

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

ALLOJENEİK KÖK HÜCRE NAKLİ YAPILAN AKUT
MYELOBLASTİK VE KRONİK MYELOSİTER LÖSEMİ
HASTALARINDA HAFTALIK ADAMTS13 ENZİM TAYİNİ VE
KOMPLİKASYONLARLA İLİŞKİSİ

DR.SİNEM CİVRİZ BOZDAĞ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
PROF.DR.MUHİT ÖZCAN

ANKARA

2005

Bu tez A.Ü BAPD ve Türk Hematoloji
Derneği tarafından desteklenmiştir.

ÖNSÖZ:

Bu çalışmanın her aşamasında bana yardımcı ve yol gösterici olan tez danışmanım Prof.Dr.Muhit Özcan'a, İç hastalıkları uzmanı olarak yetişmemde katkıları olan İç Hastalıkları Ana bilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Bülent Erbay'a ve diğer İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Öğretim Üyelerine, Laboratuvar çalışmalarında sonsuz yardımlarını gördüğüm Biyolog. Seda Günaltay'a, Uz.Dr.Klara Dalva 'ya, yöntem konusunda bana yol gösteren Goethe Üniversitesi Hemostazioloji Bilim Dalından Biyolog Martina Böhm'e, yardımlarını benden esirgemeyen Hematoloji Bilim Dalı uzmanlarına, bana destek olan tüm asistan arkadaşlarıma ve aileme teşekkürlerimle.

Dr.Sinem Civriz Bozdağ

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANELERİ
İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanlığı

Kısım:.....
Dosya No:.....Sayı:.....
Konu:.....
.....

A n k a r a
/ /

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

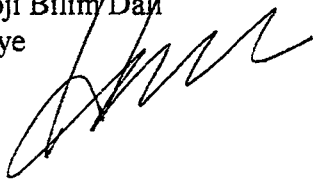
“Allojeneik Kök Hücre Nakli Yapılan Akut Myeloblastik ve Kronik Myelositer Lösemi Hastalarında Haftalık ADAMTS13 Enzim Tayini ve Komplikasyonlarla İlişkisi” başlıklı, Dr.Sinem Civriz’e ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 04 / 03 / 2005

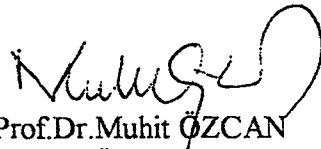


Prof.Dr.Bülent ERBAY
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı
Jüri Başkanı

Prof.Dr.Nahide KONUK
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Hematoloji Bilim Dalı
Üye



Prof.Dr.Muhit ÖZCAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Hematoloji Bilim Dalı
Tez Danışmanı



İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

1.GİRİŞ –AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1 Allojeneik Hematopoitik Hücre Nakli Komplikasyonları	3
2.2 Von Willebrand Faktör.....	8
2.3 Von Willebrand Parçalayıcı Enzim (ADAMTS13)	10
2.3a Enzimin biyosentez ve katabolizması	11
2.3b Enzimoloji	12
2.3c ADAMTS13 Enzimi Ve Çeşitli Hastalıklar	13
2.3 d ADAMTS13 Enziminin Aktivite Ölçüm Yöntemleri	14
3-HASTALAR VE YÖNTEM.....	18
3.1 Hastalar	18
3.2 Serum Toplanması ve Saklanması.....	18
3.3 ADAMTS13 Aktivitesinin Von Willebrand Ristosetin Kofaktör Yöntemiyle Ölçülmesi	18
3.4 İstatistiksel Analizler.....	19
4- BULGULAR.....	20
4.1 Hastalara ve Sağlıklı Kontrollere Ait Enzim Takip Sonuçları	20
4.2 Komplikasyon Gelişen Hastalarda ADAMTS13 Enziminin Seyiri	26
5-TARTIŞMA	32
6-ÖZET.....	38
7-SUMMARY	40
8-KAYNAKLAR.....	42

SİMGELER ve KISALTMALAR:

ABMTR	:American Bone Marrow Transplantation Registry
ADAMTS13	: Von Willebrand parçalayıcı enzim
AGVHH	:Akut graft versus host hastalığı
AML	:Akut Myeloblastik Lösemi
DF PKA	:Doku faktör prokoagulan aktivitesi
EBMTR	:European Bone Marrow Transplantation Registry
HKHN	:Hematopoietik kök hücre nakli
IBMTR	:International Bone Marrow Transplantation Registry
IFNγ	:İnterferon gama
IL-1	:İnterlökin 1
IL-6	:İnterlökin 6
IL-8	:İnterlökin 8
IL-18	:İnterlökin 18
KGVHH	:Kronik graft versus host hastalığı
KML	:Kronik myelositer Lösemi
RT PCR	:Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
TNFα	:Tümör nekrozis faktör alfa
TTP	:Trombotik trombositopenik purpura
VOH	:Veno-okluziv hastalık
vWF	:von Willebrand faktör
vWF:RiCoF	: von Willebrand ristosetin kofaktör aktivitesi

1-GİRİŞ-AMAÇ:

Yaklaşık yüz yıldır bilinen trombotik trombositopenik purpura hastalığında, von Willebrand faktörün önemli olduğu anlaşıldıktan sonra, bu molekül üzerinde yoğunlaşan çalışmalar 1996 yılında bu molekülü düzenleyici rol oynayan metalloproteazın keşfi ile aşama kaydetmiştir.

Von Willebrand faktör'ün, endotelial hücrelerden sekrete edilen yaklaşık 190 kDa büyüklüğünde olan, bivalan katyonlarca aktive edilen bir metalloproteaz tarafından fizyolojik olarak parçalandığı tespit edilmiştir (1).

Trombotik trombositopenik purpura (TTP) hastalığında, trombüslerin esas olarak von Willebrand faktör (vWF) ve trombositten oluştuğu bilinmektedir (2). Hastaların plazmaları incelendiğinde ilginç olarak oldukça büyük vWF multimerleri olduğu görülmüştür (3). Von Willebrand faktör hemostazındaki bu bozukluk vWF parçalayıcı enzim (ADAMTS13) aktivitesindeki düşüklük ile açıklanmıştır (4). Sistemik lupus eritematozus, tiroidit, psöriasis, Chrohn gibi immunolojik hastalıklara eşlik eden trombotik mikroangiopati tanısı olan hastalarda da enzim aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (5). Yapılan bir çalışmada ise, kemik iliği nakli yapılan hastalarda veno-okluziv hastalık gelişmesi durumunda enzim aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (6).

Bu çalışmanın birincil amacı, hematopoietik kök hücre nakli yapılan hastalarda bazal ve haftalık ADAMTS13 aktivitesini izlemek, bu aktivitenin klinik seyirle ilişkisini kurmaktır. Vasküler sistemde nasıl regüle edildiği belli olmayan ADAMTS13 enziminin nakile bağlı aplazi dönemindeki değişikliklerini belirlemek amaçlanmıştır. Bu çalışmanın ikincil amacı ise, henüz çok az laboratuvarında çalışılan, ülkemizde ise çalışılmadığını bildiğimiz yeni bir yöntem olan rezidüel von Willebrand ristosetin kofaktör (vWF:RiCoF) tayini aracılığıyla ADAMTS13 ölçüm yöntemini sağlıklı bir şekilde yerleştirmektir.

2-GENEL BİLGİLER:

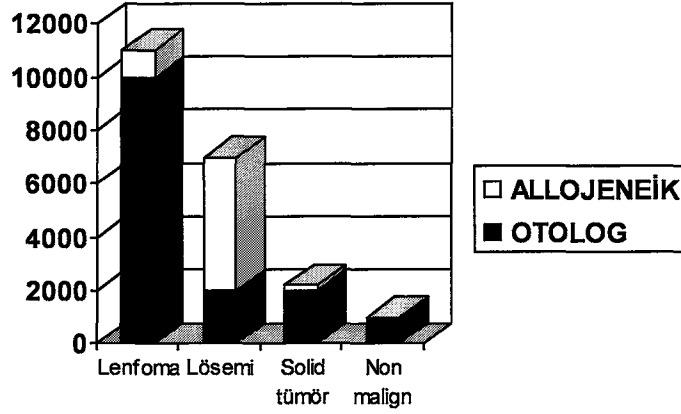
Hematopoitik hücre nakli, bazı hematolojik, immunolojik ve metabolik hastalıklarda etkin bir tedavi seçeneğidir. Hematopoitik sistemin bir çok ciddi kalıtsal veya kazanılmış hastalığı, kemosensitif, radyosensitif veya immunsensitif malignensiler için kanıtlanmış bir tedavidir.

Günümüzde, hematopoitik hücre nakli ve bu tedavi yönteminin uygun kabul edildiği hastalık sayısı giderek artmaktadır. IBMTR (International Bone Marrow Transplantation Registry), ABMTR (American Bone Marrow Registry), EBMTR (European Bone Marrow Registry) sonuçlarına göre dekad başına ortalama %10 sağkalım artışı sağlanmaktadır (7).

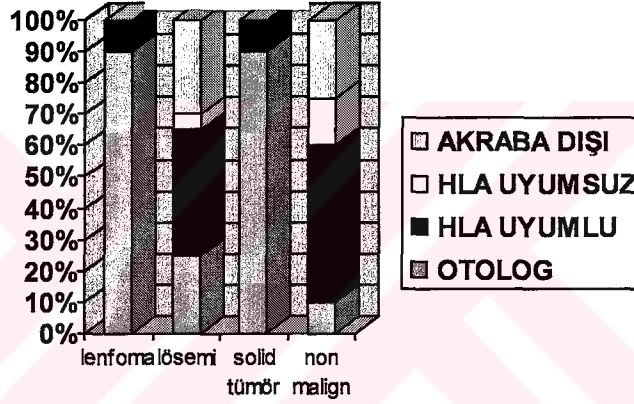
Otuzdokuz Avrupa ülkesinden alınan verilerle hazırlanan EBMTR raporlarına göre; 2002 yılında, 6915'i allojeneik (%34) ve 13292'i (%66) otolog olmak üzere 20217 hastaya ilk kez kök hücre nakli yapılmıştır. 1268 hastaya ikinci kez (759 allojeneik/509 otolog) ve 2679 (344 allojeneik/2335 otolog) hastaya ise bir çok kez nakil yapılmıştır. Toplam olarak ise; 2002 yılı içinde 24154 kök hücre nakli işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunların 8018'i allojeneik (%33) ve 16 136 (%67) 'sı otologdur.

Hematopoitik kök hücre kaynağı olarak; kemik iliği, periferal kan veya kord kanı kullanılabilir. Allojenik kök hücre nakli için, HLA uyumlu kardeş, diğer aile üyeleri veya akraba dışı gönüllüler verici olabilir (7) (Grafik 1.).

A



B



Grafik 1. Hastalık tiplerine göre otolog ve allojeneik nakil insidansları.

Allojeneik kök hücre nakli alışagelmış uygulama şeklini 1960'ların sonunda almıştır. İlk başlarda, allojeneik transplantasyon uygulamalarının günümüzde temel olarak sürmekte olan standart modelinin etki şeklinin malign hastalıkların tedavisinde 'hematopoietik hücre desteğinde toksik yüksek doz kemoradyasyon tedavisi ile hastalık eradikasyonu', malign hastalıkların ve kemik iliğinden kaynaklanan malign hastalıkların tedavisinde ise 'hematopoietik hücre desteğindetoksik yüksek doz kemoradyasyon tedavisi ile kemik iliğinin yenisi ile değiştirilmesi' olduğu düşünülmüştür. Kür sağlayan gerçek etkinin yüksek doz tedaviye ait olmaması, verici hücrelerine yer açmak için kemik iliğinin ortadan kaldırılmasının gerekmediğinin anlaşılması, transplant öncesi hazırlama rejimlerinde önemli değişikliklerin yapılmasını sağlamıştır. Çok daha az toksik, yeterli immunsupresyonu ve graftı içeren uygulamalarla graft versus tümör

etksini sağlayan başarılı transplantlar yapılmaya başlanmıştır. Myeloablatif ajanlar, busulfan, melfelan, nitrozüre(BCNU, CCNU) ve tiotepadır. Tüm bu myeloablatif ajanların teker teker baz alındığı hazırlama rejimlerinde, myeloablatif olmayan siklofosfamid, ifosfamid, etoposid, mitoksantron, doksorubisin, sisplatin, karboplatin veya sitarabin gibi ajanların yüksek dozları ek ajan olarak kullanılır. Nonmyeloablatif rejimlerde, total vücut ışınlaması, busulfan, melfelan, tiotepa, fludarabin, siklofosfamid gibi ajanlar sublethal dozlarda kullanılır.

2.1 Allojeneik Hematopietik Hücre Nakli Komplikasyonları:

Allojeneik kök hücre nakli, %20-25 oranlarında nüks riskine sahip olmakla birlikte, en etkili antilösemik tedavi olarak bilinmektedir. Birinci tam remisyonda başarılı nakil yapılan hastalarda bile, gelişen toksisiteler sonrası 5 yıllık sağkalım %50 olarak bildirilmiştir. Hasta yaşı ve hastalık evresi sağkalımı etkileyen faktörlerdir. Kronik graft versus host hastalığı, kemoterapi ile remisyona girmiş hastalarda allojeneik kök hücre nakli sonrası, uzun dönem morbiditeye sebep olur (8).

Nakilden sonra görülen komplikasyonlar, altta yatan primer hastalığa bağlı olarak değişmekle birlikte, ortak olanlar dört ana grupta toplanabilir:

1-Hazırlama rejimine ve nakil sonrası immunsupresyona bağlı komplikasyonlar; mukozit, kalp ve böbrek yetmezliği, karaciğerde veno-okluziv hastalık, interstisyel pnömoni ve geç ikincil malignite,

2-Enfeksiyonlar; nötropeni ve graftın immunolojik işlevlerinin düzelmesindeki yavaşlığa bağlı enfeksiyonlar,

3-İmmunolojik sorunlar; akut ve kronik graft versus host hastalığı, engraftman yetmezliği

4-Hastalık nüksü.

Hematopietik kök hücre nakli sonrası hastada engraftman olduktan sonra verici kaynaklı hematopoezin yeniden başlaması başarılı bir transplantasyon olarak kabul edilir.

Graft versus host hastalığı (GVHH), sağlıklı vericiden alınan immunolojik olarak yeterli T lenfositlerin, doku grubu antijenleri yönünden tam uyumlu alıcıda, bazı minör antijenler ve diğer bilinmeyen antijenler aracılığıyla gelişen, bir seri immunolojik olaylar zinciridir (9).

Akut graft versus host hastalığı (AGVHH), transplantasyon sonrası yeterli immunsupresif tedaviye rağmen, morbidite ve mortalite açısından önemli bir problem olmaya devam etmektedir. HLA uyumlu akraba vericilerinden kök hücre veya kemik iliği nakli yapılan hastaların %30'unda immunsupresif profilaksiye rağmen grade 2 ve üzeri akut GVHH gelişmektedir.

HLA farklılığı, akut GVHH'nin en önemli hazırlayıcı faktörüdür. Diğer GVHH öncüsü olan faktörler arasında; yaş, cinsiyet uyumsuzluğu (kadın verici-erkek alıcı) HLA uyumlu hastalarda minör histokompatibilite antijenleri, verici yaşı, kök hücre kaynağı ve dozu, hazırlık rejiminin cinsi ve GVHH profilaksi yoğunluğu, T hücre ayıklanması yer alır. Akut GVHH başlıca cilt, üst ve alt gastrointestinal sistem, karaciğer nadiren de göz ve oral mukozayı etkiler (9, 10).

Akut GVHH patofizyolojisi, üç fazlı bir fenomen olarak tarif edilmektedir. Başlangıçta; hazırlık rejimi veya radyasyon etkisi ile alıcı dokularında hasar meydana gelir ve İnterlökin-1 (IL-1), Tümör nekrozis faktör alfa (TNF α), İnterferon gama (IFN γ) gibi inflamatuvar sitokinler salgılanır. İkinci fazda; hem alıcı, hem de vericinin antijen sunan hücreleri inflamatuvar sitokinlere ek olarak verici T hücrelerini tetiklerler. T hücre aktivasyonu IL-2, IFN gama gibi sitokinlerin genlerinin transkripsiyonuna sebep olur. Üçüncü fazda ise, aktive olmuş verici T₈ hücreleri sitotoksitenin gelişmesine sebep olur. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalında bu konuda yapılan bir çalışmada, IL-2 ve TNF α 'nın, AGVHH gidişini belirlediği ve TNF α ile nakil ilişkili mortalite arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir (11). AGVHH hastalığında endotelial hasar olur. AGVHH gelişen ve gelişmeyen hastalardan alınan cilt biopsileri kıyaslandığında, endotelial hasarı destekleyen bulgular olarak; intimada lenfosit infiltrasyonu ve damarların etrafında von Willebrand birikiminde anlamlı artış olduğu

gösterilmiştir (12). Von Willebrand parçalayıcı enzim (ADAMTS13) ile AGVHH ilişkisini araştıran bir çalışma bugüne dek yapılmamıştır.

Kronik graft versus host hastalığı, allojeneik kök hücre nakli sonrasında en sık görülen komplikasyondur. HLA uyumlu ilik nakli yapılan hastaların %60-70'inde kronik GVHH geliştiği gösterilmiştir. Lösemi nedeniyle nakil yapılan ve GVHH profilaksisi için çeşitli tedavi rejimleri uygulanan hastalarla yapılan bir çalışmada ise kronik GVHH oranı %34 olarak rapor edilmiştir (13). Kronik GVHH gelişimine yol açan faktörler arasında en sık rastlanılanlar; ileri yaş, kadın verici ve erkek hasta, kronik myelositer lösemi veya aplastik anemi nedeniyle nakil yapılmış olması, akraba dışı nakil yapılması, kemik iliği yerine periferik kök hücre kullanılması ve T hücre ayıklanmasıdır. Kronik GVHH'de cilt, karaciğer, göz, oral mukoza, ve akciğer tutulumu olur (13).

Kronik GVHH patofizyolojisi de yeterince anlaşılamamış bir konudur. Kronik GVHH 'nin ayrı bir durum mu yoksa akut GVHH 'in devamı mı olduğu sorusu tam olarak cevaplanamamıştır. Klinik ve deneysel çalışmalarda, timik atrofi, lenfosit deplesyonu ve otoantikör oluşumundan bahsedilmektedir. Hazırlık rejimleri ve akut GVHH timik işlevi bozar ve otoreaktif T lenfositlerin negatif seçim işleminin düzenlenmesini etkiler. Self reaktif lenfositlerin büyük bir kısmının ortadan kaldırılması ve timik apopitozun bozulması, lenfosit hemostazını etkiler. Otoreaktif T hücrelerin artması, otoreaktif B hücre aktivasyonunu, hedef organ hasarı ile birlikte otoantikör oluşumunu beraberinde getirir. Kronik GVHH bir T_{h2} hastalığı olarak bilinir. Hayvan çalışmaları ile IL-12, İnterlökin 18 (IL-18), IFN γ gibi sitokinlerin rolü ortaya konmuştur. IL-12, verici sitotoksik CD8 T hücrelerinin artmasına sebep olur. IL-18 ise verici CD4 (Th2) hücrelerini, alıcıdaki reaktif B hücrelerini ve böylece alloantijen spesifik immun cevabı azaltır. Otoreaktif T hücrelerinin interferon gamayı artırmak yoluyla kollajen depolanmasını artırabileceği de düşünülmektedir (14). ADAMTS13 ile kronik GVHH arasındaki ilişkiyle ilgili olarak da hiç çalışma yapılmamıştır.

Kök hücre nakli yapılan hastalarda febril nötropeni olasılığı olan dönem, hazırlama rejiminin verilmesi ile engraftman arasında geçen dönemdir. Bu süre yaklaşık 30 gün sürer. Allojeneik nakil yapılan hastalarda ateşe yol açan enfeksiyonlar, standart febril nötropenik hastalarda görülen enfeksiyonlardan farklı olabilir. Bu hastaların hemen

hepsine kateter takıldığı ve şiddetli mukozit gelişim olasılığı göz önüne alınırsa, gram pozitif enfeksiyonların sık görülmesi beklenir. Bu dönemde enfeksiyon etkeni kaynakları, endojen flora, hava yolu ile gelen mantarlar, solunum yolu virüsleri, sağlık personelinin elleri ve latent virüslerdir. Son yıllarda, hastanın savunma mekanizmasındaki defektlerin, bakteriyel patogenezin ve enfeksiyon epidemiyolojisinin saptanması, daha etkili ama daha az toksik antimikrobiyal tedavi seçeneklerinin gelişmesi enfeksiyon nedeniyle oluşan morbidite ve mortalitenin azalmasına sebep olmuştur. Ancak fırsatçı patojenlerin epidemiyolojisi, mikroorganizmaların antimikrobiyal direnç kazanması, daha yaşlı popülasyona nakil yapılması, farklı kök hücre kaynaklarının kullanılmaya başlanması, yeni hazırlık rejimleri, immunsupresif tedavi seçenekleri, enfeksiyonla savaşılırken aşılması gereken problemlerdir (15). Yine febril nötropeni ve diğer enfeksiyöz hastalıklarla ADAMTS13 ilişkisi konusunda da hiç çalışma yapılmamıştır.

Kök hücre nakli yapılan hastalarda, transplant ilişkili trombotik mikroanjiyopati gelişebilmektedir. Bu sendrom, mikroanjiyopatik hemolitik anemi, renal disfonksiyon ve nörolojik anormalliklerle karakterizedir. Persistan anemi veya trombositopeninin, eritrosit ve trombosit geç engraftmanına, myelosupresif tedavinin etkilerine veya enfeksiyon, GVHH gibi durumlarda gelişen tüketime bağlanması nedeniyle tanı güçlüğüle konulabilmektedir. Bu sebeple bildirilen sıklık oranları %0 ile %74 arasında değişmektedir. Yapılan çalışmalarda, klasik trombotik trombositopenik purpuraya sebep olan von Willebrand parçalayıcı enzim aktivitesinin, transplant ilişkili trombotik mikroanjiyopati gelişen hastalarda azalmadığı gösterilmiştir. Patogenezde enzim eksikliğinden ziyade endotelial hasarının sorumlu olduğu düşünülmüştür. (16-18).

Allojeneik hematopoietik kök hücre nakillerinde, özellikle hazırlık rejiminin neden olduğu doku hasarı ve sitokin yükü altında ortaya çıkan birtakım değişikliklerin yol açtığı trombotik komplikasyonlar, transplant merkezlerinin önemli bir mortalite ve morbidite sorunudur. Yetişkin hastalarda nakil ve hiperkoagülabilitate ile ilişkili bir çok çalışma vardır. Nakil sonrası, 1-3. haftalarda antitrombin III ve Protein C'nin azaldığı, 1-5. haftalar arasında ise trombomodulin, doku plasminojen aktivatörü (TPA), ve plasminojen aktivatör inhibitörünün (TPA-I) arttığı gösterilmiştir (19). Ankara

Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji bölümünde yapılan bir çalışmada, allojeneik hematopoietik kök hücre nakli yapılmış olan hastalarda, aplazi döneminde Protein C'nin anlamlı olarak azaldığı ve aplazi dönemindeki Antitrombin-III miktarının akut graft versus host hastalığı gelişen hastalarda, gelişmeyenlerden daha fazla olduğu gösterilmiştir (20). Üniversitemizde yapılan bir diğer çalışmada ise, metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) gen mutasyonu veya Faktör 5 Leiden mutasyonu olanlarda, allojeneik nakil sonrası trombotik komplikasyonlar ve veno-okluziv hastalık geliştiği saptanmıştır (21). Doku faktör prokoagülan aktivitesi (DF PKA) ile ilgili yapılan bir çalışmada ise, nakil öncesi döneme göre doku faktör prokoagülan aktivitesinin aplazi döneminde %55 oranında düştüğü, engraftman döneminde ise bazal değerlerine yaklaştığı gösterilmiştir (22).

Kök hücre nakli sonrası gelişen ve hiperkoagülabilitenin rol aldığı düşünülen bir diğer hastalık ise karaciğer veno-okluziv hastalığıdır. Karaciğer veno-okluziv hastalığı (VOH); hematopoietik kök hücre naklinden sonraki 30 gün içinde gelişen hepatik venüllerde trombüs oluşumuyla karakterize bir hastalıktır. Hiperbilirubinemi, hepatomegali ve asit semptom üçlüsünden oluşur (6). Etyolojisi tam olarak belirlenememiş olmakla birlikte, hasarlanmış endotelle döşeli sinüzoid, porlar ve bozulmuş hemostatik sistem sorumlu tutulmaktadır.

Karaciğer veno-okluziv hastalığı, nakil sonrası en sık rastlanan trombotik komplikasyondur. Çeşitli kaynaklarda VOH insidansı %0-70 ve buna bağlı mortalite de %20-50 arasında değişmektedir.

Modifiye *Seattle* kriterlerine göre, nakil sonrası, 20 günden önce bilirubin düzeylerinin 2 mg /dl üzerine çıkması, sağ üst kadranda ağrısı, hepatomegali, asit ile veya asit olmadan bazalin %2 'sinden fazla kilo alımı kriterlerinden en az ikisinin olması gereklidir.

VOH gelişimini engellemenin en başarılı yolu, yüksek VOH riski olan hastalarda kök hücre naklini yapmamak, sitotoksik ilaçların dozlarını azaltmak ve fraksiyone total vücut ışınlaması uygulamak olabilir. Profilaktik düşük doz unfraksiyone heparin, kanama riskini artırırken, düşük molekül ağırlıklı heparin profilaksisi ile alınan sonuçlar daha iyimserdir (23). Ursodeoksikolik asit, safra asidi yerine geçer ve kolestazdan

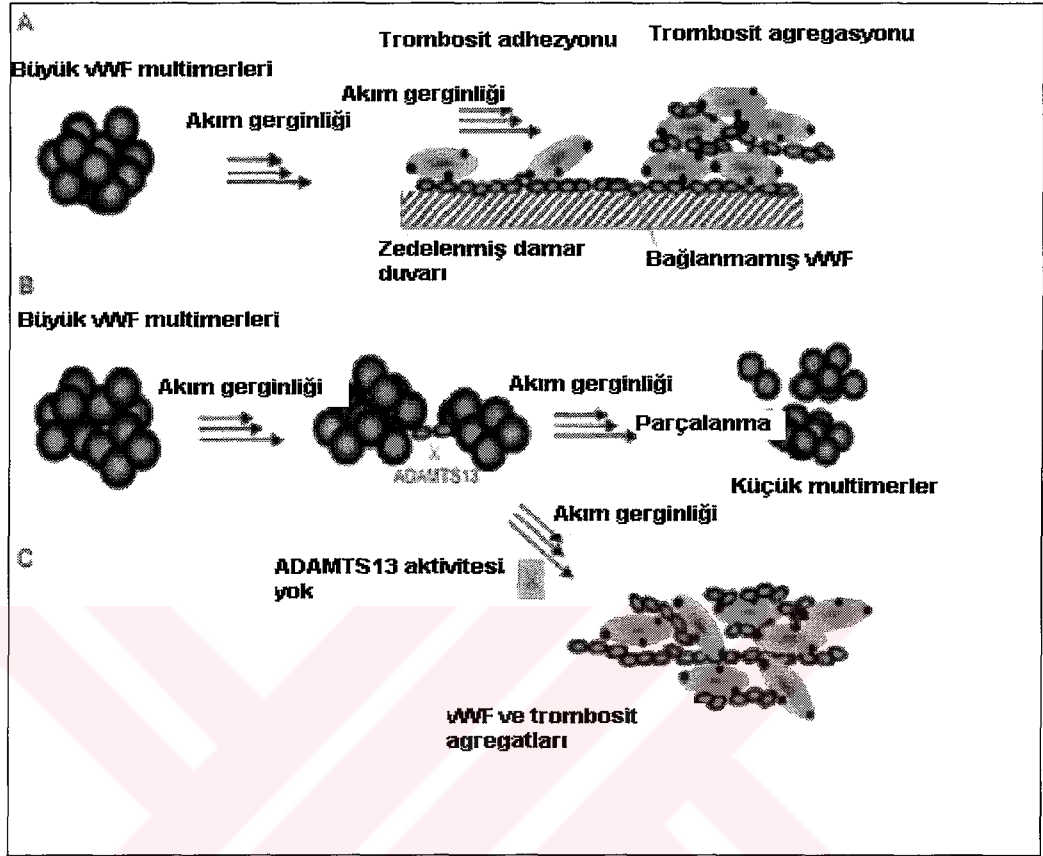
hepatositleri koruduğu düşünülmektedir. Vasküler oklüzyon tedavi stratejileri arasında doku plazminojen aktivatör ve Prostaglandin E1 kullanımı denenmektedir (23).

2.2 Von Willebrand Faktör:

Von Willebrand faktör, endotelial hücrelerden sekrete edilir. Disülfid bağları ile bağlanmış dimerlerden oluşan çok büyük bir polimerdir (24). Endoplazmik retikulumda vWF peptidleri, pro-vWF dimerik formlarını oluşturmak için karboksil terminalinin yanından bağlanır. Dimerler, golgi kompleksine ve depo granüllere geçerler. Burada öndizin parçalanır ve disülfid bağları amino terminalinin yanından ortaya çıkar. Von Willebrand multimerleri, megakaryosit ve endotel içinde yapılırlar ve *Weibel Palade* cisimcikleri içinde depolanırlar. *Weibel palade* cisimciklerinden P selektin maddesiyle eş zamanlı olarak salınırlar. Bu salgılanmayı sağlayanlar ise Shiga toksin, TNF-alfa, histamin, İnterlökin 8 ve İnterlökin 6'dır (25).

Dolaşımında, bir proteaz endotelial vWF'yi parçalar ve bir seri multimer oluşmasını sağlar (25). Bu plazma proteazının, büyük vWF multimerlerini yüksek akım gerginliği altında, in vitro olarak düşük iyonik güç altında, üre ve guanidin varlığında parçaladığı saptanmıştır.

Von Willebrand faktör, akım gerginliğine cevap veren bir yapıdadır. Statik durumlarda globular bir yapıya sahip iken, akım gerginliğine maruz kaldığı durumda uzamış filamentöz bir forma dönüşür ve parçalanmaya açık hale gelir. Statik durumlarda vWF'nin globular yapısı onu proteazın parçalayıcı etkisine maruz kalmaktan korur (24). Açılmış vWF formu vWF-trombosit bağlanma riskini artırır, trombosit-trombosit agregasyonu olur ve mikrovasküler trombüsler gelişir. Von Willebrand faktör parçalayıcı enzimin, vWF multimer boyutlarını indirgeyen tek mekanizma olmadığı da bilinmektedir. Birçok proteazın vWF parçalayıcı etkisi olduğu ve in vivo olarak birçok bölgeden vWF subunit parçalanmasının gösterilebildiği bildirilmektedir. Plazma trombospondin-1, vWF multimer boyutunu azaltan bir trimerik glikoproteindir. Von Willebrand faktör'e karşı disülfid reduktaz etkisi vardır (26).



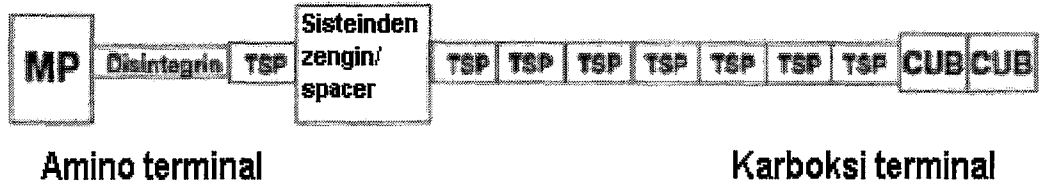
Şekil 1. Trombositler ve vWF arasındaki ilişkiyi belirlemede ADAMTS13 ve akım gerginliğinin rolü. (A)vWF hasarlanmış bir damar duvarından akım gerginliğinin etkisiyle ortaya çıkar ve trombosit adezyon, agregasyonu için substrat görevi yapar. (B)Dolaşımda, ADAMTS13, vWF'yi akım gerginliğinin etkisiyle parçalanma bölgesi ortaya çıkar çıkmaz parçalar, küçük multimerler oluşur.(C) ADAMTS13 enziminin eksikliğinde, vWF açığa çıkar, vWF parçalanması azaldığı için ultra büyük multimerler arteriol ve kapillerlerde trombosit kümelerini oluşturur (9).

2.3 Von Willebrand Parçalayıcı Enzim (ADAMTS13):

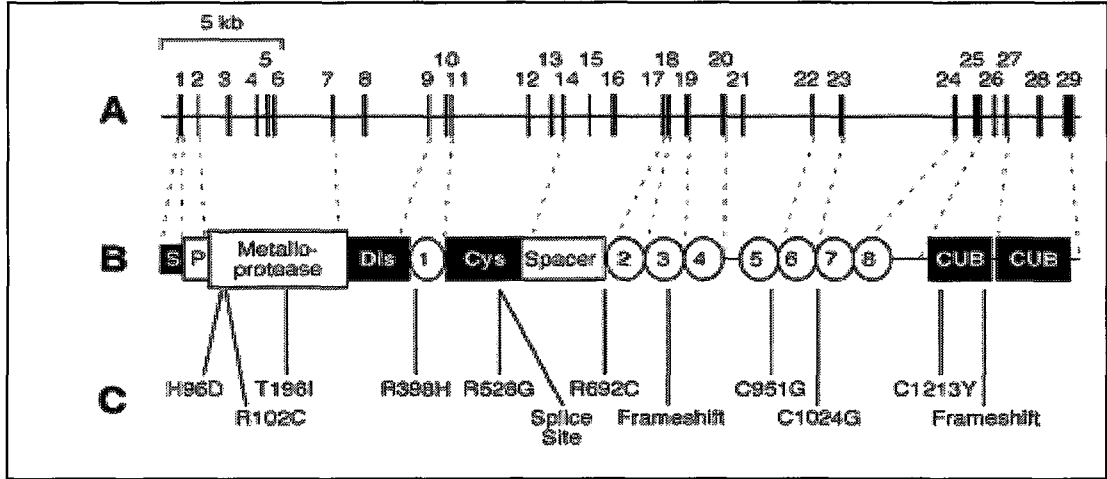
Von willebrand parçalayıcı enzim diğer adıyla ADAMTS13, on dokuz ADAMTS proteazından biridir. ADAMTS kısaltması, “*a disintegrin like and metalloprotease with thrombospondin type I*” olarak belirtilir ve ADAMTS13 bu ailenin tüm yapısal motiflerini içerir. ADAMTS13, 1427 amino asid rezidüsü bulundurur. Bir sinyal peptidi, bir görece kısa propeptid, *reprolysin*, *adamalysin* tip metalloproteaz parçası, bir

disintegrin parçası, bir *thrombospondin* tip 1 tekrarlayıcı bölüm 8TSP19, bir karakteristik sisteinden zengin bölge, *spacer* parçası ve 7 ek TSP1 tekrarı içerir. Diğer ADAMTS ailesi üyelerinden farklı olarak C terminalinde 2 CUB parçası içerir (27-29).

ADAMTS-13



Şekil 2. ADAMTS13 enzimi. Kısaltmalar: MP; metalloproteaz (proteolitik) bölge, TSP; trombospondin-1benzeri bölge, CUB; kompleman komponentlerinde bulunana benzer peptid bölgeleri içeren iki bölge, C1r/C1s; deniz *urchin* proteini ve kemik morfojenik proteini (26).



Şekil 3. ADAMTS13 yapısı ve konjenital TTP'de gelişen mutasyonlar. ADAMTS13 geni (A) kromozom 9q34 üzerinde olup 29 ekzon içerir. Noktalı çizgiler ADAMTS13 proteini ile ekzonların ilişkisini gösterir (B). Yapısal parçalar; sinyal peptid(S), propeptid(P), metalloproteaz, disintegrin parçası (Dis), trombospondin 1 tekrarları (1-8 olarak sınıflandırılmış), sisteinden zengin parça (Cys) ve *spacer* parçasından oluşur. Konjenital TTP hastalarındaki mutasyonlar ise C bölgesinde gösterilmiştir (28, 31).

2.3a Enzimin biyosentez ve katabolizması :

Northern Blot yöntemi kullanılarak 4.6 Kb uzunluğundaki mRNA' nın sadece karaciğerde bulunduğu gösterilmiştir. Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) kullanılarak ADAMTS13 enziminin mRNA veya alternatif izoformlarının beyin, plasenta, over, kalpte bulunduğu bilinmektedir. Ancak bu mRNA'ların fonksiyonel protein sağlayıp sağlamadığı açık değildir (32).

ADAMTS13, proteoliz ve glikolizasyondan oluşan posttranslasyonel işlemlere uğrar. ADAMTS13 zimojen olarak sentezlenmekte ve inaktif propeptidin parçalanması yoluyla aktive olmaktadır.(33, 34, 35).

ADAMTS13 plazma konsantrasyonu, tam olarak bilinmemekle birlikte, 1 mikrogram/mikrolitre olarak tahmin edilmektedir (35). Dolaşımdaki yarı ömrü yaklaşık 2-3 gündür. Bu durum enzimin konjenital yetmezliği olanlarda trombotik

mikroanjiopatinin rekürrensini engellemek için plazma infüzyonun her 2-3 haftada bir yapılmasının temelini açıklamaktadır (36-38).

2.3b Enzimoloji:

ADAMTS13 aktivitesi, Zn^{+2} ve Ca^{+2} düzeylerine bağlıdır. Gerekli Ca^{+2} iyonu, Ba^{+2} veya Sr^{-1} ile yer değiştirebilir. Enzim, pH 7 ve pH 11 arasında aktif olmakla birlikte pH 8'de optimal aktivite göstermektedir. Birçok metal bağlayıcılara dirençli olması plazmadaki uzun yarı ömrünü açıklar (1, 3).

ADAMTS13, konvansiyonel kromotografik yöntemlerle 190 kDa'lık bir protein olarak saptanmıştır (34). Enzim, aynı zamanda otoimmün TTP olan bir hastadan elde edilen Immunglobulin G (Ig G) kullanılarak da, immunafinite kromotografi yöntemiyle 180 kDa, 160 kDa, 120kDa olarak izole edilmiş, hepsinin aynı N terminal protein dizinini içerdiği gösterilmiştir ki, bu da, küçük dizinlerin parçalanma sonucu uzun dizinlerden geliştiğini düşündürmüştür (34). Diğer ADAMTS ve metalloproteazlar ile karşılaştırıldığında, ADAMTS13 propeptidinin oldukça kısa olduğu görülmüştür. Diğerlerinde bulunan tipik 200 aminoasid rezidüsü yerine 41 aminoasid içerdiği kanıtlanmıştır. Diğer metalloproteazlarda, propeptidler protein bağlanması için endojen şaperon olarak görev yaparlar veya 'sistein-kilit' mekanizması denen bir mekanizmayla, sistein bölgesinin aktif Zn^{+2} iyonunu koordine etmesi sayesinde proteolitik aktiviteyi inhibe ederler. ADAMTS13 diğer ADAMTS ailesi üyelerinde olduğu gibi tipik proprotein konvertaz bölgesi olan RQRR ile sonlanır fakat diğerlerinden farklı olarak potansiyel sistein kilit bölgesi içermez. Enzim bağlantı bölgesine bağlandığında kendiliğinden aktive olur (39).

ADAMTS13'ün bilinen tek substratı vWF dir. İn vivo, parçalanma işlemi vWF subunitinin ortasındaki 3 ardışık bölgede bulunan Try 842 – Met 843 arasından olur. Bu parçalanma sonrası 176 kDa ve 140 kDa dan oluşmak üzere 2 parça oluşur (1, 3, 36, 37). Endotelyal hücrelerden sekrete edilen ultra büyük multimerlere ADAMTS13 enziminin bağlanabilmesi için, CUB parçası veya trombospondin-1 benzeri bölge gereklidir. Spesifik olarak ADAMTS13 enzimi ultra büyük multimerlerin monomerik parçalarına bağlanır ve daha sonra A2 bölgesine yakın olan Tyr 842-843 Met peptid bağından

parçalama işlemi gerçekleştirilir (26). ADAMTS13 tarafından vWF parçalanma oranı, düşük konsantrasyonlarda üre veya guanidin hidroklorid ile denaturasyon veya akım gerginliği ile artar (40).

ADAMTS13 enziminin yapı/fonksiyon ilişkisi yapılan çalışmalarla ortaya konulmaya başlanmıştır; ancak, enzim aktivitesinin regülasyonu konusunda soru işaretleri halen devam etmektedir. İki yeni çalışmayla, bu sorulara yanıt aranmıştır. İnterlökin 6'nın ADAMTS13 aktivitesini sadece akım gerginliği durumunda bozduğu ve statik bir sistem kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada ise yüksek konsantrasyonlarda hemoglobinin enzim aktivitesini baskıladığı görülmüştür (41). Bu proteinlerin normal hemostazdaki rolü halen tam olarak bilinmemektedir. Crawley ve arkadaşlarının çalışmasında, normal hemostazda görev alan serin proteazlarından trombin, Xa ve plazminin ADAMTS13 enzimini yıkıma uğrattığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, enzimin trombin tarafından parçalanmasının endotelden kaynaklanan trombomodulin maddesi ile inhibe edilebildiği ancak aynı sonucun heparin ile elde edilemediği bildirilmiştir (42).

2.3c ADAMTS13 Enzimi ve Çeşitli Hastalıklar:

Yapılan çalışmalar sonucunda, yüzde beş altındaki enzim aktivite düzeylerinin TTP tanısı koyabilmek için gerekli olan sınır değerler olduğu kabul görmektedir (43, 44). Enzimin spesifitesi bir çok kez incelenmiştir. Ciddi ADAMTS13 enzim aktivitesi eksikliğinin (%5 altı) TTP tanısı alan hastalar arasındaki sıklığı % 45 ile %100 arasında değişmektedir. Bunun sebebi olarak ise, TTP hastalarının klinik kategorisinin bu farkı yarattığı düşünülmektedir. İdiopatik TTP olan veya ilaca bağlı (tiklopidin, clopidrogel) TTP olan hastalarda aktivite çok düşük bulunurken, hematopoietik nakile bağlı TTP gelişen hastalarda aktivitenin normal olduğu görülmüştür. Bir çalışmada, ciddi enzim aktivite eksikliği olan onsekiz hastanın onaltısının (%89) idiyopatik kategoride olduğu gösterilmiştir (45-47).

Gebelerde enzim aktivitesinin azalmış olduğu, 12-16.haftadan erken puerperium dönemine kadar düşük seyrettiği, bu dönemden sonra normale döndüğü gösterilmiştir

(48). Yenidoğanda, enzim aktivitesi düşük bulunurken, çocuklarda yetişkinlerle benzer sonuçlar bulunmuştur (49, 50).

Von Willebrand faktör düzeyinin arttığı bir çok durumda, ADAMTS13 aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. Bu durum kronik inflamasyon veya postoperatif dönem gibi durumlarda görülebilmekle birlikte, desmopressin infüzyonundan sonra olduğu gibi kısa süreli durumlarda da oluştuğu gösterilmiştir (51, 52). Loof ve arkadaşları, dissemine intravasküler koagülasyon tanısı olan 14 hastada enzim aktivitesinin düşük bulunduğunu bildirmiştir (53). Moore ve arkadaşları ise, TTP dışında trombositopenik hastalıkları olan (SLE, Lösemi, ITP) hastalarda orta veya ciddi derecede aktivite eksikliği olduğunu göstermişlerdir (54). İleri evre malignensi nedeniyle takipte olan hastalarda enzim aktivitesinin %15 olduğu gösterilmiştir (55, 56). Ancak bu çalışmaların hepsindeki ortak nokta enzim aktivitesinin %20 ile %50 arasında seyredip, hiçbirinde %10 altına inmemesidir. Oysa TTP tanısı alan hastalarda, %5 altında değerler görülmektedir.

2.3 d ADAMTS13 Enziminin Aktivite Ölçüm Yöntemleri:

İlk kez 1996 yılında, Furlan ve arkadaşları, sık nüks eden TTP'li hastalarda ADAMTS13 enziminin eksikliğini ortaya koymuşlardır. Tsai ise, akut ataklarda enzimin plazma aktivitesinin azaldığını, iyileşme fazında ise düzeldiğini göstermiştir (1, 46, 57, 58).

Sırasıyla Furlan ve Tsai tarafından geliştirilen iki orijinal yöntemde, plazma ADAMTS13'ün BaCl₂ ve CaCl₂ tarafından aktivasyonu sonucu denature olan von Willebrand faktör'ün parçalanması prensipine dayanmaktadır. Bu yöntemle, parçalanma sonucu yüksek moleküler ağırlıklı vWF multimerlerinin kaybı değerlendirilmektedir. Furlan ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemde, havuzlanmış insan plazmasının dilüsyonları yoluyla oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılmış ve bu yolla vWF parçalayıcı proteaz aktivitesi normalin yüzdesi olarak hesaplanmıştır (2, 46).

Tsai tarafından uygulanan yöntem ise, yüksek moleküler ağırlıklı multimerlerin kaybından çok, parçalanmış vWF fragmanlarının gelişimi üzerine kurulmuştur. Tsai'nin yönteminde, EDTA varlığı ve yokluğunda olmak üzere, substrat olarak saflaştırılmış

vWF içeren dilüe plazma ile guanidin inkübe edilir. Dimerler, indirgenmemiş ortamlarda sodium dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak ayırt edilirler. I¹²¹ işaretli anti - vWF antikorları kullanarak fragmanlar işaretlenir ve otoradyografi ile çözülürler. EDTA bulunan ve bulunmayan karışım reaksiyonlarındaki vWF C terminal dimer fragmanını temsil eden 350 KD bölgesinin yoğunluğundaki fark ölçülür (2). Eşik duyarlılık Furlan yöntemi için <math><3-5</math> iken, Tsai yöntemi için <math><1</math> dir (1, 3).

Daha yakın zamanlarda Gerritsen tarafından geliştirilen bir yöntemde ise, parçalanmış vWF multimer büyüklüğünün ölçütü olarak kollajen bağlanma affinitesi kullanılmıştır. Gerritsen ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemin 'immunblotting' ile karşılaştırılmasında bu yöntem normal ve hafif düşük düzeydeki enzim aktivitesini belirlemede daha uygun iken, immunblotting yöntemi, çok düşük düzeyde proteaz aktivitesi olanlarda daha duyarlı bulunmuştur (59). İki yönlü immunradyometrik yöntem (IRMA) kullanılarak geliştirilen bir diğer yöntemde ise, vWF subunitinin C terminal bölgesine karşı geliştirilen monoklonal antikor (MoAb 453) ve vWF N terminal bölgesine karşı geliştirilmiş I¹²⁵ ile işaretlenmiş monoklonal antikor karışımı kullanılmıştır. Bu yöntemin duyarlılığı ve özgünlüğü SDS jel elektroforez ile aynıdır ve nicel ölçüm imkanı sağlar (60).

Bizim çalışmamızda kullanılan yöntem ise, vWF multimerik boyutu ile ristosetin kofaktör aktivitesi (vWF:RCoF) arasındaki pozitif korelasyon kullanılarak geliştirilen yeni, hızlı ve basit bir yöntemdir. Bu yöntemle ADAMTS13 aktivitesi sağlıklılarda %52-134 arasında bulunmuştur (61).

Yazar adı	Substrat	Denature edici ajan	İnkübasyon zamanı	Yöntem	vWF parçalanmasını saptama yöntemi
Furlan ve ark.	Pürifiye vWF	1.5 mol/L üre	16 saat	SDS agaroz jel elektroforez,immunblotting	Azalmış multimer boyutu
Tsai ve ark.	Pürifiye vWF	0.15 mol/L guanidin Hcl	1 saat	SDS poliakrilamid jel elektroforez,immunblotting	176kDA fragman saptanması
Obert ve ark.	rekombinan vWF	1.5 mol/L üre	16 saat	İki yönlü immunradyometrik yöntem	Azalmış vWF antijen
Gerritsen ve ark.	EDTA ile muamele edilip dializ edilmiş plazma	1.5 mol/L üre	2 saat	Rezidüel kollajene bağlanma	Azalmış kollajene bağlanma
Böhm ve ark.	Pürifiye vWF	1.5 mol/l üre	16 saat	Rezidüel ristosetin kofaktör	Ristosetinle uyarılmış trombosit aggregasyonunda azalma
Kokame ve ark.	rekombinan vWF	Yok	20-60 dak	SDS poliakrilamid jel elektroforez,immunblotting	Proteolitik parçanın saptanması
Whitelock ve ark.	vWF A2 bölgesi	Yok	2 saat	Enzime bağlı immunabsorban yöntem	A2 bölgesinde azalma

Tablo 1. ADAMTS13 Aktivitesi Ölçüm Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Enzim aktivitesi için kullanılan yöntemlerde, sitrat ile antikoagüle edilmiş plazma kullanılır. Ancak, heparin, D-fenialaninprolyklorometil keton (PPACK), hirudin ve diğer direkt antitrombin inhibitörleri ile antikoagüle edilmiş plazma veya serum da kullanılabilir (26).

Enzimin kalıtsal eksikliği dışında, diğer eksiklik sebebi olan ADAMTS13'e karşı inhibitör varlığı ise, hasta plazması ile inkübe edilmiş normal plazma kullanılarak proteaz aktivitesi ölçümü yoluyla belirlenmektedir. Bir mililitre sağlıklı kişi plazmasının, 1 mililitre hasta plazması ile inkübasyonu sonucu proteaz aktivitesinin inaktivasyonu 1 ünite proteaz inhibitörü olarak belirlenir (40, 48, 49). TTP hastalarında izole edilen Ig G molekülleri, normal plazmadaki ADAMTS13 aktivitesini baskılar. Ig G moleküllerinin anti-Fab ile preinkübasyonu sonucu bu inhibisyon geriye döner. Sporadik TTP hastalarının %70-80'inde ADAMTS13 inhibitörleri bulunmaktadır. Geri kalan hastalarda daha düşük düzeyde inhibitör olduğu ve mevcut yöntemlerle saptanamadığı düşünülmektedir (62, 63).



3-HASTALAR VE YÖNTEM

3.1 Hastalar:

Bu çalışmada; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji kliniği, Kemik İliği Transplantasyon Ünitesi'nde, 2003-2004 yılları içinde kök hücre nakli yapılan 21 hasta ve 15 sağlıklı kontrol yer almaktadır. 12 hasta akut myeloblastik lösemi (AML), 9 hasta ise kronik myelositer lösemi (KML) tanısıyla izlenmekteydi. Hastaların ortanca yaşı 33, kontrollerin ortanca yaşı ise 28 idi. Hasta grubunda 12 erkek, 9 hasta ve kontrol grubunda ise 6 erkek, 9 kadın birey vardı. Üç hastaya kemik iliği, 18 hastaya ise kök hücre nakli yapıldı. Onaltı hastaya, myeloablative nakil, 5 hastaya ise nonmyeloablative nakil yapıldı. AML tanısı ile izlenen hastaların nakil işlemi gerçekleştirildiğinde yedisi 1.tam remisyonda, ikisi 2.tam remisyonda idi, üç hasta ise refrakter idi. KML tanısı ile izlenen hastaların biri 1.akselere faz , yedisi 1.kronik faz, biri ise 2.kronik fazda izlenmekteydi. GVHH profilaksisi olarak 19 hastaya siklosporin ve metotreksat, 2 hastaya ise sadece siklosporin verildi. Hastaların takip süresi ortanca 13 (6-24) aydır. 13 hasta tam remisyonda izlenmektedir; 8 hasta ise ölmüştür (Tablo2).

3.2 Plazma Toplanması ve Saklanması:

15 sağlıklı kontrolden ve toplam 21 lösemi hastasından 10 cc sitratlı plazma örneği alındı. Hastalardan nakilden 10 gün önce, nakil günü, nakil sonrası 7., 14., 21., ve 28.günlerde olmak üzere toplam 6 kez, sağlıklı kontrollerden ise bir kez kan alındı. Takip sırasında, hem akut hem de kronik GVHH geliştiğinde hastalardan tekrar kan alındı. 4° C de, 2500 g de, 40 dakika santrifüj edilerek trombositten fakir plazma örnekleri hazırlandı. Her plazma, en az iki santrifüj tüpüne konarak -80°C derecede saklandı. Ölçüm işleminin gerçekleştirileceği gün plazmaların oda sıcaklığında çözünmesi sağlanarak test için kullanıldı. 15 sağlıklı kontrolden örneklerin çalışılacağı gün kan alındı.

Bu çalışma için Etik kurul onayı alınmıştır. Tüm hastalara ve sağlıklı kontrollere, çalışma konusunda bilgi verilmiş ve onayları alınmıştır.

AML/KML	12/9
HASTALARIN YAŞ (ortanca)	33(17-61)
KONTROLLER YAŞ (ortanca)	28(26-60)
CİNSİYET(E/K)	
Hastalar	12/9
Kontrol	6/9
ALLO KÖK /KİT	(18/3)
MYELOABLATIF/NONMYELOABLATIF	18/3
NAKİL SIRASINDA HEMATOLOJİK.DURUM	
<i>AML</i>	
1.Tam remisyon	7
2.Tam remisyon	2
Refrakter	3
<i>KML</i>	
Birinci akselere faz	1
Birinci kronik faz	7
İkinci kronik faz	1
<u>HAZIRLIK REJİMLERİ</u>	
BU-CY	14
FLU -BU	5
ECP-CY-TBI	2
<u>GVHH PROFİLAKSİ</u>	
CSA-MTX	19
CSA	2

Tablo2. Çalışmaya alınan hastaların ve kontrollerin özellikleri

AML: Akut myeloblastik lösemi **KML:** Kronik Myelositer lösemi **ALLOHK:** Allojeneik kök hücre nakli **ALLOKİT:** Allojeneik kemik iliği nakli **BU-CY:** Busulfan ,siklofosfamid **ECP-CY-TBI:** Ekstrakorporeal fotoferez, siklofosfamid, total vücut ışınlanması **FLU-BU:** Fludarabin,busulfan **CSA-MTX:** Siklosporin-Metotreksat **CSA:**Siklosporin **1.TR:**Birinci tam remisyon **2.TR** :İkinci tam remisyon **REF:** Refrakter **1.KF:** Birinci kronik faz **1.AF:** Birinci akselere faz.

3.3 ADAMTS13 Aktivitesinin Von Willebrand Ristosetin Kofaktör Yöntemiyle Ölçülmesi:

Plazma örnekleri çözüldükten sonra 1:21 oranında (final volüm 210 mikrolitre) 5 mM Tris-HCl pH:8, 12,5 mM BaCl₂ ve 1 mM Pefabloc SC ile dilüe edildi. Beş dakika 37 derecede inkubasyona bırakıldı. Substrat olarak pürifiye von Willebrand faktör kullanıldı (*LFB*,Fransa). 1000 IU VWF:ag içeren substrat 1:10 oranında distile su ile dilüe edildi. Daha sonra 500 mikrolitrelik solüsyonlar halinde -20 derecede saklandı. Çalışmanın yapılacağı gün oda sıcaklığında çözdürüldü. 5 M üre, 5mM Tris HCl (pH 8) den oluşan solusyon ile 1:15 olacak şekilde dilüe edildi ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Substrat dilüsyonundan 100 mikrolitre, dilüe plazma içeren birinci karışıma eklendi ve bir gece 37 derecede bekletildi. Daha sonra vWF:RiCoF aktivitesi *BCS* koagülasyon cihazıyla (*Dade Behring*) ölçüldü. Kalibrasyon eğrisi için ise, 40 sağlıklı bireyden alınan normal insan plazma havuzu ile 56 derecede 30 dakika ısıtılmış insan plazma havuzu (vWF parçalayıcı enzim aktivitesini inhibe etmek amacıyla) karıştırılarak seri dilüsyonlar (1/2, 1/4, 1/8..) elde edildi. Hasta plazmalarına uygulanan işlem seri dilüsyonlara da uygulandıktan sonra rezidüel vWF:RiCoF aktivitesi ölçüldü. Bunun sonucunda çıkan değerlerden kalibrasyon eğrisi çizdirilerek, hasta plazmalarından elde edilen sonuçlar normalin % aktivitesi olarak bu eğri üzerinden hesaplandı. Ancak substratın 1:15 oranında üre ile dilüsyonu yapıldığında elde edilen kalibrasyon eğrisinin beklenen eğriye uymaması üzerine, substrat üre ile 1:12 oranında dilüe edildi, işlemler yukarda anlatıldığı şekilde tekrar edildi.

Faktör VIII ölçümü için; faktör VIII'den yoksun plazma hasta plazması ile karıştırıldı ve parsiyel tromboplastin zamanı *Dade Behring* koagülasyon analizeri ile ölçüldü. Elde edilen değer, standart insan plazma havuzunun Faktör VIII'den yoksun plazma ile karıştırılması sonucu elde edilen kalibrasyon eğrisi sayesinde ölçüldü.

3.4 İstatistiksel Analizler:

İstatistiksel analizler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İstatistik Ana Bilim Dalında yapılmıştır.

Normal dağılım Kolmogorov–Smirnov ve Shapiro–Wilk testleriyle değerlendirildi. Normal dağılım sağlandığı durumlarda ortalama ve standart sapma, dağılımın sağlanmadığı durumlarda ise ortanca (minimum-maksimum) değerleri alındı.

İkiden fazla hasta grubunun karşılaştırması için parametrik olarak ANOVA ve non-parametrik olarak Kruskal Wallis testleri uygulandı. Hasta gruplarının nakil öncesine göre değerlendirmeleri normal dağılım olanlar için; Friedman testi, normal dağılım olmayanlar için ise Genel Lineer Model kullanılarak yapıldı. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İkili parametrelerin karşılaştırmasında normal dağılım olduğunda, T test, normal dağılım olmadığında Mann Whitney-U testi kullanıldı. $P < 0.025$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Korelasyon analizleri ise normal dağılım olanlar için Pearson, olmayanlar için de Spearman korelasyon testleri ile yapıldı.

Çalışmada sağlıklı kontrol grubu ve hastaların yaş, cinsiyet, enzim aktivitesi açısından karşılaştırması yapıldı. Hasta grubu taniya ve gelişen komplikasyonlara göre sınıflandırılarak her grup kendi içinde incelendi. Hazırlık rejiminin farkına göre de hastalar ayrılarak kendi aralarında değerlendirildi.

4- BULGULAR:

4.1 Hastalara ve Sağlıklı Kontrollere Ait Enzim Takip Sonuçları:

Ortanca 13 aylık takipte, 7 hastada febril nötropeni, 12 hastada AGVHH, 14 hastada ise KGVHH gelişti. Hastalardan hiçbirinde venookluziv hastalık, trombotik mikroanjiopati veya tromboembolik atak gelişmedi (Tablo3).

Hastaların haftalık enzim takipleri ise Tablo 4' de görülmektedir.

AML ve KML hastalarının (ortanca 33), sağlıklı kontrol gruplarının(ortanca 28) yaş ortalamaları açısından fark görülmedi ($p>0.05$). Hastalar cinsiyete göre sınıflandırıldıklarında gruplar içinde (erkekler için, $p=0.055$ ve kadınlar için, $p=0.159$) ve gruplar arasında ADAMTS13 aktivitesi açısından haftalar boyunca istatistiksel önemli fark saptanmadı (sırasıyla haftalara göre; $p=0.190$, $p=0.702$, $p=0.272$, $p=0.916$, $p=0.06$, $p=0.86$).

Yaş ortalamaları 33 olan (26-60) 15 sağlıklı bireyden alınan plazma örneklerinin ADAMTS13 enzim düzeylerinin ortalaması 97 ± 16 (76-136) olarak saptandı.

Nakilden önceki 10.gün için; AML, KML hastaları ve sağlıklı kontroller karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla ortalamalar 90 ± 15 , 88 ± 29 ve 97 ± 16) ($p=0.540$).

AML veya KML tanısıyla izlenen 21 hastanın, haftalık ADAMTS13 enzim ortancaları ise; -10.gün için %85 (45-145), nakil günü için %78 (16-107), nakilden sonra 7.gün için % 83 (60-134), nakilden sonra 14. gün için % 86(50-109), nakilden sonra 21. gün için %89 (16-126), nakilden sonra 28. gün için %90 (10-119) olarak bulundu. Bu hastalardaki haftalık ADAMTS13 enzim aktivitesi takipleri nakil öncesine göre değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı ($p=0.156$).

KOMPLİKASYONLAR	HASTA SAYISI
FEBRİL NÖTROPENİ	7
AKUT GVHH	12
Cilt	8
Karaciğer	3
GİS	4
KRONİK GVHH	14
Cilt	6
Karaciğer	5
GİS	2
Göz	5
Oral	5
VENO-OKLUZİV HASTALIK	0
TROMBOTİK MİKROANJİOPATİ	0
TROMBOEMBOLİZM (Kateter trombozu dahil)	0

Tablo3. Hastaların nakil sonrası klinik seyirleri.

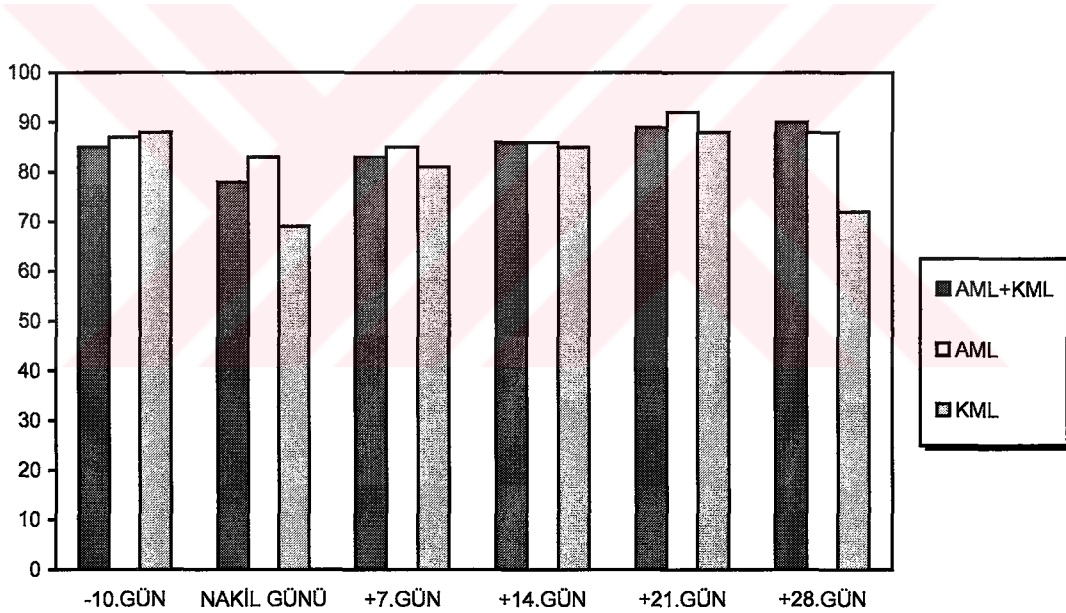
AGVHH: Akut graft versus host hastalığı, **KGVHH:** Kronik graft versus host hastalığı

No	Tanı	Yaş	Cinsiyet	Nakil-10.gün (F8) (%)	Nakil -10.gün ADAMTS13 (%)	Nakil gün ADAMTS13 (%)	Nakil +7.gün ADAMTS13 (%)	Nakil +14.gün ADAMTS13 (%)	Nakil +21.gün ADAMTS13 (%)	Nakil +28.gün ADAMTS13 (%)	AGVHH	KGVHH	SON DURUM
1	AML	44	E	79,00	85	78	69	86	75	90	var	var	EX
2	AML	28	E	61,00	72	70	77	70	69	100	yok	yok	TR
3	AML	47	E	65,00	100	93	85	82	63	28	var	var	TR
4	AML	35	K	130,00	102	66	98	85	102	112	yok	var	EX
5	AML	23	K	180,00	76	68	66	90	106	28	var	yok	TR
6	AML	28	K	129,00	74	100	95	87	99	97	var	var	TR
7	KML	29	E	102,00	145	82	123	101	82	119	yok	var	TR
8	AML	17	E	130,00	112	84	80	70	70	60	var	yok	EX
9	KML	32	E	80,00	85	83	67	50	70	58	var	yok	EX
10	AML	61	E	157,00	73	16	84	86	16	87	yok	var	TR
11	KML	39	K	82,00	85	74	75	94	100	104	yok	var	TR
12	KML	53	K	85,00	70	65	60	77	69	10	var	var	EX
13	AML	18	E	92,00	90	86	95	88	89	85	yok	var	TR
14	KML	54	E	86,00	63	43	82	95	96	100	yok	var	EX
15	KML	27	K	133,00	45	53	88	87	106	100	var	yok	TR
16	KML	41	E	100,00	116	100	134	103	105	98	var	yok	TR
17	AML	40	K	87,00	119	69	74	72	89	23	var	var	TR
18	KML	33	K	99,00	84	78	75	82	80	110	var	var	EX
19	KML	18	K	110,00	85	82	90	96	126	90	yok	var	TR
20	AML	39	E	96,00	102	107	80	79	96	80	yok	var	EX
21	AML	29	E	110,00	100	74	86	109	107	25	var	yok	TR

Tablo 4. Hastaların haftalık enzim takipleri ve hematolojik durumları. **AML:**Akut myeloblastik lösemi, **KML:** Kronik myelositer lösemi, **EX:** Exitus, **TR:**Tam remisyon.**AGVHH:** Akut graft versus host hastalığı, **KGVHH:**Kronik graft versus host hastalığı.

Hastalar tanılarına göre ayrılarak incelendiğinde ise; AML tanısıyla izlenenler için haftalık enzim tayinindeki ortalama değerler; nakil öncesi 10.günde %87 (72-116), nakil günü %83 (16-107), nakilden sonraki 7.gün için %85 (66-134), 14 gün için %86 (70-103), nakilden sonra 21 .gün için % 92 (16-126) ve nakilden sonraki 28.gün için %88 (28-112) olarak bulundu. Nakil öncesi ve nakil sonrasındaki haftalarda saptanan enzim aktiviteleri farklı değildi (p=0.790).

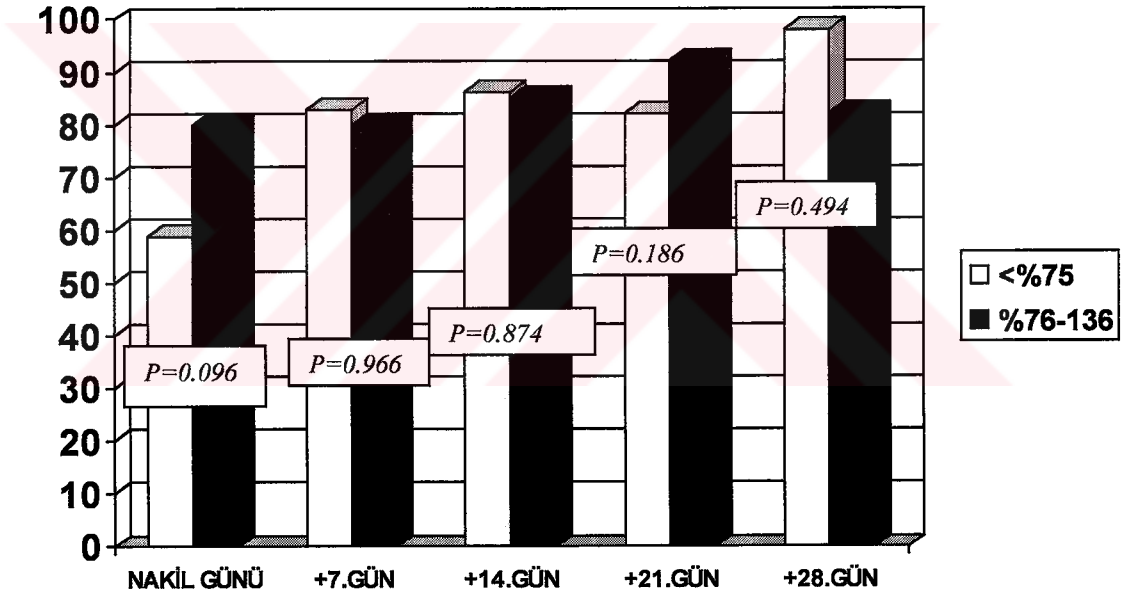
KML tanısıyla izlenen hastalara bakıldığında ise enzim değerlerinin ortalamaları; nakil öncesi %88 ± 29, nakil günü %69 ± 13, nakilden sonra 7. gün %81 ± 18, nakilden sonra 14. gün için %85 ± 17, nakilden sonra 21. gün için %88 ± 14, nakilden sonra 28 gün için ise %72 ± 43 olarak bulundu. Nakil öncesi enzim aktivitesine göre, takip eden haftalardaki enzim aktivitelerinde fark yoktu (p=0.317) (Grafik 2).



Grafik 2. AML (n=12) ve KML(n=9) hastalarının ayrı ayrı ve genel olarak tüm hastaların (n=21) haftalara göre enzim aktiviteleri.

Nakilden önceki 10.günde hastaların Faktör VIII düzeyleri ile ADAMTS13 enzim aktiviteleri arası korelasyon saptanmadı (p=0.229).

Hastalar nakil öncesi 10.gündeki ADAMTS13 değerlerine göre sınıflandırıldığında, enzim değerleri %75 altında olan 6 hasta, %76-%136 arasında olan 14 hasta ve %137 üzerinde olan 1 hasta saptandı. Enzim değerleri sağlıklı kontrollere göre normal düzeyde olan hastaların haftalar arası enzim düzeylerinde anlamlı fark görülmedi. Nakil öncesi 10.gündeki enzim değerlerine göre; ne %75 altında enzimi olan hasta grubunda, ne de %76-136 arası enzim düzeyleri olan grupta tüm haftalar boyunca elde edilen enzim düzeyleri (kendi içlerinde) karşılaştırıldığında anlamlı fark izlenmedi. Bu iki grup kendi aralarında incelendiğinde ise yine anlamlı bir fark görülmedi (Grafik 3).



Grafik 3. Nakil öncesi 10.günde enzim aktivitesi sağlıklı kontrollere göre normal sınırlarda olanlar (n=14) ve normalin altında seyredenler (n=6).

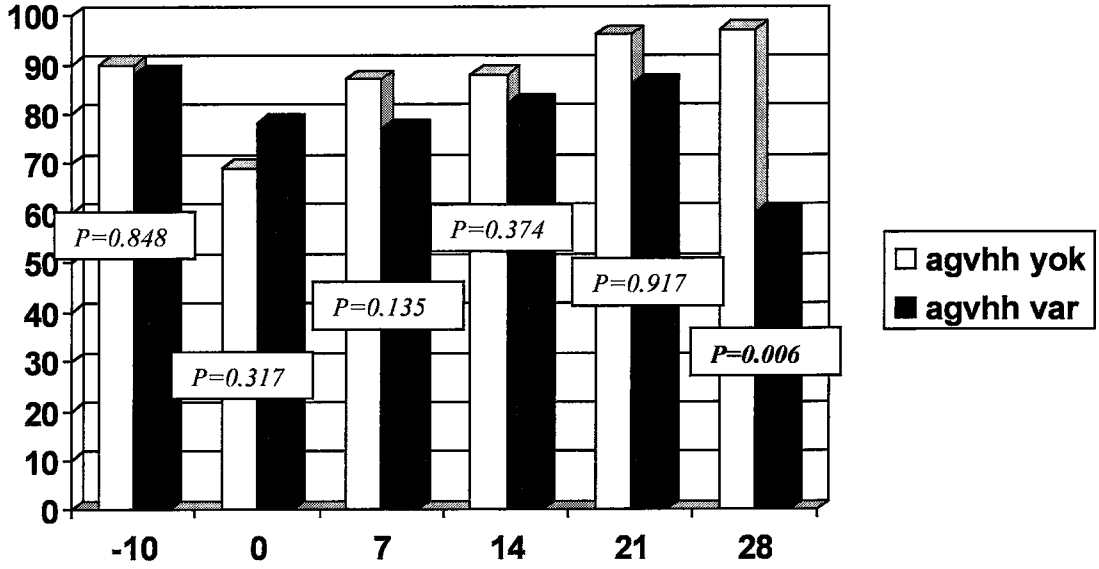
4.2 Komplikasyon Gelişen Hastalarda ADAMTS13 Enziminin Seyiri:

Akut graft versus host hastalığı (AGVHH) gelişen hastalarda (n=12), GVHH saptandığında ilk gündeki ADAMTS13 düzeyi, nakil öncesi 10.gündeki değerlerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmedi (sırasıyla, %73± 33 ile %86± 21, p=0.365).

AGVHH saptandığındaki ilk günkü, enzim düzeyleri, sağlıklı kontrollerle (n=15) karşılaştırıldığında ise sınırda bir düşüş saptandı (sırasıyla, %73±33 ile %97±16, p=0.063).

AGVHH saptandığı ilk günkü enzim düzeyleri bir önceki haftadaki değerlerle karşılaştırıldığında ise; anlamlı fark görülmedi (sırasıyla, %73±33 ile %84±17, p=0.220).

Hastaların tamamı akut GVHH gelişen (n=12) ve gelişmeyen hastalar (n=9) olarak iki gruba ayrıldı. Haftalık enzim takibinde, bu iki grup arasında fark olup olmadığı araştırıldı. Sırasıyla AGVHH gelişmeyen ve AGVHH gelişen hastalardaki ADAMTS13 enzim aktivitelerinin, nakil öncesi 10.günde ortalamaları; %90±24 ve %88 ±21 (p>0.025), nakil gününde ortalamaları; %69± 26 ve %78 ±14 (p>0.025), nakil 7.gününde ortancaları %87 (75-123) ve %77 (60-134) (p>0.025), nakil 14.günde ortalamaları %88±9 ve 82±15 (p>0.025), nakilin 21.gününde ortancaları %96 (16-126) ve %84(63-107) olarak bulundu (p>0.025). Nakilin 28.günündeki ortanca değerler ise AGVHH gelişmeyenlerde % 97±13, gelişenlerde ise %60±36 olarak kaydedildi; fark istatistiksel olarak anlamlı idi (Grafik 4).



Grafik 4. Akut graft versus host hastalığı gelişen (n=12) ve gelişmeyen (n=9) hasta gruplarının haftalık enzim takiplerine göre karşılaştırılması.

Akut GVHH gelişen hastaların kendi içlerinde ve nakil öncesine göre, diğer haftalardaki enzim aktiviteleri değerlendirildiğinde anlamlı bir fark görülmedi ($p=0.152$). GVHH gelişmeyen hastalarda ise; nakil öncesine göre nakil günü anlamlı bir düşme, nakil sonrası 28.günde ise anlamlı bir yükselme saptandı (sırasıyla, $p<0.001$ ve $p<0.01$)

Akut GVHH gelişen ve 28.gün enzim aktiviteleri düşük olan beş hastanın haftalık enzim takipleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 5). En düşük enzim aktivitesine sahip olan (%10) hastamız graft versus host hastalığı nedeniyle kaybedilmiştir.

Tanı	Yaş	Nakil öncesi 10.gün	Nakil günü	Nakil 7..gün	Nakil 14..gün	Nakil 21..gün	Nakil 28.gün	Agvhh	Son durum
AML1.TR	47	100	93	85	82	63	28	VAR	TR
AML1.TR	23	76	68	66	90	106	28	VAR	TR
KML1.KF	53	70	65	60	77	69	10	VAR	EX
KML1.KF	40	119	69	74	72	89	23	VAR	TR
KML1.KF	29	100	74	86	109	107	25	VAR	TR

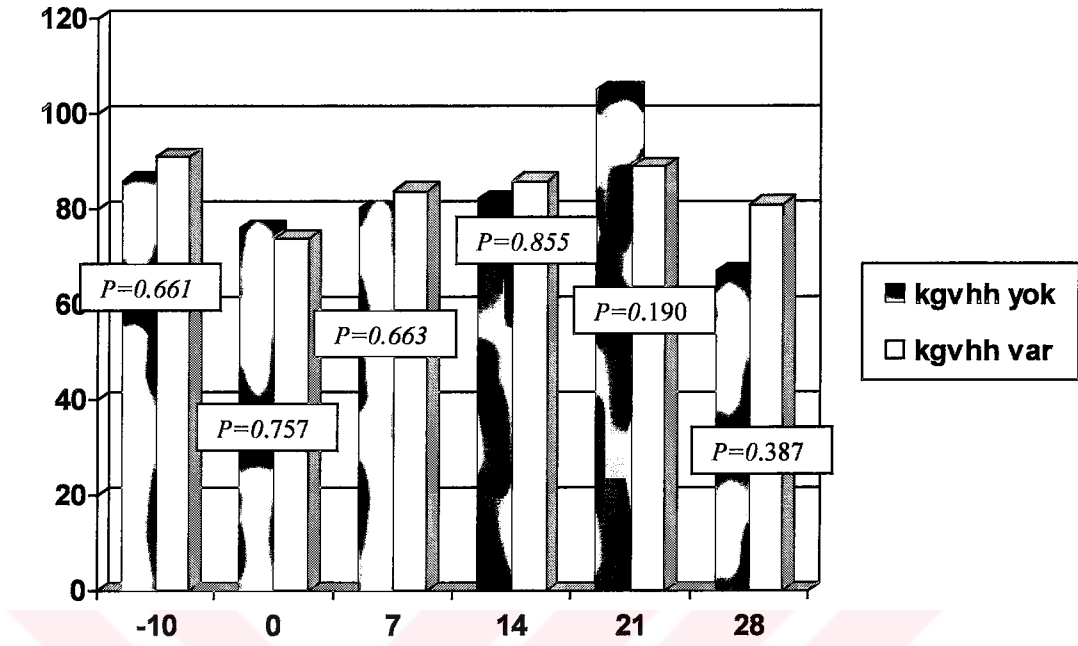
Tablo 5. Nakil +28.günde orta derecede enzim aktivite düşüklüğü olan 5 hastanın haftalık enzim takipleri, tanıları, GVHH gelişimi, hematolojik son durumu.

AML: Akut myeloblastik lösemi, **KML:** Kronik myelositer lösemi,

1.KF:1 kronik faz, **TR:**Tam remisyon, **EX:** Exitus

Kronik graft versus host hastalığı (KGVHH) gelişen hastalar ele alındığında ise; kronik GVHH gelişen hastaların (n=14) GVHH geliştiğindeki ilk günlük enzim aktivitelerinin nakil öncesi 10.güne göre bir düşüş gösterdiği ancak bu düşüşün anlamlı olmadığı gösterildi (%67±13 ile %91±30, p=0.15). Kronik GVHH ilk günlük enzim aktivitesi sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark olduğu görüldü (sırasıyla %67±13 ile %97±16, p=0.002).

Daha sonra hastalar kronik GVHH (KGVHH) gelişen (n=14) ve gelişmeyen(n=7) hastalar olarak iki gruba ayrıldı. Haftalık enzim takibinde bu iki grup arasında fark olup olmadığı araştırıldı. Sırasıyla KGVHH gelişmeyen ve KGVHH gelişen hastalarda, ADAMTS13 enzim düzeylerinin, nakil öncesi 10.günde ortalamaları sırasıyla; %86 ± 24 - %91 ± 21 (p>0.025), nakil gününde ortalama; %76±14 -%74±23 (p>0.025), naklin 7.gününde ortanca %80(66-134) - %84(60-123) (p>0.025), naklin 14.günde ortalama %82±20 – 86±7 (p>0.025), naklin 21.gününde ortanca %105 (69-107) -%89 (16-126) olarak bulundu (p>0.025). Naklin 28.günündeki ortalama değerler ise KGVHH gelişmeyen için %67±33, gelişenler için ise %81±34 olarak kaydedildi (p>0.025). Tüm sonuçlar istatistiksel olarak anlamsız idi (Grafik 5).



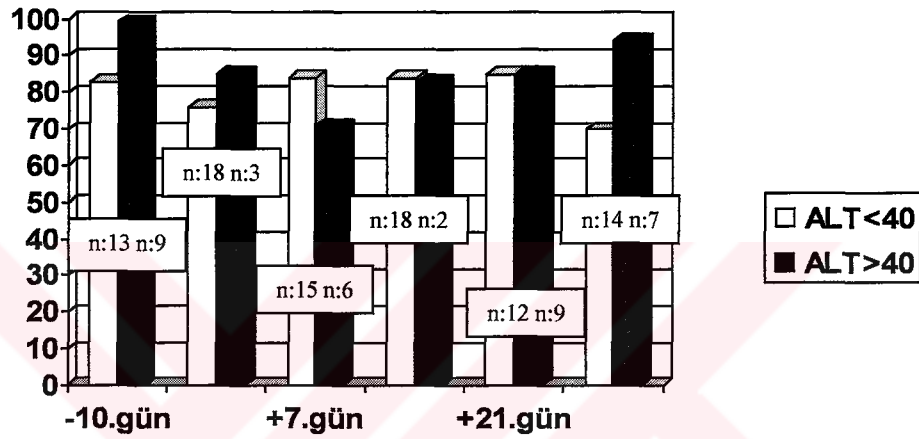
Grafik 5. Kronik graft versus host hastalığı gelişen (n=14) ve gelişmeyen (n=7) hastaların haftalık enzim takiplerinin karşılaştırılması.

Kronik GVHH gelişmeyen ve gelişen hasta gruplarında, nakil öncesine göre, takip eden haftalardaki enzim aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı saptandı (sırasıyla, $p=0.423$ ve $p=0.154$).

Hastalardan hiç birinde veno-okluziv hastalık veya trombotik atak gelişmediği için hastalar bu iki komplikasyona göre sınıflandırılmadı.

ADAMTS13 enziminin sentez yerinin karaciğer olması nedeniyle hastalar $ALT < 40$ UI/L, $ALT > 40$ UI/L olarak ayrıldı. Sırasıyla, $ALT < 40$ UI/L olanlar ve $ALT > 40$ UI/L olanlar için; nakil öncesi 10.günde 83 ± 23 ile 99 ± 18 ($p=0.153$), nakil gününde 76 (16-106) ile 85 (84-86) ($p=0.263$), nakil sonrası 7.günde 84 (66-134) ile 71 (60-95) ($p=0.185$), nakil sonrası 14.günde 84 ± 12 ile 83 ± 12 ($p=0.90$), nakil 21.günde 85 ± 27 ile 85 ± 15 ($p=0.988$) ve nakil 28 .günde ise 70 ± 36 ile 94 ± 18 ($p=0.07$) bulundu (grafik 6).

Herhangi bir haftada ALT düzeyi 80 UI/L'den yüksek olan hastaların, o haftadaki ADAMTS13 enzim düzeylerinin ortalaması 84 ± 16 olarak bulunmuştu. ALT değerleri ile ADAMTS13 aktiviteleri arası korelasyon saptanmadı.



Grafik6. Hastaların ALT düzeylerine göre gruplanması ve haftalık enzim aktivitesinin karşılaştırılması.

Hastalar bilirubin düzeylerine göre; total bilirubin <1 mg /dl, total bilirubin >1 mg/dl olanlar olarak sınıflandırıldı. İki grup arasında haftalara göre bir farklılık saptanmadı. Total bilirubin 2 mg/dl altında ve üstünde olacak şekilde tekrar değerlendirildiğinde; istatistiksel analizler, bilirubin 2 mg /dl üzerinde olan hasta sayısının yeterli olduğu 28.günde yapılabildi. Total bilirubin 2 mg/dl altında olanlarda (n=16), ADAMTS13 enzim aktivite ortalaması %88 (10-110), 2 mg /dl üzerinde olanlarda (n=5) ise, ortalama %87 (%23-97) olarak hesaplandı (p=0.554).

Hastaların haftalara göre trombosit değerleri nakil öncesi 10.günde 133 bin (9-942 bin), nakil gününde 117 bin (5-1200 bin), nakil sonrası 7.günde 24 bin (4-451 bin), nakil sonrası 14.günde 35 bin (4-111 bin), nakil sonrası 21.günde 76 bin (5-416 bin) ve 28.günde de 105 bin (14-180 bin) olarak bulundu. Haftalara göre trombosit ve

ADAMTS13 düzeyleri korele edildiğinde sadece 14. ve 21.günlerde pozitif korelasyon görüldü (sırasıyla $p=0.022$, $r=0,496$ ve $p=0.025$, $r=0,488$).

Febril nötropeni gelişen hastalar ($n=7$) incelendiğinde ise, febril nötropeni dönemi sırasındaki enzim aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte başlangıca göre daha düşük olduğu gösterildi (sırasıyla $\%67\pm 25$ ile $\%78\pm 20$, $p=0.418$).

Febril nötropeni dönemindeki değerler sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı olan bir düşüş kaydedildi (sırasıyla $\%67\pm 25$ ile $\% 97\pm 16$, $p= 0.004$).

Febril nötropeni geliştiği haftadaki değerlerin bundan bir önceki haftadaki değerlere göre düşük olduğu görüldü (sırasıyla $\%73\pm 11$ ile $\%67\pm 25$ $p=0.675$).

Hazırlama rejimine göre sınıflandırıldığında; hazırlık rejimi olarak busulfan ve siklofosfamid alan hastalarla ($n=16$), diğer rejimleri almış hastalar ($n=5$) karşılaştırıldığında, nakil öncesi ADAMTS13 düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (sırasıyla $\%80\pm 12$ 'ye karşı $\%60\pm 29$ $p=0.041$). Nakil sonrası 28.günde de busulfan ve siklofosfamid alanlarda anlamlı olarak daha düşük enzim aktivitesi görüldü (sırasıyla $\% 69\pm 35$ 'a karşı $\%100\pm 10$ ($p<0.05$)).

5- TARTIŞMA:

ADAMTS13 enziminin tanımlanması, bu enzimin normal ve patolojik fonksiyonlarına olan ilgiyi artırmıştır. Son dokuz yılda, birbiri ardına çeşitli yöntemler geliştirilerek enzim aktivitesi ölçülmeye çalışılmıştır. Bu çalışmamızda bizim uyguladığımız yöntem, ilk kez Böhm ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır (61). Yöntemin esası rezidüel ristosetin kofaktör aktivitesi ölçümüne dayanmaktadır. Bizim sağlıklı kontrol grubumuzda enzim aktivitesi ortalama 97 ± 16 (76-136) olarak saptanmıştır. Aynı yöntem kullanılarak, Alman sağlıklı kontrollerin enzim aktiviteleri benzer bulunmuştur (%52-134) (61). Bu yöntem kolay tekrarlanabilir, özel laboratuvar ekipmanı gerektirmeyen ve kısa sürede gerçekleştirilebilen bir yöntemdir. Yöntemin dezavantajı indirekt bir yöntem olmasıdır. Furlan ve Tsai'nin geliştirdiği immunblotting yönteminde, ölçümler doğrudan von Willebrand faktörün multimer boyutundaki azalma yoluyla yapılırken, bizim yöntemimizde multimer boyutundaki değişiklik ve von Willebrand ristosetin kofaktör aktivitesi arasındaki pozitif korelasyon kullanılmıştır. ADAMTS13 aktivitesinin rutin olarak çalışıldığı, ancak farklı yöntemlerin kullanıldığı laboratuvarlara, hasta plazmaları gönderilerek yöntemler arası fark araştırılmıştır. Enzim aktiviteleri %3 ile %100 arasında değişen birçok hasta plazması değerlendirildiğinde, kollajen bağlanma affinitesi kullanılan yöntemde ait yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçlar saptanmıştır. Bizim yöntemimizin de aralarında olduğu diğer yöntemler arası ise fikir birliği sağlanmıştır (64). Yine, 11 laboratuvarın katıldığı çok merkezli uluslararası bir çalışmada; %0 ve %10 aktivite düzeyleri olan iki plazmanın ayırt edilmesi planlanmıştır. Bizim çalışmamızda da, kullandığımız ristosetin kofaktör bazlı yöntem için beklenen ve gözlenen sonuçlar arası lineer bir ilişki saptanmış ve yöntemin bu iki plazmayı ayırma yeteneği mükemmel olarak tanımlanmıştır (65). Dolayısıyla bu yöntem, rahatlıkla rutin tetkikler arasına girebilecek güvenilir bir yöntem olup, ileride TTP hastalarının tedavisi ve prognozu açısından yol gösterici olan bir parametre olabilir.

Enzim aktivitesi üzerinde etkili olan lokal ve sistemik faktörler hakkında pek az bilgi vardır. Bu nedenle, çalışmaya hematopoietik kök hücre nakli (HKHN) yapılan hastalar özellikle seçilmiştir. Nakil öncesi ve sonrası karmaşık hematolojik ve

immunolojik yapılanma enzimin değişik klinik koşullarda incelenmesini olanaklı kılmıştır. Bizim serimizde, HKHN yapılan hastalarda haftalık aktivite değerleri dalgalanmalar göstermeksizin stabil seyretti; nakil günü ılımlı bir düşüş gelişip daha sonra tekrar artış gösterdi. Nakil günü görülen en düşük değer %16 idi. AML, KML ve sağlıklı kontrollerin nakil öncesi 10.günde enzim aktivitelerinin birbirinden farklı olmadığı görüldü. Nakil hastalarında enzim aktivitesinin araştırıldığı, Park ve arkadaşlarının yaptığı literatürdeki tek çalışmada, enzim aktivitesinin nakil günü azaldığı, bu azalmanın nakil sonrası 7.günde devam ettiği, ancak daha sonra enzim aktivitesinin yükseldiğı gösterilmiştir. Fakat, bizim çalışmamızda da olduğu gibi, nakil günü ve nakil sonrası 7.gündeki enzim aktivitesinin ciddi eksiklik düzeyinde (<%5) olmadığı gösterilmiştir. Park ve arkadaşları, bu çalışmayı AML, KML, aplastik anemi, nöroblastoma gibi çeşitli tanılarla allojeneik veya otoplog nakil yapılan çocuklar üzerinde yapmışlardır. Biz ise, AML, KML tanısıyla izlenen sadece allojeneik nakil yapılan erişkin hastaların enzim aktivitelerini araştırdık. Bu iki çalışmada kullanılan ADAMTS13 enzim tayinleri birbirinden farklı yöntemlerle yapıldı; Park ve arkadaşları, immunblotting yöntemini tercih ederken, biz çalışmamızda rezidü von Willebrand ristosetin kofaktör yöntemini kullandık. Park ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın primer amacı, bizim çalışmamızdan farklı olarak veno-okluziv hastalık gelişen ve gelişmeyen hasta popülasyonlarını karşılaştırmak olarak belirlenmiştir (6). Biz de kendi çalışmamızda, komplikasyon olarak VOH gelişmesi durumunda enzim aktivitesini çalışmayı planlamıştık. Ancak, hastalardan hiçbirinde VOH gelişmedi. Park ve arkadaşlarının çalışmasında, VOH gelişen gruptaki hastaların enzim düzeylerinin nakil öncesinden itibaren düşük seyrettiğı gözlenmektedir. Oysa bizim serimizdeki hastaların enzim aktivitelerinin bu şekilde düşük seyretmemiş olması VOH gelişmemiş olmasını açıklayabilir. Nakil öncesi enzim aktivitesi en düşük olan 2 hastamızda (%43 ve % 63) bile VOH, tromboembolizm veya trombotik mikroanjiopati gibi vasküler bir komplikasyon gözlemedik. A.Ü.T.F kemik iliği nakli bölümünde yapılan nakillerde VOH %4 oranında olup, literatüre oranla düşüktür. Bu durum merkezimizdeki transplant alıcılarında total beden ışınlamasının (TBI) hazırlık rejiminde kullanım

oranının düşük olmasına, daha önce fazla tedavi görmemiş, standart riskli ve karaciğer fonksiyon testlerinde belirgin bozukluk olmayan olguların varlığına bağlanabilir (66).

Çalışma grubumuzdaki hastaların nakil öncesi ADAMTS13 aktiviteleri, kontrol grubunun normal sınırlarında olanlar ve sınırın altında olanların, nakil sonrası haftalardaki enzim ortancalarının benzer seyrettiği görüldü. Nakil öncesi enzim aktivitesi normalin üstünde olan bir hastanın ise, haftalık takipleri boyunca enzim aktivitesinin hep yüksek seyrettiği tespit edildi.

Nakil öncesi 10.günde Faktör VIII düzeyleri ile enzim aktivitesi arasında korelasyon saptamadık. Yapılan çalışmalarda, von Willebrand antijeni ile, ADAMTS13 enzim aktivitesinin negatif bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Tip 3 von Willebrand hastalığı olan hastalarda enzim aktivitesinin arttığı, desmopressin infüzyonu ile vWF düzeyinin arttığı durumlarda ise enzimin azaldığı gösterilerek bu ilişki kanıtlanmıştır (67).

GVHH gelişimi incelendiğinde, akut GVHH gelişen hastalardaki enzim aktivitesinin nakil öncesi değerlerine göre değişiklik göstermediğini saptadık. GVHH geliştiği zaman enzim aktiviteleri sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında, istatistiksel olarak sınırdan bir düşüklük olduğunu gördük. Bu durum hasta sayımızın az olmasıyla açıklanabilir. Hastalar AGVHH gelişimine göre değerlendirildiğinde, nakil sonrası 28.günde AGVHH gelişen hastalardaki enzim aktivitesi GVHH gelişmeyen hastaların enzim aktivitesine göre anlamlı olarak düşüktü. AGVHH etyopatogenezinde sitokinlerin rolü olduğu bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada, IL-8 ve TNF alfa başta olmak üzere inflamatuvar sitokinlerin ultra büyük von Willebrand faktör salınımına sebep olduğu, IL-6 'nın ise, akım gerginliği gelişen durumlarda ADAMTS13 enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir (68). Nakil sonrası 28.günde enzim aktiviteleri belirgin düşmüş olan hastaların geriye dönülerek, başlangıçtan itibaren haftalara göre enzim aktiviteleri değerlendirildiğinde normal sınırlarda seyrettiğini saptadık. Salat ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, AGVHH gelişen hastaların endotelial belirleyicileri takip edildiğinde; nakil sonrası 21.günde von Willebrand düzeyinin yüksek olduğu saptanmıştır (69). Von Willebrand düzeyinin arttığı durumlarda enzim aktivitesinin azaldığını gösteren yayınlar göz önüne alındığında bizim sonuçlarımızda saptanan

28.gündeki aktivite azalmasının GVHH, sitokin, metalloproteaz ilişkisi konusunda ipucu olduğu söylenebilir. Endotel hasarı sonucu ortaya çıkan sitokinler, büyük von Willebrand faktör multimerlerinin salınımına ve ADAMTS13 enziminin aktivite değişikliğine sebep olup mikrovasküler trombus oluşumuna, GVHH gelişimine yol açabilirler.

Kronik GVHH olan hastaların, KGVHH gelişimindeki enzim aktiviteleri nakil öncesine göre farklı değil iken, sağlıklı kontrollerden anlamlı olarak düşük bulundu. AGVHH'deki gibi KGVHH'de de sitokinlerden etkilenen ADAMTS13 enzim aktivitesi KGVHH patogenezinde katkıda bulunabilir. KGVHH geliştiğinde nakil öncesine göre farkın olmaması ise, hastaların nakil öncesi aldıkları kemoterapi, hazırlık rejiminin ve nakil sırasındaki hematolojik durumlarının birbirinden farklı olması nedeniyle olabilir. Hasta sayımızın az olması da sonuçları etkileyen bir faktör olabilir.

Kök hücre nakline bağlı trombotik mikroanjiopati gelişen hastalarda, idiopatik TTP hastalarından farklı olarak enzim aktivitesinin değişmediği, endotelyal hasarın asıl sebep olduğu düşünülmektedir. Bizim serimizde hiç trombotik mikroanjiopati gelişen hasta olmadı. TTP için eşik değer olan %5'in altında aktiviteye sahip hastamız olmadığı için bu düzeyin nasıl bir klinik seyirle gittiğini izleme olanağı olmadı. Temel mekanizma endotelyal hasar olsa bile, çok düşük ADAMTS13 düzeyinin, nakil sonrası trombotik mikroanjiopati gelişimini kolaylaştırıcı etkisi olup olmadığı bu şekilde aydınlatılabildi.

Çalışmamızda enzimin sentez yerinin karaciğer olması nedeniyle, karaciğer fonksiyonları ile enzim aktiviteleri karşılaştırıldı. Her hafta için (ALT) <40 UI/L olan hastaların enzim aktiviteleri ile, ALT >40 UI/L olan hastaların enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında; ALT >40 UI/L olanlarda nakil sonrası 7.günde ADAMTS13 düzeyinde düşüklük saptandı. Ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu sonuçlar yapılan diğer çalışmalarla benzer değildi (6, 51). ALT düzeyi için alınan eşik değer 80 UI/L olarak değiştirildiğinde bile, ortalama ADAMTS13 enzim değerlerinin sağlıklı kontroller için belirlenen düzeylere benzer olduğu görüldü. Enzimin sentez yerinin karaciğer olması nedeniyle ALT düzeyi yüksek hastalarda daha düşük enzim aktivitesi görülmesi beklenirdi. Bununla birlikte, ALT düzeyindeki her artış, karaciğer

fonksiyonlarının tümüne yanısırmayabilir. Park ve arkadaşlarının çalışmasında, ADAMTS13 enzim aktivitesindeki azalmanın VOH'a sebep olmadığı, VOH sebebiyle gelişen karaciğer fonksiyon bozukluğunun enzim eksikliğine sebep olduğu ileri sürülmüştür. Ancak bizim çalışmamızda, ALT yüksekliğinin çok belirgin olmaması veya karaciğer veno-okluziv hastalığı gözlenmemiş olması, ADAMTS13 sentezinin belirgin derecede bozulmamasını açıklayabilirdi. Ancak nakil sonrası karaciğer fonksiyon bozukluğuna yol açabilecek birçok durum söz konusudur. Graft versus host hastalığı, hastaya verilen sitoredüktif, immunsupresif ajanlar, antibiyotikler veya çeşitli enfeksiyonlar da karaciğer fonksiyon bozukluğuna sebep olabilir. Bu faktörler de göz önüne alındığında iki parametre (ADAMTS13 ve karaciğer fonksiyonları) arasında basit bir ilişki kurmak zor olabilir.

Bilirubin değerleri 1 mg/dl altında ve üstünde olan gruplar için haftalara göre fark saptanmadı. Bilirubin düzeyi 2 mg /dl üzerinde olan hasta sayısı istatistiksel değerlendirme için sadece 28.günde uygundu. Ancak, 2mg altında ve üstünde bilirubin düzeyleri olan hastaların enzim aktivitelerinin ortalamaları benzerdi. ALT düzeyleri gibi bilirubin düzeyleri ile de enzim aktivitesi arasında bir ilişki saptanmadı.

Febril nötropeni atağı sırasındaki enzim aktivitesinin nakil öncesine göre anlamlı olmayacak şekilde, sağlıklı kontrollere göre ise anlamlı olacak şekilde düşük olduğu izlendi. Bianchi ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, ciddi sepsis tablosu olan hastalarda hafif azalmış (%25-50) veya orta düzeyde azalmış (%10-25) ADAMTS13 aktiviteleri olduğu gösterilmiştir (70). Biz ise çalışmamızda, febril nötropeni atağı sırasında ortalama enzim aktivite düzeyinin %67 civarında seyrettiğini tespit ettik. Çeşitli çalışmalarda, üremi ve akut inflamatuvar durumlarında, normalin %15 ile %170'i arasında değişen oranlar bildirilmekle birlikte, kronik inflamasyonda enzim aktivitesinin belirgin bir şekilde düştüğü saptanmıştır.

Trombosit düzeyleri ile ADAMTS13 enzimi kıyaslandığında ise nakil sonrası 14 ve 21.günde pozitif ilişki olduğu görülmüştür. İki parametre arasında daha önceki haftalarda ilişki gösterilememesi hastalarımızın çoğunda kanamayı önlemek amacıyla trombosit infüzyonu gerekmesine bağlı olabilir. Daha önce yapılan bir çok çalışmada, trombositopeni ve enzim eksikliği arasındaki ilişki gösterilmiştir. TTP

etyopatogenezinde de açıklandığı gibi enzim eksikliği nedeniyle gelişen ultra büyük vWF multimerlerine trombosit adezyonu sonucu trombositopeni geliştiği düşünülmektedir. Dolayısıyla, enzimin aplazi döneminde düşük olması büyük vWF aracılığıyla trombositopeniyi uzatabilir.

Hazırlık rejimi karşılaştırıldığında, myeloablative nakil planlanan ve busulfan siklofosfamid tedavisi verilen hastaların, nonmyeloablative rejimler verilen hastalara göre nakil öncesi enzim aktiviteleri daha yüksekti. Ancak nakil sonrası 28.günde, busulfan siklofosfamid alan grupta, enzim aktivitesi nakil öncesine belirgin düşerken, diğer grupta ise belirgin olarak artış gözlemlendi. Nakil sonrası 28.günde, her iki gruptaki hastaların ortalama enzim aktiviteleri istatistiksel olarak farklı bulundu. Bu durum, hastaların hematolojik durumlarının farklı olması, yapılan nakillerin mekanizmalarının birbirinden farklı olması ile açıklanabilir. Sitoredüktif ajanlar, vasküler endotelial hücrelerin antitrombotik fonksiyonlarında hasarlanma yaparlar. Dolayısıyla myeloablative nakil yapılan ve daha yoğun tedavi alan hastalarda endotelial hasarın daha fazla olması beklenir. Busulfan ve siklofosfamid alan grupta nakil sonrası enzim aktivitesindeki düşüş endotelial hasarın daha belirgin olması ile açıklanabilir.

Sonuç olarak;

1-ADAMTS13 enzimi kök hücre naklinden önemlice etkilenmemektedir.

2-Nakil sonrası graft versus host hastalığı gelişenlerde enzim aktivitesi düşer. Bu durumda Thelper hücrelerin rolü irdelenebilir.

3-İlginç olarak bu çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak, karaciğerde sentez edilen bu enzimin aktivitesi karaciğer fonksiyon bozukluğundan etkilenmez bulunmuştur.

4- Hastaların febril olması durumunda enzim aktiviteleri sağlıklı kontrollerden belirgin olarak düşüktür.

5-Nakil yapılan hastalarda enzimin seyri ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır.

6-Bu çalışma bu ölçüm yöntemi kullanılarak, allojeneik nakil hastalarında yapılmış ilk çalışmadır. Yöntem kolay, güvenilir ve tekrarlanabilir görünmektedir.

6-ÖZET:

Allojeneik Kök Hücre Nakli Yapılan Akut Myeloblastik ve Kronik Myelositer Lösemi Hastalarında Haftalık ADAMTS13 Enzim Tayini ve Komplikasyonlarla İlişkisi

Von Willebrand Parçalayıcı enzimin keşfi ve trombotik trombositopenik purpura (TTP) ile ilişkisi oldukça ilgi görmüş, ardından birçok soruyu da beraberinde getirmiştir. TTP ve TTP dışında birçok hastalıkta enzimin aktivitesi araştırılmış olmakla birlikte nakil hastalarında yapılmış çalışmalar sınırlıdır.

Biz bu çalışmada, hematopoietik kök hücre nakli yapılan hastalarda, bazal ve haftalık ADAMTS13 aktivitesini izleyerek, bu aktivitenin klinik seyirle ve özellikle hepatik komplikasyonlarla ilişkisini kurmayı amaçladık.

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji kliniği, Kemik İliği Transplantasyon Ünitesinde, 2003-2004 yılları içinde allojeneik kök hücre nakli yapılan 21 hasta ve 15 sağlıklı kontrol yer almaktadır. 12 hasta AML, 9 hasta ise KML tanısı ile izlenmekte idi. Nakil öncesi 10.gün, nakil günü, nakil sonrası 7., 14., 21. ve 28. günlerde olmak üzere hastalardan toplam altı hafta kan alındı; sağlıklı kontrollerden ise sadece testlerin çalışılacağı gün kan alındı. Hastalar ortalama 13(6-24) ay takip edildiler. Takip sırasında GVHH gelişen hastalardan tekrar kan alındı. Hastaların ADAMTS13 aktiviteyi Ristosetin kofaktör bazlı yöntem kullanılarak ölçüldü.

Sağlıklı bireylerdeki ADAMTS13 aktivitesi %76 ile %136 arasında bulundu. AML, KML hastalarının ve sağlıklı kontrollerin nakil öncesi aktiviteyi birbirinden farklı değildi. Hastaların haftalık enzim takiplerinin stabil seyrettiği ve nakil gününde ılımlı bir düşüş olduğu görüldü. Hastalar başlangıçtaki enzim aktiviteyi %76 ile %136 arasında olanlar ve %75 altında olanlar şeklinde gruplandı; takip haftalarında bazale göre ve her iki grubun kendi arasında fark olmadığı saptandı. Nakil öncesi 10.gündeki faktör VIII düzeyleri ile enzim aktiviteyi arasında korelasyon saptanmadı. Akut GVHH geliştiğindeki enzim aktivitesinin bazale ve sağlıklı kontrollere göre değişmediği gözlemlendi. Hastalar AGVHH gelişen ve gelişmeyenler olarak gruplandırıldığında, AGVHH gelişen hastaların düzeyleri nakil sonrası 28.günde anlamlı şekilde düşüktü. AGVHH gelişen hastalar grup olarak incelendiğinde de haftalık aktivite düzeyleri sabit kaldı.

AGVHH gelişmeyen hastalarda ise 0. gün anlamlı azalma izlenirken, 28.gün değeri de bazalin üzerinde bulundu. Kronik GVHH geliştiğindeki enzim aktivitesi sağlıklı kontrollere göre düşük saptandı. Hastaların karaciğer fonksiyonlarındaki bozukluk ile enzim aktivitesi ilişkili bulunmadı. Febril nötropeni gelişen hastaların febril oldukları haftadaki enzim aktivitesinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak daha düşük olduğu; ancak hastaların nakil öncesi değerlerine göre fark göstermediği görüldü. Takip boyunca hastalarda trombotik mikroangiopati, veno-okluziv hastalık ve kateter trombozu dahil hiçbir tromboembolik olay saptanmadı.

Bu çalışmada, ADAMTS13 enzim aktivitesinin allojeneik nakil sonrası stabil bir seyir sergilediği gösterilmiştir. Komplikasyon olarak, akut graft versus host hastalığı gelişen hastalarda 28.günde enzim aktivitesinin belirgin olarak düştüğü tespit edilmiştir. Karaciğer fonksiyonları ile enzim aktivitesi arasında ilişki saptanmamıştır. Hastaların febril olması durumunda da enzim aktivitelerinin sağlıklı kontrollerden belirgin olarak düşük olduğu gösterilmiştir. Nakil yapılan hastalarda enzimin seyri ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma bu ölçüm yöntemi kullanılarak, allojeneik nakil hastalarında yapılmış ilk çalışmadır.

Anahtar Sözcük: Kök hücre nakli, ADAMTS13, von Willebrand faktör (VWF), Graft versus Host hastalığı (GVHH)

7-SUMMARY:

Follow up of ADAMTS13 Enzyme and Its Relationship with Clinical Events after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation

The recent discovery of the von Willebrand Factor cleaving protease (ADAMTS13) and the association of its deficiency with thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) has generated enormous interest and brought many questions with it. The enzyme has been studied for both TTP and many other disorders; but, there are limited studies about the relationship between ADAMTS13 and hematopoietic stem cell transplantation.

We aimed to evaluate the ADAMTS13 activity weekly after the hematopoietic stem cell transplantation and its relationship with clinical outcome, especially with vascular complications.

Twenty one consecutive leukemia patients who had transplanted in Ankara University School of Medicine, Hematology Department, Bone Marrow Transplantation Unit and fifteen healthy controls were included. 12 patients were AML and 9 were CML. Plasmas were collected from patients 10 days before transplantation, the day of transplantation, and 7th, 14th, 21th, 28th days after transplantation. Patients were followed for median 13 months (6-24 months). Patient plasmas were further collected when GVHD developed. Activity of the enzyme was studied by Ristocetin co factor based method.

ADAMTS13 activity of healthy controls were found between 76% and 136%. Activity of the enzyme before the transplantation between patients with AML, with CML and healthy controls were similar. Weekly activity levels did not change significantly except the slight decrease observed on the day of transplantation. Patients were grouped according to activity of enzyme as 76%-136% and lower than 75% before the transplantation. There was no difference between the weekly activity of the groups. Besides, in both groups, weekly follow of enzyme activity did not show a difference. There was no correlation between factor VIII and ADAMTS13. Enzyme activity on the day of acute GVHD was not significantly different from either pretransplantation period or healthy controls. The enzyme activity was compared according to the presence of

acute GVHD. By the posttransplantation 28th day, patients with AGVHD had lower enzyme activity than the patients without AGVHD. Weekly enzyme activities remained stable in both groups. ADAMTS13 activity was lower in samples from patients with CGVHD compared to baseline level and to healthy controls.

No correlation was found between the hepatic functions and ADAMTS13 activity. During the febrile neutropenic period, activity was statistically lower than healthy controls. None of the patients had thrombotic microangiopathy, veno-occlusive disease or thromboembolism.

According to our data, transplantation does not have significant effect on ADAMTS13 activity. Acute or chronic GVHD and infections (febrile events) cause a slight decrease of the enzyme which may indicate the possible cytokine effect. Hepatic dysfunction and ADAMTS13 enzyme activity are not related essentially. To our knowledge, this is the first study done for allogeneic stem cell transplantation patients with this method.

Key Word: Stem cell transplantation, ADAMTS13, von Willebrand factor(VWF), Graft versus Host Disease (GVHD)

8- KAYNAKLAR:

1- Furlan M, Robles R, Lammle B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood*. 1999; 87: 4223-4234.

2-Asada Y, Sumiyoshi A, Hayashi T, Suzumiya J, Kaketani K. Immunchemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to Factor VIII related antigen . *Thromb Res*. 1985; 38: 467-479.

3-Tsai HM. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood*. 1996; 87: 4235-4244.

4-Manucci PM, Canciani MT, Forza I. Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood*. 200; 98: 2730-2735.

5-Veyradier A, Obert B, Houlier A. Specific von Willebrand cleaving protease in thrombotic microangiopathies. *Blood*. 2001; 98: 1765-1772.

6-Park Y, Yoshioka K, Ishizashi H, Yagi H, Yamamoto Y, Matsumoto M, Fujimura Y. Impaired activity of plasma von Willebrand factor cleaving protease may predict the occurrence of hepatic veno-occlusive disease after stem cell transplantation. *BMT*. 2002; 29: 789-794.

7- Gratwohl A, Schmid O, Baldomero H, Horisberger B, Urbano-Ispizua A. Haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in Europe 2002. *BMT*. 2004; Nov (2): 855-875.

8- Wingard J, Vogelsang G, Deeg H. Haematopoietic stem cell transplantation: Supportive care and long term complications. *Hematology 2002*. (ASAH Education program Book).

9-Couriel D, Caldera H, Champlin R, Komanduri K. Acute graft- versus Host Disease: Pathophysiology, Clinical Manifestations and Management. *Cancer*. 2004 ; 101(9): 1936-1945.

10-Sullivan K. Graft versus Host Disease: In Thomas' Hematopoietic cell transplantation. Australia: Blackwell Publishing, 2004: 635-655.

11-Özcan M, Topcuoğlu P, Beksac M, Dalva K. The relation between T helper subsets and risk of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *BMT*. 2003; 31: S17.

12- Zeiser R, Marks R, Bertz H, Finke J. Immunopathogenesis of acute graft versus host disease: implications for novel preventive and therapeutic strategies. *Ann Hematol*. 2004; 83: 551-565.

13-Higman MA, Vogelsang GB. Chronic graft versus host disease. *British Journal of Haematology*. 2004 ; 125(4): 435-454.

14-Kansu E. The pathophysiology of chronic graft versus host disease. *Int J Hematol*. 2004; 79(3): 209-215.

15-Wingard J, Leather H. Bacterial Infections. In Thomas' Hematopoietic cell transplantation. Australia: Blackwell Publishing, 2004: 1007-1014.

16-Daly AS, Xenocostas A, Lipton JH. Transplantation associated thrombotic microangiopathy. *BMT*. 2002; 30: 709-715.

17-Van der Plas M, Schiphorst E, Huizinga E, Hene R, Verdonck L, Finjheer R. Von Willebrand Factor Proteolysis is deficient in classic, but not in Bone Marrow Transplantation-Associated, Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 1999; 93(11): 3798-3802.

18-Elliots M, Nichos W, Plumhoff E, Litzow M. Posttransplantation Thrombotic Thrombocytopenic purpura. *Mayo Clinic Proc*. 2003; 78: 421-430.

19- Tamaki S, Wada H, Ohfuzi K, Shibata T, Masuya M, Kageyama S, Gabazza EC, Kawakami K, Tsuji K, Miyanishi E, Minami N, Nobori T, Shiku H. Hemostatic abnormalities following bone marrow transplantation. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2002 Apr; 8(2): 125-32.

20-Özcan M. The Influence of stem cell source and G-CSF administration on changes in naturally occurring anticoagulants after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. XVII ISTH,2001; Abstract: P1347.

21-Özcan M, Erkan Ö, Arat M, Topcuoğlu P, Bozdayı M, Akan H. The frequency and clinical relevance of hereditary thrombophilia in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients. XVII ISTH,2001; Abstract: CD3246.

22- Özcan M, Morton CT, Solovey A, Dandele L, Bach RR, Hebbel RP, Slungaard A, Key NS. Whole blood tissue factor procoagulant activity remains detectable during severe aplasia following bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation. *Thromb Haemost.* 2001 Feb; 85(2): 250-5.

23-Kumar S, Deleve LD, Kamth PS, Tefferi A. Hepatic venoocclusive disease *Mayo Clinic Proc.* 2003 ; 78(5): 589-598.

24- Tsai HM. Deficiency of ADAMTS13 in Thrombotic thrombocytopenic Purpura. Education program for ISH 2002; August: 132-138.

25-Lopez J, Dong J. Cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13 on endothelial cells. *Seminars in Hematology.* 2004; 41(1): 15-23.

26-Sadler J, Moake J, Miyata T, George J. Recent advances in Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematology.* 2004; (1): 407-414.

27-Kokame K, Miyata T. Genetic defects leading to Hereditary Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Seminars in Hematology.* 2004; 41(1): 34-40.

28-George J, Sadler E, Lammle B. Platelets: Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology.* 2002; (1): 315-344.

29-Zheng X, Chung D, Takayama, Majerus E, Sadler E, Fujikawa K. Structure of Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in TTP. *J.Biol Chem.* 2001; 276: 41059-41063.

30-Zheng X, Nishio K, Majerus E, Sadler E. Cleavage of von Willebrand Factor requires the spacer domain of the metalloprotease. *J.Biol Chem.* 2003; 278(32): 30136-30141.

31-Assink K, Schiphorst R, Allford S, Karpman D, Etzioni A, Brichard B, Van del Heuvel L. Mutation analysis and clinical implications of von Willebrand factor – cleaving protease deficiency . *Kidney International* . 2003; 63: 1995-1999.

32-Soejima K, Mimura N, Hirashima M.A. Novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into blood: possibly, the von Willebrand factor cleaving protease ? *J Biochem.* 2001; 130: 475-480.

33-Plaimauer B, Zimmermann K, Völkel D, Antoine G, Kerschbaumer R, Jenab, Furlan M, Gerritsen H, Lammle B, Schwarz P, Scheiflinger F. Cloning, expression and

functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). *Blood*. 2002 ; 100(109): 3626-3632.

34-Fujikawa K, Suziki H, McMullen B, Chung D. Purification of human von Willebrand factor cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood*. 2001; 98: 1662-1666.

35-Gerritsen HE, Robles R, Lammler B, Furlan M. Partial amino acid sequence of purified von Willebrand-cleaving protease. *Blood*. 2001; 98: 1654-1661.

36-Barbat J, Costa E, Guerra M. Ten years of prophylactic treatment with fresh frozen plasma in a child with chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura as a result of a congenital deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease. *Br J Haematol*. 2001;113:649-651.

37-Kinoshita S, Yoshioka A, Park YD. Upshaw-Schulman syndrome revisited: a concept of congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol*. 2001; 74: 101-108.

38-Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Lammler B. Recovery and half-life of von Willebrand factor cleaving protease after plasma therapy in patients with Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost*. 1999; 81: 8-13.

39-Majerus E, Zheng X, Tuley E, Sadler E. Cleavage of the ADAMTS13 propeptide is not required for protease Activity. *The Journal of Biochemistry*. 2003; 278(47): 46643-46648.

40- Dent JA, Berkowitz SD, Ware J. Identification of a cleavage site directing the immunochromatographic detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 6306-6310.

41- Studt JD, Hovinga JA, Antoine G, Hermann M, Rieger M, Scheiflinger F, Lammler B. Fatal congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with apparent ADAMTS13 inhibitor: in vitro inhibition of ADAMTS13 activity by hemoglobin. *Blood*. 2005; 105(2): 542-544.

42-James T, Trawley B, Jonathan K, James B, Rance, Luigina R, James S, Lane D. Proteolytic activation of ADAMTS13 by thrombin and plasmin. *Blood*. 2005; 105(3): 1085-1093.

43- Tsai HM. Advances in the Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura . J Am Soc Nephrol. 2003; 14: 1072- 1081.

44-Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Lammle B. Acquired deficiency of von Willebrand Factor-Cleaving protease in a patient with Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. Blood. 1998; 91(8): 2839-2846.

45-Furlan M, Robles R, Galbesura M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B, Krause M, Scharrer I, Aumann V, Lammle B. Von Willebrand factor cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic–uremic syndrome. N Eng J Med. 1998; 339: 1578-1584.

46- Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Lammle B. Deficient activity of von Willebrand cleaving protease in chronic relapsing TTP. Blood. 1997; 89(9): 3097-3103.

47- Vesely S, George J, Lammle B, Studt JD, Alberio L, El-Harake M, Raskob G. ADAMTS13 activity in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: relation to presenting features and clinical outcomes in a prospective cohort of 142 patients. Blood. 2003;103(1):60-67.

48- Sanchez-Luceros A, Farias CE, Amaral MM, Kempfer AC, Votta Marchese C, Salvin MJ, Woods AI, Meschengieser SS, Lazzari MA. Von Willebrand factor-cleaving protease(ADAMTS13) activity in normal non pregnant women, pregnant and post delivery women. Thromb Haemost. 2004; 92(6): 120-1326.

49- Schmugge M, Dunn MS, Amankwah KS, Blanchette VS, Freedman J, Rand ML. The activity of the von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS13 in newborn infants. J Thromb Haemost. 2004; 2(2): 228-233.

50-Kavakli K, Canciani MT, Manucci PM. Plasma levels of the von Willebrand factor-cleaving protease in physiological and pathological conditions in children. Pediatr Hematol Oncol. 2002; 19(7): 467-468.

51-Manucci PM, Canciani MT, Forza I. Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. Blood. 2001; 98: 2730-2735.

52- Reiter R, Knöbl P, Varadi K, Turecek P. Changes in von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity after infusion of desmopressin. Blood 2003; 101(3): 946-948.

53- Loof AH, Van Vliet HHDM, Kappers-Klunne MC. Low activity of von Willebrand factor cleaving protease is not restricted to patients suffering from Thrombotic thrombocytopenic purpura.

54- Moore JC, Hayward CPM, Warkentin TE, Kenton JG. Decreased von Willebrand factor protease activity associated with thrombocytopenic disorders. *Blood*. 2001; 98: 1842-1846.

55-Oleksowicz L, Bhagwati N, Deleon M. Deficient activity of von Willebrand factor cleaving protease in patients with disseminated malignancies. *Cancer res*. 1999; 59: 2244-2250.

56-Forman R, Benkel S, Novik Y, Tsai HM . Presence of ADAMTS13 activity in a patient with metastatic cancer and thrombotic microangiopathy. *Acta Hematol*. 2003; 109(3): 150-2.r *J Haematol*. 2001; 112: 1087-1088.

57- Pimanda JE, Chesterman CN, Hogg PJ. A perspective on the measurement of ADAMTS13 in Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*. 2003; 70: 257-262.

58-Veyradier A, Girma JP. Assays of ADAMTS13 activity. *Semin Hematol* 2004; 41(1): 41-47.

59-Gerritsen HE, Turecek PL, Schwartz HP, Lammle B, Furlan M. Asssay of von Willebrand factor (VWF)-cleaving protease based on decreased collagen binding affinity of degraded VWF. *Thromb Haemost*. 1999; 82: 1386-1389.

60-Obert B, Tout H, Veyradier A, Fressinaud E, Meyer D, Girma JP. Rapid and sensitive estimation of the von Willebrand Factor cleaving protease in plasma using monoclonal antibodies to VWF. *Thromb Haemost*. 1999; 82: 1382-1385.

61- Bohm M, Vigh T, Scharrer I. Evaluation and clinical application of a new method for measuring activity of VWF cleaving metalloprotease (ADAMTS13). *Ann Hematol*. 2002; 81(8): 430-435.

62-Tsai HM, Li A, Rock G. Inhibitors of von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Clin lab*. 2001; 47: 387-392.

63-Zheng X, Kaufman R, Goodnough L, Sadler E. Effect of plasma exchange on plasma ADAMTS13 metalloprotease activity, inhibitor level and clinical outcome in patients with idiopathic and nonidiopathic TTP. *Blood*. 2004 ; 103(11): 4043-4049.

64-Studt JD, Bohm M, Budde U, Girma JP, Varadi K, Lamme B. Measurement of von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity in plasma: a multicenter comparison of different assay yöntemleri. *J Thromb Haemost*. 2003; 1: 1882-1887.

65-Tripodi A, Charantarangkul V, Böhm M, Budde U, Dong F, Galbusera M, Girma JP, Moake J, Rick E, Studt D, Turecek L, Manucci M. Measurement of von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13): results of an international collaborative study involving 11 methods testing the same set of coded plasmas. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2004; 2: 1601-1609.

66-Akan H, Koç H, Bektaş M, İlhan O, Gürman G, Konuk N, Uysal A, Özcan M. The effect of HLA in development of veno-occlusive disease in MHC matched adults undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *BMT*. 1995;15 (Suppl 2):370.

67- Manucci P, Capoferri C, Canciani MT. Plasma levels of von Willebrand factor regulate ADAMTS13, its major cleaving protease. *British Journal of Hematology*. 2004; 126(2): 213-215.

68- Bernardo A, Ball C, Nolasco L, Moake JF, Dong JF. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood*. 2004 Jul 1; 104(1): 100-6.

69- Salat C, Holler E, Kolb HJ, Pilhusch R, Reinhardt, Hiller E. Endothelial cell markers in bone marrow transplant recipients with and without acute graft-versus-host disease. *BMT*. 1997; 19: 909-914.

70- Bianchi V, Robles R, Alberio L, Furlan M, Lammle. Von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) in thrombocytopenic disorders: a severely deficient activity is specific for thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2002; 100(2): 710-713.