



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI
HEMATOLOJİ BİLİM DALI**

**SAĞLIKLI DONÖRLERDE TROMBOSİTAFEREZ İŞLEMİ SONRASINDA
ENDOJEN TROMBOPOETİN SEVİYESİNDEKİ
DEĞİŞİKLİKLER**

**Dr. Güze ÖZAL
UZMANLIK TEZİ
Tez Yöneticisi: Yard. Doç. Dr. Vildan ÖZKOCAMAN**

BURSA 2007

İÇİNDEKİLER

- ÖZET..... 3
- SUMMARY..... 4
- GİRİŞ VE AMAÇ..... 5
- GENEL BİLGİLER..... 6
- MATERYAL VE METOD..... 27
- BULGULAR..... 30
- TARTIŞMA..... 34
- KAYNAKLAR..... 38
- TEŞEKKÜRLER.....47
- ÖZGEÇMİŞ.....48

ÖZET

Aferez yöntemiyle trombosit süspansiyonunun hazırlanması, transfüzyon tıbbında büyük bir avantaj sağlamıştır. Aferez yöntemi trombosit süspansiyonu hazırlanması standart bir prosedür olmasına rağmen, donörden trombosit süspansiyonu alınması sonrasında, donörün trombosit sayısının normalizasyonununun sorumlu regülatuar mekanizmalar hakkındaki bilgilerimiz sınırlıdır. Megakaryopoezde anahtar sitokin olarak trombopoetinin keşfiyle (Trombopoetin (TPO) aynı zamanda mpl-ligand ve megakaryosit büyüme ve geliştirme faktörü-MGDF olarak da bilinir) trombosit üretiminin regülasyonu hakkında bilgi edinmemiz mümkün olmuştur. Plazmadaki endojen TPO seviyeleri trombosit sayısı ile ters orantılıdır. Aplastik anemi, amegakaryositik trombositopeni veya kemik iliği transplantasyonu sonrası görülen trombositopenik durumlarda olduğu gibi megakaryosit aplazisinin olduğu durumlarda serum TPO seviyeleri belirgin olarak yüksektir. Tersine immün trombositopenik purpuralı hastaların serum TPO seviyeleri normal veya hafif yüksektir. Bu bulgular serum TPO seviyelerinin trombosit sayısından ziyade hem megakaryosit hem de trombosit kitlesiyle ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın amacı, aferez işlemi uygulanan sağlıklı donörlerde trombosit kaybıyla ilişkili olarak endojen TPO seviyelerinde değişiklik olup olmadığını araştırmaktır.

Çalışmaya ilk kez aferez işlemi uygulanan 26 sağlıklı donör alınmıştır. Serum TPO seviyeleri ve trombosit sayıları aferez işlemi öncesi, işlemin hemen sonrasında ve takip eden 4 gün boyunca ölçülmüştür. Serum TPO seviyeleri ELİSA yöntemi kullanılarak ölçülmüştür.

Bu çalışmada bazal serum TPO seviyeleri 30.21 ± 13.03 pg/ml olarak bulunmuştur. Aferez işlemi sonrası trombosit sayısındaki en belirgin azalma işlem sonrası ölçümde görülmüş ve trombosit sayısındaki artış 1. günden itibaren başlamıştır. Ancak serum TPO seviyelerindeki artış en belirgin olarak 4. günde meydana gelmiştir (36.58 ± 16.36 pg/ml). Aferez işlemi sonrası donörün trombosit sayılarının normalizasyonu boyunca trombosit sayısı ile serum TPO seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ($p > 0.05$).

Sonuç olarak aferez işlemi sonrası meydana gelen trombosit sayısındaki normalizasyon ile serum TPO seviyeleri arasında ilişki yoktur. Aferez işlemi sonrası trombosit sayısındaki normalizasyon muhtemelen trombosit depo havuzu olan dalaktan trombositlerin dolaşıma salınmasıyla meydana gelmektedir. Trombopoetin bu yanıtta geç dönemde etkili olabilir ya da megakaryosit sayısında azalma olmadığı için minimal etkili olabilir.

Anahtar kelimeler: Trombopoetin, trombositaferez, sağlıklı donörler

SUMMARY

ALTERED IN ENDOGENOUS THROMBOPOIETIN IN HEALTHY DONORS AFTER PLATELETPHERESIS

The collection of single donor platelet concentrates by automated plateletpheresis has been a major advance in transfusion medicine. Although automated plateletpheresis is a standard procedure for the collection of single donor platelet concentrates, little is known about the regulatory mechanisms involved in the normalization of the donors' platelet counts after platelet collection. Recent insights into the regulation of platelet production have been provided by the identification of thrombopoietin (TPO; also known as mpl-ligand and megakaryocyte growth and development factor-MGDF) as a key cytokine in megakaryocytopoiesis. The endogenous TPO levels in plasma are inversely correlated with the platelet counts. In patients with aplastic anemia, amegakaryocytic thrombocytopenia or after bone marrow transplantation, where thrombocytopenia is associated with megakaryocytopenic hypoplasia, TPO levels are extremely high. In contrast, patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP) exhibit normal or only mildly elevated TPO levels. This data indicated that serum TPO levels are more correlated with the combined megakaryocyte and platelet mass than with platelet numbers. The aim of this study was to test whether platelet donation is associated with changes in the serum TPO levels in healthy donors undergoing plateletpheresis.

The study group consisted of 26 healthy donors undergoing single donor plateletpheresis for the first time. Serum TPO levels and platelet counts were determined before platelet collection, at the end of apheresis, and for 4 days thereafter. Serum TPO levels were determined by a TPO specific enzyme linked immunosorbent assay.

Baseline serum TPO levels were 30.21 ± 13.03 pg/ml in this study. There was no significant correlation between serum TPO levels and platelet number during normalization of the donors' platelet counts after plateletpheresis.

In conclusion there is no correlation between serum TPO levels and normalization of platelet counts in response to plateletpheresis. Normalization of platelet counts after plateletpheresis may be ascribed to the release of platelets from the platelet storage pool, that is, the rapid mobilization of platelets from the spleen into the blood. Thrombopoietin may be affected late period in this response or may be minimally affected this response because megakaryocyte counts don't decrease.

Key words: Thrombopoietin, plateletpheresis, healthy donors

GİRİŞ VE AMAÇ

Trombositaferez yöntemiyle sağlıklı donörlerden trombosit toplanması ve trombosit süspansiyonu hazırlanması transfüzyon tıbbında büyük avantajlar sağlamıştır. Aferez yöntemi ile donörden trombosit toplanması standart bir yöntem olmasına rağmen, trombosit toplanması sonrasında donörün trombosit sayısının normalizasyonunu sağlayan regülasyon mekanizmaları hakkındaki bilgilerimiz sınırlıdır.

Megakaryositopoez ve trombosit üretimi, çeşitli hematopoetik büyüme faktörleri tarafından düzenlenmektedir. Bu hematopoetik büyüme faktörleri içinde trombosit üretimi ve megakaryopoezin regülasyonunda anahtar rol oynayan sitokin, trombopoetindir. Trombopoetin (TPO), c-mpl ligand ve megakaryosit büyüme ve geliştirme faktörü olarak da bilinir ve başlıca karaciğer ve böbrekten sentez edilir. 1980'lerden beri trombopoetin hakkında pek çok çalışma yapılmış olsa da TPO'in klonlanabilmesi ancak 1994 yılında mümkün olmuştur. Trombopoetin hem erken megakaryosit gelişiminde hem de sayı, büyüklük ve megakaryosit ploidi gibi geç megakaryosit matürasyonunda rol oynamaktadır. Aynı zamanda sağlıklı donörlere TPO'in verilmesiyle, periferik kandaki trombosit sayısını ve fonksiyonlarını da arttırdığı gözlenmiştir. Trombopoetin etkisini mpl reseptörlerine bağlanarak göstermektedir. Mpl reseptörleri hem megakaryosit hem de trombositlerin yüzeyinde bulunmaktadır ve serum trombopoetin düzeyi dolaşımdaki trombosit sayısı ile ters orantılıdır. Yani trombosit sayısı yüksek ise dolaşımdaki mpl reseptörüne bağlanan trombopoetin miktarı arttığı için serbest trombopoetin miktarı azalmakta, tersine trombosit sayısı düşük olduğunda dolaşımdaki trombopoetini bağlayan mpl reseptör sayısı azalmakta ve serbest trombopoetin miktarı artmaktadır. Kemik iliği yetmezliği olan hastalarda regülasyon bu mekanizma ile açıklanabilirken, İTP'li hastalarda trombosit sayısı düşük olmasına rağmen serum trombopoetin düzeylerinin normal olması, esansiyel trombositozu olanlarda da serum trombopoetin düzeylerinin yüksek olması TPO regülasyonunda mpl reseptörleri üzerinden olan regülasyona ek başka mekanizmalarında olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada, sağlıklı donörlerde trombositaferez işlemi sonrasında olan trombosit kaybıyla, endojen serum trombopoetin seviyelerindeki değişikliklerin monitörize edilmesi amaçlandı.

GENEL BİLGİLER

Megakaryopoez ve Trombosit Fizyolojisi

Trombositler, megakaryosit sitoplazmasından, fragmantasyon yoluyla oluşurlar. Dolaşımdaki trombositler çekirdeksiz, ovoid, gri-mavi renkli sitoplazmaya sahip, $7.06 \pm 4.85 \mu\text{m}^3$ hacminde, $3.6 \pm 0.7 \mu\text{m}$ çapında hücrelerdir. Trombositlerin elektron mikroskopik incelemelerinde her biri farklı görevlere sahip glikokaliks, plazma membranı, yüzeye açılan kanaliküler sistem, tübüler sistem, hücre iskelet yapısı, çeşitli granüller, mikroperoksizomlar, kaplı vesiküller, mitokondri ve glikojen gibi organellere sahip olduğu izlenmiştir. Trombosit yapısındaki lipidlerin %80'ini fosfolipidler oluşturur. Membranda yer alan glikoproteinler pek çok adheziv görevden sorumludurlar. Bunların en bilinenleri plazma membranının esas reseptörü olan glikoprotein IIb/IIIa ve von Willebrand faktörü ile ilişkiden sorumlu olan glikoprotein Ib-IX'dur. Trombositler kanamanın durdurulmasında, tromboz ve pıhtılaşmada rol oynayan hücrelerdir. Trombositlerin ortalama yaşam süresi 8-10 gündür. Her gün yetişkin insanlarda 1×10^{11} trombosit üretilir ve trombosit ihtiyacının arttığı durumlarda megakaryositler dolaşan trombosit miktarını 10 kata kadar arttırabilir. Bir hastalık sonucu değişmediği sürece trombosit sayısı sağlıklı kişilerde sabittir. Normalde trombosit sayısı 150 000/ μl -450 000/ μl arasında değişir. Trombosit sayısı 20 000-50 000/ μl arasında olduğunda minör spontan kanamalar ve cerrahi sonrası kanamalar meydana gelirken, sayı 20 000/ μl altında olduğunda daha ciddi, spontan kanamalar meydana gelir (1, 2, 3, 4).

Megakaryositler dolaşımdaki trombositleri oluşturan büyük hematopoetik hücrelerdir. Kemik iliğinde az sayıda bulunan megakaryositlerin normal insanda sayısı $6.1 \times 10^6/\text{kg}$ 'dır. Olgunlaşmamış megakaryositler büyük, bazofilik ve çekirdek/sitoplazma oranı yüksek hücrelerdir. Bu hücrelerin olgunlaşması ile çekirdek/sitoplazma oranı ve bazofili azalır, sitoplazma hacmi ve nükleer lobulasyon artar ve bir megakaryositin parçalanmasıyla binlerce trombosit oluşur. Her bir megakaryositten 2000-5000 adet trombosit oluşur (2).

Tanım olarak trombopoez, megakaryopoez; kemik iliğinde PPP (Pluripotent progenitör) kök hücrelerden megakaryosit gelişimi sonrası hemostazın mutlak bir parçası olan trombosit üretimine kadar giden hücrel bir süreçtir (5). Trombopoez, dolaşımdaki trombositlerin sayı ve hacmine bağlı olarak humoral mekanizmalar tarafından düzenlenmektedir (2, 3). Akut, ciddi trombositopeni durumunda, immünolojik periferik yıkım varlığında ya da tromboaferez yapıldığında kemik iliğindeki megakaryositlerin hacim, sayı, ploidi (megakaryosit çekirdeğinin çoğalma katsayısı) ve maturasyon hızı gibi parametrelerinde artış izlenmektedir (6). Bu

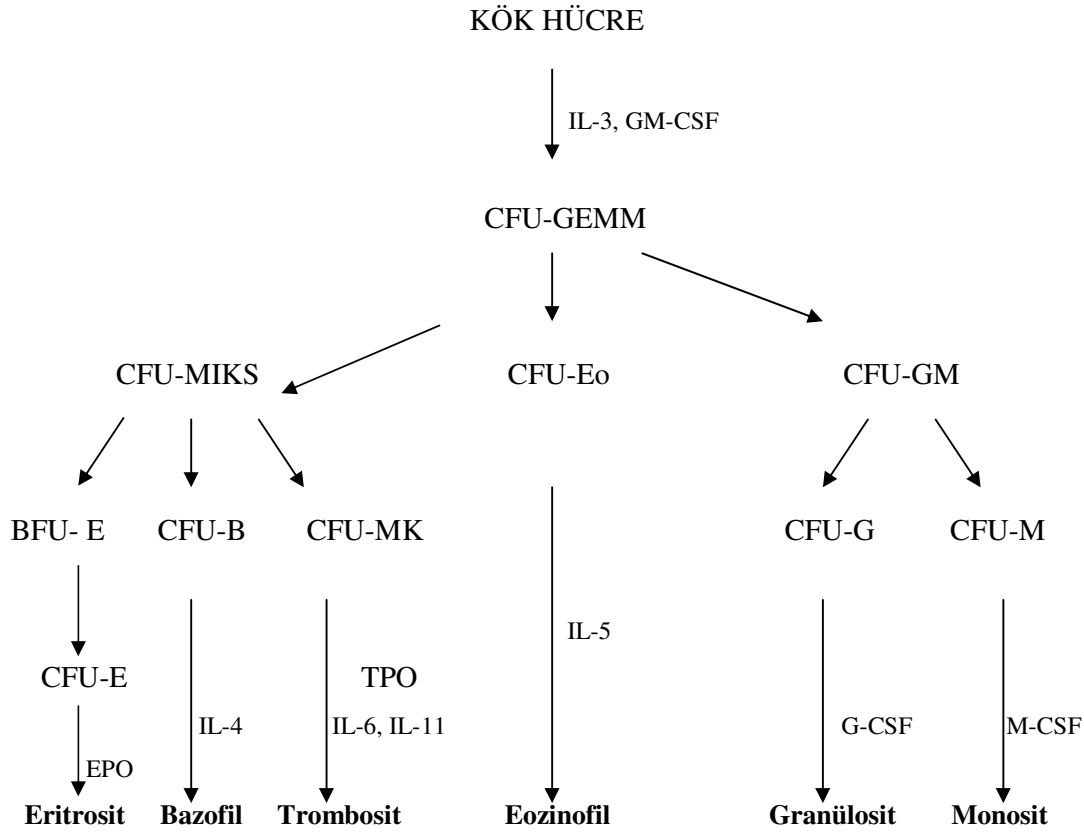
parametrelerdeki artış megakaryosit ana hücrelerinin çoğalma ve farklılaşmasının uyarılmasıyla olur. Bu da trombosit yapımında hızlanmaya neden olur. Bu değişikliklerden, kök hücrelerden hematopoetik kolonilerin gelişmesi için bulunması gereken glikoprotein yapısındaki **Hematopoetik büyüme faktörleri** denen interlökin 1 (IL-1), interlökin 3 (IL-3), interlökin 6 (IL-6), interlökin 11 (IL-11), granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF), lösemi inhibe eden faktör (LIF), stem cell faktör (SCF) ve trombopoetin (TPO) gibi sitokinler tarafından yönetilen bir humoral mekanizma sorumludur. Bu humoral mekanizmanın primer olarak regülasyonunu TPO sağlar (7).

Kanda dolaşan hücreler tek bir ortak hücreden köken almakta ve bu hücreye **pluripotent kök hücre** adı verilmektedir. Bu hücrelerin hem mitozla kendilerini çoğaltabilme, hem de tüm kan serilerine dönüşebilme yetenekleri vardır. Kemik iliği, hematopoetik hücrelerin proliferasyon, kendini yenileme ve diferansiyasyonu için bir mikroçevre oluşturur. Kemik iliğinin hematopoetik mikroçevresi endotelial hücreler, fibroblastlar, adventisyal retiküler hücreler, makrofajlar ve adipositlerden oluşur (8, 9).

Kök hücre başlıca; lenfoid kök hücre (CFU-L, Colony forming unit-Lymphoid) ve granülosit, eritrosit, makrofaj ve megakaryosit ön hücresi olan CFU-GEMM (Colony forming unit-Granulocyte, Erythrocyte, Monocyte, Macrophage) olarak adlandırılan iki farklı hücreye dönüşebilir. Farklılaşmanın devam etmesiyle CFU-GEMM' den granülosit makrofaj öncüsü CFU-GM (Colony forming unit-Granulocyte, macrophage), eozinofil öncüsü CFU-Eo (Colony forming unit-Eosinophil) ve eritrosit, bazofil, trombosit öncülerini oluşturan CFU-MİKS (Colony forming unit-Miks) meydana gelir. CFU-MİKS' den de eritrosit öncüsü BFU-E (Blast forming unit-Erythrocyte), bazofil öncüsü CFU-Bazo (Colony forming unit-Basophil) ve trombosit öncüsü CFU-Meg (Colony forming unit-Megakaryocyte) oluşur (4, 8, 9, 10).

Normalde hematopoetik kök hücreler ve progenitör hücreler Go denen hücre siklusunun istirahat fazında bulunurlar. Bu istirahatteki hücreler, hücre siklusunu başlatabilmek için hematopoetik büyüme faktörleri olarak adlandırılan birden fazla sitokin etkileşimine ihtiyaç duyarlar. Sitokinler, hematopoetik progenitörlerin proliferasyonunu tek başına yapabilenler (G-CSF, M-CSF, GM-CSF, EPO, IL-3, IL-7) ve hematopoetik progenitörlerin büyümesini uyardırma sınırlı etkisi olan veya etkisi olmayan ancak proliferasyon induksiyonunda diğer sitokinlerle beraber sinerjik olarak hareket edenler (IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-13, LİF, SCF) olmak üzere ikiye ayrılır (11). Yönelmiş veya daha matür progenitörler tek sitokine yanıt verirken, immatür prekürsörlerin proliferasyon için multipl faktör etkisine gereksinimi vardır.

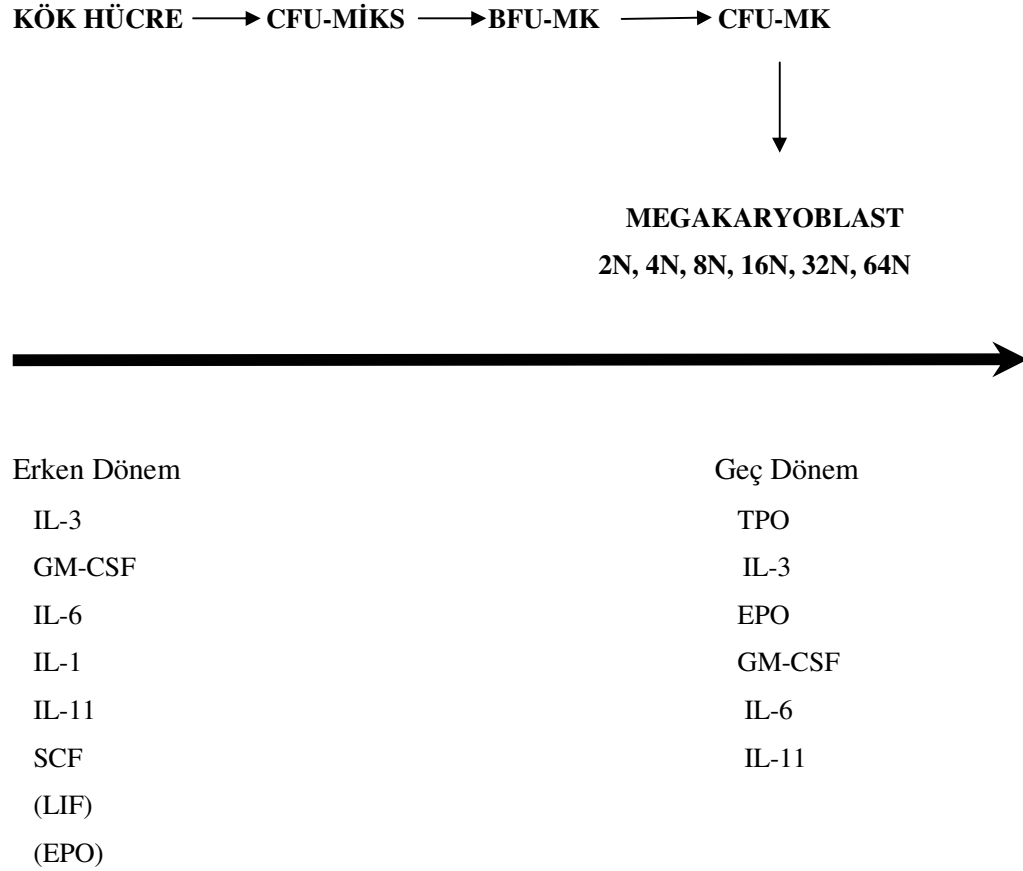
Şekil-1. Pluripotent kök hücreden periferik elemanlarının oluşum aşamaları



(*CFU-GEMM*; granülosit, eritrosit, makrofaj ve megakaryosit öncü hücresi, *CFU-GM*; granülosit, makrofaj öncü hücresi, *CFU-Eo*; eozinofil öncüsü, *CFU-B*; bazofil öncüsü, *CFU-MK*; trombosit öncüsü, *BFU-E* ve *CFU-E*; eritrosit öncü hücreleri, *EPO*; eritropoetin, *G-CSF*; granülosit stimüle edici faktör, *M-CSF*; monosit stimüle edici faktör, *IL-4, 5, 6, 11*; İnterlökin-4, 5, 6, 11.)

Trombopoeze etki eden sitokinler ise; megakaryosit öncül proliferasyonu yapanlar (IL-3, IL-1) ve yönelmiş megakaryosit öncülleri üzerinde olgunlaşma etkisi gösterenler (IL-6, IL-11) olmak üzere iki grupta incelenebilirler (12). Hematopoezin erken aşamalarında IL-3, SCF, GM-CSF, IL-6, IL-11 ve IL-1 etki etmektedir. CFU-MK oluşuktan sonra ise bu faktörlerin bir kısmı etkilerine devam etmekte ancak esas etkiyi TPO göstermektedir. TPO yokluğunda IL-3 megakaryosit gelişiminin erken dönemlerini indükleyebilirse de tam megakaryosit matürasyonu için TPO gereklidir (8, 13).

Şekil-2. Trombopoetze etki eden faktörler



Megakaryosit gelişimi, olgunlaşması ve trombosit üretimi:

Hematopoetik kök hücreden erken miyeloid öncül hücre (CFU-GEMM) oluşumunu takiben megakaryosit-eritroid öncül hücre (CFU-MİKS) meydana gelir. Çevresel faktörler, sitokinler ve kemokinlerin yardımıyla iki yönlü CFU-MİKS, yüksek derecede çoğalma yeteneği olan CFU-MK'e (HPP CFU-MK) dönüşür. Sonraki basamakta ise sırasıyla BFU-MK (Burst forming unit-megakaryocytes), CFU-MK, promegakaryoblast ve megakaryoblast oluşur (4). Bu aşamaya kadar mitoz yeteneği olan diploid (2N) megakaryosit (MK) öncülleri (megakaryoblast) bundan sonra bölünme yeteneğini kaybeder ama DNA replikasyon (endoreduplikasyon, endomitoz) ve sitoplazmik olgunlaşma yeteneği devam eder (4, 8).

Megakaryoblastdan immatür megakaryosit, matür megakaryosit ve trombositler meydana gelir. Bu olgunlaşma aşamaları;

1-) DNA replikasyonu

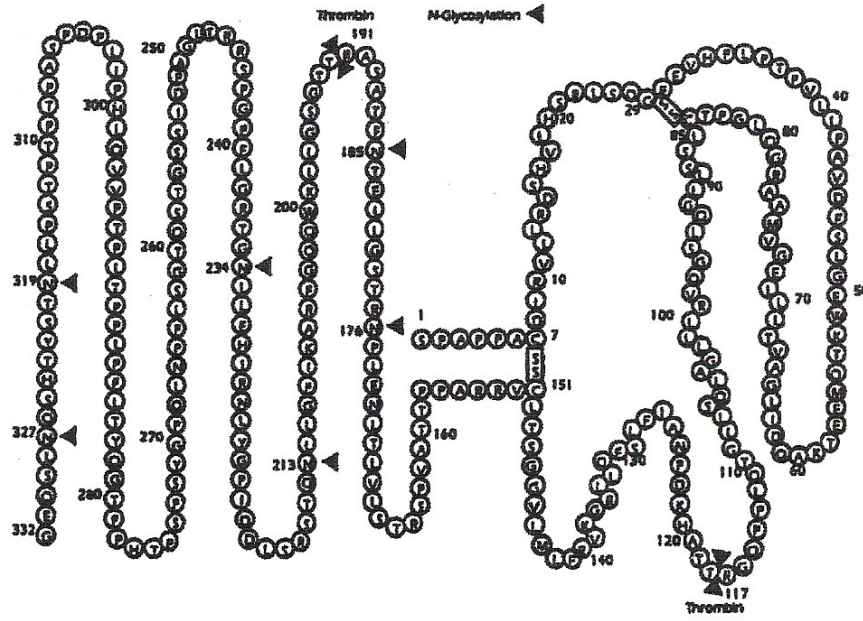
2-) Sitoplazmik olgunlaşma ve genişleme

3-) Sitoplazmik parçaların dolaşan trombositler olarak salınımından oluşur (4).

Megakaryoblast 15-50 µm çapında, geniş, oval veya atnalı şeklinde nükleusu olan dar sitoplazmalı bir hücredir. Megakaryoblast giderek büyür, sitoplazması genişler, granüller görülmeye başlar ve promegakaryositler (immatür megakaryosit) oluşur. Bu hücre 20-80 µm çapında, oval veya düzensiz kenarlı nükleusa sahiptir. Bu hücrelerden matür megakaryositler oluşur. Megakaryosit olgunlaştığında poliploid nükleus atnalı şeklini alır, sitoplazma genişler ve dolaşan trombositleri oluşturan proplatelet çıkıntılara dönüşür. Trombositler “Demarkasyon Membran Sistemi” olarak adlandırılan megakaryosit sitoplazması içindeki adalardan oluşur. Bu sistem, golgi ve endoplazmik retikulum membran yapılarının kendiliğinden birleşmesiyle oluşmaktadır (4, 14, 15). Olgunlaşma sürecinde, nükleus olgunlaşması için çekirdek materyali DNA senteziyle iki katına çıkar ama bölünme gerçekleşmez. Bu olaya “endomitoz” denir. Sonuçta 8N, 16N, 32N ve 64N kromozom içeren poliploid nükleuslu hücreler ortaya çıkar. Genel olarak çalışmalarda 4N ve 8N ploidiye sahip megakaryositlerin büyük çoğunluğunun immatür olduğu ve trombosit üretme yeteneği olan megakaryositlerin % 95’inin en az 16-32N ploidiye sahip olması gerektiği öne sürülmektedir. Megakaryosit ploidi ne kadar fazla ve sitoplazma ne kadar genişse yapılan trombosit sayısı da o kadar fazla olur. Olgunlaşma süreci insanda 5 günde olmaktadır (15, 16, 17). Trombositlere ihtiyacın artmasına yanıt olarak megakaryosit sayısı ve büyüklüğü artar, ortalama megakaryosit ploidi artar ve trombosit üretimi 11 kata kadar artabilir. Bu yanıtı düzenleyen hematopoetik büyüme faktörü TPO’dur (1).

TROMBOPOETİN

Mpl-ligand, megapoetin veya megakaryosit büyüme veya geliştirme faktörü (MGDF) olarak da bilinen trombopoetin, trombosit üretimini fizyolojik olarak düzenleyen en güçlü sitokindir (18). Trombopoetin megakaryosit gelişimi için primer fizyolojik büyüme faktörüdür. Aynı zamanda hematopoetik kök hücrenin çoğalması ve yaşamını devam ettirmesinde de ana rol oynar (19, 20).

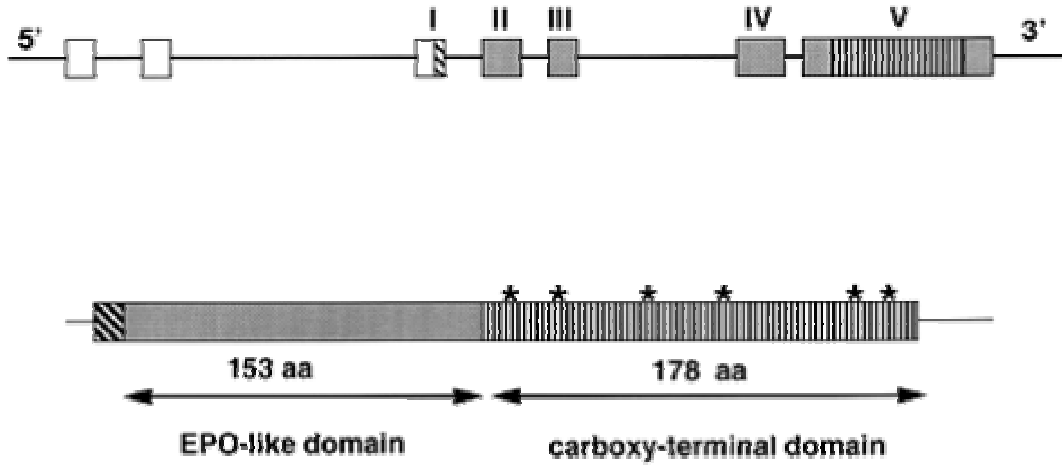


Şekil-3 Trombopoetin molekülünün moleküler yapısı (Takashi K, Atsushi M, Kinya O, Tomoyuki T, Haruhiko M, Hiroshi M. Native Thrombopoietin: Structure and Function. Stem cell 1998; 16: 322-8).

Trombopoetin Tarihçesi:

Trombosit üretiminden sorumlu humoral bir faktörün var olduğu ilk kez 1958 yılında bildirildi. Trombositopenik hastaların serumunun farelere enjekte edilmesinin trombosit sayısının yükselmesine neden olabileceği gösterildi ve bu humoral faktör eritropoetine paralel olarak “trombopoetin” olarak adlandırıldı (21, 22). Fonksiyonel olarak var olduğu bilinmesine rağmen 1994 yılına kadar trombopoetin klonlanması mümkün olmadı. 1994 yılında birbirinden bağımsız 5 grup tarafından üç değişik yöntem kullanılarak klonlandı (9, 10, 23). 1986’da Paris’de Wendling ve arkadaşları farelerde myeloproliferatif sendroma yol açan transforme edici bir viral kompleks tarif ettiler (24). 1990’da bu virüs klonlanarak retroviral bir onkogen v-mpl (viral myeloproliferatif ligand) olarak tanımlanmıştır (25). 1992’de viral onkogenin insandaki hücresel homoloğu olan c-mpl, insan eritrolösemi hücrelerinden klonlanmıştır. Çalışmalarda elde edilen ve Cys rezidüsü ile birlikte *Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser* zinciri içeren c-mpl geninin bir sitokin reseptörü kodladığı görülmüştür. Bu reseptörü kullanarak yapılan protein purifikasyon çalışmalarında hematopoetik hücrelerin büyümesinden sorumlu olan benzer bir protein yapısı kodlanmıştır. Eş zamanlı olarak beş ayrı çalışma grubu aynı molekülü kodladıklarını belirtmişlerdir. Rekombinant mpl ligandın kullanımı ile yarı katı besiyerinde üretilen megakaryositik öncül hücrelerin deney hayvanlarına verilmesiyle trombositoz geliştiği görülmüştür. Mpl ligandının ya da reseptörünün genetik eliminasyonu ile trombositopeni gelişmiştir. Bu çalışmalar mpl ligandının TPO ile aynı olduğunu desteklemektedir (9, 10, 17, 23, 26, 27, 28, 29, 30).

Trombopoetin Yapısı:



Şekil-4 Endojen trombopoetin yapısal bölümleri (Kuter DJ, Begley CG. Recombinant human thrombopoetin: basic biology and evaluation of clinical studies. Blood 2002;100; 3457-66).

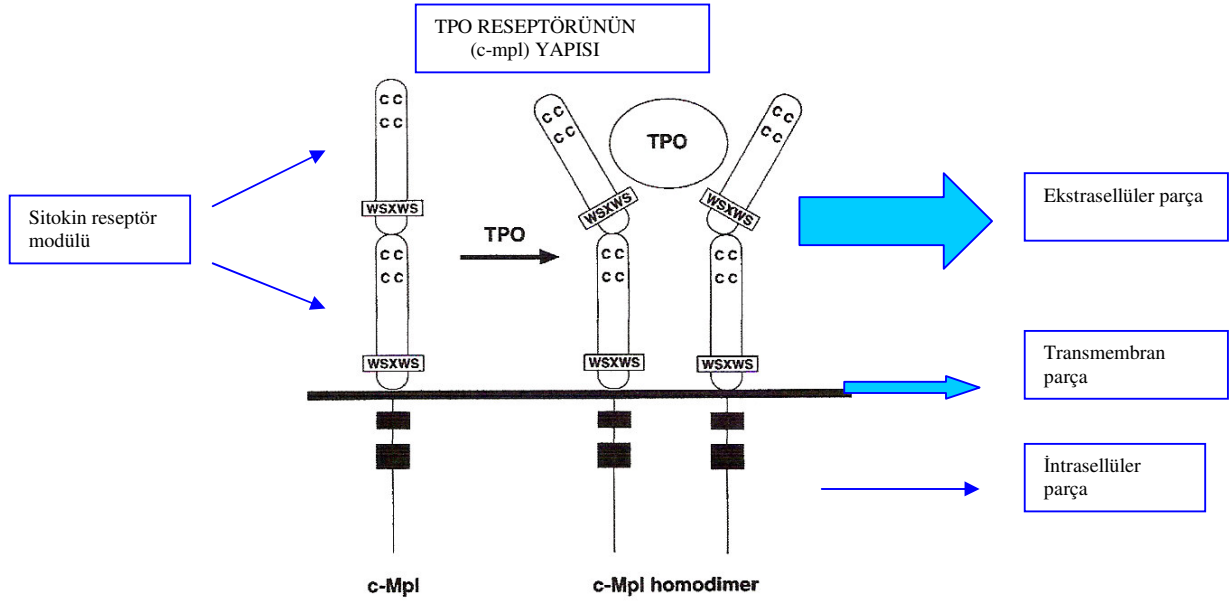
Trombopoetin, insan TPO geninin 3q26-3q27 kromozomu üzerinde yer almaktadır. İnsan TPO geni tarafından üretilen öncül protein, 21 aminoasiti sekreter bir sinyal peptid olan 353 aminoasit içerir. Dolaşımında bulunan TPO, bu 21 aminoasiti kaybeder ve 332 aminoasit içerir. TPO yaklaşık 60-70 kilodalton ağırlığındadır (4, 8, 31). Hematopoetik büyüme faktörleri değişik memeli örneklerinde birbirine benzemektedir. Ancak aminoasit dizileri türe özgüdür ve fare, köpek, domuz ve insanda TPO dizisinin % 71-88'i aynıdır. Bu molekül yapısal ve fonksiyonel olarak 2 bölgeye ayrılır. Bir uçta amino terminal reseptör bağlama bölgesi, diğer uçta ise karboksi terminal bölgesi vardır. Amino terminal uç 153 aminoasit içerir ve insan eritropoetini ile %23 oranında benzerlik gösterir. Amino terminal uç, reseptör bağlama, sinyal üretimi ve hücrel çoğalma gibi in vivo ve in vitro biyolojik aktiviteden sorumludur. Proteinin karboksi terminal ucu 179 aminoasite sahiptir ve diğer hematopoetik sitokinlerde bulunmaz. TPO'in trombopoetik etki için yalnızca amino terminal ucu gereklidir ama molekülün bu ucunun yarı ömrü tam proteininkinden kısadır. Molekülün karboksi terminal ucu stabiliteden sorumludur ve TPO'in dolaşımdaki yarı ömrünü uzatmaktadır (4, 10, 18, 31, 32).

Trombopoetin reseptörü (c-mpl):

TPO'in tanımlanması ve klonlanmasına yol açan anahtar çalışmalardan biri 1986 yılında Wendling ve ark. tarafından miyeloproliferatif lösemi virüsünün (MPVL) tanımlanmasıydı (24). MPVL enfekte ettiği hayvanlarda tüm miyeloid seride transformasyona sonuçta da hematopoetik yetmezliğe neden oldu. 1990 yılında transforme edici bir onkogen (v-mpl) bildirildi (25). 1992 yılında ise insan eritro lösemi hücrelerinde v-mpl'nin homoloğu olan hücrel bir proto-onkogen (c-mpl) klonlandı (26).

TPO reseptörü (c-mpl), hematopoetin reseptör süperaillesinin bir üyesidir (26). İnsan ve murine c-mpl reseptörleri % 86 oranında aynı yapıya sahiptir (33). Reseptörün 2 ana izoformu izole edilmiştir (mplP ve mplK). Reseptörün esas fonksiyonel formu mplP' dir ve insan dokularında TPO sinyal iletimini sağlar. mplK, reseptörün bu formunun kesin fonksiyonu hala bilinmemektedir. Reseptörün moleküler ağırlığı yaklaşık 85-92 kilodaltondur (31, 34, 35). TPO reseptör geni, 1. kromozomun kısa kolunda yerleşmiştir (1p34). Başlıca hematopoetik dokularda, hemanjioblastlarda, farklılaşmanın tüm aşamalarındaki megakaryositlerde ve trombositlerde bulunur (4, 31, 36). Bu reseptör üç bölümden oluşan bir Tip I transmembran proteindir. Amino terminal ekstrasellüler parça 466 aminoasit, transmembran parça 22 aminoasit, karboksi terminal intrasellüler parça 122 aminoasit içerir (33, 37, 38).

Ekstrasellüler parça 2 tane sitokin reseptör modülünden (CRM) oluşur. Sitokin reseptör modülü, diğer hematopoetik sitokin reseptör süperailisinin üyelerinde de bulunur. Herbir sitokin reseptör modülü 2 çift sistein rezidüsü ve bir tane pentapeptid motif (Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser-WSXWS) içeren 200 aminoasitten oluşur. WSXWS motifi reseptörün transmembran parçasına yakındır. Sitokin reseptör modülünden membranın distalinde olanı ligand bağlanmasından sorumludur. Ayrıca sinyal iletiminde negatif regülatuvar rol oynar.



Şekil-5 Trombopoetin reseptörünün yapısı. Trombopoetin hücrenin proliferasyonunu maturasyonunu veya yaşam süresini etkileyebilen çok sayıda sinyal iletim kaskadının aktivasyonuyla sonuçlanan reseptör homodimerizasyonunu stimüle eder (Warren S Alexander. *Thrombopoietin and the c-Mpl receptor: insights from gene targeting. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 1999; 31: 1027-35*).

TPO'in yokluğunda membranın proksimalindeki sitokin reseptör modülünün sinyal oluşturmasına ara vermesini sağlar. Sitokin reseptör modülünün membranın proksimalinde bulunanı sinyal iletiminde görev alır. WSXWS motifi ise ekstrasellüler parçanın uygun yapısını sürdürmesini sağlar (33, 35, 39, 40, 41). Hidrofobik transmembran parça kısmen kısa olup sinyal ileten parçadır. Reseptörün bu parçası türler arasında iyi korunmuş olsa da (insan ve murinede reseptörün bu parçası % 91 oranında benzer) diğer bilinen proteinlerle önemli bir benzerliğe sahip değildir. Reseptörün intrasellüler parçası diğer sitokin reseptörleriyle büyük benzerlik gösterir. İki tane parçası vardır box-1 ve box-2 bu parçalar trombopoetin sinyali için gereklidir (39, 41). Diğer sitokin reseptörlerinde olduğu gibi c-mpl için de tirozin fosforilasyonu, sinyal başlangıcı ve iletimi için hayati öneme sahiptir. Diğer büyüme faktörlerinin aksine c-mpl' nin intrinsik tirozin kinaz aktivitesi yoktur. Tirozin fosforilasyonu

TPO'nun reseptöre bağlanması ile gerçekleşir (42, 43, 44). Çocuklarda c-mpl'nin kongenital yokluğu veya c-mpl geninin (kromozom 1p34 üzerinde yer alır) fonksiyonel bozukluğu ciddi trombositopeni ile sonuçlanır. Reseptörün (c-mpl) ekstrasellüler veya eksternal intramembranöz parçasının mutasyonu sonucu "Kongenital Amegakaryositik Trombositopeni" meydana gelir (4, 45). Reseptörün (c-mpl) transmembran parçasındaki aktive edici bir mutasyonun familial esansiyel trombositemi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (46). Normal kemik iliğindeki megakaryositler ve trombositlerin yüzeyindeki c-mpl reseptörünün azalması "Polistemia Vera" ve "Diğer Miyeloproliferatif Hastalıklar" da gösterilmiştir. Bu hastalıklarda görülen trombositozun, sinyal anormallikleri ve reseptörün sitokinlere aşırı duyarlılığıyla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (4, 45).

Trombopoetin Sentezi ve Regülasyonu

TPO, esas olarak karaciğer ve böbrekte ayrıca beyin, kas, kemik iliği ve dalakta da yapılır (10, 23). In situ hibridizasyon teknikleriyle TPO mRNA'sı karaciğerin parankimal ve sinüzoidal endotelial hücrelerinde ve böbreğin proksimal kıvrımlı tubuler hücrelerinde saptanmıştır (47). TPO'nun belirgin bir depo havuzu olmayıp eritropoetin (EPO) gibi sentez edilip hemen salınır.

TPO, trombosit üretiminin ana fizyolojik düzenleyicisidir. Megakaryositler üzerindeki reseptörlerine (c-mpl) bağlanır ve selektif olarak megakaryositlerin çoğalmasını, olgunlaşmasını ve sitoplazmasının genişlemesiyle trombositleri oluşturup dolaşıma salınmasını sağlar (41, 48). Dolaşımdaki TPO seviyesinin regülasyonu karaciğer, böbrek, kan dolaşımı ve kemik iliği arasındaki multifaktöriyel ilişki ile oluşur. Plazmadaki endojen TPO seviyesi, trombosit sayısı ile ters orantılıdır (49, 50, 51, 52). Trombopoetin reseptör (c-mpl) yetmezliği olan farelerde trombosit sayısının düşük olduğu ve plazmadaki trombopoetin seviyelerinin de yüksek olduğu bulunmuştur (53). Bu farelere normal donörlerden trombosit transfüzyonu yapıldığında, TPO seviyesi hızlı bir şekilde azalmıştır (54). Megakaryosit hipoplazisi ile ilişkili trombositopeninin olduğu aplastik anemi, amegakaryositik trombositopeni ve miyelosüpresyona sekonder trombositopeninin olduğu hastalarda plazma TPO seviyesi belirgin derecede yüksek bulunmuştur (48, 52, 55, 56). Fakat trombosit yıkımının olduğu immün trombositopenik purpuralı hastalarda ise trombositopeninin derecesine göre beklenen aksine plazma TPO seviyesi normal veya hafif derecede artmış olduğu görülmüştür (55, 56, 57, 58, 59, 60). Homozigot NF-E2 yetmezliği olan derin trombositopenik farelerin plazma TPO seviyeleri şaşırtıcı olarak normal bulunmuştur. Bu

farelerin kemik iliğinin, iyi gelişmiş demarkasyon membran sistemi olan, ama megakaryosit sitoplazmasının gelişip, trombosit oluşturup, dolaşıma salınımını yapamayan çok sayıda megakaryosit içerdiği görülmüştür (61, 62). Bütün bu verilerin sonucunda plazma TPO seviyesinin trombosit sayısının yanısıra trombosit ve megakaryosit kitesiyle de ilişkili olduğu düşünülmüştür (63, 64).

Günümüzde hala trombopoetinin fizyolojik rolü ve kinetiği, trombopoetin tarafından trombosit üretiminin regülasyon mekanizmalarında tam olarak belli olmayan noktalar vardır. Başlangıçta TPO regülasyonu için eritropoetine benzer bir feed-back mekanizma ileri sürülmüştür. Eritropoetin üretiminin regülasyonu; anemi yüzünden oksijen miktarındaki herhangi bir azalma böbrek tubul hücreleri tarafından algılanır ve eritropoetin geninin transkripsiyon hızında artış olması ile sağlanır. Eritropoetinden farklı olarak, TPO transkripsiyonel seviyede regüle edilebiliyor gibi görünmemektedir (35). Karaciğer ve böbrekteki TPO mRNA ekspresyonu antitrombosit antikor veya radyasyonla trombositopenik hale getirilmiş farelerde artırılmamıştır. Buna rağmen TPO seviyesinde anlamlı bir artış meydana gelmiştir. Sonuç olarak TPO, transkripsiyonel olarak regüle edilmemektedir (30, 49, 50).

TPO regülasyonunu açıklamak için 2 model öne sürülmüştür (35).

- 1-) TPO regülasyonunda Kuter-Rosenberg “Sünger” modeli
- 2-) NF-E2 yetmezliği olan fare modeli

TPO regülasyonunda Kuter-Rosenberg Modeli

TPO'in trombosit aracılı temizlenmesinin TPO seviyesinin regülasyonunda ana mekanizma olduğu ileri sürülmektedir. Bu model De Gabriele ve Pennington tarafından orijinal olarak tanımlanmıştır ve daha sonra Kuter ve Rosenberg tarafından desteklenmiştir (52, 65). Bu modele göre TPO dolaşıma sabit bir hızda salınır ve TPO'in plazma seviyesi trombosit ve megakaryosit yüzeyinde bulunan mpl reseptör kitesi tarafından belirlenir (49, 52, 66, 67). Dolaşan trombositlerin sayısı direkt olarak TPO üretimini kontrol eder. Normal koşullarda dolaşımdaki trombositler yüzeylerinde bulunan c-mpl reseptörleri aracılığıyla TPO'ü bağlar ve dolaşımdan uzaklaştırır. Trombositopenik durumlarda periferik kandaki TPO yıkımı azalır ve trombosit düzelmesini sağlayan ve megakaryopoezi yöneten serum TPO düzeyi artar. Günümüzdeki kanıtların çoğu TPO üretiminin regülasyonunda bu mekanizmanın önemli rol oynadığını destekler. Trombositler TPO'in plazma düzeyini azaltabilir ama

karaciğer ve böbrekteki mRNA seviyesi derin trombositopeni veya trombositoz durumlarında değişmez (35, 43). Trombopoetin reseptörünün (c-mpl) haraplandığı farelerde trombosit sayısı düşük bulunur ve plazmadaki TPO seviyesi artmıştır. Normal trombosit süspansiyonu c-mpl reseptörleri haraplanmış farelere verildiğinde yüksek olan TPO seviyesi hızla azalır (54). Hem akut antikor aracılı hemde miyelosupresif tedavinin neden olduğu trombositopeni durumlarında plazma TPO seviyesi, derin trombositopeninin başlangıcından 24 saat sonra maksimum seviyeye yükselen trombosit sayısı ile ters orantılı olarak değişir (55, 68).

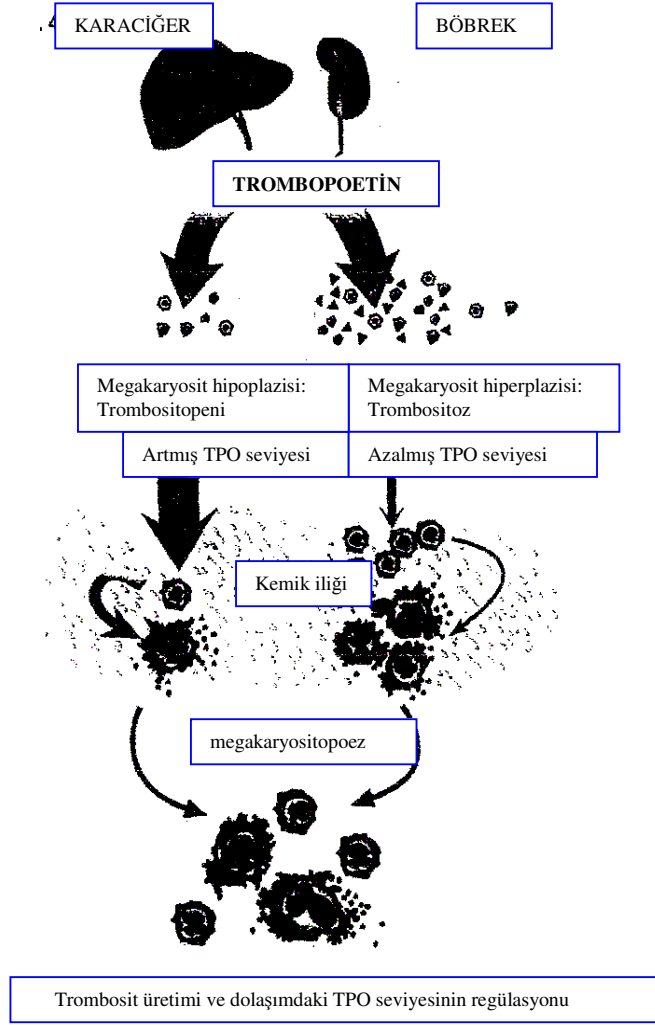
Sonuç olarak bu modele göre; TPO, karaciğer ve dalak tarafından sabit hızda sentezlenir ve plazma TPO klirensi esas olarak, dolaşımdaki trombositlerin yüzeyinde bulunan c-mpl aracılığıyla sağlanır (69).

NF-E2 yetmezliği olan fare modeli

Trombositopenik durumlarda, serum TPO seviyesi trombosit sayısından ziyade daha çok trombosit kitlesi ve megakaryosit kitlesiyle ilişkilidir. Bu teori hem NF-E2 transkripsiyon faktörü yetmezliği olan fareler, hem de dolaşımdaki TPO seviyesi normal veya düşük olmasına rağmen, derin trombositopenik olan immün trombositopenik purpuralı hastalarda bildirilen çalışmalarla desteklenmiştir (55, 62, 61, 70).

NF-E2, multipotent öncül hücreler, megakaryositik öncül hücreler, megakaryositler, mast hücreleri, eritroid hücreler üzerinde bulunan siklus kısıtlayıcı nükleer transkripsiyon faktörüdür. NF-E2, trombosit üretimi ve salınımına yol açan megakaryositlerin sitoplazmik matürasyonunun terminal fazında gereklidir (35, 61, 62).

Genetik olarak NF-E2 p 45 subüniti haraplanmış farelerde, neonatal dönemde hemorajiyile ölmelerine neden olan derin trombositopeni ve eritroid hücre defekti görülür. Bu fareler kemik iliğinde megakaryosit sayısının yüksek derecede olmasına rağmen, megakaryositlerin geç matürasyonunun durması nedeniyle derin trombositopeniktir. Ancak serum TPO seviyeleri, trombositopeninin derecesinden beklenildiği kadar yüksek değildir. NF-E2 defektif farelerin kemik iliğindeki megakaryositlerinin radyoyodunle işaretlenmiş TPO' i anlamlı miktarda bağladıkları gösterilmiştir. Bu işaretlenmiş TPO' in, aynı zamanda insan megakaryosit hücre siklusu ve megakaryositleri üzerinde bulunan c-mpl reseptörlerine de bağlanabildiği gösterilmiştir. Bu gözlemler sonucunda, megakaryosit kitlesinin de serum TPO seviyesinin regülasyonunda önemli olduğu ortaya çıkmıştır (61, 62, 71).



Şekil-6 Trombopoetin regülasyon modeli (Kaushansky K. Thrombopoietin. N Engl J Med 1998; 339: 746).

Sonuç olarak TPO regülasyonunda sadece trombosit yüzeyindeki c-mpl reseptörleri değil, megakaryosit yüzeyindeki c-mpl reseptörleri de önemli rol oynar. Bu mekanizma yıkımın ön planda olduğu trombositopenilerdeki TPO düzeyinin normal veya düşük olmasını kısmen açıklayabilmektedir. Bu hastalarda görülen megakaryosit hipertrofisi mevcut c-mpl reseptör kitlesinin artmasına ve TPO'ın bu reseptörlere bağlanmasıyla dolaşımdaki düzeyinin azalmasına neden olmaktadır.

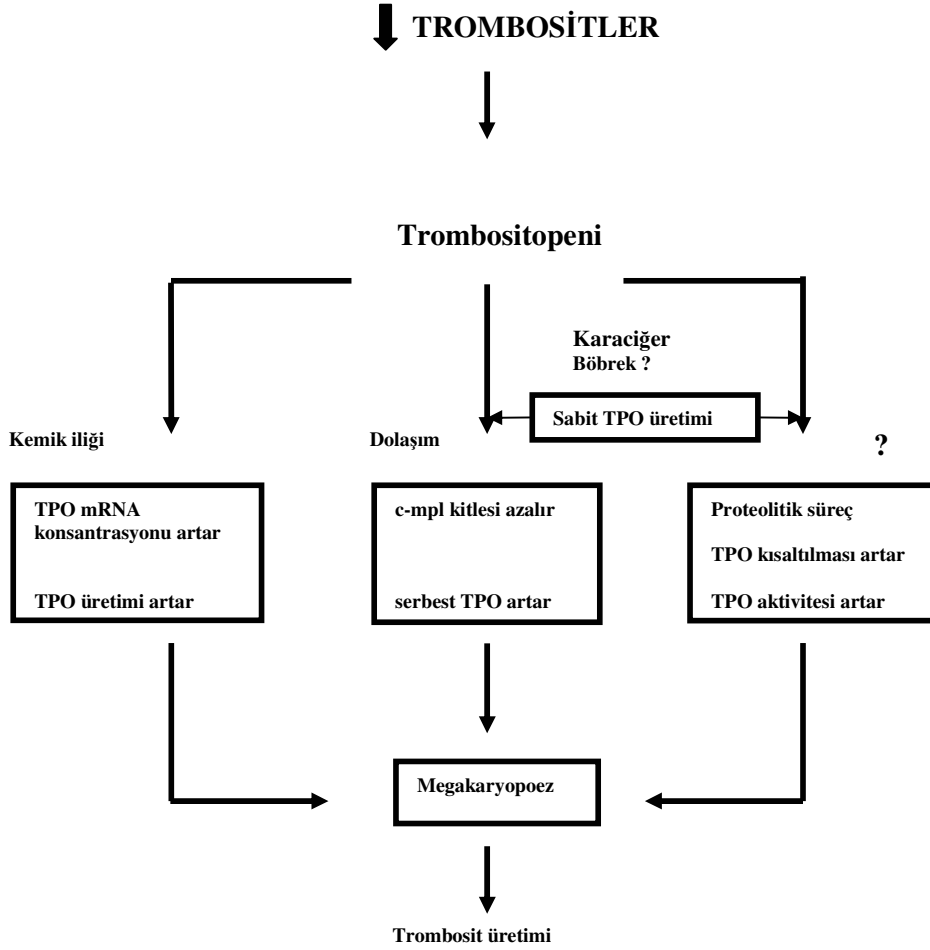
Trombopoetin regülasyonunda ana komponent reseptör aracılı uptake ve yıkımdır. Bu mekanizma aplastik anemi ve miyelosupresyona bağlı trombositopenide görülen yüksek TPO düzeylerini açıklar. Ancak yıkıma bağlı trombositopenide görülen normal veya düşük TPO düzeyini kısmen açıklarken, reaktif trombositozda görülen yüksek TPO düzeylerini

açıklayamamaktadır. Megakaryopoez ve serum TPO seviyesinin regülasyonunda bazı ek mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalardan bir tanesi; Karaciğer ve böbrekte TPO sentezi sabittir fakat trombositopenik durumlarda, trombosit ihtiyacına cevapta karaciğer ve böbrekte değil ama kemik iliği stromasında ve dalakta TPO mRNA ekspresyonunda artış meydana gelmektedir (47, 69). Normalde kemik iliği stroma hücreleri çok az miktarda TPO mRNA eksprese eder. Trombositopeni durumunda kemik iliği stroma hücrelerinde TPO için mRNA ekspresyonu büyük oranda artmaktadır (47). Bu etkinin humoral ve hücrel mediatörleri üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalardan bazılarında göre trombosit α granülleri içindeki PDGF ve PGF-2 primer insan kemik iliği stroma hücrelerinden TPO üretimini artırırken, trombosit faktör-4, trombospondin ve TGF- β TPO üretimini azaltır (72).

TPO regülasyonundaki ek mekanizmalardan bir diğeri reaktif trombositoz durumunda meydana gelir. Reaktif trombositozda serum TPO düzeyi, trombositozun derecesinden beklenenden çok yüksektir. Bu durum bir akut faz reaktanı olan IL-6'nın karaciğerden TPO transkripsiyonunu artırmasıyla açıklanmaktadır. İn vitro ortamda görülen bu etki in vivo ortamda da görülmektedir. IL-6 farelere veya kanser hastalarına verildiği zaman, karaciğerde TPO spesifik mRNA miktarı ve kandaki TPO düzeyi artar. IL-6 verilmesinin trombopoetik etkisi antitrombopoetin antikorlarıyla nötralize edilmektedir. Sonuçta TPO'in inflamasyonla ilişkili trombositozda son mediatör olduğu görülmüştür (45, 73).

Trombosit üretimi esas olarak, dolaşımdaki serbest TPO molekülünün miktarı ile düzenlenir. Trombositopeni durumunda dolaşımdaki trombosit sayısı dolayısıyla da trombosit yüzeyindeki c-mpl reseptör sayısı azaldığı için bu reseptöre bağlanan TPO miktarı azalır. Böylece dolaşımdaki serbest TPO miktarı artar. Artan TPO, megakaryositopoezi uyararak trombosit üretimini artırır (52, 74). Trombosit üretimi ve trombopoetin regülasyonundaki ek mekanizmalardan bir diğeri, TPO'in proteolizi ile TPO aktivite seviyesinin artmasıdır. TPO'in proteolizle kısaltılması en azından in vitro olarak molekülün biyolojik aktivitesini artırmaktadır. Şekilde görüldüğü gibi spesifik proteolizle TPO'in kısaltılması TPO aktivitesini artırır ve direkt olarak trombosit üretiminin düzenlenmesine katkıda bulunur. Trombositopenik durumlarda artmış trombosit ihtiyacına bağlı olarak dolaşımdaki tam uzunluktaki olgun TPO molekülü proteolize uğrayarak biyolojik olarak daha aktif olan kısaltılmış forma parçalanır. Bu parçalanma molekülün esas olarak biyolojik aktivitesinden ziyade dolaşımdaki yarı ömrünün uzamasından sorumlu olan karbonhidrat terminal parçasından olmaktadır. Ama geriye kalan biyolojik olarak aktif amino terminal parçanın yarı ömrü çok kısa olduğu için hızla dolaşımdan uzaklaştırılır. Trombopoetin fizyokimyasal

analizi yapılmış olmasına rağmen, kanda çok düşük konsantrasyonda bulunduğu için doğal insan TPO'nun tam olarak özellikleri hala net olarak bilinmemektedir (74, 75, 76).



Şekil-7 Trombopoetin tarafından trombosit üretiminin regülasyonu (Takashi K, Atsushi M, Kinya O, Tomoyuki T, Haruhiko M, Hiroshi M. Native Thrombopoietin: Structure and Function. Stem cell 1998; 16: 322-8).

Trombopoetin Hematopoetik ve Diğer Etkileri

Trombopoetin başlangıçta etkisinin esas olarak megakaryosit olgunlaşması ve megakaryositlerin trombositlere parçalanması olduğu düşünülmeye rağmen aslında biyolojik etkileri başlangıçta düşünülenlerden oldukça geniştir (45).

1- Trombopoetin, megakaryosit oluşumunu sağlayan tüm öncül hücrelerin ve hematopoetik kök hücrelerin gelişimini destekler. Megakaryosit olgunlaşmasını sağlar ve trombosit oluşumunu aktive eden olayları artırır (45).

2- Trombopoetin, hematopoetik kök hücrelerinin megakaryosit siklusuna yönelmelerini en güçlü olarak stimüle eden faktördür. Aynı zamanda öncül hücrelerin çoğalmasını sağlamak için eritropoetin, IL-11 ve SCF gibi diğer hematopoetik sitokinlerle sinerjik etki gösterir (77).

3- Kültürde trombopoetin, megakaryositlerin büyüklüklerinin, ploidisinin artmasını sitoplazmasının genişleyerek matür ve immatür trombositlere parçalanmasına yol açan proplatelet çıkıntılarının oluşmasını stimüle eder (78).

4- Trombopoetin, agregasyonu sağlamada gerekli olan kollajen, ADP veya trombin seviyesini azaltarak olgun trombositleri etkiler (79, 80). Ayrıca trombosit adhezyonunu artırır (81).

5- Trombopoetin hematopoetik kök hücrelerin yaşam sürelerini etkiler ve in vitro olarak hem murine hem de insan hücrelerinde çoğalmayı sağlamada IL-3 ve SCF ile sinerjik olarak çalışır (82, 83). Bu bulgular in vivo olarak da doğrulanmıştır. Farelerde trombopoetinin veya onun reseptörünün genetik eliminasyonu veya çocuklarda c-mpl'nin konjenital yokluğu, derin trombositopeniye yol açar ve ayrıca tüm hematopoetik siklustaki öncül hücrelerin ve hematopoetik kök hücrelerin miktarı azalır (84, 85, 86, 87).

Normal koşullarda ve çeşitli hematopoetik hastalıklarda Trombopoetin seviyeleri

Çeşitli hematolojik hastalıklarda görülen serum TPO seviyesindeki değişiklikler esas olarak TPO'nin c-mpl aracılı yıkılma modelindeki gibidir. Ancak sekonder trombositoz gibi bazı örneklerdeki TPO seviyeleri bu modelle kolayca açıklanamaz (88).

Kemoterapi ile ilişkili sitopeni ve trombopoetin seviyeleri

İnsanlarda trombositopenik ve amegakaryositik durumlardaki TPO regülasyonundaki bilgiler standart ve yüksek doz kemoterapi boyunca yapılan ölçümlerden elde edilmiştir (88). Kemoterapi sonrası serum TPO seviyelerini araştıran Engel ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada serum TPO seviyesinin trombosit sayısı ile ters orantılı olduğu doğrulanmıştır (89).

- **Periferik kök hücre nakli veya kemik iliği nakli ve trombopoetin seviyeleri**

Allogeneik kemik iliği nakli veya yüksek doz kemoterapi ile beraber periferik kök hücre nakli yapılan hastalarda da serum TPO seviyesi ile trombosit sayısı arasındaki ters ilişki doğrulanmıştır. Kemoterapi çalışmalarından beklenildiği gibi, miyeloablatif tedavi

sonrasında, trombosit sayısı en düşük değerine ulaştığında, serum TPO seviyesi pik yapmıştır (90). İlginç olarak bazı hastalarda akut graft-versus-host hastalığı boyunca serum TPO seviyeleri azalmıştır. Ayrıca kemik iliği nakli sonrası hepatik veno-okluziv hastalığı olan hastalardaki serum TPO seviyeleri, veno-okluziv hastalığı olmayan hastalardakinden anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur. Her iki durumda da serum TPO seviyelerinin daha düşük olması, bu hastalarda mevcut olan karaciğer hasarıyla açıklanmıştır (90, 91).

Kemik iliği yetersizliği olan klinik durumlarda trombopoetin seviyeleri

- **Aplastik Anemi**

Normal kişilerle karşılaştırıldığında, megakaryosit kitlesinin olmadığı veya azaldığı aplastik anemili hastalarda serum TPO seviyesinin arttığı gösterilmiştir (92). Ellidört aplastik anemili ve 119 sağlıklı kişideki serum TPO seviyelerini araştıran bir çalışmada, trombosit sayısı ters orantılı olarak, aplastik anemili hastalarda serum TPO seviyesinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Yüksek TPO seviyelerinin bu hastalarda komplet remisyon sağlanınca azalmıştır ama yine de normal kontrollerle karşılaştırıldığında serum TPO seviyeleri anlamlı olarak daha yüksek seviyede kalmıştır. Bu yükseklik devam eden hematolojik defekti göstermekte ve trombositlerin normal ya da normale yakın seviyede kalmasını sağlamaktadır şeklinde açıklanmıştır (88, 93).

- **Miyelodisplastik Sendrom**

Tamura ve arkadaşlarının miyelodisplastik sendromda (MDS), trombosit sayısı ile serum TPO seviyeleri arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmalarında, MDS'un tüm alt gruplarında, sağlıklı gönüllülerle karşılaştırıldığında, serum TPO seviyelerinin anlamlı olarak artmış olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada serum TPO seviyeleri MDS-RA'de, MDS-RAEB ve MDS-RAEB-t'e göre anlamlı derecede daha yüksek saptanmıştır. Trombosit sayısı ile serum TPO seviyesi arasındaki ters ilişki, MDS-RA'da görülürken, MDS-RAEB ve MDS-RAEB-t'de görülmemiştir. Bu durum, MDS-RAEB ve MDS-RAEB-t'de, trombosit sayısının azalmasıyla serum TPO seviyelerinde artmayı düzenleyen mekanizmanın bozulmuş olabileceği ile açıklanmıştır. Ayrıca ilginç olarak, bu alt gruplarda her trombosit başına düşen TPO reseptör sayısının da azalmış olduğu ileri sürülmüştür. Ancak MDS'da trombosit sayısı ile her trombosit başına düşen TPO reseptör sayısı arasında bir ilişki bulunamamıştır (94).

Kronik Otoimmün Trombositopeni

Kemik iliğindeki megakaryositlerin yetersiz olduğu durumlarda serum TPO seviyelerinin özellikle yüksek olduğu ve trombosit yıkımının olduğu vakalarda ise serum TPO seviyelerinde orta derecede bir yükseklik olduğu şeklindeki bir ilişki, ilk defa Emmons ve arkadaşları tarafından ileri sürülmüştür (55). Hou ve arkadaşları kemik iliğindeki megakaryosit sayısının normal olduğu veya arttığı kronik immün trombositopenik purpuralı (ITP) 16 hastada serum TPO seviyelerini araştırdıkları bir çalışmada, belirgin trombositopeni ($67 \pm 54 \times 10^9$) olmasına rağmen, serum TPO seviyeleri anlamlı olarak yükselmemiştir (95). Sakane ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği, 61 ITP'li hastada serum TPO seviyelerinin değerlendirildiği bir çalışmada, steroide yanıtı kötü olanlarda, steroide yanıtı iyi olanlara göre serum TPO seviyesi, anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışma aynı zamanda steroid cevabı ile megakaryosit sayısı arasındaki ilişkiyi de göstermiştir. Steroid yanıtı iyi olanlarda, kemik iliğindeki megakaryosit sayısı daha fazla ve dolayısıyla da serum TPO seviyesi, megakaryositler üzerindeki c-mpl reseptör aracılı yıkım nedeniyle daha düşüktür (96). Chang ve arkadaşları ITP'li hayvan modelinde artmış megakaryosit kitlesi ve yüksek trombosit turnoverı nedeniyle TPO'in reseptör aracılı alım ve yıkımının arttığını, bu nedenle de serum TPO seviyesinin trombosit yıkımının olduğu hastalıklarda, trombositopeninin derecesinden beklenenden daha az yüksek olduğunu göstermişlerdir (97).

Miyeloproliferatif Hastalıklar

- **Kazanılmış Miyeloproliferatif hastalıklar**

TPO veya reseptörünün bozulmuş regülasyonu, çeşitli hematopoetik hastalıklarda görülebilir. Hematopoetik kök hücredeki anormallikler yüzünden kandaki hücrelerin aşırı üretimiyle karakterize olan esansiyel trombositemi, miyeloid metaplazi, polisitemia vera, kronik miyeloid lösemi gibi miyeloproliferatif hastalıkların bir veya birkaçının patogenezinin aynı zamanda TPO veya onun reseptörlerindeki regülasyon bozukluğunda sorumlu olduğu düşünülmektedir (43). Hayvan çalışmalarında mpl reseptörünün spontan veya indüklenmiş mutasyonunun miyeloproliferatif hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Buna en iyi örnek TPO'in klonlanmasına neden olan onkogendir (25). Trombopoetin reseptörünün iki ek mutasyonu farelerde tümörlere ve hematopoetik hücrelerde kontrolsüz çoğalmaya

neden olur. Li ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada da TPO ve onun reseptörünün bozukluklarının miyeloproliferatif durumların oluşmasında rol oynayabileceği gösterilmiştir. Normal gruptakilerin trombositleriyle karşılaştırıldığında esansiyel trombositemili hastaların trombositlerinde, mpl ekspresyonunun belirgin derecede azaldığı gösterilmiştir (98).

Miyeloproliferatif hastalıklardaki serum TPO seviyeleri hakkında literatürdeki bilgiler kafa karıştırıcıdır. Bu hastalarda serum TPO seviyeleri, ya normal ya da hafifce yükselmiştir (99). Harrison ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yine miyeloproliferatif hastalığı olanlarda serum TPO seviyesinde anlamlı bir artış bulunmamıştır. İlginç olarak Esansiyel trombositemisi veya diğer miyeloproliferatif hastalığı olan hastalarda trombositlerdeki c-mpl ekspresyonunda anlamlı bir azalma olduğunu bulmuşlardır (100). Trombopoetin reseptör ekspresyonundaki azalmanın, miyeloproliferatif hastalıklardaki yüksek trombosit sayısı varlığında, normal veya yükselmiş olan serum TPO seviyelerinin bir kısmından sorumlu olabileceği düşünülmektedir (100). Bu hastalıklarda bulunan trombosit yüzeyindeki c-mpl reseptör sayısının azalmasıyla serum TPO seviyesinin normal veya hafif yükselmiş olması açıklanmaktadır. Aynı zamanda trombosit yüzeyindeki c-mpl reseptör sayısı az olmasına rağmen, sinyal anormallikleri ve sitokinlere aşırı duyarlılığın trombositlerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (45). Yine polisitemia veralı hastaların trombositlerinde TPO reseptörlerinde glikolizasyon defekti olduğu gösterilmiştir (101). İn vitro olarak esansiyel trombositemili ve idiyopatik miyelofibrozu hastalarda kontrolsüz megakaryosit büyümesi tanımlanmasına rağmen, bu vakalarda c-mpl mutasyonu veya mpl ligandın otokrin sitümlasyonu gösterilememiştir (102).

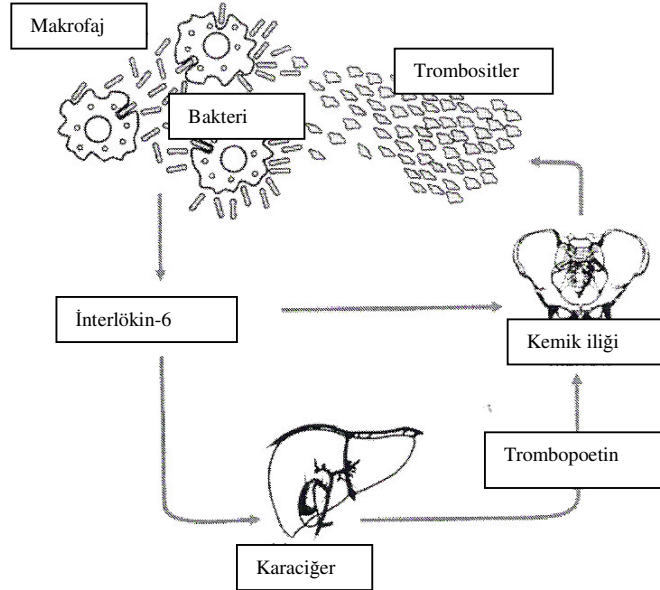
Familyal Trombositemi

Familyal trombositemi nadir görülen bir hastalıktır. Bu hastaların tamamında serum TPO seviyeleri yüksek bulunmuştur. TPO, 3q26-3q27 kromozomları üzerinde lokalizedir. Bu kromozomal lokustaki inversiyon veya delesyon anormallikleri, trombositozun olduğu miyeloid lösemi ve diğer miyeloproliferatif hastalıklarda bulunmuştur (103). TPO geninin regülatuar bölgelerindeki mutasyonlar, özellikle c-mpl reseptörünün transmembran parçası içindeki aktive edici bir mutasyon, TPO'in aşırı ekspresyonuyla sonuçlanır ve dolaşımdaki TPO'in regülasyonu bozulur. Bu da familyal trombositemiye yol açar (45, 104).

Hematolojik olmayan hastalıklardaki serum TPO seviyeleri

Sekonder (reaktif) trombositoz

Reaktif trombositoz , inflamatuvar sürecin sık görülen bir komplikasyonudur. Bu vakalarda dolaşımdaki trombopoetin seviyesi ve trombosit sayısı arasındaki ters ilişki kaybolmuştur (31). Reaktif trombositozu olan vakaların serumlarında IL-6 ve CRP düzeylerinde belirgin derecede artış vardır (105). Hsu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sekonder trombositozu olan hastalarda kontrol grubu ve klonal trombositozu olanlara göre, serum IL-6 düzeyi ve serum TPO seviyeleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ancak bu bulgu sekonder ve klonal trombositozu birbirinden ayıramamaktadır. Ayrıca bu bulgu, plazma TPO seviyelerinin reseptör aracılı yıkımı ile düzenlendiği varsayımı ile de çelişmektedir (106). İn vitro olarak IL-6, hepatic TPO mRNA ekspresyonunu artırmaktadır. Ayrıca IL-6 direkt olarak kemik iliğindeki megakaryosit öncül hücrelerin büyümesini de uyarmaktadır (107).



Şekil-8 İnflamasyon ve infeksiyondaki reaktif trombositozun oluşum mekanizması. IL-6 megakaryositleri direkt olarak ve karaciğerden TPO üretimini artırmak suretiyle indirekt olarak uyarır (Wolber EM, Jelkman W. Thrombopoietin: The Novel Hepatic Hormone. News Physiol. Sci. Vol: 17, 6-10, 2002).

İlerlemiş kanserli hastalarda da trombositoz görülen bir bulgudur. Bu bulgu artmış serum IL-6 seviyesine bağlanmaktadır (105). Sasaki ve arkadaşları ilerlemiş kanseri olan hastalarda serum TPO seviyelerinin yanı sıra çeşitli tümör hücrelerinin TPO mRNA ekspresyonunu araştırdılar (108). Buna göre kanser hücrelerinin çoğunda fonksiyonel TPO mRNA ekspresyonu bulunmaktadır. Bu da kanserli hastalarda görülen sekonder trombositozu IL-6 yanında tümör hücrelerinde TPO mRNA ekspresyonunda katkıda bulunduğunu göstermektedir (108).

MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Nisan 2006 ve Haziran 2006 tarihleri arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı kliniğinde yatmakta olan, kemik iliği baskılanması veya kemik iliği hipofonksiyonu nedeniyle trombositopenisi olup, trombosit süspansiyonu verilmesi gereken hastalara, gönüllü olarak kan vermek isteyen ve bu nedenle Uludağ Üniversitesi Kan Merkezine başvuran 26 sağlıklı erkek vericide gerçekleştirildi. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurul komisyonu tarafından onaylanan protokole göre, gönüllü vericiler çalışmanın içeriği hakkında bilgilendirildi ve yazılı olarak izinleri alındı.

Çalışmaya alınan hepsi erkek, sağlıklı, gönüllü vericilere öncelikli olarak verici olmaya uygun olup olmadıklarının saptanması için lökosit, hemoglobin, hematokrit, trombosit sayılarını içeren tam kan sayımı yapıldı. Lökosit sayısı $4000/\text{mm}^3$, hemoglobin düzeyleri $12\text{mg}/\text{dl}$, trombosit düzeyleri $150000/\text{mm}^3$ üzerinde olanlara bulaşıcı hastalık açısından taramak üzere HbsAg, Anti-HCV, VDRL, Anti-HIV testleri yapıldı. Tam kan sayımları uygun olanlar ve bulaşıcı hastalık riski taşımayan vericiler çalışmaya dahil edildi. Vericilerin hepsi trombosit-aferez işlemine başlanmadan önce yandaş hastalık, son bir hafta içinde aspirin veya non steroid anti inflamatuvar ilaç kullanımları ve infeksiyon bulguları açısından sorgulandı. Vericilerin hepsinde işlemin ilk kez yapılıyor olmasına dikkat edildi.

Trombositaferez işlemine başlamadan önce tüm vericilerden bazal trombopoetin düzeyi çalışılması için kuru tüpe 10cc kan alındı. Trombositaferez işlemi tamamlandıktan hemen sonra ve işlemi takiben 1., 2., 3., 4., günlerde tam kan sayımı için EDTA'lı tüpe 2 cc ve trombopoetin düzeyi çalışılması için kuru tüpe 10 cc kan alındı. İşlemden önce, hemen sonra ve işlemi takiben 1., 2., 3., 4., günlerde bakılan lökosit, hemoglobin, hematokrit, trombosit, MPV (ortalama trombosit hacmi), trombopoetin düzeyleri kaydedildi.

Tam kan sayımının ölçümü:

Tam kan sayımının ölçümü için EDTA'lı tüpe 2cc kan, işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1.,2.,3., ve 4. günler alındı. Kan örnekleri bekletilmeden hemen UÜTF Merkez Laboratuvarına ulaştırıldı ve otomatik kan sayım cihazında çalışıldı.

Serum Trombopoetin düzeyinin ölçümü:

Serum trombopoetin düzeyi için kuru tüpe 10 cc kan işlem öncesi, işlemden hemen sonra, 1.,2.,3., ve 4. günler alındı. Kan örnekleri 30 dakika bekletildikten sonra santrifüj cihazında 1000 devirde 15 dakika boyunca çevirilerek serumları ayrıştırıldı ve ayrıştırılan serum örnekleri -80°C'de ELISA analizinin yapılacağı güne kadar bekletildi. Serum trombopoetin düzeyleri ticari ELISA kitleri (Quantikine™ Human TPO Immunoassay; R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) kullanılarak ölçüldü.

Deneyin Prosedürü:

Kantitatif ELISA yönteminde, mikrolate test kuyucukları önceden trombopoetin için spesifik monoklonal antikorla kaplanmıştır. Çalışılacak örneklerde trombopoetin varsa immobilize antikor ile bağlanır. Bağlanan trombopoetin miktarının spektrofotometrik olarak ölçümü ile trombopoetin seviyesi saptanır.

Tüm serum örnekleri işleme başlamadan önce oda sıcaklığına getirildi. Tüm reaktifler ve çalışma standartları prospektüse göre hazırlandı. Her kuyucuğa 50 µl assay-dilüent RD1-20 eklenmesini takiben 200 µl serum örneği konuldu. Yeterince karışım için mikrolate hafifce ileri geri hareket ettirildikten sonra kuyucukların üzeri şeffaf bir yapışkan strip ile kapatıldı ve oda sıcaklığında 3 saat inkübe edildi. Daha sonra her bir kuyucuk aspire edildi ve otomatik yıkama cihazı yardımıyla yıkama tamponu kullanılarak yıkandı. Bu işlem 4 kez tekrar edildi. Bu işlemlerin ardından 200 µl trombopoetin konjugatı her bir kuyucuğa eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Tekrar her bir kuyucuk aspire edildi ve otomatik yıkama cihazı yardımıyla yıkama tamponu kullanılarak yıkandı. Her bir kuyucuğa 200 µl substrat solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Ardından her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi ve renk değişiminin homojen olması için mikrolate hafifçe sallandı. Daha sonra 30 dakika içinde spektrofotometrede 450 nm'de her bir kuyucuğun optik dansitesi ölçüldü ve 540 nm'de sonuçların doğrulanması için ölçüm tekrarlandı. Trombopoetin standardı ile hazırlanan eğriden trombopoetin miktarı hesaplanarak sonuçlar pg/ml olarak verildi (*Quantikine® Human Tpo Immunoassay Catalog Number DTP00B For the quantitative determination of human Thrombopoietin (Tpo) concentrations in cell culture supernates, serum and plasma*).

İstatistik Deęerlendirme:

İstatistiksel değerlendirme, Shapiro Wilks testi ile normal dağılımın test edilmesi sonrasında eşleştirilmiş T testi ve Wilcoxon testiyle yapıldı. Deęiřkenler arasındaki ilişkilerin incelenmesinde ise Pearson ilişki analizi kullanıldı. Yapılan istatistiksel karşılaştırmalarda baseline ile sonraki ölçümler karşılaştırıldı. Deęiřkenler arasındaki ilişkilerin incelenmesinde baseline değerlere göre % değişimler hesaplanarak değişimler arasındaki ilişkiler incelendi. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak alındı.

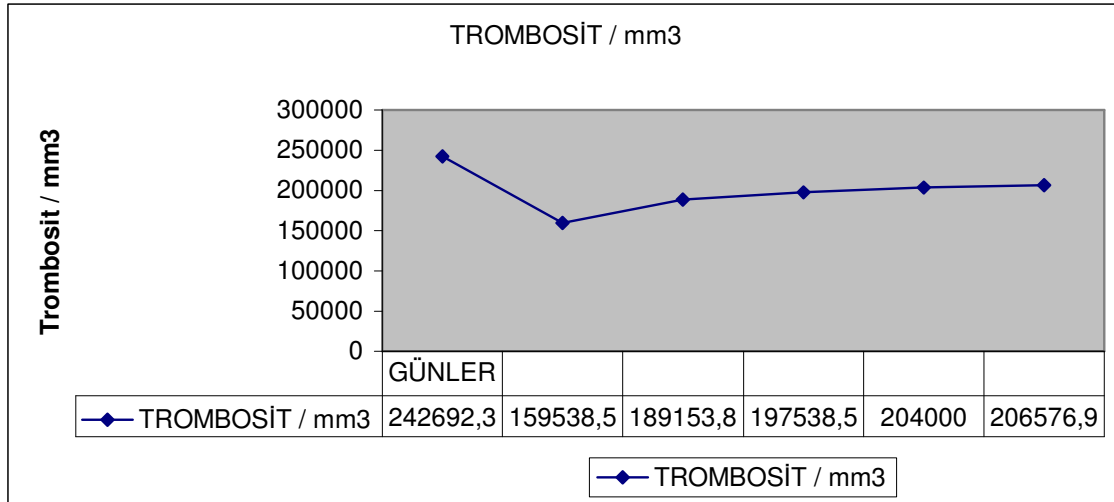
BULGULAR

Çalışmaya 26 sağlıklı donör dahil edildi. Bu donörlerin ortalama yaşları 27.57 ± 3.12 , ortalama lökosit sayıları $6365 \pm 1302/\text{mm}^3$, ortalama hemoglobin düzeyleri 14.8 ± 0.99 mg/dl, ortalama trombosit sayıları $242692 \pm 39544/\text{mm}^3$, ortalama mpv değerleri 8.8 ± 0.57 , ortalama serum trombopoetin seviyeleri 30.21 ± 13.03 pg/ml idi.

Şekil-1 de trombosit toplanması öncesi, sonrası ve 4 günlük periyot boyunca elde edilen ortalama trombosit sayıları gösterilmiştir. Şekil-2 de ise donörler arasındaki trombosit sayılarındaki değişkenlik göz önünde bulundurulduğu için aferez öncesi değer % 100 olarak kabul edilip bu değere göre aferez sonrası ve 4 günlük periyot boyunca olan değişimler % olarak gösterilmiştir. Trombosit sayısı, aferez öncesi değerine göre aferez sonrası ortalama olarak en düşük 65.74 ± 1.2 saptandı.

Trombosit sayısındaki belirgin artış, aferez sonrası 1. günde meydana geldi ama dolaşımdaki trombositlerin normale dönmesi gecikti.

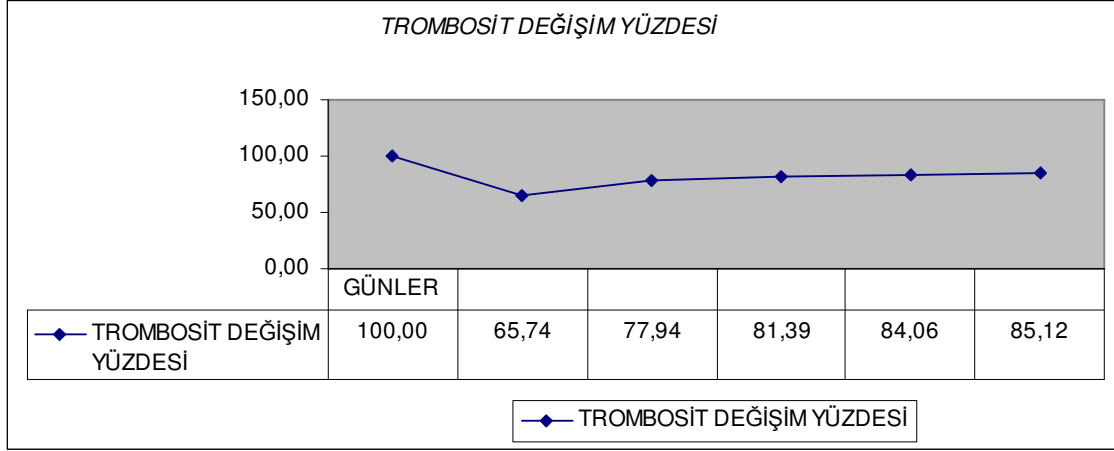
Şekil-1 *Ortalama trombosit sayıları*



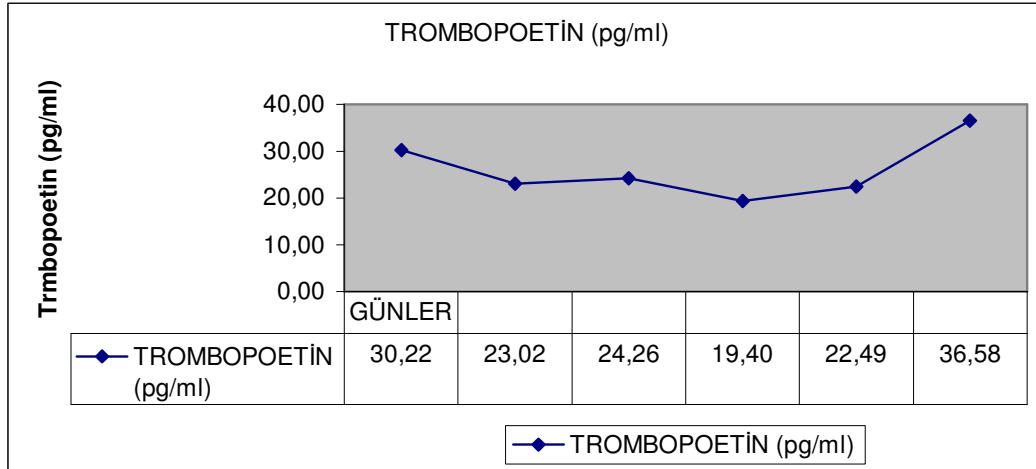
Aferez işlemi sonrası trombosit sayısındaki değişimle beraber elde edilen serum trombopoetin konsantrasyonundaki değişimler Şekil-3 de gösterildi. Şekil-4 de ise serum trombopoetin düzeyinin aferez öncesi ortalama değerine göre işlemden hemen sonra ve 4 gün boyunca olan yüzde değişimleri gösterildi. Bu çalışmada bazal serum trombopoetin seviyesi ortalama 30.21 ± 13.03 pg/ml olarak bulundu. Serum trombopoetin seviyelerinde aferez işleminden hemen sonra anlamlı bir değişiklik yoktu. Aferez işleminden sonraki ortalama serum trombopoetin düzeyi 23.01 ± 13.39 pg/ml idi. Serum trombopoetin düzeylerinde bazal değere göre artış, trombosit sayısındaki artış 1. günden itibaren başlamasına rağmen 4. günde

meydana geldi. Trombosit sayısındaki artış ile serum trombopoetin düzeyindeki artış arasında bir ilişki saptanmadı. Şekil-5 de serum trombopoetin seviyelerindeki ortalama değişiklikler ile ortalama trombosit sayılarındaki değişiklikler arasındaki ilişki gösterildi.

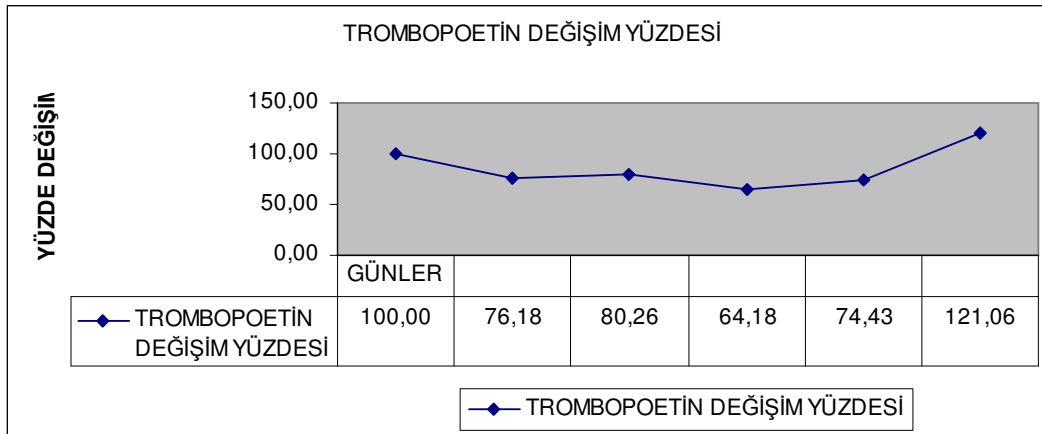
Şekil-2 *Ortalama trombosit sayılarının yüzde değişimleri*



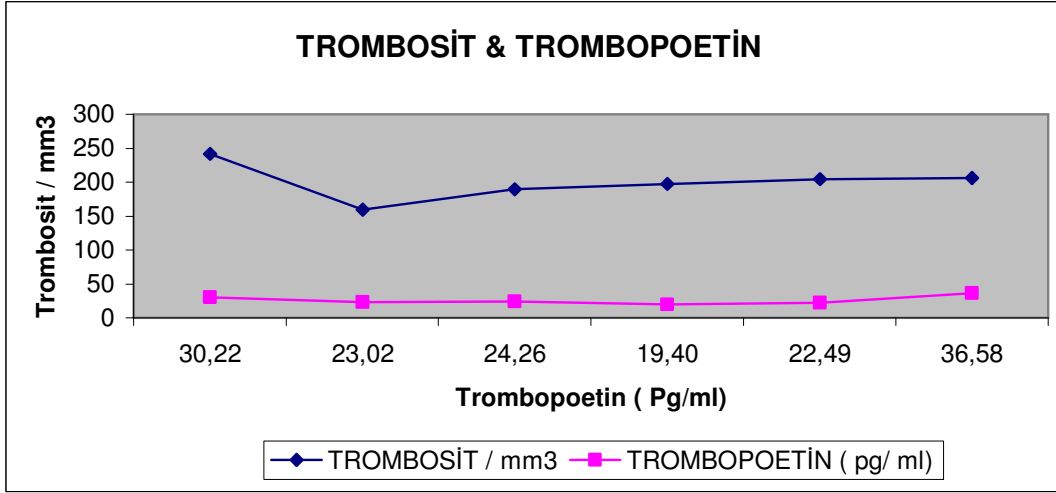
Şekil-3 *Ortalama trombopoetin düzeyleri*



Şekil-4 *Ortalama trombopoetin düzeylerinin yüzde değişimleri*



Şekil-5 Ortalama trombosit sayıları ile trombopoetin düzeyleri arasındaki ilişki



- İşlemden hemen sonra ve 4 gün boyunca trombosit sayıları ile serum trombopoetin seviyeleri arasındaki ilişkinin p değerleri tabloda gösterildi ve istatistiksel olarak trombosit sayısı ile serum trombopoetin düzeyleri arasında $p>0.05$ olduğu için anlamlı fark saptanmadı.

Tablo-1

Trombosit sayısı-TPO seviyesi	P değeri
İşlem sonrası	0,94
1.gün	0,31
2.gün	0,86
3.gün	0,88
4.gün	0,53

- Bazal serum trombopoetin değerine göre işlem sonrası ve 4 gün boyunca serum trombopoetin seviyelerinde $p>0,05$ olduğu için trombosit sayısındaki azalma sonucu beklenen anlamlı bir artış görülmedi.

Tablo-2

Bazal TPO değerine göre TPO değerleri	P değeri
İşlem sonrası	0,12
1.gün	0,15
2.gün	0,05
3.gün	0,96
4.gün	0,56

- Bazal trombosit sayısına göre işlem sonrası ve 4 gün boyunca trombosit sayılarında $p < 0,05$ olduğu için, beklenildiği gibi anlamlı bir azalma görüldü.

Tablo-3

Bazal trombosit sayısına göre trombosit sayıları	P değeri
İşlem sonrası	0,00
1.gün	0,00
2.gün	0,00
3.gün	0,00
4.gün	0,00

- Bazal mpv değerine göre işlem sonrası ve 4 gün boyunca mpv değerlerinde $p > 0,05$ olduğu için beklenildiği gibi anlamlı bir artış görülmedi.

Tablo-4

Bazal mpv değerine göre mpv değerleri	P değeri
İşlem sonrası	0,97
1.gün	0,35
2.gün	0,13
3.gün	0,58
4.gün	0,55

TARTIŞMA

Trombopoez, dolaşan trombositlerin sayı yada hacmine göre trombosit yapım hızının ayarlandığı bir humoral mekanizma ile düzenlenir (2). Megakaryosit ve trombosit gelişiminde değişik sitokinlerin (IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, LIF, GM-CSF, EPO) rol aldığı yıllardır bilinmektedir. Bu sitokinler hematopoetik öncül hücrelerin artışıını desteklemelerine ve koloni yapan unit-megakaryositin (CFU-MK) koloni oluşturmasını teşvik etmesine rağmen sıvı kemik iliği kültürü, kemik iliği koloni ölçümleri ve in vivo araştırmalar bu büyüme faktörlerinin hiçbirisinin megakaryosit sistemine özgül olmadığını göstermişlerdir (29, 115).

Trombositopeni kemik iliği megakaryositlerinde hacim, ploidi ve matürasyon hızı gibi parametrelerde değişikliklere sebep olur. Bu değişikliklerden bir humoral mekanizmanın sorumlu olduğunun kanıtı, trombositopeni oluşturulmasını takiben bu hayvanların plazmasında trombopoetin adı verilen bir trombopoez uyarıcı aktivitenin görülmesidir (7, 52). Gen yok etme tekniği ile trombopoetin eksikliği oluşturulan hayvanlarda trombosit ve megakaryosit sayılarının %80'den fazla azalması bu büyüme faktörünün trombosit üretimini düzenleyen başlıca etken olduğunu işaret etmiştir. Trombopoetin sözcüğü ilk kez yaklaşık 40 yıl önce telaffuz edilmesine rağmen, molekülün tanımlanması ancak 1994 yılında olmuştur. Kanda ve diğer vücut sıvılarında düzeylerinin çok düşük olması ayırıştırılabilmesi için tekniklerin yeterli olmaması nedeniyle molekülün tanımlanması gecikmiştir.

Trombopoetin düzeyini ölçen özgül ELİSA yönteminin kısa bir süre önce uygulamaya girmesiyle çeşitli hastalıklarda trombopoetin düzeylerini ve trombopoetin sekresyonunun regülasyon mekanizmasını araştırmak mümkün olmuştur.

Bu çalışmanın amacı, sağlıklı donörlerde trombosit aferez işlemi sonrasında serum trombopoetin seviyelerindeki olası değişiklikleri değerlendirmektir. Trombopoetin, megakaryopoezdeki anahtar sitokin olarak bilinmektedir (28, 110). Serum trombopoetin seviyelerinin regülasyonunda önemli rol oynayan ana mekanizma, trombosit sayısının azalmasıyla mpl reseptörü aracılığıyla olan trombopoetin klirensinin azalması sonucunda, serum trombopoetin seviyesinin artmasıdır. Daha önceki çalışmalarda trombosit aferez işlemi boyunca meydana gelen trombosit kaybına geçici kompensatuvar bir yanıt olarak serum trombopoetin seviyelerinde bir artış olduğu gösterilmiştir (110, 111). Bu çalışmanın sonuçları, Dettke ve arkadaşları ve Weisbach ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmalarda bulgularla bazı farklılıklar göstermektedir. Bizim çalışmamızda ve diğer 2 çalışmada da çalışmaya dahil edilenler sağlıklı donörlerdir. Dettke'nin çalışmasında 11 erkek ve 12 kadın olmak üzere toplam 23 ve Weisbach'ın çalışmasında da 21 sağlıklı donör çalışmaya dahil

edilmiştir. Her 3 çalışmada da serum trombopoetin düzeyleri ELİSA yöntemiyle ve R&D Systems Minneapolis MN adındaki aynı ticari kit kullanılarak çalışılmıştır. Yine her 3 çalışmada da serum trombopoetin düzeylerini çalışmak için 10 ml kan kuru tüpe alınmış, pıhtılaşması için bekletildikten sonra santrifüj edilip serum örnekleri bizim çalışmamızda -80°C ve diğer 2 çalışmada ise -70°C’de saklanmıştır. Dolayısıyla her 3 çalışmada ölçülen bazal serum trombopoetin düzeylerindeki farklılıklar uygulanan metod ve yöntemdeki farklılık yüzünden değildir.

İşlem öncesi bazal trombopoetin seviyeleri, Dettke ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmadaki bulgulara göre büyük farklılık gösterirken (30.21±13.03 pg/ml vs. 69.2±7.1 pg/ml), Weisbach ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmadaki bulgulara benzer bulunmuştur (30.22±13.03 pg/ml vs. 49.5±25.5 pg/ml).

Her 3 çalışmada da trombosit aferez işlemi sonrasındaki trombosit sayısındaki azalma benzerdi (Bizim çalışmamızda yaklaşık %24, Dettke’nin çalışmasında %28, Weisbach’ın çalışmasında %31 oranında trombosit sayıları azalmıştır). İşlem sonrasında trombosit sayılarındaki azalma ve takip eden günlerdeki artışlar benzer olmasına rağmen serum trombopoetin düzeylerindeki değişiklikler benzer değildi. Dettke ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, trombosit aferez işleminden hemen sonra serum trombopoetin seviyelerinde kısa dönemde herhangi bir değişiklik yokken, serum trombopoetin seviyesi trombosit sayısının azalmasıyla beraber 1. günde artmaya başlamış ve 2. günde pik yapmıştır (bazal serum TPO seviyesi 69.2±7.1 pg/ml ve 2. gün serum TPO seviyesi 117±6.8 pg/ml p<0.05). İşlem sonrası 3. ve 4. günde ise trombosit sayısının artmasıyla beraber serum trombopoetin seviyelerinde bir azalma meydana gelmiştir. Weisbach ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda da benzer şekilde trombosit aferez işlemi sonrası, serum TPO seviyesi 1. günde pik yapmıştır (bazal serum TPO seviyesi 49.5±25.5 pg/ml ve 1. gün serum TPO seviyesi 56.9±26.7 pg/ml p=0.01). Bu çalışmada ise, diğer çalışmalarla benzer şekilde işlem sonrasında trombosit sayısı azalmasına rağmen, serum trombopoetin seviyelerinde anlamlı derecede bir artış meydana gelmemiştir (bazal serum TPO seviyesi 30.22±13.03 pg/ml, 1. gün serum TPO seviyesi 24.26±14.92 pg/ml ve 2. gün serum TPO seviyesi 19.40±10.26 pg/ml p>0.05). Dettke ve arkadaşları ve Weisbach ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda trombosit aferez işlemi sonrası 1. ve 2. günlerde görülen serum TPO seviyelerindeki anlamlı derecedeki artış, işlem sonrası trombosit sayısının azalmasına cevap olarak geçici kompensatuvar bir yanıt olarak değerlendirilmiştir.

Günümüzde trombopoetin salınımının nasıl düzenlendiği henüz tam olarak anlaşılammıştır. Serum trombopoetin seviyelerinin regülasyonundaki esas mekanizma olan c-mpl reseptör aracılı yıkım mekanizmasına göre; serum TPO seviyeleri trombosit ve/veya megakaryosit yüzeyinde bulunan c-mpl reseptörü aracılığıyla TPO'in alım ve yıkımı tarafından düzenlenmektedir(52). Dolaşımdaki trombosit sayısı fazla olduğunda trombositlere c-mpl reseptörleri aracılığıyla bağlanan TPO miktarı artacağı için serum TPO seviyeleri düşerken, dolaşımdaki trombosit sayısı düşük olduğunda ise trombosit yüzeyine c-mpl reseptörleri aracılıyla bağlanan TPO miktarı azaldığı için serum TPO seviyeleri artmaktadır. Dettke ve arkadaşları ve Weisbach ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda elde ettikleri bulguyu, bu sonuca bağlamışlardır. Kemoterapi, radyasyon ve anti trombosit antikorlarla oluşturulan deneysel trombositopeni ile ilgili çalışmalarda dolaşan trombosit kitlesi ile serum trombopoetin seviyeleri arasında ters bir ilişki olduğu gösterilmiştir (52, 112). Buna karşın insanlarda yapılan başka gözlemler megakaryosit kitlesinin serum trombopoetin seviyelerinin esas düzenleyicisi olabileceği yönündedir (113). Bu uyumsuzluğu anlamak için iki farklı mekanizma ile eşit derecede trombositopeni oluşmuş olan aplastik anemili ve idiopatik trombositopenik purpuralı hastalarda serum trombopoetin seviyeleri ölçülmüş ve aplastik anemili hastalarda serum trombopoetin seviyelerinin normalin 3-19 katı yüksek olduğu, trombosit yıkımından dolayı akut trombositopenisi olan hastalarda ise serum trombopoetin düzeylerinin tespit edilemeyecek kadar düşük olduğu gözlenmiştir.

Trombosit sayısı eşit olmasına rağmen idiopatik trombositopenik purpuralı hastalardaki serum trombopoetin seviyeleri ile aplastik anemili hastalardaki serum trombopoetin seviyelerinin önemli oranda farklı olduğu bulunmuştur (55). Bu çalışmada megakaryosit kitlesi, trombosit turnoveri veya megakaryositik fonksiyonların bazı parametrelerinin serum trombopoetin seviyelerinin ana düzenleyicisi olduğu görülmektedir. Yine von den Borne'nin idiopatik trombositopenik purpuralı hastalarda yaptığı ve trombopoetin düzeyleri ile trombosit sayıları arasında ilişki kurmadığı çalışma da serum trombopoetin düzeyinin regülasyonunda trombosit kitlesi yanında megakaryosit kitlesinde önemli olduğunu desteklemiştir. Bu araştırıcı da İTP'lı hastalarda trombopoetin düzeyleri ile trombosit sayısı arasında bir ilişki bulunmamasını bu olgularda artmış olan megakaryosit sayısına bağlamıştır (114). Bu bilgiler ışığı altında trombosit sayısının dolaşımda azaldığı durumlarda megakaryosit sayısının arttığı ve ölçülebilen serbest serum trombopoetin düzeylerinin artmamasının artmış megakaryosit sayısına bağlı olduğu düşünülebilir. Dolayısıyla bizim yaptığımız çalışmada, trombosit aferez işlemi sonrası trombosit sayısı azalmıştır ancak

vücuttaki megakaryosit kitlesi azalmadığı için serum trombopoetin düzeylerinde trombosit sayısının azalmasıyla beraber bir artış görülmemiş olabilir.

MPV değerlerinde de işlem sonrasında ve takip sürecinde farklı sonuçlar elde edilmiştir. Weisbach ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada işlem sonrası ve takip süresince MPV düzeylerinde anlamlı bir artış saptanmıştır. MPV'deki bu artışın trombosit kaybına en erken hematopoetik cevabı yansıtabileceğini ileri sürmüşlerdir. MPV düzeylerindeki bu anlamlı artış bizim çalışmamızda ve Dettke ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da saptanmamıştır.

Bizim çalışmamızda trombosit aferez işlemi sonrasında ve takip süresi boyunca trombosit sayısı ile serum trombopoetin düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki gösterilemedi. İşlem sonrası ve takip süresi boyunca dolaşımdaki trombositlerin sayısındaki en belirgin artış 1. günde meydana geldi. Ancak bu dönemde serum trombopoetin düzeyinde artış gözlenmedi. Takip eden günlerde de trombosit sayısında artış olmasına rağmen serum trombopoetin düzeylerinde artış gözlenmedi. Bu durum erken dönemde trombosit sayısındaki artışın kemik iliği kaynaklı değil, trombosit depo havuzu olan dalaktan trombositlerin dolaşıma hızlı mobilizasyonuna bağlı olabilir. Trombosit aferez işlemi sonrasında intervallerin artmasıyla ilerleyen günlerde trombosit üretimine trombopoetin aracılı stimülasyonun kısmi katkısı önem kazanabilir. Bu varsayımla uyumlu olarak sağlıklı, gönüllü donörlere rekombinant trombopoetin verilmesi sonrasında dolaşımdaki trombositlerde gecikmiş bir artış görülmektedir. Sağlıklı aferez donörlerine tek doz rekombinant trombopoetin injeksiyonu sonrasında trombosit sayısındaki maksimum artış 10-14. günler arasında meydana gelmiştir (116, 117, 118). Kemoterapi öncesi tek doz rekombinant trombopoetin verilmesiyle hastaların çoğunda dolaşımdaki trombosit sayısında artışın 4. günde başlayıp 12. günde pik yaptığı gözlenmiştir. Dolaşımdaki trombosit sayısındaki bu artışa kemik iliğindeki megakaryositlerde de 4 katlık bir artış eşlik etmiştir (119).

Sonuç olarak bizim çalışmamızda trombosit aferez işlemi sonrasında dolaşımdaki trombosit sayısı ile serum trombopoetin düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki gözlenmedi. Biz işlemle ilgili trombosit kaybını yerine koymak için gereken kompensatuvar yanıtın erken dönemde trombosit depo havuzu olan dalaktan dolaşıma trombositlerin hızlı salınımına bağlı olduğunu, trombopoetin ise daha geç dönemde bu yanıtta etkili olabileceğini yada megakaryosit kitlesinde azalma olmadığı için bu yanıtta çok az etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Kuter DJ: Thrombopoietin: biology and clinical applications. *Oncologist* 1: 1996; 98-106.
2. Stenberg PE, Hill RJ. Platelets and megakaryocytes. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers (eds). *Clin Hematol*, vol 1, tenth edition. Maryland : Williams and Wilking A Waverly Com. 1999; 615-60.
3. Joseph J. Mazza; *Manual of Clinical Hematology*, third edition, Lippincott Williams & Wilkins. 2002; 180-93.
4. Varda R. Deutsch and Aaron Tomer: Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol*. 2006; 134, 453-66.
5. Quentmeier H, Zaborski M, Graf C, Ludwig WD, DrexlerHG: Expression of the receptor MPL and proliferative effects of its ligand thrombopoietin on human leukemia cells. *Leukemia* 10:1996; 297-310.
6. Corash L, Chen HY, Levin J, Baker G, Lu H, Mok Y. Regulation of thrombopoiesis: effect of the degree of thrombocytopenia on megakaryocyte ploidy and platelet volume. *Blood* 1987; 70: 177-85.
7. Wedling F, Maraskovsky E, Debili N, Florindo C, Teepe M, Titeux M, et al. C-Mpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature*; 1994;369: 571-3.
8. Kaushansky K: Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood* 1995 86 (2): 419-31.
9. Bartley TD, Bogenberger PH, Li YS, Lu HS, Martin F, Chang MS, Samal B, Nichol JL et al. : Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for cytokine receptor mpl. *Cell* 1994; 77: 1117-24.
10. Lok S, Kaushansky K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, Grant FJ, Heipel MD, Burkhead SK et al. : Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* 1994 369: 565-7.
11. Drexler HG, Quentmeier H: Thrombopoietin: expression of its receptor MPL and proliferative effect on leukemic cells. *Leukemia* 1996; 10: 1405-21.
12. Kaushansky K, Nimer SD, Gordon MS, Begley CG: Megakaryocyte growth factors: role in pathophysiology and results of clinical trials. In: *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* Mc Arthur JR (ed) 1996, s: 147-60.
13. Wun T, Pagliero T, Hammond WP, Kaushansky K, Foster DC. Thrombopoietin is synergistic with other hematopoietic growth factors and physiologic platelet agonists for platelet activation in vitro. *Am J Hematol*. 1997; 54: 225-32.

14. Cohen-Solal K, Debili N, Vainchenker W, Wendling F: Thrombopoietin (mpl-ligand) and the regulation of platelet production. *Thromb Haemostas* 1997;78 (1): 37-41.
15. Zucker-Franklin D. Megakaryocyte and their progeny: Current insights and perspectives. In lectures book of 13. meeting of the international society of haematology. Ed Ulutin O. İstanbul, Türkiye, 1995:212-7.
16. Kuefer MU, Wang WC, Head DR, Williams JA, Furman WL, et al. Thrombopoietin level in young patients is related to megakaryocyte frequency and platelet count. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998; 220 (1): 36-43.
17. Zeigler FC, de Sauvage F, Widmer R, Keller GA et al. In vitro megakaryocytopoietic and thrombopoietic activity of c- mpl ligand (TPO) on purified murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1994; 84 (12): 4045-52.
18. Wendling F. Thrombopoietin: its role from early hematopoiesis to platelet production. *Haematologica* 1999; 84: 158-66.
19. Kaushansky K. Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell. *Ann N Y Acad Sci* 2005, 1044: 139-41.
20. Kaushansky K. Lineage specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med*, 2006, 354: 2034-45.
21. Kelemen E, Cserhati I, Tanos B, Demonstration of some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic serum, *Acta Haematol.* 20 (1958) 350-55.
22. John E. J. Rasko, C. Glenn Begley, Molecules in focus the thrombopoietic factor, Mpl-ligand, *Int J Biochem Cell Biol.* 30 (1998) 657-60.
23. de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-mpl ligand. *Nature* 1994; 369: 533-38.
24. Wendling F, Varlet P, Charon M, Tambourin P. MPLV: a retrovirus complex including an acute myeloproliferative leukemic disorder in adult mice. *Virology* 1986; 149 (2): 242-6.
25. Souyri M, Vigon I, Penciollelli J-F, et al. A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. *Cell* 1990; 63 (6): 1137-47.
26. Vigon I, Mornon J-P, Cocault L, et al. Molecular cloning and characterization of MPL the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89 (12): 5640-4.
27. Sohma Y, Akahori H, Seki N, et al. Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene. *FEBS Lett* 1994; 353 (1): 57-61.

28. Kuter DJ, Beler DL, Rosenberg RD. The purification of megapoiectin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91 (23): 11104-8.
29. Kaushansky K, Lok S, Holly RD, et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 1994; 369 (6481): 568-71.
30. de Sauvage FJ, Carver-Moore K, Luoh SM, et al. Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. *J Exp Med* 1996; 183: 651-6.
31. Wolber EM, Jelkman W. Thrombopoietin: The Novel Hepatic Hormone. *News Physiol Sci* Vol2002: 17, 6-10.
32. Linden HM, Kaushansky K. The glycan domain of thrombopoietin enhances its secretion. *Biochemistry* 2000; 39: 3044-51.
33. Skoda RC, Seldin DC, Chiang MK, Peichel CL. Murine c-mpl: A member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily that transduces a proliferative signal. *EMBO J* 1993; 12: 2645-53.
34. Vigon I, Florindo S, Guenet JL, Mattei MG, Souyri M, et al. Characterization of the murine Mpl proto-oncogene, a member of the hematopoietic cytokine receptor family: Molecular cloning, chromosomal location and evidence for a function in cell growth. *Oncogene* 1993; 8: 2607-15.
35. Haznedaroglu IC, Goker H, Turgut M, Buyukasik Y, Benekli M. Thrombopoietin as a drug: Biologic expectations, clinical realities, and future directions. *Clin Appl Thrombosis/Hemostasis* 2002, 8(3): 193-212.
36. Drachman JG, Kaushansky K. Structure and the function of the cytokine receptor superfamily. *Curr Opin Hematol* 1995; 2: 22-8.
37. Kaushansky K. Thrombopoietin: From theory to reality. *Thromb Haemost* 1999; 82: 312-17.
38. Sabath DF, Kaushansky K, Broudy VC. Deletion of the membrane distal cytokine receptor homology domain of MPL results in constitutive cell growth and loss of thrombopoietin binding. *Blood* 1999; 94: 365-7.
39. Drachman JG, Kaushansky K. Dissecting the thrombopoietin receptor: Functional elements of the mpl cytoplasmic domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2350-5.
40. Warren S Alexander. Thrombopoietin and the c-Mpl receptor: insights from gene targeting. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999; 31: 1027-35.
41. Kaushansky K. Thrombopoietin: a tool for understanding thrombopoiesis. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1587-92.

42. Ihle JN. Signaling by the cytokine receptor superfamily. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 865: 1-9.
43. Kaushansky K, Drachman JG. The molecular and cellular biology of thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Oncogene* 2002; 21: 3359-67.
44. Geddis AE, Linden HM, Kaushansky K. Thrombopoietin: a pan-hematopoietic cytokine. *Cytokine Growth Factors Rev* 2002; 13: 61-73.
45. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest.* 2005; 115: 3339-47.
46. Ding J, Komatsu H, Wakita A, et al. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood* 2004; 103: 4198-200.
47. Sungaran R, Markovic B, Chong BH. Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human liver, kidney, bone marrow and spleen using in situ hybridization. *Blood* 1996; 89: 101-7.
48. Kaushansky K. Thrombopoietin: basic biology and clinical promise. *Leukemia*, 1997; 11 (suppl. 3), 426-7.
49. Stoffel R, Wiestner A, Skoda RC. Thrombopoietin in thrombocytopenic mice: Evidence against regulation at the mRNA level and for a direct regulatory role of platelets. *Blood* 1996; 87: 567-73.
50. Cohen-Solal K, Villeval JL, Titeux M, Lok S, Vainchenker W, Wendling F. Constitutive expression of Mpl ligand transcripts during thrombocytopenia or thrombocytosis. *Blood* 1996; 88: 2578-84.
51. Cohen-Solal K, Vitrat N, Titeux M, Vainchenker W, Wendling F. High-level expression of Mpl in platelets and megakaryocytes is independent of thrombopoietin. *Blood* 1999; 93: 2859-66.
52. Kuter DJ, Rosenberg RD. The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-mpl) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in rabbit. *Blood* 1995; 85: 2720-30.
53. Gurney AL, Carver-Moore K, de Sauvage FJ, Moore MW. Thrombocytopenia in c-mpl deficient mice. *Science* 1994; 265: 1445-7.
54. Fielder PJ, Gurney AL, Stefanich E, et al. Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl mediated binding to platelets. *Blood* 1996; 87: 2154-61.
55. Emmons RVB, Reid DM, Cohen RL, et al. Human thrombopoietin levels are high when thrombocytopenia is due to megakaryocyte deficiency and low when due to increased platelet destruction. *Blood* 1996; 87: 4068-71.

56. Mukai HY, Kojima H, Todokoro K et al. Serum thrombopoietin levels in patients with amegakaryocytic thrombocytopenia are much higher than those with immune thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* 1996; 76: 675-8.
57. Marsh JCW, Gibson FM, Prue RL, et al. Serum thrombopoietin levels in patients with aplastic anemia. *Br J Haematol* 1996; 95: 605-10.
58. Kosugi S, Kutara Y, Tomiyama Y, et al. Circulating thrombopoietin level in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1996; 93: 704-6.
59. Ichikawa N, Ishida F, Shimodaira S, Tahara T, Kato T, Kitano K. Regulation of serum thrombopoietin levels by platelets and megakaryocytes in patients with aplastic anemia and idiopathic thrombocytopenia purpura. *Thromb Haemost* 1996; 76: 156-60.
60. Houwerzijl EJ, Louwes H, Esselink MT, Smit JW. Increased glyco-calicin index and normal thrombopoietin levels in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura with a decreased rate of platelet production. *Haematologica* 2005; 90: 710-1.
61. Shivdasani RA, Rosenblatt MF, Zucker-Franklin D, et al. Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell* 1995; 81: 695-704.
62. Shivdasani RA, Fielder P, Keller GA, Orkin SH, de Sauvage FJ. Regulation of the serum concentration of thrombopoietin in thrombocytopenic NF-E2 knockout mice. *Blood* 1997; 90: 1821-7.
63. Tahara T, Usuki K, Sato H, et al. A sensitive sandwich ELISA for measuring thrombopoietin in human serum: Serum thrombopoietin levels in healthy volunteers and in patients with haematopoietic disorders. *Br J Haematol* 1996; 93: 783-8.
64. Folman CC, Von dem Borne AE, Rensink IH, et al. Sensitive measurement of thrombopoietin by a monoclonal antibody based sandwich enzyme linked immunosorbent assay. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1262-7.
65. De Gabriele G, Penington DG. Regulation of platelet production: "Thrombopoietin" *Br J Haematol* 1967; 13: 210-15.
66. Broudy VC, Lin NL, Sabath DF, Papayannopoulou T, Kaushansky K. Human platelets display high affinity receptors for thrombopoietin. *Blood* 1997; 89: 1896-904.
67. Stefanich E, Senn T, Widmer R, Fratino C, Keller GA, Fielder PJ. Metabolism of thrombopoietin (TPO) in vivo: Determination of the binding dynamics for TPO in mice. *Blood* 1997; 89: 4063-70.
68. Chang M, Suen Y, Meng G, et al. Differential mechanism in the regulation of endogenous levels of thrombopoietin and interleukin-11 during thrombocytopenia: insight into the regulation of platelet production. *Blood* 1996; 88: 3354-62.
69. Kaushansky K. Thrombopoietin. *N Engl J Med* 1998; 339: 746-54.

70. Kosar A, Haznedaroglu IC, Buyukışık Y, Ozcebe O, Kirazlı S, Dundar S. Circulating thrombopoietin and interleukin-6 in newly diagnosed autoimmune versus aplastic thrombocytopenia. *Haematologica* 1998; 83: 1055-6.
71. Sato T, Fuse A, Niimi H, Fielder PJ, Avraham H. Binding and regulation of thrombopoietin to human megakaryocytes. *Br J Haematol* 1998; 100: 704-11.
72. Sungaran R. The role of platelet alpha granular proteins in the regulation of thrombopoietin messenger RNA expression in human bone marrow stromal cells. *Blood* 2000; 95: 3094-101.
73. Kaser A, Brandacher G, Steurer W, et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood* 2001; 98: 2720-5.
74. Takashi K, Atsushi M, Kinya O, Tomoyuki T, Haruhiko M, Hiroshi M. Native Thrombopoietin: Structure and Function. *Stem cell* 1998; 16: 322-8.
75. Foster D, Lok S. Biological roles for the second domain of thrombopoietin. *Stem cells* 1996; 14 (suppl 1): 102-7.
76. Wada T, Nagata Y, Nagahisa H et al. Characterization of the truncated thrombopoietin variants. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213: 1091-8.
77. Broudy VC, Lin LN, Kaushansky K. Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and IL-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro. *Blood* 1995; 85: 1719-26.
78. Kaushansky K, Broudy VC, Lin N, et al. Thrombopoietin, the mpl ligand, is essential for full megakaryocyte development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1995; 92; 3234-8.
79. Chen J, Herceg- Harjacek L, Groopman JE, Grabarek J. Regulation of platelet activation in vitro by the c-mpl ligand, thrombopoietin. *Blood* 1995; 86: 4054-62.
80. Oda A, Miyakawa Y, Druker BJ, et al. Thrombopoietin primes human platelet aggregation induced by shear stress and multiple agonists. *Blood* 1996; 87: 4664-70.
81. Van Os E, Wu YP, Pouwels JG, et al. Thrombopoietin increases platelet adhesion under flow and decreases rolling. *Br. J. Haematol.* 2003; 121: 482-90.
82. Sitnicka E, Lin N, Priestley GV, et al. The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1996; 87: 4998-5005.
83. Kobayashi M, Laver JH, Kato T, Miyazaki H and Ogawa M. Thrombopoietin supports proliferation of human primitive hematopoietic cells in synergy with steel factor and/or interleukin-3. *Blood* 1996; 88: 429-36.
84. Carver-Moore K, Broxmeyer HE, Luoh S-m, et al. Low levels of erythroid and myeloid progenitors in thrombopoietin and c-mpl deficient mice. *Blood* 1996; 88: 803-8.

85. Ballmaier M, Germeshausen M, Schulze H, et al. C-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood* 2001; 97: 139-46
86. Solar GP, Kerr WG, Ziegler FC, et al. Role of c-mpl in early hematopoiesis. *Blood* 1998; 92: 4-10
87. Kimura S, Roberts AW, Metcalf D, and Aleksander WS. Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 1195-200
88. Verbeek W, Faulhaber M, Griesinger F, Brittinger G. Measurement of thrombopoietic levels: clinical and biological relationships. *Curr Opin Hematol* 2000; 7: 143-9
89. Engel C, Loeffler M, Franke E, Schmitz S: Endogenous thrombopoietin serum levels during multicycle chemotherapy. *Br J Haematol* 1999; 105: 832-8
90. Hamaguchi M, Yamada H, Morishima Y, Morishita Y, Kato Y, Sao H, et al: Serum thrombopoietin level after allogeneic bone marrow transplantation: possible correlations with platelet recovery, acute graft versus host disease and hepatic veno occlusive disease. *Int J Hematol* 1996; 64: 241-8
91. Shimazaki C, Inaba T, Uchiyama H, Sumikuma T, Kikuta T, Hirai H, et al: Serum thrombopoietin levels in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone marrow transplant* 1997; 19: 771-5
92. Kuefer MU, Wang WC, Head DR, Williams JA, Furman WL, Liu Q, et al: Thrombopoietin level in young patients is related to megakaryocyte frequency and platelet count. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998; 20: 36-43
93. Schrezenmeier H, Griesshammer M, Hornkohl A, Nichol JL, Hecht T, Heimpel H, et al: Thrombopoietin serum levels in patients with aplastic anaemia: correlation with platelet count persistent elevation in remission. *Br J Haematol* 1998; 100: 571-6
94. Tamura H, Ogata K, Luo S, Nakamura K, Yokose N, Dan K, et al: Plasma thrombopoietin (TPO) levels and expression of TPO receptor on platelets in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1998; 103: 778-84
95. Hou M, Andersson PO, Stockelberg D, Mellquist UH, Ridell B, Wadenvik H: plasma thrombopoietin levels in thrombocytopenic states: implication for a regulatory role of bone marrow megakaryocytes. *Br J Haematol* 1998; 101: 420-4
96. Sakane Y, Wada H, Kazuyo H, Shimura M, Nakasaki T, Katayama T, et al: Increased thrombopoietin levels in idiopathic thrombocytopenic purpura patients with a poor response to steroid therapy. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9: 315-21
97. Chang M, Quian JX, Lee SM, Joubran J, Fernandez G, Nichols J, et al: Tissue uptake of circulating thrombopoietin is increased in immune mediated compared with irradiated thrombocytopenic mice. *Blood* 1999; 93: 2515-24

98. Li J, Xia Y, Kuter DJ. Analysis of the thrombopoietin receptor (mpl) on platelets from normal and essential thrombocytopenic patients. *Blood* 1996; 88: 545-52
99. Pitcher L, Taylor K, Nichol J, Selsi D, Rodwell R, Marty J et al: Thrombopoietin measurement in thrombocytosis: dysregulation and lack of feedback inhibition in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 1997; 99: 929-32
100. Harrison CN, Gale RE, Pezella F, Mire-Sluis A, MacHin SJ, Linch DC: Platelet c-mpl expression is dysregulated in patients with essential thrombocythaemia but this is not of diagnostic value. *Br J Haematol* 1999; 107: 139-47
101. Moliterno AR, Spivak JL: Posttranslational processing of the thrombopoietin receptor is impaired in polycythemia vera. *Blood* 1999; 94: 2555-61
102. Taksin AL, Couedic JPL, Dusanter-Fourt I, Masse A, Giraudier S, Katz A, et al: Autonomous megakaryocyte growth in essential thrombocythemia and idiopathic myelofibrosis is not related to a c-mpl mutation or to an autocrine stimulation by Mpl-L. *Blood* 1999; 93: 125-39
103. Yamamoto K, Nagata K, Tsurukubo Y, Morishita K, Hamaguchi H. A novel translocation involving 3q21 in myelodysplastic syndrome derived overt leukemia with thrombocytosis. *Leuk Res.* 2000; 24: 453-7
104. Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato- Uranishi M, Ito M, Satoh A, Tsuboi K, Nitta M, Miyazaki H, Iida S, Ueda R. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant positive activating mutation of the c-mpl gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood* 2004; 103: 4198-200
105. Hollen CW, Henthorn J, Koziol JA, Burstein SA: Elevated serum interleukin-6 levels in patients with reactive thrombocytosis. *Br J Haematol* 1991; 79: 286-90
106. Hsu HC, Tsai WH, Jiang ML, Ho CH, Hsu ML, Ho CK, et al: Circulating levels of thrombopoietic and inflammatory cytokines in patients with clonal and reactive thrombocytosis. *J Lab Clin Med* 1999; 134: 392-7
107. Wolber EM and Jelkmann W. Interleukin-6 increases thrombopoietin production in human hepatoma cells HepG2 and Hep3B. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20: 499-506
108. Sasaki Y, Takahashi T, Miyazaki H, Matsumoto A, Kato T, Nakamura K, et al: Production of thrombopoietin by human carcinomas and its novel isoforms . *Blood* 1999; 94: 1952-60
109. Cardier JE. Effects of megakaryocyte growth and development factor (thrombopoietin) on liver endothelial cells in vitro. *Microvas Res* 1999; 58:108
110. Dettke M, Hlousek M, Kurz M, et al. Increase in endogenous thrombopoietin in healthy donors after automated plateletpheresis. *Transfusion* 1998; 38:449-53

111. Weisbach V, Friedlein H, Glaser A, Zingsem J, Zimmermann R, Eckstein R. The influence of automated plateletpheresis on systemic levels of hematopoietic growth factors. *Transfusion* 1999; 39: 889-94
112. Ulich TR, Castillo JD, Yin S, Swift S, Padilla D, Senaldi G, et al. Megakaryocyte growth and development factor ameliorates carboplatin induced thrombocytopenia in mice. *Blood* 1995; 86 (3): 971-6.
113. Nichol JL, Hokom MM, Hornkhol A, Sheridan WP, Ohashi H, Kato T, et al. Megakaryocyte growth and development factor analyses of in vitro effects on human megakaryopoiesis and endogenous serum level during chemotherapy induced thrombocytopenia. *J Clin Invest* 1995; 95: 2973-8.
114. von den Borne A, Folman C, van den Qudenijn S, et al. The potential role of thrombopoietin in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood rev* 2002; 16:57-9.
115. Debili N, Masse JM, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J, et al. Effects of the recombinant hematopoetic growth factors interleukin-3, interleukin-6, stem cell factor, and leukemia inhibitory factor on the megakaryocytic differentiation of CD34+ cells. *Blood* 1993; 82(1): 84-95.
116. Kuter DJ. The use of PEG-rhuMGDF in platelet apheresis. *Stem cells*. 1998;16: 231-42.
117. Kuter DJ, Goodnough LT, Romo J, et al. Thrombopoietin therapy increases platelet yields in healthy platelet donors. *Blood* 2001; 98: 1339-45.
118. Goodnough LT, Kuter DJ, McCullough J, et al. Prophylactic platelet transfusions from healthy apheresis platelet donors undergoing treatment with thrombopoietin. *Blood* 2001; 98: 1346-51.
119. Vadhan-Raj S, Murray LJ, Bueso-Ramos C, et al. Stimulation of megakaryocyte and platelet production by a single dose of recombinant human thrombopoietin in patients with cancer. *Ann Int Med* 1997; 126: 673-81.

TEŞEKKÜRLER

Tezimin gerçekleştirilmesinde emeği geçen asistan arkadaşlarım Dr. Yusuf Yılmaz, Dr. Bülent Gül, Dr. Serkan Torun, Dr. Ünsal Akçalı, Dr. Mehmet Ali Eren, Dr. Enver Yücel, Dr. Ömer Fatih Ölmez, Dr. Bülent Baran, Dr. Babürşah Taşlı, Dr. Önder Bekar, Dr. Koray Ayar, Dr. Mahmut İbanoğlu, Dr. Hasan Orhan, Dr. Erdem Çubukçu, Dr. İbrahim Hayek, Dr. Oğuzhan Öztürk, Dr. Aycan Acer, Dr. Osman Dr. Turgut Kaçan, İnt. Dr. İsmettullah Sayan, İnt. Dr.Emre Gündoğdu, İnt Dr.Ahmet Karaoğlu, İnt Dr. Serhat Cömert ve kan merkezi çalışanlarına teşekkür ederim.

Tezimin planlanması aşamasında destek ve bilgilerini benden esirgemeyen Prof. Dr. Rıdvan Ali, Prof. Dr. Fahir Özkalemkaş ve Yard. Doç. Dr. Vildan Özkocaman'a teşekkür ederim.

Asistanlık hayatımda bana çok şey öğrettiklerine inandığım Prof. Dr. Rıdvan Ali, Prof. Dr.Erdinç Ertürk, Doç. Dr. Ender Kurt, Yard. Doç. Dr. Vildan Özkocaman'a teşekkür ederim.

Asistanlık hayatım boyunca manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim Prof. Dr. Osman Manavoğlu, Prof. Dr. Rıdvan Ali, Doç. Dr. Türkan Evrensel, Doç. Dr. Ender Kurt, Doç. Dr. Murat Kıyıcı, Yard. Doç. Dr. Vildan Özkocaman, Yard. Doç. Dr. Özkan Kanat, Uz. Dr. Murat Keskin, canım arkadaşlarım Dr. Özen Öz, Dr. Güzin Kocamaz, Dr. Feyza Yener Öztürk, Dr. Efnan Şentürk'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca benim her türlü kararımdayanımda olan, beni koşulsuz seven, bana rahat ve huzurlu bir ortam hazırlayarak bugünlere gelmemi sağlayan canım babam Zeki Özal ve canım kardeşim Özde Özal'a teşekkür ederim.

Asistanlık hayatım boyunca bana emeği geçmiş olan tüm İç Hastalıkları A.B.D. öğretim üyelerine, asistan arkadaşlarıma ve tüm çalışan personele teşekkür ederim...

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Fatma Güze ÖZAL

Doğum tarihi: 07.01.1978

Medeni hali: Bekar

Yabancı dili: İngilizce

İlkokul: Ankara Öğretmen Hüseyin Hüsnü Tekışık İlkokulu

Ortaokul: Ankara Ayrancı Lisesi

Lise: Ankara Ayrancı Lisesi

Üniversite: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (1994-2000)

Samsun Bafra Doğanca Beldesi Doğanca Sağlık Ocağında 14 ay pratisyen Hekim olarak çalıştım.