

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

İDİYOPATİK TROMBOSİTOPENİK PURPURA TANILI
OLGULARDA
eNOS GENİNİN Glu298Asp POLİMORFİZMİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. F. Necati ARSLAN

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Saadet AKARSU

ELAZIĞ
2009

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. A. Denizmen AYGÜN

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Saadet AKARSU

Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. A. Denizmen AYGÜN

Prof. Dr. Erdal YILMAZ

Doç. Dr. Saadet AKARSU

Yrd. Doç. Dr. Mehmet KILIÇ

Yrd. Doç. Dr. Erdal TAŞKIN

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında desteğini ve yardımını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Saadet Akarsu'ya, uzmanlık eğitimim boyunca her konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. A.Denizmen AYGÜN'e ve bölüm hocalarıma teşekkür ve saygılarımı sunarım. Tez hastalarımın takiplerinde yardımları olan araştırma görevlisi arkadaşlarıma, tez istatistiklerinin yapılmasında yardımlarından dolayı Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Bilal Üstündağ'a, örneklerin çalışılmasındaki katkılarından dolayı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Yüce'ye, DNA izolasyonunda yardımlarından dolayı Dr. Murat Kara'ya, çalışma boyunca gösterdiği titizlik ve emeğinden dolayı Dr. Deniz Erol'a, tüm yaşamım boyunca bana destek olan ve fedakarlıkta bulunan aileme ve eşime teşekkür ediyorum.

ÖZET

İdiyopatik trombositopenik purpura (İTP), trombositopeni ile karakterize, benign seyirli, kendi kendini sınırlayan, sonradan kazanılmış otoimmün bir hastalıktır. Patogenezinde trombositlere karşı gelişen otoantikorlar veya otoimmün mekanizma sorumlu tutulmaktadır. Diğer bir mekanizma antikora bağımlı olarak gelişen oksidan bir ürün olan hidrojen peroksidin hücresel hasara neden olmasıdır.

Otoimmün bir hastalık olan İTP'nin patogenezi ve prognozundan oksidatif stres ve serbest radikaller sorumlu tutulabilir. Nitrik oksitin yüksek miktarı, hücresel süperoksit anyon varlığında; toksik peroksinitrit molekülünün oluşmasına neden olur. Peroksinitrit; lipid peroksidasyonu, DNA fragmentasyonu, plazma antioksidanlarının azalması gibi nedenlerle hücresel hasar oluşturabilir. Nitrik oksitin sentezini sağlayan endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) genindeki polimorfizm, enzimin fonksiyonunda değişikliğe neden olmaktadır.

Bu çalışma İTP etiyopatogenezinde eNOS Glu298Asp gen polimorfizminin rolü, hastalığın seyri ve tedavisi üzerine etkisini araştırmak amacıyla yapıldı. Çalışmaya 51'i akut İTP, 15'i kronik İTP olmak üzere toplam 66 İTP'li olgu ve 60 sağlıklı kontrol grubu alındı. Toplam İTP, akut İTP, kronik İTP ve kontrol grubunda sırasıyla GG genotipi %40.9, %39.2, %46.7, %21.7; GT genotipi sıklığı %48.5, %51, %40 ve %70; TT genotipi %10.6, %9.8, %13.3 ve %8.3 olarak saptandı. Toplam İTP grubunda GT genotipi, kronik İTP grubunda GG genotipi, akut İTP grubunda GT genotipi, kontrol grubunda ise GT genotipi en fazla saptandı.

Çalışmamızda eNOS Glu298Asp gen polimorfizmi ile İTP arasında anlamlı bir korelasyon olduğu ve bu polimorfizmin İTP etiyopatogenezinde bir risk faktörü olabileceği düşünüldü. Kronik İTP'da GG genotipi sıklığının yüksek oranda bulunması ile GG genotipine sahip bireylerin kronikleşme eğilimi gösterebileceği düşünüldü. Akut ve kronik İTP'da GG genotipi olanlar İVİG başta olmak üzere medikal tedaviye (anti-D hariç) iyi yanıt verirken, kronik İTP grubunda GT ve TT genotipi olanlar medikal tedaviye direnç göstermektedir. G alleli varlığının İTP'da tedaviye yanıtta olumlu etkisinin olduğu, T alleli varlığı ise kronik İTP'li hastaları medikal tedaviye daha dirençli kıldığı görüldü.

Anahtar kelimeler: İdiyopatik trombositopenik purpura, eNOS Glu298Asp gen polimorfizmi, intravenöz immünglobulin.

ABSTRACT

Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) Glu298Asp gene polymorphism in the cases of idiopathic thrombocytopenic purpura

Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), which is an acquired autoimmune and self-limiting disease has a benign course and characterized by thrombocytopenia. Pathogenesis of the disease include auto-antibodies formed against platelets or other auto-immune mechanisms resulting in cellular damage with formation of hydrogen peroxide which is an oxidant yield.

Oxidative stress and free-radicals could be responsible in the pathogenesis and prognosis of ITP which is an autoimmune disorder. High doses of nitric oxide results in the formation of toxic molecule peroxynitrite in the presence of cellular superoxide anion. Peroxynitrite may cause cellular injury with lipid peroxidation, DNA fragmentation and depletion of plasma antioxidants. Polymorphism of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene which supplies nitric oxide synthesis changes the functions of this enzyme.

This study investigated the role of eNOS Glu298Asp gene polymorphism in ethiopathogenesis, course and treatment of ITP. 66 patients including 51 acute and 15 chronic ITP and 60 healthy controls were enrolled in the study. In all patients with ITP and in the groups with acute, chronic ITP and healthy group, the frequency of GG genotype were found as %40.9, %39.2, %46.7 and %21.7, respectively, meanwhile the frequency of GT genotype were %48.5, %51, %40, %70 and TT genotype were %10.6, %9.8, %13.3 and %8.3, respectively. Most common genotype in all patients with ITP, acute ITP group and control group was GT genotype, while GG genotype was found predominantly in patients with chronic ITP.

In the present study, a significant correlation was found between ITP and eNOS Glu298Asp gene polymorphism. This correlation gave rise to thought that eNOS Glu298Asp gene polymorphism might be a risk factor in the ethiopathogenesis of ITP. Patients with GG genotype was thought to have a high intention for having a chronic disease due to high frequency of GG genotype in patients with chronic ITP. Patients with acute, chronic ITP and having GG genotype, responded effectively to medical treatment with IVIG therapy mainly (except anti-D). However, patients having GT and TT genotypes in the chronic ITP group were resistant to medical

therapy. Presence of G allele was observed to have a positive and T allele to have a negative affect in the medical treatment of patients with chronic ITP.

Key words: Idiopathic thrombocytopenic purpura, endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphisim, intravenous immunoglobuline.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
1. GİRİŞ.....	1
1.1. TROMBOSİTLER.....	3
1.2. TROMBOSİTOPENİ NEDENLERİ.....	4
1.3. İDİYOPATİK TROMBOSİTOPENİK PURPURA.....	8
1.3.1. Tanımı ve sıklığı.....	8
1.3.2. Etyoloji ve fizyopatogenez.....	9
1.3.3. İdiyopatik trombositopenik purpurada genetik.....	12
1.3.4. Klinik bulgular.....	12
1.3.5. Tanı ve laboratuvar parametreleri.....	14
1.3.6. Ayırıcı tanı.....	15
1.3.7. Tedavi.....	16
1.3.8. Komplikasyonlar.....	19
1.4. NİTRİK OKSİT.....	20
1.5. Nitrik oksit sentaz.....	21
1.5.1. Nitrik oksit sentazın formları.....	22
1.5.2. eNOS yapı, fonksiyon ve aktivasyon.....	24
1.5.3. eNOS gen polimorfizmleri.....	25
1.5.4. eNOS geni Glu298Asp polimorfizmi.....	27
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
2.1. Hasta ve kontrol Grubu.....	29
2.2. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal maddeler.....	30
2.2.1. Kullanılan cihazlar.....	30
2.2.2. Kimyasal maddeler ve çözeltiler.....	30
2.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu için Oligonükleotidler (primerler)...	31
2.3. Kandan DNA İzolasyonu.....	31
2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu ile eNOS Glu298Asp Gen	
Polimorfizmlerinin Saptanması.....	33
2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin yatay jel	
elektroforezinde görüntülenmesi.....	34

2.6. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle kesimi	34
2.7. Restriksiyon enzimleri ile kesilen DNA örneklerinin Agaroz jelde görüntülenmesi.....	35
2. 8. İstatistiksel Analizler.....	37
3. BULGULAR.....	38
4. TARTIŞMA.....	47
5. KAYNAKLAR.....	61
6. EKLER	70
7.ÖZGEÇMİŞ.....	74

TABLO LİSTESİ

	SAYFA
Tablo I. Çocuklarda trombositopeninin patofizyolojik Sınıflandırılması.....	6
Tablo II. NOS izoformlarını kodlayan genler ve özellikleri.....	22
Tablo III. İdiyopatik trombositopenik purpura ve kontrol grubu olgularının demografik özellikleri.....	39
Tablo IV. Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin hematolojik değerleri.....	41
Tablo V. Hasta ve kontrol gruplarında eNOS Glu298Asp polimorfizminin genotip dağılımı ve G/T allel sıklığı.....	42
Tablo VI. Gruplar arası eNOS Glu298Asp genotip dağılımı ile yaş ve trombosit parametrelerinin ilişkisi.....	46

ŞEKİL LİSTESİ

	SAYFA
Şekil I. Nitrik oksit sentazın kofaktörleri ve katalizlediği reaksiyonlar.....	21
Şekil II. eNOS gen polimorfizmleri	26
Şekil IIIa. eNOS geni Glu298Asp polimorfizmine ait Ban II enzimi ile kesilen kesilen PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	36
Şekil IIIb. eNOS geni Glu298Asp polimorfizmine ait Ban II enzimi ile kesilen kesilen PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde şematik görüntüsü	36
Şekil IV. Toplam İTP, akut İTP, kronik İTP ve kontrol grubunun eNOS Glu298Asp G/T genotip dağılımı.....	43
Şekil V. Kontrol grubu ve toplam İTP'lı (akut ve kronik) hastaların eNOS Glu298Asp G/T genotip dağılımı.....	44

KISALTMALAR

AD	: Anlamlı değil
ANA	: Antinükleer antikor
Asp	: Aspartat
B�	: Baz �ifti
BH₄	: Tetrahidrobiopterin
Ca⁺⁺	: Kalsiyum
CMV	: Sitomegalovirüs
Dntp	: Deoksinükleotid trifosfat
D�C	: Dissemine intravasküler koagülasyon
DNA	: Deoksiribon�kleikasit
E	: Erkek
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
EDTA	: Etilendiamintetraasetik aside
fL	: Femtolitre
Glu	: Glutamat
G	: Guanin
HIV	: �nsan immün yetmezlik virüsü
HPA	: �nsan trombosit antijenleri
INF	: �nterferon
�TP	: �diyopatik trombositopenik purpura
�L	: �nterl�kin
iNOS	: �nd�klenebilir nitrik oksit sentaz
�ViG	: �ntraven�z immünglobulin
K	: K�z
LDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
MP	: Metilprednizolon
MMR	: K�zamn�k-kabak�lak-k�zamn�k�ık
MPV	: Ortalama trombosit volümü
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz

NF-KB	: Nükleer faktör kappa B
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
OSİ	: Oksidatif stres indeksi
PCT	: Platokrit
PZR	: Polimeraz zincirleme reaksiyonu
PDW	: Trombosit dağılım aralığı
PT	: Protrombin zamanı
PTT	: Parsiyel tromboplastin zamanı
RA	: Romatoid artrit
RES	: Retiküloendotelial sistem
RFLP	: Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi
SDS	:Sodyum dodesil sülfat
SOD	: Süperoksit dismutaz
SD	: Standart sapma
SDMP	: Standart doz metilprednizolon
TAOK	: Total antioksidan kapasite
T	: Timin
YDMP	: Yüksek doz metilprednizolon
WBC	: Beyaz küre sayısı

1.GİRİŞ

İdiyopatik trombositopenik purpura (İTP) trombosit antijenlerine bağlanan otoantikorlar nedeniyle trombositlerin erken yıkımı sonucu oluşan trombositopeni ile karakterize bir hastalıktır (1). Hastalığın kesin sebebi bilinmemektedir. Çok sayıda çalışma immünolojik bir hastalık olduğunu desteklerken çoğunlukla immünolojik bozulmanın nedeni açık değildir ve idiyopatik terimi tercih edilir (2).

İmmün trombositopenik purpuralı çocukların %50-60'ında önceden geçirilmiş viral enfeksiyonların olduğu ve enfeksiyon sonrasında gelişen uygunsuz immün yanıtın hastalığın patogeneğinde rolü olduğu bulunmuştur. Olguların %50-65'inde oluşan uygunsuz immün yanıtın, otoimmün bir mekanizma sorumlu tutulmaktadır. Sorumlu olabilecek diğer mekanizmalar arasında bozulmuş trombosit yapımı, kompleman bağımlı mekanizma ile trombolizis ve antikora bağımlı olarak gelişen oksidan bir ürün hidrojen peroksidin hücresel hasara neden olması ileri sürülmüştür (2-6,8).

Nitrik oksit (NO) hem hücre içi hem de hücre dışında düzenleyici işlev gören küçük, reaktif bir serbest radikal moleküldür. Parakrin ve otokoid olarak fonksiyon görmek üzere hücre zarından serbestçe geçen bir nörotransmitterdir. Dolaşım sistemi açısından NO'nın vazodilatör etki gösterdiği, bölgesel kan akımı ve sistemik kan basıncı üzerine etkisi olduğu, endotele yönelik olarak ta ateroskleroza önleyici etki yaptığı bilinmektedir. Nitrik oksitin otoimmün hastalıkların fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerinde major mediyatör olarak görev aldığı düşünülmektedir. Nitrik oksit, arjininden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından sentez edilir (9-12).

Vücutta yaygın olarak bulunan ve çeşitli fonksiyonlarda görev alan NOS enzimlerinin, üç farklı izoformu bulunur. Bunlar nöronal (nNOS veya NOS-1), indüklenebilir (iNOS veya NOS-2) ve endotelial (eNOS veya NOS-3) NOS'dır. Bu izoformlar, farklı genler tarafından kodlanmaktadır. Her izoformun lokalizasyonu, regülasyonu, katalitik özellikleri ve inhibitör duyarlılıkları farklıdır. İnsandaki NOS enzimleri arasında % 51-57'lik bir homoloji vardır. Üç izoformda çeşitli dokularda yaygın olarak bulunarak fizyolojik ve patolojik olaylarda görev almaktadır (9).

Bir gen veya deoksiribonükleik asit (DNA) dizisinin alternatif formlarından (allel) birinin toplumda %1'den fazla bulunduğu durumlar polimorfizm olarak

adlandırılmaktadır. Endotelyal nitrik oksit sentaz geninde bugüne kadar tanımlanmış olan yaklaşık 161 tek nükleotid polimorfizmi (TNP) bulunmaktadır. Endotelyal NOS geni 7. eksonunda Guanin (G) nükleotidinin Timin (T) ile yer değiştirmesi ile Glu298Asp polimorfizmi oluşur. Fonksiyonel önemi olan Glu298Asp polimorfizmi enzimin yapısında 298 numaralı glutamat'ın (Glu) aspartat'a (Asp) dönüşmesine neden olarak protein dizisinde değişiklik yapar. Proteinin primer yapısını bozarak enzimde fonksiyonel bir değişiklik meydana getirmektedir (13).

Endotelyal nitrik oksit sentaz gen polimorfizminin sistemik lupus eritematozus (SLE) ve otoimmün hastalıklara yatkınlığı arttırdığı belirlenmiştir (14). Sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit (RA) gibi otoimmün hastalıklarda eNOS gen polimorfizmi varlığında glomerulonefrit gelişiminin belirgin arttığı saptanmıştır. Endotelyal NOS gen polimorfizminin hastalığın seyrinde olumsuz etkilere neden olduğu belirlenmiştir (15).

Oksidatif stres, serbest radikal (prooksidan) ile antioksidan sistem arasındaki dengenin; prooksidasyon lehine bozulması olarak tanımlanmaktadır. Prooksidan/antioksidan dengenin bozulması DNA gibi hücresel moleküllerde oksidatif hasara neden olur. Normal hücre fonksiyonları ve hücre yapılarının bütünlüğü reaktif oksijen ürünleri ile bozulur (16,17).

Oksidatif stresin İTP patogenezinde rol aldığı saptanmıştır (7). İdiyopatik trombositopenik purpurada, oksidatif stresin patogenezdaki rolü ile ilgili yapılan bir çalışmada, tanı anında oksidatif stresin arttığı, antioksidatif kapasitenin azaldığını ve İTP'nin patogenezinde artmış oksidatif stres ve azalmış antioksidan kapasitenin rol oynayabileceği vurgulanmış. İdiyopatik trombositopenik purpurada, total antioksidan kapasite (TAOK) değerinin düşük, oksidatif stres indeksi (OSİ) değerlerinin tanı anında yüksek olduğu saptanmış. Ayrıca tanı anında yüksek OSİ saptanan olgularda kronik İTP gelişme riskinin yüksek olduğu bulunmuş (8). Şu ana kadar hastalığın akut veya kronik olacağını tespit eden bir tetkik belirlenememiştir.

İdiyopatik trombositopenik purpurada, daha önce yapılan çalışmalarda oksidatif stresin varlığı belirlenmiştir (7,8). Çalışmamızda oksidatif stres ile ilgili olan NO'nin sentezinde, görevli eNOS enzim geninde Glu298Asp polimorfizm varlığının İTP patogenezindeki rolü ve bu polimorfizmin kronikleşmeye yol açıp

açmayacağını araştırmak istedik. Böylece eNOS geninin Glu298Asp polimorfizmi varlığı, İTP tanılı olgularda araştırılıp; İTP patogenezinde gen polimorfizminin rolü, prognoza ve tedaviye olan etkisi ile İTP'nın akut veya kronik formu arasında eNOS geni Glu298Asp polimorfizmi açısından fark olup olmadığı hakkında bilgi elde edilmiş olacaktır.

1.1.TROMBOSİTLER

Normal trombosit sayısı 150.000–400.000/mm³'tür. Üçte biri dalakta, üçte ikisi kan dolaşımında bulunur (18,19). Ortalama yaşam süresi 7–10 gün arasında değişmektedir. Kemik iliğindeki megakaryositlerin sitoplazmalarından ayrılan trombositler normalde 1-4 µm çapındadır. Ortalama trombosit volümü (MPV) ise 8.9 ± 1.5 fL değerindedir (18). Trombositler, yaşlandıkça parçalanmaya ya da granül içeriklerini ve membran proteinlerini kaybetmelerine bağlı küçülürler, trombolitik durumlarda ise strese bağlı eritropoeze benzer şekilde megakaryositler büyük trombositler üretirler (19,20).

Elektron mikroskobu ile incelendiğinde dolaşan trombositler düzgün konturlu yassı diskler şeklinde izlenmektedir. Trombositler çekirdeksiz olmasına rağmen, elektron mikroskobisi hemostazı sürdürmede önemli rolü olan organelleri içeren sitoplazmayı göstermektedir (21).

Trombositler elektron mikroskobik olarak periferik bölge, sol jel bölgesi ve organel bölgesi olmak üzere 3 bölgeye ayrılırlar.

1. Periferik bölge: Trombosit membranı yaklaşık 7.5 nm kalınlığında ve 3 katlı bir yapıya sahiptir. Membranın dış yüzü kabarık ve düzensiz bir yüzey örtüsü olan glikokaliks ile kaplıdır. Bu katman çeşitli protein, glikoprotein, glikolipit ve mukopolisakkaritten oluşmuştur. Glikokaliks protein ve lipidlerin üzerindeki sialik asit kalıntılarından dolayı negatif bir yüzey elektrigine sahiptir. Bu negatif elektrik dolaşan trombositlerin birbirine bağlanmasını azaltır (21). Zarın hemen altında, derindeki yapılarla zarı birbirine tutturarak hücre biçimini sağlayan ince mikrotubuluslar bulunur (23).

2. Sol jel bölgesi: Mikrofilamentlerden oluşmuşlardır. Bu tubuler sistem aktomyozin içerir ve belli koşullarda geri dönüşümlü depolimerizasyonla mikrofilamentlere ayrılır. Mikrotubulus sisteminin trombosit fagositozunda, trombositlerin depolama ve salgılama fonksiyonunda rol aldığı düşünülmektedir (24).

3. Organel bölgesi: Trombositlerin gerçek anlamda çekirdeği yoktur. Ancak genellikle hücresinin ortasında toplanan granüller çekirdek izlenimi verebilir. Bu bölgeye organel ya da granülomer denir (24). Mitokondri, golgi cihazı, granüller, glikojen tanecikleri ve vakuollerden oluşur. Trombositler dört ayrı granül içerirler. Bunlar alfa granüller, yoğun cisimler, lizozomlar ve mikroperoksizomlardır. Granüller içinde en sık rastlanan alfa granüllerdir. Bunlar trombositte spesifik platelet faktör-4, betatromboglobulin, platelet derive büyüme faktörü, trombospodin de dahil olmak üzere 20'nin üzerinde protein içerir. Alfa granüllerin membranında trombosit zarında olduğu gibi glikoprotein IIb ve IIIa da bulunur (25).

1.2.TROMBOSİTOPENİ NEDENLERİ

Trombositopenisi olan hastaya yaklaşımda özellikle öykü ve fizik muayene primer hemostaz defektini düşündürmüyorsa, öncelikli olarak düşük trombosit sayısının laboratuvar hatasına bağlı olup olmadığı saptanmalıdır (19,20). Bazen trombositler lökositlere yapışarak trombosit satellitleri denilen kümeler oluşturabilirler. Psödotrombositopeni görülme sıklığı erişkin hastalarda % 0.9-2 arasında bulunurken çocuklarda daha az sıklıkta görülmektedir (19,26).

Psödotrombositopeni kan alınırken enjektör ya da tüpte trombositlerin agregasyonuna, trombositlerin aktivasyonuna, etilendiamintetraasetik aside (EDTA) bağlı trombositlerin in vitro aglütinasyonuna, megatrombositlerin sayılamamasına ya da trombosit glikoprotein reseptörlerine bağlanan abciksimab, eptifibatide ve tirofiban gibi monoklonal antikorlara bağlı görülebilir (18-20, 27-30).

Etilendiamintetraasetik aside bağlı psödotrombositopeni nedeni, sadece bu antikoagülanın varlığında; kriptik trombosit antijenine karşı gelişen IgG ya da IgM yapısındaki antikorlardır. Sitrat, oksalat ya da heparin gibi farklı antikoagülanlar kullanılarak ya da parmak ve topuktan alınan örneğin periferik yayması incelenerek EDTA'ya bağlı psödotrombositopeni kanıtlanabilir (19,20,29).

Trombositopeniye bağlı kanamalar tipik olarak deri ve mukozalarda; peteşi, purpura, ekimoz, epistaksis, hematüri, menoraji ve gastrointestinal kanama şeklinde görülür. İntrakraniyal kanama sıklığı ise %0,1-0,5 arasında çok nadir olarak görülmektedir (18,19).

Trombositopeni; trombositlerin yetersiz yapımına, aşırı yıkımına ya da anormal dağılımına (dalakta göllenme) bağlı olabilir. Çocukluk çağında görülen trombositopenilerin etyolojik sınıflandırılması TabloI’de gösterilmiştir (18).

Trombosit yıkımına bağlı trombositopeniler, immun ve immun olmayan trombositopeniler olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. Genellikle diğer kan hücre elemanları normal sayıda bulunur. Periferik yaymada büyük trombositler görülür. Kemik iliğinde ise normal ya da artmış sayıda megakaryositler saptanır (20). Trombositopeninin belirlenmesi hastaya uygulanacak olan tedaviye yön vermesi açısından önem arz eder (19).

Tablo I. Çocuklarda Trombositopeninin Patofizyolojik Sınıflandırılması (18)

I. Artmış trombosit yıkımı (kemik iliğinde normal ya da artmış megakaryositler megakaryositik trombositopeni)

A . İmmun trombositopeniler

1. İdiyopatik

- a. İdiyopatik trombositopenik purpura

2. Sekonder

- a. Enfeksiyon (HIV, CMV, EBV, suçiçeği, kızamık, kızamıkçık, kabakulak, boğmaca, hepatit, parvovirüs B19, tüberküloz, tifo)
- b. İlaçlar
- c. Transfüzyon sonrası purpura
- d. Otoimmün hemolitik anemi (Evans sendromu)
- e. Sistemik lupus eritematozus (SLE)
- f. Hipertiroidizm
- g. Lenfoproliferatif hastalıklar

3. Neonatal immün trombositopeniler

- a. Neonatal otoimmün trombositopeni
- b. Neonatal alloimmün trombositopeni
- c. Eritroblastosis fetalis -Rh uygunsuzluğu

B. İmmün olmayan trombositopeniler

1. Trombosit tüketimine bağlı

- a. Mikroanjiopatik hemolitik anemi: Hemolitik üremik sendrom, trombotik trombositopenik purpura
- b. Dissemine intravasküler koagülasyon
- c. Virüse bağlı hemofagositik sendrom
- d. Kasabach-Merritt sendromu (dev hemanjiom)
- e. Siyanotik kalp hastalıkları

2. Trombosit yıkımına bağlı

- a. İlaçlar (ristosetin, protamin sülfat, bleomisin)
- b. Enfeksiyonlar
- c. Kardiak (intrakardiak defektlerin tamiri, prostetik kalp kapakları, sol ventriküler çıkış obstrüksiyonu)
- d. Malign hipertansiyon

II. Trombosit dağılım bozuklukları ve göllenme

A. Hipersplenizm (portal hipertansiyon, gaucher, siyanotik konjenital kalp hastalıkları, infeksiyon, neoplazi)

B. Hipotermi

III. Azalmış trombosit üretimi-etkisiz trombopoez (kemik iliğinde azalmış ya da eksik megakaryositler-amegakaryositik trombositopeni)

A. Megakaryositlerin baskılanması ya da hipoplazi

1. İlaçlar (klorotiazid, östrojenler, etanol, tolbutamid)

2. Konstitüsyonel

- a. TAR (Thrombocy-topenia absent radius) sendromu
- b. Konjenital amegakaryositik trombositopeni
- c. Amegakaryositik trombositopeni ile radio-ulnar sinostosis
- d. Trombositopeni-korpus kallosum agenezisi sendromu
- e. Paris-Trousseau sendromu
- f. Rubella sendromu
- g. Trizomi 13 ve 18

3. Etkisiz trombopoez

- a. Megaloblastik anemiler (folat ve vitamin B12 eksikliği)
- b. Ağır demir eksikliği anemisi
- c. Ailesel trombositopeniler
- d. Paroksizmal noktürnal hemoglobinüri

4. Kontrol mekanizması bozuklukları

- a. Trombopoietin eksikliği
- b. Tidal trombosit disgenезisi
- c. Siklik trombositopeniler

5. Metabolik bozukluklar

- a. Metilmalonik asidemi
- b. Ketotik glisinemi
- c. Holokarboksilaz sentetaz eksikliği
- d. İsovalerik asidemi
- e. İdiyopatik hiperglisinemi
- f. Hipotiroid annelerden doğan çocuklar

6. Herediter trombosit bozuklukları

- a. Bernard-Soulier sendromu
- b. May Hegglin anomali ve diğer MYH-9 geni ile ilişkili hastalıklar
- c. Wiskott-Aldrich sendromu
- d. Saf cinse bağlı trombositopeni
- e. Mediterranean trombositopeni

7. Edinsel aplastik bozukluklar

- a. İdiyopatik
- b. İlaçlar (doz ilişkili: antineoplastik ajanlar, benzen, organik ve inorganik arsenik, mesantoin, tridion, antitiroidler, antidiabetikler, antihistaminikler, fenilbutazon, insektisidler, altın bileşikler; idiyosenkrazi: kloramfenikol)
- c. Radyasyon
- d. Viral infeksiyonlara bağlı (HIV, EBV, hepatit)

B. Kemik iliğini infiltre eden durumlar

- 1. Benign (osteopetroz, depo hastalıkları)
- 2. Malign (de novo-lösemi, myelofibroz, langerhans hücreli histiyositoz, lenfoma, nöroblastom, solid tümör metastazları)

1.3.İDİYOPATİK TROMBOSİTOPENİK PURPURA

1.3.1.Tanımı ve sıklığı

İdiyopatik trombositopenik purpura, retiküloendotelial sistem (RES)'de immun aracılı trombosit yıkımı ile karakterize; kendini haftalar ve aylar içinde sınırlayan selim seyirli bir hastalıktır (31,32).

Purpura, ilk kez Hipokrat ve Galen tarafından ateşe bağlı lekeler ya da kırmızı kabarıklıklar, plaklar olarak tanımlanmıştır (33). Paul Gottlieb Werlhof 1735'de; erişkin bir kadında ani burun kanaması ve kanlı kusma sonrası boyun ve kollarda oluşan mor lekeleri “morbus maculosus hemorrhagicus” olarak tarif ederek Werlhof hastalığı olarak bilinen İTP'nin ilk klinik tanımını yapmıştır (20,33). Georges Hayem 1883'te trombositleri ve fonksiyonlarını tanımlayarak kanda ölçümlerini sağlayan bir metod geliştirdikten kısa bir süre sonra purpuranın düşük trombosit sayısına bağlı olduğunu saptamıştır (33).

İlk kez William J. Harrington, 1951'de trombositopenik hastaların plazmasını sağlıklı kişilere transfüze ederek; bu kişilerde gelişen hızlı trombosit düşüşünü göstererek bir trombositopenik faktörün varlığını kanıtlamıştır (34,35). Böylece İTP'nin ilk kez immun aracılı trombosit yıkımı olduğu tanımlandı. Evans bu plazma faktörünün antitrombosit antikor olduğunu saptadı. Shulman ve ark. (36,37) ise serolojik yöntemlerle bu faktörün IgG olduğunu kanıtlamıştır. Leeuwen 1982'de kronik İTP'li hastalardan elde edilen antikorların, trombositlerinde glikoprotein GpIIb-IIIa bulunmayan hastalara verildiğinde bu hastaların trombositlerine bağlanmadığını göstererek, ilk kez İTP'da oluşan antikorların trombosit yüzeyindeki GpIIb-IIIa'ya karşı oluştuğunu kanıtlamıştır (38,39).

İdiyopatik trombositopenik purpura; trombositopeni (trombosit sayısının $150.000/\text{mm}^3$ altında bulunması), kısa trombosit ömrü (ortalama yaşam süresi 7-10 gün), plazmada antitrombosit antikorların bulunması ve kemik iliğinde megakaryositlerin artması ile karakterizedir (18). İdiyopatik trombositopenik purpuranın insidansı 4-5.3/100.000 olarak rapor edilmiştir (40). Hastalığın pik insidans yaşı 2-5 yaştır. Kış ve sonbahar mevsimlerinde sıklığı artmaktadır. Her iki cinsiyette eşit görülmekle beraber, beyaz çocuklarda siyah çocuklara göre daha fazla, infant döneminde erkek çocuklarda daha fazla, adultlarda ise kızlarda (3:1) daha fazla görülmektedir (20,41).

İdiyopatik trombositopenik purpuranın akut ve kronik olarak iki klinik formu vardır (2). Bu tanıyı alan çocukların yaklaşık %90'ı akut İTP'dır. Akut İTP 6 ay içinde kendini sınırlar. Bununla birlikte tanı anında hastalığın seyrinin akut mu kronik mi olacağını belirlemek olası değildir. Akut İTP'lı çocuklarda İTP'lı hastaların %1'inden azında görülen intrakranial hemoraji gibi komplikasyon dışında mortalite nadirdir. Trombositopeninin altı aydan daha uzun süre devam etmesi ise kronik İTP olarak tanımlanır. İdiyopatik trombositopenik purpura yaklaşık olarak %10 çocukta kronikleşir. Tanı anında hastalığın seyrinin akut mu kronik mi olacağını belirlemek olası değildir (2,20,40).

İdiyopatik trombositopenik purpura altta yatan bir hastalığın olup olmamasına göre primer ve sekonder olarak da sınıflandırılabilir. Sekonder İTP nedenleri insan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonu, SLE, lenfoproliferatif hastalıklar, myelodisplazi, agammaglobulinemi, hipogammaglobulinemi, ilaca bağlı trombositopeni, alloimmün trombositopeni, konjenital/herediter immün olmayan trombositopeni şeklinde sıralanabilir. Çocuklarda sekonder İTP nadirdir. En sık SLE ve HIV enfeksiyonu sonucu görülebilir (42).

1.3.2.Etyoloji ve Fizyopatogenez

İdiyopatik trombositopenik purpuranın kesin sebebi bilinmemektedir. Yapılan çok sayıda çalışma immünolojik nedenli bir hastalık olduğunu desteklemekle beraber, çoğunlukla immünolojik bozulmanın nedeni açık değildir ve idiyopatik terimi de tercih edilmektedir (2,3,4).

İdiyopatik trombositopenik purpuralı çocukların %50-60'ında önceden geçirilmiş viral enfeksiyonlar tanımlanmıştır. Viral enfeksiyonlardan 1-4 hafta sonra çocukların bir kısmında trombosit yüzeyine karşı antikorlar gelişir. Bu antikorlar trombosit yüzey glikoproteinleri üzerindeki epitoplara bağlanmakta, daha sonra monositik fagositik sistem tarafından opsonize olmuş dolasımdaki antikorlarla kaplı trombosit, splenik makrofajlardaki Fc reseptörleri ile tanınıp parçalanmaktadır. İmmünolojik mekanizmada en fazla sorumlu antikorlar, trombosit yüzey glikoprotein IIb/IIIa kompleksine karşı oluşan otoantikorlardır (3,4,40,43). Olguların %50-65'inden bu otoimmün mekanizma sorumludur (2).

İdiyopatik trombositopenik purpuranın, immün mekanizması ilk olarak İTP'lı bir hastanın plazmasını kendine enjekte ederek trombosit miktarında hızlı bir azalmayla sonuçlanan Harrington'un (36) çalışması ile kanıtlanmasından sonra, İTP'lı hastaların plazmasını sağlıklı alıcılara infüze ederek Fc reseptör blokajını gösteren çalışmalar yapılmıştır (44-46). Çalışmaların sonucunda İTP'da kemik iliğinde trombosit üretim defekti olmadığı, antikorlarla kaplı trombositlerin retiküloendotelyal sistemde (RES) artmış yıkımı nedeniyle olduğu anlaşılmıştır. Neden olabilecek diğer mekanizmalar bozulmuş trombosit yapımı (5), kompleman bağımlı trombolizis (3,46), antikorlara bağımlı olarak oluşan bir oksidan ürün olan hidrojen peroksidin hücresel hasara neden olmasıdır (6,8). Otoimmün hastalıkların patogenezinde serbest radikallerin bir çok rolü olduğu bilinmektedir (48,49).

İdiyopatik trombositopenik purpuranın patogenezinde oksidatif stresin rol aldığı, yapılan bir tez çalışması ile desteklenmiştir (8). Bu çalışmada tanı anında oksidatif stresin arttığı, antioksidatif kapasitenin azaldığını ve İTP'nın patogenezinde artmış oksidatif stres ve azalmış antioksidan kapasitenin rol oynayabileceği vurgulanmış. İdiyopatik trombositopenik purpura tanılı olgularda, TAOK değerinin düşük, OSİ değerlerinin tanı anında yüksek olduğu saptanmış. Akut ve kronik İTP'da ölçülen TAOK ve OSİ'nin farklı düzeylerde olduğu görülmüştür. Total antioksidan kapasite düzeyinin tedavi öncesinde akut İTP'da kronik İTP'ya göre daha düşük olduğu, fakat tedavi ile akut İTP'da kronik İTP'ya göre çok daha yüksek değerlere ulaştığı gözlenmiş. Oksidatif stres indeksi ise kronik İTP'da akut İTP'ya göre hem tedavi öncesi hem de sonrasında belirgin olarak yüksek olup tedavi ile akut İTP'da kronik İTP'ya göre belirgin azalmıştır. Tanı anında yüksek OSİ saptanan olgularda hastalığın kronik seyir gösterebileceği vurgulanmıştır (8). Bu çalışma ile oksidatif stresin İTP mekanizmasında rol alabileceği düşünülmüştür.

Viral veya bakteriyel antijenlerle trombosit antijenleri arasındaki moleküler benzerliğin, otoantikör üretimini başlattığı düşünülmektedir (50-53). İdiyopatik trombositopenik purpuranın oluşumunda self-antijen tanımda ve toleransta bozukluk, Th1/Th2 sitokin profilinin değişmesi, anormal hücre yüzey moleküllerinin bulunması, hücresel sitotoksitede ve megakaryosit üretiminde bozukluk gibi multidisfonksiyonel mekanizmaların rolü üzerinde durulmaktadır. Bu mekanizmalardan biri olan moleküler taklitçilik farklı genler tarafından üretilen,

benzer yapıyı paylaşan molekülleri tanımlamak için kullanılmaktadır (54). Bakteriler ya da virüsler hücrel hasar oluşturarak kendi antijenlerini salarlar. Bu antijenler benzer ancak genetik olarak farklı olan konak antijenleri ile çapraz reaksiyona girerek immun yanıt oluştururlar (55). Örnek olarak çocuklarda görülen suçiçeğine bağlı İTP’da normal trombosit antijenleri ile virüse spesifik antikolar arasındaki çapraz reaksiyona bağlı trombosit yıkımı meydana gelebilir (56). Bazen çapraz reaksiyon indüksiyonu, devam eden bir ajana ihtiyaç duymaz ve immun hasar immunojen kaybolduktan sonra da devam eder. Bu belki de akut İTP’lı çocukların neden sadece az bir kısmında kronikleşmeye gidildiğini açıklayabilir. Kronik İTP’da de viral infeksiyon tetikleyici faktör olabilir. Ancak viral infeksiyon asemptomatiktir ya da tanınmamıştır (54).

Otoimmun hastalıkların, santral ve/veya periferik tolerans indüksiyon mekanizmasının eksikliğini yansıtan self-reaktif lenfositlerin aktivasyonunda azalma ya da eliminasyonunda bozukluk nedeniyle oluştuğu kabul edilmektedir (57). Timusta santral tolerans seleksiyonu hatalı olabilir ve yüksek afiniteli otreaktif T hücrelerin salınımına neden olabilir. Ayrıca bir self-antijeni taklit eden çevresel ajan periferik tolerans mekanizmasını kırabilir (54). İdiyopatik trombositopenik purpurada, B lenfositler tarafından üretilen antikolar trombositlerdeki self-antijenleri tanıyarak trombositlerin fagositozuna yol açarlar. Bazı çalışmalarda T hücrelerinden salınan interlökin 2 (IL-2), interlökin 10 (IL-10), Interferon γ (IFN γ) gibi proinflatuar sitokinlerin serum düzeylerinin arttığı ve anti-inflatuar sitokin olan interlökin 4 (IL-4) düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (54,58-60). Aktif hastalıkta Th1 sitokin profili olan IL-2, IL-10 ve IFN γ artışı görülürken, remisyonda Th2 profilini gösteren IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-13’ün azaldığı saptanmıştır (61).

Megakaryositler matürasyon sürecinde yüzeylerinde GpIIb-IIIa ve GpIb-IX eksprese ederler ve megakaryositlere bağlanan otoantikolar megakaryositopoezi inhibe ederek trombosit üretimini de etkilerler (50,54,61). İdiyopatik trombositopenik purpura tanısı alan birçok olguda kompensatuar artmış trombosit üretimini gösteren tipik kemik iliği bulgusu olan normal ya da artmış sayıda megakaryosit prekürsörleri saptanır (50). Trombopoetin düzeyleri trombosit üretim bozukluklarında yüksek bulunurken, İTP’da normal ya da hafif artmış trombopoetin düzeyleri bulunur (62,63).

1.3.3. İdiyopatik Trombositopenik Purpurada Genetik

İdiyopatik trombositopenik purpura, bazı etnik gruplarda ve HLA-DRw2 ile DRB1-0410 allellerinin sıklığı ile birlikte saptanmıştır. HLA-DR4 varlığı kortikosteroidlere iyi yanıtı, DRB1-0410 varlığı ise kortikosteroidlere kötü yanıtı gösterir. HLA-DRB1-1501 varlığı ile splenektomiye kötü yanıtın ilişkili olduğu gösterilmiştir (64).

İdiyopatik trombositopenik purpura gelişiminde fagositlerdeki Fc reseptör polimorfizmi etkili olabilir (19). Üç tip Fc reseptörü vardır. FcRII grubu üç gen (IIA, IIB, IIC) ve FcRIII grubu ise iki gen (IIIA, IIIB) tarafından kodlanır. Genetik polimorfizmler immunoglobulin bağlayan reseptörlerin affinitelerini değiştirmektedir. FcγRIIIA polimorfizmleri ile tedaviye yanıtın ilişkili olduğu öne sürülmüştür (65). İnsan trombosit antijenleri (HPA) ile yapılan çalışmalarda, HPA-5b alleli taşıyanların; akut İTP için artmış risk taşıdıkları gösterilmiştir (66).

1.3.4. Klinik Bulgular

İdiyopatik trombositopenik purpuralı çocuklarda görülen klasik klinik tablo, daha önce sağlıklı olan çocukta aniden ortaya çıkan peteşi ve purpuralardır. Bulgular tamamen trombositopeniye bağlı gelişen kanamalardır. Deride peteşi, purpura ve ekimozların yanında burun kanaması ve ağız içi mukoza kanaması görülebilir. Vücudun herhangi bir yerinde hematoma görülmesi nadirdir. Kanamaya ait bulgular trombositopeni derecesine bağlıdır (20,32,43).

Peteşi ve purpura dışında fizik muayene normaldir, dalak büyüklüğüne ise nadiren rastlanır. Karaciğer ve dalak büyüklüğü ile belirgin lenf nodu anomalileri bulgularının varlığında başka hastalıklar düşünülmelidir (2,20).

İdiyopatik trombositopenik purpura tanısı alan olguların %50-80'inde geçirilmiş viral enfeksiyon öyküsü mevcuttur. Enfeksiyon sonrası latent dönem ortalama 2 hafta kadar sürer. Ancak birkaç gün ile 6 hafta arasında da değişebilir (67). En sık neden etkeni belirli olmayan üst solunum yolu enfeksiyonlarıdır. Vakaların %20'sinde belirli bir etken (kızamık, suçiçeği, kabakulak, hepatit A-B-C, enfeksiyöz mononükleoz, sitomegalovirüs, parvovirüs enfeksiyonları ve bakteriyel enfeksiyonlar) saptanabilir (18). Kızamık, kabakulak, kızamıkçık (MMR) aşısından sonra genellikle 6 ay içerisinde İTP meydana gelme riski 1/24.000 dozdur (68).

Çocuklarda İTP tanısı koyarken öykü ve fizik muayenede dikkat edilmesi gereken bazı hususlar vardır. Kanama semptomları; kanama tipi, kanama derecesi, kanama süresi ve kanamanın durdurulması için yapılan invaziv girişimler sorgulanmalıdır. Sistemik semptomlar; yakın zamanda geçirilmiş viral enfeksiyon, kızamık, kabakulak, suçiçeği gibi spesifik enfeksiyon ve immun yetmezlik düşündüren tekrarlayan enfeksiyon öyküleri ile otoimmun hastalık semptomları sorgulanmalıdır. Yakın zamanda canlı virus aşısı yapıp yapılmadığı, kanamayı arttıran aspirin, trombositopeni yapan sülfonamidler ve heparin gibi ilaçların kullanımı, annede HIV enfeksiyonu olması, ailede trombositopeni ya da hematolojik hastalık öyküsü, travmatik aktiviteler, altı aydan küçük çocuklarda perinatal ve maternal öykü sorgulanmalıdır. Fizik muayenede kanama bulguları, enfeksiyona ait bulgular, hepatomegali, splenomegali, lenfadenopati, iskelet sistemi yapısal anomalilerin varlığı araştırılmalıdır (69). İdiyopatik trombositopenik purpuranın otoimmun hastalıklara eşlik etmesi çocuklarda erişkine kıyasla nadirdir. Akut İTP'nin otoimmun hastalıklarla birlikteliği nadiren gözlenirken, kronik İTP'nin otoimmun hastalıklarla birlikteliği sık gözlenir (18,67).

İdiyopatik trombositopenik purpurada görülen ekimoz ve peteşiler en sık alt ekstremitelerin ön yüzlerinde ve kostalar, skapula, omuzlar, bacaklar, pubik bölge gibi çıkıntılı kemikler üzerinde görülür. Peteşiler subkonjunktiva, yanak mukozası ve yumuşak damakta bulunabilir. Burun kanaması, diş eti kanaması, gastrointestinal kanamalar (melena, hematemez) ve genitoüriner sistem kanamaları (hematüri, menoraji) görülebilir. Retinal kanamalar, orta kulak kanamaları, intramusküler enjeksiyon ve travma sonrası derin kas içi hematoma ya da hemartroz sık görülmemektedir (18). Hastaların %50-75'i hafif kanama bulguları ile başvurur. İmmun trombositopenik purpurada çok düşük trombosit sayılarına rağmen lösemi, aplastik anemi gibi kemik iliğini tutan durumlara ya da kemoterapi alan hastalara kıyasla daha hafif kanamaların görülmesi, İTP'da trombositlerin daha genç, büyük ve hemostatik olarak daha etkili olmasına ve kemik iliği rezervinin mükemmel olmasına bağlanmıştır (19,41,70,71).

Kanama bulgularının sınıflandırılması için sıklıkla kuru ve yaş purpura terimleri kullanılmıştır. Kuru purpura sadece deri kanamalarını, yaş purpura ise aktif mukoza kanamalarını tanımlamaktadır. Ancak bu tanımlamalar ile birkaç peteşisi

olan çocuk ile yaygın peteşi ve ekimozları olan çocuğu ya da hafif burun kanaması olan çocuk ile ağır kanaması olan çocuğu ayırt etmek mümkün olamadığı için klinik kullanımda yararlı değildirler (70,71)

Kanama riskini arttıran nedenler arasında; trombosit sayısının $<20.000/\text{mm}^3$ olması, fizik aktivite düzeyi fazlalığı, travma, vasküler frajilite, ilaç kullanımı, eşlik eden diğer hastalıklar (von Willebrand hastalığı, vaskülitler, arteriovenöz malformasyonlar, ateş, anemi) sayılmaktadır. Boyun üzerindeki peteşiler, fundal hemorajiler ve kanamanın aniden başlaması hayatı tehdit eden kanamaların uyarıcı bulguları olarak kabul edilmektedir (70,71).

İdiyopatik trombositopenik purpurada kanama bulguları dışında fizik muayene normaldir. Ağır kanama yoksa solukluk görülmez. Olguların %10'da dalak ucu palpe edilebilir. Eğer belirgin splenomegali saptanırsa lösemi, SLE, enfeksiyöz mononükleoz, hipersplenizm gibi diğer tanıların düşünülmesi gerekir. İzole servikal lenfadenopatinin enfeksiyon hastalıklarına bağlı olabileceğini, yaygın lenfadenopati varsa lösemi tanısının dışlanması gerektiği göz önüne alınmalıdır (18,19).

1.3.5. Tanı ve Laboratuvar Bulguları

Tam kan sayımında trombositopeniye bağlı önemli bir kanama olmadıkça hemoglobin ve hematokrit değeri ile beyaz küre sayısı normaldir. Periferik yaymada anormal hücre morfolojisi yoktur. Normal trombosit sayısı $150-450 \times 10^3/\text{L}$ arasında değişir. İmmün trombositopenik purpurada trombosit sayısı $150 \times 10^3/\text{L}$ 'nin altındadır. Trombosit boyutları normal veya artmıştır (2,20). Kan dolaşımında bulunan antitrombosit antikorların ölçülmesinin tanı ve tedavide yeri yoktur (40). Kemik iliği incelemesi genellikle gerekli değildir. Ancak steroid tedavisi başlanacaksa lösemiye ayırt etmek amacıyla öncelikle kemik iliği aspirasyonu yapılmalıdır. Down sendromu olan çocuklarda megakaryoblastik lösemi kendisini trombositopeni ile gösterebileceğinden bu durumda kemik iliği aspirasyonu yapılmalıdır (73).

Kemik iliği incelemesinde granülositik ve eritroid seri hücreleri normal, megakaryositler ise normal veya artmıştır. Kemik iliğinde olgunlaşmamış megakaryositlerin görülmesi trombosit yıkımının lehine değerlendirilir (2). Periferik yayma megatrombositleri, psödotrombositopeniyi ve diğer hemotolojik bozuklukları ayırt etmek için ayrıntılı incelenmelidir (18).

Ortalama trombosit volümü (MPV) normal veya artmış bulunur. Hemostatik olarak daha aktif olan genç ve büyük trombositlere göre; yaşlı, küçük ve etkisiz trombositleri yansıtan düşük MPV değerinin <8 fl olmasının; kanama riski ve sıklığında artış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu da kanama riskinin önceden belirlenmesinde yardımcı olabileceğini düşündürmektedir (74).

Koagülasyon ile ilgili yapılan testlerde ise kanama zamanı uzamış bulunur. Protrombin zamanı (PT), parsiyel tromboplastin zamanı (PTT) ve fibrinojen düzeyleri normaldir. Bazı klinisyenler trombositlerin düştüğü, PT ve PTT'nın uzadığı yaygın damar içi pıhtılaşmasını ayırt etmek için bu testlere başvurumaktadırlar (75). Ancak klinik olarak bu çocuklar altta yatan hastalığa bağlı olarak hasta görünümlü olduklarından ve ek bulgularının olması nedeniyle İTP'da bu testlere gerek yoktur. Trombosit yaşam süresi Cr51 ile işaretlenmiş trombositlerin yaşam sürelerinin 1-4 saate kadar kısaldığı gösterilmiştir (18). Antinükleer antikor (ANA), anti-ds-DNA, coombs testi, karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri, monospot ve/veya EBV, HIV ve parvovirüs titreleri klinik olarak gerekli ise yapılmalıdır (2).

İdiyopatik trombositopenik purpura tanısı hikaye, fizik muayene, tam kan sayımı ve periferik kan yayması ile trombositopeninin diğer nedenlerinin ayırt edilmesi ile konulur. Hikaye, fizik muayene ve kan sayımı İTP ile uyumlu olan, atipik bulguların bulunmadığı veya diğer etyolojileri düşündürmeyen bulguların varlığında ileri tetkiklere gerek yoktur (2,20).

1.3.6. Ayırıcı Tanı

Çocuklarda trombositopeninin ayırıcı tanısı hasta yaklaşımını ve seçilecek tedaviyi etkileyeceğinden önemlidir (19). Eritrositer veya lökositler seride anormallik olduğunda malignansiyi ayırt etmek amacıyla kemik iliği aspirasyonu mutlaka yapılmalıdır. Evans sendromu, ilaca bağlı trombositopeni, portal hipertansiyon, hipersplenizm, portal ven trombozu, kronik karaciğer hastalığı, fankoni aplastik anemisi, dissemine intravasküler koagülopati, infeksiyonlar, SLE, hemolitik üremik sendrom ve transfüzyon sonrası purpura ayırıcı tanıda düşünülmelidir. Bebeklerde doğumsal amegakaryositik trombositopeni ve Wiskott-Aldrich sendromu ayırıcı tanıda akla gelmelidir. Daha büyük çocuklarda ise SLE ve lenfoma ayırıcı tanıda düşünülmelidir (2,20).

İlaçlardan bir kısmı trombositopeniye neden olabilmektedir, bunlar aşağıda sıralanmıştır (9).

a) Antibiotikler: Penisilinler, sefalosporinler, sulfonamidler, amfoterisin B, gentamisin, vankomisin, flukonazol, siprofloksasin, pentamidin, novobiosin, antitüberküloz ilaçlar

b) Antiinflamatuvar ilaçlar: Asetaminofen, diklofenak, ibuprofen, indometasin, asetil salisilik asit, meklofenat, mefenamik asit, sulfasalazin, fenilbutazon, naproksen

c) Antineoplastik ilaçlar : Aktinomisin D , aminoglutetimid

d) Antikonvülsanlar, sedatif ilaçlar ve antidepresanlar : Fenitoin, valproik asit, lityum, diazepam, karbamazepin, mianserin, haloperidol

e) Antihipertansifler ve kardiyak ilaçlar : Asetazolamid , amiodaron , kaptopril, metil dopa, hidroklorotiazid, klorotiazid, digoksin, digitoksin, furosemid, klortalidon, prokainamid, spiranolakton

f) H₂ reseptör antagonistleri: Simetidin, ranitidin.

g) Diğer: Heparin, minoksidil, desferrioksamin, etretinat, interferon- α , klorfeniramin, kinin, kinidin, danazol antazolin, klorpropamid, iyotlu kontrast ajanlar, altın tuzları, levamisol, lidokain, morfin, papaverin, tiklopidin, glibenklamid, isotretinoin.

1.3.7. Tedavi

Çocuklarda İTP'da tedavi verilmesinin amacı hayatı tehdit eden santral sinir sistemi kanamasını önlemek ve major kanama ya da uzamış kanamanın neden olacağı kan kaybı riskini azaltmaktır (2,19). Tedavi protokollerinden herhangi birinin kanamayı önlediğine ya da hastalığın seyrini etkilediğine dair kanıt bulunmamasıyla beraber tedavisi halen tartışmalıdır (40,43,51). Tedavinin hastalığı, uzun ya da kısa süreli prognozunu etkileyeceğini gösteren çalışmalar yoktur. Hastalığın kendi kendini sınırladığı bilinmektedir. Tedavi ile birlikte kronikleşme oranı değişmemektedir. Hayatı tehdit eden intrakranial kanama %1'in altında görülmektedir. Hayatı tehdit eden kanama riskini tahmin etmek için herhangi bir klinik bulgu ya da laboratuvar testi olmadığı için hekim, anne ve baba major kanama riskinden dolayı yüksek doz metil prednizolon (MP), intravenöz immunglobulin (İVİG), anti-D immunglobulin ve splenektomi gibi farmakolojik ve cerrahi tedavi yöntemlerinden birini tercih etmektedir (3,76). Trombosit sayısı $>20.000/\text{mm}^3$ ve

semptomsuz ya da minör purpurası olan hastalarda tedavinin gerekli olmadığı bildirilmektedir. Bu hastalar tedavi almasalar da yakından izlenmelidirler. Trombositopeniyi ve buna bağlı kanamayı ağırlaştırabilecek asetilsalisilik asit ve diğer pıhtılaşmayı önleyecek olan ilaçların alımı önlenmeli, fiziksel aktivite kısıtlanmalı, travmaya maruz kalmamalı ve kas içi enjeksiyonlardan kaçınılmalıdır (77).

Çocukluk çağı İTP’ında başlangıç tedavisi olarak yüksek doz MP veya İVİG tercih edilir. Tedavide başarı oranlarında fark olmadığından yapılan tercih, maliyetler ve yan etkiler zemininde değerlendirilmelidir. Yüksek doz steroid ile İVİG’in eşit derecede etkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır. İntravenöz immünglobulin tedavisi trombosit sayısında hızlı artmaya neden olur (78). İntravenöz immünglobulin 1 gr/kg/gün’den 2 gün alacak şekilde kullanılır (2). İntravenöz immünglobulin retiküloendotelial sistem (RES)’de kompetitif inhibisyona neden olmaktadır. Buna göre immünglobulin eritrositlere bağlanmakta ve makrofajlar bu eritrositlerin fagositozu ile satüre oldukları için veya intravenöz immünglobulin direkt olarak makrofajların Fc reseptörlerini bloke ederek, trombositlerin parçalanması azalmakta, böylece medikal splenektomi gerçekleşmektedir (67). Fiyatının yüksek olması kullanımdaki dezavantajlardan biridir. İntravenöz immünglobulinin infüzyonundan sonra Ig A eksikliği olan hastalarda anafilaksi, hastaların %20’sinde görülebilen infüzyon sonrası aseptik menenjit, baş ağrısı ve kusma, hastaların %1-3’ünde ateş ve soğuk algınlığı benzeri bulgular, coombs (+) hemolitik anemi, böbrek yetmezliği, immün kompleks artriti, koagülopati ve tromboembolik olaylar görülebilir. Hepatit C virus enfeksiyonu riski de bulunmaktadır (2,3,20,79,80).

Yüksek doz MP tedavisi 30 mg/kg/gün’den 3 gün, 20 mg/kg/gün’den 4 gün ağız yoluyla verilmektedir (81-83). Steroidler kapiler endotel geçirgenliğini azaltıp kanama zamanının kısalmasını sağlarlar. Antikorlarla kaplanmış trombositlerin RES’de fagositozunu engelleyerek trombosit yaşam süresini uzatırlar. Antijen antikor birleşimini yavaşlatır ve antitrombosit antikor yapımını azaltırlar (67). Steroid kullanan çocuklarda yorgunluk, sinirlilik, baş ağrısı, katarakt, uykusuzluk, irritabilite, kilo alımı, akne, kan basıncında yükselme, kan şekerinde yükselme ve epigastrik ağrı gibi yan etkiler rapor edilmiştir (80-83). İntravenöz immünglobulin

ve/veya yüksek doz MP'a cevap vermeyen hastalarda kanama semptomları yoksa ilaçsız izleme alınır. Kanama ve yaygın peteşi halinde aralıklı yüksek doz MP ve İVİG tedavileri yeterli bir koruyucu etkinlik sağlar (40).

Anti-D tedavisi akut veya kronik İTP'lı hastaların %80'inde trombosit sayısını arttırdığı ancak, bu etkinin geçici olduğu ve en fazla 5 hafta kadar sürdüğü bildirilmektedir (84,85). Etki mekanizmasında RES'de Fc reseptör blokajı, inhibitör yolların aktivasyonu, otoantikörleri yapan B lenfositleri baskılayarak otoantikör üretiminde azalma ve otoantikörleri bağlayarak otoantikörleri etkisiz hale getirme şeklinde sıralanabilir (9,10,33,44) Sadece Rh (+) hastalarda ve fonksiyonel olarak dalağı olanlarda kullanılabilir. Daha ucuz olması ve kısa sürede uygulanması avantajlarındanır. En önemli yan etkisi alloimmun hemolize neden olmasıdır. Tüm Rh pozitif olgularda anti-D verilmesi ile 1-2 hafta süren direkt coombs pozitifliği oluşur. Hemogloblin düzeyini 0.5-2 gr/dl azaltabilir. Diğer yan etkileri ateş, titreme, hipersensitivite ve baş ağrısı olarak sıralanabilir. Diğer tedavi seçeneklerine yanıt alınamadığı durumlarda, vakalarda hemoliz açısından dikkatli olarak kullanılabilir (18,85,86).

Diğer tedavi seçenekleri çocuklarda nadiren kullanılmaktadır. Steroid ve İVİG tedavisine yanıt alınamayan, splenektominin kontrendike olduğu, kanama semptomlarının eşlik ettiği refrakter trombositopenide bu tedavi seçenekleri düşünülebilir. Bu ilaçlar arasında vinka alkaloidleri (vinkristin, vinblastin), danazol, siklofosfamid, azatiopürin, siklosporin, kolşisin ve rituksimab sayılabilir (19). Vinka alkaloidleri, trombositlerin mikrotubullerine bağlanır ve oluşan kompleksin makrofajlar tarafından fagosite edilemez. Vinkristin 1.5 mg/m² intravenöz (İV) (maksimum 2 mg), vinblastin ise 6 mg/m² İV (maksimum 10 mg) 1 ay boyunca haftada tek doz verilir (3,19). Tedaviye cevap alınamaz ise kesilir. Cevap alınırsa güvenli trombosit sayısını devam ettirmek için 2-3 haftada bir doz tekrarı gerekir. Periferik nöropati, alopesi, konstipasyon, myelosupresyon (vinblastin ile doza bağımlı) ve flebit gibi yan etkiler görülebilir (18,19).

Siklofosfamid immunsupresif bir ilaç olup 1-2 mg/kg/gün oral kullanılır. Tedavi başlanmasıyla 2-10 hafta sonra yanıt gelişir. Yan etki olarak myelosüpresyon, alopesi, hemorajik sistit ve hepatotoksisite görülebilir. Siklosporin T hücre fonksiyonlarını baskılamaktadır. Tedavi dozu olarak 5 mg/kg/gün oral verilir. Bir

ayda yanıt alınamazsa kesilir. Yan etki olarak hipertansiyon, nefrotoksisite ve hepatotoksisite görülebilir (2,18,19).

Rituksimab B hücre yüzey antijeni olan CD 20'ye karşı oluşmuş monoklonal antikordur. 375 mg/m²/hafta İV 4 hafta verilir. Ateş, titreme, baş ağrısı, bulantı, kusma, hipotansiyon, sinüs taşikardisi, likenoid ve vezikülobüllöz dermatit, toksik epidermal nekroliz, Steven-Johnson sendromu ve immunsupresyon görülebilen yan etkiler arasında sayılabilir (18).

İmmun trombositopenik purpurada diğer bir tedavi seçeneği splenektomidir. Splenektomi ile antitrombosit antikorların yapıldığı ve RES tarafından trombositlerin yıkıldığı organ ortadan kaldırılmış olur. Erişkinlere oranla spontan remisyonun sık görülmesi ve özellikle 5 yaşın altında splenektomiden sonra kapsüllü mikroorganizmalarla sepsis riskinin yüksek olması nedeniyle çocuklarda daha az sıklıkta uygulanmaktadır (18).

Çocukluk çağı İTP'sı kronikleşse dahi seneler içinde düzelebildiğinden splenektomi kanama semptomları sıklığı artmadıkça ergenlik çağına kadar ertelenmelidir Splenektomi ile hastaların 2/3'ünde trombositopeni düzelebilir. Dört yaşından büyük çocuklarda bir yıldan uzun süre devam eden şiddetli İTP varsa ve kanamalar medikal tedavi ile kontrol altına alınamazsa ya da akut İTP sırasında İVİG, steroid ve trombosit transfüzyonuna rağmen intrakraniyal kanama varsa splenektomi yapılmalıdır (40).

1.3.8. Komplikasyonlar

İmmun trombositopenik purpuranın en çok korkulan komplikasyonu intrakraniyal kanamadır. Sıklığı %0.1-0.5 arasında değişmektedir (18,19). İntrakraniyal kanaması olan hastaların %73'ünde trombosit sayısı <10.000/mm³ ve %25'inde 10-20.000/mm³ arasında olduğu saptanmıştır. İntrakraniyal kanama vakaların çoğunluğunda (%51) tanıdan sonraki ilk 4 hafta içinde meydana geldiği görülmüştür (18,70,71). Kanama olgularının %77'sinde intraserebral (%87 supratentorial, %13 posterior fossada) kanama, %23'ünde ise subdural hematoma görülür. İntrakraniyal kanama gelişimi için trombosit sayısı <20.000/mm³ olması yanında olguların çoğunluğunda kafa travması (%29), aspirin tedavisi (%5) ve arteriovenöz malformasyon (%17) gibi eşlik eden risk faktörlerinin bulunduğu saptanmıştır (18,19).

1.4.NİTRİK OKSİT

Nitrik oksit, siklik guanozin monofosfat üzerinden etki gösteren potent bir periferik vasküler düz kas gevşetici olarak 1979'da tanımlanmıştır (86). Nitrik oksit, hem hücre içi hem de hücre dışında düzenleyici işlev gören küçük, reaktif bir serbest radikal moleküldür. Endotel, trombosit, vasküler düz kas hücresi ve nöronlardan salınır. Yarı ömrü 2-5 saniye olup parakrin ve otokoid olarak fonksiyon görmek üzere hücre zarından serbestçe geçen bir nörotransmitterdir. Özellikle dolaşım sistemi açısından NO'nin vazodilatör etki gösterdiği, bölgesel kan akımını ve sistemik kan basıncını düzenlediği, endotele yönelik olarak da ateroskleroza önleyici etki yaptığı bilinmektedir (11,12).

Oksidatif stres, serbest radikal (prooksidan) ile antioksidan sistem arasındaki dengenin prooksidasyon lehine bozulması olarak tanımlanır. Oksidatif stres terimi, potansiyel olarak hücresel travma oluşturabilecek serbest radikaller ve diğer reaktif moleküllerin üretimini sağlayan birkaç kimyasal reaksiyonu tanımlamak için kullanılır (16). Prooksidan/antioksidan dengenin bozulması DNA gibi hücresel moleküllerde oksidatif hasara neden olan bir faktör olarak da düşünülür. Normal hücre fonksiyonları ve hücre yapılarının bütünlüğü reaktif oksijen ürünleri ile bozulur (17).

Oksidatif stres, yeni doğan döneminde kronik akciğer hastalığı, prematür retinopati, nekrotizan enterokolit, neonatal hemokromatozise, daha büyük çocuklarda ise astma, kistik fibrozis, juvenil romatoid artrit, kolestatik karaciğer hastalıkları, kwasiorkor ve diğer bazı hastalıkların patogenezinde rol oynar. Hastalıkların oksidatif hasar sonucu geliştiği ortaya konulmuştur (88).

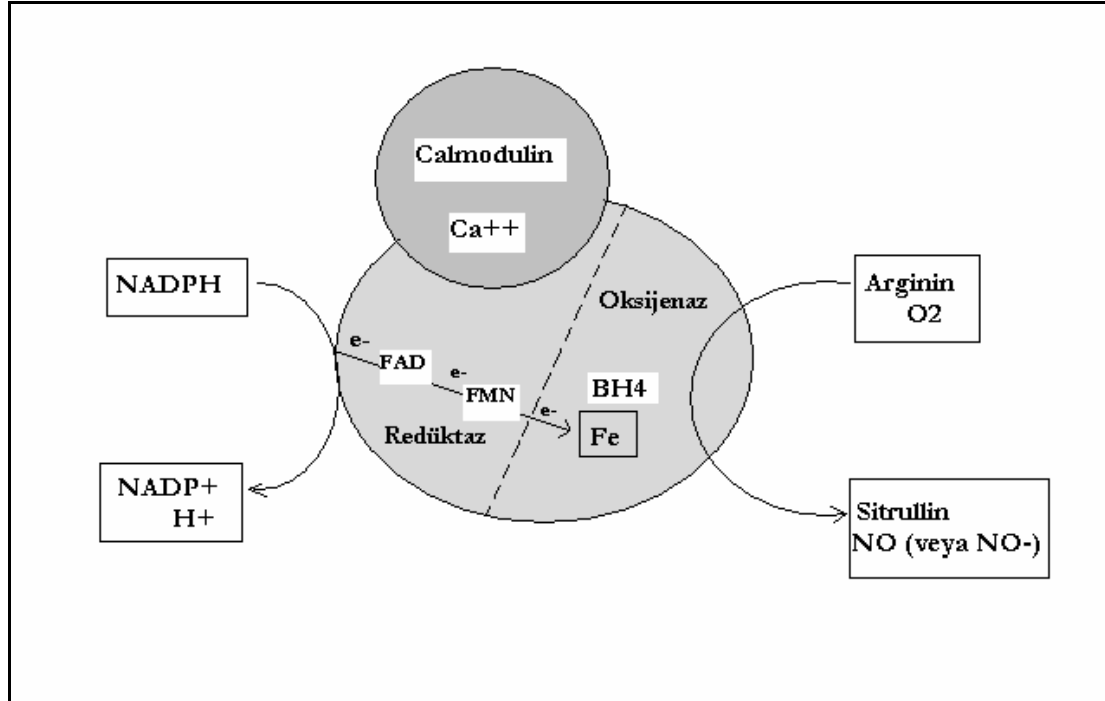
Vücutta birçok dokuda NO sentezlenmektedir. Nitrik oksit endojen L-arjinininden NOS enzim sistemi tarafından sentezlenir. İşlev sonrasında NO hızlı ve kararlı bir şekilde okside edilerek inaktif bileşikler olan nitrit ve nitrat gibi son ürünlere dönüşür. Hemoglobin NO'ı inaktive eder. Nitrik oksitin en önemli fizyolojik hedefi, çözünebilir guanilat siklaz enziminin hem grubudur. Düz kas hücresine geçen NO, guanilat siklazı uyarak, guanozin trifosfatın cGMP'ye dönüşümünü sağlamaktadır. Artan cGMP de protein kinazı ve iyon kanallarını aktif hale dönüştürür. Sekestrasyon ve hücre dışına çıkarılma yolu ile hücre içi kalsiyum

azalır. Bunun sonucu olarak gevşeme sağlanır. cGMP'nin fizyolojik etkisi ise 3'5' bağının fosfodiesteraz enzimi tarafından hidrolize edilmesi ile sonlandırılır (89).

1.5. Nitrik Oksit Sentaz

Nitrik oksit sentaz enzimleri ilk olarak 1989 yılında tanımlanmasından sonra 1991-1994 yıllarında major izoformları ve 1998-1999 yıllarında ise kristal yapıları belirlenmiştir. Nitrik oksit sentaz enzimi L-arginin aminoasidinden guanido grubunun hidroksilasyonu ile NO, L- sitrülün ve NADP oluşumunu katalize eder. Reaksiyonda tetrahidrobiopterin (BH₄, FAD, FMN ve demir protoporfirin IX (hem) kofaktör olarak görev almaktadır (Şekil I) (9).

Şekil I. Nitrik oksit sentazın kofaktörleri ve katalizlediği reaksiyonlar



NADPH tarafından ortama verilen elektronlar redoks taşıyıcıları FAD ve FMN tarafından oksijenaz bölgesine taşınmakta ve burada Fe ve BH₄ ile etkileşime girerek L-arginin ve oksijenden NO ve sitrülün oluşturan reaksiyonu katalizlemektedir (9).

1.5.1. Nitrik Oksit Sentazın Formları

Üç farklı formu vardır. Her üç izoform çeşitli dokularda yaygın olarak bulunmakta fizyolojik ve patolojik olaylarda görev almaktadır. Nitrik oksit sentaz izoformları farklı genler tarafından kodlanmaktadır (Tablo II) (9).

Tablo II. NOS izoformlarını kodlayan genler ve özellikleri (9)

NOS İzoformları	Gen Yapısı ve Büyüklüğü	Kromozomal Yerleşim	Aminoasit Sayısı, Protein Büyüklüğü
nNOS	29 ekzon	12q24.2	1434 aa
	28 intron	12q24.3	161 kDa
	> 200kb		
iNOS	29 ekzon	17 cen-q11.2	1153 aa
	25 intron		131 kDa
	37 kb		
eNOS	26 ekzon	7q35-7q36	1203 aa
	25 intron		133 kDa
	21-22 kb		

1. Nöronal NOS: İlk bulunan formudur. nNOS esas olarak santral sinir sisteminde ve periferik nitrejik sinirlerde bulunmakta nörotransmitter/nöromodülatör olarak görev yapmaktadır (9).

2. İndüklenebilir NOS: İndüklenebilir özelliktedir, hücre ve dokularda yaygın olarak bulunmaktadır. Fizyolojik olarak nonspesifik immünitede görev almasının yanı sıra esas olarak şok durumları, inflamatuvar hastalıklar gibi patolojik olaylarda rol oynamaktadır (9).

3. Endotelial NOS: İlk olarak vasküler endotelial hücrelerde tanımlanmıştır. eNOS kardiyovasküler sistemde vasküler düz kas gevşemesi, damar tonusu, trombosit agregasyonunun inhibe edilmesi gibi fizyolojik olaylarda görev almaktadır (9).

Endotelial NOS ve nöronal NOS; asetilkolin ve bradikinin gibi hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artıran ajanlar tarafından aktiflenir. Makrofajlar ve diğer bağışıklık hücrelerinde bulunan iNOS ise sitokinler ile uyarılır, kalsiyum ve kalmoduline bağımlı değildir ve yeni protein sentezine ihtiyaç duyar (90-92). Nitrik oksit sentazın üzerinde NADPH, FAD, FMN ve tetrahidrobiopterin gibi kofaktörleri ve prostetik grupları bağlamak için birçok düzenleyici bölümü vardır. Hücrede eNOS esas olarak hücre membranına bağlı bulunurken, nNOS sitozolde bulunur. Üç NOS izoformu aminoasit dizilişi bakımından %50 benzerlik gösterir. Nitrik oksit sentaz, N-metil-L-arjinin, N-nitro-L-arjinin ve N-amino-L-arjinin gibi L-arjinin analoglarınca inhibe edilebilir (90-92).

Vücutta NO konsantrasyonu düzenli olarak düşük seviyelerde dalgalanmalar gösterir ve eNOS ve nNOS tarafından kontrol edilir. Bu iki enzimin sentezi posttranskripsiyonel seviyede kontrol edilirken, iNOS uygun uyarı veya nükleer faktör Kappa B (NF-KB) gibi transkripsiyonel faktörlere cevap olarak sentezlenir (93). Bu sentezi temelde tetikleyen, NF-KB'ye cevap veren elemanların iNOS promotor gen bölgesini aktive etmesidir. iNOS, kalsiyum ve uyarıcı ajanlardan bağımsız çalıştığı için, aktivitesi daha uzundur. Bunlara bağlı olarak, iNOS'un ürettiği NO seviyesi, fizyolojik sınırların oldukça üstündedir. Bu durum, hücrel süperoksit anyon ($O_2^{\cdot-}$) varlığında ileri derecede toksik olan peroksinitrit molekülünün oluşmasına neden olur (93,94).

Peroksinitrit oluştuktan sonra gelişen lipid peroksidasyonu, DNA fragmentasyonu, plazma antioksidanlarının azalması, protein hasarı ve endotelial düz kas gevşemesinin engellenmesi gibi nedenlerle hücrel hasar oluşabilir. Peroksinitrit oluşumu; süperoksit ile süperoksit dismutaz (SOD) üretimi ve NO üretimi/harcanması arasındaki dengeye bağlıdır. Sonuç olarak, düşük konsantrasyondaki NO, hücrel fonksiyonları pozitif olarak düzenlerken, yüksek konsantrasyonlarda hücre üzerinde toksik etkiler yaratabilir. Enflamatuvar uyarı ile üretim dışında akciğer epiteli ve böbreğin distal tübülleri gibi yerlerde de devamlı bir

iNOS aktivitesi vardır (94). Pek çok hastalıkta, oksidatif stresin bir sebep mi yoksa primer hastalık sürecinin bir sonucu mu olduğu açık değildir (95).

1.5.2. eNOS: Yapı, Fonksiyon ve Aktivasyon

Endotelyal NOS 134 kD'luk iki benzer monomerden oluşan bir dimerdir ve fonksiyonel olabilmesi için dimerik formda olması gerekir. Monomerleri kodlayan gen 7q35-36 kromozomu üzerinde bulunur. eNOS geni 26 ekson içerir ve yaklaşık olarak 21 kilobazlık genomik DNA'dan oluşur. Endotelyal NOS geninin kodladığı mRNA 4052 nükleotid içerir ve haploid genomda tek kopya olarak bulunur. Endotelyal NOS hem in vivo hem de in vitro şartlarda sürekli sentez edilen tek NOS izoformudur. Enzimin dimerik hale gelmesi, hem molekülünün bağlanması ile başlar; hem'in yokluğunda enzim monomer halde kalır. Dimerik hale geçince enzime tetrahidrobiopterin (BH₄) bağlanması mümkün olur ve dimer kararlı hale gelir. Kararlı hale geçiş aynı zamanda çinko iyonlarına da bağlıdır (92,96).

Dimerin fonksiyonel aktivitesi, bağlanan BH₄ molekülünün sayısına bağlıdır. BH₄ bağlanmamış bir dimer O₂ üretebilirken, bir BH₄ molekülü bağlanmış eNOS dimeri hem O₂ hem de NO üretmektedir. Yüksek seviyede BH₄ varlığı ise doymuş bir dimer yaratarak sadece NO sentezleyen bir enzim oluşmasını sağlar (93,96-99).

Monomerlerin fonksiyonel olarak farklı olan iki kısmı vardır. Katalitik bölümü ihtiva eden N-terminal oksijenaz (amino asit 1-491) ve NADPH, FAD ve FMN bağlanma bölümlerinin bulunduğu redüktazdır (amino asit 492-1205). Enzimin hücre içindeki yeri net olarak belirsizdir. Golgi cisimciği, plazma membranı ve en çok da plazmalemmal kaveolada bulunduğu tespit edilmiştir. Kaveolada kaveolin adlı kaplayıcı proteinle sarılı olan eNOS inaktif haldedir. Hücre içi serbest kalsiyumun artması ile enzim bu proteinden sıyrılır ve aktif hale gelir ve serbest kalsiyum düzeyi düşene kadar aktif kalır. Aktive olmuş enzim ortamdaki L-arjinin, oksijen ve NADPH'dan oldukça fazla NO üretimi yapar. Her ne kadar eNOS enzimi bazal bir düzeyde üretilse de hipoksi, östrojen gibi hormonlar, yükseltgenmiş düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) ve mekanik güç gibi faktörler ekspresyonu artırabilir. Glukokortikoidler, tümör nekrozis faktörü α ve bakteriyel lipopolisakkaritler ise eNOS'un aktivitesini azaltırlar (93,96-99).

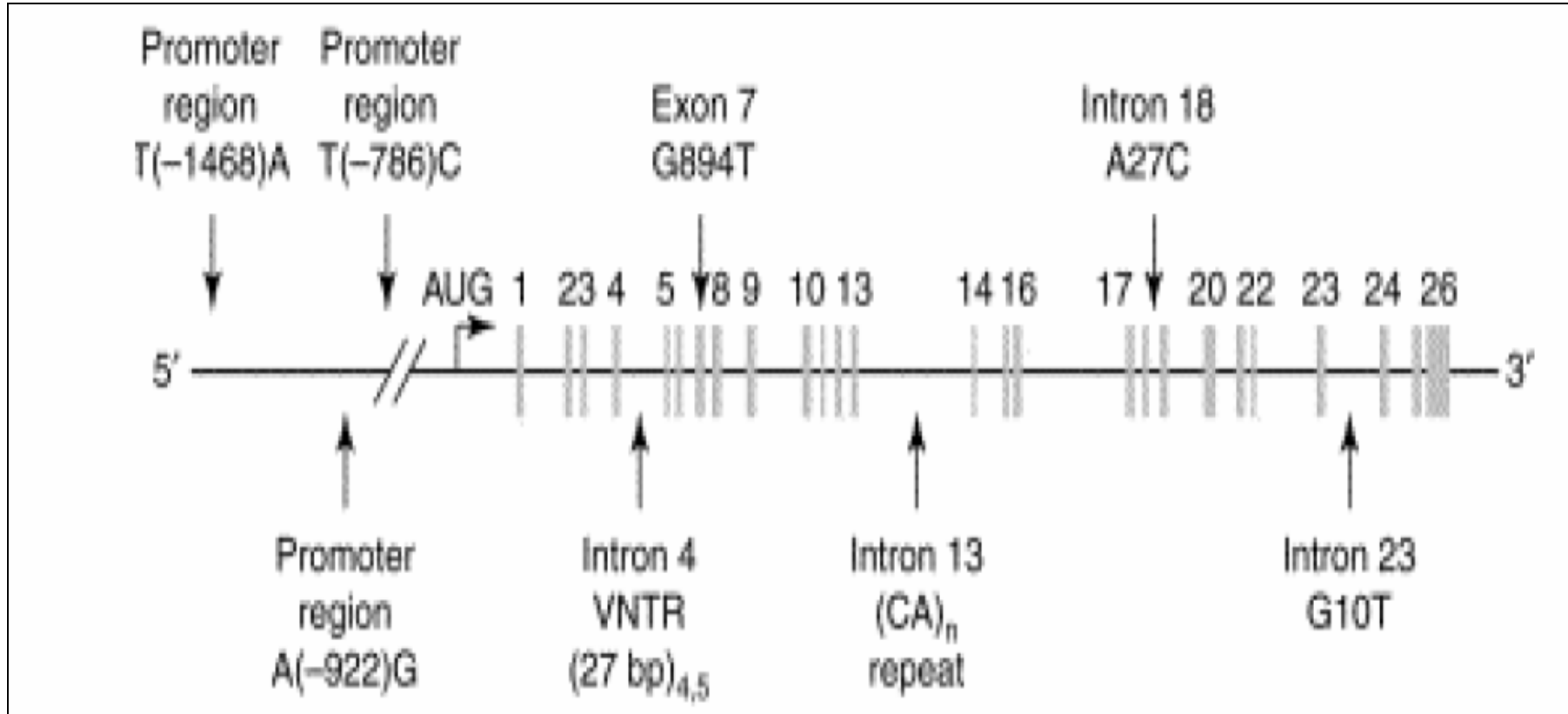
1.5.3. eNOS Gen Polimorfizmleri

Aynı tür organizmalar genellikle birbirinden farklı fenotip gösterirler. Bir çok gen lokusunda iki allel yer alır. Mutasyonların fenotipe farklı yansımalarının nedeni çoklu allel varlığındandır. Genetik polimorfizm, bir popülasyonda farklı allellere bağlı, genetik olarak belirlenmiş iki ya da daha çok alternatif fenotipin görülmesidir. Çoklu allel içeren bir bölge polimorfiktir. Bir gen veya DNA dizisinin alternatif formlarından (allel) birinin toplumda %1'den fazla bulunduğu durumlar polimorfizm olarak adlandırılmaktadır. eNOS geninde bugüne kadar tanımlanmış olan yaklaşık 161 tek nükleotid polimorfizmi (TNP) bulunmasına rağmen fonksiyonel önemi olan polimorfizmler (Şekil II) şunlardır:

- İtron 4, 27 bp'lik variable number tandem repeat (VNTR) (4b/4a)
- Ekson 7, missense Glu298Asp
- İtron 13, CA repeat
- İtron 18, Ala27Cys (A-C nükleotid değişimi, TNP)
- İtron 23, Gly10Thr (G-T nükleotid değişimi, TNP)
- Promotor bölgesinde 3 tane TNP tanımlanmıştır. Thr786Cys, Ala922Gly, Thr1468Ala (13).

Bunların sonucunda normal fonksiyonel bir enzim oluşsa da polimorfizmler transkripsiyon işlev ve hızlarında değişime sebep olabilmektedir. Örneğin intronda 13'de polimorfizmi olan bireylerde artmış koroner arter hastalığı riski olduğu, intron 4'de polimorfizmi olan bireylerde ise artmış diyabetik nefropati riski olduğu saptanmıştır (100,101).

Otoimmün hastalıkların eNOS gen polimorfizmi ile ilişkili olduğuna dair çalışmalar vardır. Sistemik lupus eritematozus tanılı olgularda yapılan bir çalışmada eNOS gen polimorfizm varlığının SLE ve otoimmün hastalıklara yatkınlığı arttırdığı belirlenmiştir (14). Romatoid artrit ve SLE tanılı olgularda yapılan geniş popülasyonlu bir çalışmada ise eNOS gen polimorfizmin varlığının hastalığa bağlı gelişen glomerulonefrit oluşumunu belirgin arttırdığı gösterilerek eNOS gen polimorfizmin varlığının hastalığın seyrinde olumsuz etkilerinin bulunduğu belirtilmiştir (15).



Şekil II. eNOS gen polimorfizmleri (13) (ekzon 7'de bulunan Glu298Asp polimorfizmi G894T polimorfizmi olarakta adlandırılmaktadır.)

1.5.4. eNOS geni Glu298Asp polimorfizmi

Endotelyal nitrik oksit sentaz geninde bulunan diğ er bir polimorfizmde ekson 7'nin açık okuma bölümünde Glu298Asp değişimi olarak saptanmıştır. Bu polimorfizmin sonucunda proteinin primer yapısında ve fonksiyonunda değişim olur. Bazı çalışmalarda, bu polimorfizmin hipertansiyon, koroner arter hastalığı ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (102,103). Bu polimorfizm protein dizisinde değişiklik yapan tek polimorfizmdir. Proteinin primer yapısını bozarak, enzimde fonksiyonel değişiklikler oluşturmaktadır. eNOS geni 7. eksonunda Guanin (G) nükleotidinin Timin (T) ile yer değiştirmesi enzim yapısında 298 numaralı glutamat'ın (Glu) aspartat'a (Asp) dönüşmesine neden olmaktadır. Bu polimorfizm ile eNOS geninde 100 kDa ve 35 kDa ürünler ve sonuçta parçalanmaya eğilimli protein ürünleri oluşmaktadır. Yani bu polimorfizm eNOS proteininde fonksiyonel etki oluşturmaktadır (13).

Endotelyal NOS gen polimorfizmleri ile çeşitli hastalıklar arasında ilişki olup olmadığı farklı hastalık gruplarında çalışılmıştır. eNOS geni Glu298Asp polimorfizmi; kronik glomerulonefrit, diyabet, hipertansiyon, polikistik böbrek hastalığı, interstisyel nefrit gibi renal hastalıklar sonucu son dönem böbrek yetmezliği gelişen ve hemodiyalize giren hastalarda kontrol grubuna göre belirgin yüksek bulunmuştur. Bu  alışmalarda Glu298Asp polimorfizminin kötü prognoz göstergesi olduğu, son dönem böbrek yetmezliği için bir risk oluşturduğu ve olası bir prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (104-106).

Çalışmamızda İTP'nin neden bazı çocuklarda meydana geldiği hastalık tablosunun bazı İTP olgularında akut seyredip diğerlerinde kronikleşmesinin nedeninin eNOS gen polimorfizmi ile ilişkisinin varlığı incelenmek istendi. Endotelyal NOS genindeki polimorfizm varlığının İTP oluşmasına, akut veya kronik olmasına ve tedavi şekline etkisi olup olmayacağı belirlenmek istenildi. Nitrik oksit sentaz enzim geninde herhangi bir polimorfizm varlığı ile posttranslasyonel modifikasyon etkilenerak veya protein degradasyonu artarak düşük enzimatik aktiviteye neden olup oksidatif stres üzerine etkili olabileceği düşünüldü. Endotelyal NOS gen polimorfizminin otoimmün hastalıklarla birlikteliği de göz önüne

alındığında otoimmün bir hastalık olan İTP’da polimorfizm varlığının araştırılması gerekmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Hasta ve kontrol grubu

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı Polikliniği'ne başvurup İTP tanısı konularak izleme alınan 66 olgudan oluşturuldu. Hasta grubu akut ve kronik İTP olmak üzere iki gruba alındı.

Akut İTP tanısı; izole trombositopeni ($150.000/\text{mm}^3$ 'ün altında) olması, diğer trombositopeni nedenlerinden ayırt edilen ve kemik iliği aspirasyonu yapılan olgularda, kemik iliği incelenmesinde normal veya artmış megakaryosit olması ile konuldu. Ailesel trombositopeni, kemik iliği baskılanmasına neden olan ilaç alımı, aktif enflamasyon, kan transfüzyonu veya splenomegalisi olan ve direk coombs ve antinükleer antikoru pozitif olan hastalar çalışmaya alınmadı (78,80). Trombositopenin 6 aydan daha uzun sürmesi kronik İTP olarak tanımlandı (20,31). Hastaların ebeveynlerinden bilgilendirilmiş onay formları alındı. Çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındıktan sonra yapıldı. Kan örnekleri Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilimdalı ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilimdalı laboratuvarlarında yapıldı.

Kontrol grubuna, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Sağlam Çocuk Polikliniği'ne başvuran daha önce İTP tanısı almamış, kemik iliği baskılanmasına yol açan ilaç tedavisi veya hastalık geçirmeyen sağlam çocuklardan, rutin incelemeleri sırasında kan sayımı yapılması gereken olgulardan oluşturuldu. Kontrol grubu, seçiminde bireylerin benzer yaş ve cinsiyette olmasına dikkat edilerek 60 sağlıklı çocuk alındı. Çocukların ebeveynleri çalışma hakkında bilgilendirilerek onay formu için imzaları alındı.

İdiyopatik trombositopenik purpura tanılı hastalardan, tanı anında ya da takipleri sırasında, kan sayımı için K-EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden arta kalan kanlar daha sonra DNA örnekleri izole edilmek üzere -20°C de dondurularak çalışma gününe kadar saklandı. Kontrol grubuna ait örnekler ise Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Sağlam Çocuk Polikliniğine başvuran ve herhangi bir nedenle kan sayımı için K-EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden arta kalan kanlar benzer şekilde alınıp dondurularak saklandı.

2.2 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

2.2.1. Kullanılan Cihazlar

1. Mikrosantrifüj (Ole Dich Instrumentmakers APS, type 157. MP, Germany ve Eppendorf microcentrifuge type 5415C, Germany)
2. pH metre (Hanna Instruments HI8521 pHmeter, Italy)
3. Elektronik hassas terazi (Shimadzu Corporation Libror AEG-320, Japan)
4. Elektroforez aparatı 1200V-500mA E815 (Belgium)
5. Electrophoresis box (Consort N. V. Parklaan 36 B-2300 Turnhout, Belgium)
6. PCR Cihazı Eppendorf Mastercycler gradient (Netheler Mlnz GmbH, 22331 Hamburg, Germany)
7. UV/visible spektrofotometre (LKB Biochrom Ultraspec Plus 4054 UV/visible spectrophotometer, Cambridge, England)
8. UV lambası ve fotoğraflama ünitesi (TCP-20-M, Vilber Lourmat, Cedex, France)
9. Hız ayarlı vorteks (Labinco L46, The Netherlands)
10. Su banyosu (Kötterman labortechnik type 3643, Germany)
11. Buzdolabı ve Derin Dondurucu, (Arçelik)
12. Etüv (Elektro-Mag)
13. Otomatik Mikropipetler (Eppendorf)

2.2.2. Kimyasal maddeler ve çözeltiler

1. Agaroz (Bioron GmbH, Ludwigshafen, Almanya)
2. Bromphenol mavisi
3. Ban II restriksiyon kesim enzimi(New England Biolabs, Cambridge, İngiltere)
4. Primerler: Integrated DNA Technologies
5. Sodyum dodesil sülfat (SDS)
6. İsopropanol

7. %70'lik etanol
 8. EDTA
 9. Borik asit
 10. Ethidium bromide
 11. TRIS baz
 12. Potasyum bikarbonat
 13. Amonyum klorür
 14. TRIS-asetat
 15. Deoksinükleotid trifosfat (dNTP) seti (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Larova GmbH, Teltow, Almanya)
 16. Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)
 17. Magnezyum Klorür
 18. 100 bp DNA ve 50 bp DNA step marker'leri (Promega, Madison, WI)
- 2.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu için Oligonükleotidler (primerler)

Endotelyal nitrik oksit sentaz geni Glu298Asp polimorfizmi genotiplerini belirlemek amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) reaksiyonunda kullanılan primerlerin dizileri aşağıda verildi.

F-5' AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA 3'

R-5' CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTCA 3'

2.3. Kandan DNA İzolasyonu

Deoksiribonükleik asit saflaştırılması Promega firmasından alınan ticari "Wizard Genomic DNA Purification Kit'i ile gerçekleştirildi (Madison, WI, USA). Bu kit 300 µL kandan DNA izolasyonu için dizayn edilmiştir. Deoksiribonükleik asit izolasyonu kitin genel kurallarına uymak koşuluyla aşağıda sıralandığı şekilde yapılmıştır.

1. 1.5 ml'lik eppendorf tüplere 900 µL "cell lysis" (hücre parçalama) solusyonu konuldu.

2. EDTA'lı tüplere alınmış kan, ters yüz edilip karıştırıldıktan sonra 300 µL alınarak hücre parçalama solusyonunun üzerine ilave edilip, eppendorf 5-6 defa ters yüz edilip karıştırıldı, 10 dk. oda ısısında bekletildi.
3. 13.000 x g de 20 saniye oda ısısında santrifüjlendi
4. Alttaki beyaz kısım zarar görmeden mümkün olduğu ölçüde fazla süpernatant uzaklaştırılıp atıldı. Altta hücrelerin üzerinde yaklaşık olarak 10-20 µL sıvı bırakıldı.
6. Beyaz hücreler 10-15 saniye vortekslenerek iyice karışması sağlandı.
7. Vortekslenmiş hücrelerin üzerine 300 µL "Nuclei lysis" (çekirdek parçalama) solusyonu eklendi. Beyaz hücrelerin parçalanması için solusyon 5-6 kez pastör pipeti ile pipetlenerek bırakıldı. Solusyon visköz bir yapı kazandı. Karıştırıldıktan sonra hala hücre kümeleri görünüyorsa 37°C'de inkübe edilip kümelerin bozulması beklendi. Kümeler 1 saat sonra hala varsa 100 µL çekirdek parçalama solusyonu eklenerek inkübasyon tekrarlandı.
8. Oda ısısına getirilmiş Nükleer lizatın üzerine 100 µL "protein precipitation" (protein çöktürme) solusyonu eklendikten sonra 10-20 saniye şiddetle vortekslendi. Bu işlem sonrasında küçük, farklı kahverengi tonlarında protein kümeleri görüldü. Numuneler tam oda ısısına gelmeden protein çöktürme solusyonu eklendiğinde yeterli bir protein çöküntüsü elde edilemeyeceğinden hareketle iyi bir çöktürme için bu ayrıntıya dikkat edildi.
9. Oda sıcaklığında 13.000 x g'de 3 dakika santifüj edilen eppendorf tüpün dibinde koyu kahverengi bir protein çöküntüsü görüldü.
10. Süpernatant, 300 µL izopropanol içeren 1.5 ml'lik santifüj tüpüne transfer edildi.
11. Yaklaşık 15-25 defa tüp ters yüz edilerek karıştırıldı. Beyaz iplik görünümündeki DNA, görülebilen bir kitle oluncaya kadar bu çevirme işlemine devam edildi. Bazı numunelerde görülebilen kümeler oluşurken, diğer bazılarında çok küçük miktarda iplikçik görüldü.
12. Bir dakika oda sıcaklığında 13.000 x g'de santrifüj edildi. DNA, örnekteki lökosit miktarının az veya fazla olmasına göre miktarı değişebilen beyaz bir çöküntü şeklinde görüldü.

13. Süpernatant dökülerek dipte kalan DNA'nın üzerine 300 µL oda sıcaklığındaki %70'lik etanol eklendi. Tüp ters yüz yapılarak DNA pelleti ve tüpün kenarları yıkandı. Yukarıdaki santrifüjleme işlemi tekrarlandı.

14. Etanol dikkatlice aspire edildikten sonra, tüpler temiz kurutma kağıtlarının üzerine ağızları alta gelecek şekilde yerleştirildi, böylece fazla etanol alınmış oldu. Sonra 5-10 dakika normal havada kurumaya bırakıldı.

15. Kurumuş tüpe 100 µL DNA rehidratasyon solusyonu eklendi. DNA'yı rehidre etmek için 65°C'de 1 saat inkübe edildi. Tüp aralıklı ters yüz edilerek karıştırıldı. Kullanılacağı zamana kadar -20 °C'de saklandı.

Tüm bu aşamalar tamamlandıktan sonra eppendorf tüplerde bulunan DNA'nın tahmini miktarını hesaplamak için UV/visible spektrometre 260 ve 280 nm'de çift dalga boyu aralığında okuma yapacak şekilde ayarlandı. DNA örneğinden 4 µL alınarak mikro küvette bulunan 746 µL saf suyun üzerine konuldu ve ters yüz yapılarak okuma gerçekleştirildi. Daha sonra $\text{ng}/\mu\text{L DNA} = A_{260} \times \text{dilasyon faktörü} \times 50$ formülünden hareketle örneklerdeki DNA'nın yaklaşık miktarı hesaplandı.

2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu ile eNOS Glu298Asp Gen Polimorfizmlerinin Saptanması

Polimeraz zincir reaksiyonu in vitro bir amplifikasyondur. Çoğaltılmak istenen DNA dizisinin her iki ucuna uygun ve komplementer seçilen primerler ile kalıp DNA hedef alınarak sentez yapılır. Bir döngüde zincir ayrışması (denatürasyon), primer hibridizasyonu ve DNA sentezi işlemleri birbirini izler. Döngüler istenen sayıda tekrarlanır, "n" sayıda tekrarlanan döngülerin sonunda çift sarmallı hedef DNA teorik olarak 2^n sayıda çoğalmış olur.

7q35-36 kromozomu üzerindeki eNOS Glu298Asp polimorfizmi saptanması amacı ile örneklerimize genin ilgili bölgeleri için dizayn edilmiş primer çiftleri ile PZR uygulandı. Bireylere ait genomik DNA örneklerinde eNOS Glu298Asp lokusuna ait alleller PZR ile çoğaltıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu karışımı, aşağıda maddeleri belirtilen ölçülerde içerecek şekilde toplam 25 µl olarak hazırlandı;

- 100 ng DNA
- Herbir primerden 0.4 µM
- dNTP 2 mM

- 2 mM MgCl₂
- 1.0 U Taq DNA Polimeraz
- 2.5 µl 10X PZR tamponu

Hazırlanan karışım thermocyclerda amplifikasyona bırakıldı. Amplifikasyonda bir defa 95 °C’de 5 dakikalık ön denatürasyondan sonra denatürasyon için 94 °C’de 1 dakika, 62 °C’de 1 dakika, uzama için 72 °C’de 1 dakika olacak şekilde toplam 35 döngü gerçekleştirildi.

2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin yatay jel elektroforezinde görüntülenmesi

Agaroz jel elektroforezi DNA moleküllerinin analizinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. DNA moleküllerinin elektriksel alanda jel üzerindeki hareketine dayanan bu metodla, değişik boyutlarda DNA moleküllerinin artımını yapmak ve bu moleküllerinin boyutlarını değerlendirmek mümkündür (107).

Çalışmada çoğaltılan eNOS geninin PZR ürünleri (517 bç) % 1.5’lik agaroz jelde yürütüldü. Agaroz jeller ultraviyole ışık altında incelenmeye alındı. Jel kasetinin büyüklüğüne göre tartılan 2 gr agaroz, 10 X ana stoktan sulandırılmış 100 ml 0,5 X TBE tamponu içinde kaynatıldı. Çözeltinin sıcaklığı 50-55 °C’e düştüğünde 5 µl etidyum bromid eklenip yatay jel kasetlerine döküldü. Agaroz jel donduktan sonra elektroforez tankına yerleştirildi. 5 µl PZR ürünleri 2 µl yükleme tamponu ile karıştırılıp ceplere yüklendi. Jeldeki DNA, Consort E861 elektroforez sistemi ile 110 V gerilimde 0,5 X TBE tamponu içerisinde 45-60 dakika yürütüldü. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin büyüklükleri Gene Ruler 100 baz-çiftlik (bç) DNA ladder moleküler ağırlık standardı ile karşılaştırılarak belirlendi.

2.6. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle kesimi

Restriksiyon enzimleri DNA’ya özgün bölgelerinden kesen bakterilerde bulunan ve yabancı DNA’ya karşı savunma görevi gören enzimlerdir. Restriksiyon enzimleri DNA’da 4-8 nukleotidlik spesifik dizileri tanırlar. Bazı restriksiyon enzimlerinin, kesilen parçaların her iki ucunda oluşturdukları kısa ve tek zincirli DNA kuyruklarına yapışkan uçlar adı verilir. Yapışkan uçlar aynı enzim ile kesim sonucu diğer uçlarla komplementer baz çiftleri oluşturabilir. Bu şekilde herhangi iki DNA fragmanı yapışkan uçları sayesinde kolayca birbirine bağlanabilir. Bazı

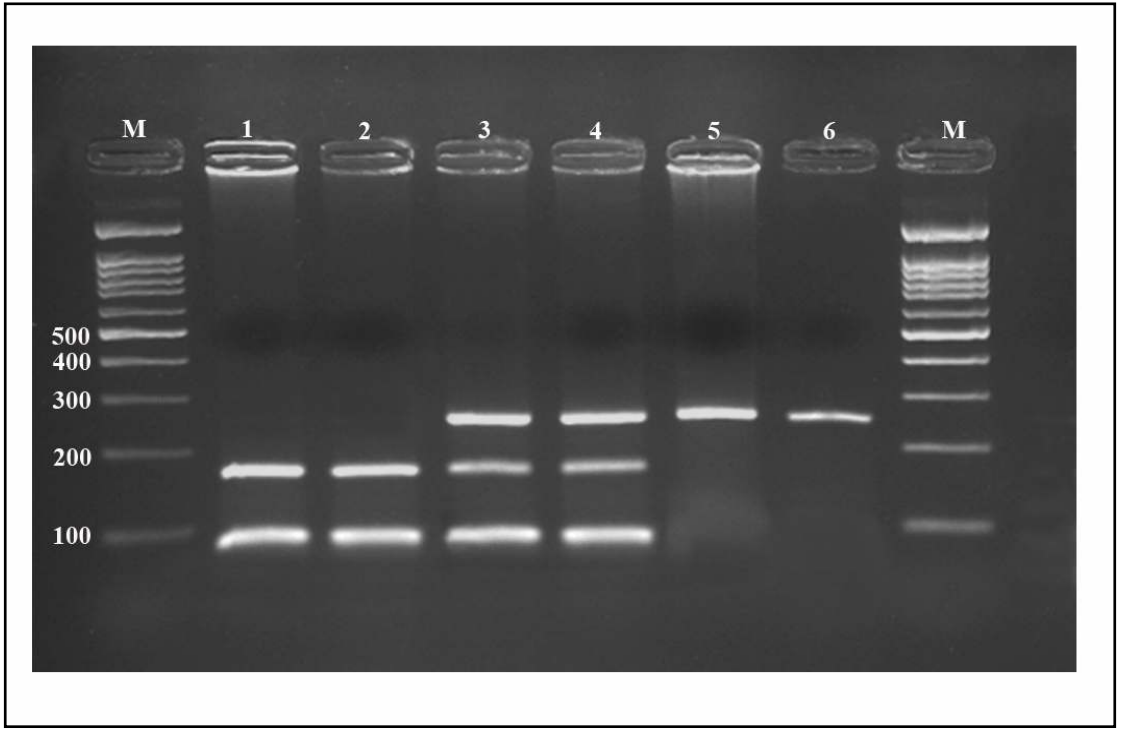
enzimler ise DNA'daki tanıma noktalarında aynı bölgeden karşılıklı kesim yaparlar, bunlar ise küt uçlu olarak adlandırılır (108).

Endotelyal NOS geni Glu298Asp polimorfizmi genotiplerinin belirlenmesi amacıyla amplifiye edilen PZR ürünleri Ban II enzimi ile kesildi. Ban II restriksiyon endonükleazı DNA parçalarında yapışkan uç oluşturan bir enzimdir. Restriksiyon enzimlerinin optimal aktivite gösterdikleri iyon konsantrasyonu ve ısıları farklılık göstermektedir. 20 µl PZR ürünü için 3 U (0.3 ml) Ban II enzimi eklenerek 37°C'lik etüvde 16 saat inkübe edildi. Ban II enziminin tanıdığı nükleotid sırası aşağıdaki gibidir.

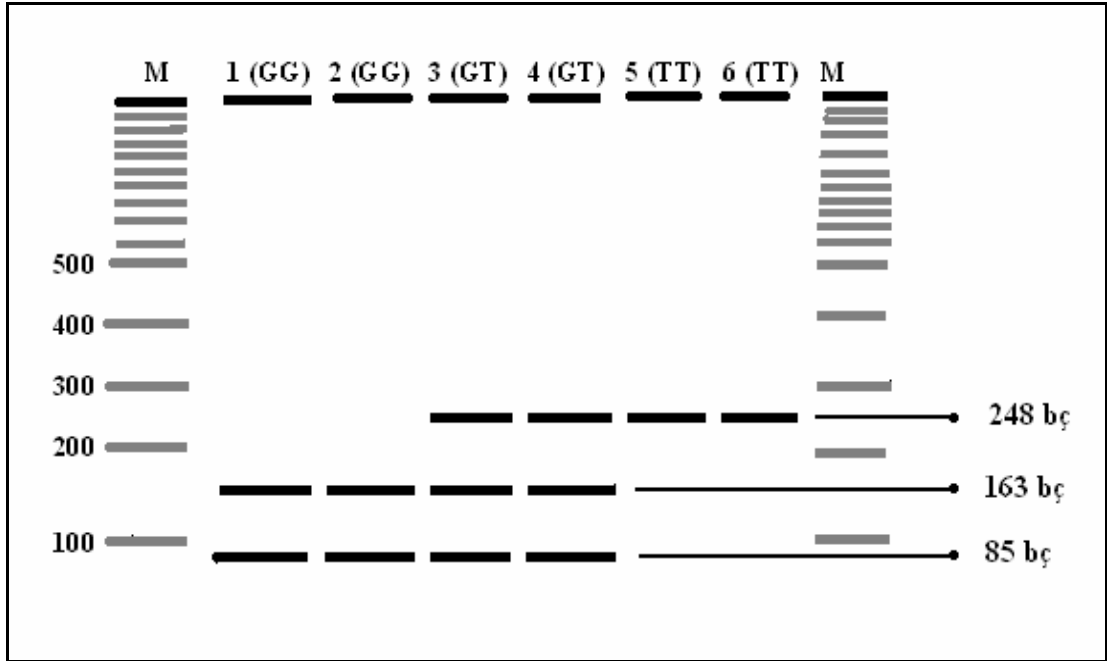
2.7. Restriksiyon enzimleri ile kesilen DNA örneklerinin Agaroz jelde görüntülenmesi

Jel elektroforezinde kullanılacak agaroz jelin konsantrasyonu ayrıştırılmak istenen parçanın büyüklüğüne göre değişiklik göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen eNOS geninin PZR ürünleri 0.5 X TBE tamponu içerisinde hazırlanmış %2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulduktan sonra Ultraviole transilluminatörde incelenerek sonuçlar gözlemlendi. Sonuçlar gen yapılarına uygun olarak kaydedildi. Her örnek için kesim olup olmadığı, Gene Ruler 100 bp 'lik DNA ladder moleküler ağırlık merdiveni standartına göre değerlendirildi. (Şekil IIIa, IIIb)

Yapılan PZR sonucu oluşan 248 bç uzunluğundaki ürün elde edildi. Elde edilen PZR ürünüde Ban II enzimi için kesim bölgesinin bulunması, 163 bç ve 85 bç DNA parçalarının oluşmasına neden olurken, kesim bölgesinin bulunmaması 248 bç'lik tek parçanın görülmesiyle sonuçlanır. Endotelyal NOS Glu298Asp genotipleri, restriksiyon bölgesinin her iki allelde bulunması ile homozigot normal (GG); 163 ve 85 bç DNA parçası elde edilir. Restriksiyon bölgesinin her iki allelde de bulunmaması ile (TT); kesim meydana gelmeyen 248 bç uzunluğundaki DNA parçası elde edilir. Restriksiyon bölgesinin sadece bir allelde bulunması ile heterozigot (GT); 248, 163 ve 85 bç uzunluğundaki DNA parçası elde edilir.



Şekil IIIa: eNOS geni Glu298Asp polimorfizmine ait Ban II enzimi ile kesilen PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1 ve 2.bireyler GG genotipi, 3 ve 4. bireyler GT, 5 ve 6. bireyler TT genotipi. T alleli 248 baz çifti (bç), G alleli 163 ve 85 bç. M: 100 bç DNA boyut belirteci.



Şekil IIIb: eNOS geni Glu298Asp polimorfizmine ait Ban II ile kesilen PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezde şematik görüntüsü

2. 8. İstatistiksel Analizler

Çalışma sonucunda elde edilen hasta ve kontrol grubu arasındaki genotip dağılımı SPSS® for Windows computing program, version 12.0 kullanılarak ki-kare testi yapılarak karşılaştırıldı. Kontrol grubu ve hastalar arasındaki G ve T allel frekansının istatistiksel anlamlılığı Fisher's Exact Test ile değerlendirildi, p değerinin <0.05 olması istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Hasta ve Kontrol Grubunu Oluşturan Olguların Özellikleri

Çalışmaya İTP grubundan 66 hasta ve kontrol grubundan 60 sağlam olgu olmak üzere toplam 126 olgu alındı. Çalışmaya alınan hasta ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyet ortalamalarının benzer olması sağlandı. Çalışmaya alınan olguların yaşları 1.5 ile 16 yıl arasında değişmekteydi.

Hasta grubu akut ve kronik İTP olmak üzere iki gruba ayrıldı. Akut İTP'li hastalar 22 kız (%43) ve 29 erkek (%57) olmak üzere toplam 51 hasta, kronik İTP'li hastalar ise 10 kız (%67) ve 5 erkek (%33) olmak üzere toplam 15 hasta olmak üzere çalışmaya alındı.

Kontrol grubundaki bireylerin cinsiyete bağımlı değişimi 21 kız (%35) ve 39 erkek (%65) olmak üzere toplam 60 sağlıklı olgudan oluşturuldu. Kronik İTP grubunda, akut İTP ve kontrol grubuna göre kızların sayısı erkeklere göre fazla bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Yaş ortalaması toplam İTP grubunda 7.24 ± 3.90 yıl, akut İTP grubunda 5.5 ± 3.62 yıl, kronik İTP grubunda 11 ± 3.26 yıl, kontrol grubunda ise 7 ± 3.76 yıl olarak bulundu. Akut İTP ile kronik İTP tanılı olgular arasında ve kontrol grubu ile kronik İTP tanılı olgular arasındaki yaş farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). İdiyopatik trombositopenik purpura tanısı alan 66 olgunun, 51 (%77)'i akut, 15 (%23)'i ise kronik İTP tanılı olgulardı. Kontrol grubu ve İTP'li hasta gruplarının demografik özellikleri Tablo III'te gösterildi.

Tablo III. İdiyopatik trombositopenik purpura ve kontrol grubu olgularının demografik özellikleri.

	Toplam İTP	Akut İTP	Kronik İTP	Kontrol grubu	P<0.05
	(a)	(b)	(c)	(d)	
n	66	51	15	60	
Yaş (ort±SD,yıl) (alt-üst)	7.24±3.90 (1.5-16)	6.33±3.62 (1.5-14)	10.33±3.26 (4-16)	7.45±3.76 (1.5-16)	b-c, c-d
Cinsiyet (%)	34E/32K (52/48)	29 E/22 K (57/43)	5 E/10 K (33/67)	39 E/21 K (65/35)	b-c, c-d

n: Hasta sayısı, ort: Aritmetik ortalama, SD: Standart sapma, E: Erkek, K: Kız.

3.2. Hasta ve Kontrol Grubunu Oluşturan Bireylerin Hematolojik Özellikleri

Hasta ve kontrol grubundaki olguların tam kan sayımı incelendiğinde beyaz küre (WBC) sayıları sırasıyla; toplam İTP grubunda $10.30 \pm 2.78 \times 10^3/\text{mm}^3$, akut İTP grubunda $10.54 \pm 2.52 \times 10^3/\text{mm}^3$, kronik İTP grubunda $9.49 \pm 3.53 \times 10^3/\text{mm}^3$ ve kontrol grubunda $8.43 \pm 2.31 \times 10^3/\text{mm}^3$ olarak bulundu. Çalışmadaki kontrol grubundaki bireylerin bakılan WBC değeri, akut İTP grubundaki olguların WBC değerlerinden daha düşük bulundu. Fakat bu iki grup ve diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Hemoglobin değerleri, toplam İTP'lı olgularda 12.31 ± 1.38 g/dl, akut İTP'lı olgularda 12.17 ± 1.37 g/dl, kronik İTP'lı olgularda 12.78 ± 1.35 g/dl, kontrol grubunda ise 13.48 ± 1.17 g/dl olarak ölçüldü. Akut İTP'lı olguların Hb düzeyleri kontrol grubuna göre daha düşük bulundu. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Gruplar arasında Hb değeri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Trombosit sayıları; toplam İTP'lı olgularda $15.19 \pm 16.67 \times 10^3/\text{mm}^3$, akut İTP'lı olgularda $14.21 \pm 13.97 \times 10^3/\text{mm}^3$ ve kronik İTP'lı olgularda $18.53 \pm 24.05 \times 10^3/\text{mm}^3$, kontrol grubunda $329.25 \pm 80.33 \times 10^3/\text{mm}^3$ olarak ölçüldü. Toplam İTP, akut İTP ve kronik İTP hastalarının trombosit sayıları kontrol grubundan daha düşük bulundu. Trombosit sayısı açısından akut, kronik ve toplam

İTP grupları ile kontrol grubu arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Çalışmadaki olguların ortalama trombosit hacimleri (MPV) değerleri; toplam İTP'lı hastalarda 12.15 ± 1.88 fL, akut İTP'lı hastalarda 11.95 ± 1.67 fL, kronik İTP'lı hastalarda ise 12.84 ± 2.40 fL, kontrol grubunda ise 10.51 ± 1.65 fL olarak ölçüldü. Toplam İTP, akut İTP ve kronik İTP'lı hastaların MPV değerleri kontrol grubunun MPV değerlerine göre daha yüksek, kronik İTP'lı hastaların ise akut İTP'lı hastalara göre MPV değerlerinin yüksek olduğu bulundu. Ancak gruplar arasında MPV değerleri açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Trombosit dağılım aralığı (PDW) değerleri; toplam İTP'da $\% 33.02\pm8.04$, akut İTP'da $\%32.27\pm7.96$, kronik İTP'da $\%35.59\pm8.04$, kontrol grubunda ise $\%30.81\pm6.59$ olarak bulundu. Trombosit dağılım aralığı, toplam İTP, akut İTP ve kronik İTP olgularında kontrol grubuna göre daha yüksek değerlerde bulundu. Kronik İTP'lı hastalarda ise akut İTP'lı hastalara göre PDW değeri daha yüksek bulundu. Gruplar arasında sadece kontrol grubu ve kronik İTP hastaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin hematolojik değerleri tablo IV'te gösterilmiştir.

Bakılan platokrit değerleri (PCT), toplam İTP grubunda $\%0.0\pm0.08$, akut İTP grubunda $\%0.01\pm0.02$, kronik İTP grubunda $\%0.07\pm0.16$, kontrol grubunda $\%0.34\pm0.83$ olarak bulundu. Toplam İTP, akut İTP ve kronik İTP gruplarının, kontrol grubu arasındaki farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Tablo IV. Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin hematolojik değerleri.

	Toplam İTP n=66 (1)	Akut İTP n=51 (2)	Kronik İTP N=15 (3)	Kontrol Grubu n=60 (4)	p<0.05
WBC ($10^3/\text{mm}^3$) (ort $\pm$ SD) (alt-üst)	10.30 $\pm$ 2.78 (4.32-18.69)	10.54 $\pm$ 2.52 (5.88-18.69)	9.49 $\pm$ 3.53 (4.32-18.04)	8.43 $\pm$ 2.31 (4.40-13.49)	
Hb (g/dl) (ort $\pm$ SD) (alt-üst)	12.31 $\pm$ 1.38 (8.50-14.70)	12.17 $\pm$ 1.37 (8.50-14.60)	12.78 $\pm$ 1.35 (10.90-14.70)	13.48 $\pm$ 1.17 (10.70-16.00)	
PLT ($10^3/\text{mm}^3$) (ort $\pm$ SD) (alt-üst)	15.19 $\pm$ 16.67 (2.00-89.00)	14.21 $\pm$ 13.97 (2.00-56.00)	18.53 $\pm$ 24.05 (3.00-89.00)	329.25 $\pm$ 80.33 (201.0-586.0)	1-4, 2-4, 3-4
MPV (fL) (ort $\pm$ SD) (alt-üst)	12.15 $\pm$ 1.88 (9.8-20)	11.95 $\pm$ 1.67 (9.80-16.40)	12.84 $\pm$ 2.40 (10.40-20.2)	10.51 $\pm$ 1.65 (8.30-13.50)	
PCT (%) (ort $\pm$ SD) (alt-üst)	0.0 $\pm$ 0.08 (0-0.48)	0.01 $\pm$ 0.02 (0-0.16)	0.07 $\pm$ 0.16 (0-0.48)	0.34 $\pm$ 0.83 (0.19-0.52)	1-4, 2-4, 3-4
PDW (ort $\pm$ SD) (alt-üst)	33.02 $\pm$ 8.04 (19.0-49.0)	32.27 $\pm$ 7.96 (19.0-48.20)	35.59 $\pm$ 8.04 (22.0-49.0)	30.81 $\pm$ 6.59 (18.50-44.0)	3-4

WBC: Beyaz küre, Hb: Hemogloblin, MPV: Ortalama trombosit volümü, PCT: Platokrit, PDW: Trombosit dağılım aralığı

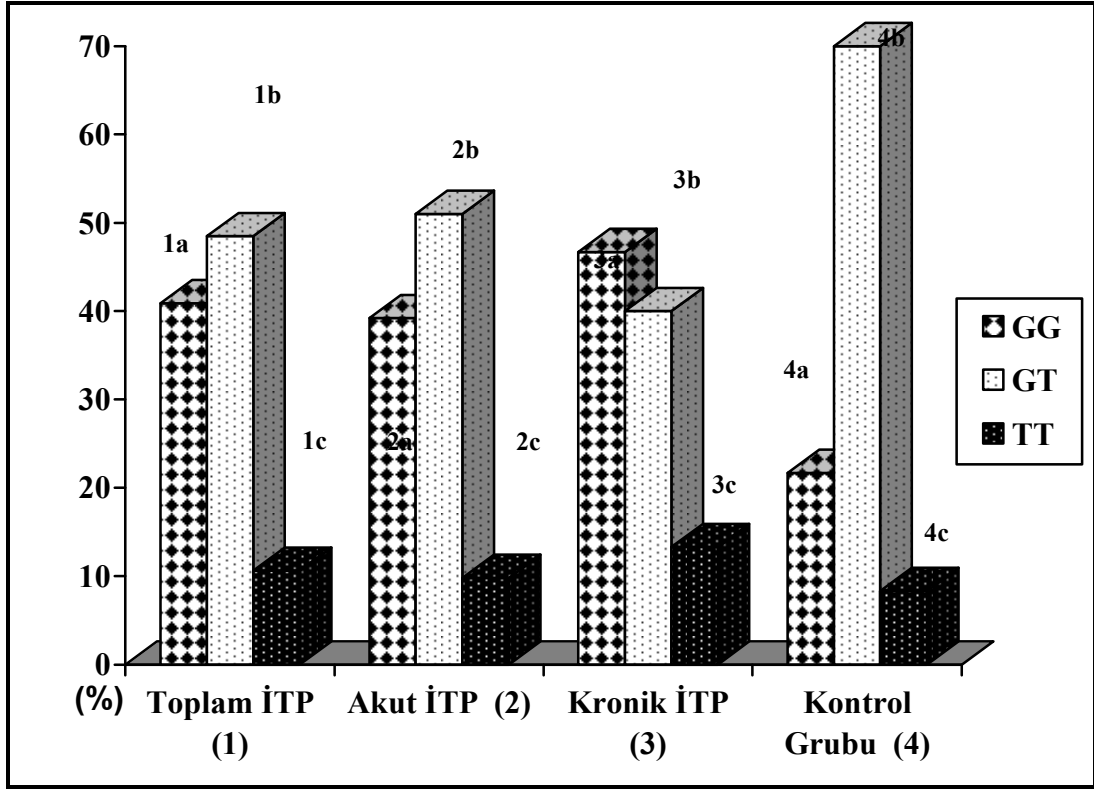
3.3. eNOS Glu298Asp Polimorfizminin Genotip Dağılımı ile G/T Allel Sıklığının Kontrol ve İTP Gruplarındaki Dağılımları

İdiyopatik trombositopenik purpura tanılı olgularda ve kontrol grubunda eNOS Glu298Asp polimorfizminin genotip dağılımı ile G ve T allel sıklığı Tablo V’te gösterilmiştir. Toplam İTP grubunda GG genotip sıklığı 27 olguda (%40.9), GT genotip sıklığı 32 olguda (%48.5) ve TT genotip sıklığı 7 olguda (%10.6), akut İTP grubunda GG genotip sıklığı 20 olguda (%39.2), GT genotip sıklığı 26 olguda (% 51) ve TT genotip sıklığı 5 olguda (%9.8), kronik İTP grubunda GG genotip sıklığı 7 olguda (%46.7), GT genotip sıklığı 6 olguda (% 40) ve TT genotip sıklığı 2 olguda (% 13.3), kontrol grubunda ise GG genotip sıklığı 13 olguda (%21.7), GT genotip sıklığı 42 olguda (%70) ve TT genotip sıklığı 5 olguda (%8.3) olarak bulundu.

Tablo V. Hasta ve kontrol gruplarında eNOS Glu298Asp polimorfizminin genotip dağılımı ve G/T allel sıklığı.

	Toplam İTP n=66 (1)	Akut İTP n=51 (2)	Kronik İTP n=15 (3)	Kontrol n=60 (4)	P
G/T genotip dağılımı					
GG	27 (%40.9)	20 (%39.2)	7 (%46.7)	13 (%21.7)	(1-4)=p<0.05 (2-4)=p<0.05 (3-4)=p<0.05
GT	32 (%48.5)	26 (%51)	6 (%40)	42 (%70)	(1-4)=p<0.05 (2-4)=p<0.05 (3-4)=p>0.05
TT	7 (%10.6)	5 (%9.8)	2 (%13.3)	5 (%8.3)	(3-4)=p<0.05
Allel sıklığı					
G	86 (%65.1)	66 (%64.7)	20 (%66.7)	68 (%56.7)	(1-4)=p<0.05 (2-4)=p<0.05 (3-4)=p<0.05
T	46 (%34.8)	36 (%35.3)	10 (%33.3)	52 (%43.3)	(1-4)=p<0.05 (3-4)=p<0.05

Endotelial NOS Glu298Asp polimorfizminin GG genotip sıklığı, İTP grubunda 27 olguda (%40.9) ve kontrol grubunda 13 olguda (%21.7) olarak bulundu. İdiyopatik trombositopenik purpura olan hastalarda GG genotipi sıklığı, kontrol grubuna göre daha sık olduğu görüldü. Toplam İTP (akut ve kronik) grubu ile kontrol grubu arasındaki GG genotipi dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulundu (p<0.05). GG genotipi akut İTP’da %39.2 iken kronik İTP’da %46.7 olarak bulundu. GG genotipi sıklığının en fazla bulunduğu kronik İTP grubu ile akut İTP ve kontrol grupları kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulundu (p<0.05). Şekil IV’te kontrol grubu, toplam İTP, akut İTP ve kronik İTP’lı hastaların eNOS Glu298Asp G/T genotip dağılımı gösterildi.



Şekil IV. Toplam İTP, akut İTP, kronik İTP ve kontrol grubunun eNOS Glu298Asp G/T genotip dağılımı.

1a-4a= $p<0.05$

1b-4b= $p<0.05$

3c-4c= $p<0.05$

2a-4a= $p<0.05$

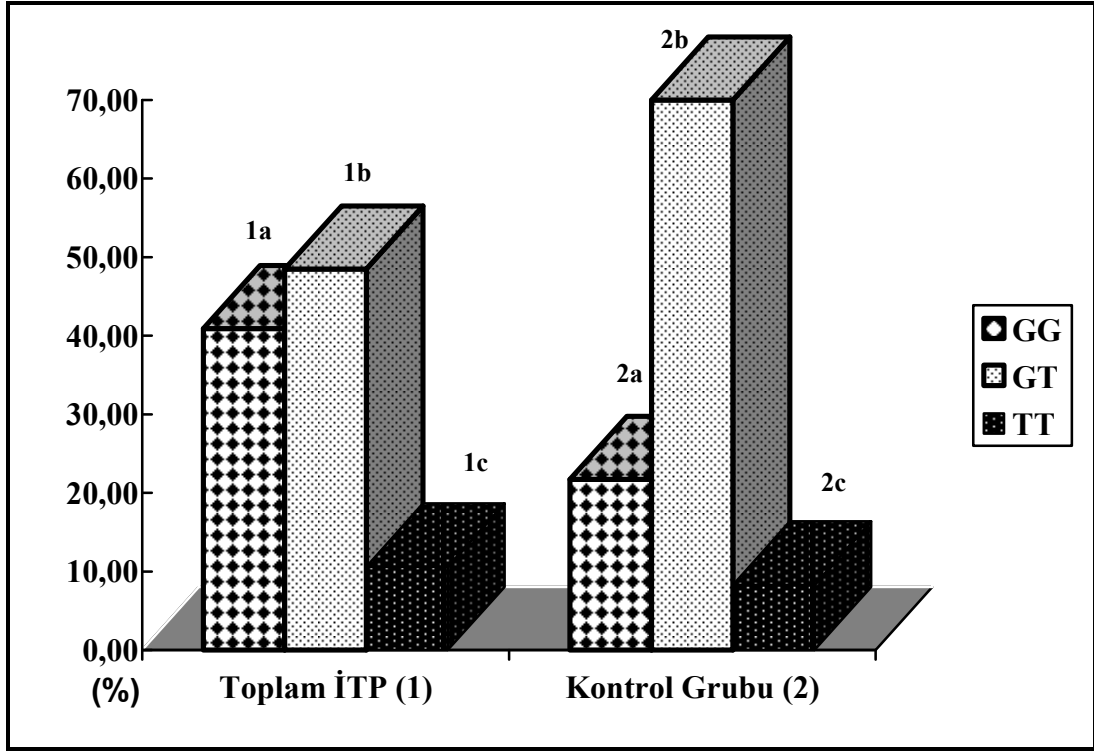
2b-4b= $p<0.05$

3a-4a= $p<0.05$

3b-4b= $p<0.05$

(anlamli bulunmayanlar yazilmedi).

Endotelyal NOS Glu298Asp polimorfizminin GT genotip sikligi, toplam İTP grubunda 32 (%48.5), kontrol grubunda 42 (%70), akut İTP grubunda 26 (%51), kronik İTP grubunda 6 (%40) oranında bulundu. Toplam İTP grubu ile kontrol grubundaki GT genotipi dağılımı kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0.05$). Kontrol grubundaki GT genotipi sikligi ile akut İTP grubundaki GT genotipi sikligi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). Kontrol grubundaki GT genotipi dağılımı ile kronik İTP grubundaki GT genotipi sikligi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). Kontrol grubu ve toplam İTP'lı hastaların eNOS Glu298Asp G/T genotip dağılımı şekil V'da gösterilmiştir.



Şekil V. Kontrol grubu ve toplam İTP'lı (akut ve kronik) hastaların eNOS Glu298Asp G/T genotip dağılımı. 1a-2a= $p<0.05$, 1b-2b= $p<0.05$ (anlamlı bulunmayanlar yazılmadı).

Endotelyal NOS Glu298Asp polimorfizminin TT genotip sıklığı, toplam İTP grubunda 7 olguda (%10.6), kontrol grubunda 5 olguda (%8.3), akut İTP grubunda 5 olguda (%9.8), kronik İTP grubunda 2 olguda (%13.3) bulundu. Kronik İTP grubunda TT genotipi dağılımı kontrol grubu ile kıyaslandığında yüksek olduğu görüldü. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Çalışmada yer alan gruplardaki G allel sıklığı dikkate alındığında; toplam İTP grubunda 86 (%65.1), akut İTP grubunda 66 (%64.7), kronik İTP grubunda 20 (%66.7), kontrol grubunda 68 (%56.7) olarak bulundu. Kronik İTP grubunda G allel sıklığı diğer gruplara göre daha yüksek bulunurken, kontrol grubunda ise diğer gruplara göre daha düşük bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Toplam İTP grubu G alleli oranı, kontrol grubundan daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Akut, kronik ve toplam İTP grupları arasında G alleli oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).

Çalışmada yer alan gruplardaki T allel sıklığı dikkate alındığında; toplam İTP grubunda 46 (%34.8), akut İTP grubunda 36 (%35.3), kronik İTP grubunda 10 (%33.3), kontrol grubunda 52 (%43.3) olarak bulundu. Kontrol grubunda T allel

sıklığı diğer gruplara göre daha yüksek bulunurken, kronik İTP grubunda ise diğer gruplara göre daha düşük bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Kontrol grubundaki T alleli oranı, toplam İTP grubundan yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Akut, kronik ve toplam İTP grupları arasında T alleli oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo VI'da kontrol grubu, akut İTP ve kronik İTP gruplarında eNOS Glu298Asp G/T genotip dağılımı ile yaş, trombosit sayısı, MPV, PDW değerleri ilişkilendirildi. Buna göre kontrol grubunda GG ve GT genotipi gösteren olguların yaşları TT genotipi gösteren olguların yaşlarından büyüktü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Kontrol grubunda trombosit ve MPV değerleri bakımından her üç genotipi gösterenler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

Akut İTP'lı hasta grubunda TT genotipi gösterenlerin yaşları GG ve GT genotipi gösterenlerin yaşlarına göre daha büyük bulundu, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Akut İTP tanılı hastalar arasında TT genotipi gösterenlerin trombosit sayıları, GG ve GT genotipi gösterenlerin trombosit sayılarına göre daha düşük bulundu. Ancak bu fark sadece GG ve TT genotipi olan olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Akut İTP grubunda TT genotipi gösteren olguların MPV değerleri, GG ve GT genotipi gösteren olguların MPV değerlerinden yüksek bulundu. Bu fark GG ve TT genotipi gösteren olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Bu grupta genotipler arası PDW değerleri açısından da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Kronik İTP'lı hastalarda GT genotipi gösterenlerin yaş ortalaması GG ve TT genotipi gösterenlere göre daha küçük bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p<0.05$). Bu grupta GT genotipi gösterenlerin trombosit sayıları GG ve TT genotipi gösterenlere göre daha düşük olup, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). GG genotipi gösteren olguların trombosit sayıları da TT genotipi gösterenlerin trombosit sayılarından daha düşük bulundu, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Aynı grupta genotipler arası MPV ve PDW değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo VI. Gruplar arası eNOS Glu298Asp genotip dağılımı ile yaş ve trombosit parametrelerinin ilişkisi

	Akut İTP (1)			Kronik İTP (2)			Kontrol grubu (3)		
	GG n=20 (a)	GT n=26 (b)	TT n=5 (c)	GG n=7 (a)	GT N=6 (b)	TT n=2 (c)	GG n=13 (a)	GT n=42 (b)	TT n=5 (c)
Yaş (yıl) (ort±SD) (alt-üst)	5.92±3.80 (1.5-12)	6.11±3.47 (2-14)	9.1±2.96 (6.5-14)	10.42±2.68 (5.5-13)	9.75±3.56 (4-14)	11.75±6.01 (7.5-16)	8.57±4.35 (2-16)	7.51±3.56 (2-14)	4±1.62 (1.5-6)
P	AD			AD			3a-3c= p<0.05, 3b-3c= p<0.05		
Trombosit (10 ⁶ /mm ³) (alt-üst)	15.30±13.60 (2.0-51.0)	15.06±15.18 (2.0-56.0)	5.40±3.50 (2.0-11.0)	24.71±30.7 (5.0-89.0)	8.16±4.02 (5.0-16.0)	28.0±35.35 (3.0-53.0)	304.4±71.56 (211.0-452.0)	332.8±83.51 (201.-586.0)	363.20±69.11 (299.0-468.0)
P	1a-1c= p<0.05			2a-2b= p<0.05, 2b-2c= p<0.05			AD		
MPV (fL) (alt-üst)	11.81±2.02 (9.8-16.4)	11.99±1.54 (9.8-15.3)	12.28±0.70 (11.4-13.0)	12.51±1.41 (10.4-14.6)	13.30±3.65 (10.4-20.2)	12.60±0.56 (12.2-13.0)	10.95±1.82 (8.3-13.5)	10.32±1.58 (8.4-13.0)	10.98±1.82 (9.0-13.0)
P	1a-1c= p<0.05			AD			AD		
PDW (alt-üst)	33.89±7.36 (19.0-47.0)	30.98±8.15 (19.0-46.0)	32.52±9.82 (23.0-48.20)	33.80±7.95 (22.0-42.0)	38.13±9.39 (26.8-49.0)	34.25±4.59 (31.0-37.5)	29.67±5.74 (19.4-40.50)	31.59±6.76 (18.50-44.0)	27.16±6.86 (21.10-36.30)
p	AD			AD			AD		

AD: p>0.05

4.TARTIŞMA

İdiyopatik trombositopenik purpura, trombositopeni ile karakterize, trombositopeniye neden olabilecek diğer hastalıkların dışlanması ile tanısı konulan, sonradan kazanılmış otoimmün bir hastalıktır. İnsidansı 4-5.3/100.000 olarak bildirilmiştir. Görülme sıklığı etnik gruplar, ırklar veya çevresel faktörlerden etkilenmemektedir (40,109-112). En sık 2-10 yaşları arasında gözlenirken, pik insidans yaşı 2-5 yaştır. Cins farklılığı göstermez. Ancak beyaz çocuklarda siyahlara göre daha fazla, infant döneminde erkek çocuklarda, erişkinlerde ise kızlarda (3:1) daha fazla görülmektedir (20,41). Akut ve kronik olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Akut formu genellikle kış ve ilkbahar mevsimlerinde 2-10 yaş arasında en sık olarak, kronik formu ise mevsimsel özellik göstermeden genellikle 10 yaşından sonra ve kızlarda daha fazla görülmektedir (18,19,42,69). Çocuklarda yaklaşık %80 spontan remisyon görülmesine karşın erişkinlerde bu oran %2 ile oldukça düşüktür (113).

Çalışmamızda akut İTP'lı 22 kız (%43) ve 29 erkek (%57) olmak üzere 51 hastanın yaş ortalaması 5.5 ± 3.62 yıl, kronik İTP grubunda 10 kız (%67) ve 5 erkek (%33) olmak üzere toplam 15 hastanın yaş ortalaması ise 11 ± 3.26 yıl olarak literatüre benzer şekilde bulundu. Kronik İTP grubunda kızların oranı erkeklere göre daha yüksek bulundu.

İki yaş altında akut İTP (infantil İTP) tanısı alan 5 vakadan 1 olgu kız, 4 olgu erkek idi. Infantil İTP'da kronikleşme oranı daha fazla görülmektedir (18). Infantil İTP erkeklerde daha sık görülmektedir (18,41). Çalışmamızda infantil İTP tanısı alan erkek hastalar (4:1) oranında görüldü. Ancak infantil İTP tanısı alan olgularımızda kronikleşme gözlenmedi.

İdiyopatik trombositopenik purpurada, trombositopeni dışındaki kan sayımı verileri genellikle normal sınırlarda bulunur. Fakat hastalarda gözlenebilen kanama miktarına bağlı değişebilen seviyede anemi, viral veya bakteriyel enfeksiyonlara bağlı lenfositoz, lökositoz ve ayrıca da eozinofili saptanabilir (2,20). Çalışmamızda beyaz küre sayısı ve Hb değerleri açısından; kontrol grubu, akut İTP ve kronik İTP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Kanamaya bağlı anemi, sadece akut İTP grubundan bir hastada gözlenirken, kronik İTP grubunda ise

gözlenmedi. Çocuklarda intrakranial kanama insidansı %0.2-1 arasındadır (113). Çalışmaya alınan olguların hiçbirinde intrakraniyal kanama gözlenmedi.

Trombositlerin hemostaz, koagülasyon ve trombozda önemli rolü vardır. Hemorajiyi önlemek için kompleks biokimyasal ve moleküler aktiviteleri olduğu bilinmektedir (114). Kemik iliğindeki üretim faktörlerinin de etkisiyle, megakaryositlerden serbestleşen trombositlerin hacimleri heterojenite gösterir. Trombopoezin arttığı durumlarda, dolaşımda genç trombositlerin artmasına bağlı olarak MPV'nin de yükseldiği gösterilmiştir. Ortalama trombosit hacmi artmış ise, makrotrombositler mevcut olup İTP ya da trombosit döngüsünün arttığı yaygın damar içi pıhtılaşması, Bernard-Soulier sendromu ve May-Hegglin anomalisi gibi durumlar düşünülür. Malign hastalıkların kemik iliğini tuttuğu durumlarda ya da hiposelüler kemik iliğinde normal MPV görülür. Ortalama trombosit hacminin azaldığı mikrotrombositler; Wiscott Aldrich sendromu, TAR sendromu ve demir eksikliği anemisi gibi durumlarda gözlenir. Ortalama trombosit hacminin demir eksikliği anemisinde artmış olarak saptandığı çalışmalar da vardır (79,115,116).

Klinik olarak İTP'da olduğu gibi, trombosit ömrünün azaldığı durumlarda boyut ve yoğunluğun genç trombosit popülasyonu ile korele olarak arttığı belirlenmiştir. Daha yoğun granüller içeren büyük trombositler daha fazla biyokimyasal, fonksiyonel ve metabolik yeterlilik taşırlar. Ortalama trombosit hacminde artma, megakaryositlerin sayıca artış göstermesi ve büyümesi ile de ilişkilidir (115,116).

Çalışmamızda ortalama trombosit sayısı açısından, akut ve kronik İTP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Ancak kontrol grubundan daha düşük olduğu ve bu farkın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. Akut İTP tanısı alan 51 olgudan 41'inde (% 80.4) trombosit sayısı <20.000 /mm³ olarak saptandı. Düşük trombosit sayılarına rağmen hiçbir olguda intrakraniyal kanama gibi hayatı tehdit eden kanamaya rastlanılmadı.

Trombositopeni olan olgularda MPV'nin yükselmesi, azalmış trombosit ömrü ile azalmış trombosit yapımını birbirinden ayırmaya yardımcı olmaktadır. Ancak kan örneğinin alınması ve antikoagülasyonunda standart bir tekniğin uygulanmaması, tekniğe bağlı olarak ölçüm sonuçlarının değişkenliği, çalışmalar arasında karşılaştırmalı yorum yapılabilmesini güçleştirmektedir (116). Çalışmamızda

ölçülebilen MPV değerleri incelendiğinde her 3 gruptaki olguların tamamında MPV değerinin normal sınırlarda (7.4-11.2 fl) olduğu saptandı. Akut İTP ve kronik İTP'lı hastaların MPV değerleri kontrol grubunun MPV değerlerine göre daha yüksek, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Ölçülen MPV değeri ısıdan ve kullanılan antikoagülana bağlı değişiklik gösterebilmektedir. Tam kan sayımı örneklemede antikoagülan olarak kullanılan EDTA'nın intrasellüler siklik AMP'yi arttırdığı ve plazma membranının geçirgenliğini değiştirdiği düşünülmektedir. Trombositlerin şişmesi ve yoğunluğundaki azalma, açıklık-impedansı ile ışık saçan metodların birbiri arasında gözlenen MPV değerindeki farklılığı açıklamaktadır. Etilendiaminetetraasetikasıit'in MPV üzerindeki etkileri ilk 7 saatte en fazla olup, 24 saat sonra stabilize olmaktadır. Örneklerin kan alındıktan 24-48 saat sonra (trombosit şişmesi durduğunda) çalışılması ise hata payını azaltabilir (117-119). Bizim çalışmamızda MPV değerlerinin tüm gruplarda 8 fL'nin üstünde ve normal sınırlarda bulunmasının nedeni; kan örneklerinin EDTA'lı tüplere alınması ve alınan kanın standart bir süre bekletilmemesinden kaynaklanabilir.

Trombosit dağılım aralığı, eritrosit dağılım aralığı kavramına benzer tarzda trombosit hacim farklılığının belirteçidir. Ortalama trombosit hacmi ile birlikte PDW'nin değerlendirilmesi trombosit hacim dağılımının daha iyi tanımlanmasını sağlar. Trombosit hacmindeki farklılık dolaşımdaki trombositlerin yaşlanmasından çok megakaryositlerin farklı ayrışması sonucudur (120,121).

Akarsu ve ark. (122) değişik hastalık gruplarında trombosit hacim değişkenlerini değerlendirdiği çalışmada, hasta grubundan kan hastalıkları içinde MPV değerleri açısından anlamlı farklılık olmasa da, PDW değerleri açısından akut lösemi-İTP, akut lösemi-aplastik anemi, aplastik anemi-demir eksikliği anemisi, İTP-demir eksikliği anemisi arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptamışlardır. Bu durum tanı anında trombosit PDW değerleri iyi değerlendirilirse lösemi-İTP ve lösemi-aplastik anemi gibi trombositopeni ile seyreden kan hastalıkları ayırımının yapılabilir olması anlamını taşımaktadır. Ortalama trombosit hacmi ve PDW değerleri bakımından, kronik İTP tanılı olguların akut İTP grubundan daha yüksek olduğunu tesbit etmişlerdir. Bu bulgu aynı grup altında anılan hastalıklarda bile trombositlerin farklı şekilde etkilendiğinin ve işlevlerinin birbirlerinden farklı olabilmesi durumunu

gösterebilir. Trombositlere ait PDW değerinin ayırıcı tanıda daha önemli olduğu dikkati çekmektedir. Çalışmamızda trombosit dağılım aralığı kronik İTP olgularında kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu. Ancak tüm gruplarda PDW değerleri referans değerden daha düşük bulundu.

İdiyopatik trombositopenik purpura patogeneğinde en fazla otoimmün mekanizma sorumlu tutulmaktadır (2). Diğer mekanizmalar arasında bozulmuş trombosit yapımı, kompleman bağımlı mekanizma ile trombolizis ve antikora bağımlı olarak gelişen oksidan bir ürün hidrojen peroksidin hücre hasara neden olması ileri sürülmüştür (3-6,8). Oksidatif stres, serbest radikal (prooksidan) ile antioksidan sistem arasındaki dengenin, prooksidasyon lehine bozulması olarak tanımlanır. Normal hücre fonksiyonları ve hücre yapılarının bütünlüğü reaktif oksijen ürünleri ile bozulur. Prooksidan/antioksidan dengenin bozulması DNA gibi hücre molekülünde oksidatif hasara neden olan bir faktör olarak da düşünülür. Vücudun zararlı reaktif oksijen radikallerini temizleyen süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimatik ve vitamin C, E gibi nonenzimatik antioksidan mekanizmalara sahiptir. (16,17). Reaktif oksijen ürünleri otoimmün hastalıklar, kanser, immün disfonksiyon, kardiyovasküler ve infeksiyöz hastalıklar, diyabet ve nörodejeneratif patolojiler dahil çeşitli kronik ve dejeneratif hastalıkların patogeneğinde önemli bir faktör olarak durmaktadır (48,49,76,77).

Nitrik oksit, vücutta düzenleyici işlev gören küçük, reaktif bir serbest radikal moleküldür. Nitrik oksit, endotel, trombosit, vasküler düz kas hücresi ve nöronlardan salgılanmaktadır (11,12). Nitrik oksit vasküler düz kas gevşemesi, damar tonusu, serebral kan akımı, sistemik kan basıncının düzenlenmesi, monosit adhezyonu, trombosit agregasyonu inhibisyonu, trombogenezis gibi fizyolojik olaylarda görev alır (9,123). Nitrik oksit, hem aktive olmamış, hem de agregasyona uğramış trombositlerden salgınabilmektedir. Reaktif oksijen ürünleri ve antioksidanlar trombosit fonksiyonlarını değiştirebilmektedir. Trombositlerden ve diğer vasküler yüzeylerden üretilen reaktif oksijen ürünleri trombositlerin yanıtını etkiler. Süperoksit, uzun zincirli yağ asitlerinin hidroperoksid türevlerinden trombositler tarafından üretilmektedir. Süperoksit, trombositlerin agregasyon cevabını arttırmaktadır. Trombositlerde azalan antioksidan miktarı ise trombosit aktivasyon yanıtının artması ile ilişkilidir (123).

Nitrik oksit endojen L-arjininden NOS enzim sistemi tarafından sentezlenip sonrasında hızlı ve kararlı bir şekilde okside edilerek inaktif bileşikler olan nitrit ve nitrat gibi son ürünlere dönüşür (89). Nitrik oksit sentaz enziminin; nöronal NOS, indüklenebilir NOS, endotelial NOS olmak üzere 3 farklı izoformu mevcuttur. Bu izoform çeşitli dokularda yaygın olarak bulunmakta fizyolojik ve patolojik olaylarda görev almaktadır (9). Endotelial NOS trombositlerde ve megakaryoblastik hücrelerde tespit edilmiştir (123).

Vücutta NO konsantrasyonu düzenli olarak düşük seviyelerde dalgalanmalar gösterir. Nitrik oksit konsantrasyonu, eNOS ve nNOS tarafından kontrol edilmektedir. Bu iki enzimin sentezi posttranskripsiyonel seviyede kontrol edilirken, iNOS uygun uyarı veya NF-KB gibi transkripsiyonel faktörlere cevap olarak sentezlenir. İndüklenebilir NOS, kalsiyum ve uyarıcı ajanlardan bağımsız olduğundan, aktivitesi daha uzun sürmektedir. Bunlara bağlı olarak, iNOS'un ürettiği NO seviyesi, fizyolojik sınırların oldukça üstünde olmaktadır (93,94).

Yüksek seviyeye ulaşan NO, hücrel süperoksit anyon ($O_2^{\cdot-}$) varlığında ileri derecede toksik olan peroksinitrit molekülünün oluşmasına neden olur (94). Peroksinitrit oluşuktan sonra gelişen lipid peroksidasyonu, DNA fragmentasyonu, plazma antioksidanlarının azalması, protein hasarı ve endotelial düz kas gevşemesinin engellenmesi gibi nedenlerle hücrel hasar oluşabilir. Peroksinitritin oluşumu; süperoksit ile SOD üretimi ve NO üretimi/harcanması arasındaki dengeye bağlıdır. Düşük konsantrasyondaki NO, hücrel fonksiyonları pozitif yönde düzenlerken, yüksek konsantrasyonlarda hücre üzerinde toksik etkiler yaratabilir (94).

Trombositler nükleus ve DNA içermemelerine karşın hücrenin tüm fonksiyonlarını gösterirler (126). Trombosit membranı yaklaşık 7.5 nm kalınlığında ve 3 katlı bir yapıya sahiptir. Membranın dış yüzü kabarık ve düzensiz bir yüzey örtüsü olan glikokaliks ile kaplıdır. Bu katman çeşitli protein, glikoprotein, glikolipit ve mukopolisakkaritten oluşmuştur (22). Serbest oksijen radikalleri ve oksidan ajanlar, membranlardaki poliansatüre yağ asitlerini lipid peroksid radikallerini oluşturması için etkileyebilir (127). Peroksinitrit oluşumunun trombositlerin membranında lipid peroksidasyonuna neden olabileceği bunun da İTP'nin

patogenezinde söz edilen diğer mekanizmalar içinde oksidatif stresinde bulunabileceğini akla getirmektedir. İdiyopatik trombositopenik purpura patogenezinde oksidatif stresin rolü ile ilgili yapılan bir tez çalışmasında tanı anında oksidatif stresin arttığı, antioksidatif kapasitenin azaldığını bulunmuş. Ayrıca tanı anında yüksek OSİ saptanan olgularda hastalığın kronik seyir gösterebileceği vurgulanmış. Sonuç olarak İTP'nın patogenezinde artmış oksidatif stres ve azalmış antioksidan kapasitenin rol oynayabileceği ifade edilmiş (8). Polat ve arkadaşları (7); erişkin yaş grubunda İTP'da lipid peroksit, glutatyon ve askorbik asit seviyelerini araştırmışlar. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında lipid peroksit düzeyinin yüksek, glutatyon ve askorbik asit seviyelerinin ise düşük olduğunu bulmuşlardır.

Koedel ve Pfister (128) lipid peroksidasyonunun bakteriyel menenjitli hastalarda yüksek olduğunu, beyin omurilik sıvısı antioksidan enzimleri ve malondialdehidin menenjitli çocuklarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman arttığını bildirmişlerdir.

Erel ve arkadaşları (129) malaryalı (vivaks) hastalarda trombositlerin oksidatif stresi ve trombositopeni ile ilgili olarak yaptıkları bir çalışmada trombosit lipid peroksit düzeylerinin sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında oldukça yüksek olduğunu, trombosit lipid peroksit düzeyleri ve tam kan trombosit sayımı arasında anlamlı negatif bir korelasyon varlığını, buna karşılık antioksidan enzim aktivitesinin azaldığını saptamışlardır.

Nitrik oksitin sentezinden sorumlu olan eNOS enzimini kodlayan gende bugüne kadar tanımlanmış olan yaklaşık 161 TNP bulunmasına rağmen protein dizisinde değişiklik yapan tek polimorfizm Glu298Asp polimorfizmidir. Glu298Asp polimorfizmi proteinin primer yapısının bozulmasına ve enzimin fonksiyonunda değişikliğe neden olmaktadır (13).

Endotelial nitrik oksit sentaz genindeki polimorfizmler ile NO seviyesi arasında ilişki olup olmadığını araştırmak üzere yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar alınmıştır. Sağlıklı Türk popülasyonunda yapılan bir çalışmada ekzon 7 Glu298Asp polimorfizmi ile NO düzeyleri karşılaştırıldığında T alleli taşıyanlarda NO düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuş (130).

Veldman ve ark. (131) yaptığı çalışmada eNOS Glu298Asp gen polimorfizminin bazal NO salınımını azalttığını ve ateroskleroz veya hipertansiyon

gelişimi ile de ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Yoon ve ark (132) koroner arter hastalığı olanlarda yaptığı çalışmada ekzon7 Glu298Asp gen polimorfizminde TT genotipi ve T alleli taşıyanlarda anlamlı olarak daha düşük nitrit/nitrat (NOx) seviyesi saptanırken, aynı çalışmada intron 4 VNTR ve intron G10-T polimorfizmleri ile NOx düzeyleri arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır. Otoimmün hastalıkların patogeneğinde oksidatif stresin rolünün olduğu dikkate alındığında, otoimmün bir hastalık olan İTP’da NO düzeyini etkileyecek mekanizmaların hastalığın patogeneğinden sorumlu olabileceğı düşünölebilir.

İdiyopatik trombositopenik purpurada hangi faktörlerin hastalarda akut veya kronik İTP gelişmesinde rol oynayabileceğine dair ya da verilen tedaviye yanıtın göstergesi olabilecek çalışmalar yeni araştırma konularını oluşturmaktadır. İdiyopatik trombositopenik purpurada genetik faktörlerin rolü bu yeni araştırmalar arasındadır. Birçok otoimmün hastalık ile HLA antijenleri arasındaki ilişki bilinmektedir. HLA klas I veya HLA DR antijenleri ile kronik İTP arasındaki ilişki araştırılmış ancak çelişkili sonuçlar bildirilmiştir (133,134). İdiyopatik trombositopenik purpura tanısı alan, belli etnik gruplarda HLA-Drw2 ve DRB1-0410 allellerinin sıklığı yüksek bulunmuştur. İdiyopatik trombositopenik purpurada HLA-DRB1-1501 ile splenektomiye kötü yanıt arasında anlamlı bir ilişki bulunduğu bildirilmektedir (64).

İmmunoglobulin bağlayan reseptörlerin genetik polimorfizmleri, immunoglobulin bağlayan reseptörlerin afinitelerini değıştirmektedir. Bunlardan FcγRIIIA polimorfizmleri ile tedaviye yanıtın ilişkili olduğu öne sürölmüştür (65). Düşük affiniteli iki FcγR’ü FcγRIIIA ve IIIB ile proinflatuar sitokinler TNF ve LTA (lenfotoksin alfa)’nın gen polimorfizmlerinin çocukluk çağı kronik İTP’li olgular ile birlikteliğı gösterilmiş ve artmış proinflatuar veya Th1 immun yanıtın, kronik İTP’de antikor oluşumuna karşı koruyucu olduğu ileri sürölmüştür (135,136)

Kronik İTP tanılı hastalarda özellikle interferon gamma ilişkili genlerin ekspresyonunun belirgin bir şekilde arttığı ve bazı otoimmün hastalıklarda interferon gamma geninin ilk introndaki +874A/T polimorfizminin hastalık gelişimi ve klinik fenotipi etkileyebileceğı yapılan bir çalışmada vurgulanmıştır (137). Bu bilgiler ışığında interferon gamma +874A/T polimorfizminin; İTP etyolojisindeki rolü, hastalığın klinik seyri ve tedaviye yanıtındaki etkisini araştırmak amacıyla

Demircioğlu ve ark. (138) yapmış olduğu bir çalışmada 35 akut İTP, 40 kronik İTP'li hasta, 90 sağlıklı kontrol grubunda olmak üzere 3 grupta +874A/T polimorfizmi sıklığını değerlendirmişlerdir. AA, AT, TT polimorfizminin genotip sıklıkları açısından değerlendirildiğinde; gruplar arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Genotip sıklığı ve allel sıklığı açısından akut İTP ile kontrol grubu ve kronik İTP ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmuştur. Akut ve kronik İTP grupları arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Kronik İTP'li hastaların uzun dönem tedavi yanıtları ile interferon gamma +874A/T gen polimorfizmi arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Sonuç olarak; interferon gamma +874A/T gen polimorfizmi sıklığı akut ve kronik İTP'li olgularda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuş ve diğer otoimmün hastalıkların da literatür verileri de göz önüne alındığında +874A/T polimorfizminin akut ve kronik İTP etyopatogenezinde bir risk faktörü olabileceği düşünülmüştür.

Endotelyal NOS gen polimorfizmleri ile çeşitli hastalıklar arasında ilişki olup olmadığını saptamak amacıyla, farklı hastalık gruplarında mutasyon varlığı çalışılmıştır. Bunlar; koroner arter hastalığı, hipertansiyon, inme, diyabetik nefropati, non diyabetik son dönem böbrek hastalığına neden olan kronik glomerülonefritler, hipertansiyon, polikistik böbrek hastalığı, interstisyel nefrit gibi renal hastalıklar, otoimmün hastalıklardan; SLE, RA, Behçet hastalığı, sjögren sendromu, vaskülitler gibi hastalıklarda Glu298Asp polimorfizmi sağlıklı kontrollere göre belirgin olarak yüksek bulunmuştur (14,15,100-106). Özellikle birçok otoimmün hastalıkta eNOS polimorfizmi bakılmış olmasına rağmen, literatürde şimdiye kadar çocuk ve erişkinlerde akut veya kronik İTP'da eNOS aktivitesi ya da eNOS Glu298Asp polimorfizmi ile ilgili araştırmaya rastlayamadık.

Fatini ve ark. (139), akut koroner sendrom tanısı alan ve sağlıklı kişilerde eNOS genine ait Glu298Asp genotip dağılımları ve allel sıklıklarını hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı olarak farklı bulmuşlardır. Akut koroner sendrom tanısı alan hastalarda Glu/Glu genotipine sahip kişilerin sıklığı %38.8 oranında saptanırken, Glu/Asp genotip sıklığı %44.6, Asp/Asp genotip sıklığını ise %16.5 oranında bildirmişlerdir. Colombo ve ark. (140) italyan erken dönem koroner arter hastalarında; Glu/Glu genotip sıklığı %45.3, Glu/Asp genotip sıklığı %38.8, Asp/Asp

genotip sıklığı %15.9 ve sağlıklı kontrol grubunda Glu/Glu genotip sıklığı %42.1, Glu/Asp genotip sıklığı %51.8, Asp/Asp genotip sıklığı %6.1 olarak saptamışlardır.

Guldiken ve ark. (141) iskemik stroke tanısı alan 146 hasta ve 133 sağlıklı kontrol grubunda yaptığı çalışmada eNOS geni Glu298Asp polimorfizmi genotip dağılımı; hasta grubunda GG genotipi sıklığı %56.3, GT genotipi sıklığı %40.6, TT genotipi sıklığı %3.1, G allel sıklığı %76.6, T allel sıklığı %23.4, sağlıklı kontrol grubunda GG genotipi sıklığı %49.3, GT genotipi sıklığı %45.8, TT genotipi sıklığı %4.9, G allel sıklığı %72.2, T allel sıklığı %27.8 bulmuşlardır. Genotip TT ve allel T yokluğunda stroke riski düşük bulunmuştur. Ancak bu çalışma Türk popülasyonundaki iskemik stroke ve Glu298Asp polimorfizmi arasındaki olası ilişkiyi desteklememiştir. Elbaz ve ark. (142) yapmış olduğu bir çalışmada GG genotipinin serebral infarktli olgularda, kontrol grubuna göre daha fazla olduğu bulunmuş. Fransız popülasyonunda GG genotipi olanlarda laküner infarkt sıklığı diğer genotiplere göre daha fazla olduğu ve GG genotipi olanlarda yüksek LDL düzeyi ile yüksek stroke oranı bulmuşlardır.

Kim ve ark. (143) Kore’de Behçet hastalığı olan 65 hasta, vaskülitte birliktelik gösteren romatolojik hastalıklardan 27 hasta ve 80 sağlıklı kontrol grubunda eNOS geni Glu298Asp polimorfizmini değerlendirmişlerdir. Vaskülitte birliktelik gösteren romatolojik hastalık grubu; 15 hasta SLE, 2 hasta RA, 3 hasta takayasu arteriti, 3 hasta Henoch Schönlein purpurası, 2 hasta poliarteritis nodosa, 1 hasta Wegener granülomatozis, 1 hasta Churg Straus sendromundan oluşturulmuştur. Behçet hastalığında Glu/Glu genotipi sıklığı %68, Glu/Asp genotipi sıklığı %32, Asp/Asp genotipi sıklığı %0, vaskülit grubu Glu/Glu genotipi sıklığı %59, Glu/Asp genotipi sıklığı %30, Asp/Asp genotipi sıklığı %11, sağlıklı kontrol grubunda ise Glu/Glu genotipi sıklığı %89, Glu/Asp genotipi sıklığı %11, Asp/Asp genotipi sıklığı %0 olarak bulunmuştur. Glu allel sıklığı Behçet hastalığında %84, vaskülitli hasta grubu %74, kontrol grubunda %94, Asp alleli sıklığı ise Behçet hastalığında %16, vaskülitli hasta grubu %26, kontrol grubunda %6 bulundu. Vaskülitli hasta grubundan SLE’li hastalarda miyokart infarktüs insidansı, yaşla ilişkili kontrollere göre 50 kat daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Bu hastalarda okluzif koroner hastalık; vaskülit, tromboz ve aterosklerozdan kaynaklanabilir. Sonuç olarak eNOS

genindeki Glu298Asp polimorfizmi ile Behçet hastalığının veya vaskülitli romatolojik hastalıkların arasında anlamlı korelasyonun olduğu bulunmuştur.

Balat ve ark. (144) primer enorezis nokturna tanısı alan 57 hasta ve 114 sağlıklı kontrol grubunda yaptığı eNOS genindeki Glu298Asp polimorfizmi ile ilgili genotip sıklığı sonuçları hasta grubunda GG genotipi sıklığı %48, GT genotipi sıklığı %33, TT genotipi sıklığı %19, sağlıklı kontrol grubunda ise GG genotipi sıklığı %61, GT genotipi sıklığı %26, TT genotipi sıklığı %13 bulmuştur. Endotelyal nitrik oksit sentaz gen polimorfizminin pozitif aile hikayesi, enorezisin sıklığı ve desmopressine klinik yanıtla ilişkisi olmadığı görülmüştür.

Bizim çalışmamızda toplam İTP grubunda GG genotipi sıklığı %40.9, GT genotipi sıklığı %48.5, TT genotipi sıklığı %10.6, akut İTP grubunda GG genotip sıklığı %39.2, GT genotip sıklığı %51 ve TT genotip sıklığı % 9.8 olarak, kronik İTP grubunda ise GG genotip sıklığı %46.7, GT genotip sıklığı %40 ve TT genotip sıklığı %13.3, bulundu. Sağlıklı kontrol grubunda ise GG genotip sıklığı %21.7, GT genotip sıklığı %70 ve TT genotip sıklığı %8.3 olarak bulundu. Mevcut sonuçlar dikkate alındığında GG genotipi toplam İTP, akut İTP ve kronik İTP grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. GG genotipi sıklığı en yüksek kronik İTP’de gözlenirken, en düşük sağlıklı kontrol grubunda bulundu. Kronik İTP grubundaki genotip dağılımı, Colombo ve ark. (140)’nın hasta grubu sonuçlarıyla benzerdir. Kronik İTP’da GT genotipi sıklığı, Guldiken ve ark. (141) hasta grubundaki GT genotipi sıklığına benzerdir.

Türkiye’de yapılan çalışmalardan Balat ve ark. (144) ile Guldiken ve ark. (141)’nın sağlıklı kontrol grubunda GG genotipi daha sık görülürken, bizim çalışmamızda GT genotipi daha sık bulunmuştur. Bu çalışmalarda olduğu gibi TT genotipinin sağlıklı kontrol grubunda en az görülmesi ise bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Tüm gruplar içinde TT genotipi sıklığının en fazla olduğu grubun kronik İTP olduğu dikkat çekmektedir.

İnfant İTP tanısı alan 5 olgumuzdan, 3 olguda GG genotipi, 2 olguda GT genotipi gözlemlendi. İnfant İTP olgularımızdan kronikleşen olmadı. İnfant İTP tanısı alan hastalarda olgu sayısının az olması nedeniyle anlamlı bir sonuç elde edilmedi.

Çalışmamızda bulunan gruplardaki G allel sıklığı dikkate alındığında; toplam İTP grubunda %65.1, akut İTP grubunda %64.7, kronik İTP grubunda %66.7,

kontrol grubunda %56.7 olarak bulundu. Toplam İTP, akut İTP, kronik İTP gruplarında G allel sıklığı kontrol grubuna göre 3 grupta da yüksek bulundu. G alleli en yüksek oranda kronik İTP grubunda görüldü.

Çalışmamızda bulunan gruplardaki T allel sıklığı dikkate alındığında; toplam İTP grubunda %34.8, akut İTP grubunda %35.3, kronik İTP grubunda %33.3, kontrol grubunda %43.3 olarak bulundu. Kontrol grubunda T allel sıklığı diğer gruplara göre daha yüksek bulunurken, kronik İTP grubunda ise diğer gruplara göre daha düşük bulundu.

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde; eNOS geni Glu298Asp polimorfizmi G alleli sıklığının İTP'da sağlıklı kontrol grubuna göre daha sık görülmesi ile G allelinin İTP etyopatogenezinde bir risk faktörü olabileceğini düşündürmüştür. Kronik İTP grubunun GG genotipinin sıklığının tüm gruplar içinde en yüksek oranda görülmesi ile GG genotipinin kronikleşmeye eğilimi arttırdığı yorumu yapılabilir.

İdiyopatik trombositopenik purpura tedavisinde tedavinin amacı uzun süren epistaksis, menoraji, hematüri ve gastrointestinal sistem kanamalarında kan kaybı riskini azaltmak ve intrakranial kanama riski nedeni ile trombosit sayısının $20.000/\text{mm}^3$ altında olanlarda yakınmaların derecesi ne olursa olsun tedavi başlanması gerektiği konusunda görüş birliği vardır. Tedavi ile özellikle ilk saatlerde trombosit sayısını yükseltmek ve trombosit sayısını güvenilir düzeyde devam ettirmek hedeflenir. Tedavinin ilk 48 saati içinde trombosit sayısında hızlı artış yapması nedeni ile en sık kullanılan ilaçlar yüksek doz İVİG ve yüksek doz steroid kullanımı tercih edilmektedir (20,69,80).

Çalışmamıza dahil edilen olguların büyük bir kısmında trombosit sayısının $20.000/\text{mm}^3$ altında olması ve genelde aile eğitiminin yetersiz olması nedeniyle tüm olgularımız hastaneye yatırılarak tedavi başlandı. Tedaviye başlarken amacımız ucuz, yan etkisi az, trombositlerde daha hızlı yükseliş sağlayacak, hastanede kalış süresini azaltacak bir ilaç tedavisi başlamaktır. Olgularımızdan, akut İTP grubundan 3 hasta hariç ($\text{Plt} > 50.000/\text{mm}^3$ olması nedeniyle) tümüne tedavi başlanmıştır.

Tedavi sonuçları değerlendirilirken; trombosit sayısının $100.000/\text{mm}^3$ ve üzerinde olması tam cevap, $50-100.000/\text{mm}^3$ arasında olması kısmi cevap, tedavi gereksinimi olmadan $50.000/\text{mm}^3$ altında olan veya ilave bir tedaviye ihtiyaç duyulan durumda ise cevapsızlık ya da refrakterlik olarak kabul edildi (145,146).

Buna göre; akut İTP grubunda tedavi verilen 48 hastadan 30'unda (%62.5) tedaviye yanıt alındı, bir hastada (%2.1) kısmi yanıt alındı ancak ikinci kez tedavi verilmedi, 17 hastada %35.4 tedaviye yanıt alınamadı ve bunlara ikinci kez tedavi verildi. Tedaviye yanıt alınan 30 olguda, GG genotipi %36.6 (11 olguda), GT genotipi %46.6 (14 olguda), TT genotipi %16.8 (5 olguda) oranında görüldü. Tedaviye yanıt veren 30 hastadan çoğunun (14 olgu) GT genotipine sahip olduğu görüldü. Ancak TT genotipine sahip olan 5 hastanın hepsinde (%100) tedaviye tam yanıt gözlenirken, bu oran GG genotipine sahip 20 olgudan 11'inde %57.9 oranında, GT genotipine sahip 26 olgudan 14'ünde %58.3 oranında bulunmuştur.

Çalışmamızda hastalara aynı tip tedavi protokolü uygulanmayıp, rastgele seçim yapılmıştır. Akut İTP grubunda tedavi alan GG genotipine sahip toplam 20 hastadan 4'ü YDMP (yüksek doz metilprednizolon) almış, 2 hastada (%50) yanıt alınırken, bir hastada yanıt alınamamıştır. Aynı grupta 3 hasta SDMP (standart doz metilprednizolon) almış, iki hastada (%66.6) yanıt alınırken bir hastada yanıt alınamamıştır. İntravenöz immunglobulin tedavisi alan 5 hastada (%100) tedaviye tam yanıt alınmıştır. Anti-D alan 7 hastanın 2'sinde (%28.5) yanıt alınmış, 4 hastada yanıt alınamamış, diğerinde ise kısmi yanıt alınmıştır. Tedaviye yanıt bakımından en yüksek oran İVİG'de (%100) bulunurken, en düşük oran anti-D'de (%28.5) bulundu. Yani GG genotipine sahip olanların İVİG ve SDMP tedavisine olan yanıtları daha iyi görünürken, anti-D'ye olan yanıtı düşük düzeydedir.

Akut İTP'lı tedavi alan olgulardan GT genotipine sahip toplam 24 olgu sırasıyla; YDMP alan 6 olgunun, 5'inde (%83.3), İVİG alan 10 olgunun 8'inde (%80), Anti-D alan 5 olgudan, bir olguda (%20) yanıt alınırken, SDMP alan 3 olgunun hiçbirinden (%0) yanıt alınamamıştır. Toplam 24 olgunun 14'ünde (%58.3) yanıt alınırken, 10 olguda (%41.7) yanıt alınamamıştır. Tedaviye yanıt bakımından en yüksek oran YDMP'de (%83.3) bulunurken, en düşük oran SDMP'da (%0) bulundu. Bu sonuçlara bakılarak GT genotipine sahip bireylerin YDMP ve İVİG tedavisine daha iyi yanıt verdiği, SDMP'a daha düşük yanıt verdiği düşünülebilir.

Akut İTP grubunda tedavi alan TT genotipine sahip 5 olgunun tamamında verilen tedavilere tam yanıt alınmıştır. Bunlar 1 olgu YDMP, 1 olgu SDMP, 1 olgu İVİG, 2 olgu anti D tedavisi almışlardır. Akut İTP tanısı alan hastalarda TT genotipi bulunanlarda medikal tedaviye yanıtlarının mükemmel olduğu düşünülebilir.

İdiyopatik trombositopenik purpurada kronikleşme oranı % 15-20 arasında değişmektedir (17,18). Bizim çalışmamızda (66 olgudan, kronik İTP olgu sayısı 15) bu oran %22.7 olarak bulunmuştur.

Kronik İTP grubundaki 15 olgudan, 7 olgu (%46.7) GG genotipine, 6 olgu (%40) GT genotipine, 2 olgu ise (%13.3) TT genotipine sahipti. Bu gruptaki 15 olgunun ilk tanı anında aldığı tedaviye 3 (%20)'ünde yanıt alınmıştır. Yanıt alınan bu 3 olgu GG genotipine sahipti. Hastaların 8 (%53.3)'inde tedaviye yanıt alınamadı. Yanıt alınamayan olguların 4'ü GT genotipine, 3'ü GG genotipine, biri TT genotipine sahipti.

Kronik İTP grubunda, GG genotipi gösteren 6 hastadan; 4 hasta YDMP, 1 hasta SDMP, 1 hasta IVIG tedavisi aldı. Kronik İTP'da tedaviye yanıt alınan 3 olguda İVİG tedavisi almıştı. İntravenöz immunglobülin tedavisine kısmi yanıt veren olgu ise ikinci tedavisinde anti-D'ye yanıt gösterdi. Standart doz metilprednizolon alan birinci hastada medikal tedaviye yanıt alınamayınca splenektomi yapıldı, ikinci hastada SDMP'a kısmi yanıt alınması üzerine ikinci tedavisinde uygulanan İVİG tedavisine yanıt alınmıştır. Anti-D tedavisi alan hastanın ikinci tedavisinde İVİG sonrası yanıt alınmıştır. Bunların sonucunda; splenektomi olan olgu dışında kronik İTP grubunda GG genotipinin medikal tedaviye iyi yanıt verdiği düşünülebilir.

Kronik İTP grubunda, GT genotipi gösteren 6 hastadan; 4 hasta YDMP, 1 hasta SDMP, 1 hasta IVIG tedavisi aldı. Hastalardan YDMP alan 2 olguda yanıt alınamadı, 2 olguda ise kısmi yanıt alındı. Kısmi yanıt alınan hastalar takiplerinin devamında farklı tedavi seçeneklerinde yanıt alındı. Yanıt alınmayan iki olgudan, birincisi vinkristine tam yanıt gösterirken, ikinci olgu hiçbir medikal tedaviye tam yanıt göstermeyince splenektomi yapıldı. Hastalardan SDMP verilen 1 olgu medikal tedavilerden hiçbirine yanıt vermeyince splenektomi yapılmıştır. İntravenöz immunglobulin alan hasta ise ikinci tedavisine kısmi yanıt vermiştir. Kronik İTP grubunda, GT genotipine sahip hastaların ilk tedavilerinde medikal tedaviye kısmi yanıt veya hiç yanıt vermediği, takip eden tedavilerinde ise 3 hastada İVİG, vinkristin, anti-D'ye yanıt alındığı, diğerlerinde yanıt alınmadığı ve medikal tedaviye yanıt vermeyen 2 olguda da splenektomi uygulanması GT genotipinin tedaviye direnç gösterdiğini düşündürülebilir.

Kronik İTP grubunda TT genotipi gösteren 2 hastanın birincisi YDMP tedavisine yanıt vermeyince verilen İVİG tedavisine kısmi yanıt vermiştir. İkinci olgu ise SDMP tedavisine kısmi yanıt sonrası verilen İVİG tedavisine yanıt vermemiştir.

Sonuç olarak; eNOS geni Glu298Asp polimorfizmi açısından akut İTP ve kronik İTP grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmuştur. Genel olarak idiyopatik trombositopenik purpurada GT genotipi en fazla gözlenmektedir. Kronik İTP’da GG genotipi sıklığının anlamlı olarak yüksek oranda bulunması, GG genotipine sahip bireylerin kronikleşme eğilimi gösterebileceği düşünülebilir. Tedavi açısından GG genotipi olan akut ve kronik İTP olgularının medikal tedaviye iyi yanıt verdiği ve İVİG ile bu grupta yüksek oranda başarı sağlandığı için, GG genotipi olan olgularda İVİG ilk tercih olarak kullanılmalıdır. GG genotipi olan olgularda anti-D tedavisi alanların ise başarı oranı düşük olduğu için bu grupta anti-D son tercih olarak kullanılmalıdır. Akut İTP grubunda GT, TT genotipi olanlarda da medikal tedaviye yanıt iyi iken, kronik İTP grubunda GT ve TT genotipi olanlar medikal tedaviye dirençli görülmektedir. Bu bilgilerin ışığı altında, G alleli varlığının İTP’da tedaviye yanıtta olumlu etkisinin olduğu, ancak kronik İTP’ya eğilimi arttırdığı, T alleli varlığı ise kronik İTP’lı hastaları medikal tedaviye daha dirençli kıldığı görüldü. Bizim olgularımızda eNOS geninin Glu298Asp polimorfizmi ile İTP arasında anlamlı bir korelasyonun olduğu ve eNOS Glu298Asp polimorfizminin akut ve kronik İTP etyopatogenezinde bir risk faktörü olabileceği düşünüldü.

5. KAYNAKLAR

1. Lilleyman JS. Management of childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1999; 105:871-875
2. Montgomery RR, Scott JP. Platelet and Blood Vessel Diseases. Behram RE, Kliegman, Jenson HB (editors). *Nelson Textbook of Pediatrics*. 17th Edition, Philadelphia; Saunders 2004; 1670-1671.
3. Dilber C. İdiopatik Trombositopenik Purpura, Türkiye Klinikleri Pediatrik Bilimler Pediatrik Hematoloji Özel sayısı 2005; 1:48-51.
4. Taub JW, Warrier I, Holtkamp C, Beardsley DS, Lusher JM. Characterization of autoantibodies against the platelet glycoprotein antigens IIb/IIIa in childhood idiopathic thrombocytopenia purpura. *Am J Hematol* 1995; 48:104-107.
5. Ballem PJ, Segal GM, Stratton JR, Gernsheimer T, Adanson JW, Slichtee SJ. Mechanisms of thrombocytopenia in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. Evidence of both impaired platelet production and increased platelet clearance. *J Clin Invest* 1987; 80:33-40.
6. Wentworth P Jr, Jones LH, Wentworth AD, Zhu X, Larsen NA, Wilson IA, et al. Antibody catalysis of oxidation of water. *Science*, 2001; 293:1806-1811.
7. Polat G, Tamer L, Tanrıverdi K, Gürkan E, Başlamışlı F, Atık U. Levels of malondialdehyde, glutathione and ascorbic acid in idiopathic thrombocytopenic purpura. *East Afr Med J* 2002; 79:446-449.
8. Varol Fİ. idiyopatik trombositopenik purpura tanılı çocuklarda oksidatif Stres ve antioksidan durum. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, 2007.
9. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357:593-615.
10. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987;2:1057-1058
11. Garg U, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibits mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83:1774-1777.
12. Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunol Today* 1992; 13:157-160.
13. Tesaro M, Thompson WC, Rogliani P, Oi L, Chaudhary PP, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci*, 2000; 97:2832-2835.
14. Serrano NC, Paez C, Correa PA, Anaya JM. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 2004; 31:2163-2168.
15. Vazgiourakis V, Sidiropoulos P, Bertias G, Koutsounaki E, Fragouli E, Raptopoulou A, et al. Association of the nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphism with increased risk for both lupus glomerulonephritis and rheumatoid arthritis in a single genetically homogeneous population. *Lupus* 2007; 16:867-874.

16. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease:curiosity, cause or consequence? *Lancet* 1994; 344:721-724.
17. Aust AE, Eveleigh JF. Mechanisms of DNA oxidation. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 344:246-252.
18. Lanzkowsky P. Disorders of platelets. Lanzkowsky P. *Manuel of Pediatric Hematology and Oncology*, Fourth Edition. California; Acedemic Press. 2005; 250-263.
19. Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look AT. Acquired Platelet Defects. Nathan DG, Orkin SH (eds). *Nathan and Oski's hematology of Infancy and Childhood*. 6th ed. Philadelphia:W.B. Saunders, 2003;1597-1609.
20. Beardsley DS, Nathan DG. Platelet Abnormalities in Infancy and Childhood. Nathan DG, Orkin SH. *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*. 5th Edition. Philadelphia; Lippincott Williams and Wilkins, 1998; 1590-1600.
21. White JG, Gerrard JM. Ultrastructural features of abnormal blood platelets. *Am J Pathol* 1976; 83:590-614.
22. Collier BS. Biochemical and electrostatic considerations in primary platelet aggregation. *Ann NY Acad Sci* 1984; 416:693-708.
23. Zwed RF, Hemker HC. Blood cell membranes and hemostasis. *Hemostasis* 1982; 11:12-39.
24. White JG, Glawson CC. Overview article: Biostructure of blood platelets. *Ultrastruct Pathol* 1980; 1:533-558.
25. Martin JH, Carson FL, Race GJ. Calcium- containing platelet granüles. *J Cell Biol* 1974; 60: 775-777.
26. Vicari A, Banfi G, Bonini PA. EDTA dependent pseudothrombocytopenia:12-month epidemiological study. *Scand J Clin Lab Invest* 1988; 48:537.
27. Racchi O, Rapezzi D. Megatrhrombocytes and spurious thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2001; 66:140.
28. Solanki DI, Blackburn BC. Spurious leukocytosis and thrombocytopenia. A dual phenomenon caused by clumping of platelets in vitro *JAMA* 1983; 250:2514.
29. Bizzaro N. EDTA dependent pseudothrombocytopenia: A clinical and epidemiological study of 112 cases with 10-year follow up. *Am J Hematol* 1995; 50:103.
30. Schrezenmeier H, Muller H, Gunsilius E, Heimpel H, Seifried E. Anticoagulant-induced pseudothrombocytopenia and pseudoleucocytosis. *Thromb Haemost* 1995; 73:506-513.
31. Lowe EJ, Buchanan GR. Idiopathic thrombocytopenic purpura diagnosed during the second decade of life. *J Pediatr* 2002; 141:253-258.
32. Medeiros D, Buchanan GR. Major hemorrhage in children with idiopathic thrombocytopenic purpura: immediate response to therapy and long-term outcome. *J Pediatr* 1998; 133:334-339.
33. Freedman J. ITP: An overview of the conference and future directions with an abbreviated ITP history. *J Pediatr Hematol/Oncol* 2003; 25:77-84.
34. Harrington W, Minnich V. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med* 1951; 38:1-10.
35. Harrington WJ, Sprague CC, Minnich V, Moore CV, Aulvin RC, Dubach R. Immunologic mechanisms in idiopathic and neonatal thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med* 1953; 38:453-465.

36. Shulman NR, Marder VJ, Weinrach RS. Similarities between known antiplatelet antibodies and the factor responsible for thrombocytopenia in idiopathic purpura: physiologic, serologic and isotopic studies. *Ann NY Acad Sci* 1965; 124:499-542.
37. Shulman NR, Weinrach RS, Libre EP, Andrews HL. The role of the reticuloendothelial system in the pathogenesis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Trans Assoc Am Physicians* 1965; 78:374-90.
38. Van Leeuwen EF, van der Von JTH, Engelfriet CP, von dem Borne AEG. Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. *Blood* 1982; 59:23-26.
39. Atabay B. Immune (Idiopathic) thrombocytopenic purpura: Pathophysiology, diagnosis and treatment . *SSK Tepecik Hast Derg* 2003;13:63-74.
40. Yetman RJ. Evaluation and manamegent of childhood idiopatic (immune) thrombocytopenia. *J Pediatr Health Care* 2003; 17:261-263.
41. Kuhne T, Buchanan GR, Zimmerman S, Michaels LA, Kohan R, Berchtold W, Imbach P. Intercontinental Childhood ITP Study Group: A prospective comparative study of 2540 infants and children with newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura from the intercontinental Childhood ITP Study Group. *J Pediatr* 2003; 143:605-608.
42. Blanchette V, Carcao M. Approach to the investigation and management of immune thrombocytopenic purpura in children. *Semin Hematol* 2000; 37:2991-3006.
43. Kunhe T. Idiopathic thrombocytopenic purpura of childhood: A problem-oriented review of the management. *Transfusion and Apheresis Scienc* 2003; 28:243-248.
44. Burdach SEG, Guersen RG. Mechanisms of intravenous immunoglobulin treatment in childhood acute idiopathic thrombocytopenic purpura. *Pediatr Res* 1985; 19:259A.
45. Bussel JB, Cines D. Immune thrombocytopenic purpura, neonatal alloimmune thrombocytopenia and posttransfusion purpura. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al. *Hematology: Basic Principles and Practice*. New York, NY, Churchill Livingstone, 1999; 2096-2114.
46. Bussel J. Fc reseptor blockade and immune thrombocytopenic purpura. *Seminars in Hematology* 2000 37; 3:261-266.
47. Tsubakio T, Tani P, Curd JG, McMillan R. Complement activation in vitro by antiplatelet antibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1986; 63:293-300.
48. Mris CJ, Earl JR, Trenam CW, Blake DR. Reactive oxygen species and iron a dangeorus partnership in inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 1995; 27:109-122.
49. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul JM et al. Oxygen radicals and human disease. *Ann Int Med* 1987; 107:526-545.
50. Aziza T, Corina E. Treatment of immune thrombocytopenic purpura in children. *Pediatr Drugs* 2005; 7:325-336.
51. Di Paola J, Buchanan G. Immune thrombocytopenic purpura. *Pediatr Clin N Am* 2002;49:911-928.
52. Gianani R, Sarvetnick N. Viruses, cytokines, antigens and autoimmunity. *Natl Acad Sci* 1996; 93:2257-2259.
53. Barnaba V. Viruses, hidden self-epitopes and autoimmunity. *Immunol Rev* 1996; 152:47-66.

54. Zhou B, Zhao H, Yang RC, Han ZC. Multi-dysfunctional pathophysiology in ITP. *Critical Rev in Oncol/Hematol* 2005; 54:107-116.
55. Oldstone MB. Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *FASEB J* 1998; 12:1255-1265.
56. Wright JF, Blanchette VS, Wang H, Arya N, Petric M, Semple JW, et al. Characterization of platelet reactive antibodies in children with varicella-associated acute immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1996; 95:145-152.
57. Shevach EM. Organ specific autoimmunity In: Paul WE, editor. *Fundamental immunology* .4th Edition. Philadelphia, PA:Lippincott Raven Publishers; 1999:1089-1125.
58. Semple J, 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; 87:4245-4254.
59. Nugent DJ. Childhood immune thrombocytopenic purpura. *Blood Rev* 2002;16:9-27.
60. Ma D, Zhu X, Zhao P, Zhao C, Li X, Zhu Y, et al. Profile of Th17 cytokines (IL-17, TGF-beta, IL-6) and Th1 cytokine (IFN-gamma) in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol* 2008; 87:899-904.
61. Chang M, Nakagawa P, Schwartz M. Inhibition of in vitro megakaryocytopoiesis by distinct ITP plasma subgroups. *Blood* 2000; 96:627a.
62. Emmons RVB, Reid DM, Cohen RL, Meng G, Young NS, Dunbar CE, et al. Human thrombopoietin levels are high when thrombocytopenia is due to megakaryocyte deficiency and low when due to increased platelet destruction. *Blood* 1996; 87:4068-4071.
63. Dame C. Thrombopoietin in thrombocytopenias of childhood. *Semin Thromb Hemost* 2001; 27:215-225.
64. Douglas B, Blanchette VS. Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 2002; 346:13:995-1008.
65. Kim TT, Inova M, Shimomura T, Fujimura K. Involment of Fc receptor polymorphism in the therapotic response of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1984; 56:287.
66. Fujimoto BS, Song KS. Genetic polymorphism of human platelet spesific antigen spesific (HPA) in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost Suppl* 1997; PS 1037.
67. Devecioğlu Ö. Kanama ve pıhtılaşma bozuklukları. Neyzi O, Ertuğrul T. *Pediatrici*, 3.Baskı İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2002; 2:1078-1082.
68. Farrington P, Pugh S, Colville A, Flower A, Nash J, Morgan C P, et al. A new method for acute surveillance of adverse events from diphtheria/tetanus/pertussis and measles/mumps. *Lancet* 1995; 345:567-69.
69. George JN, Woolf SH, Raskob GE, Wasser JS, Aledort LM, Ballem PJ, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: A practice guideline developed by explicit methods for the american society of hematology. *Blood* 1996; 88:3-40.
70. Medeiros D, Buchanan GR. Current controversies in the management of idiopathic thrombocytopenic purpura during childhood. *Pediatric Clin N Am* 1996; 43:757-772.
71. Buchanan GR, Adix L. Outcome measures and treatment endpoints other than platelet count in childhood ITP. *Semin Thromb Hemost* 2001; 27:277-285.

72. Crosby WH . Wet purpura, dry purpura. JAMA 1975; 232:744-745.
73. Bolton-Maggs PHB. Current topic: Idiopathic thrombocytopenic purpura. Arch Dis Child 2000; 83:220-222.
74. Kenet G, Lubetsky A, Shenkman B, Tamarin I, Dardik R, Rechavi G, et al. Cone and platelet analyser (CPA): new test for the prediction of bleeding among thrombocytopenic patients. Br J Haematol 1998; 101:255-259.
75. Buchanan GR. ITP: How much treatment is enough ? Contemporary Pediatric 2000; 4:112.
76. Adams DM, Kinney TR, O'Branski-Rupp E, Ware RE. High-dose oral dexamethasone therapy for chronic childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. J Pediatr 1996; 128:281-283.
77. Medeiros D, Buchanan GR. Idiopathic thrombocytopenic purpura: beyond consensus. Curr Opin Pediatr 2000; 12:4-9.
78. Imbach P, Berchtold W, Mueller-Eckhardt C, et al. Intravenous immunoglobulin versus oral corticosteroids in acute immune thrombocytopenic purpura in childhood. Lancet 1985; 31:464-468.
79. Lanzkowsky P. Disorders of platelet size. In: Philip Lanzkowsky (ed). Manual of Pediatric Hematology and Oncology. Third Edition. Boston: Academic Press 2000; 233-285.
80. Blanchette V, Imbach P, Andrew M, Adams M. Randomised trial of intravenous immunoglobulin G and oral prednisone in childhood acute immune thrombocytopenic purpura. Lancet 1994; 344:703-707.
81. Bolton-Maggs PH, Moon I. Assessment of UK practice for management of acute childhood idiopathic thrombocytopenic purpura against published guidelines. Lancet 1997; 350:620-623.
82. Bolton-Maggs PH. Acute idiopathic thrombocytopenic purpura-management in childhood. Blood 1997; 89:1465-1466.
83. Eden OB, Lilleyman JS. Guidelines for management of idiopathic thrombocytopenic purpura. Arch Dis Child 1992; 67:1056-1058.
84. Andrew M, Blanchette VS, Adams M, Ali K, Barnard D, Chan KW, et al. A multicenter study of the treatment of childhood immune thrombocytopenic purpura. with anti-D. J Pediatr 1992; 120:522-527.
85. Borgna-Pignatti C, Battisti L, Zecca M, Locatelli F. Treatment of chronic childhood immune thrombocytopenic purpura with intramuscular anti-D immunoglobulins. Br J Haematol 1994; 88:618-620.
86. Blanchette VS, Luke B, Andrew M, Sommerville-Nielsen S, Barnard D, de Veber B, Gent M. A prospective randomized trial of high-dose intravenous immune globulin G therapy, oral prednisone therapy, and no therapy in childhood acute immune thrombocytopenic purpura. J Pediatr 1993; 123:989-995.
87. Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosamine. J Cyclic Nucleotide Res 1979; 5:211-224.
88. Granot E, Kohen R. Oxidative stress in childhood--in health and disease states. Clin Nutr 2004; 23: 3-11.

89. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases. Roles, tolls and controls. *Cell* 1994; 78:915-918.
90. Moncada S. The L-arginine-nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand.* 1992; 145:201-227.
91. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 1993; 329:2002-2012.
92. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW. Structure and chromosomal localization of human constitutive endothelial nitric oxide synthases gene. *J Biol Chem* 1993; 15:268:17478-17488.
93. Hoffman A, Gloe T, Pohl U. Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism. *J Cell Physiol* 2001; 188:33-44.
94. Bivalacqua TJ, Champion HC, Hellstrom WJG. Implications of nitric oxide synthases isoforms in the pathophysiology of Peyronie's disease. *Int J Imp Res* 2002; 14:345-352.
95. Cakatay U, Kayalı R. The clinical importance of protein oxidation. *Cerrahpaşa J Med* 2004; 35:140–149.
96. Albecht E, Stagemen C, Heeringa P, Henning RH, Van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 2003; 199:8-17.
97. Ruehlman DO, Mann GE. Rapid non-genomic vasodilator actions of estrogens and sex steroids. *Curr Med Chem* 2000; 7:533-541.
98. Ramasamy S, Parthasarathy S, Harrison DG. Regulation of endothelial nitric oxide synthase gene expression by oxidized linoleic acid. *J Lipid Res* 1998; 39:268-276.
99. Ziegler T, Silacci P, Harrison VJ. Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces. *Hypertension* 1998; 32:351-355.
100. Stangl K, Cascorbo I, Laule M. High CA repeat numbers in intron 13 of endothelial nitric oxide synthase gene and increased risk of coronary artery disease. *Pharmacogenetics* 2000; 10:133-140.
101. Zanchi A, Moczulski DK, Hana LS, Wantman L. Risk of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Kidney Int* 2000; 57:405-413
102. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998; 32:3-8.
103. Nassar BA, Bevin LD, Johnstone DE. Relationship of the Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and early-onset coronary artery disease. *Am Heart J* 2001; 142:586-589
104. Suzuki H, Nagase S, Kikuchi S, Wang Y, Koyama A. Association of a missense Glu298Asp mutation of the endothelial nitric oxide synthase gene with end stage renal disease. *Clin Chem* 2000; 46:1858-1860.
105. Persu A, Stoenoiu MS, Messiaen T, Davila S, Robino C, El-Khattabi O, et al. Modifier effect of eNOS in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet* 2002; 11:229-241.
106. Nagase S, Suzuki H, Wang Y, Kikuchi S, Hirayama A, Ueda A, et al. Association of ecNOS gene polymorphisms with end stage renal diseases. *Mol Cell Biochem* 2003; 244:113-118.

107. Taioli E, Bonassi S. Pooled analysis of epidemiological studies involving biological markers. *Int J Hyg Environ Health* 2003; 206:109-115.
108. Strobel SA, Dervan PB. Site specific cleavage of a yeast chromosome by oligonucleotide directed triple helix formation. *Science* 1990; 249:73-75.
109. Imbach P. Immune thrombocytopenic purpura. In: Lilleyman J, Hann I, Blanchette VS, eds. *Pediatric Hematology*. second ed. London: Churchill Livingstone Harcourt Publishers Ltd 1999; 437-453.
110. Kühne T, Imbach P, Bolton -Maggs P, Berchtold W, Blanchette V, Buchanan GR. Newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood: an observational study. *Lancet* 2001; 358:2122-2125.
111. Sutor AH, Harms A, Kaufmehl K. Acute immune thrombocytopenia (ITP) in childhood: retrospective and prospective survey in Germany. *Semin Thromb Haemost* 2001; 27:253-267.
112. George JN, Raskolo GE. idiopathic thrombocytopenic purpura: A concise summary of pathophysiology and diagnosis in children and adults. *Semin Hematol* 1998; 35:5-8.
113. George JN, Rizvi MA. Thrombocytopenia. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. *Williams Hematology*, 6th edition. New York: McGraw Hill Co 2001; 1495-1539.
114. Adelson E, Rheingold J, Crosby W. The platelet as a sponge :A review. *Blood* 1961; 17:767-774.
115. Eldor A, Avitzour M, Or R, Hanna R, Penchas S. Prediction of Haemorrhagic Diathesis in Thrombocytopenia by Mean Platelet Volume. *Br Med J* 1982; 285:397-400.
116. Threatte GA. Usefulness of the mean platelet volume. *Clin Lab Med* 1993; 13:937-950.
117. Suvorov AV, Markosyar RA. Some mechanisms of the effect of EDTA on platelet aggregation. *Bull Exp Biol Med* 1981; 91:651-653.
118. Lusher EF. *Thrombosis: Mechanism and Control*. Stuttgart, Germany: 1975; 251-260.
119. O' Malley T, Ludham CA, Fox KAA, Elton RA. Measurement of platelet volume using a variety of anticoagulants. *Br J Haematol* 1994; 55-56.
120. Dow RB. The clinical and laboratory utility of platelet volume parameters. *Aust J Med Sci* 1994; 15:5-12.
121. Graham S, Traub B, Mink IB. Automated platelet-sizing parameters on a normal population. *Am J Clin Pathol* 1987; 87:365-369.
122. Akarsu S, Çıtak K AN, Kurt A, Varol İ, Şen Y. Değişik hastalık gruplarında trombosit hacim değişkenleri *Türk Pediatri Arşivi* 2006;41:208-213.
123. Freedman JE. Oxidative stress and platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28:11-16.
124. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L et al. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 2003; 349:1605-1613.
125. Erichsen K, Hausken T, Ulvik RJ, Svoldal A, Berstad A, Berge RK. Ferrous fumarate deteriorated plasma antioxidant status in patients with crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38:543-548.

126. Kristensen SD. The platelet-vessel wall interaction in experimental atherosclerosis and ischaemic heart disease with special reference to thrombopoiesis. *Dan Med Bull* 1992; 39:110-127.
127. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 199; 41:1819-1828.
128. Koedel U, Pfister HW. Oxidative stres in bacterial meningitis. *Brain Pathol* 1999; 9:57-67.
129. Erel O, Vural H, Aksoy N, Aslan G, Ulukanlıgil M. Oxidative stress of platelets and thrombocytopenia in patients with vivax malaria. *Clin Biochem* 2001; 34:341-344.
130. Babaoğlu MÖ. İnsanda Endotelial Nitrik Oksit Sentaz Glu298Asp Polimorfik Varyantı: Sıklığı ve Fonksiyonel Önemi. XVI. Ulusal Farmakoloji Kongresi Özet kitabı, 2001:3.
131. Veldman BA, Spiering W, Doevendans PA, Vervoort G, Kroon AA, de Leeuw PW, et al. The Glu298Asp polymorphism of the NOS 3 gene as a determinant of the baseline production of nitric oxide. *J Hypertens* 2002; 20:2023-2027.
132. Yoon Y, Song J, Hong SH, Kim JQ. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clin Cheme* 2000; 46:1626-1630.
133. Karparkin S, Fotino M, Gibofsky A, Winchester RJ. Association of HLA-DRW2 with autoimmune thrombocytopenic purpura. *J Clin Invest* 1979; 63:1085-1088.
134. Helmerhorst FM, Nijenhuis LE, de Lange GG, van den Berg Loonen PM, Jansen MF, von dem Borne AE, et al. HLA antigens in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Tissue Antigens* 1982; 20:372-376.
135. Foster CB, Zhu S, Erichsen HC, Lehrnbecher T, Imbach P, Kuhne et al. The Early Chronic ITP Study Group. Polymorphisms in inflammatory cytokines and Fc gamma receptors in child hood chronic immune thrombocytopenic purpura: a pilot study. *Br J Haematol* 2001; 113:596-599.
136. Moffat MF, Cookson WO. Tumor necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum Mol Genetics* 1997; 6:551-554.
137. Chen X, Xu J, Chen Z, Zhou Z, Fenq X, Zhou Y, et al. Interferon-gamma +874A/T and interleukin-4 intron3 VNTR gene polymorphisms in Chinese patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 2007; 79:191-197.
138. Demircioğlu F, Ören H, Kızıldağ S, Yılmaz S, Atabay B, Türker M et al. İdiopatik trombositopenik purpuralı çocuklarda interferon gamma +874A/T gen polimorfizmi sıklığı ve klinikle ilişkisinin araştırılması. XXIV.Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özetleri Kitabı, 2008; 62-63.
139. Fatini C, Sofi F, Sticchi E, Gensini F, Gori AM, Fedi S, et al. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4a4b, T-786C) and hyperhomocysteinemia on the predisposition to acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2004; 147:516-521.
140. Colombo MG, Andreassi MG, Paradossi U, Botto N, Manfredi S, Masetti S, et al. Evidence for association of common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298-Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease. *Heart* 2002; 87:525-528.

141. Guldiken B, Sipahi T, Guldiken S, Ustundağ S, Budak M, Turgut N, et al. Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene in Turkish patients with ischemic stroke. *Mol Biol Rep* 2008 (Baskıda)
142. Elbaz A, Poirier O, Moulin T, Chedru F, Cambien F, Amarenco P. Association between the Glu298Asp polymorphism in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene and brain infarction. The GENIC Investigators. *Stroke* 2000; 31:1634–1639.
143. Kim JU, Chang HK, Lee SS, Kim JW, Kim KT, Lee SW, Chung WT. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease and rheumatic diseases with vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:1083-1087.
144. Balat A, Alaşehirli B, Oğuzkan S, Gungor M. Nitric oxide synthase gene polymorphisms in children with primary nocturnal enuresis: a preliminary study. *Ren Fail* 2007; 29:79-83.
145. Albayrak D, Islek I, Kalyaci AG, Gurses N. Acute immune thrombocytopenic purpura: a comparative study of very high oral doses of methylprednisolone and intravenously administered immune globulin. *J Pediatr* 1994; 125:1004-1007.
146. Delgado J, Bustos JG, Jimanes-Yuste V, Hernandez-Navarro F. Anti-CD20 monoclonal antibody therapy in refractory immune thrombocytopenic purpura. *Haematologica* 2002; 87: 215-216.

6. EKLER

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAY FORMU

(Hekimin Açıklaması)

İdiyopatik trombositopenik purpura teşhisi alan çocuklarda eNOS geninin Glu298Asp polimorfizmi varlığı araştırılacaktır. Polimorfizm bir gen veya DNA dizisinin(genetik kodlamaların) alternatif formlarından(allel) birinin toplumda %1'den fazla bulunduğu durumudur. Araştırma sonucu genetik olarak polimorfizmin olduğu hastalarda hastalığın nedeni ile ilgili bir bilgi elde edilmiş olacak ve iki çeşidi olan İdiyopatik trombositopenik purpura hastalığında; 6 ay içinde geçen tipi ile hastalığın teşhis anından itibaren 6. aydan sonra da devam eden tipi arasında polimorfizm varlığı açısından fark olup olmadığı ortaya çıkacaktır.

Araştırmanın ismi: İdiyopatik trombositopenik purpura tanılı olgularda eNOS geninin Glu298Asp polimorfizmi

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Araştırmaya davet edilmenizin nedeni çocuğunuzda idiopatik trombositopenik purpura tanısının bulunmasıdır. F.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı ve Biyokimya Anabilim Dalı' nın ortak katılımı ile bu hastalığın tedavisi ve yapılan tedavinin rutin kan tahlilleri ile takibi yapılacaktır.Bu hastalıkta kanamanın durdurulmasında görev alan halk arasında “kan pulcukları” olarak bilinen trombositlerin sayıca yetersizliği söz konusudur. Daha önce sağlıklı olan çocuklarda birden bire vücudunda küçük küçük basmakla solmayan döküntüler (peteşi ve purpuralar), diş eti ve burun kanaması ortaya çıkar.Hastaların %1'inden azında da beyin kanaması görülmektedir.Bu açıdan idiopatik trombositopenik purpuranın tedavisi uygun şekilde yapılması önemlidir. Sizin çocuğunuz için etkin olacak tedavi şekli doktorunuz tarafından belirlenecektir. Çocuğunuzla birlikte tam 60 çocuğun tedavisi benzer testler yapılarak tarafımızdan gerçekleştirilecektir.

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: 1-) İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz. 2-) Az bir ihtimal de olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması veya enfeksiyon riski vardır.

Farklı tedavi şekilleri ile oluşabilecek riskler: Metil prednizolon kullanan çocuklarda yorgunluk, sinirlilik, baş ağrısı, irritabilite, kilo alma, akne ve epigastrik ağrı gibi yan etkiler rapor edilmiştir. İVİG'in metil prednizolona göre fiyatının yüksek olması kullanımında dezavantaj oluşturmaktadır. Ayrıca baş ağrısı ve kusma gibi bulgular İVİG infüzyonundan sonra görülen yan etkilerdir. Diğer görülebilecek basit yan etkiler çocuğunuza uygulanacak tedavinin gerekliliği açısından gözardı edilecektir.

Yukarıda sayılanlar böylesi bir analizde yaşanabilecek potansiyel risklerdir. Ancak bunlardan en az oranda zarar görmeyi sağlamak için elimizden geleni yapacağız. Çalışmanın devamı sırasında ortaya çıkabilecek sorun ve riskler katılımcının/hastanın kendisine ya da ebeveyni/sorumlusuna iletilecektir.

Yapılacak araştırmanın getireceği olası yararlar: Bu çalışma sonucunda çocuğunuzun trombositopenisi düzeltilmiş olacaktır. Ayrıca trombositopeniye bağlı peteşi, purpura, diş eti ve burun kanaması en önemlisi beyin kanamasından, çalışma gücü kaybı gibi oluşabilecek etkilerden çocuğunuz korunmuş olacaktır.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Dr. F.Necati ARSLAN tarafından çocuğunuzun idiyopatik trombositopenik purpura hastalığına yönelik tedavisi yapılacak ve aralıklı yapılacak kontrollerde alınacak rutin kan tahlilleri ile yapılan tedavinin takibi gerçekleştirilecek ve kayıt tutulacaktır.

Çocuğunuza idiyopatik trombositopenik purpura tanısı poliklinik şartlarında konduktan sonra uygulanacak tedavi şekli doktorunuz tarafından belirlenip tedavi başlatılacaktır. Çocuğunuzu daha sonra 1. gün, 2, 4, 6, 8, 14 ve 30. günlerde kontrole getirmeniz istenecektir. Çocuğunuzdan tedavinin etkinliğinin kontrol ve takibini yapabilmek amacıyla rutin zaten bakılması gereken kan tahlili alınacak ve bu alınacak kandan aynı zamanda total antioksidan kapasite'de bakılacaktır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve

reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahiptir.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Sayın Dr. F.Necati ARSLAN tarafından F.Ü. Fırat Tıp Merkezi ocuk Sağlığı ve Hastalıkları ocuk Hematoloji’de tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütölmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim). Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr. F.Necati ARSLAN’ı, 2333555-2311 ve F.Ü Tıp Faköltesi ocuk Sağlığı ve Hastalıkları’ndan arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllölük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel.

İmza

Ayırt etme yeteneği söz konusu olan hastanın kendisinin rızası alınacaktır.

Hastanın

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza

7.ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Osmaniye'nin Kadirli ilçesinde doğdum. İlk ve ortaokulu Kadirli'de tamamladıktan sonra liseyi G.Antep Fen Lisesi ve Sunguroğlu Lisesinde okudum. 1997 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde başladığım eğitimi 2003 yılında bitirerek mezun oldum. 2003 yılında Tıpta Uzmanlık Sınavı ile Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak göreve başladım.