

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
HEMATOLOJİ ÜNİTESİ

PFA-100® CİHAZI İLE İN VİTRO KANAMA ZAMANI ÖLÇÜMÜNÜN
TROMBOSİT FONKSİYON BOZUKLUĞU VE VON WILLEBRAND
HASTALIĞININ SAPTANMASINDA BİR TARAMA TESTİ
OLARAK KULLANILMASI

Dr. Sema KARAKUŞ

111757

HEMATOLOJİ UZMANLIK TEZİ

111757

TEZ DANIŞMANLARI

Prof. Dr. Semra DÜNDAR

Yrd. Doç. Dr. Yahya BÜYÜKAŞIK

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ
ANKARA

2001

TEŐEKKÖR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde katkıları bulunan sayın Prof. Dr. Semra dündar, Yrd. Doç. Dr. Yahya Büyükaşık ve laboratuvar çalıőmalarındaki yardımlarından dolayı sayın Baőteknisyen Őerafettin Kirazlı'ya içtenlikle teőekkör ederim. Dade Behring firması tez için gerekli olan test kartuőlarını temin etme konusunda yardımcı olmuőtur.



ÖZET

Karakuş, S., PFA-100® cihazı ile in vitro kanama zamanı ölçümünün trombosit fonksiyon bozukluğu ve von Willebrand hastalığının saptanmasında bir tarama testi olarak kullanılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları, Hematoloji Ünitesi tezi. Ankara, 2001. Template kanama zamanı düşük duyarlılığı ve bazı önemli dezavantajlarına rağmen, trombosit fonksiyon bozukluklarının değerlendirilmesinde bir tarama testi olarak hala kullanılmaktadır. *Platelet Function Analyzer* (PFA-100®, Dade Behring, Marburg, Germany) sitratlı kanı yüksek akışkanlık gerilimi altında kollajen ile ADP (CADP) ve kollajen ile epinefrin (CEPI) kaplı membranın ortasındaki 150µm'lik delikten aspire ederek primer hemostazı taklit etmektedir. Kapiller sistemden geçen trombositler aktive olmakta ve deliği tıkamaktadırlar. Cihaz deliğinin tamamen kapanmasına kadar geçen süreyi tıkanma zamanı (in vitro kanama zamanı, İKZ) olarak kayıt etmektedir. Bu çalışmada PFA-100® ile trombosit fonksiyon paneli (TFP, trombosit agregasyon testleri ve von Willebrand faktör antijen ve aktivitesi) arasındaki korelasyonu araştırmayı ve İKZ'nin trombosit fonksiyon bozuklukları ve von Willebrand hastalığının (vWH) tanınmasındaki olası rolünün değerlendirilmesi amaçlandı. Kanama diyatezi şüphesiyle başvuran 185 kişi ve 164 normal kontrol grubu çalışmaya alındı. Tüm hastalarda İKZ'yi ve TFP'yi çalışıldı. Normal kontrol grubunda İKZ'nin normal sınırları CEPI için 88-199 saniye, CADP için 58-144 saniye olarak belirlendi. PFA'nın duyarlılık ve özgüllüğü %88.4 ve %85.5 iken, pozitif ve negatif kestirim değerleri %83.1 ve %90.4 idi. Sağlıklı kan bankası kontrollerinde CADP ile hem RCoF aktivitesi hemde vWF:Ag düzeyleri arasında negatif yönde iyi bir korelasyon bulundu ($p=0.001$, $r=-0.33$; $p=0.001$, $r=-0.35$). Kan grubu O olan kan bankası kontrollerinde vWF:Ag düzeyleri ile RCoF aktiviteleri O-dışı kontrollere göre daha düşük bulundu ($p=0.001$, $p=0.001$). Sonuç olarak, PFA-100®'ün trombosit fonksiyon bozuklukları ve vWH'nin saptanmasında bir tarama testi olarak kullanılabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Platelet Function Analyzer*, kanama bozuklukları, ABO kan grupları

ABSTRACT

Karakuş S., Use of in vitro bleeding time measurement with PFA-100[®] as a screening test for platelet function disorders and von Willebrand disease. Hacettepe University Faculty of Medicine, Internal Medicine, Thesis in Hematology Department, Ankara 2001. Template bleeding time (TBT), is still used as a screening test for evaluation of platelet function disorders, in spite of its low sensitivity and several significant disadvantages. Platelet Function Analyzer (PFA-100[®], Dade Behring, Marburg, Germany) simulates primary hemostasis by aspirating citrated whole blood through a 150µm aperture with a high shear stress. Platelets passing through the capillary system are activated and occlude the aperture. The instrument measures the time from the start of the test until the aperture is completely occluded and reports the closure time (CT). CT is also named as in vitro bleeding time (IBT). In this study we aimed to determine the correlation of PFA-100[®] and platelet function panel (platelet aggregation studies and von Willebrand factor antigen and activity) and to assess IBT's possible role in the screening of platelet function disorders and von Willebrand Disease (vWD). One hundred eighty five patients referred for a suspicion of bleeding disorder and one hundred sixty four normal control group were involved in the study. IBT and platelet function panel were studied in all patients. Normal ranges of IBT in normal controls were 88-199 seconds for CEPI and 58-144 seconds for CADP. Sensitivity and specificity of PFA were 88.4% and 85.5%. Positive and negative predictive values of PFA-100[®] results were 83.1% and 90.4%. CADP IBT was found inversely correlated with both Rcof activity and vWF:Ag levels in healthy blood donors ($p=0.001$, $r=-0.33$; $p=0.001$, $r=-0.35$ respectively). We found lower vWF:Ag levels and Rcof activities in healthy blood donors with blood group O than non-O ($p=0.001$, $p=0.001$). As a result, PFA-100 test can be used as a screening test for detection of platelet function disorders and vWD.

Keywords: platelet function analyzer, bleeding disorders, ABO blood groups.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	x
TABLolar	xi
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Trombositlerin Yapısı	2
2.2. Trombositlerin Fonksiyonları	3
2.3. Trombosit Fonksiyon Bozuklukları	7
2.4. Trombosit Fonksiyonlarının Değerlendirilmesinde	18
Kullanılan Testler	
BİREYLER ve YÖNTEM	23
3.1. Hastalar	23
3.2. Kan Alma, Trombosit Agregasyon Testleri	24
3.3. vWF:Ag ve vWF:RCof Aktivitesinin Çalışılması	25
3.4. Template Kanama Zamanı	25
3.5. PFA-100® Cihazı ile İn Vitro Kanama Zamanı	26
3.6. vWH Tanısı	26
3.7. Kontrol Grubu	26
3.8. İstatistiksel Yöntemler	27

	vii
BULGULAR	28
TARTIŞMA	34
SONUÇLAR	39
KAYNAKLAR	41



SİMGELER VE KISALTMALAR

SCCS	Surface-connected-canalicular system
vWF	Von Willebrand faktör
vWH	Von Willebrand hastalığı
ADP	Adenozin difosfat
GP	Glikoprotein
α	Alfa
TAR	Thrombocytopenia with absent radius
aPTT	Aktive parsiyel tromboplastin zamanı
GT	Glanzmann trombastenisi
PF	Platelet faktör
RCof	Ristosetin kofaktör
PRP	Platelet rich plazma
PPP	Platelet poor plasma
PFA	Platelet function analyzer
CEPİ	Kollagen-epinefrin
CADP	Kollagen-adenozin difosfat
RIPA	Ristosetinle trombosit agregasyonu
DDAVP	1-desamino-8-d-arjinin-vazopressin
C°	Santigrad derece
ELİSA	Enzyme linked immunosorbent assay
β	Beta
AST	Aspartat amino transferaz
ALT	Alanin amino transferaz
Ag	Antijen
SPSS	Statistical package for social sciences
TxA ₂	Tromboxan A ₂
PDGF	Trombosit kökenli büyüme faktörü
HETE	Hidroksieikosatetraenoik asit
HODE	Hidroksioktadekadienoik asit

TKZ	Template kanama zamanı
ATP	Adenozin trifosfat
TGF- β	Transforming growth factor beta
HMWK	High-molecular-weight kininogen
PAI-1	Plazminojen aktivatör inhibitörü-1
CTAP III	Connective tissue activating peptide-III
CI INH	C1 inhibitörü
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
mmHg	Milimetre civa
mL	Mililitre
micg	Mikrogram
micM	Mikromol



ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Trombosit yapısının şematik görünümü	2
2.2. Trombositlerin damar duvarına adezyonu	4
2.3. Trombositler tarafından salınan moleküller	7
2.4. Trombosit agregasyon testinin temelleri	21
3.1. vWH tanısına yaklaşım	26+
4.1. Hasta ve kontrol gruplarında CEPİ düzeylerinin dağılımı	28+
4.2. Hasta ve kontrol gruplarında CADP düzeylerinin dağılımı	28++
4.3. O kan grubu kontrollerinde vWF:Ag düzeylerinin dağılımı	32+
4.4. O kan grubu kontrollerinde RCof aktivite düzeylerinin dağılımı	32++
4.5. O-dışı kan grubu kontrollerinde vWF:Ag düzeylerinin dağılımı	32+++
4.6. O-dışı kan grubu kontrollerinde RCof aktivite düzeylerinin dağılımı	32++++
5.1. PFA-100® cihazı ile bakılan in vitro kanama zamanı ile kanama diyatezine tanısal yaklaşım	38

Tam sayfa tutan şekillere sayfa numarası verilmemiştir. Bu şekillerin yerleri takip ettikleri sayfanın önüne "+" işareti eklemek suretiyle belirtilmiştir.

TABLÖLAR

xi

Tablo	Sayfa
2.1. Kalıtsal ve edinsel trombosit bozuklukları	8
2.2. Kalitatif trombosit bozuklukları	9
2.3. Yeniden düzenlenmiş von Willebrand hastalığının alt tipleri	17
2.4. Trombosit fonksiyon bozukluklarının laboratuvar tanısı	19
4.1. Hastaların kanama diyatezi nedenine göre dağılımları	28
4.2. CEPİ ve CADP için değişik üst sınır değerleri kullanılarak hesaplanan duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif kestirim değerleri	29
4.3. Kan bankası kontrollerinin cinsiyet ve kan gruplarına göre dağılımları	31

GİRİŞ

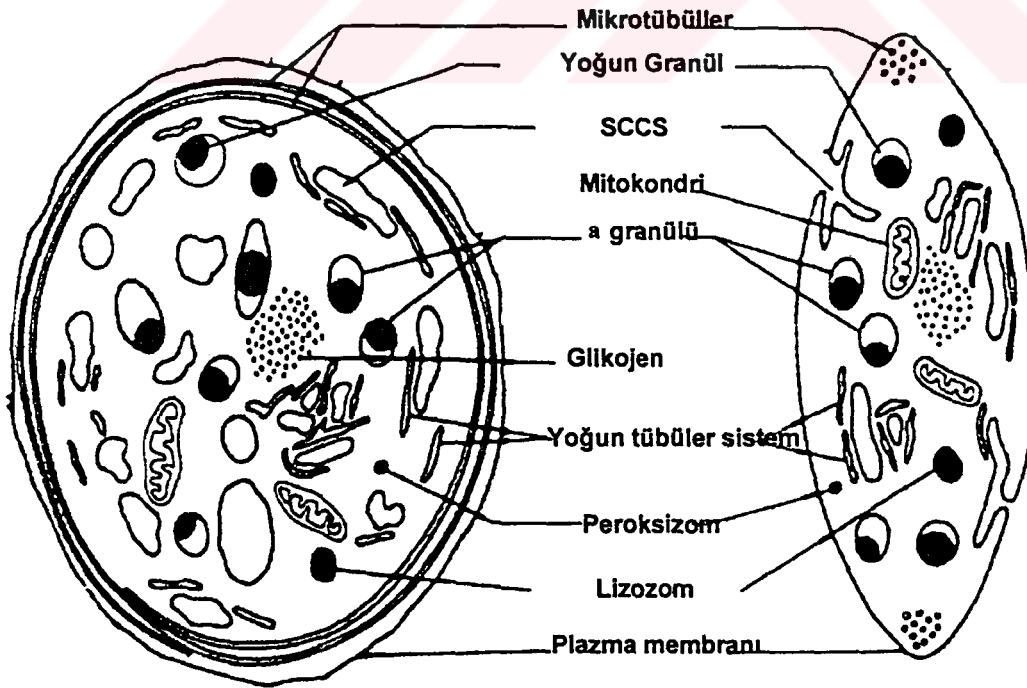
Kanama bozukluklarına tanısall yaklaşımda kanama zamanı ölçümü klinikte oldukça sık kullanılan bir tarama testidir. Template kanama zamanı (TKZ) duyarlılığı düşük olmasının yanısıra, testi yapan kişiye oldukça bağımlı olan, travmatik bir testtir. Trombosit agregasyon çalışmaları ise trombosit fonksiyon bozukluklarını saptamada TKZ'na göre çok daha duyarlı bir test olmasına karşın, daha pahalı, zaman alan, trombosit fonksiyonlarının hızlı bir şekilde taranmasına uygun olmayan testlerdir. Ayrıca trombositopenik hastalardaki olası kanama riski hakkında bilgi vermezler.

Son zamanlarda *Platelet Function Analyzer (PFA-100®)* adı verilen ve diğer testlerdeki olumsuzlukları en aza indiren yeni bir cihaz geliştirilmiştir. Cihazın test kartuşları hasar görmüş damar duvarını taklit edecek şekilde sitratlı kan örneğinin konduğu rezervuar ile ortasında delik bulunan biyolojik aktif membrandan oluşmaktadır. Membran kollajen/ADP ve kollajen/epinefrin ile kaplıdır. Sitratlı kan normal kapiller sistemdeki gibi 40 mbar'lık bir basınçla deliğe doğru akar. Trombositler membran ile temas ettikleri zaman aktive olarak agregre olmaya başlarlar. Sonunda agregre olan trombositler membran içindeki kan dolaşımını tıkamakta ve bu tıkanmanın ortaya çıkış zamanı *in vitro* kanama zamanı olarak kayıt edilmektedir. PFA-100® cihazının en sık vWH'ı başta olmak üzere konjenital ve kazanılmış kanama bozukluklarında, trombositlerin sayısal ve fonksiyonel bozukluklarında tarama testi olarak kullanımı daha önce araştırılmıştır (68,73,75). Diğer yandan normal kişilerde ABO kan gruplarının PFA üzerine olan etkileri ile PFA, vWF:Ag ve RCoF aktivite düzeyleri arasında korelasyon olup olmadığını değerlendirdik. Bu çalışmada PFA-100® 'ün primer hemostaz bozukluklarının taranmasındaki yerinin ortaya konulması ve Ünitimiz şartlarında optimal kullanım için algoritma oluşturulması amaçlandı.

GENEL BİLGİLER

2.1. Trombositlerin Yapısı

Primer hemostazın gerçekleşmesinde önemli rol oynayan trombositler pıhtı oluşumuna katılıp tüketilmediklerinde ortalama yaşam süreleri 7-10 gündür. Bu sürenin sonunda kan dolaşımından retiküloendotelial sistem tarafından temizlenirler. Trombositlerin diskoid yapısını stoplazma zarı altında yerleşmiş olan aktin iskeleti ve mikrotübül kafesi oluşturur (1). Mikrotübül kafes yapısının etrafında stoplazma organelden fakir olup, yalnızca plazma membranı ve onun invajinasyonu sonucu oluşan bir kanalcık sistemi (surface-connected canalicular system, SCCS) mevcuttur. Stoplazmada α ve yoğun (=dense) granüller, mitokondriler, peroxizomlar, lizozomlar, glikojen granülleri, dense tübüler sistem ve SCCS izlenir. Bir trombositin istirahat sırasındaki yapısı Şekil 2.1'de gösterilmiştir (2). Yoğun tübüler sistemin prostaglandin sentezinden sorumlu olabileceği veya kalsiyum deposu olarak rol oynaması muhtemel görülmektedir.



Şekil 2.1. Trombosit yapısının şematik görünümü (2)

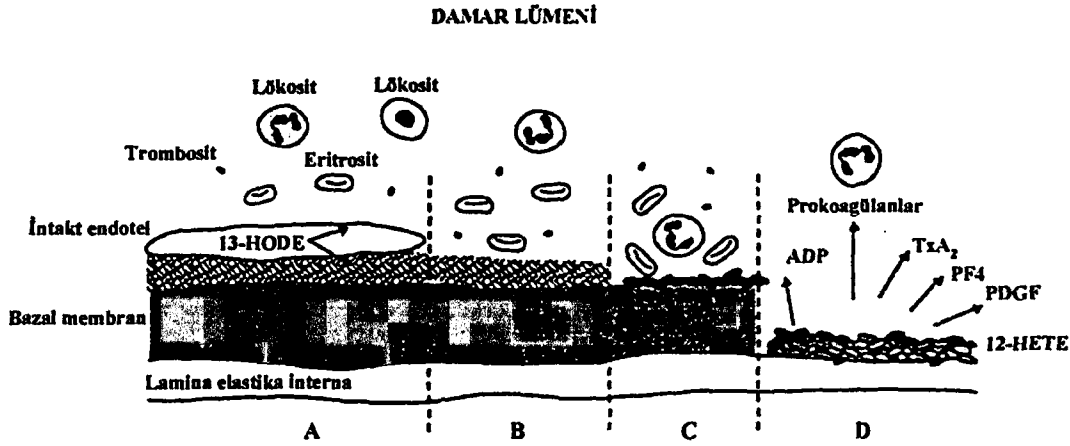
2.2. Trombositlerin Fonksiyonları

Trombositler hemostazın düzenlenmesinde ve trombüs oluşumunda rol alan, hasar görmüş vasküler duvar yapısıyla, plazma proteinleriyle ve kan dolaşımındaki diğer kan elemanlarıyla devamlı iletişim halindedir (3). Primer hemostazın sağlanmasında trombositlerin fonksiyonları sırayla gözden geçirilecektir.

Trombositlerin Adezyonu

Bir damar kesisi sonucu kanın subendotelyal dokuya teması sonucunda trombositler diğer hücreler ve bazı proteinlere (immobilize vWF, kollajen, laminin, fibronektin, trombospondin) yapışırlar ve buna adezyon adı verilir (3,4). Adezyonu takiben trombositler subendotelyal matrix üzerinde birçok yeni reseptör-substrat bağlanması ile sıkı bir şekilde yayılırlar. Kollajen, adenosin difosfat (ADP), epinefrin, trombin gibi herhangi bir agonist trombosit yüzeyindeki reseptörüne yapıştığı zaman hücrede belirgin biyokimyasal değişikliklere neden olur ve trombositin şekli değişerek, diğer hücrelerle olan etkileşimleri uyarılır. Bu şekil değişikliği sonucu trombositlerin birbirleriyle temas alanları artar. Trombosit şekil değişimi ve aktivasyonu sonucunda GPIIb/IIIa reseptöründe konfigürasyon değişikliği ile ligandı olan fibrinojeni bağlayarak kümeleşirler (=agregasyon). Agregasyonu takiben yoğun ve α granüllerinin içerikleri salgılanır (=sekresyon).

Trombosit yanıtının derecesi damar duvarındaki hasarın büyüklüğü ve derinliğine bağlıdır (Şekil 2.2). Eğer sadece endotel kaybına neden olan bir travma (=minör travma) söz konusu ise trombositler bazal membrana yapışırlar ve yayılırlar. Bu durumda sekresyon ve agregasyona neden olmazlar (5). Ancak damar duvarındaki hasar ciddi ise, damar duvarındaki daha derin katmanların trombositlerle teması sonucunda adezyon, sonrasında sekresyon ve agregasyon ile birlikte yüzeylerinde koagülasyon sisteminin aktivasyonu ile sonuçlanır (6). Trombosit yanıtlarındaki bu farklılıklar damar duvarındaki hasar sonucu ortaya çıkan maddelerin farklılığından kaynaklanmaktadır (7). Örneğin, endotel hücreleri tarafından



Şekil 2.2. Trombositlerin damar duvarına adezyonu. (A) endotel intakt iken 13-hode tarafından adezyon önleniyor. (B) Sadece endotel hasarı ile trombositlerin bazal membrana az miktardaki adezyonları. (C) Daha derindeki bazal membrana temasları sonucunda adezyon oluyor; ancak sekresyon gerçekleşmiyor. (D) Damar duvarında ciddi bir zedelenme olduğunda trombositlerin hasarlı bölgeye adezyonuyla birlikte sekresyon ve agregasyonları da gerçekleşmektedir (9)

sentezlenen tip IV ve V kollajen endotelin hemen altında bulunur ve trombositlerin adezyonuna yol açarken, özel durumların dışında agregasyona neden olmazlar. Oysa damar duvarının daha derininde yer alan düz kas hücreleri tip I ve III kollajen sentezlerler ve adezyonla birlikte agregasyon ve sekresyonu da kolaylaştırırlar (6).

Trombositlerin adezyonu için yüzeyindeki membran GPIIb/IX reseptör kompleksi ile subendoteliyal bölgedeki kollajen arasında bir köprü görevi gören ve bir plazma proteini olan vWF'e gereksinim vardır (8). Yüksek kan akım hızı vWF ve/veya trombosit GPIIb'de şekil değişikliğine neden olup, GPIIb/IIIa'nın aktivasyonunu takiben vWF'ün GPIIb/IX'a bağlanmasını kapsayan mekanizma tarafından trombositlerin agregasyonuna neden olmaktadır. Trombositler farklı vasküler yataklarda farklı akım hızları olması nedeniyle venöz trombozdan çok arteriyel trombozda daha önemlidir (10).

Endotel hücreleri tarafından sentezlenen 13-hidroksioktadekadienoik (13-HODE) asit trombosit adezyonu, agregasyonu ve tromboxan A₂ üretiminin güçlü bir inhibitörüdür. Sentezlendikten sonra endotelin hemen altına salınır ve trombositin adezyonunu inhibe eder ve bu da bazal membranın başlangıçta trombojenik olmadığını gösterir (11). Kişinin yaşı, hematokrit değeri, kan akım hızı, damarın çapı, *shear stress* trombosit adezyonunu etkileyen faktörlerdir (12).

Trombositlerin Agregasyonu

Trombositlerin agregasyonunun gerçekleşmesi için gerekli olan üç komponent vardır:

- Trombosit agonistleri:

In vivo trombosit agonistleri trombin, tromboksan A₂ epinefrin, *platelet activating factor*, vazopressin, ADP, kollajendir. Agonist ile uyarılan trombositlerde diskoid yapıdan sferik forma dönüşüm olur. Agregometre cihazında bu sırada turbiditede hafif bir artış kaydedilir. Agregasyon için bu dönüşüm şart değildir.

- Fibrinojen

Trombüs oluşumunda fibrinojen, fibrin oluşturması ve trombosit agregasyonunu desteklemesi ile katkıda bulunur. GPIIb/IIIa reseptörünün latent durumdan, fibrinojen bağlayacak aktif duruma geçmesi bütün agonistlerle olan trombosit aktivasyonunun ortak bir sonucudur. Ortamda bulunan kalsiyum gibi divalan iyonlar uzaklaştırıldığında fibrinojenin trombositlere bağlanamadığı gözlenir. Sonuç olarak agonistler fibrinojene ait olan reseptörü indüklemekte ve fibrinojen ile GPIIb/IIIa'nın bağlanabilmesi için kalsiyum iyonu gerekmektedir. Fibrinojen iki trombositin GPIIb/IIIa reseptörleri arasında köprü oluşturarak agregasyonu sağlamaktadır (13). Fibrinojen ile GPIIb/IIIa bağlanması başlangıçta geriye dönüşebilen bir reaksiyondur. Uygun şartlarda fibrinojen ile GPIIb/IIIa arasındaki bağlanma stabilize olarak geriye dönüşümsüz bir şekilde devam edip, kalıcı trombosit agregasyonuna neden olur. GPIIb/IIIa-fibrinojen kompleksinin trombosit iskeletine bağlanarak kalıcı agregasyonun sağlandığını gösteren yayınlar

olsada tam mekanizması aydınlatılamamıştır (14). Trombositlerin sekresyonunu uyaramayacak kadar düşük konsantrasyondaki ADP veya epinefrin gibi agonistler kullanıldığında veya sekresyon bozukluğu olan trombositlerle agregasyon incelendiğinde küçük bir agregasyon dalgasının oluştuğu; ancak agregasyonu amplifiye edecek α ve yoğun granül içerikleri salınamadığından trombositler fibrinojenden ayrılırlar (=disagregasyon).

- Divalan katyonlar

Agregasyonun gerçekleşmesi için milimol düzeyindeki konsantrasyonlarda magnezyum ve kalsiyum iyonlarına ihtiyaç vardır (15).

Trombositlerin Sekresyonu

Trombositlerin içinde farklı iki morfolojiye sahip veziküller vardır; α granülleri ve yoğun granüller. Bu granüllerin içinde trombosit fonksiyonlarını, vasküler tonusu ve koagülasyonu sağlayan maddeler bulunur (16,17). Trombosit sekresyon ürünleri meydana gelmiş olan trombusun mekanik özelliklerini değiştirebilir; hücre adezyonunu, vasküler hücrelerin çoğalmasını, pıhtılaşma sistemini etkileyebilirler. Kollajen, trombin, epinefrin, tromboksan A_2 ve diğer araşidonik asit metabolitleri trombositlerin sekresyonuna neden olurlar Zayıf bir uyararla sadece α granülleri salınırken, giderek artan konsantrasyonlardaki uyarılarda yoğun granüllerin de sekresyonu gerçekleşmektedir (18,19). Yoğun granüller en hızlı salgılanan trombosit organelleridir. Bu granüllerin içinde diğer trombositleri de uyararak ortama çeken ADP, diğer kan elementleri için agonistik etkisi olan ATP, damar tonusunu etkileyen serotonin, pıhtılaşmada rol oynayan kalsiyum ve granülofizin adı verilen fonksiyonu henüz anlaşılamayan bir membran proteini yer alır. Trombositlerin α granülleri içinde ise vasküler hücrelerin çoğalma ve gen ekspresyonunu ve subendotelial matriks molekül sentezini etkileyen platelet-derived growth factor, connective tissue activating peptide III, β -tromboglobulin, platelet faktör 4, transforming growth factor- β ve trombospondin gibi peptidler bulunur (20) (Şekil 2.3). Ayrıca pıhtılaşma ve hücre adezyonunda rol oynayan birçok plazma proteini de depolanmaktadır. Bu plazma proteinlerinin, trombopoez sırasında megakaryositler tarafından

Trombosit dışı nedenler sıklıkla çeşitli hastalıklara ait ürünlerin trombosit

Tablo 2.1. Kalıtsal ve edinsel trombosit bozuklukları

Kalıtsal	Edinsel
Bernard-Soulier sendromu	Myeloproliferatif hastalıklar
Glanzmann trombastenisi	Üremi
von Willebrand hastalığı	Aspirin
Afibrinojenemi	Penisilin tipi antibiyotikler
Gri platelet sendromu	Etanol maruziyeti
Wiskott-Aldrich sendromu	Dextran
Hermansky-Pudlak sendromu	C ₁₉ ve C ₂₁ yağ asitleri
Chediak-Higashi anomalisi	Dissemine intravasküler koagülasyon
Trombositopeni with absent radius (TAR)	Paraproteinemiler
Aspirin benzeri eksiklik	
Sikloksijenaz eksikliği	

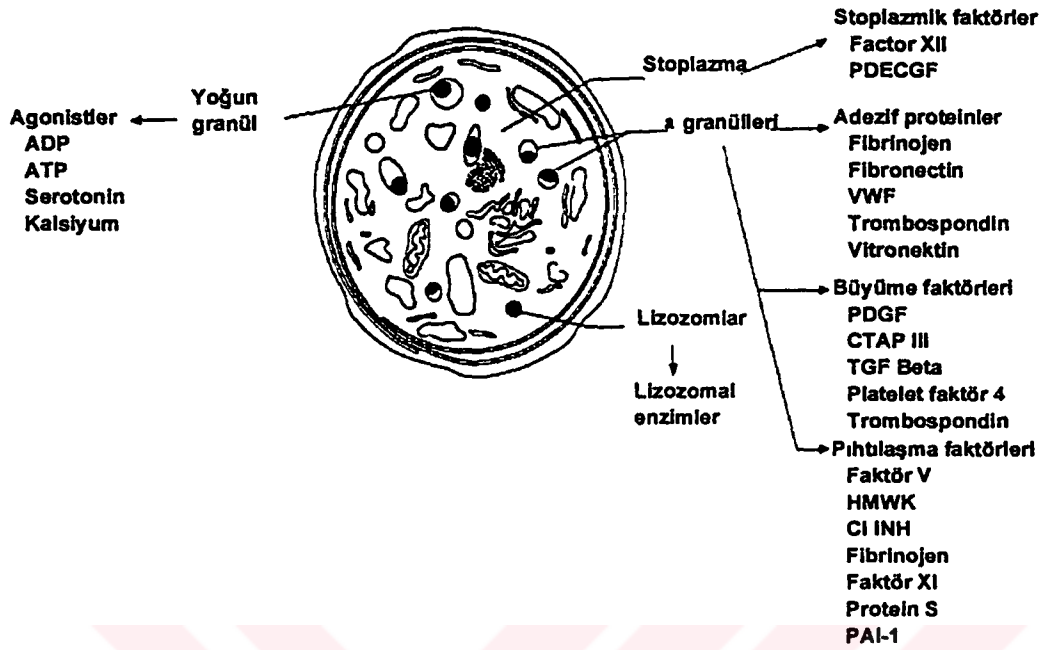
adezyon veya agregasyonunu inhibe etmesine bağlı olarak meydana gelmektedir. Trombosit ile ilgili bozukluklarda çoğunlukla ilaçlara veya myeloproliferatif hastalıklara bağlıdır (Tablo 2.2).

A- Kalıtsal Trombosit Fonksiyon Bozuklukları

Adezyon Bozuklukları

Hasara uğramış vasküler alanda trombositler membranlarında yer alan GPIb-V-IX kompleksi ile vWF'e bağlanarak subendotelial bölgeye adezyon yapar (24). Küçük damarlarda, akım hızı daha geniş arterlere göre daha yüksek olduğundan trombositlerin adezyonu için GPIb-IX ve vWF'e ihtiyaç varken büyük arterlerde, GPIb-V-IX ve vWF olmadan adezyon gerçekleşmektedir (25).

Bernard-Soulier Sendromu



Şekil 2.3. Trombositler tarafından salınan moleküller (21)

plazmadan alınıp, α granülleri içinde depolandıkları düşünülmektedir (22). Trombosit α granülleri içinde fibrinojen, fibronektin, vWF, vitronektin ve membranlarında P seletin gibi adezyon proteinleri de içerirler. Trombositlerin yoğun ve α granül ürünlerinden farklı olarak hücre içinde depolanmayan diğer sekresyon ürünleri de trombositleri ortama çekmek ve vasküler tonusu ayarlamak gibi görevleri bulunan arasıdonik asit deriveleridir (tromboksan A_2 gibi). Bir diğer sekresyon organeli de lizozomlardır. Hidrolaz ve heparatinaz gibi enzimler salarlar. Fibrin monomerlerinin polimerizasyonu ve pıhtı stabilizasyonundan sorumlu olan faktör XIII trombosit stoplazmasında depolanıp, aktivasyonu takiben salınır (23).

2.3. Trombosit Fonksiyon Bozuklukları

Trombositlerin fonksiyon ile ilgili bozuklukları trombositopati olarak ta adlandırılır. Klinikte kolay morarma, burun ve dişeti kanamaları, menoraji ve postoperatif kanamalarla kendini gösterebilirler. Trombositopatiler kalıtsal ve edinsel olarak sınıflandırılabilir (Tablo 2.1). Bu bozukluklar trombosit içi veya dışı ile ilgili nedenlere bağlı olabilir.

Otozomal resesif geçişli olan bu hastalık ilk olarak 1948 yılında Bernard ve Soulier tarafından tanımlanmıştır (26). Açıklanamayan bir nedenden ötürü

Tablo 2.2. Kalitatif trombosit bozuklukları

Adezyon Bozukluğu	Primer Agregasyon Bozukluğu	Sekresyon Bozukluğu
Bernard-Soulier sendromu	Glanzmann trombastenisi	Storage pool hastalığı
Üremi	Afibrinojenemi	Gri platelet sendromu
Dissemine intravasküler koagülasyon		Wiskott-Aldrich sendromu
Paraproteinemiler		Hermansky-Pudlak sendromu
		Chediak-Higashi anomalisi
		Trombositopeni with absent radius
		Üremi
		Aspirin
		Sikloksijenaz eksikliği
		Etanol

kanamanın şiddeti ilk görüldüğü infant döneminden sonra yaşla birlikte azalma eğilimindedir. İki olguda, GPIIb/IIIa geninin 129. kodonunda nokta mutasyonu gösterilmiştir (27). Bu sendromda vWF'ün bağlanması için gerekli olan GPIIb-V-IX adezyon reseptöründe eksiklik sonucunda trombositlerle adezyon yapamazlar. Laboratuvar bulguları olarak, hafif-orta derecede trombositopeni, periferik yaymada trombositlerde anizositoz gözlenir. Bazı heterozigot olgularda trombositopeni ile birlikte büyük trombositler görülür ve hastalar semptomsuzdur. Büyük olan bu trombositlerin görünümü normaldir ve normal trombositlere göre granül içerikleri ve vWF düzeyleri daha yüksektir (28); ancak yaşam süreleri daha kısadır (29). Kanama zamanı uzamıştır. Ristosetin trombosit aglutinasyon

çalışmaları anormal olup; vWF içeren normal plazma eklenmesiyle bu anormal yanıt düzelmez. Hem plazma , hem de trombosit faktör VIII antijen düzeyleri normal veya artmıştır (28). Trombosit agregasyon çalışmalarında, ADP, epinefrin, araziidonik asit ile agregasyon normalken; ristosetin ile belirgin olarak azalmıştır. Kollajen ve trombin ile değişkendir. Trombositten zengin plazma elde ederken büyük trombositleri lenfosit ve eritrositlerden ayırmanın güç olması ve büyük trombositlerin ışık geçirgenliğini etkilemesi sonucu agregasyon eğişisinde meydana gelebilecek eğişik sonuçlar nedeniyle kollajen ve trombin cevabında eğişik sonuçlar alınmaktadır.

Trombosit Tipi (Pseudo) von Willebrand Hastalığı

Trombositopatiler içinde yer alan bu hastalık tip IIb von Willebrand hastalığına (vWH) benzemektedir. Bu otozomal dominant geçişli olan kanama bozukluğu GPIIb α 'nın ya 233 veya 239.uncu terminaldeki tek bir nokta mutasyonu ile meydana gelen aminoasit eğişikliğine bağlıdır (30). Sıklıkla hafif kanama kliniği trombositopeniye bağlı olarak görülürken; bazı ağır olgularda faktör VIII koagülasyon düzeylerindeki düşüklüğe bağlı olarak derin doku kanama ve hemartrozları da görülebilir. Kanama zamanı genellikle uzamıştır. Aktive parsiyel tromboplastin zamanındaki (aPTT) uzama, vWF ve Faktör VIII koagulan aktivitesindeki düşüklüğün derecesine bağlı olarak eğişmektedir. Ristosetinle trombosit agregasyon çalışmaları tip IIb vWH'ndaki gibi hiper agregasyon göstermektedir. Bu hiperagregasyon normal plazmaya hastanın trombositleri konduğunda da ortaya çıkmaktadır ki bu da hastanın trombositlerinde bir bozukluk olduğunu göstermektedir. Hastanın plazması normal trombositlere eklendiğinde, azalan vWF'e bağlı olarak ristosetinle agregasyon azalmaktadır. Burada vWF'ündeki düşüklük esas olarak büyük vWF multimerlerindeki kayba bağlıdır (31). Tip IIb vWH'ndan ayırt etmek tedavi yaklaşımı açısından önemlidir; çünkü trombosit tipi vWH'nda vWF verildiği takdirde trombositopenileri ağırlaşır.

Agregasyon Bozuklukları

Agregasyon dinamik ve metabolik olarak aktif bir olay olup; aglutinasyon ile karıştırılmamalıdır. Formalinle fikse edilerek ölü duruma getirilmiş olan ve ristosetin testinde kullanılan trombositler aglutine olabilir; ancak agregasyon yapamazlar. Trombositlerin agregasyon yapabilmeleri için GPIIb/IIIa (fibrinojen reseptörü) gereklidir.

Glanzmann Trombastenisi

Glanzmann Trombastenisi (GT) otozomal resesif olarak geçen bu hastalık sadece homozigot olduğu zaman kanama komplikasyonları ile kendini gösterir. Bu hastalıkta çeşitli nokta mutasyonları gösterilmiştir. Hastalığın patofizyolojisinde trombositlerin agregasyonu için gerekli olan GPIIb/IIIa kompleksindeki eksiklik sorumludur. Hastalığın tip I ve tip II olmak üzere iki alt grubu vardır (32). Tip I ağır formu olup, trombosit içindeki fibrinojen gibi GPIIb-IIIa kompleksi yoktur. Pıhtı retraksiyonu gözlenmez. Tip II'de ise trombositlerde normalin altında fibrinojen düzeyi ile birlikte, GPIIb-IIIa kompleksi normalin %15'i düzeylerinde bulunmaktadır. Pıhtı retraksiyonu izlenebilir. Klinikte mukokutanöz kanamalar ile birlikte kanama zamanı belirgin olarak uzamıştır. Doğumla birlikte kolay morarma ve kanama komplikasyonları görülmeye başlar; ancak yaşla beraber azalma eğilimindedir. Trombositlerin sayısı, büyüklük ve morfolojisi ve yaşam süresi normaldir. Trombositler ADP, epinefrin, kollajen veya trombinle agregasyon yapamazlar; ancak ristosetin eklendiğinde aglutinasyon yapabilirler (25). Trombositlerin adezyon ve granül sekresyon fonksiyonları bozulmamıştır. Trombosit sayısı normal olduğunda pıhtı retraksiyon kaybı, birkaç istisna dışında, GT için diagnostiktir (33). Bu hastalığın tanısı için GPIIb/IIIa kompleksinin eksikliğini gösteren monoklonal antikolar geliştirilmiştir. Heterozigot GT hastalarında GPIIb/IIIa içeriği normalin %50'si oranında olup, pıhtı retraksiyonu, agregasyon çalışmaları ve kanama zamanı normal bulunmaktadır. Tedavide trombosit transfüzyonları, menorajiye yönelik hormon tedavisi, kronik kan kaybına bağlı gelişen demir eksikliği anemisi için oral demir verilmesi gerekebilir. Allojenik kemik iliği nakli dört yaşındaki tip I GT hastasında başarıyla uygulanmıştır (34).

Sekresyon Bozukluğu

Sekresyon bozukluğu iki nedene bağlı olabilir: Ya trombositlerdeki granüllerin ADP depoları eksiktir (*depo havuz hastalığı*) veya normal olan granül içeriğinin salınımında bir bozukluk vardır (*aspirin-benzeri bozukluk*). Her iki tipinde de primer agregasyon dalgası normaldir; ancak sekonder agregasyon dalgası dışarıdan ADP ve epinefrin uyarısıyla yoğun granüllerden endojen ADP salınımı ile meydana geldiği için sekresyon bozukluğu olanlarda gözlenmez.

Depo Havuz Hastalığı

Bu hastalıkta α granül, yoğun granül veya ikisinde birden azalma veya eksiklik söz konusudur. Yoğun granül eksikliği daha sıklıkla görülür ve α granül eksikliğine göre daha ciddi kanamalarla seyder. Bunun nedeni α granüllerin ihtiyaçtan fazla sayıda bulunması ve yoğun granüllerin trombositlerin pıhtı oluşturabilmeleri için daha önemli içeriklere sahip olmasıdır.

Gri Trombosit Sendromu

Depo havuz hastalığına bir örnektir ve α granül eksikliği söz konusudur. Wright ile boyanmış periferik yaymada gri veya mavi-gri renkte görülürler. İçerikleri olan platelet faktör 4 (PF4), β -tromboglobulin ve fibrinojen ile ilgili testler bozuktur. Aynı zamanda PF3 düzeylerinde de azalma bildirilmiştir (35). Yoğun granül içerikleri normaldir. Kalsiyum ve sikloksijenazın depolandığı yoğun tübüler sistem de bu hastalıkta etkilenmiştir (36). Gri platelet sendromu nadir görülmekle birlikte otozomal dominant ta olabilir (35). Klinikte hafif kanama, kolay morarma, orta derecede trombositopeni ve anormal trombosit morfolojisi vardır. ADP, epinefrin ve araşidonik asit ile agregasyon testleri genellikle normaldir. Trombin ve kollajende sonuçlar değişken olabilir. Bu hastalar hemostatik olarak genellikle normaldir; ancak ağır kanama komplikasyonu olan birkaç olgu bildirilmiştir. Bir kız çocuğunda kanama trombosit infüzyonu ve antifibrinolitik tedavi ile kontrol altına alınabilmiştir (37).

Wiskott-Aldrich Sendromu

Bir immün yetmezlik bozukluğu olan bu hastalık trombositopeni, küçük trombositler, tekrarlayan infeksiyonlar ve egzema ile karakterizedir. Geçiş X'e bağlı olan bu hastalıkta etkilenen erkek çocuklar yüksek kanama riski ve infeksiyon nedeniyle çocukluk dönemine kadar nadiren yaşarlar. Hastalık genini taşıyan kadınlar ise normaldir. Hastalığın X kromozomunun kısa kolunun proximal kesimindeki (Xp11) genetik bozukluğa bağlı olduğu gösterilmiştir (38). Trombositopeninin nedeni yetersiz yapım ve azalmış trombosit ömrüdür (39). Trombositlerde ve T lenfositlerde yüzey membran protein eksikliğine bağlı hücre membran bozukluğu mevcuttur (39,40).

Hermansky-Pudlack Sendromu

Bu sendrom tirozinaz pozitif okülökutanöz albinizm, makrofajlarda seroid-benzeri pigmentin birikimi ve trombosit fonksiyon bozukluğuyla karakterizedir. Otozomal resesif geçişli nadir bir hastalık olup, yoğun granül eksikliği mevcuttur.

Chediak-Higashi Sendromu

Albinizm, tekrarlayan infeksiyonlar, kanama diyatezi ve bütün granül içeren hücrelerde dev lizozomlar bu hastalığın özellikleridir. Trombositopeniyle birlikte, yoğun granül eksikliği mevcuttur. ADP, epinefrin, kollajen, araşidonik asite trombosit cevabı görülmez (41).

Granül Sekresyon Bozukluğu

Aspirin-benzeri bozukluk olarak ta adlandırılan bu grupta klinik ve laboratuvar bulguları oldukça heterojen olup, α ve yoğun granül içeriklerinin normal olması dışında depo havuz hastalığına benzemektedir. ADP ve epinefrin ile sekonder agregasyon dalgası görülmez. Kollajenla trombosit agregasyonundaki bozukluk yoğun granüllerden ADP'nin salınımındaki bozukluğa bağlıdır.

B- Edinsel Trombosit Fonksiyon Bozuklukları

Trombosit fonksiyonları pek çok ilaç, hastalıklar ve diyetten etkilenmektedir.

İlaçlar

Aspirin, penisilinler, alkol klinik olarak en sık kanama komplikasyonlara neden olduğu bilinen ajanlardır (42). Aspirin alımından sonra sikloksijenaz enziminin geriye dönüşümsüz olarak inhibisyonu sonucunda sekonder agregasyon dalgası izlenmez. Trombositin ömrü boyunca (on gün) enzim inhibisyonu devam eder. Aspirin alımı sonrasında kanama zamanındaki uzama değişkendir. Aspirin alımından iki saat sonra insanların çoğunda 2-9 dakikalık uzama görülebilir. Toplumun %10-15'inde iki dakikadan daha az bir kanama zamanı uzaması görülürken, %10-15'inde ise dokuz dakikadan daha fazla uzama saptanır. Kanama zamanında belirgin uzama olması vasküler bozukluklar, trombositopeni, vWF eksikliği, dolaşan antikoagülanlar gibi çeşitli nedenlere bağlı olabilir. Depo havuz hastalığında olduğu gibi, yoğun granüllerden ADP salınımındaki azalmayla orantılı olarak kanama zamanındaki uzama da artar. Trombositleri benzer şekilde etkileyen diğer ilaçlar indometazin, ibuprofen, butazolidin gibi steroid olmayan anti-inflamatuar ajanlardır.

Trombosit fonksiyonlarını en çok etkileyen penisilin grubu ilaç karbenisilindir. Etki mekanizmaları tam olarak bilinmese de trombosit yüzeyindeki glikoproteinlerle etkileşim sonucu agregasyon yapan ajanlara karşı cavapta azalmaya neden oldukları düşünülmektedir.

Alkole uzun süre maruziyet trombositopeniye, PF3 salınımında bozulma ve sekonder agregasyonda azalmaya yol açar (43). Olası bir mekanizma etanol tarafından prostaglandin sentezinin bozulmasıdır. Alkol kesimi sonrasında trombosit sayısı, kanama zamanı ,tromboksan A₂ salınımı normale gelmektedir (43).

Dipiridamol trombositlerin cAMP konsantrasyonunu arttırarak trombosit fonksiyonlarını inhibe etmektedir. Fazla miktarda intravenöz dextran ve benzeri plazma genişleticilerin verilmesi trombosit fonksiyonlarını azaltmaktadır. Bunu ya trombosit membranı ile etkileşerek veya trombositlerin yüzeyinin plazma genişleticiler tarafından kaplanması sonucunda yapmaktadırlar.

Diyet

Omega-3 yağ asitlerini içeren balıkların bol miktarda yenmesi yağ asitlerinin araşidonik asitin yerine geçerek prostaglandin sentezini bozması sonucunda trombosit fonksiyonlarını azaltmaktadır (42). Soğan, sarmısak gibi bitkiler de trombosit agregasyonunu inhibe edebilirler. Fazla miktarda E vitamini alımı peroksidasyon yoluyla trombosit lipidlerini etkileyip, prostaglandin sentezini bozmaktadır.

Diğer hastalıklar

Myeloproliferatif Hastalıklar

Malign myeloproliferatif hastalıklar sıklıkla büyük, hipogranüler trombositler ile birlikte olup, trombosit fonksiyonlarından biri veya hepsinde bozukluk görülebilir. Epinefrin ile sekonder agregasyon dalgasında azalma en sık gözlenen agregasyon bozukluğu olup, GPIIb-IX reseptöründe azalma da bildirilmiştir.

Üremi

Kan üre azotundaki yükselme diyaliz ile düzelebilen trombosit fonksiyon bozukluğuna neden olabilir. Üremide trombosit adezyon, agregasyon ve sekresyon fonksiyonları bozulmuştur. Bu bozulmanın nedeni guanidosüksinik asit, fenolik asit gibi üremik toksinlerin trombosit agregasyonunu inhibe etmesidir. Bazı üremik hastalarda uygun trombosit adezyonu için gerekli olan yüksek molekül ağırlıklı vWF içeren FVIII/vWF komplekslerinde bozukluk mevcuttur.

Dissemine Intravasküler Koagülasyon

Tüketime bağlı olarak trombositopeniyle birlikte erken aktive olan trombositler granüllerini salarak edinsel depo havuz hastalığına neden olurlar. Ek olarak, fibrin-(ojen) yıkım ürünleri trombositlerin membranı ile etkileşerek, adezyon ve agregasyon fonksiyonlarında bozukluğa neden olabilirler.

Immünglobulin Üretimi

Trombositlere antikor bağlanması trombosit yıkımını arttırdığı gibi, fonksiyonlarını da bozarlar. Sistemik lupus eritematozis ve immün trombositopenik purpura gibi artmış immünglobulin düzeylerine sahip hastalıklarda kollajen, ADP, epinefrin kullanıldığında trombosit agregasyonunda azalma olduğu görülmüştür. Bazı antikorlar megakaryositopoez sırasında trombosit granüllerine madde alımını etkileyerek trombosit fonksiyonunu bozmaktadırlar (44).

Von Willebrand Hastalığı

Eric von Willebrand 1926 yılında kanama zamanında uzama ile kendini gösteren ve otozomal dominant olarak geçen bu hastalığı ilk olarak tanımlamıştır (45). Hastaların burun kanamaları, menorajiler, diş çekimi sonrası kanamalar ve kolay morarma şikayetleri mevcuttur. Hem otozomal dominant hem de otozomal resesif geçişli olduğu bilinen vWH'nda 1971 yılında Zimmerman ve arkadaşları tarafından gösterilen faktör VIII/vWF kompleksinde vWF kısmının azaldığı ya da olmadığı gösterilmiştir (46). Aynı yıl, vWH plazmasındaki trombositlerin normal plazmadaki trombositlerin tersine ristosetin adı verilen antibiyotik varlığında agregate olmadıkları gösterilmiştir (47). Ristosetin etkisi, plazmadaki vWF eksikliğine ikincil olarak gelişmektedir (48). Faktör VIII kompleksindeki yapısal bozukluk plazmada çeşitli vWF multimerlerinin üretimiyle sonuçlanmaktadır. Azalmış olmasına rağmen, faktör VIII:C komponenti her zaman mevcuttur. Bu hastalık, vWF multimerlerinin büyüklük çeşidine, plazmada vWF antijeni ve vWF:ristosetin kofaktör (vWF:RCoF) varlığına göre alt gruplara ayrılırlar (Tablo 2.3) (49). En sık görülen kalıtsal kanama bozukluğu olan vWH'nda bazen hasta operasyon veya travma geçirene kadar yada erişkin yaş dönemine kadar belirti veya bulgu vermeden ulaşabilirler. Edinsel vWH ise genellikle otoimmün veya lenfoproliferatif hastalıklar ile birlikte görülüp, vWF'e karşı gelişen antikorlara bağlı olarak meydana gelmektedir (50-54). Primer hastalığın tedavisi ile edinsel vWH da düzelir. Klinikte, çocukluk yaş döneminde kanama daha ağır seyrederken yaşla birlikte azalır. Hastalığın

otozomal resesif geçişli formunun dışında kas içi kanamalar ve hemartrozlar nadiren görülür.

Tablo 2.3. Yeniden düzenlenmiş von Willebrand hastalığının alt tipleri

Tip	Geçişi	zellikleri
1		vWF kısmi eksikliği
2A		Yüksek molekül ağırlıklı multimerlerde kayıp, trombosit bağımlı fonksiyonda azalma
2B		Trombosit glikoprotein 1b'ye artmış duyarlılığa bağlı yüksek molekül ağırlıklı multimerlerin kaybı
2M		Yüksek molekül ağırlıklı multimerlerin kaybı ile birlikte olmayan trombosit bağımlı fonksiyonda azalma
2N		Faktör VIII duyarlılığında azalma
3		ağır vWF eksikliği

Tip 1 hastalığın en sık görülen formudur. Karaciğer hastalıklarında veya gebelikte vWF düzeyleri arttığı için tip 1 vWH maskelenebilir. Bu şartlar altında tip 1 hastalığı düzeltme ihtimali varken, tip 2'de yoktur (55). Laboratuvar bulgularında kanama zamanı uzamıştır. Plazma faktör VIII:C düzeylerine bağlı olarak aPTT uzayabilir. Ristosetinle trombosit aglütinasyon ve agregasyonu bozuktur (vWF:RCoF) ve vWF:Ag düzeyleri azalmıştır.

Tedavide amaç plazmadaki faktör VIII:C düzeylerini arttırmak ve fonksiyonel olan büyük vWF multimerlerinin dolaşıma verilerek kanama zamanını normale getirmektir. Tedavide intravenöz olarak verilen ve sentetik antidiüretik hormon analogu olan 1-desamino-8-d-arjinin-vazopressin (DDAVP), endojen depolardan vWF salınımını uyararak, vWF:RCoF aktivitesinin takibi ile tedavide kullanılabilir (56,57). Ayrıca vWF

içeren kriyopresipitat veya faktör VIII konsantreleri gibi yeterli miktarda büyük vWF multimerleri içeren insan kaynaklı ürünler de tedavide kullanılabilir (58).

2.4. Trombosit Fonksiyonlarının Değerlendirilmesinde Kullanılan Testler

Trombosit sayımı normal olup, kolay morarma, burun kanamaları, dişeti kanamaları, cerrahi veya travma sonrası kanama öyküsü olan kişilerde trombosit fonksiyon bozukluğu olma ihtimali yüksektir. Bu hastalarda trombosit fonksiyon bozukluğu ve vWH'nin varlığını saptamaya yönelik olarak yapılan testlerin ilki, kanama zamanıdır (Tablo 2.4).

a- Template Kanama Zamanı

Günümüzde kanama zamanı tayininde Mielke'nin modifiye edilmiş Ivy yöntemi kullanılmaktadır. Bu metoda kullanılan aletin ismine dayanılarak template yöntemi de denmektedir. Sfigomanometre kullanılarak manşon üst kola takılır ve 40 mmHg basıncına kadar şişirilir. Daha sonra ön kol volar yüzüne template (örn: Simate R, Organon teknika GmbH, Germany) ile damar üzerine denk gelmeyecek şekilde kesi yapılarak, kanamanın ne kadar sürede durduğu kaydedilerek kanama zamanı ölçülmüş olur. Standart kesi yapan aletlerin kullanılmasına rağmen, birçok faktör sonuçların yanlış çıkmasına yol açmaktadır:

- Testi yapan kişinin deneyimi ve farklı kişilerin yapması sonuçları önemli ölçüde etkilemektedir. Uyumlu duplike sonucu verebilmek için ortalama olarak 60 ölçüm yapılması gerektiği gösterilmiştir (59).
- Venöz basınç ta önemlidir. Basıncın 40 mmHg düzeyinde sabit bir şekilde tutulması test sonuçlarını etkileyebileceği için gereklidir.
- Cilt sıcaklığının 16C⁰'nin altında veya 43.5C⁰'nin üstünde olması da testi uzatmaktadır.
- Kesi yapılırken fazla bastırılması sonucunda kesi derinliğinin artması veya ön kol çukuruna horizontal kesi yapılması gibi durumlarda kanama zamanı daha uzun çıkmaktadır.

Tablo 2.4. Trombosit fonksiyon bozukluklarının laboratuvar tanısı

	Aspirin alımı	Depo Havuz Hastalığı	Bernard-Soulier Sendromu	Glanzmann Trombastenisi	Von Willebrand Hastalığı	Afibrinojenemi*
Kanama Zamanı	Uzamış	Uzamış	Uzamış	Uzamış	Uzamış	Uzamış
Trombosit sayısı	Normal	Normal	Normal/ ↓	Normal	Normal/ ↓**	Normal
APTT	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal/↑	↑
Fibrinojen	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	↓
ADP cevabı	Bozuk	Bozuk	Normal	Bozuk	Normal	Bozuk
Ristosetin cevabı	Normal	Normal	Bozuk	Normal	Bozuk	Normal

↓: Azalmış, ↑: Artmış

*: Afibrinojenemi bir trombosit fonksiyon bozukluğu olmamakla birlikte onu taklit edebilir.

** : vWH'nda trombosit sayısı bazen düşük olabilir.

- Testin yapılabilmesi için hastanın bulunması gereklidir.
- Testin yeniden yapılması zor ve kısıtlıdır.

Template kanama zamanı vWH gibi herediter trombosit fonksiyon bozukluklarında sıklıkla normal bulunabilmektedir. Böbrek biyopsisi yapılan üremik hastalarda kanama zamanı ile subkapsüler kanama komplikasyonu arasında herhangi bir korelasyon saptanamamıştır (60). Bu nedenle template kanama zamanının preoperatif tarama testi olarak kullanılmaması gerektiği ileri sürülmektedir.

b- İn vitro Kanama Zamanı Ölçümü

Son yıllarda *in vitro* koşullarda primer hemostazın gerçekleştiği koşulları taklit eden PFA-100® (Dade Behring, Liederbach, Germany) adlı cihaz üretilmiştir (61). PFA-100® cihazı kollajen-Epinefrin (CEPI) ve kollajen-ADP (CADP) ile kaplı membran deliklerinin yüksek akışkanlık gerilimi (=shear stress) ortamında agregre olan trombositler tarafından oklüzyonu temeline dayalı olarak çalışmaktadır. Test kartuşları hasar görmüş damar duvarını

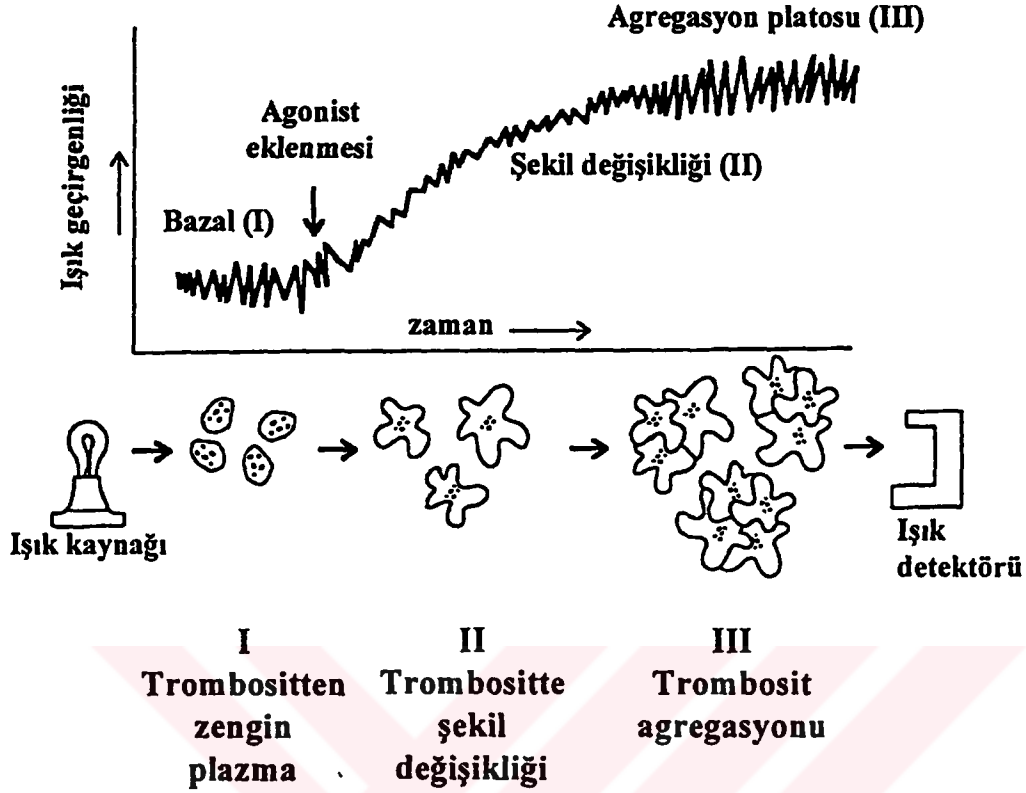
taklit edecek şekilde sitratlı kan örneğinin konduğu rezervuar ile ortasında delik bulunan biyolojik aktif membrandan oluşmaktadır. Membran trombosit agonistleri olan kollajen, ADP ve epinefrin ile kaplıdır. Membranın hemen üzerinde bulunan odacıkta ortadaki delikten geçen kan toplanır. Cihaz kanı rezervuardan deliğe doğru normal kapiller sistemdeki gibi 40 mbar'lık bir basınçla aspire eder. Trombositler deliğin etrafındaki kollajen ile kaplı membran ile temas ettikleri zaman aktive olarak adezyon fonksiyonunu gerçekleştirirler. Daha sonra agrege olmaya başlarlar. Sonunda agrege olan trombositler membran içindeki kan dolaşımını tıkamakta ve bu tıkanmanın ortaya çıkış zamanı *in vitro* kanama zamanı olarak kayıt edilmektedir.

c- Trombosit Agregasyon ve Sekresyon Testleri

Trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesinde en yaygın olarak kullanılan en eski testlerden biridir. Kullanıma girmesi ile birlikte *in vitro* cam bilye retansiyon testii *in vivo* trombosit adezivite testi ve pıhtı retraksiyon testinin önemleri azalmıştır. Trombosit agregasyonu dört değişik metolla ölçülebilmektedir:

Turbidometrik (=Optik) Agregometri

Hastadan alınan kan örneği sitratlı bir tüpe konarak santrüfuj edilerek trombositten zengin (PRP) ve trombositten fakir plazmalar (PPP) (kontrol için) elde edilir. Her iki plazma örneği 37C⁰ 'de küvete konur. Daha sonra ADP, kollajen, epinefrin, ristosetin gibi trombosit agonistleri bir manyetik düzenek yardımıyla karıştırılan sitratla antikoagüle edilmiş trombositten zengin plazma örneğine eklenince trombositlerde şekil değişikliğini ve takiben agregasyonu indüklerler. Başlangıçta bulanık bir süspansiyon olan PRP içinde agregatlar oluşmaya başladığında saydamlaşarak ışığı geçirmeye başlar. Agregometre de trombosit süspansiyonundaki bu ışık geçirgenliğindeki değişimi kaydeder (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Trombosit agregasyon testinin temelleri (9)

Trombosit Agregatlarının Sayım Yöntemi

Küçük trombosit agregatlarının oluşumu impedans veya turbidometrik yöntemler ile ölçülemez. Dolayısıyla agonist eklenmesini takiben erken dönemde meydana gelen değişiklikler kaydedilemez. Bu yöntemde agonist ile uyarılma sonrasında tek başına duran trombositlerin sayısındaki azalma ölçülür. Trombosit karışımına agonist eklendikten hemen sonra ortama glutaraldehit veya paraformaldehit ilave edilerek agregasyon durdurularak agregatlar fiks edilir. Agregat sayısı, kalan trombosit sayısı ve hacmi bir elektronik partikül sayıcı yada akım sitometri cihazı yardımıyla ölçülür. Agonist eklenmesinden 10 saniye sonra konvansiyonel agregometride bu kadar kısa sürede saptanamayan trombositlerin %90'nının yaklaşık yüzer hücrelik agregatlar oluşturdukları gösterilmiştir. Bu yöntem pratikte pek kullanılmamaktadır.

İmpedans Agregometri

Bu yöntemde PRP yerine antikoagüle edilmiş tam kan kullanılmaktadır. Işık geçirgenliği yerine elektriksel direnç değişimi ölçülmektedir. Uyarılan trombositler agregate olup elektrotlara yapışarak direnci arttırmaktadırlar.

Fibrinojen Bağlanması Tetkik Edilmesi

Radioimmunoassay yöntemlerle ¹²⁵I işaretli fibrinojen kullanılarak trombosit agregasyonunun temel reaksiyonu olan aktif GPIIb/IIIa reseptörü ile fibrinojenin bağlanması ölçülmektedir.

Trombosit agregasyonu sırasında gerçekleşen yoğun granül, alfa granül ve eikozanoid sekresyonları da ölçülebilmekte [lumiagregometrik ve *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)] ve böylece trombosit agregasyonu, aktivite düzeyleri ve fonksiyonel kapasiteleri hakkında fikir edinilebilmektedir. Bu yöntemlerin dışında monoklonal antikor bağlanması, poliakramid jel elektroforezi, immünüelektroforez ve en son akım sitometri metodlarıyla trombosit membranında yer alan glikoproteinler ölçülebilmektedir. Kalıtsal trombosit fonksiyon bozuklukları moleküler genetik yöntemlerle de araştırılabilmektedir.

BİREYLER VE YÖNTEM

3.1. Hastalar

Çalışmaya Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Erişkin Hematoloji ünitesine kanama diyatezi öyküsüyle başvuran hastalarla, Hematoloji bölümü koagülasyon yönünden bir referans merkezi olarak çalıştığı için dış merkezlerden trombosit fonksiyon testleri çalışılmak üzere gönderilen toplam 185 hasta alındı. Hastaların 123'ü kadın (%66.4), 62'si erkekti (%33.5). Çalışılan kan örneklerinin 44'ü çocuk hastaya, 89'u erişkin hastaya aitken, 52 kan örneğinin hasta yakınları tarafından getirildiği için hangi gruba ait olduğu bulunamadı.

Hematoloji bölümüne kolay morarma, cilt ve mukoza kanamaları nedeniyle başvuran ve ciddi mukokutanöz kanama öyküsü bulunan hastalara sırasıyla aşağıda sıralanan laboratuvar testleri uygulanarak trombosit fonksiyon bozukluğu veya vWH şüphesi olan hastalar belirlendi:

1. Tam kan sayımları (Hemoglobin, beyaz küre, trombosit)
2. Karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri (kan üre azotu, kreatinin, ürik asit, kalsiyum, fosfor, bilirubin, AST, ALT, alkalin fosfataz, gama glutaril transferaz, albumin, total protein)
3. Template kanama zamanı
4. Protrombin zamanı, aktive parsiyel tromboplastin zamanı, trombin zamanı, fibrinojen düzeyi
5. Faktör VIII, IX, XI düzeyleri
6. *In vitro* kanama zamanı (PFA)
7. Trombosit agregasyon testleri
8. vWF:Ag ve RCoF aktivitesi

Hacettepe Tıp Fakültesi Hematoloji Bölümüne kanama diyatezi nedeniyle başvuran hastalarda ciddi mukokutanöz kanama öyküsü pozitifliği için:

- a- Aşağıda belirtilen semptomlardan iki veya daha fazlasının bulunması veya;
- b- kan transfüzyonu yapılmasını gerektiren bir veya daha fazla semptomun varlığı veya;

c- Üç veya daha fazla tekrar eden semptom olması gerekmektedir:

- Travma öyküsü olmadan başlayan, kısa süreli kompresyon ile (10 dakikadan az) durmayan, iki veya daha fazla burun kanaması epizodu olması (kan transfüzyonu gerektirmişse 1 atak yeterli)
- Minimal travma yada travmasız cilt kanaması cilt kanaması ya da ekimoz (ilk başvuru bulgusu olarak yada tıbbi tedavi gerektirecek şekilde)
- Basit yaralanmayı takiben 15 dakika veya daha uzun süren ya da bir hafta içinde kendiliğinden tekrar eden kanama
- Tıbbi bakım gerektiren oral kavite kanamaları (gingival kanama, diş çıkma yerinden kanama, dil veya dudak ısırık yerlerinden kanama)
- Tıbbi bakım gerektiren veya (akut yada kronik) anemi ile sonuçlanan spontan gastrointestinal kanama (ülserasyon veya portal hipertansiyon ile ilgili olmayacak) Oral cerrahiye takiben ağır, uzun ya da tekrar eden ve tıbbi bakım gerektiren kanama
- Akut veya kronik anemiyle sonuçlanan veya tıbbi tedavi gerektiren menoraji (organik lezyon olmayacak)
- Tıbbi bakım gerektiren diğer cilt-mukoza kanamaları (örn: göz, kulak, solunum yolu, uterus dışı genito-üriner)

3.2. Kan Alma, Trombosit Agregasyon Testleri

Hacettepe Tıp Fakültesi Erişkin Hematoloji Bölümüne kanama diyatezi nedeniyle başvuran hastalara son iki hafta içinde trombosit fonksiyonlarını etkilemesi muhtemel ilaç almamaları söylendi. Dış merkezlere de kan örneği yollanmadan önce ilaç kullanımının sorgulanması konusunda bilgi verildi. Bütün deneyler için kan örnekleri sabah saat 8⁰⁰-10⁰⁰ arasında , aç karnına Vacutainer® kullanılarak %3.8 trisodyum sitrat (1:9 dilüsyon) içeren 5 mL'lik vakumlu silikonize cam tüplere alındı. Kan alınmasını takiben 2 saat içinde kan örnekleri çalışıldı. Önce 700 g devirde 7 dakika santrfüj edilerek PRP ve sonrasında 5000 g devirde 7 dakika santrfüj yapılarak PPP örnekleri elde edildi. Chrono-Log 500 VS marka (Chrono-Log Corp., Havertown, PA, USA) agregometre cihazı kullanılarak hazırlanan PRP'lara sırasıyla kollajen (2

micg/mL, tip I at tendonu kollajeni, Chrono-Par Collagen, Chrono-Log Corp.), ADP (2 micM, liyofilize ADP, Chrono-Par ADP, Chrono-Log Corp.), epinefrin (10 micM, liyofilize l-Epinefrin tartarat, Chrono-Par Epinefrin, Chrono-Log Corp.) ve ristosetin (dondurulmuş kuru ristosetin, Chrono-Par Ristosetin, Chrono-Log Corp., sırasıyla 5 ve sonrasında üzerine 0.25 micg/mL) konarak oluşan agregasyon eğrileri kaydedildi.

3.3. vWF:Ag ve vWF:RCoF Aktivitesinin Çalışılması

In vitro kanama zamanı uzun ve vWH'ı için klinik şüphesi olan hastalarda tanı koyabilmek için daha ileri testlerin yapılması gereklidir. Agregasyon testi sırasında yapılan *ristosetin-induced platelet agregasyonu* (RIPA) trombosit agregasyonu için gerekli minimum ristosetin konsantrasyonunu göstermek için kullanılan kalitatif bir testtir. vWF:RCoF aktivitesi ise plazma vWF'ünün fonksiyonunu değerlendirmektedir. Hasta plazmaları -20 C⁰ de depolanıp, aynı anda çalışıldı. İlk olarak standart aktivite eğrisi vWF'ün referans örneğine karşı kalibre edilmiş normal *pool* plazma veya referans plazma dilüsyonları hazırlanarak çizildi. Bu plazma dilüsyonları aynı ristosetin konsantrasyonları (genellikle 1 mg/ml) içeren yıkanmış veya filtre edilmiş normal trombosit süspansiyonlarına eklendi. Sonuçta agregometre cihazında oluşan trombosit agregasyonunun derecesi kaydedildi. Trombositler metabolik olarak aktif olmadıklarında *fixed* veya liyofilize trombositler de kullanılabilir. Test hasta ve kontrol plazmaları ile de tekrar edilip, vWF:RCoF aktivite yüzdesi standart plazmalardan hazırlanan eğri kullanılarak belirlendi. vWF:Ag (STA[®] -Liatest[®] vWF, immuno-turbidimetric assay, Diagnostica Stago) de şüphe edilen hastaların hepsinde çalışıldı.

3.4. Template Kanama Zamanı

Hastaların bir kısmında modifiye Ivy yöntemiyle ön kol volar yüzüne template (örn: Simplate, Organon Tecnica GmbH, Germany) kullanılarak kanama zamanları bakıldı. Sfingomanometre kullanılarak manşon üst kola takılır ve 40 mmHg basınca kadar şişirilerek test sonuna kadar aynı basınçta kalması

sağlanır. *Template* ile damar üzerine denk gelmeyecek şekilde kesi yapılarak kanamanın ne kadar sürede durduğu kaydedilir.

3.5. PFA-100® Cihazı ile İn Vitro Kanama Zamanı

Çalışmaya alınan tüm hastalarda kan alımını takiben 2 saat içinde trombosit agregasyon testleri ile birlikte PFA-100® ile *in vitro* kanama zamanları da ölçüldü. Sitratlı tüpten alınan 800µL kan örneği önce CEPI kartuşuna kondu. Cihazın verdiği *in vitro* kanama zamanı sonucu uzamışsa aspirin-benzeri etkiyi ekarte edebilmek için CADP kartuşuna da kan örneği konur. Eğer çıkan değer normal sınırlar içinde yer alıyorsa, aspirin-benzeri etki; uzamışsa vWH veya trombosit fonksiyon bozukluğunun varlığını gösterebilmek için agregasyon testleri ve vWF:Ag, vWF:RCoF aktivitesi çalışıldı. CEPI ve CADP için normalin alt ve üst sınırları sağlıklı hasta değerleri kullanılarak belirlendi.

3.6. vWH Tanısı

vWH'inin tanısını koyarken izlenen yol Şekil 3.1'de özetlenmiştir .

3.7. Kontrol Grubu

1. Kontrol Grubu: Kan bankasına trombosit bağıışı için başvuran ve sözlü onay alınan 122 aferez vericisi (11 kadın, 111 erkek) kontrol grubu olarak kullanıldı. Son 15 gün içinde trombosit fonksiyonlarını bozabilecek ilaç kullanım öyküsü olmayan bu kişilerden sitratlı tüplere vacutainer® kullanılarak alınan kan örneklerinden 4 saat içerisinde *in vitro* kanama zamanları çalışıldı. Daha sonra -20C⁰de depolanan plazmalarından vWF, vWF:RCoF aktiviteleri çalışıldı. O ve O dışı kan gruplarında vWF düzeylerinde farklılık olduğu bilindiği için, kontrol grubunda yer alan olguların hepsinin kan grubu belirlendi.

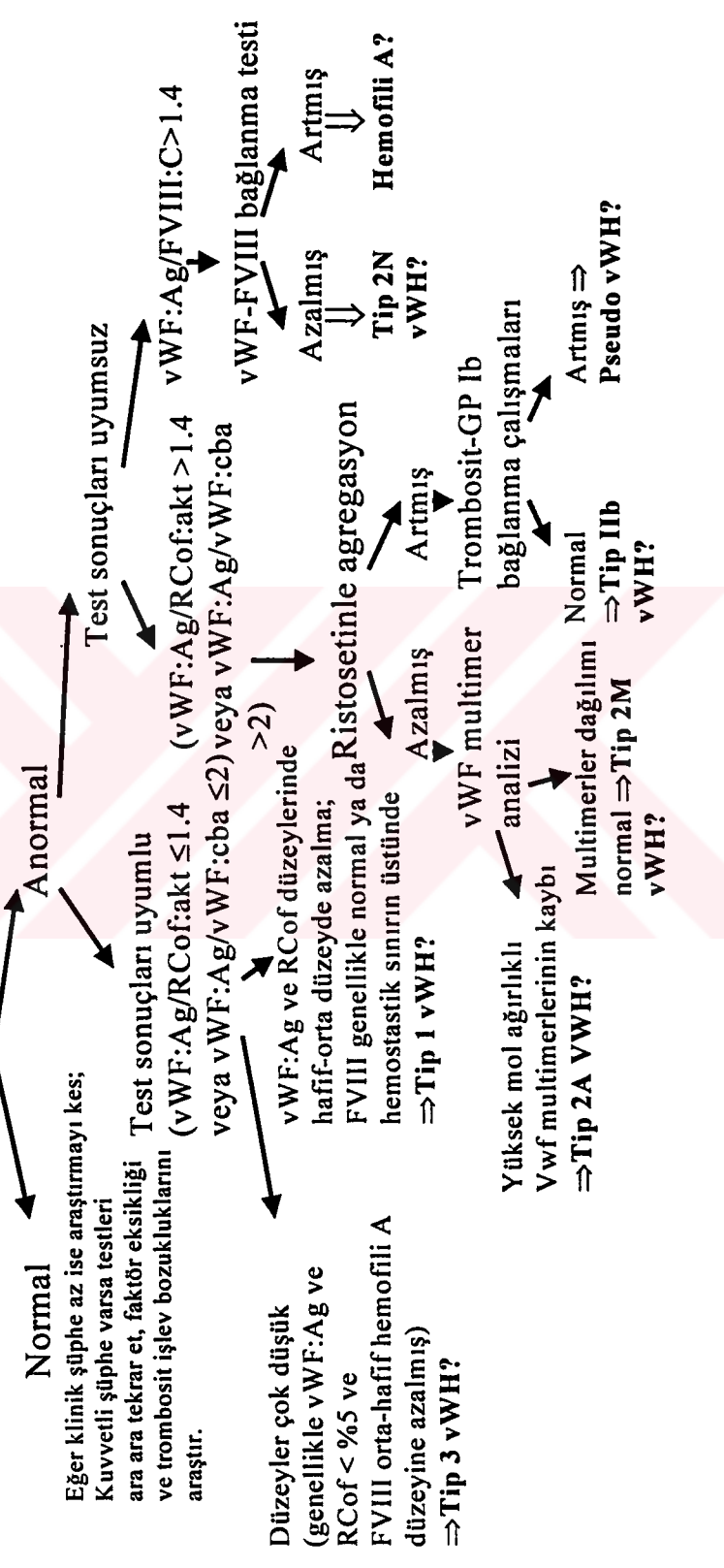
2. Kontrol Grubu: Gönüllü 42 sağlıklı hastane personeline PFA ile *in vitro* kanama zamanı, vWF:Ag ve RCoF çalışıldı.

kişisel öyküsünün de pozitif olması gereklidir. Çoğu kez ailede anormal kanama ya da tanı konmuş hastalık öyküsü vardır. ISTH taslak kriterlerine göre tip 1 vWH tanısı için 1) vWF:Ag ve vWF:Akt düzeylerinin birden fazla ölçümde düşük (ilgili ABO kan grubunun ve popülasyonun 2,5 persentil ya da - 2 SD değerlerinin altında) saptanması; 2) ciddi mukokutanöz kanama varlığı; 3) aile öyküsü pozitifliği (ya da vWH ile uyumlu mutasyon pozitifliği) gereklidir. Son 2 kriterden yalnızca birisi sağlandığında muhtemel vWH denilir. Asemptomatik vWF düşüklüğü olan bir hastada muhtemel vWH tanısı için ailesinde en az 2 kişiye kanıtlanmış VWH olmalıdır.

Klinik Hikaye

(Kanama öyküsü, aile öyküsü, ilaç öyküsü, kan grubu, cinsiyet [bayansa gebelik?, östrojen tedavisi?, aşırı adet kanamaları?])

FVIII:C, vWF:antijen, RCof aktivitesi veya vWF:kollajen bağlanma testi (vWF:cba)(kanama zamanı veya PFA-100 de istenebilir)



Şekil 3.1. vWH tanısına yaklaşım

3. Kontrol Grubu: Trombosit agregasyon testleri için refere edilen ve agregasyon çalışmaları, vWF:Ag ve RCoF aktivite testleri sonucunda herhangi bir bozukluk saptanamayan 73 kişi sağlıklı hasta grubu adıyla bu gruba dahil edildi.

3.8. İstatistiksel Yöntemler

Bütün istatistiksel hesaplamalar Statistical Package for Social Sciences (SPSS) v 7.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illionis, USA) programı ile yapıldı.

Normal vWF:Ag ve vWF:RCoF Aktivitesinin Tanımları

Kan bankası donörlerinin 2.5 ve 97.5 persentil aralıkları normal sınırlar olarak kabul edildi (64,65).

Kan bankası kontrollerinde PFA ile bakılan *in vitro* kanama zamanı değerlerinin vWF, hemoglobin ve trombositlerle korelasyonu ile tüm kontrol hastalarında CEPI, CADP, vWF:Ag ve RCoF arasındaki korelasyon araştırılırken *Pearson* korelasyon testi kullanılırken, PFA sonuçlarının hasta grup ile kontrol grubu arasında ve kan bankası kontrollerinde O ve O dışı kan grupları arasında farklı olup olmadığının test edilmesinde sırasıyla student-t testi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı.

PFA ile bakılan *in-vitro* kanama zamanı testi ile en iyi sensitivite, spesivite, pozitif ve negatif prediktivite değerleri çeşitli sınır değerler denenerek bulunmaya çalışıldı.

BULGULAR

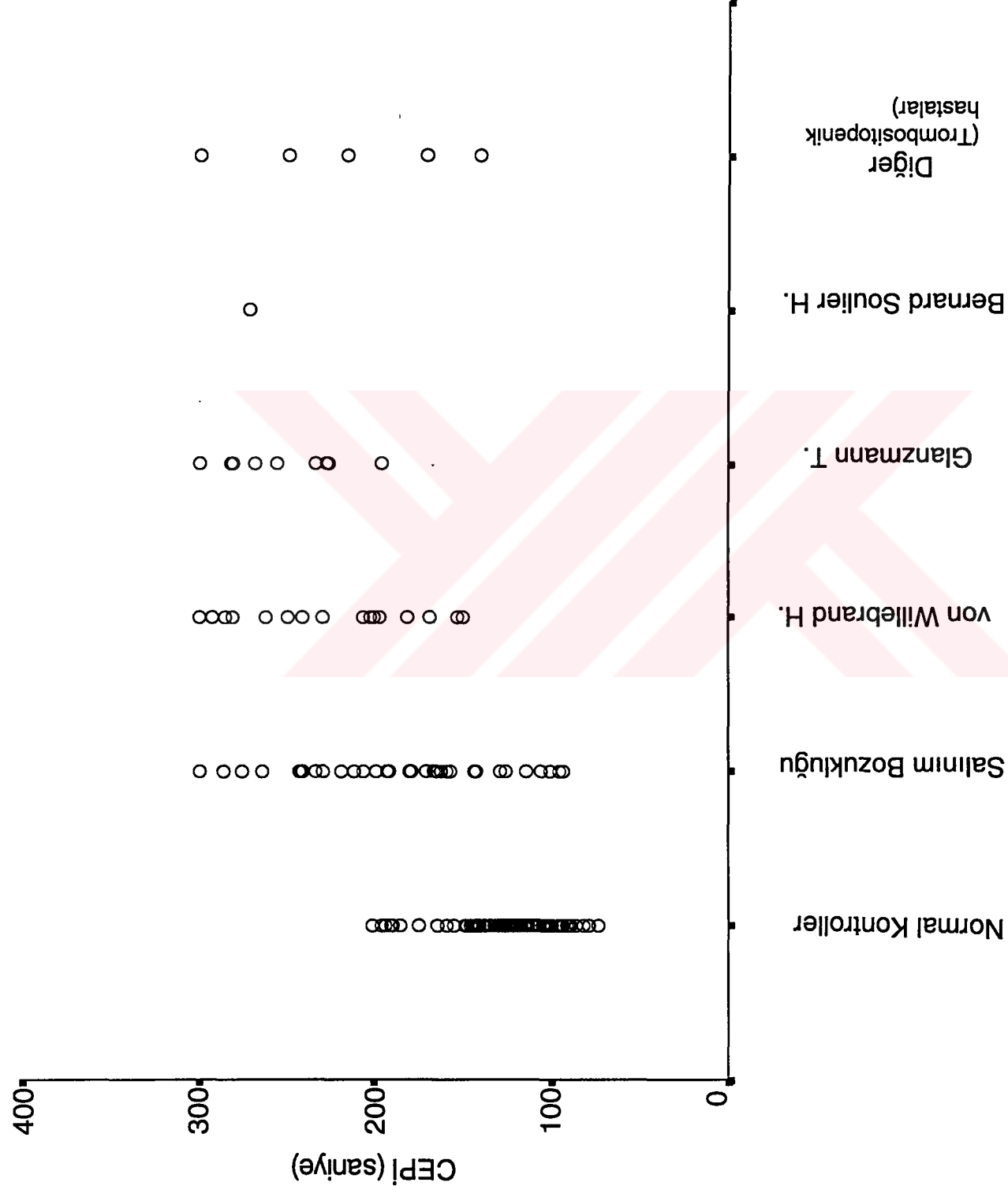
Trombosit fonksiyon testleri (trombosit agregasyon paneli, vWF:Ag ve RCoF aktivitesi) çalışılan 185 kişinin 80'inde (%43.2) trombosit fonksiyon bozukluğu ve vWH'ı bulundu. Hastalıklara göre dağılımı Tablo 4.1'de gösterilmektedir. Salınım bozukluğu olanlarda CEPİ median değeri 181 saniye (94-300), CADP 93 saniye (79-300) olarak bulundu. Glanzmann trombastenili hastalarda, CEPİ ve CADP sınırları >197->300 saniye ve vWH olanlarda ise, CEPİ median değeri 230 saniye (112-300), CADP 209 saniye (98-300) olarak saptandı. Şekil 4.1'de hasta ve kontrol gruplarında CEPİ ve Şekil 4.2'de CADP düzeylerinin dağılımı gösterilmektedir.

Tablo 4.1. Hastaların kanama diyatezi nedenine göre dağılımları

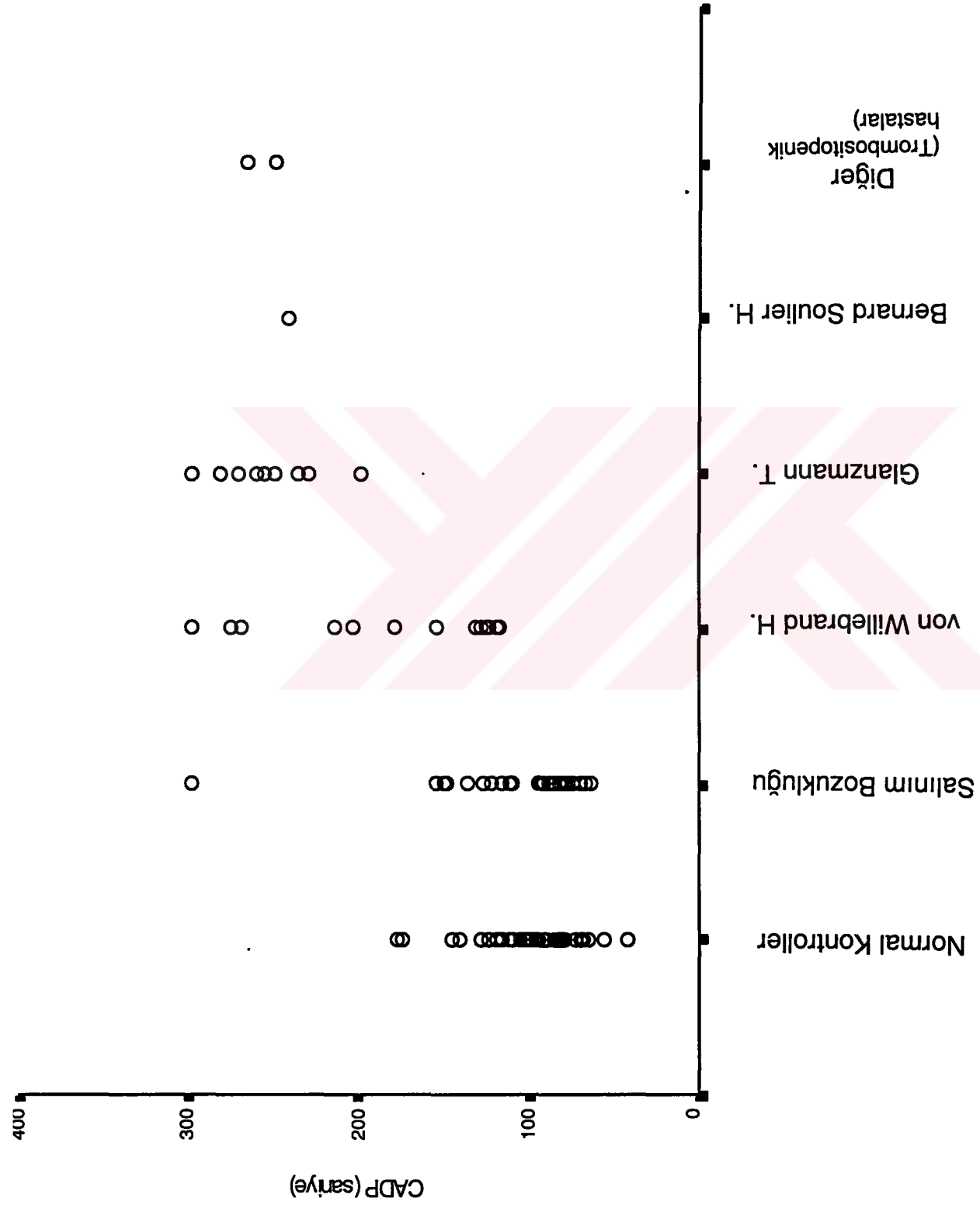
Kanama diyatezi	n
Salınım bozukluğu	43
vWH	21
Glanzmann trombastenisi	11
Bernard-Soulier sendromu	1
Diğer*	4
Toplam	80

* : Trombosit fonksiyon testlerinde bozukluk nedeni olan trombositopeni varlığı.

Trombosit fonksiyon bozukluğu ve vWH tanılarının gözden kaçmasını önlemek için, en uygun duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif kestirim değerleri CEPİ ve CADP için değişik üst sınır değerleri denenerek bulunmaya çalışıldı (Tablo 4.2). Sonuç olarak ≥ 150 saniye CEPİ değeri sınır olarak kabul edildiğinde en uygun duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktivite sonuçlarının elde edildiği görüldü. Aynı anda CADP çalışmanın duyarlılık yönünden ek bir avantaj sağlamadığı, ancak kanama diyatezinin nedenini saptamak yönünden değer taşıdığı belirlendi.



Şekil 4.1. Hasta ve kontrol gruplarında CEPI düzeylerinin dağılımı



Şekil 4.2. Hasta ve kontrol gruplarında CADP düzeylerinin dağılımı

PFA ile bakılan *in vitro* kanama zamanının duyarlılığı %88.4, özgüllüğü %85.5, pozitif kestirim değeri %83.1, negatif kestirim değeri %90.4 olarak belirlendi.

Anemik (hemoglobin değeri 12 g/dl'nin altında olanlar) hastalar hesaplamasının dışında tutulduğunda duyarlılık %79.3, özgüllük %89.2, pozitif ve negatif kestirim değerleri sırasıyla %89.4 ve %83.3 iken, anemik hastalarda sonuçlar sırasıyla %100, %50, %54.5 ve %100 olarak hesaplandı.

Tablo 4.2. CEPI ve CADP için değişik üst sınır değerleri kullanılarak hesaplanan duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif kestirim değerleri

	DUYARLILIK	ÖZGÜLLÜK	POZİTİF KESTİRİM	NEGATİF KESTİRİM
CEPI-150	88.40	85.50	83.10	90.40
CEPI-155	83.80	88.60	85.24	87.50
CEPI-160	77.40	92.40	88.88	83.90
CEPI-165	77.40	92.40	88.88	83.90
CEPI-170	70.96	94.93	91.66	80.64
CEPI-175	69.35	94.93	91.48	79.78
CEPI-180	69.35	96.20	93.47	80.00
CEPI-185	66.12	96.20	93.18	78.35
CADP-95	80.00	60.00	74.50	65.38
CADP100	76.00	80.00	83.72	67.60
CADP105	76.00	76.60	81.81	66.66
CADP110	76.00	66.66	76.59	63.33
CADP115	70.00	86.66	86.84	64.10
CADP120	68.00	90.00	88.88	63.40
CADP125	63.00	93.33	90.90	61.36
CEPI-CADP 150-95	96.36	45.45	74.64	88.23
150-100	96.36	51.51	76.81	89.47

150-105	96.36	54.54	77.94	90.00
150-110	96.36	54.54	77.94	90.00
150-115	96.36	60.60	80.30	90.90
150-120	94.54	63.63	81.25	87.50
150-125	94.54	63.63	81.25	87.50
155-95	92.59	50.00	75.75	80.00
155-100	90.74	56.25	77.77	78.26
155-105	90.74	62.50	80.32	80.00
155-110	90.74	62.50	80.32	80.00
155-115	90.74	68.75	83.05	81.48
155-120	88.88	71.87	84.21	79.31
155-125	88.88	71.87	84.21	79.31
160-95	92.59	50.00	75.75	80.00
160-100	90.74	56.25	77.77	78.26
160-105	90.74	62.50	80.32	80.80
160-110	90.74	62.50	80.32	80.80
160-115	90.74	68.75	83.05	81.48
160-120	88.88	71.87	84.21	79.31
160-125	88.88	71.87	84.21	79.31
165-95	92.45	50.00	75.38	80.00
165-100	90.56	56.25	77.41	78.26
165-105	90.56	62.62	81.35	80.76
165-110	90.56	65.62	81.35	80.76
165-115	90.56	71.87	84.21	82.14
165-120	88.67	75.00	85.45	80.00
165-125	88.67	78.12	87.03	80.64
170-95	92.30	50.00	75.00	80.00
170-100	90.38	56.25	77.04	78.26
170-105	90.38	65.62	81.03	80.76
170-110	90.38	65.62	81.03	80.76

170-115	90.38	71.87	83.92	82.14
170-120	88.46	75.00	85.18	80.00
170-125	88.46	78.12	86.79	80.64
175-95	92.30	50.00	75.00	80.00
175-100	90.38	59.37	78.33	79.16
175-105	90.38	68.75	82.45	81.48
175-110	90.38	68.75	82.45	81.48
175-115	90.38	75.00	85.45	82.75
175-120	88.46	78.12	86.79	80.64
175-125	88.46	81.25	88.46	81.25
180-95	92.30	50.00	75.00	80.00
180-100	90.38	59.37	78.33	79.16
180-105	90.38	68.75	82.45	81.48
180-110	90.38	68.75	82.45	81.48
180-115	90.38	75.00	85.45	82.75
180-120	88.46	78.12	86.79	80.64
180-125	88.46	81.25	88.46	81.25

Kan bankası kontrol grubunda PFA ile *in vitro* kanama zamanı, vWF:Ag, RCoF aktivitesi O ile O-dışı kan gruplarında ayrı ayrı çalışıldı. Tablo 4.3'te kan bankası kontrollerinin kan grupları ve cinsiyetlerine göre dağılımları gösterilmektedir.

Tablo 4.3. Kan bankası kontrollerinin cinsiyet ve kan gruplarına göre dağılımları

Cinsiyet	O -	O +	A -	A +	B -	B +
Kadın		4		6		1
Erkek	4	43	4	43	1	16
Toplam	4	47	4	49	1	17

Kan bankası kontrollerinde CEP \bar{I} =140.36 \pm 28.97 saniye (71-273), CADP=87.93 \pm 14.72 saniye (53-143) olarak bulunurken, tüm kontrol grubu

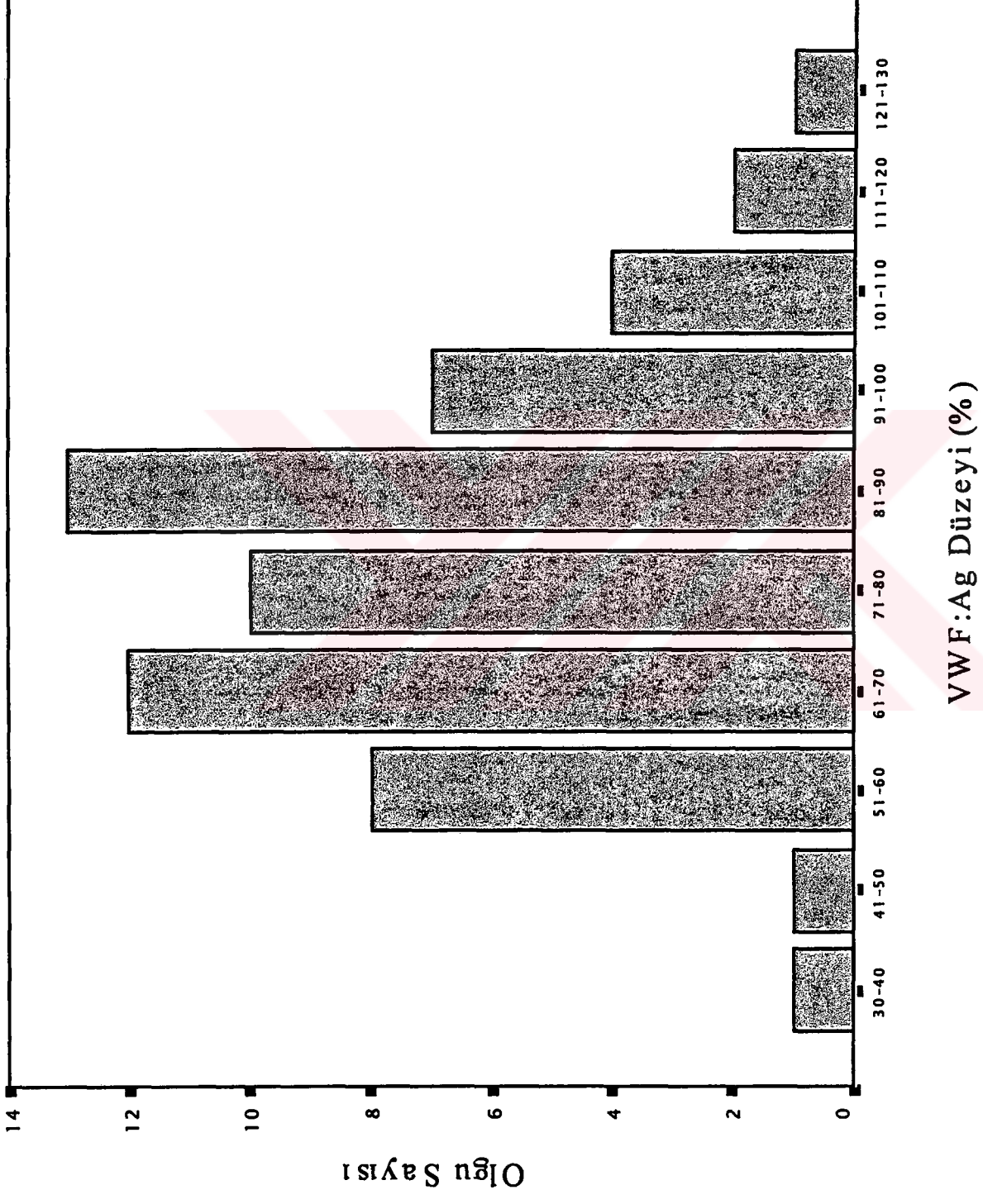
değerlendirildiğinde $CEPI=134.55\pm 28.75$ (71-273) (%2.5-%97.5=87.65-198.75) saniye, $CADP=90.11\pm 19.81$ (44-179) (%2.5-%97.5=57.55-143.60) saniye olarak bulundu. CEPI yönünden O ile O-dışı kan grubu kontrolleri arasında fark yokken ($p=0.16$), CADP O kan grubu olanlarda O-dışı gruba göre daha uzun bulundu ($p=0.01$). O kan grubu kontrollerinde $vWF:Ag$ düzeyi= 78.6 ± 18.81 (31-134) (%2.5-%97.5=37-123) (Şekil 4.3), RCoF aktivitesi 86.20 ± 29.53 (40-169) (%2.5-%97.5=42-168) olarak bulundu (Şekil 4.4). O-dışı kan gruplarında ise, $vWF:Ag$ düzeyi= 106.92 ± 29.14 (57-180) (%2.5-%97.5=51.5-178.5) (Şekil 4.5) iken, RCoF aktivitesi 86.20 ± 29.53 (40-169) (%2.5-%97.5=54-312) olarak bulundu (Şekil 4.6). Bütün kontrol olguları değerlendirildiğinde $vWF:Ag$ düzeyi= 93.87 ± 28.50 (31-180) (%2.5-%97.5= 51-170) iken, RCoF aktivitesi 101.27 ± 36.18 (40-216) (%2.5-%97.5=53-200) olarak bulundu.

Kan bankası kontrollerinde CEPI, CADP, hemoglobin, trombosit düzeyleri arasında korelasyon bakıldığında sadece beklenildiği gibi CEPI ile CADP arasında pozitif yönde orta derecede bir ilişki olduğu görüldü ($p=0.005$, $r=0.26$).

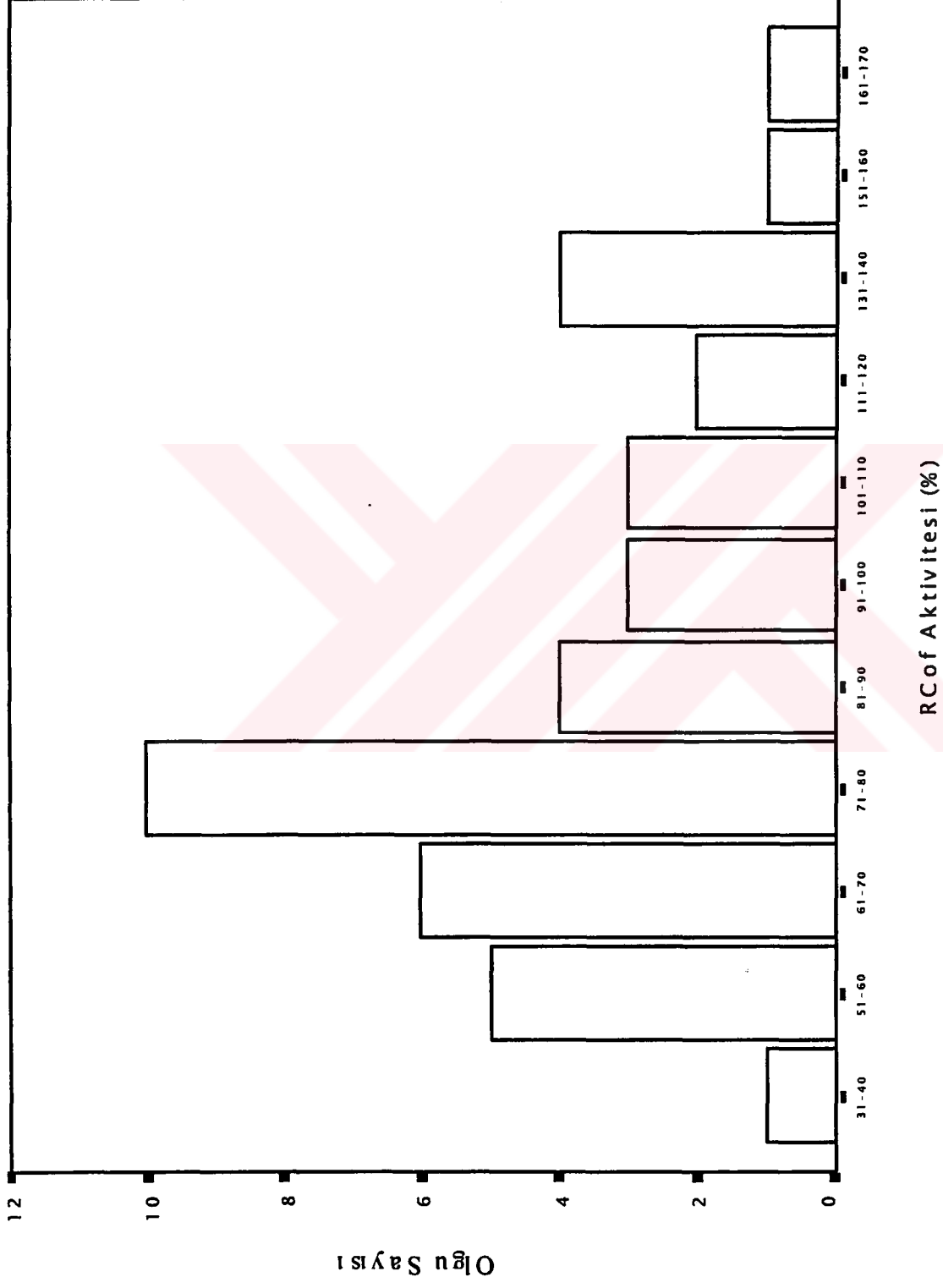
Sağlıklı hasta grubuyla kontrol grubu CEPI ve CADP yönünden karşılaştırıldığında CEPI kontrol grubunda (140.36 ± 28.97) sağlıklı hasta grubuna (124.58 ± 25.89) göre daha uzun bulunurken ($p=0.01$), CADP yönünden gruplar arasında fark bulunmadı ($p=0.21$).

Kontrol ve sağlıklı hastalar arasında CEPI ve CADP'nin cinsiyet yönünden farklı olup olmadığı test edildiğinde, CEPI erkek olgularda (138.88 ± 30.46) kadınlara (129.08 ± 26.17) göre daha uzun olarak bulunurken ($p=0.02$), CADP'de bir fark bulunmadı ($p=0.52$).

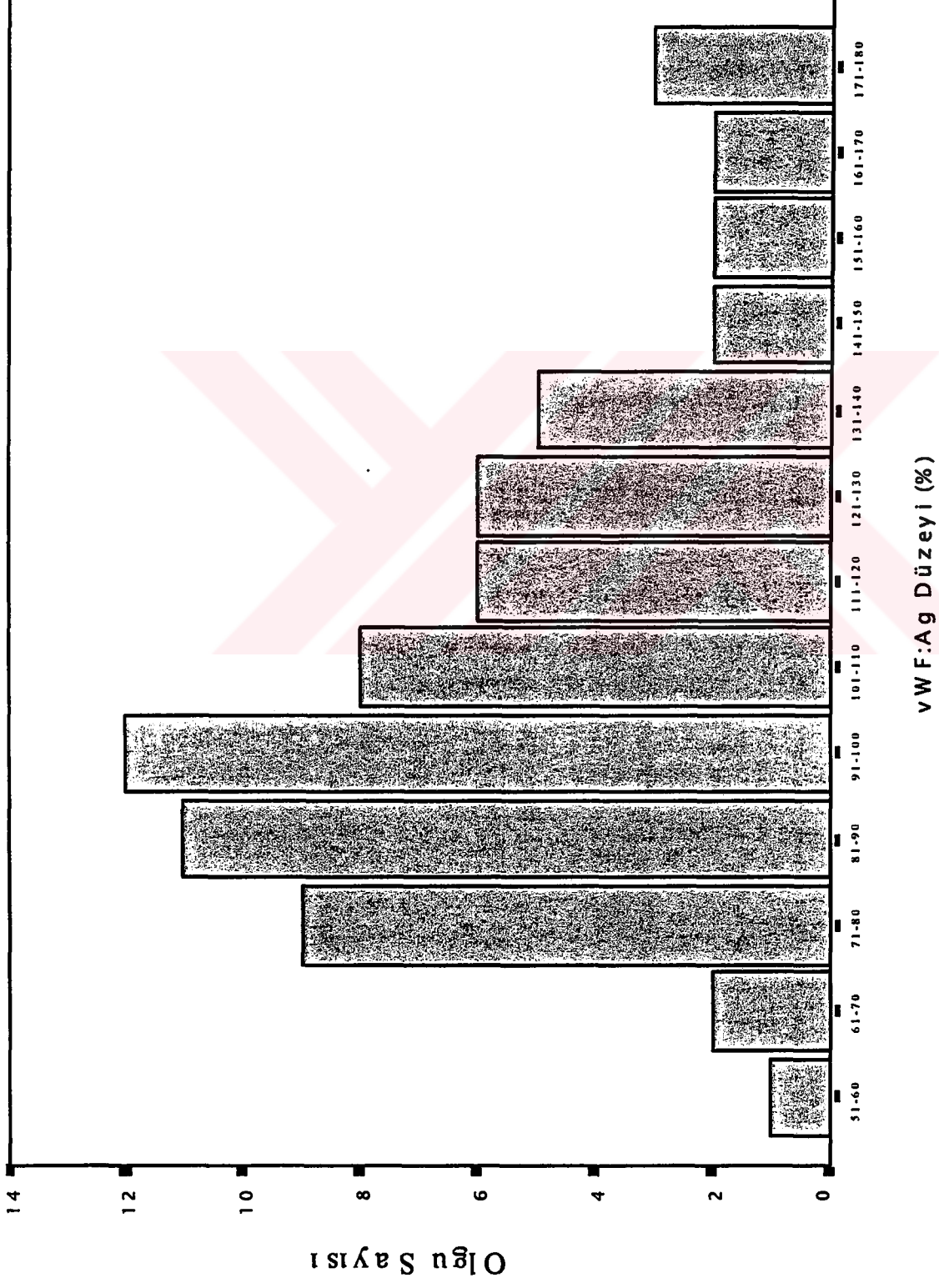
Tüm kontrol hastalarında PFA, $vWF:Ag$ ve RCoF arasında korelasyon varlığı araştırıldığında, CEPI ile CADP arasında pozitif yönde orta derecede bir korelasyon ($p=0.001$, $r=0.42$) CEPI ile $vWF:Ag$ arasında ters yönde çok zayıf bir ilişki ($p=0.04$, $r=-0.15$), CADP ile $vWF:Ag$ arasında ters yönde orta derecede bir ilişki ($p=0.001$, $r=-0.35$), CADP ile RCoF arasında negatif yönde orta derecede bir ilişki ($p=0.001$, $r=-0.33$), $vWF:Ag$ ile RCoF arasında



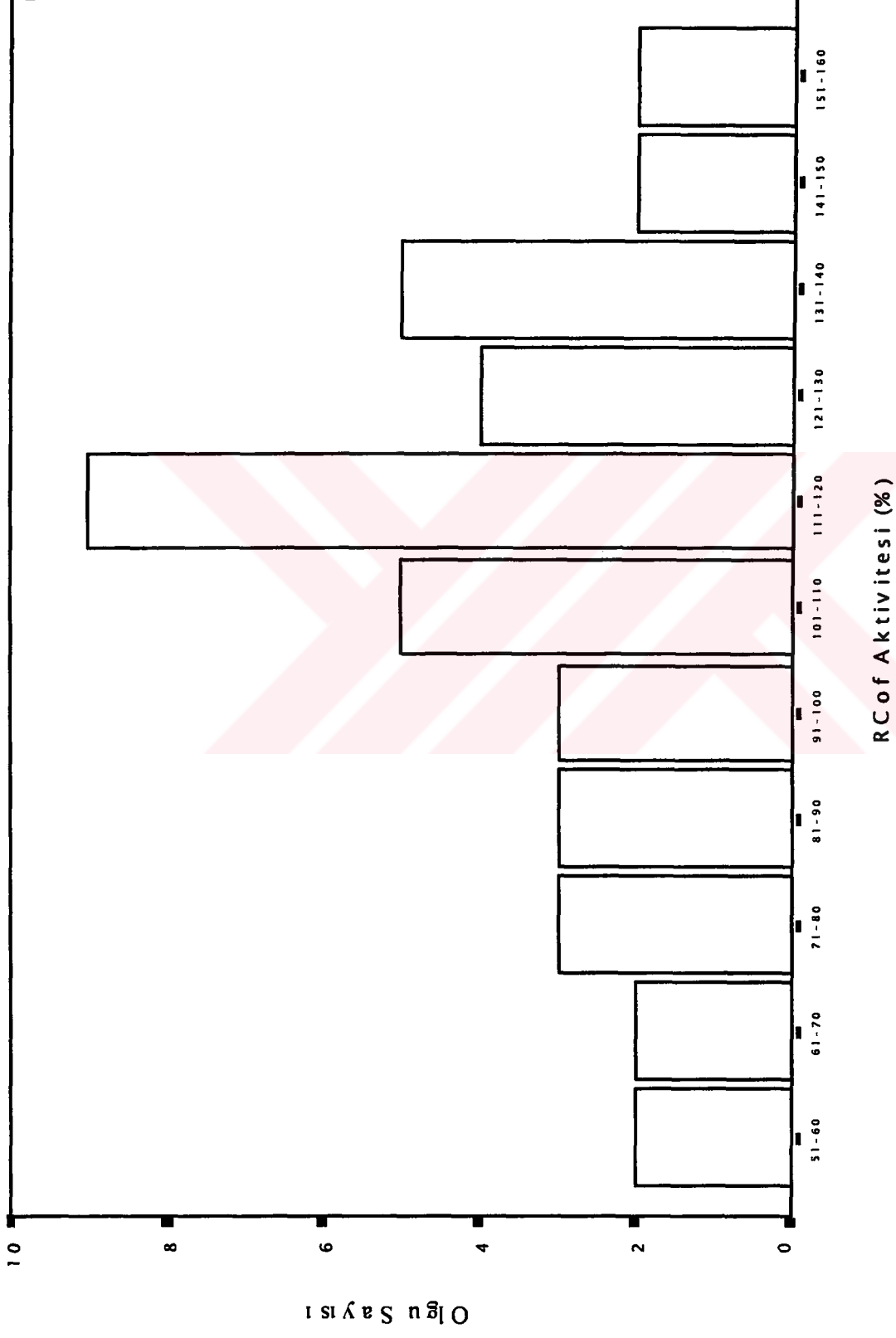
Şekil 4.3. O kan grubu kontrollerinde vWF:Ag düzeylerinin dağılımı



Şekil 4.4. O kan grubu kontrollerinde RCof Aktivite düzeylerinin dağılımı



Şekil 4.5. O-dışı kan grubu kontrollerinde vWF:Ag düzeylerinin dağılımı



Şekil 4.6. O-dışı kan grubu kontrollerinde RCoF aktivite düzeylerinin dağılımı

pozitif yönde orta derecede ($p=0.001$, $r=0.36$) bir korelasyon olduğu gözlemlendi.

Template kanama zamanı 30 hastada bakılabildi. Kanama zamanı sonuçları Trombosit fonksiyon testleri ile karşılaştırıldığında duyarlılığı %50, özgüllüğü %77, pozitif kestirim değeri %60, negatif kestirim değeri ise %70 olarak bulundu.

TARTIŞMA

Kanama zamanı klinik pratikte trombosit fonksiyonlarını değerlendirmek için oldukça sık kullanılan bir testtir. Template kanama zamanının eksik olan yönleri daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (61,62). PFA-100® cihazı template kanama zamanındaki teknik hataları içermemesi yanısıra, daha hızlı, objektif ve invaziv olmayan bir şekilde trombosit fonksiyon bozuklukları ve vWH'nı saptayabilmektedir. Yapılan klinik çalışmalar hafif kanama bozukluklarında (örn: vWH) PFA-100® ile bakılan *in vitro* kanama zamanının template kanama zamanına göre daha duyarlı olduğunu ve trombositopenik hastalarda kanama riskini değerlendirme ve tedaviye yanıtın belirlenmesinde etkili olduğunu göstermiştir (63,64,65,66). PFA-100® cihazında primer hemostazı taklit edecek şekilde sitratla antikoagüle edilmiş kan kollajen-ADP veya kollajen -epinefrin ile kaplı membranın ortasındaki 150 µm'lik delikten sabit bir basınç altında akmakta ve zamanla aktive olan trombositlerin adezyon ve agregasyonu ile bu delik kapanmaktadır. Cihaz bu deliğin kapanma zamanını *in vitro* kanama zamanı olarak kayıt etmektedir (66). Alınan sitratlı kan örneğinin 4 saat içinde çalışılması gerekmektedir (67). Trombositopeni varlığı veya hematokrit düşüklüğü test sonuçlarını etkileyebilmektedir.

CEPl kartuşundaki izole uzama en sık görülen bozukluktur. Bu izole uzamanın en sık nedeni aspirin veya steroid dışı antiinflamatuvar ilaç kullanımına bağlı olarak gelişen trombosit agregasyon bozukluğudur. Bu kişilerin trombosit agregasyon testleri de sekresyon bozukluğu ile uyumlu sonuç vermektedir. CEPl kartuşunda izole uzama ile birlikte trombosit agregasyon testlerinin normal olduğu δ-depo havuz hastalığı olan olgular bildirilmiştir (68). CEPl ile birlikte CADP kartuşundaki uzama genellikle trombosit fonksiyon bozukluğu ve/veya vWH'ı yönünden daha yoğun bir araştırma yapılmasını gerektirmektedir. CADP kartuşunda uzama olan hastalar primer hemostaz bozukluğu riski nedeniyle cerrahi girişim sırasında yüksek kanama riski taşımaktadırlar. Oysa template kanama zamanındaki uzamanın kanama öyküsü olmayan, yakın zamanda steroid dışı

antiinflamatuvar ilaç veya aspirin kullanmamış hastalarda operasyon sırası veya sonrasındaki kanama riskini arttırdığı görülmemiştir (69,70). PFA-100® ile *in vitro* kanama zamanının klinikte yaygın kullanım alanlarından biri de aspirin kullanan hastaların takibine olanak vermeleridir. Aspirin kullandığı bilinen kişilerde CEPI uzun, CADP normal olduğunda bu sonucun direk aspirine bağlı olduğunu söylemek mümkün olduğu halde, template kanama zamanındaki uzama nedeninin aspirin veya diğer nedenlere mi bağlı olduğunun ayrımı yapılamamaktadır. Bir çalışmada aspirin alan 17 hastanın 16'sında PFA sonucu bozuk iken, template kanama zamanları normal bulunmuştur ve bu da PFA'nın aspirin etkisini saptamadaki duyarlılığının template kanama zamanından daha yüksek olduğunu göstermektedir (64). Bir çalışmada vWH'ı olanların %20'sinde (71), diğer bir çalışmada ise %30'unda template kanama zamanları normal olarak bulunmuştur (63). Bu sonuçlarda template kanama zamanının vWH'ı tanısını atlama ihtimalinin yüksek olduğunu göstermektedir. PFA-100® ile bakılan duplike sonuçlar normal kontrollerin sadece %2'sinde %20'den fazla bir sapma gösterirken, hastalarda böyle bir sapma (%0) gözlenmemiştir (63). PFA vWH'ında DDAVP ile yanıtın değerlendirilmesinde de kullanılmaktadır. Bu hastalarda DDAVP verilmesini takiben hem CEPI hemde CADP kartuşunda düzelme olduğu gösterilmiştir (63,72,73,74).

PFA-100® ile *in vitro* kanama zamanı daha önce normal kişilerde, aspirin kullananlarda vWF veya sistemik hastalığı olan kişilerde yoğun bir şekilde araştırılmıştır (63,66,67,68,73,75). Bu çalışmada amacımız kanama diyatezi ile başvuran hastalarda PFA-100® cihazının tarama testi olarak kullanılabilirliğini belirlemek ve bu hastalarda tanısal bir yaklaşım şeması oluşturmaktır. Yapılan çalışmalarda vWH'ı veya Glanzmann trombastenisi, depo havuz hastalığı gibi trombosit fonksiyon bozukluğu olan olgularda PFA-100® ile bakılan *in vitro* kanama zamanı duyarlılığı %88-100 arasında değişen oranlarda bulunmuştur (63,66,68). Bizim çalışmamızda da diğerlerine benzer şekilde duyarlılık %88.4, özgüllüğü %85.5 olarak bulundu.

Özellikle vWH'ının hafif formlarında tanı koyması oldukça zor olmaktadır. Daha önce vWF:Ag düzeylerinin O kan grubu olan sağlıklı kişilerde O-dışı olanlara göre daha düşük olduğu gösterilmiştir (76). Bu sağlıklı kişilerde çok hafif bir kanamaya meyil sorunu olabilmektedir. Bizim kontrol grubumuzda da O kan grubu olanlarda vWF:Ag düzeyi [37-123 (%2.5-%97.5)], O-dışı kan grubu olanlara [51.5-178.5 (%2.5-%97.5)] göre daha düşüktü ($p=0.001$). Ayrıca O kan grubu olan kontrollerde RCoF aktivitesi de [42-168(%2.5-%97.5)] O-dışı kontrol grubundan [54-312(%2.5-%97.5)] daha düşük bulundu ($p=0.001$). Sonuç olarak O ve O-dışı kan grubu olanlarda vWF:Ag ve RCoF aktivite düzeylerinin normal sınırları farklı olduğundan VWH'ı tanısı koyarken kan grubunun bilinmesinin önemi görülmüştür.

Bir çalışmada PFA-100® üzerine kan gruplarının etkisi araştırılmış ve O kan grubu olanlarda daha düşük vWF:Ag düzeyleri ile CEPI değerinde uzama olduğu görülürken, CADP kartuşunda bir fark saptanamamış (77). Kan grubu O olanlarda CEPI ile CADP arasındaki bu farklı sonuçların nedenini de şu şekilde açıklamışlardır: 1- epinefrinin trombosit aktivasyonu için daha zayıf ancak (78), ADP'den daha güçlü bir uyarıcı olarak ortamda bulunan daha düşük düzeydeki vWF'ü etkileyebilmektedir. Trombosit agregasyonunun yeniden düzenlenmiş modeline göre, yüksek akışkanlık gerilimi altında trombositlerin bağlanması için vWF ile trombosit yüzeyindeki GP1b arasında etkileşim olması gerekmektedir (79) ve bu mekanizma epinefrin tarafından güçlü bir şekilde uyarılmaktadır (80). Böylece plazmadaki hafif vWF eksikliklerinde epinefrin-bağımlı trombosit aktivasyonu ve agregasyonu gerçekleşmektedir. Sonuç olarak Patolojik düzeylerdeki vWF eksikliklerinden farklı olarak, plazmadaki hafif vWF azalmalarına CEPI'ye bağlı, fakat CADP'ye bağlı olmayan *in vitro* kanama zamanının duyarlı olduğu görülmüştür (77).

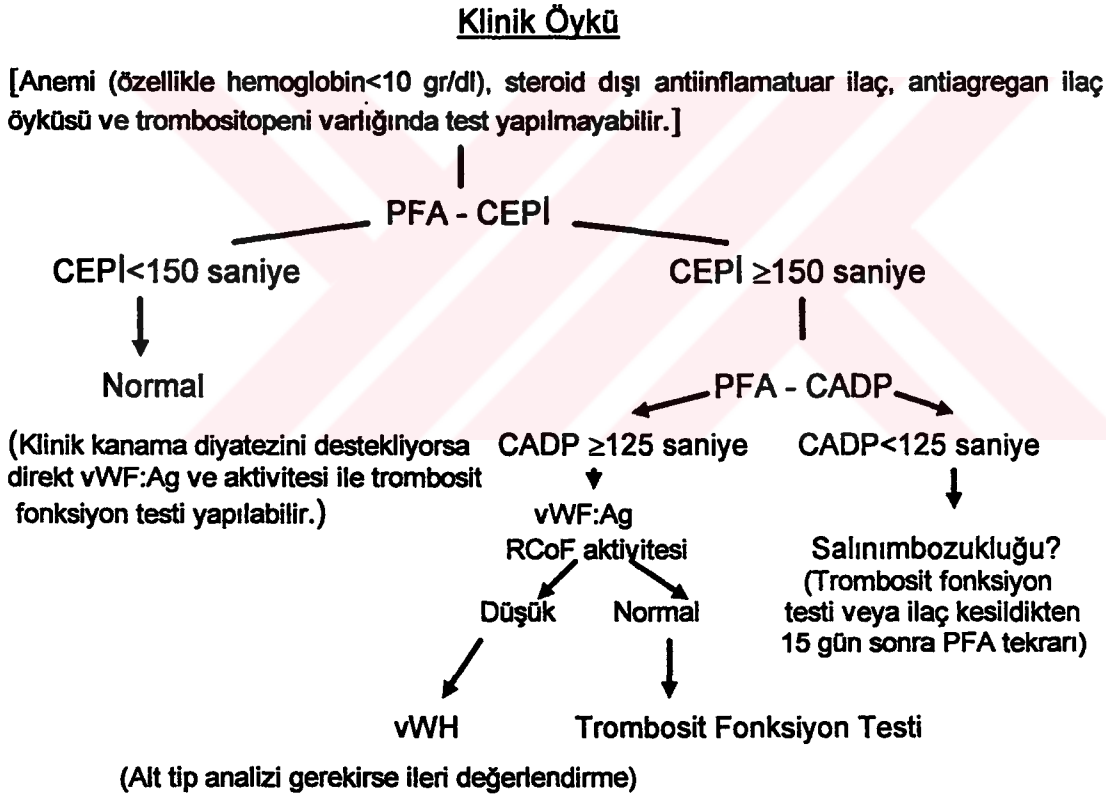
Bu çalışmada kan bankası kontrollerinde CEPI değeri, trombosit agregasyon testleri ile vWF:Ag ve RCoF aktivitesi bakılıp normal çıkmış olan kişilere göre daha uzun bulundu. Bunun nedeninin kan bankasına başvuran

kişilerin ilaç kullanımları sadece sorularak test edildiği için alınan kan örneklerinde uzamış PFA sonuçlarının ilaç kullanımına bağlı olabileceği düşünüldü. Ayrıca bazı kan örneklerinin alındıktan sonra iki saat içinde çalışılmaması da bu sonuca katkıda bulunmuş olabilir. Bu nedenle PFA ile bakılan *in vitro* kanama zamanının normal sınırları belirlenirken sağlıklı hastane personeli, kan bankası ve kanama diyatezi nedeniyle tüm testleri yapıp normal çıkmış olan kişiler birleştirilerek ortaya konan PFA sonuçları; CEPİ=134±29 (71-273) (%5-%95=92-182), CADP= 88±16 (44-143) (%5-%95=66-117) olarak bulundu. Bulduğumuz bu değerler ürün kataloğundaki değerlere (CEPİ=132[94-193], CADP=92[71-118] yakın bulunmuştur.

Kanama zamanı ile plasma RCoF aktivitesi arasında iyi bir korelasyon olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır (78). Bir çalışmada PFA-100® ile bakılan *in vitro* kanama zamanı ile plazma vWF:RCoF aktiviteleri arasında normal kontrollerde ters yönde bir ilişki saptanırken, vWH'ı olanlarda PFA sonuçlarının net bir sayı şeklinde belirtilememesi (değerlerin büyük çoğunluğu >250 saniye şeklinde çıktığı için) nedeniyle korelasyon hesaplanamamıştır (63). Bir diğer çalışmada sağlıklı kan bankası kontrollerinde kan grubu O olanlarda O-dışı kan grubu olanlara göre hem CEPİ hem de CADP değerlerinde uzama olduğu, ancak bu uzamaların normal sınırlar içinde yer aldığı görülmüştür (81). Bizim çalışmamızda ise CADP O kan grubu olanlarda O-dışı kan grubu kontrollerine göre daha uzun bulunurken, CEPİ'de bir fark saptanamamıştır ve kontrol hastalarında özellikle CADP ile vWF:Ag'i ve RCoF aktiviteleri arasında orta derecede negatif bir korelasyon olduğu görüldü. Bu da daha önce bir çalışmada gösterildiği gibi vWH'ı tanısında CADP kartuşunun CEPİ'ye göre daha duyarlı olduğunu desteklemektedir (82).

Sonuç olarak PFA-100® ile *in vitro* kanama zamanı uygulaması kolay, objektif, yüksek duyarlılık, özgüllük ile primer hemostazı değerlendirmeye yarayan bir tarama testi olarak kullanılabilir. Anormal PFA sonuçları daima dikkate alınmalı ve vWH'ı varlığını ekarte etmek için klinik ve aile öyküsü ile birlikte ileri laboratuvar yöntemleri uygulanmalıdır. PFA-100®'nın vWH'ı

varlığında duyarlılığı template kanama zamanına göre oldukça yüksek iken, normal PFA sonuçları tip 1 ve tip 2N vWH'ını ekarte ettirmemektedir (63). Eğer PFA sonucu bozuksa ve aspirin, steroid dışı antiinflamatuvar kullanımı, hematokrit düşüklüğü ve trombositopeni gibi nedenler ekarte edilmişse trombosit fonksiyon bozukluğu ve vWH'ı yönünden ileri araştırmalara gidilmelidir. Eğer PFA-100® sonucunda CADP normal, CEPİ uzunsa aspirin ve benzeri ilaç kullanımı bir neden olabilir. CEPİ kartuşunun kanama diyatezi öyküsü olanlarda trombosit fonksiyon bozukluğu ve/veya vWH'ını saptamak için bir tarama testi olarak öncelikle yapılması ve uzama saptandığı takdirde vWH'ı için daha duyarlı olan ve ayırıcı tanının yapılmasını mümkün kılan CADP çalışılmalıdır. CADP'de de uzama olduğu takdirde vWF:Ag ve RCoF aktivitesi kan grubu dikkate alınarak çalışılmalıdır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. PFA-100® cihazı ile bakılan *in vitro* kanama zamanı ile kanama diyatezine tanısal yaklaşım

SONUÇLAR

Kanama bozukluklarına tanısai yaklaşımda PFA-100®'ün bir tarama testi olarak kullanılabilirliğini araştıran bu çalışmamızda aşağıdaki sonuçlar elde edildi:

1. Kanama diyatezi şüphesiyle başvuran 185 hastanın trombosit agregasyon testleri ve vWF:Ag ile RCoF aktiviteleri bakılarak sonuçların CEPI ve CADP ile korelasyonu belirlendi. Bunun sonucunda CEPI için sınır değeri ≥ 150 saniye olarak kabul edildiğinde en uygun duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif kestirim değerlerinin elde edildiği görüldü. Aynı anda CADP çalışmanın duyarlılık yönünden ek bir avantaj sağlamadığı, kanama diyatezinin nedenini belirlemek yönünden değer taşıdığı görüldü.

2. PFA ile bakılan in-vitro kanama zamanının duyarlılığı %88.4, özgüllüğü %85.5, pozitif kestirim değeri %83.1, negatif kestirim değeri %90.4 olarak belirlendi.

3. Kan bankası sağlıklı kontrol grubunda CEPI yönünden O ile O-dışı kan grubu kontrolleri arasında fark yokken ($p=0.16$), CADP O kan grubu olanlarda O-dışı gruba göre daha uzun bulundu ($p=0.01$).

4. O kan grubu kontrollerinde vWF:Ag düzeyi=37-123, RCoF aktivitesi =42-168 olarak bulundu. O-dışı kan gruplarında ise, vWF:Ag düzeyi=51.5-178.5 iken, RCoF aktivitesi=54-312 olarak bulundu. O kan grubu kontrollerinde hem vWF:Ag düzeyleri, hemde RCoF aktiviteleri O-dışı kan grubu kontrolleriyle karşılaştırıldığında daha düşük saptandı ($p=0.001$, $p=0.001$).

5. Tüm kontrol hastalarında PFA, vWF:Ag ve RCoF arasında korelasyon varlığı araştırıldığında, CADP ile vWF:Ag ($p=0.00$, $r=-0.35$) ve RCoF arasında ($p=0.001$, $r=-0.33$) negatif yönde orta derecede bir ilişki olduğu görüldü.

6. Sonuç olarak eğer PFA bozuk çıkarsa ve aspirin, steroid dışı antiinflamatuvar kullanımı, hematokrit düşüklüğü ve trombositopeni gibi nedenler ekarte edilmişse trombosit fonksiyon bozukluğu ve vWH'ı yönünden ileri araştırmalara gidilmelidir. Eğer CADP normal, CEPI uzunsa

aspirin ve benzeri ilaç kullanımı bir neden olabilir. CEPI kartuşunun kanama diyatezi öyküsü olanlarda trombosit fonksiyon bozukluğu ve/veya vWH'ını saptamak için bir tarama testi olarak öncelikle yapılması ve uzama olduğu takdirde vWH'ı için daha duyarlı olan ve ayırıcı tanının yapılmasını mümkün kılan CADP çalışılmalıdır. CADP'de de uzama olduğu takdirde vWF:Ag ve RCoF aktivitesi kan grubu dikkate alınarak çalışılmalıdır.



KAYNAKLAR

1. Behnke O. Microtubules in disc-shaped blood cells. *Int Rev Exp Pathol* 1970;9:1-4.
2. Isenberg WM, Bainton DF. Megakaryocyte and platelet structure. "Basic principles and Practice in Hematology" (Ed. Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE)'de, New York , Churchill Livingstone, 1995, s.1516.
3. Stemerman MB, Spaet TH. The subendothelium and thrombogenesis. *Bull NY Acad Med* 1972;48:289-294.
4. Tschopp TB, Baumgartner HR, Silbergauer K ve ark. Platelet adhesion and platelet thrombus formation on subendothelium of human arteries and veins exposed to flowing blood *in vitro*. A comparison with rabbit aorta. *Haemostasis* 1979;8:19-23.
5. Madri JA, Dreyer B, Pitlick FA ve ark. The collagenase components of the subendothelium: correlation of structure and function. *Lab Invest* 1980;43:303-308.
6. Wang CL, Miyata T, Wexler B ve ark. Collagen induced platelet aggregation and release: Critical size and structural requirements of collagen. *Biochim Biophys Acta* 1978;544:468-474.
7. Trelstad RL. Special state of the fibril end: Site of growth, point of cell surface attachment and possible site for platelet interaction. "Collagen-Platelet Interactions" (Ed. Gastpar H)'da, Newyork, Schattauer Verlag, 1978, s. 153-162.
8. Caen JP, Michel H, Tobelem G ve ark. Adhesion and aggregation of human platelets to rabbit subendothelium. A new approach for investigation: Specific antibodies. *Experientia* 1976;33:91-96.
9. Rifkin R. The megakaryocyte-platelet system. "Clinical Hematology" (Ed. AS Martin, CL Steininger, JA Koepke)'de, II. Baskı, Lippincott, Philadelphia, New York, 1998, s.689-706.

10. Goldsmith HC, Turritto VT. Rheologic aspects of thrombosis and hemostasis: Basic principles and application. *Thromb Haemost* 1986;55:415-421.
11. Buchanan MR, Richardson M, Vallee E. Basement membrane underlying the vascular endothelium is not thrombogenic. *Clin Invest Med* 8 (suppl B) 1985:B27.
12. Collier BS. Platelets in cardiovascular thrombosis and thrombolysis. "The heart and cardiovascular system" (Ed. Foggard HA, Haley E, Jennings RB)'de, II. Baskı, New York, Raven, 1991, s 219-274.
13. Gawaz MP, Loftus JC, Bajt ML ve ark. Ligand bridging mediates integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (platelet GPIIb-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J Clin Invest* 1991;88:1128-1139.
14. Painter RG, Ginsberg MH. Concanavalin A induces interactions between surface glycoproteins and the platelet cytoskeleton. *J Cell Biol* 1980;86:77-85.
15. Kirchhofer D, Gailit J, Ruoslahti E ve ark. Cation-dependent changes in the binding specificity of the platelet receptor GPIIb-IIIa. *J Biol Chem* 1990;265:525-534.
16. Holmsen H, Day HJ. The selectivity of the thrombin induced platelet release reaction: Subcellular localization of released and retained substances. *J Lab Clin Med* 1970;75:840-846.
17. Hoving T. The ultrastructure of rabbit blood platelet aggregates. *Thromb Diath Haemorrh* 1962;8:455-461.
18. Packham MA. Stages in the interaction of platelets with collagen. *Thromb Haemost* 1976;36:269-273.
19. Kinlough-Rathbone RL, Reimers JJ, Mustard JF. Sodium arachidonate can induce platelet shape change and aggregation which are independent of the release reaction. *Science* 1976;192:1011-1016.
20. Harrison P, Cramer EM. Platelet α granules. *Blood Rev* 1993;7:52-58.
21. Plow EF, Ginsberg MH. Molecular basis of platelet function. "Hematology. Basic principles and practice" (Ed. Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie

- B, Cohen HJ, Silberstein LE)'de , Churchill Livingstone, New York, 1995, s.1524.
22. Handagama PJ, George JN, Shuman MA ve ark. Incorporation of a circulating protein into megakaryocyte and platelet granules (peroxidase/endocytosis/guinea pig). *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:861-867.
 23. Sixma JJ, van den Berg A, Schiphorst M ve ark. Immunocytochemical localization of albumin and factor VIII in thin cryosections of human blood platelets. *Thromb Haemost* 1984;51:388-395.
 24. Nurden A, Nurden P. A review of the role of platelet membrane glycoproteins in platelet-vessel wall interaction. *Bailliere's Clin Hematol* 1993;6:653-659.
 25. Legrand YJ, Karniguiah A, Lefrancier P. Interaction of platelets with a nonpeptide derived from type III collagen. *Blood* 1981;58:198-204.
 26. Bernard J, Soulier JP. Sur une nouvelle variété de dystrophie thrombocytaire hémorragique congénitale. *Sem Hfp Paris* 1948;24:3217-3222.
 27. Li C, Martin E, Roth GJ. The genetic defect in two well-studied cases of Bernard-Soulier syndrome: A point mutation in the fifth leucine-rich repeat of platelet glycoprotein Ib α . *Blood* 1995;86:3805-3809.
 28. Howard MA, Montgomery DC, Hardisty RM. Factor VIII-related antigen in platelets. *Thromb Res* 1974;4:617-623.
 29. Tomer A, Scharf RE, McMillan R. Bernard-Soulier syndrome: Quantitative characterization of megakaryocytes and platelets by flow cytometric and platelet kinetic measurements. *Eur J Haematol* 1994;52:193-199.
 30. Takahashi H, Murata M, Moriki T. Substitution of Val for Met at residue 239 of platelet glycoprotein Ib alpha in Japanese patients with platelet - type von Willebrand disease. *Blood* 1995;85:727-731.
 31. Russell S, Roth GJ. Pseudo von Willebrand disease: A mutation in the platelet glycoprotein Ib alpha gene associated with a hyperactive surface receptor. *Blood* 1993;81:1787-1794.

32. Lee H, Nurden AT, Thomaidis A. Relationship between fibrinogen binding and the platelet glycoprotein deficiencies in Glanzmann's thrombasthenia type I and type II. *Br J Haematol* 1981;48:47-50.
33. George JN, Reimann TA. Inherited disorders of the platelet membrane: Glanzmann's thrombasthenia and Bernard Soulier disease. "Basic Principles and Clinical Practice in Hemostasis and Thrombosis" (Ed. Colman RW, Hirsch J, Marder VJ.) de. Lippincott, Philadelphia, 1982, s.496-506.
34. Bellucci S, Devergie A, Gluckman E. Complete correction of Glanzmann's thrombasthenia by allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1985;59:635-642.
35. Mori k, Suzki S, Sugai K. Electron microscope and functional studies on platelets in gray platelet syndrome. *Tohoku J Exp Med* 1984;143:261-266.
36. Mori k, Suzki S, Sugai K. Morphological changes of platelets during the process of platelet agregation in gray platelet syndrome. *Thoku J Exp Med* 1986;149:425-431.
37. Gootenberg JE, Buchanan GR, Holtkamp CA. Severe hemorrhage in a patient with gray platelet syndrome. *J Pediatr* 1986;109:1017-1022.
38. Peacocke M, Siminovitch KA. The Wiskott-Aldrich syndrome. *Semin Dermatol* 1993;12:247-251.
39. Ochs HD, Slichter SJ, Harker LA. The Wiskott-Aldrich syndrome: Studies of lymphocytes, granulocytes and platelets. *Blood* 1980;55:243-249.
40. Remold-O'donnell, Rosen FS, Kenney DM. Defects in Wiskott-Aldrich syndrome blood cells. *Blood* 1996;87:2621-2629.
41. Apitz-Castro R, Cruz MR, Ledezma E. The storage pool deficiency in platelets from humans with the Chidiak-Higashi syndrome: Study of six patients. *Br J Haematol* 1985;59:471-477.
42. Firkin BG (1984). "The platelet and its disorders", MTB, Press.
43. Mikhailidis DP, Jenkins WJ, Barradas MA. Platelet function defects in cronic alcoholism. *Br Med J* 1986;293:715-721.

44. Handagama PJ, Shuman MA, Bainton DF. Incorporation of intravenously injected albumin, immunoglobulin G and fibrinogen into guinea pig megakaryocyte granules. *J Clin Invest* 1989;84:73-81.
45. von Willebrand EA. Hereditäre pseudohämophilie. *Finska Lak Sällsk Handl* 1926;68:87-93.
46. Zimmerman TS, Ratnoff OD, Powell AE. Immunologic differentiation of classic hemophilic (factor VIII deficiency) and von Willebrand disease. *J Clin Invest* 1971;50:244-249.
47. Castaman G, Lattuada A, Mannucci PM ve ark. Characterization of two cases of acquired von Willebrand syndrome with ciprofloxacin: Evidence for heightened proteolysis of von Willebrand factor. *Am J Hematol* 1995;49(1):83-90.
48. Ermens AA, de Wild PJ, Vader HL ve ark. Four agglutination assays evaluated for measurement of von Willebrand factor (ristocetin cofactor activity). *Clin Chem* 1995;41(4):510-516.
49. George M, Rodgers and Charles S Greenberg. Inherited coagulation disorders. "Wintrobe's Clinical Hematology" (Ed. Richard Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM.)'de, X. Baskı, Waverly International Baltimore, MD, USA, 1999, s.1682-1732.
50. Coccia MR, Barnes HV. Hypothyroidism and acquired vWD. *J Adolesc Health* 1991;12:152-157.
51. Facon T, Caron C, Cortin P. Acquired type II vWD associated with adrenal cortical carcinoma. *Br J Haematol* 1992;80:488-492.
52. Handin RI, Moloney WC. Antibody induced von Willebrand's disease. *Blood* 1974;44:933-938.
53. Ingram GIC, Kingston PJ, Leslie J. Four cases of acquired von Willebrand's syndrome. *Br J Haematol* 1971;21:189-194.
54. Richard C, Cuadrado MA, Prieto M. Acquired vWD in multiple myeloma secondary to absorption of vWF by plasma cells. *Am J Hematol* 1990;35:114-119.

55. Slaughter TF, Parker JK, Greenberg CS. A rapid method for the diagnosis of von Willebrand's disease subtypes by the clinical laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 1995;119:148-155.
56. Lusher JM. Response to 1-deamino-8-D-arginine vasopressin in von Willebrand disease. *Haemostasis* 1994;24(5):276-283.
57. Favalaro EJ, Dean M, Grispo L ve ark. Von Willebrand disease: Use of collagen binding assay provides potential improvement to laboratory monitoring of desmopressin (DDAVP) therapy. *Am J Hematol* 1994;45(3):205-213.
58. Berntop E. Plasma product treatment in various types of von Willebrand's disease. *Haemostasis* 1994;24(5):289-297.
59. Sixma JJ. Estimation of the bleeding time. "Hematology. Basic Principles and Practice." (Ed. Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE)'de Churchill Livingstone, New York, 1995, s.2235-2242.
60. Lind SE. The bleeding time does not predict surgical bleeding. *Blood* 1991;77:2547-2552.
61. Rodgers RP, Levin J. A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Hemost* 1990;16:1-20.
62. Mammen EF, Comp PC, Gosselin R ve ark. PFA-100 system: a new method for assessment of platelet dysfunction. *Semin Thromb Haemost* 1998;24:195-202.
63. Fressinaud E, Veyradier A, Truchaud F ve ark. Screening for von Willebrand disease with a new analyzer using high shear stress: a study of 60 cases. *Blood* 1998;91:1325-1331.
64. Francis J, Francis D, Larson L ve ark. Can the platelet function analyzer (PFA[®])-100 test substitute for the template bleeding time in routine clinical practice? *Platelets* 1999;10:132-136.
65. Aleskog AE, Killander A, Olsson K ve ark. Preoperative evaluation of primary hemostasis in patients with thrombocytopenia using the thrombostat 4000. *Semin Thromb Hemost* 1995;21(Suppl 2):59-65.

- 66.Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R ve ark. Description of an *in vitro* platelet function analyzer-PFA-100. *Semin Thromb Hemost* 1995;21:106-112.
- 67.Mammen EF, Alshameeri RS, Comp PC. Preliminary data from a field trial of the PFA-100 system. *Semin Thromb Hemost* 1995;21(Suppl 2):113-121.
- 68.Cattaneo M, Lecchi A, Agati B ve ark. Evaluation of platelet function with the PFA-100 system in patients with congenital defect of platelet secretion. *Thromb Res* 1999;96:213-217.
- 69.Peterson P, Hayes TE, Arkin CF ve ark. The preoperatif bleeding time test lacks clinical benefit: College of American Pathologists' and American Society of Clinical Pathologists' position article. *Arch Surg* 1998;133:134-139.
- 70.De Caterina R, Lanza M, Manca G ve ark. Bleeding time and bleeding: an analysis of the relationship of the bleeding time test with parameters of surgical bleeding. *Blood* 1994;84:3363-3370.
- 71.Italian Working Group: Spectrum of von willebrand disease: A study of 100 cases. *Br J Haematol* 1977;35:101-119.
- 72.Carcao MD, Blanchette VS, Dean JA ve ark. The platelet function analyzer (PFA-100®): A novel *in vitro* system for evaluation of primary hemostasis in children. *Br J Haematol* 1998;101:70-73.
- 73.Rand ML, Carcao MD, Blanchette VS. Use of the PFA-100® in the assesment of primary, platelet-related hemostasis in a pediatric seting. *Semin Thromb Hemost* 1998;24:523-529.
- 74.Favaloro EJ, Kershaw G, Bukuya M ve ark. Laboratory diagnosis of von willebrand disorder and monitoring of DDAVP therapy: efficacy of the PFA-100® and vWF:CBA as combined diagnostic strategies. *Haemophilia* 2001;7(2):180-189.
- 75.Escolar G, Cases A, Vinas M ve ark. Evaluation of acquired platelet dysfunctions in uremic and cirrhotic patients using the platelet function analyzer (PFA-100): influence of hematocrit elevation. *Haematologica* 1999;84(7):614-619.

76. Gill JC, Endres-Brooks j, Bauer PJ ve ark. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von willebrand disease. *Blood* 1987;69:1691-1697.
77. Lippi G, Franchini M, Brocco G ve ark. Influence of the ABO blood type on the platelet function analyzer PFA-100. *Thromb Haemost* 2001;85:369-370.
78. Bennet SJ, Shattil SJ. Platelet function. "Hematology" (Ed. Williams WJ, Beutler E, Erslev Aj, Lichtman MA)'de, McGraw-Hill, 1990, s.1233-1250.
79. Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL ve ark. A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest* 2000;105:783-791.
80. Goto S, Ikeda Y, Murata M ve ark. Epinephrine augments von willebrand factor-dependent shear-induced platelet aggregation. *Circulation* 1992;86:1859-1863.
81. Moeller A, Weippert-Kretschmer M, Prinz H ve ark. Influence of ABO blood groups on primary hemostasis. *Transfusion* 2001;41:56-60.
82. Favaloro EJ, Facey D, Henniker A. Use of a novel platelet function analyzer (PFA-100®) with high sensitivity to disturbances in von willebrand factor to screen for von willebrand's disease and others disorders. *Am J Hematol* 1999;62:165-174.