

**T.C**  
**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**  
**ÇOCUK HEMATOLOJİ BİLİM DALI**

**İDİOPATİK TROMBOSİTOPENİK PURPURALI ÇOCUKLARDA**  
**İNTERFERON-GAMMA GEN POLİMORFİZMİ SIKLIĞI VE**  
**KLİNİKLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Yan Dal Uzmanlık Tezi**  
**Uzm. Dr. Fatih DEMİRCİOĞLU**

**Tez yöneticisi**  
**Prof. Dr. Hale ÖREN**

**İzmir,2008**

**T.C**  
**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**  
**ÇOCUK HEMATOLOJİ BİLİM DALI**

**İDİOPATİK TROMBOSİTOPENİK PURPURALI ÇOCUKLARDA**  
**İNTERFERON-GAMMA GEN POLİMORFİZMİ SIKLIĞI VE**  
**KLİNİKLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Yan Dal Uzmanlık Tezi**  
**Uzm. Dr. Fatih DEMİRCİOĞLU**

**Tez yöneticisi**  
**Prof. Dr. Hale ÖREN**

**İzmir,2008**

| <b>İÇİNDEKİLER</b>  | <b>Sayfa</b> |
|---|--------------|
| İçindekiler.....  | I            |
| Tablolar.....   | III          |
| Şekiller.....   | IV           |
| Resimler.....   | V            |
| Kısaltmalar.....  | VI           |
| 1. ÖZET.....  | 1            |
| 2. SUMMARY.....   | 3            |
| 3. GİRİŞ ve AMAÇ.....   | 5            |
| 4. GENEL BİLGİLER.....  | 7            |
| 4.1. İDİOPATİK TROMBOSİTOPENİK PURPURA.....                               | 7            |
| 4.1.1. Giriş ve tanım.....  | 7            |
| 4.1.2. Epidemiyoloji.....   | 7            |
| 4.1.3. Patofizyoloji.....   | 7            |
| 4.1.3.1. Antitrombositer antikolar ve platelet yıkımı.....                | 8            |
| 4.1.3.2. İTP’de Sitokinler ve T hücrelerinin fonksiyonu.....              | 10           |
| 4.1.4. İTP’de klinik bulgular ve tanı.....                                | 12           |
| 4.1.5. İTP’de tedavi.....   | 15           |
| 4.1.6. İTP’de genetik çalışmalar.....                                     | 20           |
| 4.2. SİTOKİNLER ve OTOİMMÜNİTE.....                                       | 21           |
| 4.2.1. İnterferon-Gamma.....  | 24           |
| 4.2.1.1. Fonksiyonları.....   | 24           |
| 4.2.1.2. Genetik.....   | 25           |
| 5. HASTALAR VE YÖNTEM.....  | 28           |
| 5.1. Çalışma Grupları.....  | 28           |
| 5.2. Yöntem.....  | 29           |
| 5.2.1. DNA izolasyonu.....  | 29           |
| 5.2.2. Kullanılan gereçler, kimyasal maddeler ve solusyonlar.....         | 30           |
| 5.2.2.1. Gereçler.....  | 30           |
| 5.2.2.2. Kimyasal maddeler.....   | 31           |
| 5.2.3. İnterferon gamma 874 (Aà T) polimorfizminin değerlendirilmesi..... | 31           |
| 5.3. İstatistiksel değerlendirme.....                                     | 31           |

|  | <b>Sayfa</b> |
|--|--------------|
| 6. SONUÇLAR.....   | 33           |
| 6.1. Akut ve kronik İTP'li hasta gruplarının özellikleri.....  | 33           |
| 6.2. Hasta ve kontrol gruplarının intreferon-gamma gen<br>polimorfizminin değerlendirilmesi.....   | 34           |
| 6.3. İntreferon-gamma 874 (A $\rightarrow$ T) gen polimorfizmi ile kanama<br>semptomlarının şiddeti ve konik İTP'de tedavi<br>cevabının değerlendirilmesi..... | 37           |
| 7. TARTIŞMA.....   | 38           |
| 8. SONUÇLAR.....   | 43           |
| 9. KAYNAKLAR.....  | 45           |

| <b>TABLolar</b>  | <b>Sayfa</b> |
|--|--------------|
| <b>Tablo I</b> : İTP'de sitokin profili.....   | 11           |
| <b>Tablo II</b> : Akut ve kronik İTP'de genel özellikler.....  | 13           |
| <b>Tablo III</b> : İTP'de ayırıcı tanı.....  | 14           |
| <b>Tablo IV</b> : Hematopoyetik sitokinler.....  | 21           |
| <b>Tablo V</b> : Akut ve kronik İTP'li hastaların demografik ve laboratuvar özellikleri.....   | 33           |
| <b>Tablo VI</b> : İTP'li hastalar ile kontrol grubunda IFN- $\gamma$ 874 (A $\rightarrow$ T) polimorfizmi genotip ve allel sıklığı.....          | 36           |
| <b>Tablo VII</b> : Akut İT kronik İTP ve kontrol grubu arasında IFN- $\gamma$ 874 (A $\rightarrow$ T) polimorfizmi genotip ve allel sıklığı..... | 37           |
| <b>Tablo VIII</b> : Kronik İTP'de IFN- $\gamma$ 874(A $\rightarrow$ T) polimorfizmi ile tedavi yanıtlarının değerlendirilmesi.....               | 38           |

| <b>ŞEKİLLER</b>  | <b>Sayfa</b> |
|--|--------------|
| <b>Şekil 1:</b> İTP patogenezinde epitop yayılımı.....   | 9            |
| <b>Şekil 2:</b> İTP’de patogenetik mekanizmaların şematik görünümü.....  | 12           |
| <b>Şekil 3:</b> İTP’de tedavinin etki mekanizmalarının şematik görünümü.....   | 16           |
| <b>Şekil 4:</b> Otoimmünite gelişiminde patogenetik mekanizmaların şematik görünümü...   | 23           |
| <b>Şekil 5:</b> İnterferon-gammanın fonksiyonlarının şematik görünümü.....   | 25           |
| <b>Şekil 6:</b> IFN- $\gamma$ geninin 874. pozisyonunda bulunan olası genotipin melting curve analysis ile şematik olarak görünümü. .... | 36           |
| <b>Şekil 7:</b> Hastalarımıza ait erime eğrilerinin şematik görünümü.....  | 35           |

## **RESİMLER**

**Sayfa**

**Resim1:** %1'lik etidyum bromidli agaroz jelde yürütülmüş DNA örnekleri..... 30

## **KISALTMALAR**

**İTP:** İdiopatik trombositopenik purpura

**İVİG:** İntravenöz immünglobulin

**SLE:** Sistemik lupus eritematozis

**JIA:** Juvenil idiyopatik artrit

**PCR:** Polymerase change reaction

**IFN- $\gamma$ :** İnterferon-gamma

**IL-2:** İnterlökin-2

**IL-4:** İnterlökin-4

**IL-5:** İnterlökin-5

**IL-6:** İnterlökin-6

**IL-10:** İnterlökin-10

**IL-13:** İnterlökin-13

**IL-15:** İnterlökin-15

**HLA:** İnsan lökosit antijeni

**TGF  $\beta$ 1:** Transforming growth faktör beta-1

**HPA:** İnsan trombosit antijeni

**TLR7:** Toll-like reseptör 7

**NK:** Natural killer

**MAIPA:** Monoclonal antibody- specific immobilization of platelet antigens

**CD:** Cluster of diferantiation

**ASH:** Amerikan Hematoloji Komitesi

**TNF:** Tümör nekrozis faktör

**LTA:** Lenfotoksin alfa

**GM-CSF:** Granülosit-monosit koloni stimüle edici faktör

**M-CSF:** Monosit koloni stimüle edici faktör

**G-CSF:** Granülosit koloni stimüle edici faktör

**MHC:** Major histocompatibility complex

**DNA:** Deoksiribonükleik asit



## 1. ÖZET

**Amaç:** İdiopatik trombositopenik purpura (İTP), etyolojisi henüz bilinmeyen, sıklıkla iyi seyirli akkiz, otoimmün bir hastalıktır. Genetik zeminde çevresel faktörlerin etkisi ile ortaya çıkabileceği düşünülmektedir. İTP patogenezini aydınlatmaya yönelik birçok genetik çalışma yapılmıştır. Son yıllarda yapılmış bir çalışmada kronik İTP'li hastalarda özellikle interferon-gamma ilişkili genler ile Toll-benzeri reseptör genlerinin ekspresyonunun belirgin olarak arttığı saptanmıştır. Bu da İTP'nin genetik zeminde gelişen bir hastalık olduğu hipotezini desteklemektedir.

İnterferon-gamma immünregülasyonda önemli rol oynayan bir proteindir. Ortamda interferon-gamma yüksek iken öncül T lenfositler  $T_{H1}$  yönünde değişmekte ve otoimmün hastalık gelişimine yatkınlık oluşturmaktadır. Sistemik lupus eritematozis (SLE), romatoid artrit ve kronik İTP gibi otoimmün hastalıklarda  $T_{H1}/T_{H2}$  oranının arttığı bildirilmiştir. Ayrıca interferon-gamma ile ilişkili genlerde olan bazı yapısal değişikliklerin tip 1 diyabet, Hashimoto tiroiditi, Graves' hastalığı, multiple skleroz, romatoid artrit ve SLE gibi otoimmün hastalıkların gelişimine neden olabileceği, interferon-gamma geninin ilk intronundaki +874A/T polimorfizminin hastalık gelişimi ve klinik fenotipi etkileyebileceği rapor edilmiştir.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda interferon-gamma +874A/T polimorfizminin İTP etyolojisindeki rolünü ve hastalığın klinik seyri ve tedavi yanıtındaki etkisini araştırmayı planladık.

**Hastalar ve yöntem:** En az 6 aydır İTP tanısıyla izlenen 35 akut, 40 kronik İTP'li çocuk çalışmaya alındı. Kontrol grubunu 90 sağlıklı çocuk oluşturdu. İTP tanısı öykü, fizik muayene ve laboratuvar bulguları ile konuldu. Diğer trombositopeni yapabilecek durumlar dışlandı. Hasta ve kontrol grubundan 2 ml kan örneği %0.1 EDTA'lı steril tüpe alınarak  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de depolandı. Tüm kan numunelerinin DNA izolasyonu yapıldı. İnterferon-gamma +874A/T polimorfizm sonuçları real-time PCR ve LightCycler<sup>TM</sup> ile elde edildi.

**Bulgular:** Akut İTP'li hastaların yaşları 6 ay-15 yaş (ortanca 7), kronik İTP'li hastaların yaşları 6 ay-18 yaş (ortanca 10,3) idi. Kronik İTP'li hastaların yaş ortalaması anlamlı olarak yüksekti ( $p=0,01$ ). Tanı anında kronik İTP'li hastaların trombosit sayıları akut İTP'li hastalara göre yüksekti, ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla  $17,7\pm 18,29$ ,  $12,51\pm 17,37$ ,  $p=0,2$ ).

Tüm İTP'li hastalar arasında 21 hastada AA (%28), 35 hastada AT (%44,8) ve 19 hastada TT (%27,2) genotipi saptandı. Kontrol grubunda ise 47 hastada AA (%52,2), 36 hastada AT (%40) ve 7 hastada TT (%7,8) genotipi vardı. İTP'li hastalar ve kontrol grubu arasında genotip açısından anlamlı fark olduğu görüldü ( $p=0,001$ ). Allel sıklığı açısından

incelendiğinde İTP'li hastalarda A alleli 78 hastada (%52), T alleli 72 hastada (%48) mevcuttu; kontrol grubunda A alleli 130 hastada (%72,2), T alleli 50 hastada (%27,8) saptandı. Aradaki fark anlamlı idi ( $p<0,0001$ ).

Çalışmaya alınan çocuklar akut İTP, kronik İTP ve kontrol grubu olmak üzere üç gruba ayrıldığında gruplar arasında AA, AT ve TT genotipi açısından anlamlı bir ilişki olduğu gözlemlendi ( $p=0,002$ ). AA, AT, TT polimorfizmi genotip sıklıkları açısından akut İTP grubu ile kontrol grubu ve kronik İTP grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark vardı ( $p=0,002$ ,  $p=0,008$ ). Akut İTP ve kronik İTP hastaları arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,285$ ). Allel sıklığı açısından değerlendirildiğinde akut İTP ile kontrol grubu ve kronik İTP ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunurken, akut İTP ve kronik İTP grupları arasında anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla  $p=0,002$ ,  $p=0,002$ ,  $p=0,896$ ).

Kanama semptomlarının şiddeti (hafif, orta, ağır) ve interferon-gamma polimorfizmi arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ( $p=0,09$ ). Ayrıca kronik İTP'li hastaların uzun dönem tedavi yanıtları ile interferon-gamma +874A/T gen polimorfizmi arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,568$ ).

**Sonuç:** İnterferon-gamma +874A/T polimorfizmi sıklığı akut ve kronik İTP'li olgularda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ve diğer otoimmün hastalıklardaki literatür verileri de göz önüne alındığında +874A/T polimorfizminin bizim olgularımızda akut ve kronik İTP etyopatogenezinde bir risk faktörü olabileceği düşünüldü.

## **2. SUMMARY**

### **THE FREQUENCY OF INTERFERON-GAMMA GENE POLYMORPHISM IN CHILDREN WITH IDIOPATHIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA AND THE INVESTIGATION OF ITS RELATIONSHIP WITH CLINICAL FINDINGS**

Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) is an acquired, autoimmune, and frequently good prognostic disease in which the etiology is still unknown. It is suggested that the disease occurs with the influence of environmental factors under a genetic basis. There are many genetic studies which have been done to clarify the pathogenesis of ITP. A recent study showed that expression of Toll-like receptor and interferon-gamma associated genes is significantly increased in patients with chronic ITP. This study supports the hypothesis that ITP is a disease occurring under a genetic base.

Interferon-gamma is an important protein which takes place in immunoregulation. When the amount of interferon-gamma is high, T<sub>H</sub>0 lymphocytes are converted to T<sub>H</sub>1 cells. This leads a predisposition to the occurrence of autoimmune disorders. The ratio of TH1/TH2 increases in many autoimmune disorders including SLE, RA, and chronic ITP. On the other hand, structural changes in interferon-gamma related genes are also associated with the development of autoimmune disorders, such as type 1 diabetes mellitus, Hashimoto thyroiditis, Graves' disease, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, and SLE. +874A/T polymorphism in the first introne of interferon-gamma gene is associated with the development and clinical phenotype of these autoimmune diseases.

The aim of this study is to investigate whether interferon gamma +874A/T polymorphism is a risk factor for the development of ITP, and whether it affects the clinical course and response to the treatment.

#### **Methods**

Thirty five patients with acute ITP and 40 patients with chronic ITP who were followed for at least 6 months were included. Control group consisted 90 healthy children. The diagnosis of ITP was established with history, physical examination and laboratory findings. Other causes of thrombocytopenia were excluded. Two millilitres of blood sample was taken into sterile tubes containing 0.1% EDTA from each child and all blood samples were stored at -20 until analysis. DNA was isolated from blood samples and interferon gamma +874A/T polymorphism was studied with real-time PCR and LightCycler<sup>TM</sup>.

#### **Results**

The median age of patients with acute and chronic ITP was 7 years and 10.3 years, respectively. The mean age of patients with chronic ITP was significantly higher (p=0.01).

The platelet counts of patients with chronic ITP at the time of diagnosis were higher compared to patients with acute ITP, but this was not statistically significant ( $p=0.2$ ).

Regarding all patients with ITP, 21 patients had AA, 35 patients had AT, and 19 patients had TT genotype. In the control group, 47 children had AA, 36 children had AT, and 7 children had TT genotype. There was a statistical difference between ITP and control group regarding the genotype ( $p=0.001$ ). The frequency of A and T alleles in ITP group was 52% and 48%, respectively. The frequency of A and T alleles in control group was 72.7% and 27.8%, respectively. The frequency of allele distribution was statistically different between the ITP and control groups ( $p<0.0001$ ).

When the children were divided into three groups (acute ITP, chronic ITP and control group), there was a statistical significant difference between the groups regarding the AA, AT, and TT genotypes ( $p=0.002$ ). There was a statistical significant difference between acute ITP and control group regarding the frequency of AA, AT, and TT gene polymorphisms ( $p=0.002$ ). Similarly, there was a statistical significant difference between chronic ITP and control group regarding the frequency of AA, AT, and TT gene polymorphisms ( $p=0.008$ ). There was no statistical difference between acute and chronic ITP groups ( $p=0.285$ ). There was a statistical significant difference between acute ITP and control group regarding allele frequency ( $p=0.002$ ). Similarly, there was a statistical significant difference between chronic ITP and control group regarding allele frequency ( $p=0.002$ ). There was no statistical difference between acute and chronic ITP groups regarding allele frequency ( $p=0.896$ ).

There was no correlation between interferon gamma +874A/T polymorphism and severity of bleeding (mild, moderate and severe) ( $p=0.09$ ). Again, there was no correlation between interferon gamma +874A/T polymorphism and response to lon term treatment in patients with chronic ITP ( $p=0.568$ ).

## **Conclusion**

In conclusion, there was a significant difference between patients with ITP and control group regarding interferon gamma +874A/T polymorphism and in the light of recent data involving other autoimmune disorders, we thought that interferon gamma +874A/T polymorphism may be a risk factor for ITP in our patients.

### 3. GİRİŞ ve AMAÇ

İdiopatik trombositopenik purpura (İTP) düşük trombosit sayısı ve mukokutanöz kanamalar ile karakterize, diğer trombositopeni yapan nedenlerin dışlanması ile tanı konabilen akkiz, otoimmün bir hastalıktır (1,2). İTP süresine göre akut, kronik veya rekürren olarak adlandırılmaktadır. Akut İTP, geçici bir kanama epizodu sonrası altı ay içinde düzelirken, kronik İTP’de bu durum altı aydan uzun sürmektedir. İTP atakları arasındaki süre üç aydan uzun ise rekürren olarak adlandırılmaktadır. Çocukluk çağında vakaların %70-80’i akut seyirli iken geri kalanı kronik seyirlidir (2-6). Yıllık insidansı çocuklarda 100.000’de 2-8, erişkinlerde 100.000’de 5, en sık görülme yaşı çocuklarda 2-6 yaş, erişkinlerde ise 15-40 yaşdır (7-11).

İTP’de trombosit glikoproteinlere (GpIIb/IIIa, G1b/IX, GpIa/IIa, GpV, GpIV) karşı otoantikörler gelişmekte ve antikörlerle kaplı trombositlerin Fc reseptörleri aracılığı ile dalakta yıkılması sonucu trombositopeni gelişmektedir. Bu İTP’nin, özellikle akut İTP’nin, patogenezinde bilinen en önemli mekanizmadır (2,5,6,12). Akut İTP’de, bir enfeksiyon sonrası mikroorganizmaların antijenik yapılarının trombosit antijenleri ile çapraz reaksiyon vermesi sonucu trombositopeni geliştiği düşünülürken, kronik İTP’de immünolojik mekanizmaların (T hücre disfonksiyonu, immün disregülasyon v.b) patogenezinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Yukarıda da bahsedildiği gibi İTP gelişiminde en önemli mekanizma trombosit glikoproteinlerine karşı otoantikör gelişmesidir. Ancak hastaların %30-40’ında antitrombosit antikörleri tespit edilememektedir. Bu durum fizyopatolojide başka mekanizmalar olduğunu düşündürmekte ve muhtemel mekanizmaları aydınlatmak için çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Th1/Th2 oranında artma ve buna bağlı olarak IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10 ve IL-15 gibi sitokinlerin artması, hücre aracılıklı sitotoksikite anormallikleri ve megakaryopoezin baskılanması gibi çok farklı patogenetik mekanizmalar İTP gelişiminde rol aldığı düşünülen diğer immünolojik mekanizmalardır (1,2,12). Ancak İTP’deki immün disfonksiyonun kesin mekanizması henüz bilinmemektedir.

İTP’nin gelişimi sürecinde hala pek çok soru cevap beklemektedir:

1. İTP’yi başlatan ve trombosit yıkımına neden olan defekt nedir?
2. Niçin bazı insanlar tedavi ile hızla düzelirken bazılarında bu süreç devam etmektedir?
3. Farklı hastalarda trombositopeni gelişiminde farklı mekanizmalar mı mevcuttur?
4. Niçin bazı hastalarda ağır klinik bulgular varken bazılarında hastalık asemptomatiktir?

5. SLE, Hashimoto tiroiditi vb gibi diğer otoimmün hastalıklardakine benzer bir patogenezi mi mevcuttur?

Yukarıdaki birçok soruyu açıklayabilmek için immünolojik mekanizmalar yanında farklı etnik gruplarda akut-kronik İTP gelişimini etkileyebilecek genetik faktörler araştırılmaktadır. İnsan lökosit antijen (HLA) gen polimorfizmleri, Fc $\gamma$  reseptör gen polimorfizmleri, transforming growth faktör beta-1 (TGF  $\beta$ 1= megakaryopoiesis inhibitörü) gen polimorfizmleri ve insan trombosit antijen (HPA) polimorfizmleri ile İTP arasındaki ilişki araştırılmaktadır (13-15). Ayrıca son zamanlarda mikroarray yöntemle yapılan genetik bir çalışmada, özellikle interferon ile ilişkili genler ve Toll-benzeri reseptör 7 (TLR7) gen ekspresyonunun İTP'li hastalarda belirgin olarak artmış olduğu görülmüştür. Bu nedenle İTP'nin genetik yatkınlık zemininde gelişen otoimmün bir hastalık olduğu düşünülmektedir (16).

İnterferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), T lenfositler ve natural killer (NK) hücreleri tarafından salgılanan homodimerik yapıda 34 kD ağırlığında bir proteindir. Bu protein, lenfositler, mononükleer fagositler hücreler, endotel ve NK hücrelerinin yüzeyinde bulunan reseptörlerine bağlanarak stimüle edici veya baskılayıcı genlerin aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır. Ayrıca IFN- $\gamma$ , T ve B hücrelerinin diferansiyasyonu, Th<sub>0</sub> CD4<sup>+</sup> T hücrelerin otoimmün hastalıklarda önemli rol oynayan Th<sub>1</sub> fenotipine dönüşmesi, CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin maturasyonu ve B lenfositlerde immünglobulin alt gruplarının değişmesi gibi aşamalarda ve immün cevabın regülasyonunda kritik rol oynamaktadır (17-21). Tip 1 diyabet, Hashimoto tiroiditi, multiple skleroz, sistemik lupus eritematozis ve juvenil idiopatik artrit gibi birçok otoimmün hastalıkta olduğu gibi İTP'de de Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> oranı ve buna paralel olarak IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10 ve IL-15 gibi sitokinlerin salınımının arttığı bilinmektedir. Artmış IFN- $\gamma$  Th<sub>0</sub> CD4<sup>+</sup> T hücrelerin Th<sub>1</sub> fenotipine progresyonu kolaylaştırmakta ve Th<sub>1</sub> hücreleri de IFN- $\gamma$  salınımını artırarak bir kısır döngü oluşturmaktadır. Bu da otoimmün sürecin devamında önemli rol oynamaktadır (22-25).

Bu araştırmada İTP ve diğer otoimmün hastalıkların gelişiminde önemli rol oynayan IFN- $\gamma$  874 A/T gen polimorfizminin çocukluk çağında İTP gelişmesindeki rolü ve hastalığın klinik seyri ve tedaviye yanıtındaki ilişkisinin araştırılması planlanmıştır.

## **4. GENEL BİLGİLER**

### **4.1 İDİOPATİK TROMBOSİTOPENİK PURPURA**

#### **4.1.1 Giriş ve tanım**

İdiopatik trombositopenik purpura (İTP), trombosit glikoproteinlerine karşı antikor gelişimi ve trombositlerin dalakta Fc reseptörleri aracılığı ile yıkımının söz konusu olduğu, kanamaya yatkınlık ile giden otoimmün bir hastalıktır (1,2,26,27). İlk kez 1700'lü yıllarda Werholf tarafından izole trombositopeni ile peteşi ve mukokütanöz kanamaları olan bir hastada tanımlanmış ve "morbus hemorajik makülozis" olarak adlandırılmıştır. Daha sonra ilk tanımlayan kişinin ismine istinaden Werholf sendromu olarak adlandırılmıştır. Günümüzde idiyopatik, immün, otoimmün trombositopenik purpura gibi isimler kullanılmakta olup altta yatan bir neden bulunmadığı takdirde idiyopatik trombositopenik purpura olarak adlandırılmaktadır. İTP altı aydan kısa sürerse akut, uzun sürerse kronik, üç aydan fazla süren aralıklarla ortaya çıkan atak varlığında rekürren olarak adlandırılmaktadır (1,2,12,28).

#### **4.1.2 Epidemiyoloji**

İTP çocukluk çağının en sık görülen akiz kanama diyatezidir. Çocuklar arasında yapılmış Avrupa çalışmaları insidansı 5,8/100,000, prevalans 4,6/100.000'dir. Çocuklarda en sık 2-6 yaş arasında ortaya çıkmakta olup kız ve erkek cinsiyette eşit oranda görülmektedir. Erişkinlerde ise prevalans 7,9/100.000 olup kadınlarda erkeklere oranla yaklaşık iki kat fazla görülmektedir (29-31).

#### **4.1.3 Patofizyoloji**

İTP'de klinik, semptom ve bulguların sebebi retiküloendotelial sistemde özellikle dalakta otoantikor ile kaplı trombosit yıkım hızının artmasıdır. Megakaryositler tarafından trombosit üretim hızı ile duyarlı trombositlerin yıkım hızları arasındaki denge trombosit sayısını belirler. Bu da genellikle hastalığın aktif döneminde yıkım>yapım iken, tedavi-remisyon döneminde yıkım<yapım şeklindedir (5,27). Çocuklarda İTP'nin patogeneğinde, özellikle akut İTP'de, sıklıkla bir enfeksiyon sonrası gelişen uygunsuz immün yanıt suçlanmaktadır. Spesifik olarak trombosit membranında bulunan glikoproteinlere karşı oluşan antikorlar ve oluşan immün kompleksler, nonspesifik olarak trombosit yüzeyine bağlanmakta, opsonizasyona ve dalakta Fc reseptörü aracılığıyla trombositlerin yıkımına sebep olmaktadır (2,5,6,12,32). Bunun yanında T hücre klonunun Th<sub>1</sub> yönünde farklılaşması, T hücre aracılı sitotoksiste, trombosit glikoproteinlerine karşı oluşmuş antikorların megakaryositlerdeki antijenlere bağlanarak dismegakaryopoiezise neden olması gibi birçok patogenetik mekanizma İTP gelişiminde ve kronikleşmesinde önemli rol oynamaktadır (26).

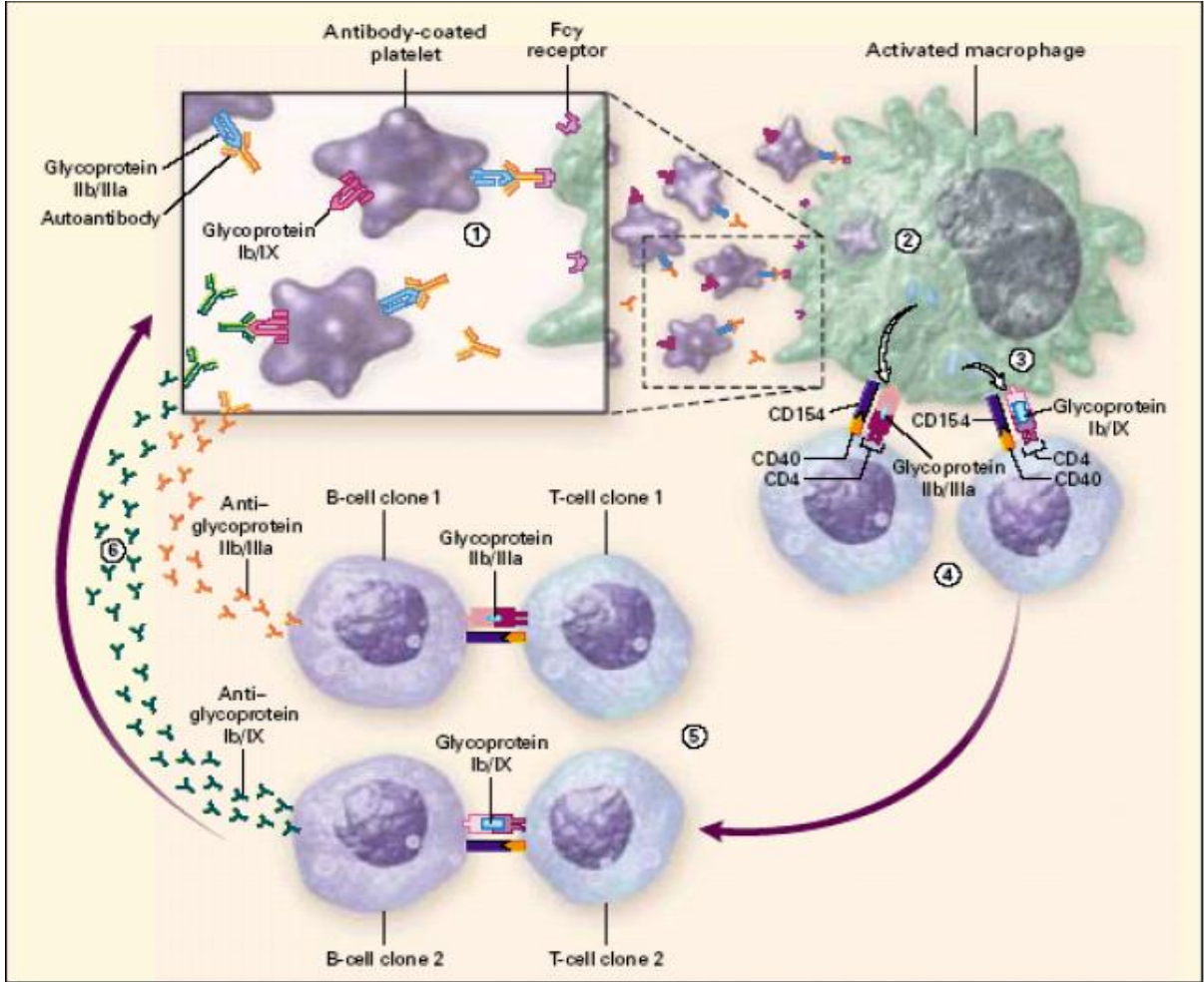
#### 4.1.3.1 Antitrombositler antikorlar ve platelet yıkımı

İTP patogeneğinde ilk olarak antitrombosit antikorlar aracılığı ile trombosit yıkımının olduğu düşünölmüştür ve bu hipotez hala geçerliliğini korumaktadır. İlk kez 1950'li yılların başında Harrington ve arkadaşları İTP'li hastalardan elde ettikleri serumları sağlıklı insanlara verdikleri zaman trombositopeni geliştiğini görmüşler ve İTP'den plazmada bulunan bir faktörün sorumlu olduğunu düşünmüşlerdir (33,34). Daha sonra 1965 yılında Shulman ve arkadaşları sağlıklı kişilere artan dozlarda İTP'li hasta serumu verdiklerinde doza bağımlı olarak trombositopeninin arttığını, splenektomili kişilerde aynı oranda trombositopeni sağlamak için daha yüksek dozda İTP'li hasta serumu verilmesi gerektiğini göstermişlerdir (35). Bu çalışmalar ışığında immünglobulin G (IgG) niteliğinde olan ve trombositlere bağlanan antikorların bu süreçte etkili olduğu ve İTP'li annelerin bebeklerinde meydana gelen geçici trombositopeninin de bu mekanizma ile açıklanabileceği düşünölmüştür. 1975 yılında Dixon ve Rosse isimli araştırmacılar ilk kez trombosit ilişkili IgG'yi tanımladılar. Başlangıçta bu çalışma çok ilginç olarak karşılandı ve yapılan çalışmalarda İTP'li hastaların %85-90'ında yüksek sensitivitede olduğu göröldü, ancak spesifitesi düşüktü (36). Leeuwen ve arkadaşları, platelet immünofloresan test kullanarak 1982'de glikoprotein IIb/IIIa'ya karşı gelişmiş olan spesifik antikorları gösterdi. Bu çalışmada kronik İTP'li hastalardan elde edilen antikorlar, trombositlerinde glikoprotein IIb/IIIa bulunmayan Glanzman trombastenili hastalara verildiğinde trombositopeni gelişmediği göröldü (37). Daha sonraki süreçte glikoprotein Ib/IX, Ia/IIA, IV, V ve diğer trombosit antijenlerine karşı gelişen IgA, IgM ve IgG tipinde otoantikorlar saptanmıştır (38-44). 1987'de hem trombosit üzerindeki hem de plazmadaki serbest otoantikorları belirleyebilen "immünobead assay" ve "monoclonal antibody- specific immobilization of platelet antigens (MAIPA)" adında iki yeni ölçüm yöntemi geliştirilmiştir (45,46). Tüm bu tetkik yöntemleri ile birlikte halen antitrombositler antikorların sensitivitesinin %50-70, spesifitesinin %85-90 civarında olduğu görölmüştür (46).

Trombosit glikoproteinlerine karşı gelişmiş antikorlarla opsonize olmuş trombositler, retiküloendotelial sistemde özellikle dalakta, Fc gama reseptör (FcγR) taşıyan fagositoz ve antijen prezentasyonundan sorumlu olan mononükleer fagositer hücreler tarafından hücre içine alınır. Hücre içinde parçalanan trombositlerin yüzeyinde bulunan yeni antijenik yapılar hücre yüzeyine taşınır ve buradaki reseptörler aracılığı ile T hücrelerine sunulur. T hücreleri tarafından bu antijenik yapılara karşı otoantikor yapılması için B hücreleri uyarılır. Bu mekanizmaya "İTP'de epitop yayılımı" denir (1,2,8,12). **Şekil 1**'de de (8) göröldüğü gibi glikoprotein IIb/IIIa antijenleri otoantikorlarla kaplanmakta ve bunlar Fc reseptörlerine



bağlanmaktadır. Fagositoz sonrası hücre içinde parçalanan trombosit parçacıkları makrofaj yüzeyine taşınmakta ve burada CD154-CD40 etkileşimi sonucunda glikoprotein IIB/IIIa'ya karşı birinci T hücre klonu gelişmekte ve bu da birinci B hücre klonu aracılığıyla daha yüksek oranda antiglikoprotein Iib/IIIa gelişmesini sağlamaktadır. Bunun yanında yeni bir antijen olarak glikoprotein Ib/IX ikinci T hücre klonuna sunulmakta ve bu da ikinci B hücre klonu aracılığı ile yeni bir antikor gelişmesini sağlamaktadır. Ayrıca bu reaksiyonlar sırasında çeşitli sitokinlerin salgılanması da söz konusu olmaktadır.



**Şekil 1:** İTP patogenezinde epitop yayılımı (8)

İTP'li hastaların büyük bir kısmında son geliştirilen yöntemlerle bile halen trombosit otoantikorları tespit edilememektedir. Bu durum fizyopatolojide başka mekanizmalar olabileceğini düşündürmektedir. Antitrombosit antikorlarının varlığının sensitivitesi %49-66, spesifitesi %78-92, pozitif prediktif değeri %80-83 olarak bulunmuş ve negatif değerin İTP tanısından uzaklaştırmaması gerektiği bildirilmiştir. Ayrıca bu antikorların İTP için spesifik olmadığı, trombositopeni ile giden lösemi ve aplastik anemi gibi çok sayıda hastalıkta bulunduğu bilinmektedir (47,48). Trombositlere karşı oluşan antikorların aynı zamanda

megakaryositlerin üzerinde bulunan GpIIb/IIIa ve GpIb gibi reseptörlere bağlanarak megakaryosit üretimini azalttığı gösterilmiştir. Bu antikorların megakaryositlerin proliferasyonunu, maturasyonlarını bozabileceği ve erken sürede yıkılmalarına neden olabileceği düşünülmektedir (49-55).

İTP'de dalağın fonksiyonu ilk kez Avusturyalı bir tıp öğrencisi olan Kaznelson tarafından 1916 yılında incelenmiştir. Kaznelson ve arkadaşları tarafından İTP'li bir hastaya splenektomi uygulandıktan sonra trombositleri hızla yükselmiş ve kanama yakınmaları tamamen gerilemiş. Splenektomi sonrası trombositlerin yükselmesi dalağın trombositleri yıkarak mı yoksa kemik iliğine inhibisyon sağlayan bir madde salgılayarak mı etki ettiği konusunda kafalarda soru işaretleri oluşturmuştur (56). Sonraki dönemde Harrington tarafından otoantikorların saptanması ve Doan ve arkadaşları tarafından İTP'li hastaların splenektomi sonrası yapılan incelemelerinde dalakta aşırı miktarda sea blue histiosit görülmesi ve bunların trombosit parçalayıcı olarak adlandırılması dalağın kemik iliğini baskılayan bir maddeden çok yıkım fonksiyonunun ön planda olduğunu düşündürmüştür (33,57).

#### **4.1.3.2. İTP'de Sitokinler ve T hücrelerinin fonksiyonu**

CD4<sup>+</sup>T hepler (Th) hücrelerinin immün sistemin en önemli kontrol mekanizması ve düzenleyici komponentlerinden biri olduğu düşünülmektedir. Th hücre klonları sentezledikleri sitokin ve hücre fonksiyonlarına göre T helper 1 (Th1) ve T helper 2 (Th2) olmak üzere iki farklı hücre klonuna dönüşebilmektedirler. Th1 hücre klonu interlökin 2 (IL-2), IL-10, IL-15, tümör nekrozis faktör beta (TNF-β) ve interferon-gamma (IFN-γ) gibi sitokinler salgılayarak, Th2 klonu IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 gibi sitokinler salgılamaktadır (23-25).

Th1 hücreleri, T hücreleri tarafından gerçekleştirilen hücre sel immünitinin düzenlenmesinde görev almakta, sitotoksikite, gecikmiş tipte hipersensitivite reaksiyonlarında rol oynamakta, monosit aktivasyonu ile proinflatuvar sitokinleri oluşturmakta, hücre içi bakteriyel enfeksiyonlar ve düşük antikor yapımını gerektiren makrofajlarla sağlanan mikrobisidal aktivite ve kontakt dermatit gibi enflamatuvar reaksiyonların oluşmasını sağlamaktadır (22-25).

Th2 hücreleri, B hücrelerinin görev aldığı hü moral bağışıklık sisteminde görev almakta, antikor oluşumunu, eozinofil aktivasyonunu sağlamakta, monositlerin aktivasyonunu engelleyerek, anti-inflamatuvar sitokinleri oluşturmakta, IgE gibi kalıcı antikor yapımını gerektiren ve eozinofillerin görüldüğü allerjik reaksiyonlar ve paraziter enfeksiyonların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (22-25).

İTP'li hastalarda, özellikle kronik İTP'de, %30-40'ının serumlarında antitrombosit antikörlerin saptanamaması nedeniyle bu hastalarda trombositopeni gelişimine farklı mekanizmaların katkıda bulunduğu düşünülmüştür. Megakaryosit ve trombositlere karşı direk olarak T hücre aracılı sitotoksikite hastaların büyük kısmında trombositopeninin ana mekanizmasını oluşturmaktadır. Olsson ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, İTP'li hastalarda hücre aracılı sitotoksikitede rol alan T hücrelerinin genlerinde up-regülasyon olduğu gösterilmiş ve T hücrelerinin anahtar rol oynadığı düşünülmüştür (58). CD8<sup>+</sup> sitotoksik T hücreleri ve CD4<sup>+</sup> Th hücreleri ve bunların sekreter sitokinleri B hücre klonunun antitrombositler antikör üretimini kontrol etmektedir. Ayrıca İTP'li hastalarda Th1 ilişkili sitokinlerin hakimiyetinin olduğu da bilinmektedir (**Tablo I**)(12,59,60).

**Tablo I:** İTP'de sitokin profili (12)

---

**Th1 profil:** artmış IL-2, IL-10, IL-15, INF- $\gamma$ , TNF- $\beta$

**Th2 profil:** azalmış IL-4, IL-5, IL-6, IL-13

**sIL-2R:** artmıştır

**TGF- $\beta$ :** azalmıştır

**M-CSF:** artmıştır

---

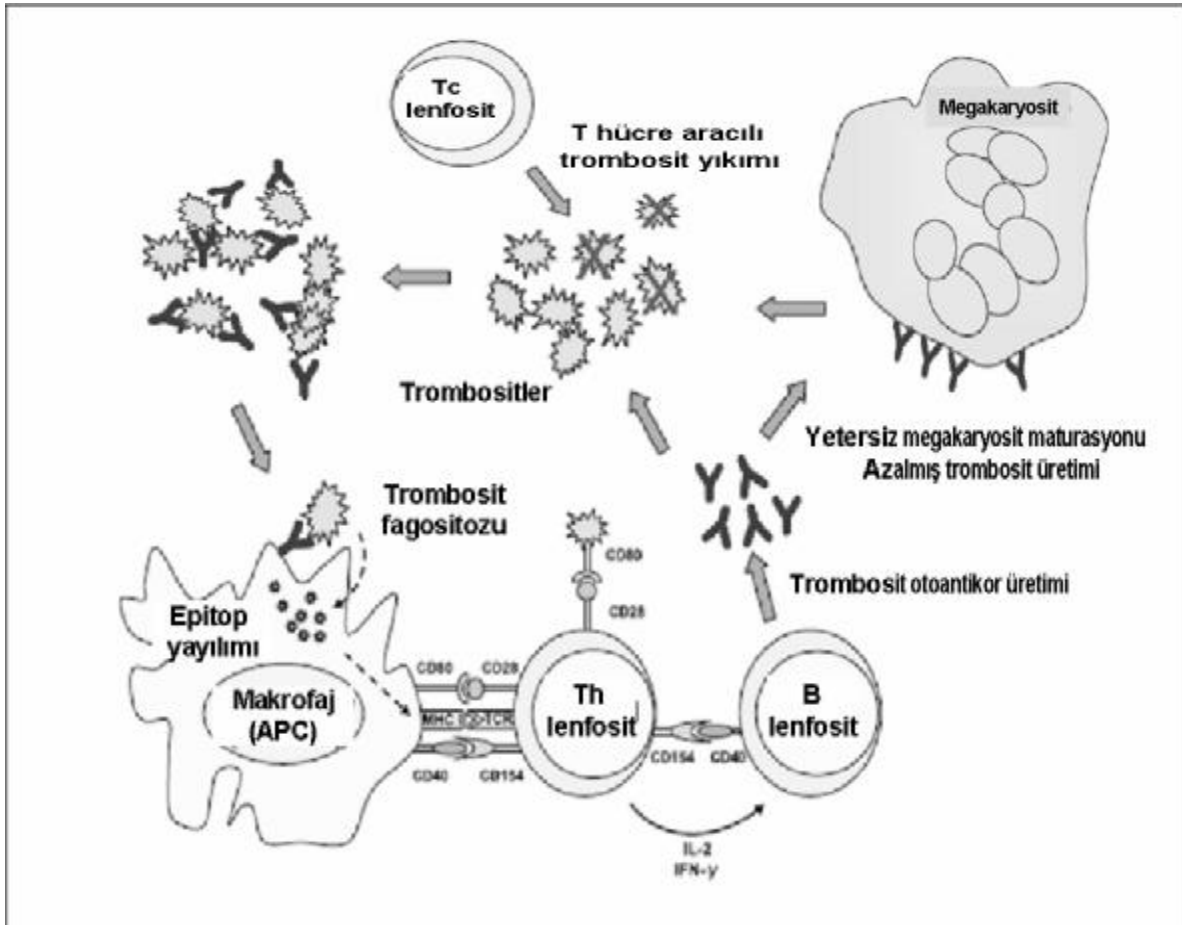
\* IL: İnterlökin, INF- $\gamma$ : İnterferon-gamma, TNF- $\beta$ : Tümö nekrozis faktör beta, sIL-2R: soluble interlökin 2 reseptör, TGF- $\beta$ : transforming growth faktör beta, M-CSF: Monosit koloni stimulan faktör

Daha öncede bahsedildiği gibi Th1/Th2 dengesi normal şartlar altında immün sistemin düzenlenmesi ve kontrolünde önemlidir. Bu dengenin Th1 lehine artması özellikle otoimmün hastalıkların gelişiminde kritik rol oynamaktadır. Juvenil idiopatik artrit (JIA), sistemik lupus eritematozis (SLE), Hashimoto tiroiditi, tip 1 diyabet gibi otoimmün hastalıkların gelişim sürecünde Th1 hücre oranının baskın olduğu bilinmektedir. Bu hastalarda hastalık aktivasyon döneminde Th1 tarafından salgılanan sitokinlerin plazmada yüksek oranda bulunduğu da bilinmektedir (61-65).

İTP'li hastalarda Th1 ve Th2 karşılaştırması ilk olarak erişkin kronik İTP hastalarında olmuştur. Semple ve arkadaşlarının (66) akut ve kronik İTP'li hastalarda yaptığı çalışmada HLA DR<sup>+</sup> T hücreleri, soluble IL-2 reseptörü ve Th1 aktivasyonunu düşündüren IL-2, TNF- $\beta$ , INF- $\gamma$  gibi sitokinlerde artma olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular daha sonra birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarla desteklenmiştir (60,67-69). Ayrıca

remisyonadaki İTP hastaları veya kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Th1 aracılıklı sitokinlerin aktif hastalık döneminde yüksek olduğu bilinmektedir (2,66,70). Bu makale sonuçlarından da anlaşılmaktadır ki İTP'li hastalarda Th1 ve onun salgıladığı sitokinler yüksek oranda bulunmaktadır ve İTP'nin aktivasyon döneminde bu oranlardaki artış daha belirgindir.

Trombosit glikoproteinlerine karşı otoantikor gelişimi, Th1 hücre yanıtının baskın olması ve dalakta artmış trombosit yıkımı en sık karşılaşılan patogenetik mekanizmalar olmakla birlikte, kemik iliğinde megakaryositlerde immün/nonimmün mekanizmalarla trombosit üretiminin azalması, kompleman sistemini aktivasyonu aracılığı ile trombosit yıkımının artması, Fas/FasL yolundaki disfonksiyonlar sonucunda artmış trombosit yıkımı da son zamanlarda İTP patogenezinde karşımıza çıkan ve araştırılan konulardır (2,71). İTP'de patogenetik mekanizmalar **şekil 2**'de özetlenmiştir (71).



**Şekil 2:** İTP'de patogenetik mekanizmaların şematik görünümü (71)

#### 4.1.4. İTP'de klinik bulgular ve tanı

Akut İTP'li hastaların %50-85'inde kanama semptomlarının başlangıcından 1-3 hafta önce üst solunum yolu enfeksiyonu gibi bir hastalık geçirme yada canlı virus aşısı (kızamık,

kızamıkçık, su çiçeği) yapıma öyküsü vardır (6,27,71,72). Bu nedenle akut İTP en sık, üst solunum yolu hastalıkları prevalansıyla paralel olarak sonbahar ve kış mevsiminde görülür. Akut İTP daha çok çocukluk yaş grubunun hastalığıdır ve %80-90 oranında 6-12 ay içerisinde spontan remisyon görülmektedir. Kronik İTP hastaları ise daha çok erişkin hastalarda uzun süreli purpura öyküsü veya asemptomatik iken rutin laboratuvar incelemeleri sırasında saptanarak hastaneye başvururlar (1,2,26,73). Akut ve kronik İTP'nin genel özellikleri **tablo II**'de verilmiştir (74).

**Tablo II:** Akut ve kronik İTP'de genel özellikler (74)

| Özellikler       | Akut İTP                     | Kronik İTP              |
|------------------|------------------------------|-------------------------|
| Yaş              | 2-6                          | 20-40                   |
| Cinsiyet farkı   | Yok                          | K/E, 3/1                |
| Enfeksiyon       | 1-3 hafta öncesinde          | Nadir                   |
| Başlangıç        | Ani                          | Yavaş                   |
| Trombosit sayısı | < 20,000/mm <sup>3</sup>     | >20,000/mm <sup>3</sup> |
| Süre             | 2-6 hafta, nadiren daha uzun | Aylar-yıllar            |
| Spontan remisyon | %80-90                       | Nadir                   |

Çocuklarda İTP iki ana klinik formda görülmektedir. Tanıdan sonra altı ay içinde düzelen formu akut İTP, tanıdan sonra altı aydan uzun süren formu ise kronik İTP olarak adlandırılmaktadır. Kronik olguların az bir kısmı aralıklı trombositopeni atakları ile karakterize olup rekürren İTP olarak adlandırılmaktadır. Kız cinsiyet ve yaşın 10 yaştan büyük olması kronik İTP gelişim riskini arttıran faktörlerdir (2,6,8,12).

İTP diğer trombositopeni yapan nedenlerin dışlanması ile tanı konulan bir hastalıktır (1,26) (**Tablo III**). İmmün trombositopeninin sekonder formları; sistemik lupus eritematozus, antifosfolipid antikor sendromu, immün yetmezlikler (IgA eksikliği, yaygın değişken hipogamaglobulinemi), lenfoproliferatif hastalıklar, HIV ve EBV gibi enfeksiyonlar ve ilaç (heparin, kinidin...) kullanımı sırasında görülebilir. Bunlar sekonder immün trombositopenik purpura olarak adlandırılmaktadır.

Özellikle üç ayın altındaki çocuklarda pasif olarak geçen antikorların sebep olduğu kazanılmış alloimmün ve otoimmün trombositopeni nedenleri düşünülmelidir. Kalıtsal nonimmün trombositopeni nedenleri de İTP'yi taklit edebilmektedir (1,8,26). Eğer öyküde küçük yaştan beri mukokutanöz kanama öyküsü alınıyorsa familial trombositopeniler, tip2 vonWillebrand hastalığı ve Bernard –Soulie hastalığı ayırıcı tanıda hatırlanmalıdır.

Fizik muayenede genelde mukokutanöz kanamalar (peteşi, purpura, ekimoz, epistaksis konjunktival kanama, ve diğer mukokutanöz kanamalar) dışında bulgu saptanmamaktadır. Hastalar kanama semptomlarına göre hafif, orta ve şiddetli gibi gruplara ayrılabilir (75,76). Belirgin splenomegali mutlaka diğer tanıları düşündürmelidir. Ancak %10 çocukta dalak lingulası palpe edilebilir.

**Tablo III: İTP’de ayırıcı tanı (26)**

---

**İmmün**

Primer

İdiopatik trombositopenik purpura

Sekonder

İlaçlar (kinidin v.b)

Posttransfüzyon purpura

Human immunodeficiency virus

Hepatit C virüs

Enfeksiyöz mononükleoz

Sistemik lupus eritematozis

Crohn hastalığı

Antifosfolipit antikor sendromu

Kronik lenfositik lösemi

Lenfoma

Ig-A eksikliği

Yaygın değişken immün yetmezlik

Sarkoidoz

**Nonimmün**

Hipersplenizm

Myelodisplazi

Akut lösemi

İlaçlara bağlı kemik iliği baskılanması (valproik asid, alkol)

Hereditör trombositopeni (MYH-9 mutasyonu, Bernard-Solier, Glanzman)

Mikroanjyopatik hemolitik anemi

---

Tam kan sayımında trombositopeni dışında diğer hücre serileri yaşına uygun normal sınırlar içindedir. Periferik kan yaymasının incelenmesi sonucunda psödotrombositopeni, kalıtsal iri trombosit sendromları ve diğer hematolojik bozukluklar dışlanmalıdır. Büyüklük-küçüklü trombositler ve iri-immatür trombositler sıklıkla görülebilir. Bu durum, aynı trombosit sayısına sahip kemik iliği yetmezliği hastalarının neden İTP hastalarından daha fazla kanadıklarını da açıklamaktadır (1,8,26,27).

Atipik bulgular yoksa tanı için minimal laboratuvar değerlendirme önerilmektedir. Tanı sırasında kemik iliği aspirasyonu yapılması gerekliliği en çok tartışılan konulardan biridir. Tedavi verilmeyecek veya İVİG verilecek olan hastalara eğer fizik muayene ve laboratuvar tetkiklerinde atipik bulgular yoksa önerilmemektedir. Zorunlu olmamakla beraber birçok pediatrik hematolog akut lösemi ayırıcı tanısı için kortikosteroid tedavisi öncesinde kemik iliği aspirasyonu yapılmasını önermektedir (27,77-80).

Akut İTP'de hastaneye yatışın etkinliğini değerlendiren ve kesin bir standardizasyon getiren bir çalışma yoktur. Amerikan Hematoloji Derneği (ASH) önerilerine göre trombosit sayısı kaç olursa olsun ciddi kanaması olan her hasta ve trombosit sayısı  $20 \times 10^9/L$ 'nin altında, mukoz membran kanaması olan hastalar hastaneye yatırılarak tedavi edilmelidir (81).

#### **4.1.5. İTP'de tedavi**

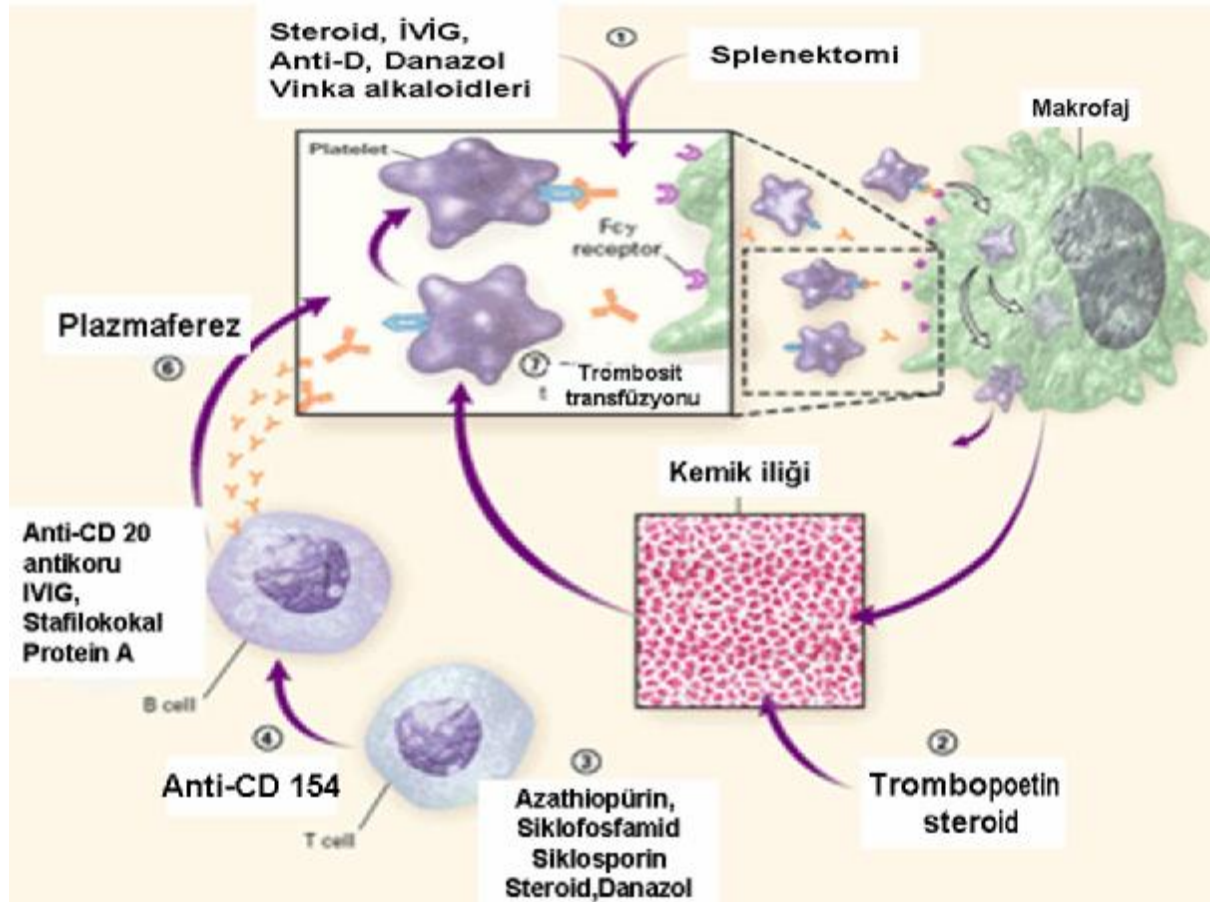
Çocuklarda akut İTP'nin tanı sırasındaki ilk tedavisi tartışmalıdır. Spontan remisyon olması nedeni ile tedavi verilmeden de izlenebilmektedir (1,2,12,26). Ancak intrakraniyal kanama ve fiziksel aktiviteye bağlı beklenmedik kanama korkusu tedavi kararını etkilemektedir. İTP'de intrakraniyal kanama insidansı %0,4-3 arasında değişmektedir (9,82). Literatürde bildirilen 20 intrakraniyal kanama olgusu değerlendirildiğinde hepsinin trombosit sayısı  $20 \times 10^9/L$ 'nin altında olup %80'ininde  $10 \times 10^9/L$ 'nin altında olduğu, sekizinde travma, arteriovenöz malformasyon, aspirin alımı gibi risk faktörleri olduğu saptanmıştır.  $20 \times 10^9/L$ 'nin altındaki trombosit sayısı ve kanamayı kolaylaştırıcı faktörlerin varlığında (antitrombosit ilaç kullanımı, travma) intrakraniyal kanama riski artmaktadır (9,82).

Trombosit sayısı  $20 \times 10^9/L$ 'nin altındaki İTP'li hastalarda trombosit sayısını güvenli hemostatik düzeye en kısa sürede yükseltecek minimum tedavi uygulaması ideal tedavi yöntemidir. Amerikan Hematoloji Derneği'nin 1996'da yayınladığı İTP'li çocuklarda tedavi kriterlerine göre; trombosit sayısı  $20 \times 10^9/L$ 'nin üzerinde olan ve kanama bulgusu olmayan hastalarda tedavi önerilmemektedir. Trombosit sayısı  $20 \times 10^9/L$ 'nin altında olan ve mukozal kanaması olan çocuklarda tedavi gerekli görülmektedir. Tedavide amaç; trombosit sayısını  $20 \times 10^9/L$ 'nin üzerine çıkarmak ve kanamayı durdurmaktır (81).

İTP’de immunpatogeneze yönelik son yıllardaki gelişmeler tedavide yeni görüşler ortaya çıkarmıştır. İTP’de yeni tedavi modaliteleri geliştirilmesinde yol gösterici olmuştur.

İTP’de tedavi seçenekleri (Şekil 3)(8):

- Trombosit klirensi inhibitörleri: Kortizon, İVİG, Vinka alkaloidleri, Danazol
- İmmünoşpresif ilaçlar: Azotiyopurin, Siklofosamid, Siklosporin
- CD20 ye karşı antikolar (Rituximab)
- CD154’e karşı antikolar (IDEC-131)
- Trombopoetin
- Kemik iliği nakli



Şekil 3: İTP’de tedavinin etki mekanizmalarının şematik görünümü (8)

Çocuklarda sıklıkla immün yanıtın modülasyonunu sağlamak için İVİG, anti-Rh(D) immünglobülin ve immünoşpresif tedavi olarak da kortikosteroidler kullanılmaktadır (1,2,26,27).



İTP'de glukokortikoidlerin etki mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte; antikor taşıyan trombositlerin fagositozunu inhibe ettikleri, B lenfositlerinden antikor üretimini baskıladıkları, kapiller bütünlüğün sağlanması ve vasküler prostasiklin sentezinin inhibisyonu ile uzamış kanama zamanının normale dönmesinde etkili oldukları bildirilmiştir (83-88).

İTP'li hastalarda İVİG tedavisinin akut ve uzun dönemde görülen etkileri bulunmaktadır. İVİG immun sistem üzerindeki akut etkisini, Fc Reseptörünün (FcRs) bağlandığı membranın aktivitesinde değişiklik yaparak göstermektedir. Bu hipoteze göre; İVİG, FcRs'ni bloke ederek trombositlerin fagositozla yıkımını inhibe etmektedir. FcRs bazı hücrelerin yüzeyinde eksprese edilmektedir ve trombositler gibi immünglobuline duyarlı olarak fagosite edilen hücreler için fonksiyonel önemleri vardır. Anti-Rh (D) kaplı eritrositlerin ömrünün İVİG tedavisi ile uzadığının gösterilmesi bu hipotezi desteklemektedir (71,89,90). İTP'de IL-4, IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$  ve TNF- $\beta$ 'nin arttığı ve İVİG'in FcRs taşıyan monosit ve lenfositlerden sitokin sentezi ve serbestleşmesini etkilediği gösterilmiştir (91-96).

İVİG anti-GpIIbIIIa'ya karşı anti-idiotipik antikorlar içermektedir. Bu anti-idiotipik antikorlar GpIIbIIIa'ya karşı otoantikorların bağlanmasını inhibe etmektedirler. Anti-idiotip sistemi içindeki dengenin yeniden düzenlenmesi veya alternatif olarak anti-idiotipik antikor sekresyonunun supresyonu İVİG'in uzun dönem etkilerindedir ve İTP'nin uzun vadede düzelmesine neden olabilmektedir (93-97).

Dalağın hem antikor sentez yeri, hem de antikor bağlanmış trombositin fagositozla uzaklaştırılmasında retiküloendotelial sistemin önemli bir komponenti olması nedeniyle İTP patogeneziindeki rolü büyüktür. Dolayısı ile splenektomi sonucunda hem antikor sentezi, hem de trombosit fagositozu azalmakta ve trombosit sayısı artmaktadır (6). Kronik İTP'li hastalarda splenektomi endikasyonlarını iki faktör etkilemektedir: kronik İTP'li çocuklarda 1/3 veya daha fazlasında spontan remisyon olabileceği ve postsplenektomi enfeksiyon riskinin bulunmasıdır. Bu nedenle çocuklarda splenektominin mümkün olan en geç sürede yapılması önerilmektedir. Bir yıldan uzun süren kronik İTP'li hastalarda kanama şikayeti varsa, trombosit sayısı  $10 \times 10^9/L$ 'nin altındaki 3-10 yaştaki çocuklara ve trombosit sayısı  $10-30 \times 10^9/L$  olan, kanama şikayeti bulunan ve 8-12 yaşındaki çocuklara splenektomi önerilmektedir (71,81,89,98,99). Bunların dışında primer tedaviye (glukokortikoid, İVİG ve/veya anti-D) sadece geçici olarak yanıt veren, kontrol edilemeyen kanamaları olan ve cerrahi bir kontrendikasyon olmayan hastalarda splenektomi önerilmektedir (5,27,81).

Ritüksimab spesifik olarak normal ve maliyen B lenfositlerin üzerinde ekspresse edilen CD20 antijenine karşı geliştirilmiş kimerik insan/fare monoklonal antikorudur (100,101). Etki mekanizmasını kompleman aracılı sitotoksisite ve hücre aracılı antikor bağımlı sitotoksisite sonucunda artmış B lenfosit apoptozu ile gösterir (102). İlk kez CD-20 pozitif Non Hodgkin lenfomalı hastalarda başarı ile kullanılmıştır (103). Daha sonra İTP, faktör VIII'e karşı inhibitör varlığı, erişkin tipi trombotik trombositopenik purpura, otoimmün hemolitik anemi, sistemik lupus eritematozis, romatoid artrit gibi B lenfositlerin rol aldığı birçok otoimmün hematolojik ve romatizmal hastalıkta kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (104-111).

İTP'de ritüksimab ilk kez erişkin hastalarda kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Perotta ve arkadaşları altısı splenektomili 10 erişkin kronik İTP'li hastada ritüksimab kullanmış ve beşinde tam cevap, birinde kısmi cevap elde etmiştir. Hastaların cevap süresi bir ay ile 14 ay arasında olmuştur (112). Bu çalışmadan sonra erişkin İTP hastalarında ritüksimab ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Arnold ve arkadaşları (113) MEDLINE, EMBASE, Cochrane ve Amerikan Hematoloji Derneği'nin kongre kitapçıklarında yer alan özetleri tarayarak 2006 yılına kadar olan erişkin kronik İTP'de ritüksimab kullanılan çalışmaları değerlendirmiş ve kriterlere uygun 19 (313 hasta), güvenli 29 (306 hasta ) çalışma bulmuşlardır. Tüm yayınlar gözönüne alındığında tam cevap oranı (trombositlerin  $>150.000/\text{mm}^3$  olması) %43,6 (%95 CI %29,5-57,7) ve kısmi cevap oranı (trombositlerin  $>50.000/\text{mm}^3$  olması) %62,5 (%95 CI %52,6-72,5) olarak bulunmuştur. Hastaların tamamına yakınına ritüksimab öncesinde steroid ve diğer tedavi seçenekleri kullanmış, %53,8'ine splenektomi uygulanmıştır. Bu makaleye alınmış çalışmaların tamamına yakınında ritüksimab  $375 \text{ mg}/\text{m}^2$  dozunda haftada bir kez dört hafta süreyle uygulanmıştır.

Çocukluk çağı kronik İTP'sinde ise ritüksimab kullanımı ilk kez 2003 yılında Bengston ve arkadaşları (114) tarafından bildirilmiştir. Yaygın peteşi ve trombositopenisi mevcut olan üç aylık bir bebekte, kemik iliği aspirasyonunda artmış megakaryositlerle birlikte diğer trombositopeni yapacak nedenler dışlanmış ve İTP tanısı konmuş, steroid, İVİG ve anti-D tedavisine kısmi yanıt elde edilmiş, ancak steroid kesildikten sonra tekrar trombositopenisi ve ciddi gastrointestinal kanaması gelişmesi nedeniyle splenektomi yapılmış, cevap elde edilememiştir. Bunun üzerine ritüksimab başlanan hasta tedaviye çok iyi cevap vermiş ve ikinci haftadan sonra tam cevap elde edilmiştir. Aynı yıl Zaja ve arkadaşları (108) 16 yaşında kronik İTP'li bir hastada ritüksimabı kullanmışlar ve başarılı sonuç elde etmişlerdir.

Çocukluk çağında kronik İTP'de ritüksimab ile tedavi edilmiş ilk geniş seri sonuçları Shenoy ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Bu çalışmada diğer tedavilere dirençli 20

kronik İTP hastasına 375 mg/m<sup>2</sup>/hafta 4 doz veya 750 mg/m<sup>2</sup>/hafta 3 doz şeklinde ritüksimab verilmiştir. Yüksek dozlarda bile herhangi bir yan etki gözlenmezken %70 vakada kısmi veya tam cevap elde edilmiştir (115). Daha sonraki yıllarda birçok dergide çocukluk çağında kronik İTP’de ritüksimab kullanımı ile ilgili çalışmalar yayınlanmıştır. 2007 yılının sonuna doğru Franchini ve arkadaşları kronik İTP nedeniyle ritüksimab kullanmış çocukların sonuçlarını derlemiştir. Bu döneme kadar ingilizce literatürde yayınlanmış makalelerde toplam 150 kronik İTP’li çocuğa ritüksimab kullanıldığı bildirilmiştir. olguların hemen hepsi öncesinde steroid, İVİG, anti-D ve splenektomi gibi tedavi seçeneklerinden bir veya birçoğunu kullanmıştır. 90 (%60) hastada kısmi veya tam cevap elde edilmiş, bunlardan 29/90 tanesi (%32) rekürrens gösterirken, 61/90 tanesi (%58) sürekli remisyonda kalmıştır. Bu bilgiler ışığında önceki tedavilere dirençli kronik İTP vakalarında yaklaşık %50 oranında cevap alınabildiği görülmektedir (116).

Ritüksimab genelde iyi tolere edilen bir ilaçtır, ancak infüzyon sırasında halsizlik, ateş, anafilaksi ve sitokin salınımına bağlı bazı akut yan etkiler ortaya çıkabilir. Sıklıkla bu yan etkiler ilk infüzyon sırasında ortaya çıkar ve sonraki infüzyonlarda daha azdır. Bu nedenle infüzyon öncesi premedikasyon yapmak gerekebilir. Bunun dışında değişen oranlarda serum hastalığı, interstisyel pnömoni bildirilmiştir. En önemli yan etkilerden birisi de humoral immüitenin uzun süre baskılanmasıdır. Ritüksimab aracılı B hücre sayısında ve immünglobulin seviyelerinde baskılanma aylarca sürebilir. Bu nedenle bu dönemde hastalar ciddi bakteriyel ve viral hastalıklarla karşı karşıya kalabilmektedir (100,101).

Son yıllarda rekombinan insan trombopoietini, pegylated rekombinan insan megakaryosit büyüme ve gelişme faktörü, AMG 531 (trombopoezi uyarıcı protein), eltrombopag (SB-497115-GR) ve AKR-501 gibi megakaryositlerdeki trombopoetin reseptörü veya postreseptör yolak aktivasyonunu sağlayarak trombosit yapımını artıran ilaçlarla ilgili çalışmalar artmaktadır. Bunlardan rekombinan insan trombopoietini, pegylated rekombinan insan megakaryosit büyüme ve gelişme faktörüne karşı vücutta otoantikor geliştiği ve etkinliğini azalttığı bildirilmiştir. Diğer ajanlara karşı herhangi bir otoantikor mevcut olmayıp ciddi bir yan etki ve toksisite bildirilmemiştir. Bununla ilgili çalışmalar halen devam etmektedir (117).

#### 4.1.6. İTP'de genetik çalışmalar

İdiopatik trombositopenik purpurada hangi faktörlerin hastalarda akut veya kronik İTP gelişmesinde rol oynayabileceği ya da tedaviye vereceği yanıtın göstergesi olabilecek çalışmalar yeni araştırma konularını oluşturmaktadır.

Birçok otoimmün hastalık ile HLA antijenleri arasındaki ilişki bilinmektedir. Kronik İTP'de otoimmunitenin nedeni tam olarak anlaşılammakla birlikte HLA antijenleri ile antijenik peptitlerin bağlanmasında anormallik de sorumlu tutulmaktadır, ancak HLA klas I veya DR antijenleri ile kronik İTP arasındaki ilişki ile ilgili çalışmalarda çelişkili sonuçlar bildirilmiştir (8,118-120). Belli etnik gruplarda HLA-DRW2 ve DRB1\*0410 allelleri sıklığı İTP'li hastalarda yüksek bulunmuştur (8). Anti-GpIIbIIIa antikorları ile DRB1\*0410 alleli arasında korelasyon bulunmamış ancak steroidde iyi yanıt veren hastalarda HLA-DR4 ve DRB1\*0410 belirgin olarak az saptanmıştır. Benzer bulgular Hong Kong'lu Çin'lilerde gösterilememiştir (8,121). HLA-DRB1\*1501 ise splenektomiye kötü yanıt ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (8). Bu bulgular İTP'de genetik faktörlerin rolünü vurgulamaktadır; ancak etnik farklılıklar da göz önünde bulundurulmalıdır.

Fc reseptörlerinin trombositlerin klirensinde önemli rolü bulunmaktadır (38). Üç tip Fcγ reseptörü vardır: Fcγ RI monomerik IgG'ye güçlü affinite gösterir, Fcγ RII ve Fcγ RIII immün kompleks formunda IgG'ye sadece efektif olarak bağlanır. FcRII grubu üç gen (IIA,IIB,IIC) ve FcRIII grubu ise iki gen (IIIA ve IIIB) tarafından kodlanır. Antikorla kaplı trombositlerin makrofajlardaki Fcγ reseptörleri ile dolaşımdan uzaklaştırılması İTP'de trombositopeninin başlıca nedeni olduğundan, Fcγ genotipleri ve İTP arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalarda Fcγ RIIIA genotiplerinden 158 F/F kronik İTP'li hastalarda kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuş ve 158V/V medikal tedavi ile komplet remisyona giren hastalarda belirgin olarak yüksek saptanmıştır (14,122). Düşük affiniteli iki FcγR'ü FcγRIIIA ve IIIB ile proinflamatuvar sitokinler TNF ve LTA (lenfotoksin alfa)'nin gen 8 polimorfizmlerinin çocukluk çağı kronik İTP'li olguları ile birlikteliği gösterilmiş ve artmış proinflamatuvar veya Th1 immün yanıtın, kronik İTP'de antikor oluşumuna karşı koruyucu olduğu ileri sürülmüştür (123).

HPA sistemleri ile ilgili polimorfizmler ile İTP'li hastalar arasında ilişki araştırılmış ve HPA-5b alleli taşıyanların akut İTP için artmış risk taşıdıkları bildirilmiştir (124,125). Diğer bir çalışmada da kronik refrakter İTP ile HPA-2 arasında ilişki bildirilmiştir (13,124). Ancak bu polimorfizmlerin rolü farklı etnik gruplarda değişkenlik göstermektedir. Bundan dolayı her etnik grup hastalık için kendi popülasyon çalışmalarını yapmaları gerekir.

## 4.2. SİTOKİNLER ve OTOİMMÜNİTE

Sitokinler, doğal ve adaptif immünyetede rol alan hücreler tarafından salgılanan önemli proteinlerdir. Herhangi bir mikroorganizma veya antijenik uyarı sonrasında salgılanan pek çok farklı sitokin immün sistem regülasyonu ve inflamasyonda önemli rol oynamaktadır. Hematopoetik sistemde de hücrelerin diferansiyasyonu ve otoimmün hematolojik hastalıkların gelişimi sırasında sitokinler etkili bir şekilde görev yapmaktadır. **Tablo IV**'de hematopoezde rol alan sitokinlerin yapı ve fonksiyonları görülmektedir (20).

**Tablo IV:** Hematopoietik sitokinler (20)

| Sitokinler                                       | Büyükklük                                      | Hücre kaynağı  | Hedef hücre                                      | Etkilediği hücre popülasyonu                    |
|--|--|--|--|---|
| <b>Stem cell faktör</b>                          | 24 kD  | Kemik iliği stromal hücreleri                                  | Pluripotent kök hücre                            | Tümü  |
| <b>İnterlökin-7</b>                              | 25 kD  | Fibroblast, kemik iliği stromal hücreleri                      | İmmatür lenfoid öncüller                         | B ve T lenfositler                              |
| <b>İnterlökin-3</b>                              | 20-26 kD                                       | T hücreleri  | İmmatür öncüller                                 | Tümü  |
| <b>Granülosit-monosit koloni stimülan faktör</b> | 18-22 kD                                       | T hücreleri, makrofajlar, endotel hücreleri, fibroblastlar     | İmmatür ve ara öncül hücreler, matür makrofajlar | Granülosit ve makrofajlar, makrofaj aktivasyonu |
| <b>Monosit koloni stimülan faktör</b>            | Dimer halinde 70-90 kD, 40 kD'luk alt üniteler | Makrofaj, endotel hücreleri, kemik iliği hücreleri, fibroblast | Ara öncül hücreler                               | Monositler                                      |
| <b>Granülosit koloni stimülan faktör</b>         | 19 kD  | Makrofaj, fibroblast, endotel hücreleri                        | Ara öncül hücreler                               | Granülositler                                   |

Otoimmünite insanlardaki pek çok organ sistemini etkileyen hastalıkların gelişiminde önemli role sahip olup, Amerika'da insanların %1-2'sini etkilediği düşünülmektedir (22). Otoimmün hastalıkların patogenezi ve genetiği hakkında son iki dekatta olan gelişmeler bu hastalıkların aydınlatılmasına önemli katkıda bulunmuştur ancak bu konuda hala pek çok bilinmeyen noktalar vardır.

Otoimmün hastalıkların patogenezinin irdelenmesi sürecinde birkaç önemli görüş önem arz etmektedir (22):

**1. T lenfositler, B lenfositler veya her ikisinde normal immün sistem cevabında self tolerans mekanizmalarının bozulması veya yetersizliği sonucu otoimmünite gelişir.**

Lenfositlerin normal gelişimi sırasında insanların kendi vücut antijenleri (self antijen) için spesifik reseptörler oluşmaktadır. İnsanda mevcut olan self-tolerans mekanizmaları sonucunda self-antijenik yapılara bağlanan bazı lenfositlerin maturasyonu baskılanmakta, bazılarının ise yok edilmesi veya inaktive edilmesi ile otoimmün sürecin gelişmesi önlenmektedir. Self-tolerans mekanizmasının kaybı sonucunda bu antijenik yapılarla bağlanan lenfositler antijenleri antijen sunan hücelere sunmakta ve otoimmün sürecin gelişimine katkıda bulunmaktadır.

Son zamanlarda iki temel nedenden dolayı otoimmünitede T lenfositlerin rolüne odaklanılmaktadır. Birincisi Th hücreler tüm immün cevabın regülasyonunda anahtar rol oynamaktadır. İkincisi birkaç otoimmün hastalıkta major histocompatibility kompleks (MHC) ile ilgili genetik yatkınlık gösterilmiştir. MHC moleküllerinin fonksiyonu T hücrelerine antijen sunmaktır. Bu iki durumdan dolayı T hücre tolerans mekanizmalarında olan bozukluğun otoimmün hastalık gelişiminde en önemli mekanizma olduğuna inanılmaktadır. T hücre tolerans mekanizmalarındaki bozukluklar sonucunda hücre aracılı immün reaksiyonlar gerçekleşmektedir. Ayrıca Th hücre anormallikleri sonucunda ise otoantikor üretimi söz konusu olabilmektedir.

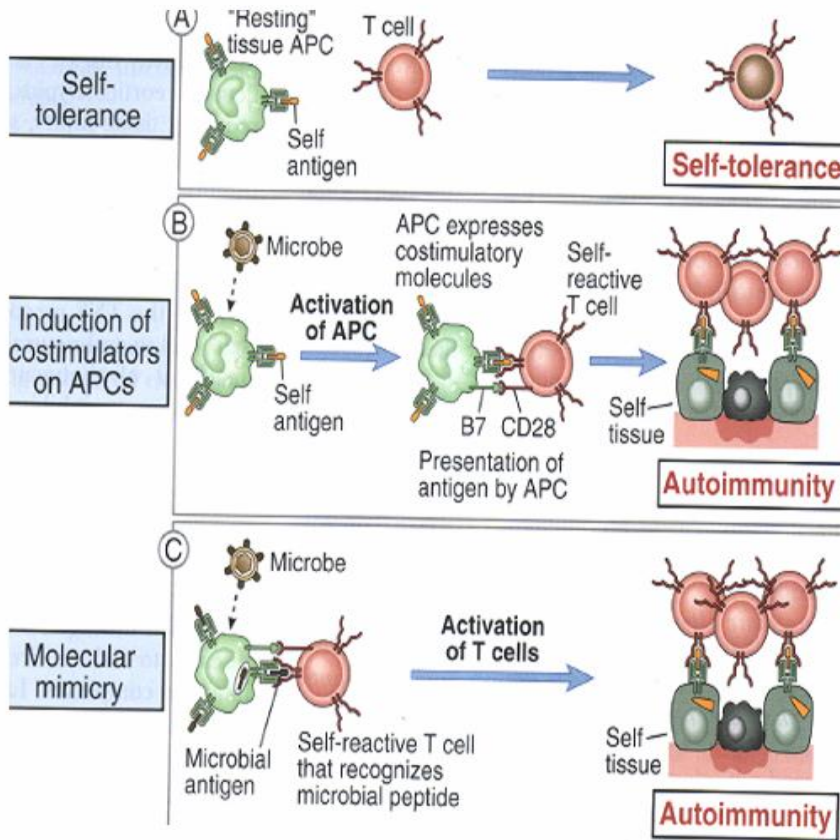
**2. Otoimmünite gelişim sürecinde genetik yatkınlık zemininde enfeksiyon gibi çevresel faktörler major rol oynamaktadır.**

Yatkınlık oluşturan genler varlığında enfeksiyon gibi çevresel faktörlerin etkisiyle self-tolerans mekanizmaların bozulması söz konusu olabilmektedir. Ayrıca enfeksiyon otoreaktif T lenfositlerin dokuya göçünü ve aktivasyonunu sağlamakta, bunun sonucunda doku hasarlanması olmaktadır. Enfeksiyon ve doku hasarlanması sonucunda ortaya çıkan antijenik yapılarla otoimmünitenin geliştiği doku antijenleri arasında benzerlik olabilmekte ve self tolerans mekanizmalarının bozulması kolaylaşabilmektedir. Bu süreç sonrasında otoimmünite gelişimi kolaylaşabilmektedir.

**3. Otoimmün hastalıkların her birisi organ veya sisteme spesifik olabilir.** Örneğin sistemik dolaşımında self antijen ve spesifik antikordan oluşan immün kompleks varlığında SLE gibi sistemik hastalıklar oluşmakta iken, otoantikör veya self antijene T hücre cevabı varlığında myastenia graves, tip 1 diyabet, multiple skleroz gibi tek organ hasarı ile giden organ spesifik durumlar çıkabilmektedir. İdiopatik trombositopenik purpurada, özellikle kronik İTP’de, otoantikör gelişimi ve self antijene karşı T hücre cevabı sözkonusudur.

**4. Değişik otoimmün hastalıklarda doku hasarlanması için farklı mekanizmalar sözkonusudur.**

**5.** Otoimmün reaksiyonlar doku hasarlanması sonucunda ortaya çıkan tek bir self antijene karşı gelişmektedir. Daha sonraki süreçte bu antijenik yapının MHC tarafından T hücrelerine sunumu sırasında yeni antijenik yapılara karşı da otoantikör gelişim olmaktadır. Yani otoimmünite bir kez başladığında kısır döngü halini alabilmektedir. Bu fenomen “**EPİTOP YAYILIMI**” olarak adlandırılmakta olup özellikle kronik ve refrakter otoimmün hastalık gelişiminde etkilidir. Daha öncede bahsedildiği gibi İTP gelişiminde de epitop yayılımı önemli rol oynamaktadır (1,8,22). **Şekil 4**’te otoimmün hastalık gelişiminde self tolerans mekanizmaları, genetik yatkınlık ve enfeksiyon gibi çevresel etkenlerin rolü görülmektedir (22).



**Şekil 4:** Otoimmünite gelişiminde patogenetik mekanizmaların şematik görünümü (22).

Yukarıda da bahsedildiği gibi İTP patogenezinde pek çok ve kompleks mekanizma rol oynamaktadır. Ancak özellikle T hücre self tolerans mekanizmasında bozulmalar, Th1 yanıtının ve ona ait sitokinlerinin baskın olması en önemli rolü oynamaktadır. Bu süreçte ise Th1 gelişiminde en önemli fonksiyonu lenfositlerden salgılanan ortamdaki interferon-gamma mevcudiyeti belirlemektedir. Bu nedenle interferon-gamma ve onunla ilişkili genlerde olan polimorfizm, genetik yatkınlık gibi durumlarda çevresel faktörlerin etkisi ile İTP gelişiminde kolaylaşmakta olabilir.

#### **4.2.1. İnterferon-Gamma**

İnterferon-gamma, CD4<sup>+</sup> Th1 lenfositler, CD8<sup>+</sup> T lenfositler, natural killer (NK) hücreleri tarafından salgılanan 34 kilodalton (kD) ağırlığında homodimerik yapıda bir polipeptid (17,18). Bir miktar antiviral etkisi olduğu kabul edilse de temelde antiviral değildir ve immün cevapta etkili bir sitokindir. İnterferon-gamma primer olarak makrofaj aktivasyonu yapan bir sitokin olmakla birlikte doğal ve adaptif immünite regülasyonunda önemli fonksiyonlara sahiptir. Aynı zamanda tip II interferon olarak da adlandırılmaktadır (20).

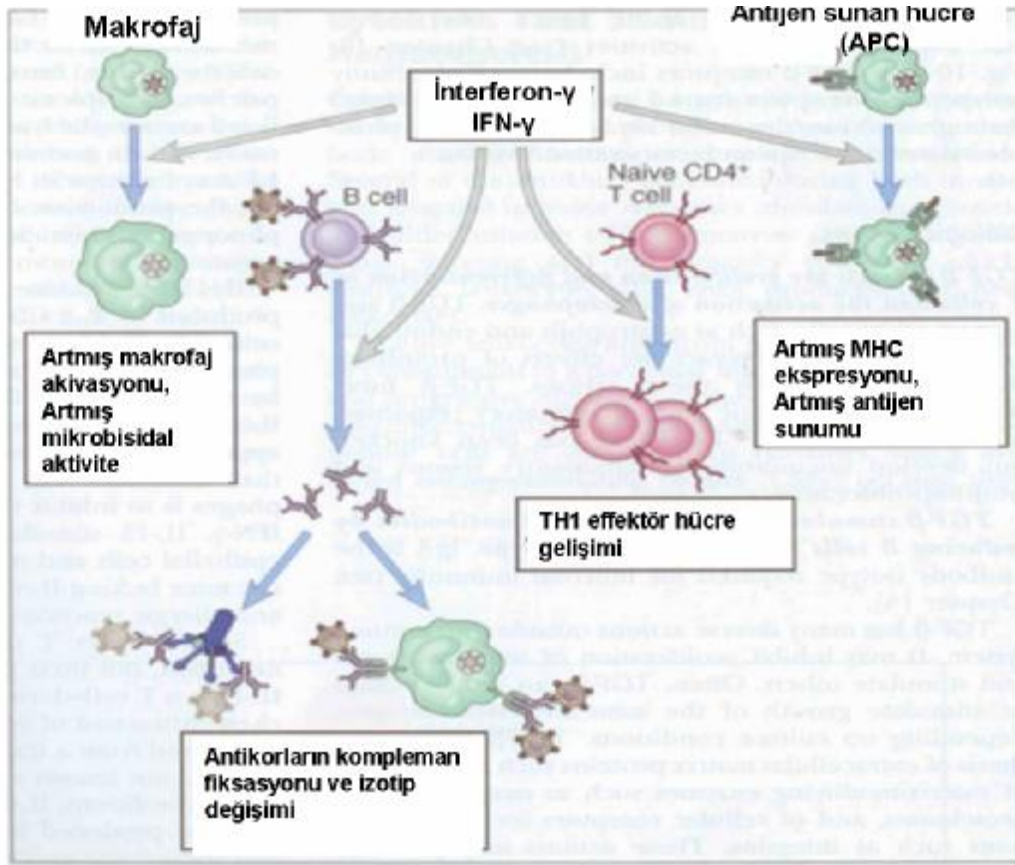
##### **4.2.1.1 Fonksiyonları**

İnterferon-gamma etkisini hedef hücre yüzeyinde bulunan dimer yapıda olan reseptörleri aracılığı ile yapmaktadır. Bu reseptörler sıklıkla mononükleer fagositler sistem, endotel hücreleri, NK hücreleri ve lenfositlerde bulunmaktadır (17-19). İnterferon-gamma'nın immün sistem regülasyonu sırasındaki önemli fonksiyonları bulunmaktadır (**Şekil 5**) (20). Bu fonksiyonlar aşağıda özetlenmiştir (20):

- 1.** İnterferon-gamma, temelde makrofajları aktive eden bir sitokindir. NK hücreleri ve T lenfositlerden salgılanan interferon-gamma makrofaj aktivasyonu yaparak intrasellüler yerleşen mikroorganizmaların öldürülmesinde önemli rol oynar. Bu etkisini makrofajlarda reaktif oksijen radikalleri ve nitrik oksid salgılanmasını artırarak yapar. Bu fonksiyonu özellikle tüberküloz gibi intrasellüler mikroorganizmaların yok edilmesinde önemlidir. İnterferon-gamma eksikliği veya disfonksiyonu durumunda yaygın sistemik tutulumlu veya tedaviye dirençli tüberküloz vakaları ortaya çıkabilmektedir.
- 2.** Antijen sunan hücrelerde bulunan MHC I ve MHC II miktarını artırarak T hücrelerine antijen sunumunu kolaylaştırmaktadır. Bu sayede yeni antijenik yapıların T hücrelerine sunumunu artırarak "epitop yayılımına" katkıda bulunmakta ve yeni otoantikor yapımını kolaylaştırabilmektedir.



3. Doğal CD4<sup>+</sup> T lenfositlerden Th1 gelişimini kolaylaştırmakta ve Th2 gelişimini inhibe etmektedir. Bu da daha önce birçok otoimmün hastalıkta ve İTP’de gösterildiği gibi Th1/Th2 oranını artırmakta, bunun sonucunda otoimmün hastalıkların gelişmesini kolaylaştırmaktadır.
4. B lenfositlerde bazı immünglobulin G subgrublarında değişiklik yapmaktadır. Örneğin farelerde yapılmış deneysel çalışmalarda IL-4 bağımlı IgE ve IgG1 sentezini azaltmakta, IgG2a sentezini artırmaktadır.
5. Nötrofilleri aktive etmekte ve NK hücrelerinin sitolitik aktivitesini artırmaktadır.



**Şekil 5:** İnterferon-gammanın fonksiyonlarının şematik görünümü. İnterferon-gamma makrofaj aktivasyonu sonucunda mikrobisidal aktivite, B lenfosit stimülasyonu sonucunda antikor üretimi, antijen sunan hücrelerin uyarılması sonucunda immün sistemin aktive edilmesi gibi önemli fonksiyonları yanında, otoimmün hastalıkların gelişiminde çok önemli bir aşama olan saf CD4<sup>+</sup> (T<sub>H0</sub>) hücrelerden T<sub>H1</sub> gelişmesinde de rol alır (22).

#### 4.2.1.2. Genetik

İmmünolojik olaylarda kavşak noktada bulunan ve önemli fonksiyonlarda rol oynayan interferon-gamma'nın kromozomu 12q24.1 lokalizasyonunda bulunmaktadır. Dört ekzon ve

üç intron içermektedir. İlk intronda 1349 ve 1373 bölgeler arasında yüksek oranda CA mikrosatellit tekrarları bulunmaktadır. Bu allellerdeki CA tekrarı ile farklı miktarlarda interferon-gamma üretimi arasında ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bunun da immün hastalıkların kişiden kişiye değişebilen klinik seyri ve şiddetini açıklayabilecek önemli bir nokta olduğu düşünülmektedir. Bir çalışmada allel 2'de yüksek oranda (12 adet) CA tekrarı ile in vitro olarak yüksek interferon-gamma üretimi ile arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (126,127). CA tekrar polimorfizmleri yanında ilk introndaki +874. pozisyonundaki tek nükleotid polimorfizminin de (Adenin/Timin, A/T) değişik oranlarda interferon-gamma üretimi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. İn vitro olarak 874. pozisyonda AA mevcudiyetinde düşük, AT mevcudiyetinde orta, TT mevcudiyetinde yüksek oranda interferon-gamma üretimi olduğu gösterilmiştir (128,129).

İnterferon-gamma geninde mevcut olan CA tekrar ve +874 A/T polimorfizmleri ile salgılanan interferon-gamma miktarları arasında ki ilişkinin gösterilmesi ve interferon-gamma'nın otoimmün hastalık gelişiminde önemli rolünün bilinmesi nedeniyle çeşitli otoimmün hastalıklarda interferon-gamma gen polimorfizminin etkisi merak konusu olmuştur. Bu ilişki juvenil idiyopatik artrit, multiple skleroz, tip 1 diyabet, Hashimoto tiroiditi, sistemik lupus eritematozis gibi birçok otoimmün hastalıkta araştırılmıştır (61-65).

Goris ve arkadaşları tarafından Almanya, İtalya, Sardunya ve İsveç gibi geniş bir alanda yaşayan multiple sklerozlu (MS) hastalar arasında yapılan ve CA tekrar polimorfizminin irdelendiği bir çalışmada tüm hastalar ile kontrol grubu ile arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Hastalar etnik kökenine göre ayrı ayrı irdelendiğinde sadece İsveçli hastalarda MS ve CA polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki saptanırken, Alman, İtalyan ve Sardunyalı hastalarda anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (130). Otoimmün tiroid hastalıklarının en önemlisi olan Hashimoto ve Graves hastalıkları ile interferon-gamma +874 A/T tek gen polimorfizmi ilişkisini irdeleyen bir çalışmada, yüksek interferon-gamma üretimi ile ilişkili TT genotipinin Hashimoto tiroiditli hastalarda anlamlı şekilde daha fazla olduğu görülürken, düşük interferon-gamma üretimi ile ilişkili olan AA genotipinin ise Graves hastalarında anlamlı şekilde daha fazla olduğu saptanmıştır (131).

Yüz otuz altı sistemik lupus eritematozis (SLE) hastasını içeren ve ilk introndaki CA tekrar polimorfizminin irdelendiği bir çalışmada ise hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel fark saptanmamıştır (64). Aynı şekilde 207 tip 1 diyabetli Japon çocukta bakılan CA tekrar polimorfizminde, tip1 diyabet ve CA tekrarı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (132). Buna karşın diğer bir tip 1 diyabetli hasta popülasyonunda ise sağlıklı kontrollere göre IFNG geninde allel 3'de anlamlı şekilde artmış CA tekrar polimorfizmi

saptanmıştır (133). Bu çalışmalara benzer şekilde JIA'de de interferon gamma gen polimorfizmi ile klinik şiddet arasında anlamlı ve anlamsız ilişki olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (65,134).

Bu çalışmalar ışığında hastalıkların gelişiminde rol oynayan genetik faktörlerde bölgesel farklılıkların olduğu hipotezi güç kazanmaktadır. Polimorfizmler toplumlara göre değişkenlik gösterdiğinden her toplumun çeşitli hastalıklarda kendi polimorfizmini çalışması sağlıklı olacaktır. Biz kendi kliniğimizde İTP tanısı ile izlenen hastaların interferon-gamma +874A/T polimorfizmi ile hastalığın seyri (akut-kronik), klinik şiddeti ve tedaviye cevap arasındaki ilişkiyi incelemek istedik.

## 5. HASTALAR VE YÖNTEM

Bu çalışma için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu'ndan onay aldı (No: 230/2007). Projenin mali desteği Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Fonu'ndan karşılandı (Proje talep no:2007190).

### 5.1. Çalışma Grupları

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji kliniğinde en az 6 aydır İTP tanısı ile izlenen hastalar çalışmaya alındı. İnterferon-gamma +874 A/T gen polimorfizminin, akut ve kronik İTP gelişmesi, hastalığın oluşması, klinik seyir ve tedaviye yanıtındaki rolünü araştırmak için hastalar 3 gruba ayrıldı:

**Grup1:** Akut İTP tanısı ile en az 6 aydır düzenli olarak izlenen,

**Grup2:** Kronik İTP tanısı ile en az 6 aydır izlenen hastalar,

**Grup3:** Kontrol grubu

Kontrol grubu olarak kronik bir hastalığı olmayan, İTP geçirmemiş, otoimmün bir hastalığı olmayan, tam kan sayımı ve periferik kan incelemesi normal olan sağlıklı çocuklar çalışmaya alındı.

Akut ve kronik İTP tanısıyla izlenen hastaların yaş, cinsiyet, başvuru yakınması, tanıdaki trombosit sayısı, uygulanan tedaviler, tedaviye yanıt, hastalık süresi, kronikleşme, geçirdiği enfeksiyonlar ve aşılama öyküsü dosyalarından retrospektif olarak elde edildi. İTP tanısı, deri ve mukoza kanamaları ile birlikte trombositopeninin varlığı ve trombositopeniye neden olabilecek diğer hastalıkların dışlanması ile kondu. Hastalarımızın öyküsünden ve laboratuvar özelliklerinden kollajen vasküler hastalık veya trombositopeni yapabilecek diğer hematolojik hastalıklar dışlandı. Atipik bulguları olan veya steroid ile tedavi edilecek hastalara tedaviye başlamadan önce tanıyı doğrulamak için kemik iliği aspirasyonu yapıldı.

Tedaviye yanıt kriterleri olarak; trombosit sayısı tedavisiz  $> 100 \times 10^9/L$  ise tam remisyon (TR), trombosit sayısı tedavi ile  $> 100 \times 10^9/L$  çıkıyorsa kısmi yanıt (KY), trombosit sayısı  $< 100 \times 10^9/L$  ve tedavi ile  $> 20 \times 10^9/L$  oluyorsa minör yanıt (MY), trombosit sayısı  $< 100 \times 10^9/L$  olup tedavi ile  $< 20 \times 10^9/L$  ise yanıtız (Y) olarak kabul edildi(81). Kronik İTP'li hastaların tedaviye yanıtları bu kriterlere göre belirlendi.

Hastalar kanama şiddetlerine göre 3 gruba ayrıldı:

- **Hafif şiddette kanamalı grup;** mukoza kanaması olmaksızın peteşi, purpura ve ekimozu olan hastaları,

- **Orta şiddette kanamalı grup;** mukoza kanaması (epistaksis, diş eti kanaması, menoraji ) olan hastaları,
- **Ağır şiddette kanamalı grup;** vücudun herhangi bir yerinde derhal müdahale veya kan transfüzyonu gerektiren hayatı tehdit edici kanama ve/veya intrakranyal kanaması olan veya gastrointestinal ve üriner sistem kanaması olan hastaları içerdi (75,76).

Hasta ve kontrol grubundan 2ml kan örneği %0.1 EDTA'lı steril tüpe alınarak -20 C° de depolandı. Örneklerin toplanması tamamlandıktan sonra kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı. IFNG geni için gen polimorfizmi (+874 A/T) analiz sonuçları kaydedildi.

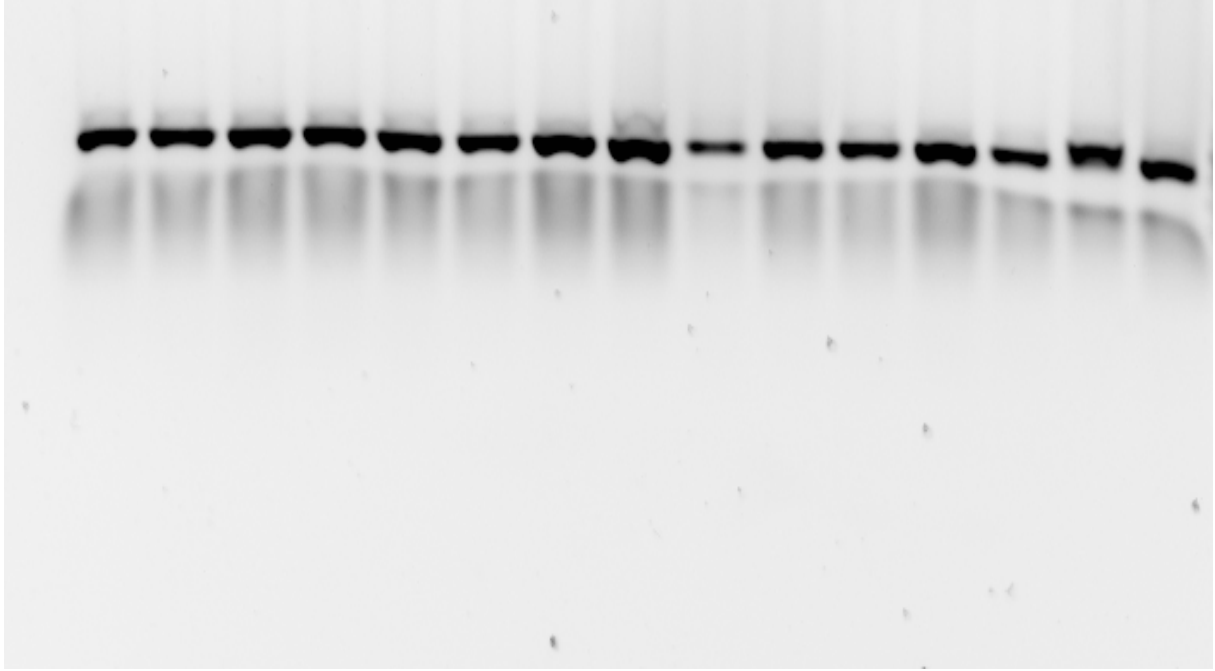
## **5.2 Yöntem**

### **5.2.1 DNA izolasyonu:**

DNA izolasyonu öncesinde -20 C°'de saklanan kan örnekleri oda ısısında eritildi. Genomik DNA Nucleospin Blood DNA ekstraksiyon kiti (Macherey-Nagel) kullanılarak elde edildi.

- 1- 200µl kan örneğine 25µl Proteinaz K ilave edilerek 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerine konuldu.
- 2- 200 µl B3 buffer eklenerek 10-20 sn vortex ile karıştırıldı.
- 3- 70 C de 15 dk inkübe edildi.
- 4- 210 µl %96-100 etanol ileve edildive tekrar vortex ile mix edildi.
- 5- Örnekler NucleoSpin Blood kolonlara aktarıldı ve 8500 rpm de 1 dak santrifüj edildi. Altta supernatan bulunan toplama tüpü atıldı.
- 6- NucleoSpin Blood kolon yeni bir 2ml lik tüpe konulararak 500 µl BW ilave edildi ve 2dk full speed santrifüj edildi.
- 7- NucleoSpin Blood kolon yeni bir tüpe konularak 600µl B5 ilave edilerek 1 dakika full speed santrifüj edildi.
- 8- Süpernatant atılarak yeni bir tüpe konuldu ve 1dk full speed santrifüj edildi.
- 9- NucleoSpin kolon 1,5 ml2lik santrifüj tüpüne konularak 100 µl 70C'de inkübe edilmiş BE ilave edildi. 1dk oda ısısında inkübe edildikten sonra 1dk full speed santrifüj edildi.

İzolasyonları gerçekleştirilen kan örneklerinin DNA saflıkları ve miktarları %1'lik 0,5µl/g/ml etidyum bromidli jelde 10V/cm olacak şekilde yürütüldü. Ultraviyole ışık altında fotoğrafı çekildikten sonra DNA'ların sağlam ve PCR için uygun olduğu belirlendi (**Resim 1**).



**Resim 1:** %1'lik etidyum bromidli agaroz jelde yürütülmüş DNA örnekleri.

## 5.2.2 Kullanılan gereçler, kimyasal maddeler ve solusyonlar

### 5.2.2.1 Gereçler

1. Elektroforez ekipmanı (Hoffman mini jel)
2. LightCycler 2,0
3. Güç kaynağı ( Pharmacia Biotech)
4. Santrifüj (Heaus)
5. Soğutmalı santrifüj (SorvallRMC 14)
6. Su banyosu (Grant)
7. Manyetik karıştırıcı (Nüve)
8. Tartı (Chyo)
9. Otomatik pipetler 0,2-200µl (Gilson)  
20-200µl (Gilson)  
100-1000µl (Gilson)

### 5.2.2.2 Kimyasal maddeler

1. Agaroz (Sigma Kat.No:A9539)
2. Borik asit (Sigma Kat.No:6768)
3. Brom fenol blue (Sigma Kat.No:5525)
4. İnterferon gama A874T Toolset for Lightcycler
5. Etanol (Carlo ERBA Kat No:414608)
6. Etidyum bromid (Sigma Kat.No:7637)
7. Fast Start DNA Master SYBR Green 10x
8. Trisma-Base (Sigma Kat.No:T8524)

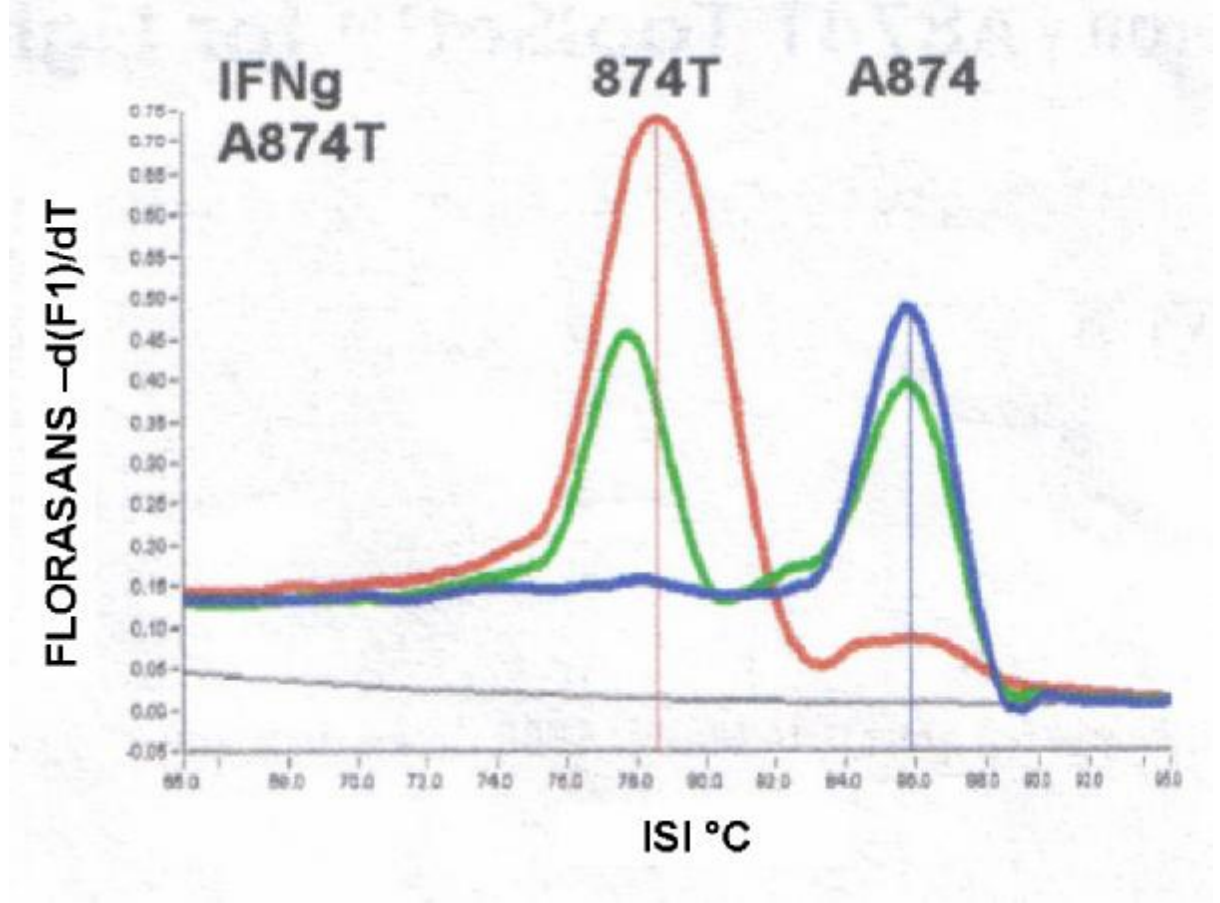
### 5.2.3. İnterferon gamma 874 (A $\rightarrow$ T) polimorfizminin değerlendirilmesi

Elde edilen ve PCR ile çoğaltılan DNA'larda 874 (A $\rightarrow$ T) polimorfizminin saptanmasında ticari olarak mevcut olan interferon gamma A874T ToolSet<sup>TM</sup> for LightCycler<sup>TM</sup> kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) kullanıldı. LightCycler<sup>TM</sup> (Roche Diagnostics) isimli aletle real time PCR ve melting curve analysis (erime eğrisi analizi) yapılarak A874T genotipi belirlendi.

İki mikrolitre izole genomik DNA ile 18 mikrolitre reaktif karışımı ve pozitif-negatif kontroller önceden soğutulmuş LightCycler<sup>TM</sup> cam kapiller tüpüne pipetlendi. Kapatılan kapiller tüpler santrifüj edildi ve LightCycler<sup>TM</sup> pervanesine yerleştirildi. IFN- $\gamma$  geninin amplifikasyon profili 95 °C' de 10 dk DNA denatürasyonu ve FastStart enzim aktivasyonunu, 20 saniye süreyle 95°C, 5 sn 60°C' primer bağlanma sıcaklığı, 72 °C sıcaklıkta DNA amplifikasyonunu, 45 siklus olarak tamamlandı. 90 saniye süreyle 40-95 °C arasında değişen melting curve analysisi, 30 saniye süreyle 40 °C'ye kadar düşen soğutma sürecini içeren siklüs proğramı sonlandırıldı. Bu siklüsler sırasında ısıtma ve soğutma işlemleri meydana gelirken amplifiye edilmiş DNA'nın 874. pozisyonunda mevcut olan spesifik baz ile reaksiyona giren reaktörlerin belirli ısılarda oluşturduğu floresansın (ışımaya) LightCycler<sup>TM</sup> aletinin sensörleri tarafından algılanması ile oluşturulan melting curve analysis ile 874. pozisyonunda hangi bazın (allelin) ve genotipin mevcut olduğu saptandı.

**Şekil 6**'da İnterferon-gamma geninin 874. pozisyonundaki olası genotipin melting curve analysisi (erime eğrisi analizi) görülmektedir. Burada mavi ile görülen eğri sağlıklı kişilerde görülen homozigot AA 874 genotipini, yeşil eğri heterozigot A874T genotipini, kırmızı eğri homozigot 874 TT genotipini, siyah eğri DNA içermeyen kontrol solüsyonunu simgelemektedir. Burada 78.6 °C'de yoğun ışımaya olması durumunda belirgin şekilde kırmızı eğri (874 TT), 85.8 °C'de yoğun ışımaya olması durumunda belirgin şekilde mavi eğri (874 AA

genotipi), hem 78,6 °C ve hem de 85,8 °C’de hafif eğri oluşması durumunda yeşil eğri (A874T) meydana geldiği görüldü. Burada daha önceden numara verilerek kaydedilmiş hasta ve kontrol grubu hasta sonuçları tek tek yorumlanarak kaydedildi.



**Şekil 6:** İnterferon-gamma geninin 874. pozisyonunda bulunan olası genotipin melting curve analysis ile şematik olarak görünümü.

### 5.3 İstatistiksel değerlendirme

Tüm istatistiksel değerlendirmeler bilgisayarda “SPSS for MS Windows Release 11,0” programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasında sayısal değişkenlerin karşılaştırılmasında “independent samples t tests” kullanılmıştır. Çoklu grup ortalamalarının karşılaştırılması “Pearson ki-kare” testi ile veya beklenen değerden biri <5 ise “Fisher’s Exact Test” ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık için  $p < 0,05$  kabul edilmiştir.



## 6. SONUÇLAR

Çalışmaya 1 Ocak 2000 ile 1 Eylül 2007 tarihlerinde tanı almış 35 akut, 40 kronik İTP'li hasta alınmıştır. Kontrol grubu daha önce tanımlanmış olan dışlama kriterlerini karşılayan 90 sağlıklı çocuktan oluşmuştur.

### 6.1. Akut ve kronik İTP'li hasta gruplarının özellikleri:

Akut ve kronik İTP'li hastaların yaşları, cinsiyet ve izlem süreleri, tanı anındaki hemoglobin, beyaz küre ve trombosit sayımları **tablo V**'de özetlenmiştir.

Kronik İTP'li hastaların yaş ortalaması ve beyaz küre sayısının akut İTP'li hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü (sırasıyla  $p=0,01$ ,  $p=0,04$ ). Kronik İTP'li hastaların tanı anındaki trombosit sayıları akut İTP'li hastalara göre yüksek idi (sırasıyla  $17,77\pm 18,29$ ,  $12,51\pm 17,37$ ), ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,2$ ). Her iki grup arasında cinsiyet, hemoglobin ve izlem süresi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla  $p=0,4$ ,  $p=0,41$  ve  $p=0,1$ ) (**Tablo V**).

**Tablo V:** Akut ve kronik İTP'li hastaların demografik ve laboratuvar özellikleri

|  | <b>Akut İTP</b><br><b>(n=35)</b>      | <b>Kronik İTP</b><br><b>(n=40)</b>     | <b>p</b> |
|--|---------------------------------------|--|----------|
| <b>Yaş (yıl)*</b>                      | 7,75±3,83<br>(0,5-15, median 7)       | 10,36±4,7<br>(0,5-18, median 10,25)    | 0,01     |
| <b>Cinsiyet (E/K)</b>                  | 15/20                                 | 21/19                                  | 0,4      |
| <b>Hemoglobin (g/dL)*</b>              | 11,7±1,12<br>(9,3-13,4, median 11,9)  | 11,4±1,15<br>(9,4-13,2, median 11,4)   | 0,41     |
| <b>Beyaz küre (x10<sup>9</sup>/L)*</b> | 8,371±2,830<br>(4,4-15,2, median 7,5) | 10,047±4,076<br>(4,6-23,3, median 8,7) | 0,04     |
| <b>Trombosit (x10<sup>9</sup>/L)*</b>  | 12,51±17,37<br>(1-98, median 7)       | 17,77±18,29<br>(0-90, median 12,5)     | 0,2      |
| <b>İzlem süresi (ay)*</b>              | 31,5±21,8<br>(6-90, median 22)        | 44,6±41,96<br>(6-156, median 30)       | 0,1      |

\* Değerler ortalama±standart sapma (minimum-maksimum, median) olarak verilmiştir.

Tüm İTP'li hastaların 36'sinde (%48) önceden geçirilmiş üst solunum yolu enfeksiyonu öyküsü, 4'ünde (%5) aşı öyküsü vardı. 35 hastada (%47) öyküde herhangi bir özellik yok idi.

Kanama semptomlarının şiddetine göre hastaların 59'u (%78,7) hafif, 10'u (%13,3) orta, 6'sı (%8) ağır grupta yer almakta idi. Ağır grupta yer alan hastaların birinde santral sinir sistemi kanaması, ikisinde gastrointestinal sistem kanaması ve üçünde makroskopik hematüri mevcut idi. Hafif veya orta grupta yeralan hastaların çoğu peteşi-purpura, ekimoz veya epistaksis-oral mukozal kanaması gibi mukokütanöz kanamalar ile başvurmuştu.

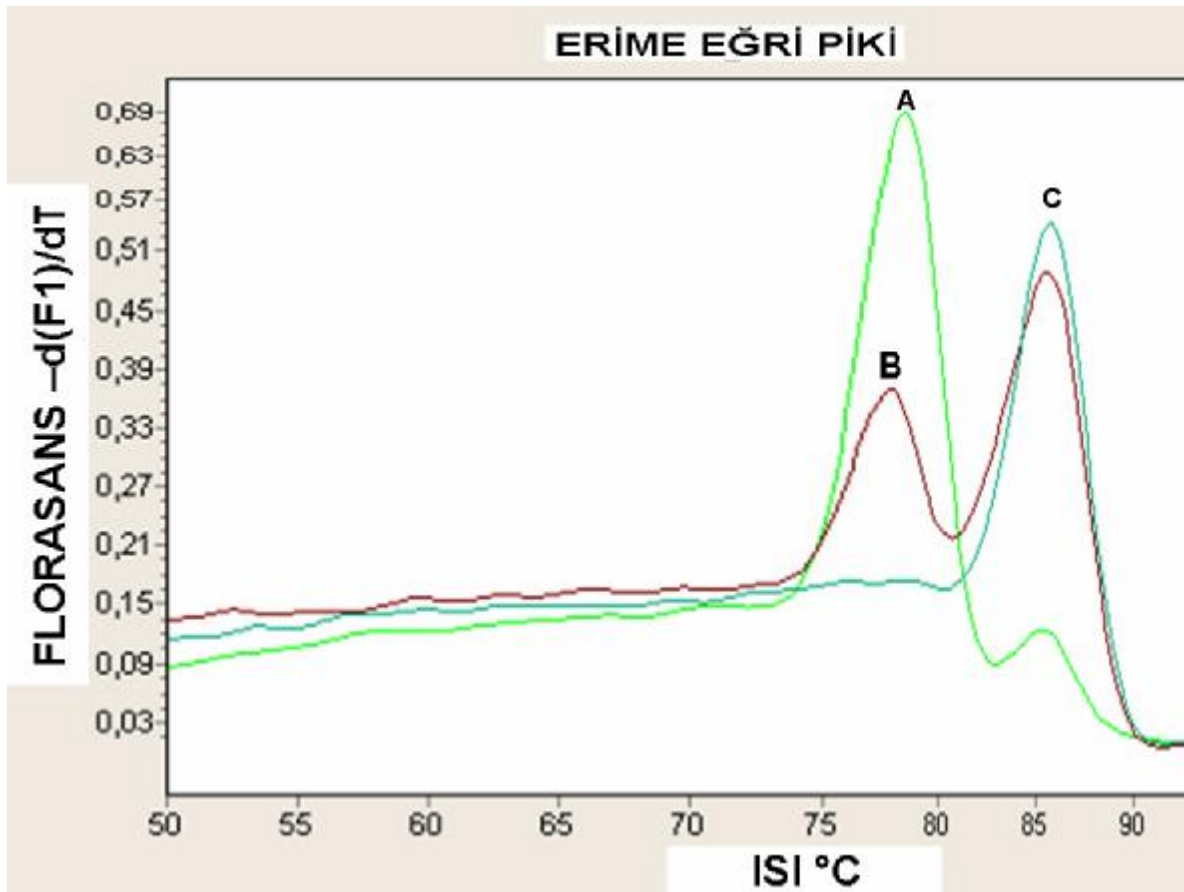
Tanı anında 38 hasta (%50,7) sadece steroid, 18 hasta (%24) sadece IVIG ve 12 hasta (%16) steroid+IVIG ile tedavi edilirken 7 hasta (%9,3) tedavisiz izlenmişti. Akut İTP'li 35 hastanın 18'i steroid (%51,4), 9'u IVIG (%25,7), beşi steroid+IVIG (%14,3) ile tedavi edilip, üçü (%8,6) tedavisiz izlenirken; kronik İTP'li 40 hastanın ise 20'si steroid (%50), 9'u IVIG (%22,5) ve 7'si steroid+IVIG (%17,5) ile tedavi edilmiş, dördü (%10) tedavisiz izlenmişti. Akut ve kronik İTP'li hastalarda başlangıç tedavi seçeneği açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0,984). Başlangıç tedavisine cevap oranları incelendiğinde, tedavi verilen 68 hastanın 54'ünde (%79,4) tam yanıt, 9'unda (%13,2) kısmi yanıt, 5'inde (%7,4) ise minör yanıt-yanıtsızlık gözlemlendi. Akut İTP'li hastaların başlangıç tedavi yanıtı 31/32'sinde (%96,8) tam yanıt iken, 1/32'sinde (%3,2) kısmi yanıt idi. Kronik İTP'li hastalarda ise başlangıç tedavi cevabı 23/36 (%63,9) hastada tam yanıt, 8/36 hastada (%22,2) kısmi yanıt ve 5/36 hastada (%13,9) minör-cevapsız yanıt şeklinde idi. Her iki grup arasında başlangıç tedavisine cevap açısından anlamlı fark saptandı (p=0,003).

Uzun dönem takip sonuçları incelendiğinde, kronik İTP'li hastaların 14'ünde (%35) tam yanıt, 14'ünde (%35) kısmi yanıt ve 12'sinde (%30) yanıtsızlık-minör yanıt saptandı. Kronik İTP'li hastalardan 7'sine (%17,5) splenektomi uygulanmıştı. Beş hastada (%71,5) tam cevap elde edilirken, 2 hastada (%28,5) minör cevap -cevapsızlık söz konusu idi. Kronik İTP'li hastaların izleminde steroid ve IVIG'den farklı olarak beş hastada anti-D, bir hastada monoklonal anti-CD20 antikoru (Ritüksimab), bir hastada siklosporin kullanılmıştı.

## **6.2. Hasta ve kontrol gruplarının intreferon-gamma gen polimorfizminin değerlendirilmesi**

Real-time PCR yöntemi ile interfron-gamma geninin birinci intronunda +874A/T polimorfizmi çalışılarak adenin ve timin allelleri ile (A $\rightarrow$ T) genotipi kaydedildi. **Şekil 7'**de üç farklı genotipe sahip hastalarımızın erime eğrisi grafiği görülmektedir. Başlangıçta hastalar İTP ve kontrol grubu olmak üzere iki gruba ayrıldı. İTP'li hastaların 21'inde AA (%28),

35'inde AT (%44,8) ve 19'unda TT (%27,2) genotipi saptandı. Kontrol grubunun ise 47'sinde AA (%52,2), 36'sında AT(%40) ve 7'sinde TT (%7,8) genotipi vardı. İTP'li hastalar ve kontrol grubu arasında genotip sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p=0,001$ ). Kontrol grubuna göre İTP'li hastalarda TT genotipi anlamlı derecede fazlaydı. Allel sıklığı açısından incelendiğinde İTP'li hastalarda A alleli 78 hastada (%52), T alleli 72 hastada (%48) mevcut iken, kontrol grubunda A alleli 130 hastada (%72,2), T alleli 50 hastada (%27,8) mevcut idi. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,0001$ )(**Tablo VI**).



**Şekil 7.** Hastalarımıza ait erime eğrilerinin şematik görünümü. A 'da görülen hastanın erime eğrisi 78,6 °C civarında pik yapmış olup homozigot AA genotipi ile uyumludur. B'deki hastanın erime eğrisi hem 78,6 °C hem de 85,8 °C'de pik yapmış olup heterozigot AT genotipi ile uyumludur. C'deki hastanın erime eğrisi ise sadece 85,8 °C'de pik yapmış olup homozigot TT genotipi ile uyumludur.

**Tablo VI:** İTP’li hastalar ile kontrol grubunda IFN- $\gamma$  874 (A  $\rightarrow$  T) polimorfizmi genotip ve allel sıklığı

| IFN- $\gamma$ 874 (A $\rightarrow$ T) | İTP hastaları (n=75) | Kontrol grubu (n=90) | p       |
|---------------------------------------|----------------------|----------------------|---------|
| Polimorfizmi                          | n(%)                 | n(%)                 |         |
| <b>Genotip sıklığı</b>                |                      |                      | <0,0001 |
| A/A                                   | 21 (28)              | 47 (52,2)            |         |
| A/T                                   | 35 (44,8)            | 36 (40)              |         |
| T/T                                   | 19 (27,2)            | 7 (7,8)              |         |
| <b>Allel sıklığı</b>                  |                      |                      | 0,001   |
| A                                     | 78 (%52)             | 130 (72,2)           |         |
| T                                     | 72 (%48)             | 50 (27,8)            |         |

Hastalar akut İTP, kronik İTP ve kontrol grubu olmak üzere üç gruba ayrıldığında da gruplar arasında AA, AT ve TT genotip sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (p=0,002). 35 akut İTP hastasının 11’inde (%31,4) AA, 13’ünde (%37,2) AT ve 11’inde (%31,4) TT polimorfizmi saptandı. Kronik İTP hastalarının 10’unda (%25) AA, 22’sinde (%45) AT ve 8’inde (%20) TT saptanırken kontrol grubunda AA 47 (%52,2) hastada, AT 36 (%40) hastada ve TT 7 (%7,8) hastada gözlemlendi (**Tablo VII**). AA, AT, TT polimorfizmi genotip sıklıkları açısından akut İTP hastaları ile kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı farklılık gözlemlendi (p=0,002). Aynı şekilde genotip sıklığı açısından kronik İTP hastaları ve kontrol grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark mevcut iken, akut ve kronik İTP hastaları arasında ise anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla p=0,008, p=0,285)(**Tablo VII**).

A ve T allel sıklığı açısından irdelendiğinde ise akut İTP hastaları ile kontrol grubu ve kronik İTP ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanırken, akut İTP hastaları ile kronik İTP hastaları arasında anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla p=0,002, p=0,002, p=0,896) (**Tablo VII**).

**Tablo VII:** Akut İT kronik İTP ve kontrol grubu arasında IFN- $\gamma$  874 (A $\rightarrow$ T) polimorfizmi genotip ve allel sıklığı

| IFN- $\gamma$ 874 (A $\rightarrow$ T) | Akut İTP (n=35) | Kronik İTP | Kontrol grubu (n=90) | p     |
|---------------------------------------|-----------------|------------|----------------------|-------|
| Polimorfizmi                          | n(%)            | n(%)       | n(%)                 |       |
| <b>Genotip sıklığı</b>                |                 |            |                      | 0,002 |
| A/A                                   | 11 (31,4)       | 10 (25)    | 47 (52,2)            |       |
| A/T                                   | 13 (37,2)       | 22 (45)    | 36 (40)              |       |
| T/T                                   | 11 (31,4)       | 8 (20)     | 7 (7,8)              |       |
| <b>Allel sıklığı</b>                  |                 |            |                      | 0,001 |
| A                                     | 36 (51,4)       | 42 (52,5)  | 130 (72,2)           |       |
| T                                     | 34 (48,6)       | 38 (47,5)  | 50 (27,8)            |       |

### 6.3. İnterferon-gamma +874A/T gen polimorfizmi ile kanama semptomlarının şiddeti ve kronik İTP’de tedavi cevabının değerlendirilmesi

Kanama semptomlarının şiddeti (hafif, orta, ağır) ve interferon-gamma +874A/T polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (p=0.09). Ayrıca kronik İTP’li hastaların tedavi yanıtları ile interferon-gamma +874A/T polimorfizmi karşılaştırıldığında da istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanmadı (p=0,568)(**Tablo VIII**). Akut İTP’li hastaların hemen hepsinde tam yanıt olduğu için tedaviye yanıt- interfeeron-gamma +874A/T polimorfizmi ilişkisi değerlendirilmedi. İlginç olarak tedaviye refrakter olan ve splenektomi uygulanmış yedi hastadan altı tanesi TT genotipine sahipken, bir hastada AT genotipi mevcuttu. Aynı zamanda splenektomiye cevapsız iki hasta da TT genotipi mevcuttu.

**Tablo VIII:** Kronik İTP’de IFN- $\gamma$  874 (A $\rightarrow$ T) polimorfizmi ile tedavi yanıtlarının değerlendirilmesi

|               | Tam yanıt<br>(n=14) | Kısmi yanıt<br>(n=14) | Minimal yanıt ve<br>Yanıtsız (n=12) | p     |
|---------------|---------------------|-----------------------|-------------------------------------|-------|
|               |                     |                       |                                     | 0,568 |
| AA            | 4 (%28,5)           | 3 (%21,5)             | 3 (%25)                             |       |
| AT            | 6 (%43)             | 10 (%71,3)            | 6 (%50)                             |       |
| TT            | 4 (%28,5)           | 1 (%7,2)              | 3 (%25)                             |       |
| <b>Toplam</b> | 14 (%100)           | 14 (%100)             | 12 (%100)                           |       |

## 7. TARTIŞMA

İdiopatik trombositopenik purpura sıklıkla geçirilmiş bir üst solunum yolu enfeksiyonu sonrası birkaç hafta içinde peteşi, purpura, ekimoz gibi mukokutanöz kanama semptomları ile ortaya çıkan nadiren intrakranyal kanama gibi ciddi kanamalara neden olabilen benign bir hematolojik hastalıktır (1,2,8,12). En sık 2-6 yaş arasında ortaya çıkmakta olup, kız ve erkeklerde eşit sıklıkta görülmektedir (27,29,30). Segal ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ileri yaş çocuklarda ve erişkinlerde kız/erkek oranının 1.9 olduğu ifade edilmiştir (31). Belletrutti ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada da kronik İTP'li hastalarda tanı yaşının ve başvuru anındaki trombosit sayısının akut İTP'li hastalara göre anlamlı şekilde yüksek olduğu gösterilmiştir (135-137). Bizim hastalarımızda da kronik İTP'li hastaların tanı anındaki yaş ortalamaları akut İTP hastalarına göre anlamlı derecede yüksek idi ( $p=0.01$ ). Kronik İTP'li hastalarda tanı anındaki trombosit sayısı da yüksekti ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0.2$ ).

İlk tanı sonrasında hastalarımızın 38'i (%50,7) sadece steroid, 18'i (%24) sadece İVİG, 12'si (%16) steroid+İVİG alırken, 7'si (%9,3) tedavisiz izlenmişti. Akut ve kronik İTP'li hastalarda başlangıç tedavi seçeneği açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,984$ ). Bu bulgular literatür ile uyumlu idi (138). Akut İTP'li hastalar ile kronik İTP'li hastaların başlangıç tedavi cevabı oranları açısından anlamlı fark saptandı( $p=0,003$ ). Bir hastamızda (%1,3) intrakranyal kanama izlenirken hiçbir hastamız kanama nedeniyle kaybedilmedi. Bu oranlar daha önceki literatür bulguları ile uyumlu idi (9,82).

İTP'de patogenetik mekanizmalar hala kesin olarak bilinmemektedir. Özellikle akut İTP'de ÜSYE veya aşılama öyküsünün bulunması nedeniyle, epitop benzerliği sonucunda gelişmiş antikörlerin trombosit yıkımını artırdığı ve trombositopeniye neden olduğu düşünülmektedir (1,2). Kronik İTP'de ise  $T_H1$  hakimiyeti ve bununla ilişkili IFN- $\gamma$ , IL-2 ve IL-10 gibi sitokinlerin artmış olması başka immünolojik mekanizmaların varlığını düşündürmektedir (12,26,60,67,68,139).

İTP'nin genetik yatkınlık zemininde çevresel faktörlerin etkisi ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. Daha önce İTP'li hastalarda doku grubu antijenleri, Fc $\gamma$  reseptör polimorfizmi, human platelet antijen (HPA) polimorfizmi, TGF-beta gen polimorfizmi gibi genetik faktörler ile hastalığın patogenezi arasında ilişkiyi araştıran çalışmalar yapılmıştır. Bazı yayınlarda belli etnik gruplarda HLA-DRW2 ve DRB1\*0410 allelleri sıklığı İTP'li hastalarda yüksek bulunurken, bazı yayınlarda da HLA-DRB1\*1501'in splenktomiye kötü yanıt ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Benzer sonuçlar Fc $\gamma$  reseptör polimorfizmi ve HPA polimorfizmi ile de gösterilmiştir. Bu çalışmalarda sonuçların toplumdan topluma değiştiği,

bu nedenle genetik yatkınlık açısından her toplumun kendi çalışmasını yapması gerektiği ifade edilmiştir (8,13,14,122).

İTP gelişiminde yukarıda bahsedilen birçok genetik faktör yanında, 2006 yılında Sood ve arkadaşları tarafından yeni bir fikir ortaya atılmıştır (16). Bu çalışmada beş İTP'li ve beş sağlıklı kişinin mikroarray yöntemi ile gen ekspresyon profili çıkartılmıştır. Bu çalışmanın amacı mikroarray yöntemi ile ortaya çıkan gen profilindeki bulguların ileri dönemde hastalığın kronikleşip kronikleşmeyeceği ve tedaviye cevabın belirlenmesi gibi durumları aydınlatmada yardımcı olup olmayacağını belirlemek olarak verilmiştir. Çalışma sonucunda özellikle İTP'li hastalarda interferon tarafından indüklendiği bilinen interferon ilişkili genlerin ekspresyonunun belirgin olduğu ve interferon ilişkili genlerin ekspresyonunun kontrollere göre 12 kat fazla olduğu görülmüştür (16).

İnterferon-gamma lenfositler ve NK hücreleri tarafından salgılanan bir polipeptittir. En önemli fonksiyonlarından birisi doğal T lenfositlerden  $T_H1$  lenfosit gelişmesini sağlamasıdır. Ortamda artan  $T_H1$  lenfositlerden tekrar interferon-gamma salgılanarak  $T_H1$  lenfosit gelişimini uyarılacaktır. Bunun sonucunda kısır bir döngü oluşacaktır (20). İnterferon-gamma geninde olası bir defekt artmış sitokin üretimi ve  $T_H1$  yanıtına neden olabilecek ve bu da diğer otoimmün hastalıklar yanında İTP gelişmesini kolaylaştırabilecektir. Biz de İTP'de intreferon-gamma +874A/T gen polimorfizminin etyolojide rolü olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

İnterferon-gammanın kromozomu 12q24.1 lokalizasyonunda olup dört ekzon üç intron içermektedir. İlk introndaki 874. pozisyondaki A→T polimorfizmi değişik oranlarda interferon-gamma üretimi ile ilişkili bulunmuştur. Bazı çalışmalarda sağlıklı kişilerde bulunan AA genotipinde interferon-gamma üretimi düşük iken TT genotipi varlığında interferon-gamma üretimi yüksek olarak bulunmuştur (128,129). Aynı şekilde diğer bir çalışmada yüksek miktarda T alleli varlığında interferon-gamma sitokin üretiminin fazla olduğu, A alleli hakimiyeti durumunda ise interferon-gamma sitokin üretiminin düşük olduğu gösterilmiştir (140). Bu bulgularda da hastalıkların genotipi ile klinik şiddeti arasında ilişki olabileceğini düşündürmektedir.

İnterferon-gamma +874A/T polimorfizmi ile klinik arasındaki ilişki birçok otoimmün hastalıkta araştırılmıştır. Ito ve arkadaşlarını yaptığı Hashimoto hastalığı ve dirençli Graves hastalığı gibi otoimmün tiroid patolojilerini içeren bir çalışmada ağır Hashimoto hastalığı olan grupta hafif Hashimoto hastalığı ve kontrol grubuna göre T allel sıklığının anlamlı şekilde fazla olduğu ( $p=0,047$ ) ve bunun da artmış interferon-gamma üretimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak aynı gruplar genotip açısından karşılaştırıldığında anlamlı fark

saptanmamıştır ( $p>0,05$ ). Hashimoto hastaları tiroglobulin antikoru negatif ve pozitif olmak üzere iki gruba ayrıldığında tiroglobulin antikoru negatif olan grupta T allel penetrasyonunun anlamlı şekilde fazla olduğu saptanmıştır ( $p=0,029$ ). Burada da gruplar arasında genotip açısından anlamlı fark saptanmamıştır (62). Bu bulgular sonucunda değişik allel veya genotip sıklıklarının hastalarda farklı klinik veya laboratuvar testlerinin ortaya çıkmasına neden olabildiği görülmektedir.

Hindistanda Rekha ve arkadaşları tarafından yapılmış diğer bir çalışmada ise 106 Hashimoto hastası, 26 otoimmün olmayan tiroid hastası, 60 Graves' hastası ve 150 kontrol grubu çalışmaya alınmıştır. Hashimoto tiroiditi olan hastalarda yüksek sitokin üretimi ile ilişkili TT genotipinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmüştür ( $p<0,001$ ). Diğer yandan Graves' hastalığına sahip hastalarda ise ilginç olarak düşük sitokin üretimi ile ilişkili AA genotipinin yüksek olduğu saptanmıştır ( $p=0,03$ ). Sonuçta Hashimoto hastalığının yüksek oranda TT genotipi, Graves hastalığının yüksek oranda AA genotipi bulundurduğu bildirilmiştir (131). Aynı zamanda diğer otoimmün endokrinolojik hastalık olan tip 1 diyabette de interferon-gamma ile hastalığın ilişkili olduğunu bildiren veya karşıt görüşte olan çalışmalar vardır (61,132,133).

Diğer bir otoimmün hastalık olan sistemik lupus eritematozisli (SLE) hastalarda da interferon-gamma gen polimorfizmi ile klinik arasındaki ilişki araştırılmıştır. 154 SLE hastası ve 154 kontrol arasında yapılan çalışmada hastalar ile kontrol grubu arasında allel ve genotip sıklığı açısından anlamlı fark saptanmamıştır. Artriti olan hastalar ile artriti olmayan hastalar arasında yapılan karşılaştırma sonucunda A alleli ve AA genotip sıklığının artritli hastalarda daha fazla olduğu görülmüştür ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,006$ )(141). Bu bulgular da farklı genetik penetransın aynı hasta grubunda farklı kliniği ortaya çıkarabileceği fikrini desteklemektedir.

Bizim çalışmamıza 75 İTP (35 akut, 40 kronik) hastası ve 90 sağlıklı kontrol olgusu alındı. Tüm İTP hastaları ile kontrol grubu arasında hem TT genotipi hem de T allel sıklığı açısından anlamlı fark mevcuttu; TT genotipi ve T alleli İTP'li olgularda belirgin fazlaydı. Hastalar akut, kronik ve kontrol grubu olacak şekilde üç gruba ayrıldığında da gruplar arasında AA, AT, TT genotipi ve A, T allelleri açısından anlamlı fark saptandı. Hem akut İTP, hem de kronik İTP hastaları ve kontrol grubu arasında genotip ve allel sıklığı açısından anlamlı fark saptanırken, akut İTP hastaları ile kronik İTP hastaları arasında ise genotip ve allel sıklığı açısından anlamlı fark saptanmadı.

Biz bu çalışmayı yürütürken, interferon-gamma +874A/T polimorfizmi ile İTP arasındaki ilişkiyi değerlendiren bir başka çalışma yayınlanmıştır. Çocuk ve erişkin



İTP'lerinden oluşan 196 hasta ve 128 sağlıklı kontrolün çalışıldığı Çin'de yapılan bu çalışmada AA, AT ve TT genotipi ile A ve T alleli açısından hastalar ve kontrol grubu arasında fark saptanmamıştır. Hastalar başlangıç yaşına göre < 14 yaş (çocuk hastalar) ve >14 yaş (erişkin hastalar) olmak üzere iki gruba ayrılmış ve 14 yaş altındaki 75 hastanın 11 tanesi akut, 64 tanesi kronik İTP hastası olarak çalışmaya alınmıştır. Bunlar kendi aralarında karşılaştırıldığında tüm çocuk İTP hastaları ile kontrol grubu arasında genotip ve allel farklılığı açısından anlamlı fark saptanmamıştır. Aynı sonuç akut ve kronik İTP'li çocuklar ile kontrol grubunun karşılaştırılması sonrası da görülmüştür. Erişkin hasta grubunda da, tüm hastalar, akut ve kronik İTP hastaları ile kontrol grubu karşılaştırılmasında genotip ve allel penetrasyonu açısından anlamlı fark saptanmamıştır (143).

Polimorfizmlerin sıklığı ve klinik ile ilişkisi toplumdan topluma değişiklik gösterebilmektedir. Avrupada yapılmış Almanya, Finlandiya, Kuzey İtalya, Danimarka, Sardunya ve İsveçli multiple skleroz hastalarından oluşan çok merkezli bir çalışmada, tüm hastalar ile kontrol grubu arasında interferon-gamma CA tekrar polimorfizmi arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Hastalar etnik kökenine göre ayrı ayrı değerlendirildiğinde sadece İsveçli hastalar ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunurken, diğer ülke hastaları arasında anlamlı fark saptanmamıştır (130). Benzer şekilde Khani-Hanjani ve arkadaşları Kanadalı romatoid artritli hastalarda hastalığın şiddeti, radyolojik bulguları ile interferon-gamma CA tekrar polimorfizmi arasında anlamlı ilişki saptarken, Constantin ve arkadaşları tarafından Fransız hastalarda benzer bir ilişki saptanmamıştır (65,142). İTP'li olgularda HLA-DRW2, HLA-DR4 ve DRB1\*0410 allelleri sıklığı da çeşitli etnik gruplarda farklılık göstermektedir (8,121).

Çalışmamızda kanama semptomlarının şiddeti ve interferon-gamma polimorfizmi arasında ilişki saptanmadı. Aynı şekilde kronik İTP'li hastalarda tedavi cevabı ile polimorfizm arasında da ilişki saptanmadı. İlginç olarak splenektomi yapılmak zorunda kalınan kronik İTP'li 7 hastadan 6'sı TT, biri AT polimorfizmine sahipti. Hasta sayısı az olmasına rağmen, bu da farklı genotiplerde farklı klinik prezentasyon ve tedavi cevabı olabileceği hipotezini desteklemektedir.

Sonuç olarak interferon-gamma immün sistem regülasyonunda önemli rol oynamakta ve otoimmün hastalık gelişmesinde kritik öneme sahip Th1 hakimiyetinin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Bizim çalışmamız sonucunda interferon-gamma +874A/T polimorfizminin toplumumuzda İTP gelişmesine yatkınlık yaratabileceği düşünüldü. Ancak akut-kronik İTP gelişmesi, kanama semptomlarının şiddeti, kronik İTP'de tedavi cevabı ile interferon-gamma

+874 A/T gen polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı. Bu ilişki toplumdan topluma değişebileceğinden, her toplum kendi gen polimorfizmini çalışarak interferon-gamma ve İTP gelişimi arasındaki riskini belirlemelidir.

## 8. SONUÇLAR

1. Çalışmaya 35 akut İTP, 40 kronik İTP ve 90 sağlıklı çocuk olmak üzere toplam 165 çocuk alınmıştır.
2. Akut İTP'li 35 hastanın 15'i (%42,8) erkek, 20'si kız (%47,2), kronik İTP'li 40 hastanın 21'i (%52,5) erkek, 19'u (%47,5) kız olarak bulunmuştur. İki hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0,4$ ).
3. Akut İTP'li hastaların yaş ortalaması  $7,75\pm 4,7$  (6 ay-18 yaş, median 7 yaş), kronik İTP'li hastaların yaş ortalaması  $10,36\pm 3,83$  (6 ay-17 yaş, median 10,25 yaş) idi. İki hasta grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p=0,01$ ).
4. Her iki grup arasında hemoglobin, trombosit sayısı ve izlem süresi açısından anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla  $p=0,41$ ,  $p=0,2$ ,  $p=0,1$ ).
5. Hastaların 59'u (%78,7) hafif, 10'u (%13,3) orta, 6'sı (%8) ağır-klinik grupta yer almaktaydı.
6. Akut İTP'li 35 hastadan 18'i steroid (%51,4), 9'u İVİG (%25,7), beşi steroid+İVİG (%14,3) ile tedavi edilmiş, üçü (%8,6) tedavisiz izlenmişti. Kronik İTP'li 40 hastanın 20'si steroid (%50), 9'u İVİG (%22,5), 7'si steroid+İVİG (%17,5) ile tedavi edilmiş; dördü (%10) tedavisiz izlenmişti. Akut ve kronik İTP'li hastalarda başlangıç tedavi seçeneği açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,984$ ).
7. Kronik İTP'li hastaların 14'ünde (%35) tam yanıt, 14'ünde (%35) kısmi yanıt ve 12'sinde (%30) yanıtızlık-minör yanıt saptandı.
8. Kronik İTP'li hastalardan 7 tanesine (%17,5) splenektomi uygulandı. Beş tanesinde (%71,5) tam cevap elde edilirken, 2 tanesinde (%28,5) minör cevap-cevapsızlık söz konusuydu.
9. İTP'li hastalar ve kontrol grubu arasında genotip sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark mevcut idi ( $p=0,001$ ). Kontrol grubuna göre İTP'li hastalarda TT genotipi anlamlı derecede fazla idi.
10. İTP'li hastalar ve kontrol grubu arasında allel sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark mevcut idi ( $p=0,001$ ). Kontrol grubuna göre İTP'li hastalarda T alleli anlamlı derecede fazlaydı.
11. Hastalar akut İTP, kronik İTP ve kontrol grubu olmak üzere üç gruba ayrıldığında da gruplar arasında genotip sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ( $p=0,002$ ). Akut İTP-kontrol, kronik İTP-kontrol karşılaştırmasında anlamlı fark saptanırken, akut İTP-kronik İTP karşılaştırmasında anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla  $p=0,002$ ,  $p=0,008$ ,  $p=0,285$ ).

12. Allel sıklığı açısından bakıldığında ise akut İTP-kontrol ve kronik İTP kontrol karşılaştırmasında anlamlı fark saptanırken, akut İTP ve kronik İTP hastaları arasında anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla  $p=0,002$ ,  $p=0,002$ ,  $p=0,896$ ).
13. Kanama semptomlarının şiddeti (hafif, orta, ağır) ve interferon-gamma +874A/T polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ( $p=0,09$ ).
14. Kronik İTP'li hastaların tedavi yanıtları ile interferon-gamma +874A/T polimorfizmi arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanmadı ( $p=0,568$ ).
15. Splenektomi uygulanmış yedi hastadan altı tanesi TT genotipine sahipken, bir hastada AT genotipi mevcuttu.

## **9. KAYNAKLAR**

1. Psaila B, Bussel JB. Immune thrombocytopenic purpura. *Hematol Oncol Clin N Am* 2007;21:743–759.
2. Cooper N, Bussel J. The pathogenesis of immune thrombocytopenic purpura. *Br J Hem* 2006;133:363-374.
3. Mattia DD, Principe DD, Vechio GD, et al. Study group acute childhood thrombocytopenic purpura: AIEOP consensus guidelines for diagnosis and treatment. *Haematologica* 2000; 85: 420-424.
4. Kühne T, Imbach P, Bolton-Maggs P, Berchtold W, Blanchette V, Buchanan GR. Newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood: an observational study. *Lancet* 2001;358:2122-2125.
5. Imbach P. Immune thrombocytopenic purpura. In: Lilleyman J, Hann I and Blanchette V, editors. *Pediatric Hematology*. Second edition, London: Churchill Livingstone, Harcourt publishers limited, 1999; 437-453.
6. Blanchette V, Carcao M. Approach to the investigation and management of immune thrombocytopenic purpura in children. *Semin Hematol* 2000; 37: 299-314.
7. Chu YW, Korb J, Sakamoto KM. Idiopathic thrombocytopenic purpura. *Pediatr Rev* 2000; 21:95-103.
8. Cines DB, Blanchette VS, Douglas B, Chir B. Immune thrombocytopenic purpura. *N Eng J Med* 2002;346:995-1008.
9. Sutor AH, Harms A, Kaufmehl K. Acute immune thrombocytopenia (ITP) in childhood: retrospective and prospective survey in Germany. *Semin Thromb Haemost* 2001;27:253-267.
10. Frederikson H, Schmidt K. The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults increases with age. *Blood* 1999;94:909-913.
11. George JN, Raskolo GE. Idiopathic thrombocytopenic purpura: A concise summary of the pathophysiology and diagnosis in children and adults. *Semin Hematol* 1998; 35:5-8.
12. Zhou B, Zhao H, Yang RC, Han ZC. Multi-dysfunctional pathophysiology in ITP. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2005;54:107–116.
13. Kim BS, Song KS. Genetic polymorphism of human platelet specific antigens (HPA) in patients with immune thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1997;suppl:PS1037.

14. Fujimoto TT, Inove M, Shimomura T, Fujimura K. Involvement of Fc $\gamma$  receptor polymorphism in the therapeutic response of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2001;115:125-130.
15. Gratama JW, D'Amaro J, de Koning J, den Ottolender GJ. The HLA-system in immune thrombocytopenic purpura: Its relation to the outcome of therapy. *Br J Haematol* 1984;56:287-293.
16. Sood R, Wong W, Jeng M, Zehnder JL. Gene expression profile of idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Pediatr Blood Cancer* 2006;47:S675-677.
17. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997;15: 749–795.
18. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 1993;11: 571–611.
19. Revel M, Chebath J. Interferon-activated genes. *Trends Biochem Sci* 1996;11: 166–170.
20. Abbas AK, Litchman AH. Cytokines. In: Abbas AK, Litchman AH, editors. *Cellular and molecular immunology*. Fifth edition, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005:243-274.
21. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145–73.
22. Abbas AK, Litchman AH. Diseases caused by immune responses: Hypersensitivity and autoimmunity. In: Abbas AK, Litchman AH, editors. *Cellular and molecular immunology*. Fifth edition, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005: 411-431.
23. Mosmann TR, Cerwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2347-2357.
24. Mosmann TR, Schumacher JH, Street N, et al. Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD $^{+}$  T cells. *Immuol Rev* 1991;123:209-229.
25. Romagnani S. Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol Today* 1991;12:256-257.
26. McMillan R. The pathogenesis of chronic immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 2007 ;44:S3-S11
27. Wilson DB. Acquired platelet defects. In: Nathan DG, Ginsburg D, Orkin SH, Look AT, editors. *Nathan and Oski's Hematology of infancy and childhood*. Sixth edition, Philadelphia: Saunders company, 2003:1597-1630.

28. Kuhne T. Idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood: controversies and solutions. *Pediatr Blood Cancer* 2006;47:650-652.
29. Zeller B, Rajantie J, Hedlund-Treutiger I, et al. Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura in the Nordic countries: epidemiology and predictors of chronic disease. *Acta Paediatr* 2005;94:178–184.
30. Hedman A, Henter J, Hedlund I, et al. Prevalence and treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura of childhood in Sweden. *Acta Paediatr* 1997;86:226–227.
31. Segal J, Powe N. Prevalence of immune thrombocytopenia: analyses of administrative data. *J Thromb Haemost* 2006;4:2377–2383.
32. McMillan R. Autoantibodies and autoantigens in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 2000;37:239-248.
33. Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, et al. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med* 1951;38: 1–10.
34. Harrington WJ, Sprague CC, Minnich V, et al. Immunologic mechanisms in idiopathic and neonatal thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med* 1953;38:433–469.
35. 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. *Annals of the New York Academy of Science* 1965, 124:499–542.
36. Dixon RH, Rosse WF. Platelet antibody in autoimmune thrombocytopenia. *Br J Hem* 1975; 31:129–134.
37. van Leeuwen EF, van der Ven JT, Engelfriet CP, von dem Borne AE. Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. *Blood*. 1982;59:23-26.
38. Berchtold P, Mc Millan R, Tani P, Sommerville-Nielsen, Blanchette VS. Autoantibodies against platelet membrane glycoproteins in children with acute and chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 1989;74:1600-1602.
39. Imbach P, Tani P, Berchtold P, et al. Different forms of chronic childhood thrombocytopenic purpura defined by antiplatelet autoantibodies. *J Pediatr* 1991;118:535-539.
40. Nielsen HE, Andersen EA, Carlsen N, Nir M, Taaning E. Presence of platelet antibodies idiopathic thrombocytopenic purpura may discriminate acute from chronic disease. *Acta Paediatr* 2003;92:1208-1210.

41. Thomas S. Platelet membrane glycoproteins in haemostasis. *Clin Lab* 2002;48:247-262.
42. Movassaghi N, Moorhead J, Leikin S. Antiplatelet antibodies in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Dis Child* 1979;133:257-259.
43. Taub JW, Warriar I, Holtkamp C, Beardsley DS, Lusher JM. Characterization of autoantibodies against the platelet glycoprotein antigens IIb/IIIa in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 1995;48:104-107.
44. McMillan R. Antiplatelet antibodies in chronic adult immune thrombocytopenic purpura: assays and epitopes. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003;Suppl 1:857-861.
45. McMillan R, Tani P, Millard F, et al. Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. *Blood* 1987;70:1040-1045.
46. Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Mueller-Eckhardt C. Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood* 1987;70:1722-1726.
47. Kelton JG, Murphy WG, Lucarelli A, et al. A retrospective comparison of four techniques for measuring platelet-associated IgG. *Br J Hematol* 1989;97:105-108.
48. Mueller-Eckhardt C, Kayser C, Mersch-Baumert K, et al. The clinical significance of platelet-associated IgG: A study of 298 patients with various disorders. *Br J Hematol* 1980;46:123-131.
49. McMillan R, Luiken GA, Levy R, Yelenosky R, Longmire RL. Antibody against megakaryocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura. *JAMA* 1978;239:2460-2462.
50. Chang M, Nakagawa PA, Schwartz M. Effects of immune thrombocytopenic purpura (ITP) patient plasma on in vitro megakaryocytopoiesis. *Blood* 1999;94 Suppl 1:646a.
51. Vainchenker W, Deschamps JF, Bastin JM, et al. Two monoclonal antiplatelet antibodies as markers of human megakaryocyte maturation: immunofluorescent staining and platelet peroxidase detection in megakaryocyte colonies and in vivo cells from normal and leukemic patients. *Blood* 1982;59:514-521.
52. Chang M, Nakagawa PA, Williams SA, et al. Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 2003;102:887-895.
53. Alimardani G, Guichard J, Fichelson S, Cramer EM. Pathogenic effects of antiglycoprotein Ib antibodies on megakaryocytes and platelets. *Thromb Haemost* 2002;88:1039-1046.



54. Wang ZY, Shen ZX. Megakaryocytes and platelets in immune thrombocytopenic purpura. *Baillieres Clin Haematol* 1997;10:89-107.
55. Houwerzijl EJ, Blom NR, van der Want JJL, et al. Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2004;103:500-506.
56. Kaznelson, P. Verschwinden die hamorrhagischen diathese bei einem halle von essentielle thrombopenie (Frank) nach milz extirpation. *Wiener Klinische Wochenschrift* 1916;29;1451–1454.
57. Doan CA, Bouroncle BA, Wiseman BK. Idiopathic and secondary thrombocytopenic purpura: clinical study and evaluation of 381 cases over a period of 28 years. *Annals of Internal Medicine* 1960;53:861.
58. Olsson B, Andersson PO, Jernas M, et al. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nat Med* 2003;9:1123–1124.
59. Sayeh E, Sterling K, Speck E, et al. IgG antiplatelet immunity is dependent on an early innate natural killer cell-derived interferon-gamma response that is regulated by CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood* 2004;103:2705–2709.
60. Panitsas FP, Theodoropoulou M, Kouraklis A, et al. Adult chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) is the manifestation of a type-1 polarized immune response. *Blood* 2004;103:2645–2647.
61. Morris GA, Lowe CE, Cooper JD, et al. Polymorphism discovery and association analyses of the interferon genes in type 1 diabetes. *BMC Genet* 2006;7:12-18.
62. Ito C, Watanabe M, Okuda N, Watanabe C, Iwatani Y. Association between the severity of Hashimoto's disease and the functional +874A/T polymorphism in the interferon-gamma gene. *Endocr J* 2006;53:473-478.
63. Schrijver HM, Hooper-van Veen T, van Belzen MJ, et al. Polymorphisms in the genes encoding interferon-gamma and interferon-gamma receptors in multiple sclerosis. *Eur J Immunogenet* 2004;31:133-140.
64. Lee JY, Goldman D, Piliero LM, Petri M, Sullivan KE. Interferon-gamma polymorphisms in systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2001;2:254-257.
65. Constantin A, Navaux F, Lauwers-Cancès V, et al. Interferon gamma gene polymorphism and susceptibility to, and severity of, rheumatoid arthritis. *Lancet* 2001;358:2051-2052.

66. Semple JW, Milev Y, Cosgrave D, et al. Differences in serum cytokine levels in acute and chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: relationship to platelet phenotype and antiplatelet T-cell reactivity. *Blood* 1996;87:4245-4254.
67. Wang T, Zhao H, Ren H, et al. Type 1 and type 2 T-cell profiles in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Haematologica* 2005;90:914-923.
68. Ogawara H, Handa H, Morita K, et al. High Th1/Th2 ratio in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 2003;71:283-288.
69. Culić S, Labar B, Marusić A, Salamunić I. Correlations among age, cytokines, lymphocyte subtypes, and platelet counts in autoimmune thrombocytopenic purpura. *Pediatr Blood Cancer* 2006;47:S671-S674.
70. Mouzaki A, Theodoropoulou M, Gianakopoulos I, Vlaha V, Kyrtsionis MC, Maniatis A. Expression patterns of Th1 and Th2 cytokine genes in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) at presentation and their modulation by intravenous immunoglobulin G (IVIg) treatment: their role in prognosis. *Blood* 2002;100:1174-1179.
71. Stasi R, Evangelista ML, Stipa E, Buccisano F, Venditti A, Amadori S. Idiopathic thrombocytopenic purpura: current concepts in pathophysiology and management. *Thromb Haemost.* 2008;99:4-13.
72. Di Paola JA, Buchanan GR. Immune thrombocytopenic purpura. *Pediatr Clin N Am* 2002;49:911-928.
73. George JN. Initial management of immune thrombocytopenic purpura in children: Is supportive counseling without therapeutic intervention sufficient? *J Pediatr* 2000;137:598-600.
74. Lilleyman JS. Management of childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br Haematol* 1999;105:871-875.
75. Bolton- Maggs P. Severe bleeding in idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25 Supl 1: S47-S51.
76. Buchanan GR. Bleeding signs in children with idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003;25 Supl 1: S42-S46.
77. Reid MM. Bone marrow examination before steroids in thrombocytopenic purpura or arthritis. *Acta Paediatr* 1992;81:1052-1053.
78. Calpin C, Dick P, Poon A, Feldman W. Is bone marrow aspiration needed in acute childhood idiopathic thrombocytopenic purpura to rule out leukemia? *Arch Pediatr Adolesc Med* 1998;152:345-357.

79. Anoop P. Decision to perform bone marrow aspiration in immune thrombocytopenic purpura must be based on evidence. *Pediatr Hematol Oncol* 2008;25:91-92.
80. Halperin DS, Doyle JJ. Is bone marrow examination justified in idiopathic thrombocytopenic purpura? *Am J Dis Child* 1988;142:508-511.
81. George JN, Woolf SH, Raskob GE, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* 1996;88:3-40.
82. Bolton-Maggs PH, Moon I. Assessment of UK practice for management of acute childhood idiopathic thrombocytopenic purpura against published guidelines. *Lancet* 1997; 350: 620-623.
83. McMillan R, Longmire RL. In vitro platelet phagocytosis by splenic leucocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Eng J Med* 1974;290:249.
84. McMillan R, Longmire R. The effect of corticosteroids on human IgG synthesis. *J Immunol* 1976;116:1592.
85. Robson HN, Duthie JJR. Capillary resistance and adrenocortical activity. *Br J Med* 1950;2:971.
86. Kitchen CS, Weiss L. Amelioration of endothelial abnormalities by prednisone in experimental thrombocytopenia in the rabbit. *J Clin Invest* 1977;60:1129.
87. Kitchen CS, Pendergast JF. Human thrombocytopenia is associated with structural abnormalities of the endothelium that are ameliorated by glucocorticoid administration. *Blood* 1986; 67: 203-206.
88. Brajchman MA, Senyi AF. Shortening of the bleeding time in rabbits by hydrocortisone caused by inhibition of prostacyclin generation by the vessel wall. *J Clin Invest* 1979;63:1026-1035.
89. Arnold DM, Kelton JG. Current options for the treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol.* 2007;44:S12-S23.
90. Rehman A. Acute immune thrombocytopenic purpura in children. *Turk J Hematol.* 2007;24:41-51.
91. Nugent D, Wang Z, Sandborg C, Berman M. Reduced levels of IL-4 in immune mediated thrombocytopenia (ITP): role of cytokine imbalance in autoimmune disease. *Immunohematology* 1988;2:65A.
92. Garcia – Suarez J, Prieto A, Reyes E, et al. Abnormal IFN gamma and TNF- alpha secretion in purified CD2+ cells from autoimmune thrombocytopenic purpura (ATP)

- patients. Their implication in the clinical course of the disease. *Am J Hematol* 1995;49:271-276.
93. Basta M, Langlois PF, Marques M, et al. High dose intravenous immunoglobulin modifies complement-mediated in vivo clearance. *Blood* 1989;74:326-333.
  94. Berchtold P, Dale GL, Tani P, McMillan R. Inhibition of autoantibody binding to platelet glycoprotein IIb/IIa by anti-idiotypic antibodies in intravenous gammaglobulin. *Blood* 1989;74:2414-2417.
  95. Rossi F, Kazatchkine MD. Antiidiotypes against autoantibodies in pooled normal polyspecific Ig. *J Immunol* 1989;143:4104-4109.
  96. Dietrich G, Kazatchkine MD. Normal immunoglobulin G (IgG) for therapeutic use (intravenous Ig) contain anti-idiotypic specificities against an immunodominant, disease-associated, cross-reactive idiotype of human anti-thyroglobulin autoantibodies. *J Clin Invest* 1990;85:620-625.
  97. Dietrich S, Kaverl SV, Kazatchkine MD. Modulation of autoimmunity by intravenous globulin through interaction with the functions of the immune/ idiotypic network. *Clin Immunol Immunopathol* 1992;62:873-881.
  98. Shojaiefard A, Mousavi SA, Faghihi SH, Abdollahzade S. Prediction of response to splenectomy in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *World J Surg* 2008;32:488-493.
  99. Tarantino MD, Bolton-Maggs PH. Update on the management of immune thrombocytopenic purpura in children. *Curr Opin Hematol.* 2007;14:526-534.
  100. Garvey B. Rituximab in the treatment of autoimmune haematological disorders. *Br J Haematol.* 2008;141:149-169.
  101. Zhou Z, Yang R. Rituximab treatment for chronic refractory idiopathic thrombocytopenic purpura. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008;65:21-31.
  102. Pescovitz MD. Rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody: History and mechanism of action. *Am J Transplant* 2006;6:859–866.
  103. Boye J, Elter T, Engert A. An overview of the current clinical use of the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab. *Ann Oncol* 2003; 14:520–525.
  104. Yomtovian R, Niklinski W, Silver B, et al. Rituximab for chronic recurring thrombotic thrombocytopenic purpura: A case report and review of the literature. *Br J Haematol* 2004;124:787–795.
  105. Leandro MJ, Edwards JC, Cambridge G, et al. An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002;46:2673–2677.

106. Leandro MJ, Edwards JC, Cambridge G. Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion. *Ann Rheum Dis* 2002;61:883–888.
107. Hongeng S, Tardtong P, Worapongpaiboon S, et al. Successful treatment of refractory autoimmune haemolytic anaemia in a post-unrelated bone marrow transplant paediatric patient with rituximab. *Bone Marrow Transplant* 2002;29: 871–872.
108. Zaja F, Iacona I, Masolini P, et al. B-cell depletion with rituximab as treatment for immune hemolytic anemia and chronic thrombocytopenia. *Haematologica* 2003;87:189–195.
109. Zecca M, Nobili B, Ramenghi U, et al. Rituximab for the treatment of refractory autoimmune hemolytic anemia in children. *Blood* 2003;101:3857–3861.
110. Franchini M, Gandini G, Di Paolantonio T, et al. Acquired hemophilia A: A concise review. *Am J Hematol* 2005;80:55–63.
111. Zaja F, Vianelli N, Sperotto A, et al. B-cell compartment as the selective target for the treatment of immune thrombocytopenias. *Haematologica* 2003;88:538–546.
112. Perrotta A, Abuel C. Response of chronic relapsing ITP of 10 years duration to rituximab. *Blood* 1998;92: 88B-88B, *Meeting Abstract: 3360*.
113. Arnold DM, Dentali F, Crowther MA, et al. Systematic review: efficacy and safety of rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med* 2007;146:25-33.
114. Bengtson KL, Skinner MA, Ware RE. Successful use of anti-CD20 (rituximab) in severe, life-threatening childhood immune thrombocytopenic purpura. *J Pediatr* 2003;143:670-973.
115. Shenoy S, Kelly M, Grossman W, Ramadas J, Musselman M. Rituximab therapy in children with chronic refractory immune cytopenia: Long term efficacy and immune function analysis. *Blood* 2003;102: 286A-286A, *Meeting Abstract: 1020*.
116. Franchini M, Zaffanello M, Veneri D, Lippi G. Rituximab for the treatment of childhood chronic idiopathic thrombocytopenic purpura and hemophilia with inhibitors. *Pediatr Blood Cancer* 2007;49:6-10.
117. Kalpatthi R, Bussel JB. Diagnosis, pathophysiology and management of children with refractory immune thrombocytopenic purpura. *Curr Opin Pediatr* 2008;20:8-16.
118. Karpatskin S, Fotino M, Gibofsky A, Winchester RJ. Association of HLA-DRW2 with autoimmune thrombocytopenic purpura. *J Clin Invest* 1979;63:1085-1088.

119. Helmerhost FM, Nijenhuis LE, De Lange GG, et al. HLA antigens in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Tissue Antigens* 1982;20:372-376.
120. Moller E. Mechanisms for induction of autoimmunity in humans. *Acta Paediatr Suppl* 1998;424:16-20.
121. Nomura S, Matsuzaki T, Ozaki Y, et al. Clinical significance of HLA-DRB1\*0410 in Japanese patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1998;91:3616-3622.
122. Salmon JE, Edberg JC, Brogle NL, Kimberly RB. Allelic polymorphism of human Fc $\gamma$  receptor IIA and Fc $\gamma$  receptor IIB: Independent mechanisms to differences in human phagocyte function. *J Clin Invest* 1992;89:1247-1281.
123. Foster CB, Zhu S, Erichsen HC, et al. The Early Chronic ITP Study Group, Polymorphism in inflammatory cytokines and Fc gamma receptors in childhood chronic immune thrombocytopenic purpura: a pilot study. *Br J Haematol* 2001;113:596-599.
124. Lippman SM, Arnett FC, Conley CL, Ness PM, Meyers DA, Bias WB. Genetic factors predisposing to autoimmune hemolytic anemia, chronic thrombocytopenic purpura, and systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1982;73:827-840.
125. Fujimoto TT, Inoue M, Shimomura T, Fujimura K. Involvement of Fc gamma receptor polymorphism in the therapeutic response of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2001;115:125-130.
126. Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur J Immunogenet.* 1999;26:1-3.
127. Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee J-H, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* 2000;61:863-866.
128. Daher S, Shulzhenko N, Morgun A, et al. Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2003;58:69-77.
129. Dabora SL, Roberts P, Nieto A, et al. Association between a high expressing interferon-gamma allele and a lower frequency of kidney angiomyolipomas in TSC2 patients. *Am J Hum Genet* 2002;71:750-758.
130. Goris A, Epplen C, Fiten P, et al. Analysis of an IFN-gamma gene (IFNG) polymorphism in multiple sclerosis in Europe: effect of population structure on association with disease. *J Interferon Cytokine Res.* 1999;19:1037-1046.

131. Rekha PL, Ishaq M, Valluri V. A differential association of interferon-gamma high-producing allele T and low-producing allele A (+874 A/T) with Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. *Scand J Immunol* 2006;64:438-443.
132. Tegoshi H, Hasegawa G, Obayashi H, et al. Polymorphisms of interferon-gamma gene CA-repeat and interleukin-10 promoter region (-592A/C) in Japanese type I diabetes. *Hum Immunol* 2002;63:121-128.
133. Jahromi M, Millward A, Demaine A. A CA repeat polymorphism of the IFN-gamma gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes. *J Interferon Cytokine Res* 2000;20:187-190.
134. Vandebroek K, Cunningham S, Goris A, et al. Polymorphisms in the interferon-gamma/interleukin-26 gene region contribute to sex bias in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2773-2778.
135. Belletrutti M, Ali K, Barnard D, Blanchette V, Chan A, David M, Luke B, Price V, Ritchie B, Wu J; Canadian Pediatric Chronic ITP Working Group; Canadian Pediatric Thrombosis and Hemostasis Network. Chronic immune thrombocytopenic purpura in children: a survey of the canadian experience. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007;29:95-100.
136. Fogarty PF, Segal JB. The epidemiology of immune thrombocytopenic purpura. *Curr Opin Hematol* 2007;14:515-519.
137. Glanz J, France E, Xu S, Hayes T, Hambidge S. A population-based, multisite cohort study of the predictors of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura in children. *Pediatrics* 2008;121:e506-12.
138. Treutiger I, Rajantie J, Zeller B, Elinder G, Rosthøj S, NOPHO ITP Working Group. Initial management of children with newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura in the Nordic countries. *Acta Paediatr* 2006;95:726-731.
139. Liu F, Changlin W, Yang X, et al. Polarization and apoptosis of T cell subsets in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Cellular and Molecular Immunology*. 2005;2:387-392.
140. Hoffman SC, Stanley EM, Darrin Cox E, et al. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokin production in anti-CD3/CD28 stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation* 2001;72:1444-1450.
141. Tangwattanachuleeporn M, Sodsai P, Avihingsanon Y, Wongpiyabovorn J, Wongchinsri J, Hirankarn N. Association of interferon-gamma gene polymorphism (+874A) with arthritis manifestation in SLE. *Clin Rheumatol* 2007;26:1921-1924.

- 142.** Khani-Hanjani A, Lacaille D, Hoar D, et al. Association between dinucleotide repeat non-coding region of interferon-gamma gene and susceptibility to, and severity of, rheumatoid arthritis. *Lancet* 2000;356:820-825.
- 143.** Chen X, Xu J, Chen Z, et al. Interferon- $\gamma$  +874 A/T and interleukin-4 intron VNTR gene polymorphism in Chinese patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Europ J Hematol* 2007;79:191-197.