talasemi | 6 |
| 2.2.2. Beta Talasemi | 7 |
| 2.2.2.1. Beta Talasemi Minör | 9 |
| 2.3. TROMBOSİTLER | 10 |
| 2.3.1. Trombositlerin Yapısal Bölümleri | 10 |
| 2.3.1.1. Periferik Bölge | 10 |
| 2.3.1.2. Sol Jel Bölgesi | 11 |
| 2.3.1.3. Organel Bölgesi..... | 11 |
| 2.3.2. Trombosit Fonksiyonları..... | 12 |
| 2.3.3. Trombosit Aktivasyon Markerları..... | 18 |
| 2.3.3.1. Platelet Faktör 4..... | 18 |
| 2.3.3.2. Beta Tromboglobulin..... | 18 |

| | |
|---|----|
| 2.3.3.3. Serum Soluble CD40 ligand | 19 |
| 2.3.3.4. Serum Soluble P-Selektin..... | 23 |
| 2.3.3.5 Ortalama Trombosit Hacmi (MPV)..... | 24 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 26 |
| 4. BULGULAR..... | 29 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 34 |
| KAYNAKLAR..... | 39 |



TABLolar LİSTESİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|------------------------|
| Tablo 2.1. İnsan hemoglobinlerindeki globin zincirleri..... | 5 |
| Tablo 2.2. Beta talasemide eritrosit indeksi deęiřimi..... | 8 |
| Tablo 2.3. Beta talasemide hemoglobin düzeyleri | 8 |
| Tablo 2.4: Trombosit Granülleri ve İçerikleri..... | 11 |
| Tablo 2.5: Ortalama Trombosit Hacmini Arttıran ve Azaltan Durumlar..... | 25 |
| Tablo 4.1: Gruplara göre cinsiyet dağılımı..... | 29 |
| Tablo 4.2: Gruplara göre yaş dağılımı..... | 29 |
| Tablo 4.3: Grupların Vücut Kitle İndeksinin Karşılaştırılması..... | 30 |
| Tablo 4.4: Hemogram için BTM ve kontrol grubu..... | 30 |
| Tablo 4.5: sCD40L için BTM ve kontrol grubu..... | 31 |
| Tablo 4.6: sPS için BTM ve kontrol grubu..... | 31 |
| Tablo 4.7: Beta tromboglobulin için BTM ve kontrol grubu..... | 31 |
| Tablo 4.8: Platelet faktör 4 için BTM ve kontrol grubu..... | 32 |
| Tablo 4.9: Sigara içenler ve sigarayı bırakanlar için BTM ve kontrol grubu..... | 32 |
| Tablo 4.10: Esansiyel hipertansiyon için BTM ve kontrol grubu..... | 32 |
| Tablo 4.11: Tip 2 Diyabetes Mellitus için BTM ve kontrol grubu..... | 33 |
| Tablo 4.12: Kullanılan ilaçlar için BTM ve kontrol grubu..... | 33 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| Şekil 2.1. Hemoglobin A yapısı..... | 3 |
| Şekil 2.2. Hem molekülü yapısı..... | 4 |
| Şekil 2.3. Globin sentezi..... | 5 |
| Şekil 2.4. Globin gen kümeleri..... | 6 |
| Şekil 2.5. Periferik yaymada talasemik eritrositlerin..... | 8 |
| Şekil 2.6: Trombosit Aktivasyonu..... | 14 |
| Şekil 2.7: Trombositlerde Granül Sekresyonu..... | 16 |
| Şekil 2.8: İnsan CD40 modeli..... | 19 |
| Şekil 2.9: CD40- CD40 L etkileşimi..... | 20 |

KISALTMALAR

| | |
|---------------|--|
| AA | : Araşidonik asit |
| ADP | : Adenozin difosfat |
| AGE | : İleri glikozilasyon son ürünleri |
| AMI | : Akut myokard infarktüs |
| BTG | : Beta tromboglobulin |
| BTM | : Beta talesemi minör |
| DAG | : Diaçil gliserol |
| DIC | : Dissemine intravasküler koagülasyon |
| GP | : Glikoprotein |
| HPLC | : Yüksek performanslı lipid kromatografi |
| ICAM-I | : İnterselüler Adezyon Molekülü-I |
| IP3 | : İnozitol trifosfat |
| KDa | : Kilodalton |
| LA-PF4 | : Afinitesi düşük platelet faktör 4 |
| MCH | : Ortalama korpuskular hemoglobin |
| MCV | : Ortalama korpuskular hacim |
| MPV | : Ortalama Trombosit Hacmi |
| PAF | : Trombosit aktive edici faktör |
| PDW | : Trombosit dağılım aralığı |
| PF-4 | : Platelet faktör 4 |
| PGI2 | : Prostaglandin |
| PPi | : İnorganik pirofosfat |
| PTKA | : Perkütan Translüminal Koroner Anjiyoplasti |
| RA | : Romatoid artrit |
| RDW | : Kırmızı kan hücre dağılım aralığı |
| sCD40L | : Soluble CD40 ligand |
| sPS | : Soluble P selektin |
| SLE | : Sistemik Lupus Eritamatosuz |
| TF | : Doku faktörü |
| TNF | : Tümör nekrozis faktör |
| TxA2 | : Tromboksan A2 |

| | |
|---------------|-------------------------------------|
| VKİ | : Vücut kitle indeksi |
| VCAM-I | : Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-I |
| VEGF | : Vasküler endotelyal growth faktör |
| vWF | : von Willebrand faktör |
| WHO | : Dünya sağlık örgütü |



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Beta Talasemi Minör (BTM), hemoglobinin yapısındaki beta globülin zincirinin yapım azlığına bağlı bozulmuş hemoglobin yapısından kaynaklanan hipokromik mikrositer eritrosit indeksleri ile karşımıza çıkan kronik hemolitik bir anemidir. Yapılan çalışmalarda BTM hastalarında bazı hastalıkların insidansının arttığı, bazı hastalıkların insidansının ise azaldığı gösterilmiştir (1). Doğum defektleri, gestasyonel diyabet, diyabetes mellitus tip 2, renal hastalıklar(renal tübüler defektler ve glomerüler hastalıklar), astım bronşiale, osteoporoz, depresyon ve fibromyalji riskinin BTM'li hastalarda arttığı gösterilmiştir (2-13). Bunların dışında BTM'li kişilerde otoimmüniteye yatkınlık olduğu gösterilmiştir (14). Örneğin; Romatoid artrit BTM prevalansı arttığı gibi, BTM'de de Romatoid Artrit insidansının normal populasyona göre arttığı gösterilmiştir (15-19). Sistemik Lupus Eritamatosuz(SLE)'un ise insidansının azaldığı ancak klinik olarak daha ağır seyrettiği bildirilmiştir (20-21). Yapılan bir meta-analizde ise BTM ve kontrol grubu karşılaştırıldığında serebrovasküler ve kardiyovasküler iskemik olayların BTM'de daha seyrek görüldüğü tespit edilmiştir (22). BTM'de niçin bazı hastalıkların daha sık görüldüğü ve niçin bazı hastalıkların daha seyrek görüldüğü tam olarak bilinmemektedir.

BTM'de serebrovasküler ve kardiyovasküler iskemik olayların daha seyrek görülmesini açıklama için bazı hipotezler ileri sürülmüştür.

- 1) Kronik hemolitik anemiden dolayı BTM'lilerde kolesterol düşüktür, bu nedenle aterosklerozis daha seyrek görülebilir.
- 2) Kan basıncı daha seyrek olarak yükselir, daha ılımlı yükselir, bu nedenle iskemik olaylar daha seyrek görülmüş olabilir.
- 3) Kan viskozitesi düşüktür bu nedenle iskemiye karşı korunmuş olabilirler.

Bu hipotezlerin hepsi geçerli olabilir. Fakat bu konuda başka bir etkenin de rol alabileceğini düşündük ve bunu kanıtlamak için çalışmamızı yapmaya karar verdik.

1978-1979 yılında yapılmış olan iki çalışmada bazı BTM'lerde hemorajik eğilim olduğu(menometroraji, kolay ekimoz oluşması, epistaksis) ve bu hastaların in vitro ortamda bakılan trombosit agregasyon testlerinde azalmış trombosit fonksiyonları tespit edilmiştir.

(23,24) Bu iki çalışmadan ilham alarak BTM'li hastalarda trombositlerin defektif (hipoaktif) olabileceğini bu yüzden serebrovasküler ve kardiyovasküler iskemik olayların daha seyrek görülebileceğini düşündük.

Hipotezimize göre BTM'lilerde genel olarak trombositler hipoaktif olabilir. Bu yüzden serebrovasküler ve kardiyovasküler iskemik olaylar genel olarak daha seyrek görülebilir. Bazı BTM'lilerde trombositlerin hipoaktivitesi daha belirgin olup kendini hemorajik eğilim olarak gösterebilir.

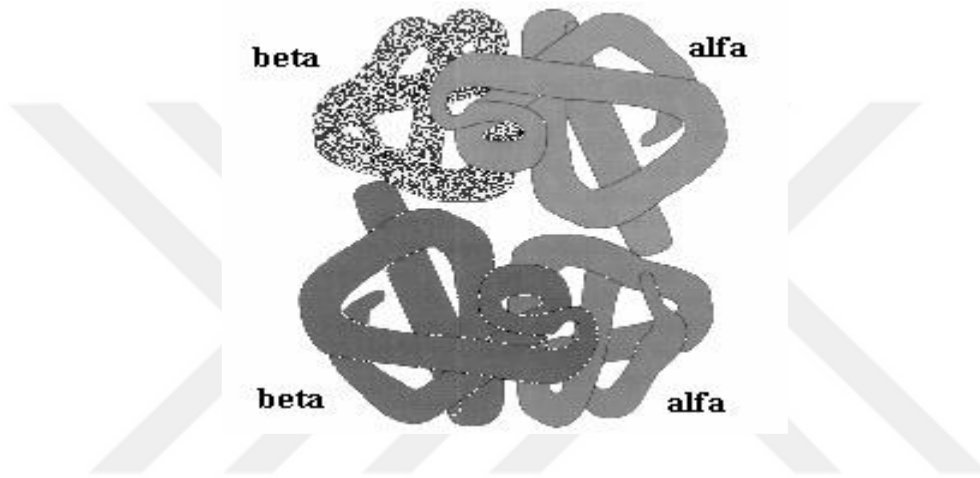
Trombositler aktive olduğu zaman çeşitli trombosit aktivasyon markerları salgılanmaktadır. Bu markerlar trombositlerin aktivasyonunu değerlendirmede kullanılmaktadır. Biz çalışmamızda bu aktivasyon markerlarından daha önceki çalışmalarda bakılıp etkinlikleri gösterilen ve çalışılmaları hem maliyet olarak hem de iş gücü olarak daha uygun olan beta tromboglobulin (BTG), platelet faktör 4 (PF4), soluble P selektin (sPS) ve soluble CD40 ligandı (sCD40L) araştırdık.

Bu çalışmada BTM'li hasta grubunda serebrovasküler ve kardiyovasküler iskemik olayların genel popülasyona göre daha seyrek görülmesinin bir sebebinin de BTM'li hastaların hipoaktif trombositlere sahip olabileceğini düşünerek, BTM'li hasta grubu ve kontrol grubu arasında trombosit aktivasyon markerlarından sCD40L, sPS, BTG ve PF4 düzeylerini karşılaştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HEMOGLOBİN YAPISI VE SENTEZİ

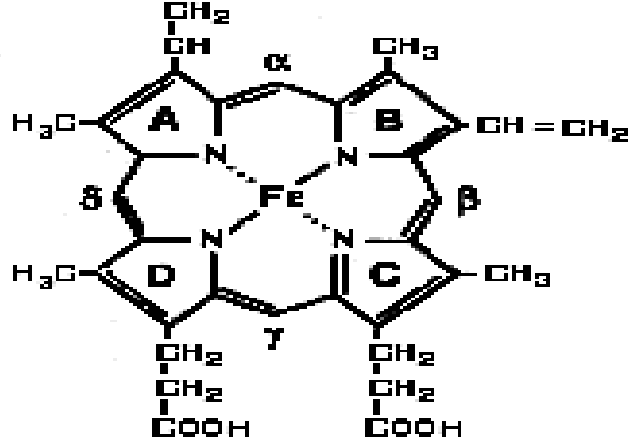
Hemoglobin eritrositlerin kırmızı rengini sağlayan ve oksijen taşıma yeteneği kazandıran bileşenidir. Protein yapısındaki hemoglobin oksijeni akciğerlerden dokulara, karbondioksiti ise dokulardan akciğerlere taşımaktadır (25). Molekül ağırlığı yaklaşık 64.500 dalton olup molekülün %96'sını globin proteini, %4'ünü de hem yapısı oluşturmaktadır (Şekil 2.1)(26).



Şekil 2.1. Hemoglobin A yapısı

2.1.1. Hem Yapısı

Hem grubu dört pirol halkasından meydana gelen protoporfirin halka sistemi ile bir demir atomundan oluşmaktadır. Meten köprüleri ile birbirine bağlanan dört pirol halkasından meydana gelen tetrapirel halkasına yan zincir olarak dört metil, iki vinil ve iki propiyonat eklenmiştir.(Şekil 2.2) Protoporfirin halkasına zincirler onbeş farklı şekilde bağlanabilmektedir. Biyolojik sistemde protoporfirin IX olarak isimlendirilen izomerinin bulunduğu belirlenmiştir (27).



Şekil 2.2. Hem molekülü yapısı

Molekülde Protoporfirin IX halkasının merkezine prostetik grup olarak demir yerleşir. Hem dönüşümlü olarak oksijenle bağlanması ancak demir ferröz (Fe^{2+}) formunda iken olur. Demir ferrik (Fe^{3+}) duruma okside olduğunda hem oksijene bağlanamaz ve methemoglobin olarak isimlendirilir. Hemoglobinin globin proteininden ayrı olarak demir serbest halde oksijene bağlanamaz (28).

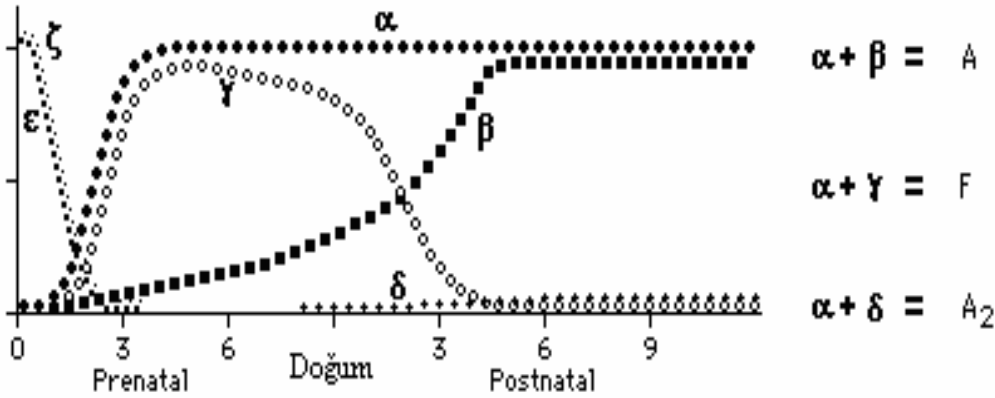
2.1.2. Globin Yapısı

İki farklı globin zinciri kombine olarak hemoglobini oluşturur. Bu zincirlerden biri alfa iken diğeri non-alfa zinciridir. Embriyogenesizin ilk haftaları dışında globin zincirlerinden biri daima alfadır (Tablo 2.1)(28).

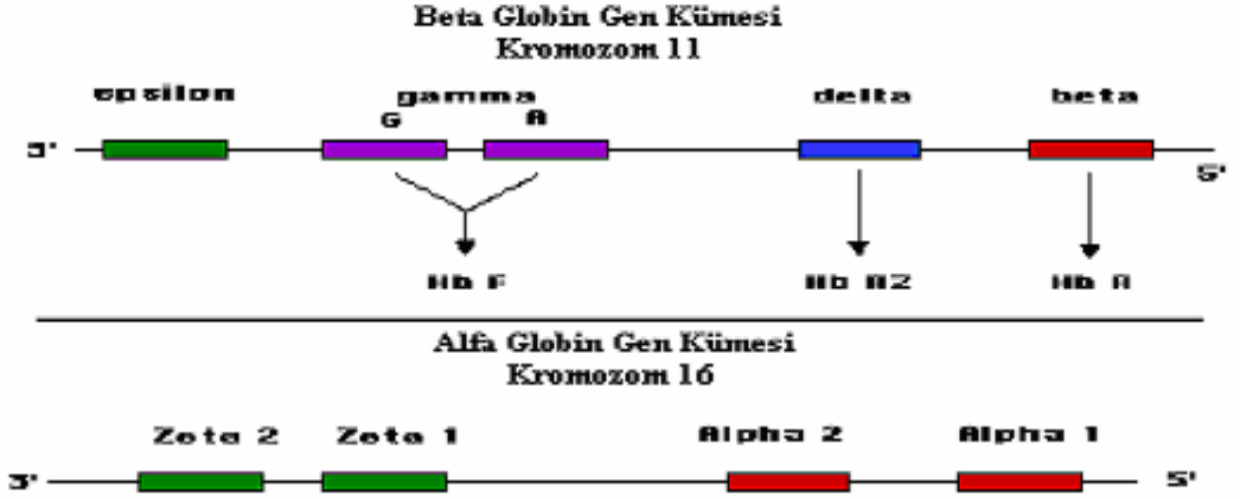
Tablo 2.1. İnsan hemoglobinlerindeki globin zincirleri (29)

| Embriyonik hemoglobinler | Fetal hemoglobin | Yetişkin hemoglobinleri |
|--|------------------------------------|--|
| gower 1- ζ_2, ϵ_2 gower 2- α_2, ϵ_2 Portland- ζ_2, γ_2 | hemoglobin F- α_2, γ_2 | hemoglobin A- α_2, β_2 hemoglobin A2- α_2, δ_2 |

Embriyoda ilk sentezlenen globin zinciri zeta (ζ) ve alfa (α) zincirine benzeyen epsilon (ϵ). Beş altı haftalık gestasyon öncesinde Hb Gower 1 (ζ_2, ϵ_2) majör hemoglobin olarak gözlenir. Hb Gower 2 (α_2, ϵ_2) 4-13 haftalar arası embriyoda gözlenir, diğer bir erken dönem hemoglobini ise Portland (ζ_2, γ_2)'dır. Hb F (α_2, γ_2) fetal hayatın major hemoglobini'dir. (Şekil 2.3) Normal erişkin hemoglobininde Hb A %97 oranındadır ve 9 haftalık fetusta gösterilebilir. Hb A2 erişkin hemoglobininin %2.5'ini oluşturur (30).

**Şekil 2.3.** Globin sentezi

Globin komponentlerini şifreleyen α benzeri genler 16. kromozomda, β benzeri genler 11. kromozomda yer alır (25). α globin gen kümesi üç fonksiyonel gen içerir; ζ geni, α_1 geni ve α_2 geni. Gen delesyonları veya zincir sentez eksikliği veya yokluğu sonucu α -talasemi oluşur. B globin gen kümesi ise ϵ geni, γ geni, δ geni ve β geni olmak üzere beş gen içerir (Şekil 2.4)(26). β globin geni, β globin zincirindeki 146 aminoasidi kodlamak için gerekli bilgiyi, 3 ekson, 2 intron ve 5', 3' düzenleyici bölgelerden oluşan yaklaşık 1.8 kb üzerinde taşımaktadır (31).



Şekil 2.4. Globin gen kümeleri

2.2. TALASEMİ SENDROMLARI

Normal bir erişkinde yapısal olarak birbirinden farklı üç hemoglobin vardır; bunlar Hb A, Hb F, ve Hb A2 dir. Talasemi bu üç farklı hemoglobinin yapısındaki dört ($\alpha, \beta, \delta, \gamma$) farklı globin zincirlerinden bir veya birden fazlasının yapım azlığı veya hiç yapılamama durumudur (32).

Talasemi ilk kez Detroitli bir çocuk hekimi olan Thomas Cooley tarafından 1925 yılında derin anemisi, dalak büyümesi, büyüme geriliği, ve kemik deformiteleri gibi benzer bulguları olan çocuklarda ayrı bir hastalık olarak tanımlanmıştır (33).

Talasemi otozomal resesif geçiş gösteren heterozigot formda taşıyıcılığa, homozigot formda hastalığa yol açan kronik hemolitik bir anemidir (34).

Talasemi sınıflandırması yetersiz globin zincir yada zincirlerine göre yapıldığında, α zincir sentezinin yokluğu yada eksikliği α -talasemi , β zincir sentezinin yokluğu yada eksikliği β -talasemi olarak adlandırılır (26).

2.2.1. Alfa Talasemi

α -Talasemide en sık rastlanılan patoloji gen delesyonudur. Dört α geninden bir tanesi delesyona uğradığında α^+ -talasemi, (sessiz talasemi veya α - talasemi-2), iki α geni delesyona uğradığında α^0 -talasemi (α -talasemi taşıyıcılığı veya α -talasemi-1) adı verilen taşıyıcılık, üç α -

geni delesyona uğradığında ise Hb H (β 4) hastalığı adı verilen hastalık ortaya çıkar. Hb Bart's (γ 4) (hidrops fetalis) ise dört α -geni de delesyona uğramıştır, bu durumda intra uterin tedavi yapılmazsa fetal ölüm veya doğumu takiben 1-2 dakika içinde bebek ölümü gerçekleşir (32,35,36).

2.2.2. Beta Talasemi

11. kromozomdaki β geninde çeşitli ve çok sayıda genetik mutasyonlar sonucu, β globin zincir yapısının azalması veya hiç yapılmaması ile β -talasemi hastalığı ortaya çıkmaktadır.

β -talaseminin en önemli nedenini, α -talasemide görülen büyük delesyonlar değil gen içindeki nokta mutasyonları oluşturmaktadır. Bugüne kadar β -talasemi'ye neden olan 200'den fazla nokta mutasyon belirlenmiştir. IVS-1-110 Türkiye'de en sıklıkla rastlanan β talasemi mutasyonudur (%40) (37).

β talasemi klinik durum göz önüne alınarak sınıflandırıldığında major klinik bulguları ve derin anemisi olan hastalar **talasemi major**, anemisi düzenli transfüzyon gerektirmeyen hastalar **talasemi intermedia**, anormal eritrosit morfolojisi olmasına rağmen anemisi olmayan veya çok az olan hastalar **talasemi minör**, talasemi geni taşımasına rağmen anormal eritrosit morfolojisi göstermeyen hastalar da **talasemi minima** olarak sınıflandırılır (26).

β globin zincirinin eksikliği veya yokluğuyla gama ve delta zinciri artışı HbA2 ve HbF artmasına neden olmaktadır. (Şekil 2.5) β -talasemi'li hastalarda inutero γ globin sentezi yeterli olduğu için β globin sentezindeki defekt HbA'nın HbF ile yer değiştirmesi gereken dönemde başlar. Klinik bulguların yaşamın ilk birkaç ayında görülmemesinin nedeni budur (34).

β -talasemide anemi, periferik sirkülasyondaki eritrositlerin inefektif eritropoesisi ve prematür hemolizinin kombinasyonundan kaynaklanmaktadır.

Hastalığı ağırlaştıran ikinci ve daha önemli olay ise β globin zinciri eksikliğinedeniyle eşlenmemiş fazla α globin subünitelerinin birikip, çökmesi eritrosit membran ve organellerinde geri dönüşümsüz harabiyete neden olup, eritrositlerin dalakta yıkımını arttırmaktadır.

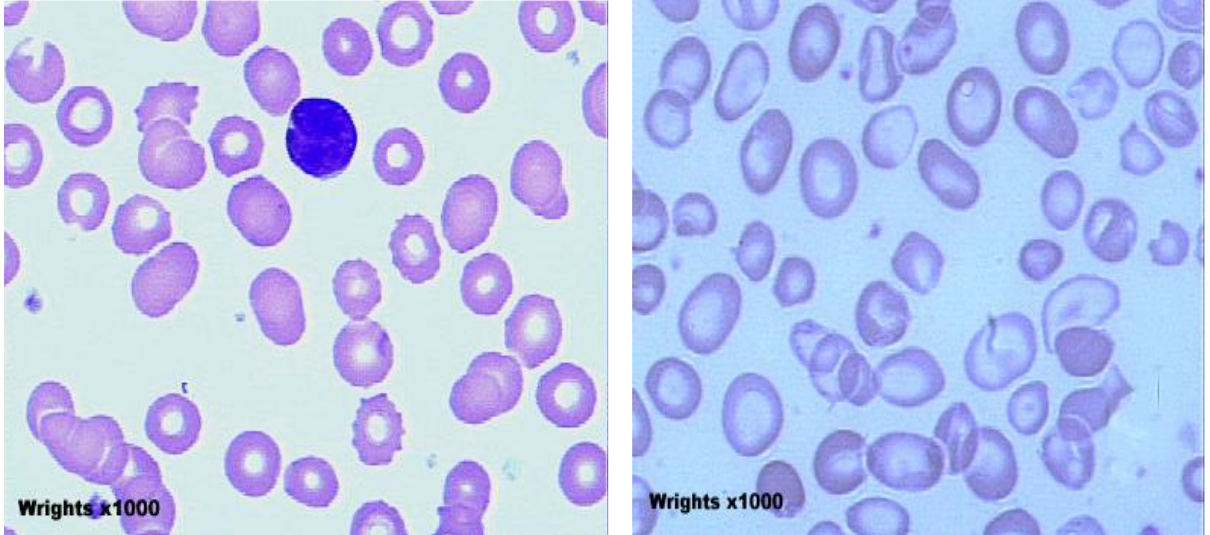
β -talasemi tanısında öncelikle mikrositik hipokromik anemiyi ortaya koymak için eritrosit indeksine bakılır,(Tablo 2.2) daha sonra periferik yaymada eritrosit morfolojileri incelenir,(Şekil 2.6) hemogloblin analiziyle HbA düşüklüğü ve HbA2, HbF artışı araştırılır.(Tablo 2.3) İleriki basamakta ise genetik testlerle mutasyon taraması yapılır (38).

Tablo 2.2. Beta talasemide eritrosit indeksi deęiřimi (29)

| Eritrosit İndeksi | Normal | | Hasta | Taşıyıcı |
|-------------------|------------|------------|---------------------|---------------------|
| | Erkek | Kadın | β -Thal Major | β -Thal Minor |
| MCV | 80-94 fl | 81-99 fl | 50-70 fl | <79 fl |
| MCH | 27-31 pg | 27-31 pg | 12-20 pg | <27 pg |
| Hb | 14-18 g/dl | 12-16 g/dl | <7 g/dl | 9.1-15.3 g/dl |

Tablo 2.3. Beta talasemide hemoglobin düzeyleri (29)

| Hemoglobin Tipi | Normal | Hasta | | Taşıyıcı |
|-----------------|--------|---------------------------------|--|---------------------|
| | | β° -Thal Homozigot | β^{+} -Thal Homozigot veya β^{+}/β° Heterozigot | β -Thal Minor |
| HbA | 96-98% | 0 | 10-30% | 92-95% |
| HbF | <1% | 95-98% | 70-90% | 0.5-4% |
| HbA2 | 2-3% | 2-5% | 2-5% | >3.5% |



şekil 2.5. .Periferik yaymada talasemik eritrositlerin hipokromileri(sağ) ve mikrositerliği(sol). Eritrositlerin merkezindeki solukluk çapının %30'undan fazlasını kaplamakta ve eritrositlerin çapları 7 μ m'den kuk gözleniyor.

2.2.2.1. Beta Talasemi Minör

Üç farklı tipte olabilir.

1. Yüksek A2 ile olan β talasemi taşıyıcılığı

-En fazla görülen tiptir,

-HbA2: %3,5-8, HbF: %1-5'dir,

- β^+ veya β^0 mutasyonlarla olan heterozigotlar farklıdır.

-Klinik fenotipi β globin geni mutasyonunun β globin zincir üretimi üzerindeki etkisi belirler.

- β^+ taşıyıcılarda MCV ve MCH daha yüksektir. Homozigot çocuklarında transfüzyona bağımlı anemi görülürken, bazen de talasemi intermedia fenotipi olabilir.

2. Yüksek A2, yüksek F ile olan β talasemi taşıyıcılığı

-Farklı bir varyanttır. Hem A2 hem de Hb F (%5-20) yüksektir. b gen delesyonu varken, d ve g genleri sağlamdır.

3. Normal A2 ile olan β talasemi taşıyıcılığı

-Sessiz taşıyıcılardan ayrılmalıdır. Sessiz taşıyıcılardan farkı, hipokrom mikrositer anemi oluşudur (Hb A2 seviyesi sınırdan saptanır).

-Hem b hem d geni defektlidir (aynı kromozom veya karsı sağlam kromozomda).

-Ebeveynlerden biri bu tip, diğeri klasik taşıyıcı ise homozigot çocukta ağır klinik tablo görülür.

BTM tanısı konarken aşağıdaki hastalıklardan ayırıcı tanısının yapılması gerekmektedir.

- Demir eksikliği anemisi
- Alfa Talasemi taşıyıcılığı
- Kronik hastalık anemisi

Beta talasemi taşıyıcılığında; eritrositoz ve mikrositozun olması, RDW'nin normal saptanması ayırıcı tanıda önemlidir.

BTM’de herhangi bir tedavi vermeye gerek yoktur. Ancak genetik danışmanlık mutlaka verilmeli ve hasta anne, baba ve kardeşleri taşıyıcılık yönünden taranmalıdır.

2.3. TROMBOSİTLER

Trombositler ilk kez 1842 yılında, Dona, Gerber ve Addison tarafından kanda, eritrositler ve lökositlerin yanında küçük yuvarlak partiküller olarak tanımlanmıştır. Trombositlerin kanın ayrı, şekilli bir elemanı olduğunu ise 1882 yılında Bizarro bildirmiştir. Pıhtılaşma esnasında trombositlerin kümeleşmesi ve sonra kümeleşmiş bu trombositlerin eriyerek homojen bir maddeye değişimini tanımlayan viskoz metamarfoz deyimini ilk olarak Schimmelbush tarafından kullanılmıştır(39). 1906 yılında Wright trombositlerin kemik iliğinde bulunan megakaryosit denen hücrelerden parçalanarak oluştuğunu bildirmiştir. Daha sonra yapılan florasan antikor tekniği ile megakaryositler ve trombositlerin aynı antijenik yapıda olduğunun gösterilmesi ve mikrosinematografi tekniği ile mega karyositlerin izlenerek trombosit oluşumunun gözlenmesi ile trombositlerin kökeninin megakaryositler olduğu kesinlik kazanmıştır(40-43).

Trombositler kemik iliğinde megakaryosit denen 35-160 mikrometre çapında dev hücrelerin sitoplazmasının parçalanması sonucu oluşan 2-5 mikrometre çapında hücrelerdir. Ortalama ömürleri yaklaşık dokuz gündür. Normalde periferik kanda 150000-400000 arasında trombosit bulunur ve bu hücreler dolaşımdan retiküloendotelial sistem tarafından temizlenirler (44,45).

Trombositler disk şeklinde çekirdeksiz hücrelerdir. Yaşlandıkça yapıları değişir, boyut olarak küçülürler dansiteleri azalır. Elektron mikroskopi incelemelerinde periferik bölge, sol jel bölgesi(hyalomer) ve organel bölgesi olmak üzere 3 ana yapıdan oluştukları tespit edilmiştir.

2.3.1-TROMBOSİTLERİN YAPISAL BÖLÜMLERİ

2.3.1.1-Periferik Bölge

Bu bölge daha çok trombositlerin uyarılara karşı oluşturduğu kimyasal etkileşimler ve adezyonda rol oynar. Dış kabuk, ünit membran ve submembran bölümlerinden oluşur. Dış kabuğun yapısında bulunan glikoproteinler trombositlerin adezyon ve agregasyonunda rol oynayan çeşitli hücreler için reseptör görevi görürler. Ünit membran daha çok trombosit iç ortamının korunması, trombosit adezyonu ve kontraksiyonda görev alan fosfolipitten zengin bir

yapıdır(45,46). Submembran ise aktin ve myozin içeren mikroflamanlar ve mikrotübüllerden oluşan yapısından dolayı disk şeklinin korunması, pseudopot oluşumu, pıhtı retraksiyonunda görev alır (45-47).

2.3.1.2-Sol Jel Bölgesi

Organelden fakir fibröz yapıda olan, mikrotubul ve mikroflamanlardan oluşan bu bölgede iki kanal sistemi bulunur. Elektron dens tubuler sistem hücre şeklinin korunmasında ve kalsiyum deposu olarak açık kanal sistemi ise trombosit sekresyon reaksiyonlarında rol oynar(45-49).

2.3.1.3-Organel Bölgesi

Trombosit fonksiyonlarında rol oynayan; granüller, yoğun cisimcikler ve mitokondrilerin olduğu bölgedir (46,50,51). Lizozimler, alfa granüller ve peroksizomlar olmak üzere 3 tip granül mevcuttur.(Tablo 2.4)

Tablo 2.4: Trombosit Granülleri ve İçerikleri (52)

| | | |
|-------------------|--------------------------------|--|
| LİZOZOM | Asit Hidrolazlar | β -N-Asetilglukozaminidaz β -N-Asetilgalaktozaminidaz β -Glukoronidaz β -Galaktozidaz α -Arabinozidaz |
| PEROKSİZOM | | Katalaz |
| α -GRANÜL | Koagülasyon Faktörleri | Faktör V Fibrinojen |
| | Trombosit Spesifik Proteinleri | β -Tromboglobulin PF4 |
| YOĞUN CİSİMCİKLER | | ATP, ADP, PPI, Ca,Serotonin |

2.3.2-TROMBOSİT FONKSİYONLARI

Trombositlerin en önemli fonksiyonu kanamanın durdurulmasında hemostatik tıkaçı oluşturmak ve kanın koagülasyonuna katılmaktır (53-55). Damar duvarı zedelendikten sonra saniyeler içerisinde bir miktar trombosit zedelenmiş bölgeye tutunur daha sonra trombosit sayısı giderek artarak zedelenmiş bölgeyi kapatacak bir kitle oluştururlar ve tıkaç görevi görürler(49,50,56,57).

Trombositlerin trombosit dışı yüzeylere yapışmasına adezyon denir. Trombositler subendotelyumun fibril biçimindeki yapılarına ve kollejene yapışma kabiliyetine sahiptir. Trombosit adezyonu için von Willebrand(vWF) faktörün bulunması zorunludur. Trombosit membranında bulunan glikoprotein Ib ve IIb/IIIa kompleksi vWF için reseptör görevi görür. vWF kollojen ve trombositler üzerindeki spesifik reseptörlerine bağlanarak köprü vazifesi görür. Trombositler kollejene adezyonu sonrası aktive olur. Elips şeklinde trombositler aktive olunca küresel şekle dönüşürler ve çok hızlı biçimde psödopodlar çıkarırlar (53,58), aggregasyon ve granül sekresyonu gelişir.

Agonist maddelerin spesifik membran reseptörlerine bağlanması ile oluşan agonist-reseptör kompleksi, regülatör G protein ile fosfolipaz C nin aktivasyonunu sağlar, bu sayede başlayan fosfotidil inozitoldeki değişiklikler protein C kinaz aktivasyonu ile sonuçlanır. Protein C kinaz ise granül sekresyonunda rol oynayan protein olmak üzere çeşitli proteinlerin sentezinde rol oynar (49,56,57,59,60).

Trombositlerde şekil değişikliği, agregasyon ve sekresyon fonksiyonları için Ca konsantrasyonunun belirli seviyeler üzerinde olması gerekir (48,49,59). Ca konsantrasyonu 300nM üzerinde şekil değişikliği olurken agregasyon ve sekresyon fonksiyonları için ise konsantrasyonun 600 nM nin üzerinde olması gerekmektedir (61). Ca birde miyozin hafif zincir aktivasyonuna aracılık eder. Fosforile myozin aktin flamanları ile reaksiyona girerek, diskoid trombositlerin şekil değiştirmesine ve sferik trombositlerin meydana gelmesinde rol oynar(48,49,59,62).

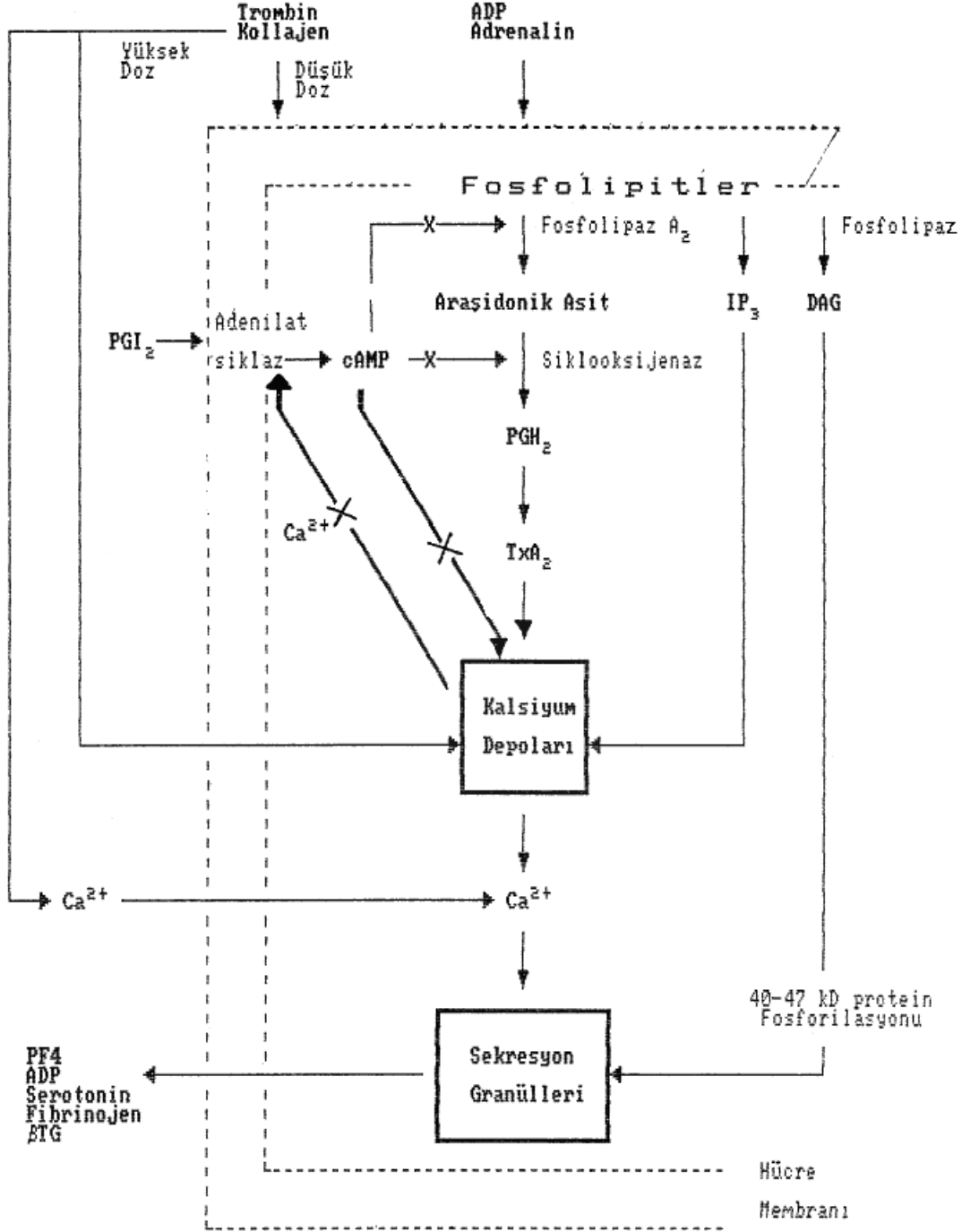
Kontraktıl elemanların aktivasyonu sırasında uzun aktin flamanları trombositlerin sitoplazmasında bulunan granülleri santrale çeker ve sonuçta trombosit sekresyonunun ilk basamağı olan granül santralizasyonu gerçekleşmiş olur (48,49,56,59).

Trombositlerin kontraktıl birimleri pıhtı retraksiyonunda önemli rol oynar. Trombositler pseudopodlarını fibrin lifleri boyunca uzatarak, GPIIb/GPIIIa kompleksi ile fibrin moleküllerine

tutunur, daha sonra kontraktıl birimlerin etkileşimi ile psödopotlar geri çekilir. Psödopotlar ile fibrin lifleri de çekilerek, pıhtı büzüşmesi ve tromboze damarların açılmasına neden olur (56,57,59).

Trombositlerin birbirine tutunması olayına agregasyon denir. Primer ve sekonder olmak üzere iki tipi vardır. Primer agregasyon sekresyon reaksiyonu olmadan görülen geri dönüşümlü bir olaydır. Sekonder agregasyon ise geri dönüşümsüzdür ve sekresyon ile birlikte gerçekleşir (63). Trombosit alfa granüllerinden sekrete edilen trombospondin membran yüzeyinde bulunan spesifik reseptörüne ve fibrinojene bağlanarak fibrinojen köprülerini sağlamlaştırır böylece reversible mikroagregatlar irreversible makroagregatlara dönüşür (50,56,60,64).

Trombositlerin subendotelyumla temasıyla veya agonistlerle uyarılmasıyla granüllerinden ADP salınmaya başlar. ADP trombositlerin uyarılmasını sağlayarak alfa granüllerden agregasyonda rol oynayan çeşitli proteinlerin salınımına yol açar. Eş zamanlı olarak trombosit membranından araşidonik asit salınımı artar. Araşidonik asitten tromboksan sentaz enzimi ile tromboksan A2 üretilir. Tromboksan A2 ile birlikte ADP trombosit agregasyonunu başlatır (65,66,67). (Şekil 2.6)



Şekil 2.6: Trombosit Aktivasyonu (62)

Agregasyonda rol oynayan proteinlerin bir kısmı trombositlerden salınırken, bir kısmı ise plazmada hazır halde bulunurlar(67). GPIIb/GPIIIa kompleksi bu proteinler için reseptör görevi yapar. Trombositler dinlenme durumunda iken GPIIb/GPIIIa kompleksi kapalı iken, trombositler aktifleşince bu kompleks de agregasyon proteinlerinin bağlanması için hazır duruma geçer (65). Sonuçta proteinler reseptörlerine bağlanarak trombositlerin birbirine yapışması sağlanır.

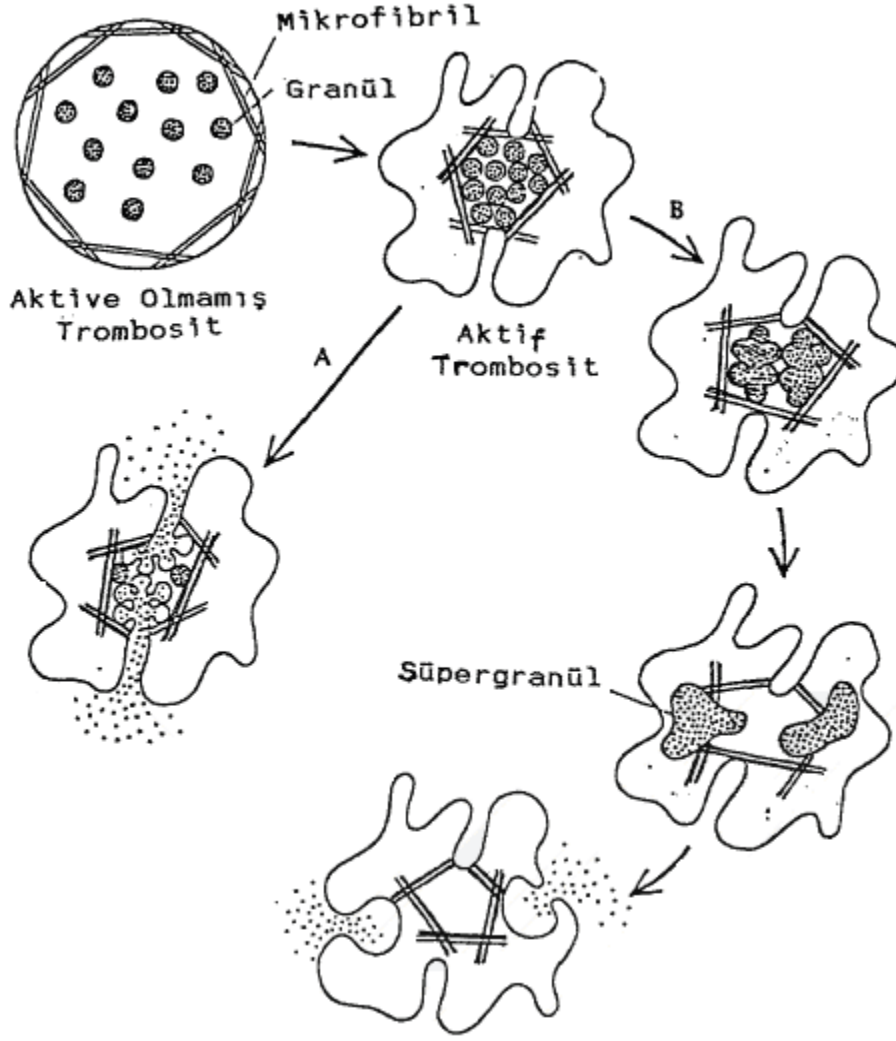
Agonist, trombosit membranındaki spesifik reseptörlere bağlanınca plazma membranının iç tabakası ve yoğun tübuler sistemden plazmaya kalsiyum salınır. Plazmaya salınan kalsiyum miktarı, agonistin yapısına ve konsantrasyonuna bağlıdır. Sitoplazmaya geçen kalsiyum kalmodulin ile ilişkiye girer. Kalsiyum-kalmodulin kompleksi miyozin kinazı aktive eder. Aktif miyozin kinaz miyozini fosforile eder. Fosforile edilmiş miyozin aktin ile ilişkiye girerek, kontraksiyonu başlatır.

Trombositlerde sekresyon olayı ekzositoz ile gerçekleşir. Sekresyon olayı sitoplazmik Ca yükselmesi ile başlar (65). Daha sonra kontraktıl elemanlar granülleri santrale çekerler. Santralde toplanan granüller membranla ilişkili açık kanal sistemiyle veya direk trombosit membranı ile füzyona uğrayarak içeriklerini hücre dışına boşaltırlar(48,49). Trombosit sekresyonunda yoğun granüller plazma membranı ile kaynaşırken alfa granüller hücrenin yüzeyine açılan kanal sistemi ile kaynaşır(65,66).

Bazı granüllerin önce birbirleri ile birleşerek süper granülleri oluşturduğu gösterilmiştir(48,49). Bu süper granüllere su ve elektrolit girmesi sonucu granüller genişler ve muhtevaları seyrelir. Sertliği azalmış olan bu birleşik granüller aktin myozin mikrofibril ağının kasılması ile trombositin merkezinden periferine doğru hareket ederler.

İmmunhistokimyasal çalışmalarla fibrinojen, BTG ve PF4'ün büyük vakuollerin yanı sıra plazma membranı boyunca da lokalize olduğunu göstermiş ve bazı sekresyon ürünlerinin dış membrana bağlı olarak buldukları sonucuna varılmıştır (49).

Özetleyecek olursak; trombosit aktivasyonu ile birlikte disk biçimindeki trombositler küre şekline dönüşür, psödopodlar oluşur, alfa granüller hücre merkezine toplanır ve sekresyon gelişir. (Şekil 2.7)



Şekil 2.7: Trombositlerde Granül Sekresyonu (48)

Aktive plateletler prokoagulan bir yüzey oluşturarak ve dolaşan doku faktörünü ortaya çıkararak fibrin formasyonunun oluşmasını destekler. Bu nedenle plateletler hemostazın esansiyel bir komponenti olduğu gibi arteriyel trombozun da önemli bir komponentidir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, dolaşan aktive ve/veya hiperreaktif platelet varlığının yüksek trombotik riski artırabileceğini göstermiştir.

Miyokard enfarktüsü, iskemik stroke ve periferik arter oklüzyonunun ana nedeni olan arteriyel trombüs, aterosklerotik plak varlığında meydana gelir. Plak rüptürü olduğu zaman plateletler subendotelyal matriksteki vWF ve kollajen fibriller ile bağlantı kurarak aktive olur. Trombin formasyonu ve plak ilişkili doku faktörün açığa çıkmasıyla da indirekt aktivasyon meydana gelir (68-70). Bugün aterosklerozun bir inflamatuvar hastalık olduğuna ve plateletlerin özellikle damar duvarındaki inflamatuvar reaksiyona katkıda bulunarak aterosklerotik plak

gelişmesinde önemli rol oynadığına inanılmaktadır (71). Kardiyovasküler hastalıklarda aspirin, klopidogrel ve GPIIb/IIIa antagonistleri gibi platelet fonksiyon inhibitörlerinin koruyucu etkisinin gösterilmiş olması da plateletlerin atherotrombozda rol aldığının önemli bir göstergesi olmuştur. Aspirinin trombotik olayları azaltmasındaki başarısı (72) ve platelet volüm, sayı ve fonksiyonunun kardiyovasküler ölümlerin öngörülmesindeki prognostik değeri (73,74) plateletlerin önemini destekleyen kanıtlardandır.

Plateletler aktive olunca çeşitli trombosit aktivasyon markerları salgılanmaktadır.

Alfa granül ürünleri:

- ✓ Beta tromboglobulin
- ✓ Platelet faktör 4
- ✓ ADP, ATP, serotonin, kalsiyum ve pirofosfat

Trombosit hacim değişiklikleri:

- ✓ Mean platelet volüm (MPV)
- ✓ Platelet distribution width (PDW)

Membran glikoproteinleri:

- ✓ Soluble CD40 ligand
- ✓ Soluble P selektin
- ✓ Glikoprotein V
- ✓ Glikoprotein IIb/IIIa
- ✓ Glikokalisin

Metabolik ürünler:

- ✓ PGI₂
- ✓ Tromboksan A₂
- ✓ Tromboksan B₂

Bu markerlar in vivo ve in vitro olarak çalışılabilmektedirler. İn vivo çalışmalarda; tam kan, ELİSA ve flow sitometri yöntemi kullanılabilir.

İn vitro platelet fonksiyon testleri:

- ✓ Spontan agregasyon testleri
- ✓ Agonistle uyarılmış agregasyon testleri
- ✓ Adezyon testleri (kollajene adezyon, cama adezyon)

2.3.3. TROMBOSİT AKTİVASYON MARKERLARI

2.3.3.1 Platelet Faktör 4

Trombositlerin aktivasyonu sonucunda alfa granüllerden düşük molekül ağırlıkta trombosit özgü 2 protein salınır. Bunlar trombosit faktör 4 (PF4) ve afinitesi düşük trombosit faktör 4 (LA-PF4)'dür. (75,76) LA-PF4'ün plazmada proteolizisi sonucu β -tromboglobulin ortaya çıkar.(77) BTG ve PF4 endojen heparinle birleşerek onu nötralize ederler ve koagülasyonu hızlandırır. PF4'ün anti-heparin aktivitesi BTG'ye göre 6,5 kat fazladır. (78) PF4 trombositlerden proteoglikanla molekül ağırlığı 350.000 olan bir kompleks halinde salınır. Bu kompleks plazmada çözünür. PF4 molekül ağırlığı 7700 olan birbirinin aynı dört alt gruptan oluşan bir tetramerdir. Tetramer olarak ağırlığı 30000 daltondur. PF4 salındıktan sonra endotel hücrelerine hemen yapışarak dolaşımdan temizlenir. BTG ise böbrekler yoluyla temizlenir. Bu nedenle PF4'ün yarı ömrü 10 dakika, BTG'nin ki ise 100 dakikadır. BTG ve PFT trombositlere özgül proteinler oldukları için plazma düzeylerinin artması in vivo trombosit aktivasyonunun güvenilir bir ölçütü kabul edilmektedir. (79)

2.3.3.2 β -Tromboglobulin

β -tromboglobulin yaklaşık 36, 000 dalton ağırlığında trombosit spesifik bir proteindir. Tanımlanmış 4 tip subünitesi mevcuttur(80). Alfa granüllerden salgılanır(80) BTG'nin yarılanma ömrü yaklaşık 100 dakikadır.

Platelet hiperaktivasyonu alfa granüllerden özellikle BTG ve PF4 gibi içeriklerin salınmasını sağlar(81). Bu platelet aktivasyonu subendotelial yapılar, aterosklerotik yapılar, çeşitli immun kompleksler ile ilişkisi sonucu ortaya çıkar. Aktivasyon ADP, kollojen ve trombin gibi çeşitli uyarılar tarafından indüklenebilir(81).

Trombosit spesifik proteinleri değerlendirirken hiperkoagulan durumların veya pretrombotik yatkınlıkların fibrinopeptid ve D-dimer gibi diğer markerları göz önünde bulundurmak gereklidir. Bununla birlikte böbrek hastalıklarında BTG'nin renal klirensi azaldığından dolayı platelet hiperaktivasyonu olmadan plazma BTG düzeylerinde artışa eğilim vardır (82).

Trombosit hiperaktivasyonu ile ilgili olarak myokard infarktüsü(83), kalp kapak hastalıkları(84), embolizm(84), venöz trombozlar(85), distal vasküler hastalıklar(81), diyabet(86), cerrahiler(87), kanser(81) gibi durumlarda plazma BTG düzeyleri artar.

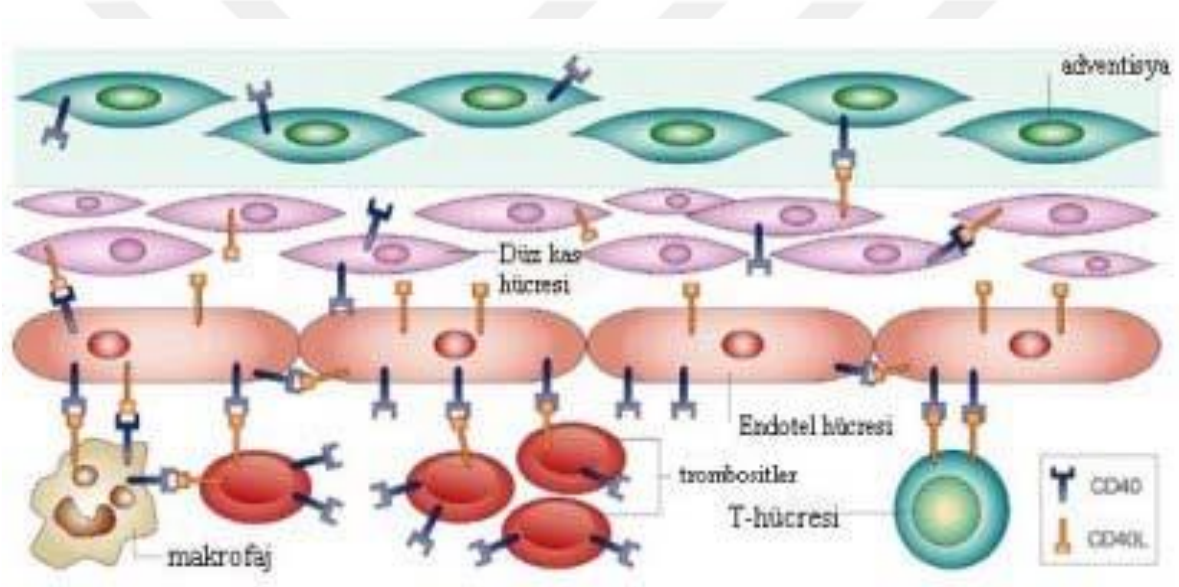
2.3.3.3 Serum Soluble CD40L

CD40, 45-50 kDa ağırlığında, 277 aminoasitten oluşan glikoprotein yapıda membran bağımlı bir moleküldür (Şekil 2.8). CD40 geni 20q11-2-q13-2 kromozomda bulunmaktadır. CD40 tümör nekrozis faktör (TNF) ailesi üyelerinden biridir. CD40 B hücrelerinin her gelişme aşamasında, monosit, makrofaj, trombosit, folüküler dentritik hücrelerinde, eozinofillerde, aktif CD8 pozitif T hücrelerinde eksprese olur. Kan hücrelerinin dışında CD40, timüs epitelyum hücrelerinde, böbrek, keratinosit, sinovial membran fibroblastı ve deri fibroblastı hücrelerinde ve aktif endotel hücreler üzerinde sentezlenmektedir (88). CD40 aktivasyonu endotel hücreleri ve düz kas hücrelerinde trombosit aktive edici faktör (PAF), inflamatuvar mediatör molekül sentezini artırarak neoanjiogenezi indüklemektedir.



Şekil 2.8: İnsan CD40 modeli

CD40'nun ligandı olan CD40L (CD154), TNF ailesinin bir üyesidir. CD40L, trimer şeklinde olup aktif olan CD4 pozitif, CD8 pozitif, T hücrelerinde sentezlenmektedir. Bunun dışında değişik seviyelerde monosit, aktif B hücreler, vasküler endotelial hücreler, düz kas hücreleri, dentritik hücreler ve trombositler üzerinde de görülebilir (88). CD40-CD40L ilişkisi ilk olarak T-cell bağımlı B cell immün cevapta gösterilmiştir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar bu reseptör ligand ilişkisinin ateroskleroz ve değişik inflamatuvar olaylarda da önemli rol aldığını göstermektedir (88). CD40 L'in trimerik membran bağımlı formu dışında, aktive trombositlerden salınan 18-kDa'luk soluble (sCD40L) formu vardır. Trombositler sirkülasyondaki soluble CD40L'in ana kaynağıdır. Trombin, ADP ya da kollajen ile aktive olan trombositler sCD40L salgırlar (89). Membran bağımlı CD40L'in sinyal iletimi hücre içinde sentezlenen sCD40L'in sinyal iletiminden daha sınırlı ve daha yavaştır (90). (Şekil 2.9)



Şekil 2.9: CD40- CD40 L etkileşimi

Son çalışmalar aktive trombositlerin endotel hücrelerindeki CD40-CD40L etkileşimini sağlayarak inflamasyon ve koagulyasyonda önemli rol oynadığını göstermektedir (91) (Şekil 2.9). CD40-CD40L etkileşimi ile endotel hücreleri ve monositler doku faktörü sentezlemektedir. Doku faktörü normalde dolaşımda bulunmayan ve endotel hasarı sonucu ortaya çıkan, doku hücrelerinin membranında bulunan bir proteindir. Doku faktörü sentezi DIC ve ateroskleroz gibi trombotik olaylara eşlik etmektedir (88). CD40L trombositlerin proinflamatuvar yanıtında ve cylooxygenase-2 (COX-2) ekspresyonunu artırarak vasküler endoteliumun aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır (92,93).

Trombositler aktive olunca yüzeylerinde CD40L sentezlemeye başlar. Daha sonra membranda bulunan CD40L serbestleşerek soluble forma geçer. Kandaki soluble CD40L'in %90 kaynağı trombositlerdir. Serum sCD40L trombosit aktivasyonunda ve arterial trombüs stabilizasyonunda rol oynamaktadır (93).

sCD40L trombosit aktivasyonunu :

1. P selektin ekspresyonu ve trombosit degranülasyonu
 2. Reaktif oksijen ve nitrojen sentezi
 3. Trombosit agregasyonu ve trombosit lökosit konjugasyonu
- yaparak artırmaktadır (94).

Pek çok çalışmada serum sCD40L'in adezyon moleküllerini, sitokinleri, matriks metalloproteinazları ve doku faktörü sentezini artırarak aterom plağı gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Hipertansiyonda serum sCD40L'in artmış olduğu gösterilmiştir. Serum sCD40L artışı anormal anjiogenezis belirteci olan anjiopietin-2 artışı ile koreledir(95). Artmış serum sCD40L düzeyi kardiovasküler hastalıkta prognostik öneme sahiptir. Anjiogenezis pek çok mediatörün rol aldığı kompleks bir olaydır. VEGF ve anjiopietin endotel için en özgün olanlardır. Anjiopietin 1 düz kas hücreleri üzerine etki ederek kan damarlarının matürasyonunu sağlamaktadır. Anjiopietin 2 ise anjiopietin 1'in Tre 2 reseptör antagonistidir. VEGF ile birlikte kan damarlarının stabilizasyonunu bozarak yeni damar tomurcuklanmasına izin verir. Deneysel çalışmalarda CD40-CD40L sistemi ile anjiogenez arasında ilişki bulunmuştur. Melter ve arkadaşları yaptıkları deneysel çalışmada insan umbilikal ven endotel hücrelerini sCD40L ile muamele etmişler ve VEGF mRNA ekspresyonunun arttığını göstermiştir (96). Ayrıca VEGF'nin de anjiopietin 2'yi upregüle ettiği gösterilmiştir. Trombositler vasküler inflamasyonu ve anjiogenezisi artırarak hipertansiyonlu hastalarda kardiovasküler komplikasyonların gelişmesine neden olurlar. Farelerde, cilt altına sCD40L enjeksiyonu sonrası invivo olarak anjiogenezisin indüklendiği gösterilmiştir (97). Metabolik sendrom ateroskleroza neden olan proinflamatuvar ve protrombotik olayların eşlik ettiği bir durumdur. Serum sCD40L'in diyabet ve hiperkolesterolemi gibi kardiovasküler hastalık riskinin arttığı durumlarda yükseldiği gösterilmiştir (98). Yapılan çalışmalarda metabolik sendromda monositlerde CD40 ve CD40L sentezi kontrol grubuna göre artmıştır. İkinci olarak

metabolik sendromda serum soluble CD40L'in arttığı ve bunun ana kaynağının aktive trombositler olduğu gösterilmiştir (98).

Crohn ve ülseratif kolit gibi inflamatuvar barsak hastalıklarında immün ve nonimmün mekanizmalar rol oynamaktadır. İnflamatuvar yanıtta CD40-CD40L interaksyonunun majör rol oynadığı düşünülmektedir. CD40L ve sCD40L'in fibroblast, endotel hücreleri gibi nonimmün hücrelere bağlanmaları sonucu proinflamatuvar olayların tetiği çekilmektedir. Çalışmalarda CD4 (+) T hücreler ve aktive trombositlerin intestinal fibroblastlara ve intestinal mikrovasküler endotel hücrelerine etki ederek ICAM-I ve VCAM-I sentezini artırdığı gösterilmiştir. Proinflamatuvar olayların yanında CD40L doku faktörü sentezini de artırarak protrombotik olaylarda rol oynamaktadır. Soluble CD40L'in trombozis ve inflamasyonda önemli rolü vardır. Bu nedenle çeşitli inflamatuvar barsak hastalıkları, SLE, RA, kardiovasküler hastalıklar gibi kronik inflamatuvar hastalıklarda ve trombotik hastalıklarda serum sCD40L konsantrasyonu yüksek bulunmuştur (99). Diyabetik hastalarda yapılan çalışmalarda glikoz ve AGE (advanced glycation end product)'nin trombositlerden sCD40L salınımını artırdığı gösterilmiştir. Artmış serum sCD40L konsantrasyonu hiperglisemi ile inflamasyon arasındaki ilişkiyi göstermektedir (100). CD40-CD40L sisteminin aktive olması hümmoral ve selüler immün cevabın artmasına neden olur. B hücrelerinde CD40L'in bağlanması sonucu proliferasyon ve memory B hücrelerine farklılaşma olmaktadır. T hücrelerinde CD3 ligasyonundan kısa bir süre sonra CD40L hücre yüzeyinde belirir. CD40L olmayan farelerde antijen spesifik T-cell cevabında azalma olduğu gösterilmiştir (88). Primatlarda anti-CD40L antikoru kullanılarak böbreğin akut rejeksiyonu engellenmiştir.

CD40 hematolojik malignansilerde ve solid tümörlerde de salınmaktadır ancak CD40'ın kanser gelişimindeki rolü kesin ispatlanamamıştır (101).

Kord kanındaki ve kemik iliğindeki pek çok progenitör hücre CD40L eksprese eder. CD40L mutasyonu nötropeninin eşlik ettiği memory B hücrelerinin olmadığı, T hücre fonksiyonunun değiştiği ciddi enfeksiyonların eşlik ettiği hiper IgM sendromunun gelişmesine neden olur (102).

Trombositler sirkülasyondaki sCD40L'in ana kaynağıdır (71). Trombositlerin agregasyonu ve aktivasyonu sCD40L'in serbestleşmesi ile ilişkilidir. Rekombinant sCD40L ile yapılan çalışmalarda trombositlerde P selektin seviyesinin arttığı gözlenmiştir. Ayrıca sCD40L anlamlı olarak trombosit agregasyonunu artırmıştır. P selektin trombosit-lökosit agregasyonunu artırmakta ve trombosit-nötrofil-monosit konjugat formasyonları olmaktadır.

Trombosit aktivasyon ve agregasyonu aynı zamanda oksidatif stresi de indüklemektedir. Trombositler CD40-CD40L interaksyonu ile koagulasyon ve inflamasyonun orkestra şefidir (102).

2.3.3.4 P-Selectin

Selektinler, lökositlerin damar duvarına bağlanması ve sonra kandan ayrılmasını sağlayan moleküler olaylar zincirinin en başında yer alırlar (103). Bu yolla selektinler nötrofil ve monositlerin inflamasyon bölgesine geçmesini sağlar. Selektinlerden L-Selektin lenfosit resirkulasyonu sırasında lenfositlerin lenf düğümlerine göçü olayında rol alır. E-Selektin nötrofil ve monosit için sitokinlerle uyarılabilen endotel hücre adezyon molekülüdür (104).

Bir hücre yüzey adezyon molekülü olan P-Selektin, insanlarda trombositlerin alfa granülleri ve endotel hücrelerinin “Weibel-Palade” cisimciklerinde depo halinde bulunur. (105,106) Weibel-Palade cisimciklerinde bazal seviyede bulunan P-Selektin; histamin, trombin, platelet aktive edici faktör (PAF) gibi aktive edici faktörlerle karşılaştığında birkaç dakika içinde hücre yüzeyine dağılır ve lökositlerin bağlanmasına yardımcı olurlar. Bu hücrelerin aktive olması ile hızla hücre yüzeyine geçen P-Selektin, nötrofiller ve monositler arasındaki adeziv ilişkiden sorumludurlar.

P-Selektin ayrıca süperoksit oluşumu, granüler sekresyon ve trombositleri aktive eden faktörlerin ve lökotrienlerin sentezi ile de ilişkilidir.(108,109) Özellikle trombinin aktive ettiği trombositlerin nötrofil ve monositlere adezyonu, P-Selektin aracılığıyla gerçekleşmektedir. (105,106)

Aktive plateletlerdeki P-Selektin ekspresyonu sadece lökosit-endotel adezyonunu değil; plateletler arası agregasyon ve Glikoprotein IIb/IIIa-fibrinojen bağlantısını da stabilize eder. P-Selektin, doku faktörü(TF) oluşumunu indüklediği gibi aktive monosit/makrofajlardan PAF üretimini indükleyerek prokoagülan aktiviteye yardımcı olmaktadır.Bu da P-Selektinin inflamasyonda ve aterogenezde rol aldığını göstermektedir.

2.3.3.5 Ortalama Trombosit Hacmi (MPV)

MPV; trombosit büyüklüğünü gösterir. Yapılan çalışmalarla MPV'deki yükselme trombosit büyüklüğünde artış ile birlikte olduğu, büyük trombositlerin ise normal trombositler ile karşılaştırıldığında enzimatik ve metabolik olarak daha aktif durumda oldukları gösterilmiştir (110,111). Ayrıca hacmi artmış trombositler; daha yoğun granül içerip, kollajen ile daha çabuk aktive olan, fazla tromboksan B2 üreten, daha fazla serotonin ve BTG salgılayan ve daha fazla GP Ib ve GPIIb-GPIIIa reseptörü eksprese etme kapasitesine sahiptirler. Bu nedenle trombositlerin hem subendoteliyal dokuya hem de biri birilerine bağlanma kapasitesi artmıştır (112,113).

AMI'de MPV yüksekliği, ölüm ve rekürren vasküler olayların bağımsız bir prediktörü olduğu gösterilmiştir (114). Martin ve ark. (114) AMİ geçiren ve yüksek MPV sahip olan hastaların iki yıllık izlemlerinde, MPV yüksek olan grupta reinfarktüs ve ölüm gibi kötü klinik sonuçlar ile birliktelik olduğunu gösterdiler. Kiliçli -Çamur ve ark. (115) kararlı angina pektoris, kararsız angina pektoris, AMİ ve normal kişileri aldıkları bir çalışmada; AMİ ve kararsız angina pektoris olan grupta MPV değerlerini daha yüksek bulmuşlardır.

Akut vasküler olaylar dışında, Yang ve ark. (116) kararlı ve kararsız angina pektoris olan hastalarda elektif şartlarda PTKA yaptıkları bu hastaların periprosedürel MPV ile 6 aylık dönem içindeki restenoz arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Restenoz olan grupta MPV, olmayanlara göre daha yüksektir.

Yine diyabetik hastalarda MPV normal kişilerden yüksektir ve özellikle tip II diyabetiklerde sürekli bir trombosit stimülasyonu olduğu gösterilmiştir. Diyabetiklerdeki kronik stimülasyonun nasıl gerçekleştiği açıklanamamıştır(117). Yine vasküler yapıların patofizyolojisinde büyük rol oynadığı preeklampitik gebelerde MPV yüksek bulunmuştur (118). Ayrıca MPV'nin yaşla birlikte değişim gösterdiği; yeni doğanlarda düşük olup yaş ilerledikçe trombosit hacminde bir artış olduğu gözlenmektedir (119).

Tablo 2.5: Ortalama Trombosit Hacmini Arttıran ve Azaltan Durumlar

| MPV Artıran Durumlar | MPV Azaltan Durumlar |
|---|--|
| Akut Koroner Sendromlar | Romatizmal Kalp Hastalığı |
| Akut iskemik olaylar (İnme, Geçici İstemik Atak) | Akut Poststreptokoksik Glomerulonefrit |
| Kadınlarda (Preeklamsi, Hormon Replasman Tedavisi) | Kronik Böbrek Yetersizliği |
| Aterosklerotik hastalıklar (Koroner Arter Hastalığı, Renal Arter Stenozu) | Nefrotik Sendrom |
| Diyabet | |
| Hipertansiyon | |
| Obesite | |
| Hiperkolesterolemi | |
| İnfeksiyon (Dissemine İntravasküler Koagülasyon, Sepsis) | |
| İnflamatuvar Barsak Hastalıkları | |
| Hematolojik Hastalıklar (Demir Eksikliği Anemisi, İdiyopatik Trombositopenik Purpura, Trombositopeni, Aplastik Anemi) | |

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız prospektif kesitsel bir çalışmadır. Eylül 2013-Mart 2014 tarihleri arasında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hastanesi İç Hastalıkları polikliniğine başvuran BTM hastalarından uygun olan ve gönüllü olan 37 kişi çalışmamıza dahil edildi. Yaş, cinsiyet ve vücut kitle indeksi (VKİ) bakımından benzer olan ve BTM olmayan, 01 Nisan 2014-20 Nisan 2014 tarihleri arasında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hastanesi İç Hastalıkları polikliniğine başvuran 41 kişi kontrol grubu olarak çalışmamıza dahil edildi.

Çalışma Dışlama Kriterleri:

1. Akut ve kronik enfeksiyonu olanlar,
2. Antiagregan veya antikoagülan kullananlar,
3. Oral kontraseptif ve kolesterol düşürücü ilaç kullananlar,
4. Kontrolsüz hipertansiyon, iskemik kalp hastalığı, kalp yetmezliği, serebrovasküler hastalığı olanlar,
5. Periferik arter hastalığı, venöz trombozu olanlar,
6. Solid tümörü, hematolojik malignitesi olanlar,
7. Gebelik veya laktasyon döneminde olanlar,
8. Kollajen doku hastalığı olanlar,
9. FMF, Tip 1 DM, hipertiroidi ve hipotiroidisi olanlar,
10. Adrenal ve hipofiz yetmezliği olanlar,
11. Vitamin B12, folik asit ve demir eksikliği anemisi olanlar,
12. > Grade 2 böbrek yetmezliği, kronik hepatiti ve portal hipertansiyonu olanlar,
13. Trombositopeni ve trombositozu olanlar,
14. Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı olanlar,
15. KOAH ve astım hastalığı olanlar.

Mean corpuscular volüme (MCV) < 80 fL, mean corpuscular hemoglobin (MCH) < 27 µg ve HbA2 ≥ %3.5 olanlar BTM olarak kabul edildi. WHO kriterlerine göre anemisi olmayan (erkekler için Hgb ≥ 13 g/dL, kadınlar için Hgb ≥ 12 g/dL olanlar) ve MCV ve MCH'si normal olanlar kontrol grubuna dahil edildi.

Vücut kitle indeksi VKİ: $[\text{Kilo(kg)}]/[\text{Boy(m)}]^2$ formülüne göre hesaplandı. Çalışmaya dahil edilen her hastanın özgeçmişi, soygeçmişi ve kullandığı ilaçlar sorgulanıp fizik muayenesi yapıldı. Kan ve idrar tetkiki ve gerektiğinde görüntüleme tetkikleri kullanılarak komorbiditeleri değerlendirildi. Dahil edilme ve dışlama kriterleri değerlendirilerek uygun olan hastalar çalışmaya dahil edildi.

Kan örnekleri sabah aç olarak alındı ve rutin kan analizleri aynı gün yapıldı. Tam kan sayımı; Sysmex XT 1800i (ROCHE-2011, Kobe, Japan) cihazı ile, biyokimya örnekleri COBAS-C sistem kitleri kullanılarak COBAS 8000 (ROCHE-2007, Tokyo, Japan) cihazı ile analiz edildi. Tiroid hormonları Advia Centaur kitleri (Advia-2013-Tarrytown, USA) kullanılarak kemilüminesans metoduyla Siemens Advia Centaur (Siemens-2006, Dublin, Ireland) cihazı ile çalışıldı. Hemogloblin elektroferesi ise yüksek performanslı lipid kromatografi (HPLC) yöntemi ile Shimadzu 20-A (Shimadzu-2013, Kyoto, Japan) cihazı kullanılarak değerlendirildi.

Beta tromboglobulin ve platelet faktör 4 analizi amacıyla plazma elde etmek için % 3.8 sodyum sitratlı plastik tüpe, 1/9 oranında kan alındıktan sonra 2500 devirde 20 dakika $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi. Santrifüj edilen plazma polipropilen plastik tüplere alınarak -80°C 'de 25 gün saklandı. sCD40L ve sPS analizi amacıyla serum elde etmek için ise jelli tüpe kan alınıp 20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra serum kısmı polipropilen plastik tüplere alınarak -80°C 'de 25 gün saklandı.

Human soluble CD40L Platinum marka ELISA kiti (Bender Med Systems, cat no: BMS265, lot no: 87059020, Vienna-Austria), Human soluble P-selektin Platinum marka ELISA (Bender Med Systems; cat no:BMS219/4; lot no: 93950016 Vienna; Austria) kitleri kullanıldı. Human β -TG Assera Chrom Stago marka ELISA kiti (cat no:00950, lot no: 111398, Seine - France), Human PF4 Assera Chrom Stago marka ELISA (cat no : 00951, lot no:111112, Seine – France) kitleri kullanıldı. Multiskan FC® Microplate Reader cihazı (Thermo Scientific, USA) ile 450 nm dalga boyunda okuma yapıldı.

Çalışmaya katılan hastalar BTM ve kontrol grubu olmak üzere iki gruba ayrıldı. Bu iki gruptaki nominal bağımsız değişkenler ki-kare testi kullanılarak karşılaştırıldı. Sürekli sayısal değişkenlerin normal dağılım gösterip göstermediği One Sample Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak değerlendirildi. Daha sonra iki gruptaki normal dağılım gösteren sürekli sayısal değişkenler Student's T testi ile, normal dağılım göstermeyen sürekli sayısal değişkenler Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı.

İki kuyruklu p değeri < 0.05 ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Araştırmamız Bezmialem Vakıf Üniveristesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alınarak yapıldı. Bütün hastalardan bilgilendirilmiş onam formu alındı. Çalışmamız 2009 Helsinki Bildirgesine göre gerçekleştirildi.



4. BULGULAR

Araştırmamıza 99 hasta alındı ancak dışlama kriterlerine göre 21 kişi çalışmadan çıkarıldı ve araştırmamız 50 tanesi kadın, 28 tanesi erkek olmak üzere toplam 78 hasta ile gerçekleştirildi. BTM grubunda 37 kişi (24 kadın, 13 erkek), kontrol grubunda ise 41 kişi (26 kadın, 15 erkek) çalışmaya dahil edildi. İki grup arasında cinsiyet dağılımı yönünden anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p= 0,918$).

Tablo 4.1: Gruplara göre cinsiyet dağılımı

| | BTM grubu (n:37) | Kontrol grubu (n:41) | p değeri |
|-----------------------|------------------|----------------------|----------|
| Cinsiyet, Kadın/Erkek | 24/13 | 26/15 | 0,918 |

BTM grubunun yaş ortalaması $39,90 \pm 13.94$, kontrol grubunun yaş ortalaması $39,02 \pm 11.68$ olup aralarında anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p=0,760$). Çalışmaya alınan tüm hastaların yaş ortalaması ise 39.4 ± 12.7 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.2: Gruplara göre yaş dağılımı

| | BTM grubu (n:37) | Kontrol grubu (n:41) | |
|-----|------------------------|------------------------|----------|
| | Ortalama \pm s.sapma | Ortalama \pm s.sapma | p değeri |
| Yaş | $39,90 \pm 13.94$ | $39,02 \pm 11.68$ | 0,760 |

Çalışmamızda her iki grubun vücut kitle indeksi(VKİ) karşılaştırılmıştır. VKİ hastaların kilolarının boylarının karesine bölünerek hesaplanmıştır. BTM grubunun VKİ ortalaması $26,92 \pm 4,76$ kg/m², kontrol grubunun VKİ ortalaması 25.83 ± 3.57 kg/m² olarak tespit edilmiş olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir ($p=0,560$).

Tablo 4.3: Grupların Vücut Kitle İndeksinin Karşılaştırılması

| | BTM grubu (n:37) | Kontrol grubu (n:41) | |
|--|------------------------|------------------------|----------|
| | Ortalama \pm s.sapma | Ortalama \pm s.sapma | p değeri |
| Vücut Kitle İndeksi (kg/m ²) | 26,92 \pm 4,76 | 25.83 \pm 3.57 | 0,560 |

BTM ve kontrol grubu hemogram açısından karşılaştırıldığında ise; hemoglobin (Hb), hematokrit (Htc), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH); BTM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı ($p<0,005$). PDW(platelet distribution width), RBC (red blood cell), RDW (red cell distribution width) ise BTM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı ($p<0,005$). MPV(mean platelet volüme), trombosit ve beyaz kan hücresi (WBC) ise her iki grupta benzer olarak sonuçlandı ($p>0,005$).

Tablo 4.4: Hemogram için BTM ve kontrol grubu

| | BTM grubu (n:37) | Kontrol grubu (n:41) | p değeri |
|------------------|--------------------|----------------------|----------|
| RBC x 1012 /L | 6,11 \pm 0.88 | 4.79 \pm 0.60 | <0.001 |
| Hb, g/L | 117.5 \pm 13.6 | 135.1 \pm 16.8 | <0.001 |
| Htc, % | 36,67 \pm 3.90 | 40.50 \pm 4.04 | <0.001 |
| MCH, pg/cell | 19.81 \pm 2.51 | 27.49 \pm 5,09 | <0.001 |
| MCV, fL | 61.34 \pm 3.79 | 84.78 \pm 6.53 | <0.001 |
| RDW, % | 16.90 \pm 1.47 | 13.28 \pm 1.28 | <0.001 |
| WBC, x109/L | 7.23 \pm 2.03 | 6.62 \pm 1.99 | 0.184 |
| Platelet, x109/L | 288.15 \pm 73.26 | 264.49 \pm 73.02 | 0.152 |
| MPV,fL | 10.32 \pm 0.91 | 10.07 \pm 0.63 | 0.156 |
| PDW, % | 14.17 \pm 2.47 | 12.00 \pm 1.47 | <0.001 |

Trombosit aktivasyon markerlerinden sCD40L düzeyi, gruplar arası karşılaştırıldığında BTM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptanmıştır (p:0,009). BTM grubunda sCD40L $35,24 \pm 5,15$, kontrol grubunda ise $50,45 \pm 26,89$ olarak bulunmuştur.

Tablo 4.5: sCD40L için BTM ve kontrol grubu

| | BTM grubu (n:37) | Kontrol grubu (n:41) | |
|---------------|------------------------|------------------------|----------|
| | Ortalama \pm s.sapma | Ortalama \pm s.sapma | p değeri |
| sCD40L, IU/ml | $35,24 \pm 5,15$ | $50,45 \pm 26,89$ | 0,009 |

sPS düzeyi de, gruplar arası karşılaştırıldığında BTM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptanmıştır (p:0,010). BTM grubunda sPS $250,10 \pm 80,24$, kontrol grubunda ise $291,95 \pm 57,18$ olarak bulunmuştur.

Tablo 4.6: sPS için BTM ve kontrol grubu

| | BTM grubu (n:37) | Kontrol grubu (n:41) | |
|------------|------------------------|------------------------|----------|
| | Ortalama \pm s.sapma | Ortalama \pm s.sapma | p değeri |
| sPS, IU/ml | $250,10 \pm 80,24$ | $291,95 \pm 57,18$ | 0,010 |

BTM ve kontrol grubu karşılaştırıldığında BTG düzeyinde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p:0,497). BTM grubunda BTG $355,06 \pm 40,25$, kontrol grubunda ise $348,68 \pm 41,46$ olarak bulunmuştur.

Tablo 4.7: BTG için BTM ve kontrol grubu

| | BTM grubu (n:37) | Kontrol grubu (n:41) | |
|------------|------------------------|------------------------|----------|
| | Ortalama \pm s.sapma | Ortalama \pm s.sapma | p değeri |
| BTG, IU/ml | $355,06 \pm 40,25$ | $348,68 \pm 41,46$ | 0,497 |

PF4 düzeyi, gruplar arası karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p:0,507). BTM grubunda PF4 $159,63 \pm 22,68$, kontrol grubunda ise $155,90 \pm 25,79$ olarak bulunmuştur.

Tablo 4.8: PF4 için BTM ve kontrol grubu

| | BTM grubu (n:37) | Kontrol grubu (n:41) | |
|------------|------------------------|------------------------|----------|
| | Ortalama \pm s.sapma | Ortalama \pm s.sapma | p değeri |
| PF4, IU/ml | $159,63 \pm 22,68$ | $155,90 \pm 25,79$ | 0,507 |

BTM grubunda sigara içerenler BTM ve kontrol grubunda sigara içen kişi sayısı 10, kontrol grubunda ise sigara içen sayısı 11 olarak bulunmuş olup iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamamıştır (p: 0,813). Sigarayı bırakmış olan kişi sayısı ise BTM grubunda 2, kontrol grubunda ise 3 kişi olarak bulunmuştur ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamamıştır (p:0,906).

Tablo 4.9: Sigara içenler ve sigarayı bırakanlar için BTM ve kontrol grubu

| | BTM grubu (n:37) | Kontrol grubu (n:41) | p değeri |
|---------------------|------------------|----------------------|----------|
| Sigara içenler | 10 | 11 | 0,813 |
| Sigarayı bırakanlar | 2 | 3 | 0,906 |

BTM ve kontrol grubu esansiyel hipertansiyonu olan hasta sayısı açısından karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p:0,870). BTM grubunda esansiyel hipertansiyonu olan hasta sayısı 4, kontrol grubunda ise 5 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.10: Esansiyel hipertansiyon için BTM ve kontrol grubu

| | BTM grubu (n:37) | Kontrol grubu (n:41) | p değeri |
|-------------------------|------------------|----------------------|----------|
| Esansiyel hipertansiyon | 4 | 5 | 0,870 |

BTM grubunda Tip 2 Diyabetes Mellitus hastalığı olan hasta sayısı 3, kontrol grubunda da 3 olarak bulunmuştur. İki grup arasında Tip 2 Diyabetes Mellitus hastalığı olan hasta sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p:0,768$).

Tablo 4.11: Tip 2 Diyabetes Mellitus için BTM ve kontrol grubu

| | BTM grubu (n:37) | Kontrol grubu (n:41) | p değeri |
|--------------------------|------------------|----------------------|----------|
| Tip 2 Diyabetes Mellitus | 3 | 3 | 0,768 |

BTM grubu ve kontrol grubu kullanılan ilaçlar açısından karşılaştırıldığında ise iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.12: Kullanılan ilaçlar için BTM ve kontrol grubu

| | BTM grubu (n:37) | Kontrol grubu (n:41) | p değeri |
|-------------------------------|------------------|----------------------|----------|
| Sülfanilüre | 1 | 1 | 0.520 |
| Metformin | 3 | 3 | 0.768 |
| ACE inhibitörü | 1 | 2 | 0.928 |
| Anjiotensin reseptör blokleri | 2 | 1 | 0.928 |
| Amlodipin | 1 | 1 | 0.520 |
| Beta-bloker | 1 | 2 | 0.928 |
| Diüretik | 1 | 1 | 0.520 |

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda baktığımız trombosit aktivasyon markerlarından sCD40L ve sPS, BTM grubundaki hastalarda anlamlı olarak düşük bulunmuştur. CD40/CD40L sistemi TNF ailesine ait olup protrombotik ve proinflamatuvar role sahiptirler (120). CD40 ve CD40L T hücrelerinin, monositlerin, aktif B hücrelerinin, vasküler endotel hücrelerin, düz kas hücrelerinin, dentritik hücrelerin ve aktif trombositlerin üzerinde görülebilir (120). Serum sCD40L trombosit aktivasyonunda ve arterial trombus stabilizasyonunda rol oynamaktadır (121).

sCD40L trombosit aktivasyonunu :

1. P selektin ekspresyonu ve trombosit degranülasyonu
2. Reaktif oksijen ve nitrojen sentezi
3. Trombosit agregasyonu ve trombosit lökosit konjugasyonu yaparak artırmaktadır (122).

sCD40L sadece ileri aterosklerozlu kişilerde değil aynı zamanda genel popülasyonda da prognostik role sahiptir. Yapılan bir çalışmada ateroskleroz risk grubu taşıyan grupla sağlıklı grup arasında yapılan karşılaştırmada bazal sCD40L düzeyi 95 persentilin üzerinde olan sağlıklı gruptaki kişilerde de 4 yıllık izlemde ateroskleroz geliştiği gözlenmiştir (120).

Artmış sCD40L düzeyleri sadece klinik olarak aterosklerotik hastalığı olanlarda değil aynı zamanda aterosklerozun komplikasyonlarını yaşamamış ama ateroskleroz risk faktörlerini taşıyan örneğin; Tip 2 diyabet ve/veya hiperkolesterolemi ve/veya hipertansiyonlu ve/veya obesiteli hastalarda da gösterilmiştir (123).

Bu sonuç ateroskleroz risk faktörlerinin plateletlerden sCD40L salınımını stimule ettiğini düşündürmektedir (123).

P-Selektin plateletlerin alfa granüllerinde ve endotel hücrelerinin Weibel-Palade cisimciklerinde bulunabilen bir adezyon molekülüdür (123). P-selektin hem aktive

platelet hem de aktive endotelin hücre dış yüzeyinde mevcut olmasına rağmen ölçülen sPS'in çoğunluğu platelet orijinlidir (124). Platelet aktivasyonunu takiben yüzey membranında P-Selektin eksprese olur ve daha sonra buradan ayrılarak kana salınır (123). Kan alındıktan sonra hemen plazması ayrılmak şartıyla plazma sPS düzeyi ex vivo artış göstermemektedir. Ayrıca sPS düzeyi antikoagülan kullanımından ve farklı plazma elde etme metodlarından etkilenmediği için güvenilir bir in vivo platelet aktivasyon markerı olarak kullanılabilir (123).

P-Selektin kan hücreleri ile endotel arasındaki interaksiyonda rol oynadığı, bazı lökositlerin ve plateletlerin endotele adezyonundan kısmen sorumlu olduğu için kardiyovasküler olayların prediktörü olarak kullanılabilir (124). Yapılan hayvan deneylerinde de P-Selektin düzeyi düşük olan hayvanların aterosklerotik plak geliştirme eğiliminin azaldığı gösterilmiştir (124). Ayrıca aktif aterosklerotik plakta artmış P-Selektin ekspresyonu varken fibrotik inaktif plakta P-Selektin ekspresyonu yoktur (124).

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada farelerde P-Selektin defekti oluşturulduktan sonra farelerin kanama zamanının uzadığı ve hemorojik lezyonların arttığı gözlenmiştir. Bu farelere normal platelet transfüzyonu yapıldığında ise daha büyük ve daha kalsifiye aterosklerotik plaklarının olduğu gözlenmiştir (125). Koroner arter hastalığı, hipertansiyon ve atriyal fibrilasyon gibi bir takım hastalıklarda plazma sPS düzeyinin arttığı gösterilmiştir ve bu prognozla da ilişkili bulunmuştur (124).

Çalışmamızda sCD40L ve sPS'in BTM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptanması BTM'li hastalarda serebrovasküler ve kardiyovasküler iskemik olayların genel popülasyona göre daha seyrek görülmesi ile ilgili olabilir ve BTM'li hastalarda trombositlerin daha az aktif olduğu hipotezini destekleyebilir. Çünkü çalışmamızda BTM ve kontrol grubunda bulunan kişiler aynı kardiyovasküler risk faktörleri taşımasına rağmen (yaş,cinsiyet,VKİ,lipid profili, tip 2 DM,HT,sigara) BTM grubunda sPS ve sCD40L anlamlı olarak düşük saptanmıştır.

Araştırmamızda baktığımız BTG ve PF4 düzeyleri ise BTM ve kontrol grubunda benzer olarak saptandı. BTG ve PF4 platelet spesifik kemokinler olup platelet alfa granüllerinde depolanırlar. Plateletler aktive olduğu zaman ise kana salınırlar (123). Bu

kemokinlerin yüksek seviyeleri protrombotik ve trombotik hastalarda in vivo platelet aktivasyonunun göstergesi olarak kabul edilmektedir (123).

BTG ve PF4 farklı salınım ve eliminasyon süresi nedeniyle aynı anda bakılmalıdır. Bu sayede in vivo platelet aktivasyonu, in vitro artefakt olarak yüksekliğinden ayrılmış olur (123). PF4 dolaşımdan hızlıca temizlenirken BTG daha uzun bir süre yüksek kalır (123). Temel bilimlerde başlangıçta yapılmış gözlemlere göre bu iki molekül platelet aktivasyonu için ümit verici bir marker gibi görünürken, akut koroner sendromda faydasını gösteren çok az çalışma vardır ve bu çalışmalar netleşmemiş sonuçlar vermiştir. Bizim çalışmamızda da bu iki marker her iki grupta benzer bulunmuştur.

BTM'de şimdiye kadar MPV ve PDW dahil hiçbir in vivo platelet aktivasyon markeri çalışılmamıştır. Sadece in vitro adezyon ve agonistle uyarılmış trombosit fonksiyon testlerinin çalışıldığı iki adet çalışma vardır ve 1978-1979 yıllarında yapılmıştır.

1979 yılında Fernandez de Castro Pompo ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada in vitro platelet fonksiyon testlerinde BTM grubunda kollajen adezyonu kontrol grubu ile benzer iken cam adezyonu BTM grubunda daha düşük bulunmuştur (126).

Agonistle indüklenen platelet agregasyon testlerinde BTM grubunda kontrol grubuna kıyasla kollajen, ADP, adrenalin, araşidonik asit ve trombine azalmış agregasyon cevabı elde edilmiştir. Ristosetine cevap ise her iki grupta benzer bulunmuştur (126). Bu çalışma kolay ekimoz, epistaksis ve menometroraji gibi deri ve mukoza kanamalarının bazı BTM'li ve beta talasemi majorlü hastalarda gözlenmiş olması sebebiyle yapılmıştır (126).

Ayrıca 1978 yılında Eldor ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada daha az sayıda BTM'li hasta grubunda ADP, kollajen, ristosetin ve adrenaline azalmış platelet agregasyon cevabı elde edilmiştir (127).

Bu iki çalışma bizim çalışmamız için ilham kaynağı olmuştur. BTM'li hastaların plateletleri genellikle daha az aktif veya defektif olabilir. Bu durum BTM'de iskemik olayların daha az yaşanmasına sebep olurken bazı BTM'lilerde bu trombosit defekti daha belirgin olup kendini hemorajik eğilim şeklinde gösterebilir.

Çalışmamızda iki trombosit aktivasyon markeri kontrol gurubuna benzer bulunurken iki trombosit aktivasyon markeri kontrol gurubundan düşük bulunmuştur. Aslında BTM de trombositleri aktifleyebilecek bir neden vardır. Bu da BTM li hastalardaki düşük dereceli hemolizdir. Çünkü hemolizin trombositleri aktive ettiği bilinmektedir. Bizim çalışmamızda BTM gurubunda PDW anlamlı olarak daha yüksek iken MPV anlamlı olmayarak daha yüksekti. Bu sonuç BTM de esasen bir miktar trombosit aktivasyonu olduğunu gösterebilir. Buna karşılık iki trombosit aktivasyon markerını kontrol gurubundan düşük iki trombosit aktivasyon markerının kontrol gurubuna benzer bulunması ilginç bir durumdur.

sCD40L ve sPS membran glikoproteinleri grubundan olan trombosit aktivasyon markeri iken BTG ve PF4 alfa granullerinden salınan platelet aktivasyon markerleridir. Buna göre BTM’de trombositlerin membran glikoproteinleri grubu trombosit aktivasyon markerlerinde bir defekt olabilir.

sCD40L ve sPS ile iskemik olaylar arasındaki ilişki PF4 ve BTG’ninkine göre daha güçlü olarak gösterilmiştir. Çalışmamızda sCD40L ve sPS nin düşük bulunması, PF4 ve BTG’nin kontrol grubuna benzer bulunmasından daha çok anlam ifade edebilir.

BTM’lilerde serebrovasküler ve kardiyovasküler iskemik olayların daha seyrek görüldüğünün tespit edildiği bir meta-analizde erkeklerde böyle bir koruyuculuğun olduğu ancak kadınlarda böyle bir durumun söz konusu olmadığı bildirilmiştir (128). Bunun sebebi meta-analizde ele alınan çalışmalarda bayan hasta sayısının erkeklere göre çok düşük olması olabilir veya gerçekten BTM sadece erkek cinsiyette iskemik olaylara karşı koruyucu olabilir (128).

Daha önce bahsettiğimiz gibi BTM’liler kolesterol değerleri daha düşük olduğu, kan basınçları daha seyrek ve ılımlı olarak yükseldiği ve kan viskoziteleri daha düşük olduğu için serebrovasküler ve kardiyovasküler iskemik olayları daha seyrek yaşamış olabilirler (128). Bize göre bu hipotezlerin hepsi geçerli olabilir ve BTM’de iskemik olayların daha seyrek gözlenmesi multifaktöryel olabilir. Ayrıca BTM’de trombosit aktivasyonunun düşük olması da buna katkıda bulunabilir.

Çalışmamız dışlama kriterlerinde bahsedilen şartlar platelet aktivasyon markerlarını etkilediği bilinen veya etkileyebilme ihtimali olan durumlardır. Ancak trombosit aktivasyon markerlarını etkilediği bilinen tip 2 DM ve esansiyel hipertansiyon hastalarını her iki grupta da benzer sayıda olacak şekilde çalışmamıza dahil ettik.

Çalışmaya alınan hasta sayımızın nispeten az olması çalışmamızın bir limitasyonudur.

Çalışmamızın hipotezinin kanıtlanması için flow sitometri metoduyla trombosit aktivasyon markerlarının bakılması ve tam kan in vitro agregasyon testlerinin yapılması gerekmektedir.

Biz bu çalışmayı yaparak daha farklı platelet aktivasyon markerlarının bakıldığı ve farklı platelet aktivasyon marker analiz yöntemlerinin kullanıldığı ve daha büyük popülasyonlarda yapılacak yeni çalışmalara kapı açmış olabiliriz.

Sonuç olarak; BTM'li hastalarda, serebrovasküler ve kardiyovasküler iskemik olayların genel popülasyona göre daha seyrek görülmesinin bir sebebi de BTM'li hastaların hipoaktif trombositlere sahip olması olabilir.

KAYNAKLAR

1. Altinoz MA, Gedikoglu G, Deniz G. B Thalassemia trait association with autoimmune diseases: β globin locus proximity to the immunity genes or role of hemorphins? *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2012 Apr;34(2):181-90. doi: 10.3109/08923973.2011.599391. Epub 2011 Jul 28. Review.
2. Ibba, R.M., Zoppi, M.A., Floris, M., Manca, F., Axiana, C., Cao, A., Monni, G. Neural tube defects in the offspring of thalassemia carriers. *Fetal Diagn Ther* 2003, 18, 5–7.
3. Lam, Y.H., Tang, M.H. Risk of neural tube defects in the offspring of thalassaemia carriers in Hong Kong Chinese. *Prenat Diagn* 1999, 19, 1135–1137.
4. Bencaiova, G., Krafft, A., Burkhardt, T., Zimmermann, R. Hemoglobinopathies, body iron stores and gestational diabetes mellitus. *Haematologica* 2005, 90, 1138–1139.
5. Tong, P.C., Ng, M.C., Ho, C.S., So, W.Y., Li, J.K., Lam, C.W., Cockram, C.S., Chan, J.C. C-reactive protein and insulin resistance in subjects with thalassemia minor and a family history of diabetes. *Diabetes Care* 2002, 25, 1480–1481.
6. Morreale, S. Incidence of thalassaemic trait in patients with diabetes mellitus. *Riv Eur Sci Med Farmacol* 1987, 9, 153–155.
7. Oktenli, C., Bulucu, F. Renal tubular dysfunction in a patient with β -thalassemia minor. *Nephron* 2002, 92, 222–223.
8. Cetin, T., Oktenli, C., Ozgurtas, T., Yenicesu, M., Sanisoglu, S.Y., Oguz, Y., Yildiz, O., Kurt, I., Musabak, U., Bulucu, F., Kocar, I.H. Renal tubular dysfunction in β -thalassemia minor. *Am J Kidney Dis* 2003, 42, 1164–1168.
9. Palma-Carlos, A.G., Palma-Carlos, M.L., Costa, A.C. “Minor” hemoglobinopathies: A risk factor for asthma. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2005, 37, 177–182.
10. Orzincolo, C., Castaldi, G., Scutellari, P.N., Vita, F., Bagni, B. Osteoporosis and the thalassemia “trait”. *Radiol Med* 1993, 85, 23–27.
11. Greep, N., Anderson, A.L., Gallagher, J.C. Thalassemia minor: A risk factor for osteoporosis? *Bone Miner* 1992, 16, 63–72.
12. Pamuk, G.E., Pamuk, O.N., Set, T., Harmandar, O., Yesil, N. An increased prevalence of fibromyalgia in iron deficiency anemia and thalassemia minor and associated factors. *Clin Rheumatol* 2008, 27, 1103–1108.

13. Keşkek SO, Kirim S, Turhan A, Turhan FG. Depression in subjects with beta-thalassemia minor.
14. Lukens JN: The thalassemias and related disorders: Quantitative disorders of hemoglobin synthesis. Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JV and Lukens JN. *Wintrobe's Clinical Hematology*, 9th Ed. Lea&Febiger, Philadelphia, 1993:1102-1145
15. Górriz, L., De León, C., Herrero-Beaumont, G., del Vallado, P.F. Arthritis in β -thalassemia minor. *Arthritis Rheum* 1983, 26, 1292–1293.
16. Montecucco, C., Caporali, R., Rossi, S., Epis, O. Rheumatoid arthritis in β -thalassaemia trait. *Rheumatology (Oxford)* 1999, 38, 1021–1022.
17. Castellino, G., Govoni, M., Trotta, F. Rheumatoid arthritis in β -thalassaemia trait. *Rheumatology (Oxford)* 2000, 39, 1286–1287.
18. Richter, J., Specker, C., Mödder, U., Schneider, M. Arthropathy in β -thalassemia minor. *Med Klin (Munich)* 2000, 95, 40–43.
19. Caporali, R., Bugatti, S., Rossi, S., Cavagna, L., Bogliolo, L., Montecucco, C. Rheumatoid arthritis in β -thalassemic trait: Clinical, serologic and immunogenetic profile. *Joint Bone Spine* 2004, 71, 117–120. 12.
20. Castellino, G., Govoni, M., Padovan, M., Rizzo, N., Trotta, F. Beta thalassaemic trait and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2005, 64, 653–654.
21. Castellino, G., Govoni, M., Trotta, F. β -thalassaemic trait and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2004, 22, 382–383.
22. Dentali F, Romualdi E, Ageno W, Cappellini MD, Mannucci PM. Thalassemia trait and arterial thromboembolic events: a systematic review and a meta-analysis of the literature. *J Thromb Haemost*. 2011 May;9(5):917-21. Review.
23. Fernández de Castro Pombo M, González Barón M, Fernández Zamorano A, Montero JL, López Pastor A. [An assessment of platelet function in beta-thalassaemia (author's transl)]. *Sangre (Barc)*. 1980;25(5):535-40. Spanish. No abstract available.
24. Eldor A Abnormal platelet functions in beta thalassaemia. *Scand J Haematol*. 1978 May;20(5):447- 52.
25. Erişim: (kacr.or.kr/library/item.view) erişim tarihi: 11.08.2004
26. Lukens JN: The thalassemias and related disorders: Quantitative disorders of hemoglobin synthesis. Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JV and Lukens JN. *Wintrobe's Clinical Hematology*, 9th Ed. Lea&Febiger, Philadelphia, 1993:1102-1145
27. Onat T, Eerk K, Sözmén Y.E. *İnsan Biyokimyası*. Ankara: Palme Yayıncılık. 2002: 135, 535-536.

28. Erişim: (chem.purdue.edu/chm 333) erişim tarihi: 12.8.2004
29. Erişim: (globin.cse.psu.edu) erişim 21.05.2004
30. Segel GB, Oski FA:Hematology of the newborn. *General Hematology*. Williams SW, Beutler E, Erslev AJ, Lichttman AM. 4th ed. 1991:100-111
31. Swee L. T. B-thalassemia. *Bailliere's Clinical Haematology* ,1993;6(1):151-175.
32. Altay Ç. Talasemi: tanı ve tedavide yenilikler. XXIX. Ulusal Hematoloji Kongresi.Antalya-Türkiye.7-11
33. Şaşmaz İ. Talassemi majorlü çocuklarda karaciğer ve demir metabolizması. Uzmanlık tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı,Adana,1996.
34. Ulusal Hemoglobinopati Konseyi Kitapçığı. 2th Ed. Tunç B, Timur H.İ, Tarama Programları ve Yöntemleri. Nisan 2003, Antalya.33-42
35. Weatherall D.J, Clegg JB; The Thalassaemia Syndromes. 4th ed. Blackwell Scientific Publication, Oxford,2001:224-225
36. Küçük M. Hemoglobinopatiler. Uysal A,V. Klinik Hematoloji, Ankara, Anadol Yayıncılık, 1984:124-128.
37. Çürük M,A. Hemoglobinopatilerde Tarama ve Tanı Yöntemleri Neler Olmalı? 3. Uluslararası Talasemi Yaz Okulu ve Avrupa Transfüzyon Tıbbı Okulu.Antalya, 20-25.5.2004:157-167
38. Chakraborty d, Bhattacharyya M. Antioxidant defense status of red blood cells of patients with β -thalassemia and E β -thalassemia. *Clinica Chimica Acta*, 2001; 305:(123-129)
39. Schimmelbusch G: Die bultplattchem und die blutgerrinnung wirchows. Arch. J. Path. Anat. 101:201, 1885.
40. Holmsen H and Day H J: The platelet release reaction and its role in platelet aggregation. Acta. Med. Sceand. Suppl. 525:75, 1971.
41. Rosenthal R L, Vyas S B: Morphological studies on the mechanism of viscous metamorphosis of blood platelets. Blood platelets. Brown-Little and Co. Boston. Mass. 89, 1961.
42. Sharp A A: Viscous metamorphosis of blood platelets. A sudy of the relationship to coagulation factors and fibrin formation. Brit. J. Haemat. 4:28, 1958.
43. Sharp A A: Platelet viscous metamorphosis. Blood platelets. Brown and Little Co. Boston. Mass 67, 1961.

44. Ganong, W. F. : Circulation body fluids. Review of Medical Physiology, 14th Ed., Prentice Hall Int. Inc., USA; 436-458, 1989.
45. Wintrobe, M., Lee, G.R., Roggs, D., Bithell, J., Forester, J.: Platelets and megakaryocytes. Clinical Hematology, 8th Edition, Lea and Febigel Company, USA, 355-379, 1981.
46. Willams, W., Beutler, E., Erslew, A., Lichtman, M.: Platelet morphology and function. Hematology, 4th Edition, Mc Graw Hill Book Company, USA, 1121-1135, 1985.
47. Colman, R.W., Hirsh, J., Marder, V.J., Saltzman, E.W. : Biochemistry of the platelet. Hemostasis and Thrombosis, J. B. Lippincott Company, USA, 431-443, 1982.
48. Gerrard, JM.: Platelet aggregation: Cellular regulation and physiologic role. Hospital Practice, 15:89-105, 1988.
49. Zucker, M.B., Nachimas, V.T.: Platelet activation. Arteriosclerosis 5:2-18, 1985.
50. Sodeman, W., Sodeman, T. : Pathophysiology of hemostasis and thrombosis. Sodeman's Pathologic Physiology, 7th Edition, W.B. Saunders Company, USA, 705-759, 1985.
51. Ulutin, O.N. : Platelet morphology. The Platelets, 1st Edition, Kağıt ve Basım İşleri A.Ş., Turkey, 7-36, 1976.
52. Colman, R. W., Hirsh, J., Marder, V. J., Saltzman, E. W. : Platelet secretion. Hemostasis and Thrombosis, J. B. Lippincott Company, USA, 390-403, 1982.
53. Harper A T: Laboratory guide disordered haemostasis. Butter-worth and Co. Ltd. 74, 1970.
54. Holmsen H, Day H J, Pimental A M: Adenine nucleotide metabolism of blood platelets. V. Subcellular localization of some related enzymes. Biochemica et Biophysica Acta. 186:244, 1969.
55. Holmsen H and Weiss H J: Hereditary defect in platelet release reaction caused by a deficiency in storage pool of platelet adenine nucleotide. Brit. J. Haemat. 19:643, 1970.
56. Willams, W., Beutler, E., Erslew, A., Lichtman, M.: Biochemistry and function of platelets. Hematology, 4th Edition, Mc Graw Hill Book Company, USA, 1136-1176, 1985.
57. Wintrobe, M., Lee, G.R., Roggs, D., Bithell, J., Forester, J.: The physiology of primary hemostasis, Clinical Hematology, 8th Edition, Lea and Febigel Company, USA; 380-404, 1981.

58. Ulutin O N, Karaca M: A new way of considering the pathogenesis and investigation about the platelet defect in cases of thrombopathia. *Forum Medicum (İstanbul)*. 2:257, 1956.
59. Frojmovic, M. M., Milton, J. O.: Human platelet size, shape and related functions in health and disease. *Physiol Rev* 62(1): 185-261, 1982.
60. Halam, T.J., Sanchez, A., Rink, T.J.: Stimulus-response coupling in human platelets; changes evoked by PAF in cytoplasmic free Ca²⁺ monitored with the fluorescent calcium indicator quin 2. *Biochem J* 218:819, 1984.
61. Rink, T.J., Smith, S.W. Tsien, R.Y.: Cytoplasmic area Ca²⁺ in human platelets:Ca²⁺ thresholds and Ca-independent activation for shape-change and secretion. *FEBS Letters* 148 (1):21-25, 1982.
62. Colman, R.W., Hirsh, J., Marder, V.J., Saltzman, E.W.: Platelet function and its disorders. *Hemostasis and Thrombosis*, J.B. Lippincott Company, USA, 443-463, 1982.
63. Lopaciuk, S., et al. : Subcellular distribution of fibrinogen and factor XIII in human blood platelets. *Thromb. Res.* 8: 453, 1976.
64. Leung, L., Nachman, R.: Molecular mechanisms of platelet aggregation. *Ann Rev Med* 37: 176-186, 1986.
65. Gerrard, JM.: Platelet aggregation: Cellular regulation and physiologic role. *Hospital Practice*, 15:89-108
66. Haut, MJ. :”Thrombogenesis in Diseases of Blood vessels.” Horwitz, O., McCombs, P., Roberts, B.Lea and Febiger, pp:22-58, (1985).
67. Holmsen, H. : Physiological Functions of platelets. *Annals of Medicine*. 21:23-30 (1989).
68. Steinhubl SR, Moliterno DJ: The role of the platelet in the pathogenesis of atherothrombosis. *Am J Cardiovasc Drugs* 2005;5:399–408.
69. Freedman JE: Molecular regulation of platelet-dependent thrombosis. *Circulation* 2005;112:2725–2734.
70. Vorchheimer DA, Becker R: Platelets in atherothrombosis. *Mayo Clin Proc* 2006;81:59–68.
71. Gawaz M, Langer H, May AE: Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005;115: 3378–3384.
72. Balasubramanian V, Grabowski E, Bini A, Nemerson Y: Platelets, circulating tissue factor, and fibrin colocalize in ex vivo thrombi: real-time fluorescence images of

thrombus formation and propagation under defined flow conditions. *Blood* 2002;100: 2787–2792.

73. Ni H, Freedman J: Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. *Transfus Apher Sci* 2003;28:257–264.
74. Steinhubl SR, Moliterno DJ: The role of the platelet in the pathogenesis of atherothrombosis. *Am J Cardiovasc Drugs* 2005;5:399–408.
75. Niewiarowski S, Proteins secreted by platelet. *Thrombos Haemostas* 38:924, 1977
76. Moore S, Pepper DS, Cash ID, The isolation and characterisation of a platelet-specific beta-globulin (beta-thromboglobulin) and the detection of antiurokinase and antiplasmin released from thrombin-aggregated washed human platelets. *Biochim Biophys Acta* 379:360, 1975
77. Niewiarowski S, Waltz D, James P, et al, Identification and separation of secreted platelet proteins by isoelectric focusing. Evidence that low-affinity platelet factor 4 is converted to β -thromboglobulin by limited proteolysis. *Blood* 50:453, 1980
78. Rucinski B, Niewiarowski S, James P, Walz DA, Budzynski AZ., Antiheparin proteins secreted by human platelets. purification, characterization, and radioimmunoassay. *Blood* 53:47, 1979
79. Kaplan KL, Owen J., Plasma levels of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation in vivo. *Blood* 57:199, 1981
80. Begg G.S., Pepper D.S., Chesterman C.N., Morgan F.J. "Complete covalent structure of human β -thromboglobulin" *Am. Chem. Soc.*, 17, 9, 1739-1744, 1978.
81. Zahavi J., Kakkar V.V.:" β -thromboglobulin- a specific marker of in vivo platelet release reaction". *Thromb. Haemostasis*, 44, 23-29, 1980
82. Kurihara Y., Nakayama H., Nakagawa S.: Plasma β -thromboglobulin and platelet factor 4 in renal insufficiency". *Thromb. Res.*, 18, 557-560,1980.
83. Rasi V., Ikkala E., Torstila I.:"Plasma β -thromboglobulin in acute myocardial infarction". *Thromb. Res.*, 25, 203-212, 1982.
84. Conard J., Terrier E., Baillet M., Horellou M.H., Jaulmes B., Samama M., Baillet J.: "Variations de la β -thromboglobuline au cours de la contraception orale, des valvulopathies appareillees ou non, et de l'embolie pulmonaire". *Nouv. Presse Med.*, 10,16, 1327-1329, 1981.
85. Van Hulsteijn H., Bertina R., Briet E.: "A one-year follow up study of plasma fibrinopeptide A and β -thromboglobulin after deep vein thrombosis and pulmonary embolism". *Thromb. Res.*, 27, 225-229, 1982.

86. Fritschi J., Christe M., Lammle B., Marbet G.A., Berger W., Duckert F.:” Platelet aggregation, β -thromboglobulin and platelet factor 4 in diabetes mellitus and in patients with vasculopathy”. *Thromb. Haemostasis*, 52, 3, 236-239, 1984.
87. Douglas J.T., Blamey S.L., Lowe G.D.O., Carter D.C., Forbes C.D.:”Plasma β -thromboglobulin, fibrinopeptide A and B β 15-42 antigen in relation to postoperative dvt, malignancy and stanazolol treatment”. *Thromb. Haemostasis*, 53, 235-238, 1985.
88. Eva L.Taavo T, Agneta S. Role of platelet P-Selectin and CD40 Ligand in the Induction of Monocytic Tissue Factor Expression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2000;20:2322-2328
89. Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. CD40 Is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation .*Circulation Research* 2003;92:1041-1048
90. Pietravalle F, Lecoanet-Henchoz S, Blasey H, Aubry JP, Elson G, Edgerton MD Bonnefoy JY, Gauchat JF .Human Native Soluble CD40 L is a biologically active trimer ,processed inside microsomes. *The Journal of Biological Chemistry* 1995;271:5965-5967
91. Uwe S; Peter L. CD40 Signaling and plaque instability .*Circulation Research*. 2001;89:1092-1103
92. Chakrabarti S, Varghese S, Vitseve O, Tanriverdi K, Freedman JE. CD40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2428-2434
93. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998;391:591-4
94. Erez O, Romero R, Hoppensteadt D, Fareed J, Chaiiworapongsa T, Kusanovic J, Tovi S, Gotsch F, Than N, Vaisbuch E, Kim C, Espinoza J, Mittal P, Hamil N, Chang C, Mazor M, Hassan S. Premature labor: a state of platelet activation ? *2008;36:2008-20*
95. Lim HS, Blann AD, Chong AY, Freestone B, Lip GY. Plasma vascular endothelial growth factor, angiopoietin-1, and angiopoietin-2 in diabetes: implications for cardiovascular risk and effects of multifactorial intervention. *Diabetes care* 2004;27(12):2918-24
96. Redman CW, Sargent IL: preeclampsia ,the placenta and the maternal systemic inflammatory response -a review .*Placenta* ,2003;24:21-27

97. Natal C, Restituto P, Colina I, Diez J, Varo N. The pro-inflammatory mediator CD40 ligand is increased in the metabolic syndrome and modulated by adiponectin *J Clin Endocrin Metab* 2008;18:247-255
98. Danese S, Katz JA, Saibeni S, Papa A, Gasbarrini A, Vecchi M, Fiocchi C. Activated platelets are the source of elevated levels of soluble CD40 ligand in the circulation of inflammatory bowel disease patients. *Gut* 2003;52:1435-1441
99. Blair PJ, Riley JL, Harlan DM, Abe R, Tadaki DK, Hoffmann SC, White L, Francomano T, Perfetto SJ, Kirk AD, June JH. CD40 Ligand (CD154) Triggers a short-term CD4⁺ T cell activation response that results in secretion of immunomodulatory cytokines and apoptosis. *J EXP Medicine* 2000;4:651-660
100. Varo N, Libby P, Nuzzo R, Italiano, Doria A, Schönbeck U. Elevated release of sCD40 L from platelets of diabetic patients by thrombin, glucose and advanced glycation end products. *Diabetes Vasc Dis Res* 2005;2:81-7
101. Ottaiano A, Pisano C, De Chiara A, Ascierio PA, Botti G, Barletta E, Apice G, Gridelli C, Iaffaioli VR. CD activation as potential tool in malignant neoplasms. *Tumori* 2002;88:361-6
102. Paul L. Friedlander, Christie L. Delaune, Jennifer M. Abadie, Marisa touns, Jeffrey LaCour, Luis Marrero, Qiu Zhong, Jay K. Kolls. Efficacy of CD40 Ligand Gene Therapy in Malignant Mesothelioma. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol* 2003;29:321-330
103. Berg EL, Goldstein LA, Jutila MA, Nakache M, Picker LJ, Streeter PR, Wu NW, Zhou D, Butcher EC. Homing receptors and vascular addressins: Cell adhesion molecules that direct lymphocyte traffic. *Immunol Rev* 1989; 108:5-17.
104. Iwabuchi K, Ohgama J, Ogasawara K, Iwabuchi C, Negishi I, Good RA, Onoe K. Distribution of MEL-14⁺ cells in various lymphoid tissues. *Immunobiol* 1991; 182: 161-73.
105. Carlos TM, Harlan JM., Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994, 84:2069-101
106. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P., The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 1995;9:866-73
107. Bonfanti R, Furie BC, Furie B, Wagner DD., PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* 1989;73:1109-112
108. Lorant DE, Patel KD, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM, Zimmerman GA., Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or

- thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J Cell Biol.* 1991;115:223-34
109. Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, McEver RP, McIntyre TM., Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. *Cell Biol.* 1991 Feb;112:749-59
 110. Corash L, Chen HY, Levin J et al. Regulation of thrombopoiesis effects of the degree of thrombocytopenia on megakaryocyte ploidy and platelet volume. *Blood* 1987; 70: 177–85.
 111. Butkiewicz A, Kemonia H, Dymicka-Piekarska V, Bychowski J: Betatromboglobulin and platelets in unstable angina. *Cardiol Pol* 2003; 58: 449-55.
 112. Braunwald E: Unstable angina. A classification. *Circulation*, 1989; 80: 410–14.
 113. Threutte GA: Usefulness of the mean platelet volume. *Clin Lab Med*, 1993; 13:937–50.
 114. Martin J, Bark PM, Burr ML. Influence of platelet size on outcome after myocardial infarction. *Lancet.* 1991; 338:1409–1411.
 115. Kiliçli-Çamur N, Demirtunç R, Konuralp C, Eskiser A, Ba°aran Y. Could mean platelet volume be a predictive marker for acute myocardial infarction? *Med Sci Monit*, 2005; 11(8): CR387–392.
 116. Alexander Yang, Luciano Pizzulli, Berndt Lüderitz. Mean platelet volume as marker of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty in patients with stable and unstable angina pectoris. *Thrombosis Research* 2005; 49,1–7.
 117. Paul F, Jason Y, Stephen C, Jeremy J, Steve G, Jack G. Chronic expression of platelet adhesion proteins is associated with severe ischemic heart disease in type 2 diabetic patients Chronic platelet activation in diabetic heart patients. 2003;17.269–278.
 118. Konijnenberg A, Joris AM, Ben W, Marianne CL, Lazarov R, Otto P, Boer K, Sturk A. Can flow cytometric detection of platelet activation early in pregnancy predict the occurrence of preeclampsia *Am J Obstet Gynecol.* 1997; 177:434-442.
 119. Faustini M, Bronzo V, Maffeo G, Russo V, Munari E, Vigo D. ReferenceIntervals and Age-related Changes for Platelet Count, Mean Platelet Volume and Plateletcrit in Healthy Pre-weaning Piglets in Italy. *J. Vet. Med. A* 50,466–469 (2003).
 120. Antoniadis C, Bakogiannis C, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Stefanadis C. The CD40/CD40 ligand system: linking inflammation with atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Aug 18;54(8):669-77. Review.

121. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998;391:591-4
122. Erez O, Romero R, Hoppensteadt D, Fareed J, Chaiiworapongsa T, Kusanovic J, Tovi S, Gotsch F, Than N, Vaisbuch E, Kim C, Espinoza J, Mittal P, Hamil N, Chang C, Mazor M, Hassan S. Premature labor: a state of platelet activation? *2008*;36:2008-20
123. Ferroni P, Riondino S, Vazzana N, Santoro N, Guadagni F, Davì G. Biomarkers of platelet activation in acute coronary syndromes. *Thromb Haemost.* 2012 Dec;108(6):1109-23.
124. Blann AD, Nadar SK, Lip GY. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2003 Dec;24(24):2166-79.
125. Subramaniam M¹, Frenette PS, Saffaripour S, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice. *Blood* 1996;87:1238-42.
126. Fernández de Castro Pombo M, González Barón M, Fernández Zamorano A, Montero JL, López Pastor A. [An assessment of platelet function in beta-thalassaemia (author's transl)]. *Sangre (Barc).* 1980;25(5):535-40. Spanish. No abstract available.
127. Eldor A. Abnormal platelet functions in beta thalassaemia. *Scand J Haematol.* 1978 May;20(5):447-52.
128. Dentali F, Romualdi E, Ageno W, Cappellini MD, Mannucci PM. Thalassemia trait and arterial thromboembolic events: a systematic review and a meta-analysis of the literature. *J Thromb Haemost.* 2011 May;9(5):917-21. Review.

