

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

**İDİYOPATİK TROMBOSİTOPENİK PURPURA
TANILI OLGULARDA PARAOKSONAZ-1 (PON-1) L/M 55
GEN POLİMORFİZMİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Oya ÇAKICI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Saadet AKARSU**

**ELAZIĞ
2008**

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. Erdal TAŞKIN

Yrd. Doç. Dr. Mehmet KILIÇ

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, bana bilgi ve tecrübelerinden faydalanma fırsatı veren değerli tüm hocalarıma, 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 ve Genetik Anabilim Dalı başkanı Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Yüce'ye, DNA izolasyonunda yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Murat Kara'ya, çalışma boyunca gösterdiği titizlik ve emeğinden dolayı Dr. Deniz Erol'a, eğitimim boyunca bana destek olan ve fedakarlıkta bulunan eşim Hasan Çakıcı'ya ve ikiz çocuklarım Ege Çakıcı ve Efe Çakıcı'ya teşekkür ediyorum.

ÖZET

İdiyopatik trombositopenik purpura tanılı olgularda paraoksonaz-1 (PON-1)

L/M 55 gen polimorfizmi

İdiyopatik trombositopenik purpura (İTP), dolaşımdaki trombositlerin yıkımının artması ile karakterize, kendi kendini sınırlandıran, otoimmün, çocukluk çağının en sık karşılaşılan edinsel trombositopeni nedenidir. İdiyopatik trombositopenik purpura patogenezinde geçirilen viral enfeksiyonlar sonucunda trombositlere karşı oluşan antikorlar sorumlu tutulmaktadır.

Oksidatif hasar otoimmün hastalıkların patogenezinde rol oynar. Oksidatif stres ve serbest radikaller İTP'nin patogenezi ve prognozundan sorumlu tutulabilir. Karaciğerde sentezlenen ve bir ester hidrolaz enzimi olan paraoksonaz-1 (PON-1) antioksidan özelliği olan bir enzimdir. İnsan serum PON-1 enziminin iki genetik polimorfizmi bulunmaktadır. Bunlardan biri; 55. pozisyondaki metiyonin (M alleli), lösin (L alleli) ile değişince ortaya çıkan polimorfizmdir.

Bu çalışmada antioksidan özelliği olan paraoksonaz-1 L/M 55 gen polimorfizminin İTP'nin etyopatogenezindeki rolü, hastalığın seyri ve tedaviye etkisi araştırıldı.

Çalışmaya 51 akut, 15 kronik İTP ve 60 sağlıklı kontrol grubu alındı. Akut İTP, kronik İTP ve kontrol grubunda LL genotipi sıklığı sırasıyla %19.6, %40 ve %26.7 olarak, LM genotipi; %60.8, %46.7 ve %65 olarak, MM genotipi sıklığı ise %19.6, %13.3 ve %8.3 olarak saptandı. Kronik İTP grubunda LL genotipi sıklığı, akut İTP ve kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı yüksek bulundu ($p<0.05$).

Kontrol grubunda MM genotipi sıklığı İTP gruplarına göre düşük bulundu ($p<0.05$). Kronik İTP grubundaki L allel sıklığı akut İTP grubuna göre istatistiksel anlamlı yüksek bulundu ($p<0.05$). Akut İTP grubunda M allel sıklığı kronik İTP grubuna göre istatistiksel anlamlı yüksek bulundu ($p<0.05$).

Sonuç olarak; paraoksonaz-1 L/M 55 gen polimorfizmi İTP'da akut ve kronik formda sağlıklı bireylere göre değişiklik göstermektedir. Bu değişiklik bazı bireyleri hastalığa duyarlı kılabilir. Hastalığın seyrini etkileyebilir ve hatta verilen tedaviye yanıtı değiştirebilir.

Anahtar kelimeler: İdiyopatik trombositopenik purpura, paraoksonaz, polimorfizm, metil prednizolon, intravenöz immünglobulin.

ABSTRACT

Paraoxonase-1 (PON-1) L/M 55 gene polymorphism in the cases of idiopathic thrombocytopenic purpura

Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), which is an autoimmune, self-limiting characterized by an increase in the destruction of thrombocytes in circulation, is the most common cause of acquired childhood thrombocytopenia. It has been considered that getting over viral infections cause to trigger the body to produce antibody destroy the thrombocytes in the pathogenesis of idiopathic thrombocytopenic purpura.

Oxidative damage plays a role the pathogenesis of autoimmune disorders. Oxidative stress and free-radicals could be responsible the pathogenesis and prognosis of ITP. Paraoxonase-1 (PON-1) is an ester-hydrolyase enzyme which has antioxidative feature and synthesized by liver. Two genetic polymorphisms were detected in human serum PON-1 enzyme. Of first appears in case of 55 Met(M)/Leu(L) polymorphism.

In this study, it had investigated that the role of paraoxonase-1 M/L gene polymorphism in etiopathogenesis of ITP, course of disorder and its effects of the therapy.

Fifty-one patients with acute ITP, fifteen patients with chronic ITP and sixty healthy controls were investigated. For individuals with acute, chronic ITP and healthy group, the frequency of LL genotype were founded as 19.6%, 40% and 2%, respectively, meanwhile the percentages for LM genotype were 60.8%, 46.7% , 65% and of MM genotype were 19.6%, 13.3% ve 8.3%. Our result indicate that the frequency of LL genotype in chronic ITP group is statistically and significantly higher than those of acute ITP group and controls ($p < 0.05$).

The frequency of MM genotype in controls was lower than the MM frequencies of ITP patient ($p < 0.05$). Having been comparing data, the frequency of L allele in chronic ITP group were statistically higher ($p < 0.05$). For acute ITP group, the frequency of M allele were statistically higher than the frequency of chronic group.

Consequently, paraoxonase-1 L/M 55 gene polymorphism in the cases of ITP displayed differences when compared those of controls. This difference might create

a susceptibility in some patients against disorder. It could effect course of disorder, even might change respons of treatment. It was founded that individuals who has LL genotype tend to be chronic.

Key words: Idiopathic thrombocytopenic purpura, paraoxonase, polymorphisim, methylprednisolone, intravenous immunoglobuline.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. TROMBOSİTOPENİ NEDENLERİ.....	3
1.2. İDİYOPATİK TROMBOSİTOPENİK PURPURA.....	6
1.2.1. Tanımı ve sıklığı.....	6
1.2.2. Etyoloji ve patogenez.....	6
1.2.3. Genetik.....	7
1.2.4. Klinik bulgular.....	8
1.2.5. Tanı ve laboratuvar parametreleri.....	9
1.2.6. Ayırıcı tanı.....	10
1.2.7. Tedavi.....	10
1.2.7.a. Kortikosteroidler.....	11
1.2.7.b. İntravenöz immunoglobulin (IVIG).....	11
1.2.7.c. Anti-D.....	12
1.2.7.d. Diğer tedaviler.....	12
1.2.7.e. Splenektomi.....	13
1.3. GENETİK VARYASYON VE POLİMORFİZM.....	14
1.4. PARAOKSONAZ (PON) AİLESİ.....	15
1.4.1. Paraoksonazın enzim sınıflandırılmasındaki yeri.....	15
1.4.2. Sentez ve yapısı.....	17
1.4.3. Paraoksonaz-1 (PON-1) polimorfizmi.....	19
1.4.3.a. L/M 55 polimorfizmi.....	19
1.4.3.b. Q/R 192 polimorfizmi.....	20

1.4.4. Paraoksonaz-1'in kimyasal özellikleri.....	20
1.4.5. Paraoksonaz-1'in antioksidan özellikleri.....	22
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
2.1. Hasta Grubu.....	24
2.2. Sağlıklı Kontrol Grubu.....	24
2.3. Örneklerin Alınması ve Saklanması.....	24
2.4. Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri.....	25
2.4.1. Kullanılan cihazlar.....	25
2.4.2. Çözelti ve tamponlar.....	25
2.5. Kandan DNA İzolasyonu.....	26
2.6. Oligonükleotidler (primerler).....	28
2.7. PCR ile Paraoksonaz-1 55 Gen Polimorfizmlerinin Saptanması.	28
2.7.1. PON-1 55 polimorfizmine ait amplifikasyon koşulu.....	28
2.7.2. Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) ile Genotiplendirme.....	29
2. 8. İstatistiksel Analizler.....	31
3. BULGULAR.....	32
3.1. PON-1 L/M 55 Genotip Dağılımı ile L/M Allel Sıklığının Kontrol ve İTP Gruplarındaki Dağılımları.....	35
4. TARTIŞMA.....	41
5. KAYNAKLAR.....	53
6. EKLER.....	67
7. ÖZGEÇMİŞ	71

TABLO LİSTESİ

	SAYFA
Tablo I. Çocuklarda trombositopeninin patofizyolojik sınıflandırılması.....	4-5
Tablo II. Akut İTP’da tedavi.....	11
Tablo III. PON-1 genine ait primer dizileri.....	28
Tablo IV. İdiyopatik trombositopenik purpura ve kontrol grubu olgularının demografik özellikleri.....	32
Tablo V. Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin hematolojik değerleri.....	34
Tablo VI. İdiyopatik trombositopenik purpuralı olgular ve kontrol grubunun PON-1 L/M 55 genotip dağılımı ve L/M allel sıklığı.....	36
Tablo VII. Gruplar arası PON-1 L/M 55 genotip dağılımı ile yaş ve trombosit parametreleri ilişkisi.....	40

ŞEKİL LİSTESİ

	SAYFA
Şekil 1. PON gen ailesi ve PON-1, PON-2 ve PON-3 genlerinin insan 7. kromozomu q21. ve q22. bantları üzerindeki yerleri.....	15
Şekil 2. İnsan paraoksonaz enziminin (PON-1) yapısı.....	18
Şekil 3. PON-1 geninin yapısı.....	19
Şekil 4. PON-1 proteininin üç boyutlu yapısı.....	21
Şekil 5a. Olgularımıza ait PON-1 55 polimorfizmine ait Hsp92 II enzimi ile kesilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	30
Şekil 5b. Olgularımıza ait PON-1 55 polimorfizmine ait Hsp92 II enzimi ile kesilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsünün şematize hali.....	30
Şekil 6. Toplam İTP (1), akut İTP (2), kronik İTP (3) ve kontrol grubunun (4) PON-1 L/M 55 genotip dağılımı.....	37
Şekil 7. Toplam İTP'lı (akut ve kronik) hastalar ve kontrol grubunun PON-1 L/M 55 genotip dağılımı.....	38

KISALTMALAR

Angstrom	Å
İstatistiksel anlamı yok	AD
Antinükleer antikor	ANA
Arilesteraz	ARE
Baz çifti	Bp
Sığır serum albümini	BSA
Beta- talasemi minör	BTM
Sitomegalovirüs	CMV
Kobalt	Co ⁺⁺
Seruloplazmin	CP
Bakır	Cu ⁺⁺
Dissemine intravasküler koagülasyon	DiC
Deoksiribonükleikasit	DNA
Erkek	E
Epstein-Barr virüsü	EBV
Etilendiamintetraasetik asid	EDTA
Femtolitre	fL
Fokal segmental glomeruloskleroz	FSGS
Hemoglobin	Hb
Yüksek dansiteli lipoprotein	HDL
İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü	HIV
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂
İnsan trombosit antijenleri	HPA
Hemolitik üremik sendrom	HÜS
Uluslar arası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği	IUBMB
İdiyopatik trombositopenik purpura	İTP
İntravenöz immünglobulin	İViG
Kız	K
Lösin	L
Yüksek dansiteli lipoprotein	LDL

Metiyonin	M
Magnezyum	Mg⁺⁺
Mangan	Mn⁺⁺
Oksidatif stres indeksi	OSİ
Ortalama trombosit volümü	MPV
Oral megadoz metilprednizolon	OMDMP
Organofosfat	OP
Total antioksidan kapasite	TAOK
Trombosit aktive edici faktör asetil hidrolaz	PAF-AH
Polimeraz zincir reaksiyonu	PCR
Platokrit	PCT
Trombosit dağılım aralığı	PDW
Platelet	PLT
Paraoksonaz	PON
Paroksizmal noktürnal hemoglobinüri	PNH
Protrombin zamanı	PT
Parsiyel tromboplastin zamanı	PTT
Restriksiyon endonükleaz	RE
Retikuloendotelyal sistem	RES
Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi	RFLP
Reaktif oksijen bileşikleri	ROS
Standart sapma	SD
Standart doz metilprednizolon	SDMP
Sistemik lupus eritematozus	SLE
Tek nükleotid polimorfizmleri	TNP
Trombotik trombositopenik purpura	TTP
Ultraviyole	UV
Yüksek doz metilprednizolon	YDMP
Wiskott-Aldrich sendromu	WAS
Beyaz küre sayısı	WBC

1. GİRİŞ

İdiyopatik trombositopenik purpura (İTP), dolaşımdaki trombositlerin yıkımının artması ile karakterize, benign seyirli, kendi kendini sınırlandıran, çocukluk çağıının en sık karşılaşılan edinsel trombositopeni nedenidir (1). İdiyopatik trombositopenik purpuranın insidansı 4-5.3/100.000 olarak rapor edilmiştir. Hastalığın pik insidans yaşı 2-5 yaşdır. Kış ve sonbahar mevsimlerinde sıklığı artar (2). Patogenez dikkate alındığında bu hastalığa immun trombositopenik purpura da denilmektedir (1).

İdiyopatik trombositopenik purpura; trombositopeni (trombosit sayısı $<150.000/\text{mm}^3$), trombosit yaşam süresinin kısılması, plazmada antitrombosit antikorların bulunması ve kemik iliğinde megakaryositlerin artışı ile karakterize bir hastalıktır (3). Viral enfeksiyondan 1-4 hafta sonra çocukların bir kısmında trombosit yüzeyine karşı antikorlar gelişir. Bu antikorlar, trombosit yüzey glikoprotein IIb/IIIa kompleksine karşı oluşan otoantikorlardır (4,5). Bunun dışında Sistemik lupus eritematosus (SLE), lenfoproliferatif hastalıklar, myelodisplazi, agammaglobulinemi /hipogammaglobulinemi, canlı virüs aşılı ve kullanılan ilaçlara sekonder İTP gelişebilir (6,7). Olguların % 50-65'inden bu otoimmün mekanizma sorumludur. Otoimmüniteyi başlatan nedenler tamamen açık değildir ve idiyopatik terimi tercih edilir (8). Ayrıca nedenler arasında antikora bağımlı olarak oluşan oksidan ürün hidrojen peroksidin hücrel hasara neden olması ileri sürülmüştür (9).

Organizmada serbest radikallerin üretilme hızı ve bunların ortamdaki temizlenme hızı denge halindedir. Serbest radikal miktarının antioksidan kapasiteyi aşması durumunda oksidatif stres meydana gelir (10). Hücrel antioksidanlar oluşan serbest radikalleri etkisizleştirmezse; protein, lipid ve nükleik asitlerle etkileşime girerek proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında değişikliklere; membran bütünlüğü ve fonksiyon kayıplarına ve bazı mutasyonlara neden olabilirler (11).

Bugüne kadar İTP'nin akut veya kronik seyrini saptayabilen klinik veya laboratuvar bulgusu saptanmamıştır. Bir çalışmada akut ve kronik İTP'da oksidatif stres düzeyi farklı saptanmıştır. Tanı anında daha yüksek oksidatif stres saptanan olgularda hastalığın kronik seyri beklenebilir (12). Oksidatif stres ve serbest radikaller İTP'nin patogenezi ve prognozundan sorumlu tutulabilir. Membran

lipitlerine bağlı antikorlar ve trombosit yıkımı üzerinde, İTP'daki lipit peroksidasyonunun artması ve antioksidan kapasitenin azalması anlamlı bir rol oynayabilir (12,13). Oksidatif stres altında sadece lipoproteinler değil hücrenin yapısındaki lipidler de peroksidasyona uğramaktadır (14).

Antioksidanlar, hedef moleküllerdeki oksidatif hasarı engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanır (15). İnsan vücudunda bulunan paraoksonaz-1 (PON-1), lipit peroksidasyonunun bu etkilerini nötralize eder. Böylece hücre membranlarını koruyucu etki gösterir (16). Paraoksonaz, Aldrige sınıflama sistemine göre, A grubu arildialkilfosfataz sınıfı bir ester hidrolaz enzimidir (14). Paraoksonaz ismi bir insektisid olan paratyonun metaboliti olan paraoksonu hidrolize etme kapasitesinden gelmektedir. İnsanlarda 7. kromozomun uzun kolunda q21.3 bölgesinde bir araya gelen, birbirine komşu oldukları bilinen PON-1, paraoksonaz-2 (PON-2) ve paraoksonaz-3 (PON-3) olarak adlandırılmış üç adet PON geni bulunmaktadır (17). Karaciğerde sentezlenen ve dolaşıma katılan PON-1, yüksek dansiteli lipoprotein yapısında yer almaktadır. Yüksek dansiteli lipoprotein ile düşük dansiteli lipoprotein (LDL)'i peroksidasyona karşı korumaktadır (18). İnsan serum PON-1 enziminin iki genetik polimorfizmi bulunmaktadır. Bu iki polimorfizm 55. ve 192. pozisyonlardaki aminoasitlerin değişimi ile ortaya çıkar. Birincisi; 55. pozisyonundaki metiyonin (M alleli) lösin (L alleli) ile değişince, ikincisi ise; 192. pozisyonundaki glutamin (Q alleli) arginin (R alleli) ile değişince oluşan polimorfizmdir (19). Genetik polimorfizmlerden dolayı, bireyler arasındaki serum PON-1 aktivitesi 10-40 kat kadar değişkenlik gösterir. Bireyler arasındaki bu değişkenliğe ilaveten, Q192R, L55M gibi nokta mutasyonlarının proteindeki değişikliklere öncülük etmesinden dolayı, serum PON-1 aktivitesi bakımından ırklar arasında da dikkate değer ölçüde farklılıklar vardır (20).

İdiyopatik trombositopenik purpura patogenezinde oksidatif hasarın rolü saptanmıştır (12,13,21-24). Ayrıca kronik İTP'da oksidatif stres durumunun daha yüksek olduğu belirlenmiştir (12). Çalışmamızda, İTP patogenezinde; antioksidan özelliği olan PON-1 genindeki L/M 55 gen polimorfizminin etkisini araştırmak istedik. Ayrıca PON-1 L/M 55 gen polimorfizminin akut ve kronik İTP tanılı olgularda farklılığının varlığını araştırılarak bu polimorfizmin farklı tedavi şekillerinin başarısını belirlemede etkisi araştırılmak istendi.

1.1. TROMBOSİTOPENİ NEDENLERİ

Trombositler pıhtılaşmada önemli role sahiptirler. Tüm yaş gruplarında normal trombosit sayısı 150.000-400.000/mm³'tür. 1/3'ü dalakta, 2/3'ü kan dolaşımında bulunur (3,25). Yaşam süreleri ortalama 7-10 gündür. Kemik iliğindeki megakaryositlerin sitoplazmalarından ayrılan trombositler normalde 1-4 µm çapındadır. Ortalama trombosit volümü (MPV) ise 8.9 ± 1.5 µm³ değerindedir (3). Trombositler yaşlandıkça parçalanmaya ya da granül içeriklerini ve membran proteinlerini kaybetmelerine bağlı küçülürler (25).

Kan alınırken trombositlerin aktivasyonuna (3,25), enjektör ya da tüpte trombositlerin agregasyonuna (1), etilendiamintetraasetik aside (EDTA) bağlı trombositlerin in vitro aglütinasyonuna (3,25,26), megatrombositlerin sayılamamasına (3,13,25) ya da abciksimab, eptifibatide ve tirofiban gibi ilaçlar kullanıldığında trombosit glikoproteinlerine bağlanan monoklonal antikorlara (3,25) bağlı psödotrombositopeni görülebilir.

Trombositopeni trombositlerin yetersiz yapımına, aşırı yıkımına ya da anormal dağılımına (dalakta göllenme) bağlı olabilir. Çocukluk çağında görülen trombositopenilerin etyolojik sınıflandırılması Tablo I'de gösterilmiştir (3). Trombositopenin tipi seçilecek tedaviyi etkileyeceğinden önemlidir (25).

Trombosit yıkımına bağlı trombositopeniler, immun ve immun olmayan trombositopeniler olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. Genellikle diğer kan hücre elemanları normal sayıda bulunur ve periferik yaymada büyük trombositler görülür. Kemik iliğinde ise normal ya da artmış sayıda megakaryositler saptanır (27).

Tablo I. Çocuklarda Trombositopeninin Patofizyolojik Sınıflandırılması (3)

I. Artmış trombosit yıkımı (kemik iliğinde normal ya da artmış megakaryositler)	B. İmmun olmayan trombositopeniler
A . İmmun trombositopeniler	1. Trombosit tüketimine bağlı
1. İdiyopatik	a. Mikroanjiyopatik hemolitik anemi: Hemolitik üremik sendrom, trombotik trombositopenik purpura (HÜS, TTP)
a. İdiyopatik trombositopenik purpura	b. Dissemine intravasküler koagülasyon (DIC)
2. Sekonder	c. Virüse bağlı hemofagositik sendrom
a. İnfeksiyon (HIV, CMV, EBV, suçiçeği, kızamık, kızamıkçık, kabakulak, boğmaca, hepatit, parvovirüs B19, tüberküloz, tifo)	d. Kasabach-Merritt sendromu (dev hemanjiom)
b. İlaçlar	e. Siyanotik kalp hastalıkları
c. Transfüzyon sonrası purpura	2. Trombosit yıkımına bağlı
d. Otoimmün hemolitik anemi (Evans sendromu)	a. İlaçlar (ristosetin, protamin sülfat, bleomisin)
e. Sistemik lupus eritematozus (SLE)	b. İnfeksiyonlar
f. Hipertiroidizm	c. Kardiak (intrakardiak defektlerin tamiri, prostetik kalp kapakları, sol ventriküler çıkış obstrüksiyonu)
g. Lenfoproliferatif hastalıklar	d. Malign hipertansiyon
3. Neonatal immün trombositopeniler	II. Trombosit dağılım bozuklukları ve göllenme
a. Neonatal otoimmün trombositopeni	A. Hipersplenizm (portal hipertansiyon, gaucher, siyanotik konjenital kalp hastalıkları, infeksiyon, neoplazi)
b. Neonatal alloimmün trombositopeni	B. Hipotermi
c. Eritroblastosis fetalis -Rh uygunsuzluğu	

Tablo I. Devamı (3).

III. Azalmış trombosit üretimi-etkisiz trombopoez

(kemik iliğinde azalmış ya da eksik megakaryositler)

A. Megakaryositlerin baskılanması ya da hipoplazi

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

2. Konstitüsyonel

- a. TAR sendromu
- b. Konjenital amegakaryositik trombositopeni
- c. Trombositopeni-korpus kallosum agenezisi sendromu
- d. Paris-Trousseau sendromu
- e. Rubella sendromu
- f. 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 (PNH)

4. Kontrol mekanizması bozuklukları

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

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. Hereditör trombosit bozuklukları

- a. Bernard-Soulier sendromu
- b. May Hegglin anomalisi
- c. Wiskott-Aldrich sendromu

7. Edinsel aplastik bozukluklar

- a. İdiyopatik
- b. İlaçlar
- c. Radyasyon
- d. Viral infeksiyonlara bağlı (HIV, EBV, hepatit)

B. Kemik iliğini infiltre eden durumlar

- 1. Benign (osteopetroz, depo hastalıkları)
 - 2. Malign (miyelofibroz, langerhans hücreli histiyositoz, sekonder lenfoma, nöroblastom, solid tümör metastazları)
-

1.2. İDİYOPATİK TROMBOSİTOPENİK PURPURA

Purpura terimi ilk kez Hipokrat ve Galen tarafından kırmızı kabarıklıklar ya da ateşe bağlı lekeler ve plaklar olarak tanımlanmıştır (28). 1735’de, Paul Gottlieb Werlhof; 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 (27,28).

1.2.1. Tanımı ve Sıklığı

İdiyopatik trombositopenik purpura, immün aracılı trombosit yıkımı ile karakterize; benign, kendi kendini haftalar ve aylar içinde sınırlayan bir hastalıktır (29,30). Trombositopeni, kısa trombosit ömrü, plazmada antitrombosit antikorların bulunması ile karakterizedir (31).

İnsidansı 16 yaş altındaki çocuklarda yılda 3-10/100.000 ve prevalansı 1-4 yaşta 9.3/100.000, 6-11 yaşta 7.3/100.000 ve 11-14 yaşta 4.1/100.000 olarak rapor edilmiştir (32).

Hastalığın pik insidans yaşı 2-5 yaştır. Kış ve sonbahar mevsimlerinde sıklığı artar (2). Her iki cinsiyette eşit görülmele beraber, beyaz çocuklarda siyah çocuklardan daha sık, infantlarda; erkeklerde kızlara oranla daha sık, adultlarda ise kızlarda erkeklerden üç kat daha sık görülmektedir (33).

1.2.2. Etyoloji ve Patogenezi

1951’de Harrington’un trombositopenik bir faktörün varlığını göstermesi; daha sonra bu faktörün Ig G olduğunun kanıtlanmasının (34) ardından, İTP’li hastaların plazmasını sağlıklı alıcılara infüze ederek Fc reseptör blokajını gösteren çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar İTP’nin kemik iliğinde trombosit üretiminde bir defekte bağlı olmayıp antikorlarla kaplı trombositlerin retikuloendotelial sistem (RES)’de yıkım hızının artışı sonucu meydana geldiğini göstermiştir (35-37).

Trombositlerin ve kemik iliğinde megakaryositlerin yüzeyinde yer alan membran glikoproteinlerine karşı oluşan otoantikorlar trombositlerin artan yıkımından sorumlu tutulmaktadır (25). Bu otoantikorlar için antijenik hedefler arasında en sık rastlanılan GpIIb-IIIa kompleksidir (5,25,38,39). Gp Ib-IX-V kompleksi, Gp Ia-IIa, Gp V ve Gp IV tanımlanmış diğer spesifik glikoproteinlerdir

(3,5,38,39). Otoantikörler çoğunlukla Ig G tipinde bulunmakla birlikte Ig A ve Ig M tipinde de görülebilmektedir (5,38-40).

İdiyopatik trombositopenik purpura tanılı olguların çoğunda viral infeksiyon öyküsü bulunmaktadır (4). Otoantikör üretimini başlatan faktörler bilinmemektedir (41). Viral ya da bakteriyel antijenler ile, hastanın trombosit antijenleri arasında moleküler benzerliğin; otoantikör üretimini başlattığı düşünülmektedir (40-42). İdiyopatik trombositopenik purpura'nın oluşumunda self-antijen tanımada ve toleransta bozukluk, anormal hücre yüzey moleküllerinin bulunması, Th1/Th2 sitokin profilinin değişmesi, hücrel sitotoksitede ve megakaryositopoezde bozukluk gibi multidisfonksiyonel mekanizmaların rolü üzerinde durulmaktadır (43).

İdiyopatik trombositopenik purpura'da otoantikör oluşumunda hem humoral hem de hücrel immun sistem rol almaktadır (43). Antikör kaplı trombositler Fc reseptörler aracılığı ile antijen sunan hücrelere (makrofajlar ve dendritik hücreler) bağlanırlar ve hücre içine alınarak yıkılırlar. Antijen sunan hücreler, trombositlerin glikoproteinlerini yıkmakla kalmayarak diğer trombosit glikoproteinlerinden yeni kriptik epitoplara oluştururlar (41) ve yeni peptidleri (CD 154-CD 40 T hücrelerinde eksprese edilen yardımcı stimulan moleküller) hücre yüzeyinde eksprese ederek sitokinler aracılığı ile CD4+ T hücrelerinin (Th1 ve Th2) proliferasyonunu başlatırlar. Aktifleşen CD4+ T hücreleri de otoreaktif B hücrelerini aktive ederek antitrombosit antikörlerin salınmasına neden olurlar (41). Trombosit üretim bozukluklarında görülen, yüksek trombopoietin düzeylerinin aksine; İTP'da normal ya da hafif artmış trombopoietin düzeyleri görülür (44,45).

1.2.3. Genetik

Monozigotik ikizlerde ve bazı ailelerde bildirilen İTP olgularında otoantikör üretimine eğilim saptanmıştır (46,47). Belli etnik gruplarda HLA-DRw2 ve DRB1*0410 allellerinin sıklığı yüksek bulunmuştur. HLA-DR4 ile kortikosteroidlere iyi yanıtın, DRB1*0410 ile kortikosteroidlere kötü yanıtın ve HLA-DRB1*1501 ile splenektomiye kötü yanıtın ilişkili olduğu gösterilmiştir (48).

İdiyopatik trombositopenik purpura gelişiminde fagositlerdeki Fc reseptör polimorfizmi etkili olabilir (37). Üç tip Fc reseptörü vardır. FcRII grubu üç gen (IIA, IIB, IIC) ve FcRIII grubu ise iki gen (IIIA, IIIB) tarafından kodlanır (49). Genetik polimorfizmler Ig bağlayan reseptörlerin afinitelerini değiştirmektedir. FcγRIIIA

polimorfizmleri ile tedaviye yanıtın ilişkili olduğu öne sürülmüştür (50). İnsan trombosit antijenleri (HPA) ile yapılan çalışmalarda HPA-5b alleli taşıyanların akut İTP için artmış risk taşıdıkları gösterilmiştir (49,51).

1.2.4. Klinik Bulgular

Akut İTP ve kronik İTP olmak üzere klinik olarak iki ana formda görülür. Akut İTP'da tanıdan sonra trombosit sayısı 6 ay içinde normale ($150.000/\text{mm}^3$) döner ve relaps görülmez. Kronik İTP'da ise trombosit sayısı 6 aydan sonra da düşük seyredir. Çocuklarda İTP vakalarının % 85-90'ı akut tiptir (52). Vakaların % 15-20'si ise kronikleşir (6,25). Trombosit sayısı normale döndükten sonra trombositopeni atakları ile seyreden rekürren İTP, kronik İTP'nin bir formu olarak kabul edilir (3) ve çocuklarda % 1-4 oranında görülmektedir (49).

Klinik görünüm sağlıklı bir çocukta aniden gelişen peteşi ve ekimozlar ile karakterizedir. 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, yumuşak damakta da bulunabilir. Epistaksis, diş eti kanaması, gastrointestinal kanamalar (melena, hematemez) ve genitoüriner sistem kanamaları (hematüri, menoraji) görülebilir. Retinal kanamalar, orta kulak kanamaları, intramuskuler enjeksiyon ve travma sonrası derin kas içi hematoma ya da hemartroz sık görülmemektedir (3). Hastaların % 50-75'i hafif kanama bulguları ile başvurur (25).

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 (25,32,53). Kanama bulgularının sınıflandırılması için sıklıkla kuru ve yaş purpura terimleri kullanılmıştır (54). Kuru purpura deri kanamalarını, yaş purpura ise aktif mukoza kanamalarını tanımlamaktadır (53).

Kanama riski belirleyicileri arasında trombosit sayısı ($<20.000/\text{mm}^3$), fizik aktivite düzeyi, travma, vasküler fragilite, ilaç kullanımı ve eşlik eden diğer hastalıklar (von Willebrand hastalığı, vaskülitler, arteriyovenöz malformasyonlar, ateş, anemi) sayılmaktadır. Boyun üzerindeki peteşiler, fundal hemorajiler ve

kanamanın aniden başlaması hayatı tehdit eden kanamaların uyarıcı bulguları olarak kabul etmektedir (53).

İdiyopatik trombositopenik purpurada kanama bulguları dışında fizik muayene normaldir. Ağır kanama yoksa solukluk görülmez. Olguların % 10'unda dalak ucu palpe edilebilir (3,25). Eğer belirgin splenomegali saptanırsa lösemi, SLE, enfeksiyöz mononükleoz, hipersplenizm gibi diğer tanılar düşünülmelidir. Hepatomegali ve lenfadenopati saptanmaz. Ancak enfeksiyona bağlı servikal lenfadenopati görülebilir (52).

1.2.5. Tanı ve Laboratuvar Parametreleri

Hikaye, fizik muayene, tam kan sayımı ve periferik kan yayması ile, trombositopeninin diğer nedenlerinden ayırt edilerek konulur (1,4,8,25,49). Ayrıca dolaşımdaki antitrombosit antikorlarının ölçümü ve kemik iliği incelemesi yapılabilir. Kemik iliği incelenmesi genellikle gerekli değildir (1,2,4,25,52). Kemik iliği incelenmesinde asıl amaç lösemi gibi diğer hematolojik hastalıkların ayırıcı tanısını yapmaktır (3). Tipik İTP olgularında kemik iliği aspirasyonu gereksiz kabul edilmektedir (3,55). Eğer steroid tedavisi verilecekse tedavi öncesinde lösemi tanısını dışlamak için kemik iliği aspirasyonunun yapılması gerekir (56,57).

Ortalama trombosit volümü (MPV) normal ya da artmıştır (58). Hemostatik olarak daha aktif olan, genç ve büyük trombositlere karşı; yaşlı, küçük ve etkisiz trombositleri yansıtan MPV değerinin <8 fl olmasının; kanama riski ve sıklığında artış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (59).

Periferik yayma ile tam kan sayımında saptanan trombositopeni, megatrombositler görülerek psödotrombositopeni ve diğer hematolojik bozuklukların ayırıcı tanısı yapılır (3). Kemik iliği incelenmesinde megakaryositlerin normal veya artmış olduğu saptanır. Eritroid ve miyeloid hücreler normaldir. Eozinofillerin artışı görülebilir. Kan kaybı fazla ise eritroid hiperplazi saptanabilir. Kanama zamanı uzamış bulunur. Protrombin zamanı (PT), parsiyel tromboplastin zamanı (PTT) ve fibrinojen düzeyleri normaldir. Bazı klinisyenler trombositlerin düştüğü, PT ve PTT'nin uzadığı yaygın damar içi pıhtılaşmasını dışlamak için bu testlere başvururlar (60). Trombosit yaşam süresinin, Cr51 ile işaretlenmiş trombositlerde 1-4 saate kadar kısaldığı gösterilmiştir (3).

Antitrombosit antikorları ölçen testler; hastanın trombositlerine bağlanan antikorları ölçen direkt testler ya da hasta serumu ya da plazmasındaki antikor ya da Ig G'yi ölçen indirekt testlerdir. Direkt testler, sadece trombosit glikoproteinlerinin ekstraselüler kısmındaki epitoplara karşı gelişen antikorları, indirekt testler ise hem sitoplazmadaki hem de ekstraselüler kısımdaki epitoplara karşı oluşan antikorları saptar. Ayrıca indirekt testler alloantikörleri da saptar. İdiyopatik trombositopenik purpurada direkt testlerinin pozitif olması daha olasıdır ve indirekt testlere tercih edilir (61,62).

Kronik İTP'lı olgularda ise ek laboratuvar tetkikleri ile ayırıcı tanının yapılması gerekmektedir. Bu durumda kemik iliği aspirasyonu incelemesi, tiroid fonksiyon testleri, idrar incelenmesi, batin ultrasonografisi, sedimentasyon hızı, antinükleer antikor (ANA), anti-dsDNA, direkt coombs testi, lupus antikoagulanı, trombosit antijenlerine spesifik antikorlar, serum immunglobulinleri ve Ig G alt grupları, trombosit fonksiyon testleri, koagulasyon çalışmaları, HIV, CMV, EBV, rubella, parvovirus B19 ve diğer viruslar için serolojik testlerin mutlaka yapılması gereklidir (55).

1.2.6. Ayırıcı Tanı

Ayırıcı tanıda ilaca bağlı trombositopeni, Evans sendromu, portal hipertansiyon, portal ven trombozu, kronik karaciğer hastalığı, fankoni aplastik anemisi, dissemine intravasküler koagülopati, hemolitik üremik sendrom ve transfüzyon sonrası purpura düşünülmelidir (55,63).

Eğer kırmızı veya beyaz küre serisinde anormallik varsa malignensiyi dışlamak amacıyla kemik iliği aspirasyonu yapılmalıdır. Genç çocuklarda konjenital amegakaryositik trombositopeni ve WAS ayırıcı tanıda akla gelmelidir. Daha büyük çocuklarda ise SLE ve lenfoma ayırıcı tanıda düşünülmelidir (1,8).

1.2.7. Tedavi

Tedavi protokollerinden herhangi birinin kanamayı önlediğine ya da hastalığın seyrini etkilediğine dair kanıt bulunmamasına rağmen (25,29,40,53), birçok klinisyen tarafından güvenli trombosit sayısı düzeyine ($>20.000/mm^3$) daha hızlı ulaşılabilmesi için tedavi verilmektedir (64).

Tablo II. Akut İTP’da tedavi (65).

Tedavi	Doz	Trombosit sayısının yükselme hızı	Yan etkiler
-Gözlem	-	3-4 hafta	-
-Kortikosteroid			Davranış değişiklikleri, glikozüri, hipertansiyon, kilo artışı, osteopeni
•Standart doz	1-2 mg/kg/gün, 7-21 gün	3-10 gün	
•Yüksek doz	4 mg/kg/gün, 7 gün 10-30 mg/kg/gün, 5-10 gün	2-4 gün	
-İntravenöz İmmünglobulin (IVIĞ)	0,4 g/kg/gün, 2-5 gün 0,8 g/kg/gün, 1 gün 1 g/kg/gün, 1 gün	24 saat	Ateş, bulantı, kusma, baş ağrısı, aseptik menenjit
-Anti-D	50-75 µg/kg/gün, 1-2 gün	24 -48 saat	Ateş, bulantı, kusma, titreme, miyalji, hemoliz

1.2.7.a. Kortikosteroidler

Antikor ile kaplı trombositlerin dalakta fagositozunu önler ve trombosit yaşamını uzatır. Kapiller direnci artırır. Vasküler stabiliteyi sağlar (trombosit sayısı artmadan kanamanın durması bu olayın kanıtıdır). Trombosit antikoru sentezini engeller (3,25,41). Akut İTP tedavisi hekim tarafından farklı şekillerde planlanabilir. Bu amaçla prednizon: 2 mg/kg/gün 14-21 gün, 60 mg/m²/gün, 21 gün (14 günde azaltma yapılır), 4 mg/kg/gün, 7 gün şeklinde uygulanabilir. Ancak 7 günlük oral megadoz metilprednizolon (OMDMP 30 mg/kg/gün, 3 gün ve 20 mg/kg/gün, 4 gün) tedavisi etkili, kolay uygulanabilir ve ucuz olarak görülmektedir (66).

Hiperglisemi, kilo artışı, hipertansiyon, cushingoid yüz, akne, psödötümör serebri, katarakt, büyüme ve gelişme geriliği, avasküler nekroz ve psikoz gibi yan etkilerinden dolayı uzun süreli steroid kullanımından sakınılmalıdır (1,3).

1.2.7.b. İntravenöz İmmunoglobulin (IVIĞ)

Retiküloendotelial sistemde Fc reseptör blokağı, inhibitör yolların aktivasyonu, içerdiği anti-idiyopatik antikorlar aracılığı ile otoantikor üretiminde azalma (otoantikorları yapan B hücrelerini baskılayarak) ve otoantikorları bağlayarak etkisiz hale getirme yoluyla etkili olur (3,25,41,49).

İntravenöz immunglobulin tedavisi ile vakaların %95'inde 48 saat içinde trombosit sayısında belirgin artış saptanır. Etki süresi yaklaşık 2-4 hafta kadardır (25). İntravenöz immunglobulin tedavisi ile %15-75 oranında yan etki görülür (55). Başlıca yan etkileri; ateş, titreme, bulantı, kusma, hipotansiyon, baş ağrısı (infüzyon hızına bağlı) gibi geçici, hafif yan etkiler görülür. Anafilaksi (özellikle Ig A eksikliği olanlarda), nadiren coombs (+) hemolitik anemi (anti-A, anti-B ve anti-D gibi eritrosit alloantikorlarına bağlı), viral bulaş (hepatit C geçişi bildirilmiştir. HBV ve HIV geçişi bildirilmemiştir), böbrek yetersizliği (67) ve hemipleji gibi nörolojik komplikasyonlar da görülebilmektedir (68). Meninkslerde immun kompleks birikimine bağlı gelişen aseptik menenjitin % 10-25 olguda görüldüğü bildirilmiştir (69). Baş ağrısı için deksametazon 0.15-0.3 mg/kg iv, ateş gibi yan etkiler için ise profilaktik asetaminofen ya da difenhidramin verilebilir (3).

1.2.7.c. Anti-D

Anti-D immunoglobulin, spesifik olarak eritrositlerdeki D antijenine bağlanır. Antikor ile kaplı eritrositler RES'de özellikle dalakta öncelikle tutularak Fc reseptör blokajı yaparlar ve trombositlerin klirensini azaltırlar. Steroidler ya da İVİG'den farklı olarak immun sistem üzerine başka etkileri (B ve T hücre fonksiyonları gibi) bulunmamaktadır (29). Anti-D ile trombosit sayısında artış IVIG kadar hızlı değildir (49).

Trombosit sayısında artış genellikle 48 saat sonra başladığından acil tedavide yeri yoktur (3). Etkisi 1-5 hafta kadar sürer (25). Sadece Rh (+) hastalarda ve splenektomi olmamış hastalarda kullanılabilir (70). Ateş, titreme, baş ağrısı, hipersensitivite, immun hemoliz (Hb'de 0.4-6.1 g/dl, ortalama 1.7 g/dl düşme) başlıca yan etkilerdir (3).

1.2.7.d. Diğer Tedaviler

Vinka alkaloidleri (vinkristin, vinblastin), danazol, siklofosfamid, azatiopürin, siklosporin, α -interferon, rituksimab, plazmaferez ve protein A immunoabsorbsiyon çocuklarda nadiren kullanılması gereken diğer tedavi seçenekleridir. Steroidler ve İVİG tedavisine ya da splenektomiye yanıt alınmayan, splenektominin kontrendike olduğu ve kanama semptomlarının eşlik ettiği refrakter trombositopenili hastalara saklanmalıdır (25).

Vinka alkaloidleri trombositlerin mikrotubullerine bağlanır ve oluşan kompleksin makrofajlar tarafından fagositozu inhibe edilir. Vincristin 1.5 mg/m² iv (maksimum 2 mg) 1 ay boyunca, haftada tek doz verilir. Yanıt yoksa kesilir. Yanıt varsa güvenli trombosit sayısını devam ettirmek için 2-3 haftada bir doz tekrarı gerekir (1,25). Periferik nöropati, konstipasyon, alopesi, miyelosupresyon gibi yan etkiler görülebilir (1).

Siklofosamid immunsupresif bir ajan olup 1-2 mg/kg/gün oral kullanılır. Tedavi başladıktan 2-10 hafta sonra yanıt gelişir. Miyelosupresyon, alopesi, hemorajik sistit, hepatotoksisite görülebilen yan etkilerdir (25).

Siklosporin, T hücre fonksiyonlarını baskılar ve 5 mg/kg/gün dozda oral verilir. Yan etki olarak hipertansiyon ve hepatotoksisite görülebilir (25).

Danazol retikuloendotelial makrofajlardaki Fc reseptör sayısını azaltır. Dozu 300-400 mg/m²/gün olacak şekilde oral verilir. İki aydan önce yanıt beklenmez. Hirşutizm, akne, kilo alımı gibi virilizan yan etkiler görülebilir (1).

Rituksimab B hücre yüzey antijeni olan CD20'ye karşı oluşmuş monoklonal antikorlardır. Dozu 375 mg/m²/hafta iv, 4 hafta şeklindedir (3).

1.2.7.e. Splenektomi

Splenektomi ile antitrombosit antikorların yapıldığı ve RES tarafından trombositlerin yıkıldığı organ ortadan kaldırılmış olur (52). Erişkinlere oranla spontan remisyonun sık olması ve özellikle 5 yaşın altında splenektomi sonrası kapsüllü mikroorganizmalarla sepsis riskinin yüksek olması nedeniyle çocuklarda daha az sıklıkta uygulanmaktadır (1). Akut İTP'da tedaviye yanıtız, hayatı tehdit eden kanama varsa ya da kronik İTP'da tanıdan 1 yıl sonra trombosit sayısı <30.000/mm³ ve tedaviye yanıtız kanama bulguları mevcutsa splenektomi düşünölmelidir (3).

Perioperatif trombosit sayısını arttırmak için steroid ve İVİG verilebilir. Trombosit transfüzyonu, sadece intraoperatif kanamada gerekli olursa kullanılabilir. Splenektomiden 2-3 hafta önce pnömokok, hemofilus influenza tip b ve meningokok aşıları yapılmalıdır (1). Splenektomiye yanıt alınamayan olgularda aksesuar dalak varlığı ve SLE gibi otoimmün hastalıklar araştırılmalıdır (52). Howell-Jolly cisimciğı (nükleer kromatin artıkları) varlığı, aksesuar dalak olasılığını ortadan kaldırmayacağı için radyonüklid incelemeler yapılmalıdır (25,71).

1.3. GENETİK VARYASYON VE POLİMORFİZM

Bir karakteri temsil eden ve bu karakterin yavru döllere aktarılmasını sağlayan DNA parçasına gen adı verilir. Her karakterin geni kromozom üzerinde lokus denen belirli bir yerde bulunur. Bir karakteri temsil eden kromozomların karşılıklı bölgelerinde (lokuslarda) bulunan iki gen çiftine allel gen adı verilir. Her toplumun kendine özgü bir genetik yapısı vardır (72).

Bir popülasyonun genetik yapısını anlamak için o popülasyondaki bireylerin genotiplerini tanımak ve her bir genotipteki bireylerin sayısını bilmek gerekir. Örneğin, otozomal bir gen lokusunda eğer iki allel varsa (A, a) popülasyonda bu gen bakımından üç genotip bulunabilir: AA, Aa, aa. Bir genotipteki birey sayısının popülasyondaki toplam birey sayısına oranı genotip frekansıdır (73).

Gen frekansı bir lokusa ait farklı allellerin popülasyon içerisinde birbirlerine oranıdır. Popülasyon değişmezliğini korudukça, gen ve genotip frekansları da değişmeden kalır (72,73).

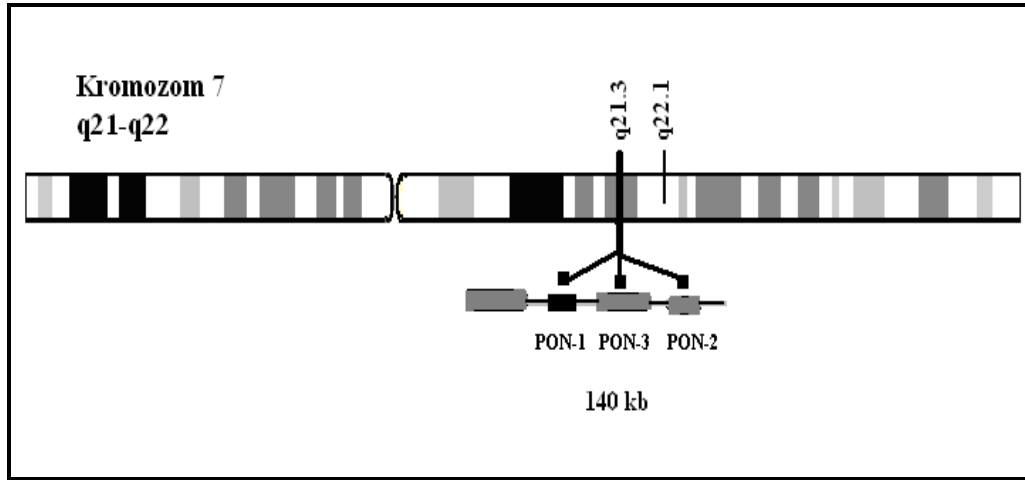
Genetik polimorfizm, bir popülasyonda, farklı allellere bağlı olarak genetik olarak belirlenmiş iki veya daha çok alternatif fenotipin görülmesidir. Eğer bir lokustaki allel frekansı en az %1 ise ve bu alleli taşıyan heterozigotların frekansı %2'den büyükse bu gen lokusuna polimorfik denebilir (74).

Tek nükleotid polimorfizmi, genetik polimorfizmlerin en yaygın formudur. Nükleotid değişiklikleri spesifik transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını değiştirebilir, böylece transkripsiyon oranını etkileyebilir. Ya da mRNA stabilitesini etkileyebilir ve üretilen protein seviyesini değiştirebilir. Kodlayıcı bölgedeki tek nükleotid polimorfizmleri (TNP) klinik olarak oldukça önemli potansiyele sahiptirler. Yapısal/fonksiyonel olarak farklı bir aminoasit değişimi sadece proteinin yapısı ve/veya stabilitesini etkilemez aynı zamanda protein-protein etkileşim yollarını da bozabilir. Bundan başka intron-ekzon sınırlarında olmak üzere ekzon (protein sentezi için gereken baz dizilerini içeren kısım) veya intronlardaki (gerekmeyen baz dizilerinin olduğu kısım) varyasyonlar alternatif splicingi (transkripsiyonla üretilen mRNA molekülünün intron bölgelerinin kırılıp ekzon bölgelerinin yaklaştırılması işlemidir) etkileyebilir ve böylece farklı protein formlarının üretilmesine yol açabilir. Lokus kontrol bölgelerindeki polimorfizmler

ise potansiyel olarak gen ekspresyonunu etkileyebilir ve hastalıklarla sonuçlanabilir. Böylece TNP'ler çok farklı etkilere sahip olabilirler (75,76).

1.4. PARAOKSONAZ (PON) AİLESİ

İnsan genomu şu ana kadar belirlenmiş olan PON-1, PON-2 ve PON-3 olarak adlandırılan en az 3 adet PON geni içermektedir (Şekil 1). Her üç gen 7. kromozomun q21 ve q22. bantları üzerinde yerleşmiş olup aminoasit dizileri arasında yaklaşık olarak %53 oranında benzerlik bulunur. Dokulardaki ekspresyonları ile dağılımları birbirinden farklılık gösterir (17).



Şekil 1. PON gen ailesi ve PON-1, PON-2 ve PON-3 genlerinin insan 7. kromozomu q21. ve q22. bantları üzerindeki yerleri (77'den değişiklik yapılarak).

1.4.1. Paraoksonazın Enzim Sınıflandırılmasındaki Yeri

Enzimler IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Uluslar arası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği) kriterlerine göre 6 grupta sınıflandırılır:

EC.1. Oksidoredüktazlar: Oksidasyon-redüksiyon (yükseltgenme-indirgenme) reaksiyonlarını katalize eden enzimler

EC.2. Transferazlar: Fonksiyonel bir grubun transfer reaksiyonunu katalize eden enzimler

EC.3. Hidrolazlar: Çeşitli bağların hidrolizini yani hidrolitik reaksiyonları katalize eden enzimler

Hidrolazlar şu şekilde sınıflandırılırlar:

EC.3.1. Ester bağlarına etkili hidrolazlar (Esterazlar)

- EC.3.1.1. Karboksilik ester hidrolazlar
- EC.3.1.2. Tiyol esteri hidrolazları
- EC.3.1.3. Fosforik monoester hidrolazlar
- EC.3.1.4. Fosforik diester hidrolazlar
- EC.3.1.5. Trifosforik monoester hidrolazlar
- EC.3.1.6. Sülfürik monoester hidrolazlar
- EC.3.1.7. Difosforik monoester hidrolazlar
- EC.3.1.8. Fosforik triester hidrolazlar (fosfotriesterazlar)
 - EC.3.1.8.1. Arildialkilfosfataz (**paraoksonaz**)
 - EC.3.1.8.2. Diizopropilflorofosfataz

EC.3.2. Glikozillenmiş bileşiklere etkili hidrolazlar

EC.3.3. Eter bağlarına etkili hidrolazlar

EC.3.4. Peptid bağlarına etkili hidrolazlar

EC.3.5. C-N bağlarına etkili hidrolazlar

EC.3.6. C-C bağlarına etkili hidrolazlar

EC.3.7. Halidik bağlara etkili hidrolazlar

EC.3.8. P-N bağlarına etkili hidrolazlar

EC.4. Liyazlar: Bu enzimler C-C, C-O ve C-N arasındaki bağların hidrolizden ve oksidasyondan farklı bir yolla kırarlar veya bu atomlar arasına bir çift bağ ilave eden enzimler

EC.5. İzomerazlar: Bir molekül içindeki geometrik ve yapısal değişiklikleri yani izomerizasyon reaksiyonlarını katalize eden enzimler

EC.6. Ligazlar (Sentetazlar): C-O, C-S, C-N ve C-C arasında bir bağ oluşmasını sağlayan enzimlerdir.

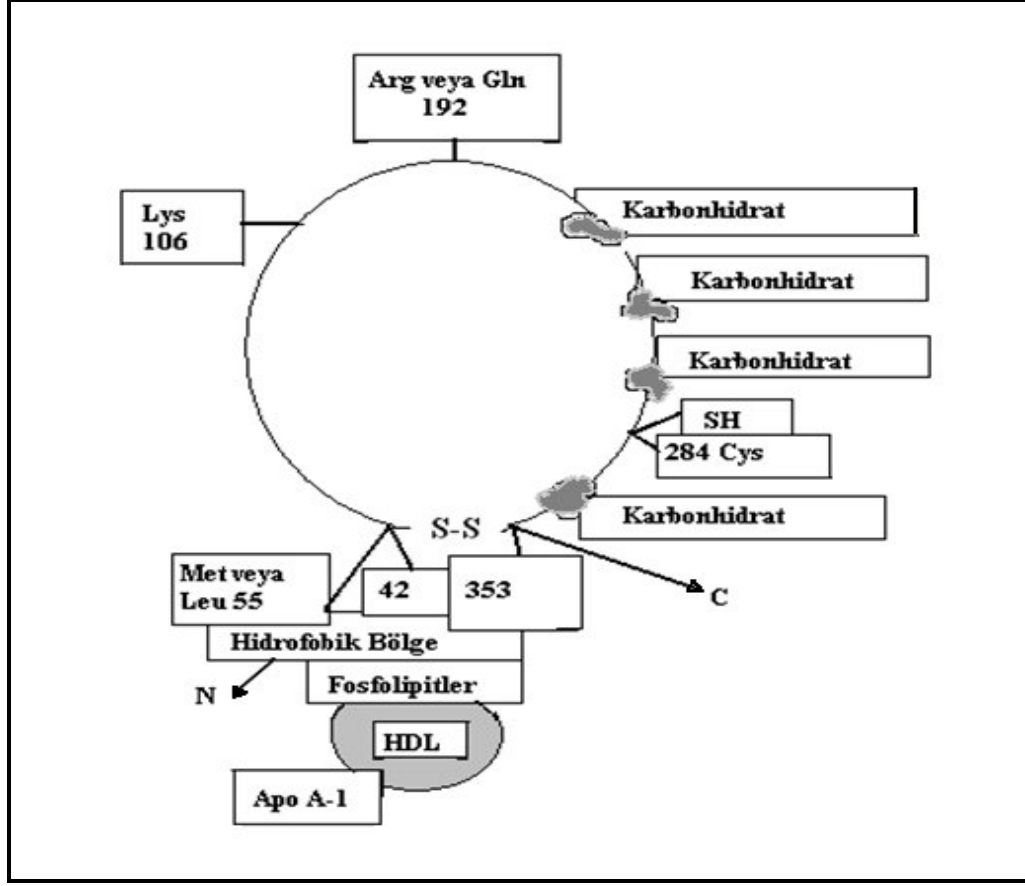
Esterazlar oldukça geniş bir enzim sınıfı olup alifatik ve aromatik ester bağlarının yanında peptidleri, amidleri ve halidleri hidrolize ederler. Esterazlar substratlarına göre 3 sınıfta incelenirler: A-esterazlar (arilesterazlar, paraoksonaz) organofosfatları (OP), B-esterazlar (karboksilesterazlar) alifatik esterleri, C-esterazlar (asetilesterazlar) asetat esterlerini hidrolize ederler (78). Paraoksonaz (EC.3.1.8.1), Aldrige sınıflama sistemine göre; A grubu arildialkilfosfataz sınıfı bir

ester hidrolaz enzimidir. Paraoksonaz ismi bir insektisid olan paratyonun metaboliti olan paraoksonu hidrolize etme kapasitesinden gelmektedir (14).

1.4.2. Sentez ve Yapısı

Paraoksonazlar kuşlar, balıklar ve böcekler dışında bir çok hayvan türünde bulunmaktadır (79,80). İnsanlarda serum PON aktiviteleri yenidoğan ve prematürlerde erişkin düzeylerinin yarısı kadar görülür ve doğumdan yaklaşık bir yıl sonra normal düzeylere ulaşır (81). Paraoksonaz-1 proteininin karaciğer ve plazmada, PON-2 proteininin karaciğer, böbrek, kalp, beyin, testis dokularında ve aortik düz kas hücrelerinde, PON-3 proteininin ise karaciğer ve plazmada bulunduğu immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir (17).

İnsan serum PON-1 proteini saflaştırılmış olup yaklaşık 43 kDa moleküler ağırlığında, 355 amino asitten oluşan bir glikoproteindir (82). Bazı yayınlarda PON-1 proteininin metiyonin amino asiti sayılmayarak 354 amino asitten oluştuğu belirtilmektedir (83). Total ağırlığının %15.8'ini oluşturan 3 karbonhidrat zinciri içerir. İnsan PON-1 proteini 3 adet sistein içerir ve protein, bu üç sistein molekülünden ikisinin aralarında yaptıkları disülfid bağlarına göre iki oksidasyon durumunda bulunabilir. Protein yapısında bulunan 42. ve 353. sistein amino asitlerinin oluşturduğu tek disülfid bağı, polipeptid zincirinin halka yapıda olmasına neden olmaktadır (Şekil 2). İki yüz seksen dördüncü konumdaki serbest sistein amino asidinin aktif merkez için rol aldığı düşünülmektedir (84).



Şekil 2. İnsan paraoksonaz enziminin (PON-1) yapısı (85).

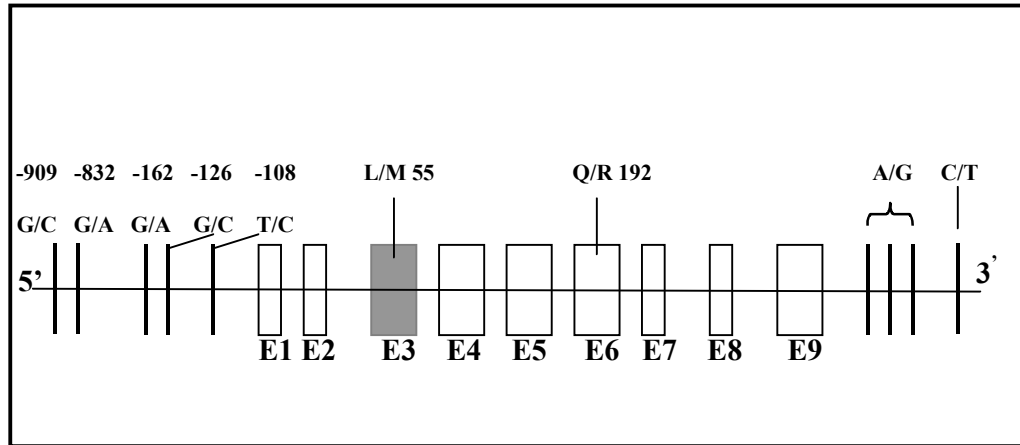
Paraoksonaz-2 (PON-2) bir hücre içi proteini olup yaklaşık olarak 44 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Fizyolojik veya patofizyolojik rolü tam olarak bilinmemekle beraber, PON-1 gibi PON-2’de de bazı polimorfizmler gözlenmektedir. PON-2’nin A/G 148 polimorfizmini; kolesterol, LDL-kolesterol, açlık kan şekeri ve doğum ağırlığı ile ilişkilendiren çalışmalar mevcuttur (86). Yüksek miktarlarda PON-2 sentezleyen hücrelerde yapılan çalışmalarda okside fosfolipid ve hidrojen peroksida maruz bırakılan hücrelerin oksidatif streslerinin düşük olduğu bildirilmiştir (87).

Paraoksonaz-3 (PON-3) yaklaşık 40 kDa molekül ağırlığında bir protein olup, PON-1’e göre çok düşük miktarlarda bulunmaktadır. Esas olarak karaciğerde sentez edilir ve serumda HDL ile birlikte bulunur. Paraoksonaz-1’in aksine PON-3’ün arilesteraz aktivitesi sınırlıdır ve PON aktivitesi yoktur (88). Üç PON üyesinden PON-3 en son tanımlananı olup üzerinde en az çalışılanıdır. Paraoksonaz-1 ve

PON-2 gibi PON-3’de antioksidan etkiler göstermektedir. Ancak PON-1 ve PON-2’nin aksine PON-3 ekspresyonu oksidatif stresten etkilenmemektedir (88).

1.4.3. Paraoksonaz-1 (PON-1) Polimorfizmi

PON-1 geninin kodlayan bölgesi 9 ekzondan oluşmakta ve bazı polimorfizmler göstermektedir. Polimorfizmlerin spesifik bir formu tek nükleotid polimorfizmidir (TNP) ve genin kodlayan bölgesinde 2 adet TNP görülür. Lösin/Metiyonin değişimi 55. konumda (L/M 55) ve Glutamin/Arjinin değişimi 192. konumda (Q/R 192) görülmektedir (Şekil 3). Bu iki polimorfizm restriksiyon endonükleazlar ile kolayca tespit edilebilmekte ve restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmleri olarak adlandırılmaktadır. Bu ayırımı göre oluşan PON-1’in allelik formları izozim veya allozim olarak adlandırılırlar (89).



Şekil 3. PON-1 geninin yapısı. Dokuz adet ekzon (E1-E9) kutucuklar ile gösterilmiştir. 5' düzenleyici uçtaki 5 polimorfizm, kodlayan bölgedeki 2 polimorfizm ve 3' translasyona girmeyen uçtaki 4 polimorfizm görülmektedir (90).

1.4.3.a. L/M 55 Polimorfizmi

Lösin/Metiyonin (L/M) 55 polimorfizmi, PON-1 enzim aktivitesini Q/R 192 polimorfizminden bağımsız olarak etkilemektedir. Substrat olarak paraokson kullanıldığı zaman, L55 taşıyan allozimin M55 taşıyan allozimden daha yüksek aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (91). Lösin/Metiyonin (L/M) polimorfizmi aynı zamanda karaciğerdeki enzim ekspresyonunu etkilemekte ve bunun sonucunda enzimin serumdaki yoğunluğunu belirlemektedir (91). Lösin55 alleli M55 alleleline

göre daha çok eksprese olmakta ve dolayısıyla L55 alleli taşıyan bireylerin serumlarında PON-1 yoğunluğu daha yüksek olmaktadır. Ayrıca M55 izoformu L55 izoformuna göre daha az stabil bir yapıdadır (92).

Paraoksonaz-1 enzim aktivitesindeki değişiklik bireyler arasındaki farklılıklardan kaynaklanır. Aynı genotipe sahip bireylerin PON-1 enzim aktivitelerinde 13 kata kadar varan farklılıklar görülebilmektedir. Enzimin yoğunluğunu değiştirmesi nedeni ile L/M 55 polimorfizmi sadece substrata spesifik enzim aktivitesinde değişikliğe neden olmaz, aynı zamanda fenilasetat gibi polimorfizmden etkilenmeyen bir substrata karşı da enzim aktivitesinin değişmesine neden olur (93).

1.4.3.b. Q/R 192 Polimorfizmi

Paraoksonazın 192. konumunda Arjinin (R) bulunduran izoziminin, Glutamin (Q) bulunduran izozimine göre paraoksone karşı daha yüksek aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (94). Yapılan çalışmalarda düşük aktiviteli QQ allozim taşıma oranının yaklaşık olarak %40, yüksek aktiviteli RR allozim taşıma oranının ise %10 ve bu allozimlerin arasında bir aktivite gösteren QR heterozigot allozimi taşıma oranının ise %50 civarında olduğu görülmüştür (89).

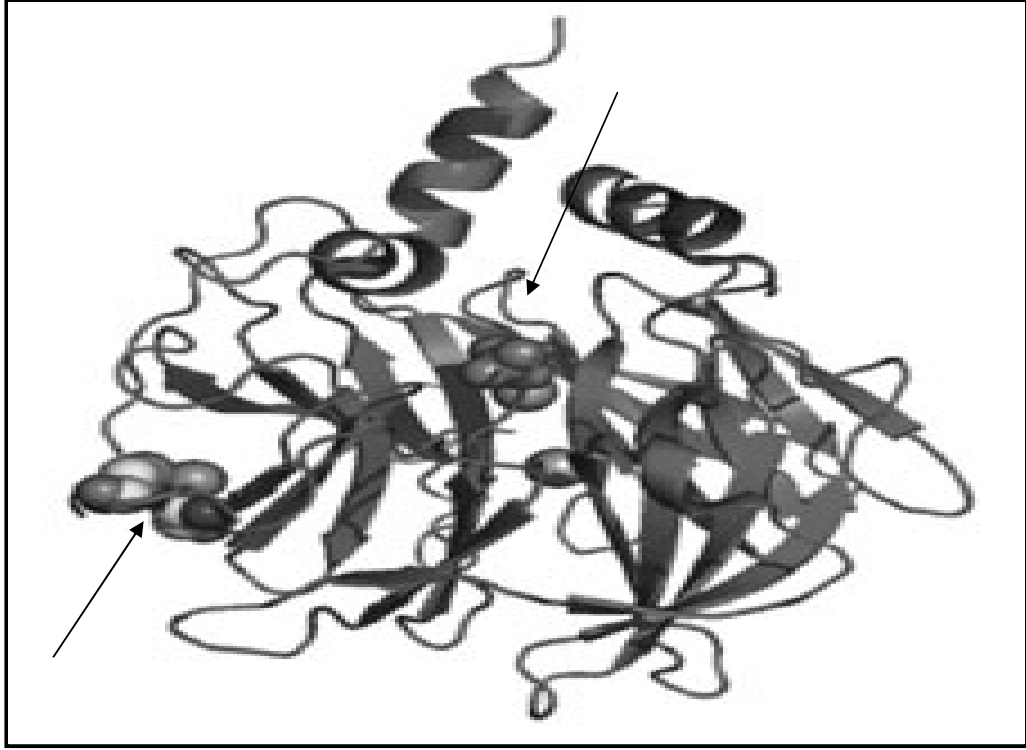
1.4.4. Paraoksonaz-1'in Kimyasal Özellikleri

Paraoksonaz-1 kalsiyum bağımlı esteraz olup, 355 aminoasitten oluşan glikoproteini yüksek oranda lösin içerir. İzoelektrik noktası 5.1'dir (82). Enzimin iki yapısal izoformunun bulunduğu düşünülmektedir ve bu izoformlarda paraoksonazın iki oksidasyon bölgesi bulunmaktadır. Bir izoformda bütün sisteinler serbest iken diğerinde tek disülfid bağı bulunmaktadır. Disülfid bağının olduğu izoformda 284. konumdaki sisteinin serbest bulunması bu amino asidin enzimin aktif merkezinde rol aldığı kanısını uyandırmaktadır.

Bu yapısal izoformlar, genetik izoformları belirleyen nokta mutasyonlarla açıklanamamaktadır (21).

Maksimum PON-1 aktivitesi için Ca^{++} gereklidir. Üç boyutlu yapıda β -tabakaların merkezinde 7.4 angstrom (\AA) aralıklı iki adet Ca^{++} bulunmaktadır (şekil 4). Bunlardan bir tanesi yapısal kalsiyum olup yapıdan uzaklaştırılması geri dönüşümsüz denatürasyona neden olmaktadır. Diğer ise katalitik etkinlikte görev

alan kalsiyumdur. Paraoksonaz-1'in organofosfat substratlarına karşı hidrolitik aktivitesi kalsiyuma bağımlı iken, lipid peroksitlerinin birikimini önlemede kalsiyumun gerekli olmadığı bildirilmektedir (95). Paraoksonazın etkisinin Ca^{++} iyonlarına bağımlı olması bu enzimi Co^{++} , Mn^{++} ve Mg^{++} 'a gerek duyan diğer A grubu esterazlardan ayıran önemli bir özelliktir (96).



Şekil 4. PON-1 proteininin üç boyutlu yapısı. Molekülün ortasındaki küreler (okla belirtilen) kalsiyum iyonlarını temsil etmektedir (97).

Paraoksonaz-1 organofosfatlara (OP) ilave olarak fenilasetat gibi aromatik esterleri, sarin, tabun ve soman gibi sinir sistemini etkileyen savaş gazlarını ve laktonları da hidroliz etmektedir (98). Son zamanlarda yapılan çalışmalar PON-1 enziminin aslında bir laktonaz olduğunu göstermektedir. Paraoksonazların fizyolojik substratı henüz tam olarak tanımlanamamış olmakla beraber yapılan araştırmalar gıdalarla alınan laktonların veya yağ asidi peroksidasyon ürünlerinin olabileceğini göstermiştir (99).

1.4.5. Paraoksonaz-1'in Antioksidan Özellikleri

İnsan PON-1 enziminin paraokson ve fenilasetat hidrolizine ilave olarak laktonaz, düşük de olsa peroksidaz ve fosfolipaz A2'ye benzer etkiler gösterdiği bulunmuştur (86). Plazma lipoproteinlerinin yapısında bulunan fosfolipidlerin oksidasyonu sonucu enzimatik hidroliz ile inaktive olabilen hidroperoksidler, izoprostanlar ve aldehidler gibi birçok ürün oluşur (100). Lipid oksidasyonundaki artışın oksidatif stresin artması veya endojen antioksidanların eksilmesinden kaynaklandığına inanılmaktadır.

Yüksek dansiteli lipoproteinler yapısında bulunan proteinlerin ayrıştırılıp saflaştırılması yolu ile insan PON-1 enziminin HDL (yüksek dansiteli lipoprotein)'nin apolipoprotein A-I (apoA-I) ve Apo J (clusterin) fraksiyonları ile birlikte bulunduğu bildirilmiştir (101). İn vitro koşullarda saflaştırılmış PON-1 ve HDL bağlı PON-1'in, LDL oksidasyonunu inhibe etmesi bu enzimin in vivo şartlarda LDL oksidasyonuna karşı etkin bir antioksidan olduğunu düşündürmektedir. Paraoksonaz-1'in LDL'i Cu^{++} iyonunun veya hücre serbest radikallerin sebep olduğu oksidasyondan koruduğu bildirilmiştir (23).

Yine PON-1'in HDL ilişkili trombosit aktive edici faktör asetil hidrolaz (PAF-AH) ile birlikte çalışarak lipid peroksidlerini hidroliz ettiği ve bu işlemde PAF-AH'ın ikincil savunma elemanı olarak görev yaparak, PON-1'in etkisinden kurtulmuş olan peroksidleri hidrolize ettiği varsayılmaktadır (100). Bu enzimlerin her ikisi birden veya muhtemelen PON-1 tek başına HDL'in antioksidan rolünün devamından sorumludur. Paraoksonaz-1 geninden yoksun fakat normal PAF-AH geni taşıyan farelerle yapılan çalışmalarda; PON-1 geninden yoksun farelerin LDL oksidasyonunda etkisiz kaldığı gösterilmiştir (102).

İdiyopatik trombositopenik purpura patogenezinde oksidatif hasarın rolü saptanmıştır (12,13,21-24). Ayrıca kronik İTP'da oksidatif stres durumunun daha yüksek olduğu belirlenmiştir (12). İdiyopatik trombositopenik purpuranın ortaya çıkmasında ve kronikleşmesinde oksidatif strese neden olabilecek bir genetik eğilimin etkin olabileceği düşünülmektedir. Rosenblat ve ark. (103); PON-1'in bu antioksidan etkilerinin enzimin lipolaktonaz aktivitesinden kaynaklandığını ve nokta mutasyon analizleri ile bu etkilerin oluşmasında enzimin yapısında bulunan iki histidin aminoasidinin (H^{115} ve H^{134}) anahtar rol oynadığını bildirmişlerdir.

Bu nedenlerle antioksidan özelliği olan PON-1'in L/M 55 gen polimorfizmini araştırmak, İTP'da bu yönde polimorfizm varlığı ve ayrıca akut İTP ve kronik İTP tanılı olgularda bu polimorfizm düzeyinde farklılıklar olup olmadığını, varsa bunun tedaviye cevabı nasıl etkilediğini belirlemek istedik.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hasta Grubu

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı polikliniğinde İTP tanısı konularak izleme alınan 60 hasta (51 akut İTP,15 kronik İTP) grubundan oluşturuldu. Etik kurul onayı alındıktan sonra örnekler Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı ve Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çalışıldı.

Akut İTP tanısı; izole trombositopeni (trombosit sayısının $150.000/mm^3$ ün altında) olması, diğer trombositopeni nedenlerinin dışlanması ve kemik iliği aspirasyonu yapılması, (kemik iliği incelenmesinde normal veya artmış megakaryosit olması) ile konuldu. Ailesel trombositopeni, ilaç alımı, aktif enflamasyon, kan transfüzyonu veya splenomegalisi olan ve direkt combs ve antinükleer antikoru pozitif olan hastalar çalışma dışı bırakıldı (104,105).

Hasta ebeveynlerinden bilgilendirilmiş onay formları alındı (Ek 1).

2.2. Sağlıklı Kontrol Grubu

Sağlıklı kontrol grubu olarak Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Sağlam Çocuk Polikliniği'ne başvuran ve daha önce İTP hikayesi olmayan, kemik iliği baskılanmasına yol açan ilaç kullanma öyküsü olmayan ve herhangi bir hastalık geçirmeyen sağlam çocuklardan oluşturuldu. Çocuklara ait yaş, cinsiyet, geçirdiği hastalıklar, ilaç kullanma öyküsü gibi bilgiler belirlenmiş ve katılan çocukların ebeveynleri çalışma hakkında bilgilendirilerek onay formu için imzaları alındı.

2.3. Örneklerin Alınması ve Saklanması

İdiyopatik trombositopenik purpura tanılı hastalardan tanı anında rutin tetkikler için K-EDTA (etilendiamintetraasetik aside)'li tüplere alınan kan örneklerinden arta kalan kanlar daha sonra DNA örnekleri izole edilmek üzere $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ de saklandı. Kontrol grubuna ait örnekler ise Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Sağlam Çocuk Polikliniği'ne başvuran ve herhangi bir nedenle rutin tarama sırasında K-EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden arta kalan kanlar benzer şekilde alınıp saklandı.

2.4. Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri

2.4.1. Kullanılan Cihazlar

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

2.4.2. Çözelti ve Tamponlar

- Amonyum klorür
- Potasyum bikarbonat
- Magnezyum Klorür
- Sodyum dodesil sülfat (SDS)
- İsoopropanol
- Etanol %70'lik
- Borik asit
- EDTA
- Bromphenol blue

- Bylene cyanole
- Ficoll
- Agaroz
- Ethidium bromide
- TRIS-baz
- TRIS-asetat
- DTT (dithiotreitol)
- Deoksinükleotid trifosfat (dNTP) seti (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
(MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)
- Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)
- 100 bp DNA ve 50 bp DNA step belirteçleri (Promega, Madison, WI)

2.5. Kandan DNA İzolasyonu

DNA 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.

Gerçekleştirilen deney aşamaları aşağıdaki sıralama şeklinde yapıldı.

- 1.5 ml'lik tüplere 900 µL Cell lysis (hücre parçalama) solüsyonu konuldu.
- Alt-üst edilmiş kandan 300 µL alınarak hücre parçalama solüsyonunun üzerine ilave edildi. Beş-altı defa alt-üst edildi, 10 dk. oda ısısında bekletildi.
- Yirmi saniye 13.000 x g'de oda ısısında santrifüj edildi.
- Alttaki beyaz kısma zarar vermeden mümkün olduğu ölçüde fazla süpernatant uzaklaştırıldı ve atıldı. Alttaki hücrelerin üzerinde yaklaşık olarak 10-20 µL sıvı bırakıldı.
- Beyaz hücreler vortekslenerek iyice karışması 10-15 saniye sağlandı.
- Vortekslenmiş hücrelerin üzerine 300 µL Nuclei lysis (çekirdek parçalama) solüsyonu eklendi. Beyaz hücrelerin parçalanması için solüsyon 5-6 kez pastör pipeti ile pipetlendi ve bırakıldı. Solüsyon visköz bir yapı kazandı. Karıştırıldıktan sonra hala hücre kümeleri görünüyorsa 37 °C'de inkübe edildi ve kümelerin bozulması beklendi. Kümeler 1 saat sonra hala varsa 100 µL çekirdek parçalama solüsyonu eklenerek inkübasyon tekrarlandı.

- Oda ısısına getirilmiş nükleer lizatin üzerine 100 µL protein precipitation (protein çöktürme) solüsyonu eklendi. Vortekslelendikten sonra (10-20 saniye) küçük, değişik kahverengi tonlarında protein kümeleri görüldü. Numuneler tam oda ısısına gelmeden protein çöktürme solüsyonu eklendiğinde yeterli bir protein çöküntüsü elde edilemeyeceğinden hareketle iyi bir çöktürme için bu ayrıntıya dikkat edildi.

- Oda sıcaklığında 3 dakika 13.000 x g'de santifüj edildi. Eppendorf tüpün dibinde koyu kahverengi bir protein çöküntüsü görüldü.

- Süpernatant 300 µL izopropanol içeren 1.5 ml'lik santifüj tüpüne transfer edildi.

- Sürekli alt-üst edilerek ve ters çevrilerek 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.

- Bir dakika oda sıcaklığında 13.000 x g'de santrifüj edildi. Örnekteki lökosit miktarının az veya fazla olmasına göre DNA miktarı değişebilen beyaz bir çöküntü olarak görüldü.

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

- Etanol dikkatlice aspire edildi. Bu aşamada DNA çok gevşektir. Yanlışlıkla pipetlenebileceğinden dikkatli olmak gerekir. Tüpler temiz kurutma kağıtlarının üzerine ağızları alta gelecek şekilde yerleştirildi. Böylece fazla etanol alınmış oldu. Sonra 5-10 dakika normal havada kurumaya bırakıldı.

- Kurumuş tüpe 100 µL DNA rehidratasyon solüsyonu eklendi. DNA'yı rehidre etmek için 65 °C'de 1 saat inkübe edildi. Tüp ara ara çalkalandı kullanılacağı zamana kadar -20 °C'de saklandı.

Bu işlemler bittikten sonra eppendorf tüplerde bulunan DNA'nın tahmini miktarını hesaplamak için şu işlem gerçekleştirildi: 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 alt-üst yapıldı. Okuma gerçekleştirildi.

2.6. Oligonükleotidler (primerler)

Çalışmada kullanılacak olan Primer (Oligonükleotid) Biobasic firmasına (BioBasic, Ontario, Canada) sentezletirildi. PCR deneylerinde kullanılacak olan oligonükleotidler, insan DNA'sı üzerindeki ilgili gen bölgesinin amplifikasyonunu gerçekleştirmek için kullanıldı. Satın alınan primerin nükleotid sekansı tablo III'de belirtilmiştir.

Tablo III. PON-1 genine ait primer dizileri.

İleri: 5'-GAA GAG TGA TGT ATA GCC CCA G-3'

Geri: 5'-TTT AAT CCA GAG CTA ATG AAA GCC -3'

2.7. PCR ile Paraoksonaz-1 (PON-1) 55 Gen Polimorfizmlerinin Saptanması

Kary Mullis tarafından 1980 yılında tasarlanmış olan Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (PCR) 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 (106).

PON-1 geni L/M 55 polimorfizmlerinin saptanması amacı ile örneklerimize genin ilgili bölgeleri için dizayn edilmiş primer çiftleri ile PCR uygulandı. Bireylere ait genomik DNA örneklerinde PON-1 55 lokusuna ait aleller PCR ile çoğaltıldı. Polimeraz zincirleme reaksiyonu karışımı 100-200 ng DNA, herbir primerden 0.5 µL, 0.1 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂ ve 1.0 U Taq DNA Polimeraz olacak şekilde hazırlandı. Amplifikasyon reaksiyonları PCR cihazında aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

2.7.1. PON-1 55 polimorfizmine ait amplifikasyon koşulu:

1. 95 °C de 5 dakika başlangıç denatürasyonu,
2. 94 °C de 1 dakika denatürasyon,
3. 62 °C de 1 dakika bağlanma

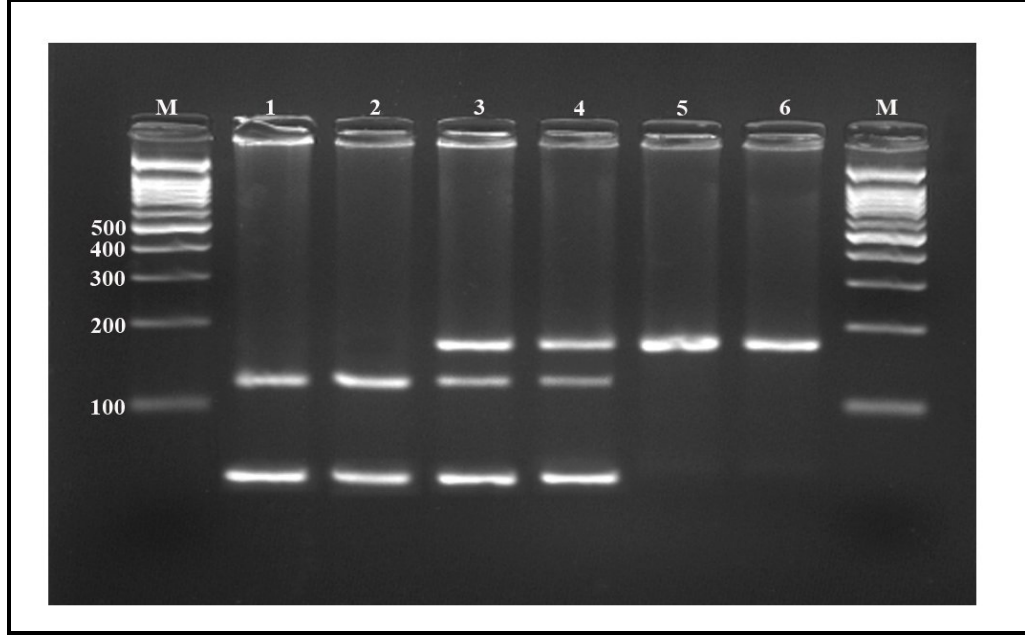
4. 72 °C de 1 dakika uzama olmak üzere 35 döngüden oluşan bir PCR programı kullanıldı.

PCR ile çoğaltılan PON-1 55 lokusuna ait fragman Hsp192 II restriksiyon endonükleaz ile kesilmiş ve daha sonra %2'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu.

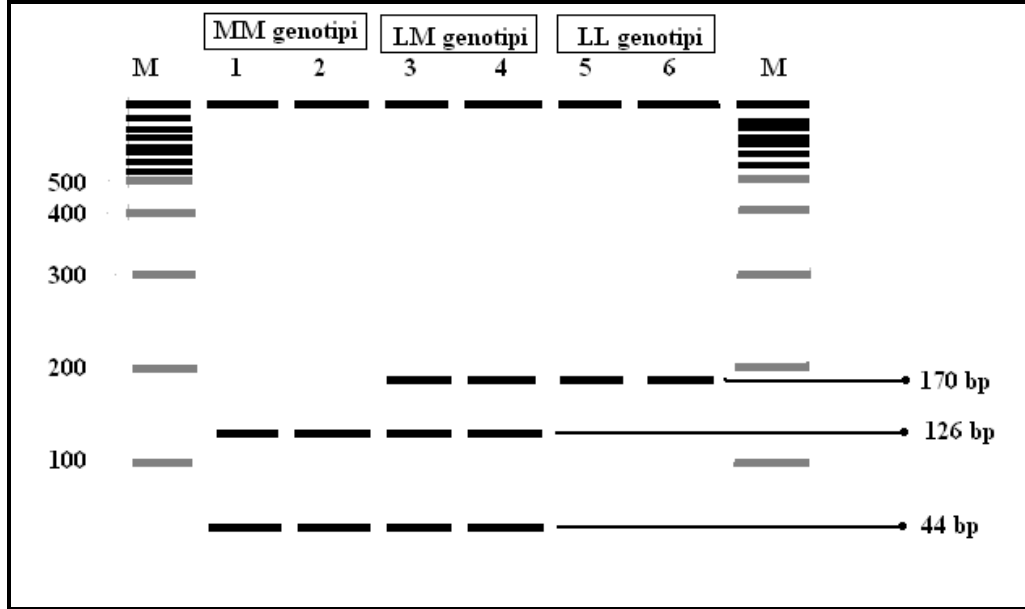
2.7.2. Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) ile Genotiplendirme

Elektroforez işlemini müteakip L/M 55 polimorfizmi için 170 baz çiftlik (bp) bantlar veren PCR ürünleri restriksiyon endonükleaz (RE) ile kesim işlemine tabi tutuldu. L/M 55 polimorfizmi için 170 bp'lık PCR ürününün RE kesimini gerçekleştirmek amacıyla 25 µl PCR ürünü, 8 U Hsp92 II enzimi, 5 µl 10X NEB tamponu, sığır serum albümini (BSA 0.1 µg/µl yoğunluğunda) steril distile su ile 50 µl'ye tamamlanarak iyice karıştırılıp 3-5 sn santrifüj edilerek 37 °C'de 16 saatlik inkubasyona bırakıldı. Ellibeşinci konumda M varlığı Hsp 92 II enzimi için kesim noktası oluşturur ve 55 MM homozigot bireylerde kesim sonrası 126 bp ve 44 bp'lık iki bant görülür. Ellibeşinci konumda L varlığında ise Hsp 92 II enzimi kesim noktası ortadan kalkmakta ve 55 LL homozigot bireylerde kesim sonrası esas ürün olan 170 bp'lık bant görülür. Ellibeş L/M heterozigot bireylerde ise hem kesilmeyen 170 bp, hem de kesim ürünleri olan 126 bp ve 44 bp'lık bantlar görülür ve böylece PON-1 55 genotipinin tayininde kullanılır (107).

Restriksiyon endonükleaz işlemine maruz bırakılan ürünler %3.5'luk agaroz jelde yukarıda bahsedildiği şekilde elektroforeze tabi tutulduktan sonra genotipleme yapıldı. Şekil 5a ve 5b'de görüldüğü gibi L aleli 170 bp, M alleli 126 bp ve 44 bp da bant vermektedir.



Şekil 5a. Olgularımıza ait PON-1 55 polimorfizmine ait Hsp92 II enzimi ile kesilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1 ve 2. bireyler MM genotipi, 3 ve 4. bireyler LM, 5 ve 6. bireyler LL genotipi. L alleli 170 bp, M alleli 126 bp ve 44 bp. M: 100 bp DNA boyut belirteci.



Şekil 5b. Olgularımıza ait PON-1 55 polimorfizmine ait Hsp92 II enzimi ile kesilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsünün şematize hali. 1 ve 2. bireyler MM genotipi, 3 ve 4. bireyler LM, 5 ve 6. bireyler LL genotipi. L alleli 170 bp, M alleli 126 bp ve 44 bp. M: 100 bp DNA boyut belirteci.

2.8. İstatistiksel Analizler

Çalışmada elde edilen bulgular SPSS.12 paket programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirildi. Veriler ortalama±standart deviasyon olarak verildi. Gruplar arası ve grupların kendi içindeki analizlerde tek yönlü varyans analiz testi (ANOVA) ve post ANOVA testler olarak LSD ve Tukey B testleri kullanıldı. Genotipik dağılımların farklılıkları Ki-kare testi ile değerlendirildi. Kontrol grubu ve hastalar arasındaki allelik dağılım farklılıkları Fisher's exact testi ile değerlendirildi, p değerinin <0.05 olması istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

İdiyopatik trombositopenik purpura tanılı olguların 51 (%77)'i akut, 15 (%23)'i ise kronik İTP tanılı olgulardı. Akut İTP'lı olguların kız ve erkek oranları sırasıyla 22 (%43) ve 29 (%57) olarak, kronik İTP'lı olguların kız ve erkek oranları 10 (%67) ve 5 (%33) ve kontrol grubundaki bireylerin cinsiyete bağımlı değişimi 21 (%35) kız ve 39 (%65) erkek olarak bulundu.

Kronik İTP grubunda akut İTP ve kontrol grubuna göre kızların sayısı erkeklere göre istatistiksel olarak anlamlı farklı bulundu ($p<0.05$). Kontrol grubu ve İTP'lı hasta gruplarının demografik özellikleri tablo IV'de gösterildi.

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

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

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

Yaş ortalaması toplam İTP grubunda 7.24±3.90 yıl, akut İTP grubunda 6.33±3.62 yıl, kronik İTP grubunda 10.33±3.26 yıl ve kontrol grubunda ise 7.45±3.76 yıl olarak bulundu. Kronik İTP tanılı olgular ile kontrol grubu arasında ve akut İTP ile kronik İTP tanılı olgular arasındaki yaş farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Kontrol grubundaki olguların beyaz küre sayıları (WBC) akut İTP grubundaki olguların WBC değerlerinden daha düşüktü. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).

Hemoglobin değerleri 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 ($p>0.05$).

Trombosit sayıları akut İTP'lı olgularda 14.21 ± 13.97 $10^3/\text{mm}^3$, kronik İTP'lı olgularda 18.53 ± 24.05 $10^3/\text{mm}^3$, kontrol grubunda ise 329.25 ± 80.33 $10^3/\text{mm}^3$ olarak ölçüldü. Akut ve kronik İTP hastalarının trombosit sayıları kontrol grubundan düşük olarak saptandı ($p<0.05$).

Çalışmadaki akut İTP'lı olguların ortalama trombosit hacimleri (MPV) 11.95 ± 1.67 fL, kronik İTP'lı olguların 12.84 ± 2.40 fL ve kontrol grubunda ise 10.51 ± 1.65 fL olarak ölçüldü. Akut İTP ve kronik İTP'lı hastaların MPV değerleri kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu. Kronik İTP'lı hastalarda ise akut İTP'lı hastalara göre daha yüksek MPV değerleri saptandı. Ancak gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark görülmedi ($p>0.05$). Bakılan PCT değerleri akut İTP grubunda $\%0.01\pm 0.02$, kronik İTP grubunda $\%0.07\pm 0.16$ ve kontrol grubunda $\%0.34\pm 0.83$ olarak bulundu. Gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0.05$).

Trombosit dağılım aralığı (PDW) ise akut İTP ve kronik İTP olgularında kontrol grubuna göre, kronik İTP'lı hastalarda ise akut İTP'lı hastalara göre daha yüksek bulundu. Kontrol grubu ve kronik İTP hastaları arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı çıktı ($p<0.05$). Trombosit dağılım aralığı toplam İTP, akut İTP, kronik İTP ve kontrol gruplarında sırası ile 33.02 ± 8.04 , 32.27 ± 7.96 , 35.59 ± 8.04 ve 30.81 ± 6.59 olarak değerlendirildi. Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin hematolojik değerleri tablo V'te gösterilmiştir.

Tablo V. 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 (10³/mm³) (ort±SD) (alt-üst)	10.30±2.78 (4.32-18.69)	10.54±2.52 (5.88-18.69)	9.49±3.53 (4.32-18.04)	8.43±2.31 (4.40-13.49)	
Hb (g/dl) (ort±SD) (alt-üst)	12.31±1.38 (8.50-14.70)	12.17±1.37 (8.50-14.60)	12.78±1.35 (10.90-14.7)	13.48±1.17 (10.70-16.00)	
PLT (10³/mm³) (ort±SD) (alt-üst)	15.19±16.67 (2.00-89.00)	14.21±13.97 (2.00-56.00)	18.53±24.05 (3.00-89.00)	329.25±80.33 (201.0-586.0)	1-4, 2-4, 3-4
MPV (fL) (ort±SD) (alt-üst)	12.15±1.88 (9.8-20)	11.95±1.67 (9.80-16.40)	12.84±2.40 (10.40-20.2)	10.51±1.65 (8.30-13.50)	
PCT (%) (ort±SD) (alt-üst)	0.0±0.08 (0-0.48)	0.01±0.02 (0-0.16)	0.07±0.16 (0-0.48)	0.34±0.83 (0.19-0.52)	2-4, 3-4, 1-4
PDW (ort±SD) (alt-üst)	33.02±8.04 (19.0-49.0)	32.27±7.96 (19.0-48.20)	35.59±8.04 (22.0-49.0)	30.81±6.59 (18.50-44.0)	3-4

WBC: Beyaz küre, **Hb:** Hemoglobin, **PLT:** Platelet **MPV:** Ortalama trombosit volümü, **PCT:** Platokrit, **PDW:** Trombosit dağılım aralığı.

3.1. PON-1 L/M 55 Genotip Dağılımı ile L/M Allel Sıklığının Kontrol ve İTP Gruplarındaki Dağılımları

Akut İTP grubunda LL, LM ve MM genotip sıklığı sırası ile 10 (%19.6), 31 (%60.8) ve 10 (%19.6) olarak, kronik İTP grubunda sırası ile 6 (%40), 7 (%46.7) ve 2 (%13.3), kontrol grubunda ise 16 (%26.7), 39 (%65) ve 5 (%8.3) olarak saptandı.

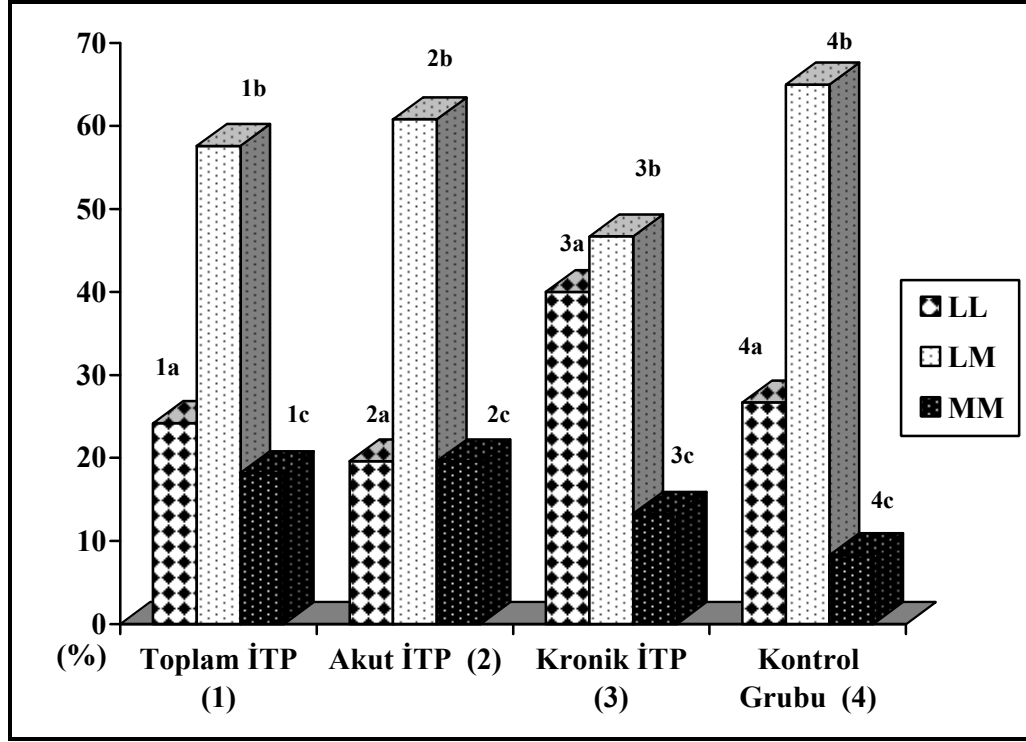
Her üç grupta da (kontrol, akut İTP, kronik İTP) en sık görülen genotip LM genotipi olup kontrol grubunda akut İTP grubuna göre daha fazla görüldü. Ancak istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$). Kronik İTP grubunda ise LM genotipi akut İTP ve kontrol grubuna göre daha düşüktü. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). İTP gruplarında MM genotipi kontrol grubuna göre daha sık bulunurken akut İTP'deki yükseklik kontrol grubu ve kronik İTP grubuna göre olan bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Kronik İTP grubunda LL genotipi kontrol grubu ve akut İTP grubuna göre daha sık bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Şekil 6'da kontrol grubu, akut İTP ve kronik İTP'li hastaların PON-1 L/M 55 genotip dağılımı gösterilmiştir.

Akut İTP grubunda L alleli 51 (%50), M alleli 51 (%50) oranında bulundu. Kronik İTP grubunda L alleli 19 (%63.3), M alleli 11 (%36.7), kontrol grubunda ise L alleli 71 (%59.2), M alleli 49 (%40.8) oranlarında saptandı. Kronik İTP grubunda diğer gruplara oranla L alleli daha sık bulundu. Kronik İTP grubundaki L allel sıklığı akut İTP grubuna göre daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Akut İTP grubunda M alleli diğer gruplara göre daha sık görüldü. Akut İTP grubundaki M allel sıklığı kronik İTP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Kontrol grubu ve İTP'li hastaların oluşturduğu İTP grubunun PON-1 L/M 55 genotip dağılımı ile L ve M allel sıklığı Tablo VI'da gösterilmiştir.

Tablo VI. İdiyopatik trombositopenik purpuralı olgular ve kontrol grubunun PON-1 L/M 55 genotip dağılımı ve L/M allel sıklığı.

	Toplam İTP n=66 (1)	Akut İTP n=51 (2)	Kronik İTP n=15 (3)	Kontrol n=60 (4)	P<0.05
L/M 55 genotip dağılımı					
LL	16 (%24.2)	10 (%19.6)	6 (%40)	16 (%26.7)	3-4, 2-3, 2-4
LM	38 (%57.6)	31 (%60.8)	7 (%46.7)	39 (%65)	3-4, 2-3
MM	12 (%18.2)	10 (%19.6)	2 (%13.3)	5 (%8.3)	2-4, 2-3, 3-4, 1-4
Allel sıklığı					
L	70 (%53)	51 (%50)	19 (%63.3)	71 (%59.2)	2-3, 2-4, 1-4
M	62 (%47)	51 (%50)	11 (%36.7)	49 (%40.8)	2-3, 1-4



Şekil 6. Toplam İTP (1), akut İTP (2), kronik İTP (3) ve kontrol grubunun (4) PON-1 L/M 55 genotip dağılımı.

$$4a-3a= p<0.05$$

$$4b-3b= p<0.05$$

$$4c-2c= p<0.05$$

$$2a-3a= p<0.05$$

$$2b-3b= p<0.05$$

$$2c-3c= p<0.05$$

$$4a-2a= p<0.05$$

$$4c-3c= p<0.05$$

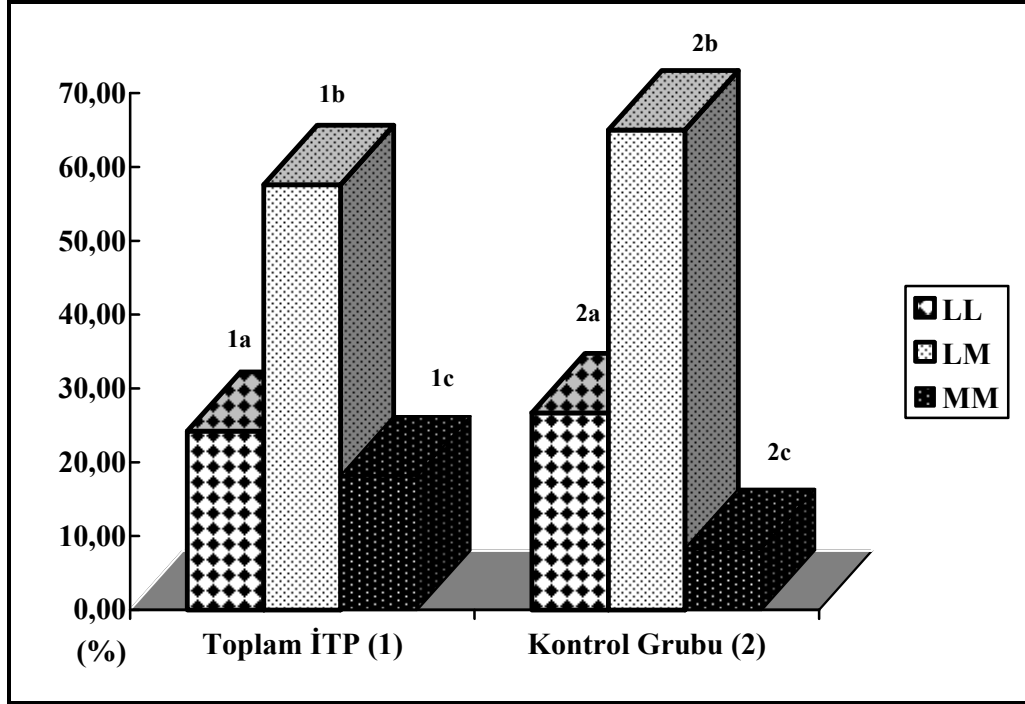
$$1c-4c= p<0.05$$

(Anlamli bulunmayanlar yazılmadı).

Toplam İTP olguları ile kontrol grubu kıyaslandığında ise İTP'lı hastalarda LL genotipi 16 (%24.2), LM genotipi 38 (%57.6), MM genotipi ise 12 (%18.2) olarak bulundu. Kontrol grubu ile İTP grubu arasında LL ve LM genotipi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$). Ancak MM genotipi İTP grubunda kontrol grubuna göre daha yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Kontrol grubu ve İTP'lı (akut ve kronik) hastaların PON-1 L/M 55 genotip dağılımı şekil 7'de gösterilmiştir.

Kontrol grubunda L alleli 71 (%59.2), M alleli 49 (%40.8) oranlarında bulunurken İTP grubunda L alleli 70 (%53), M alleli 62 (%47) oranında bulundu. İdiyopatik trombositopenik purpura grubunda M alleli oranı kontrol grubundan daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Kontrol grubunda İTP

grubuna göre daha yüksek bulunan L allel sıklığı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).



Şekil 7. Toplam İTP'lı (akut ve kronik) hastalar ve kontrol grubunun PON-1 L/M 55 genotip dağılımı.

1c-2c= $p<0.05$ (Anlamlı bulunmayanlar yazılmadı).

Tablo VII'de kontrol grubu, akut İTP ve kronik İTP gruplarında PON-1 L/M 55 genotip dağılımı ile yaş, trombosit sayısı, MPV, PDW değerleri ilişkilendirildi. Buna göre kontrol grubunda MM genotipi gösteren olguların yaşları LL ve LM 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 anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Ancak bu grupta MM genotipi gösteren olguların PDW değerleri LL genotipi gösteren olguların PDW değerlerine göre yüksekti ve bu fark istatistiksel anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Akut İTP'lı hasta grubunda MM genotipi gösterenlerin yaşları LL ve LM genotipi gösterenlerin yaşlarına göre daha büyük olup MM ve LM genotipleri arasındaki yaş farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Akut İTP tanılı hastalar arasında MM genotipi gösterenlerin trombosit sayıları LL ve LM genotipi gösterenlerin trombosit sayılarına göre daha yüksek bulundu. Ancak bu fark MM ve LM genotipi gösteren olgular arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). Akut İTP grubunda MM genotipi gösteren olguların MPV değerleri LL ve LM genotipi gösteren olguların MPV değerlerinden düşük olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Bu grupta genotipler arası PDW değerleri açısından da istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).

Kronik İTP'lı hastalarda MM genotipi gösterenlerin yaş ortalaması LL ve LM genotipi gösterenlere göre daha küçük bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Bu grupta MM genotipi gösterenlerin trombosit sayıları LL ve LM genotipi gösterenlere göre daha düşük olup istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Yine LM genotipi gösterenlerin trombosit sayıları da LL genotipi gösterenlerin trombosit sayılarından anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p<0.05$). Aynı grupta genotipler arası MPV değerleri açısından MM genotipi gösterenler ile LL ve LM genotipi gösterenler arasında istatistiksel anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). Bu grupta MM genotipi gösterenlerin MPV değerleri diğerlerine göre daha yüksekti.

Kronik İTP grubunda PDW değerleri bakımından ise MM genotipi gösterenlerin değerleri LL ve LM genotipi gösterenlerin PDW değerine göre daha yüksek bulundu. Bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Tablo VII. Gruplar arası PON-1 L/M 55 genotip dağılımı ile yaş ve trombosit parametreleri ilişkisi.

	Akut İTP (1)			Kronik İTP (2)			Kontrol grubu (3)		
	LL n=10 (a)	LM n=31 (b)	MM n=10 (c)	LL n=6 (a)	LM n=7 (b)	MM n=2 (c)	LL n=16 (a)	LM n=39 (b)	MM n=5 (c)
Yaş (yıl) (ort±SD) (alt-üst)	6.25±3.77 (1.5-12)	5.53±3.13 (1.5-14)	8.9±4.04 (2.5-14)	10.91±3.72 (5.5-16)	10.42±2.33 (7.5-14)	8.25±6.01 (4-12.5)	7.53±4.15 (2-16)	7.12±3.51 (1.5-14)	9.7±4.38 (2-13)
p	1b-1c= p<0.05		2a-2c= p<0.05, 2b-2c= p<0.05			3a-3c= p<0.05, 3b-3c= p<0.05			
PLT (10³/mm³) (ort±SD) (alt-üst)	15.10±9.93 (2.0-36.0)	12.86±13.58 (2.0-56.0)	17.50±18.75 (2.0-55.0)	30.33±33.7 (6.0-89.0)	12.14±12.5 (3.0-39.0)	5.50±0.70 (5.0-6.0)	352.50±103.70 (211.0-586.0)	326.00±71.02 (201.0-468.0)	279.80±40.27 (231.0-331.0)
p	1b-1c= p<0.05		2a-2b= p<0.05, 2a-2c= p<0.05, 2b-2c= p<0.05			AD			
MPV (fL) (ort±SD) (alt-üst)	11.05±2.44 (8-15.3)	11.57±3.86 (4.7-20.3)	9.69±3.44 (3.8-16.4)	12.51±1.50 (10.4-14.5)	12.28±1.32 (10.4-14.6)	15.75±6.29 (11.3-20.2)	10.61±1.92 (8.3-13)	10.52±1.53 (8.4-13.0)	10.10±1.90 (9.1-13.5)
p	AD		2a-2c= p<0.05, 2b-2c= p<0.05			AD			
PDW (ort±SD) (alt-üst)	34.45±21.91 (14.5-73.4)	33.69±18.24 (12.4-78.0)	33.53±17.83 (11.2-67.3)	34.23±8.92 (22.0-42.0)	33.78±6.32 (26.8-45.0)	46.0±4.24 (43.0-49.0)	28.66±6.33 (19.4-38.7)	31.0±6.60 (18.5-44.0)	35.56±5.49 (26.3-40.5)
p	AD		2a-2c= p<0.05, 2b-2c= p<0.05			3a-3c= p<0.05			

AD: p>0.05

4. TARTIŞMA

İdiyopatik trombositopenik purpura, çocukluk çağında en sık görülen akkiz kanama bozukluğudur. Çocuklarda akut İTP'nin patogeneğinde sıklıkla bir enfeksiyon sonrası uygunsuz immün yanıt oluşması suçlanmaktadır. Spesifik olarak trombosit membranına karşı oluşan antikorlar veya hastalığa bağlı oluşan immün kompleksler trombosit yüzeyine yapışmakta. Genç trombositlerin yıkımına neden olmaktadır (108-110). Trombosit üzerindeki GpIIb/IIIa veya GpIb/IX kompleksleri İTP ile ilişkili antikorların esas bağlanma yerleridir. İTP'da bazı antikorların glikolipitlere de bağlanabildiği gösterilmiştir (111). Bu otoimmunitiyi başlatan nedenler tamamen açık değildir (8). Ayrıca nedenler arasında antikora bağımlı olarak oluşan oksidan ürün hidrojen peroksidin hücresel hasara neden olmasında ileri sürülmüştür (9).

Oksidatif ve antioksidatif sistemler arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak meydana gelen oksidatif stres, yaşlanma, kanser, ateroskleroz, romatoid artrit (RA), osteoartrit (OA), fibromyalji ve osteoporoz gibi birkaç hastalık ile ilişkilendirilmiştir (112-114). Altındağ ve ark. (115) RA'li hastalarda TAOK'nin azaldığını, oksidatif stres indeksi (OSİ) ve DNA hasarının arttığını bulmuşlardır. Bu yüzden DNA hasarının RA hastalarında hastalığın patogeneğine katkıda bulunan aşırı reaktif oksijen radikalleri (ROS) üretimi ve yetersiz antioksidan kapasite ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Öztürk ve ark. (116) otoimmün bir hastalık olan RA hastalarındaki oksidan/antioksidan durumu değerlendirmek için yaptıkları çalışmada, RA'li hastalarda kontrol grubuna göre antioksidan kapasitenin azalmış, oksidatif stresin arttığını saptamışlardır. Akut ve kronik İTP'da artan oksidatif stres hastalığın seyrini etkileyebilir (12).

Doğal toplumlarda pek çok etken genetik bilginin dölden dölge geçiş biçimini etkileyerek toplumun genetik yapısını değiştirebilir. Genetik yapıyı değiştiren etkenlerin başlıcaları mutasyon, seleksiyon, göç, rastlantısal olmayan eşleşmedir. Bu etkenlerin hiç birinin bulunmadığı koşullarda ise toplumun genetik yapısı döllere boyunca değişmeksizin korunur. Bu kavram ilk kez 1908 yılında, birbirlerinden tamamen bağımsız olarak, Hardy ve Weinberg tarafından ortaya konmuştur (72,73). Hardy-Weinberg yasası şu şekilde ifade edilebilir; mutasyon, seleksiyon ve göç gibi

olayların meydana gelmediği yeterli büyüklükteki bir populasyonda rastgele eşleşme koşullarında, ilk dölden itibaren gen ve genotip frekansları sabit kalır.

Literatürde şimdiye kadar çocuk ve erişkinlerde akut veya kronik İTP’da PON aktivitesi ya da polimorfizmini araştıran çalışmaya rastlamadık. Bundan dolayı bu çalışma ile akut, kronik ve toplam İTP tanılı olgularda antioksidan özelliği olan PON-1 L/M 55 gen polimorfizmi araştırıldı. Polimorfizm değişiklikleri, bunların kronikleşme üzerine etkileri ve tedavi yanıtlarının değişip değişmediği saptandı.

Akut İTP en sık 2-10 yaşları (2-5 yaş pik yapar) arasında görüldüğü, kronik İTP’nin ise adölesan yaşta daha sık görüldüğü bildirilmekte (2,56,117-120). Akut, kronik ve toplam İTP ile sağlıklı kontrol grubunda yaptığımız, paraoksonaz-1 L/M 55 gen polimorfizmini araştırdığımız çalışmamızda akut İTP ve kronik İTP gruplarında yaş ortalamaları benzer şekilde bulunmuştur. Etnik gruplar, ırklar veya çevresel faktörler hastalığın görülme sıklığını değiştirmemektedir (56,120). Çocuklarda görülen kronik İTP erişkin forma benzemektedir. Kızlarda daha fazladır ve mevsimsel özellik göstermemektedir (117,118). Hastalığın sinsisi başlangıçlı olması ve 10 yaşın üzerinde tanı almasının da kronik İTP için risk faktörü olduğu bildirilmektedir (119). Bizim çalışmamızda da kronik İTP grubunda cinsiyet bakımından benzer şekilde kızların oranı erkeklere göre yüksekti (tablo IV).

İdiyopatik trombositopenik purpurada trombositopeni dışındaki kan sayımı verileri yaşlarına uygun normal sınırlardadır. Ancak kanamaya bağlı hafif bir anemi, viral veya bakteriyel enfeksiyonlara bağlı nötrofili, lenfositöz olabileceğini bildiren yayınlar mevcuttur (40,120,121). Bizim çalışmamızda da beyaz küre sayısı ve Hb değerleri açısından; kontrol grubu, akut İTP ve kronik İTP grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (tablo V).

Trombositler hacim, yoğunluk, yaş ve metabolik fonksiyon bakımından heterojen olan küçük diskoid hücresel elementlerdir. Kemik iliğindeki üretim faktörlerinin etkisiyle trombosit hacim heterojenitesi meydana gelir. Dolaşımda olgunlaşma gerçekleşmez. Trombopoietik strese cevap olarak oluşan MPV’de artma megakaryositlerin artmış büyümesi ile birlikte. Büyük trombositler stres trombositleri olarak tanımlanır. Megakaryosit stimülasyonunun derecesi trombosit hacminin en önemli belirleyicisidir (122). Hastalığın başlangıcından itibaren

trombosit haciminin değerlendirilmesi ile akut ve kronik İTP ayırımı yapılabilir (123).

Trombosit sayıları açısından akut ve kronik İTP hastalarının trombosit sayıları kontrol grubundan daha düşük ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Akut İTP olgularının %80.4'de trombosit sayısı $<20.000 /\text{mm}^3$ olarak saptandı. Düşük trombosit sayılarına rağmen hiçbir olguda hayatı tehdit eden intrakraniyal kanama görülmedi.

Ortalama trombosit hacmi (MPV) trombositopeninin yıkım fazlalığından yada yapım azlığından olduğunu belirler (124). Trombosit hacmi impedans ya da ışık dağıtım teknolojisi aletleri ile rutin olarak ölçülebilir (122,124). Referans değerler impedans açıklığına göre MPV 8.0-13.0 fl, optik sisteme göre ise MPV 7.4-11.2 fl olarak belirlenmiştir (122). Çalışmamızda optik sisteme göre değerlendirme yapıldı.

Kenet ve ark. (59) tarafından MPV değerinin <8 fl olması artmış kanama riski ile birlikte bulunmuştur. Çalışmamızda ölçülebilen MPV değerleri incelendiğinde her 3 gruptaki olguların tamamında MPV'nin normal sınırlarda (7.4-11.2 fl) olduğu saptandı. Akut İTP ve kronik İTP'li hastaların MPV değerleri kontrol grubunun MPV değerlerine göre daha yüksek, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi. Ancak kronik İTP grubunda MM genotipine sahip olguların MPV değerleri LL ve LM genotipine sahip olguların MPV değerlerinden anlamlı yüksek bulundu (tablo VII).

Trombosit dağılım aralığı (PDW) eritrosit dağılım aralığı kavramına benzer şekilde trombosit hacim heterojenitesinin indeksidir. Referans değerler impedans açıklığına göre 9.0-14.0 fl ve optik sisteme göre ise %44-56 olarak belirlenmiştir (122). Trombosit dağılım aralığı kronik İTP olgularında kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu. Ancak tüm gruplarda olguların büyük çoğunluğunda PDW değerleri referans değerden daha düşük bulundu.

Trombositler, çekirdeksiz, oval/yuvarlak diskoid şekilli 2-4 μm çapında özelleşmiş kan hücreleridir. Kemik iliğinde megakaryositlerce oluşturulur. Nukleus ve DNA içermemelerine karşın hücrenin tüm fonksiyonlarını gösterir (125). 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 lipitlerin üzerindeki sialik asit kalıntılarından dolayı negatif bir yüzey elektriğine sahiptir. Bu negatif elektrik dolaşan trombositlerin birbirine bağlanmasını azaltır (126). Trombositlerin membranında bulunan lipitlerin oksidatif stresten etkilenebileceği düşünülebilir. Lipit peroksidasyonu aracılığıyla İTP’da hastalığın seyrinin etkilenebileceği, tedaviye yanıtın değişebileceği düşünülebilir.

Polat ve ark. (13); erişkin yaş grubunda İTP’da lipid peroksit, glutasyon ve askorbik asit seviyelerini araştırmışlar. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında lipid peroksit düzeyinin yüksek, glutasyon ve askorbik asit seviyelerinin ise düşük olduğunu bulmuşlardır. Ohyashiki ve ark. (127); rat trombositlerinin serbest oksijen radikallerine maruz bırakıldığında trombosit lipid peroksidasyonunun arttığını ve buna paralel olarak agregasyon kapasitesinin azaldığını saptamışlardır. Worner ve ark. (128); potasyum tetraperoxokromat kullanarak serbest oksijen radikal tipleri oluşturarak statik ve dinamik yapıları ve trombosit membran fonksiyonunu bozduklarını gözlemlədiler. Erel ve ark. (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 varlığı, buna karşılık antioksidan enzim aktivitesinin azaldığı saptanmıştır.

Akut ve kronik İTP’da tedavi öncesi ve sonrası oksidatif stres ve total antioksidan kapasiteyi (TAOK) araştıran bir çalışmada; tedavi öncesinde akut, kronik ve toplam İTP gruplarında trombositopeni ile birlikte total peroksit düzeyinin belirgin yüksek, TAOK düzeyinin belirgin düşük olduğu saptanmış. Tedavi ile birlikte trombositopeninin düzelmesiyle total peroksit düzeyinde belirgin azalma ve TAOK düzeyinde belirgin artma gözlenmiştir (12).

Bu açıdan ele alındığında; kalsiyum bağımlı, HDL kolesterol içeren bir enzim olan ve başta LDL kolesterol olmak üzere plazma lipoproteinlerini serbest oksijen radikallerine bağılı oksidasyondan koruyan antioksidan bir enzim olan paraoksonaz enzimi üzerinde durmak gerekir. Paraoksonaz, lipit peroksitleri ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi potent oksidant yapıları enzimatik reaksiyonlarda substrat olarak kullanabilir. Özellikle H_2O_2 , aterogenezis sırasında arter duvarı endotelinde oluşan

major bir reaktif oksijen bileşikleri (ROS) türüdür ve LDL oksidasyonuna yol açarak daha potent oksidatif ürünler oluşumuna neden olabilmektedir. Bu yüzden paraoksonaz enziminin H₂O₂'i hidrolize edebilme yeteneği özellikle potent oksidant yapıların ortadan kaldırılmasında önemli bir rol oynamaktadır (130). Paraoksonaz bu antioksidant özelliği nedeniyle diyabetes mellitus, miyokard infarktüsü, Alzheimer hastalığı, sistemik amiloidoz, böbrek yetmezliği, Parkinson hastalığı, SLE, romatoid artrit gibi birçok hastalıkla ilişkisi araştırılan bir enzimdir.

Paraoksonaz-1'in antioksidan etkisinin hangi mekanizma ile oluştuğu net olmamakla beraber bazı hipotezler ileri sürülmektedir. Proteinin 284. konumundaki serbest sistein aminoasitinin PON-1'in antioksidan kapasitesinde önemli bir rolü olduğunu iddia eden çalışmalar mevcuttur. Aviram ve ark. (131); PON-1'in bu aminoasitten yoksun gen ile transfeksiyona (bir genin plazmid aracılığı ile başka bir hücrenin çekirdeğine taşıyıp DNA'sına yerleştirilmesi) tabi tuttukları hücrelerin süpernatantlarının LDL oksidasyonunu engelleyemediklerini, buna karşın normal PON-1 ile transfekte ettikleri hücrelerin süpernatantlarının LDL oksidasyonunu engellediğini göstermişlerdir.

Genelde serbest sistein içeren proteinlerin sülfhidril gruplarının metal şelatörleri ve serbest radikal yok edici olarak görev yapmaları bu hipotezi daha da güçlendirmektedir. Buna karşın PON-1 proteininin kristal yapısının incelenmesi bu sisteinin içe doğru gömülü olduğu ve böyle bir görevi yapamayacağı şeklinde karşıt görüşler de mevcuttur.

Harel ve ark. (132); 284. sisteinden yoksun mutant PON-1 proteinlerinin ekspresyonunun düşük olması ve stabil olmamasından yola çıkarak bu sistein molekülünün proteinin yapısal korunmasında ve stabilizasyonundan sorumlu olabileceğini ileri sürmüştür.

Rosenblat ve ark. (103); PON-1 enziminin LDL, HDL, makrofaj ve aterosklerotik lezyonlardaki okside lipidleri modüle etmek suretiyle antioksidan etki gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Paraoksonaz-1'in çeşitli mekanizmalar ile makrofajlarda kolesterol birikimini engellediği gösterilmiştir (133,134). Bu mekanizmalar arasında okside LDL'in hücreye alınımının engellenmesi, makrofajların kolesterol biyosentezinin inhibisyonu ve makrofajlardan kolesterol atılımının artışı sayılabilir (135).

Mackness ve ark. (136); 300 sağlıklı insanda 55 polimorfizmi ve 192 polimorfizminin birbirinden bağımsız PON-1 aktivitesindeki değişikliği göstermişlerdir. Homozigot AA/MM polimorfizmi gösterenlerden, homozigot BB/LL polimorfizmi gösterenlerde PON-1 aktivitesini daha yüksek bulmuşlardır. Bireyler arasında PON aktivitesindeki bu değişikliğin polimorfizmden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda akut, kronik İTP ve kontrol gruplarının tümünde en yüksek oranda LM genotipi bulundu. MM genotipi akut, LL genotipi ise kronik İTP'da daha yüksek oranda saptandı (tablo VI).

James ve ark. (137); diyabetik retinopati ve hipertansiyon gelişen olgularda izlenen düşük serum PON-1 aktivitesinin lipid peroksidasyonuna artmış yatınlıktan kaynaklandığı yorumunu yapmışlardır. Sporadik idiopatik Parkinson olgularında yapılan çalışmada PON-1 ile metabolize olan çevresel nörotoksinlerin yaşla birlikte nörodejenerasyondan sorumlu tutulabileceği ve B allelinin Parkinson hastalığına genetik yatınlık oluşturabileceği ileri sürülmüştür (138).

Antikardiolipin antikoları pozitif bulunan bir grup hastada yapılan çalışmada modifiye LDL'ye karşı otoantikoların arttığı, PON-1 aktivitesinin belirgin olarak düştüğü ve arteriyel tromboz geliştirme riski yüksek olan R genotipinin de artma eğiliminde olduğu izlenmiştir (139). Başka bir çalışmada IgA nefropatili hastalarda PON-1 aktivitesinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu ve böbrek fonksiyonlarında kötüleşmeyle ilişkili olduğu gösterilmiş (140). Tip 2 diabetes mellitus tanılı olgularda yapılan başka bir çalışmada PON-1 55 LM ve PON-1 192 AB polimorfizminin oksidan-antioksidan sistem üzerine etkisi araştırılmıştır. PON-1 192 BB ve PON-1 55 LL allellerinin oksidatif stresten koruyucu olduğu saptanmış (141).

Heijmans ve ark. (19); 85 yaş ve üzeri kişilerle PON-1 gen frekansı çalışarak bu grubu genç populasyonla karşılaştırdıklarında yaşlı grubun %8.5 oranında R/R homozigot allellere sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Çok uzun yaşlara kadar hayatta kalanların PON-1 192 geninin R alleliyle ilişkileri bulunmuştur. Yine başka bir çalışmada R alleli taşımayan kişilerde erken yaşlarda kardiovasküler hastalıkların riskinin büyük ölçüde arttığı bildirilmektedir (142).

Malin ve ark. (143) 123 otopsi vakasında PON-1 55 L/M genotip dağılımı ve bunun arter duvarlarındaki kalınlaşmayla ilişkisini incelemişlerdir. Yaş ve PON-1 55

L/M genotipinin arterlerin ateroskleroz ciddiyetiyle anlamlı derecede ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. LL homozigot bireylerin M alleli taşıyanlara göre arterlerinde daha fazla aterosklerotik plaklar olduğunu, stenotik lezyonlar tespit edildiğini ve arter duvarlarının daha kalın olduğunu saptamışlardır.

Fortunato ve ark.(144); orta yaşlı 310 kadın üzerinde yaptıkları çalışmada karotisin değişik bölgelerindeki aterosklerotik plaklarla PON-1 55 L alleli varlığının (LL+LM) ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada biyopsi ile fokal segmental glomeruloskleroz (FSGS) tanısı alan 25 çocuk ve 30 sağlıklı kontrol grubunda PON-1 192 ve PON-1 55 polimorfizmi araştırılmış. PON-1 polimorfizmi açısından FSGS ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu bildirilmiş. FSGS'li olgularda AA genotipi sıklığı kontrol grubuna göre AB+BB genotipinden daha düşük (AA genotipi için %48'e %73 ve AB+BB genotipi için %52'e %27) olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). PON-1 55 genotipi frekansı FSGS ve kontrol grubunda LL genotipi için %76'ya karşın %43 ve LM+MM genotipi frekansı %24'e %57 oranında (p<0.05) anlamlı bulunmuş. Çocuklarda FSGS gelişiminde B allel ve L allelinin risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (145).

Işık ve ark.'nın (146) romatoid artritli erişkin hastalarda yaptıkları çalışmada lipit peroksidasyon ürünü olan lipit hidroperoksitlerin, serbest sülfidril gruplarının düzeyleri ve PON-1 aktivitesi, arilesteraz (ARE) aktivitesi ve seruloplazmin (CP) çalışılmıştır. Aktif RA'li 47 hasta ve 23 sağlıklı gönüllü çalışmaya dahil edilmiş. Romatoid artritli hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla lipit hidroperoksitlerin düzeyi yüksek (p<0.001), serbest sülfidril gruplarının düzeyi, PON-1, ARE ve CP aktivitesi ise düşük bulunmuştur (sırasıyla; p<0.001, <0.001, <0.01 ve <0.01). Hasta grubunda lipit hidroperoksitlerin düzeyi ile PON-1 aktivitesi arasında negatif bir korelasyon olduğu saptanmıştır (r= -0.420 ve p<0.01). Romatoid artritli hastalarda artan oksidatif stres ve azalmış antioksidant varlığı nedeniyle bu hastalarda ateroskleroz gelişimi ve doku hasarının kaçınılmaz olduğu yorumu yapılmıştır.

Başka bir çalışma; otuziki beta- talasemi minör ve 28 sağlıklı kontrol grubunda yapılmış. Serum PON ve arilesteraz aktivitesi, lipit hidroperoksit düzeyi, TAOK, total oksidant durum ve oksidatif stres indeksi saptanmıştır. Beta- talasemi minör grubunda kontrol grubuna göre TAOK, serum PON ve arilesteraz aktivitesi anlamlı derecede düşük bulunmuş (p<0.001). Buna karşın total oksidant durum, lipit hidroperoksit düzeyi ve

oksidatif stres indeksi, hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmuştur (sırasıyla; $p<0.001$, $p<0.05$ ve $p<0.001$). Hastaların serum PON aktivitesiyle Hb düzeyleri arasındaki korelasyon anlamlı bulunmuş ($r=0.501$, $p<0.001$). Beta- talasemi minörde artan oksidatif strese karşın düşük olan serum PON-1 aktivitesi aneminin derecesi ile ilişkilidir. Beta- talasemi minör de bu durum ateroskleroz gelişimine eğilim yaratabilir şeklinde yorumlanmıştır (147).

Paraoksonaz aktivitesi, genetik ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Farklı toplumlarda çok geniş aralıklarda değişken profiller sergilediği gözlenmiştir (148). Bu nedenle irksal farklılıkları ortaya koymak için sağlıklı bireylerde (genelde erişkinlerde) yapılan paraoksonaz polimorfizmini araştıran çalışmalarda mevcuttur.

Mackness ve ark.(149); 1995 yılında İngiliz toplumunda PON-1 L/M 55 polimorfizmini araştırmışlar. M allel sıklığını %28, L allel sıklığını %72 olarak bulmuşlardır. Sanghera ve ark. (150); 1997 yılında Asya yerlilerinde M allel sıklığını % 20, L allel sıklığını %80 olarak bulmuşlardır. Çin halkında ise M allel sıklığını %96, L allel sıklığını %4 olarak saptamışlardır. Mackness ve ark. (151); 1998 yılında İngiliz toplumunda M allel sıklığını %57, L allel sıklığını %43 olarak, Heijmans ve ark. (152); 2000 yılında Hollanda'lılarda M allel sıklığını %37, L allel sıklığını %63 olarak, Cascorbi ve ark. (153); 1999 yılında Alman toplumunda M allel sıklığını %33, L allel sıklığını %67 olarak, Phuntuwateve ark. (154); 2005 yılında Tayland toplumunda M allel sıklığını %5, L allel sıklığını %95 olarak bulmuşlardır.

Sepahvand ve ark. (155); 2007 yılında İran halkında M allel sıklığını %41, L allel sıklığını %59 olarak saptamışlardır. Bizim çalışmamızda ise kontrol grubunda (sağlıklı bireyler) M allel sıklığı %40.8, L allel sıklığı %59.2 olarak, akut İTP grubunda M allel sıklığı %50, L allel sıklığı %50, kronik İTP grubunda M allel sıklığı %36.7, L allel sıklığı %63.3 olarak bulundu. Sağlıklı kontrol grubumuzdan elde ettiğimiz sonuçlar Sepahvand ve arkadaşlarının İran popülasyonundan elde ettiği sonuçlarla benzerdir.

Garin ve ark. (156); 1997 yılında Kafkas toplumunda M allel sıklığını %38, L allel sıklığını %62 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda kronik İTP tanılı olgularda M allel sıklığı %36.7, L allel sıklığı %63.3 olarak, kontrol grubunda (sağlıklı bireyler) M allel sıklığı %40.8, L allel sıklığı %59.2 olarak bulundu. Bu sonuçlar Garin ve arkadaşlarının sonuçlarına yakın bulundu.

Aynacıoğlu ve ark. (157); 1999 yılında Türk toplumunda (n=381) M allel sıklığı %28, L allel sıklığı %72 olarak saptamıştır. Çalışmamızda kontrol grubunda (sağlıklı bireyler) M allel sıklığı %40.8, L allel sıklığı %59.2 olarak bulundu. Aynacıoğlu ve arkadaşlarının Türk toplumunda elde ettiği sonuçlarla uyumsuz olması olgu sayımızın azlığına bağlandı. Ayrıca çok farklı etnik grupları bir arada barındıran Türkiye'nin farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda değişik sonuçlar alınabileceği düşünölmelidir.

Akut İTP grubunda ise, yapılan diğer çalışmalardan (149,150,152-155) farklı olarak M alleli daha sık gözlemlendi. Kronik İTP grubunda elde ettiğimiz sonuçlar Garin ve ark.'nın (156) Kafkas halkında, Cascorbi ve ark.'nın (153) Alman toplumunda, Heijmans ve ark.'nın (152) Hollanda toplumunda ulaştığı sonuçlara yakın bulundu. Bu grupta L alleli daha sık göröldü ancak bu sonuç daha önce farklı toplumlarda tespit edilen (149,150,152-157) L allel sıklığına benzerdir. Eğer akut kronik ayrımı yapılmazsa İTP'lı olgularda M alleli %47, L alleli %53 oranında bulundu. Kontrol grubuna kıyasla M alleli daha sık gözlemlendi. İstatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.05$).

Elde ettiğimiz sonuçlara bakarak akut İTP'li olgularda kontrol grubuna kıyasla daha az görölen LL genotipi İTP'nin başlangıcı ile ilişkili olmasa bile akut İTP geçiren birey eğer LL genotipine sahip ise kronikleşmeye eğilimi artırabilir. Kontrol grubuna göre toplam İTP grubunda daha yüksek bulunan MM genotipine sahip olmak ise hastalığa bireyi duyarlı kılabilir.

Daha önceden yapılan bir çalışmada kronik İTP tanılı olgularda 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 etkileyebileceği vurgulanmıştır (158). Bu bilgiler ışığında interferon gamma +874A/T polimorfizminin; İTP etyolojisindeki rolü, hastalığın klinik seyri ve tedaviye yanıtındaki etkisini araştırmak amacıyla Demircioğlu ve ark.'nın (159) yapmış olduğu çalışmada 35 akut İTP, 40 kronik İTP'lı hasta, 90 sağlıklı kontrol grubunda olmak üzere 3 grupta +874A/T polimorfizmi sıklığı değerlendirilmiştir. Sonuçlar gruplar arasında 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'lı 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'lı olgularda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuş ve diğer otoimmün hastalıkların da literatür verileride göz önüne alındığında +874A/T polimorfizminin akut ve kronik İTP etyopatogenezinde bir risk faktörü olabileceği düşünülmüştür.

İdiyopatik trombositopenik purpura tedavisinde amaç tedavinin uzun süren epistaksis, menoraji, hematüri ve gastrointestinal sistem kanamalarında kan kaybı riskini azaltmak ve intrakranial kanama riski nedeni ile trombosit sayısı $20.000/\text{mm}^3$ 'ün altında olanlarda yakınmaların derecesi ne olursa olsun tedavi başlanması gerektiği konusunda görüş birliği vardır (1,160-163). Son yıllarda tedavinin ilk 48 saati içinde trombosit sayısında hızlı artış yapması nedeni ile yüksek doz İVİG ve yüksek doz steroid kullanımı önerilmektedir (1).

Çalışmamıza dahil edilen olgularımızın büyük bir kısmında trombosit sayısı $<20.000/\text{mm}^3$ olduğundan, toplumumuzun sosyokültürel özelliklerinden dolayı tüm olgularımıza hastaneye yatırılarak tedavi başlandı. Tedaviye başlarken amacımız ucuz, yan etkisi az, trombositlerde daha hızlı yükseliş sağlayacak, hastanede kalış süresini azaltacak bir yöntemle başlamakti. Olgularımızdan 3 tanesi hariç ($\text{Plt}>50.000/\text{mm}^3$ olması nedeniyle) tümüne tedavi başlandı.

Tedavi sonuçları değerlendirilirken; trombosit sayısının $100.000/\text{mm}^3$ ve üzerinde olması tam cevap, 50 ile $100.000/\text{mm}^3$ arasında olması kısmi cevap, tedavi gereksinimi olmadan $50.000/\text{mm}^3$ altında minör cevap ve ilave bir tedaviye ihtiyaç duyulan; trombosit sayısının $50.000/\text{mm}^3$ altında olması durumu cevapsızlık yada refrakterlik olarak kabul edildi (104,164).

Buna göre; akut İTP grubundaki hastaların %62.5'inde (n=30) tedaviye yanıt alındı, %2.1'inde (n=1) kısmi yanıt alındı. Ancak 2. bir tedavi verilmedi. Yanıt alınamayanların oranı %35.4 (n=17) olarak saptandı. Bunlara 2. bir tedavi verildi. Tedaviye yanıt alınan olguların %23.3'ü (n=7) LL, %56.7'si (n=17) LM ve %20'si (n=6) MM genotipine sahipti. Tedaviye yanıt verenlerin çoğunun LM genotipine sahip olduğu görüldü.

Ancak hastalara aynı tip tedavi protokolü uygulanmayıp, rastgele seçim yapıldı. Akut İTP grubunda tedavi alan LL genotipine sahip toplam 10 hastadan 2'si YDMP (yüksek doz metilprednizolon) aldı. Bunlarda tedaviye tam yanıt alındı. Aynı grupta 1 hastaya SDMP (standart doz metilprednizolon) verildi. Tedaviye refrakter olarak değerlendirildi. İntravenöz immünglobulin alan 3 hastada tedaviye tam yanıt alındı. Anti-D alan 4 hastanın 2'sinde yanıt alındı, 1 olguda yanıt alınamadı, diğerinde kısmi yanıt alındı. Anti-D tedavisine yanıt %50 olarak bulundu. Yani LL genotipine sahip olanların İVİG ve YDMP tedavisine olan yanıtları daha iyi görünmektedir.

Akut İTP'lı tedavi alan olgulardan LM genotipine sahip toplam 29 olgunun 7'si YDMP aldı, 5'inde yanıt alındı (%71). Standart doz metilprednizolon alan 5 olgunun 2'sinde yanıt alındı (%40). İntravenöz immünglobulin alan 10 olgunun 8'inde yanıt alındı (%80). Anti-D alan 7 olgunun ise 2'sinde yanıt alındı (%28). Bu sonuçlara bakılarak LM genotipine sahip bireylerin Anti-D tedavisine daha dirençli olduğu ve yine LL genotipine sahip bireylerde olduğu gibi YDMP ve İVİG tedavisine daha iyi yanıt verdiği söylenebilir.

Akut İTP grubunda tedavi alan MM genotipine sahip toplam 9 olgunun 2'sinde YDMP tedavisine bir olguda yanıt alındı (%50). Standart doz metilprednizolon tedavisi 1 olguda kullanıldı ve yanıt alındı. 3 olguda İVİG tedavisi verildi ve hepsinde yanıt alındı (%100). Üç olguda ise Anti-D tedavisi verildi ve yalnızca 1'inde tedaviye yanıt alındı (%100). MM genotipine sahip bireylerinde İVİG tedavisine daha iyi yanıt verdiği söylenebilir.

İdiyopatik trombositopenik purpurada kronikleşme oranı %15-20 olarak bildirilmiştir (3,25). Bizim çalışmamızda ise bu oran %22.7 olarak bulundu.

Kronik İTP grubundaki 15 olgunun 6'sı (%40) LL genotipine, 7'si (%46.7) LM genotipine, 2'si (%13.3) MM genotipine sahipti. Bu gruptaki 15 olgunun ilk tanısında aldığı tedaviye 3'ünde (%20) yanıt alındı. Yanıt alınan bu 3 olgu LL genotipine sahipti. Tedavi olarak hepsi İVİG aldı.

Hastaların 7'sinde (%46.7) tedaviye yanıt alınamadı. Yanıt alınamayan olguların 5'i LM, 2'si MM genotipine sahipti. Tedavi olarak LM genotipi gösteren 1 hasta YDMP alıp, 2. tedavi olarak verilen İVİG tedavisine de yanıt alınamadı. Ancak bu hastada vincristin tedavisine yanıt alındı. Bir hastaya Anti-D tedavisi başlandı.

Bu hastada ancak vincristine yanıt alındı. Hastalardan 2'si SDMP tedavisi aldı. Bu hastalarda da diğer tedavilere yanıt alınamadı. Sonuçta splenektomi yapıldı. LM genotipine sahip kronik İTP'li hastaların steroid ve İVİG tedavisine yanıt vermediği, vincristine daha iyi yanıt alındığı söylenebilir. MM genotipi gösteren hastalardan biri İVİG, diğeri YDMP tedavisi aldı.

Hastaların 5'i (%33.3) tedaviye kısmi yanıt verdi. Bu hastalarında 3'ü LL, 2'si LM genotipine sahipti. Bunlarda da tedavi olarak YDMP (2 olguya), SDMP (2 olguya), İVİG (1 olguya) tedavisi başlandı. Bunların içinde LL genotipine sahip 1 hastaya splenektomi yapıldı. Splenektomi yapılan olguların 2'si LM, 1'i LL genotipine sahipti. Bu bilgilerin ışığı altında L alleli bulundurmanın kronikleşmeye eğilim yaratacağı, ancak tedaviye yanıtın iyi olduğu, M alleli bulundurmanın ise tedavide kişiyi daha direçli kıldığı söylenebilir.

Sonuç; akut İTP, kronik İTP ve kontrol grubunda paraoksonaz-1 L/M 55 gen polimorfizmi açısından farklılık vardır. Genel olarak tüm gruplarda en yüksek oranda bulunan LM genotipidir. MM genotipine sahip bireyler hastalığa daha duyarlıdır, LL genotipine sahip bireyler ise kronikleşme eğilimi göstermektedir. LM genotipine sahip bireyler Anti-D tedavisine daha direçlidir. LL ve LM genotipine sahip olanların başlangıç tedavisinde İVİG veya YDMP tercih edilmesi, MM genotipine sahip bireylere ise İVİG tedavisi verilmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Ayrıca İTP'li olgularda PON 192 Q/R ve 55 L/M polimorfizminin PON aktivitesiyle birlikte değerlendirilmesi daha olumlu sonuçlar verecektir.

5. KAYNAKLAR

1. Beardsley DS, Nathan DG. Platelet abnormalities in infancy and childhood. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood, 5th Edition. Nathan DG, Orkin SH 1998; 1590-1600.
2. Yetman RJ. Evaluation and manamegent of childhood idiopatic (immune) thrombocytopenia. J Pediatr Health Care 2003; 17:261-263.
3. Lanzkowsky P. Disorders of platelets. Manual of Pediatric Hematology and Oncology, 4th Edition. Elsevier Inc, 2005; 250-263.
4. Dilber C. İdiopatik trombositopenik purpura. Türkiye Klinikleri Pediatrik Bilimler Pediatrik Hematoloji Özel sayısı 2005; 1:48-51.
5. Taub JW, Warriar 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.
6. Blanchette V, Carcao M. Approach to the investigation and management of immune thrombocytopenic purpura in children. Semin Hematol 2000; 37:299-314.
7. Farrington P, Pugh S, Colville A, Flower A, Nash J, Morgan-Capner P, et al. A new method for acute surveillence of adverse events from diphteria/tetanus/pertussis and measles/mumps. Lancet 1995; 345:567-569.
8. 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.
9. 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.
10. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. Endocr Rev 2004; 4:612-628.
11. Akkus İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Yayınları 1995; 3-95.
12. Varol Fİ. İdiyopatik Trombositopenik Purpura Tanılı Çocuklarda Oksidatif Stres ve Antioksidan Durum. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü, 2007.

13. 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.
14. Li WF, Costa LG, Furlong CE. Serum paraoxonase status: a major factor in determining resistance to organophosphates. *J of Toxicol Environ Health* 1993; 40:337-346.
15. Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim* 1998; 11:342-346.
16. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, et al. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions. *Circulation* 2000; 101:2510-2517.
17. Hong-Liang L, De-Pei L, Chihj-Chuan L. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress and diseases. *J Mol Med* 2003; 81:766-779.
18. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:473-480.
19. Heijmans BT, Westendorp RGJ, Lagaay AM, Knook DL, Kluit C, Slagboom PE. Common paraoxonase gene variants, mortality risk and fatal cardiovascular events in elderly subjects. *Atherosclerosis* 2000; 149:91-97.
20. Adkins S, Gan KN, Mody M, LaDu BN. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 192, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 1993; 52:598-608.
21. Sorenson RC, Primo-Parmo SL, Kuo CL, Adkins S, Lockridge O, La Du BN. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92:7187-7191.
22. Aviram M, Rosenblat M, Bisgair CL. Paraoxonase inhibits high density lipoprotein (HDL) oxidation and preserves its functions: a possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; 101:1581-1590.
23. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 1993; 104:129-135.
24. Watson AD, Navab SY, Hama A. Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 95:774-782.

25. Acquired Platelet Defects. Nathan and Oski (eds) Haematology of Infancy and Childhood, 6th Edition. Saunders Company, Philadelphia, 2003; 1597-1609.
26. Bizzaro N. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: a clinical and epidemiological study of 112 cases with 10-year follow up. *Am J Hematol* 1995; 50:103.
27. Platelet Disorders of Infancy and Childhood. Nathan and Oski(eds) Haematology of Infancy and Childhood 1993; 1567-1580.
28. Freedman J. ITP: An overview of the conference and future directions with an abbreviated ITP history. *J Pediatr Hematol/Oncol* 2003; 25:77-84.
29. 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.
30. Lowe EJ, Buchanan GR. Idiopathic thrombocytopenic purpura diagnosed during the second decade of life. *J Pediatr* 2002; 141:253-258.
31. Lanzkowsky P (editor). Disorders of platelets. Manual of Pediatric Hematology and Oncology. 3rd Edition, California; Academic Press, 2000; 233-250.
32. Abdul Rehman. Acute immune thrombocytopenic purpura in children. *Turk J Hematol* 2007; 24:41-51.
33. Kuhne T, Buchanan GR, Zimmerman S, Michaels LA, Kohan R, Berchtold W, et al. 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.
34. 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.
35. Burdach SEG, Guersen RG. Mechanisms of intravenous immunoglobulin treatment in childhood acute idiopathic thrombocytopenic purpura. *Pediatr Res* 1985; 19:259.
36. Bussel JB, Cines D. Immune thrombocytopenic purpura, neonatal alloimmune thrombocytopenia and posttransfusion purpura. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al (eds): Hematology: Basic Principles and Practice. New York, NY, Churchill Livingstone 1999; 2096-2114.

37. Bussel JB. Fc reseptor blockade and immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 2000; 37:261-266.
38. McMillan R. Autoantibodies and autoantigens in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 2000; 37:239-248.
39. Berchtold P, McMillan R, Tani P, Sommerville-Nielsen S, Blanchette VS. Autoantibodies against platelet membran glycoproteins in children with acute and chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 1989; 74:1600.
40. Di Paola J, Buchanan G. Immune thrombocytopenic purpura. *Pediatr Clin N Am* 2002; 49:911-928.
41. Aziza T, Corina E. Treatment of immune thrombocytopenic purpura in children. *Pediatr Drugs* 2005; 7:325-336.
42. Gianani R, Sarvetnick N. Viruses, cytokines, antigens and autoimmunity. *Natl Acad Sci* 1996; 93:2257-2259.
43. Zhou B, Zhao H, Yang R, Han ZC. Multi-dysfunctional pathophysiology in ITP. *Critical Rev in Oncol/Hematol* 2005; 54:107-116.
44. 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.
45. Dame C. Thrombopoietin in thrombocytopenias of childhood. *Semin Thromb Hemost* 2001; 27:215-225.
46. Laster AJ, Conley CL, Kickler TS, Dorsch CA, Bias WB. Chronic immune thrombocytopenic purpura in monozygotic twins: genetic factors predisposing to immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1982; 307:1495-1498.
47. Karpatkin S, Fotino M, Winchester R. Hereditary autoimmune thrombocytopenic purpura: an immunologic and genetic study. *Ann Med* 1981; 94:781-782.
48. Nomura S, Matsuzaki T, Ozaki Y, Yamaoka M, Yoshimura, C, Katsura K, et al. Clinical significance of HLA-DRB*0410 in Japanase patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1998; 91:3616-3622.
49. Atabay B. Immune (idiopathic) thrombocytopenic purpura: pathophysiology, diagnosis and treatment. *SSK Tepecik Hastanesi Dergisi* 2003; 13:63-74.

50. Kim TT, Inova M, Shimomura T, Fujimura K. Involment of Fc receptor polymorphism in the therapotic response of idiopathic thrombocytopenic purpura. *B J Haematol* 1984; 56:287.
51. Fujimoto BS, Song KS. Genetic polymorphism of human platelet spesific antigen spesific (HPA) in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost Suppl* 1997; 1037.
52. Neyzi O, Ertuğrul T. *Pediatri*, 3.Baskı 2002: 2:1078-1082.
53. Buchanan GR, Adix L. Outcome measures and treatment endpoints other than platelet count in childhood ITP. *Semin Thromb Hemost* 2001; 27:277-285.
54. Crosby WH. Wet purpura, dry purpura. *JAMA* 1975; 232:744-745.
55. 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.
56. Sutor AH, Harms A, Kaufmehl K. Acute immune thrombocytopenia (ITP) in childhood: retrospective and prospective survey in Germany. *Semin Thromb Hemost* 2001; 27:253-267.
57. Bolton-Maggs PHB, Moon I. Assesment of UK practice for management of acute childhood idiopathic thrombocytopenic purpura against published guidelines. *Lancet* 1997; 350:620-623.
58. Saxon BR, Blanchette VS. Reticulated platelet counts in the diagnosis of acute immune thrombocytopenicpurpura. *J Pediatr Hematol/Oncol* 1998; 20:44-48.
59. 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.
60. Buchanan GR. ITP: how much treatment is enough? *Contemporary Pediatric* 2000; 4:112.
61. Chong BH, Keng TB. Advancesinthe diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 2000; 37:249-260.
62. Brighton TA, Evans S, Castaldi PA, Chesterman CN, Chong BH. Prospective evaluation of clinical usefulnessof an antigen-specific assay (MAIPA) in idiopathic

- thrombocytopenic purpura and other immune thrombocytopenias. *Blood* 1996; 88:194-201.
63. Chu YW, Korb J, Sakamoto KM. idiopathic thrombocytopenic purpura. *Pediatr Rev* 2000; 21:95-103.
64. Beardsley DS. Platelet autoantigens: identification and characterization using immunoblotting. *Blood* 1989; 59:47-51.
65. Panepinto JA, Brousse DC. Acute Idiopathic Thrombocytopenic Purpura of Childhood- Diagnosis and Therapy. *Pediatric Emergency Care* 2005; 21:691-695.
66. Akarsu S, Kılıç M, Taşkın E, Kurt A, Yılmaz E, Aygün AD. Akut immün trombositopenik purpura tedavisinde farklı dozlarda steroid ile intravenöz immünoglobülin tedavilerinin etkinlik ve fiyatlarının karşılaştırılması. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2005; 48:209-214.
67. Levy JB, Pusey CD. Nephrotoxicity of iv immunoglobulin. *QJM* 2000; 93:751-755.
68. Tsiouris J, Tsiouris N. Hemiplegia as a complication of treatment of childhood immune thrombocytopenic purpura with intravenously administered immunoglobulin. *J Pediatr* 1998; 424:65-70.
69. Scribner CL, Kapit RM, Phillips ET, Rickles NM. Aseptic meningitis and intravenous immunoglobulin therapy. *Ann Int Med* 1994; 121:305-361.
70. Freiberg A, Mauger D. Efficacy, safety, and dose response of intravenous anti-D immune globulin (WinRho SDF) for the treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura in children. *Semin Hematol* 1998; 35:23-27.
71. Aslan D, Yetgin S. İmmün Trombositopeni. *Katkı Pediatri Dergisi* 2002; 23:343-357.
72. Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A. *The History and Geography of Human Genes*, Princeton University Press 1994; 11-125.
73. Oraler GI. *Temel Genetik*. 8. Basım, İ.Ü. Fen Fakültesi, İstanbul, 1990: 215:51-249.
74. Passarge E. *Renkli Genetik Atlası*, Yüce Yayıncılık ve Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2000: 2-77.
75. Brookes AJ. The esence of SNPs. *Gene* 1999; 234:177-186.
76. Akin H. *Tıbbi Genetik Terimleri Sözlüğü*. Sendrom III, 2003: 1:17.

77. Liang Li H, Liu DP, Liang CC. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J Mol Med* 2003; 81:766-779.
78. Walker CH, Mackness MI. Esterases: problems of identification and classification. *Biochem Pharmacol* 1983; 32:3265-3269.
79. La Du BN, Adkins S, Kuo CL, Lipsig D. Studies on human serum paraoxonase/arylesterase. *Chem Biol Interact* 1993; 87:25-34.
80. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7:69-76.
81. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON-1) activity. *Biochem Pharmacol* 2005; 69:541-550.
82. Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug Metab Dispos* 1991; 19:100-106.
83. Furlong CE, Costa LG, Hassett C, Richter RJ, Adler DA, Disteché CM, et al. Human and rabbit paraoxonases: purification, cloning, sequencing, mapping and role of polymorphism in organophosphate detoxification. *Chem Biol Interact* 1993; 87:35-48.
84. Lourdes R, Bharti M, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J* 2001; 354:1-7.
85. Balcı EÖ, Donma O, Ekmekçi H. Paraoksonaz. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2004; 35:78-82.
86. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2005; 38:153-163.
87. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, et al. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2001; 276:44444-44449.
88. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, et al. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:542-547.

89. Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993; 3:73-76.
90. Furlong CE, Cole TB, Jarvic GP, Costa LG. Pharmacogenetics considerations of the paraoxonase polymorphisms. *Pharmacogenomics* 2002; 3:341-348.
91. Baltter Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanche H, Passa P, Froguel P, et al. Paraoxonase polymorphism Met-Leu 54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased cardiovascular risk in diabetes. *J Clin Invest* 1997; 99:62-66.
92. Leviev I, Deakin S, James RW. Decreased stability of the M54 isoform of paraoxonase as a contributory factor to variations in human serum paraoxonase concentrations. *J Lipid Res* 2001; 42:528-535.
93. Furlong CE, Richter RJ, Seidel SL, Costa LG, Motulsky AG. Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase. *Anal Biochem* 1989; 180:242-247.
94. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33:498-507.
95. Khersonsky O, Tawfik DS. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON-1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry* 2005; 44:6371-6382.
96. La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Parmo S, Sorenson RC, et al. On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact* 1999; 119:379-388.
97. Bayrak T, Bayrak A, Demirpençe E, Kılınç A. Yeni bir kardiyoasküler belirteç adayı: paraoksonaz. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2005; 36:147-151.
98. Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2004; 369:78-88.
99. Khersonsky O, Tawfik DS. The histidine 115-histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases. *J Biol Chem* 2006; 281:7649-7656.
100. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Fault KF, Fogelman AM, et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 96:2882-2891.

101. Bergmeier C, Siekmeier R, Gross W. Distribution spectrum of paraoxonase activity in HDL fractions. *Clin Chem* 2004; 50:2309-2315.
102. Castellani LW, Navab M, Van Lenten BJ, Hedrick CC, Hama SY, Goto AM, et al. Overexpression of apolipoprotein AII in transgenic mice converts high density lipoproteins to proinflammatory particles. *J Clin Invest* 1997; 100:464-474.
103. Rosenblat M, Gaidukov L, Khersonsky O, Vaya J, Oren R, Tawfik DS, et al. The catalytic histidine dyad of high density lipoprotein-associated serum paraoxonase-1 (PON1) is essential for PON1-mediated inhibition of low density lipoprotein oxidation and stimulation of macrophage cholesterol efflux. *J Biol Chem* 2006; 281:7657-7665.
104. 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.
105. Imbach P, Berchtold W, Mueller-Eckhardt C, Rossi E, Wagner HP, Gaedicke G. Intravenous immunoglobulin versus oral corticosteroids in acute immune thrombocytopenic purpura in childhood. *Lancet* 1985; 31:464-468.
106. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-350.
107. Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism *Nat Gen* 1993; 3:73-76.
108. Heyns AP, Lotter MG, Badenhorst PN, Felicity de K, Pieters H, Herbst C, et al. Kinetics and sites of destruction of 111-indium-oxine-labeled platelets in idiopathic thrombocytopenic purpura: a quantitative study. *Am J Hematol* 1982; 12:167-177.
109. Schmidt KG, Rasmussen JW. Kinetics and distribution in vivo of 111-In-labeled autologous platelets in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Scand J Haematol* 1985; 34:47-56.
110. Ballem PJ, Segal GM, Stratton JR, Gernsheimer T, Adamson JW, Slinchster S. Mechanisms of thrombocytopenia in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. Evidence for both impaired platelet production and increased platelet clearance. *J Clin Invest* 1987; 80:33-40.

111. Koerner TAW, Weinfeld HM, Bullard LSB, Williams LCJ. Antibodies against platelet glycosphingolipids: detection in serum by quantitative HPTLC-autoradiography and association with autoimmune and alloimmune processes. *Blood* 1989; 74:274-284.
112. James R, Leviev I, Ruiz J, Passa P, Fuegel P, Gavin MCB. Promoter polymorphism T (107) C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000; 29:390-439.
113. Clarimon J, Eerola J, Hellstrom O, Tienari PJ, Singleton A. Paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and Parkinson's disease in a Finnish population. *Neurosci Lett* 2004; 367:168-170.
114. Delgado AJ, Ames PR, Donohue S, Stanyer L, Nourooz- Zadeh J, Ravirajan C, et al. Antibodies to highdensity lipoprotein and beta2-glycoprotein I are inversely correlated with paraoxonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome, *Arthritis Rheum* 2003; 48:284-296.
115. Altindag O, Karakoc M, Kocyigit A, Celik H, Soran N. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 2007; 40:167-171.
116. Ozturk SH, Cimen BY, Cimen BO, Kaçmaz M, Durak I. Oxidant/antioxidant status of plasma samples from patients with rheumatoids arthritis. *Rheumatol Int* 1999; 19:35-37.
117. Kuhne T, Imbach P, Bolton-Maggs P, Berchtold W, Blanchette V, Buchanan G. Newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood: an observational study. *Lancet* 2001; 358:2122-2125.
118. Imbach P. Immune thrombocytopenic purpura. In: Lilleyman J, Hann I, Blanchette V, eds. *Pediatric Hematology*, second ed. London: Churchill Livingstone Harcourt Publishers Ltd 1999; 437-453.
119. Blanchette V, Carcao M. Approach to the investigation and management of immune thrombocytopenic purpura in children. *Semin Hematol* 2000; 37:299-314.
120. George JN, Raskolo GE. idiopathic thrombocytopenic purpura: Aconcise summary of pathophysiology and diagnosis in children and adults. *Semin Hematol* 1998; 35:5-8.
121. Cines DB, Blanchette VS, Chir B. Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 2002; 346:995-1008.
122. Dow RB. The clinical and laboratory utility of platelet volume parameters. *Australian Jnl Med Sci* 1994; 15:12-15.

123. Tomita E, Akatsuka J, Kokubun Y. Differential diagnosis of various thrombocytopenias in childhood by analysis of platelet volume. *Pediatr Res* 1980; 14:133-137.
124. Bessman JD, Gilmer PR, Gardner FH. Use of mean platelet volume improves detection of platelet disorders. *Blood Cells* 1985; 11:127-135.
125. 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.
126. Collier BS. Biochemical and electrostatic considerations in primary platelet aggregation. *Ann NY Acad Sci* 1984; 416:693-708.
127. Ohyashiki T, Kobayashi M, Matsui K. Oxygen radical mediated lipid peroxidation and inhibition of ADP induced platelet aggregation. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288:282-286.
128. Worner P, Patscheke H, Paschen W. Response of platelets exposed to potassium tetraperoxochromate, an extracellular source of singlet oxygen hydroxy radicals, superoxide anions and hydrogen peroxide. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1979; 360:559-570.
129. Erel O, Vural H, Aksoy N, Aslan G, Ulukanligil M. Oxidative stress of platelets and thrombocytopenia in patients with vivax malaria. *Clin Biochem* 2001; 34:341-344.
130. Lee MK, Bok SH, Jeong TS, Moon SS, Lee SE, Park TB, et al. Supplementation of Naringenin and its synthetic derivative alters antioxidant enzyme activities of erythrocyte and liver in high Cholesterol fed rats. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2002; 10:2239-2244.
131. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1617-1624.
132. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Megeed R, et al. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11:412-419.
133. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997; 272:20963-20966.

134. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med* 2004; 37:1304-1316.
135. Rozenberg O, Shih DM, Aviram M. Human serum paraoxonase 1 decreases macrophage cholesterol biosynthesis: possible role for its phospholipase-A2-like activity and lysophosphatidylcholine formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:461-467.
136. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon. *Br J Pharmac* 1997; 112:265-268.
137. James R, Leviev I, Ruiz J, Passa P, Fuegel P, Gavin MCB. Promoter polymorphism T (107) C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000; 29:390-439.
138. Clarimon J, Eerola J, Hellstrom O, Tienari PJ, Singleton A. Paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and Parkinson's disease in a Finnish population. *Neurosci Lett* 2004; 367:168-170.
139. Delgado AJ, Ames PR, Donohue S, et al. Antibodies to highdensity lipoprotein and beta2-glycoprotein I are inversely correlated with paraoxonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome, *Arthritis Rheum* 2003; 48:284-296.
140. Kovacs TJ, Harris S, Vas TK, Seres I, Short CD, Wittmann IK, et al. Paraoxonase gene polymorphism and serum activity in progressive IgA nephropathy. *J Nephrol* 2006; 19:732-738.
141. Ağaçhan B, Yılmaz H, Ergen HA, Karaalı ZE, Isbir T. Paraoxonase (PON1) 55 and 192 Polymorphism and Its Effects to Oxidant-Antioxidant System in Turkish Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Physiol Res* 2005; 54:287-293.
142. Mackness B, Gershan KD, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, et al. Paraoxonase Status in Coronary Heart Disease, *Artheroscler. Thromb Vasc Biol* 2001; 1451-1457.
143. Malin R, Järvinen O, Sisto T, Koivula T, Lehtimäki T. Paraoxonase producing PON1 gene M/L 55 polymorphism is related to autopsy-verified artery-wall atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2001; 157:301-307.

144. Fortunato G, Rubba P, Panico S, Trono D, Tinto N, Mazzaccara C, et al. Paraoxonase gene polymorphism, PON 1 55, as an independent risk factor for increased carotid intima-media thickness in middle-aged women. *Atherosclerosis* 2003; 167:141-148.
145. Bıyıklı NK, Alpay H, Yıldız N, Agachan B, Ergen A, Zeybek U, et al. Paraoxonase 1 192 and 55 polymorphisms in nephrotic children. *Pediatr Nephrol* 2006; 2:649-654.
146. Işık A, Koca SS, Üstündağ B, Çelik H, Yıldırım A. Paraoxonase and arylesterase levels in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2007; 26:342-348.
147. Selek S, Aslan M, Horoz M, Gur M, Erel O. Oxidative status and serum PON-1 activity in beta-thalassemia minor. *Clin Biochem* 2007; 40:287-291.
148. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Wincour PH, Arrol S, Ishola M, et al. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1991; 86:193-199.
149. Mackness MI, Durrington PN. Paraoxonase: another factor in NIDDM cardiovascular disease. *Lancet* 1995; 346:856.
150. Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Kamboh MI. Genetic Polymorphism of Paraoxonase and the Risk of Coronary Heart Disease. *Arterioscler Thromb and Vasc Biol* 1997; 17:1067-1073.
151. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *Febs Lett* 1998; 423:57-60.
152. Heijmans BT, Westendorp RG, Lagaay AM, Knook DL, Kluft C, Slagboom PE. Common paraoxonase gene variants, mortality risk and fatal cardiovascular events in elderly subjects. *Atherosclerosis* 2000; 149:91-97.
153. Cascorbi I, Laule M, Mrozikiewitz PM, Mrozikiewicz A, Andel C, Baumann G, et al. Mutations in the human paraoxonase 1 gene: frequencies, allelic linkages, and association with coronary artery disease. *Pharmacogenetics* 1999; 9:755-761.
154. Phuntuwate W, Suthisisang C, Koanantakul B, Mackness MI, Mackness B. Paraoxonase 1 status in the Thai population. *J Hum Genet* 2005; 50:293-300.
155. Sepahvand F, Parvaneh RM, Shafiei M, Ghaffari SM, Shirazi MR, Mahmoudian M. Frequency of Paraoxonase 192/55 Polymorphism in an Iranian Population *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*. 2007; 70: 1125-1129.

156. Garin MCB, James RW, Dussoix P, Blanche H, Passa P, Froguel P, et al. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. *J Clin Invest.* 1997; 99:62-66.
157. Aynacıoğlu AS, Cascorbı I, Mrozıkiewicz PM, Nacak M, Tapanyığıt EE, Roots I. Paraoxonase 1 mutations in a Turkish population. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 157:174-177.
158. 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.
159. Demircioğlu F, Ören H, Kızıldağ S, Yılmaz S, Atabay B, Türker M, et al. İdiopatik Trombositopenik Purpuralı Çocuklarda İnterferon Gamma +874A/T Gen Polimorfizmi Sıklığı ve Klinikle İlişkisinin Araştırılması. XXIV.Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özetleri Kitabı, 2008: 62-63.
160. Blanchette VS, Luke B, Andrew M, Sommerville-Nielsen S, Barnard D, de Veber B, et al. A prospectiv e 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.
161. Moussalem M, Yasinse N. Immune thrombocytopenic purpura in childhood: a Lebanese perspective. *Molec Immunol* 2003; 39:1105-1107.
162. George JN, Woolf SH, Raskob GE. Immune thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* 1996; 88:3-40.
163. Lilleyman JS. Intracranial haemorrhage in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Arch Dis Child* 1994; 71:251-253.
164. 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 Paraoksonaz-1 (PON-1) L/M 55 gen polimorfizmi varlığı araştırılacaktır. Polimorfizm bir gen veya DNA dizisinin(genetik kodlamaların) alternatif formlarından(allel) birinin toplumda %1'den fazla bulunduğu durumdur. 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 PON-1 L/M 55 gen polimorfizmidir.

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 de beyin kanamasından, çalışma gücü kaybı gibi oluşabilecek etkilerden çocuğunuz korunmuş olacaktır.

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

Çocuğunuza idiopatik 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. Oya Çakıcı tarafından F.Ü. Fırat Tıp Merkezi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Çocuk 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 yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi 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 sorununun 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. Oya Çakıcı’yı, 23335555-2311 ve F.Ü Tıp Fakültesi Çocuk 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 bakıma ve hekim ile olan ilişkiye 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 gönüllülük 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

1970 yılında Amasya'nın Merzifon ilçesinde doğdum. İlkokulu Merzifon, ortaokulu Samsun'nun Havza ilçesinde, lise eğitimimi Ankara Yenimahalle Kız Meslek Lisesi'nde tamamladıktan sonra 1988 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tıp eğitimime başladım, 1994'te mezun oldum. Mecburi hizmetimi Gümüşhane'de tamamladıktan sonra Samsun Havza Ilıca sağlık ocağı, İskenderun 3 nolu sağlık ocağı, Batman Sason Merkez sağlık ocağı, Denizli Kale sağlık ocağında görev yaptım. Fırat Üniversitesi Fırat Tıp Merkezi'nde Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ihtisasına 2002 yılında başladım. Evli ve iki çocuk annesiyim.