

**T.C.**  
**TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL**  
**ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM**  
**DALI**

Tez Yöneticisi  
Dr. Öğr. Üyesi Seval AKPINAR

**İMMÜN TROMBOSİTOPENİK PURPURALI**  
**HASTALARDA B LENFOSİT ALT GRUPLARININ**  
**ARAŞTIRILMASI**

(Uzmanlık Tezi)

**Dr. Ahmet Tuğser DEMİREL**

TEKİRDAĞ-2023



## **TEŞEKKÜR**

İç Hastalıkları Uzmanlık eğitimim süresince derin bilgi ve tecrübeleriyle eğitimime katkıda bulunan başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Burhan TURGUT'a, tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Seval AKPINAR'a ve tüm hocalarım, hayatımın her anında olduğu gibi asistanlığım boyunca da benden desteklerini esirgemeyen canım anneme, teyzelerime ve yol arkadaşım Dr. Ebru AMET'e teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLolar DİZİNİ.....	iv
SİMGE VE KISALTMALAR.....	v
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. PRİMER İMMÜN TROMBOSİTOPENİK PURPURA .....	5
2.1.1. Etiyoloji.....	5
2.1.2 Epidemiyoloji.....	5
2.1.3 Patofizyoloji .....	5
2.1.4 Laboratuvar .....	6
2.1.5 Ayırıcı Tanı .....	7
2.2 İTP tedavisi .....	7
2.2.1 Erişkinlerde akut İTP tedavisi .....	7
2.2.2 Erişkinlerde Kronik İTP tedavisi.....	10
2.3 Periferik kan lenfosit grupları .....	12
2.3.1Edinsel İmmün Sistem .....	13
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	16
3.1. İstatiksel Metodlar .....	19
4. BULGULAR .....	21
5. TARTIŞMA.....	31
6. SONUÇLAR.....	37
ÖZET .....	39
SUMMARY .....	41
KAYNAKLAR.....	43

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> İTP hastalarında demografi, tedavi yöntemleri ve ek tanılar.....	21
<b>Tablo 2.</b> Hasta ve kontrol gruplarında hematolojik parametrelerin karşılaştırılması .....	22
<b>Tablo 3.</b> Yüzey antijenleri, İgD ve İgM varlığına göre B lenfosit sayılarının hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırılması.....	23
<b>Tablo 4.</b> İTP hastalarında İgD, İgM ve yüzey antijenlerinin farklı kombinasyonlarını taşıyan B lenfosit yüzdelerinin yaş ile ilişkisi.....	24
<b>Tablo 5.</b> İTP hastalarında cinsiyetleri bakımından İgD, İgM ve yüzey antijen kombinasyonlarına sahip B lenfosit yüzdelerinin karşılaştırılması. ....	25
<b>Tablo 6.</b> Yüzey antijenleri, İgD ve İgM'nin farklı kombinasyonlarını taşıyan .....	26
<b>Tablo 7.</b> Ritiksumab tedavisi alan ve ritiksumab tedavisi almayan İTP hastalarında İgD, İgM ve yüzey antijen kombinasyonlarına sahip B lenfosit yüzdelerinin karşılaştırılması. ....	27
<b>Tablo 8.</b> Eltrombopag tedavisi alan ve eltrombopag tedavisi almayan İTP hastalarında İgD, İgM ve yüzey antijen kombinasyonlarına sahip B lenfosit yüzdelerinin karşılaştırılması. ....	28
<b>Tablo 9.</b> Splenektomi yapılan ve splenektomi yapılmayan İTP hastalarında İgD, İgM ve yüzey antijen kombinasyonlarına sahip B lenfosit yüzdelerinin karşılaştırılması... ..	29
<b>Tablo 10.</b> İTP hastalarında İgD, İgM ve yüzey antijen kombinasyonlarına sahip B lenfosit yüzdelerinin hemoglobin, lökosit ve trombosit değerleri ile ilişkisi.....	30

## SİMGE VE KISALTMALAR

- ASH** (american society of hematology): Amerikan Hematoloji Birliği
- CD** (cluster of differantiation): Yüzey farklılaşma antijeni
- CVID** (common variable immune deficiency): Yaygın Değişken İmmün Yetersizlik
- DM** (diabetes mellitus)
- FITC** (fluorescein isothiocyante)
- GPIB** (glikoprotein Ib)
- GP IIB/IIIA** (glikoprotein Iib/IIia)
- HT** (hipertansiyon)
- HIV** (human immunodeficiency virus): İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
- HLA** (human leukocyte antigen): İnsan lökosit antijeni
- IgG** (Immune globulin): İmmünglobulin G
- İTP** (immün trombositopenik purpura)
- İVİG** (intravenöz immünglobulin )
- PE** (phycoerythrin)
- PerCP** (peridinin clorophyll)
- PLT** (platelet): Trombosit
- WBC** (white blood cell): Lökosit

## 1. GİRİŞ

İmmün trombositopenik purpura (İTP), otoantikörlerin trombositlere karşı gelişmesi sonucu trombosit yıkımının olduğu ve trombosit sayısının azlığı ile karakterize bir hastalıktır. Klinikte karşımıza çoğu zaman kanama bulguları için istenen tetkiklerde trombositopeni saptanması ile çıkar, bazen de herhangi bir semptom yokken başka bir nedenle istenen tetkikler sonucunda trombositopeni fark edilir. Trombosit sayısı  $100 \times 10^3 / \text{mm}^3$  altında olduğunda periferik yayma kullanılarak gerçek trombositopeni olup olmadığı doğrulanır. Sonrasında ise diğer trombositopeni yapan etkenlerin dışlanması ile tanısı konulur.

İTP’de trombosit yıkımı, trombosit membran glikoprotein reseptörlerinden sıklıkla GpIIb/IIIa epitoplarna daha az sıklıkla da GpIb veya HLA antijenine karşı gelişen antikörler nedeniyle meydana gelir. Bu antikörlerle kaplı trombositler mononükleer fagositer sistem hücrelerinin Fc reseptörleri ile tanınarak ortadan kaldırılır. Trombositlerin büyük bir kısmı dalakta, daha az sıklıkta da karaciğerde yıkıma uğrar. Bunu kompanse etmek amacıyla kemik iliğinde trombosit üretimi artar ve sıklıkla megakaryosit miktarında artış gözlenir. İTP patogenezi net olarak anlaşılamamış olsa da İTP’de trombosit ve öncüllerine karşı gelişen bu otoantikörlerin üretiminden otoreaktif B ve T hücrelerinin doğrudan ve dolaylı olarak dahil olduğu bilinmektedir (1). Bu otoreaktif hücreler İTP’de artmaktadır (2). Rituksimab’ın bu otoreaktif B ve T hücrelerine karşı azaltıcı etkisi, İTP hastalarında tedavide kullanılma nedenidir. Bu da İTP hastalarında patogenezi B ve T hücrelerinin etkinliğini göstermektedir. (3,4)

Lenfositler tüm kan hücreleri gibi kemik iliğindeki kök hücrelerinden köken alır, antijen reseptörleri üretir ve olgun hücrelerin karakteristik özelliklerini geliştirirler. Bu olgun B ve T lenfositlere naif lenfositler denir. Kemik iliğinden ve timustan göç eden bu hücreler

antijen uyarıları ile değişim ve olgunlaşmalarını tamamlamak üzere çevresel lenf organlarına göç ederler. Antijenler ile uyarılan lenfositler klonal genişleme yaşar, bir kısmı antijeni elimine eden efektör hücrelere dönüşürken bir kısmı sekonder immün yanıtta rol almak üzere hafıza hücreleri olarak farklılaşır.

Lenfositler ve diğer lökositlerin tanımlanması modern sınıflandırma sisteminde CD (cluster of differentiation-yüzey farklılaşma) antijenleri ile yapılır. CD antijenlerini tanıyan antikolar ile hücrelerin hangi seriye ait olduğu, farklılaşma/olgunlaşma durumları ve diğer özellikleri ortaya konabilmektedir.

B hücreleri kemik iliğinde ilk önce antijenden bağımsız olarak çeşitli gelişim evreleri geçirirler. B hücrelerini oluşturacak hematopoetik kök hücreleri (CD34+CD45+) IL-7'nin etkisiyle pro-B hücrelerini (CD19+CD40+CD43+CD45+) meydana getirir. Gelişim evresine devam eden B hücrelerinde IgM proteini oluşur. Bu IgM eksprese eden lenfositlere immatür B lenfosit (CD45+CD19+CD20+CD22+CD40+IgM+) ismi verilir. İmmatür B lenfositler kemik iliğinden ayrılır ve olgunlaşma evrelerini dalakta tamamlar sonrasında da çevresel lenfoid organlara giderler. B lenfositlerin antijen ile karşılaşmadan önceki son olgunlaşma evresi IgD'nin IgM ile beraber ekspresyonudur. Bu hücrelere naif B hücresi (CD19+CD27-IgD+IgM+) adı verilmektedir (5). Fonksiyonel B hücre reseptörü içeren B lenfositler kan yolu ile çevresel lenfoid organlara göçer. Sonrasında aktif T hücre ve antijen bağımlı evre ile aktifleşen B hücreler germinal merkezlere yerleşir. Burada hafıza B hücresi ve plazma hücresine dönüşen bu hücreler ayrıca dalakta marjinal zondaki germinal merkezlerde de plazma hücresine dönüşmektedir. Dalak foliküllerinde bulunan marjinal zone B hücreleri foliküler B hücreleri ile aynı hücrelerden üretilmektedir (6,7). B hücre alt gruplarının CD antijenlerini tanımlama amacıyla monoklonal antikoların kullanıldığı EuroClass sınıflaması mevcuttur (8);

\*B hücre: CD19+

\*Naif B hücre: CD19+CD27- IgD+ IgM+

\*Marjinal zon B hücresi: CD19+CD27+IgM+IgD+

\*Unswitched hafıza B hücresi: CD19+CD27+CD38-IgM+

\*Switched hafıza B hücresi: CD19+CD27+CD38- IgD- IgM-

\*Plazmablast: CD19+CD27+IgD- IgM-CD38high

Akım sitometride; hücreler yüzeylerinde bulunan ya da hücre içerisindeki proteinlere özgü florosan maddeler işaretli antikolarla inkübe edilerek işaretlenir ve çok renkli immünofenotipik analiz yapılır. Her bir belli antijene karşı geliştirilmiş antikor farklı bir

florosan madde ile ('FITC' fluorescein isothiocyanate, 'PE' phycoerythrin, 'PerCP' peridinin clorophyll gibi) işaretlenmiştir. Bunun sonucunda hücrelerin hangi spesifik antijeni taşıdığı floresan sinyalleri değerlendirilerek belirlenebilmektedir.

Çalışmamızda, kliniğimizde İTP tanısıyla takipli hastalarımızda B lenfosit maturasyon aşamalarını ve değişimlerini gösteren antijenleri belirlemeye yönelik geliştirilmiş DuraClone IM B cells Tube kullanarak akım sitometrik analiz yapılmıştır. Çalışmamızda ana amaç B lenfosit maturasyon durumunun ve farklı alt tip değişimlerinin hastaların tedavi yanıtları ve diğer klinik ve laboratuvar özellikleri ile ilişkisinin ortaya konmasıydı.





## 2. GENEL BİLGİLER

Trombositopeni üç ayrı neden ile gelişebilir. İlk neden azalmış kemik iliği üretimidir, ikinci neden artmış splenik sekestrasyondur, üçüncü neden ise trombosit yıkımının hızlanmasıdır. İTP'nin karmaşık bir patogenezi vardır ve şu anda bu hastalık için spesifik bir teşhis protokolü yoktur. Tanı esas olarak periferik kandaki trombosit yıkımına bağlı trombosit sayısının azalmasına dayanır. İTP'deki trombositopeninin asıl sebebi trombositlere karşı gelişmiş olan otoantikörlerin dolaşımında olan trombositlerin yüzeyine tutunması sonrasında trombosit yıkımına yol açmasıdır. Bu otoantikörlerin oluşmasına neden olan tetikleyici faktör belli değildir ancak monosit alt gruplarının yardımcı T lenfositler ve regülatuar T lenfositler ile direkt etkileşmesi bu durumun meydana gelmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (9). İTP trombosit düşüklüğü, hemorajik epizodlar ve purpura ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. Güncel literatürlerde açılımı immün trombositopenik purpura olarak netleştirilmiştir. İmmün trombositopeni tanısı sekonder trombositopeniye yol açacak diğer etkenlerin dışlanması ile tanı konulur. Diğer trombositopeni yapan nedenler; enfeksiyöz hastalıklar, kollajen vasküler hastalıklar, lenfoproliferatif hastalıklar, gebelik, aşılarda ve ilaçlardır.

İTP'nin 3 evresi vardır ve şu şekilde tanımlanır.

- 1- Yeni tanı İTP: Tanıdan itibaren 3 aydan kısa süredir olmasına denir.
- 2- Persistan İTP: Tanıdan itibaren geçen süre 3-12 ay arasında olup spontan remisyona girmemişse denir.
- 3- Kronik İTP: Tanıdan itibaren 12 aydan daha uzun süredir olmasına denir.

## **2.1. PRİMER İMMÜN TROMBOSİTOPENİK PURPURA**

### **2.1.1. Etiyoloji**

Primer immün trombositopeni, trombosit düşüklüğüne sebep olacak diğer nedenlerin olmaması durumunda izole trombositopeni (trombosit sayısı  $<100 \times 10^3 / \text{mm}^3$ ) ile kendini gösteren otoimmün bir hastalıktır. Primer İmmün trombositopeni diyebilmek için öncelikle diğer trombositopeni sebeplerinin ekarte edilmesi önemlidir. İmmün trombositopeni enfeksiyöz hastalıklara (HIV, Helicobacter Pylori), malignitelere (genellikle adenokarsinom ve lenfomalar), CVID (yaygın değişken immün yetmezlik) ve diğer otoimmün hastalıklara sekonder oluşabilmektedir. Bu hastalıklarda nedeni tam olarak net olmamakla birlikte oluşan antitrombosit antikorlar trombosit yıkımına yol açmaktadır. Tanıda ilaçların sorgulanması da sekonder sebeplerin dışlanması açısından önem taşımaktadır. Aspirin asetazolamid, aminosalisilik asit, karbamazepin, digitoksin, sefalotin, kinidin, meproamat, metildopa, fenitoin, sülfematazin ve rifampin trombositopeniye yol açabilecek ilaçlardır.

### **2.1.2 Epidemiyoloji**

Amerika'da yaşa bağlı İTP prevalansı (trombosit sayısı  $<100 \times 10^3 / \text{mm}^3$ ) 100.000'de 9,5 seviyelerinde, Kuzey Avrupa'da ise 100.000'de 2,68 olarak tespit edilmiştir. Avrupa'da erişkinlerin ortalama tanı yaşı 50 ve ayrıca yaşla birlikte İTP insidansının da arttığı bildirilmiştir (10).

### **2.1.3 Patofizyoloji**

İmmün trombositopeni hücreye özgü glikoproteinlere (GpIIb/IIIa ve GpIb) karşı oluşan antikorların trombosit yıkımını arttırdığı bir hastalıktır. Temel olarak bu antikorlarla kaplanmış olan trombositler retikuloendotelial sistem hücrelerinin Fc reseptörleri ile trombosit opsonizasyonuna sebep olurlar. Bu antikor kaplı trombositler büyük bir kısmı dalakta olacak şekilde daha az sıklıkta da karaciğerde yıkıma uğrar. Bunun sonucunda kompanse etmek amacıyla kemik iliğinde trombosit üretimi artar ve megakaryosit miktarında artış gözlenir. İmmatür megakaryositler büyük ve tek çekirdekli olarak görülebilirler (5, 11).

## 2.1.4 Laboratuvar

Tanı anında trombosit sayısı genellikle  $25-30 \times 10^3/\text{mm}^3$  civarındadır. Sıklıkla ağır İTP olarak sınıflandırılan durumlarda trombosit sayısı  $10 \times 10^3/\text{mm}^3$  altında tespit edilmektedir. Trombositopeninin periferik yayma ile doğrulanması ve trombosit anizositozunun görülmesi önemlidir. Ortalama trombosit hacmini gösteren MPV ('mean platelet volume' ortalama trombosit hacmi) değeri ve trombosit anizositozunu gösteren PDW ('platelet distribution width' trombosit dağılım genişliği) değeri ölçülebilirse eğer; İTP tanısında yönlendirici parametre olarak değerlendirilir (3).

Hemogramda akut kanama nedeniyle normositik anemi, kronik kanama olduğu durumlarda ise demir eksikliği anemisi görülmektedir. Otoimmün hemolitik anemi düşündüğümüz durumlarda coombs testi pozitifliği görülürse Evans Sendromu olarak değerlendirilebilir. Total lökosit sayısı genellikle normaldir. Çocukluk çağında görülen akut İTP olgularında eozinofili, Ebstein-Barr virüs enfeksiyonu olanlarda ise lenfositoz görülebilmektedir (3). Protrombin zamanı ve aktif parsiyel tromboplastin zamanı gibi koagülasyon testleri ise genellikle normal saptanmaktadır.

Günümüzde trombosit ile ilişkili antikor ve benzeri spesifik ve sensitif bir test bulunmamaktadır. Kanda IgG ölçülebilir ancak spesifitesi oldukça düşük olduğundan rutin anlamda tanı amaçlı kullanılmaz. İTP kemik iliğinde spesifik bir değişikliğe yol açmamaktadır. Amerikan Hematoloji Birliği tarafından (ASH; the Association of American Hematology) tanı anında 60 yaşın altında olan ve tedaviye yanıt vermiş İTP hastalarında kemik iliği biyopsisi önerilmemektedir (12). Klinik ve laboratuvarında atipik bir bulguya rastlanmaz ise ileri tetkik ve incelemeye gerek yoktur.

### 2.1.4.1 Antitrombosit antikorlar

Primer İTP tanısı temelde klinik değerlendirme sonrasında sekonder trombositopeni yapan nedenlerin dışlanması ile konulmaktadır. 1980'li yıllarda trombosit ilişkili Ig alt tipinin İTP'de yükseldiği görülmüş ancak sonrasında spesifitesinin düşük olduğu fark edilerek tanı amaçlı kullanılmamıştır. 1990'lı yıllarda antikorların trombosit yüzeyindeki glikoproteinlere karşı geliştiği tespit edilmiş ancak buna yönelik testlerin fazlasıyla maliyetli olması, spesifite %78-93 iken sensitivitesi %49-66 olması nedeniyle rutin kullanıma girmemiştir (13).

### 2.1.5 Ayırıcı Tanı

Primer İTP olarak değerlendirilen hastalarda sekonder sebepleri dışlamak için bazı testler öncelikli olarak yapılmalıdır. ASH tarafından önerilmekte olan en önemli testlerden ilk ikisi HIV ve HCV'ye karşı gelişen antikorlarıdır. Japonya'da helicobakter pilori prevalansının yüksek olması ve tedavi ile yüksek trombosit yanıtı alınması sebebiyle, helicobakter pilori varlığının da araştırılması önerilmektedir (14).

Detaylı ilaç sorgulamasının yapılması önem arz etmektedir. Tipik olarak ilaç ilişkili immün trombositopeni ilaç başlanmasından 1-2 hafta sonra veya ilaç başlandığı gibi meydana gelir. İlacın kesilmesi sonrasında 1-2 gün içinde normale dönmesi beklenmektedir. İlaç ilişkili immün trombositopeni de meydana gelen antikorlar birkaç yıl daha sebat edeceğinden etiyojinin bulunması çok önemlidir (15). Aspirin asetazolamid, aminosalisilik asit, karbamazepin, digitoksin, kinidin, metildopa, fenitoin, rifampin trombositopeniye neden olabilecek ilaçlardan bir kaçıdır.

### 2.2 İTP tedavisi

İTP tedavi önerilerinin çoğu yüksek düzey kanıtlı randomize kontrollü çalışmalar yerine uzman görüşlerine dayalıdır. ASH tarafından yayınlanmış bir klinik kılavuzu bulunmaktadır. Türk Hematoloji Derneği tarafından yayınlanan kılavuzlarda tedaviye yanıt sınıflandırılmıştır ve yanıt için kanama bulgularının olmaması gerektiği bildirilmiştir. Tedavi yanıtı şu şekilde yapılmaktadır;

Tam yanıt: Trombosit sayısının  $> 100 \times 10^3 / \text{mm}^3$  olmasıdır,

Kısmi yanıt: Trombosit sayısı  $30-100 \times 10^3 / \text{mm}^3$  arasında olması ya da tanı anındaki trombosit değerinin en az iki katına ulaşmış olmasıdır.

Yanıtız: Verilen tedavilere rağmen trombosit sayısının  $< 30 \times 10^3 / \text{mm}^3$  olması ya da tanı anındaki trombosit değerinin iki katına ulaşmamasıdır.

Kortikostreoid bağımlılığı: Trombosit değerinin  $> 30 \times 10^3 / \text{mm}^3$  olması ya da semptomların engellenebilmesi için sürekli ya da ara ara en az 2 ay olacak şekilde kortikosteroid kullanılmasıdır.

Refrakter İTP: Splenektomi yapılmasına rağmen tedavi ihtiyacı devam eden hastalar için kullanılır (13).

#### 2.2.1 Erişkinlerde akut İTP tedavisi

Erişkinlerde trombosit sayısı ile kanama doğrusal orantılıdır. ASH ('American Society of Hematology' Amerika Hematoloji Topluluğu) tarafından yayınlanan İTP kılavuzuna göre

trombosit sayısı  $<30 \times 10^3/\text{mm}^3$  ise kanama olması beklenmeden hastaya uygun dozda steroid tedavisi başlanması önerilmektedir. Trombosit sayısı  $<20 \times 10^3/\text{mm}^3$  olan hastalarda ise asemptomatik olsalar bile hastaneye interne edilerek tedaviye başlanması önerilmektedir. Trombosit sayısı  $50 \times 10^3/\text{mm}^3$ 'ün üzerinde olan hastalarda kanama semptomları çok beklenmezken, bu hastalarda semptom olmasa dahi operasyon planlanması durumunda tedavi planlanması gerektiği belirtilmektedir (16).

Literatürde İTP hastalarına yönelik olarak yapılmış retrospektif çalışmalarda yetişkin hastaların tedaviye yanıtının iyi olduğu ve sağlıklı popülasyona kıyasla mortalitenin belirgin artmadığı gösterilmiştir (17). Kohli R. ve Chatuverdi S. (18) tarafından yayınlanan bir makalede İTP'de mortalite oranının genel popülasyona nazaran daha yüksek olduğu bildirilmiş olup mortalitenin çoğunlukla kanama, tedavilere sekonder gelişen enfeksiyonlar ve artmış hematolojik malignite görülme riski nedeniyle meydana geldiği bildirilmiştir.

İTP yaşlı hastalarda daha az görülmektedir. 45 yaşından büyük yetişkinlerde İTP daha az görülmekle birlikte bu hasta grubu tedaviye daha dirençli ve kanama komplikasyonlarının daha sık görüldüğü ve mortalite oranlarının arttığı bildirilmiştir. Cohen YC ve arkadaşları (19) tarafından yapılan bir çalışmada 49 tane İTP hastası değerlendirilmiş. 40 yaş altındaki İTP tanılı hastalarda mortalite %2,2 iken 60 yaş üzerindeki grupta bu oran %47.8 tespit edilmiştir.

### **2.2.1.1- Steroid**

İTP'de ilk basamak tedavi seçeneği steroidlerdir. Steroidler, trombositopeni üzerinde direkt ve indirekt olarak etki ederler: dalakta trombosit tüketimini azaltmalarının yanında antikor üretimine de etki ederek antikorların azalmasını sağlarlar. Bunun yanında kemik iliğine de etki ederek trombosit üretimini de arttırmaktadırlar. Temel olarak steroidler erken dönemlerinde Fc reseptör sayısını azaltmaktadır, bununla birlikte kronik kullanımlarında antikor üretimini de azaltırlar ancak bu etkinin sağlanabilmesi için steroidlerin yüksek dozda ve uzun süreli kullanılması gerekmektedir. Steroidlerin bu etkileri dışında ayrıca endotel hücrelerini etkilemesi ve bunun sonucunda kanama semptomlarını da azaltma etkisi mevcuttur. Endotel hücrelerinin bulunduğu kültür ortamına steroid ilave edilmesi sonrasında bu hücrelerin zamanla büyüdüğü ve daha çok birleşme eğiliminde olduğu ayrıca bu hücrelerde protein sentezinin arttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (3).

İTP hastalarında steroid tedavisi ilk olarak Dameshek (20) tarafından 1958 yılında uygulanmıştır. 11'i akut ve 19'u kronik İTP ile takip edilmekte olan toplam 30 hastaya günlük 20-150mg arasında prednizon verilmiştir. Hastaların 22'sinde ortalama 22 gün içerisinde

trombosit sayısında artma görülmüş ve 2,5-15mg/gün prednizon ile takip edilmiş. Diğer 8 hastada ise prednizon relaps görülmeden tamamen kesilebilmiştir.

Yapılan farklı çalışmalara göre, başlangıç doz olarak 1mg/kg/gün prednizolon verilen hastalarda tam veya kısmi remisyon görülme oranları %65-85 arasındadır. Ancak ilaç kesilmesinin ardından remisyon hastaların %25'inde devam etmektedir (21).

Trombosit sayısı genelde 1 hafta içerisinde yükselir ve 2-4 hafta arasında pik seviyesine ulaşır. 4 hafta tedavi verilmesine rağmen yanıt alınamayan hastalarda steroid dışı tedavi seçenekleri düşünülmelidir.

Literatürde immün trombositopenik hastalarda kortikostteroid tedavisini değerlendiren prospektif çalışmalar da mevcuttur. Bellucci ve arkadaşları (22) tarafından yapılmış bir çalışmada İTP tanılı hastalara randomize bir şekilde 0.25mg/kg/gün dozlarında ve 1mg/kg/gün dozlarında prednizolon tedavisi verilmiştir. En az 6 ay süreyle trombosit sayısının  $100 \times 10^3 / \text{mm}^3$ 'ün üzerinde olan hastalar tam remisyon olarak değerlendirilmiştir. Pediatrik hasta grubunda tam remisyon oranı %74, erişkin hasta grubunda %41 olarak bulunmuştur. Pediatrik ve yetişkin hasta gruplarının her ikisinde de bu steroid tedavisinin yüksek ve düşük dozları anlamlı bir fark görülmemiştir.

Kılavuzlar İTP hastalarına başlangıç tedavisi verilmesi planlandığında asemptomatik hastalarda dahi 1mg/kg/gün dozunda prednizolon tedavisi verilmesini önermektedir.

Yapılan bir diğer prospektif randomize kontrollü çalışmada steroid ve İVİG tedavisi karşılaştırılmış; İVİG tedavisi almakta olan hastalarda trombosit sayısının steroid alan hastalara göre daha hızlı yükseldiği görülmüştür. Ancak uzun vadede geleneksel steroid tedavisine kıyasla İVİG vermenin üstünlüğü saptanmadığı belirtilmiştir (23).

Prednizolonun uzun süreli günlük kullanımda ortaya çıkması beklenen yan etkilerinden dolayı yüksek doz deksametazon verilmesiyle ilgili de bir çok çalışma yapılmıştır. İTP hastalarına 4 gün boyunca günlük 40mg olacak şekilde deksametazon tedavisinin verilmesinin %85'lerde bir yanıt oranına sahip olduğu bildirilmiştir (24). Mazzuconi ve arkadaşları (25) yeni tanı İTP hastalarını 4 gün boyunca 40mg/gün deksametazon ile tedavi etmiş, bu tedaviyi 14 günde bir toplam 4 kez olacak şekilde vermiştir. Hastaların %85'i tedaviye yanıt vermiş olup, %65'inde tam remisyon elde edilmiştir. 15 ay sonra relaps görülme oranı %81 tespit edilmiştir.

Bu yapılan çalışmalar nedeniyle son zamanlara kadar ilk basamak tedavi seçimi olarak prednizolon ve deksametazon arasında aykırı görüşler bulunmakla birlikte ASH kılavuzlarında ilk basamak tedavi seçimi klinisyene bırakılmıştır (16).

### **2.2.1.2- İntravenöz immünglobulin (İVİG)**

İVİG tedavisi ilk olarak 1981'de İTP için kullanılmıştır. Temelde Fc reseptör blokajı yapmaları, B hücrelerine olan etkileri ve antiinflamatuvar etkileri sayesinde etkinlik göstermektedirler. İVİG tedavisi en hızlı yanıt alınan yöntem olmakla birlikte maliyetli olduğu için erişkin hastalarda, hayatı tehdit eden kanama durumlarında veya hastanın cerrahi müdahaleye hazırlanması gerektiği takdirde tercih edilmektedir. Uzun dönem etkinliği de steroid tedavisine göre düşüktür. Özellikle pediatrik çağ hastalarında steroidlerle birlikte kullanımı önerilmektedir.

Yapılan 28 çalışma değerlendirildiğinde İTP tanılı 282 erişkin hastada ilk doz İVİG uygulaması sonrası; %64'ünde trombosit sayısının  $100 \times 10^3/\text{mm}^3$ 'ün üzerine, yine bu hastaların %83'ünde ise  $50 \times 10^3/\text{mm}^3$ 'ün üzerinde seyrettiği görülmüştür (26). Trombosit sayılarındaki artış tedavi verilmesinden sonraki iki gün içerisinde gerçekleşmiş ve tedavi verilmesinden bir hafta sonra en yüksek değerlerine ulaşmıştır.

İVİG tedavisinde görülen başlıca yan etki baş ağrısıdır. Bazı hastalarda ateş, miyalji ve deri döküntüsü de görülebilmektedir. İVİG tedavisi verilirken bol sıvı replasmanı gerekmektedir.

### **2.2.2 Erişkinlerde Kronik İTP tedavisi**

İTP eğer 12 aydan daha uzun sürüyorsa kronik İTP şeklinde tanımlanmaktadır. Erişkinlerin büyük bir bölümünde steroide cevap alınmış olsa bile genelde kronikleşmektedir.

Asemptomatik hastalar trombosit  $30 \times 10^3/\text{mm}^3$ - $50 \times 10^3/\text{mm}^3$  aralığındaysa tedavisiz takip edilebilir. Trombosit sayısı  $30 \times 10^3/\text{mm}^3$  altında olan ve semptomatik hastalara yeniden prednizolon ile tedavi verilebilir. Sonrasında trombosit  $30 \times 10^3/\text{mm}^3$  üzerine çıkmasa da kanama semptomları görülmeyecek şekilde doz azaltılabilir. Günde 10mg'dan daha az prednizolon idame tedavisi olarak trombosit sayısı kontrol altında tutulabiliyorsa ek bir tedaviye gerek yoktur. Bazı hastalar trombosit sayısı uzun süre  $10 \times 10^3/\text{mm}^3$  seviyelerinde olmasına rağmen ekimoz ya da peteşi dışında ek kanama bulgusu göstermezler (27). Kronik İTP tedavisinde geleneksel olarak splenektomi hala kullanılan bir yöntemdir. Günümüzde rituksimab ve trombosit stimulan ajanlar da kullanılmaktadır.

#### **2.2.2.1- Splenektomi**

4 hafta süresince steroid tedavisi almasına rağmen trombosit sayısı  $30 \times 10^3/\text{mm}^3$ 'den az olan ya da kanama bulguları devam eden hastalar; steroide yanıtız İTP olarak değerlendirilir. Steroid tedavisine yanıtız olan, trombosit sayısı  $10 \times 10^3/\text{mm}^3$ 'ün altında seyreden ya da steroid doz azaltımı sırasında nüks gelişmiş hastalarda splenektomi düşünülebilir (12).

Yapılan çalışmalarda splenektomi sonrası tam remisyon görülme sıklığı %50-80 seviyelerindedir (28). Operasyon sonrası trombosit sayısı hızla yükselir ve 24-48 saat içerisinde pik değerine ulaşır. Operasyon kaynaklı mortalite oranı %1'in altındadır. Splenektomi öncesi ve sonrasında kapsüllü bakterilere karşı aşılama yapıldığı takdirde operasyon sonrası enfeksiyon riski de oldukça minimaldir.

Splenektomiye yanıtız ya da splenektomiye yanıt verdikten sonra relaps görülen hastalarda aksesuar dalak ön planda düşünölmeli ve araştırılmalıdır (29). Aksesuar dalak nedeniyle olan relaps; splenektomiden aylar hatta yıllar sonra dahi görölebilir. Yapılan çalışmalarda aksesuar dalak bulunma sıklığı splenektomi sonrası relaps olan hastalarda %50 oranında tespit edilmiştir (30).

### **2.2.2.2 Rituksimab**

Ritüksimab, bir anti-CD20 monoklonal antikordur. Apoptozisi indökleme sonrasında antikör ve kompleman bağımlı hücre mediatörlerine toksik etki göstermektedir. Ritüksimab verildikten sonra ortalama 6-12 aylık bir süre içerisinde azalmış olan B hücreler eski değerlerine dönmektedir.

Yapılan çalışmalarda ritüksimab tedavisi almış olan hastaların %40-60'ında trombosit sayısı 6 ay süresince  $50 \times 10^3 / \text{mm}^3$ 'ün üzerinde seyrettiğı tespit edilmiştir (31). Buna rağmen yanıt oranı zamanla düşmektedir. Patel ve arkadaşları (32) tarafından yapılan bir çalışmada 5 yıl sonra remisyonda olan hasta sayısı %26 olarak bildirilmiştir.

Yapılan bir metaanaliz çalışmasında verilmiş tedavilere refrakter ya da bu tedaviler sonrasında nüks gelişmiş olan 299 hasta değerlendirilmiş ve bu hastalarda ritüksimab tedavisinin ardından hastaların %55'inde cevap alındığı bildirilmiştir. Remisyon süreleri ise 24-120 hafta civarında ortalama 74 hafta olarak tespit edilmiştir (33).

### **2.2.2.3 Trombopoezi indökleyici ajanlar**

Refrakter İTP tedavisinde kullanılan diğör ajanlar trombopoezi indökleyici ajanlardır. Günümüzde eltrombopag ve romiplostim olarak iki adet preparat mevcuttur. Eltrombopag peptid yapılı oral bir ajandır ve etkisini trombopoetin reseptörü ile etkileşmesi neticesinde kemik iliğinde megakaryosit üretimini arttırıp farklılaşmasını uyararak göstermektedir (34). Karaciğör enzimlerinde hafif yükseklik, bulantı ve kusma ise en sık görülen yan etkileri arasında sayılmaktadır.

Bu ilaç grubu temel olarak cerrahi öncesinde köprü tedavisi ihtiyacı olan hastalarda, splenektomi ve ritüksimab gibi tedavilerin tercih edilemediğı hastalarda, splenektomi, steroid ya da İVİG sonrasında relaps olan hastalarda kullanılabilir.



Yapılan bir çalışmada eltrombopag verilen İTP hastaları plasebo verilen kontrol grubu ile karşılaştırılmış, eltrombopag kullanımı olan hastaların %59'unda trombosit sayısı  $50 \times 10^3/\text{mm}^3$ 'ün üzerine çıktığı plasebo grubunda ise bu oranın %16 olarak tespit edildiği bildirilmiştir. Ayrıca eltrombopag tedavisi verilen grupta kanama semptomlarının daha az görüldüğü bildirilmiştir. Tedaviye devam etmeyen hastalarda ise iki hafta içerisinde trombosit sayısının düşmeye başladığı görülmüştür (34).

Romiplastim peptid yapılı, trombopoetin reseptörlerine bağlarak etki gösteren enjektabl bir ajandır. Yapılan çalışmalarda başarısı eltrombopag ile benzerdir (35). Yan etkileri temelde bulantı, kusma ve artralji olarak sayılmakla birlikte ciddi yan etkileri nadir olan bu ilacın uzun süreli kullanım durumlarında doz ayarlaması ve trombosit takibi önerilmektedir.

Trombopoetin mimetikleri splenektomi uygulanmış ya da uygulanmamış hasta gruplarında etkili bir seçenektir. Yine de yüksek tedavi maliyeti ve uzun dönem toksisitesi belirsiz olması bu tedavi seçeneğinin refrakter İTP hastalarına saklanması önerilmektedir.

#### **2.2.2.4 İmmüsupresif Ajanlar**

Azatiopürin, siklosporin, mikofenolat mofetil, aktinomisin gibi immüsupresif ajanlar tek başına veya steroid ile birlikte kullanılabilir. İTP tedavisinde etkinlikleri tam olarak bilinmemektedir. İlaç etkinlikleri değişkenlik göstermekle birlikte genelde remisyon kısa sürmektedir. Çocuk yaş grubunda yeterli veri yoktur (36). Kundan mishra ve arkadaşları (37) tarafından 2021'de yayımlanan bir çalışmada azatiopürin sonrasında 95. Günde yanıt oranı %38.1 olarak bildirilmiş ve ilacın en sık görülen yan etkisinin lökopeni olduğu belirtilmiştir. Poudyal ve arkadaşları (38) tarafından yapılan bir çalışmada steroid tedavisine rağmen 21. gününde yanıt alınamayan hastalar steroid refrakter kabul edilmiş ve bu hastalara azatiopürin başlanması neticesinde tedavinin 90. gününde anlamlı yanıt alındığı bildirilmiştir.

### **2.3 Periferik kan lenfosit grupları**

Genel anlamda lenfositlerin tamamı morfolojik olarak birbirine benzese de işlevsel anlamda bakıldığında kökenleri ve fenotipleri ile birbirinden ayrılmaktadırlar. Günümüzde bu hücreler monoklonal antikor panelleri sayesinde tanımlanabilen ve CD olarak adlandırılan yüzey proteinleri ile birbirlerinden ayırt edilebilmektedirler. CD yüzey proteinleri belirli hücre tiplerini ve gelişim evrelerini tanımlama amacıyla kullanılmaktadırlar. Çevresel dolaşımda üç

farklı lenfosit grubu vardır; bunlar T lenfositler, B lenfositler ve natural killer olarak bilinmektedir.

### **2.3.1 Edinsel İmmün Sistem**

Edinsel immün sistem temelde antikor aracılı (hümorale) ve hücresele olmak üzere iki tipten oluşur. Hümorale immün sistemde B lenfositler ve salgıladıkları antikorlar, hücresele immün sistemde ise T lenfositler etki göstermektedir (39). Hümorale immün sistem, hücre dışı patojenlere karşı koruma sağlamaktadır. B lenfositler tarafından üretilen antikorlar, antikor aracılı hücresele sitotoksitite, opsonizasyon, kompleman sisteminin aktivasyonu gibi birçok olayda rol alır (39,40). Antikor aracılı immüniteden sorumlu olan B lenfositler gebeliğin 8. haftasında fetal karaciğerde gelişimine başlar (41). Sonrasında 15. haftadan itibaren kemik iliği, B lenfositlerin gelişiminde fetal karaciğer ile birlikte rol alır (41). Doğumdan sonra B lenfositler yalnızca kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerden gelişir (6). B lenfositler CD19, CD20 CD22 ve CD45 fenotipine sahiptirler.

B hücreleri kemik iliğinde ilk önce antijenden bağımsız olarak çeşitli gelişim evreleri geçirirler. B hücrelerini oluşturacak hematopoetik kök hücreleri (CD34+CD45+) IL-7'nin etkisiyle çoğalarak pro-B hücreler (CD19+CD40+CD43+CD45+) adı verilen hücreleri meydana getirir.

Gelişim evresine devam eden B hücrelerinde IgM proteini oluşur. Bu IgM ekspresyen eden lenfositlere immatür B Lenfosit (CD45+CD19+CD20+CD22+CD40+IgM+) ismi verilir. İmmatür B hücreleri kemik iliğinden ayrılır ve olgunlaşma evrelerini dalakta tamamlar sonrasında da çevresel lenfoid organlara ilerler. IgD ve IgM'nin beraber ekspresyonu olan hücrelere naif B hücresi adı verilmektedir (5). Fonksiyonel B hücre reseptörü içeren B lenfositler kan yolu ile çevresel lenfoid organlara göçer. Sonrasında aktif T hücre ve antijen bağımlı evre ile aktifleşen B hücreler germinal merkezlere yerleşir. Burada hafıza B hücresi ve plazma hücresine dönüşen bu hücreler ayrıca dalakta marjinal zondaki germinal merkezlerde de plazma hücresine dönüşmektedir. Dalak foliküllerinde bulunan marjinal zon B hücreleri foliküler B hücreleri ile aynı hücrelerden üretilmektedir (7,42) Transitional B lenfositler denilen hücreler ise kemik iliğinden kana yeni göç etmiş hücreler için bir tanımlamadır

#### **B hücre tipleri:**

**Marginal zon B hücreler:** Dalakta marginal zon bölgesinde bulunan bu hücreler dolaşımdaki patojenlere karşı ilk savunma görevini üstlenmektedir. Bu bölgenin kanlanması

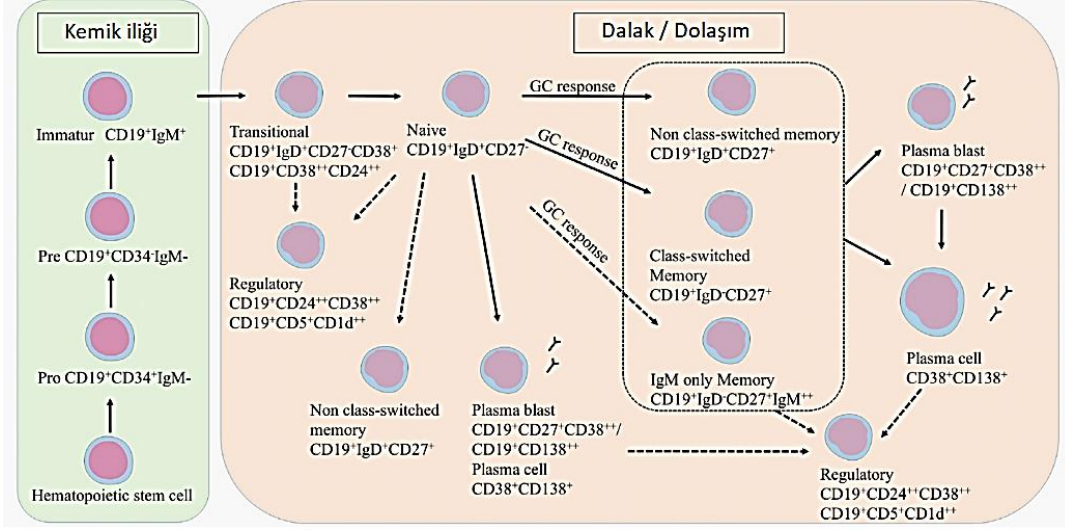
oldukça yoğundur. (43). T hücre bağımlı ve bağımsız olarak B hücrelerinden gelişmekle birlikte daha çok T hücre bağımsız olarak gelişmektedir (44).

**Foliküller B hücreler:** Bu hücreler B2 hücreler olarak da adlandırılmaktadır. Dolaşımda bulunmazlar, sekonder lenfoid dokuların foliküllerinde bulunurlar (44). Bu hücreler enfeksiyon olduğu zamanlarda yüksek afiniteleri antikorları oluştururlar (45).

**Hafıza B lenfositler:** B hücreleri antijen karşılaşması sonrasında plazma hücrelerine veya hafıza hücrelerine dönüşmektedir. Yetişkin bireylerde B lenfositlerin %30-60 kadarı hafıza B hücreleridir. Ortalama olarak bu hücrelerin yarısı da switched hafıza B hücreleridir (46). Hafıza B hücrelerin markerı CD27'dir. CD27+ hafıza B hücreleri iki gruba ayrılmaktadır, unswitched hafıza B hücreler ağırlıklı olarak IgM sentezlerken, switched hafıza B hücreler IgG, IgM, IgA ve IgE sentezlemektedir (46). Switched hafıza B hücreleri T hücre yardımı sonucunda germinal merkezde gelişmektedir. Bu hücreler oto-reaktif antikorlar oluşturabilmektedir. Oluşan bu antikorlar düşük afinitelidir ve sağlıklı bireylerde çok az miktarda bulunmaktadır. Otoimmün hastalıkların gelişiminden bu antikorlar sorumlu tutulmaktadır (48,49).

**Plasmablast:** B hücrelerin farklılaşıp oluşturduğu ve immunoglobulin salgılayan kısa ömürlü bu hücreler antijene karşı erken dönemde oluşmaktadır. Ürettikleri antikorlar plazma hücrelerine göre antijenler için zayıf afiniteye sahiptir. Plasmablastlar T hücrelerine bağlı veya bağımsız olarak gelişmektedirler (45).

**Plasma hücreleri:** B hücrelerinin farklılaşması sonucu oluşan bu hücreler antikor salgılamakla görevli uzun ömürlü hücrelerdir ve proliferasyon olmazlar. Salgıladıkları antikorların antijen afinitesi yüksektir (44). Bu hücreler de temel olarak germinal merkezlerde T lenfositlere bağlı olarak B hücre aktivasyonu sonucu oluşsa da T hücrelerinden bağımsız olarak B hücrelerinin aktivasyonu sonucu oluşabilirler (50). Periferal kandaki B lenfositlerin gelişim şeması ve bu lenfositlerin alt grubu için yüzey belirteçleri Şekil 1'de gösterilmiştir. (51).



**Şekil 1. B lenfosit gelişim basamakları (51)**

### 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada Temmuz 2021 – Eylül 2022 tarihleri arasında Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı'na başvuran İTP tanılı hastalar prospektif olarak değerlendirildi.

#### **Hasta ve Kontroller:**

Çalışmaya toplamda 39 İTP hastası ve 9 sağlıklı yetişkin kontrol grubu olarak dahil edildi. Dahil edilen İTP hastalarının takipleri ve tedavileri kliniğimiz tarafından devam ettirilmekte idi. Çalışmaya katılan hastalarda özellikle aldıkları tedavi sonrasında tam yanıt ve kısmi yanıt şartı arandı. Tedaviye yanıtız hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

Hastaların ilk tanı anındaki en düşük trombosit değerleri ve son kontrollerindeki hemogram değerleri kaydedildi. Aldıkları tedaviler üzerinden gruplandırma yapıldı. Birinci basamak tedavi sonrasında rituksimab kullanımı olan hastaların; rituksimab kullanımı üzerinden en az 1 yıl geçmiş olması şartı ile çalışmaya dahil edildi.

Gebe olan hastalar, ilk tedavisi verildiğinde 18 yaş altında olan hastalar, aktif enfeksiyonu olan hastalar, aktif kanseri olan hastalar ve romatolojik hastalığı olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

Çalışmaya, hasta grubu ile yaş ve cinsiyet açısından benzer, 9 kişilik de kontrol grubu alınmıştır.

#### **Kan örneklerinin alınması ve hazırlanması:**

Çalışmaya dahil edilen İTP tanılı hastalar rutin poliklinik kontrolleri sırasında bilgilendirilerek rutin tetkiklerine ek olarak 4 ml kan örneği alındı ve hematoloji laboratuvarında akım sitometrisi cihazı ile çalışıldı.

#### **Akım sitometrik analiz:**

Alınan kan örnekleri hematoloji laboratuvarında bulunan akım sitometrisi cihazında çalışıldı. DuraClone IM B cells tube kullanılarak 8 renkli akım sitometrik analiz yapıldı. Her bir Duraclone tüpünde IgD-FITC (Fluorescein isothiocyanate), CD21-PE (Phycoerythrin), CD19-ECD (Phycoerythrin-Texas Red-x), CD27-PC7 (Phycoerythrin- Cyanine 7), CD24-APC (Allophycocyanin), CD38-APC-A750 (Allophycocyanin – Alexa Fluor 750), IgM-pacific Blue, CD45-Krome Orange boyları mevcuttu. Hastalardan alınan örneklerden 100 µl alınıp 2 defa isoflow ile yıkama yapıldı. Yıkamış örnekten 100 µl alınıp Duraclone tüpüne eklenerek 2000 µl VersaLyse solüsyonu eklenerek 15 dakika inkübasyon edildi. İnkübasyon sonucu 5 dakika daha santrifüj edilen örnek prospektüse uygun olarak çalışıldı. Euroclass sınıflamasında kullanılan monoklonal antikorlar kullanılarak B hücre alt grupları aşağıdaki şekilde tanımlandı (8):

\*B hücre: CD19+

\*Naif B hücre: CD19+CD27– IgD+ IgM+

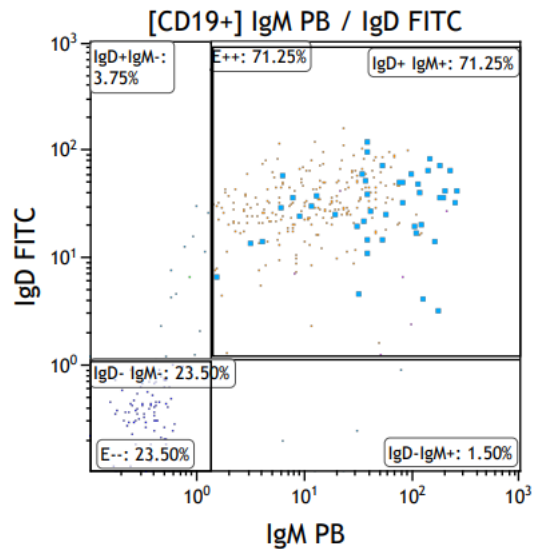
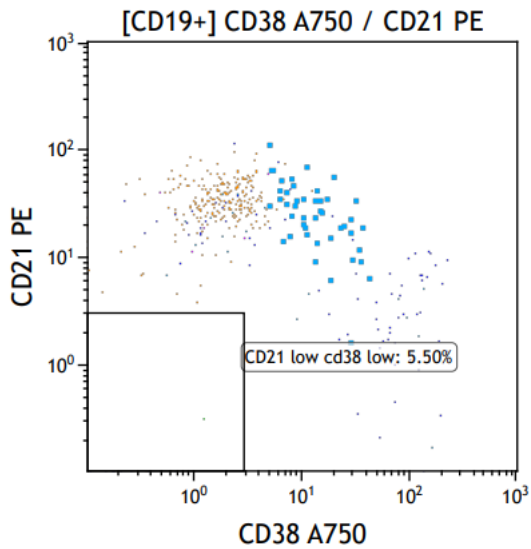
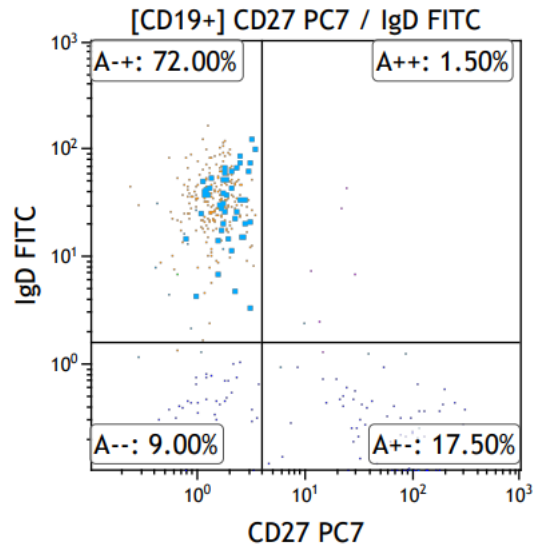
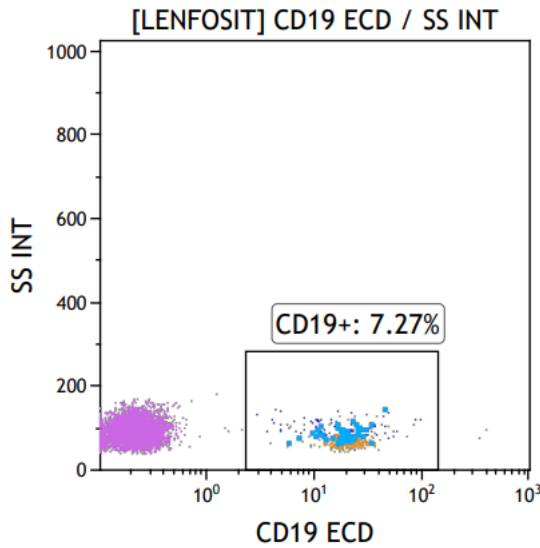
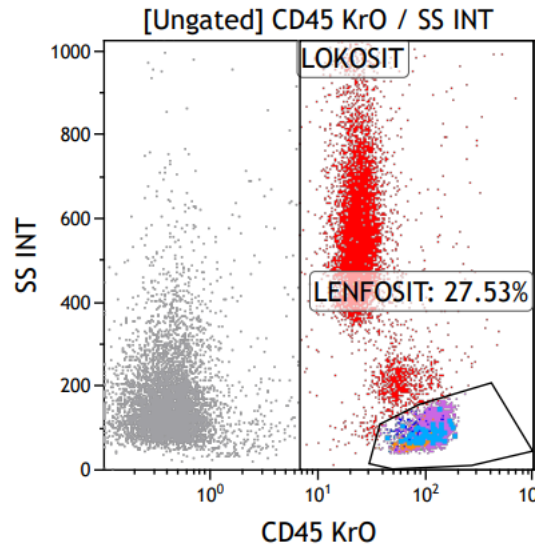
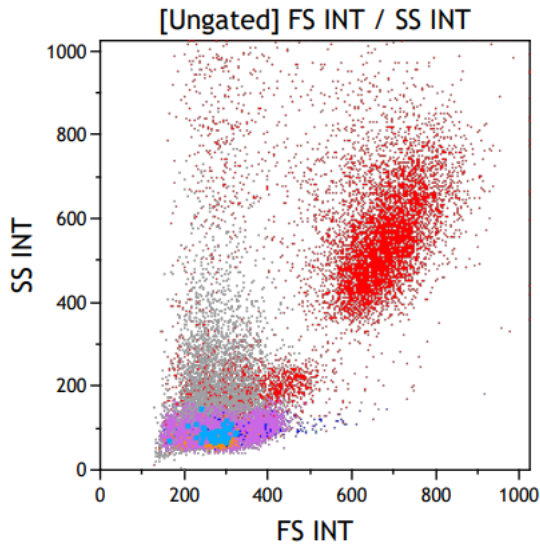
\*Marjinal zon B hücre: CD19+CD27+IgM+IgD+

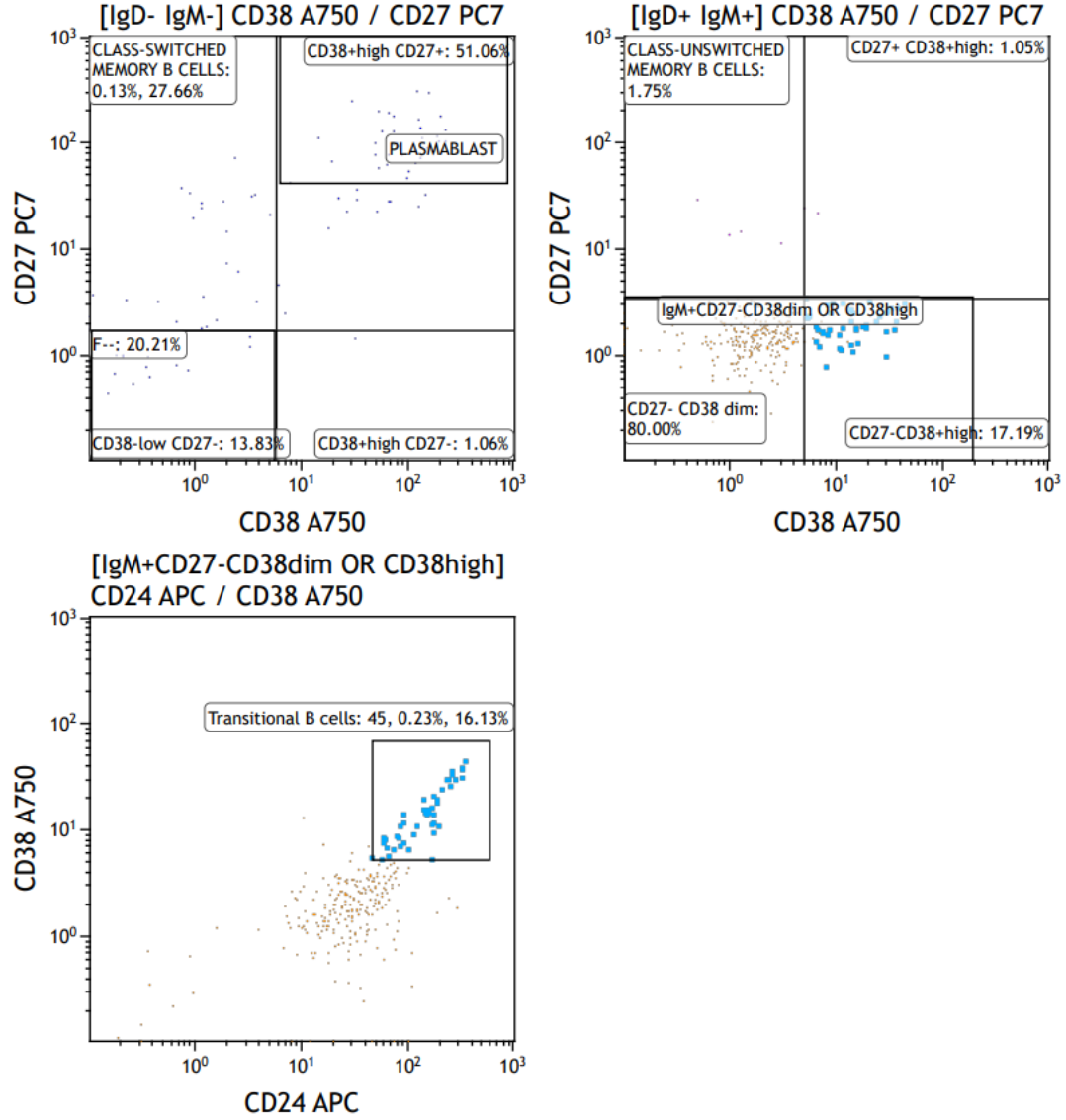
\*Unswitched hafıza B hücre: CD19+CD27+CD38-IgM+

\*Switched hafıza B hücre: CD19+CD27+CD38- IgD– IgM–

\*Plazmablast: CD19+CD27+IgD- IgM–CD38high

Şekil 2’de örnek bir hastanın flow sitometri görüntüsü mevcuttur.





Şekil 2. 8 renkli immünofenotipik analiz ile B lenfosit alt tiplerinin belirlenmesi

### 3.1. İstatiksel Metodlar

Çalışmamız neticesinde toplanmış veriler için özetlemede tanımlayıcı istatistikler dağılıma bağlı olarak ortalama, standart sapma veya medyan olarak tablolaştırıldı. Kategorik olan değişkenler sayı ve yüzde olarak şekilde özetlendi. Bu sayısal değişkenliklerde normallik Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov ve Anderson-Darling testleri ile kontrol edildi.

Bağımsız iki grup karşılaştırılmalarında; sayısal değişkenlerin normal dağılım gösterdiği durumlarda Independent Samples T-test, normal dağılım göstermediği durumlar için ise Mann Whitney U test kullanıldı.



Sayısal değişkenlerin karşılaştırıldığı durumlarda; normal dağılım gösteriyorsa Pearson's r korelasyon katsayısı, bu sayısal değişkenlerin normal dağılım göstermediği durumlarda ise Spearman's Rho korelasyon katsayısı kullanıldı.

İstatistiksel analizler *Jamovi (Version 2.2.5.0)* ve *JASP (Version 0.16.1)* programları ile yapılmış olup, istatistik analizlerde anlamlılık düzeyi  $<0.05$  (p-value) olarak dikkate alındı.



## 4. BULGULAR

İTP hastalarının ortalama yaşı  $46.58 \pm 13.61$  idi ve hastaların 27'si (%69.2) kadındı. Benzer şekilde seçilmiş olan kontrol grubunda ortalama yaş  $34.8 \pm 12.65$  idi ve kontrol grubundaki sağlıklı bireylerin 6'sı (%66.6) kadındı. 10 (%25.6) hastaya rituksimab verilmişken, 15 (%38.5) hasta eltrombopag tedavisi alıyordu ve 7 (%17.9) hastada splenektomi uygulanmıştı, toplam 16 (%41) hasta ise sadece steroid tedavisi ile takip edilmişti. Komorbidite hastaların 10'unda (%20.8) vardı ve hipertansiyon ile diabetes mellitus bu komorbiditeler içinde en sık görülenler idi. Kontrol grubundaki bireylerin herhangi bir ek hastalığı yoktu. (**Tablo 1**).

**Tablo 1.** İTP hastalarında demografi, tedavi yöntemleri ve ek tanılar

	Overall (n=39 hasta 9 kontrol)
<b>Yaş (Hasta grubu) †</b>	46.58 ± 13.61
<b>Cinsiyet (Hasta grubu) ‡</b>	
Erkek	12 (30.8)
Kadın	27 (69.2)
<b>Yaş (Kontrol grubu)</b>	34.8 ± 12.65
<b>Cinsiyet (Kontrol grubu)</b>	
Erkek	3 (33.3)
Kadın	6 (66.6)
<b>Ritüksimab, evet ‡</b>	10 (25.6)
<b>Eltrombopag, evet ‡</b>	15 (38.5)
<b>Splenektomi, evet ‡</b>	7 (17.9)
<b>Sadece Steroid</b>	16 (41)
<b>Ek hastalık durumu ‡</b>	10 (20.8)
DM	5 (50.0)
HT	7 (70.0)
Hipotiroidi	2 (20.0)
Epilepsi	1 (10.0)
Gut	1 (10.0)

‡: n (%), †: Ortalama ± Standart Sapma, §: Ortanca [minimum-maksimum]

Çalışmaya dahil edilen İTP hastalarının trombosit sayıları beklendiği gibi, kontrol grubuna göre anlamlı biçimde düşüktü ( $p<0.001$ ). Tedavi sonrası takipteki hastaların beyaz küre değerleri kontrol grubuna göre anlamlı biçimde yüksekti (0.046). Tedavi sonrası takipteki hastaların hemoglobin, nötrofil ve lenfosit değerleri kontrollerden farklı saptanmadı. Akım sitometri ile belirlenen lenfosit yüzdeleri gruplar arasında benzer değerlere sahipti (her biri için  $p>0,05$ ) (**Tablo 2**).

**Tablo 2.** Hasta ve kontrol gruplarında hematolojik parametrelerin karşılaştırılması

	Hasta Grubu (n=39)	Kontrol Grubu (n=9)	P
<b>PLT (Tanı anı)</b> §	9500,0 [1000,0 – 35000,0]	-	-
<b>PLT (Tedavi sonrası)</b> §	122000,0 [4000,0 – 401000,0]	242000,0 [191000,0 – 378000,0]	<b>&lt;0,001*</b>
<b>Hemoglobin (Tanı anı)</b>	13,66 ± 1,64	-	-
<b>Hemoglobin (Tedavi sonrası)</b>	13,31 ± 1,52	12,87 ± 1,05	0,318*
<b>WBC (Tanı anı)</b> §	7630,0 [3700,0 – 16100,0]	-	-
<b>WBC (Tedavi sonrası)</b> §	7330,0 [4680,0 – 16950,0]	5620,0 [4320,0 – 7810,0]	<b>0,046*</b>
<b>Nötrofil (Tanı anı)</b> §	5400,0 [2320,0 – 12300,0]	-	-
<b>Nötrofil(Tedavi sonrası)</b> §	4280,0 [2000,0 – 13400,0]	3260,0 [1800,0 – 5220,0]	0,061*
<b>Lenfosit (Tanı anı)</b> §	1930,0 [670,0 – 4630,0]	-	-
<b>Lenfosit (Tedavi sonrası)</b> §	2350,0 [1070,0 – 4000,0]	2000,0 [1840,0 – 2440,0]	0,267*
<b>Flow sitometri Lenfosit yüzdesi</b> §	19,38 [1,74 – 50,54]	20,15 [2,31 – 39,55]	0,191*

Tanımlayıcı istatistikler dağılıma bağlı olarak ortalama ± standart sapma veya ortanca [minimum-maksimum] şeklinde verildi.

\*. Mann-Whitney U test.

\*\*. Independent Samples T-Test.

IgD+CD27+ (marginal zon B hücresi), IgD-IgM-CD27-CD38+High, IgD+IgM+CD27+CD38- (unswitched hafıza B hücresi), IgD+IgM+CD27+CD38+High B lenfosit alt tiplerinin yüzdeleri hasta grubunda anlamlı derecede düşük saptanırken (sırasıyla p=0,041, p<0,001, p=0,014 ve p=0,001), IgD+IgM+CD27-CD38Dim B lenfosit alt tiplerinin yüzdeleri ise hasta grubunda anlamlı biçimde yüksek saptandı (p=0,001). Diğer IgD, IgM ve yüzey antijenine sahip B lenfosit alt tipleri açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı fark saptanmadı (her biri için p>0,05) (**Tablo 3**).

**Tablo 3.** Yüzey antijenleri, IgD ve IgM varlığına göre B lenfosit sayılarının hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırılması

	Hasta Grubu (n=39)	Kontrol Grubu (n=9)	p*
CD19+	6,77 [0,26 – 19,57]	5,50 [3,66 – 9,54]	0,285
IgD+ CD27-	70,00 [22,58 – 94,70]	60,93 [5,17 – 83,69]	0,21
IgD+ CD27+	7,32 [0,01 – 55,76]	12,91 [3,39 – 38,62]	<b>0,041</b>
CD21Low CD38Low	4,73 [0,01 – 66,67]	4,42 [2,12 – 8,62]	0,552
IgD+ IgM-	3,84 [0,01 – 66,67]	2,05 [0,01 – 10,20]	0,182
IgD+ IgM+	75,00 [22,22 – 94,75]	72,85 [44,14 – 81,82]	0,644
IgD- IgM+	3,83 [0,01 – 21,58]	3,81 [0,01 – 17,24]	0,672
IgD- IgM-	16,28 [3,00 – 47,31]	22,52 [9,96 – 37,93]	0,174
IgD- IgM- CD27+ CD38-	70,83 [0,01 – 99,99]	77,61 [31,43 – 87,93]	0,444
IgD- IgM- CD27+ CD38+High	11,36 [0,01 – 99,90]	7,46 [4,76 – 55,71]	0,383
IgD- IgM- CD27- CD38+High	0,01 [0,01 – 5,66]	1,82 [0,01 – 8,51]	<b>&lt;0,001</b>
IgD- IgM- CD27- CD38-Low	11,59 [0,01 – 41,67]	7,62 [0,01 – 23,53]	0,224
IgD+ IgM+ CD27+ CD38-	7,87 [0,01 – 67,82]	30,91 [1,08 – 71,09]	<b>0,014</b>
IgD+ IgM+ CD27+ CD38+High	0,41 [0,01 – 50,00]	9,09 [0,32 – 21,83]	<b>0,001</b>
IgD+ IgM+ CD27- CD38+High	10,88 [0,01 – 30,41]	7,69 [4,59 – 67,65]	0,597
IgD+ IgM+ CD27- CD38Dim	75,00 [28,47 – 95,26]	28,57 [9,43 – 79,66]	<b>0,001</b>
IgM+ CD27- CD38Dim or CD38High	0,05 [0,01 – 0,36]	0,03 [0,01 – 0,14]	0,193
IgM+ CD27- CD38Dim or CD38High	9,30 [0,01 – 35,62]	9,52 [4,15 – 30,77]	0,853

Tanımlayıcı istatistikler dağılıma bağlı olarak ortanca [minimum-maksimum] şeklinde verildi.

\*. Mann-Whitney U test.

IgD+CD27- (naif B hücresi) B lenfosit alt tiplerinin yüzdeleri ile hasta yaşları arasında orta düzeyde ve pozitif yönde anlamlı bir ilişki saptandı ( $r=0,329$   $p=0,041$ ) IgD-IgM+ ve IgD+ IgM+CD27+CD38- (unswitched hafıza B hücresi) B lenfosit alt tiplerinin yüzdeleri ile hasta yaşı arasında ise yine orta düzeyde ancak negatif yönde anlamlı bir ilişki gözlemlendi (sırasıyla  $r=-0,398$   $p=0,012$  ve  $r=-0,376$   $p=0,018$ ). IgD, IgM ve yüzey antijenleri açısından diğer B lenfosit alt tipleri ile hasta yaşı arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (her biri için  $p>0,05$ ) (Tablo 4).

**Tablo 4.** İTP hastalarında IgD, IgM ve yüzey antijenlerinin farklı kombinasyonlarını taşıyan B lenfosit yüzdelerinin yaş ile ilişkisi

Hasta grubu (n=39)	Yaş	
	r	P
CD19+	0,273	0,092**
IgD+ CD27-	0,329	<b>0,041*</b>
IgD+ CD27+	-0,231	0,157*
CD21Low CD38Low	-0,188	0,251*
IgD+ IgM-	-0,079	0,634*
IgD+ IgM+	0,250	0,124*
IgD- IgM+	-0,398	<b>0,012*</b>
IgD- IgM-	-0,238	0,144**
IgD- IgM- CD27+ CD38-	-0,226	0,166*
IgD- IgM- CD27+ CD38+High	0,259	0,111*
IgD- IgM- CD27- CD38+High	-0,192	0,241*
IgD- IgM- CD27- CD38-Low	0,012	0,944**
IgD+ IgM+ CD27+ CD38-	-0,376	<b>0,018*</b>
IgD+ IgM+ CD27+ CD38+High	0,135	0,411*
IgD+ IgM+ CD27- CD38+High	-0,179	0,276*
IgD+ IgM+ CD27- CD38Dim	0,226	0,166**
IgM+ CD27- CD38Dim or CD38High	0,039	0,815*
IgM+ CD27- CD38Dim or CD38High	-0,108	0,514*

\*. Spearman's rho test.

\*\* . Pearson's r test.

B lenfosit alt tiplerinin yüzde değerlerinde erkek ve kadın hastalar arasında anlamlı fark olmadığı tespit edildi (her biri için  $p>0,05$ ) (**Tablo 5**).

**Tablo 5.** ITP hastalarında cinsiyetleri bakımından IgD, IgM ve yüzey antijen kombinasyonlarına sahip B lenfosit yüzdelерinin karşılaştırılması.

	Cinsiyet		P
	Erkek (n=12)	Kadın (n=27)	
<b>CD19+</b>	6,43 ± 3,73	8,14 ± 4,52	0,228**
<b>IgD+ CD27-</b>	69,78 [50,54 – 88,46]	70,00 [22,58 – 94,70]	0,831*
<b>IgD+ CD27+</b>	7,74 [0,01 – 22,22]	5,00 [0,79 – 55,76]	0,584*
<b>CD21Low CD38Low</b>	4,40 [0,01 – 66,67]	5,39 [0,27 – 27,27]	0,903*
<b>IgD+ IgM-</b>	5,14 [0,01 – 66,67]	3,47 [0,01 – 15,87]	0,411*
<b>IgD+ IgM+</b>	72,80 [22,22 – 92,31]	76,18 [34,43 – 94,75]	0,692*
<b>IgD- IgM+</b>	3,49 [0,01 – 7,23]	4,65 [0,01 – 21,58]	0,153*
<b>IgD- IgM-</b>	16,51 ± 8,30	18,00 ± 11,34	0,648**
<b>IgD- IgM- CD27+ CD38-</b>	69,90 [0,01 – 99,99]	72,00 [27,66 – 95,56]	0,761*
<b>IgD- IgM- CD27+ CD38+High</b>	10,96 [0,01 – 99,90]	11,36 [0,01 – 51,06]	0,796*
<b>IgD- IgM- CD27- CD38+High</b>	0,01 [0,01 – 5,66]	0,01 [0,01 – 3,45]	0,665*
<b>IgD- IgM- CD27- CD38-Low</b>	9,51 [0,01 – 22,00]	12,64 [2,13 – 41,67]	0,055*
<b>IgD+ IgM+ CD27+ CD38-</b>	6,88 [0,01 – 32,76]	10,81 [1,28 – 67,82]	0,563*
<b>IgD+ IgM+ CD27+ CD38+High</b>	0,30 [0,01 – 50,00]	0,60 [0,01 – 14,63]	0,398*
<b>IgD+ IgM+ CD27- CD38+High</b>	11,97 [0,01 – 25,00]	9,97 [2,23 – 30,41]	0,670*
<b>IgD+ IgM+ CD27- CD38Dim</b>	72,70 ± 11,08	71,64 ± 17,80	0,821**
<b>IgM+ CD27- CD38Dim or CD38High</b>	0,04 [0,01 – 0,16]	0,05 [0,01 – 0,36]	0,258*
<b>IgM+ CD27- CD38Dim or CD38High</b>	9,12 [0,01 – 33,33]	9,30 [0,01 – 35,62]	0,831*

Tanımlayıcı istatistikler dağılıma bağlı olarak ortalama ± standart sapma veya ortanca [minimum-maksimum] şeklinde verildi.

\*. Mann-Whitney U test.

\*\* . Independent Samples T-Test.

IgD+IgM- B lenfosit alt tipinin yüzdeleri ek hastalığı olmayan İTP hastalarında ek hastalığı olan İTP hastalarına göre anlamlı derecede daha yüksekken (p=0.006); IgD+IgM+ B lenfosit alt tiplerinin yüzdeleri ek hastalığı olmayan İTP hastalarında ek hastalığı olan İTP hastalarına göre anlamlı biçimde daha düşüktü (p=0.044). Diğer IgD, IgM ve yüzey antijenine sahip B lenfosit alt tipleri yüzdeleri arasında ek hastalığı olan ve olmayan İTP hastalarında anlamlı fark saptanmadı (her biri için p>0,05) (**Tablo 6**).

Tablo 6. Yüzey antijenleri, IgD ve IgM'nin farklı kombinasyonlarını taşıyan B lenfosit yüzdelerinin ek hastalığı olan ve olmayan İTP hastalarında karşılaştırılması

Hasta grubu (n=39)	Ek Hastalık Durumu		p*
	Yok (n=31)	Var (n=8)	
<b>CD19+</b>	6,52 [0,26 – 16,54]	8,15 [3,56 – 19,57]	0,404
<b>IgD+ CD27-</b>	70,00 [22,58 – 94,70]	71,47 [45,38 – 92,50]	0,626
<b>IgD+ CD27+</b>	5,60 [0,01 – 55,76]	7,89 [1,64 – 20,75]	0,728
<b>CD21Low CD38Low</b>	4,73 [0,01 – 66,67]	4,54 [0,91 – 16,25]	0,917
<b>IgD+ IgM-</b>	4,68 [0,01 – 66,67]	0,95 [0,01 – 6,20]	<b>0,006</b>
<b>IgD+ IgM+</b>	71,25 [22,22 – 92,31]	80,03 [52,10 – 94,75]	<b>0,044</b>
<b>IgD- IgM+</b>	3,83 [0,01 – 21,58]	4,74 [1,00 – 12,47]	0,313
<b>IgD- IgM-</b>	16,67 [3,16 – 47,31]	10,38 [3,00 – 34,73]	0,076
<b>IgD- IgM- CD27+ CD38-</b>	70,00 [0,01 – 99,99]	75,52 [33,33 – 94,74]	0,715
<b>IgD- IgM- CD27+ CD38+High</b>	13,21 [0,01 – 99,90]	7,28 [0,01 – 33,33]	0,237
<b>IgD- IgM- CD27- CD38+High</b>	0,01 [0,01 – 5,66]	0,01 [0,01 – 2,22]	0,962
<b>IgD- IgM- CD27- CD38-Low</b>	11,59 [0,01 – 33,33]	14,13 [5,26 – 41,67]	0,281
<b>IgD+ IgM+ CD27+ CD38-</b>	6,90 [0,01 – 67,82]	12,62 [1,58 – 25,09]	0,972
<b>IgD+ IgM+ CD27+ CD38+High</b>	0,33 [0,01 – 50,00]	0,75 [0,01 – 14,63]	0,496
<b>IgD+ IgM+ CD27- CD38+High</b>	11,67 [0,01 – 30,41]	9,29 [2,62 – 28,28]	0,509
<b>IgD+ IgM+ CD27- CD38Dim</b>	76,30 [28,47 – 95,26]	72,00 [60,54 – 94,76]	0,808
<b>IgM+ CD27- CD38Dim or CD38High</b>	0,04 [0,01 – 0,36]	0,06 [0,03 – 0,12]	0,453
<b>IgM+ CD27- CD38Dim or CD38High</b>	9,72 [0,01 – 35,62]	6,47 [2,67 – 17,71]	0,366

Tanımlayıcı istatistikler dağılıma bağlı olarak ortanca [minimum-maksimum] şeklinde verildi.

\*. Mann-Whitney U test.

Ritüksimab alan hastalarda IgD+CD27- (naif B hücresi), IgD+IgM+ ve IgD+IgM+ CD27-CD38Dim B lenfosit alt tiplerinin yüzdeleri ritüksimab almayan İTP hastalarına göre anlamlı biçimde daha yüksekti (sırasıyla;  $p<0.001$ ,  $p=0,002$  ve  $p<0.001$ ). IgD+CD27+ (marginal zon B hücresi), IgD-IgM+, IgD-IgM- ve IgD+IgM+CD27+CD38- (unswitched hafıza B hücresi) B lenfosit alt tiplerinin yüzdeleri ise ritüksimab alan İTP hastalarında ritüksimab almayan İTP hastalarına göre anlamlı biçimde daha düşüktü (sırasıyla  $p=0.001$ ,  $p=0,021$ ,  $p=0.026$  ve  $p=0.001$ ). Diğer IgD, IgM ve yüzey antijenleri kombinasyonlarına sahip B lenfosit alt tiplerinin yüzdeleri ritüksimab alan ve almayan İTP hastaları arasında anlamlı farklılığa sahip değildi (her biri için  $p>0,05$ ) (**Tablo 7**).

**Tablo 7.** Ritüksimab tedavisi alan ve ritüksimab tedavisi almayan İTP hastalarında IgD, IgM ve yüzey antijen kombinasyonlarına sahip B lenfosit yüzdelerinin karşılaştırılması.

Hasta grubu (n=39)	Ritüksimab		P
	Hayır (n=29)	Evet (n=10)	
CD19+	6,74 [0,26 – 19,57]	8,52 [2,32 – 11,43]	0,653*
IgD+ CD27-	67,30 [22,58 – 88,46]	84,14 [70,00 – 94,70]	<b>&lt;0,001*</b>
IgD+ CD27+	9,65 [0,01 – 55,76]	3,02 [0,79 – 5,00]	<b>0,001*</b>
CD21Low CD38Low	4,80 [0,01 – 66,67]	2,58 [0,34 – 12,50]	0,139*
IgD+ IgM-	3,84 [0,01 – 66,67]	3,12 [0,01 – 12,70]	0,596*
IgD+ IgM+	66,95 ± 16,75	81,15 ± 8,59	<b>0,002**</b>
IgD- IgM+	4,88 [0,01 – 21,58]	2,00 [0,81 – 4,65]	<b>0,021*</b>
IgD- IgM-	17,27 [3,85 – 47,31]	10,22 [3,00 – 23,50]	<b>0,026*</b>
IgD- IgM- CD27+ CD38-	72,00 [0,01 – 99,99]	58,57 [27,66 – 87,93]	0,135*
IgD- IgM- CD27+ CD38+High	11,11 [0,01 – 99,90]	19,25 [7,14 – 51,06]	0,104*
IgD- IgM- CD27- CD38+High	0,01 [0,01 – 5,66]	0,01 [0,01 – 1,72]	0,695*
IgD- IgM- CD27- CD38-Low	11,32 [0,01 – 31,11]	17,25 [1,72 – 41,67]	0,108*
IgD+ IgM+ CD27+ CD38-	13,04 [0,01 – 67,82]	3,08 [1,28 – 6,90]	<b>0,001*</b>
IgD+ IgM+ CD27+ CD38+High	0,35 [0,01 – 50,00]	0,90 [0,01 – 3,26]	0,337*
IgD+ IgM+ CD27- CD38+High	11,11 [0,01 – 30,41]	9,77 [3,46 – 28,28]	0,898*
IgD+ IgM+ CD27- CD38Dim	67,86 ± 16,03	83,86 ± 7,47	<b>&lt;0,001**</b>
IgM+ CD27- CD38Dim or CD38High	0,05 [0,01 – 0,36]	0,05 [0,01 – 0,23]	0,936*
IgM+ CD27- CD38Dim or CD38High	9,09 [0,01 – 35,62]	10,08 [0,52 – 17,71]	0,785*

Tanımlayıcı istatistikler dağılıma bağlı olarak ortalama ± standart sapma veya ortanca [minimum-maksimum] şeklinde verildi.

\*. Mann-Whitney U test.

\*\* Independent Samples T-Test.



Eltrombopag alan hastalarda IgD+CD27- (naif B hücresi) B lenfosit alt tiplerinin yüzdeleri eltrombopag almayan İTP hastalarına göre anlamlı biçimde daha yüksekti (p=0,035). CD21Low CD38Low, IgD-IgM+ ve IgD+IgM+CD27+CD38- (unswitched hafıza B hücresi) B lenfosit alt tiplerinin yüzdeleri ise eltrombopag alan İTP hastalarında eltrombopag almayan İTP hastalarına göre anlamlı biçimde daha düşüktü (sırasıyla; p=0,007, p=0,007 ve p=0,009). Diğer IgD, IgM ve yüzey antijenleri kombinasyonlarına sahip B lenfosit alt tiplerinin yüzdeleri eltrombopag alan ve almayan İTP hastaları arasında anlamlı farklılığa sahip değildi (her biri için p>0,05) (Tablo 8).

**Tablo 8.** Eltrombopag tedavisi alan ve eltrombopag tedavisi almayan İTP hastalarında IgD, IgM ve yüzey antijen kombinasyonlarına sahip B lenfosit yüzdelerinin karşılaştırılması.

Hasta grubu (n=39)	Eltrombopag		P
	Hayır (n=24)	Evet (n=15)	
CD19+	7,44 ± 3,64	7,88 ± 5,35	0,783**
IgD+ CD27-	68,32 [22,58 – 92,50]	75,49 [42,45 – 94,70]	<b>0,035*</b>
IgD+ CD27+	8,00 [1,50 – 55,76]	3,78 [0,01 – 22,22]	0,209*
CD21Low CD38Low	6,52 [2,13 – 27,27]	2,65 [0,01 – 66,67]	<b>0,007*</b>
IgD+ IgM-	3,61 [0,01 – 15,87]	5,39 [0,01 – 66,67]	0,965*
IgD+ IgM+	71,88 [34,43 – 94,75]	76,99 [22,22 – 88,05]	0,326*
IgD- IgM+	4,89 [0,53 – 13,98]	2,80 [0,01 – 21,58]	<b>0,007*</b>
IgD- IgM-	16,67 [3,00 – 47,31]	12,72 [3,16 – 26,64]	0,356*
IgD- IgM- CD27+ CD38-	71,02 [27,66 – 99,99]	70,83 [0,01 – 81,58]	0,348*
IgD- IgM- CD27+ CD38+High	11,23 [0,01 – 51,06]	13,51 [4,00 – 99,90]	0,378*
IgD- IgM- CD27- CD38+High	0,01 [0,01 – 5,66]	0,01 [0,01 – 2,22]	0,061*
IgD- IgM- CD27- CD38-Low	12,20 [0,01 – 41,67]	10,81 [0,01 – 31,11]	0,829*
IgD+ IgM+ CD27+ CD38-	14,20 [1,58 – 67,82]	3,33 [0,01 – 32,14]	<b>0,009*</b>
IgD+ IgM+ CD27+ CD38+High	0,38 [0,01 – 3,26]	0,52 [0,01 – 50,00]	0,285*
IgD+ IgM+ CD27- CD38+High	11,11 [0,01 – 30,41]	10,88 [0,01 – 28,28]	0,593*
IgD+ IgM+ CD27- CD38Dim	69,17 ± 15,90	76,44 ± 15,35	0,166**
IgM+ CD27- CD38Dim or CD38High	0,05 [0,01 – 0,36]	0,06 [0,01 – 0,15]	0,896*
IgM+ CD27- CD38Dim or CD38High	10,20 [0,01 – 35,62]	9,09 [0,01 – 33,33]	0,507*

Tanımlayıcı istatistikler dağılıma bağlı olarak ortalama ± standart sapma veya ortanca [minimum-maksimum] şeklinde verildi.

\*. Mann-Whitney U test.

\*\*.. Independent Samples T-Test.

Splenektomi uygulanan İTP hastalarında IgD+CD27+ (marginal zon B hücresi) B lenfosit alt tiplerinin yüzdeleri splenektomi yapılmayan İTP hastalarına göre anlamlı biçimde daha düşüktü (p=0,044). Diğer IgD, IgM ve yüzey antijenleri kombinasyonlarına sahip B lenfosit alt tiplerinin yüzdeleri splenektomi yapılan ve splenektomi yapılmayan İTP hastaları arasında anlamlı farklılığa sahip değildi (her biri için p>0,05) (**Tablo 9**).

**Tablo 9.** Splenektomi yapılan ve splenektomi yapılmayan İTP hastalarında IgD, IgM ve yüzey antijen kombinasyonlarına sahip B lenfosit yüzdelerinin karşılaştırılması.

Hasta grubu (n=39)	Splenektomi		p*
	Hayır (n=32)	Evet (n=7)	
<b>CD19+</b>	6,76 [0,26 – 19,57]	7,27 [4,08 – 16,54]	0,51
<b>IgD+ CD27-</b>	69,05 [22,58 – 94,70]	77,81 [51,22 – 88,46]	0,085
<b>IgD+ CD27+</b>	8,19 [0,01 – 55,76]	3,49 [1,50 – 7,32]	<b>0,044</b>
<b>CD21Low CD38Low</b>	4,77 [0,01 – 66,67]	4,33 [0,27 – 10,47]	0,826
<b>IgD+ IgM-</b>	3,66 [0,01 – 66,67]	3,84 [0,01 – 9,30]	0,884
<b>IgD+ IgM+</b>	73,78 [22,22 – 94,75]	76,99 [56,10 – 92,31]	0,534
<b>IgD- IgM+</b>	4,04 [0,01 – 21,58]	2,80 [0,01 – 4,88]	0,133
<b>IgD- IgM-</b>	15,17 [3,00 – 47,31]	16,28 [3,85 – 31,71]	0,742
<b>IgD- IgM- CD27+ CD38-</b>	72,11 [0,01 – 95,56]	65,79 [27,66 – 99,99]	0,453
<b>IgD- IgM- CD27+ CD38+High</b>	11,23 [0,01 – 99,90]	15,71 [0,01 – 51,06]	0,660
<b>IgD- IgM- CD27- CD38+High</b>	0,01 [0,01 – 5,66]	0,01 [0,01 – 1,06]	0,488
<b>IgD- IgM- CD27- CD38-Low</b>	11,46 [0,01 – 41,67]	14,29 [0,01 – 23,68]	0,756
<b>IgD+ IgM+ CD27+ CD38-</b>	11,43 [0,01 – 67,82]	4,17 [1,75 – 13,04]	0,133
<b>IgD+ IgM+ CD27+ CD38+High</b>	0,46 [0,01 – 50,00]	0,33 [0,01 – 1,67]	0,474
<b>IgD+ IgM+ CD27- CD38+High</b>	9,82 [0,01 – 30,41]	11,88 [3,91 – 21,74]	0,227
<b>IgD+ IgM+ CD27- CD38Dim</b>	70,28 [28,47 – 95,26]	80,00 [65,22 – 91,46]	0,153
<b>IgM+ CD27- CD38Dim or CD38High</b>	0,06 [0,01 – 0,36]	0,05 [0,02 – 0,27]	0,569
<b>IgM+ CD27- CD38Dim or CD38High</b>	8,39 [0,01 – 35,62]	14,04 [3,36 – 20,00]	0,115

Tanımlayıcı istatistikler dağılıma bağlı olarak ortanca [minimum-maksimum] şeklinde verildi.

\*. Mann-Whitney U test.

IgD-IgM-CD27+CD38- (switched hafıza B hücresi) B lenfosit alt tiplerinin yüzdeleri ile hemoglobin değerleri arasında pozitif ve orta düzeyde bir ilişki varken ( $r=0,415$   $p=0,010$ ), IgD-IgM-CD27+CD38+High (plasmoblast) B lenfosit alt tipinin yüzdeleri ile hemoglobin değerleri arasında negatif ve orta düzeyde ve anlamlı bir ilişki saptanmıştır ( $r=-0,403$   $p=0,012$ ). IgM+CD27-CD38Dim or CD38High B lenfosit alt tiplerinin yüzdeleri ile ise beyaz küre değerleri arasında orta derecede ve negatif yönde anlamlı bir ilişki gözlenmiştir ( $r=-0,321$   $p=0,046$ ). Diğer IgD, IgM ve yüzey antijen kombinasyonlarına sahip B lenfosit yüzdeleri ile hemoglobin değerleri, beyaz küre ve trombosit sayıları arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (her biri için  $p>0,05$ ) (Tablo 10).

**Tablo 10.** İTP hastalarında IgD, IgM ve yüzey antijen kombinasyonlarına sahip B lenfosit yüzdelerinin hemoglobin, lökosit ve trombosit değerleri ile ilişkisi

Hasta grubu (n=39)	Hemoglobin		Lökosit		Trombosit	
	r	p	r	p	r	P
CD19+	0,205	0,216**	0,057	0,732*	-0,148	0,368*
IgD+ CD27-	0,057	0,732*	-0,015	0,929*	-0,120	0,465*
IgD+ CD27+	0,020	0,907*	-0,059	0,723*	-0,041	0,805*
CD21Low CD38Low	-0,027	0,871*	0,204	0,213*	0,172	0,295*
IgD+ IgM-	0,135	0,418*	0,118	0,476*	0,215	0,189*
IgD+ IgM+	-0,048	0,776*	-0,100	0,545*	-0,232	0,155*
IgD- IgM+	-0,055	0,745*	-0,010	0,953*	-0,062	0,708*
IgD- IgM-	0,012	0,943**	0,118	0,475*	0,207	0,206*
IgD- IgM- CD27+ CD38-	0,415	<b>0,010*</b>	0,088	0,593*	-0,268	0,099*
IgD- IgM- CD27+ CD38+High	-0,403	<b>0,012*</b>	-0,074	0,655*	0,242	0,139*
IgD- IgM- CD27- CD38+High	0,148	0,376*	-0,185	0,259*	0,044	0,789*
IgD- IgM- CD27- CD38-Low	-0,330	0,043**	-0,145	0,379*	-0,057	0,729*
IgD+ IgM+ CD27+ CD38-	0,060	0,720*	-0,034	0,837*	-0,039	0,812*
IgD+ IgM+ CD27+ CD38+High	-0,310	0,058*	-0,276	0,089*	-0,187	0,254*
IgD+ IgM+ CD27- CD38+High	-0,066	0,696*	-0,228	0,162*	-0,088	0,593*
IgD+ IgM+ CD27- CD38Dim	0,228	0,168**	0,060	0,716*	0,003	0,983*
IgM+ CD27- CD38Dim or CD38High	0,059	0,726*	-0,321	<b>0,046*</b>	-0,265	0,103*
IgM+ CD27- CD38Dim or CD38High	-0,091	0,588*	-0,031	0,853*	-0,164	0,319*

\*. Spearman's rho test.

\*\* . Pearson's r test.

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Kliniğinde halen takip edilmekte olan primer immün trombositopenik purpura tanılı hastaların demografik ve klinik bulguları ile akım sitometrik immünfenotipleme ile belirlenen B lenfosit alt grupları arasındaki ilişkiler kesitsel olarak değerlendirildi.

Çalışmamızda ana amaç B lenfosit maturasyon durumunun ve farklı alt tip değişimlerinin hastaların tedavi yanıtları ve diğer klinik ve laboratuvar özellikleri ile ilişkisinin ortaya konmasıydı. Hastaların aldıkları tedavilere göre kendi aralarında ve kontrol grubuna göre B lenfosit yüzey markerları incelendi. İTP'ye yönelik literatürde hem tedavilerin karşılaştırıldığı hem de kronikleşme sürecindeki faktörlerin araştırıldığı (52,53) birçok çalışma olmasına rağmen İTP hastalarında lenfosit alt gruplarının tanımlanması konusunda az sayıda çalışma vardır. (54,55,56)

B hücrelerinin çevresel kanda ortak yüzey belirteci CD19, CD20, CD22'dir. Bu yüzey belirteçlerinden en sık kullanılmakta olanı ise CD19'dur. B lenfositlerin farklılaşma aşamalarını (alt tiplerini) belirlemek için akım sitometri ile CD19+ olan hücreler belirlendikten sonra IgM, IgG, CD27, CD38 boyamaları yapılır. CD19+CD27-IgM+IgD+ hücreler naif B hücreler, CD19+CD27+IgM+IgD+ hücreler marjinal zon B hücreleri, hafıza B hücrelerinden izotip dönüşümü yapmayıp yalnızca IgM üreten CD19+CD27+IgM+IgD- (unswitched) ve izotip dönüşümü yapan IgG, IgA ya da IgE üreten hafıza B hücreleri (switched hafıza B hücresi) tanımlanır (57).

Yetişkinler bireylerde B lenfositlerin %30-60 kadarı hafıza B hücreleridir. Ortalama olarak bu hücrelerin yarısı da switched hafıza B hücreleridir. Switched hafıza B hücreleri T

hücre yardımı sonucunda germinal merkezde gelişmektedir. Bu hücreler oto-reaktif antikorlar oluşturabilmektedir. Oluşan bu antikorlar düşük afinitlidir ve sağlıklı bireylerde çok az miktarda bulunmaktadır. Otoimmün hastalıkların gelişiminden bu antikorlar sorumlu tutulmaktadır (47,48).

Sağlıklı kişilerin B lenfosit alt grup dağılımlarının belirlenmesi, hastaların B lenfosit alt gruplarının yorumlanması açısından önem göstermektedir. Literatürde B lenfosit alt grup dağılımlarını gösteren referans çalışmalar mevcuttur (61,62) Bizim çalışmamızda bu çalışmalardan farklı olarak İTP hastalarının ve sağlıklı kontrol grubunun B lenfosit alt grupları tanımlanmış ve karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda; IgD+CD27+(marginal zon B hücresi), IgD-IgM-CD27-CD38+High, IgD+IgM+CD27+CD38- (unswitched hafıza B hücresi), IgD+IgM+CD27+CD38+High B lenfosit alt tipleri yüzdeleri hasta grubunda anlamlı derecede düşük saptanırken, IgD+IgM+CD27-CD38Dim B lenfosit alt tipi yüzdeleri ise hasta grubunda anlamlı biçimde yüksek saptandı. Diğer IgD, IgM ve yüzey antijeni kombinasyonlarına sahip B lenfosit yüzde değerlerinde hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı fark saptanmadı.

Yaş ile lenfosit alt grupları değişim göstermektedir. Hafıza B hücreleri kord kanında saptanmazken, yaşamın ilk yılında yavaş yavaş artmakta ve ikinci yılın sonunda yetişkin B hücre sayısının %20'sine ulaşmaktadır. Yaşla birlikte marjinal zon B hücrelerinde artış gerçekleşmektedir (58).

Etnik, coğrafya, yaş ve cinsiyet farklılıklarının lenfosit dağılımları üzerine etkili olabileceği düşünülmektedir (52). Ülkemizde 30 kişilik yetişkin sağlıklı birey grubuna yapılan çalışmada CD19+ B lenfosit dağılımı %3.4-15.9, yine yapılan başka çalışmada %3.9-20.7 aralığında bildirilmiştir (59,60). Bizim çalışmamızda ise CD19+ B lenfosit dağılımı İTP hastalarında ortalama %19.38 (1.74-50.54) saptanırken kontrol grubunda ortalama %20.15 olarak saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda doğumdan itibaren 18 yaşına kadar total B ve naif B lenfosit oranlarında azalma, switched B hücrelerde ise artış olduğu bildirilmektedir (59,63,64). Yapılan bazı güncel çalışmalarda ise yaş ve cinsiyet farklılıklarının B lenfosit alt grupları üzerinde bir etkisi olmadığı bildirilmiştir (65). Bizim çalışmamızda, hasta grubunda IgD+CD27- (naif B hücreleri) B lenfosit alt tipi yüzdeleri ile hasta yaşları arasında orta düzeyde ve pozitif yönde anlamlı bir ilişki saptandı. IgD-IgM+ ve IgD+IgM+CD27+CD38- (unswitched hafıza B hücresi) B lenfosit alt tipleri yüzdeleri ile hasta yaşı arasında ise yine orta düzeyde ancak negatif yönde anlamlı bir ilişki gözlemlendi. Çalışmamızdaki bu bulgular ele alındığında İTP hastalarında sağlıklı popülasyonun tersine naif B hücrelerinde artış

gözlenirken; unswitched hafıza B hücrelerinde azalma görülmüştür. IgD, IgM ve yüzey antijenleri açısından diğer kombinasyonlara sahip B lenfosit sayıları ile hasta yaşı arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Ayrıca cinsiyet açısından baktığımızda ise IgD, IgM ve yüzey antijeni kombinasyonlarına sahip B lenfosit alt gruplarında erkek ve kadın hastalar arasında anlamlı fark olmadığı tespit edildi. Çalışmalar arasında gözlenen bu farklılıkların sebebi çalışmaya dahil edilen kişilerin sayısında ve yaş grup dağılımlarında farklılık olmasının yanında yine çalışmalarda alınan numunelerin çalışma teknikleri farklılıklarının da rol oynadığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda tam remisyona ve kısmi remisyona sağlanan hastalar ve kontrol grubu arasında hemogram parametreleri ve akım sitometri ile saptanan B lenfosit alt tipleri karşılaştırıldı; tedavi sonrası trombosit sayıları kontrol grubuna göre anlamlı biçimde düşük olarak saptandı. Tedavi sonrası hemoglobin, nötrofil ve lenfosit değerleri kontrollerden farklı saptanmadı. Akım sitometri ile saptanan lenfosit yüzdeleri ise gruplar arasında benzer değerlere sahipti.

İTP hastalığı genç yetişkin popülasyonda kadınlarda 3 kat daha sık görülmektedir. (68). Benzer şekilde çalışmamıza dahil edilen 39 hastanın %69.2'si kadındı. İTP 60 yaşın altında kadınlarda daha sık izlenirken, yapılan çalışmalarda 60 yaş üzerinde kadın ve erkek oranının eşit olduğu bildirilmiştir (4). Yaş ile İTP insidansının artmakta olduğu ve 70 yaşından sonra erkeklerde daha sık olduğu da yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (74). Çalışmamızda hastaların tanı anındaki median yaşı 46 olarak tespit edildi ve cinsiyetler arası ortalama yaş arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

Çalışmamızda 10 (%25.6) hastaya takipleri esnasında rituksimab tedavisi uygulanmışken, 15 (%38.5) hasta eltrombopag tedavisi alıyordu ve 7 (%17.9) hastada splenektomi uygulanmıştı, toplam 16 (%41) hasta ise sadece steroid tedavisi ile takip edilmişti. Çalışmaya giren hastalarda tedavisi devam edenler varken tam remisyona ile takiplerine devam edilenler de mevcuttu. Çalışmaya dahil edilen hastalarda eltrombopag verilen 15 hastanın 5'i öncesinde rituksimab almış olup bu hastaların rituksimab üzerinden en az bir yıl geçmiş olması dikkate alınarak çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmamıza dahil edilen hastaların 22'si (%56.5) tam yanıt ile takip edilirken 17'si (%43.5) kısmi yanıtı olarak takip edilmektedir. Yanıtsız hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Kısmi yanıtı hastaların ise sadece birinci basamak tedavi almış olanların sayısı 7 (%41.1), ikinci basamak tedavilerin en az birini almış olanların sayısı 10 (%58.9)'dur. İkinci basamak tedavi alanların kısmi yanıtı ayrı ayrı incelendiğinde

sadece rituksimab tedavisi alanların sayısı 3 (%17.6), sadece eltrombopag tedavisi alanların sayısı 3 (17.6), sadece splenektomi yapılmış hasta sayısı 1 (%0.58)'dir. Çalışmamızda hem eltrombopag hem de rituksimab tedavisi almış kısmi yanıtız hasta sayısı ise 3 (%17.6) olarak tespit edilmiştir. Komorbidite hastaların 10'unda (%20.8) vardı ve en sık görülen komorbid durumlar HT ve DM idi. Ek hastalık varlığının İTP hastalarında B lenfosit alt grup dağılımına etkisinin gösterildiği bir çalışmaya literatürde rastlanamamıştır. Çalışmamızda ek hastalığı olan İTP hastalarının sayısı yeterli görülmediğinden ve bu hastalıkların toplu olarak analiz edilmesi uygun olmayacağından alt grup dağılımları incelenmemiştir.

İTP hastalarında tedavi başlanması gereken seviyelerde trombosit sayısı saptandığında ya da klinik olarak tedavi başlanması gerektiğinde kontrendikasyon yoksa ilk başlanacak tedavi steroidlerdir (67). Çalışmamızda 16 hastaya (%41) sadece metilprednizolon tedavisi verilmiş ve bu hastaların 9'unda (%56.2) tam yanıt alındığı görülmüştür. Literatüre baktığımızda Karpatkin ve arkadaşlarının (68) yaptığı bir çalışmada steroid ile vakaların %36-44'ünde tam yanıt saptanmıştır. Çalışmamızı bu açıdan değerlendirecek olursak steroidde tam yanıt oranlarımız literatüre oranla yüksek saptanmıştır.

Çalışmamızda metilprednizolon sonrasında yanıt alınamayan ve takiplerinde nüks gelişen hastalara ikinci basamak tedavilerin tercih edildiği görülmüştür. Rituksimab bu tedavi seçeneklerinden ilkidir. Rituksimab bir CD20 monoklonal antikordur. İmmun trombositopenide artmış otoantikörlerin artmış CD20+ B hücreleri ile alakalı olduğu düşünülmektedir (69). Bu sebeple rituksimab İTP hastalarında uzun yıllardır kullanılmış ve kullanılmaya da devam edilmektedir. Bizim çalışmamızda, poliklinikte takiplerine devam edilen ve çalışmaya dahil edilen 39 hastanın 10'una (%25.6) ikinci basamak tedavi olarak rituksimab uygulanmıştır. Literatürde anti CD-20 monoklonal antikoru olan rituksimabın kullanıldığı İTP hastalarında B lenfositlerinin incelendiği az sayıda çalışma vardır. Gudbrandsdottir ve arkadaşları (70) tarafından yapılmış bir çalışmada rituksimab tedavisi sonrası İTP hastalarında B hücrelerinin değişimi incelenmiştir. Rituksimab ve birinci basamak tedavi verilenlerin sadece birinci basamak tedavi verilen hasta grubu ile karşılaştırıldığı bu çalışmada; rituksimab alımından 12 ay sonrasında CD27+ B hücrelerinin önemli derecede düştüğü gösterilmiştir. Bu çalışmada CD27+ B hücreleri hafıza B hücreleri olarak tanımlanmıştır. Bizim çalışmamızda yine bu çalışmaya benzer şekilde rituksimab almış İTP hastalarında IgD+CD27+, IgD-IgM+, IgD-IgM- ve IgD+IgM+ CD27+ CD38-(unswitched hafıza B hücresi) B lenfosit alt tipleri yüzdeleri anlamlı derece düşük saptanmışken IgD+CD27- (naif B hücresi), IgD+IgM+ ve IgD+IgM+CD27-CD38Dim B lenfosit alt tipleri

yüzdeleri ise rituksimab almayan İTP hastalarına göre anlamlı biçimde daha yüksek saptanmıştır. Diğer IgD, IgM ve yüzey antijenleri sahip B lenfosit yüzdeleri ritiksumab alan ve almayan İTP hastaları arasında anlamlı fark bulunamamıştır.

Ritüksimab dışında bir diğer ikinci basamak tedavi seçeneği ise splenektomidir. Anna Kwiatkowska ve arkadaşlarının (71) 2019'da yaptığı bir çalışmada splenektomi sonrasında İTP hastalarının remisyonu araştırılmıştır. Yapılan çalışmada 41 yaşın altında olanlar ve operasyon öncesi trombosit sayısı  $\geq 97 \times 10^3/\text{mm}^3$  olan hastalarda splenektomi sonrasında remiyon oranı anlamlı bir biçimde yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Literatürde ayrıca splenektomi ve İTP patogenezinin incelendiği çalışmalar mevcuttur. Asmaa M ve arkadaşları (72) tarafından yapılan bir çalışmada IgM salgılayan hafıza hücrelerinin artışının İTP patogenezinde rol oynayabileceği belirtilmiştir. Ayrıca Martinez-Gamboa L ve arkadaşları (73) tarafından yapılan çalışmada, İTP hastalarında splenektomi sonrasında germinal merkez kaybına bağlı olarak hafıza B hücrelerinin azalmış üretimi incelenmiştir. Kruetzman ve arkadaşlarının (74) yaptığı bir çalışmada ise genel olarak otoimmün hastalıklarda splenektomi sonrasında hafıza B hücrelerinin azalması bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda, poliklinikte takiplerine devam edilen ve çalışmaya dahil edilen 39 hastanın 7'sine (%17.9) splenektomi uygulandığı görülmüştür. Splenektomi uygulanan İTP hastalarında IgD+CD27+ (marginal zon B hücresi) B lenfosit alt tipi yüzdesi splenektomi yapılmayan İTP hastalarına göre anlamlı biçimde daha düşük saptanmıştır. Diğer IgD, IgM ve yüzey antijenleri kombinasyonlarına sahip B lenfosit yüzdeleri splenektomi yapılan ve splenektomi yapılmayan İTP hastaları arasında anlamlı fark bulunamamıştır.

2000'lerin başlarından itibaren ikinci basamak tedavi olarak belirlenen rituksimab ve splenektomi İTP hastalarında tercih edilen ve kullanılan en sık tedavilerdir. Her iki seçenekte de tam remiyon sağlama potansiyeli bulunsa da uzun vadeli yanıtlar tam olarak tatmin edici görülmemektedir. Ayrıca bu tedaviler sonrasında görülen komplikasyonlar yaygın olmasa da önem taşımaktadır. Ghanima W ve arkadaşları (75) tarafından yapılan bir çalışmada splenektomi ve rituksimab sonrası gelişen yan etkiler incelenmiş ve splenektomi sonrasında enfeksiyon ve tromboembolizm riskinde artış, rituksimab sonrası enfeksiyon oranlarında artış ve çok nadir de olsa progresif multifokal lökoensefalopati vakaları bildirilmiştir. Bu sebeple geliştirilen ve 2008 yılında ruhsatlandırılan trombopoetin reseptör agonistleri İTP hastalarında ikinci basamak tedavi olarak kullanılmaya başlanmış ve giderek yaygınlaşmıştır. Romiplastim ve eltrombopag bu ajanlardan ikisidir. Ülkemizde şu an için bulunan ve yaygın olarak kullanılan trombopoetin reseptör agonisti eltrombopagdir. Karaciğer enzimlerinde yükselme



ve tromboza yatkınlık yan etkileri olarak sayılabilse de piyasaya çıkışından itibaren geçen 10 yıl süre içerisinde etkilerinin incelendiği; Ghanima W. Ve arkadaşları (76) tarafından yapılan bir metaanaliz çalışmada bu ajanların kabul edilebilir toksisiteye sahip, iyi tolere edilen ve etkili tedaviler olduğu bildirilmiştir. Raymond S. M. Wong ve arkadaşları (77) tarafından yapılan bir çalışmada çalışmaya dahil edilen hastaların %40'ında eltrombopag ile tedavi sonrasında 25 haftaya kadar yanıt korunmuş ve trombosit sayısı  $50 \times 10^3 / \text{mm}^3$  üzerinde seyrettiği, hastaların %70'inde ise trombosit sayısının  $30 \times 10^3 / \text{mm}^3$  üzerinde seyrettiği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda, poliklinikte takiplerine devam edilen ve çalışmaya dahil edilen 39 hastadan 15'i (%38,5) eltrombopag kullanmakta idi. Eltrombopag verilen 15 hastanın 5'i öncesinde rituksimab almış olup bu hastaların rituksimab üzerinden en az 1 yıl geçmiş olması şartı aranarak çalışmaya dahil edilmiştir. Literatürde eltrombopag kullanan İTP hastalarının B lenfosit değişimlerini inceleyen çalışma bulunamamıştır. Bizim çalışmamızda Eltrombopag alan hastalarda IgD+CD27- (naif B hücresi) B lenfosit alt tipi yüzdeleri eltrombopag almayan İTP hastalarına göre anlamlı biçimde daha yüksek saptanmıştır. CD21<sup>Low</sup>CD38<sup>Low</sup>, IgD- IgM+ ve IgD+IgM+ CD27+CD38- (unswitched hafıza B hücresi) B lenfosit alt tipleri yüzdeleri ise eltrombopag alan İTP hastalarında eltrombopag almayan İTP hastalarına göre anlamlı biçimde daha düşük saptanmıştır. Diğer IgD, IgM ve yüzey antijenleri kombinasyonlarına sahip B lenfosit yüzdeleri eltrombopag alan ve almayan İTP hastaları arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Eltrombopag alan hastalar daha önce rituksimab alıp almamasına göre ayrı olarak incelenmediğinden bu sonucun çıkmasında rituksimab kullanımının etkili olduğu düşünülmüştür. Sadece rituksimab kullanımı ile benzer şekilde eltrombopag kullanan İTP hastalarında da hafıza B hücreleri düşük saptanmıştır. Çalışmamızda ikinci basamak tedavi alan hastaların yanıt oranları karşılaştırılmamıştır.

## 6. SONUÇLAR

Primer immün trombositopenik purpura, döküntüler ile karşımıza gelen eritrosit ve beyaz küre sayılarının normal seyrettiği izole trombositopeni tablosudur. Biz çalışmamızda B lenfosit alt gruplarının hasta ve sağlıklı bireylerle karşılaştırılmasını, ayrıca hasta grubunda yaş, cinsiyet, ek hastalık ve alınan tedavi farklılıklarına göre B lenfosit alt gruplarını inceledik. Bunun için Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Hastanesi Hematoloji Kliniği tarafından takip edilmekte olan 39 İTP hastası ve 9 sağlıklı birey çalışmaya dahil edildi, prospektif olarak değerlendirildi.

- 1- Hasta ve kontrol grubunun B lenfosit alt grupları karşılaştırıldığında; IgD+CD27+ (marginal zon B hücresi), IgD-IgM-CD27-CD38+High, IgD+IgM+CD27+CD38- (unswitched hafıza B hücresi) , IgD+IgM+CD27+CD38+High B lenfosit alt tipleri yüzdeleri hasta grubunda anlamlı derecede düşük saptanırken, IgD+IgM+CD27-CD38Dim B lenfosit alt tipinin yüzdeleri ise hasta grubunda anlamlı biçimde yüksek saptandı.
- 2- İTP hastalarında yaş ile B lenfosit alt grupları incelendiğinde; IgD+CD27- (naif B hücresi) B lenfosit alt tipi yüzdeleri hasta grubunda daha yüksek saptandı. IgD-IgM+ ve IgD+IgM+CD27+CD38-(marginal zon B hücresi) B lenfosit alt tipleri yüzdeleri hasta grubunda daha düşük saptandı Cinsiyet açısından ise B lenfosit alt gruplarında anlamlı bir fark saptanmadı.
- 3- Rituksimab almış olan hastalarda IgD+CD27-(naif B hücresi), IgD+IgM+ ve IgD+IgM+CD27-CD38Dim B lenfosit alt tipleri yüzdeleri rituksimab almayan İTP hastalarına göre anlamlı biçimde daha yüksek saptanmıştır. IgD+CD27+ (marginal

zon B hücresi), IgD-IgM+, IgD-IgM- ve IgD+IgM+CD27+CD38- (unswitched hafıza B hücresi) B lenfosit alt tipleri yüzdeleri ise rituksimab alan İTP hastalarında rituksimab almayan İTP hastalarına göre anlamlı biçimde daha düşük saptanmıştır.

- 4- Eltrombopag alan hastalarda IgD+CD27- (naif B hücresi) B lenfosit alt tipi yüzdesi eltrombopag almayan İTP hastalarına göre anlamlı biçimde daha yüksek saptanmıştır. CD21Low CD38Low, IgD-IgM+ ve IgD+IgM+CD27+CD38- (unswitched hafıza B hücresi) B lenfosit alt tipleri yüzdeleri ise eltrombopag alan İTP hastalarında eltrombopag almayan İTP hastalarına göre anlamlı biçimde daha düşük saptanmıştır. Eltrombopag alan hastalar daha öncesinde rituksimab almış ve almamış olanlar şeklinde ayrı olarak incelenmediğinden bu sonucun rituksimab kullanımı ile alakalı olduğu düşünülmüştür.
- 5- Splenektomi uygulanan İTP hastalarında IgD+CD27+ (marginal zon B hücresi) B lenfosit alt tipi yüzdeleri splenektomi yapılmayan İTP hastalarına göre anlamlı biçimde daha düşük saptanmıştır.

## ÖZET

İmmün trombositopenik purpura trombosit sayısında düşüş ile seyreden otoimmünitenin rol oynadığı bir hastalıktır. Birinci basamak tedavi sonrasında remisyon oranı yüksek olmasına rağmen remisyon kaybı sık görülür ve nüks nedeniyle ikinci basamak tedavi ihtiyaçları oluşur. Aynı tedaviden bir hastanın fayda görmesi diğer hastanın fayda görmemesine sebep olan farklılık net değildir.

Lenfositler tüm kan hücreleri gibi kemik iliğindeki kök hücrelerinden köken alır, antijen reseptörleri üretir ve matür hücrelerin karakteristik özelliklerini geliştirirler. Bu matür B ve T lenfositlere naif lenfositler denir. Kemik iliğinden ve timustan göç eden bu hücreler antijen uyarıları ile değişim ve olgunlaşmalarını tamamlamak üzere periferik lenf organlarına göç ederler. Antijenler ile uyarılan lenfositler klonal genişleme yaşar, bir kısmı antieni elimine eden efektör hücrelere dönüşürken bir kısmı sekonder immün yanıtta rol almak üzere hafıza hücreleri olarak farklılaşır.

Lenfositler ve diğer lökositlerin tanımlanması modern sınıflandırma sisteminde CD yüzey antijenleri ile yapılır. CD yüzey markerları hücrenin hangi kümeye farklılaştığını gösteren monoklonal antikordur. B lenfositlerin (CD45+, CD19+) immün sistemdeki ana rolü immünojenik yapıları tanımak, onları hatırlamak ve daha sonra bu antijenlere karşı antikor sentezleyecek plazma hücrelerine farklılaşmaktır. Kemik iliğinden periferik lenf organlarına göçü IgM ve IgD sentezi ile ilişkilidir. Maturasyonun erken safhalarındaki bir B lenfositte IgM+ iken CD24 sentezi artmış, CD27 ise negatif tespit edilir. CD27 yüzey antijeninin kazanılmasıyla B lenfositin naif B lenfositten marjinal zon fenotipe farklılaştığı anlaşılır. CD38 yüzey antijeni pozitifleşen hücre hafıza B lenfositine farklılaşmış olarak tanımlanır. IgM ve IgD yüzey antijenlerinin kaybının tespiti ile antikor değişimi ile hafıza hücrelerinin plazmablasta farklılaştığı söylenebilir.

Akım sitometride, hücre yüzeyindeki veya içerisindeki proteinlere özgü antikorlarla inkübe edilir sonrasında antikenlere bağlanır. Buradaki spesifik antikorlar spesifik floresan boya ile (FITC, PE, PerCP gibi) işaretlenmektedir. Bu sayede hücrelere özgü antijenler floresan sinyalleri değerlendirilerek belirlenebilmektedir. Biz çalışmamızda İTP tanısı ile takip edilmekte olan hastaların akım sitometri yardımı ile B lenfosit alt gruplarını inceledik.

Çalışmamız Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Hastanesi Hematoloji Kliniği tarafından, İTP tanısı ile takip edilmekte olan hastaların rutin muayeneleri sonrasında yaklaşık

4 ml kan örneği alınarak ve B lenfosit yüzey antijenlerini içeren DuraClone IM B cells Tube kullanarak akım sitometri ile tespit edildiği cross sectional bir çalışmadır. Hastaların yaş, cinsiyet, ek hastalıkları, laboratuvar bulguları, aldıkları tedavi seçenekleri ve akım sitometri verileri kaydedildi. Çalışmamızın istatistiksel analizler *Jamovi (Version 2.2.5.0)* ve *JASP (Version 0.16.1)* programları ile yapılmış olup ve istatistik analizlerde anlamlılık düzeyi 0.05 (p-value) olarak dikkate alındı.

Çalışmaya 39 hasta 9 sağlıklı kontrol grubu dahil edilmiş olup bunların 33'ü kadındı. Hastaların yaş ortalamaları  $46.58 \pm 13.61$  (min-max: 20-72 yaş) yıl olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu hasta grubu ile aynı demografik özelliklere sahipti. Hasta ve kontrol grubunun B lenfosit alt grupları karşılaştırıldığında; IgD+CD27+(marginal zon B hücresi), IgD-IgM-CD27- CD38+High, IgD+IgM+CD27+CD38- (unswitched hafıza B hücresi), IgD+IgM+CD27+ CD38+High B lenfosit alt tipleri yüzdeleri hasta grubunda anlamlı derecede düşük saptanırken, IgD+IgM+CD27-CD38Dim B lenfosit alt tipi yüzdeleri ise hasta grubunda anlamlı biçimde yüksek saptandı. İTP hastalarında sağlıklı popölasyona göre yaş ile azalması beklenen naif B hücresi anlamlı derecede yüksek saptanırken diğer B hücrelerinde anlamlı fark saptanmadı. Rituksimab uygulanan hastalarda CD27+ hafıza B hücreleri genel anlamda düşük saptanırken, naif B hücrelerinin arttığı görüldü. Eltrombopag kullanan hastalarda da benzer sonuçlar alınmış olup öncesinde rituksimab kullanımı olması bu duruma neden olduğu düşünölmüştür. Splenektomi uygulanan hastalarda beklendiği gibi marginal zon B hücresi anlamlı derecede düşük saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** İmmün Trombositopenik Purpura , B Hücreleri , CD Yüzey Belirteçleri , CD27

# **INVESTIGATION OF B LYMPHOCYTE SUBGROUPS IN PATIENTS WITH IMMUNE THROMBOCYTOPENIC PURPURA**

## **SUMMARY**

Immune thrombocytopenic purpura is a disease in which autoimmunity plays a role with a decrease in platelet count. Although the remission rate is high after first-line therapy, loss of remission is common and second-line therapy is needed due to relapse. The difference between one patient benefiting from the same treatment and the other not benefiting from the same treatment is not clear.

Like all blood cells, lymphocytes originate from stem cells in the bone marrow, produce antigen receptors and develop the characteristic features of mature cells. These mature B and T lymphocytes are called naive lymphocytes. These cells, which migrate from the bone marrow and thymus, migrate to the peripheral lymph organs to complete their transformation and maturation with antigen stimuli. Antigen-stimulated lymphocytes experience clonal expansion, some transform into effector cells that eliminate antigen, while others differentiate into memory cells to play a role in the secondary immune response.

Identification of lymphocytes and other leukocytes is done by CD surface antigens in the modern classification system. CD surface markers are monoclonal antibodies that show which cluster the cell has differentiated into. The main role of B lymphocytes (CD45+, CD19+) in the immune system is to recognize immunogenic structures, remember them, and then differentiate into plasma cells that will synthesize antibodies against these antigens. Its migration from the bone marrow to peripheral lymph organs is associated with IgM and IgD synthesis. In a B lymphocyte in the early stages of maturation, CD24 synthesis is increased while IgM+ is detected, while CD27 is negative. With the acquisition of CD27 surface antigen, it is understood that the B lymphocyte differentiates from the naive B lymphocyte to the marginal zone phenotype. Cells with positive CD38 surface antigen are defined as differentiated into memory B lymphocytes. It can be said that the memory cell differentiates into plasmablast with the detection of the loss of IgM and IgD surface antigens and the change of antibodies.

In flow cytometry, cells are incubated with antibodies specific for proteins on their surface or inside the cell and bind to antigens. Each specific antibody is labeled with

fluorescent dyes such as FITC, PE, PerCP. By evaluating the fluorescent signals given by cells with certain antigens when they encounter a laser beam, it can be determined which specific antigen that cell carries. In our study, we examined the B lymphocyte subgroups of the patients followed up with the diagnosis of ITP with the help of flow cytometry.

Our study is a cross-sectional study in which approximately 4 ml of blood samples were taken after routine examinations of patients followed up with the diagnosis of ITP by Tekirdağ Namık Kemal University Hematology Clinic and determined by flow cytometry using DuraClone IM B cells Tube containing B lymphocyte surface antigens. Age, gender, comorbidities, laboratory findings, treatment options and flow cytometry data of the patients were recorded. Statistical analyzes of our study were performed with Jamovi (Version 2.2.5.0) and JASP (Version 0.16.1) programs and the level of significance was considered as 0.05 (p-value) in statistical analysis.

39 patients and 9 healthy control groups were included in the study, and 33 of them were women. The mean age of the patients was  $46.58 \pm 13.61$  (min-max: 20-72 years) years. The control group had the same demographic characteristics as the patient group. When the B lymphocyte subgroups of the patient and control groups were compared; percentages of IgD+CD27+(marginal zone B cell), IgD-IgM-CD27- CD38+High, IgD+IgM+CD27+CD38- (unswitched memory B cell), IgD+IgM+CD27+ CD38+High B lymphocyte subtypes in the patient group were significantly higher, while the percentages of IgD+IgM+CD27-CD38Dim B lymphocyte subtypes were found to be significantly lower in the patient group, they were found to be significantly higher. While naive B cells, which are expected to decrease with age, were found to be significantly higher in ITP patients compared to the healthy population, no significant difference was found in other B cells. While CD27+ memory B cells were found to be low in general in patients treated with rituximab, naive B cells were found to be increased. Similar results were obtained in patients using eltrombopag, and it was thought that previous use of rituximab caused this situation. As expected, marginal zone B cells were found to be significantly lower in patients who underwent splenectomy.

**Key Words:** Immune Thrombocytopenic Purpura, B Cells, CD Markers, CD27

## KAYNAKLAR

1. Li Z, Zhang M, Hu H, Liu S, Lu Z. On predicting the T cell and B cell epitopes of platelet membrane glycoprotein II b/III a antibody from human and mice. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 2010;27:1146–51
2. Semple JW, Milev Y, Cosgrave D, Mody M, Hornstein A, Blanchette V, et al. Differences in serum cytokine levels in acute and chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: relationship to platelet phenotype and antiplatelet T-cell reactivity. *Blood* 1996;87:4245–54
3. Parodi E, Nobili B, Perrotta S, Rosaria Matarese SM, Russo G, Licciardello M, et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) in children with chronic refractory symptomatic immune thrombocytopenic purpura: efficacy and safety of treatment. *Int J Hematol* 2006;84:48–53
4. Stasi R, Del Poeta G, Stipa E, Evangelista ML, Trawinska MM, Cooper N, et al. Response to B-cell depleting therapy with rituximab reverts the abnormalities of T-cell subsets in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2007;110:2924–30
5. Abbas AK, Lichtmann, A.H, and Pillai, S. Antigen Recognition in the Adaptive Immune System (4th edition) *Basic Immunology, Functions and Disorders of the Immune System*. Elsevier Saunders, Philadelphia, ABD 2014;71-91.
6. Hardy, R.R. and K. Hayakawa, B cell development pathways. *Annu Rev Immunol*, 2001. 19: p. 595-621.
7. Bonilla FA. and Oettgen, H.C. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 3-23
8. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass Trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*. 2008; 111: 77-85.
9. Zhong H, Bao W, Li X, Miller A, Seery C, Haq N, et al. CD16+ monocytes control T-cell subset development in immune thrombocytopenia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2012;120(16):3326-35.
10. Michel M. Immune thrombocytopenic purpura: epidemiology and implications for patients. *European Journal of Haematology*. 2009;82:3-7.
11. Liel MS, Recht M, Calverley DC. Thrombocytopenia caused by immunologic platelet destruction. *Wintrobe's Clinical Hematology: Thirteenth Edition: Wolters Kluwer Health Adis (ESP)*; 2013. p. 1061-76.
12. Neunert C, Lim W, Crowther M, Cohen A, Solberg Jr L, Crowther MA. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2011;117(16):4190-207.
13. McMillan R, editor *Clinical role of antiplatelet antibody assays*. *Seminars in thrombosis and hemostasis*; 1995: Copyright© 1995 by Thieme Medical Publishers, Inc.
14. Stasi R, Sarpatwari A, Segal JB, Osborn J, Evangelista ML, Cooper N, et al. Effects of eradication of *Helicobacter pylori* infection in patients with immune thrombocytopenic



purpura: a systematic review. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2009;113(6):1231-40.

15. George JN, Aster RH. Drug-induced thrombocytopenia: pathogenesis, evaluation, and management. *ASH Education Program Book*. 2009;2009(1):153-8.

16. American Society of Hematology 2019 guidelines for immune thrombocytopenia Cindy Neunert, Deirdra R. Terrell, Donald M. Arnold, George Buchanan, Douglas B. Cines, Nichola Cooper, Adam Cuker, Jenny M. Despotovic, James N. George, Rachael F. Grace, Thomas Kühne, David J. Kuter, Wendy Lim, Keith R. McCrae, Barbara Pruitt, Hayley Shimanek, Sara K. Vesely *Blood Adv* (2019) 3 (23): 3829–3866

17. Portielje JE, Westendorp RG, Kluin-Nelemans HC, Brand A. Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2001;97(9):2549-54.

18. Kohli R, Chaturvedi S. Epidemiology and clinical manifestations of immune thrombocytopenia. *Hämostaseologie*. 2019;39(03):238-49.

19. Cohen YC, Djulbegovic B, Shamai-Lubovitz O, Mozes B. The bleeding risk and natural history of idiopathic thrombocytopenic purpura in patients with persistent low platelet counts. *Archives of internal medicine*. 2000;160(11):1630-8.

20. Dameshek W, Rubio F, Mahoney JP, Reeves WH, Burgin LA. Treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) with prednisone. *Journal of the American Medical Association*. 1958;166(15):1805-15.

21. Berchtold P, McMillan R. Therapy of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura in adults [see comments]. 1989.

22. Bellucci S, Charpak Y, Chastang C, Tobelem G. Low doses v conventional doses of corticoids in immune thrombocytopenic purpura (ITP): results of a randomized clinical trial in 160 children, 223 adults. 1988.

23. Jacobs P, Wood L, Novitzky N. Intravenous gammaglobulin has no advantages over oral corticosteroids as primary therapy for adults with immune thrombocytopenia: a prospective randomized clinical trial. *The American journal of medicine*. 1994;97(1):55-9.

24. Cheng Y, Wong RS, Soo YO, Chui CH, Lau FY, Chan NP, et al. Initial treatment of immune thrombocytopenic purpura with high-dose dexamethasone. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(9):831-6.

25. Mazzucconi MG, Fazi P, Bernasconi S, De Rossi G, Leone G, Gugliotta L, et al. Therapy with high-dose dexamethasone (HD-DXM) in previously untreated patients affected by idiopathic thrombocytopenic purpura: a GIMEMA experience. *Blood*. 2007;109(4):1401-7.

26. Carroll RR, Noyes WD, Kitchens CS. High-dose intravenous immunoglobulin therapy in patients with immune thrombocytopenic purpura. *JAMA*. 1983;249(13):1748-50.

27. Picozzi VJ, Roeske WR, Creger WP. Fate of therapy failures in adult idiopathic thrombocytopenic purpura. *The American journal of medicine*. 1980;69(5):690-4.

28. Naouri A, Feghali B, Chabal J, Boulez J, Dechavanne M, Viala JJ, et al. Results of splenectomy for idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acta haematologica*. 1993;89(4):200-3.

29. Wallace D, Fromm D, Thomas D. Accessory splenectomy for idiopathic thrombocytopenic purpura. *Surgery*. 1982;91(2):134-6.
30. Fabris F, Zanatta N, Casonato A, Randi ML, Luzzatto G, Girolami A. Response to splenectomy in idiopathic thrombocytopenic purpura: prognostic value of the clinical and laboratory evaluation. *Acta haematologica*. 1989;81(1):28-33.
31. Arnold DM, Dentali F, Crowther MA, Meyer RM, Cook RJ, Sigouin C, et al. Systematic review: efficacy and safety of rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Annals of internal medicine*. 2007;146(1):25-33.
32. Patel VL, Mahévas M, Lee SY, Stasi R, Cunningham-Rundles S, Godeau B, et al. Outcomes 5 years after response to rituximab therapy in children and adults with immune thrombocytopenia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2012;119(25):5989-95.
33. Ambriz P, Munoz R, Quintanar E, Sigler L, Aviles A, Pizzuto J. Accessory spleen compromising response to splenectomy for idiopathic thrombocytopenic purpura. *Radiology*. 1985;155(3):793-6.
34. Bussel JB, Provan D, Shamsi T, Cheng G, Psaila B, Kovaleva L, et al. Effect of eltrombopag on platelet counts and bleeding during treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*. 2009;373(9664):641-8.
35. Kuter DJ, Rummel M, Boccia R, Macik BG, Pabinger I, Selleslag D, et al. Romiplostim or standard of care in patients with immune thrombocytopenia. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(20):1889-99.
36. Poudyal BS, Sapkota B, Shrestha GS, Thapalia S, Gyawali B, Tuladhar S. Safety and efficacy of azathioprine as a second line therapy for primary immune thrombocytopenic purpura. *Journal of Nepal Medical Association*. 2016;55(203):16-21.
37. Bouroncle BA, Doan CA. Refractory idiopathic thrombocytopenic purpura treated with azathioprine. *New England Journal of Medicine*. 1966;275(12):630-5.
38. Mishra K, Pramanik S, Sandal R, Jandial A, Sahu KK, Singh K, et al. Safety and efficacy of azathioprine in immune thrombocytopenia. *American journal of blood research*. 2021;11(3):217.
39. Schijns, V., et al., Rational Vaccine Design in Times of Emerging Diseases: The Critical Choices of Immunological Correlates of Protection, Vaccine Antigen and Immunomodulation. *Pharmaceutics*, 2021. 13(4).
40. Forthal, D.N., Functions of Antibodies. *Microbiol Spectr*, 2014. 2(4): p. AID0019-2014.
41. Holt, P.G. and C.A. Jones, The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy*, 2000. 55(8): p. 688-97.
42. LeBien, T.W. and T.F. Tedder, B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 2008. 112(5): p. 1570-80.
43. Pillai S, Cariappa A, Moran ST. Marginal Zone B Cells". *Annual Review of Immunology* 2005; 23: 161-196.
44. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. "The generation of antibodysecreting plasma cells". *Nature Reviews Immunology* 2015; 15 (3): 160-171. 68

45. Murphy, Kenneth (2012). *Janeway's Immunobiology 8th Edition*. New York, NY: Garland Science. ISBN 9780815342434
46. Krutzmann S, Rosado MM, Weber H, Germing U, Tournilhac O, Peter HH, et al. Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J Exp Med* 2003; 197: 939-945.
47. Sanz I, Chungwen W, Lee FE-H, Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Sem Immunol*. 2008; 20: 67-82
48. Haymore BR, Mikita CP, Tsokos GC. Common variable immune deficiency (CVID) presenting as an autoimmune disease: role of memory B cells. *Autoimmunity Reviews*. 2008; 7: 309-312.
49. Kurosaki T, Kometani K, Ise W. "Memory B cells". *Nature Reviews Immunology*. 2015; 15: 149-159.
50. Bortnick A; Chernova I, Quinn WJ, Mugnier M; Cancro MP, Allman D. "LongLived Bone Marrow Plasma Cells Are Induced Early in Response to T CellIndependent or T Cell-Dependent Antigens". *The Journal of Immunology* 2012; 188: 5389-5396.
51. Claes N, Fraussen J, Stinissen P, Hupperts R and Somers V. B cells Are Multifunctional Players in Multiple Sclerosis Pathogenesis: Insights from Therapeutic Interventions. *Front Immunol*. 2015 Dec 21; 6: 642
52. Grimaldi-Bensouda L, Nordon C, Michel M, Viallard J-F, Adoue D, Magy-Bertrand N, et al. Immune thrombocytopenia in adults: a prospective cohort study of clinical features and predictors of outcome. *haematologica*. 2016;101(9):1039.
53. Jaime-Pérez JC, Aguilar-Calderón P, Jiménez-Castillo RA, Ramos-Dávila EM, Salazar-Cavazos L, Gómez-Almaguer D. Treatment outcomes and chronicity predictors for primary immune thrombocytopenia: 10-year data from an academic center. *Annals of Hematology*. 2020;99(11):2513-20.
54. Behzad MM, Asnafi AA, Jaseb K, Jalali Far MA, Saki N. Expression of CD markers' in immune thrombocytopenic purpura: prognostic approaches. *APMIS* 2017; 125: 1042–1055
55. Behzad MM, Asnafi AA, Jalalifar MA, Moghtadaei M, Jaseb K, Saki N. Cellular expression of CD markers in immune thrombocytopenic purpura: implications for prognosis. *APMIS* 2018; 126: 523–532
56. Roles of CD5+ , CD19+ , CD41a+ , CD55+ and CD59+ in Chronic Immune Thrombocytopenic Purpura (ITP) Fatma Kaya1 , Ilhami Berber2\*, Mehmet Ali Erkurt2 , Ismet Aydogdu3 and Ismail Reisli
57. Warnatz, K. ve Schlesier, M. (2008). Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*, 74, 261- 271.
58. Bukowska-Strakova, K., Kowalczyk, D., Baran, J., Siedlar, M., Kobylarz, K. ve Zembala, M. (2009). The B-cell compartment in the peripheral blood of children with different types of primary humoral immunodeficiency.
59. Besci, O., et al., Reference values for T and B lymphocyte subpopulations in Turkish children and adults. *Turk J Med Sci*, 2021. 51(4): p. 1814-1824.

60. Yaman, A., et al., Reference ranges of lymphocyte subsets of healthy adults in Turkey. *Med Princ Pract*, 2005. 14(3): p. 189-93.
61. Bisset, L.R., et al., Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur J Haematol*, 2004. 72(3): p. 203-12.
62. Oras, A., et al., Comprehensive flow cytometric reference intervals of leukocyte subsets from six study centers across Europe. *Clin Exp Immunol*, 2020. 202(3): p. 363-378.
63. Duchamp, M., et al., B-cell subpopulations in children: National reference values. *Immun Inflamm Dis*, 2014. 2(3): p. 131-40.
64. Morbach, H., et al., Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol*, 2010. 162(2): p. 271-9.
65. Turğut Kaynak, F. (2022). Erişkin sağlıklı bireylerde çok renkli akan hücre ölçer ile T ve B lenfosit alt gruplarının yaşa özgü referans değerlerinin oluşturulması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji AD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.
66. Syed NN, Adil S, Sajid MR, Usman M, Moiz B, Kakepoto GN, et al. Chronic ITP: Analysis of various factors at presentation which predict failure to first line treatment and their response to second line therapy. *Journal of Pakistan Medical Association*. 2007;57(3):126.
67. George JN, Shattil SJ. The clinical importance of acquired abnormalities of platelet function. *New England Journal of Medicine*. 1991;324(1):27-39.
68. Karpatkin S. Autoimmune thrombocytopenic purpura. *The American journal of the medical sciences*. 1971;261(3):127-38.
69. Martin F, Chan AC. Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic. *Immunity* 2004;20:517–2770. Gudbrandsdottir S, Brimnes M, Køllgaard T, Hasselbalch HC, Nielsen CH. Effects of rituximab and dexamethasone on regulatory and proinflammatory B-cell subsets in patients with primary immune thrombocytopenia. *Eur J Haematol*. 2018;100(1):45–52
71. Kwiatkowska A, Radkowiak D, Wysocki M, Torbicz G, Gajewska N, Lasek A, et al. Prognostic factors for immune thrombocytopenic purpura remission after laparoscopic splenectomy: a Cohort study. *Medicina*. 2019;55(4):112.
72. Regulatory and Memory B Lymphocytes in Children With Newly Diagnosed Immune Thrombocytopenia Asmaa M. Zahrana , Sanaa Shaker Alyb, Ahmed Elabdc , Ismail Lotfy Mohamadd, e , Khalid I. Elsayhd
73. Martinez-Gamboa L, Mei H, Loddenkemper C, Ballmer B, Hansen A, Lipsky PE, Emmerich F, et al. Role of the spleen in peripheral memory B-cell homeostasis in patients with autoimmune thrombocytopenia purpura. *Clin Immunol*. 2009;130(2):199-212
74. Krutzmann S, Rosado MM, Weber H, Germing U, Tournilhac O, Peter HH, Berner R, et al. Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J Exp Med*. 2003;197(7):939-945
75. Ghanima W, Godeau B, Cines DB, Bussel JB. How I treat immune thrombocytopenia: the choice between splenectomy or a medical therapy as a second-line treatment. *Blood*. 2012;120(5):960-969.

76 Thrombopoietin receptor agonists: ten years later Waleed Ghanima,<sup>1,2</sup> Nichola Cooper,<sup>3</sup> Francesco Rodeghiero,<sup>4</sup> Bertrand Godeau<sup>5</sup> and James B. Bussel<sup>6</sup>

77. Marieke Schoonen W, Kucera G, Coalson J, Li L, Rutstein M, Mowat F, et al. Epidemiology of immune thrombocytopenic purpura in the General Practice Research Database. *British journal of haematology*. 2009;145(2):235-44.

