



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

**İŞİTME ENGELLİ OKULLARDA OKUYAN
MAKROTROMBOSİT SAPTANAN ÇOCUKLARDA
MYH-9 GEN MUTASYON TARAMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Emre TAŞDEMİR

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Tülin Tiraje CELKAN

İSTANBUL-2019

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması ve tamamlanmasında büyük sabır ile bilgi ve tecrübelerini paylaşan, zaman ayıran, her sorunumda yanımda olan, birçok konuda örnek aldığım tez danışmanımdan çok daha fazlası Sayın Prof Dr Tülin Tiraje Celkan'a,

Her koşulda eğitim kalitesini arttırmayı hedefleyen ve titizlikle gayret eden, bu hayatta disiplinli olmayı öğrendiğim Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof Dr Ahmet Arvas'a,

Çocuk bölümünü seçmemde etkisi olan, her zaman pozitif enerjisiyle bize hekim olmanın önemini her daim hissettiren Sayın Prof Dr Özgür Kasapçopur'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım saygıdeğer tüm Cerrahpaşa Çocuk kliniği hocalarıma,

Asistanlık eğitimim boyunca başta eşkıdemlerim Emrullah Arslan, Gürkan Tarçın, Yusuf Can Doğan, Emre Özer, Aslı Katı, Selen Baran ve Gözde Apaydın olmak üzere hastane içinde ve dışında birlikte vakit geçirdiğim tüm asistan arkadaşlarıma,

Tezimin hazırlanmasında yardımcı olan Uzm Dr Hande Kızılocak ve başta Uzm Dr Seha Saygılı, Uzm Dr Hande Turhan ve Uzm Dr Serdar Nepesov olmak üzere asistanlık eğitimime katkıda bulunan tüm uzman doktor ağabeylerim ve ablalarıma,

Tezimin kan toplama kısmında yardımcı olan hemşire Fatma Çakır Demir, Nevin Avşar, Ebru Beşik ve Ceylan Ceyhan başta olmak üzere asistanlık süresince beraber çalıştığımız mesai arkadaşlarımız olan tüm hemşirelerimize ve sağlık personelimize,

Asistanlığımın son çeyreğinde tanıştığım, daha önce hissetmediğim duyguları yaşatan, her daim yanımda olduğunu hissettiğim ve olmasını istediğim sevgili Dr. Tuğçe Uçar'a,

Her zaman arkamda desteklerini hissettiğim Özkan ağabeyime, Gökhan ağabeyim ve sevgili eşi Ecem'e ve ailemizin yeni üyesi, neşesi Elif'e,

Bugüne kadar tüm başarılarımda en büyük pay sahibi olan, sevgisiyle varlığıyla bana huzuru hissettiren canım annem Sevim Taşdemir ve babam Habip Taşdemir'e,

Sonsuz Teşekkürler....

Dr. Emre TAŞDEMİR

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
KISALTMALAR	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Trombositler.....	2
2.1.1. Normal Megakaryopoez ve Trombopoez	2
2.1.2. Trombositopeni.....	5
2.1.2.1. Konjenital trombositopeni	7
2.1.2.1.1. Trombosit Çapı	8
2.1.2.1.2. Aile Öyküsü	9
2.1.2.1.3. İTP tedavisine yanıtızsızlık	9
2.1.2.1.4. Fizik Anomalilerin varlığı	9
2.1.2.2. MYH-9 ilişkili Trombositopeniler	9
2.1.2.2.1. May-Hegglin Anomalisi	10
2.1.2.2.2. Epstein Sendromu	11
2.1.2.2.3. Fechtner Sendromu	11
2.1.2.2.4. Sebastian Platelet sendomu	11
2.1.2.2.5. NMHC IIA proteini ve MYH-9 gen mutasyonu	13
2.1.2.2.6. Makrotrombosit oluşumu	15

2.1.2.2.7. Hematolojik olmayan bulguların oluşumu:	16
2.1.2.2.8. Klinik	16
2.1.2.2.9. Tanı	18
2.1.2.2.10. Tedavi	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
4. BULGULAR.....	25
5. TARTIŞMA.....	32
6. Sonuçlar-Çıkarımlar	37
7. Kaynaklar	40

TABLolar LİSTESİ

Tablo-1: Yeni tanı makrotrombositopeni incelerken anamnezde dikkat edilmesi gerekenler.....	7
Tablo-2: Trombosit apına (MPV) göre kalıtsal trombositopeniler	8
Tablo-3: Kalıtsal trombosit hastalıklarının sınıflandırılması.....	10
Tablo-4: MYH-9 ilişkili hastalıklarda trombositopeni ve hematolojik olmayan bulguların varlığına göre sendromlar.....	12
Tablo-5: Farelerde NMMII izoformları	14
Tablo-6: İşitme engelli öğrenciler ile ilgili sayısal veriler.....	25
Tablo-7: Hastaların trombosit sayısı, MPV ve yaş ortalamaları	27
Tablo-8: Ekzon 1 S96A değişimi ve ekzon 26 A1144L polimorfizm gösteren hastaların yaş, cinsiyet, trombosit sayısı ve MPV değerleri	28
Tablo-9: PLT, MPV değerlerine göre mutasyon veya polimorfizm grlme oranları ..	29
Tablo-10: Trombosit değerlerine göre mutasyon veya polimorfizm sıklığı karşılaştırılması.....	29
Tablo-11: Mutasyon veya polimorfizm saptanan hastaların MPV ve yaş ortalaması .	29
Tablo-12: Trombositopeni saptanan hastaların aile hikayeleri.....	30
Tablo-13: S96L mutasyonu pozitif saptanan hastaların aile hikayeleri.....	31

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil-1: Megakaryosit sitoplazmasından trombosit oluşum evreleri.....	3
Şekil-2: A:MYH-9 genomik yapısı, B: (NMMIIA)'nın şematik yapısı	13
Şekil-3: MPV dağılım yüzdeleri	25
Şekil-4: MYH9 geni, ekzon 1, p.S96L değişimi.....	26
Şekil-5: MYH9 geni 26.ekzonda hasta bireye ait DNA Dizi Analizi görüntüsü A1144L polimorfizmine neden olan T>G değişiminin gerçekleştiği nokta ok ile işaretlenmiştir	27



KISALTMALAR

MYH-9	Myozin Ağır Zincir 9
PLT	Platelet
MPV	Ortalama Trombosit Hacmi
MK	Megakaryositler
ITP	İmmun Trombositopenik Purpura
KT	Konjenital Trombositopeni
IVIG	İntravenöz İmmunglobulin
WAS	Wiscott Aldrich Sendromu
XLT	X'e bağlı trombositopeni
BSS	Bernard Soulier sendromu
TAR	Trombosit absent radii sendromu
CAMT	Konjenital amegakaryositik trombositopeni
MHA	May-Hegglin anomalisi
NMMHC	Kas dışı miyozin ağır zincir
EPS	Epstein sendromunu
FS	Fechtner sendromu
SPS	Sebastian trombosit sendromunu
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonunda

ÖZET

İşitme engelli okullarda okuyan makrotrombosit saptanan çocuklarda MYH-9 gen mutasyon taraması

Bu araştırmaya İstanbul İl Milli Eğitim Müdürlüğü'ne bağlı işitme engelli okullarındaki 18 yaş altı öğrenciler dahil edildi. Çalışmaya alınan 172 hastadan 140'ına MYH9 (Miyozin Ağır Zincir-9) gen taraması yapıldı.

Hastaların öncelikle trombosit sayısı ve ortalama trombosit hacim değerleri belirlendi. Çalışmaya trombositopeni ($PLT < 150.000 \text{ mm}^3$) ve ortalama trombosit hacmi (MPV) 10 fL üzerinde saptanan 6 hasta, $MPV > 10 \text{ fL}$ olan 11 hasta ile MPV (8-10 fL) olan 123 hasta olmak üzere toplamda 140 hasta dahil edildi. MPV değeri 8fL altında saptanan 32 hasta mutasyon analizine dahil edilmedi. Çalışmanın mutasyon analizi kısmında polimorfik değişimler (tekli nükleotid değişimleri vb.) ve mutasyonlar, DNA bankamızda mevcut olan sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirildi

Çalışmaya katılan 172 hastanın 80'i kız, 92'si erkekti. Klinik olarak hiçbir hastada kanama bulgusu veya şikayeti yoktu.

Mutasyon analizine göre Ekzon 1 S96L değişimi ve ekzon 26 A1144L polimorfizm saptanan toplam 15 hasta (mutasyon/4 hasta, polimorfizm/11 hasta) vardı. Ortalama trombosit sayısı ve ortalama MPV değeri açısından mutasyon-polimorfizm saptanan ve saptanmayan gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Çalışmada mutasyon veya polimorfizm çıkma oranı; $MPV > 10 \text{ fL}$ üzerinde olan hastalarda %29, $PLT < 150.000 \text{ mm}^3$ olan hastalarda %42,8, $MPV > 10 \text{ fL}$ ve $PLT < 150.000 \text{ mm}^3$ olan hastalarda %50 olarak saptandı. Mutasyon veya polimorfizm görülme oranı trombositopenik olan hastalarda istatistiksel olarak anlamlı artmıştı ($p=0,005$). Trombositopenik olup $MPV < 10 \text{ fL}$ olan bir hastada mutasyon veya polimorfizm saptanmadı.

İşitme kaybı olan hastalarda trombosit sayısı düşük ve MPV yüksek saptanırsa mutlaka MYH-9 mutasyon analizi bakılmalı ve pozitif saptanan olgularda böbrek fonksiyonları değerlendirilmesinin ve özellikle katarakt açısından göz muayene takibine alınmasının gerektiğini düşünmekteyiz.

ABSTRACT

MYH9 gene mutation screening in students with macrothrombocytes/
thrombocytopenia who are attending in hearing impaired schools in Istanbul

This research was carried out with students under the age of 18 who were educated in the schools of hearing-impaired affiliated to Istanbul Provincial Directorate of National Education. Out of a total of 172 students, MYH9(Myosin Heavy Chain-9) gene was screened in 140 students.

Firstly, platelet(PLT) count and mean platelet volume(MPV) values of the patients were determined. A total of 140 patients(6-patients with thrombocytopenia (PLT<150.000mm³) and MPV>10fL, 11-patients with MPV>10fL and 123-patients with MPV between 8-10fL) were involved in the study. Thirty-two patients with MPV<8fL were not included in the mutation analysis. In the mutation analysis part of the study, polymorphic changes and mutations were evaluated by comparing with the healthy control group in our DNA bank.

Eighty of the patients involved in the study were female and 92 were male. None of the patients had any signs or symptoms of bleeding.

According to the mutation analysis, there were 15 patients with exon 1-S96L change and exon 26-A1144L polymorphism(mutation/4patient, polymorphism/11patient). No significant difference was found between the groups with and without mutation-polymorphism in terms of mean platelet count and mean MPV value. In the study, the rate of mutation or polymorphism was determined as %29 for the patients with MPV>10fL, 42,8% for the patients with PLT<150.000mm³ and 50% for the patients with PLT<150,000mm³ and MPV>10fL. The rate of mutation-polymorphism was significantly increased in patients with thrombocytopenia(p=0.005). No mutation-polymorphism was detected in one patient with thrombocytopenia and MPV<10fL.

In the hearing-impaired patients with low thrombocyte counts and high MPV levels, MYH-9 mutation analysis should be evaluated. We also recommend that these patients would be followed-up for kidney functions and ophthalmological problems especially cataracts.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Trombositopeniler trombosit büyüklüğüne göre sınıflandırılır ve makrotrombositlerin eşlik ettiği trombositopeniler en sık rastlanan gruptur. Makrotrombositopeni sendromları otozomal dominant kalıtılan hastalıklardır. Makrotrombositopeni yanında sensörinöral işitme kaybı, katarakt, nefrit ve polimorfonükleer hücreler içinde görülen Döhle cisimcikleri bu hastalığa eşlik edebilir.

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Bilim Dalı olarak İstanbul ili içerisinde bulunan 18 yaş altı çocuk ve gençlerin eğitim gördüğü işitme engelli okullarında bir araştırma yaparak işitme engelli çocuklarda, işitme kaybı ile beraber trombositlerinin etkilenip etkilenmediğini ortaya koymayı planladık. Bu grup hastalarda kanama bulguları çok hafif olup klinik şikayete neden olmamaktadır.

Amacımız öncelikle işitme engelli çocuk ve gençlerimizi tarayarak, genetik özelliklerini araştırmak ve daha sonraki nesilleri uyarmaktır. Ayrıca uzun dönemde hastalığın diğer bulgularının ortaya çıkması ile oluşabilecek sağlık sorunlarının ne olduğunu konusunda birey ve aileleri bilinçlendirerek, mümkünse oluşabilecek sekelleri engellemek ya da profilaktik olarak ilaç kullanımı ile hafifleterek yaşam kalitesini arttırmayı hedefledik.

Tarama kapsamında çocuklardan, aileler bilgilendirilerek aydınlatılmış onam alındıktan sonra, kan tahlili alındı. Tetkik sonuçları ile genetik açıdan pozitif bulunan çocuklar, kliniğimizce ileri dönemde oluşacak sağlık sorunları ile ilgili takibe alınması planlandı. Bu sayede işitme engelli olan hastaların aile incelemesi ve bilgilendirilmesi sağlanacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Trombositler

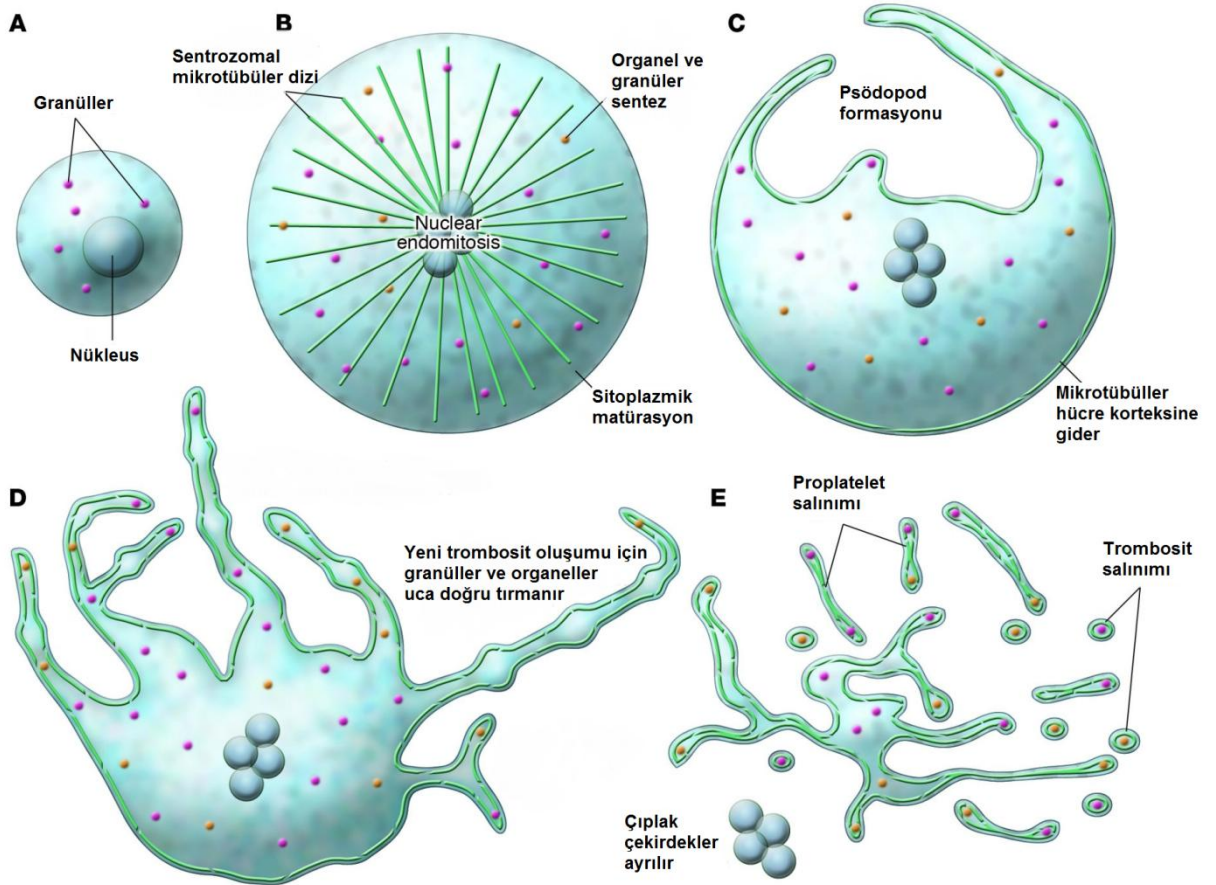
Trombosit veya diğer adı ile kan pulcukları/platelet hemostaz ve trombozda rol alan dolaşımdaki en küçük hücre parçacıklarıdır(1). Son yıllardaki araştırmalar trombositlerin bu yönde farklılaşmalarına rağmen immün dirençte, enflamatuvar cevapta, yara iyileşmesinde en az hemostazdaki kadar etkin olduğu gösterilmiştir. Damarda bir hasar olduğunda dolaşımdan ayrılıp, hasarlı bölgede bir tıkaç oluşturarak damardan kan kaybının oluşmasını engeller. Ama bazen de aterosklerotik bir damarda pıhtı oluşturarak kalp krizi ya da inme nedeni olabilir (2,3).

İnsan vücudunda bulunan trombositlerin 1/3'ü dalakta, 2/3'ü ise dolaşımdadır, ortalama yaşam süreleri 9-10 gündür (4,5). Erişkin bir insanda her gün yaklaşık 1×10^{11} trombosit üretilir, ihtiyaç arttığında bu üretim 10-20 kat, ekzojen trombopoetin-mimetik ilaçlarla ilave 5-10 kat artabilir. Trombosit üretimi hematopoetik kök hücre ve megakaryositler seri üretimine yönelmiş öncü hücrelerin çoğalmasına ve farklılaşmasına, bu hücrelerin büyük, polipoid megakaryositlere olgunlaşmasına ve sonunda sitoplazmanın parçalanmasına (fragmentasyon) bağlıdır. Megakaryopoez ve trombopoezde rolü olan dış etkenleri; endotelial ve diğer hücreler, matriks glikozaminoglikanları, trombopoetin, kök hücre faktörü ve stromal hücre-kaynaklı faktör-1 gibi protein hormonları ve sitokinleri içeren bir destek kemik iliği stroması oluşturur. Bu süreç için sitokinlerin gerekliliği, megakaryosit oluşumunda transkripsiyon faktörlerinin kritik rolü tanımlanmış, endomitoz ve proplatelet oluşumu gibi trombopoezin en olağan dışı iki yönünü de içeren moleküler mekanizmalar çalışılmış, trombosit üretimini spesifik olarak modifiye eden hipotezler geliştirilmiştir (6,7).

2.1.1. Normal Megakaryopoez ve Trombopoez

Megakaryositler hematopoetik kök ve progenitor hücrelerden; morfolojisi, boyutu ve ploidi ve yüzey fenotipi farklı ara hücrelerin aracılığıyla meydana gelirler. Bir başka deyişle, megakaryositlerden trombosit üretimi bir olgunlaşma süreci sonrasında olur. Megakaryositlerin gelişimi ve matürasyonu GATA-1, E26 transformasyon-spesifik transkripsiyon faktörü (ETS) ailesinin üyeleri, nükleer faktör

eritoid 2 transkripsiyon faktörü (NF-E2) ve STAT3 gibi farklı transkripsiyon faktörleri tarafından yönetilir. Olgunlaşma programının sonunda megakaryositlerden, çok sayıda sitoplazmik çıkıntılar belirir, bu çıkıntılar proplatelet olarak adlandırılır. Bir megakaryosit 10-20 proplatelet oluşturabilir, her biri kör bir çıkıntı şeklinde başlar, zamanla incelişip dallanır (6). Proplatelet uzanımı başladığında, megakaryositler de dramatik bir değişikliğe uğrar, yuvarlak hücre formundan proplatelet üreten ve vasküler aralığa uzun kollar çıkararak bir hücreye dönüşür. Yapılan çalışmalar hücre iskeletinin proplatelet oluşumunda temel makine gibi fonksiyon gösterdiğini kanıtlamıştır(8). Biyokimyasal olarak megakaryosit hücre iskeleti; aktin, α -aktinin, filamin, kas-dışı miyozin (MYH9 geni ürünü), beta1-tubulin, talin ve diğer aktin-bağlayan proteinlerden oluşur. Megakaryositler de dıştan gelen uyarılara karşı şekil değiştirerek, sitoplazma etrafındaki organelleri transport ederek ve granül sekresyonu yaparak, trombositler gibi cevap verebilir. Bu fonksiyonlar hücrenin mikrofilament ve mikrotübül sistemlerine bağlıdır. İlave olarak, mikrotübüller trombosit oluşumunun geç dönemlerinde de hayati rol oynar (Şekil-1) (4,6,9).



Şekil-1: Megakaryosit sitoplazmasından trombosit oluşum evreleri(2)

Proplateletten trombosit oluşumu araştırılırken ‘preplatelet’ olarak adlandırılan, trombosit üretiminde bir ara evre saptanmıştır (10). Preplateletler çekirdeksiz trombosit öncüleridir, diskoid yapıda, proplateletten daha küçüktür (2-10 um), artmış RNA içeriği ile ‘genç (retiküle) trombositler’ ve kalıtsal/edinsel makrotobositopenilerdeki ‘büyük trombositler’ ile ilişkili olabilir. Preplateletlerin, GFP-beta1-tubulin taşıyan proplateletlere, diğer tanımlamayla ‘8 figürü’ ya da ‘halter’ şekilli olarak tanımlanan proplateletlere reversibl olarak dönüşebildiği ileri sürülmüştür (10,11)

Trombositler megakaryositlerden (MK) farklılaşma ve olgunlaşma aşamalarından, granüller MK’ların biyosentetik ve endositik aşamalarından geçerek oluşur. Olgunlaşmanın son aşamasında MK’lar kemik iliği sinüzoidlerinin damarları içinde yayılır, önce proplateletler sonrasında da trombositler ortaya çıkar. Bu aşamada daha sonra trombositlerin içinde belli sayı ve homojenlikte yer alacak granüller, proplateletlerin tomurcuğunda yer almalıdır. Bu işlem için mikrotübüllerin önemli rolü vardır. Mikrotübüller bir yol açarak kinesin-ilişkili granüllerin ve mitokondrilerin bu kanal içerisinde ilerlemesinde görev alır. Organeller proplateletlerin içine girince orada tutulup mikrotübül sarmal çevresine yerleşir. Son olarak trombosit oluşumu sırasında organeller mikrotübül sarmalından ayrılır ve trombosit içinde subsellüler bölüme geçer. Granül ve organellerin MK sitoplazmasından proplatelete geçmesinde ve mikrotübül sarmalından ayrılıp trombosite geçmesine neden olan kontrol mekanizmasının ne olduğu halen anlaşılamamıştır. Bu sayede her trombosit içine belli miktarda homojen olarak organel ve granül ve granül içinde belli sayıda faktör, protein, vb. bulunmaktadır (12). Pertuy ve ark. yaptıkları çalışmada da miyozin IIA’nın kemik iliğindeki MK ve trombositlerin içinde organellerin homojen dağılması ile görevli olduğu ortaya koymuştur. Miyozin IIA olmadığında erken evre MK ve proplateletlerde aktin ve hücre iskelet yapı bozukluğu oluşmakta ve granül dağılımı anormal olmaktadır (12).

Sonuç olarak; megakaryositler trombositlerin tek kaynağıdır, trombositler megakaryosit sitoplazmasının parçalanmasıyla oluşan hücrelerdir. Trombosit oluşum mekanizmaları başlıca iki faza ayrılır. İlk faz nükleer proliferasyon ve megakaryosit sitoplazmasının genişlemesi, sitoplazmanın hücre iskeleti proteinleri, trombosite spesifik granüller ve granül içerikleri ve membranöz sistemle dolmasıdır. Bu faz günler içinde tamamlanır ve megakaryosite spesifik büyüme faktörlerinin indüksiyonuna

ihtiyaç duyar. Prolateletler ikinci fazda oluşturulur, bu faz saatler içerisinde tamamlanır ve trombositler dolaşıma salınır (6).

Megakaryosit öncü hücrelerden trombositin dolaşıma katılmasına kadar geçen süre 4-7 gün arasında değişir. Trombosit sayısı normal olan insanlarda dolaşan trombositlerin yaşam süresi ortalama 10 gündür, bu süre orta derece trombositopenisi olan hastalarda 7 gün, ciddi trombositopenide ise 5 gündür. Çoğu fizyolojik ve patolojik durumda trombosit sayısı, plazma trombopoetin düzeyi ile ters orantılıdır. Trombositler ‘‘proplatelet’’ olarak tanımlanan, içinde membran, organel, granül ve solübl makromoleküllerin olduğu sitoplazmik komponenti içeren megakaryosit membranının uzantılarının parçalanmasıyla oluşur. Her bir megakaryositin, rezidüel nükleer materyali kemik iliği makrofajları tarafından ortadan kaldırılmadan önce, yaklaşık 1000-3000 adet trombosit ürettiği tahmin edilmektedir. (6)

2.1.2. Trombositopeni

Trombosit sayısı normalde 150.000 ile 450.000/mm³ arasında değişmekle birlikte; etnik ve cinsiyet farklılıklarının olabileceği bildirilmiştir (13-15). Bu nedenle ITP çalışma grubu, başka klinik bulgusu olmayan sürekli trombositleri 100.000/mm³ civarında olan olguların da normal kabul edilebileceğini belirtmişlerdir. Ancak, çocuklarda etnik ve cinsiyete göre bir referans aralığı olmadığı için, trombositopeni alt sınırı halen 150.000/mm³ olarak değerlendirilmektedir (16).

Trombositler özellikle hemostazın primer fazında, yani zedelenen damarda primer trombosit tıkaçı oluşana kadar ana aktörlerden biridir. Primer hemostazda etkin üç kritik olay trombosit adezyonu, granül salınım reaksiyonu ve trombosit agregasyonu olup; yaralanmayı takiben birkaç saniye içinde glikoprotein Ia/IIa aracılığıyla vasküler subendoteldeki kollajen fibrillere yapışır. Yapışan trombositlerin granül içerikleri ve tromboksan A2 yoluyla sekresyon başlatılır (17). Periferik yaymada en önemli özellikleri biraraya gelme-kümelenme yani agregasyondur. Eğer yeterli sayıda trombosit mevcut ancak agregasyon yoksa hasta ya antiagregan ajan alıyordur veya tüpten periferik yayma yapılmışsa agregasyonu önleyen katkı maddesi mevcuttur ya da konjenital agregasyon bozukluklarını aklı getirmeliyiz. Trombositopenilerin %15-20’si yalancı trombositopenidir. Bu nedenle trombositlerin sayı ve özelliklerini anlayabilmek için mutlaka periferik kandan direkt yayma yapmalıyız. Özellikle son model kan sayım

cihazlarının pıhtıyı algılama özellikleri olduğu için hatalı sonuç alma olasılığı daha azdır. Kan alındıktan hemen sonra çalışıldığında da hatalı sonuç olasılığı daha az olur. Trombositopenik hastada periferal kanda trombositlerin hepsi aynı büyüklükte ise yapım azlığı düşünülebilir. Trombositler irili ufaklı iseler trombosit yıkımı veya konjenital makrotrombositopatilerle karşı karşıya olabiliriz (18).

Bazen anne ve babadan yapılan periferal kan yaymasında da dev trombositleri görüyorsak otozomal-dominant geçişli konjenital formlar akla gelebilir (18). İlaçlar ve etilendiamin tetraasetik asite bağımlı veya soğuk aglütininelere bağlı psödotrombositopeniler akıldan çıkarılmamalıdır. Kısa süreli veya hiçbir tedavi yapılmadan düzelen trombositopenilerde ilaçlarla başlatılan veya gıda/rengli madde kullanımı sonu gelişen trombositopeni düşünülmelidir (19).

Trombositopeniler noktasal kapiller kanamalar (peteşiler), peteşilerin birleşmesinden 1cm çapa kadar olan morarmalar (purpuralar) veya purpuraların birleşmesinden oluşan daha büyük lezyonlar (ekimozlar) halinde seyrediyorsa yani klinik bulgular belirginse ağır trombositopeniler söz konusudur. Trombositlere karşı alloimmunizasyon, trombosit yapım azlığı söz konusu olabilir. Salt trombosit sayıca azlığı ile beraber olabilir veya klinik tabloya lökosit azlığı veya anormalliği ile beraber olabilir. Anormal lökositler bir Downey hücresi, blast karakterinde veya sitotoksik T lenfositleri veya doğal öldürücü hücrelerde olduğu gibi granüllü olabilir. Olay bir immun reaksiyon mu, dissemine intravasküler koagülasyonda olduğu gibi harcanan olay mı çok iyi ayırt etmek gerekir. Bir hipersplenizm veya kemik iliği yetmezlik sendromlarıyla veya pansitopeni ile seyreden sistemik bir hastalığın, örneğin; sistemik lupus erimatozusun bulgusu olabilir. Daima her trombositopeni bir malignansinin habercisi olabilir noktasından hareketle veya tedavide steroid seçeneğini seçeceğimiz immun trombositopenilerde kemik iliği aspirasyonu ile tanıyı doğrulamamız gerekebilir. Direkt yayma değerlendirmesinin her zaman gerek trombositler, gerekse diğer hücrelerin morfoloji ve dağılımı yönünden altın kural olduğu unutulmamalıdır (20).

Birçok trombositopenide dikkat edilmesi gereken, trombosit sayısı belli bir eşige düştüğünde veya damarsal bozukluklar eşlik ettiğinde klinik bulguların başlamasıdır. Damar endoteli ve trombositlerin kendi yapısı sağlam olması koşuluyla trombosit sayısı 80.000/mm³'e kadar klinik bulgu yoktur. 50.000/mm³'e düşünce yavaş yavaş peteşi, purpura ve ekimozlar çıkmaya başlayabilir. 50.000/mm³ altında

diapedez bulguları belirgin olabilir; klinik bulgulara mukokütanöz kanamalar, epistaksis, menoraji, gastrointestinal kanama, seyrek olarak intrakranyal kanama veya hemartroz eşlik edebilir. İç organlara veya kapalı alanlara kanamalar damarsal yapılar, doku, organ bütünlüğünün bozulduğunu gösterebilir. Her hasta kendi semptom, klinik ve laboratuvar bulgularıyla ve kişiselleştirilmiş tedavi kapsamında değerlendirilmelidir (20).

2.1.2.1. Konjenital trombositopeni

Konjenital trombositopeniler (KT) heterojen bir grup hastalığı içeren ve genellikle doğumdan itibaren trombosit sayısının düşük olduğu durumlardır. Bazı durumlarda sadece sayı azlığı değil, trombosit fonksiyonlarında bozulma da eşlik edebilir. Kanama bulguları, hafif-orta dereceden yaşamı tehdit eden ciddi ağır kanama bulgularına kadar değişebilir. Bu nedenle, hafif kanama kliniği olan olgular, genellikle rastgele yapılan hemogramda ılımlı trombositopeninin varlığı ile tanınabilirler. Bu olguların büyük bir bölümü, immün trombositopeni (ITP) tanısı alarak izlenir. Ancak son yıllarda moleküler tanıdaki gelişmeleri KT tanı olanağını arttırmıştır (21).

Tablo-1: Yeni tanı makrotrombositopeni incelerken anamnezde dikkat edilmesi gerekenler (3)

Öykü	ITP	Kalıtsal trombositopeni
Kanama ne zaman başladı	Yeni	Hayat boyu
Yakın zamanda var olan sağlık problemleri ve ilaç kullanımı	Evet	Hayır
Küçük travma, adet kanaması, doğum yada cerrahiler sırasında ekstra kanama varlığı	Yok	Var
Aile bireylerinde kanama varlığı	Yok	Var
Daha önceye ait normal trombosit değeri varlığı	Var	Yok
Tedavi yanıtı (steroids, IVIG, anti-D, splenektomi)	%80 yanıt	Değişken, hafif artış
Trombosit süspansiyon infüzyon cevabı	Yok/çok kısa süreli	Var/ normal yaşam süresi

Trombositopeni ile başvuran olgularda, KT düşündürecek temel bazı kriterler vardır. Bu kriterlerden ilk 4'ü, KT kanısına varmada çok önemlidir;

- 1.Trombosit çapı,
- 2.Aile Öyküsü,
3. ITP tedavisine karşın trombosit sayısında yeterince yükselme olmaması,
- 4.Olgularda fizik anomalilerin olması (örneğin; Radius yokluğu).

Taniya yaklaşımda önemli olan bu kriterleri ayrıntılı incelersek:

2.1.2.1.1. Trombosit Çapı

Bugün birçok hemogram cihazı trombosit çapını rutin ölçmektedir. Ancak, periferik yaymada trombosit morfolojisinin incelenmesi halen altın kuraldır. Yaymada trombosit çapı, eritrositler ile karşılaştırılır. En az eritrosit büyüklüğünde veya daha iri olması ortalama trombosit hacminin (MPV) yüksek olduğunu gösterir. Trombosit çapına göre KT'yi şu şekilde sınıflandırabiliriz (Tablo-2) (22).

Tablo-2: Trombosit çapına (MPV) göre kalıtsal trombositopeniler (21)

Küçük MPV (<7fL)	Normal MPV (7-11 fL)	Büyük MPV (>11 fL)
WAS	CAMT/TAR/CTRUS	MYH9 patolojileri
XLT	FDP/AML	BSS
	ANKRD-26 mutasyonu	VCFS
	CYCS mutasyonu	XLT-Diseritropoz
		Paris-Trousseau/Jakobsen sendromu
		TUBB-1'e bağlı
		Sitosterolemia

* WAS: Wiscott Aldrich Sendromu, XLT: X'e bağlı trombositopeni, BSS: Bernand Soulier sendromu, TAR: Trombosit absent radii sendromu, CAMT: Konjenital amegakaryositik trombositopeni

2.1.2.1.2. Aile Öyküsü

Ailede trombositopeni varlığı veya kanama kliniği mutlaka sorgulanmalıdır. Eğer akraba evliliği var ya da ailede birden fazla bireyde trombositopeni saptanmış ise, KT'yi mutlaka düşünmek gerekir. Kalıtsal geçiş sıklıkla otozomal dominant olmakla birlikte X'e bağlı veya otozomal resesif bir geçiş de söz konusudur (22).

2.1.2.1.3. İTP tedavisine yanıtızsızlık

İTP tedavisine yanıtızsız olan olgularda; KT ayırıcı tanısı için trombosit artışının ne kadar olması gerektiği konusunda bir sınırlama yoktur. Ancak immun trombositopenik purpura (İTP) tedavisi sonucunda trombosit düzeyinin $>30.000/mm^3$ çıkması, genellikle İTP'yi düşündürür (21). Trombosit düzeyinin $10.000/mm^3$ kalması ise, hem KT hem de tedaviye yanıtızsız İTP'li olgularda görülebilir. Ayrıca Wiscott Aldrich sendromlu bazı çocuklarda; steroid, intravenöz immunglobulin (IVIG) veya splenektomi sonrası trombositler artabilir. Bu nedenle; İTP ve KT ayırıcı tanısında çok dikkat edilmelidir (22).

2.1.2.1.4. Fizik Anomalilerin varlığı

Israrlı trombositopenisi olan olgularda, bazı fizik anomalilerin varlığı KT'yi düşündürür. Bu anomaliler; radius yokluğu, radial-ulnar sinositoz, işitme kaybı, nefrit, bifid uvula, sağ aortik ark olabilir. Ayrıca sık enfeksiyon ve egzeması olan olgularda da KT düşünülmelidir.

Son yıllarda yeni moleküler yöntemlerin kullanılması; özellikle 'yeni nesil dizileme' ile bu konudaki fenotip-genotip ilişkisi daha iyi ortaya çıkmıştır (22).

2.1.2.2. MYH-9 ilişkili Trombositopeniler

Trombositlerin kalıtsal bozukluklarından biri trombosit sayı bozukluklarıdır (Tablo 3). Bu grupta yer alan MYH9 ilişkili trombosit hastalıkları 4 adettir. Bunlar;

Tablo-3: Kalıtsal trombosit hastalıklarının sınıflandırılması (23)

I. Trombosit sayı bozuklukları

- 1. **MHY9 ilişkili Trombosit Hastalıkları**
 - May-Hegglin anomalisi**
 - Sebastian sendromu**
 - Fechtner sendromu**
 - Epstein sendromu**
- 2. Konjenital amegakaryositik trombositopeni
- 3. Amegakaryositik trombositopeni ile radioulnar sinositoz
- 4. Trombositopeni-Radius yokluğu sendromu
- 5. X-Geçişli trombositopeni ile diseritropoez
- 6. Lösemiye yatkınlık ile seyreden trombositopeni
- 7. Montreal trombosit sendromu
- 8. Akdeniz makrotrombositopenisi

II. Ağır Trombosit Fonksiyon Bozuklukları

- 1. Wiskott Aldrich sendromu
- 2. Glanzmann trombastenisi
- 3. Bernard Soulier sendromu

III. Reseptör ve Sinyal İleti Bozuklukları

- 1. Trombosit siklooksijenaz eksikliği
- 2. Tromboksan sentaz eksikliği
- 3. Tromboksan A2 reseptör eksikliği
- 4. Adenozin difosfat reseptör eksikliği

IV. Trombosit Granül Bozuklukları

- A. Dense granül bozuklukları**
 - 1. İdiopatik dense granül bozuklukları
 - 2. Hermansky-Pudlak sendromu
 - 3. Chediak- Higashi sendromu
- B. Alfa granül bozuklukları**
 - 1. Gri trombosit sendromu
 - 2. Paris- Tousseau/ Jacobsen sendromu
 - 3. İdiopatik alfa ve dense granül depo havuz hastalığı

V. Fosfolipid bozuklukları

- 1. Scott sendromu

2.1.2.2.1. May-Hegglin Anomalisi

May, 1909 yılında hafif kanama semptomları olan geniş trombositlere sahip birçok üyeli bir aile tanımladı (2,3,23). Hegglin 1945'te etkilenen bireylerin lökositlerinde Döhle benzeri inklüzyon cisimleri buldu (24). Bu, trombositopeni, dev plateletler ve lökosit inklüzyon cisimleri üçlüsünü tanımlamak için May-Hegglin anomalisi (MHA) terimine yol açtı. Makrotrombositopeniler içinde May-Hegglin

anomalisi bilinen ilk trombosit fonksiyon bozukluğu olan hastalıktır. Dev trombositler ve değişen trombositopeni (sıklıkla orta derecede) görülür. Granülosit inklüzyonlar görülür. Bu inklüzyon cisimleri, periferik yaymada; iç şeklinde ve parlak mavi renkte görölmektedir. Inklüzyonlar polimorfonükleer lökositlerin sitoplazmasının periferinde oval ya da yuvarlak şekilde, spesifik granül içermeyen amorf dansiteli ribozomal filamentler şeklindedir. Onlar ribonükleik asitten ibarettir. Esasen defektif NMMHC protein depolarıdır (25,26). Kanama genellikle hafiftir. Bu durum trombositlerin boyutları nedeniyle ve küçük damarlarda kollajen maruziyeti hasarlı endotele adezyon için gerekli şekil değişiminin zorluğu nedeniyledir. Kanama esasen travma, cerrahi ya da diğ çekimi nedeni ile olur. Bozuk-hatalı tubulin ve büyük hacimli trombositler muhtemelen azalmış pıhtı stabilitesinden sorumludur. (26,27)

2.1.2.2.2. Epstein Sendromu

1972'de Epstein ve arkadaşları, Epstein sendromunu (EPS) sağırlık ve nefritle ilişkili dev trombositler ile karakterize edilen; ancak, MHA'nın aksine, lökosit inklüzyon cisimleri olmayan ilk makrotrombositopenik sendrom olarak tanımladılar (28). Sensörinöral sağırlık ve böbrek yetmezliği ile birlikte dir. Katarakt görülmez. Trombositopeniye ilavaten adenzin difosfat ve kollajene cevapta defektif trombosit agregasyon ve sekresyonuna ikincil kanama ile karakterizedir (27).

2.1.2.2.3. Fechtner Sendromu

Peterson ve arkadaşları 1985'te, interstisyel nefrit, katarakt, sağırlık (Alport'a benzeyen bir sendrom kompleksi) ve lökosit inklüzyon cisimleri ile karakterize dominant kalıtılan makrotrombositopenik sendrom tanımladılar ve bu hastalığı Fechtner sendromu (FS) olarak adlandırdılar (29). Lökositlerdeki inklüzyon cisimleri, MHA'da gözlemlenenden çok daha küçük ve iç şeklinden ziyade tipik olarak yuvarlak şeklindedir. Kanama klinik olarak hafif ile orta şekilde olup, travma, diğ çekimi ve cerrahiye takiben önemli kanama eğilimi olur. Hastalar da böbrek yetmezliği geliştiğinde daha fazla kanarlar (25,27).

2.1.2.2.4. Sebastian Platelet sendomu

Greinacher ve arkadaşları 1990'da, Sebastian trombosit sendromunu (SPS) lökositlerde küçük inklüzyon cisimleri olan daha hafif bir varyant makrotrombositopeni

olarak tanımladı. İlk raporda, etkilenen SPS aile üyeleri, katarakt, böbrek yetmezliği veya yüksek tonlu sensörinöral işitme kaybı göstermezken, bu aile 18 yıl sonra yeniden değerlendirildiğinde, bazı etkilenen bireylerde genç yaşta (45-50 yaş) katarakt geliştiği ve 50 yaşından büyük tüm etkilenen aile üyelerinde yüksek tonlu işitme bozukluğu geliştiği bildirildi. Lökositlerde görülen inklüzyonlar Fechtner sendromunda gözlenenlere benzerdir (30). Mikroskopta incelediğinde, döhle cisimciklerine benzer inklüzyonlar ribzomlardan oluşur ve MHA'da gözlenenenden daha küçüktür, filamentler dağınıktır ve bunları çevreleyen membran yoktur. Kanama eğilimi hafiften ortaya değişir (23-27).

Tablo-4: MYH-9 ilişkili hastalıklarda trombositopeni ve hematolojik olmayan bulguların varlığına göre sendromlar (3)

	May-Haglin	Fechtner	Ebstein	Sebastian
Makrotrombositopeni	+	+	+	+
Büyük inklüzyon cisimciği	+			
Küçük inklüzyon cisimciği		+		+
Duyuma kaybı		+	+	(+)
Nefrit		+	+	
Katarakt		+		(+)

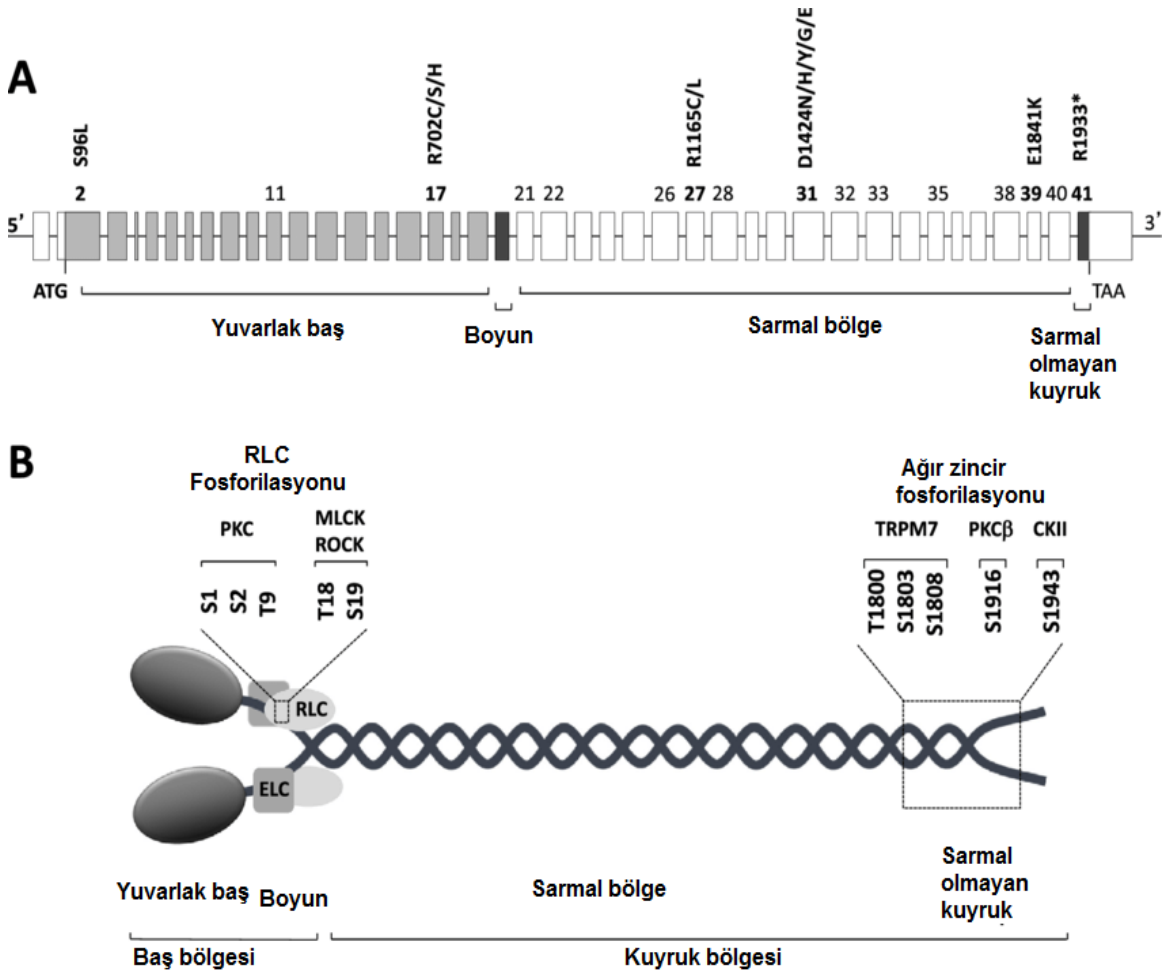
(+): bulguların daha geç yaşta çıkması

1999'da bu dev trombosit bozukluklarının kalıtımı 22 kromozomun kısa kolundaki 5.5 Mb'lık bölge ile ilişkilendirildi (31,32). Kısa bir süre sonra iki grup, MYH9 geninde bu makrotrombositopenilerin altta yatan nedeni olarak mutasyonları tanımladı (33,34) MHA, EPS, FS ve SPS sendromları şimdi katarakt, nefrit ve sensorineural işitme kaybı gibi ek özelliklerin varlığı veya yokluğu ile fenotipik farklılıklar gösteren, MYH-9 gen mutasyonlarından kaynaklanan birbiriyle ilişkili bozukluklar olduğu kabul edilmektedir.

Bu nedenle bu hastalıklara MYH-9 ilişkili makrotrombositopeniler olarak adlandırılması önerilmiştir. (33,35,36)

2.1.2.2.5. NMHC IIA proteini ve MYH-9 gen mutasyonu

Kromozom 22q12-13'te bulunan MYH-9 (miyozin ağır zincir 9) geni, kas dışı miyozin ağır zincir tipIIA (NMMHC IIA) proteinini kodlar. Bu protein hematopoietik hücrelerin kontraktıl olmaları için gerekli olan hücre iskelet proteinidir. NMMIIA proteini, üzerinde ATP ve aktin için bağlanma yeri olan baş ve kuyruk kısmından oluşur. Myosin baş kısmı aktin zinciri boyunca hareket eder (Şekil-2).



Şekil-2: A:MYH-9 genomik yapısı, B: (NMMIIA)'nın şematik yapısı

NMMII, MYH-9 geninin kodladığı NMMIIA, MYH-10 geninin kodladığı NMMHIIB ve MYH-14 geninin kodladığı NMMIIC olmak üzere 3 izoformu vardır. Trombositler sadece NMMIIA içerir. Farelerde yapılan çalışmalarda NMMII

izoformları birçok farklı dokularda ve birden fazla izoform olarak yer aldığı gösterilmiştir (25).

Tablo-5: Farelerde NMMII izoformları (25)

Fare dokusu	II-A	II-B	II-C
Embriyonik karaciğer odakları	++		
Embriyonik böbrek	++	+	+
Embriyonik göz	++(lens epiteli)	+(retina)	+(lens ve retina)
Embriyonik damak	++		+
Embriyonik damar endoteli	++		
Kıl folikülleri	++		+
Koklea	++	+	+++
Diş gelişimi	++		+
Lakrimal gland	++		+
Embriyonik ve neonatal Santral sinir sistemi		++	+
Kalp		+	+/-
Embriyonik kıkırdak			+
Embriyonik bağırsak	++	+	+
Trombosit	++		
Nötrofil granülositleri	++		
Eozinofil granülositleri	+	+	
Monositler	++		
Lenfositler	++		

Nötrofillerde ve eozinofillerle az sayıda monositlerde inklüzyon cisimciği saptanır. İnküzyonlar Wright-giemsma ile parlak mavi renkte boyanır. Wright boyasından ziyade May-Grünwald-Giemsma ile daha iyi görünürler (25). Döhle cisimciği

olarak adlandırılır. Bu yapıların mutasyona uğramış kasa ait olmayan miyozinin ağır zincir IIA olduğu düşünülmektedir. Bu inklüzyon cisimciği normalde enfeksiyon varlığında bazen de gebelikte nötrofil içinde saptanan inklüzyon cisimciklerine çok benzer. Ancak enfeksiyonda inklüzyon cisimcikleri enfeksiyonun düzelmesi ile kaybolurken, MYH-9 anomalisinde sabit olarak kalmaya devam eder (33).

NHMHC IIA'nın temel fonksiyonu hücrenin hareketliliği, megakaryosit kontraksiyonu ve sitoplazmik yapının korunmasıdır. Megakaryositlerde proteinin bulunmaması defektif megakaryopoez ile trombositopeniye, trombositlerde bulunmaması ise şekil bozukluğu ile makrotrombosit oluşumuna yol açar (37). Proteinin farklı doku ve organlarda sentezlenememesi sonucu hematolojik olmayan bulgulardan nefrit, sensörinöral işitme kaybı ve katarakt gelişebilir (38). Ancak çoğu hücre birden fazla kas dışı miyozin izoformu içerir ve proteindeki mutasyonlarda görülen fonksiyon kaybını kompanse edebilir. Trombositler sadece NMMIIA içerdiğinden, makrotrombositopeni her zaman görülür (25).

NMMIIA'nın baş kısmını etkileyen mutasyonlar (exon1-16), kuyruk lokasyonlu mutasyonlara göre (exon 20-40) daha ciddi organ tutulumları ile ilişkilidir. Exon 16 ile ilişkili mutasyonlar renal yetmezlik, sağırılık ve katarakt gelişimi açısından yüksek risk oluştururken, exon 24 ile 30 bölgesindeki mutasyonlar daha hafif hematolojik olmayan özellikler gösterir (39).

2.1.2.2.6. Makrotrombosit oluşumu

Trombosit oluşumu, aktin ve tubulin de dahil olmak üzere megakaryosit hücre iskeleti komponentlerinin yoğun olarak yeniden düzenlenmesini içerir. Ayrıca oluşan trombositlerin her birinin boyutunun ayarlanması da önemlidir. Ancak, trombosit oluşumunun bu yönü hakkında bilgi çok kısıtlıdır, yine de proplateletten trombosit oluşurken uygun trombosit volümünü ayarlama tubulinin ölçüm cihazı gibi çalıştığı düşünülmektedir. Trombosit oluşumu bazı yollarda GATA-1, GPIb-IX kompleks, Wiscott-Aldrich sendromu proteini ve trombosit miyozininden (NMHCIIA) de etkilenmelidir ki her birinin gen defekti büyük ya da küçük trombositlerin yapımına sebep olmaktadır (6, 8,11,40).

Kültürlenmiş megakaryositler üzerine yapılan in vitro çalışmalar, miyozin IIA'nın proplatelet oluşumunu inhibe ettiğini ortaya koymuştur. MYH-9 mutasyonları

nedeniyle miyosin IIA fonksiyonunun kaybı, prolatalet oluşumunu teşvik eder ve erken ve olgunlaşmamış trombosit salınımını tetikleyerek makro-trombositopeni ile sonuçlanabilir. Dev trombositler, sadece işlev kaybı olan ve sitoskeletal kontraktıl yapıların yeniden düzenlenmesine katılamayan mutant miyosin IIA'yı eksprese eder (41).

2.1.2.2.7. Hematolojik olmayan bulguların oluşumu:

MYH-9 ilişkili trombositopenilerde kataraktın patogenezi bilinmemektedir. Böbrek hasarı ve işitme kaybı mekanizmaları hakkında yalnızca sınırlı bilgi edinilmiştir (42).

Böbrekte NMM-IIA, podosit, mesangial, tübüler ve endotel hücrelerinde yer alır. Podosit olarak da adlandırılan glomeruler visseral epitelyal hücreler, glomerüler bazal membranın dış yüzünü kaplayan oldukça özelleşmiş hücrelerdir. Podositlerin kapillerler üzerinde sonlanan ayaksı çıkıntılarının aralarında filtrasyon yarıkları (yarık diafram) bulunur. Miyosin IIA'nın, podosit ayaksı çıkıntılarında aktin-miyosin kasılma aparatının önemli bir bileşeni olduğu ve kılcal damar duvar bütünlüğünün korunmasında rol oynadığı düşünülmektedir. MYH9 bozukluklarında, miyosin IIA anormal dağılır veya mesangial hücrelerde, tübüler hücrelerde ve podositlerde azalır. Mutasyona uğradığında yarık diaframın yapısı ve fonksiyonun bozulmasıyla, proteinüriye, gomeruler bazal membranda hasara ve glomeruloskleroza yol açtığı düşünülmektedir (42-45).

Kokleada NMMHC-IIA, spiral limbus ve spiral ligamentte olduğu gibi korti organının tüylü duyu hücrelerinde yer aldığı fareler üzerinde yapılan immüno-lokalizasyon çalışmalarında gösterilmiştir (46-48). NMMHCIIA tüylü hücrelerde stereosilya, kutikuler tabaka, plazma membranı ve mitkondri içinde bulunur. Bu araştırmalar, MYH9 mutasyonlarının, miyosin VI gibi myosin süper ailesinin diğer üyelerinin mutasyonlarından türeyen sağırılık modellerinde gözlenenlere benzer şekilde, stereosilyanın yapısal bütünlüğünün bozulmasıyla işitme kaybına yol açtığı hipotezine yol açmıştır. (48,49).

2.1.2.2.8. Klinik

MYH-9 ilişkili trombositopenilerin hepsinde makrotrombositopeni ve inklüzyon cisimi olmasına rağmen Alport sendromundakine benzer nefrit, duyma kaybı ve katarakt olmasına göre farklı sendromlar oluşmaktadır (50). Klinik ayırım bazen çok zor olabilir

çünkü aynı aile içinde bile nefrit ve duyma kaybının seyri farklı olabilir. Henüz kalıtımın nasıl geçtiğinin bilinmemesi ve çevresel faktörlerin etkisi bunun nedeni olarak düşünülmektedir. Örneğin duyma kaybı ve kataraktın MHA'da ve Sebastian sendromunda görülme olasılığı sırası ile %82 ve %23'dür. Hematüri, proteinüri ve böbrek problemleri ise Fechtner ve Ebstein sendromunda daha sık, MHA ve Sebastian sendromunda daha nadir görülür (51). Son yıllarda bu dört farklı isimle anılan hastalıkların aslında aynı hastalığın farklı klinik tabloları olduğu kabul edilerek nozolojik olarak hastalara MYH-9 ilişkili trombositopeniler denilmektedir (39).

Hastalık ağırlığı genelde en sık olarak yaşla ilişkili olarak bulunmaktadır. Beklenildiği gibi yenidoğan ve çocuklukta bu grup hastalıklar daha ağır seyrederken yaşla birlikte klinik bulgular azalmaktadır (52). Tanı almadan yaşamını tamamlayan birçok MYH-9 ilişkili trombositopenili olgu olduğu düşünülmektedir (53). Yenidoğan bebeklerde trombositopeni çoğunlukla hasta bebek eşlik eden bulgusu olduğu için sepsisle birlikte saptanır. Yenidoğan döneminde %5'den az trombositopenili bebekte kalıtsal neden saptanabilir. Çocukluk çağında nadir olmakla beraber Fanconi anemisi, kalıtsal kemik iliği yetersizliği gibi hastalıkların ilk bulgusu da trombositopeni olabileceği bilinmelidir (53).

Tüm MYH-9 ilişkili trombositopenili olgularda bebeklikten itibaren trombositopeni vardır. Fakat bazı hastalarda sensörinöral sağırılık, kimisinde presenil katarakt diğer bir grupta glomerulonefrit ve böbrek yetersizliği ilerleyen dönemde izlenebilir. İşitme kaybı veya proteinüri geliştiğinde hızlı seyretme eğilimi gösterir. Bu komplikasyonların erken yaşta başlama riski sendromlar arasında farklılık gösterir. Fechtner sendromlu hastalarda adolesan yaşta renal hastalıklar ve işitme kaybı başlama riski yüksektir. May Hagglin anomalili hastalar sıklıkla sadece trombositopeni ile başvururken, sebastian sendromlu hastalarda işitme kaybı ve katarakt sıklıkla 50 yaş civarında gelişir. Birçok hastada hematolojik olmayan bulguların tahmini gelişme riski aile öyküsü ve mutasyonun lokalizasyonuna göre yapılır (39). Pecci ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; 108 hastanın NMMHC-IIA motor baş kısmında mutasyon varlığında 40 yaşından önce başlayan nefrit ve sağırılığın eşlik ettiğini saptamışlardır. Kuyruk bölgesinde olan mutasyonlarda bu ek bulgulara pek rastlanılmadığı gibi trombosit değerleri de yüksek bulunur (39).

Trombosit sayısı genellikle 20.000-130.000 mm³ arasındadır. Ancak trombositlerin boyutları nerede ise eritrosit boyutunu geçer. Hastaların kanama semptomları hafif ve enderdir. Kolay morarma ve hematomlar gözlenebilir. Peteşi enderdir. Bugüne kadar sadece bir kafa içi kanama olgusu bildirilmiştir. Hastalar genellikle izole hematolojik bulgular ile saptanırlar (25,38,54).

Hastaların tanı almasının, yanlış olarak kronik ITP denilerek gereksiz yere ağır tedavi almasını önlemesi açısından önemi vardır (50,55). Yoksa bu grup hastalarda hayatı tehdit edici kanamalara sık rastlanılmaz. Ancak hastalarda trombosit fonksiyon ya da sayısını etkileyecek ilaç kullanımından kaçınılmalıdır. Ağır travma ya da cerrahi varlığında nadiren trombosit süpsansiyonu kullanması gerekebilir. Gebelikte de pek sorun olmaz, rahatlıkla normal doğum yapabilirler (56).

2.1.2.2.9. Tanı

Makrotrombositopeni ve lökositlerde Döhle cisimciğine, hematüri, katarakt, sensorionöral işitme kaybı bulgularının eşlik etmesi tanıyı yüksek oranda doğrular. Kesin tanı 22q12-13 kromozomunda MYH9 geninde saptanacak mutasyonun moleküler yöntemle saptanmasına dayanır(25,27,57).

NMM-IIA kümelerinin immunoboyamaları ile inklüzyon cisimlerinin görülmesi altın standarttır. İmmunoflorasan tetkik ile hastanın lökositlerinde miyozin-9 agregat tespiti yapılır. PFA-100 kullanarak trombosit agregometri ve trombosit fonksiyon çalışmaları büyük bir kusur göstermez. Çünkü agregasyon eğrisinde tipik şekil değişikliği yoktur. Kemik iliği muayenesi gerekmez (25,57).

2.1.2.2.10. Tedavi

Kanamayı durdurmak için lokal kontrol sağlanır. Kanama durdurulamaz ise antifibrinolitik ajanlar ve trombosit transfüzyonu gerekebilir. Desmopressin bazı hastalarda kanama zamanını %50 kısaltabilir. Yeni lisanslı trombopoietik ajanlar araştırılmaktadır. Trombopoietin reseptör aganistleri (eltrombopag, romipositim) elektif ya da majör cerrahi hastalarında kullanılabilir (27,57).

Hematolojik olmayan belirtilerden presenil kataraktı veya işitme kaybını önlemek için bir tedavi mevcut değildir. Ancak, işitme kaybı motorprotein defekti nedeniyle kohleada bulunan silioların bozulmuş hareketinin sonucu olduğundan,

yüksek ses gürültüsünden (müzik konserleri, kulaklıklar) kaçınılması muhtemelen sağırılığın başlangıcını geciktirmeye yardımcı olur. Ayrıca, böbrek yetmezliğinin önlenmesi için nedensel bir tedavi yoktur. MYH-9 ile ilişkili trombosit bozukluğunda renin-anjiyotensin sisteminin farmakolojik blokajı 4 kişide proteinüriyi azalttığı gösterilmiştir (58).

Chen Y ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada miyozin II inhibitör blebbistatin ve ROCK inhibitör Y27632'in MYH-9 ilişkili trombositopeni tanılı hastalarda proplateletlerdeki bozukluğu düzelterek, ultrastrüktürel karakteristik bulguların normalleştirdiğini gösterdiler. Bu sayede yeni tedavi seçeneği olarak aktomyosin kasılma değişikliği gerçekleştirilerek hastaların gelecekte tedavi edilmesi planlanmaktadır (59).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Grubunun Oluşturulması

Bu araştırmada İstanbul il Milli Eğitim Müdürlüğü'ne bağlı 18 yaş altı çocuk ve gençlerin eğitim gördüğü işitme engelli okullarındaki öğrenciler çalışmaya alındı. Bu kapsamda gerekli izin İstanbul il Milli Eğitim Müdürlüğü'nden alınarak, Halıcıoğlu İşitme Engelliler Okulu, Mimar Sinan İşitme Engelliler Okulu, Göztepe İşitme Engelliler Okulu ve Tuzla İşitme Engelliler Okul'larında öğrenim gören öğrencilerden MYH-9 (Miyozin Ağır Zincir-9) gen taraması yapılması planlandı. Çalışmaya işitme engelli olan 172 birey dahil edildi ve tüm bireylere çalışmanın olası sonuçları hakkında bilgi verilerek gönüllü olarak katıldıklarına dair onam formu alındı.

Çalışmaya katılan gönüllülerden tam kan sayımı yapılarak, hastaların öncelikle trombosit sayı ve ortalama trombosit hacim değerleri belirlendi. Çalışmaya trombositopeni ($PLT < 150.000/mm^3$) ve ortalama trombosit hacmi (MPV) 10fL üzerinde saptanan 6 hasta, $MPV > 10fL$ olan 11 hasta ile $MPV(8-10fL)$ olan 123 hasta olmak üzere toplamda 140 hasta dahil edildi. MPV değeri 8fL altında saptanan 32 hasta mutasyon analizine dahil edilmedi.

Çalışmanın mutasyon analizi kısmında polimorfik değişimler (tekli nükleotid değişimleri vb) ve mutasyonlar, DNA bankamızda mevcut olan sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

Projenin Etik Kurul Onayı İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alındı.

Yöntemler

DNA İzolasyonu

Araştırmaya katılan bireylerden alınan 9ml kan, 1ml 0,5M Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Scharlau, İspanya) bulunan tüplere aktarılmıştır. Bu kan örneği 50mL'lik falkon tüpe konur ve içerisinde 25ml RBC (Red Blood Cell) lizis solüsyonu [155 mM Amonyum Klorid (AppliChem, Almanya); 10mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya); 0,5 mM EDTA (AppliChem, Almanya) eklenir, 20 dk buzda bekletilir. +4°C, 4000 rpm'de 15 dk santrifüj (Hettich, Almanya) edildikten sonra süpernatant dökülür. Tüpün dibindeki çökelek üzerine tekrar RBC lizis solüsyonu ilave

edilir. Bu işlem tüm eritrositler giderilene kadar tekrarlanır. Son kez süpernatant döküldükten sonra dipte kalan lökositler üzerine 1000µL RBC lizis solüsyonu eklenir ve bu karışımın 800µl'si ependorf tüpüne alınarak -20°C sıcaklıkta stok olarak saklanır. Geriye kalan 200µL bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 20µg/mL olacak şekilde Proteinaz K enzimi (MBI Fermentas, Litvanya), son konsantrasyon %0,5 olacak şekilde %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (Merck, Almanya) ve lökosit hacminin 2,5 katı olacak şekilde nükleaz solüsyonu 10mM Trisklorid (Amresco, ABD) pH: 8; 100mM Sodyum Klorid (Merck, Almanya), 1mM pH: 8 EDTA (AppliChem, Almanya) eklenerek bir gece 56°C'de sıcak su banyosunda (Mommert, Almanya) bekletilir. İkinci gün işlemi olarak proteinlerin DNA'dan uzaklaştırılması amacıyla tüplere 1:1 oranında Fenol/Kloroform [Fenol (Merck, Almanya), Kloroform (Merck, Almanya), İzamilalkol (Merck, Almanya)] eklenerek 10 dk çalkalanır ve buz içerisinde 20 dk bekletildikten sonra +4°C'de 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilir. İki faza ayrılan karışımın üst kısmı başka bir ependorf tüpüne alınarak üzerine toplam hacmin 1/10'u kadar 3M Sodyum Asetat (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar %95'lik alkol (Tekel, Türkiye) eklenir. Ependorf tüpü ters düz edilerek DNA görünür hale getirildikten sonra -20°C'de bir gece bekletilir. Üçüncü gün tüpler +4°C 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek DNA çöktürülür. Süpernatant kısmı dökülerek tüpe 500µL %70'lik alkol (Tekel, Türkiye) eklenir ve +4°C 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonunda alkol dökülür ve tüpler kurutma kağıdı üzerinde kapakları açık bir şekilde kurumaya bırakılır. Kurutulduktan sonra tüp içerisine Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) solüsyonu eklenip 37°C'de bir gece bekletilerek DNA'nın çözülmesi sağlanır. İzole edilen DNA +4°C veya -20°C'de saklanabilmektedir.

Elde edilen DNA'ların kalitesinin ölçümü ve çalışmaya dahil edilip edilmeyeceğinin tayini için iki yöntem kullanılmıştır:

a. Spektrofotometrik ölçüm: İzole edilen DNA örnekleri spektrofotometrede A260 ve A280 dalga boylarında okunarak hem ug/ml cinsinden konsantrasyonları tespit edilecek hem de A260/A280 oranı ile protein kontaminasyonu olup olmadığı değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonrası A260/A280 oranı 1.7-1.9 olan örneklerle işlemlere devam edilmiştir.

b. Agaroz jel elektroforezi: İzole edilen DNA örneklerinin bütünlüklerinin kontrolü amacıyla %1'lik agaroz jel hazırlanmış ve bu jeldeki yürüme profilleri değerlendirilmiştir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

MYH9 (Miyozin Ağır Zincir-9) geninin taranması için yapılan polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) son konsatrasyonu 10pmol/μl olacak şekilde seyreltilen primer çifti kullanılmıştır. PCR bileşenleri; 10X Taq tampon çözeltisi (Bioron, Almanya), 25mM MgCl₂ (Fermentas, ABD), son konsantrasyon 2mM olacak şekilde dNTP [(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)(Bioron, Almanya)], son konsatrasyonu 10pmol/μl Forward ve Reverse primerler (Alpha, Kanada), Taq DNA polimeraz (Fermentas, ABD) belirli oranlarda kullanılarak PCR şartları sağlanmış son hacim 50μl'e ddH₂O ile tamamlanmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları; 95°C'de 5 dakika, bunu takip eden 34 siklusta; 94°C'de 1 dakika, 60°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika, 72°C'de 7 dakika olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir (Thermal Cycle, Biometra, Almanya).

Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Bio Basic Inc, ABD); kullanılacağı amaca uygun olarak belirli yüzdelerde hazırlanır. Bu çalışmada MYH9 genine ait 7 ekzon ve TUBB1 genine ait 4 ekzon için PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde değerlendirildi. %2'lik agaroz jel için 3g TBE 1X (Tris-HCl, Borik asit, EDTA) solüsyonu ile 150ml' ye tamamlandı. TBE 1X solüsyonu; TBE 5X solüsyonunun 1/5 oranında ddH₂O ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. TBE 5X solüsyonunun hazırlanışı; 54 g Tris (Amresco, ABD), 27,5g Borik asit (AppliChem, Almanya), 20ml 0.5M pH:8 EDTA (AppliChem, Almanya) ve deiyonize su (ddH₂O) ile 1000mL'ye tamamlanarak hazırlanır. Agaroz istenilen yüzdelerde hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında (Beko, Türkiye) kaynatılır. Üzerine Etidyum Bromid'in (Sigma, ABD) %5'lik stok solüsyonundan 8μl ilave edildikten sonra iyice karıştırılır ve jel tabağına (Qwl Scientific, ABD) dökülür. Jel dökülmeden önce jel tabağı uygun taraklar kullanılarak hazırlanır. Agarozun donması için yaklaşık 45 dk beklenir. Agaroz donduktan sonra jel tabağıyla birlikte jel elektroforez tankına (Biometra, Almanya) yerleştirilir. Elektroforez tankı TBE 1X solüsyonu ile jelin üstünü kapatacak şekilde doldurulur. PCR ürünlerinden 10μl alınarak temiz bir parafilm (Parafilm, Chicago, ABD) üzerinde 5μl Brom-Fenol Mavisi (BBF, Merck, Almanya) ile

karıştırılır ve jellere yüklenir. PCR ürünlerinin değerlendirilebilmesi ve reaksiyonun istenilen uzunluktaki doğru bölgeyi çoğalttığını görebilmek için marker (Φ X174 DNA-HaeIII BioLabs, ABD; Φ X174 DNA-HinfI BioLabs, ABD) PCR ürünleriyle birlikte jele 3 μ l kadar yüklenir. 90-100 V akımda 30-40 dk kadar yürütülür (Biometra, ABD). Ultraviyole ışıkta (Spectroline, ABD) incelenir. Image Analyser’da (Alpha Imager, ABD) fotoğraflarır.

PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu

Maksimum 50 μ L PCR ürünü alınarak pürifikasyon işlemi yapılmıştır. İşlem pürifikasyon kitinin 96 kuyulu özel plakasında yapılır. Alınan PCR ürününün 1.8 katı AgenCourt temizleme solüsyonu eklenir ve karışması sağlanır. Plaka 3 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra mıknatıs özelliğindeki plaka üzerine yerleştirilir. 10 dk bekletilir. Solüsyon içindeki mıknatıs özellikli manyetik topların PCR ürünü ile birlikte plakaya yapıştığı ve kahverengi halka oluştuğu gözlenir. Oluşan kahverengi alan dışında kalan kısım mikropipet yardımı ile uzaklaştırılır. 200 μ L %70’lik etanol eklenir, 30s sonra alkol alınır. Bu işlem 2 kere tekrar edilir. Oda sıcaklığında manyetik plaka üzerinde alkolün buharlaşması sağlanır. Kuruma sağlandıktan sonra 40 μ L bidistile su ile sulandırılır. %2’lik jelde sonuçlar incelenir. Bant yoğunluğuna göre DNA dizi analizinde kullanılacak PCR ürünü belirlenir.

DNA Dizi Analizi

Her bir bölge için birbirinden farkları tespit edilen bant profilleri, nükleotit dizilerinin belirlenmesi için kapiller sistem otomatik sekans cihazı (CEQ800XL, Beckman Coulter, ABD) kullanıldı. DNA dizi analizi için hazırlanan primerlerle yapılan PCR işlemi sonrası pürifikasyon işlemine tabi tutulan örnekler DNA dizi analizine alındı. Bunun için 0,2ml’lik, 96 tane kuyucuk içeren plakalar kullanılıp her bir kuyucuğa 12 μ l premiks (2 μ l 10X reaksiyon tamponu, 1 μ l dNTP karışımı, 2 μ l ddUTP, 2 μ l ddGTP, 2 μ l ddCTP, 2 μ l ddATP, 1 μ l polimeraz enzimi), 5 μ l temizlenmiş PCR ürünü, 20 μ mol primer konularak “cycle sequencing” işlemi gerçekleştirildi. Bunun için plaka, PCR cihazına (Biometra, Almanya) yerleştirilip 94°C’ de 5 dk ilk denatürasyon, 30 siklus 96°C’de 20s denatürasyon, 50°C’de 20s yapışma ve 60°C’ de 4 dk’lık uzama evresi gerçekleştirildi. “Cycle sequencing” sonlandıktan hemen sonra reaksiyonun durdurulması için her bir kuyucuğun dibine 5 μ l durdurma solüsyonu (1,5 M C2H3O2Na, 50mM EDTA, 20 mg/ml’ lik Glikojen) pipetlendi. Örneklerin üzerine 60 μ l

%95'lik soğuk etanol eklenerek +4°C'de 4000rpm'de 4 dk santrifüjlenerek (Hettich, Almanya) yıkama işlemi gerçekleştirildi. Üstteki kısım dökülerek %70'lik alkolden 200µl eklenip, +4°C'de 4000rpm'de 2 dk santrifüjlenerek üstteki kısım döküldü. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra plak 300rpm'e çikana kadar ters olarak santrifüjlenip fazla etanol uzaklaştırıldı. Plate, liyofilizatör cihazına (Christ, Almanya) yerleştirilip ve yüksek vakum altında örnekler kurutuldu. Kuruyan örneklerin üzerine 25µl formamid içeren solüsyondan konularak DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrı tutulması sağlandı. Her bir kuyucuk mineral yağ ile kapatıldıktan sonra plate, DNA dizi analizi cihazına yerleştirildi ve elde edilen sonuçlar CEQ Sequencing Software programı kullanılarak dalgalar halinde görünür hale getirildi. Bu işlemler için hizmet alımı yapıldı. (Medsantek)

İstatistiksel yöntem

Verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS 20.0 (IBM Corporation 2011, NY) paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sürekli ölçümlerse ortalama ve standart sapma olarak özetlendi. Kategorik verilerin karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanıldı. p-değeri <0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

Etik kurul Onayı

Çalışma için İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi klinik araştırmalar etik kurulundan 3 Ekim 2017 tarihinde 29430533-903.99-339552 sayılı yazı ile onay alındı.

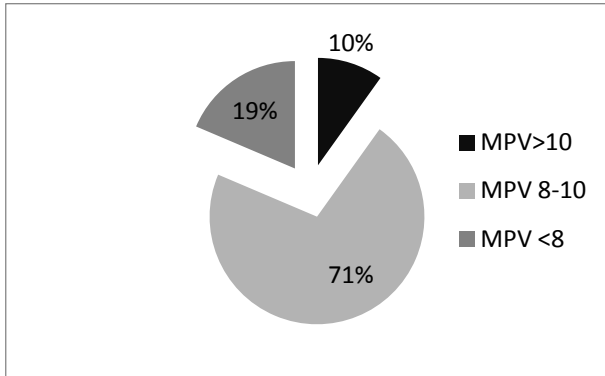
4. BULGULAR

Çalışmaya katılan 172 hastanın 80'i kız, 92'si erkektir. Hastaların tam kan sayımına göre $PLT < 150.000 \text{mm}^3$ altında 7 hasta, $MPV > 10 \text{fL}$ üzerinde 17 hasta, MPV 8-10fL aralığında 123 hasta,

$MPV > 10 \text{fL}$ ve $PLT < 150.000 \text{mm}^3$ olan 6 hasta saptanmıştır (Tablo-6). MPV değerlerine göre dağılım yüzdeleri Şekil-3'de gösterilmiştir. Klinik olarak hiçbir hastada kanama bulgusu veya şikayeti yoktu.

Tablo-6: İşitme engelli öğrenciler ile ilgili sayısal veriler

	n (%)
*Cinsiyet (Kız)	80 (46)
* $MPV > 10$	17 (10)
* MPV 8-10	123 (72)
* $PLT < 150.000 \text{mm}^3$	7 (4)
* $MPV > 10$ ve $PLT < 150.000 \text{mm}^3$	6 (3,5)



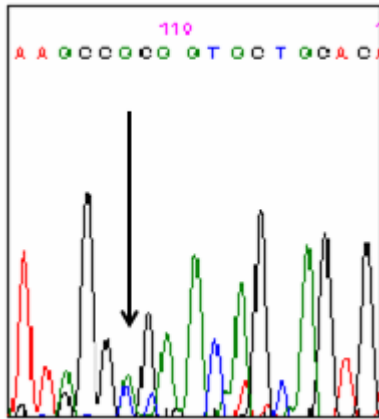
Şekil-3: MPV dağılım yüzdeleri

44 ekzona sahip MYH9 geninde literatür araştırması sonucu mutasyon sıklığı yüksek olan 7 bölge- Ekzon 1, Ekzon 16, Ekzon 25, Ekzon 26, Ekzon 30, Ekzon 38, Ekzon 40 çalışılmıştır. MYH9 geninde yapılan taramada sırasıyla ekzon 1 ve 26'da

değişimler tespit edilmiştir. Bu ekzonların PCR ürün boyutları sırasıyla 274 ve 510 bp'dir.

Ekzon 1 de bulunan değişim 286.nükleotitte meydana gelen Timin'den Guanin değişikliğine neden olan heterozigot değişimdir. C>T değişiminin proteine olan etkisine bakıldığında 96. kodonda Serin'den Lösin aminoasidine dönüşüme neden olduğu saptanmıştır. Bu değişimin mutasyon olup olmadığının kontrolü amacıyla değişimin protein üzerindeki etkisini saptamak amacıyla internet tabanlı bir program olan Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>) kullanılmıştır.

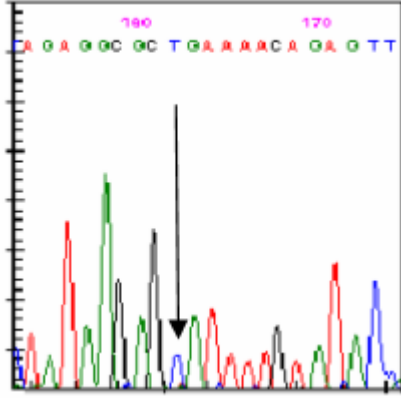
Bu program dizinin evrim boyunca korunmuşluğunu proteinin tahmini yapısını göz önüne alarak hesaplamaktadır. Yapılan hesaplama sonucunda dizide var olan aminosit ile değişim sonucu oluşan aminosit için bir skor elde edilmektedir. Bu skor değeri 2'den büyükse değişimin proteini hasara uğrattığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda karşılaştırmak amacıyla NCBI e-veritabanında yer alan "Multipl Alignment Tool" seçeneği kullanılarak türler arasında karşılaştırma yapılmış aminoasidin bulunduğu konumun genin fonksiyonu açısından önemli olduğu bu nedenle de meydana gelen mutasyonun genin fonksiyonu üzerinde etkiye sahip olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Bu sonuç evrimsel süreçte aminoasidin türler arasında neden korunduğunu açıklamaktadır. Bu değerlendirme ile değişimin yanlış anlamlı(missense) mutasyona neden olduğu belirlenmiştir.



Şekil-4: MYH9 geni, ekzon 1, p.S96L değişimi

Ekzon 26'da daha önce Ensembl e-veritabanında rs710181 referans numarasıyla belirtilen bir polimorfizm saptanmıştır. Bu değişim 3660.nükleotitte Timin'den Guanin bazına homozigot değişim şeklinde meydana gelmiştir. Çalışmada 11 hastada

saptanmıştır. Proteinde 1144. pozisyonda GCT'den GCG kodonuna geçişerek Alanin'den Lizin aminoasidinin değişimine neden olmaktadır.



Şekil-5: MYH9 geni 26.ekzonda hasta bireye ait DNA Dizi Analizi görüntüsü A1144L polimorfizmine neden olan T>G değişiminin gerçekleştiği nokta ok ile işaretlenmiştir

Mutasyon analizine göre Ekzon 1 S96L değişimi ve ekzon 26 A1144L polimorfizm saptanan toplam 15 hastanın yaş ortalaması 11,2 yıl, ortalama trombosit sayısı 276.000mm³ ve ortalama MPV değeri 9,5fL saptanmıştır. Mutasyon analizi negatif saptanan 125 hastanın yaş ortalaması 12 yıl, ortalama trombosit sayısı 281700mm³ ve ortalama MPV değeri 9,1fL saptanmış olup iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo-7).

Tablo-7: Hastaların trombosit sayısı, MPV ve yaş ortalamaları

	Toplam (n=172)	Çalışma n=140	Mutasyon(+) n=15	Mutasyon (-) n=125	*p
PLT	289,6 (81-571)	281,1 (81-571)	276 (109-571)	281,7 (81-427)	0,693
MPV	8,9 (6,9-16,5)	9,17 (8-16,5)	9,5 (8-12,6)	9,12 (8-16,5)	0,207
Yaş	11,8 (4-18,5)	11,9 (5-18,5)	11,2 (5-17)	12 (6-18,,5)	0,418

*Mann Whitney U testi

Mutasyon analizine göre Ekzon 1 S96L değişimi ve ekzon 26 A1144L polimorfizm gösteren hastaların yaş, cinsiyet, trombosit sayı ve MPV değerleri tablo-8'te gösterilmiştir.

Tablo-8: Ekzon 1 S96A değişimi ve ekzon 26 A1144L polimorfizm gösteren hastaların yaş, cinsiyet, trombosit sayı ve MPV değerleri

Hasta	Yaş	Cinsiyet	PLT X1000/mm3	PLT <150.000 mm3	MPV	MPV >10	Ekzon 1 S96A değişimi	Ekzon 26 A1144L Değişimi
1-(8)	16	K	325	-	9,6	-	+	-
2-(11)	10	E	146	+	12,6	+	-	+
3-(17)	17	K	301	-	8,2	-	-	+
4-(42)	8	Ê	342	-	10,7	+	-	+
5-(45)	12,5	K	249	-	9,7	-	-	+
6-(53)	12	K	256	-	8,9	-	+	-
7-(64)	10,5	K	109	+	10,6	+	+	-
8-(78)	11	E	330	-	8,5	-	+	-
9-(97)	13,5	K	125	+	10,4	+	-	+
10-(102)	14,5	E	180	-	11,1	+	-	+
11-(115)	5	E	206	-	9,2	-	-	+
12-(117)	6,5	E	397	-	8,5	-	-	+
13-(122)	9,5	E	281	-	8,2	-	-	+
14-(131)	10	E	321	-	8	-	-	+
15-(173)	13	K	571	-	8,7	-	-	+

Çalışmada mutasyon veya polimorfizm çıkma oranı; MPV>10fL üzerinde olan hastalarda %29, PLT <150.000mm3 olan hastalarda %42,8, MPV>10fL ve PLT<150.000mm3 olan hastalarda %50 olarak saptanmıştır (Tablo-3). Mutasyon veya plimorfizm görölme oranı trombositopenik olan hastalarada istatikselsel olarak anlamlı artmıştır (p=0,005) (Tablo-10). Trombositopenik olup MPV <10fL olan bir hastada mutasyon veya polimorfizm saptanmadı.

Tablo-9: PLT, MPV değerlerine göre mutasyon veya polimorfizm görülme oranları

	Toplam	Ekzon 1: S96A değişimi	Ekzon 26 A144L Değişimi	Yüzde%
MPV>10	17	1	4	29
PLT 50-100.000 mm ³	1	0	0	0
PLT 100-150.000 mm ³	6	1	2	50
PLT <150.000mm ³	7	1	2	42,8
PLT >150.000 mm ³	133	3	9	9
MPV<10 ve PLT>150.000mm³	122	3	7	8,1
MPV>10 ve PLT<150.000 mm³	6	1	2	50

Tablo-10: Trombosit değerlerine göre mutasyon veya polimorfizm sıklığı karşılaştırılması

	PLT<150.000mm³	PLT>150.000mm³	*p
S96L/A1144L	3	12	0,005

**Mann Whitney U testi*

Mutasyon veya polimorfizm saptanan trombositopenik olan ve olmayan hastalar karşılaştırıldığında; MPV ortalama değerleri sırasıyla 11,2fL ve 9,1fL olarak anlamlı saptandı (p=0,043), yaş ortalamasına göre karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı (p=0,942) (Tablo-11).

Tablo-11: Mutasyon veya polimorfizm saptanan hastaların MPV ve yaş ortalaması

	PLT<150.000	PLT≥150.000	*p
Yaş	11,3	11,2	0,942
MPV	11,2	9,1	0,043

**Mann Whitney U testi*

Tablo-12: Trombositopeni saptanan hastaların aile hikayeleri

	Cinsiyet	Yaş	PLT	MPV	İlk tanı (Yaş)	Akraba evliliği	Kanama öyküsü	Kardeş-benzer durum	Böbrek problemi	Göz problemi	MYH-9 analizi
1-AD	K	18	144	11,3	8	+	(-)	(-)	Amca 35 yaş (ex)	(-)	
2-ZG	K	15	140	10,1	1,5	+	(-)	(-)	(-)	(-)	
*3-İÇ	E	10	146	12,6	1	(-)	(-)	(+)	Dede- diyaliz	(-)	A1144L
4-TK	E	13	145	9,7	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
5-NÖ	K	10,5	109	10,6	1,5	(-)	(-)	Kuzen	(-)	(-)	S96L
6-EG	K	13,5	125	10,4	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A1144L
7-MO	E	12,5	81	11,7	1	1,5. kuzen	(-)	2 Teyze İşitme	(-)	(-)	

*Trombositopenik ve MPV yüksek hastalardan A1144L polimorfizmi çıkan 3 numaralı hastanın aynı okulda okuyan 1 yaş büyük kardeşi de işitme engelliydi. Kardeşinde, taramada makrotrombosit saptandı ve yapılan gen analizinde mutasyon veya polimorfizm saptanmadı.

Tablo-13: S96L mutasyonu pozitif saptanan hastaların aile hikayeleri

	Cinsiyet	Yaş	PLT	MPV	İlktam	AE	Kanama Öyküsü	Kardeş Benzer Durum	Böbrek problemi	Göz problemi
ÖY	K	16	325	9,6	1,5yaş			(+) ve anne, Baba		
HD	K	12	256	8,9	4	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
NÖ	K	10, 5	109	10,6	1,5yaş	(-)	(-)	Kuzen	(-)	(-)
HK	E	11	330	8,5	1,5	(-)	(-)	Yok	(-)	(-)

S96L mutasyonu saptanan hastalardan 1 tanesi makrotrombositopenik olarak saptandı. Trombosit ve MPV değerleri normal aralıkta olan diğer 3 hastalardan biri tek çocuk, diğer 2'sinde ise ailede birinci derece yakınlarında işitme kaybı olduğu öğrenildi (Tablo-8). Kardeşlerine ve aileye yönelik genetik mutasyon analizi yapılması planlandı.

5. TARTIŞMA

MYH9 geni kas olmayan miyozin ağır zincir IIA'yı (NMMHC-IIA) kodlar ve kan hücreleri, böbrek ve koklea dahil olmak üzere birçok farklı dokuda eksprese edilir (60). NMMHC-IIA, aktin bağlayan, ATPaz aktivitesine sahip olan ve motor aktivitesi için gerekli olan hegzamerik miyozin molekülünün bir bileşenidir ve bir N-terminal baş alanı ve sarmal-rulo çubuk yapısı oluşturmak için homodimerizasyona maruz kalan bir C-terminali kuyruk alanından oluşur (61). MYH9'daki mutasyonlar; nefrit, sağırılık ve katarakt gibi değişik derecelerde Alport belirtileri ile lökosit inklüzyon cisimleri olan otozomal dominant dev trombosit bozukluklarına neden olur (34,62). Hastalığa neden olan genin bulunmasından önce MYH9 ilişkili hastalıklara, May-Hegglin anomalisi (MHA), Sebastian sendromu (SBS), Fechtner sendromu (FTNS) ve Epstein sendromu (EPTS) tanıları kondu. MHA ve SBS, trombosit ve lökosit defekti olan hematolojik hastalıklardı. Makrotrombositopeniye ek olarak, EPTS'li hastalarda işitme ve böbrek anomalileri (Döhle benzeri cisimler ve katarakt olmayan) bulunurken, FTNS'li hastalar MYH-9 ile ilişkili tüm özelliklere en şiddetli fenotiplere sahipti. Bununla birlikte, MYH9 mutasyonları olan hastalar tespit edildiğinde, MHA, SBS ve FTNS ayırt edici özelliklerini yitirmiştir (63). Her şeyden önce Döhle benzeri cisimlerin NMMHC-IIA'nın agregatları olduğunu bulunmasıyla, tüm MYH9 ilişkili hastalarda granülosit inklüzyonlarının tanınmasını sağlamıştır (62). Inklüzyon cisimleri boyutlardan bağımsız olarak, periferik kan yaymalarında immunfloresan analizi kullanılarak her zaman saptanabilir. Üstelik makrotrombosit ve trombositopeni de etkilenen tüm bireylerde mevcuttur, ancak normal aralığın alt sınırında trombosit sayısının bildirildiği nadir istisnalar vardır (64). Ayrıca daha önce MHA veya SBS olarak sınıflandırılanlar da dahil olmak üzere MYH9 mutasyonlarına sahip kişiler, yaşamları boyunca sensörinöral işitme kaybı, böbrek hasarı ve/veya katarakt gelişme riski altındadır. Son olarak büyük kohort çalışmaları, etkilenen bireylerin %50'sinden fazlasında karaciğer enzimlerinin artmış olduğunu tespit ederek MYH9 ilişkili hastalıkların fenotipik spektrumunu daha da genişletmesi önerildi (65,66). Çalışmamızda hastalarımıza karaciğer fonksiyonlarını çalışmadığımız için bu konuda yorumumuz yoktur.

MYH-9daki mutasyonlar sadece klasik dev trombosit bozukluklarına değil aynı zamanda otozomal dominant sendromik olmayan sağırılığa da neden olur,

DFNA17(OMİM 603622) (46). Sendromik olmayan sağırlık prelingual sağırlıkta kalıtsal işitme kaybının %70'ini oluşturur ve oldukça genetik olarak heterojen bir hastalık grubudur (67). DFNA17'yi klinik özelliklere dayanarak diğer sendromik olmayan işitme kaybından ayırt etmek mümkün değildir. Sendromik olmayan sağırlık DFNA17, ekzon 16'daki MYH9 mutasyonu R705H değişimi ile oluşan ayrı bir klinik başlık olarak bilinmektedir. DFN-17'de değiştirilmiş kalıntı olan R705H, ATPaz ve hareketli aktiviteler için kritik bir segment olan miyozin kafasındaki SH1 sarmalında yatar (46). Şimdiye kadar, S96L, R702C ve R702H gibi ekzon 1 ve 16 tarafından kodlanan SH1 sarmalının içinde veya yakınında bulunan çeşitli mutasyonlar, MYH9 bozukluklarında tarif edilmiştir. Bu mutasyonlar sıklıkla sensörinöral işitme kaybı ile birlikte (39,63). Eva Verver ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada DFNA17 tanılı 2 farklı ailenin 4 etkilenen bireylerinde, sensörinöral işitme kaybının yanında trombositopeni, dev trombositler, lökosit inklüzyonları ve karaciğer enzimlerinde hafif-orta derecede yükselme saptanmış ve DFNA17'nin, MYH9 ilişkili hastalıkların geniş fenotipik spektrumunun parçası olabileceği ileri sürülmüştür (68). DFNA17 ekzon 16'nın bir bölümünde olduğu için bizim çalışmamızda ekzon 16'yı detaylı inceledik. Ancak hiçbir hastamızda DNA'nın bu bölümünde mutasyon ya da polimorfizm gösteremedik. Benzer şekilde Kunishima ve arkadaşlarının 2009 yılında 157 sendromik olmayan işitme engelli Japon hastalarda yapmış olduğu bir çalışmada, sık saptanan ve işitme kaybının bildirildiği ekzon 1,16,26 ve 30 mutasyon taraması yapılmış ve hiçbir hastada mutasyon saptanmadığı bildirilmiştir (69). Çalışmamızda 140 işitme engelli hastada, 44 ekzona sahip MYH9 geninde literatür araştırması sonucu mutasyon sıklığı yüksek olan 7 bölge Ekzon 1, Ekzon 16, Ekzon 25, Ekzon 26, Ekzon 30, Ekzon 38, Ekzon 40 çalışılmıştır. Çalışmamızda MYH9 geninde yapılan taramada, sırasıyla ekzon 1 ve 26'da değişimler tespit ettik. Dört hastada ekzon 1'de S96L değişimi yanlış anlamlı (missense) mutasyon olarak değerlendirildi (Tablo-3). Literatürdeki çalışmalarda 2009 yılına kadar 11 farklı ekzonda toplamda 31 mutasyon bildirilmiştir. Bu mutasyonlardan 4 bireyde ekzon1 de S96L saptandığı ve hastaların 3'ünde trombositopeniye işitme ve böbrek bozuklukları eşlik etmektedir. İki bin dokuz yılında Alman popülasyonunda S96L mutasyonu saptanan 2 kişide sadece trombositopeni varken, işitme kaybı, böbrek yetmezliği ve katarakt olmadığı belirtilmiş, etkilenen hastaların yaşları hakkında bilgi verilmemiştir (70). Taramamızda böbrek fonksiyonları veya katarakt açısından ek değerlendirmeler yapmadık. Ancak mutasyon analizine göre Ekzon 1 S96L değişimi ve

ekzon 26 A1144L polimorfizm saptanan hastalara böbrek fonksiyonları ve katarakt açısından muayenelerini planlandık.

Tüm genetik çalışma yaptığımız işitme engelli hastalarda polimorfizm veya mutasyon saptanma oranını %10,7(mutasyon %2,8=4/140, polimorfizm %7,8=11/140) olarak saptadık. Bu çalışmada trombositopenik olan hastalarda ekzon1 S96L değişimi ve ekzon 26'da A1144L polimorfizm çıkma oranı %42,8 iken, trombositopenik olmayan hastalarda %9 olarak bulduk. İşitme engelli hastalarda trombositopeni olması, mutasyon veya polimorfizm saptanma oranını istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırmıştır (p=0.005). **Hem trombositopenik hem MPV>10 fL üzerinde olan hastalarda bu oran %50 idi. Bu çalışma sonucunda işitme kaybı olan hastalarda trombosit düşük ve MPV yüksek saptanırsa mutlaka MYH-9 mutasyon analizi bakılmalı ve böbrek ve göz muayene takibine alınmalıdır sonucunu çıkarttık.** Beklenildiği şekilde mutasyon veya polimorfizm saptanan olgularda trombositopenik olanların, trombositopenik olmayanlara göre MPV değeri anlamlı olarak yüksek saptadık (p=0,043). S96L mutasyonu saptadığımız 4 hastamız vardı. Beklemediğimiz şekilde bu hastaların 3'ünde MPV normaldi. Sadece birinde hem MPV yüksek saptadık, hem de bu hasta trombositopenikti (Tablo-13).

Literatürde ekzon 26'da A1144L polimorfizmin sağlıkla ilişkisi net gösterilmese de, bizim olgularımızdan makrotrombositopenik olan 2 hastada bu polimorfizmi saptadık (71,72).

Ayrıca trombositopeni veya makrotrombosit saptanmayan grupta, 3 hastada ekzon 1'de S96L mutasyonu ve 7 hastada A1144L polimorfizmi saptadık (%8,1). Böylece trombositopenik olmayan işitme engelli hastalarda da MYH9 mutasyon analizi yapılabileceğini düşünmekteyiz (Tablo-12).

Arrondel ve arkadaşları ilk olarak 2001 yılında, Epstein ve Fecthner sendromlu ailelerde yaptıkları çalışmada 2 farklı ailede S96L mutasyonu tanımlamıştır. Ailelerden ilkinde annede işitme kaybı, makrotrombositopeni ve nefropati gelişmişken, 6 yaşında kızında makrotrombositopeni ve işitme kaybı olmasına rağmen, henüz hematüri ve proteinüri gelişmediği bildirilmiştir. Diğer ailede makrotrombositopeni ve nefropati olan ancak işitme kaybı olmayan bir kız çocuğunda S96L mutasyonu saptandığı bildirilmiştir. Aynı ailede fenotipik bir özelliği olmayan babada ve kızda, ekzon 30'da R1400W polimorfizm saptanmış ve S96L mutasyonunun fenotipik ifadesini

etkileyebileceğini, daha genel olarak MYH9'un kendisinde veya MYH9 ile etkileşime giren diğer genlerdeki polimorfizmler veya nadir varyantlar, MYH9 mutasyonlarının böbrek ekspresyonunda rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (73). Bu nedenle literatürdeki tüm olgular ve bizim çalışma grubumuz MYH-9 ilişkili klinik bulguların hepsini aynı anda görülmeyebileceğini zaman içinde gelişebileceğini vurgulamıştır. Yine aynı aile içinde değişik yaş dilimlerinde bulguların ortaya çıkabileceği bilinmektedir. Bunun yanında aynı aile içinde fenotip genotip ilişkisinin çok farklı olabileceğini saptadık. Örneğin 3 nolu hastanın kardeşinde de işitme kaybı olmasına rağmen kardeşlerden birinde A1144L polimorfizmi saptarken, diğer olguda bu genetik değişikliği gösteremedik.

Althaus ve arkadaşlarının 2011'de yapmış olduğu derlemede, 2 yaşında trombositopeni nedeniyle immun trombositopenik purpura (ITP) tanısı alıp 31 yaşında MYH9 ekzon 1'de S96L mutasyonu saptanana kadar tedavi ve takip edilen bir vaka bildirilmiş. Otuz bir yaşına geldiğinde kanama eğilimi, son dönem böbrek yetmezliği, sensörinöral işitme kaybı ve katarakt ile bulgu verdiği bildirilmiştir. Aynı ekip tarafından 1990'da makrotombositopeni ve lökositlerde inklüzyon cisimciği olan, ancak başka organ belirtileri olmayan birçok üyeli büyük bir aileyi yeniden değerlendirdiklerinde, çoğu bireyde genç yaşta (40-50 yaş) katarakt ve tüm bireylerde 50 yaş ve üstünde yüksek tonlu işitme bozukluğu geliştiği saptanmıştır. Eğer işitme kaybı veya böbrek yetmezliği çocuklukta geliyorsa (özellikle 6 yaş altında), bulguların daha ağır seyrettiği gözlenmiştir (30, 25).

Althaus ve arkadaşlarının yanında literatürde de çok kere vurgulandığı gibi MYH-9 tanısının konulmasının önemi, bu hastalığın yanlışlıkla İTP tanısı konularak gereksiz tetkik yapılması ve tedavi verilmesinin engellenmesidir. Özellikle çocukluk döneminde daha önceden hiç kan sayımı yapılmayan hastalarda kronik İTP tanısı konulurken bu konuya dikkat edilmelidir. Çünkü MYH-9 ilişkili trombositopenik hastalarda İTP hastalarına benzer şekilde kortikosteroid ve İVİG tedavisine belli ölçüde yanıt alınabilir. Bizim kronik İTP diye Hematoloji polikliniğinde izlediğimiz ve MYH-9 ilişkili olduğunu düşündüğümüz 7-8 hastamız bulunmaktadır. Bu hastaların çoğunda duyma kaybı belirtilmemekte ancak sorgulandığında farkedilmektedir ve çoğu hastamızda bu şikayet 10'lu yaşlardan sonra ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda S96L mutasyonu saptadığımız ve trombosit sayısı ve MPV değerleri normal aralıkta olan 3 hastanın 2'sinde ailede birinci derece yakınlarında işitme kaybı olduğu öğrenildi. Kardeşlerine ve aileye yönelik genetik mutasyon analizi yapılmasını planlandık. Bu değerlendirme bize ailede işitme öyküsü varlığında trombosit sayı ve MPV değişikliği olmasa da genetik taramada mutasyon ya da polimorfizm olabileceğini düşündürdü. Ama eğer işitme kaybı olan hastada hematolojik olarak trombositopeni ve MPV yüksekse hastaların yarısında mutasyon-polimorfizm saptanabileceğini çalışmamızda gösterdik.



6. SONUÇLAR-ÇIKARIMLAR

Bu araştırmada İstanbul il Milli Eğitim Müdürlüğü'ne bağlı 18 yaş altı çocuk ve gençlerin eğitim gördüğü işitme engelli okullarındaki öğrencilerde sık görülen MYH-9 gen mutasyon analizi yapıldı. Bu çalışma sonucunda;

1-MYH-9 ilişkili trombosit sayı ve fonksiyon bozukluklarının klinik olarak ağır gitmediğini saptadık. Kanama bu hastalarda ya çok hafif ya da hiç yoktu.

2-Çalışmaya katılan 172 hastanın 80'i kız, 92'si erkekti.

3-Hastaların tam kan sayımına göre $PLT < 150.000mm^3$ altında 7 hasta, $MPV > 10fL$ üzerinde 17 hasta, MPV 8-10fL aralığında 123 hasta, $MPV > 10fL$ ve $PLT < 150.000mm^3$ olan 6 hasta saptandı.

4-Mutasyon analizine göre Ekzon 1 S96L değişimi ve ekzon 26 A1144L polimorfizm saptanan toplam 15 hasta vardı (4 mutasyon, 11 polimorfizm). Tüm genetik çalışma yaptığımız işitme engelli hastalarda polimorfizm veya mutasyon saptanma oranını %10,7 (mutasyon %2,8=4/140, polimorfizm %7,8=11/140) olarak saptadık.

5-Bu çalışmada trombositopenik olan hastalarda ekzon1 S96L değişimi ve ekzon 26'da A1144L polimorfizm çıkma oranı %42,8 iken, trombositopenik olmayan hastalarda %9 olarak saptadık. İşitme engelli hastalarda trombositopeni olması, mutasyon veya polimorfizm saptanma oranını istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırmıştır ($p=0.005$).

6-Hem trombositopenik hem $MPV > 10fL$ üzerinde olan hastalarda mutasyon-polimorfizm saptanma oranı %50 idi.

7-Beklenildiği şekilde mutasyon veya polimorfizm saptanan olgularda trombositopenik olanların, trombositopenik olmayanlara göre MPV değeri anlamlı olarak yüksek saptadık ($p=0,043$).

8-S96L mutasyonu saptadığımız 4 hastamız vardı. Beklemediğimiz şekilde bu hastaların 3'ünde MPV normaldi. Sadece birinde hem MPV yüksek saptadık, hem de bu hasta trombositopenikti.

Çıkarımlar

1-İşitme kaybı olan hastalarda trombosit düşük ve MPV yüksek saptanırsa mutlaka MYH-9 mutasyon analizi bakılmalı ve pozitif saptanan olgularda böbrek fonksiyonları değerlendirilmeli ve göz muayene takibine alınmalıdır. Aile bireyleri bu konuda aydınlatılmalı ve ileri yaşlarda bulguların oturabileceği belirtilerek en az yılda bir kez hayat boyu takibinin uygun olduğu belirtilmelidir.

2- İşitme engelli olan ve trombosit düşük olmayan ve/veya MPV yüksek saptanmayan ancak aile öyküsünde birinci derece yakınlarında işitme engelli birey olan olgularda MYH-9 mutasyon-polimorfizm analizi bakılabileceğini önermekteyiz.

3-İşitme kaybı olan trombosit düşük olmayan ve/veya MPV yüksek saptanmayan hastalarda MYH9 ilişkili hastalıklar olabilir ancak olasılık çok daha düşüktür. Bu hastalarda da hiç olmazsa bir kez böbrek fonksiyonları değerlendirilmeli ve göz muayenesi yapılmasını da önermekteyiz.

4-MYH9 bozuklukları sadece iyi huylu hematolojik anormallikler değil, aynı zamanda ciddi böbrek, iç kulak ve lensi etkileyen sendromik bozukluklara da neden olabilir. Hematolojik olmayan komplikasyonların prognozu ve tedavisi veya sekel gelişmeden profilaktik tedavisi için genetik tanı zorunludur. Bununla birlikte genetik testlerin hastalar üzerinde önemli psikolojik etkileri olabileceği bilinmelidir. Bu nedenle bu ailelere genetik danışmanlık verilmesini tavsiye etmekteyiz.

5-Tüm kronik ITP olarak takip edilen hastaların MYH-9 hastalığı olabileceği düşünülerek aile öyküsünün bu konuda derinleştirilmesi ve hastanın kendisinin özellikle işitme testi açısından değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

6-Hematolojik olmayan belirtilerin yönetimi;

a-Prezenil kataraktı veya işitme kaybını önlemek için bir tedavi yoktur. Ancak, işitme kaybı motorprotein defekti nedeniyle kohleada bulunan silioların bozulmuş hareketi sonucu olduğundan, yüksek ses gürültüsünden (müzik konserleri, kulaklıklar) kaçınılması, sağırlığın başlangıcını geciktirmeye yardımcı olabileceği hasta grubuyla paylaşılmalıdır.

b-Böbrek yetmezliğinin önlenmesi için de kesin bir tedavi protokolü yoktur. MYH9 ile ilişkili trombosit bozukluğunda renin-anjiyotensin sisteminin farmakolojik

blokaının proteinüriyi azalttığı bilinmektedir. Bu nedenle, MYH9 ile ilişkili trombosit bozukluğu olan bireylerde böbrek yetmezliğinin erken aşamasında bu tedaviye başlamak uygun olabilir.



7. KAYNAKLAR

1. Ulutin O. Platelets. 1976, İstanbul.
2. Celkan T. Normal trombosit fonksiyonlar. TPHD eğitim serisi –IV. Ed: Ören H, Celkan T, Bör Ö Güneş AM. Galenos yayınevi 2017; 17-30
3. Celkan T. MYH-9 ilişkili trombositopeniler. Editör Soysal T. THD hematolog 2015; 5:390-395.
4. Machlus KR, Italiano JE Jr. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. J Cell Biol 2013;201:785-96
5. McGuinn C, Bussel JB. Disorders of platelets. In: Lanzkowsky P, Lipton JM, Fish JD (eds). Lanzkowsky's Manual of Pediatric Hematology and Oncology. 6th ed. San Diego, Elsevier Academic Press 2016:239-78.
6. Kaushansky K. Megakaryopoiesis and thrombopoiesis Williams Hematology. 9th ed. New York, McGraw-Hill Education, 2016:1815-28.
7. Müller-Newen G, Stope MB, Kraus T, Ziegler P. Development of platelets during steady state and inflammation. J Leukoc Biol 2017; 101:1109-17
8. Machlus KR, Wu SK, Stumpo DJ et al. Synthesis and dephosphorylation of MARCKS in the late stage of megakaryocyte maturation drive proplatelet formation. Blood 2016;127:1468-80.
9. Poulter NS, Thomas SG. Cytoskeletal regulation of platelet formation: Coordination of F-actin and microtubules. Int J Biochem Cell Biol 2015;66:69-74
10. Thon JN, Montalvo A, Patel-Hett et al. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. J Cell Biol 2010;191:861-74
11. Machlus KR, Thon JN, Italiano Jr. Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of cellular and molecular processes mediating platelet formation. Br J Haematol 2014;165:227-36
12. Pertury F, Eckly A, Weber J ad. Myosin IIA is critical for organelle distribution and F-actin organization in megakaryocytes and platelets. Blood 2014;123:1261-69.

13. Stasi R, Amadori S, Osborn J, Newland AC, Provan D. Long-term outcome of otherwise healthy individuals with incidentally discovered borderline thrombocytopenia. *PLoS med* 2006;3:e24.
14. Bain BJ. Ethnic and sex differences in the total and differential white cell count and platelet count. *J clin Pathol* 1996; 49. 664-6
15. Adibi P, Faghieh Imani E, Talaei M, Ghanei M. Population-based platelet reference values for an Iranian population. *Int J Lab Hematol* 2007;29:195-9
16. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood* 2009;113:2386-93
17. Beyan C, Nevruz O. Kanama ve tromboz, Harrison İç Hastalıkları Prensipleri Tercümesi. İçinde: Sağlık Y. Nobel Tıp Kitabevi, 2004:354-5
18. Wilton DB. Acquired platelet disorders. In Nathan and Oski's *Hematology of Infancy and childhood*. 7th ed. 2009:1553-90
19. Lamber MP, Poncz M. Inherited platelet disorders. In Nathan and Oski's *Hematology of Infancy and childhood*. 7th ed. 2009:1463-97
20. Stasi R. How to approach thrombocytopenia. *ASH Education Program Book*, 2012:191-7
21. Gunes AM. Konjenital trombositopeniler. TPHD eğitim serisi –IV. Ed: Ören H, Celkan T, Bör Ö Güneş AM. Galenos yayınevi 2017; 47-64.
22. Drachman JG. Inherited thrombocytopenia: when a low platelet count does not mean ITP. *Blood* 2004;103:390-8.
23. Akarsu S. MYH-9 ilişkili trombosit hastalıkları. TPHD eğitim serisi –IV. Ed: Ören H, Celkan T, Bör Ö Güneş AM. Galenos yayınevi 2017; 65-9.
24. Hegglin R. Gleichzeitige konstitutionelle Veränderungen an Neutrophilen und Thrombozyten. *Helv Med Acta* 1945;12:439–40. In: Althaus K, Najm J, Greinacher A, MYH 9 related platelet disorders- often unknown and misdiagnosed. *Klin Padiatr* 2011, 223:120-5

25. Althaus K, Najm J, Greinacher A, MYH 9 related platelet disorders- often unknown and misdiagnosed. *Klin Padiatr* 2011, 223:120-5
26. Kamath V, Gnanasekaran KK, Mammen J. MYH 9-related disorders, a probable May-Hegglin anomaly case series: A tertiary care experience. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2016;9:137-40
27. Zetterberg E, Carlsson Alle MS, Najm J, Greinacher A. Thrombin generation in two families with MYH9 –related platelet disorder. *Platelets* 2016; 27: 264-7.
28. Epstein CJ, Sahud MA, Piel CF, et al. Hereditary macrothrombocytopathia, nephritis and deafness. *Am J Med* 1972; 52:299–310
29. Peterson LC, Rao KV, Crosson JT, White JG. Fechtner syndrome—a variant of Alport’s syndrome with leukocyte inclusions and macrothrombocytopenia. *Blood* 1985;65:397–406
30. Greinacher A, Nieuwenhuis HK, White JG. Sebastian platelet syndrome: a new variant of hereditary macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions. *Blut* 1990;61:282-8
31. Toren A, Rozenfeld-Granot G, Rocca B, et al. Autosomal dominant giant platelet syndromes: a hint of the same genetic defect as in Fechtner s yndrome owing to a similar genetic linkage to chromosome 22q11-13. *Blood* 2000;96:3447–51
32. Kunishima S, Kojima T, Tanaka T, et al. Mapping of a gene for May-Hegglin anomaly to chromosome 22q. *Hum Genet* 1999;105:379–83
33. Seri M, Cusano R, Gangarossa S Mutation in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly, and Fecthner and Sebastian syndromes. The May-hegglin/Fecthner syndrome Consortium. *Nat Genet* 2000;26:103-5
34. Kelley MJ, Jawien W, Ortel TL, Korczak JF. Mutation of MYH9, encoding non-muscle myosin heavy chain A, in May-Hegglin anomaly. *Nat Genet* 2000;26:106–8
35. Heath KE, Campos-Barros A, Toren A, et all. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant

- macrothrombocytopenias: May-Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-like syndromes. *Am J Hum Genet* 2001;69:1033–45
36. Geddis AE, Kaushansky K. Inherited thrombocytopenias: toward a molecular understanding of disorders of platelet production. *Curr Opin Pediatr* 2004;16:15–22
 37. Clauser S, Cramer-Borde E. Role of electron microscopy in the diagnosis of platelet disorders. *Semin Thromb Hemost* 2009;35:213-23.
 38. Althaus K, Greinacher A. MYH9-related platelet disorders. *Semin thromb Hemost* 2009;35:189-203.
 39. Pecci A, Panza E, Pujol-Moix N et al. Position of nonmuscle myosin heavy chain IIA (NMMHC-IIA) mutations predicts the natural history of MYH9-related disease. *Hum Mutat* 2008 ; 29 : 409 – 17
 40. Hartwig J, Italiano J Jr, The birth of platelet. *J Thromb Haemost* 2003;1:1580-86.
 41. Kunishima S, Saito H. Advances in the understanding of MYH9 disorders. *Curr Opin Hematol.* 2010 ;17:405-10
 42. Balduini CL, Pecci A, and Savoia A Recent advances in the understanding and management of MYH9-related inherited thrombocytopenias *British Journal of Haematology*, 2011 154, 161-74
 43. Sekine T, Konno M, Sasaki S, et al. Renal manifestations, progression and pathological findings in patients with R702 mutations in MYH9. *Kidney Int* 2010; 78:207–14.
 44. Arrondel C, Vodovar N, Knebelmann B, et al. Expression of the nonmuscle myosin heavy chain IIA in the human kidney and screening for MYH9 mutations in Epstein and Fechtner syndromes. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:65–74.
 45. Ghiggeri GM, Caridi G, Magrini U, et al. Genetics, clinical and pathological features of glomerulonephritis associated with mutations of nonmuscle myosin IIA (Fechtner syndrome). *Am J Kidney Dis* 2003; 41: 95–104.
 46. Lalwani, A.K., Goldstein, J.A., Kelley, M.J., Luxford, W., Castelein, C.M. & Mhatre, A.N. Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a

- mutation in nonmuscle myosin MYH9. *American Journal of Human Genetics* 2000; 67: 1121–8.
47. Mhatre, A.N., Li, J., Kim, Y., Coling, D.E. & Lalwani, A.K. Cloning and developmental expression of nonmuscle myosin IIA (Myh9) in the mammalian inner ear. *Journal of Neuroscience Research* 2004; 76: 296–305.
 48. Lalwani, A.K., Atkin, G., Li, Y., Lee, J.Y., Hillman, D.E. & Mhatre, A.N. Localization in stereocilia, plasma membrane, and mitochondria suggests diverse roles for NMHC-IIa within cochlear hair cells. *Brain Research* 2008; 1197: 13–22.
 49. Mhatre, A.N., Li, Y., Atkin, G., Maghnouj, A. & Lalwani, A.K. Expression of Myh9 in the mammalian cochlea: localization within the stereocilia. *Journal of Neuroscience Research*, 2006; 84: ,809–18.
 50. Sung CC, Lin SH, Chao TK R1933X mutation in the MYH9 gene in May Hegglin anomaly mimicking idiopathic thrombocytopenic purpura *J Formos Med Assoc* 2014; 113:56-9
 51. Ishida M, Mori Y, Ota N et all. Association of a novel in-frame deletion mutation of MTH9 gene with end-stage renal failure: case report and review of the literature. *Clin Nephrol* 2013;80 :218-22
 52. Gresikova MI. Learning from errors: when a low platelet count in neonate excludes immune thrombocytopenic purpura in mother. *Bratisl Lek Listy* 2013;114:232-36.
 53. Balduini CL, Savoia A, Seri M. Inherited thrombocytopenias frequently diagnosed in adults. *J Thromb haemost* 2013;11:1006-19
 54. Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW et all. UKHCDO. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *Br J Haematol* 2006;135:603-33.
 55. Noris P, Klersy C, Gresele P et all. Platelet size for distinguishing between inherited thrombocytopenias and immune trombocytopenia: a multicentric, real life study. *Br J haematol* 2013;162: 112-9.

56. Hussein BA, Gomez K, Kadir RA. May hegglin anomaly and pregnancy: systemic review *Blood Coagul Fibrinolysis* 2013;24:554-61
57. Palandri, Zolli M, Polverelli N, Noris P, et al. MYH9 related thrombocytopenia and intracranial bleedings: a complex clinical/surgical management and review of the literature. *Br J Haematol* 2015;170:729-31.
58. Pecci, A., Granata, A., Fiore, C.E. & Balduini, C.L. Renin-angiotensin system blockade is effective in reducing proteinuria of patients with progressive nephropathy caused by MYH9 mutations (Fechtner-Epstein syndrome). *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 2008; 23:, 2690–92.
59. Chen Y, Boukour S, Milloud R et al. The abnormal proplatelet formation in MYH9 related macrothrombocytopenia results from an increased actomyosin contractility and is rescued by myosin IIA inhibition. *J Thromb Haemost* 2013;11:2163-75.
60. Simons M, Wang M, McBride OW ,et al: Human nonmuscle myosin heavy chains are encoded by two genes located on different chromosomes. *Circ Res* 1991;69:530–39.
61. Sellers, J.R. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 1496: 3–22.
62. Kunishima, S., Kojima, T., Matsushita, et al Mutations in the NMMHC-A gene cause autosomal dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions (May–Hegglin anomaly/Sebastian syndrome). *Blood* 2001; 97: 1147–9.
63. Seri, M., Pecci, A., Di Bari, MYH9-related disease: May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness. *Medicine* 2003; 82:203–15.
64. Pecci A, Klersy C, Gresele P, et al. MYH9-related disease: a novel prognostic model to predict the clinical evolution of the disease based on genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat.* 2014 ;35:236-47

65. Pecci A, Biino G, Fierro T, Alteration of liver enzymes is a feature of the MYH9-related disease syndrome. Italian Registry for MYH9-related diseases. PLoS One. 2012;7: :e35986.
66. Favier R, DiFeo A, Hezard N, A new feature of the MYH9-related syndrome: chronic transaminase elevation. Hepatology. 2013 ;57:1288-9.
67. Hilgert N, Smith RJ, Van Camp G. Function and expression pattern of nonsyndromic deafness genes. Curr Mol Med. 2009 ;9:546-64
68. Verver E, Pecci A, De Rocco D, et al R705H mutation of MYH9 is associated with MYH9-related disease and not only with non-syndromic deafness DFNA17. Clin Genet. 2015 ;88:85-9
69. Kunishima S, Matsunaga T, Ito Y, et al. Mutations in MYH9 exons 1, 16, 26, and 30 are infrequently found in Japanese patients with nonsyndromic deafness. Genet Test Mol Biomarkers 2009; 13: 705–707.
70. Karina A, Andreas Greinacher, MYH9-Related Platelet Disorders Semin Thromb Hemost 2009;35: 189–203.
71. Jeffrey BK, Michael WS, George WN *MYH9* is a major-effect risk gene for focal segmental glomerulosclerosis Nat Genet. 2008; 40: 1175–84
72. George WN, Barry IF, Donald WB Dense mapping of MYH9 localizes the strongest kidney disease associations to the region of introns 13 to 15 Human Molecular Genetics 2010; 19: 1805–15
73. Arrondel C, Vodovar N, Knebelmann B et al. Expression of the Nonmuscle Myosin Heavy Chain IIA in the Human Kidney and Screening for *MYH9* Mutations in Epstein and Fechtner Syndromes J Am Soc Nephrol 2001; 13: 65-74