

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

AKUT İMMÜN TROMBOSİTOPENİK PURPURALI
ÇOCUKLARDA MEGA DOZ METİLPREDNİZOLON TEDAVİSİ
ÖNCESİ VE SONRASINDA SİTOKİN PROFİLİ, APOPTOZİS,
GLUKOKORTİKOID RESEPTÖR VE
P-GLİKOPROTEİN EKSPRESYONU

Dr. Emine Esin YALINBAŞ ŞENSES
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR

2008

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

AKUT İMMÜN TROMBOSİTOPENİK PURPURALI
ÇOCUKLARDA MEGA DOZ METİLPREDNİZOLON TEDAVİSİ
ÖNCESİ VE SONRASINDA SİTOKİN PROFİLİ, APOPTOZİS,
GLUKOKORTİKÖİD RESEPTÖR VE
P-GLİKOPROTEİN EKSPRESYONU

Dr . Emine Esin YALINBAŞ ŞENSES
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Özcan BÖR

ESKİŞEHİR
2008

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Emine Esin YALINBAŞ ŞENSES'e ait "Akut immün trombositopenik purpuralı çocuklarda mega doz metilprednizolon tedavisi öncesi ve sonrasında sitokin profili, apoptozis, glukokortikoid reseptör ve P-glikoprotein ekspresyonu" adlı çalışma jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:30.05.2008

Jüri Başkanı	Prof. Dr. Nejat AKGÜN Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	İmza
Üye	Prof. Dr. A.Kadir KOÇAK Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	İmza
Üye	Prof. Dr. Özcan BÖR Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	İmza

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yönetim Kurulu'nun
Tarih ve Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zübeyir KILIÇ
Dekan

TEŞEKKÜR

Eskiőehir Osmangazi Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında yapmıő olduğum uzmanlık eğitimim sũresince bilgi ve deneyimleri ile yol gũsteren, tezimle ilgili her konuda desteğini esirgemeyen tez danıőmanım Prof. Dr. Őzcan BŐR'e, tezimin her aőamasında gũrũőlerinden ve bilgilerinden yararlandığım İć Hastalıkları Anabilim Dalı ve Hematoloji Bilim Dalı baőkanı Prof. Dr. Zafer GũLBAŐ'a teőekkũr ve saygılarımı sunarım. Kan Őrneklelerinin çalıőılması sũrecinde yardımlarından dolayı Hematoloji Laboratuvarı sorumlusu biyolog Gũlcihan DEMİRAL ve Mediha KAYMAK'a, istatistiksel değerlendirmelere katkılarından dolayı Bioistatistik Anabilim Dalı Őęretim ũyesi Yard. Doç. Dr. Fezan ŐAHİN'e, projemize destek veren Eskiőehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araőtırma Projeleri Komisyonu'na teőekkũr ederim.

ÖZET

Yalınbaş Şenses, EE. Akut immün trombositopenik purpuralı çocuklarda megadoz metilprednizolon tedavisi öncesi ve sonrasında sitokin profili, apoptozis, glukokortikoid reseptör ve P-glikoprotein ekspresyonu. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2008. Akut immün trombositopenik purpura (İTP)'nin patogenezinde, trombosit spesifik otoantikor üretimi dışında T lenfositlerin de önemli rolü vardır. Bu çalışmada akut İTP'li hastalarda T lenfositlerde intrasellüler IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ düzeyi ile T lenfosit apoptozisinin patogenezdaki yeri araştırıldı. Ayrıca glukokortikoid tedavisinin bu sitokin profili ve apoptozis üzerine etkisi ile direnç gelişiminde olası mekanizmalardan P-glikoprotein (P-gp) ve glukokortikoid reseptör (GCR) ekspresyonu araştırıldı. Bu amaçla akut İTP tanısı alan, trombosit değerleri $20.000/mm^3$ 'ün altında olan, yaşları 10 ay-17 yaş arasındaki 20 hasta ile 20 sağlıklı kontrol grubu çalışmaya alındı. Akut İTP'li hastalara 1-3. günler 30 mg/kg/gün, 4-7.günler ise 20 mg/kg/gün mega doz metilprednizolon (MDMP) tedavisi verildi. Akut İTP'li hastalarda tedavi öncesi Th lenfositlerde kontrollere göre anlamlı olarak IL-2, IL-4, IL-6 ve IFN- γ düzeylerinde artma saptandı ($p<0.05$). Th1/Th2 oranı için bakılan IFN- γ /IL-4 oranında fark saptanmadı ($p>0.05$). Mega doz metilprednizolon tedavisi öncesi ve sonrası Th lenfositlerde intrasellüler IL-2 ve IFN- γ düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmışken ($p<0.05$), IL-4 ve IL-6 düzeyinde ise farklılık yoktu ($p>0.05$). IFN- γ /IL-4 oranı ise tedavi sonrası tedavi öncesine göre azalmış saptandı ($p<0.05$). Akut İTP'de tedavisi öncesi T lenfositlerde P-gp ekspresyonu ile T lenfosit ve monositlerde GCR ekspresyonunda kontrol grubuyla arasında fark saptanmadı ($p>0.05$). MDMP sonrası P-gp ekspresyonu tedavi öncesine göre anlamlı olarak artmış bulundu ($p<0.05$). Hem T lenfositlerde hem de monositlerde tedavi öncesi ve sonrası GCR ekspresyonu oranında fark yoktu ($p>0.05$). Mega doz metil prednizolon tedavisi öncesi akut İTP'li hastalar ile kontrol grubu arasında T lenfositlerde ve monositlerde geç ve nekrotik apoptozis açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$). Erken apoptozis yüzdesi ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p<0.05$). Tedavi öncesi ve sonrası T lenfositlerde erken apoptozis ve geç apoptoziste fark görülmedi ($p>0.05$), nekrotik apoptoziste anlamlı bir artış saptandı ($p<0.05$). Sonuç olarak çocukluk çağı akut İTP'de Th0 sitokin profilinin görüldüğü, MDMP tedavisinin Th0 sitokin paterni yerine Th2 sitokin paterninin yer almasını sağladığı ve ayrıca T lenfosit apoptozisini indüklediği düşünüldü. P-gp ve GCR ekspresyonunun daha iyi değerlendirilebilmesi için tedaviye direçli olgu sayısının artması gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Akut İTP, sitokinler, P-glikoprotein, glukokortikoid reseptör ekspresyonu, apoptozis, mega doz metil prednizolon

ABSTRACT

Yalinbas Senses, EE. Cytokine profile, apoptosis, glucocorticoid receptor and P-glycoprotein expression before and after mega dose methyl prednisolone treatment in children with acute immune thrombocytopenic purpura. Eskisehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Speciality Thesis, Eskisehir, 2008. T lymphocytes have been implicated to have an important role in the pathogenesis of acute immune thrombocytopenic purpura (ITP) beside the production of platelet specific autoantibodies as a cause of thrombocytopenia. The aim of the study is to investigate the role of Th intracellular IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ and T lymphocyte apoptosis in the pathogenesis of acute ITP. The study also examines the effect of glucocorticoid treatment on cytokine profile and T cell apoptosis, P-glycoprotein (P-gp) and glucocorticoid receptor (GCR) expression changes as possible mechanisms for glucocorticoid resistance. The study includes 20 children between ages of 10 months-17 years with the diagnosis of acute ITP and had a platelet count $<20.000/mm^3$ and 20 healthy children as a control group. Patients with acute ITP were treated with mega dose methylprednisolone (MDMP) in the dose of 30 mg/kg/day between day 1 and 3 and 20 mg/kg/day between day 4 and 7. Before the treatment acute ITP patients had significantly higher Th lymphocyte intracellular IL-2, IL-4, IL-6 and IFN- γ levels compared to control group ($p<0.05$). IFN- γ /IL-4 ratio, as an indicator of Th1/Th2 cytokine profile, was similar between acute ITP pretreatment group and control group ($p>0.05$). Th lymphocyte intracellular IL-2 and IFN- γ levels were significantly lowered with MDMP treatment ($p<0.05$). IL-4 and IL-6 levels showed no difference after MDMP treatment ($p>0.05$). IFN- γ /IL-4 ratio was also lowered with the MDMP treatment ($p<0.05$). T lymphocyte P-gp expression, T lymphocyte and monocyte GCR expression were all similar between acute ITP pretreatment and control groups ($p>0.05$). It was found that T lymphocyte P-gp expression was higher in posttreatment group than pretreatment group ($p<0.05$). Both T lymphocyte and monocyte GCR expression percentages were not different in pre and posttreatment groups ($p>0.05$). There were no significant difference between pretreatment acute ITP group and control group in regard of T lymphocyte late and necrotic apoptosis ($p>0.05$). But early apoptosis in T lymphocytes was significantly lower in pretreatment acute ITP group than control group ($p<0.05$). Although pre and posttreatment T lymphocyte early and late apoptosis percentages were similar ($p>0.05$), necrotic apoptosis in T lymphocytes was significantly increased with MDMP treatment ($p<0.05$). As a conclusion, the study suggested that Th0 cytokine profile is observed in acute ITP and MDMP treatment causes Th0 to Th2 cytokine profile shift and induction of T lymphocyte apoptosis. There is need to have a greater number of resistant cases in order to better evaluate the P-gp and GCR expression in glucocorticoid resistance in acute ITP.

Key words: Acute ITP, cytokines, P-glycoprotein, glucocorticoid receptor expression, apoptosis, mega dose methyl prednisolone

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. İmmün Trombositopenik Purpura.....	4
2.1.1: Patogenez.....	6
2.1.2: İTP’de Genetik.....	11
2.1.3:İTP’deTrombopoez ve Megakaryopoez.....	13
2.1.4: İTP’de Klinik Özellikler.....	13
2.1.5: İTP’de Laboratuvar Bulguları.....	15
2.1.6: İTP’de Tanı.....	17
2.1.7: İTP’de Ayırıcı Tanı.....	17
2.2: İTP Tedavisi.....	18
2.3: Sitokinler.....	24
2.4: Apoptozis.....	27
2.4.1: Apoptozisi Düzenleyen Aracılar.....	29
2.4.2: Apoptozisin İndüklenmesi.....	32
2.5: Glukokortikoid’lerin Etki Mekanizması ve Glukokortikoid Rezistansı, GC’ nin Pleomorfik Etkileri.....	33
2.5.1: Glukokortikoid ile İndüklenmiş Apoptozise Direnç Mekanizmaları.....	34
2.5.2: Yukarı Doğru Mekanizmalar-1: Yetersiz Ligand.....	35
2.5.3: Yukarı Doğru Mekanizmalar-2: Glukokortikoid Reseptör Mutasyonları, Bağlantı Yeri Varyantları veya Yetersiz Ekspresyon.....	36

2.5.4: Hücre Ölümü ya da Aktive Edici Sağkalım Sinyallerini Etkileyen: Aşağı Doğru Mekanizmalar.....	37
2.6: P-glikoprotein.....	38
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	41
4. BULGULAR.....	45
5. TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇLAR.....	70
KAYNAKLAR.....	73

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ATP	Adenozin trifosfat
AİF	Apoptozis-indükleyici faktör
AİHÖ	Aktivasyonun indüklediği hücre ölümü
ALL	Akut lenfoblastik lösemi
ANLL	Akut non lenfoblastik lösemi
ANA	Anti nükleer antikor
antidsDNA	Anti çift sarmallı deoksiribo nükleik asit
ASH	Antijen sunan hücre
BCRP	<i>Breast cancer resistance protein</i>
BSH	<i>British Society of Hematology</i>
CAD	<i>Caspase-activated deoxyribonuclease</i>
CMV	Sitomegalo virüs
CR-1	<i>Complement receptor-1</i>
DIC	Disemine intravasküler koagülasyon
EBV	Ebstein Barr virüsü
ESOGÜTF	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
FcR	Fc reseptörü
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GC	Glukokortikoid
GCR	Glukokortikoid reseptör
G-CSF	Granülosit koloni stimüle edici faktör
GM-CSF	Granulosit makrofaj koloni stimüle edici faktör
GRE	Glukokortikoid responsif element
HLA-DR	İnsan lökosit antijen
HPA	<i>Human platelet antigen</i>
HIV	<i>Human immuno deficiency virus</i>
ICAD	<i>Inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease</i>
IFN- α	İnterferon alfa
IFN- β	İnterferon beta

IFN- γ	İnterferon gama
IL-1	İnterlökin 1
IgA	İmmünglobulin A
IgG	İmmünglobulin G
İTP	İmmün trombositopenik purpura
İVİG	İntravenöz immünglobulin
KKK	Kızamık, kızamıkçık, kabakulak
LRP	<i>Lung resistance protein</i>
M-CSF	Makrofaj koloni stimüle edici faktör
MDMP	Mega doz metil prednisolone
MDR-1	Multi drug rezistans-1
MGDF	<i>Megakaryocyte derived growth faktör</i>
MHC	Major histokompatibilite
mRNA	<i>Messenger</i> Ribonükleik asit
MRP-1	Multi drug rezistans protein-1
MS	Multiple skleroz
MTX	Metotreksat
NATP	Neonatal alloimmün trombositopenik purpura
NİTP	Neonatal idyopatik trombositopenik purpura
NK	Natural killer
NSAİİ	Non steroidal anti inflamatuvar ilaç
OTV	Ortalama trombosit volümü
PAF	Platelet aktive edici faktör
PAIgG	<i>Platelet-associated IgG</i>
PARP	Poli adenzin di fosfat-riboz polimeraz
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
P-gp	P-glikoprotein
PHA	<i>Phytohemagglutinin</i>
PI	<i>Propidium iodide</i>
PMA	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>

PTZ	Protrombin zamanı zamanı
aPTT	Aktive parsiyel tromboplastin
RA	Romatoid artrit
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SLE	Sistemik lupus eritematozus
SSS	Santral sinir sistemi
Tc	Sitotoksik T lenfosit
Th0	<i>T helper 0</i>
Th1	<i>T helper 1</i>
Th2	<i>T helper 2</i>
TNF- α	Tümör nekrozis faktör alfa
TNF- β	Tümör nekrozis faktör beta
TNFR-1	Tümör nekroz faktör reseptörü-1
TPO	Trombopoetin
TRADD	<i>TNFR-1 associated death domain</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa no
2.1: İTP'nin Patogenezi.....	8
2.2: Apoptozis Yolağı.....	29
2.3: Steroid hormonlarının Reseptöre Bağlanması.....	34
2.4: P-glikoprotein molekül yapısı.....	38
4.1: Akut İTP'li hastalarda tedavi öncesi, sonrası ve kontrol grubunda Th intraseküler IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ düzeyleri.....	49
4.2: Akut İTP'li hastalarda tedavi öncesi, sonrası ve kontrol grubunda IFN- γ /IL-4 oranı.....	50
4.3: Akut İTP'li hastalarda tedavi öncesi, sonrası ve kontrol grubunda T lenfositlerde P-gp ekspresyonu.....	52
4.4: Akut İTP'li hastalarda tedavi öncesi, sonrası ve kontrol grubunda T hücre ve monosit yüzeyinde GCR ekspresyonu.....	53
4.5: Akut İTP'li hastalarda tedavi öncesi, sonrası ve kontrol grubunda T hücrelerinde apoptozis.....	55

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa no
2.1: Akut ve Kronik İTP'nin klinik özellikleri.....	14
2.2: Çocuklarda Akut İTP'de başlangıç tedavisi.....	19
2.3: İTP tedavisinde kullanılan ajanların etki mekanizmaları.....	23
2.4: Apoptotik ve nekrotik hücrenin özellikleri.....	28
2.5: İnsan ABC üst familyasına ait taşıyıcı proteinlerin özellikleri.....	39
4.1: Akut İTP'li hastalarda ve kontrol grubunda yaş ve cinsiyet dağılımı.....	45
4.2: Akut İTP'li hastalarda ve kontrol grubunda tedavi öncesi trombosit, beyaz küre ve absolü lenfosit sayısı.....	46
4.3: Akut İTP'li hastalarda tedavi öncesi ve sonrasında trombosit, beyaz küre ve absolü lenfosit sayıları.....	46
4.4: Tedavi öncesi akut İTP'li hastalarda ve kontrol grubunda CD4+T lenfosit intrasellüler IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ düzeyleri ve IFN- γ /IL-4 oranı.....	47
4.5: Tedavi sonrası akut İTP'li hastalarda ve kontrol grubunda CD4+T lenfosit intrasellüler IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ düzeyleri ve IFN- γ /IL-4 oranı.....	48
4.6: Akut İTP'li hastalarda tedavi öncesi ve sonrası CD4+T lenfosit intrasellüler IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ düzeyleri ve IFN- γ /IL-4 oranı.....	49
4.7: Tedavi öncesi akut İTP'li hastalarda ve kontrol grubunda T hücrelerinde P-gp ekspresyonu, T hücre ve monosit yüzeyindeki glukokortikoid reseptör ekspresyonu.....	51
4.8: Akut İTP'li hastalarda tedavi öncesi ve sonrası T hücrelerinde P-gp ekspresyonu, T hücre ve monosit yüzeyindeki glukokortikoid reseptör ekspresyonu.	52
4.9: Tedavi öncesi akut İTP'li hastalarda ve kontrol grubunda T hücrelerinde erken, geç ve nekrotik apoptozis.....	54
4.10: Akut İTP'li hastalarda tedavi öncesi ve sonrasında T hücrelerinde erken, geç ve nekrotik apoptozis.....	54

1. GİRİŞ

İmmün trombositopenik purpura (İTP), idiopatik trombositopenik purpura olarak da bilinen, trombositopeni, trombosit yaşam süresinde kısalma, plazmada anti-trombosit antikor varlığı ve kemik iliğinde artmış megakaryositlerle karakterize edinsel otoimmün bir hastalıktır (1, 2). Yıllık insidansı 1/10.000 olup, çocuklarda en sık görülme yaşı 2-10 yaşdır (4-8 yaş arası pik yapar) (3). Çocukluk çağında İTP sıklıkla viral bir hastalığı takiben akut bir başlangıç gösterir. (4). Birçok olguda (%80) spesifik bir tedavi gerektirmez ve altı ay içinde spontan remisyon gözlenir. Olguların yaklaşık % 10-20'sinde trombositopeni 6 aydan daha uzun sürmektedir ve kronik İTP olarak tanımlanır. Hastalığın sinsi başlangıçlı olması ve 10 yaşın üzerinde tanı alması kronik İTP için risk faktörü olduğu bildirilmiştir (5, 6).

İmmün trombositopenik purpurada klinik semptom ve bulguların sebebi dalak, karaciğer ve kemik iliğinde trombosit yıkım hızının artmasıdır (7). İTP'li çocukların %50-60'ında önceden geçirilmiş viral enfeksiyonlar tanımlanmıştır. Viral enfeksiyonlardan birkaç hafta sonra çocukların bir kısmında trombosit yüzeyine karşı yönelmiş antikorlar gelişmektedir (8). Antikorla kaplı trombositlerin yıkımı üç farklı yolla olabilir. İlk olarak kompleman kaskadının direkt aktivasyonu ile membran atak kompleksinin oluşumu ve bu kompleksin trombosit membranında delikler oluşturarak trombosit lizisine yol açmasıdır. Diğer iki mekanizma ise kompleman reseptörü (CR1) ve/veya Fcγ reseptörü (FcγR) aracılığıyla makrofajların trombositleri fagosite etmesidir (8). İTP'de oluşan antikorların trombosit yüzeyindeki GpIIbIIIa'ya karşı olduğu gösterilmiş olmakla beraber sonraki çalışmalarda çoğu İTP hastasının plazmasında ve trombositleri üzerinde GpIIbIIIa, GpIbIX, GpIaIIa, GpV, GpIV ve diğer spesifik trombosit glikoproteinlerine karşı IgG, IgA ve/veya IgM tipinde otoantikorlar tanımlanmıştır. Bu glikoproteinlere karşı bulunan antikorların megakaryositlere de bağlandığı ve in vitro şartlarda megakaryosit üretimini azalttığı gösterilmiştir. Bu antikorların megakaryositlerin çoğalmalarını ve matürasyonlarını engelleyebileceği, hatta erken yıkılmalarına sebep olabileceği düşünülmektedir (7).

İmmün trombositopenik purpura patogeneğinde trombositlere karşı oluşan otoantikorlar dışında başka mekanizmalarında olduğu rapor edilmiştir. Hücrel immünite disfonksiyonunun patogeneşte önemli rolü olduğu bildirilmektedir. Hücrel immünite disfonksiyonu; aktive trombosit-spesifik otoreaktif T lenfositler

aracılığıyla otolog trombosit antijenlerin tanınması ve B hücreleri tarafından trombosit reaktif antikor üretimine neden olması yanında sitotoksik T lenfosit (Tc) aktivasyonunu içermektedir (9). Son yapılan çalışmalar viral bir enfeksiyonu takiben İTP’de proinflamatuvar bir sitokin hakimiyeti (IL-2, IFN- γ , TNF- α) olduğunu ortaya koymuştur (10). Hem proinflamatuvar sitokinler hem de bazı çocuklarda persiste eden T hücre repertuarı daha önce baskılanmış olan trombosit membran antijenlerine bağlanan otoantikorların ortaya çıkmasına ortam sağlamaktadır. Bu hastalarda başvuruda, T hücre profili Th0 ve/veya Th1, sitokinlerden de interlökin 1-alfa (IL-1 α) veya interlökin 1-beta (IL-1 β)’nın artması, IL-4’ün azalması şeklinde bulunmuştur (10). T hücre aktivitesi makrofajların aktivasyonunu, kompleman bağlayıcı antikor oluşumunu ve CD8+ T hücrelerde sitotoksik aktiviteyi indükler. İTP’deki immünolojik profili araştırmak amacıyla yapılan çalışmaların sonuçlarında farklılıklar vardır (11-13). Çalışmaların çoğunun hem erişkin hem de kronik İTP’li olgularda yapıldığı görülmektedir. Çocukluk çağı akut İTP’li olguların yer aldığı bir çalışmada bu olgularda Th0 sitokin profili bildirilmiştir (14).

Apoptosis immün sistemin normal gelişimi ve dengesi için önemlidir. Son yıllarda immatür otoreaktif T lenfositlerin timustaki negatif seleksiyonla yok edilmesinde apoptozisin başarısızlığı nedeniyle otoimmün hastalıkların oluşabileceği bildirilmiştir (15). Matür otoreaktif T-hücre klonlarının ise aktivasyonun indüklediği hücre ölümü (AİHÖ) yoluyla periferde yok edildiği gösterilmiştir (16). AİHÖ, T lenfositlerde farklı mekanizmalarla oluşabilir. Bunlardan en iyi tanımlanan Fas/FasL yoludur. Aktif İTP’lilerde aktive T lenfositlerin AİHÖ yoluyla apoptozise dirençlerinin artması otoreaktif T lenfositlerin yok edilmesinde defekte neden olabilmektedir (17). Bu nedenle T lenfositlerde AİHÖ’ne direncin düzelmesi İTP’li hastalarda remisyon sürecinin sağlanmasında önemli bir mekanizma olabilir.

İmmün trombositopenik purpuranın tedavisinde steroid veya intravenöz immünglobülin (İVİG) kullanılabilir (18). Steroidler birçok ülkede İVİG’e göre ucuz olması nedeni ile tercih edilmekte ancak uzun süreli ve tekrarlayan dozlarda kullanıldığında kilo artımı, büyüme geriliği, hiperglisemi, davranış değişiklikleri, hipertansiyon, katarakt ve osteoporoz gibi steroidlere bağlı yan etkilere neden olduğu bilinmektedir (19, 20). İTP’de steroidler vasküler stabiliteyi artırarak, antikor üretimini ve antikor ile kaplı trombositlerin klirensini azaltarak etki göstermektedir

(21). Steroidler ile farklı doz ve tedavi süresi öneren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Genellikle ülkemizde akut İTP'de mega doz metilprednizolon (MDMP) tedavisi intravenöz olarak ilk 3 gün 30mg/kg/gün, sonraki 4 gün 20 mg/kg/gün olarak kullanılmaktadır. MDMP tedavisi ile 2. haftada tedaviye yanıt oranı %84-95 olarak bildirilmiştir. Bu tedavi ile hastalarda etkin trombosit sayısında yükselme sağlanmakta ve yan etkilerden kaçınılmaktadır (22-24).

Glukokortikoid (GC) tedavisine her zaman yeterli yanıt alınamamaktadır (25) Otoimmün ve neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanılan GC'lere karşı rezistans gelişim mekanizmalarıyla ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur (26,27). Öne sürülmüş mekanizmalardan biri P-glikoprotein (P-gp) fonksiyonunun artmasıdır. Hücre membranında taşıyıcı protein olarak tanımlanan P-gp'nin hücre içi bazı ilaçların birikimini azalttığı saptanmış ve bu artmış fonksiyondan yedinci kromozom üzerinde bulunan multi drug rezistans-1 (MDR-1) geninin aşırı ekspresyonu sorumlu tutulmuştur. İTP tedavisinde kullanılan GC'ler P-gp substratıdır, tedaviye bağımlı, refrakter İTP'li olgularda yapılan az sayıdaki çalışmalarda lenfosit P-gp fonksiyonunda artış saptanmıştır (28, 29).

Glukokortikoid rezistansı ile ilişkili öne sürülmüş diğer bir mekanizma da reseptör ekspresyon seviyesinde azalma ve çeşitli reseptör subtiplerinin ekspresyonunda olan farklılıklardır (30). Bu konuda İTP'li olgularda yapılmış olan bir çalışmada glukokortikoid duyarlı ve rezistans olgular arasında alfa reseptör ekspresyonu benzer bulunmuşken beta izoform-mRNA ekspresyonu rezistan grupta duyarlı gruba göre anlamlı olarak artmış saptanmıştır (31). Nefrotik sendromlu ve akut lenfoblastik lösemi (ALL)'li olgularda yapılan çalışmalarda düşük glukokortikoid reseptör (GCR) ekspresyonunun tedaviye kötü yanıtla ilişkili olabileceği gösterilmiştir (30, 32, 33).

Bu çalışmada akut İTP tanısı alan çocuklarda mega doz metilprednizolon tedavisi öncesi ve sonrasında sitokin profilinin (IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ), apoptozisin ve glukokortikoid reseptör ile P-gp ekspresyonunun İTP patogenezi veya glukokortikoid tedavisi ile ilişkisinin araştırılması planladı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1: İmmün (İdiyopatik) Trombositopenik Purpura

Trombositler 1-4 μm büyüklüğünde olup, $150.000-400.000/\text{mm}^3$ sayısındadır. Ortalama trombosit volumü (OTV) $8.9\pm 1.5\mu\text{m}^3$ 'dür. Trombositlerin yaşam süresi 7-10 gündür, 1/3'ü dalakta, 2/3'ü de dolaşımda bulunur (1).

Trombositler hemostazının birinci fazının önemli bir bileşenidir. Sayıca azaldığında veya fonksiyonunda defekt olduğunda kanama görülebilir. Kanama daha çok deri ve mukoz membranlarda (peteşi, purpura, ekimoz, epistaksis gibi), hematüri, menoraji, gastrointestinal kanama şeklinde olmaktadır (1).

İmmün trombositopenik purpura, trombositopeni (trombosit sayısı $100000/\text{mm}^3$ 'ün altında), kısalmış trombosit ömrü, plazmada anti-trombosit antikor varlığı ve kemik iliğinde artmış megakaryositlerle karakterize akkiz otoimmün bir hastalıktır (1,4). İTP'nin ilk klinik tanımını 1735'de P. G Werlhof'un (34) bir hastasında vücudunda oluşan mor lekeleri "*morbus maculosus hemorrhagicus*" olarak tarif ederek yaptığı belirtilmiştir (4, 35, 36). Georges Hayem 1883'te trombositleri ve fonksiyonlarını tanımlayarak kanda ölçümlerini sağlayan bir metod geliştirmiş ve kısa bir süre sonra purpuranın düşük trombosit sayısına bağlı olduğu saptanmıştır (35-37). İlk kez 1951'de William J Harrington (38) trombositopenik hastaların plazmasını sağlıklı kişilere transfüze etmiş, bu kişilerde geçici trombositopeni oluşturarak "trombositopenik faktör"ün varlığını kanıtlamıştır (34, 35). Evans ve ark. (39) bu plazma faktörünün antitrombosit antikor olduğunu saptamıştır. Shulman ve ark. (40) serolojik yöntemlerle tanımlanan bu antikorun IgG olduğunu göstermişlerdir. 1982'de Van Leeuwen ve ark. (41) kronik İTP'li hastalardan elde edilen antikorların, trombositlerinde glikoprotein (Gp) IIbIIIa bulunmayan (Glanzman's trombasteni) hastalara verdiğinde bu hastaların trombositlerine bağlanmadığını göstermişler ve ilk kez İTP'de oluşan antikorların trombosit yüzeyindeki Gp IIbIIIa'ya karşı oluştuğunu saptamışlardır (41, 42).

İmmün trombositopeni primer, sekonder ve neonatal immün trombositopeni olarak üçe ayrılır (1, 43).

Primer immün trombositopeni, immün trombositopenik purpuradır. Burada trombosit membranındaki glikoproteinlere karşı otoantikor oluşumu mevcuttur.

Bunun yanında patogeneğinde birden fazla mekanizmanın da rol aldığı bilinmemektedir.

Sekonder immün trombositopeninin nedenleri arasında; enfeksiyonlara bağlı (viral- *Human immuno deficiency virus* (HIV), Sitomegalo virüs (CMV), Epstein Barr virüsü (EBV), varisella, kızamıkçık-kızamık-kabakulak (KKK), boğmaca, hepatit, parvovirüs B19, bakteriyel- tuberkuloz, tifo vb), ilaca bağlı trombositopeni (asetaminofen, ibuprofen, etambutol, penisilin grubu, sefalosporinler, sulfonamidler, antineoplastik ilaçlardan aktinomisin-D vb.), transfüzyon sonrası purpura, otoimmün hemolitik anemi (Evans Sendromu), sistemik lupus eritamatozus (SLE), lenfoproliferatif hastalıklar, myelodisplazi, agammaglobulinemi veya hipogammaglobulinemi ve hipertiroidizm sayılabilir.

Neonatal trombositopeni; neonatal idiyopatik trombositopenik (NİTP) ve neonatal alloimmün (izoimmün) trombositopenik purpura (NATP) bu grupta yer almaktadır. NİTP, İTP'li gebelerin maternal IgG tipi antikorlarının fetal dolaşıma geçmesiyle fetal trombositlerin yıkılması sonucu meydana gelmektedir. NATP, normal trombosit sayısına sahip (özellikle gebelikleri sırasında etkilenmiş yenidoğan öyküsü olan) annelerden doğan trombositopenik bebeklerde görülebilmektedir. Fetal ve maternal trombosit antijenleri arasında uygunsuzluk bulunan trombositlerin plesanta yolu ile geçişinden kaynaklanmaktadır. En sık trombosit antijen sistemleri *human platelet antigen* (HPA)-1a veya P1^{A1} ile ilişkilendirilmektedir. HPA'lara karşı oluşan antikorlar trombosit agregasyonuna engel olmakta ve trombositlerde fonksiyonel defekte yol açmaktadırlar (1).

İTP akut, kronik veya rekürren olabilir. Çocuklarda akut form daha yaygındır. Akut formda, trombosit sayısı tanıdan sonraki 6 ay içinde normale ($>150\ 000/\text{mm}^3$) döner ve relaps görülmez (1, 10). Akut İTP'de olguların %60-75'inde trombositopeni verilen tedaviden bağımsız olarak 2-4 ayda düzelir. Akut İTP'de 1-7 yaş arası erkek ve kız çocuklarda eşit insidans vardır (10). Akut İTP'li olguların %10-20'sinde trombositopeni 6 aydan sonra da persiste etmekte olup bu durum kronik İTP olarak adlandırılır (44). Bununla beraber 6 ayın sonunda hala trombositopenisi düzelmeyen yaklaşık %25 çocuğun 12 ay sonunda remisyona girdiği (trombosit $>150.000/\text{mm}^3$) bildirilmiştir (45).

Kronik İTP’de, trombosit sayısındaki düşüklük 6 aydan uzun sürelidir. Hastalığın sinsi başlangıçlı olması ve 10 yaşın üzerinde tanı almasının da kronik İTP için risk faktörü olduğu bildirilmektedir (6).

Kronik olguların bir kısmında görülen ve 3 aydan daha uzun süreli trombositopeni atakları ile seyreden rekurren İTP, çocukların %1-4’ünde görülmekte ve kronik İTP’nin bir formu olarak değerlendirilmektedir. Rekurren formda trombosit sayısı normale döndükten sonra tekrar azalır. Erişkinlerde kronik form daha yaygınken, bayanlarda daha sık görülür ve mevsimsel değişkenlik göstermez (46).

Kronik refrakter İTP; 6 aydan 12 aya kadar süren standart tedavi sonunda hastaların trombosit sayısının $30.000/mm^3$ ün üzerinde olmaması (tedaviye dirençli) olarak tanımlanmaktadır. Bu grup, İTP hastalarının küçük bir alt grubunu (%9) oluşturur ve klinik olarak değişkenlik göstermektedir (47).

2.1.1: Patogenez

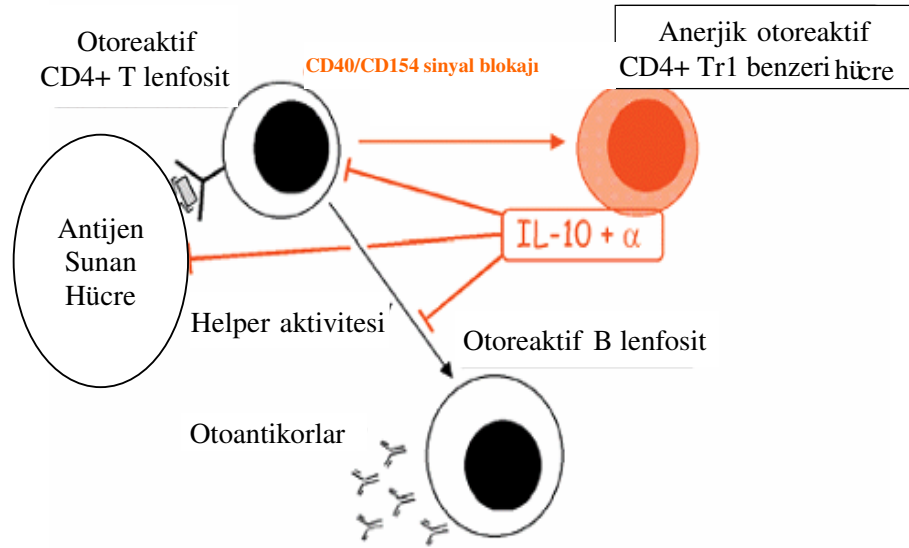
İmmün trombositopenik purpura, trombosit membran glikoproteinlerine karşı olan antikorlar (Gp IIb/IIIa, GpIb/IX, GpIa/IIa, Gp V ve Gp IV gibi) nedeniyle oluşur. Antikorlar İTP’li hastaların trombositlerinin üzerinde veya plazmada antijen yakalama metodu ile saptanabilmektedir. Ancak İTP hala bir klinik tanıdır ve trombosit antikor testlerle tanı konması ya da dışlanması güvenilir değildir (1).

Son yıllarda yapılan çalışmalar viral veya çevresel nedenle oluşan İTP’de proinflamatuvar bir sitokin hakimiyeti olduğunu ortaya koymuştur (10). Hem proinflamatuvar sitokinler hem de bazı çocuklarda T hücre repertuarı daha önce baskılanmış olan trombosit membran antijenlerine bağlanan otoantikorların ortaya çıkmasına serbest bir ortam sağlamaktadır. Bakteriyel veya viral antijenlerle hastanın kendi antijenleri arasındaki moleküler benzeşmenin otoimmüniteyi başlatabileceği düşünülmektedir (48). Trombosit spesifik antikorlar genellikle enfeksiyondan 4-8 hafta sonra ortaya çıkmaktadır. Otoantikorların oluşumu hücrel ve humoral sistemler tarafından düzenlenmekte ve kontrol edilmektedir (10, 49).

Antikorlarla ilgili yapılan ilk çalışmalarda İTP’de varolan antikorların trombosit yüzeyindeki GpIIbIIIa’ya karşı olduğu saptanmıştır. Daha sonraki çalışmalarda İTP hastalarının plazmasında ve trombositleri üzerinde GpIIbIIIa ($\alpha 2\beta 3$), GpIbIX, GpIaIIa, GpV, GpIV ve diğer spesifik glikoproteinlere karşı IgG,

IgA, IgM tipinde otoantikolar tanımlanmıştır (21, 50). Genellikle hastalarda birden fazla glikoproteine karşı antikolar saptanmaktadır. Hastaların %50-85'inde IgG tipi otoantikolar, %50'sinde diğer tip antikolar tespit edilmiştir. İTP'li çocukların çoğunda çok düşük trombosit sayılarına rağmen ağır kanamaların görülmemesi, antikoların trombositlerin yıkımına neden olduğu ancak trombosit fonksiyonlarını bozmadığını düşündürmektedir (51, 52). Antikolarla kaplı trombositler dalağa geldiklerinde Fc reseptör (FcR) aracılığı ile mononükleer fagositler tarafından dolaşımdan uzaklaştırılırlar. Trombositlere karşı oluşan antikoların aynı zamanda megakaryositlerin de üzerinde bulunan GpIIbIIIa ve GpIb-IX gibi reseptörlere de bağlanarak megakaryosit üretimini azalttığı gösterilmiştir. Bu antikoların aynı zamanda megakaryositlerin proliferasyonu, maturasyonu ve erken yıkılmalarına da neden olabileceği düşünülmektedir (53-55).

Yabancı bir antijene karşı humoral immün yanıtın başlaması pek çok hücre tipinin ve onların salgıladığı ürünlerin kompleks biyolojik ilişkileriyle gerçekleşir. İmmün yanıt, hücre yüzey glikoproteini gibi bir antijenin ilk kez antijen sunan hücre (ASH) ile etkileşimi sonucu başlamaktadır (Şekil 2.1). ASH'ler genellikle major histokompatibilite kompleks (MHC) klas II pozitif makrofajlar ve dendritik hücreler ile bazı durumlarda B hücreleridir. Antijenin ASH tarafından hücre içine alınımını takiben antijen proteolitik degradasyon ile daha küçük antijenik parçalara bölünür. Daha sonra bu antijenik peptidler ASH'nin hücre membranına taşınır ve burada antijen spesifik T *helper* (Th) lenfositlere sunum için MHC-klass II molekülleri ile beraber yeniden eksprese edilirler (37). MHC- peptid kompleksi CD4+ T hücresi üzerindeki T hücre reseptörü ile yeterli affinite sağlandığı zaman, antijen spesifik sinyal 1 başlamakta ve hem ASH hem de T hücrelerinde bir dizi koordine moleküler olaylar sonrası sinyal 2 oluşmakta ardından T hücre aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır.



Şekil 2.1: İTP'nin patogenezi- Kuwana M. (56)'den alınmıştır.

Bu T hücre veya ASH olayları B hücrelerinin plazma hücrelerine diferansiyasyonunu ve antijen spesifik IgG antikorlar üretimini stimüle edebilir (49). Böylelikle antijen spesifik Th hücrelerindeki herhangi bir defekt veya anormal stimülasyon bu immün yanıtın seyrini önemli ölçüde değiştirebilmektedir. Bu durum Th hücrelerinin yabancı antijene karşı antikor geliştirip geliştirmeyeceğini belirlemede, ayrıca antikor üretimi olduğunda yanıtın düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Ayrıca antikor affinite maturasyonu gibi olayların stimülasyonu, regülatuar T hücreleri ve/veya solubl sitokinlerin düzenlenmesi gibi pek çok olayda hayati öneme sahiptir (49).

İmmün trombositopenik purpurada başlangıçta enfeksiyon ajanının epitopuna spesifik T hücre yanıtı oluşmaktadır. Fakat zamanla T hücreleri genişleyerek yeni T hücre klonları oluşmakta, aynı proteinin farklı bölümleri reaksiyona girerek bu epitoplara karşı daha önceden tolerans geliştiren otoreaktif B hücrelerini uyarmaktadırlar (57, 58). Bilindiği gibi trombosit yüzeyindeki GpIIb/IIIa, otoantikörler tarafından tanınarak antijen sunan hücrelere (makrofaj ve dendritik hücreler) Fc reseptörleri aracılığı ile bağlanmakta ve hücre içine alınarak degrade edilmektedir. Ancak antijen sunan hücreler sadece GpIIb/IIIa'yı degrade ederken diğer trombosit glikoproteinlerinden yeni kriptik epitoplara oluştururlar. Aktive olmuş antijen sunan hücreler yeni peptidleri (CD40-CD40L interaksyonu yardımı ile) hücre yüzeyinde ekspres ederek sitokinler aracılığı ile CD4+T hücre klonlarının (T-

hücre klon1 ve T-hücre klon2) proliferasyonunu başlatır. Yeni trombosit antiijenlerinin B hücre immünglobulin reseptörleri proliferer olur ve antiGpIIb/IIIa yanında, antiGpIb/IX antikoları sentezide artmaktadır. Bu durum İTP'de “*epitop spreading*” olarak tanımlanmaktadır (21, 49).

T hücreleri aktive olduğunda bu hücrelerin yanıtları salgılandıkları sitokin ürünleri ile genellikle ayırt edilebilmektedir (49). Th1 yanıtı primer olarak IL-2, IFN- γ , granülosit koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) varlığı ile karakterizedir ve gecikmiş tip hipersensivite reaksiyonu ve primer olarak kompleman fiske IgG izotiplerinin sentezi ile ilişkilidir (49). Bunun yanında Th2 yanıtı IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 üretimi ve non kompleman fiske IgG ile özellikle IgE sentezine aracılık etmesi ile karakterizedir (49). Th0 sitokin yanıtının ise Th1 ile Th2 yanıtlarına aracılık eden hücrelerden daha az diferansiye Th hücrelerinden oluştuğu düşünülmektedir. Çünkü bu Th1/Th2 sitokinlerinin çoğu ya da hepsi Th0 yanıtında mevcuttur. Bu sitokin yanıtlarının ASH ile Th hücreleri arasındaki koordineli olaylar neticesinde geliştiği düşünülmektedir (49). Th1 ve Th2 alt tipleri genellikle IFN- γ /IL-4 üretimine göre tanımlanlanmaktadır, çünkü IL-2, IL-6 ve IL-10 üretimi sadece tek bir alt tip ile sınırlı değildir (59).

Self toleransın kırılması, merkezi toleransın başarısızlığı sonucu otreaktif T hücrelerinin anormal birikimi, self-antiijenleri taklit edebilir. Çevresel uyarılar (antiijenik taklit) aberran self antiijen ekspresyonu, sitokin sekresyon ve/veya kostimülasyonda defektler gibi bir dizi mekanizma sonucu oluşabilir. Organ spesifik otoimmün hastalıklar primer olarak özel dokulara yönelmiştir örneğin, tip I diabette insülin üreten β hücreler, Graves hastalığında tiroid hücreleri ve İTP'de trombositler gibi (60). Organ spesifik otoimmünitede otoantikör üretimi T hücre aktivasyonuna bağlıdır. Çoğu otoimmün hastalıkta, otreaktif T hücreleri ve sitokin profilleri tanımlanmış olmakla beraber asıl hastalık indükleyici otoantiijenler ve anormal T hücre aktivasyonu etiyolojisi hala anlaşılması zordur (49). Organ spesifik otoimmün hastalıklar genellikle sitokin paterninde kayma ile ilişkilidir. Çoğu aktif organ spesifik otoimmünitenin proinflamatuvar Th1 yanıtı ile ilişkili olma eğilimi varken genelde Th2 immün yanıtı otoimmüniteden korunma ile ilişkilidir (49).

Başvuru sırasında İTP'de immün durumu değerlendirmek için Sood ve ark (61) tarafından yapılan bir çalışmada, her bir döngüde 24 473 ayrı genin kullanıldığı

tam kan gen ekspresyonu mikroarray çalışmasında, İTP'nin erken dönemlerinde IFN- γ 'ya bağlı genlerin ekspresyonunda artış, yani proinflamatuvar ve Th1 hakimiyetini destekleyen bulgular gösterilmiştir. Bunun yanında birkaç çalışmada çocukluk çağı İTP'de inflamatuvar sitokin persistansı ve bozulmuş T hücre apoptozisi bildirilmiştir (17, 48, 62-64).

İmmün trombositopenik purpura patogeneğinde T hücre apoptozisi de önemli rol oynamaktadır. Timustaki negatif seleksiyon nedeniyle potansiyel olarak patojenik, immatür otoreaktif T lenfositlerin ortadan kaldırılmasında apoptozisin başarısızlığının otoimmün hastalıkların patogeneğinde yer alabileceğine dair son yıllarda çeşitli veriler yayınlanmıştır. Bununla beraber, otoreaktif klonlar sağlıklı kişilerde de mevcuttur ancak bir immün yanıtı neden olmazlar. Bu durum ya T hücre reseptörün antijene olan düşük affinitesinden ya da sitokin sekresyonu, proliferasyon ve diferansiyasyona bir klonun yanıt vermedeki başarısızlığı olarak tanımlanan tolerans nedeniyle olmaktadır. Ayrıca bu matür otoreaktif T-hücre klonlarının AİHÖ yoluyla periferde de yok edildiği gösterilmiştir. AİHÖ T hücrelerinde farklı ölüm yolları ile indüklenebilir, bunlardan en iyi tanımlanmış olanı Fas/FasL'dir. Fas'ın ayrıca aktive lenfositlerde upregüle edildiği de gösterilmiştir. AİHÖ için diğer aday yollar ise TNF- α , IFN- γ ve IL-2'yi içermektedir. Ancak hücredeki apoptotik süreçte pek çok protein rol almakta ve bu durum aktif İTP'li olgularda gözlenen AİHÖ'ne rezistanstan sorumlu yolu tanımlamayı zorlaştırmaktadır (15, 17, 65)

Çocukluk çağı İTP'de, anahtar patolojik olay daha önce salgılanmış olan otoantikörlerin supresyonunda olan başarısızlık olabilir (66). Özellikle CD25+ T regulatuar hücrelerle karakterize T lenfosit yollarının 2-5 yaş çocuklarda tam matür olmayabileceği ve böylelikle viral antijenlerle çapraz reaktivite nedeni timusta delesyondan kaçan B lenfositlerce otoimmün antikor üretimi ve antijen sunumuna olanak sağladığı öne sürülmüştür. Bu hastalarda başvuru anında T hücre profili ve sitokinler Th1 yanıtı, IL-1 α veya IL-1 β artması ve IL-4 azalması ile uyumlu olup bu durum juvenil romatoid artrit ve erken başlangıçlı diabet ile benzerlik göstermektedir (9, 48, 62). Genel olarak pek çok çocukta daha sık olarak glikoproteinler $\alpha 2\beta 3$ ve GpIb kompleks olmak üzere çeşitli trombosit epitoplarına karşı hem IgG hem de IgM otoantikörleri içeren poliklonal bir yanıt oluşmaktadır (10, 58).

Son yıllardaki makaleler proinflamatuvar yanıt sırasında timusta kritik CD4+CD25+ regülatör T hücrenin oluşumunun otoreaktif etkin hücreler ve antikorların önlenmesinde önemli olabileceğini öne sürmektedir. Gerçekte bu kromozom 2q11.2'de heterojen delesyon sonucu timus hipoplazili çocuklarda otoimmün hastalıklara karşı bir yatkınlık oluşmaktadır. Sağlıklı infantlarda absölu CD4+CD25+ T hücre sayısı, otoimmün hastalığın %10 insidanda görüldüğü bu kromozom 22q11.2 delesyon sendromlu çocuklardakine göre belirgin olarak daha yüksek saptanmıştır (10, 66).

İmmünglobulin spesifitesinin çeşitliliği nedeni ile her çocuk ve erişkin trombositlere karşı otoantikör oluşturma potansiyeline sahiptir. Bilinmeyen nedenlerle, bu kişinin kendisine reaktif antitrombosit klonları fetal gelişim sırasında silinmemekte ve doğumdan sonra kişinin antikor repertuarında bulunmaya devam etmektedir. İnvivo olarak, bazı antitrombosit antikorlar doğal olarak oluşan antikor olup periferal tolerans olarak adlandırılan bir çeşit doğal immün supresyonunun sıkı kontrolü altındadır (67).

Tedaviyle veya tedavisiz trombositopeninin ilk 6 ayda veya İTP'nin akut fazında düzeliyor olması hastanın bu periferal toleransı ve otoantikör supresyon ağının tekrar yapılması yeteneğine dayanabilir. Mevcut tedavi primer olarak bu regülatör yolun tekrar düzenlenmesine kadar trombosit tüketiminin azaltılmasına yönelik olmaktadır (58).

Akut İTP patogeneğinde, enfeksiyöz ajana karşı yönlendirilmiş immün yanıtın çapraz reaktivitesinin, kronik İTP'de ise spesifik antikor üretimi, T hücre aktivasyonu ve sitokin artması ile uyarılan bir immün yanıtın önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bununla beraber İTP'nin her iki formunda da immün yanıtın sonlandırılmasında bir bozukluk olduğu varsayılmaktadır (6, 11, 68).

2.1.2: İmmün Trombositopenik Purpurada Genetik

İnsan lökosit antijenleri (HLA), Fc- γ reseptör ve insan trombosit antijen (HPA) sistemleri ile ilgili polimorfizmler ile İTP arasındaki ilişki araştırılmaktadır (69). Bu polimorfizmlerin bazı hastalarda akut veya kronik İTP gelişimi veya tedaviye yanıtta belirleyici olabildiği gösterilmiştir. Birçok otoimmün hastalık ile HLA antijenleri arasındaki ilişki bilinmektedir. Kronik İTP'de otoimmünitenin nedeni tam olarak anlaşılacakla birlikte HLA antijenleri ile antijenik peptidlerin

bağlanmasında anormallik de sorumlu tutulmaktadır (70). Belli etnik gruplarda HLA-DRW2 ve DRB1*0410 allelleri sıklığı İTP'li hastalarda yüksek bulunmuştur (69). HLA-DR4 ile kortikosteroidlere iyi yanıtın, DRB1*0410 ile kortikosteroidlere kötü yanıtın ve HLA-DRB1*1501 ile splenektomiye kötü yanıtın ilişkili olduğu gösterilmiştir (70). Anti-GPIIb/IIIa antikorları ile DRB1*0410 alleli arasında korelasyon bulunmamış ancak steroide iyi yanıt veren hastalarda, HLA-DR4 ve DRB1*0410 belirgin olarak düşük saptanmıştır (71).

İmmün trombositopenik purpura gelişiminde fagositlerdeki Fc reseptör polimorfizmi etkili olabilir (72). Fc reseptörlerinin trombositlerin klirensinde önemli rolü bulunmaktadır (50). Üç tip Fc- γ reseptörü vardır: Fc- γ RI monomerik IgG'ye güçlü affinite gösterir, Fc- γ RII ve Fc- γ RIII immün kompleks formunda IgG'ye sadece efektif olarak bağlanır. FcRII grubu üç gen (IIA, IIB, IIC) ve FcRIII grubu ise iki gen (IIIA ve IIIB) tarafından kodlanır. Çeşitli genetik polimorfizmler immünglobulin bağlayan reseptörlerin affinitesini değiştirmektedir. Fc- γ RIIA 494A alleli IgG2 için yüksek affiniteli, 494G ise tam ters etkili reseptörlere yol açmaktadır (73).

Fc- γ reseptör IIA ve IIIA polimorfizmlerinin çocukluk çağı İTP'si ile artmış ilişkisi bildirilmektedir. Bu durum İTP'nin başlangıç ve devamında otoantikor bağlı trombositlerin klirensindeki bireysel farklılıklara işaret edebilmektedir. Bu konuyla ilgili çalışmalar Fc- γ reseptör polimorfizmlerinin tedaviye verilen yanıtın öngörülmesinde de rol oynayabileceğini öne sürmektedir (48, 74).

Yapılan çalışmalarda Fc- γ RIIIA polimorfizmlerinin İTP'de tedaviye yanıtı etkilediği, fakat Fc- γ RIIA polimorfizmlerinin etkisiz olduğu ileri sürülmüştür (75).

Olsson ve ark. (17) yaptıkları çalışmada İTP'li olgularda sağlıklı bireylere göre T lenfositlerde apoptozis ile ilişkili genlerin (A₂₀, Caspase 8, bax) ekspresyonunda farklılıklar saptamıştır.

İmmün trombositopenik purpurada genetik faktörler ile ilgili çalışmalar farklı etnik gruplarda değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle her etnik grubun, hastalık için kendi popülasyon çalışmalarını yapmaları önerilmektedir.

2.1.3: İmmün Trombositopenik Purpurada Trombopoez ve Megakaryopoez

Trombopoetin (TPO) trombosit yapımı ile ilgili major hormon olup, TPO seviyesi trombosit sayısı ve megakaryosit kitlesi ile ters ilişkilidir. İTP’de, sirküle eden ve dokularca tutulan TPO veya megakaryosit kaynaklı büyüme faktörü (*megakaryocyte-derived growth factor*) (MGDF) seviyeleri normaldir veya çok az artmıştır (68).

Kemik iliğinde artmış megakaryosit sayısı İTP’li hastalarda immün aracılı trombosit yıkımının bir işaretidir. Yaklaşık 20 yıl önce yapılan çalışmalarda yetişkin İTP’lilerin 1/3’ünden fazlasında kemik iliğinde artmış megakaryosit sayısına rağmen yetersiz trombosit üretimi olduğu belirtilmektedir (76). Otoantikörlerin trombosit üretimini engellediği hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (68, 77).

2.1.4: Klinik Özellikler

En sık görülme yaşı 2-10 yaştır ve 4-8 yaş arası pik yapar. Akut İTP’de kız erkek oranı eşit dağılım gösterir. Hastalığın sıklıkla geçici olması nedeniyle tam insidansı bilinmemektedir. Tahmin edilen yıllık insidansı 1/10.000’dir (1, 78, 79). Çocukluk çağında İTP sıklıkla viral bir hastalığı takiben akut bir başlangıç gösterir. (4). Birçok olguda (%80) spesifik bir tedavi gerektirmez ve altı ay içinde spontan remisyon gözlenir. Olguların yaklaşık % 10-20’sinde İTP 6 aydan daha uzun sürmektedir, bu durum kronik İTP olarak tanımlanır. Çocuklarda kronik İTP, erişkin forma benzer ve kızlarda daha sık gözlenmektedir. Akut ve kronik İTP’nin klinik özellikleri Tablo 2.1’de gösterilmiştir. İTP’de tipik olarak daha önce herhangi bir şikayeti olmayan sağlıklı bir çocukta ani başlayan peteşi ve ekimoz mevcuttur. (1, 5). 2 yaş altı çocuklarda (*infantil İTP*) aşağıdaki klinik özellikler vardır (1, 80):

- Erkek/Kız oranı daha yüksektir.
- İTP öncesi enfeksiyon sıklığı daha azdır.
- Kronik İTP görülme sıklığı daha azdır.
- Tedaviye yanıt iyi değildir.
- Daha şiddetli klinik seyir göstermektedir.

Tablo 2.1: Akut ve Kronik İTP'nin klinik özellikleri.

ÖZELLİK	AKUT	KRONİK
<i>Yaş</i>	2-8 yaş arası	Erişkin
<i>Cinsiyet dağılımı(K/E)</i>	Eşit	3/1
<i>Mevsimsel özelliği</i>	Bahar aylarında	Yok
<i>Öncül enfeksiyon</i>	%80	Daha nadir
<i>İlişkili otoimmün durumlar</i>	Sık değil	Daha sık
<i>Trombosit sayısı</i>	<20000/mm ³	40000-80000/mm ³
<i>Başlangıç</i>	Akut	Sinsi
<i>Eozinofili ve lenfositoz</i>	Sık	Nadir
<i>Ig A seviyeleri</i>	Normal	Normalden az
<i>Süre</i>	Genelde 2-6 hafta	Aylar-yıllar
<i>Prognoz</i>	%80'inde spontan remisyon	Değişken klinik seyir

Predispozan Faktörler:

Olguların %50-80'inde, genellikle hastalıktan birkaç hafta öncesi viral enfeksiyon öyküsü vardır. Postenfeksiyöz olgularda nonspesifik üst solunum yolu enfeksiyonu en sık nedendir. %20 olguda kızamıkçık, kızamık, suçiçeği, boğmaca, kabakulak, enfeksiyöz mononukleozis, sitomegalovirus, hepatit A, B, C, parvovirus veya bakteriyel enfeksiyon gibi spesifik enfeksiyonlar saptanabilmektedir (1). Alerjik reaksiyon, böcek ısırığı, kızamık-kızamıkçık-kabakulak (KKK) gibi aşılama ve diğer immün stimulanlara maruziyet öyküsü verebilirler (78). Çocukluk çağı İTP'de çevresel immün tetikleyici varlığını destekleyen diğer gözlem ise mevsimsel değişkenliktir. En sık kış ve sonbaharda görülürken en az yaz mevsiminde görülmektedir (46, 79).

Semptomlar:

Sağlıklı bir çocukta aniden gelişen peteşi, purpura, ekimoz ve muköz membran kanamaları İTP ile ilişkili semptomlardır.

Cilt; Ekimoz ve purpuralar genellikle alt ekstremitelerin ön yüzlerinde ve kemik çıkıntılar üzerindedir (kostalar, skapula, omuzlar, bacaklar ve pubik bölge

gibi). Olguların %50'sinde semptomlar hafiftir, bacak veya gövdede birkaç ekimoz bulunabilir.

Muköz Membranlar; Peteşiler subkonjunktival, yanak mukozası, yumuşak damakta olabilir. Burun kanaması, diş eti kanaması, muköz membran kanaması, gastrointestinal kanamalar ve böbrekten kanama da görülebilir. Hastalık başlangıçta menorajıyla seyredebilir ve şiddetli kanamalara neden olabilir. Hematemez ve melena nadirdir.

Santral sinir sistemi (SSS); Ciddi bir komplikasyondur. Genellikle diğer yerlerde olan kanama bulguları, baş ağrısı ve baş dönmesi kanama öncesinde vardır. İTP'de intrakraniyal hemoraji insidans %0.1-0.5'tir. Genellikle 13 ay-16 yaş arasında görülür. Trombosit sayısı olguların %73'ünde $<10000/\text{mm}^3$; %25'inde $10-20000/\text{mm}^3$, %2'sinde $>20000/\text{mm}^3$ 'tür. İTP tanısı ve intrakranial kanama arasındaki süre vakaların %51'inde <4 hafta, %49'unda 4 hafta-9 yıl (ortalama 27 hafta) olmaktadır. Kanama vakaların %77'inde intraserebral (%87'sinde supratentoryal, %13'ünde posterior fossa) ve %23'ünde subdural hematoma şeklindedir. Santral sinir sistemi kanaması olan vakaların %50'sinin daha önce steroid ve/veya İVİG tedavisi aldığı bildirilmiştir. Yaklaşık %54 hastada kalıcı hasar olmadığı saptanmıştır (1).

Retinal kanama nadir görülmektedir.

Orta kulak kanamaları sık değildir, işitme bozukluğuna yol açabileceği bildirilmiştir

Derin kas hematomları ve hemartrozlar; nadirdir, plazma koagülasyon faktör bozukluğunun karakteristik bulgusudur; intramusküler enjeksiyon veya ciddi travma sonrası görülebilir.

Kanama bulguları dışında fizik muayene anlamlı değildir. Ciddi bir kanama olmadıkça genelde solukluk yoktur. Dalak hastaların %10'undan azında palpabldır. Splenomegali bulgusu lösemi, sistemik lupus eritematozus, enfeksiyöz mononükleozis veya hipersplenizmi düşündürmelidir. Öncülük eden viral hastalık olmadıkça servikal lenfadenopati yoktur (1).

2.1.5: Laboratuvar Bulguları

Trombosit sayısı; Hastaların genelde ilk başvuru anında trombosit sayısı $150000/\text{mm}^3$ 'den az olmaktadır. Sıklıkla ciddi generalize kanama bulguları olanlarda trombositler $20000/\text{mm}^3$ 'den az olabilir. OTV artmış veya normaldir ($8.9 \pm 1.5 \text{ mm}^3$).

OTV; hemostatik olarak daha aktif olan genç ve büyük trombositlere karşı yaşlı, küçük ve etkisiz trombositleri yansıtan OTV değerinin 8 fl'nin altında olmasının kanama riski ve sıklığında artış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (81). Kanama riskinin önceden belirlenmesinde yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

Periferik yayma; Otomatik cihazlarla ölçülen trombositopeni periferik yayma ile doğrulanmalıdır (psödotrombositopeni, megatrombosit varlığı ve diğer hematolojik durumlar açısından). Trombositler dışında periferik yayma normal olarak değerlendirilir. Ancak aktif enfeksiyon varsa artmış nötrofil, lenfosit veya atipik mononükleer hücre bulunabilir. Kan kaybı fazla ise anemi mevcut olabilir.

Kemik iliği; Genellikle megakaryositler artar, sıklıkla immatürdür ve tomurcuklanma görülmemektedir. Eritroid ve myeloid hücreler normal izlenmektedir. Eozinofiller nadiren artmıştır. Ciddi kan kaybı varsa eritroid hiperplazi görülebilir. Kemik iliği bulguları sadece klinik bulgular varlığı ve sekonder trombositopeniye neden diğer sebepler dışlandığında trombosit sayısı düşükse tanısaldır.

Koagülasyon profili; Kanama zamanı uzayabilir, protrombin zamanı (PTZ), aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT), fibrinojen düzeyleri normal saptanmaktadır.

Trombosit ömrü, kısalmıştır. Kranyum-51 ile işaretli bazı trombositlerin ömrü birkaç dakika ile 1-4 saat arasında değişebilmektedir (1).

ANA, anti-ds-DNA, Coombs testi, karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri, monospot ve/veya EBV, HIV, parvovirus antikor düzeyleri klinik olarak gerekli ise yapılmalıdır.

Antitrombosit antikorlar: İmmün trombositopenilerde sorumlu antitrombosit antikorunu tanımlamak güçtür. Antiglobulin aracılı agglutinasyon yöntemleri uygun değildir. Çünkü tüm trombositler IgG içerir ve bu reagent ile etkileşebilir. Trombosit agregasyonunu, antiglobulinin indüklediği aglutinasyondan ayırmak güçtür. *Platelet-associated IgG* (PAIgG) yöntemleri İTP'ye yol açan antitrombosit antikorlarını direkt ölçülemez (43). İTP tanısında PAIgG sensitivitesi %90 ve spesifitesi %30'un altında olduğu bildirilmiştir (43, 72). PAIgG, İTP'li hastaların çoğunda yüksektir, ancak nonimmün etyolojili trombositopenilerde ve diğer otoimmün hastalıklarda yüksek bulunabilmektedir. Trombosit ilişkili IgG,

A, M ve albumin megakaryositten yeni salınan trombositlerin alfa granüllerinde yer alır ve düzeyleri yeni yapılmış trombositlerde yüksek olup trombosit dolaşımında yaşlandıkça azalır. Bu nedenle total PAIgG, herhangi bir nedenle artmış trombosit yapımı durumunda artmıştır. Gerçek antitrombosit otoantikolar total PAIgG miktarının küçük bir bölümünü oluşturur ve bu antikoların (antitrombosit glikoprotein antikoları) saptanmasının İTP tanısında %51 spesifik ve %80 sensitif olduğu bulunmuştur. Antitrombosit antikolarının hedef proteinleri (GPIIb/IIIa; GPIIb/GPIIb-IIIa, GPIb; GPIIIa; GPIb;GPV; GPIIa; GPIb) gibi trombosit membranındaki spesifik glikoproteinlerdir. Trombositlerin membran proteininin sitoplazmik uzantısına karşı da antikor gelişebilir. Ancak intrasellüler antijene karşı gelişen antikolar genelde İTP'ye yol açmaz. (21, 43).

2.1.6: Tanı

Başvuru sırasındaki öykü, klinik bulgular ve laboratuvar değerlendirme çocukluk çağı İTP'si tanısında temeldir. İzole trombositopeni varlığında tam bir fizik muayene ve periferik yayma değerlendirmesi yapılmalıdır. Bununla beraber birden fazla hücre serisinde düşüklük varsa, hasta da splenomegali ya da lenfadenopati varsa, steroid gibi ilaç uygulamaları öncesinde kemik iliği değerlendirilmelidir. Çünkü bu tedavi lösemi tanısını karıştırabilir, tanıyı geciktirebilir ve farkında olunmayan bir tümör lizis sendromunu tetikleyebilir.

Klinik muayene de splenomegali ve lenfadenopati olmadan purpura dışında normal fizik muayene bulguları saptanabilir. Trombosit sayımı ve periferik yaymada eritrosit ve beyaz küre anormalliği olmadan sadece trombositopeni eşlik edebilir. Kemik iliği incelemesinde, normal veya artmış sayıda megakaryosit, normal myeloid ve eritroid seri bulunabilmektedir (1, 82).

2.1.7: Ayırıcı Tanı

Ayırıcı tanıda, trombositopeni yapan diğer bütün nedenler gözden geçirilmelidir. Evans Sendromu (trombositopeni, direkt Coombs pozitifliği, splenomegali), kronik karaciğer hastalığı, hipersplenizm, fankoni aplastik anemisi, hemolitik üremik sendrom, DIC, ilacın indüklediği trombositopeni, SLE, EBV, parvovirus, HIV gibi enfeksiyonlara bağlı sekonder trombositopeni nedenlerinin dışlanması gerekmektedir (1). Daha erken yaşlarda konjenital amegakaryositik

trombositopeni veya trombosit azlığı, doğumda radius yokluğu, iskelet anomalilerinin eşlik ettiği TAR sendromu, Wiskott-Aldrich sendromu ayırıcı tanıda akla gelmelidir (1, 21, 83).

2.2: İmmün Trombositopenik Purpura Tedavisi

Amerikan Hematoloji Birliği'nin 1996 yılında yayınlanan kılavuzunda, trombosit sayısı $30000/\text{mm}^3$ 'ün üzerinde olan çocukların hastaneye yatırılmalarına gerek olmadığı ve ayrıca asemptomatik ya da sadece minör purpura varsa başlangıç tedavisi olarak steroid, İVİG veya anti-D verilmemesi gerektiği belirtilmiştir (82). Yine aynı kılavuzda hangi grup İTP'li çocuğun tedavisiz izlenebileceğine dair mevcut verilerin yetersiz olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında trombosit sayısı $20000/\text{mm}^3$ ile $30000/\text{mm}^3$ arasında olan asemptomatik olgular ile trombosit sayısı $30000/\text{mm}^3$ üzerinde olan ve sadece minör purpurası olan çocuklarda tedavisiz gözlemin uygun olacağı belirtilmiştir. Trombosit sayısı $50000/\text{mm}^3$ 'ün altında olan ve ciddi mukoz membran kanaması olan veya trombosit sayısı ne olursa olsun ciddi yaşamı tehdit eden kanaması olan olgularda spesifik tedavi verilmemesinin yani sadece gözlemin uygunsuz olacağı vurgulanmıştır (82).

Çocukta kanama yok ancak dağınık peteşi, yüzeysel morarmalar varsa ciddi trombositopeni ile ilişkili risk faktörleri hakkında aile bilgilendirilip hastaneye hızlı bir şekilde dönebileceği bilgisi alınırsa yakın gözlem yapılabilir. Eğer aile yerleşim yeri olarak izole bir yerde ise veya çocuğu yakın olarak gözlemleyemeyecekse, trombosit sayısını $20000/\text{mm}^3$ 'ün üzerine çıkaracak ve trombositopeni süresini kısaltacak tedavinin düşünülmesinin yararlı olacağı belirtilmiştir (84).

Amerikan Hematoloji Birliği tarafından yayınlanan kılavuza göre tedavi kararı semptomlardan daha çok trombosit sayısına göre alınmıştır (82). Trombosit sayısı $30000/\text{mm}^3$ 'ün üzerinde ve minör purpurası olan hastalarda tedavi verilmesinin gereksiz olduğu belirtilmiş, trombosit sayısı $20000/\text{mm}^3$ 'ün altında ve yaygın mukozal kanaması olan hastalar ile trombosit sayısı $10000/\text{mm}^3$ ve minör purpurası olan hastaların steroid, İVİG ya da anti-D ile tedavi edilmeleri gerektiği önerilmiştir. İngiliz Hematoloji Birliği (BSH) tarafından yayınlanan kılavuzda ise tedavi kararının sadece trombosit sayısına göre değil klinik bulgular dikkate alınarak verilmesi gerektiği savunulmuştur (85).

Yaşamı tehdit eden kanama ile gelen hastalarda; intravenöz mega doz metil-prednizolon (30mg/kg/gün, iv 15-20 dk infüzyon 3 gün), intravenöz immünglobulin (İVİG) (1g/kg/gün) ve aferezle elde edilen trombosit süspansiyonu devamlı (0.5-1 U/ m² /saat) veya aralıklı (2-4 U/m² /her 6-8 saatte bir) verilmelidir. Tedaviye 2-3 gün devam edilmelidir. Acil splenektomi yapılabilir. Bu tedaviler yetersiz kalırsa plazma değişimi düşünülmelidir (45, 82, 86).

Çocukluk çağı İTP hastalarında Amerikan Hematoloji Birliği'nin tedavi önerileri Tablo 2.2'de görülmektedir (82).

Tablo 2.2: Çocuklarda Akut İTP'de Başlangıç Tedavisi.

Oral Prednizolon	2 mg/kg/gün x 14-21 gün, (son 7 gün azaltılarak) 4 mg/kg/gün x 7 gün (21 günde azaltılarak)
İntravenöz metilprednizolon	60 mg/m ² (max doz 80 mg) x 21 gün (son 7 gün azaltılarak) 30 mg/kg/gün 3 gün, 20 mg/kg/G 4 gün 15 dk infüzyon
İVİG	0.8 g/kg/gün, 1gün 1 g/kg/gün, 2 gün 0.4 g/kg/gün, 5 gün 0.25 g/kg/gün, 2 gün
Anti-D	50 µg/kg/G, 2 gün (25-75 µg/kg/gün)

Pediyatrik İTP çalışma grubunun yaptığı bir araştırmada 38 ülkeden 136 merkeze başvuran 1496 olgunun değerlendirmesi sonucunda olguların %31'inin sadece izlendiği, %29'unun İVİG, %33'ünün kortikosteroid, %7'sinin İVİG ile beraber kortikosteroid tedavisi aldığı tespit edilmiştir (46).

Kronik İTP'lilerde trombosit sayısı 20000/mm³'ün altında, semptom yok ya da aktif muköz membran kanaması olmadan minör purpurası varsa tedavi gerekli değildir. Menstruasyonu olan kızlarda birkaç ay menstruasyonu baskılayıcı depoprovera gibi uzun etkili progesteronlar yararlı olmaktadır. Aspirin, NSAİİ, trombosit fonksiyonunu etkileyen diğer ilaçlardan ve travmatik spor aktivitelerinden kaçınılmalıdır. (1).

Kortikosteroid Tedavisi:

Kortikosteroidler birçok ülkede İVİG'e göre ucuz olması nedeni ile tercih edilmekte ancak uzun süreli ve tekrarlayan dozlarda bazı istenmeyen etkileri ortaya çıkmaktadır. Steroidler;

- Dalakta antikor kaplı trombositlerin fagositozunu inhibe eder
- Trombosit ömrünü uzatır.
- Kapiller rezistansi iyileştirir.
- Trombosit antikor üretimini inhibe eder.

Steroidler bölünmüş dozlarda 2 mg/kg/gün veya 60 mg/m²/gün (max. 60 mg/gün) prednizon olmak üzere çeşitli tedavi rejimleri günümüzde uygulanmaktadır. Prednizon 5-7 günlük aralarla trombosit sayımına bakılmaksızın kademeli olarak azaltılır ve yanıtı bakılmaksızın 21.-28. gün sınırında kesilir (87-89). 4 mg/kg/gün 4 günlük daha kısa prednizon tedavisi de başarıyla kullanılmıştır (90).

Bazı olgularda, metilprednizolon 30 mg/kg/gün (max. 1 gr/gün) 3 gün, sonrasında 4 gün boyunca 20 mg/kg'dan verilebilir. Bu tedavinin konvansiyonel steroide (2 mg/kg) göre daha iyi yanıt verdiği belirtilmiştir (91, 92).

Yakın zamandaki yayınlar İTP tedavisinde yüksek doz steroidlerin yararını göstermişlerdir. Bu yayınlarda İVİG'e göre daha kısa sürede, daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (91-94). MDMP tedavisi İTP'de sadece trombosit sayısının artımında etkili olmayıp, aynı zamanda geride kalan trombositlerin aktivasyonu ile hemorajik kontrol üzerinde de etkileri bulunmaktadır (95).

Daha önceki çalışmalarda otoimmün hastalıklarda steroid kullanımı ile beraber immün sistem fonksiyonu üzerinde steroid uygulaması ve konakçının durumuna göre immün sistemde supresyondan, immün sistem fonksiyonlarında artışa kadar farklı etkiler gözlenmiştir (96). Konvansiyonel doz steroid tedavisi alan çeşitli hastalıklara sahip hastalarda veya gönüllülerde yapılmış daha önceki çalışmalarda bu tedavi sonucunda proinflamatuvar sitokinlerde, MHC-II molekül ekspresyonunda, aktive T lenfosit ve bunların salgılamış olduğu sitokinlerde mitojenik aktivitede ve gecikmiş hipersensitif antikor yanıtlarında inhibisyon görülmüştür (96-100). Fakat bu çalışma sonucunda sayılmış olan konvansiyonel dozda baskılayıcı etkilerin aksine MDMP tedavisinin immün sistem üzerinde supresif bir etkisi olmadığı görülmüştür. İTP'de primer immünolojik defekt otoreaktif B lenfositlerdir ve trombositlere karşı

antikorları salgırlar. Aynı zamanda antikor yanıtını düzenleyen T lenfositler ve diğer hücrelerdeki self toleransın eksikliği de hastalık patogenezinde önemli olabilir. Bu araştırmacılar MDMP'nin T hücre regulasyonunu düzelterek antikor üretimi üzerine bir etkisi olabileceğini ileri sürmüşlerdir (95).

İmmün trombositopenik purpurada uzun süreli steroid kullanımı istenen bir durum değildir. Mega doz steroid tedavisi veya uzamış kullanımı trombositopeni yaratabilir ve trombosit üretimini baskılayabilir.

Ayrıca steroid tedavisi kilo alımı, kushingoid yüz, sıvı retansiyonu, akut hiperglisemi, hipertansiyon, duylu durumunda dalgalanmalar, pseudotümör serebri, katarakt, büyüme geriliği ve vasküler nekroza neden olabilir (20).

İntravenöz İmmunglobulin Tedavisi:

İlk kez Imbach ve ark.(101) tarafından 1981'de İTP'li çocuklarda kullanılan İVİG'in esas etkisi retikuloendotelial hücreler üzerindeki Fc reseptör blokajı aracılığıyla olmaktadır. Etki mekanizmaları (1);

- Retikuloendotelial Fc reseptör blokajı,
- İnhibitör yolların aktivasyonu,
- Otoantikör sentezinin azaltılması,
- Fc reseptör taşıyan monosit ve lenfositlerden sitokin sentez ve serbestleşmesini etkiler.

Akut İTP'de İVİG, özellikle neonatal semptomatik immün trombositopeni ve steroid tedavisine daha refraktör olan 2 yaş altındaki süt çocuklarına verilebilir. Kortikosteroid tedaviye alternatif olarak gösterilebilir, ancak çok daha pahalıdır ve ciddi yan etkileri olmaktadır, ayrıca klinik olarak anlamlı düzeyde steroidlerden daha iyi olmadığı belirtilmiştir (1).

Akut İTP'de 0.4 gr/kg/gün İVİG 5 gün boyunca veya 1 gr/kg/gün İVİG 2 gün boyunca verilir. Tek doz olarak daha düşük 0.8 gr/kg/gün veya 0.25 gr/kg/gün 2 gün uygulamada başarılı olmaktadır.

Kronik İTP'de; ilk gün 1 gr/kg/gün, takiben trombosit seviyesini güvenli tutacak (20.000/mm³ ün altında) şekilde yanıtı göre 0.4-1 gr/kg periodik tek doz infüzyon şeklinde uygulanmaktadır. Bir gün İVİG, bir gün steroid uygulamasının da yararlı olduğu belirtilmiştir.

Akut İTP’de başlangıçta İVİG’e %80 yanıt alınmaktadır. Steroidlere ve anti-D’ye göre trombosit sayısı daha hızlı artmaktadır. İmmunglobulin preparatları başlangıçta yavaş verilmelidir çünkü büyük protein yükü infuzyondan 24-48 saat sonra daha sık olarak baş ağrısı ve kusma ile ilişkili olabilmektedir. Baş ağrısı (infuzyon hızına bağlı), ateş, aseptik menenjit, anafilaksi (özellikle IgA eksikliği olanlarda), hemolitik anemi, viral hastalık bulaşma riski (hepatit C) önemli yan etkileridir (1, 102) . İVİG sonrası diğer sık görülen durum ise hafif-orta nötropenidir ki bu durum genellikle 48 saatte düzelir. Ve bu durum nedenli hemen kemik iliği aspirasyonu yapılması önerilmemektedir (58).

Anti-D Tedavisi:

İlk olarak 1983 yılında İTP tedavisinde kullanılmaya başlanan Anti-D; eritrositlerdeki Rh antijenine karşı yüksek titrede antikor içeren plazmadan elde edilen gamma immün globulindir (103). Antikor ile kaplı eritrositler retikuloendotelial sistemde öncelikle dalakta tutularak Fc reseptör blokajı yaparlar, antikor ile kaplı trombositler Fc reseptörlerine bağlanamaz ve sonuçta trombosit yıkımı azalır. Rh pozitif hastalara verilmektedir. Splenektomi yapılmamış hastalarda yapılanlara göre daha etkindir. Trombosit sayısındaki artış tedaviden 48 saat sonra olur, bu nedenle acil tedavide kullanılması uygun değildir (1, 58, 104).

Anti-D 50-75 µg/kg intravenöz infuzyon şeklinde 3-5 dakikada verilir. Ateş, titreme, baş ağrısı, anti-D ilişkili extravasküler hemolize bağlı olarak hemoglobin değerinde ortalama 1.7 g/dL (0.4-6.1 g/dL) azalma ve hematokrit değerinde düşme, intravasküler hemolize bağlı akut böbrek yetersizliği görülebilen yan etkilerdir. Subkutan Anti D uygulamasının bu yan etkileri önemli ölçüde azalttığını gösteren çalışmalar vardır. Dalak ve retikuloendotelial sistemce trombosit klirensi üzerine etki eden ajanlarla tedavi etkinliğini 3-4 haftada kaybeder. Sonrasında trombosit sayısı tekrar 20.000/mm³ün altına inebilir (1). Bu tedavi 3-8 hafta aralarla tekrarlanabilir.

Yapılan bir çalışmada intravenöz Anti-D’nin 50 µg/kg tek doz verilmesi, çocukların yaklaşık %70’inde 3 gün içinde trombosit sayısını 20.000/mm³e yükselttiği gösterilmiştir (103).

Hem Anti D Ig G hem de İVİG tedavisinde trombosit sayısının 20.000 ve 50.000/mm³ üzerine çıkması için gerekli süre benzerdir. Genellikle çocuklar

başvurudan ve ilk tedaviden sonra 24-48 saat için gözlem altında tutulur. Bu nedenle bu açıdan her iki tedavinin de bir diğerine avantajı yoktur. Anti D Ig G ile takip eden tedavi klinikte veya infüzyon merkezlerinde gözlem altında verilmelidir (58).

İmmün trombositopenik purpuranın tedavisinde kullanılan steroidlerin, İVİG'in, Anti-D'nin etki mekanizmaları Tablo 2.3'de gösterilmiştir (1).

Tablo 2.3: İTP tedavisinde kullanılan ajanların etki mekanizmaları.

<i>Etki</i>	<i>Steroid</i>	<i>İVİG</i>	<i>Anti-D</i>
<i>Kapiller rezistans artışı</i>	+	-	-
<i>Retikuloendotelyal blokaaj</i>	+/-	+	+
<i>Trombosit antikor bağlanması</i>	+	+/-	-
<i>Fc reseptör bağlanmasında değişiklik</i>	+	+	+/-
<i>T hücre supresyonu</i>	+	+	-
<i>İmmünglobulin sentezi</i>	↓	↓	N/ ↓
<i>Sitokin üretimi</i>	↓	↓	N

Ritüksimab Tedavisi:

B lenfositlerinin yüzeyinde bulunan CD-20 antijenine karşı spesifik monoklonal bir antikordur. Ritüksimab normal veya malign B hücrelerinin lizisine yol açmaktadır. İTP'de otoreaktif B lenfositlerin ortadan kaldırılması amacıyla kullanılmaktadır. Rituximab erişkin hastalardaki başarısı nedeniyle bazı pediatrik hematologlar kronik İTP'li çocuklarda trombosit sayısını arttırmak ve splenektomiden kaçınmak için bu ajanı kullanmıştır (105, 106). 375 mg/m² iv haftada bir ve dört hafta süresince uygulanabilir. Wang ve ark. (105) ortalama 13 ay süren tam yanıt (trombosit sayısının 150.000/mm³'e yükselmesi) yaklaşık %50 hastada sağlamıştır. İlaça bağlı ateş, titreme, baş ağrısı, baş dönmesi, bulantı, kusma, hipotansiyon, sinus taşikardisi görülebilmektedir.

Diğer Tedaviler:

Vinka alkaloidleri (vinkristin, vinblastin), danazol, siklofosfamid, azatiopürin, siklosporin, α -interferon 2b, dapson, kolşisin, epsilon-aminokaproik asit, rekombinant faktör VIIa nadiren İTP tedavisinde kullanılırlar. Özellikle Kronik İTP'li hastalarda anti-CD40 veya antiD-154 gibi T hücrelerine bağlanan, anti-tümör nekrozis faktör veya reseptörüne karşı monoklonal (Enbrel, Remisade) antikorlar kullanılabilir (1).

Splenektomi:

Amerikan Hematoloji Birliğinin yayınladığı kılavuza göre, tanıdan sonra 12 aydan uzun süreli hastalık durumunda, 3-12 yaş arası; $10000/\text{mm}^3$ 'ün altında trombosit sayısı olan, 8-12 yaş arası; kanama bulguları yanında trombosit sayısı $10000-30000/\text{mm}^3$ olan ve daha önceki tedaviler ile sadece geçici başarı sağlanan olgulara splenektomi yapılabileceği belirtilmiştir (82). Karşı konulamayan splenektomi sonrası enfeksiyonlar nedeniyle işlem kesin endikasyonu olan hastalara yapılmalıdır. 2 yıldan önce splenektomi gerekliliği nadir olmaktadır. Çünkü trombositopeni iyi tolere edilmekte ve tedaviyle (steroid, İVİG) kontrol altında tutulabilmektedir (1). Elektif splenektomiden en az iki hafta önce Hemofilus influenza tip b'ye karşı aşılama, iki yaş üzeri olgulara da polivalan pnömokok aşısı ve kuadrivalan meningokok aşıları önerilmektedir (82). Splenektomi sonrası penisilin profilaksisi uygulamasının bakteriyel enfeksiyon riskini önemli ölçüde azalttığı bildirilmektedir. Laparoskopik splenektomi tercih edilen bir yöntem olarak belirtilmektedir (1).

Splenektomi sonrası yaklaşık %70 olguda tam ve uzun süreli düzelme görülür. Steroid ve İVİG tedavisine yanıt alınmış olması splenektomiye yanıt verme olasılığı için iyi bir gösterge olabileceği belirtilmiştir. Splenektomi sonrası persistan trombositopenisi olan olguların %40'ında aksesuar dalak saptanmıştır (1).

2.3: Sitokinler

Sitokinler hücreler düzenleyici proteinlerdir. Çeşitli uyarılara karşı cevap olarak özel hücreler tarafından salgılanır ve hedeflenen hücrelerin davranışını etkilerler. Belli bir sitokin çeşitli hücreler tarafından farklı dokularda salgılanır fakat

aynı biyolojik etkiyi gösterir. İTP’de sitokin profili ile ilgili yapılan çalışmalarda homojenlik saptanmamıştır.

İmmün trombositopenik purpurada hem deneysel modellerde hem de *invivo* olarak aşırı antijenik uyarının Th lenfositlerce Th2 tipinde sitokin yanıtına neden olduğu gösterilmiştir. Bu durum IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 artmış üretimi ile karakterize iken IL-12, IFN- γ , TNF- β down regüle olmaktadır. Bu sitokin profili B lenfositleri aşırı antikor üretimi için aktive eder. Viral epitoplar trombosit yüzeyindeki yapılara karşı otoantikor üretimini veya trombosit yüzeyinde eksprese olan viral epitoplara karşı antikor üretimini indükleyebilirler. Sitotoksik immün yanıt yokluğunda virüsler gibi intrasellüler mikroorganizmalar elimine edilemezler. Bununla beraber çoğu çalışmada otoimmün hastalıklar da (romatoid artrit, multipl skleroz ve diabet gibi) Th1 tipinde sitokin yanıtı (IL-2, IFN- γ ve TNF- β) bildirilmiştir. İTP li çocuklarda periferik kana bakıldığında IL-2, IFN- γ ve TNF- α ’da artma ile IL-4, IL-6 seviyesinde düşme Th1 tip sitokin paternini göstermektedir. Bu tip T hücre aktivitesi, makrofajların aktivasyonu ve kompleman bağlayıcı antikor oluşumunun CD8+ T hücrelerde sitotoksik aktiviteyi indüklemesini sağlamaktadır. Aksine siklik İTP ve hematolojik malignitelerle ilişkili trombositopenide bazı gruplarda artmış IL-11, IL-6, IL-4, IL-10 ve GM-CSF üretimi bulunmuştur. TPO genellikle pediatrik İTP olgularında artmış değildir. IL-1, GM-CSF ve makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) kök hücre faktörü IL-3 ve IL-6’ da megakaryosit farklılaşmasını kontrol eder. IL-4 ve IL-6 sınırlı sayıda İTP li olgularda artmış olarak gösterilmiştir. Platelet aktive edici faktör (PAF), *Platelet derived growth factor* (PDGF), *Transforming growth factor beta* (TGF- β) 1-2, β kemokinler, monositler, makrofajlar, granüositler ve T lenfositler için kemoatraktan olup aktive trombositlerce salındıkları belirlenmiştir. Trombositlerin bu sitokinleri alfa granüller içinde eksprese ettiği gösterilmiştir. Bu faktörlerin de hücre yüzeyinde IgG ile etkileşimi olduktan sonra trombositlerin aktive olmasıyla salınabileceği belirtilmiştir (107).

Kemokinler ve sitokinlerin salınımı immün kompleksle işaretli trombosit ve GPIIb/IIIa glikoprotein reseptörlere karşı otoantikorlar ile kaplı trombositleri fagosite ederek bunları elimine eden makrofajları ortama çekip aktivasyonunu sağlayabilmektedir. Literatürde bu sitokin ve kemokinlerin hangilerinin aşırı

eksprese olduğuna dair İTP'li olgularda pek fazla bilgi bulunmamaktadır (107). Bununla beraber otoantikör oluşumu başladığında, sitokinler daha fazla otoantikör üretimine engel olamayabilir, çünkü reaktif B hücreleri plateletleri fagosite etmiş olan makrofajlardaki endojen eksprese olan epitoplara (GP Iİb/IIIa) sürekli maruz kalmaktadır (14, 108). Yabancı mikroorganizmalarla karşılaşan dendritik hücre ve makrofajlarda IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8 üretimi ile karakterize proinflamatuvar bir sitokin yanıtı oluşurken takiben kemokin salınımı ve IL-1 α , TGF- β ve IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinlerle hemostaza dönmek için ters yanıt gelişmektedir.

Normal ve patolojik immün yanıtlar aydınlatılacaksa hastalık başlangıcı ile değerlendirme yapılacağı zamanı göstermek önemlidir. Buna ek olarak patojenik mekanizmaları anlamak için çok sayıda ölçümler yapmak önemlidir.

Akut İTP'li çocuklarda başlangıçta bozulmuş IFN- α/β sentezi olduğu ileri sürülmüştür. Bu durum aşırı viral replikasyon ile sonuçlanabilmekte ve bunu yüksek antikör üretimi izlemektedir. Sonuçta immün kompleks oluşumu indüklenir. Yüksek viral yük Th1 tip (IL-2, IFN- γ , TNF- β yüksek) yanıtına neden olur ve çok sayıda virus ile enfekte hücrenin sitotoksik olarak yok edilmesi yüksek miktarda viral antijen salınımına yol açar ve bu da yüksek affiniteli immün globulin antikörlerinde içeren aşırı bir hümorale yanıtı tetikler. Oluşan immün kompleksler trombositlerin yüzeyindeki Fc reseptörlerine bağlanır. Trombositlerde bu kompleksler hem Fc bağlı hem de Fc bağımsız yol ile hücre içine alınır. Trombositlere antikör ve kompleman bağlanması PAF, PDGF α/β ve TGF- β aktivasyonu ve salınımını indüklemektedir. Bu sitokinler monositler, dendritik hücreler, granulositler ve lenfositler için kemokin olarak etki gösterir ve immünoreaktif bir ortam oluşturulur. Antijen kaplı trombositler, immün kompleksli trombositlerin up-regüle olmuş Fc reseptörleri ile adhezyon molekülleri sayesinde fagositozunu da içeren anormal immün yanıtı neden olabilirler (14, 108).

2.4: Apoptozis

Apoptozis veya programlanmış hücre ölümü, inflamatuvar cevap oluşturmadan hücrelerin ölümü ile sonuçlanan bir seri kontrollü olaylar zinciridir.

Ayrıntılı olarak ilk 1972 yılında Kerr ve ark. (109) tarafından tanımlanan apoptozis (programlanmış hücre ölümü) immün sistemin dengesinin korunmasında

önemlidir (110). Periferik matür T hücrelerinin antijen cevabının düzenlenmesi ve homeostazının sağlanmasında da apoptozisin rolü olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Apoptozis, hem lenfosit birikimine engel olmakta hem de otoantijenlere karşı olabilecek ve otoimmüniteye yol açabilecek reaksiyonları en aza indirmektedir (111, 112).

Apoptozisin immün sistemde iki önemli fonksiyonu vardır: 1) Timus ve kemik iliğinde otreaktif olan hücrelerin temizlenmesini sağlar. 2) Periferik immün sistemde lenfositlerin birikimini engeller. Lenfosit apoptozisinden sorumlu olan esas ajan Fas reseptör ve onun ligandı olan FasL (CD95L)'dir. Karşılaşılan antijen miktarı apoptozisin başlatılmasında etkilidir. Ne kadar çok antijen varsa, TNF gibi ölüm sitokinleri ve bu sitokinlerin reseptörlerinin ekspresyonu da o kadar artar. Ortamda sürekli antijen olmasının, lenfositlerin aşırı çoğalmasına yol açması apoptozisin başlaması ile engellenir (113, 114). Hücre yüzeyinde bulunan TNF reseptörleri (TNFRs) ve Fas, belli aminoasid dizilimi ve homolojiyi paylaşırlar. Bu proteinlerin hücre dışı kısımları ligand bağlanma için önemlidir. Sitoplazmik bölümleri, ölüm bölgeleri içerir ve bu bölgeler apoptozisin başlaması için gerekli olan sitoplazmik sinyal proteinlerinin bağlandığı yerlerdir (114).

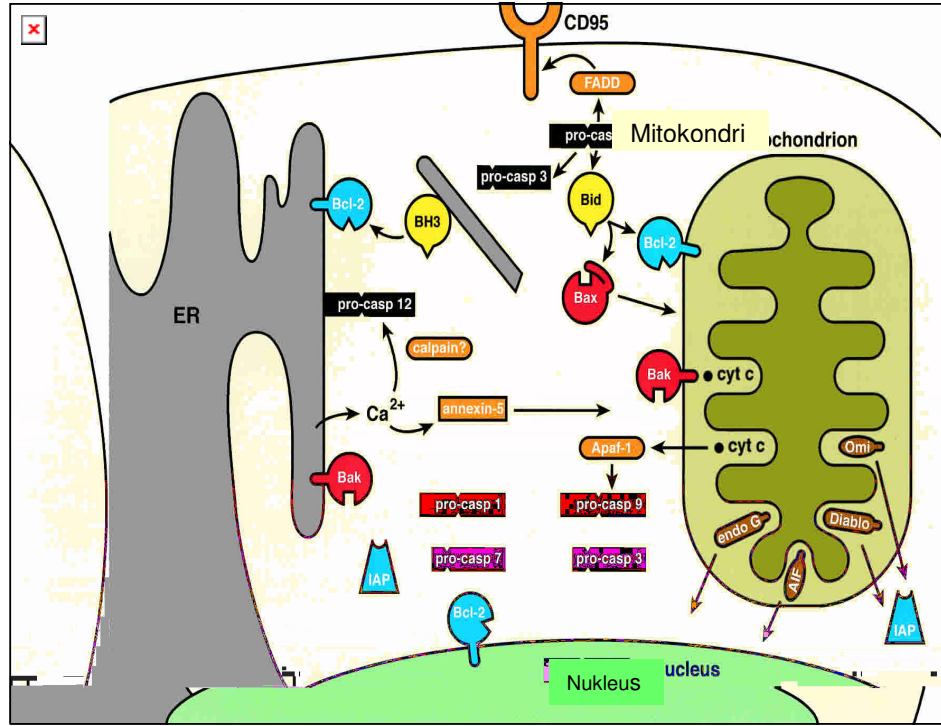
Apoptotik süreçte hücrede morfolojik çeşitli değişiklikler olur. Ayırt edilmesi gereken üç temel hücre şekli (normal, apoptotik, nekrotik) mevcuttur (Tablo 2.4).

Tablo 2.4: Apoptotik ve nekrotik hücrenin özellikleri.

APOPTOZİS	NEKROZİS
Büyüme faktörü eksikliği, hücre yaşlanması, HIV, kemoterapötikler, radyasyon, mega doz glukokortikoid, Fas veya TNRF-1 reseptörlerinin aktivasyonu, sitotoksik T lenfositler, çok şiddetli olmayan oksidatif stres	İskemi, hipertermi, hipoksi, litik viral enfeksiyon, toksik maddelerin yüksek konsantrasyonu, şiddetli oksidatif stres yol açar.
İyi kontrollü, bazı aktivasyonları ve enzimatik basamakların olması	Bozulmuş iyon homeostazisi
ATP gereklidir (aktif süreç)	ATP gerekli değildir (pasif süreç)
+4°C’de gerçekleşmez	+4°C’de gerçekleşebilir
DNA internukleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır, mono ve oligonukleozomlara ayrılır	DNA rastgele parçalanır
Prelitik DNA fragmantasyonu	Postlitik DNA fragmantasyonu
Doku hasarı yoktur, lokal hücre kaybı vardır	Aşırı doku hasarı görülür
İntakt hücre membranı fakat membranda “bleb”lerin oluşumu	Hücre membran bütünlüğünün kaybı
Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler	Lizozomal enzimler salınır
İnflamatuar yanıt görülmez	İnflamatuar yanıt gelişir
Organel ve çekirdek yapısı normal	Bozulmuş
Kromatin yoğunlaşması düzenli	Düzensiz

2.4.1: Apoptozisi Düzenleyen Aracilar

Apoptozis çok sayıda aracı tarafından düzenlenmekte olup bunlar içerisinde kalsiyum gibi bazı iyonlar, *seramid*, *c-myc*, *p-53* ve hatta mitokondri gibi organeller yer alır (Şekil 2.3) (110, 115).



Şekil 2.3: Apoptozis yolağı-Adams J.M (110)'den alınmıştır.

Apoptotik süreç boyunca hücre içine kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları endonükleaz aktivasyonunda, doku transglutaminaz aktivasyonunda, gen regülasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alabilirler (116). Ancak hücreye kalsiyum girişi apoptozisin gerçekleşmesi için gerekli değildir.

Bcl-2 ailesi, üyelerinin bir kısmının apoptozisi indüklediği (Bax, Bad, Bid, Bcl-Xs), bir kısmının ise inhibe ettiği (Bcl-2, Bcl-Xl) geniş bir ailedir. Hücrenin sağkalımı bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır (110). Bunlardan biri olan Bcl-2/Bax'ın oranının bazı hematolojik malignensilerde prognostik değer taşıdığı bildirilmiştir.(117). Çünkü oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu da

prognozu belirleyici bir değer taşıyabilir. *Bcl-2* geni ilk olarak insan B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır. Bu lenfoma tipinde, *Bcl-2* normalden uzun yaşam sürelerine neden olur. Böylece malignite oluşumuna zemin hazırlamaktadır. *Bcl-2* özellikle mitokondri dışı membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir (110). *Bax* sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır, burada küçük delikçikler açılmasını sağlar, böylece seçici iyon geçirgenliği kaybolur, sonuçta sitokrom *c* ve apoptozis-indükleyici faktör (AİF)'ün mitokondriden sitozole çıkmasını sağlar (110, 115).

Seramid, membrana bağlı asid sfingomyelinaz aktivasyonunun bir ürünüdür (116). Plasma membran hasarına karşı bir sinyal olduğu düşünülmektedir.

p53, hücrede bir şekilde (radyasyon, kemoterapi etkisiyle) DNA hasarı (nükleotid eksikliği) oluştuğunda, eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda *p53* apoptozisi indükler (115). *p53*'ün apoptozisi indüklemesi *Bax*'ın ekspresyonunu artırması böylece *Bcl-2/Bax* oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleşir. Bazı virüsler (insan papillom virüsü, Epstein-Barr virüsü, adenovirüs tip 12) ya *p53*'ü inaktive ederek ya da *Bax*'a bağlanarak apoptozisi bloke ederler, böylece bu hücrelerin enfekte ettikleri hücreler doğal hücre ölüm mekanizmasından kurtulduklarından virüsle-indüklenen karsinogenezise bu yolla katkıda bulunurlar (110).

Sitokrom c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir. Apoptozis sürecinde önemli bir yere sahiptir. Bu yüzden de sitokrom *c*'nin *mitokondri*den sitoplazmaya salınması apoptozise giden bir hücrede irreversibl bir döneme girildiğini işaret eder. Sitokrom *c*, mekanizması tam olarak aydınlatılmamış bir şekilde mitokondriden AİF ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom *c* sitoplazmik protein olan Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*)'e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur (110). Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz 3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (*inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease*, ICAD) inaktifleştirir, böylece ICAD'ünün bağladığı kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (*caspase-*

activated deoxyribonuclease, CAD) serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur. Buraya kadarki mekanizma kaspaz-bağımlı apoptozisi gösterir, oysa kaspaz-bağımsız apoptozisin varlığı da bilinmektedir. Kaspaz-bağımsız apoptozis yine mitokondriden salıverilen bir faktör olan AİF'ün etkisiyle gerçekleştirilir (110, 118).

Kaspaz'lar, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozisde rol almaktadır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek preteolitik bir kaskada sebep olurlar. Bazıları (kaspaz 2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken bazıları da (3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinir (110). Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletirler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örneğin, DNA tamirinde rol alan poli ADP-riboz polimeraz (PARP) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. İlk tanımlanan enzim interlökin 1- β dönüştürücü enzim (ICE)'dir ve prokaspaz 1 olarak bilinir. Kaspaz kaskadı, sitokrom *c*'nin sitoplazmaya salıverilmesiyle prokaspaz 9'un aktivasyonu yoluyla aktifleştirildiği gibi, kaspazlar da sitokrom *c*'nin salıverilmesine neden olabilirler. Bir kaspaz inhibitörleri ailesi olan *inhibitors of apoptosis* (IAP)'leri kaspazları selektif olarak inhibe ederler, böylece apoptotik mekanizmayı durdururlar. Bu inhibitörler birçok malign hücreler tarafından aşırı eksprese edilmektedirler. IAP'leri ayrıca hücre siklusunu da etkileyerek apoptozisi durdurabilmektedirler. (110). Kaspazlardaki defektler otoimmün hastalıklara, kansere ve bazı nörolojik bozuklukların oluşumuna katkıda bulunabilir. Hatta, kaspaz 8'in nöroblastomada tümör süpressörü olarak işlev gördüğü bulunmuştur. Her dokunun eksprese ettiği kaspaz tipi farklı olabilir. Bu durumda farklı dokular için farklı kaspazların aktivasyonu yoluyla apoptozisin gerçekleştiği düşünülebilir. Hatta hücrelerin değişik farklılaşma derecelerinde değişik kaspazların aktivasyonuna gereksinim duyulabilir. Örneğin, periferik T hücreleri Fas'ın aktivasyonuna yanıt olarak gelişen apoptozisde kaspaz-3'e gereksinim duyarlar ama timositler kaspaz-3 eksikliğinde yine Fas'la indüklenen bir apoptozise gidebilirler (117).

Granzim' ler, patojenle enfekte edilmiş hücrelerin veya tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkin rol alırlar. Perforinler ve granzimler normal olarak sitotoksik lenfositlerin ve *natural killer* (NK) 'lerin sitoplazmik granüllerinde bulunurlar (119). Sitotoksik T lenfositlerinin hedef hücreye bağlanmasıyla perforinler salgılanır ve hedef hücrenin membranına bağlanarak membranda porlar meydana getirirler. Perforin porlar sitozolik kalsiyum düzeylerinin hızla artmasına yol açar. Beraberinde salgılanan ve bir serin proteaz olan granzimin de bu porlar aracılığıyla hücreye girmesiyle hücre içinde prokaspaz 8'in aktivitesi, dolayısıyla kaspaz kaskadı başlatılır. Bu da enfekte hücreyi (veya kanser hücrelerini) apoptozise götürür (110, 115).

2.4.2: Apoptozisin İndüklenmesi

Apoptozis klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi sonucu indüklenir . Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler. Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokarda bulunurlar. İlgili ligandına Fas ligand (FasL) denir. FasL, (TNF) ailesinin bir üyesidir. FasL sitotoksik T lenfositlerinde ve natural killer hücrelerde bulunur. Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri protein:protein interaksiyonlarından geçerler (120). Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri adı verilen TNFR-1 *associated death domain* TRADD ve *Fas associated death domain* (FADD) ile interaksiyona girerler . Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz 8'i aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatırlar (110).

Apoptozisin bu fizyopatolojik özelliklerinden yararlanılarak apoptotik hücreler değişik metodlarla tespit edilebilmektedir. Apoptozise uğramış hücrelerin Anneksin V yöntemi ile tespiti bunlardan biridir. Membran fosfolipidlerinden biri olan fosfatidilserin, hücrenin plazma membranının sitoplazma kısmına bakan iç yüzünde olduğu halde, apoptotik sürecin başlaması ile hücrenin plazma membranının dış yüzeyine çıkmaya başlar. Anneksin-V, hücrenin dış yüzeyinde ortaya çıkan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, hücre yüzeylerine Anneksin-V bağlanma oranı, o hücre topluluğundaki apoptozise uğramış hücrelerin oranını

vermektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için flowsitometride de ikinci boya olarak *Propidium iodide* (PI) eklenmektedir (121, 122). Bu yöntemde Anneksin-V pozitif, PI negatif hücreler apoptozise uğramış hücrelerdir. Hem Anneksin-V hem de PI pozitif hücreler de nekroza uğramış hücreler olarak değerlendirilmektedir.

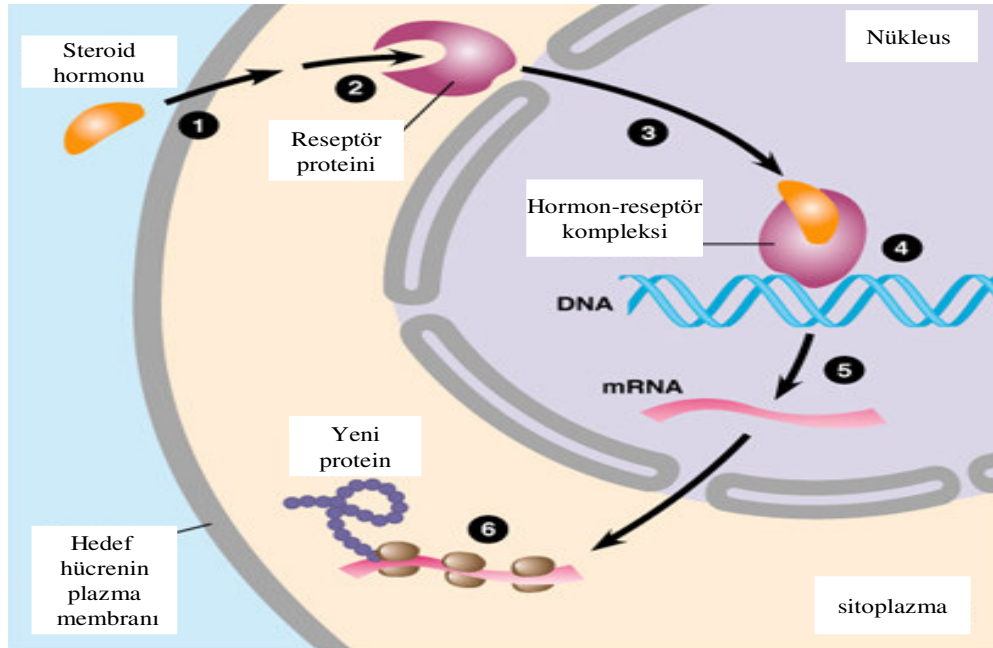
2.5: Glukokortikoidlerin Etki Mekanizması ve Glukokortikoidlere Rezistans

Glukokortikoidlerin Pleomorfik Etkileri

Glukokortikoidlerin tipi ve konsantrasyonu, hücre dışı ortam ve hücre içi içerik, vb. gibi bir çok etkene bağlı olarak GC ve analogları memeli hücreleri ve tüm organizmalar üzerindeki çeşitli etkilere aracılık etmektedirler. Bunlar içinde başta protein, lipid ve karbonhidratların katabolizması dahil olmak üzere metabolizma üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Ayrıca, ALL'yi de içeren birçok sistemde hücre siklusu ilerleyişini baskılamaktadır (123). GC'ler, özellikle immatür timositler ve ALL hücreleri olmak üzere lenfoid serinin belirli hücrelerinde masif apoptozisi indükler ve bu özelliği nedeni ile lenfoid malignitelerinin tedavisinde kullanılmıştır (27, 123). GC'nin ayrıca kemik, hipokampus, eozinofil, fibroblast ve belirli kanser hücreleri gibi bazı lenfoid olmayan dokular ve hücrelerde tek başına ya da diğer hücre ölümü indükleyicilerle birlikte hücre ölümünü indükledikleri bildirilmiştir. İlginç olarak GC'ler, eritroblast, nötrofil ve memede, over, karaciğer ve fibroblastlar gibi birkaç hematolojik olmayan dokuda sağkalımı destekler. Bu tür sağkalım üzerindeki olumlu etkiler, kemoterapötiklerin etkisiyle etkileşime girdiklerinde klinik olarak anlamlı olabilmektedir (96, 124). Koşullara bağlı olarak GC hem hücre ölümünü tetiklemiş hem de bazı hücrelerdeki sağkalımı desteklemiştir (125). Bu durum glukokortikoidlerin pro ve antiapoptotik potansiyelini de göstermektedir.

Glukokortikoidlerin reseptör bağımsız etkileri çok yüksek konsantrasyonlarda meydana gelebilse de (tahminen membran pertubasyonu yoluyla) fizyolojik ya da terapötik seviyelerdeki GC'lerin etkilerinin hepsi olmasa da çoğu GCR aracılığıyla olur (Şekil 2.2) (126). GCR, nükleer reseptör ailesinin ligandla aktive transkripsiyon faktörüdür (steroid reseptör alt ailesi, yedi üyeden oluşur: östrojen reseptörü α ve β , östrojen ilişkili reseptörler 1 ve 2, mineralokortikoidler, androjenler ve progesteronların reseptörleri). Bir multiprotein kompleksi olarak sitoplazmada bulunur (127). Ligand bağlanmasının üzerine GCR, bağlanma proteinlerinden en

azından bazısından ayrılır ve konvansiyonel gen izlemeleriyle ya da mikroarray analizleriyle tanımlanan genlerin ekspresyonunu indüklemek yada baskılamak için nükleusun içine taşınır (27, 128). Gen indüksiyonu GCR'nin DNA elementleri ile etkileşimi yoluyla olurken (GC responsif elementleri (GRE)), gen baskılaması negatif GRE'ler, diğer sekans spesifik transkripsiyon faktörleriyle protein-protein etkileşimi, koaktivatörler için yarışma ve diğer mekanizmalar aracılığıyla meydana gelir (128). Bu mekanizma muhtemelen çoğu GC etkisini gösteren mekanizmasıyken, bu hormonlar daha hızlı (20-30 dak), GCR'ye bağımlı etki gösterirler ki bu mekanizma daha az anlaşılmiştir (126). İyi karakterize edilmiş sitoplazmik veya nükleer GCR'ye ek olarak membran ilişkili türler de bildirilmiştir, (129).



Şekil 2.2: Steroid hormonlarının reseptörlerine bağlanması.

2.5.1: Glukokortikoid ile İndüklenmiş Apoptozise Direnç Mekanizmaları

Genel anlamda GC direnci tek bir hücrenin ya da organizmanın tamamının tüm ya da kısıtlı sayıda GC tepkilerine cevap verememesidir. GCR yokluğu durumunda olduğu gibi mutlak ya da GC konsantrasyonu, apoptozisi inhibe eden ya da kolaylaştıran faktörlerin varlığı gibi özel durumlarla bağlantılı ve göreceli olabilir. GC direnci, özel deneysel veya klinik şartlar altında lenfoid seri hücrelerin GC ile

indüklenmiş hücre ölümüne gidememeleridir. Diğer yanıtları da etkileyip etkilemediğinin, içeriğe bağımlı mı mutlak mı olduğunun, ve altında yatan moleküler mekanizmaların ne olduğunun önemli klinik sonuçları vardır. Örneğin, eğer GCR gen mutasyonları sebep olduysa GC direnci mutlak ve irreversibldir, bu da tüm uzun dönem yan etkileriyle GC tedavisine devam etmeyi sorgulamaktadır. GC ile tetiklenmiş sinyal ileti yolları boyunca GC direnci için neredeyse sonsuz sayıda muhtemel moleküler mekanizma tasarlanabilir (120, 130-132). Kavramsal olarak yukarı doğru ve aşağı doğru mekanizmalar olarak gruplandırılabilirler. Bunlardan ilki GCR'yle, ligandıyla ve onun fonksiyonunu kontrol eden GCR-ilişkili proteinlerle ilgilidir ve hepsini olmasa da GC etkilerinin çoğunu etkileyecek potansiyeli vardır. İkincisi ise sadece bireysel GC yanıtlarıyla etkileşir ve onları etkiler. Lenfoid malignitelerde klinik olarak ilişkili GC direnci hem apoptozis indüksiyonu hem de GC-aracılı hücre döngüsünün arrestisi ile en azından ALL hücre serilerinde ayrı yollar izleyen proseslere direnç göstermeyi gerektirerek GC'nin varlığında tümör hücrelerinin sürekli olarak genişlemesi anlamına gelmektedir. Ne var ki aşağı doğru mekanizmalarda multipl yolların eş zamanlı bir şekilde etkileşime uğraması yukarı doğru mekanizmalar ile olduğundan çok daha komplekstir. GC ile indüklenmiş apoptozise direnç göstermede neden oluşturabilecek bir rol şu ana dek temel olarak yukarı doğru mekanizmalar için sağlanmıştır.

2.5.2: Yukarı Doğru Mekanizmalar-1: Yetersiz Ligand

Glukokortikoidlere yanıtta en baştaki ihtiyaç biyolojik olarak aktif GC'nin yeterli hücre içi seviyelerine olan gereksinimdir. Bu parametreyi teknik olarak değerlendirmek zordur, ancak GC benzeri biyoaktivite tedavi sırasında hastaların plazmasında tespit edilebilir (133). Yetersiz plazma seviyeleri bozulmuş uptake, dolaşımda artmış steroid bağlayıcı proteinlerden ya da eğer ilaç prednizon gibi bir ön ilaç ise azalmış dönüştürücü enzim aktivitesinden kaynaklanabilir. Hücre içi GC seviyeleri geniş ABC taşıyıcı ailesinin üyelerinin aşırı ekspresyonuyla azalabilir. Bunlardan en çok dikkat çekenler MDR-1 gen kodlu P-glikoprotein (P-gp) ve çoklu ilaç direnci ilişkili protein MRP ve resmi olarak ABC ailesine ait olmayan ancak yine de ilaç direncine dahil edilen major bir atlama proteini olan *lung resistance proteini* (LRP) olarak sayılabilir (134). Diğer ajanlara olan apoptotik yanıtı etkilemesine ek olarak GC direncinin bu formu verapamil veya siklosporin gibi P-gp inhibitörlerine

olan hassasiyetiyle ve çeşitli GC analoglarına yönelik değişken etkisiyle karakterizedir (135). Farenin timoma serisinde GC direncinden MDR-1 geninin aşırı ekspresyonu sorumlu tutulmuştur ancak hastalarda bu GC rezistans formunun rolü kesin değildir (130, 134, 136). Sonuç olarak, GC direnci rat osteosarkom hücrelerinde veya bu enzim için transgenik fare osteoblastları/osteositlerinde gösterildiği gibi kortizolü aktif olmayan kortizona dönüştüren 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaz tip 2 gibi GC'yi metabolize eden enzimlerin ekspresyonu sebebi ile olabilir.

2.5.3: Yukarı Doğru Mekanizmalar-2: Glukokortikoid Reseptör Mutasyonları, Bağlantı Yeri Varyantları veya Yetersiz Ekspresyon

Yoldaki bir sonraki kontrol noktası, mutasyonların, GCR varyantlarının oluşunun ve yetersiz ekspresyonun dirence sebep olabileceği GCR'nin kendisidir. GC'ye dirençli insan ALL hücre serilerinde GCR geninde çok sayıda fonksiyon kaybı mutasyonları gözlenmiştir (137, 138) ancak GCR mutasyonlarının in vivo'da büyük bir direnç mekanizması oluşturup oluşturmadığı sorusu cevapsız kalmıştır. Mutajenik potansiyeliyle GC ve kemoterapinin kombinasyonu, GCR mutasyonlarının gelişimine ve bir sonraki seçimine eğilim yaratmaktadır. Ancak yapılan bir çalışmada, kombinasyon kemoterapisi alan 22 kronik lenfatik lösemi hastasındaki GCR'nin DNA ve liganda bağlanma alanlarında hiçbir mutasyon bulgusuna rastlanmamıştır ve relaps ALL'li yaklaşık 50 çocukta yapılan bir başka çalışmada GC direncinin sebebi olarak GCR mutasyonları için sınırlı sayıda bulgu saptanmıştır.

Glukokortikoid direncine alternatif bağlanma, poliadenilasyon veya translasyon başlangıçtan kaynaklanan GCR varyantlarının yani (GR- β , GR- γ , GR-P/GR- δ , GR-A ve GR-B) artmış ekspresyonu da neden olabilmektedir. GCR-P/GR- δ ve GCR-A GC'ye dirençli myelom hücre serisinde, GCR-P ise normal lenfositlerin yanı sıra bir çok hematopoietik ve diğer malignitelerde tespit edilmiştir fakat bu varyantların GC'ye olan duyarlılığı nasıl etkileyebileceği hala aydınlatılamamıştır.(139).

Glukokortikoid reseptör- β bağlantı yeri varyantının dominant negatif bir GCR proteinini kodladığı bildirilmiştir ve lenfoblastik maligniteli hastaları da içeren GC direncinin çeşitli formlarına dahil edilmiştir (140). Çeşitli hematopoietik tümörlerde

eğer varsa da çok az GCR- β ekspresyonu bulunur ve onun GC direnci gelişimindeki rolü tam kesinleşmemiştir(139).

Haarman ve ark (133) bazı çocuk lösemi alt grubunda GCR- γ 'nin muhtemel rolü dışlanamasa da GCR- β 'nin çocuk lösemisindeki GC direnciyle ilgisi olmadığı sonucuna varmışlardır. GCR-B'nin lenfoid malignitelerde GC ile indüklenmiş apoptozise olan hassasiyeti etkileyip etkilemediği bilinmemektedir.

Glukokortikoid reseptör- α başlıca fonksiyonel GCR izoformudur ve yukarıda belirtildiği ekspresyonu deneysel sistemdeki GC hassasiyeti için kritik bir faktördür. Klinik çalışmalarda, tanıdaki hücre başına yaklaşık 10000 kopyanın üzerindeki GCR ekspresyon seviyeleri, çocuk ALL'de tedavide olumlu sonuç arasında ilişki bulunmuştur (141). Daha önce tartışıldığı gibi tedavinin başlangıcındaki GCR seviyeleri, tedavi sırasındaki GCR ekspresyon kinetikleri (yukarı veya aşağı regülasyon) kadar önemli olmayabilir fakat bununla ilgili klinik çalışmalar şu ana kadar bildirilmemiştir.

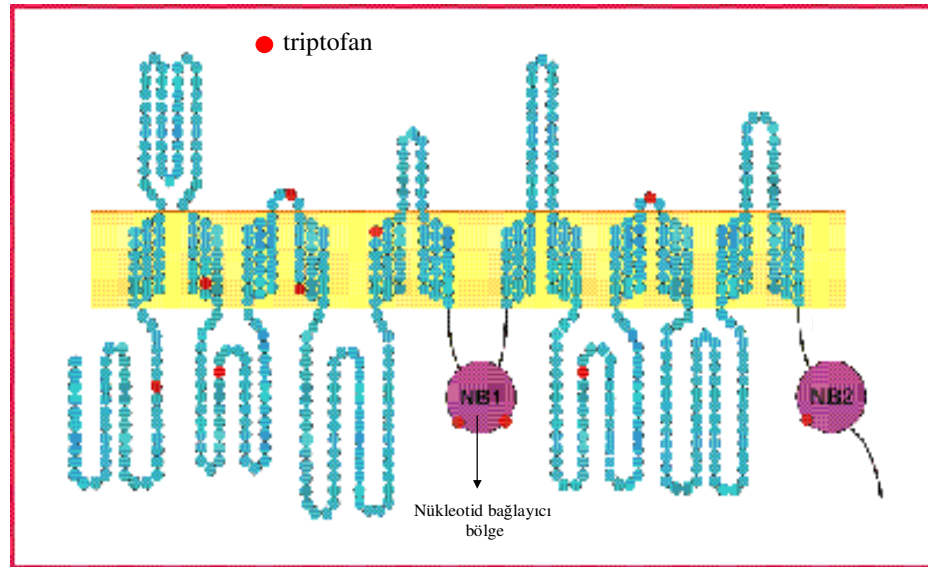
2.5.4: Hücre Ölümü ya da Aktive Edici Sağkalım Sinyallerini Etkileyen Aşağı Doğru Mekanizmalar

Teorik olarak, GC ile indüklenmiş apoptozise olan direnç ölüm indüksiyonu için önemli olan GC ile regüle edilmiş genlerin yanıtızsızlığından ya da bu genlerdeki mutasyonlardan veya GC ile indüklenmiş ölüm yolları ile etkileşen genlerin ve/veya yolların aktivasyonundan kaynaklanır. Deneysel sistemlerde aşağı doğru mekanizmalarla oluşan GC direnci hakkında literatürde pek çok yayın bildirilmiştir; ancak hepsinde olmasa da çoğu durumda gözlenen fenotip ilacın sürekli varlığında sürdürülen gerçek uzun vadeli direnç yerine azalmış hassasiyet olarak belirtilmiştir (27). Hastalarda glutatyon ve glutatyon S-transferaz ekspresyonu ve Bcl-2 reostatu'ndaki değişiklikler çok fazla dikkat çekmiştir. Bcl-2 reostatuyla ilgili olarak, Bcl-2 ailesinin üyelerinin ekspresyonu (bir bakıma çelişkili sonuçlar ortaya çıkmıştır) bir çok çalışmada incelenmiştir. Örneğin bazı araştırmacılar Bcl-XL ya da Bax- α /Bcl-2 oranının lösemi hücrelerinin GC ile indüklenmiş apoptozisten korunmasında rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir, fakat bir yayında in vivo kemoterapi sırasında Bax ve Bcl-2 ekspresyonunda hiçbir değişiklik saptamamıştır ve diğer yayınlarda ise ne Bcl-2 ne Bcl-XL, Mcl-1, Bax, Bad veya Bak'ın tanıda bu tür çocuklarda

öngörüsül öneme sahip olmadığı sonucuna varılmıştır (142-144). Relaps ALL örneklerinde Bcl-2 artmıştır. Antisense oligonükleotidlerince Bcl-2 veya Bcl-XL'in aşağı regülasyonu lösemi ya da myelom hücre serilerinde veya hastalardan yeni izole edilmiş olan myelom hücrelerinde sensitizasyonuna sebep olmuştur (145-147).

2.6: P-glikoprotein

İlk olarak 1976 yılında tanımlanmış olan P-glikoprotein; hücre membranında bulunan protein yapısında ve ATP'ye bağımlı bir taşıyıcıdır. P-gp 1280 aminoasidin birleşmesinden oluşur ve molekül ağırlığı 170 kilodalton'dur. P-gp, yedinci kromozomdaki (7q21) MDR-1 geni tarafından kodlanmaktadır Aminoasid zincirindeki ATP'nin hidrolizi aktif ilaç taşınması için enerji sağlar. P-gp iki ayrı bölümden membrana bağlıdır ve her bölümde 6'şar tane transmembranal segment bulunur (Şekil 2.4) (148,149).



Şekil 2.4: P-glikoprotein'in moleküler yapısı

İlaç direnç mekanizmalarından MDR; hücre içi ilaç birikiminde azalma (ilacın hücre içine girişinde azalma veya hücre dışına atma işlevinde artış), ilaç-hedef ilişkisinde azalma, detoksifikasyon işlevinde artış veya ilaç dağılımında değişiklik şeklinde gözlenebilmektedir. P-gp'nin hücre içi ilaç birikimini azalttığı saptanmış ve bu artıştan yedinci kromozom üzerinde bulunan MDR-1 geninin fazla ekspresyonu sorumlu tutulmuştur. Daha sonra yapılan çalışmalarda sadece P-gp'nin sorumlu

olmadığı, çoklu ilaç direnci sebebi bir protein ailesi olan ve ksenobiyotiklerin taşınmasında görevli ATP bağımlı taşıyıcı proteinlerin (ABC proteinleri) ATP *Binding Cassette Superfamily Transporters* sorumlu olduğu saptanmıştır. P-gp 200'den fazla proteinin içinde bulunduğu ve ilaçların biyolojik membranlardan geçişinden sorumlu olan ABC üst familyasının bir üyesidir Tablo 2.5 (148, 149). Şu ana kadar 30 farklı ATP bağımlı protein tanımlanmış ve dört alt büyük ve dört alt küçük grubu belirlenmiştir.

Tablo 2.5: İnsan ABC Üst familyasına ait taşıyıcı proteinlerinin özellikleri.

Protein	Gen Adı	Alternatif Adlar	Aminoasid sayısı
MDR1 (p-gp)	ABCB1	PGY1;GP170	1280
MRP1	ABCC1	MRP	1531
MPP2	ABCC2	CMOAT. CMRP	1545
BCRP	ABCG2	MXR, ABCP	655

Büyük grupların en önemlileri MRP/CFRT olup, dokuz protein çeşidi içermektedir. Diğer bir büyük grup MDR/TAP'in ise yedi protein çeşidi mevcuttur. ATP bağımlı taşıyıcı proteinler arasında P-gp, çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein ailesi (MRP 1-9) ve meme kanseri direnç proteini, *breast cancer resistance protein* (BCRP) çoklu ilaç direnci ile ilişkili proteinlerdir. ATP bağımlı proteinler haricinde; akciğer direnç proteini, *lung resistance protein* (LRP), deoksisitidin kinaz benzeri enzim modifikasyonları, apoptozisi indükleyen kemoterapötik etkinin inhibisyonu, sitostatik ilaçların hedef enzimlerinde mutasyonlar, p53 gen mutasyonu hematolojik malignitelerdeki diğer ilaç direnç mekanizmaları olarak bilinmektedir (148, 149).

P-glikoprotein enerjiye bağımlı olarak çalışır ve hücre içine giren ilacın dışarı pompalanmasını sağlayarak, hücre içi ilaç konsantrasyonunu azaltmaya çalışır. P-gp artışı ile hidrofobik olan doksorubisin, daunorubisin, etoposid, taxol, vinkristin, vinblastin gibi birçok kemoterapötik ilaca karşı direnç gelişebilmektedir (149). P-gp insanda birçok dokuda bulunmakla birlikte dağılımı nedeni ile normal fonksiyonları arasında bazı ipuçları bulunmaktadır. Taşıyıcı protein olması nedeni ile bazı küçük

lipofilik moleküllerin yanında büyük kompleks yapıya sahip lipidleri, steroid hormonları, peptidleri taşıyabilmektedir. P-gp, endojen toksik bileşikler ve ksenobiyotiklere karşı hematopoetik sistemi korumaktadır (148).

İmmün trombositopenik purpura tedavisinde kullanılan glukokortikoidler de P-gp substratıdır ve yapılan çalışmalarda İTP'li olgularda kontrol grubuna göre artmış lenfosit P-gp fonksiyonu saptanmıştır (28, 29, 150).

Çoklu ilaç direnç mekanizmalarının tanımlanması ile birlikte, oluşan direncin azaltılmasına yönelik çalışmalar da yoğunluk kazanmıştır. Bu konuda özellikle anti MDR-1 oligonükleotidleri ile P-gp ekspresyonu ve fonksiyonunun azaltılması veya staurosporin gibi protein kinaz C inhibitörleri ile MDR-1'in ekspresyonunun azaltılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca P-gp'i bağlayan [3H] azidopin veya [3H]sitostatik ilaçlar ile oluşan çoklu ilaç direnci geri döndürülebilmektedir (150, 151).

Araştırılmış diğer bir konu ise MDR-1 polimorfizmidir. En sık saptanmış ve çalışılmış olma tek nükleotid polimorfizmleri G2677T/A ve C3435T'dir. İTP'li olgularda bu konu ile ilgili bir çalışma olmamakla beraber nefrotik sendromlu olgularda MDR-1 gen polimorfizminin tedaviye yanıtla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (152). Ancak Morita ve ark. (153) yaptıkları in vitro çalışmada her iki polimorfizmin de P-gp fonksiyonunda anlamlı değişikliğe yol açmadığını göstermiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi (ESOGÜTF) Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD'de Temmuz 2007-Nisan 2008 tarihleri arasında akut İTP tanısı alan, yaşları 10 ay ile 17 yaş arasındaki 9'u erkek, 11'i kız olmak üzere toplam 20 çocuk çalışmaya alındı.

İTP tanısında şu kriterler dikkate alındı (1,82);

Purpura dışında fizik muayene bulgularının normal olması, dikkate değer splenomegali ve lenfadenopatinin bulunmaması,

Tam kan sayımında ve periferik yaymada trombositopeni saptanması, eritrosit ve beyaz kürelerin normal bulunması,

Kemik iliği incelemesinde megakaryosit sayısının normal veya artmış bulunması, myeloid ve eritroid serinin normal olması,

Hipersplenizm, mikroanjyopatik hemolitik anemi, DIC, ilaca bağlı trombositopeni, SLE, EBV, HIV, parvovirüs enfeksiyonları gibi sekonder trombositopeni nedenlerinin olmaması.

Öyküde semptomları yeni başlamış veya 6 ayı geçmemiş olan Akut İTP'li olgulardan trombosit sayısı $20.000/\text{mm}^3$ 'ün altında olan ve MDMP tedavisi başlanması planlanan hastalar çalışmaya alındı.

Akut İTP tanısı alan ancak trombosit sayısı $20.000/\text{mm}^3$ 'ün üzerinde olan ve herhangi bir tedavi verilmeyen hastalar, İVİG verilen hastalar, sekonder trombositopeni şüphesi bulunan hastalar çalışmaya alınmadı.

Kontrol grubu olarak sağlam çocuk polikliniğine başvuran steroid kullanım öyküsü olmayan, fizik muayenesinde enfeksiyon bulgusu olmayan yaş ve cinsiyet eşlemeli çocuklardan aileler bilgilendirilerek diğer kan tahlilleri alınırken kan örnekleri alındı. Kontrol grubuna kemik iliği incelemesi yapılmadı.

Çalışma protokolü için ESOGÜTF Etik Kurul'un 2007/162 sayılı kararı ile onay alındı. Çalışmaya alınan çocukların aileleri çalışmanın amacı ve yöntemi anlatılarak bilgilendirildi.

Hastaların başvuru zamanı, yaşı ve cinsiyeti belirlendi. Ayrıntılı öyküsü alındı ve fizik muayeneleri yapıldı.

Hastalardan başvuru anında antekübital venden alınan 2 cc kan örneği ile Hematoloji Laboratuvarı'nda *Volume-conductivity-scatter* prensibi ile *Beckman-*

Coulter LH 750 kan sayımı cihazında tam kan sayımı çalışıldı. Aynı kan örneğinden periferik yayma hazırlandı ve *Wright* boyası ile boyanarak mikroskopta x100 büyütme ile trombositopeni varlığı doğrulandı. Hastalardan steril şartlar altında, lokal anestezi uygulanarak yaşa uygun özellikteki kemik iliği aspirasyon iğnesi ile yaklaşık 0.5 ml kemik iliği aspire edildi; lam üzerine yayılarak *Wright* boyası ile boyandı. Mikroskopta x10, x40 ve x100 büyütme ile incelendi.

Çalışmaya alınan hastalara 3 gün 30 mg/kg/gün, 4 gün 20 mg/kg/gün dozunda toplam 7 gün olmak üzere MDMP tedavisi verildi. Tedavinin birinci (steroid dozu öncesinde) ve yedinci günlerinde tam kanda Th hücrelerinde intrasellüler sitokin düzeyi, lenfosit-monosit yüzeylerindeki GCR düzeyi ölçümü ve T lenfositlerdeki apoptoz tayini için heparinle yıkanmış enjektöre 2 cc, T lenfosit yüzeyindeki P-gp düzeyi ölçümü için ise *K3 EDTA*'lı tüpe 5 cc venöz kan örnekleri alındı. *K3 EDTA*'lı tüpe ve heparinle yıkanmış enjektöre kan örnekleri alındı. Hastalardan ve kontrol grubundan alınan kan örnekleri aynı gün içinde ESOGÜTF Hematoloji Laboratuvarı'nda çalışıldı.

Tam Kanda T Helper Hücrelerinde İntrasellüler Sitokin Düzeyi Ölçümü:

Heparinli enjektördeki 0.5 cc kan, 0.5 cc +2 mM *L-glutamine* (RPMI) ile karıştırıldı, üzerine 25 µl *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate* (PMA), 20 µl *Calcium ionomycine*, 20 µl *Brefeldin* eklendi. 37°C'de 4-6 saat inkube edildikten sonra 4 adet tüpe 100'er µl kan konuldu. Her tüpe 2 ml dilüe *pharmylse* eklenip vortekslendi. 10 dakika karanlıkta bekletildikten sonra 1800 RPM'de 5 dk santrifüj edilip supernatan atıldı, 2 cc *Dulbecco staining buffer* ile yıkandıktan sonra supernatan atıldı. Birinci tüpe CD4 *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) (10 µl)-CD3 PerCP(10 µl), ikinci tüpe CD4 FITC(10 µl)-CD3 PerCP(10 µl), üçüncü tüpe CD4 PE(10 µl)-CD3 PerCP(10 µl), dördüncü tüpe CD4 PE(10 µl)-CD3 PerCP(10 µl) yerleştirildi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkube edildi. Bir kez *Dulbecco staining buffer* ile yıkayıp 1800 RPM'de 5 dakika santrifüj edildi, supernatanı atıldıktan sonra pellete 500 µl *cytofix/cytoperm* konulup vortekslendi. Oda sıcaklığında 15 dk karanlıkta inkube edildi. 1800 RPM'de 5 dakika santrifüj edilip supernatanı atıldı. 2 cc dilüe *Perm/wash* solusyonu konuldu ve vortekslendi. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 10 dakika inkube edildi. 1800 RPM'de 5 dk santrifüj edildi, supernatanı atıldı. Birinci tüpe IL-2 *Phycoerythrin* (PE) (10 µl), ikinci tüpe IL-4 PE(10 µl), üçüncü tüpe IFN-γ

FITC (10 µl), dördüncü tüpe IL-6 FITC(10 µl) eklendi. Karanlıkta 30 dakika inkube edildi, pellete 0.5 cc *cellfix* eklendi, *cellquest* programında 15.000 hücre sayılarak analiz edildi (154). Sonuçlar yüzde olarak verildi. Bir olguda laboratuvar şartları nedeni ile tedavi öncesi ve sonrası Th intrasellüler sitokin ölçümü yapılamadı.

T Lenfosit ve Monosit Yüzeylerindeki GCR Ölçümü:

İki adet tüpe 10'ar µl CD3 (T lenfosit) PerCP, CD14 (monosit) PE konularak lenfositler ve monositler belirlendi. Üzerlerine eklenen 100'er µl heparinli kan ile 15 dakika oda sıcaklığında inkube edildi, 2 cc *lyses* ile eritrositler *lyse* edildi. 10 dakika sonunda 1800 RPM'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra *Phosphate buffered saline* (PBS) ile yıkayıp tekrar santrifüj edildi. 2 tüpe 100 µl, *Reagent A* konulup, 15 dakika oda sıcaklığında inkube edildi. 15 dakika sonunda 3 cc PBS konulup, 300 x g'de 5 dakika santrifüj edilerek supernatan atıldı. Tüplere 100'er µl *Reagent B* kondu, tüplerden birine 20 µl IgG1 FITC yerleştirildi. İkinci tüpe 1/10 dilüsyon yapılmış 20 µl glukokortikoid reseptör FITC eklendi. Oda sıcaklığında 30 dakika inkube edildi, 3 cc PBS ile 300 x g'de 5 dakika santrifüj edilip, supernatan atıldı, 0.5 cc *cellfix* konuldu, *cellquest* programında 15000 hücre sayıldı ve analiz edildi (32). Sonuçlar yüzde olarak verildi.

T lenfosit Yüzeyindeki P-gp Ölçümü:

Birinci tüpe IgG1 PE, ikinci tüpe P-glikoprotein PE 20'şer µl konularak 15 dakika oda sıcaklığında inkube edildi. 2 cc *lysing solution* ile eritrositler *lyse* edildi, 20 dakikalık inkubasyonun sonunda 1800 RPM'de 5 dakika santrifüj edildi, supernatan atıldı. Bir kez PBS ile yıkandı, supernatan atılarak 0.5 cc *cellfix* konulup, *cellquest* programında 15000 hücre sayılarak analiz edildi (150). T lenfositlerde P-gp ekspresyonu *Kolmogorov Smirnov* istatistiksel analizi ile D değeri olarak belirlendi (155, 156).

T Lenfositlerde Apoptozis Tayini:

Üç cc heparinli kan alınıp 1077 dansiteli *ficoll hypaque* ile lenfosit izole edildi. *Binding buffer* distile su ile 10 kat dilüe edildi, izole lenfositler soğuk PBS ile 2 kez yıkandı, soğuk *dilue binding buffer* ile 10^5 - 10^6 hücre/ml'ye ayarlandı, 490 µl hücre süspansiyonu üzerine 5 µl *dilue Annexin V FITC* ve 5 µl PI konuldu. Karanlıkta 10 dakika buzun üzerinde bekletildikten sonra örnek *flowcytometri* ile

ölçüldü (17). Sonuçlar erken, geç ve nekrotik apoptozis olarak yorumlandı. *Annexin V* pozitif olanlar erken apoptozis, *Annexin V* ve *PI* pozitif olanlar geç apoptozis, *PI* pozitif olanlar nekrotik apoptozis olarak değerlendirildi (157, 158). Sonuçlar yüzde olarak verildi.

İstatistiksel Değerlendirme:

İstatistiksel değerlendirme için SPSS for Windows 13.0 programı kullanıldı. Veriler normal dağılım gösteren değişkenlerde ortalama \pm SD, normal dağılım göstermeyen değişkenlerde ise ortanca (%25-%75) değerler olarak verildi. İstatistiksel analizde MDMP tedavisi öncesi değerlerin kontrol grubu ile karşılaştırılmasında sürekli değişkenlerde normal dağılım gösterenlerde bağımsız t testi, normal dağılım göstermeyenlerde Mann Whitney U testi, kategorik değişkenlerde ki kare testi, tedavi öncesi ve sonrası değerlerin karşılaştırılmasında ise normal dağılım gösterenlerde eşleştirilmiş t testi, normal dağılım göstermeyenlerde Wilcoxon t testi kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi (ESOGÜTF) Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD'na başvuran akut İTP'li 20 hasta ile kontrol grubu olarak sağlıklı 20 çocuk çalışmaya alındı.

Çalışmamızda akut İTP'li olguların ortalama yaşı 8.6 ± 5.1 yıl olup kontrol grubu ile (9.3 ± 3.1) benzer bulundu ($p > 0.05$) (Tablo 4.1). Akut İTP'li olguların 11'i (% 55) kız, 9'u (% 45) erkek idi. Kontrol grubunda ise 10 (% 50) kız, 10 (% 50) erkek olup cinsiyet açısından iki grup arasında istatistiksel açıdan fark saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Akut İTP'li hastalarda ve kontrol grubunda yaş ortalaması ve cinsiyet dağılımı.

	Akut İTP	Kontrol grubu	p değeri
Yaş (yıl-ortalama\pmSD)	8.6 \pm 5.1	9.3 \pm 3.1	>0.05
Cinsiyet (yüzde-Erkek/kız)	55.0 / 45.0	50.0 / 50.0	>0.05

Çalışmada akut İTP'li olguların tedavi öncesi ve sonrasındaki trombosit sayısı, beyaz küre sayısı ve absolü lenfosit sayısı, CD4+ T hücrelerde intrasellüler IL-2, IL-4, IL-6 ve IFN- γ düzeyleri, T hücrelerinde P-gp ekspresyonu, T hücre ve monosit yüzeyindeki glukokortikoid reseptör ekspresyonu ve T hücre apoptozisi istatistiksel olarak değerlendirildi.

Akut İTP'li olguların trombosit sayıları ($6300.0 \pm 6035.9/\text{mm}^3$) kontrollere ($328150.0 \pm 85286.7/\text{mm}^3$) göre anlamlı olarak daha düşük iken ($p < 0.001$) beyaz küre (akut İTP tedavi öncesi ve kontrol grubu sırasıyla $8615.0 \pm 3046.0/\text{mm}^3$ / $7610.0 \pm 2319.0/\text{mm}^3$) ve absolü lenfosit sayıları (sırasıyla $2560.0 \pm 840.7/\text{mm}^3$ / $2610.0 \pm 739.1/\text{mm}^3$) açısından fark saptanmadı. ($p > 0.05$) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Akut İTP’li hastalarda ve kontrol grubunda tedavi öncesi trombosit, beyaz küre ve absolü lenfosit sayısı.

	Akut İTP	Kontrol grubu	p değeri
Trombosit sayısı (/mm³)	6300.0±6035.9	328150.0±85286.7	<0.001
Beyaz küre sayısı(/mm³)	8615.0±3046.0	7610.0±2319.0	>0.05
Absolü Lenfosit sayısı (/mm³)	2560.0±840.7	2610.0±739.1	>0.05

Mega doz metilprednizolon tedavisi sonrası olguların hem trombosit (tedavi sonrası ve öncesi sırasıyla 268950.0±198497.9/mm³ / 6300.0±6035.9/mm³) (p<0.001), hem beyaz küre (sırasıyla 16775.2±6020.1/mm³ / 8615.0±3046.0/mm³) (p<0.001) hem de absolü lenfosit sayıları (sırasıyla 3844.5±1974.9/mm³ / 2560.0±840.7/mm³) tedavi öncesine göre anlamlı olarak artmış bulundu (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Akut İTP’li hastalarda tedavi öncesi ve sonrasında trombosit, beyaz küre ve absolü lenfosit sayıları.

	Tedavi öncesi	Tedavi sonrası	p değeri
Trombosit sayısı (/mm³)	6300.0±6035.9	268950.0±198497.9	<0.001
Beyaz küre sayısı(/mm³)	8615.0±3046.0	16775.2±6020.1	<0.001
Absolü Lenfosit sayısı (/mm³)	2560.0±840.7	3844.5±1974.9	<0.01

Kontrol grubu ve akut İTP’li olgularda MDMP tedavisi öncesi CD4+ T hücrelerde intrasellüler IL-2, IL-4, IL-6 ve IFN- γ düzeyleri karşılaştırıldı. Akut İTP’li hastalarda başvuru sırasında, tedavi öncesi CD4+ T hücrelerinde IL-2 (sırasıyla %50.0 (44-60) / %46.5 (35-50), IL-4 (sırasıyla %7.0 (5-10) / %5.0 (4-7)), IL-6 (sırasıyla %3.8 (1.7-6) / %2.0 (1.1-3.6)) ve IFN- γ (sırasıyla %19.9±7.2 / %13.9±3.4) düzeylerinin hepsi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek

saptanmışken ($p<0.05$), IFN- γ /IL-4 oranında (sırasıyla 2.9 ± 1.6 / 2.7 ± 1) farklılık bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 4.4 ve Şekil 4.2).

Tablo 4.4: Tedavi öncesi akut İTP’li hastalarda ve kontrol grubunda CD4+ T lenfosit intrasellüler IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ düzeyleri ve IFN- γ /IL-4 oranı.

	Akut İTP	Kontrol grubu	p değeri
IL-2 (%)	50.0 (44-60)	46.5 (35-50)	<0.05
IL-4 (%)	7.0 (5-10)	5.0 (4-7)	<0.05
IL-6 (%)	3.8 (1.7-6)	2.0 (1.1-3.6)	<0.05
IFN-γ (%)	19.9 ± 7.2	13.9 ± 3.4	<0.05
IFN-γ/IL-4	2.9 ± 1.6	2.7 ± 1.0	>0.05

Akut İTP’li hastalarda tedavi sonrası CD4+ T lenfosit intrasellüler sitokin seviyeleri kontrol olguları ile karşılaştırıldığında ise IL-2 (akut İTP tedavi sonrası ve kontrol grubu sırasıyla %41.0 (30-45) / %46.5 (35-50)) ve IFN- γ (sırasıyla %15.8 \pm 5.5 / %13.9 \pm 3.4) düzeylerinde farklılık bulunmadı ($p>0.05$). IL-4 (sırasıyla %8.0 (6-11) / %5.0 (4-7)) ve IL-6 (sırasıyla %4.7 (3-10) / %2.0 (1.1-3.6)) düzeylerinin akut İTP’li hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı ($p<0.05$). IFN- γ /IL-4 oranı ise tedavi sonrası akut İTP’li olgularda (1.9 ± 1.2) kontrol grubuna (2.7 ± 1) göre anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p<0.05$) (Tablo 4.5, Şekil 4.2).

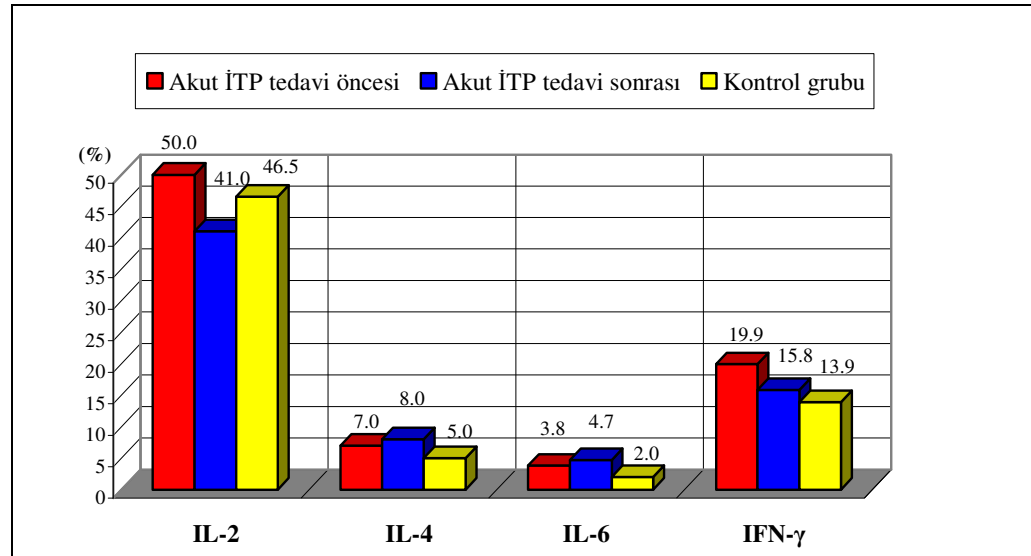
Tablo 4.5: Tedavi sonrası akut İTP'li hastalarda ve kontrol grubunda CD4+ T lenfosit intrasellüler IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ düzeyleri ve IFN- γ /IL-4 oranı.

	Akut İTP Tedavi sonrası	Kontrol grubu	p değeri
IL-2 (%)	41.0 (30-45)	46.5 (35-50)	>0.05
IL-4 (%)	8 (6-11)	5 (4-7)	<0.05
IL-6 (%)	4.7 (3 -10)	2.0 (1.1-3.6)	<0.05
IFN-γ (%)	15.8 \pm 5.5	13.9 \pm 3.4	>0.05
IFN-γ/IL-4	1.9 \pm 1.2	2.7 \pm 1.0	<0.05

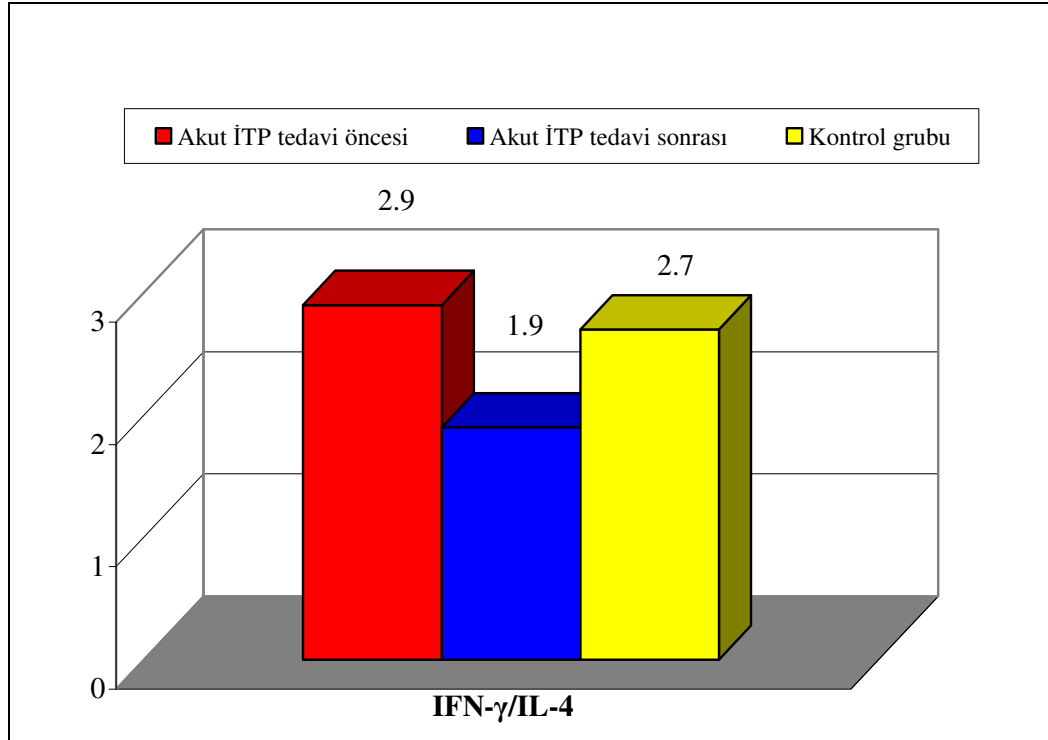
Çalışmamızda MDMP tedavisi öncesi ve sonrası Th lenfositlerde intrasellüler sitokin düzeyleri değerlendirildiğinde tedavi sonrası IL-2 (tedavi öncesi ve sonrası sırasıyla %50 (44.0-60.0) / %41 (30-45)) ve IFN- γ (sırasıyla %19.9 \pm 7.2 / %15.8 \pm 5.5) düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmışken ($p < 0.05$), IL-4 (sırasıyla %7 (5 -10) / %8 (6-11)) ve IL-6 (%3.8 (1.7-6) / %4.7 (3-10.0)) düzeyinde ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir yükselme bulundu ($p > 0.05$). IFN- γ /IL-4 oranının da tedavi sonrası (1.9 \pm 1.2) tedavi öncesine (2.9 \pm 1.6) göre azalmış olduğu saptandı ($p < 0.05$). (Tablo 4.6, Şekil 4.2). Tedaviye dirençli iki olguda da tedavi sonrası IL-2 düzeyleri tedavi öncesine göre artmışken, IFN- γ düzeyleri tedavi öncesi ile benzerdi. Olguların birinde IL-4 ve IL-6 düzeyinde tedavi sonrası öncesine göre artış mevcutken, diğer olguda tedavi sonrası ve öncesi değerler benzer bulundu.

Tablo 4.6: Akut İTP'li hastalarda tedavi öncesi ve sonrası CD4+ T lenfosit intrasellüler IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ düzeyleri ve IFN- γ /IL-4 oranı.

	Akut İTP Tedavi öncesi	Akut İTP Tedavi sonrası	p değeri
IL-2 (%)	50.0 (44-60)	41.0 (30-45)	<0.05
IL-4 (%)	7.0 (5-10)	8.0 (6-11)	>0.05
IL-6 (%)	3.8 (1.7-6)	4.7 (3-10)	>0.05
IFN-γ (%)	19.9 \pm 7.2	15.8 \pm 5.5	<0.05
IFN-γ/IL-4	2.9 \pm 1.6	1.9 \pm 1.2	<0.05



Şekil 4.1. Akut İTP'li hastalarda tedavi öncesi, sonrası ve kontrol grubunda Th intrasellüler IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ düzeyleri.



Şekil 4.2. Akut İTP’li hastalarda tedavi öncesi, sonrası ve kontrol grubunda IFN-γ/IL-4 oranı.

Tedavi öncesi akut İTP’li hastalarda ve kontrol grubunda T lenfositlerde P-gp ekspresyonu karşılaştırıldığında iki grup arasında farklılık bulunmadı (akut İTP tedavi öncesi ve kontrol grubu sırasıyla 0.41 ± 0.12 / 0.39 ± 0.17) ($p > 0.05$) (Tablo 4.7, Şekil 4.3). T lenfositlerde (sırasıyla %40.1 (14.6-68.5) / %58.7 (5.6-90.0)) ve monositlerde (sırasıyla %71 (11.0-85.0) / %61 (20.0-85.3)) flowsitometrik yöntemle ölçülen glukokortikoid reseptör ekspresyonu açısından da iki grup arasında istatistiksel açıdan fark saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo 4.7, Şekil 4.4).

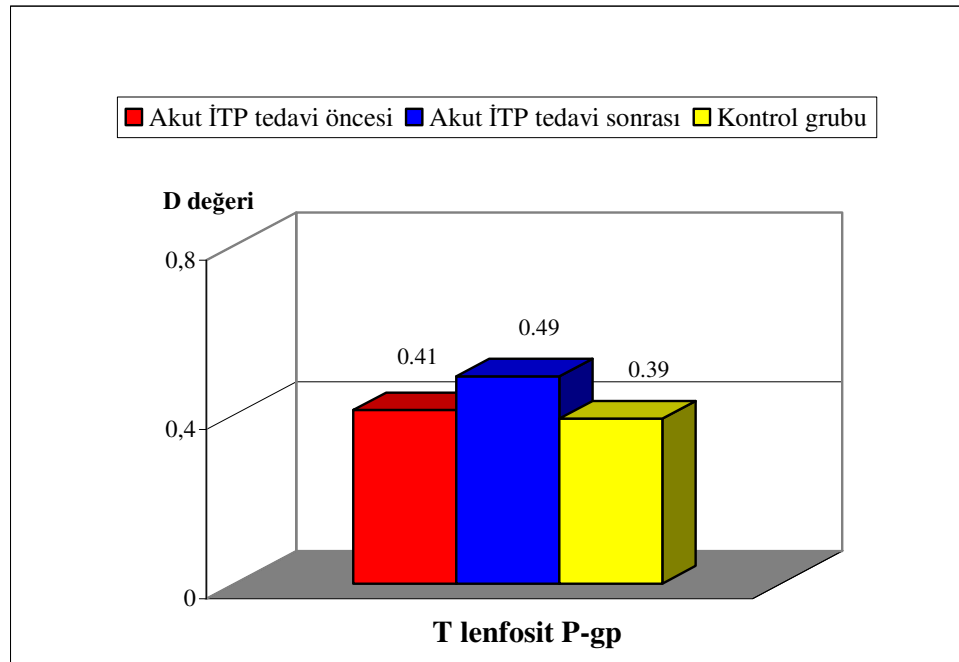
Tablo 4.7: Tedavi öncesi akut İTP'li hastalarda ve kontrol grubunda T hücrelerinde P-gp ekspresyonu, T hücre ve monosit yüzeyindeki glukokortikoid reseptör ekspresyonu.

	Akut İTP	Kontrol grubu	p değeri
P-gp ekspresyonu (D değeri)	0.41 ±0.12	0.39±0.17	>0.05
T hücre GR ekspresyonu (%)	40.1 (14.6-68.5)	58.7 (5.6-90.0)	>0.05
Monosit GR ekspresyonu (%)	71.0 (11.0-85.0)	61.0 (20.0-85.3)	>0.05

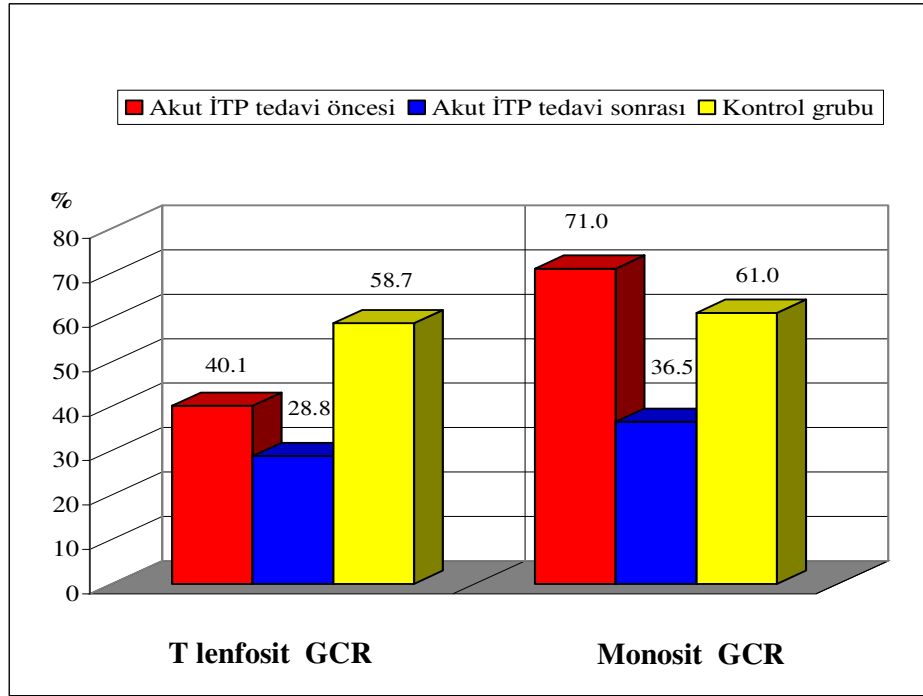
Akut İTP'li hastalarda MDMP tedavisi sonrası P-gp ekspresyonunda (0.49 ±0.11) tedavi öncesine (0.41 ±0.12) göre anlamlı bir artış bulundu (p<0.05) (Tablo 4.8, Şekil 4.3). Tedaviye dirençli sadece iki olgu bulunması nedeni ile tedaviye dirençli olgular ile yanıt verenler arasında bir karşılaştırma yapma imkanı olmadı. Bunun yanında tedaviye dirençli olguların birinde tedavi öncesi P-gp ekspresyonu D değeri 0.37'den tedavi sonrası 0.45'e yükselmiş iken, diğer olguda tedavi öncesi P-gp ekspresyonu D değeri 0.42'den 0.30'a düşmüş bulundu. Hem T lenfositlerde (tedavi öncesi ve sonrası sırasıyla %40.1 (14.6-68.5) / %28.8 (5.4-80.4)) hem de monositlerde (sırasıyla %71.0 (11.0-85.0) / %36.5 (17.0-93.5)) tedavi öncesi ve sonrası GCR ekspresyonunda farklılık bulunmadı (p>0.05) (Tablo 4.8, Şekil 4.3, Şekil 4.4). Tedaviye dirençli olgulardan birinde MDMP tedavisi sonrası T lenfosit GCR ekspresyonu %40.1'den %80.7'ye, monosit GCR ekspresyonu ise %64'ten %92'ye artmış iken diğer dirençli olguda tedavi sonrası T lenfosit GCR ekspresyonu %59.3'ten %1.43'e, monosit GCR ekspresyonu ise %80'den %10'a azalmış bulundu. Bunun yanında MDMP tedavisine yanıt veren hastalarda T lenfositlerdeki GCR ekspresyonuna bakıldığında bazı olgularda %85.6'dan %3.8'e belirgin düşüş yanında %7.3'ten 97.9'a belirgin artış gösteren olguların da mevcut olduğu görüldü. Benzer bulgu monosit GCR ekspresyonunda da mevcuttu.

Tablo 4.8: Akut İTP'li hastalarda tedavi öncesi ve sonrası T hücrelerinde P-gp ekspresyonu, T hücre ve monosit yüzeyindeki glukokortikoid reseptör ekspresyonu.

	Akut İTP Tedavi öncesi	Akut İTP Tedavi sonrası	p değeri
P-gp ekspresyonu (D değeri)	0.41 ±0.12	0.49 ±0.11	<0.05
T hücre GR ekspresyonu (%)	40.1 (14.6-68.5)	28.8 (5.4-80.4)	>0.05
Monosit GR ekspresyonu (%)	71.0 (11.0-85.0)	36.5 (17.0-93.5)	>0.05



Şekil 4.3. Akut İTP'li hastalarda tedavi öncesi, sonrası ve kontrol grubunda T lenfositlerde P-gp ekspresyonu (D-değeri)



Şekil 4.4. Akut İTP’li hastalarda tedavi öncesi, sonrası ve kontrol grubunda T hücre ve monosit yüzeyinde GCR ekspresyonu (yüzde ekspresyon).

Flowsitometrik analizle Anneksin-V ve PI kullanılarak yapılan değerlendirmede akut İTP’lilerde MDMP tedavisi öncesi ile sağlıklı kontrollerde T lenfositlerde erken apoptozis, geç apoptozis ve nekrotik apoptozis çalışıldı. Akut İTP’lilerde T lenfositlerde erken apoptozis yüzdesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük saptandı (akut İTP tedavi öncesi ve kontrol grubu sırasıyla %11.6 (7.7-15.7) / %20 (16.6-24.9)) ($p < 0.01$). Geç apoptotik (sırasıyla %0.9 (0.6-1.2) / %0.7 (0.3-1.3)) ve nekrotik apoptotik T lenfosit yüzdesi (sırasıyla %0.4 (0.2-0.8) / %0.5 (0.1-0.8)) açısından her iki grupta istatistiksel fark saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo 4.9 ve Şekil 4.5).

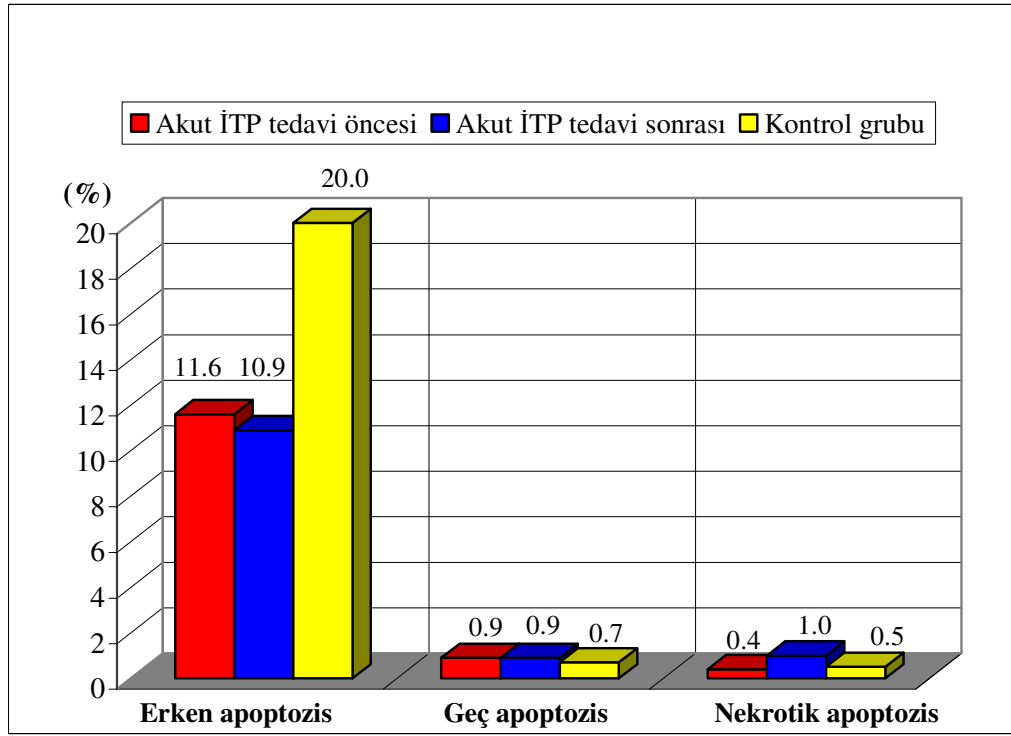
Tablo 4.9: Tedavi öncesi akut İTP'li hastalarda ve kontrol grubunda T hücrelerinde erken, geç ve nekrotik apoptozis.

	Akut İTP	Kontrol grubu	p değeri
T hücre apoptozis erken (%)	11.6 (7.7-15.7)	20.0 (16.6-24.9)	<0.01
T hücre apoptozis geç (%)	0.9 (0.6-1.2)	0.7 (0.3-1.3)	>0.05
T hücre apoptozis nekrotik (%)	0.4 (0.2-0.8)	0.5 (0.1-0.8)	>0.05

MDMP tedavisi öncesi ve sonrası T lenfositlerde erken (tedavi öncesi ve sonrası sırasıyla %11.6 (7.7-15.7) / %10.9 (7.1-16.8)) ve geç apoptoziste (sırasıyla %0.9 (0.6-1.2) / %0.9 (0.5-1.3)) fark görülmedi ($p>0.05$). Bununla beraber nekrotik apoptozis tedavi sonrası (%1 (0.5-2.1)) öncesine (%0.4 (0.2-0.8)) göre anlamlı olarak artmış bulundu ($p<0.01$) (Tablo 4.10, Şekil 4.5).

Tablo 4.10: Akut İTP'li hastalarda tedavi öncesi ve sonrasında T hücrelerinde erken, geç ve nekrotik apoptozis.

	Akut İTP Tedavi öncesi	Akut İTP Tedavi sonrası	p değeri
T hücre apoptozis erken (%)	11.6 (7.7-15.7)	10.9 (7.1-16.8)	>0.05
T hücre apoptozis geç (%)	0.9 (0.6-1.2)	0.9 (0.5-1.3)	>0.05
T hücre apoptozis nekrotik (%)	0.4 (0.2-0.8)	1.0 (0.5-2.1)	<0.01



Şekil 4.5. Akut İTP'li hastalarda tedavi öncesi, sonrası ve kontrol grubunda T hücrelerinde apoptozis.

5- TARTIŞMA

İmmün trombositopenik purpura trombosit membranındaki antijenlere karşı antikör üretimi, retiküloendotelial sistemde trombositlerin makrofajlarca Fc-aracılı artmış yıkımı ile karakterize edinsel organ-spesifik otoimmün bir hastalıktır (69, 159). Etiyolojisi kesin olarak bilinmemekle beraber İTP sebebi olabilecek birçok farklı mekanizma gösterilmiştir. İTP’de ana immunolojik defektin antitrombosit antikörler üreten otoreaktif B lenfositler olduğu kabul edilmektedir. Ancak disfonksiyonel hücrel immünitenin de İTP patofizyolojisinde önemli olduğu bilinmektedir (160). Hücrel immünite disfonksiyonu; otolog trombosit antijenlerini tanıyıp cevap veren ve B hücreleri tarafından trombosit reaktif antikörlerin üretilmesini indükleyen aktive trombosit-spesifik otoreaktif T hücrelerini içermektedir. Ayrıca T hücre aracılı sitotoksikite ve kompleman aracılı trombosit lizisini de kapsamaktadır (161-163). Sonuçta İTP’nin patofizyoloji ve patogenezi, immün sistem dengesinin bir kısmının potansiyel olarak etkilendiği kompleks bir durumdur.

Çalışmamızda akut İTP’li hastalarda MDMP tedavisi sonrası lenfosit sayısında anlamlı bir artış bulunmuştur. İTP’de MDMP tedavisinin immün sistem üzerine etkilerinin araştırıldığı Yetgin ve ark.’nın (95) çalışmasında da total lenfosit sayısı ve bunun yanında CD3+, CD4+, CD19+ ve CD8+ lenfosit suptiplerinin tümünde tedavi sonrası artış bildirilmiştir. Bu çalışmada tedavi sonrasında lenfosit sayısındaki artış metilprednizolon tedavisinin etkisi olarak değerlendirildi.

Otoimmün hastalıkların sıklıkla sitokin anormallikleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (60). İTP’nin de bazı sitokin anormallikleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (108).

Akut İTP’de sitokin profilinin değerlendirildiği bu çalışmada, olgularda MDMP tedavisi öncesi ve sonrası flowsitometri ile CD4+ T hücrelerde intrasellüler IL-2, IL-4, IL-6 ve IFN- γ düzeyleri çalışılmış ve sağlıklı kontroller ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak başvuru sırasında, tedavi öncesi CD4+ T hücrelerinde IL-2, IL-4, IL-6 ve IFN- γ düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı artış saptandı. IFN- γ /IL-4 oranında benzer bulunması Th1 veya Th2 sitokin profiline doğru bir kayma olmadığını göstermektedir. Th1 ile Th2 yanıtlarına aracılık eden

hücrelerden daha az diferansiye Th hücrelerinden oluşan ve her iki hücre tipinin sitokinlerini üretebilen Th0 sitokin profilini desteklemektedir (108).

Literatürde İTP'de sitokin yanıtını araştıran çalışmalarda hem farklı olgu grupları (akut, kronik, karışık), farklı yaş grupları (çocuk, erişkin, karışık) hem de metodolojik olarak farklı yöntemler (plazmada sitokin düzeyi, periferik lenfositlerde intrasellüler sitokin düzeyinde flowsitometri ya da T hücre genlerinde *Reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) gibi) kullanılmıştır. Bu nedenle sitokin profili ile ilgili farklı yorumlar olduğu görülmektedir.

Semple ve ark. (9) kronik İTP'li çocuklarda Th1 aktivasyon paternine eğilimli erken CD4+ Th0 sitokin paterni saptamıştır. Kronik İTP'de artmış serum IL-2, IFN- γ , IL-10 seviyeleri saptanmışken IL-4 seviyeleri ölçülebilir düzeyde bulunmamıştır (9). Daha sonraki çalışmalar da kronik İTP'de Th0 ve özellikle Th1 ilişkili sitokinlerin varlığını doğrulamıştır. Garcia-Suarez ve ark. (12) kronik İTP'li hastaların CD2+ lenfositlerinin T hücre mitojeni *Phytohemagglutinin* (PHA) ile stimülasyonu sonrası artmış seviyede IFN- γ ve TNF- α ürettiğini göstermiştir. Yorum olarak da şiddetli trombositopenili hastalarda Th1 reaktivitesine doğru bir fonksiyonel kayma olduğunu belirtmişlerdir. Takiben Abboud ve ark. (164) kronik İTP'li 10 çocuğun 8'inde serumda anlamlı olarak artmış GM-CSF seviyesi göstermiştir. GM-CSF yine bir Th1 belirteci olup kronik İTP'li bazı hastalarda şiddetli trombositopeniye yanıtla ilişkili olabilir. Lazarus ve ark. (165) IL-2'ye benzer özellikler taşıyan bir sitokin olan IL-15'in artmış seviyelerde bulunduğunu bildirmiştir. Yoshimura ve ark. (166) ise kronik İTP'li olgularda artmış seviyede IL-2, IFN- γ ve M-CSF rapor etmiştir. Bu grup artmış seviyede solubl Fas ve Fas L saptamış olup bu apoptozisle ilişkili moleküllerin hastalık patogenezinde rol oynayabileceğini öne sürmüştür .

Kronik İTP'de anormal Fas ve FasL seviyeleri Shenoy ve ark (167) tarafından da gösterilmiş olup, değişmiş Fas yolu sinyalinin defektif IL-2 sekresyonuyla beraber ya da beraber olmadan hematolojik otoimmünitede etiyolojide göz önünde bulundurulması gerektiği yargısına varmışlardır. Mouzaki ve ark. (14) ise 18 akut İTP'li çocuk olguda İVİG tedavisi öncesi ve sonrası RT-PCR ile IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10 düzeyleri ile serumda TGF- β seviyesini araştırmıştır. Sonuç olarak akut İTP'de Th0 sitokin profili saptanmışken takipte kronik İTP'ye ilerleyen

olgularda ise Th1 sitokin yanıtı bildirmişlerdir. İlginç olarak stabil remisyonda olan ve İVİG ile tedavi edilen ve kür olan olgularda polarize Th2 sitokin yanıtı gösterilmiştir. TGF- β plazma seviyesi ise aktif hastalıkta düşük iken remisyonda artmış bulunmuştur. Andersson ve ark.(107) DNA *mikroarray* ve RT-PCR analizlerini kullandıkları çalışmalarında aktif İTP'lilerde T hücre genlerin upregule olduğu ve IFN- γ 'nın anlamlı olarak artmış olduğunu bildirmiştir. Wang ve ark. (59) erişkin kronik İTP'li (aktif ve remisyonda) olgularda hem periferik kanda hem de splenositlerde Th hücre profili yanında CD8+ sitotoksik T hücrelerinin de sitokin profillerini araştırmış ve aktif İTP'lilerde kontrole göre periferik kanda anlamlı olarak artmış Th1/Th2 ve Ts1/Ts2 oranı, splenositlerde de anlamlı olarak artmış Th1/Th2 oranı bildirmişlerdir. İTP'de sitotoksik T lenfosit profili ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada, CD8+ T hücreleri; IL-4 veya IFN- γ sekrete eden CD4+ T hücrelerinin gelişimini etkileyerek in vivo Th1/Th2 cevabının dengesini değiştirdiği bildirilmiştir (59, 168-170). Ayrıca CD8+ T hücreleri; CD4+ Th hücreleri perforin-aracılı sitotoksikite gelişiminde de önemli role sahiptir ve ko-stimulatuar etkileşimleri inhibe ederek CD4+ T hücreleri proliferatif cevaplarını da baskıladığı bildirilmiştir (168, 171, 172). CD8+ T hücreleri; B hücrelerince antikor üretimi ve makrofaj aktivasyonunda immün cevabın başka komponentlerinde rol almaktadır (173-175). Vukmanovic-Stejic ve ark. (13); Tc1 klonlarının Th1-yanlı CD4 efektörlerinin gelişimini desteklerken Tc2 klonlarının aksini yaptığını bildirmiştir. Ayrıca Tc2 klonlarının sadece Th2 efektörlerini desteklemekle kalmayıp aynı zamanda Th1 hücreleri gelişimini de baskıladıklarını görmüşlerdir.

Bu bahsedilen sonuçların bazılarının aksine, aktif kronik İTP'nin Th0/Th1 sitokin paterni ile ilişkili olabileceğini bildiren yayınlar vardır. Crossley ve ark. (13) kronik İTP'li olguların periferik kan mononükleer hücrelerinin in vitro PHA ile stimülasyonu sonucu düşük seviyede IL-2 ve IFN- γ ürettiğini bazı hastaların periferik kan mononükleer hücrelerinin ise yüksek seviyede IL-10 ürettiğini saptamışlardır. Hastaların IFN- α ile tedavi sonrası ise PHA ile stimüle hücrelerin IL-2 ve IFN- γ 'yı artmış, IL-10'u da azalmış salgıladığını rapor etmişler ve IFN- α tedavisinin Th1 sitokin seviyelerini artırıp otoantikor üretiminin azalmasına neden olduğu yorumuna varmışlardır. Webber ve ark. (176) kronik İTP'li olgularda plazma IL-4 seviyelerinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu, IFN- γ düzeylerinin ise kontrol

olguları ile farklılık göstermediğini bildirmiştir. IL-4'ün kronik İTP tedavisinde potansiyel bir hedef olabileceğini öne sürülmüştür. Ancak bu çalışmada bir grup hastanın remisyonda olduğu daha önce tedavi almış oldukları göz önünde bulundurulduğunda bu sonucun yorumlanması zorlaşmaktadır.

Çalışmamızda MDMP tedavisinin Th intrasellüler sitokin düzeyleri üzerine etkileri değerlendirildiğinde, tedavi sonrası IL-2 ve IFN- γ düzeyinde anlamlı bir azalma, IL-4 ve IL-6 düzeyinde ise istatistiksel anlama ulaşmayan bir yükselme saptandı. IFN- γ /IL-4 oranı ise tedavi sonrası anlamlı olarak azalmış bulundu. Tedavi sonrası sitokin düzeylerinin kontrol olguları ile karşılaştırmasında, IL-2 ve IFN- γ düzeylerinin benzer, hem IL-4 hem de IL-6 düzeylerinin ise akut İTP grubunda kontrollere göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptandı. Bu sitokin profili Th2 sitokin paternini göstermektedir. Bunun yanında tedavi verilmeden gözlem altında tutulan ve spontan remisyona giren akut İTP'li olgularda remisyon sürecinde Th sitokin profilini ortaya koymak için ayrı bir çalışma grubu oluşturulabilir.

Glukokortikoidlerin sitokin profili üzerindeki etkileri önce in vitro olarak hayvan deneylerinde, sonra in vitro olarak insan periferik kan mononükleer hücrelerinde ve sonrasında da Grave's hastalığı, romatoid artrit ve SLE'de araştırılmıştır (177-184). Tüm bu çalışmalar GC'lerin Th2 tipinde sitokin profiline neden olduğunu bildirmiştir. Literatürde görebildiğimiz kadarıyla İTP'de GC'lerin tedavide kullanımının sitokin profili üzerindeki etkisini gösteren literatürde görebildiğimiz kadarıyla tek yayın vardır. Guo ve ark.(185) 2007'de yayınladıkları çalışmada 52 erişkin kronik İTP'li olguda 4 günlük 40mg/gün oral deksametazon tedavisi öncesi ve sonrası IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 ve TGF- β 1 düzeylerini bildirmişlerdir. Tedavi öncesi IFN- γ , IL-2 düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksek iken IL-4, IL-10 ve TGF- β 1 düzeyleri anlamlı olarak daha düşük yani Th1 sitokin profili bildirilmiştir. Tedavi sonrası ise IFN- γ , IL-2 düzeyleri düşmüşken, IL-4, IL-10 düzeyleri artmış saptanmıştır. TGF- β 1 düzeyi de tedavi ile artmış ancak kontrollere göre hala daha düşük olarak belirtilmiştir. Takipte sitokin düzeylerinin remisyonda olan olgularda stabil kaldığı relaps olan hastalarda ise tedavi öncesi Th1 yanıtına döndüğü ifade edilmiştir. Bu bulgularla deksametazon tedavisinin Th1 sitokin hakimiyetini düzeltebileceği yorumuna varılmıştır (185).

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar ve Guo ve ark.'nın (185) yayını beraber değerlendirildiğinde GC'lerin İTP tedavisinde fagositoz ve B lenfositlerce antikor üretiminin baskılanması gibi bilinen etkilerinin yanı sıra sitokin profilinin Th0/Th1 yanıtından Th2 paternine kaymasının sağlanmasının da bir etki mekanizması olabileceği öne sürülebilir. Bu sonuçlar Th0/Th1 hücre yanıtının Th2 paternine kaymasının hastalığı aktif süreçten remisyona taşıdığını göstermektedir ve bu da İTP'de Th sitokin paternini regüle eden immünoterapilerin hastalık tedavisinde etkin olacağına işaret etmektedir.

Bahsedilen tüm bu çalışmalar ve çalışma sonuçlarımız beraber yorumlandığında akut İTP'nin Th0 sitokin paterni ile karakterize bir hastalık olduğu, aktif hastalığın devam ettiği ve kronik forma ilerleyen olgularda ise Th1 sitokin profilinin hakim olduğu, remisyonun spontan ya da farklı tedaviler sonrası Th2 sitokin profiline kayma ile sağlandığı yargısına varılmıştır.

İTP'nin klasik tedavisinde GC'ler, İVİG, immun supresör ajanlar yer almaktadır. Akut olguların %10-20'si kronik forma ilerlemekte ve kronik form olguların yaklaşık %30'unun da GC'lere direnç gösterdiği belirtilmiştir. Vinka alkaloidleri, alkile edici ajanlar refraktör İTP tedavisinde kullanılabilir. Tüm bu terapötik ajanların hem yüksek oranda yan etki riski hem de maliyeti mevcuttur (85). İTP'li olgularda tedavi başarısızlığı ilaç rezistansı mekanizmaları ile ilişkili olabilir. Bunlardan malign hastalıklarda en sık çalışılmış olanı MDR-1 olup, P-gp'nin aşırı fonksiyonu ile karakterizedir (186). P-gp 170 kDa'luk bir transmembran molekül olup ABC transporterler süper ailesinin bir üyesidir (187). MDR-1 fenotipi vinka alkaloidler, antrasiklinler, GC'ler ve diğer bazı maddeler karşı azalmış duyarlılığı içerir (187). Bu durum P-gp tarafından ilaç dışarı atılımı sonucu meydana gelmektedir. Bu nedenle intrasellüler ilaç konsantrasyonu azalır ve bu da terapötik etkiyi azaltır (188).

Çalışmamızda akut İTP'li olgularda MDMP tedavisi öncesi ve sonrası flowsitometri ile T lenfositlerde P-gp ekspresyonu çalışılmış olup sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta tedavi öncesi T lenfositlerde P-gp ekspresyonu kontrol grubu ile benzer olarak saptanmış iken tedavi sonrası P-gp ekspresyonu tedavi öncesine göre anlamlı bir artış göstermiştir. Tedaviye dirençli sadece iki olgu bulunması nedeni ile tedaviye dirençli olgular ile yanıt verenler arasında istatistiksel

karşılaştırma yapılamadı. Bunun yanında tedaviye dirençli olguların birinde tedavi öncesi P-gp ekspresyonu D değeri 0.37'den tedavi sonrası 0.45'e yükselmiş iken, diğer olguda tedavi öncesi P-gp ekspresyonu D değeri 0.42'den 0.30'a düşmüş bulundu. Ruiz-Soto ve ark. (29) 2003 yılında yaptıkları çalışmada 30 erişkin kronik İTP'li olgu ile 25 sağlıklı kontrolleri değerlendirmişlerdir. İTP'li olgular 1. grup yanıt verenler; ilaçla yada ilaçsız $50000/\text{mm}^3$ trombosit düzeyine sahip patolojik kanaması olmayanlar, 2. grup tedaviye bağımlı; trombosit sayısının iyileştirilmesi için tedavinin zorunlu olduğu olgular, 3. grup refrakter; Amerikan Hematoloji Birliği önerileri doğrultusunda tedavi alan ancak trombosit düzeyi yükseltilemeyen olgular, 4. grup stabil hastalık; spontan remisyona giren olgular olmak üzere 4 gruba ayrılmışlardır. Çalışmada olgulardan alınan periferik venöz kandan periferik kan mononükleer hücreler izole edilmiş, bu hücreler P-gp ile dışarı atılan ve floresan bir ilaç olan daunorubisin ile inkübe edilmiş ve P-gp fonksiyonel aktivitesi flowsitometri ile analiz edilerek sonuçlar daunorubisin atılımı yapan lenfosit yüzdesi olarak verilmiştir. Sonuçta İTP hastalarında P-gp aktivitesi gösteren lenfosit yüzdesi kontrollere göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. P-gp fonksiyonu refrakter grupta (ortalama %6.4) tedaviye bağımlı (ortalama %5.4) yanıt veren (ortalama %6.4) ve stabil hastalığı (ortalama %5.2) olan gruplara daha yüksek bulunmuş ancak istatistiksel fark saptanmamıştır (29). İTP'de P-gp ile ilgili diğer çalışmada ise refrakter veya rekürren İTP'li ya da Evans' sendromlu olgularda rhodamin 123 kullanılarak P-gp fonksiyonu araştırılmış ve önceki çalışma ile benzer sonuç bulunmuştur (28).

Refrakter grupta artmış P-gp aktivitesi otoimmün hücre aktivasyonu sonucu, uzun sürede yüksek ilaç gereksinimince indüklenmiş olabilir ya da gerçekten tedaviye refrakter olmasının nedeni olabilir. Bununla beraber diğer ilaç rezistans mekanizmaları dışlanamaz. Alternatif transporter proteinler, multidrug rezistans protein 1 (MRP-1) ve bunun homologları (MRP 2, MRP 3, MRP5, MRP6) ve ayrıca meme kanseri rezistan protein kemoterapötik ajanlara rezistansta gösterilmiştir (189, 190).

Bu iki çalışmada, çalışmamızdan farklı olarak kronik İTP' ya da rekürren/refrakter İTP'li olgular yer almaktadır. Önceki çalışmalarda olguların çalışma öncesi bir veya daha fazla glukokortikoid tedavi alma ihtimali göz önünde

bulundurulmalı ve çalışma sonuçlarımız ile İTP’de P-gp fonksiyonunun değerlendirildiği literatürdeki iki çalışma karşılaştırılırken daha önce glukokortikoid tedavisi alanların farklı sonuçlar doğurabileceğine dikkat edilmelidir.

Otoimmün hastalıklarda özellikle romatoid artritte MDR-1 fenotipine dair araştırmalar 1990’ların ortasında Jogensen ve ark.(191) ile Maillefet ve ark.(192) tarafından başlatılmıştır. Bu araştırmacılar, sırayla 3 veya daha fazla ikincil ajan ile tedavi öyküsü bulunan RA’lı hastaların sinoviyal sıvısında artmış P-gp mRNA seviyesi ile uzun dönem steroid tedavisi alan RA’lı hastalarda periferik lenfositlerde P-gp yüzey aşırı ekspresyonu saptamıştır. Bu bildiriler steroid ve/veya immünsupresif ilaç alan RA’lı hastalarda immün hücrelerde aşırı P-gp aktivitesinin bu ajanların artmış hücre dışı atılımı ve dolayısıyla azalmış terapötik etkinlik ile ilişkili olabileceğini öne sürmektedir. Yudoh ve ark.(193), sulfasalazin veya busillamine kısmen yanıtız RA’lı hastalarda Th1 hücrelerde yüksek P-gp ekspresyonu bildirmişlerdir.

P-gp fonksiyonunun kemoduyarlaştırıcılar olarak bilinen siklosporin A, verapamil gibi bir dizi maddelerce engellenebileceği gösterilmiştir (193, 194). Neoplastik durumlarda multidrug rezistansın geri çevrilebilmesi için bu maddelerin kullanımına dair denemeler potansiyel klinik yararları yanında yüksek doz kullanım sonucu yan etkiler nedeniyle cesaret kırıcıdır (195-197). Metotreksat (MTX) RA’de en sık kullanılan antiromatik ilaç olup, sıklıkla diğer ajanlarla kombine edilmektedir. MTX’in siklosporin-A ile kombine kullanımı RA’de terapötik etkinlikte yararlı etkinlik gösterir (198). Ayrıca prednizon bağımlı SLE’de düşük doz verapamil tedavide başarıyla kullanılmıştır (199). Bu durum verapamilin P-gp substratları ile direkt kompetitif inhibisyona girmesi ya da alternatif olarak verapamilin farmakolojik etkisi olan kalsiyum kanal blokajı ile olabilir. Kalsiyum iyonu hücrenel aktivasyonu için önemlidir, böylelikle verapamil P-gp fonksiyonundan bağımsız olarak bu efektör/otoreaktif lenfositler üzerinde etki gösteriyor olabilir. Bu otoreaktif lenfositlerde hücreye kalsiyum girişini bloke ederek hücre ölüm yolunda Ca²⁺ sinyal mekanizmalarını engelleyebilir (200). Ayrıca hem kalsiyum iyonları hem de protein kinaz C MDR-1 fenotipi ile ilişkilidir ve Th1 ile Th2 lenfositlerde farklı kalsiyum hücre içi alımı/hücre dışı atılımı tanımlamıştır (201, 202). P-gp’nin sitokin sentezi ve immün regulasyonundaki rolü araştırılmaktadır (203, 204).

Verapamil gibi ilaçların otoimmün hastalıklarda kullanımı ilaçların farmakolojik etkilerinin optimizasyonunu sağlamaya bir alternatif olabilir, böylelikle tedavi sürecindeki riskler azalır. Hatta vinkristine (diğer bir P-gp substratı) gibi sitotoksik ajanlarla uç tedaviler ve hatta splenektomiden bile kaçınılabılır. Bu olasılıkların değerlendirilebilmesi için daha geniş ve böylelikle tedaviye dirençli daha fazla olgunun yer aldığı prospektif çalışmalara gereksinim vardır.

Glukokortikoidlere dirençte bir diğer olası mekanizma GCR ekspresyonunda azalmadır. GC'lerin immünosupresif etkisi yeterli intrasellüler GCR ekspresyonu ile ilişkilidir. ALL'li çocukların %70-90'ı , ANLL çocukların da %20'si ilk hastalık atağında GC monoterapiye total ya da parsiyel remisyon şeklinde yanıt verir. Bununla beraber takibeden relaplarda GC tedavisine yanıt ALL'de %30-40, ANLL'de ise %10'dur ve bu da GCR'deki düşme ile korele bulunmuştur (205).

Düşük GCR seviyesinin tedaviye yüksek direnç ile ilişkili olduğu gösterilmişken, yüksek reseptör seviyesi her zaman tedaviye iyi yanıt göstermez (206). Periferik kandaki monosit ve lenfositlerdeki intrasellüler GCR ekspresyonunun saptanması hastanın tedaviye kişisel duyarlılığını saptamaya yardımcı olabilir.

Çalışmamızda akut İTP'li olgularda MDMP tedavisi öncesi ve sonrası T lenfositlerde ve monositlerde GCR ekspresyonu flowsitometri çalışılmış olup sonuçlar kontrol grubu ile tedavi öncesi ve sonrası olarak karşılaştırılmıştır. Tedavi öncesi hem T lenfositler üzerindeki hem de monositler üzerindeki GCR ekspresyonu açısından kontrol grubu ile farklılık saptanmamıştır. MDMP öncesi ve sonrası GCR ekspresyonuna bakıldığında ise bazı olgularda tedavi sonrası değerlerde belirgin azalmalar varken bazı olgularda tam tersi olarak belirgin artışlar saptanmıştır. Bununla beraber ortalama değerlerin istatistiksel analizinde tedavi öncesi ve sonrası değerler arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Tedaviye dirençli iki olgudan birinde hem T lenfosit hem de monosit GCR ekspresyonunda downregülasyon varken diğer olguda tam tersine upregülasyon saptandı.

Glukokortikoid reseptörler nükleusu olmayan hücreler dışında tüm dokularda hücrelerde mevcuttur. Hücre reseptör sayısı organlar arasında hatta aynı doku içinde bile farklılık gösterir (207). Bu değişkenlik çok fazladır, dalakta hücre başına birkaç reseptörden KC'de 50000'e dek uzanır. GC duyarlılığı ile reseptör sayısı arasındaki

korelasyon tam olarak belirli değildir. Yakın zamandaki çalışmalara göre glukokortikoid tedavisi sırasında GCR sayısında düşme hücreleri glukokortikoid fazlalığına karşı korur (208-210). Bu fenomenin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Muhtemelen GCR gen transkripsiyonu baskılanır ve reseptör proteinin post-translasyon döngüsü artar (211). GCR sayısındaki artış trisiklik antidepresanlar, cAMP, PGE2, IFN- γ ve antijen stimülasyonu ile indüklenir (212-216).

Periferik kanda lenfositlerde GCR saptanmasında kullanılan bir yöntem de radioizotop çalışması olup, ancak pahalı ve zaman kaybettirici bir işlemdir, bu nedenle rutin uygulanmamaktadır. Ayrıca literatürde hücre başına GCR sayısı ölçülen çalışmalar da vardır. Bu metot Kaspers ve ark.(205) tarafından kullanılmıştır. Berki ve ark. (217) çalışmamızla aynı metodu kullandıkları çalışmalarında böbrek transplantasyonu sonrası hastalarda GCR'leri değerlendirmiş ve intravenöz pulse GC tedavisi sonrası hastalarda GCR ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir. %50 hastada bu azalma geçici iken, kalan %50'sinde uzamış oral tedavi süresince persiste etmiştir. GC dozuna bağlı GCR sayısında azalma ayrıca, Sanden ve ark.(218) tarafından romatolojik hastalıklarda saptanmıştır. Haack ve ark. (219) ise steroid tedavisine yanıt ile GCR sayısında bir ilişki tespit etmemiştir. Bagdasarova ve ark. (220) steroid duyarlı nefrotik sendromlu hastalarda monositlerde artmış GCR ekspresyonu, steroid rezistan olguların monositlerinde de azalmış GCR ekspresyonu saptamıştır. Carlotti ve ark. (221) in vitro steroid duyarlılığı ve GCR'leri değerlendirmiştir. Bu çalışmada nefrotik sendromlu olgularda glukokortikoide doku duyarlılığında GCR sayısı ve affiniteadaki anormalliklerin rol alabileceği sonucuna varılmıştır.

Yine nefrotik sendromlu olgularda yapılan bir çalışmada Wasilewska ve ark.(32) ilk atakta verilen steroid sonrası CD3 GCR ekspresyonunda azalma görüldüğünü, tekrarlayan ataklarda tedavi öncesi CD3 ve CD14 GCR ekspresyonun ilk atak ve kontrol grubuna göre düşük saptandığını ve verilen steroid sonrası reseptör ekspresyonun daha da düştüğünü bildirmiştir. Sonuç olarak da düşük GCR sayısının tedaviye kötü yanıtla ilişkili olabileceği vurgulanmıştır. Rogler ve ark. (209) GCR ekspresyonu ve bunların bağlanma kapasitesinin hastalar arasında farklılık gösterdiğini ve bunun tedaviye yanıtla korele olduğunu bildirmiştir. İTP'li

olgulara GCR ekspresyonu ile ilgili yapılmış tek yayın bulunmaktadır. Bu yayında da T lenfositlerde GCR ekspresyonu farklı GCR izoformları açısından değerlendirilmiş olup glukokortikoid duyarlı ve dirençli olgular arasında alfa reseptör ekspresyonu benzer bulunmuşken beta izoform-mRNA ekspresyonu dirençli grupta duyarlı gruba göre anlamlı olarak artmış saptanmıştır (31).

Arttırılmış veya azaltılmış GCR ekspresyonuyla transgenik farelerde, farklı GCR seviyeli insan T-ALL hücre serilerinde ve GC'ye hassas ve dirençli multipl myelom serilerinde yapılan çalışmalarda da ileri sürüldüğü gibi GCR ekspresyonunun seviyesi GC hassasiyeti için önemli bir belirleyici olmaktadır (222-225). Ancak yanıtın başlangıcındaki GCR ekspresyonu bu mekanizmanın sadece bir parçasını temsil edebilir: İlk 24 saat içinde GC'nin ortamdan çıkarılması ALL hücrelerindeki hücre ölümünü engeller, bu da yeterli GCR seviyelerinin yeterli bir sürede sağlanması gerektiğini öne sürmektedir (226). GCR ekspresyonu, en azından GC ile indüklenmiş apoptosize uğramayan hücrelerde negatif *feedback* regülasyonuna maruz kalmaktadır (227). Bunun tersine GC'nin sitolitik etkisine hassas hücrelerde GCR otoindüksiyonu bulgusu gözlenmiştir: Multipl myelom serilerinde GC hassasiyeti ve direnci, sırasıyla GCR mRNA'nın indüksiyonu ile koreledir (228, 229). Tetrasiklinle regüle GCR ekspresyonunu araştıran deneylerde, CCRF-CEM türevlerindeki GC ile indüklenmiş apoptozis için GCR otoindüksiyonuna ihtiyaç olduğu gösterilmiştir ve bozulmuş GCR otoindüksiyonu aynı ALL modelinin GC'ye dirençli alt klonlarında görülürken GC'ye hassas alt klonlarda görülmemiştir (230, 231). Ayrıca GC'ye hassas CCRF-CEM T-ALL hücreleri gibi bir vahşi tip ve bir mutant GCR alelini taşıyan Jurkat T-ALL hücreleri GCR'ye dirençlidir ve kendi GCR'lerini otoindüklemeye başarısız olmaktadır (232). Transgenik GCR'nin ekspresyonuyla yüksek GCR seviyeleri elde etmek bu hücrelerde GC hassasiyetine sebep olur (233). Böylece en azından lösemi hücre serilerinde yanıtın kritik bir safhası boyunca yeterli GCR seviyelerinin sürdürülmesi hücre ölümü indüksiyonu için zorunlu gibi görünmektedir ve bu da GCR otoindüksiyonuyla elde edilir.

Bu mekanizma bizim çalışmamızda MDMP sonrası T lenfosit ve monositlerde GCR ekspresyonunda tedavi öncesi değerlere göre bir düşme saptanmamış olmasını izah edebilir. Çalışma sonuçlarımızda tedavi sonrası tedaviye

yanıt verenler içinde GCR ekspresyonunda belirgin artış yanında belirgin düşme de olan olguların da bulunması, dirençli bir olguda GCR downregülasyonu diğ erinde upregülasyonu saptanmış olması nedeniyle, başlangıçta düşük GCR ekspresyonu olan olgularda GCR otoindüksiyon yoluyla reseptör upregülasyonu oldu ğ u, aksine zaten yüksek GCR ekspresyonu olan olgularda ise hücrenin aşırı glukokortikoid uyarısına ba ğ lı hasarlardan kaçınabilmesi için reseptör downregülasyonu gerçekleşti ğ i ö ne sürülebilir. Bu konunun hem akut hem de daha önce glukokortikoid tedavi alıp almadı ğ ının göz önünde bulunduruldu ğ u tedaviye dirençli, rekürren ve kronik İTP'li olguların da yer aldığı daha geniş prospektif çalışmalarla değerlendirilmesi uygun olacaktır.

Apoptosis immün sistemin normal gelişimi ve dengesi için önemlidir. Son zamanlarda timustaki negatif seleksiyon nedeniyle potansiyel olarak patojenik, immatür otoreaktif T lenfositlerin eliminasyonunda apoptozisin başarısızlığının otoimmün hastalıkların patogeneğinde yer alabilece ğ ine dair bulgular mevcuttur (15). Bununla beraber, otoreaktif klonlar sağlıklı kişilerde de mevcuttur ancak bir immün yanıtı neden olmazlar. Bu ya T hücre reseptörün antijene olan düşük afinitesinden ya da anerji yani sitokin sekresyonu, proliferasyon ve diferansiyasyona bir klonun yanıt vermedeki başarısızlığı olarak tanımlanan tolerans nedeniyledir (65, 234). Bu sistem kusursuz olmadığı için birkaç kontrol basama ğ ı mevcuttur ve matür otoreaktif T-hücre klonlarının aynı zamanda aktivasyonun indükledi ğ i hücre ölümü yoluyla da periferde yok edildi ğ i gösterilmiştir (16).

Çalışmamızda akut İTP'li olgularda MDMP tedavisi öncesi ve sonrası T lenfositlerde apoptozis Anneksin V ve PI kullanılarak çalışılmışdır. Sonuçlar tedavi öncesi ve sonrası konrotrol grubuyla olarak karşılaştırılmıştır. Apoptozis erken, geç ve nekrotik olarak değerlendirilmiştir. MDMP tedavisi öncesi T lenfositlerde erken apoptozis yüzdesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük iken, geç ve nekrotik apoptozis yüzdeleri benzerdir. Tedavi öncesi ve sonrası değerlere bakıldığında ise T lenfositlerde erken ve geç apoptoziste fark görülmemişken nekrotik apoptoziste anlamlı bir artış saptanmıştır. Glukortikoidlerin İTP'de T hücre apoptozisi üzerinde in vitro etkisi Olsson ve ark. (17) tarafından gösterilmiş olmakla beraber in vivo olarak ilk kez bizim çalışmamızda değerlendirilmiştir. Çalışmamızda erken ve geç apoptoziste tedavi öncesi ve sonrası değerlerde fark saptanmamışken

nekrotik apoptoziste anlamlı artış bulunmuş olması MDMP tedavisinin T lenfositlerde hızlı bir lenfolizise yol açmış olabileceği bu nedenle de apoptozisin daha erken fazlarının saptanamayabileceği şeklinde yorumlanmıştır. İTP'de in vivo çalışmalar olmasa da Leussink ve ark. (235) multipl sklerozlu hastalarda Anneksin V kullanarak yaptıkları çalışmada metilprednizolon tedavisi ve sonrası özellikle CD4+ T lenfositlerde apoptoziste anlamlı artış bulmuştur. Frisullo ve ark. (236) yüksek doz kortikosteroid tedavisinin sonrası Anneksin V (+) CD4+ ve CD8+ T lenfositlerde anlamlı artış saptanmışken monositlerdeki apoptozis oranı değişmemiştir.

Olsson ve ark.(17) aktif ve remisyondaki erişkin kronik İTP'li olgularda T hücre apoptozisini araştırmıştır. Sonuçta aktif İTP'de remisyondakilere ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak A20, calpastatin, NFKBIA, TANK, kaspaz 8, TRADD, kaspaz-1 ekspresyonu artmışken, azalmış Bax, p50 ekspresyonu bulunmuştur (17). Bu moleküller farklı yollarla apoptoziste yer almaktadırlar. Bu bulgular daha önceki çalışmalar ile uyumludur. Yoshimura ve ark. (166) kronik İTP'li olgularda daha yüksek seviyede solubl Fas ve FasL saptamıştır. Shenoy ve ark. (167) hematolojik bozukluklarda otoimmünite etiyojisinde değişmiş Fas yolu sinyalinin yer alabileceğini öne sürmüş olup; otoreaktif klonların ekspansiyonunu destekleyebilecek Fas aracılı hücre ölümüne rezistans T hücre varlığını tespit etmişlerdir. Apoptotik genlerin ekspresyonunda farklılıklar olması ve aynı grubun daha önceki çalışmasında Fas, İFN- α ve IL-2 reseptör beta (IL2RB) gen ekspresyonunda artış saptanmıştır. İTP olgularında T lenfositlerde değişmiş AİHÖ için aktivasyon ve proliferasyonun bir gereklilik olması nedeniyle çalışmada T lenfosit proliferasyonu analizi için bir düzenek oluşturulmuş (17). Aktif İTP'li, remisyonda İTP'li ve sağlıklı kontrol gruplarından alınan T lenfositler IL-2 ve deksametazon varlığında kültüre edilmiş. Çalışmada hem aktif İTP'li hem de remisyonda İTP'li olgulardan elde edilen T lenfositlerde kontrollere göre (3H)-timidin dahil edilmesinin ölçümü ile saptandığı üzere daha az deksametazonun eksprese ettiği IL-2 ile indüklenmiş proliferasyon vardır ki bu da daha yüksek düzeyde proliferasyonu ve aktivasyonu göstermektedir. Bununla beraber bu gözlemin açıklaması için diğer ihtimal olarak; sağlıklı kontrollerin T hücreleri deksametazonun indüklediği apoptozise daha duyarlı olabilir, bu da geriye proliferere olabilecek daha az hücre bırakıyor olabilir. Bu ihtimalin değerlendirilmesi için bir

deney düzeneği daha kurulmuş olup burada IL-2 ile stimüle edilmiş T hücreleri deksametazon varlığında ve yokluğunda kültüre edilmiş ve Annexin V boyaması ile apoptozis değerlendirilmiştir. Remisyondaki İTP'li olgularda T hücrelerinde aktif İTP'li ve sağlıklı kontrollere göre hem deksametazon varlığında hem de yokluğunda daha yüksek oranda apoptozis saptanmış iken aktif İTP ve kontrol olgularında T hücre apoptozisi yüzdesi benzer bulunmuştur (17).

Çalışmamızda ise akut İTP'de T lenfositlerde Annexin V boyaması ile değerlendirilen erken apoptozis kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktür. Bu bulgu akut İTP patogenezinde reaktif T lenfositlerin apoptozise daha rezistan olduğu ve bunun da patogenezdeki mekanizmalardan biri olabileceğine işaret ediyor olabilir.

Aktive T hücrelerin normal reaksiyonu AİHÖ ile ölmektir. Olsson ve ark.(17)'nin çalışmasında remisyondaki İTP'lilerde sağlıklı kontrollere göre artmış T hücre apoptozisi gözlenmiştir. Bununla beraber aktif İTP'li olgularda T hücrelerinde remisyondaki İTP'lilere göre benzer oranda artmış aktivasyon/proliferasyona rağmen daha az oranda apoptozis gözlenmiştir. Aktif İTP'li olgularda T hücreleri AİHÖ'ne rezistandır ve AİHÖ'ne yanıtın düzeltilmesi remisyonu sağlayabilir. Apoptoziste yer alan genlerden çalışmada *microarray* analizde farklı ekspresyon gözlenenlerden en çok çalışılanı *Bax*'dır. *Bax*'ın proapoptotik olduğu ve çoğunlukla apoptozis inhibitörü olarak etki gösteren bcl-2 ile heterodimerize olduğu gösterilmiştir (237, 238). *Bcl-2* ve *Bax* oranının hücrenin apoptozis yoluyla öleceğini yoksa hayatta kalacağını mı belirlemede önemli olduğu gösterilmiştir (237). Bu nedenle *Bax* aktif İTP'li olgularda T hücrelerinde AİHÖ'ne rezistansı için bir adaydır. Bununla beraber apoptotik düzenekte pek çok protein beraberce çalışmaktadır. Bu durum aktif İTP'li olgularda gözlenen AİHÖ'ne rezistanstan sorumlu yola karar vermeyi imkansız hale getirmektedir. T hücrelerinde apoptozise ve AİHÖ'ne rezistans diğer otoimmün hastalıklar (multiple skleroz (MS), SLE, RA) ve deneysel otoimmünite modellerinde gösterilmiştir (238-242).

Bozulmuş AİHÖ'nün otoimmünitede ortak bir patojenik mekanizma ile ilgili olduğu öne sürülmektedir. Otoimmüniteli olgularda önce aktif olan sonra remisyona girenlerde seri olarak apoptotik belirteçlerin ölçülmesi, bu hipotezi daha da destekleyici olacaktır. Sonuç olarak çalışmadaki bulgular aktif İTP'li olgularda T

lenfositlerdeki apoptotik rezistans, potansiyel patojenik otoreaktif T lenfositlerin AİHÖ yoluyla ortadan kaldırılmasında yetersizliğe neden olabilir tezini öne sürmektedir. Bu trombosit antikor üretimi hücre aracılı sitotoksiste ile otoimmün trombosit yıkımının devamına neden olur. Ayrıca İTP'li olgularda T lenfositlerin AİHÖ'ne duyarlılığının normale dönüşü remisyona varmada önemli bir mekanizma olabilir. Bunun yanında glukokortikoidlerin bilinen etkilerinin yanı sıra, otoreaktif T lenfositlerin apoptozis yoluyla delesyonu diğer bir etki mekanizması olabilir ve bu konu ileri çalışmalarla araştırılmalıdır.

Sonuç olarak bu çalışmada; akut İTP'li hastalarda Th0 sitokin profili ve T lenfositlerde apoptoziste azalma saptanmış olup, bu bulgu hücrel immün disfonksiyonunun akut İTP patogeneziindeki önemini ortaya koymaktadır. Ayrıca MDMP tedavisi sonrasında Th2 sitokin profilinin baskın olması ve T lenfosit apoptozisinde artış olmasının hem T lenfositlerin İTP patogeneziindeki rolünü desteklemekte hem de MDMP'nin tedavide oto reaktif T lenfositlerin üzerinden de etki gösterebileceğine işaret etmektedir. Tedaviye olası direnç mekanizmalarından T lenfosit yüzeyindeki P-gp ekspresyonunda artış, T lenfosit ve monositlerde GCR ekspresyonunda azalma tedaviye dirençli daha fazla sayıda olgunun yer alabileceği geniş bir seride değerlendirilmelidir.

6. SONUÇLAR

Akut İTP'li olgularda mega doz metilprednizolon tedavisi öncesi, sonrası ve kontrol grubu olarak sağlıklı gönüllülerde trombosit sayısı, beyaz küre sayısı ve absolü lenfosit sayısı, CD4+ Th hücrelerde intrasellüler IL-2, IL-4, IL-6 ve IFN- γ düzeyleri, T hücrelerinde P-gp ekspresyonu, T hücre ve monosit yüzeyindeki glukokortikoid reseptör ekspresyonu ve T hücre apoptozisinin değerlendirildiği bu çalışmada aşağıdaki sonuçlara varıldı.

1. Akut İTP'li hastaların trombosit sayıları kontrollere göre anlamlı olarak daha düşük iken ($p<0.001$) beyaz küre ve absolü lenfosit sayıları benzer bulundu ($p>0.05$).
2. Mega doz metilprednizolon tedavisi sonrası akut İTP'li hastaların hem trombosit ($p<0.001$), hem beyaz küre ($p<0.001$) hem de absolü lenfosit sayıları ($p<0.01$) tedavi öncesine göre anlamlı olarak artmış bulundu.
3. Akut İTP'li hastalarda mega doz metilprednizolon tedavisi öncesinde CD4+ T hücrelerinde intrasellüler IL-2 düzeyi kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu ($p<0.05$).
4. Akut İTP'li hastalarda tedavi öncesi CD4+ T hücrelerinde intrasellüler IL-4 düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış saptandı ($p<0.05$).
5. Akut İTP'li hastalarda tedavi öncesi CD4+ T hücrelerinde intrasellüler IFN- γ düzeyi kontrol grubuna göre yüksek bulundu ($p<0.05$).
6. Akut İTP'li hastalarda tedavi öncesi CD4+ T hücrelerinde intrasellüler IL-6 düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış saptandı ($p<0.05$).
7. Tedavi öncesi Th1/Th2 oranını gösteren IFN- γ /IL-4 oranında akut İTP'li hastalarda kontrol grubuna göre fark saptanmadı ($p>0.05$).
8. Tedavi sonrası akut İTP'li hastalarda CD4+T lenfosit intrasellüler IL-2 ve IFN- γ düzeyleri kontrol grubu ile benzer bulundu ($p>0.05$).
9. Tedavi sonrası akut İTP'li hastalarda CD4+ T hücrelerinde intrasellüler IL-4 ve IL-6 düzeylerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu saptandı ($p<0.05$).

10. Tedavi sonrası akut İTP'li hastalarda Th1/Th2 oranını gösteren IFN- γ /IL-4 oranı kontrol grubuna göre daha düşük bulundu ($p<0.05$).
11. Mega doz metilprednizolon tedavisi öncesi ve sonrasında akut İTP'li hastalarda CD4+ T hücrelerinde intrasellüler IL-2 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p<0.05$).
12. Mega doz metilprednizolon tedavisi öncesi ve sonrasında CD4+ T hücrelerinde intrasellüler IL-4 ve IL-6 düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).
13. Mega doz metilprednizolon tedavisi öncesi ve sonrasında akut İTP'li hastalarda CD4+ T hücrelerinde intrasellüler IFN- γ düzeyinde anlamlı bir düşüş görüldü ($p<0.05$).
14. Mega doz metilprednizolon tedavisi öncesi ve sonrasında akut İTP'li hastalarda Th1/Th2 oranını gösteren IFN- γ /IL-4 oranı anlamlı olarak düşmüş saptandı ($p<0.05$).
15. Akut İTP'li hastalarda tedavi öncesi T lenfositlerde P-gp ekspresyonu kontrol grubu ile benzer bulundu. ($p>0.05$).
16. Tedavi öncesi T lenfosit ve monositlerde GCR ekspresyonları değerlendirildiğinde akut İTP'li hastalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel fark saptanmadı ($p>0.05$).
17. Mega doz metilprednizolon tedavisi sonrası T lenfositlerde P-gp ekspresyonu tedavi öncesine göre anlamlı olarak artmış saptandı ($p<0.05$).
18. Mega doz metilprednizolon tedavisi öncesi ve sonrası akut İTP'li hastalarda T lenfosit ve monositlerdeki GCR ekspresyonunda fark saptanmadı ($p>0.05$).
19. Tedavi öncesi akut İTP'li hastalarda T lenfositlerdeki erken apoptozis yüzdesi kontrol grubuna göre daha düşük bulundu ($p<0.01$).
20. Tedavi öncesi akut İTP'li hastalar ve kontrol grubu arasında T lenfositlerde geç apoptozis ve nekrotik apoptozis açısından fark saptanmadı ($p>0.05$).
21. Mega doz metilprednizolon tedavisi öncesi ve sonrası akut İTP'li hastalarda T lenfositlerde erken apoptozis ve geç apoptoziste fark saptanmadı ($p>0.05$).

22. Mega doz metilprednizolon tedavisi öncesi ve sonrası akut İTP'li hastalarda T lenfositlerde nekrotik apoptoziste anlamlı bir artış görüldü ($p<0.01$).

KAYNAKLAR

1. Lanzkowsky P. Disorders of Platelets. In:Lanzkowsky P, editör. Manual of Pediatric Hematology and Oncology. 4 th ed.New York:Elsevier Inc;2005.p.250-63.
2. Imbach P. Immune thrombocytopenic purpura. In:Lilleyman J, Hann I, Blanchette VS, editörs. Pediatric Hematology. 2 nd ed.London:Churchill Livingstone, Harcourt Publishers Ltd;1999.p.437-53.
3. Sutor AH, Harms A, Kaufmehl K. Acute immune thrombocytopenia (ITP) in childhood: retrospective and prospective survey in Germany. Semin Thromb Haemost. 2001;27:253-67.
4. Rodeghiero F. Idiopathic thrombocytopenic purpura: an old disease revisited in the era of evidence based medicine. Haematologica. 2003;88:1081-7.
5. Tarantino MD. Treatment options for chronic immune (idiopathic) thrombocytopenia purpura in children. Semin Hematol. 2000;37 Suppl 1:35-41.
6. Blachette V, Carcao M. Approach to investigation and management of immune thrombocytopenic purpura in children. Semin Hematol. 2000;37:299-314.
7. Ören H. XXIX Ulusal Hematoloji Kongresi. Mezuniyet sonrası eğitim kursu, 1-5 Kasım 2002 Antalya.
8. Rehman A. Acute immune thrombocytopenic purpura in children. J Turk Hematol. 2007;37:41-51.
9. Semple JW, Milev Y, Cosgrave D, Mody M, Hornstein A, et al. Differences in serum cytokine levels in acute and chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: relationship to platelet phenotype and antiplatelet T cell reactivity. Blood. 1996;87:4245-54.
10. Nugent DJ. Immune thrombocytopenic purpura of childhood. Hematology. 2006;97:97-103.
11. Vukmanovic-Stejic M, Vyas B, Gorak-Stolinska P, Noble A, Kemeny DM. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. Blood 2000;95:231-40.

12. Garcia-Suarez J, Prieto A, Reyes E, et al. Abnormal γ IFN and α TNF secretion in purified CD+2 cells from autoimmune thrombocytopenic purpura patients: their implication in the clinical course of the disease. *Am J Hematol.* 1995;49:271-6.
13. Crossley AR, Dickinson AM, Proctor SJ, Calvert JE. Effects of interferon-alpha therapy on immune parameters in immune thrombocytopenic purpura. *Autoimmunity.* 1996;24:81-100.
14. Mouzaki A, Theodoropoulou M, Gianakopoulos I, Vlaha V, Kyrtsolis MC, Maniatis A. Expression patterns of Th1 and Th2 cytokine genes in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) at presentation and their modulation by intravenous immunoglobulin G (IVIg) treatment: their role in prognosis. *Blood.* 2002;100:1774-9.
15. Shi YF, Sahai BM, Green DR. Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature.* 1989;339:625-6.
16. Kawabe Y, Ochi A. Programmed cell death and extrathymic reduction of Vbeta8+ CD4+ T cells in mice tolerant to Staphylococcus aureus enterotoxin B. *Nature.* 1991;349:245-8.
17. Olsson B, Andersson PO, Jacobsson S, Carlsson L, Wadenvik H. Disturbed apoptosis of T-cells in patients with active idiopathic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost.* 2005;93:139-44.
18. Blanchette VS, Luke B, Andrew M, Sommerville-Nielsen S, Bernard D, et al. A prospective randomised trial of high dose intravenous immune globulin G therapy, oral prednisone therapy, and no therapy in childhood acute immune thrombocytopenic purpura. *J Pediatr.* 1993;123:989-95.
19. Blanchette V, Imbach P, Andrew M, Adams M, McMillan J, et al. Randomised trial of intravenous immunoglobulin G, intravenous anti-D, and oral prednisone in childhood acute immune thrombocytopenic purpura. *Lancet.* 1994;344:703-7.
20. Stanbury RM, Graham EM. Systemic corticosteroid therapy-side effects and their management. *Br J Ophthalmol.* 1998;82:704-8.
21. Atabay B. Immune (idiopathic) thrombocytopenic purpura: pathophysiology, diagnosis and treatment. *SSK Tepecik Hast Derg.* 2003;13:63-74.

22. Ozsoylu S, Irken G, Karabent A. High-dose intravenous methylprednisolone for acute childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol.* 1989;42:431-5.
23. Duru F, Fisgin T, Yarali N, Kara A. Clinical course of children with immune thrombocytopenic purpura treated with intravenous immunoglobulin or mega dose methylprednisolone or observed without treatment. *Pediatr Hematol Oncol.* 2002;19:219-25.
24. Erduran E, Aslan Y, Gedik Y, Orhan F. A randomized and comparative study of intravenous immunoglobulin and mega dose methylprednisolone treatments in children with acute childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *Turk J Pediatr.* 2003;45:295-300.
25. Zhao H, Li H, Zhang L, Wang T, Ji L, Yang R. Retrospective analysis of 472 Chinese children with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: a single center experience. *Haematologica.* 2005;90:860-1.
26. Kofler R, Schmidt S, Kofler A, Ausserlechner MJ. Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoblastic leukemia. *J Endocrinol.* 2003;178:19-27.
27. Schmidt S, Rainer J, Pioner C, Presul E, Rimi S, Kofler R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ.* 2004;11 Suppl 1:45-55.
28. Levy AS, Cunningham-Rundles S, Mazza B, Simm M, Gorlick R, Bussel J. High P-glycoprotein-mediated export observed in patients with a history of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 2002;118:836-8.
29. Ruiz-Soto R, Richaud-Patin Y, Lopez-Karpovitch X, Llorente L. Multidrug resistance-1 (MDR-1) in autoimmune disorders III: increased P-glycoprotein activity in lymphocytes from immune thrombocytopenic purpura patients. *Exp Hematol.* 2003;31:483-7.
30. Tissing WJE, Lauten M, Meijerink JP, den Boer ML, Koper JW, et al. Expression of the glucocorticoid receptor and its isoforms in relation to glucocorticoid resistance in childhood acute lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2005;90:1279-81.

31. Zhao YH, Zhou J, Li XX. A study on the relationship between alpha- and beta-isoform of glucocorticoid receptors and glucocorticoid-resistant idiopathic thrombocytopenia purpura. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2005;44:363-5.
32. Wasilewska A, Zoch-Zwierz W. Expression of glucocorticoid receptors in nephrotic children depending on total prednisone dose. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2005;18:799-806.
33. Kato GJ, Quddus FF, Shuster JJ, Boyett J, Pullen JD. High glucocorticoid receptor content of leukemic blasts is a favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1993;82:2304-9.
34. Paul Gottlieb Werlhof (1699-1767). Thrombocytopenic purpura. *JAMA*. 1968;206:2892.
35. Freedman J. ITP: An overview of the conference and future directions with an abbreviated ITP history. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003;25:77-84.
36. Blanchette M, Freedman J. The history of idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Transfus Sci*. 1998;19:231-6.
37. Freedman J, Blanchette M. Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP): a historical odyssey. *Acta Paediatr Suppl*. 1998;424:3-6.
38. Harrington W, Minnich V. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med*. 1951;38:1-10.
39. Evans RS, Takahashi K, Duane RT, Payne R, Liu C. Primary thrombocytopenic purpura and acquired hemolytic anemia: Evidence for a common etiology. *Arch Int Med*. 1951;87:48-65.
40. Shulman NR, Marder VJ, Weinrach RS. Similarities between known antiplatelet antibodies and the factor responsible for thrombocytopenia in idiopathic purpura: physiologic, serologic and isotopic studies. *Ann NY Acad Sci*. 1965;124:499-542.
41. Van Leeuwen EF, van der Von JTH, Engelfriet CP, Von dem Borne AE. Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. *Blood*. 1982;59:23-6.

42. Van Leeuwen EF, Helmerhorst FM, Engelfriet CP, Von dem Borne AE. Maternal autoimmune thrombocytopenia and the newborn. *Br Med J (Clin Res. Ed)*. 1981;283:104.
43. Aslan D, Yetgin S. İmmun Trombositopeni. *Katkı Pediatri Dergisi*. 2002;23:343-57.
44. Montgomery RR, Scott JP. Disorders of Platelets and Blood Vessels. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, editörs. *Nelson Textbook of Pediatrics* 16th ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders; 2000. p.1520-2.
45. Imbach P, Kühne T, Müller D, Berchtold W, Zimmerman S, et al. Childhood ITP: 12 months follow-up data from the prospective registry I of the Intercontinental Childhood ITP Study Group (ICIS). *Pediatr Blood Cancer*. 2006;46:351-6.
46. Kühne T, Imbach P, Bolton-Maggs PHB, Berchtold W, et al. Newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood: an observational study. *Lancet*. 2001;358:2122-5.
47. Beardsley SD. ITP in the 21st century. *Hematology*. 2006;97:402-7.
48. Foster CB, Zhu S, Erichsen HC, Lehrnbecher T, Hart ES, et al. Early Chronic ITP Study Group. Polymorphisms in inflammatory cytokines and Fcγ receptors in childhood chronic immune thrombocytopenic purpura: a pilot study. *Br J Haematol*. 2001;113:596-9.
49. Semple JW. T cell and cytokine abnormalities in patients with autoimmune thrombocytopenic purpura. *Transfus Apher Sci*. 2003;28:237-42.
50. Berchtold P, McMillan R, Tani P, Sommerville-Nielsen S, Blanchette VS. Autoantibodies against platelet membrane glycoproteins in children with acute and chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood*. 1989;74:1600-2.
51. Aziza T, Corina E. Treatment of immune thrombocytopenic purpura in children. *Pediatr Drugs*. 2005;7:325-36.
52. Di Paola J, Buchanan G. Immune thrombocytopenic purpura. *Pediatr Clin North Am*. 2002;49:911-28.

53. Takahashi R, Sekine N, Nakatake T. Influence of monoclonal antiplatelet glycoprotein antibodies on in vitro human megakaryocyte colony formation and proplatelet formation. *Blood*. 1999;93:1951-8.
54. Chang M, Nakagawa PA, Williams SA, Schwartz MR, Imfeld KL, et al. Immune thrombocytopenic purpura plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood*. 2003;102:887-95.
55. McMillan R, Wang L, Tomer A, Nichol J, Pistillo J. Suppression of in vitro megakaryocyte production by anti-platelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood*. 2004;103:1364-9.
56. Kuwana M, Ikeda Y. The role of autoreactive T-cells in the pathogenesis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol*. 2005;81:106-12.
57. Ware RE, Howard TA. Phenotypic and clonal analysis of T lymphocytes in childhood immune thrombocytopenic purpura. *Blood*. 1993;82:2137-42.
58. Nugent DJ. Childhood Immune Thrombocytopenic Purpura. *Blood Rev*. 2002;16:27-9.
59. Wang T, Zhao H, Ren H, Guo J, Xu M, et al. Type 1 and type 2 T-cell profiles in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*. 2005;90:914-23.
60. Mackay IR. The "autoimmune diseases" 40th anniversary. *Autoimmun Rev*. 2002;1:5-11.
61. Sood R, Wong W, Jeng M, Zehnder JL. Gene expression profile of idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Pediatr Blood Cancer*. 2006;47:675-7.
62. Wu KH, Peng CT, Li TC, Wan L, Tsai CH, et al. Interleukin 4, interleukin 6 and interleukin 10 polymorphisms in children with acute and chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 2005;128:849-52.
63. Liu F, Wu C, Yang X, Xiao H, Zhuo X, et al. Polarization and apoptosis of T cell subsets in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Cell Mol Immunol*. 2005;2:387-92.

64. Wu C, Liu F, Zhou X, Cheng Z, Yang X, et al. Effect of protein kinase C on proliferation and apoptosis of T lymphocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura children. *Cell Mol Immunol*. 2005;2:197-203.
65. Coopamah MD, Garvey MB, Freedman J, Semple JW. Cellular immune mechanisms in autoimmune thrombocytopenic purpura: An update. *Transfus Med Rev*. 2003;17:69-80.
66. Sullivan KE, McDonald-McGinn D, Zackai EH. CD4(+) CD25(+) T-cell production in healthy humans and in patients with thymic hypoplasia. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9:1129-31.
67. Roark JH, Bussel JB, Cines DB, Siegel DL. Genetic analysis of autoantibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura reveals evidence of clonal expansion and somatic mutation. *Blood*. 2002;100:1388-98.
68. Mc Millan R. Autoantibodies and autoantigens in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol*. 2000;37:239-48.
69. Cines DB, Blanchette VS, Chir B. Immune Thrombocytopenic Purpura. *N Engl J Med*. 2002;346:13:995-1008.
70. Möller E. Mechanisms for induction of autoimmunity in humans. *Acta Paediatr. Suppl* 1998;424:S16-S20.
71. Nomura S, Matsuzaki T, Ozaki Y, Yamaoka M, Yoshimura C, et al. Clinical significance of HLA-DRB*10410 in Japanese patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 1998;91:3616-22.
72. Wilson DB. Acquired platelet defects. In: Nathan DG, Orkin SH, Look AT, Ginsburg D, editörs. *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders; 2003; p.1597-630.
73. Salmon JE, Edberg JC, Brogle NL, Kimberly RB. Allelic polymorphism of human Fcγ receptor IIA ve Fcγ receptor IIB: Independent mechanisms to differences in human phagocyte function. *J Clin Invest*. 1992;89:1247-81.

74. Carcao MD, Blanchette VS, Wakefield CD, Stephens D, Ellis J, et al. Fc gamma receptor IIa and IIIa polymorphisms in childhood immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 2003;120:135-41.
75. Song KS, Kim BS, Choi CR, Lee SM Association of Br polymorphism of platelet GP Ia gene and immune thrombocytopenic purpura. *Platelets.* 1997;8:361-5.
76. Gernsheimer T. Pathophysiology and thrombokinetics in autoimmune thrombocytopenia. *Blood Rev.* 2002;16:7-8.
77. Parker RI, Siegel RS, Ratajczak MZ, Gewirtz AM. Deficient in vitro megakaryocytopoiesis and decreased in vivo platelet turnover in children and young adults with chronic thrombocytopenia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1998;20:196-201.
78. Jadavji T, Scheifele D, Halperin S. Thrombocytopenia after immunization of Canadian children, 1992 to 2001. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22:119-22.
79. Panepinto JA, Brousseau DC. Acute idiopathic thrombocytopenic purpura of childhood diagnosis and therapy. *Pediatr Emerg Care.* 2005;21:691-5.
80. Sutor AH, Harms A, Kaufmehl K. Acute immune thrombocytopenia (ITP) in childhood:retrospective and prospective survey in Germany. *Semin Thromb Hemost* 2001;27:253-67.
81. Kenet G, Lubetsky A, Shenkman B, Tamarin I, Dardik R, et al. Cone and platelet analyser (CPA): new test for the prediction of bleeding among thrombocytopenic patients. *Br J Haematol.* 1998;101:255-9.
82. George JN, Woolf SH, Raskob GE, Wasser JS, Aledort LM, Ballem PJ, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura:A practise guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood.* 1996;88:3-40.
83. Dilber C. İdiyopatik trombositopenik purpura. *Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci.* 2005;1:48-52.

84. Tancabelic J, Stout LA, Wetering J. Acute immune thrombocytopenic purpura in children and adolescents in South Dakota 1998-2004. *S D J Med.* 2005;58:465-8.
85. Bolton-Maggs PHB, Moon I. Assessment of UK practice for management of acute childhood idiopathic thrombocytopenic purpura against published guidelines. *Lancet.* 1997;350:620-3.
86. Kühne T, Buchanan GR, Zimmerman S, Michaels LA, Kohan R, et al. A prospective comparative study of 2540 infants and children with newly diagnosed ITP from The Intercontinental Childhood ITP Study Group. *J Pediatr* 2003;143:605-8.
87. Buchanan GR, Holtkamp CA. Prednisone therapy for children with newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura. A randomized clinical trial. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1984;6:355-61.
88. Sartorius JA. Steroid treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura in children: Preliminary results of a randomized cooperative study. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1984;6:165-9.
89. Blanchette V, Bolton-Maggs P. Childhood immune thrombocytopenic purpura: diagnosis and management. *Pediatr Clin North Am.* 2008;55:393-420.
90. Carcao MD, Zipurksy A, Butchart S, Leaker M, Blanchette VS. Short course oral prednisone therapy in children presenting with acute immune thrombocytopenic purpura (ITP). *Acta Pediatr.* 1998;424:71-4.
91. Albayrak D, Islek I, Kalaycı AG, Gurse N. Acute immune thrombocytopenic purpura: A comparative study of very high oral doses of methylprednisolone and intravenously administered immune globulin. *J Pediatr.* 1994;125:1004-7.
92. Ancona KG, Parker RI, Atlas MP, Prakash D. Randomized trial of high dose methylprednisolone versus intravenous immune globulin for the treatment of acute immune thrombocytopenic purpura in children. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2002;24:540-4.
93. Cines DB, McKenzie SE, Siegel DL. Mechanisms of action of therapeutics in idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2003;25:52-6.

94. Ozsoylu S. Bolus methylprednisolone therapy in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura in children. *Acta Haematol.* 1984;72:359-62.
95. Yetgin S, Yenicesu I, Ersoy F. The effects of megadose methylprednisolone therapy on the immune system in childhood immune thrombocytopenia. *Pediatr Hematol Oncol.* 2005;22:401-7.
96. Wiokens T, Rijk RD. Glucocorticoids and immune function: unknown dimension and new frontiers. *Immunol Today.* 1997;18:418-24.
97. Fauci AS, Date DC. The effect in vivo hydrocortisone on subpopulation of human lymphocytes. *J Clin invest.* 1974;53:240-6.
98. Fauci AS. Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. II. Differential effects of in vivo hydrocortisone, prednisone and dexamethasone on in vitro expression of lymphocyte function. *Clin Exp Immunol.* 1976;24:54-62.
99. Boumpas DT, Poliogianni F, Anastaziou ED, Balow JE. Glucocorticoid action on the immune system: molecular and cellular aspects. *Clin Exp Rheumatol.* 1991;9:413-23.
100. Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med.* 1993;119:1198-208.
101. Imbach P, Barandun S, d'Apuzzo V, Baumgartner C, Hirt A, Morell A, et al. High dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *Lancet.* 1981;1:1228-31.
102. Salama A, Mueller-Eckhardt C, Kiefel V. Effect of intravenous immunoglobulin in immune thrombocytopenia/competitive inhibition of reticuloendothelial system function by sequestration of autologous red blood cells. *Lancet.* 1983;11:193-5.
103. Meyer O, Kiesewetter H, Hermsen M, Petriedes P, Rose M, et al. Replacement of intravenous administration of anti-D by subcutaneous administration in patients with autoimmune thrombocytopenia. *Pediatr Blood Cancer.* 2006;47:721-2.

104. Kjaersgaard M, Halse H. A review of Anti-D treatment of childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *Pediatr Blood Cancer*. 2006;47:717-20.
105. Wang J, Wiley JM, Luddy R, Greenberg J, Feuerstein MA, Bussel JB. Chronic immune thrombocytopenic purpura in children: assessment of rituximab treatment. *J Pediatr*. 2005;146:217-21.
106. Bennett C, Rogers Z, Kinnamon D, Bussel JB, Mahoney DH, et al. Prospective phase 1/2 study of rituximab in childhood and adolescent chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2006;107:2639-42.
107. Andersson J. Cytokines in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Acta Paediatrica Supplement* 1998;424:61-4.
108. Fessatou S, Galetselli M, Garoufi A, Aroni S, Krikos X, Karpathios T. Effect of alpha-interferon in a child with chronic refractory idiopathic thrombocytopenic purpura. *Pediatr Hematol.Oncol*. 1999;16:477-9.
109. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-57.
110. Adams MJ. Ways of dying: Multiple pathways to apoptosis. *Genes and Development*. 2003;17:2481-95.
111. Lenardo M, Chan FK, Hornung F, McFarland H, Siegel R, et al. Mature lymphocyte apoptosis-immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol*. 1999; 17:221-53.
112. Straus SE, Sneller M, Lenardo MJ, Puck JM, Strober W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: The autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann Intern Med* 1999;130:591-601.
113. Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FK, Dale J, et al. Inherited human caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome II. *Cell*. 1999;98:47-58.
114. Jackson CE, Fischer RE, Hsu AP, Anderson SM, Choi Y, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance. *Am J Hum Genet*. 1999;4:1002-14.

115. Doç.Dr.E.Ulukaya. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı, Apoptosis ders notları, 2002.
116. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol.* 2000;157:1415-27.
117. Gulbins E, Jekle A, Ferlinz K, Grassme H, Lang F. Physiology of apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;279:605-15.
118. Greenstein S, Ghias K, Krett NL, Rosen S. Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. *Clini Cancer Res.* 2002;8:1681-94.
119. Liu F, Wu C, Yang X, Xiao H, Zhuo X, Cheng Z, Chen Q. Polarization and apoptosis of T cell subsets in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Cell Mol Immunol.* 2005;2:387-39.
120. Mateo V, Ménager M, de Saint-Basile G, Stolzenberg MC, Roquelaure B, et al. Perforin-dependent apoptosis functionally compensates Fas deficiency in activation-induced cell death of human T lymphocytes. *Blood.* 2007;110:4285-92.
121. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell.* 1995;81:935-46.
122. Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Haanen C: Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis.* 1998;3:115-21.
123. Renner K, Ausserlechner MJ and Kofler R. A conceptual view on glucocorticoid-induced apoptosis, cell cycle arrest and glucocorticoid resistance in lymphoblastic leukemia. *Curr Mol Med.* 2003;3:707-17.
124. Amsterdam A, Sasson R. The anti-inflammatory action of glucocorticoids is mediated by cell type specific regulation of apoptosis. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;189:1-9.

125. Fan W, Sui M, Huang Y. Glucocorticoids selectively inhibit paclitaxel-induced apoptosis: mechanisms and its clinical impact. *Curr Med Chem.* 2004;11:403-11.
126. Bloom JW, Chacko J, Lohman IC, Halonen M, Martinez FD, Miesfeld RL. Differential control of eosinophil survival by glucocorticoids. *Apoptosis* 2004;9:97-104.
127. Buttgereit F, Scheffold A. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids.* 2002;67:529-534.
128. Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev.* 1997;18:306-60.
129. Geley S, Fiegl M, Hartmann BL, Kofler R. Genes mediating glucocorticoid effects and mechanisms of their regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1996;128:1-97.
130. Gametchu B, Watson CS. Correlation of membrane glucocorticoid receptor levels with glucocorticoid-induced apoptotic competence using mutant leukemic and lymphoma cells lines. *J Cell Biochem.* 2002;87:133-46.
131. Tissing WJ, Meijerink JP, den Boer ML and Pieters R. Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2003;17:17-25.
132. Schaaf MJ, Cidlowski JA. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002;83:37-48.
133. Haarman EG, Kaspers GJ, Pieters R, Rottier MM, Veerman AJ. Glucocorticoid receptor alpha, beta and gamma expression vs in vitro glucocorticoid resistance in childhood leukemia. *Leukemia.* 2004;18:530-7.
134. Raivio T, Palvimo JJ, Kannisto S, Voutilainen R, Janne OA. Transactivation assay for determination of glucocorticoid bioactivity in human serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:3740-4.
135. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002;2:48-58.

136. Karssen AM, Meijer OC, van dS, I, Lucassen PJ, de Lange EC, et al. Multidrug resistance P-glycoprotein hampers the access of cortisol but not of corticosterone to mouse and human brain. *Endocrinology*. 2001;142:2686-94.
137. Bourgeois S, Gruol DJ, Newby RF, Rajah FM. Expression of an mdr gene is associated with a new form of resistance to dexamethasone-induced apoptosis. *Mol Endocrinol*. 1993;7:840-51.
138. Hala M, Hartmann BL, Böck G, Geley S, Kofler R. Glucocorticoid receptor gene defects and resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in human leukemic cell lines. *Int J Cancer*. 1996;68:663-8.
139. Strasser-Wozak EMC, Hattmannstorfer R, Hala M, Hartmann BL, Fiegl M, et al. Splice site mutation in the glucocorticoid receptor gene causes resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in a human acute leukemic cell line. *Cancer Res*. 1995;55:348–53.
140. De Lange P, Segeren CM, Koper JW, Wiemer E, Sonneveld P, et al. Expression in hematological malignancies of a glucocorticoid receptor splice variant that augments glucocorticoid receptor-mediated effects in transfected cells. *Cancer Res*. 1995;61:3937-41.
141. Longui CA, Vottero A, Adamson PC, Cole DE, Kino T, et al. Low glucocorticoid receptor alpha/beta ratio in T-cell lymphoblastic leukemia. *Horm Metab Res*. 2000;32:401-6.
142. Lauten M, Cario G, Asgedom G, Welte K, Schrappe M. Protein expression of glucocorticoid receptor in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Haematologica*. 2003;88:1253-8.
143. Casale F, Addeo R, D'Angelo V, Indolfi P, Poggi V, et al. Determination of the in vivo effects of prednisone on Bcl-2 family protein expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Oncol*. 2003;22:123-8.
144. Stahnke K, Eckhoff S, Mohr A, Meyer LH, Debatin KM. Apoptosis induction in peripheral leukemia cells by remission induction treatment in vivo: selective depletion and apoptosis in a CD34+ subpopulation of leukemia cells. *Leukemia*. 2003;17:2130-9.

145. Salomons GS, Smets LA, Verwijs-Janssen M, Hart AA, Haarman EG, et al. Bcl-2 family members in childhood acute lymphoblastic leukemia: relationships with features at presentation, in vitro and in vivo drug response and long-term clinical outcome. *Leukemia*. 1999;13:1574-80.
146. Haarman EG, Kaspers GJ, Pieters R, Van Zantwijk CH, Broekema GJ, et al. BCL-2 expression in childhood leukemia versus spontaneous apoptosis, drug induced apoptosis, and in vitro drug resistance. *Adv Exp Med Biol*. 1999;457:325-33.
147. Liu Q, Gazitt Y. Potentiation of dexamethasone, taxol and Ad-p53-induced apoptosis by Bcl-2 anti-sense oligodeoxynucleotides in drug-resistant multiple myeloma cells. *Blood*. 2003;101:4105-14.
148. Richaud-Patin Y, Soto-Vega E, Jakez-Ocampo J, Llorente L. P-glycoprotein in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2004;3:188-92.
149. Okyar A. P-glikoprotein ve P-gp'nin ilaç farmakokinetiğindeki rolü. *Türk Farmakoloji Derneği Bülteni*. 2005;83:16-9.
150. Abd El-Ghaffar HA, Aladle DA, Farahat SE, Abd El-Hady N. P-glycoprotein (P-170) expression in acute leukemias. *Hematology*. 2006;11:35-41.
151. Meaden ER, Hoggard PG, Khoo SH, Back DJ. Determination of P-gp and MRP1 expression and function in peripheral blood mononuclear cells in vivo. *J Immunol Methods*. 2002;262:159-65.
152. Wasilewska A, Zalewski G, Chyczewski L, Zoch-Zwierz W. MDR-1 gene polymorphisms and clinical course of steroid-responsive nephrotic syndrome in children. *Pediatr Nephrol*. 2007;22:44-51.
153. Morita N, Yasumori T, Nakayama K. Human MDR1 polymorphism: G2677T/A and C3435T have no effect on MDR1 transport activities. *Bioch Phar*. 2003;65:1843-52.
154. Picker LJ, Singh MK, Zdraveski Z, Treer JR, Waldrop SL, et al. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood*. 1995;86:1408-19.

155. Tanaka S, Hirano T, Saito T, Wakata N, Oka K. P-glycoprotein function in peripheral blood mononuclear cells of myasthenia gravis patients treated with tacrolimus. *Biol Pharm Bull.* 2007;30:291-6.
156. Ivy P, Olshefski R, Taylor B, Patel K. Correlation of P-glycoprotein expression and function in childhood acute leukemia. *Blood.* 1996;88:309-18.
157. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. *J Immunol Methods.* 1993;159:197-207.
158. Carbonari M, Cibati M, Fiorilli M. Measurement of apoptotic cells in peripheral blood. *Cytometry.* 1995;22:161-7.
159. Pfyeller SL, Weber S, Luscher EF. Studies of the mechanism of the human platelet release reaction induced by immunologic stimuli. III. Relationship between the binding of soluble IgG aggregates to the Fc receptor and cell response in the presence and absence of plasma. *J Immunol.* 1977;118:514-24.
160. Yang R, Han ZC. Pathogenesis and management of idiopathic thrombocytopenic purpura: an update. *Int J Hematol.* 2000;71:18-24.
161. Zhou B, Zhao H, Yang RC, Han ZC. Multi-dysfunctional pathophysiology in ITP. *Crit Rev Oncol/Hematol.* 2005;54:107-16.
162. Kuwana M, Kaburaki J, Ikeda Y. Autoreactive T cells to platelet GPIIb-IIIa in immune thrombocytopenic purpura: Role in production of anti-platelet autoantibody. *J Clin Invest.* 1998;102:1393-402.
163. Tsubakio T, Tani P, Curd JG, Mc Millan R. Complement activation in vitro by antiplatelet antibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 1986;63:293-300.
164. Abboud MR, Laver J, Xu F, Weksler B, Bussel J. Serum levels of GM-CSF are elevated in patients with thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 1996;92:486-8.
165. Lazarus AH, Ellis J, Semple JW, Mody M, Crow AR, Freedman J. Comparison of platelet immunity in patients with SLE and with ITP. *Transfus Sci.* 2000;22:19-27.

166. Yoshimura C, Nomura S, Nagahama M, Ozaki Y, Kagawa H, Fukuhara S. Plasma-soluble Fas (APO-1, CD95) and soluble Fas ligand in immune thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol.* 2000;64:219-24.
167. Shenoy S, Mohanakumar T, Chatila T, Tersak J, Duffy B, et al. Defective apoptosis in lymphocytes and the role of IL-2 in autoimmune hematologic cytopenias. *Clin Immunol.* 2001;99:266-75.
168. Williams NS, Engelhard VH. Perforin dependent cytotoxic activity and lymphokine secretion by CD4+ T cells are regulated by CD8+ T cells. *J Immunol.* 1997;159:2091-9.
169. Srikiatkachorn A, Braciale TJ. Virus specific CD8+ T lymphocytes downregulate T helper cell type 2 cytokine secretion and pulmonary eosinophilia during experimental murine respiratory syncytial virus infection. *J Exp Med.* 1997;186:421-32.
170. Holmes BJ, MacAry PA, Noble A, Kemeny DM. Antigen-specific CD8+ T cells inhibit IgE responses and interleukin-4 production by CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 1997;27:2657-65.
171. Noble A, Zhao ZS, Cantor H. Suppression of immune responses by CD8 cells. II. Qa-1 on activated B cells stimulates CD8 cell suppression of T helper 2 responses. *J Immunol.* 1998;160:566-71.
172. Ciubotariu R, Colovai AI, Pennesi G, Liu Z, Smith D, et al. Specific suppression of human CD4+ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8+CD28- regulatory T cells. *J Immunol.* 1998;161:5193-202.
173. Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suciuc-Foca N. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *Int Immunol.* 1998;10:775-83.
174. Cronin DC 2nd, Stack R, Fitch FW. IL-4-producing CD8+ T cell clones can provide B cell help. *J Immunol.* 1995;154:3118-27.
175. McMennamin C, Holt PG. The natural immune response to inhaled soluble protein antigens involves major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted CD8+ T cell-mediated but MHC class II-restricted CD4+ T cell

- dependent immune deviation resulting in selective suppression of immunoglobulin E production. *J Exp Med.* 1993;178:889-99.
176. Webber NP, Mascarenhas JO, Crow MK, Bussel J, Schattner EJ. Functional properties of lymphocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Hum Immunol.* 2001;62:1346-55.
177. Ramirez F, Fowell DJ, Puklavec M, Simmonds S, Mason J. Glucocorticoids promote a TH2 cytokine response by CD4 T cells in vitro. *Immunol.* 1996;156:2406-12.
178. Ramirez F. Glucocorticoids induce a Th2 response in vitro. *Dev Immunol.* 1998;6:233-43.
179. Agarwal SK, Marshall GD Jr. Dexamethasone promotes type 2 cytokine production primarily through inhibition of type 1 cytokines. *J Interferon Cytokine Res.* 2001;21:147-55.
180. Franchimont D, Louis E, Dewe W, Martens H, Vrindts-Gevaert Y, et al. Effects of dexamethasone on the profile of cytokine secretion in human whole blood cell cultures. *Regul Pept.* 1998;73:59-65.
181. Myśliwiec J, Kretowski A, Topolska J, Siewko K, Jakubczyk D, et al. Serum Th1 and Th2 profile cytokine level changes in patients with Graves' ophthalmopathy treated with corticosteroids. *Horm Metab Res.* 2001;33:739-43.
182. Lacka K, Manuszewska E, Korczowska I, Lacki JK. The effect of methylprednisolone pulse treatment on cytokine network in Graves ophthalmopathy. *Curr Eye Res.* 2007;32:291-7.
183. De A, Blotta HM, Mamoni RL, Louzada P, Bertolo MB, et al. Effects of dexamethasone on lymphocyte proliferation and cytokine production in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2002;29:46-51.
184. Xie HF, Li J, Shi W. Hunan Yi. Effect of corticosteroids on the balance of Th cytokines in patients with systemic lupus erythematosus. *Ke Da Xue Xue Bao.* 2002;27:533-5.

185. Guo C, Chu X, Shi Y, He W, Li L, et al. Correction of Th1-dominant cytokine profiles by high-dose dexamethasone in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Clin Immunol*. 2007;27:557-62.
186. Ling V. Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1997;40 Suppl:3-8.
187. Deeley RG, Cole SP. Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). *Semin Cancer Biol*. 1997;8:193-204.
188. Ford JM. Modulators of multidrug resistance. Preclinical studies. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1995;9:337-61.
189. Chan HS, DeBoer G, Thorner PS, Haddad G, Gallie BL, Ling V. Multidrug resistance. Clinical opportunities in diagnosis and circumvention. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1994;8:383-410.
190. Van der Kolk DM, de Vries EG, Müller M, Vellenga E. The role of drug efflux pumps in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2002;43:685-701.
191. Jorgensen C, Sun R, Rossi JF, Costes J, Richard D, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human rheumatoid synovium. *Rheumatol Int*. 1995;15:83-6.
192. Maillefert JF, Maynadie M, Tebib JG, Aho S, Walker P, et al. Expression of the multidrug resistance glycoprotein 170 in the peripheral blood lymphocytes of rheumatoid arthritis patients. The percentage of lymphocytes expressing glycoprotein 170 is increased in patients treated with prednisolone. *Br J Rheumatol*. 1996;35:430-5.
193. Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, Yonezawa T, Kimura T. Increased expression of multidrug resistance of P-glycoprotein on Th1 cells correlates with drug resistance in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999;42:2014-5.
194. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:48-58.
195. Kim RB. Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers. *Drug Metab Rev*. 2002;34:47-54.

196. Miller TP, Grogan TM, Dalton WS, Spier CM, Scheper RJ, Salmon SE. P-glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil. *J Clin Oncol.* 1991;9:17-24.
197. Bates SE, Wilson WH, Fojo AT, Alvarez M, Zhan Z, et al. Clinical reversal of multidrug resistance. *Stem Cells.* 1996;14:56-63.
198. Tugwell P, Pincus T, Yocum D, Stein M, Gluck O, et al. Combination therapy with cyclosporine and methotrexate in severe rheumatoid arthritis. The Methotrexate-Cyclosporine Combination Study Group. *N Engl J Med.* 1995;333:137-41.
199. Diaz-Borjon A, Richaud-Patin Y, Alvarado de la Barrera C, Jakez-Ocampo J, Ruiz-Argüelles A, Llorente L. Multidrug resistance-1 (MDR-1) in rheumatic autoimmune disorders. Part II: Increased P-glycoprotein activity in lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients might affect steroid requirements for disease control. *Joint Bone Spine.* 2000;67:40-8.
200. Vilpo J, Koski T, Vilpo L. Calcium antagonists potentiate P-glycoprotein-independent anticancer drugs in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Haematologica.* 2000;85:806-13.
201. Aftab DT, Yang JM, Hait WN. Functional role of phosphorylation of the multidrug transporter (P-glycoprotein) by protein kinase C in multidrug-resistant MCF-7 cells. *Oncol Res.* 1994;6:59-70.
202. Fanger CM, Neben AL, Cahalan MD. Differential Ca²⁺ influx, K⁺Ca channel activity, and Ca²⁺ clearance distinguish Th1 and Th2 lymphocytes. *J Immunol.* 2000;164:1153-60.
203. Jorgensen C, Maillefert JF. Multidrug resistances genes in rheumatology. Is their role immunological or pharmacological? *Joint Bone Spine.* 2000;67:8-10.
204. Pendse S, Sayegh MH, Frank MH. P-glycoprotein a novel therapeutic target for immunomodulation in clinical transplantation and autoimmunity? *Curr Drug Targets.* 2003;4:469-76.

205. Kaspers GJ, Pieters R, Klumper E, De Waal FC, Veerman AJP. Glucocorticoid resistance in childhood leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1991;13:187-201.
206. Griese M, Kusenbach G, Lusebring K, Koster W, Roth B, Reinhardt D. Glucocorticoid receptors in mononuclear blood cells and their correlation to endogenous and exogenous corticoids in healthy and asthmatic children. *Eur J Pediatr* 1988;147:490-5.
207. Grzanka A, Jarzab J, Rogala B. Molecular mechanism of glucocorticoid action. *Pol Arch Med Wewn*. 1996;95:375-82.
208. DeRijk R, Sternberg EM. Corticosteroid resistance and disease. *Ann Med*. 1997;29:79-82.
209. Rogler G, Meinel A, Lingauer A, Michl J, Zietz B, et al. Glucocorticoid receptors are down-regulated in inflamed colonic mucosa but not in peripheral blood mononuclear cells from patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Invest*. 1999;29:330-6.
210. Shipman GF, Bloomfield CD, Kazimiera JGP, Munck AU, Smirt KA. Glucocorticoids and lymphocytes. III. Effects of glucocorticoid administration on lymphocyte glucocorticoid receptor. *Blood*. 1983;61:1086-90
211. Tanaka H, Akama H, Ichikawa Y, Homma M, Oshima H. Glucocorticoid receptors in normal leukocytes: effects of age, gender, season, and plasma cortisol concentrations. *Clin Chem*. 1997;37:1715-9.
212. Oakley RH, Cidlowski JA. Homologous down regulation of the glucocorticoid receptor: the molecular machinery. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1993;3:63-88.
213. Lowy MT. Corticosterone regulation of brain and lymphoid corticosteroid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1991;39:147-54.
214. DiBattista JA, Martel-Pelletier J, Cloutier JM, Pelletier JP. Modulation of glucocorticoid receptor expression in human articular chondrocytes by cAMP and prostaglandins. *J Rheumatol Suppl*. 1991;27:102-5.

215. Salkowski CA, Vogel SN. IFN-gamma mediates increased glucocorticoid receptor expression in murine macrophages. *J Immunol.* 1992;148:2770-7.
216. Crabtree GR, Munck A, Smith KA. Glucocorticoids and lymphocytes. II. Cell cycle-dependent changes in glucocorticoid receptor content. *J Immunol.* 1980;125:13-7.
217. Berki T, Kumanovics G, Kumanowics A, Falus A, Ujhelyi E, Nemeth P. Production and flow cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody. *J Immunol Methods.* 1998;214:19-27.
218. Sanden S, Tripmacher R, Weltrich R, Rohde W, Hiepe F, Burmester GR, Buttgereit F. Glucocorticoid dose dependent downregulation of glucocorticoid receptors in patients with rheumatic diseases. *J Rheumatol.* 2000;27:1265-70.
219. Haack D, Scharer K, Asam-Tauscher A, Vecsei P. Glucocorticoid receptors in idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 1996;13:653-6.
220. Bagdasarova IV, Ivanov DD, Afanas'eva VV. The morphofunctional characteristics of the blood lymphocytes in steroid-sensitive and steroid-resistant glomerulonephritis. *Arkh Pathol.* 1991;53:28-32.
221. Carlotti AP, Franco PB, Elias LL, Facincani I, Costa EL, et al. Glucocorticoid receptors, in vitro steroid sensitivity, and cytokine secretion in idiopathic nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 2004;65:403-8.
222. Chauhan D, Auclair D, Robinson EK, Hideshima T, Li G, et al. Identification of genes regulated by dexamethasone in multiple myeloma cells using oligonucleotide arrays. *Oncogene.* 2002;21:1346-58.
223. Geley S, Hartmann BL, Hala M, Strasser-Wozak EMC, Kapelari K, Kofler R. Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in human T-cell acute lymphoblastic leukemia CEM-C1 cells is due to insufficient glucocorticoid receptor expression. *Cancer Res.* 1996;56:5033-38.
224. Reichardt HM, Umland T, Bauer A, Kretz O, Schutz G. Mice with an increased glucocorticoid receptor gene dosage show enhanced resistance to stress and endotoxic shock. *Mol Cell Biol.* 2000;20:9009-17.

225. Pazirandeh A, Xue Y, Prestegard T, Jondal M, Okret S. Effects of altered glucocorticoid sensitivity in the T-cell lineage on thymocyte and T-cell homeostasis. *FASEB J.* 2002;16:727-9.
226. Brunet CL, Gunby RH, Benson RSP, Hickman JA, Watson AJM, Brady G. Commitment to cell death measured by loss of clonogenicity is separable from the appearance of apoptotic markers. *Cell Death Differ.* 1998;5:107-15.
227. Wallace AD, Cidlowski JA. Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J Biol Chem.* 2001;276:42714-21.
228. Gomi M, Moriwaki K, Katagiri S, Kurata Y, Thompson EB. Glucocorticoid effects on myeloma cells in culture: correlation of growth inhibition with induction of glucocorticoid receptor messenger RNA. *Cancer Res.* 1990;50:1873-8.
229. Pedersen KB, Vedeckis WV. Quantification and glucocorticoid regulation of glucocorticoid receptor transcripts in two human leukemic cell lines. *Biochemistry.* 2003;42:10978-90.
230. Ramdas J, Liu W, Harmon JM. Glucocorticoid-induced cell death requires autoinduction of glucocorticoid receptor expression in human leukemic T cells. *Cancer Res.* 1999;59:1378-85.
231. Kofler R, Schmidt S, Kofler A, Ausserlechner MJ. Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoblastic leukemia. *J Endocrinol.* 2003;178:19-27.
232. Riml S, Schmidt S, Ausserlechner MJ, Geley S, Kofler R. Glucocorticoid receptor heterozygosity combined with lack of receptor autoinduction causes glucocorticoid resistance in Jurkat acute lymphoblastic leukemia cells. *Cell Death Differ.* 2004;11 Suppl 1:65-72.
233. Helmberg A, Auphan N, Caelles C, Karin M. Glucocorticoid-induced apoptosis of human leukemic cells is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 1995;14:452-60.

234. Fillion MC, Bradley AJ, Devine DV, Décary F, Chartrand P. Autoreactive T cells in healthy individuals show tolerance in vitro with characteristics similar to but distinct from clonal anergy. *Eur J Immunol.* 1995;25:3123-7.
235. Leussink VI, Jung S, Mershdorf U, Toyka KV, Gold R. High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes. *Arch Neurol.* 2001;58:91-7.
236. Frisullo G, Nociti V, Iorio R, Katia Patanella A, Bianco A, et al. Glucocorticoid treatment reduces T-bet and pSTAT1 expression in mononuclear cells from relapsing remitting multiple sclerosis patients. *Clin Immunol.* 2007;124:284-93.
237. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993;74:609-19.
238. Hockenbery D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature.* 1990;348:334-6.
239. Sharief MK, Semra YK. Upregulation of the inhibitor of apoptosis proteins in activated T lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2001;119:350-7.
240. Xu L, Zhang L, Yi Y, Kang HK, Datta SK. Human lupus T cells resist inactivation and escape death by upregulating COX-2. *Nat Med.* 2004;10:411-5.
241. Schirmer M, Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ. Resistance to apoptosis and elevated expression of Bcl-2 in clonally expanded CD4+CD28- T cells from rheumatoid arthritis patients. *J Immunol.* 1998;161:1018-25.
242. Lev N, Barhum Y, Melamed E, Offen D. Bax-ablation attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Neurosci Lett.* 2004;359:139-42.