

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Ahmet Muzaffer DEMİR

İMMÜN TROMBOSİTOPENİLİ HASTALARDA ANTİOKSİDAN VE APOPTOZİS İLİŞKİLİ GEN İFADELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Candeniz AVCI

EDİRNE – 2017



TEŞEKKÜR

Tez konusu seçiminde ve oluşturulmasında emeği geçen hocamın görevden ayrılmasından sonra tezimi bitirmemde büyük katkıları olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet Muzaffer Demir'e, uzmanlık eğitimime katkılarından dolayı İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gülbin Ünsal'a ve tüm İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri'ne, tezimin hazırlanmasında emeği geçen Hematoloji Uzmanı Dr. Elif G. Ümit'e, tüm çalışma arkadaşlarıma, bugünlere gelmemde büyük emekleri olan aileme ve her koşulda yanımda olan eşim Dr. Kürşat Avcı'ya en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER	3
İMMÜN TROMBOSİTOPENİ	3
ANTIÖKSİDAN MEKANİZMA	8
APOPTOZİS	14
APOPTOZİS MEKANİZMALARI	15
APOPTOZİSİN GENETİK KONTROLÜ.....	15
GEN İFADELERİ	16
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	21
BULGULAR	24
TARTIŞMA	35
SONUÇLAR.....	39
ÖZET	41
SUMMARY	43
KAYNAKLAR.....	45
EKLER	

KISALTMALAR

DNA	: Deoksiribonükleik Asit
GP	: Glikoprotein
HBsAg	: Hepatit B Yüzey Antijeni
IL	: İnterlökin
İTP	: İmmün Trombositopeni
İViG	: İntravenöz İmmünglobulin
MP	: Metilprednizolon
OSİ	: Oksidatif Stres İndeksi
TAOK	: Total Antioksidan Kapasite
TCR	: T Hücre Reseptörü
TPO	: Trombopoietin

GİRİŞ VE AMAÇ

İmmün trombositopeni (İTP), dolaşımdaki trombositlerin antikor aracılığı ile yıkımının artması ile tanımlanan ve kendi kendini sınırlayabilen otoimmün-edinsel bir trombositopenidir. İTP karmaşık bir patogeneze sahip olan heterojen bir hastalıktır (1). Etiyolojisinde oksidatif etki, antioksidan mekanizma, apoptozis ve anti-apoptozisin etkisi olduğu üzerine çalışmalar bulunmaktadır. İmmün trombositopeni, sık rastlanan bir kanama bozukluğu olmasına rağmen patogenezi tam olarak bilinmemektedir. Trombositopeniye; otoimmün yıkım, komplemana bağımlı trombolizis ve trombosit yapımında bozulma gibi mekanizmalar neden olur. İTP hastalarında trombositlerin yüzeyinde bulunan membran glikoproteinlerine karşı otoantikorlar oluşur (2, 3). Trombositlere karşı oluşan otoantikorların çoğunluğu Ig G olup, Ig A ve Ig M antikorları da bulunmuştur (4, 5). Antikorlarla kaplı trombositler retiküloendotelyal sistemde, özellikle dalakta bulunan doku makrofajları tarafından sunulan Fc γ reseptörlerine bağlanarak dolaşımdan uzaklaştırılırlar (6).

İmmün trombositopeni hastalarında otoimmün trombosit yıkımı kemik iliğinde megakaryosit yapımını artırır. Buna rağmen İTP hastalarının çoğunda trombosit üretimi normalin altında seyreder. Chang ve ark. (7) yaptığı bir çalışmada İTP hastalarında GpIb ve GpIIb-IIIa kompleksine karşı oluşan antikorların in-vitro ortamda megakaryopoezi baskıladığı gösterilmiştir.

Apoptozis ilişkili gen ifadeleri (ekspresyonları) ve antioksidan mekanizmalar trombositopeni ve/veya ineffektif trombopoeze yol açabilmektedir. İmmün trombositopeni’de megakaryositlerin apoptozis ve para-apoptozisin yapısal özelliklerini sergilediği bildirilmiştir. İn vitro ortamda İTP plazmasına sağlıklı bireyden alınan megakaryosit üzerinde apoptozis ile uyumlu morfolojik değişiklikleri uyardığı gösterilmiştir (8). Farklı apoptozis yollarının,

megakaryopoezisin farklı olgunlaşma basamaklarında rol aldığı görülmektedir. Altta yatan mekanizmanın anlaşılması gelecekte yapılan çalışmalarla yeni tedavi stratejileri gelişimine yol açabilir ve hasta alt gruplarının saptanması ile yeni tedavi yaklaşımlarına yarar sağlayabilir (9,10). Bugünkü kanıtların megakaryositlerin apoptozisin intrinsik ve ekstrinsik her iki basamağına da sahip olduğunu desteklemesine rağmen, megakaryositlerde apoptozisin ekstrinsik yolunun moleküler ve fonksiyonel yönü keşfedilmeyi beklemektedir (10).

Oksidatif stresin İTP patogenezinde rol aldığı saptanmıştır (11). İmmün trombositopeni’de, oksidatif stresin patogenezdaki rolü ile ilgili yapılan bir çalışmada, tanı anında oksidatif stresin arttığı, antioksidatif kapasitenin azaldığını ve İTP’nin patogenezinde artmış oksidatif stres ve azalmış antioksidan kapasitenin rol oynayabileceği vurgulanmıştır. İmmün trombositopeni’de, tanı anında total antioksidan kapasite (TAOK) değerinin düşük, oksidatif stres indeksi (OSİ) değerlerinin yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca tanı anında yüksek OSİ saptanan olgularda kronik İTP gelişme riskinin yüksek olduğu bulunmuştur (12).

Bizim çalışmamızda da; Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Bölümü’ne Mart 2015-Mart 2016 arasında başvuran, 12 aktif, 12 remisyon döneminde ve 10 sağlıklı gönüllü kullanılarak, İTP’li hastalarda antioksidan (SOD, CAT, Hsp60) ve apoptozis (Bcl-xl, Survivin, p27) ilişkili gen ifadelerinin klinik bulgularla ilişkisi değerlendirilmiştir.

GENEL BİLGİLER

İMMÜN TROMBOSİTOPENİ

Giriş ve Terminoloji

İmmün trombositopeni (İTP), trombositlere karşı oluşan otoantikörlerin trombositlerin yaşam sürelerini kısaltması sonucu gelişen ve trombositopeni ile seyreden edinsel bir hastalıktır. İTP’de periferik trombosit yıkımı, kemik iliğinde megakaryosit artışı ile karşılanmaya çalışılır. Bununla beraber oluşan anti-trombosit antikorları megakaryopoezi de etkileyebilir ve kemik iliğinde megakaryosit sayısı azalmış veya trombosit yapımı bozulmuş olabilir (1).

İmmün trombositopeni, etiyolojide rol oynayan faktörlere göre primer ya da sekonder olarak iki gruba ayrılır. Sekonder İTP nedenleri arasında otoimmün hastalıklar, viral enfeksiyonlar ve ilaçlar mevcuttur. Aslında sekonder İTP, primer İTP dışındaki bütün immün trombositopenileri kapsar. Uluslararası Çalışma Grubu, primer İTP’yi trombosit sayısının $100.000/\text{mm}^3$ altında olması ve beraberinde diğer trombositopeni nedenlerinin dışlanması olarak tanımlamıştır (13). İmmün trombositopeni için yeni evreleme tanımlamaları yapılmış ve İTP tanıdan itibaren geçen süreye göre evrelendirilmiştir. Yeni tanı İTP, tanıdan itibaren ilk 3 ayı kapsar. Persistan İTP, tanıdan itibaren 3-12 aylar arasında devam eden, spontan remisyona girmeyen veya tedavi kesildiğinde remisyonda kalmayan olguları içerir. Kronik İTP ise 12 ay ve daha uzun süren olgulardır. Refrakter İTP, splenektomi sonrasında ağır İTP gelişimi olarak tanımlanır (1). Uluslararası Çalışma Grubu, İTP’de tedaviye yanıt için de bazı kriterler tanımlamıştır. Tam yanıt, tedavi sonrası trombosit sayısının $> 100.000/\text{mm}^3$ olmasıdır. Parsiyel yanıt, trombosit sayısının $30-100.000/\text{mm}^3$ olması veya başlangıç trombosit sayısının en az iki katı olmasıdır. Yanıtsız, trombosit sayısı $< 30.000/\text{mm}^3$ olan veya başlangıç trombosit sayısının

iki katına ulaşamamış olgulardır. Tam yanıt kaybı ise tam yanıt alınmış hastada en az bir gün arayla yapılmış iki ölçümde trombosit sayısının $100.000/\text{mm}^3$ altında olması ve/veya kanama olmasıdır. Uluslararası Çalışma Grubu tedaviye yanıt süresinin tedavi tipine göre de farklılık gösterebileceğini belirtmiştir. Yanıt süresi hesaplanırken, yanıtın ilk alındığı zaman başlangıç kabul edilip, yanıtın kaybedildiği zamana kadar geçen süre ele alınmalıdır. Yanıt kaybı, trombosit sayısının en az bir gün arayla yapılmış iki ölçümde $30.000/\text{mm}^3$ altında olması veya trombosit sayısındaki artışın bazal trombosit sayısının iki katından az olması veya kanama olmasıdır. Ağır İTP ise gelişteki kanamanın yeterli tedaviye rağmen devam etmesi veya yeni tedavi ve ilaç doz artırımı gerektirecek yeni kanama oluşumu olarak tanımlanır (1).

İnsidans

İmmün trombositopeni sık rastlanan bir otoimmün hastalıktır. Fakat toplumlarda yapılan çeşitli çalışmalarda farklı yaş, cinsiyet dağılımlarının olması ve trombosit sayısı için farklı sınır değerleri alınması nedeniyle geniş bir insidans aralığına sahiptir. Detaylı bir çalışmada, trombositopeni için eşik değer $100.000/\text{mm}^3$ olarak belirlendiğinde, İTP'nin yıllık insidansı 3.2 /100.000 kişi olarak hesaplanmış, eşik değer $50.000/\text{mm}^3$ alındığında ise bu oranın 2.7/100.000 kişi olduğu saptanmıştır. Kadın/erkek oranı 1,7'dir. Ortalama tanı yaşı 56'dır. Altmış yaş üzerindeki popülasyonda iki kat daha sık görülür (14).

Bölgemizdeki verilere baktığımız zaman; Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Hematoloji poliklinik ve servisinde 1991-2012 yılları arasında immün trombositopeni tanısı ile takip edilen 216 hasta incelendiğinde, hastalarda tanı anında ortalama yaş 42,3, kadın/erkek oranı 2,7/1 olarak saptanmıştır (15). Çocuk yaş grubunda en sık 2-4 yaşları arasında görülür. İTP çocuklarda kendiliğinden düzelme eğiliminde olmakla birlikte erişkinlerde genellikle kronik bir hastalık şeklinde seyreder.

Patofizyoloji

İlk olarak 1950'li yıllarda İTP'nin antikorlara bağlı oluşabileceği düşünülmüştür. Bu düşünce doğrultusunda yapılan çalışmalarda, sağlıklı gönüllülere İTP hastalarının serumları infüze edilmiş ve gönüllülerde akut, ağır bir trombositopeni ve beraberinde purpura geliştiği görülmüştür. Sonrasında yapılan çalışmalarda da trombositopeni etkisinin verilen İTP serumu miktarı ve globulin fraksiyonu ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir. Bu araştırmalar İTP hastalarının dolaşımında herkesin trombositlerinin yüzeyinde bulunan genel antijenlere karşı gelişmiş otoantikorlar olduğunu düşündüren bir hipotez geliştirilmesine yol açmıştır. Shulman ve ark. (16) serolojik testlerle bu otoantikoru Ig G olduğunu göstermişlerdir.

Yetmişli yıllarda yapılan çalışmalarda, kronik İTP hastalarında trombosit-ilişkili immünglobulin G düzeyinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. İlk trombosit hedef antijeni ise 1982’de tanımlanmıştır. VanLeeuwen ve ark. (17) tarafından İTP’li hastalardan alınan serum örneklerindeki antikorların trombosit glikoprotein (GP) IIb/IIIa kompleksine bağlandığı gösterilmiştir.

1987’de hem trombosit üzerindeki hem de plazmadaki serbest otoantikorları belirleyebilen “immunobead assay” ve “monoclonal otoantibodyspecific immobilization of platelet antigen (MAIPA)” adında iki ölçüm yöntemi geliştirilmiştir. Bu yeni teknikler sayesinde yapılan araştırmalarda anti-trombosit antikorların büyük kısmının (~%80) GP IIb/IIIa, kalanının da GP Ib/IX kompleksi ve GP IV, GP Ia/IIa gibi diğer trombosit antijenlerine karşı olduğu izlenmiştir. Ancak bu yöntemlerle bile İTP’li hastaların en az %20’sinde halen anti-trombosit antikorlar saptanamamaktadır.

İmmün trombositopenide başlangıçta rol oynayan tolerans kaybının primer mekanizması halen bilinmemektedir (13). Hastaların %50-85’inde Ig G tipi otoantikorlar, %50’sinde sıklıkla diğer tip otoantikorlarla birlikte Ig A tipi, çok küçük bir grupta ise yine diğer tip otoantikorlarla birlikte Ig M tipi antikorlar tanımlanmıştır (18). Trombosit yüzeyindeki antijenlere bağlı antikorlarla kaplı trombositler, makrofaj gibi antijen sunucu hücrelere (APC; Antijen presenting cell) Fc reseptörü yoluyla bağlanır. Büyük çoğunluğu dalakta ve daha az miktarda da retiküloendotelial sistemin diğer organlarının mononükleer fagositik hücrelerinde olmak üzere hızla uzaklaştırılırlar.

Trombositlerin yıkımının beraberinde immün yanıtı uyardığı düşünülmektedir. Antijen sunucu hücre, fagosit ettiği trombositlere ait epitoplara T helper lenfositlere sunar. Aktive olan T helper hücresi, B lenfosit hücrelerini ve antikor yapımını uyarır. Artan bu oto-antikorla opsonize olmuş trombositler başta makrofajlar tarafından dalakta yıkılır. Ayrıca bu oto-antikorlar kemik iliğinde megakaryositlere bağlanarak megakaryositlerin maturasyonunu ve trombosit üretimini de bozarlar. Bununla birlikte İTP patogenezinde otoreaktif sitotoksik T lenfositlerin (CD8+ T lenfosit) trombosit yıkımına neden olduğu alternatif bir yolak daha vardır. Ancak bununla ilgili in vivo mekanizma henüz aydınlatılamamıştır (19-21).

Birçok hastada İTP antikor aracılı olsa da, antikorlar CD4+ T hücresi ve onların sitokinlerinin kontrolündedir. Anormal T hücre yanıtları sonucunda oto-reaktif B hücre klonları oluşmaktadır. İTP hastalarındaki GPIIb/IIIa-reaktif CD4+ T hücreleri, normal trombositlere bağlanabilen anti-GPIIb/IIIa antikorlarının üretimini artırır. Bu T hücre klonları, kimyasal olarak modifiye edilmiş anti-GPIIb/IIIa’ya ve rekombinant anti-GPIIb/IIIa fragmanlarına yanıt oluşturur, fakat doğal anti-GPIIb/IIIa ile yanıt oluşturmaz. Bu şekilde, İTP hastalarındaki oto-

reaktif CD4+ T hücreler modifiye bir GPIIb/IIIa molekülüne yanıt oluşturabilir. Oto-reaktif CD4+ T hücreleri tarafından tanınan bazı GPIIb/IIIa fragmanları tanımlanmış olsa da bu anormallikleri başlatan ilk olay net olarak tanımlanamamıştır (22).

Kompleman sistemi aktivasyonun İTP patogenezinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. İTP hastalarında trombositlerin yüzeyinde artmış oranda trombosit ilişkili C3, C4 ve C9 olduğu gösterilmiştir. İn vitro çalışmalarda antitrombosit antikorların varlığında C3 ve C4'ün trombositlere bağlanarak lizise neden olabildiği gösterilmiştir (19).

Helikobakter pylori'nin İTP patogenezindeki rolü net değildir. Yapılan bir çalışmada Helikobakter pylori'nin antibiyotikler ile eradikasyonundan sonra trombosit sayısında belirgin artış olduğu izlenmiştir. Başka bir çalışmada da Helikobakter pylori tedavisi yapılan İTP hastalarında, eradikasyon tedavisi başarısız olsa bile trombosit sayılarının tedavi almayanlara göre daha yüksek seyrettiği görülmüştür. Ancak trombosit düzeylerindeki bu yükselmenin H. Pylori eradikasyonundan ziyade, antibiyotik tedavisinin etkisi ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Ancak günümüzde İTP hastalarında Helikobakter pylori için rutin tarama ya da tedavi önerilmemektedir (1).

Apoptozisin genetik ya da otoantikorlar tarafından uyarılmış disregülasyonu İTP'de trombositopeni ya da ineffektif trombopoiesis yol açar. Altta yatan mekanizmanın anlaşılması gelecekte yapılan çalışmalarla yeni tedavi stratejileri gelişimine yol açabilir ve hasta alt gruplarının saptanması ayrı tedavi yaklaşımlarına yarar sağlayabilir (9, 10)

Çekirdeksiz trombositler ve megakaryositler fonksiyonel apoptotik mekanizmaya sahiptirler. Apoptozisin intrinsik yolu yaşam sürelerini belirler. Major apoptotik yollardan biri intrinsik (mitokondriyal) apoptotik yoldur (23, 24). Apoptozisin intrinsik yolu Bcl-2 protein ailesi üyeleri tarafından düzenlenir. İntrinsik yolun anahtar mediatörleri Bax ve Bak, kontrolsüzce mitokondri dış membranında oligomerize olursa mitokondri dış membran permeabilizasyonu indüklenir ve sitokrom c ve diğer solüble ve apoptojenik proteinlerin sitoplazmaya salınımı olur. Sitokrom c, kaspaz 9'u aktive eder ve ardışık kaspaz tepkimeleri devam eder. Bak ve Bax aktivitesi sıkı bir şekilde megakaryositlerde ekspresse edilen antiapoptotik Bcl-2 aile üyeleri; Bcl-2, Bcl-xl ve Mcl-1 tarafından kontrol edilir. Bcl-xl ve Mcl-1'in megakaryosit yaşamını kordineli bir şekilde düzenlediği fakat trombosit yaşamı için Mcl-1'in önemsiz olduğu görülmüştür (25-27).

Apoptozisin ekstrinsik yolu TNF reseptör süper ailesine ait ölüm reseptörlerine bağlanma ile tetiklenir. Prokaspaz 8'in aktive edilmesi ile kaspaz 3, 6 ve 7 direkt aktive olur. Ekstrinsik yol Bcl-2 ailesi ve mitokondriyi bypass eder (23,28).

İmmün trombositopeni’de megakaryositlerin apoptozis ve paraapoptozisin yapısal özelliklerini sergilediği bildirilmiştir. İn vitro ortamda İTP plazmasına sağlıklı bireyden megakaryosit maruziyeti ya da in vivo transfüzyonun apoptozis ile uyumlu morfolojik değişiklikleri indüklediği gösterilmiştir (8). Apoptozise giden hücrelerin yüzeyinde fosfatidilserin eksternalizasyonu fagositler tarafından apoptotik hücrelerin temizlenmesine yol açar. Trombositler üzerinde anormal artmış fosfatidil serin maruziyeti kronik İTP’li yetişkin hastalarda ve yeni tanı konmuş İTP’li çocuk hastalarda bildirilmiştir (29)

Trombosit yüzey molekülleri GPIIb-IIIa ve GPIb α , İTP’de otoantikorların hedefi olarak belirtilmektedir. Leytin ve ark.’ları (30) farelere anti-GPIIb antikor enjeksiyonunun fare trombositlerinde kaspazların aktivasyonu sonucu apoptozisi indükleyebildiğini ve trombositopeni geliştiği göstermişlerdir. Anti GPIIb enjeksiyonu trombositlerde fosfatidil serin maruziyeti, kaspaz 3 aktivasyonu ve mitokondri iç membran potansiyelinin depolarizasyonu ile sonuçlanmıştır. Kronik İTP’li yetişkinlerde proapoptotik soluble Fas ligand düzeyi artmış bulunmuştur. Diğer çalışmada ise soluble TRAIL düzeyinde abartılı artış bildirilmiştir (10).

Otoimmün hastalıklar oksidatif stres ile ilişkilidir (31). Reaktif oksijen ürünleri, T lenfosit aktivitesini baskılayarak otoimmün hastalıklar için zemin oluşturur. İmmün trombositopeninin immün bir hastalık olması nedeniyle patogenezinde oksidatif hasarın rolü olduğu düşünülmektedir (32, 33). İmmün trombositopeni’de, oksidatif stresin patogenezdaki rolü ile ilgili yapılan bir çalışmada, tanı anında oksidatif stresin arttığı, antioksidatif kapasitenin azaldığı ve İTP patogenezinde artmış oksidatif stres ve azalmış antioksidan kapasitenin rol oynayabileceği vurgulanmıştır. İmmün trombositopeni’de, TAOK değerinin düşük, OSİ değerlerinin tanı anında yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca tanı anında yüksek OSİ saptanan olgularda kronik İTP gelişme riskinin yüksek olduğu bulunmuştur (12).

Trombosit Üretimi ve Yıkımı

İmmün trombositopeni hastalarında yerine konan trombosit süspansiyonu sadece geçici olarak trombosit sayısını yükseltir, beraberinde, verilen bu trombositlerin de dolaşımdaki yaşam süreleri kısalmıştır. İTP hastalarının plazmasında trombositlere bağlanmamış antikorlar da dolaşmaktadır. Bu serbest antikorlar dolaşıma katılan trombositlere bağlanarak yıkımına yol açmaktadır. Bununla birlikte ilerleyen dönemlerde yapılan çalışmalarda, trombositopeninin sadece trombosit ömrünün kısalması ile açıklanamayacağı, buna ek olarak trombosit yapımında da bozukluklar olabileceği düşünülmüştür. Bu görüş, daha sonra, kronik ve akut İTP’de kemik iliğinde megakaryosit sayısındaki artışa rağmen trombosit üretiminde azalma olduğunu gösteren başka araştırmalar tarafından da desteklenmiştir (16).

İTP’de artmış trombosit yıkımı megakaryopoezis uyarımına neden olmaktadır. Yapılan bir çalışmada artmış megakaryosit koloni formasyonu gösterilmiş ancak megakaryosit progenitörlerinin gelişiminde supresyon ve/veya maturasyon duraklaması olduğu izlenmiştir. İTP hastalarında glikoproteinlere karşı oluşan otoantikörler megakaryosit gelişimini de etkiler ve bunun sonucunda trombosit üretimi azalır (16).

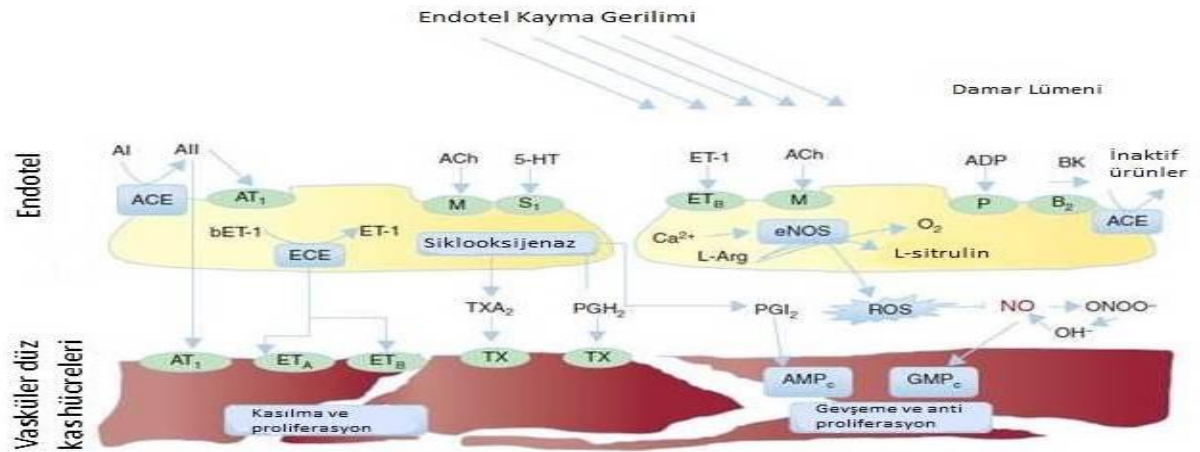
İmmün trombositopeni hastalarındaki trombositopeninin düzeyi, trombosit yıkım ve üretimi arasındaki denge ile ilişkilidir. Çoğu İTP hastasında kemik iliğinde normal veya artmış oranda megakaryosit görülmektedir. İTP’de görülen kompensatuar trombosit üretimindeki artış nedeniyle, periferik yaymada dev trombositler görülür ve otomatik kan sayım cihazında ortalama trombosit hacmi yüksek saptanır. Daha büyük ve genç trombositlerin granülleri daha büyüktür ve fonksiyonları daha iyidir (16).

İmmün trombositopenideki trombositlerin artmış boyut ve fonksiyonları, megakaryopoezin ve trombopoezin major düzenleyicisi olan TPO (Trombopoetin)’e bağlıdır. Protein yapısındaki TPO, megakaryositlerin koloni sayısını, boyutunu ve trombosit üretimini artırır (22). TPO ve İTP arasındaki ilişki net değildir. Yapılan birçok çalışmada, İTP hastalarında TPO düzeyleri (plazmada veya serumda) normal veya hafif yüksek bulunmuştur.

ANTİOKSİDAN MEKANİZMA

Endotel

Endotel dokusu vasküler hemostazın devam ettirilmesinde otokrin ve parakrin fonksiyon göstererek hayati bir rol oynamaktadır (34). Endotel dokusunun fonksiyonları çok çeşitlidir; trombosit agregasyon inhibisyonu, koagülasyon aktivasyonunun inhibisyonu, fibrinolizis fonksiyonları ile pıhtılaşmayı önleyici bir yüzey oluşturmak, ayrıca doku ve dolaşım arasında madde alışverişi, vasküler tonusun düzenlenmesi, lökosit ve trombosit adhezyonunun regülasyonu endotelin bu çeşitli fonksiyonları arasındadır (35). Şekil 1’de endotel hücrelerinden salınan mediyatörler gösterilmiştir.



Şekil 1. Endotelden Salınan Mediyatörler. Endotel Hücresinden hem Vazodilatasyon hem de Vazokonstriksiyon Yapan Mediyatörler Salınır (36)

Oksidatif Stres

Serbest radikaller reaktif moleküllerdir. Yaşamsal faaliyetler sırasında solunum, otooksidasyon reaksiyonları, enzimatik sistem gibi endojen kaynaklar ve sigara dumanı, hava kirliliği, ultraviyole ışınları, iyonize radyasyon ve ksenobiyotikler gibi çeşitli çevresel kaynakların etkisiyle meydana gelebilmektedirler (37). Oksidatif stres, organizmadaki prooksidan ve anti-oksidan dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır (38, 39). Prooksidan ürünlerin artıp, antioksidan ürünlerin azaldığı ve prooksidan ürünlerin uzaklaştırılamadığı oksidatif stres durumu birçok kronik hastalığın temelini oluşturmaktadır.

Serbest Radikaller

Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron içeren moleküllerdir. Eşleşmemiş elektronlarını eşlemek için diğer moleküller ile hızla reaksiyona girerek daha kararlı yapıları oluştururlar (40).

Reaktif Oksijen Türevleri (ROT)

Serbest radikaller tek elektronlarını bir başka moleküle verebilir (redüksiyon) veya bir başka molekülden elektron alarak (oksidasyon) daha kararlı bir yapı oluşturmaya çalışırlar. Bu özellikleri ile oksijen molekülleri radikal ve non-radikal olarak ikiye ayrılırlar (41). (Tablo 1)

Tablo 1. Oksijen türevi bileşikler

Non-Radikaller	Radikaller
Singlet oksijen	Hidroksil
Ozon	Alkoksil
Hidrojen Peroksit	Peroksil
Hipoklorid	Superoksit
Lipid hidroperoksit	Nitrik Oksit
Peroksinitrit	Azot Dioksit

Süperoksit radikali: Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$) moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile oluşur. Süperoksit radikali zayıf oksidan özellikte olup bir dizi reaksiyon ile hücre hasarına neden olabilir. Bu reaksiyonların en önemlilerinden biri Haber-Weiss reaksiyonudur. Bu reaksiyonda oksijen (O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) demir (Fe) varlığında etkileşerek oldukça reaktif olan hidroksil radikallerini oluşturmaktadırlar. Oluşan bu hidroksil radikali oldukça reaktif olup deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı meydana getirebilmektedir (42). Bunun dışında süperoksit radikalinden süperoksit dismutaz enziminin katalizlediği dismutasyon reaksiyonu ile (H_2O_2) ve (O_2) üretilir (42).

Hidroksil radikalleri: Hidroksil radikali insan vücudunda bulunan en güçlü serbest radikaldir. Organizmada lipid, protein ve nükleik asitlerle reaksiyona girebilmektedir. DNA ve RNA'da kırıklar oluşturarak mutajenik etki gösterirler. Hücre membranında bulunan fosfolipitler ile reaksiyona girerek peroksil radikalini oluşturur. Peroksil radikalleri ve sitotoksik aldehytler, membran proteinlerinde ciddi bir hasara neden olurlar ve membrana bağlı bazı enzimleri ve reseptörleri inaktive ederler (43, 44).

Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Serbest radikaller vücutta endojen ve ekzojen olarak oluşabilmektedir (Tablo 2). Organizmada genelde oksijenin kullanıldığı elektron transport sisteminde oluşmaktadır. Bunun dışında siklooksijenaz ve lipooksijenaz yolunda, endotel, nötrofil, monosit ve makrofaj gibi hücrelerde de oluşabilmektedir. En önemli ekzojen kaynağı ise güneş ışığı ve sigaradır (45).

Tablo 2. Hücrede endojen ve ekzojen yollar ile oluşan serbest radikallerin kaynakları (45)

EKZOJEN KAYNAKLAR	ENDOJEN KAYNAKLAR
Redoks siklus bileşikleri (ör, doksorubisin)	Mitokondriyal elektron transport zinciri
İlaç oksidasyonları (ör, parasetamol)	Mikrozomal elektron transport zinciri
Sigara	Oksidan enzimler
Güneş ışığı	Ksantin oksidaz
Isı şoku	İndolamin dioksijenaz
Okside glutatyon	Galaktoz oksidaz
	Siklooksijenaz
	Lipoksijenaz
	Monoamin oksidaz
	Fagositik hücreler
	Nötrofiller
	Monositler ve makrofajlar
	Eozinofiller
	Endotelial hücreler
	Otooksidasyon reaksiyonları (Fe+2)

Serbest Radikallerin Vücuttaki Zararlı Etkileri

Serbest radikallerin vücuttaki zararlı etkileri Tablo 3'te gösterilmiştir (46).

Tablo 3. Artmış reaktif oksijen türevi bileşiklerin vücuttaki zararlı etkileri (46)

Hücre membranının en önemli bileşeni olan lipid ve proteinlerin yapısını bozmak
Mitokondri içerisinde gerçekleşen aerobik solunumu bozmak
DNA'da zincir kırıklarına yol açarak mutajenik etki göstermek
Elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipoksijenaz, siklooksijenaz, ksantinoksidaz, indolamin dioksijenaz, triptofan dioksijenaz ve galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktive etmek
Trombositlerin agregasyonunu artırmak
Ekstraselüler matriksteki kollagen doku bileşenlerini yıkmak

Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri

Serbest radikallerin etkilerine en hassas olan moleküller lipitlerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksitler, alkoller, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi peroksidasyon ürünlerini oluşturmaktadırlar (47).

Membran lipitlerinin peroksidasyonu sonucunda membranın iyon geçirgenliği bozulmaktadır. Lizozomal membranların tahribi hidrolitik enzimlerin salınmasına ve intrasellüler sindirime neden olur. Biriken hidroperoksitler direkt olarak toksik etki göstermenin

yanısıra duyarlı aminoasit kalıntılarını (methionin, histin, stein, lizin) okside eder veya zincir polimerizasyon reaksiyonlarıyla enzimleri inaktive edebilirler (48).

Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Serbest radikaller ile etkileşim sonucunda proteinlerde; aminoasit modifikasyonu, proteinlerin parçalanması, proteinlerin agregasyonu veya çapraz bağlanmalar meydana gelir (49). Proteinin temel yapısındaki değişme, antijenitesinde değişmeye ve proteolize yol açabilir.

Radikaller, membran proteinleri ile reaksiyona girebilirler ve enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilirler (50).

Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri

Serbest radikaller ekstrasellüler matriksin yapısal elemanı olan ve mukosakkarid yapıdaki hiyaluronik asit ile reaksiyona girebilmektedir. Hiyaluronik asitin hasarı sonucu sırasıyla, inflamatuvar eklem hastalıklarının ve kataraktın oluşumunda serbest oksijen radikallerinin rolü vardır (50, 51).

Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri

Serbest radikallerin DNA ile tepkimesi sonucunda baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilmektedir. Oksidatif DNA hasarı da denen bu olay: mutagenез, kanserogeneз ve yaşlanmaya yol açmaktadır (52).

Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hasara karşı organizma, antioksidan savunma mekanizmasını kısaca antioksidanları geliştirmiştir. Tablo 4 ve 5'te antioksidanların etki mekanizmaları ve bazı önemli antioksidanlar gösterilmiştir (53,54).

Tablo 4. Antioksidanların etki mekanizmaları (53)

Serbest radikallerin antioksidan enzimler aracılığı ile veya doğrudan temizlenmesi. (Yok edici antioksidanlar)
Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun engellenmesi
Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu katalizleyen metal iyonlarının bağlanması
Zedelenmiş hücresel yapıların hasar sonrası tamir edilmesi veya temizlenmesi. (Tamir etkisine sahip antioksidanlar)

Tablo 5. Bazı önemli antioksidanlar (54)

Enzimatik antioksidanlar	Enzimatik olmayan antioksidanlar
SOD	Vitamin E (tokoferol)
Katalaz (CAT)	Vitamin A (β -karoten)
GSH peroksidaz	Vitamin C (askorbik asit)
GSH redüktaz	Glutasyon
	Ürik asit

Doğal (Endojen) Antioksidanlar

Enzim Yapısındaki Antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit dismutaz süperoksit radikalının (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen bir antioksidan enzimdir. Tepkime sonucu oluşan H_2O_2 'nin uzaklaştırılması için glutasyon peroksidaz ve katalaz (CAT) ile birlikte çalışır (55).

Katalaz (CAT): Katalaz'ın görevi H_2O_2 'yi suya ve oksijene parçalamaktır (52).

Glutasyon peroksidaz: Hidrojen peroksitin indirgenmesinden sorumludur (56). Ayrıca büyük moleüllü lipit hidroperoksitlerinin indirgenmesinden de sorumludur (57).

Glutasyon redüktaz: Glutasyon redüktaz, glutasyon peroksidaz (GSH-Px)'ın hidroperoksitleri indirgemesi sonucu oluşan okside glutasyonu (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatona (GSH) dönüştürerek dolaylı antioksidan etki gösterir (56).

Enzim olmayan endojen antioksidanlar: Enzim olmayan antioksidanlar; melatonin, albumin, seruloplazmin, transferrin, haptoglobulin, ürik asit, ferritin, bilirubin, glutasyon, sistein, metiyonin, laktoferrindir (58).

Eksojen Antioksidanlar

Vitamin C (askorbik asit): Askorbik asit düşük konsantrasyonlarda oksidan, yüksek konsantrasyonlarda antioksidan özellik gösteren bir vitamindir. Askorbik asitin metabolizma üzerine pek çok etkisi vardır. Bazıları; (59).

Lipit peroksidasyonunu başlatan radikallerin etkilerini yok ederek, lipitleri oksidasyona karşı korur.

Tokoferoksil radikalının α -tokoferole indirgenmesini sağlayarak E vitamininin yeniden yapılanmasını sağlar. Böylece E vitamini ile birlikte LDL kolesterolün okside olmasını engeller.

Vitamin E (α -tokoferol): Çok güçlü zincir kırıcı antioksidan özellik gösteren bir vitamindir. Bu nedenle membran fosfolipitlerini serbest oksijen radikallerine karşı koruyan en önemli antioksidandır. Vitamin E ve glutatyon peroksidaz birbirlerini tamamlayan antioksidanlardır. Glutatyon peroksidaz oluşan peroksitleri ortadan kaldırırken, vitamin E peroksitlerin sentezini engeller (59).

β -Karoten: Zincir kıran bir antioksidan olarak görev yapar ve peroksit radikallerinin oluşumunu önler (59).

Diğer ekzojen alınan antioksidanlar: Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopurinol, oksipurinol), NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler), kalsiyum kanal blokerleri (verapamil, nifedipin), non- steroid antiinflamatuar ilaçlar (ibuprofen), demir tutucu ilaçlar (desferoksamin, EDTA), rekombinant SOD (r-SOD), besinlerdeki doğal antioksidanlar (C vitamini, E vitamini ve β karoten), nötrofil adezyon inhibitörleri, asetilsistein, mannitol, melatonin ekzojen antioksidanların bazılarıdır (54, 60-62).

APOPTOZİS

Apoptozis terimi ilk olarak 1972 yılında hücre ölümünün morfolojik bir formunu tanımlamak için kullanılmıştır (23). Apoptozis enerji bağımlı biyokimyasal bir mekanizmadır. Apoptozis, fizyolojik ve patolojik birçok olayda önemli rol oynar. Bunlar;

Embriyonal ve fetal gelişimde; immün sistemin olgunlaşması esnasında, santral lenfoid organlardaki otoreaktif lenfositlerin ortadan kaldırılmasını sağlar. Böylece periferik lenfoid ve myeloid kompartmanların aşırı büyümesi kısıtlanır. Sinir sistemi gelişirken; aksonları hedef organlara ulaşamayan nöronların ortadan kaldırılmasını ve nöronlarla hedef organlar arasında oluşan bağlantı hatalarının onarılmasını sağlar.

Hormon salgısının azalmasına bağlı olarak gelişen involüsyonlarda; örneğin menstrüasyonda endometrial dokunun yıkılması, laktasyon sonrası meme atrofiksi.

Dokularda hücre homeostazının sağlanması: bağırsaktaki kript epitellerinin sürekli yenilenmesi.

İmmün reaksiyonlarda; Viral hepatitte karaciğerde oluşan apoptotik hücreler (Concilman cisimcikleri) veya graft versus host reaksiyonları gibi (24).

Hücrelerin herhangi bir nedenle hasarlanmaları durumunda veya yaşlılıkta örneğin ısı, radyasyon, antikanser ilaçlar, hipoksi gibi durumlarda apoptozis belirli uyarılarla başlatılan moleküler olayların enerjiye bağımlı döngüsünün son noktasıdır (63).

APOPTOZIS MEKANİZMALARI

Hücrenin apoptozise gidebilmesi için ilk önce, ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyal ile karşılaşması gerekir. DNA hasarı, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış, hücre içi pH değişiklikleri, hücre siklus bozuklukları hücreyi apoptozise götüren hücre ölüm sinyallerini başlatır. Hücre dışı mekanizmada ise, ölüm reseptörlerinin hücre yüzeyinde spesifik ligandlarına bağlanması sonucu hücre içi kaspazlar aktive olur. Aktive olan kaspazlar hedef proteinleri yıkarak, hücre içi değişikliklere neden olur (23, 64). Hücre daha sonra membranla çevrili küçük parçalara bölünür. Bunlara “apoptotik cisim” adı verilir. Apoptotik cisimler çevredeki parankim hücreleri ve fagositler tarafından fagosite edilerek yok edilir (23).

Yapılan araştırmalar ekstrensek ve intrinsek yol olarak iki ana apoptotik yolun olduğunu, bu iki yolun birbiri ile bağlantılı olduğunu ve bir yolda rol alan moleküllerin diğer yoldakini de etkilediğini göstermiştir. Bu iki yola ilave olarak T-hücre aracılı sitotoksisteyi ve perforin-granzim bağımlı hücre ölümünü içeren bir yol daha vardır (24, 65).

Mitokondriyal stres durumlarında açığa çıkan ve kofaktör nükleotid trifosfat (ATP ve dATP) ile aktiflenen sitokrom-c, sitoplazmada apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ve kaspaz 9 ile birleşerek kaspaz-3’ü aktive eder ve kaspaz kaskadının sürdürülmesi ile hücrel proteoliz gelişir.

Ölüm aktivatörlerinin (FasL ve TNF) hücre yüzeyindeki Fas ve TNF reseptörlerine bağlanması ve sitoplazmada kaspaz-8’i aktive etmesiyle apoptotik döngü başlar.

Endoplazmik retikulumda bulunan prokaspaz 12’nin, yüksek kalsiyum seviyeleri, kalsiyum bağımlı bir tiyol-proteaz olan, hücre iskeleti ve sinyal iletiminde görev alan kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile aktif hale geçmesi, aktiflenmiş kaspaz 12, kaspaz 9 ile sitoplazmada etkileşerek kaspaz kaskadını aktifler ve apoptozis oluşumuna neden olur.

Apoptozisin Genetik Kontrolü

Organizmada apoptozisi uyaran ve engelleyen çok sayıda gen ve protein bulunmaktadır (23, 24, 66). Tablo 6’da apoptozisi baskılayan ve indükleyen genler gösterilmiştir.

Tablo 6. Apoptozis ve genler (66)

Apoptozisi baskılayan genler	Apoptozisi indükleyen genler
Bcl-2/Bax grubundan:	Bcl-2/Bax grubundan:
Bcl-2,	Bax Harakiri/DP5
BHRL-1,	Bcl-XS, BLK,
Bcl-xL,	BaxBad,
Bcl-w,	Noxa,
Brag-1,	Bcl-G1 Map-1,
Mcl-1 E1B-19K,	BIM/BOD BIK/NBK
CED-9,	c-myc
A1/BFL-1,	p53,
BOO/Diva,	p21
NR13	Fas,
ras onkogeni	FADd
p35	

GEN İFADELERİ

Bcl-2/Bax Protein Ailesi

Apoptozisin mitokondriyal yolağının regülasyonu Bcl-2/Bax gen ailesi ile sağlanır. Bazı antiapoptotik (bcl-2, bcl-xL, Mcl-1) ve proapoptotik (bax, bad, bid) proteinler bu grupta yer almaktadır. “Bcl-2/Bax” oranı “ölüm anahtarı” olarak değerlendirilmektedir. Bu proteinlerin seviyeleri hücrenin öleceğine veya yaşayacağına karar verir. Örneğin Bcl-2'nin Bax ile olan etkileşiminde, Bcl-2'nin oranının daha yüksek olması hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlarken, Bax'ın daha fazla olması durumunda hücre ölüme gitmektedir (25,66).

Bcl-2, güçlü bir ölüm inhibitörüdür. Antioksidan yolda mitokondriden sitokrom-c salınımını engellemede rol oynar. Bcl-2'nin ayrıca mitokondri ile olan ilişkisinden dolayı antioksidan bir etkiye sahip olduğu ve böylece oksidan stresin neden olduğu apoptozisi baskılayabildiği gösterilmiştir (26, 67).

Bcl-2 ve myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1), Bcl-2-like 1 (Bcl-xL), Bcl-2-like 2 (Bcl-w) ve Bcl-2 ilişkili protein A1 (Bfl-1) gibi diğer antiapoptotik proteinlerin ekspresyonu; Bax ve Bak proteinlerinin homo-oligomerizasyonunu ve aktivasyonunu engelleyerek hücre ölümünü bloke eder. Bcl-xL ve Bcl-2 birlikte mitokondri membran geçirgenliğini korurlar (23,24,27).

Apoptotik uyarıya yanıt olarak Bcl-2 ailesinin sadece BH3 alanını içeren belirli üyeleri aktive olur. BH3 proteinleri, Bcl-2 ilişkili X proteininin (Bax) ya da Bcl-2 antagonist /killer-1 (Bak) gibi proapoptotik proteinlerin mitokondride aktivasyonuna yol açar. Apoptotik uyarı Bax-Bax homodimerlerinin oluşumuna ve sitozolden mitokondriye translokasyonuna neden olur. Bax integral bir membran protein haline gelir. Bax ve Bak mitokondri membranında por

oluşumunu indükler. Mitokondrinin selektif iyon geçirgenliği kaybolur. Bax'ın hidrofobik C terminal ucu açığa çıkar ve sitokrom c salınımına neden olur (27, 65-67).

Sitokrom c ve apoptozis indükleyici faktör olarak bilinen AIF, mitokondriden stoplazmaya çıkar. AIF doğrudan kromatin kondansasyonunun ve nükleer fragmentasyonun meydana geldiği çekirdeğe doğru yönelirken, sitokrom c apoptozisin en son basamağında rol alır. Sitokrom c bir stoplazma proteini olan Apaf-1'in aktivatörüdür. Sitokrom c'nin Apaf-1'e bağlanması prokaspaz-9'u aktive eder ve ATP'nin de katılımı ile oluşan komplekse 'apoptosom' denir. Prokaspaz 9'un aktivasyonu bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır (25).

Fas ligand ile Fas'ın aktivasyonu kaspaz 8'i aktive eder. Kaspaz 8 ise stoplazmadaki Bid'nin bölünerek aktiflenmesine yol açar. Oluşan tBid, Bcl-2'yi inaktive etmek veya Bax'ı aktiflemek üzere mitokondri membranına yerleşir ve mitokondri proteinleri ile etkileşerek apoptoze neden olur (64).

Apoptozis kompleks biyokimyasal kaskad olaylarının bir sonucudur. Kaspazlar normal hücrelerde inaktif proenzimler olarak sentez edilirler. Bir kaspazın diğer kaspazı aktive edebildiği bu proteolitik kaskad, apoptotik sinyal yolunu artırır ve hızlı hücre ölümüne neden olur. Kaspazlar sistein proteazlardır, aktiviteleri hücre ölüm yolunda ortaya çıkar. Tanımlanmış 10 büyük kaspaz; başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2, 8, 9, 10), efektör kaspazlar (kaspaz 3, 6, 7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz 1, 4, 5) olarak sınıflandırılmıştır (23, 24, 63).

Bcl-xl

İnsanlarda 20q11.21 kromozomda yerleşik olan Bcl-xl, Bcl-2 L1 tarafından kodlanır (68). Bcl-2'ye benzer şekilde 4 farklı Bcl-2 homolog alan (BH1-BH4) taşır. Bunlar da mitokondri dış membranı, endoplazmik retikulum ve nükleer membran gibi çeşitli membranöz komponentlere yerleşiktir (68-70). Bcl-2 ve Bcl-xl önemli antiapoptotik faktörler olup bu etkileri, antioksidan etkenleri yönetme yeteneklerinden kaynaklanmaktadır (71, 72).

Bcl-xl endoplazmik retikulumdaki kalsiyum depolarını azaltarak proapoptotik sitosolik kalsiyum düzeyini düşürür (73, 74). Bcl-xl sadece proapoptotik faktörleri antagonize ederek sitoprotektif etki göstermez aynı zamanda p53 aktivitesini de etkisiz hale getirir (75).

Yapılan çalışmalarda Bcl-xl'nin intraselüler Asetil CoA düzeylerini sınırladığı bildirilmiştir. Bundan dolayı yüksek Bcl-xl düzeyleri sitoprotektif etki göstererek krebs döngüsündeki tüm metabolitlerin düzeyini azaltır (76).

Kolon ve akciğer adenokarsinomlarında Bcl-xl düzeyleri yüksek olarak bulunmuştur. Ayrıca Bcl-xl düzeyinin kolon adenokarsinomlarda evre ile ilişkili olduğu bulunmuş, ancak aynı ilişki akciğer adenokarsinomlarında saptanamamıştır (77).

Bcl-xl hem normal oral skuamöz epitelde hem de skuamöz hücreli karsinomlarında salgılanmaktadır. Bcl-xl, karsinomlarda daha yaygın bir şekilde sitoplazmik salınım gösterirken normal epitelde hem sitoplazmik hem de nükleer salınımı göstermiştir. Yüksek düzeydeki Bcl-xl'nin klinikopatolojik değişkenlerle herhangi bir ilişki içerisinde olmadığı bildirilmiştir (78).

Over karsinomlarında Bcl-xl yüksekliğinin hastalarda sağ kalımı kısalttığı bildirilmiştir (79). Mesane karsinomlarının büyük çoğunluğunda Bcl-xl düzeylerinin yüksek olduğu bulunmuş ve bu düzeylerin tümörün evre ve derecesi ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (80). Pankreasın duktal adenokarsinomlarında da Bcl-xl yüksek düzeyde tespit edilmiştir. Bu proteinin inhibisyonu ile tedaviye olan yanıtı kolaylaştırabileceği bildirilmiştir (81, 82). Meme karsinomlarında Bcl-xl düzeylerinin yüksekliğinin tümörün radyoterapiye duyarlılığını azalttığı gösterilmiştir. Bcl-xl'nin inhibisyonunun tümörün radyoterapiye duyarlı hale getireceği bildirilmiştir (83). Prostat karsinomlarında da artmış Bcl-xl düzeyleri tespit edilmiştir. Çeşitli moleküllerle bu proteinin inhibisyonunun kanser hücrelerinin apoptozis yeteneğini arttırabileceği ön görülmüştür (84, 85).

Survivin Yapı ve Fonksiyonu

Survivin geni insan kromozomunun 17q25 üzerinde bulunur. İnterfazda survivin ubiquitinasyon ve proteazom bağımlı destruksiyon ile ayrılır ve daha sonra ekspresyonu hücre siklus perodisitesine katkıda bulunur. Sadece survivin ve survivin-ΔEx-3 ün apoptozun engellenmesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (86).

Survivin ve Kanser Moleküler Tanısı

Retropektif çalışmalarda, survivin ekspresyonu olan hastalarda, hastalık progresyonun olumsuz markerları, artmış rekürrens hızı ve tedaviye artmış direnç ile ilişkili olarak kısalmış yaşam süresi gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda, survivin ekspresyonu bcl-2 ya da düşük apoptotik indeksle ilişkili bulunmuştur (86).

Survivin peptidlerine karşı HLA sınıf-1 kısıtlı sitolitik T hücreleri in vivo meme kanseri, lösemi ve melanoma hastalarında bulunur. Survivin yeni ya da rekürren mesane kanserli tüm hastaların idrarında saptanırken (%100 spesifiklik), gönüllüler ve neoplastik olmayan

genitoüriner hastalık ya da mesane dışı genitoüriner kanserli hastaların idrarında survivin negatif test edilmiştir (86,87).

Isı Şok Proteinleri

Moleküler şaperonlar olarak bilinen proteinler polipeptitlerin ribozomal çıkış tüneline çıkmasına yardım ederek katlanmalarını sağlarlar. Birçok hastalıkta proteinlerin hücre içinde katlanmasının engellenmesi vardır (88). Isı şok proteini (Hsp) ve şaperon isimleri genelde aynı anlamda kullanılırsa da şaperon aktivitesi göstermeyen bazı Hsp'ler ve tam tersi olarak Hsp ailesi üyesi olmayan bazı şaperonlar vardır (89).

Hücreler ani ısı artışı, anoksi, reaktif oksijen bileşikleri ve glukoz düzey değişikliğine maruz kaldıklarında ısı şok proteinleri (Hsp) olarak adlandırılan proteinler sentezler. Şaperon fonksiyonu olan majör Hsp'ler: Hsp104, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 ve küçük Hsp'ler (Hsp27)'dir (89).

Isı Şok Proteinlerinin Fizyolojik Fonksiyonları

Hsp 60 ve Hsp 70 ailelerinin bireyleri, hücre içi polipeptidlerin katlanma, açılma ve translokasyonunda olduğu kadar, oligomerik protein komplekslerin toplanma, birleşme ve ayrılmasında da önemli rol oynar. Hsp 70 endoplazmik retikulum içinde ağır zincirlerin prematür bir şekilde kendi aralarında birleşmesini engeller.

Isı Şok Protein Aileleri

Isı şok proteinleri, molekül ağırlıklarına göre bazı alt gruplara ayrılırlar.

Büyük Hsp'ler: Dev AAA süperailisinin (çeşitli hücre aktiviteleriyle ilgili ATPazlar) üyesi Hsp100 şaperonları kararlı katlanmış proteinleri bile çözme ve büyük protein çöktürmelerini çekip ayırma yeteneğine sahiptirler (90).

Küçük Hsp'ler: Stresle bozulan protein çöktürmelerinin açılması ve yeniden katlanmasında kullanılan ATP bağımlı şaperonların stabilizasyonunda çeşitli rolleri vardır (89).

Hsp70: Hsp70 polipeptitlerin açılmış hidrofobik alanlarına bağlanır. Hsp70 aktivitesi ATP bağlama, ATP hidrolizi, nükleotit değiştirme döngüleriyle kontrol edilir (91).

Hsp40: Yeni sentezlenmiş proteinlerin üçte biri katlanma ve oligomerizasyon için endoplazmik retikulum lümenine taşınır. Hsp40 içeren endoplazmik retikulum moleküler şaperonları, bu proteinlerin çökmesini engeller ve katlanmasına yardım eder (92).

Hsp60: Olgunlaşmamış proteinleri natif konformasyonuna katlamada görev alırlar (93). İlk olarak enfeksiyöz ajanların Hsp60 salınımında majör rol oynadığı düşünülmüştür. Özellikle klamidy enfeksiyonlarında yaşam döngüsünün litik fazında konak hücrelerden ve kendisinden

Hsp60 salgılanır. Bunun sonucunda kanda klamidya antikorları ve Hsp60 seviyesi anlamlı olarak yüksektir ve bu hastaların aterosklerotik lezyonlarına bakıldığında human ve klamidyal Hsp60 düzeyinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür (94). İkinci olarak Hsp60'ın, kronik inflamasyon sonucunda ölmüş olan hücrelerden salınıyor olabileceği düşünülmüştür (95-97).

Son olarak da hücre yüzeyinde üretilmiş olan Hsp60 apoptoz ile mikropartiküller halinde kana salınıyor olabileceği hipotezi üzerinde durulmuştur. Sonuç olarak dolaşımdaki Hsp60 çeşitli yollarla salınmış olabileceği görülmüştür (98).

Tüm insanlar enfeksiyon ve aşılama ile Hsp60 antijenine karşı koruyucu ve yararlı bir bağışıklık geliştirir. Fizyolojik şartlar altında, vasküler endotel hücrelerinden Hsp60 salınımı yoktur. Fakat klasik aterosklerotik risk faktörleriyle vasküler endotel stres altında kaldığında Hsp60 ve adezyon molekülleri eş zamanlı olarak salınarak hücresel ve humoral immüniteyi tetiklemektedir (99).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'nda, 2015-2016 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Aktif İmmün trompositopeni tanısı alan 12 hasta, steroid tedavisi sonrası remisyon dönemine giren 12 hasta ve 10 yaş ve cinsiyet grubu eşleştirilmiş sağlıklı kontrol grubu çalışmaya dahil edildi. 12 sağlıklı gönüllü ile çalışmaya başlanılmış ancak çalışma sonucunda 10 gönüllünün verileri kabul edilebilir görülmiştir.

Çalışma protokolünün amacı, gereç ve yöntemleri, gönüllü bilgilendirme metninin gözden geçirilmesi sonucunda, Helsinki Deklarasyonu Kararları'na, Hasta Hakları Yönetmeliği'ne ve etik kurallarına uygun olarak tasarlandı. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 21.01.2015 tarihinde etik kurul onay belgesi alındı (Ek 1). Çalışma, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: TÜBAP 2015-40).

Çalışma kapsamına alınan her birey “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu” okunarak bilgilendirildi, çalışmaya katılan kişi tarafından imzalanan formun bir kopyası katılımcıya verildi.

KAN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI

Genetik çalışmalar kapsamında immün trombositopenili 12 aktif, 12 remisyonunda 10 sağlıklı kontrol vericiden EDTA'lı kan tüpleri kullanılarak her denekten 1 tüp olmak üzere 5 cc kan alındı. EDTA'lı kan tüplerinde bulunan kan örnekleri vida kapaklı alüminyum cryotüp taşıma ataçmanına yerleştirildi ve içinde sıvı azot bulunan dewar kabına daldırıldı. Örnekler dewar kabı ile laboratuvara getirildi ve getirilen bu örnekler çalışma yapılınca kadar -80 °C'de derin dondurucuda depolandı.

RNA İzolasyonu

Kan dokularından total RNA izolasyonu için Total RNA PureLink® RNA Mini Kit (Life Sciences) kullanıldı ve RNA kit protokolüne göre izole edildi. Kan dokularından izole edilen RNA miktarları Qubit® Fluorometer (Invitrogen) ile belirlendi ve High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) kullanılarak PCR şartları Step 1: 25°C, 10 dk; Step 2: 37 °C, 120 dk; Step 3: 85 °C, 5 dk olacak şekilde programlanarak ve cDNA sentezi yapıldı. Elde edilen cDNA'lar daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere -20 C'de saklandı.

Real Time-PCR (RT-PCR) Çalışmaları

Deneme ve Kontrol gruplarında oksidatif hasar biomarkeri olan ve aynı zamanda hücrelerde reaktif oksijen türleri (ROS)'nin süpürülerek hücre DNA'sı ve organellerin zarar görmesini engelleyen Süper oksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) enzim sentezinden sorumlu gen ifadeleri, aynı zamanda özellikle mitokondrial DNA hasarı sonucu oluşabilecek yanlış proteinlerin imhası ve proteinlerin düzgün olarak katlanmasından sorumlu ısı şok protein (Heat Shock Protein) HSP60 gen ifadeleri, ayrıca apoptoz sinyal yolağından inhibitor, aktivatör ve başlangıç genleri olarak görev üstlenen p27, bclxl ve survivin genlerinin ifadeleri, elde edilen cDNA kütüphaneleri kullanılarak gen ifadeleri düzeyinde ortaya konuldu.

Bu çalışmada cDNA'lar, RT-PCR'da SYBR Green boyası kullanılarak floresan emüsyon ölçümü yapılarak tespit edildi. qPCR Mastermix protokolüne uygun olarak,

SOD:	F(5'-GTTCGGTGACAACACCAATG-3') ve R(5'-GGAGTCGGTGATGTTGACCT-3'),
CAT:	F(5'-TACGAGCAGGCCAAGAAGTT-3') ve R(5'-ACCTTGTACGGGCAGTTCAC-3'),
HSP60:	F(5'GTCGCGCCCCGTTAGCAC 3') R(5'CATCGCGTCCCACCTTCTTCAT 3')
Survivin:	F(5' GACGACCCCATAGAGGAACA-3') R(5' GACAGAAAGGAAAGCGCAAC -3')
Bcl-xL:	F(5'GTAAACTGGGGTCGCATTGT-3') R(5'-TGGATCCAAGGCTCTAGGTG-3')
p27 Kip1:	F(5'-CCGGCTAACTCTGAGGACAC-3') R(5'-TTGCAGGTCGCTTCCTTATT-3')

primerleri kullanılarak RT-PCR’da PCR program: 1 döngü 2 dakika 50°C ve 10 dakika 95°C, bunu takiben, 40 döngü denaturasyon (95°C 15 s) ve annelling ve uzatma (60°C ‘de 1 dakika) ile çoğaltıldı ve gen ekspresyonlarına ait pikler belirlendi. Düzeltme faktörü olarak GAPDH: F (5’- TTGGTATCGTGGAAGGACTCA-3’) ve (5’- TGTCATCATA TTTGGCAGGTTT-3’) primerleri kullanıldı ve relatif gen ekspresyonları tanımlandı.

İstatistiksel Yöntem

Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma, medyan frekans ve oran değerleri kullanıldı. Değişkenlerin dağılımı Kolmogorov Simirnov test ile ölçüldü. Nicel bağımsız verilerin analizinde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Bağımlı nicel verilerin analizinde Wilcoxon testi kullanıldı. Nitel bağımsız verilerin analizinde Ki-kare test, Ki-kare test koşulları sağlanmadığında Fischer test kullanıldı. Trombositlerin akut dönem gen ekspresyonları ile analizinde Spearman korelasyonu kullanıldı. Analizlerde SPSS 20.0 (Lisans No:10240642) programı kullanıldı. Anlamlı p değeri ($p<0.05$) olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışma grubumuz toplamda 24 İTP tanılı olgudan ve 10 kontrol bireyinden oluşturulan prospektif bir çalışma olarak planlandı. Tanıdan itibaren ilk 3 ayı kapsayan dönemde trombositopenisi olan 12 aktif-tedavi almamış yeni olgu akut dönemdeki hastalar olarak, steroid tedavisi sonrası trombosit sayıları $100.000/\text{mm}^3$ üzerine çıkan 12 olgu remisyon dönemindeki hastalar olarak çalışmaya dahil edildi. Kontrol Grubu olarak 10 sağlıklı gönüllü çalışmaya alındı.

Olguların yaş ortalaması 42,41 yıl idi. Akut İTP grubunun ortalama trombosit sayısı $25.167 \pm \text{SD}/\text{mm}^3$ iken, steroid tedavisi sonrası remisyona giren grubun ortalama trombosit sayısı $186.250 \pm \text{SD}/\text{mm}^3$ 'tü.

Olgu ve kontrol grubunda hastaların cinsiyet dağılımı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Olgu ve kontrol grubunda hastaların cinsiyet dağılımları

		Olgu Grubu		Kontrol Grubu		p
		n	%	n	%	
Cinsiyet	Kadın	10	83,3	8	80,0	1,00 χ^2
	Erkek	2	16,7	2	20,0	

χ^2 Ki-kare test

$p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Çalışma sırasında elde ettiğimiz akut dönem, remisyon dönemi ve kontrol grubuna ait trombosit değerleri, apoptozis ve antioksidan ile ilişkili gen ve enzimlere ait verilerin tamamı Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. İTP hastalarında akut dönem, remisyon dönemi ve kontrol grubu değerleri

	Akut Dönem		Remisyon Dönemi		Kontrol Grubu	
	Ort.±s.s.	Medyan	Ort.±s.s.	Medyan	Ort.±s.s.	Medyan
GAPDH	31,3 ± 2,2	31,8	32,8 ± 2,2	33,2	34,3 ± 0,6	34,2
B-Actin	34,2 ± 1,3	34,4	33,6 ± 1,2	33,8	33,7 ± 0,7	33,5
Sod	37,5 ± 2,7	36,8	38,6 ± 4,2	36,5	37,3 ± 2,0	36,7
Cat	35,8 ± 1,6	35,5	34,7 ± 3,1	35,4	34,0 ± 1,1	33,9
Bcl2	31,0 ± 2,4	30,2	31,0 ± 2,0	30,6	32,5 ± 3,7	31,6
Cyc-C	37,5 ± 4,4	36,3	36,5 ± 3,5	35,3	32,4 ± 2,9	33,9
Hsp 60	39,9 ± 5,2	37,4	39,2 ± 4,6	37,5	38,9 ± 3,7	38,7
Hsp 70	42,1 ± 4,2	40,7	41,7 ± 6,0	39,7	41,6 ± 4,8	41,1
Bax	41,4 ± 7,0	37,8	40,4 ± 5,9	37,5	35,7 ± 2,5	35,1
Survivin	37,3 ± 5,8	35,8	37,2 ± 5,7	35,7	37,4 ± 3,0	38,0
Bcl-Xl	41,6 ± 2,3	41,9	41,7 ± 2,6	41,3	40,0 ± 1,1	40,0
Akt Cas3	35,5 ± 1,7	35,4	36,1 ± 5,1	34,8	32,8 ± 1,4	32,9
Trombosit	25.167	22.500	186.250	184.000	282.600	261.000

^w Wilcoxon test

Akut dönemde Cat, Cyc-C, Bax, Akt Cas 3 değeri kontrol grubundan anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti. Akut dönemde GAPDH değeri kontrol grubundan anlamlı ($p<0.05$) olarak daha düşüktü. Akut dönem ve kontrol grubunda B actin, SOD, Bcl-2, hsp60, hsp70, survivin ve bcl-xl değerleri anlamlı ($p>0.05$) farklılık göstermemiştir (Tablo 9).

Tablo 9. İTP hastalarında akut dönem ve kontrol grubu karşılaştırılması

	Akut Dönem		Kontrol Grubu		p
	Ort.±s.s.	Medyan	Ort.±s.s.	Medyan	
GAPDH	31,3 ± 2,2	31,8	34,3 ± 0,6	34,2	0,002 ^m
B-Actin	34,2 ± 1,3	34,4	33,7 ± 0,7	33,5	0,210 ^m
Sod	37,5 ± 2,7	36,8	37,3 ± 2,0	36,7	0,895 ^m
Cat	35,8 ± 1,6	35,5	34,0 ± 1,1	33,9	0,010 ^m
Bcl2	31,0 ± 2,4	30,2	32,5 ± 3,7	31,6	0,429 ^m
Cyc-C	37,5 ± 4,4	36,3	32,4 ± 2,9	33,9	0,000 ^m
Hsp 60	39,9 ± 5,2	37,4	38,9 ± 3,7	38,7	0,391 ^m
Hsp 70	42,1 ± 4,2	40,7	41,6 ± 4,8	41,1	0,692 ^m
Bax	41,4 ± 7,0	37,8	35,7 ± 2,5	35,1	0,007 ^m
Survivin	37,3 ± 5,8	35,8	37,4 ± 3,0	38,0	0,429 ^m
Bcl-Xl	41,6 ± 2,3	41,9	40,0 ± 1,1	40,0	0,129 ^m
Akt Cas3	35,5 ± 1,7	35,4	32,8 ± 1,4	32,9	0,001 ^m

^m Mann-whitney u test

* $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Remisyon döneminde Cat, Cyc-C, Bax, Akt Cas 3 değerleri kontrol grubundan anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti. Remisyon döneminde ve kontrol grubunda GAPDH, B actin, SOD, Bcl-2, hsp60, hsp70, survivin ve bcl-xl değerleri anlamlı ($p>0.05$) farklılık göstermemiştir (Tablo 10).

Tablo 10. İTP hastalarında remisyon dönemi ve kontrol grubu karşılaştırılması

	Remisyon Dönemi		Kontrol Grubu		p
	Ort.±s.s.	Medyan	Ort.±s.s.	Medyan	
GAPDH	32,8 ± 2,2	33,2	34,3 ± 0,6	34,2	0,075 ^m
B-Actin	33,6 ± 1,2	33,8	33,7 ± 0,7	33,5	0,895 ^m
Sod	38,6 ± 4,2	36,5	37,3 ± 2,0	36,7	0,947 ^m
Cat	34,7 ± 3,1	35,4	34,0 ± 1,1	33,9	0,025^m
Bcl2	31,0 ± 2,0	30,6	32,5 ± 3,7	31,6	0,356 ^m
Cyc-C	36,5 ± 3,5	35,3	32,4 ± 2,9	33,9	0,002^m
Hsp 60	39,2 ± 4,6	37,5	38,9 ± 3,7	38,7	0,792 ^m
Hsp 70	41,7 ± 6,0	39,7	41,6 ± 4,8	41,1	0,692 ^m
Bax	40,4 ± 5,9	37,5	35,7 ± 2,5	35,1	0,015^m
Survivin	37,2 ± 5,7	35,7	37,4 ± 3,0	38,0	0,356 ^m
Bcl-Xl	41,7 ± 2,6	41,3	40,0 ± 1,1	40,0	0,056 ^m
Akt Cas3	36,1 ± 5,1	34,8	32,8 ± 1,4	32,9	0,002^m

^m Mann-whitney u test

$p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Akut dönemde GAPDH değeri remisyon dönemine göre anlamlı ($p<0.05$) olarak daha düşüktü. Remisyon döneminde ve akut dönemde B actin, SOD, Cat, Bcl-2, Cyc-C, hsp60, hsp70, bax, survivin, bcl-xl ve akt cas 3 değeri anlamlı ($p>0.05$) farklılık göstermemiştir. (Tablo 11)

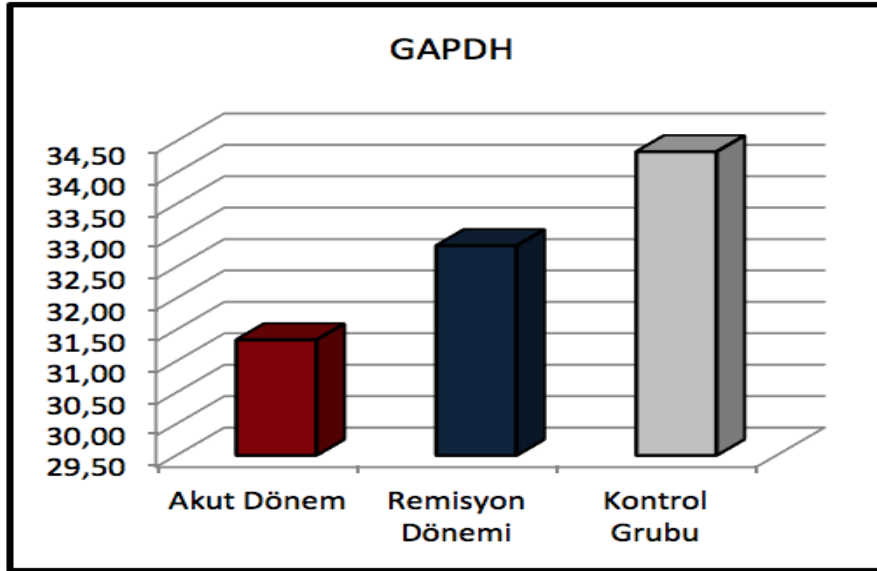
Tablo 11. İTP hastalarında akut dönem ve remisyon dönemi karşılaştırılması

	Akut Dönem		Remisyon Dönemi		p
	Ort.±s.s.	Medyan	Ort.±s.s.	Medyan	
GAPDH	31,3 ± 2,2	31,8	32,8 ± 2,2	33,2	0,019^w
B-Actin	34,2 ± 1,3	34,4	33,6 ± 1,2	33,8	0,209 ^w
SOD	37,5 ± 2,7	36,8	38,6 ± 4,2	36,5	0,638 ^w
Cat	35,8 ± 1,6	35,5	34,7 ± 3,1	35,4	0,272 ^w
Bcl2	31,0 ± 2,4	30,2	31,0 ± 2,0	30,6	1,000 ^w
Cyc-C	37,5 ± 4,4	36,3	36,5 ± 3,5	35,3	0,071 ^w
Hsp 60	39,9 ± 5,2	37,4	39,2 ± 4,6	37,5	0,875 ^w
Hsp 70	42,1 ± 4,2	40,7	41,7 ± 6,0	39,7	0,814 ^w
Bax	41,4 ± 7,0	37,8	40,4 ± 5,9	37,5	0,937 ^w
Survivin	37,3 ± 5,8	35,8	37,2 ± 5,7	35,7	0,937 ^w
Bcl-XI	41,6 ± 2,3	41,9	41,7 ± 2,6	41,3	0,875 ^w
Akt Cas3	35,5 ± 1,7	35,4	36,1 ± 5,1	34,8	0,638 ^w

^w Wilcoxon test

p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

İTP'li hastaların akut ve remisyon dönemleri ile kontrol grubunun GAPDH değerleri arasındaki ilişki Şekil 2'de gösterilmiştir.

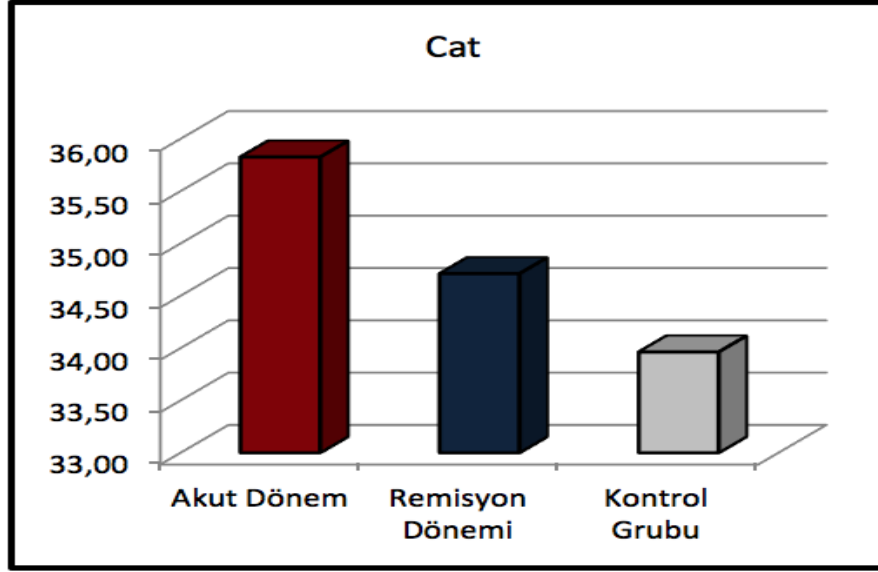


Şekil 2. İTP'li hastaların akut ve remisyon dönemleri ile kontrol grubunun GAPDH değerleri arasındaki ilişki

Akut dönemde GAPDH değeri kontrol grubundan anlamlı (p<0.05) olarak daha düşüktü. Akut dönemde GAPDH değeri Remisyon döneminde de anlamlı (p<0.05) olarak daha

düşüktü. Remisyon döneminde ve kontrol grubunda ise GAPDH değeri anlamlı ($p>0.05$) farklılık göstermemiştir.

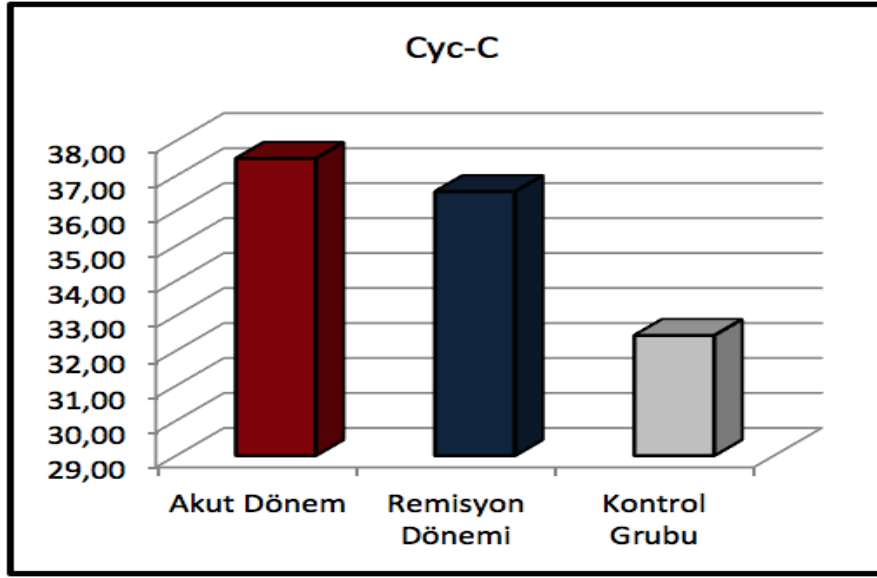
İTP’li hastaların akut ve remisyon dönemleri ile kontrol grubunun Cat değerleri arasındaki ilişki Şekil 3’te gösterilmiştir.



Şekil 3. İTP’li hastaların akut ve remisyon dönemleri ile kontrol grubunun Cat değerleri arasındaki ilişki

Akut ve Remisyon döneminde Cat değeri kontrol grubundan anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti.

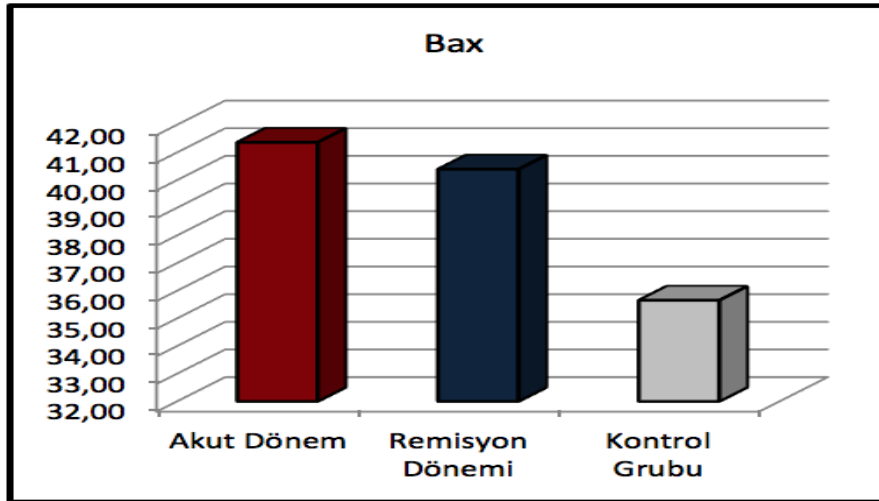
İTP’li hastaların akut ve remisyon dönemleri ile kontrol grubunun Cyc-C değerleri arasındaki ilişki Şekil 4’te gösterilmiştir.



Şekil 4. İTP’li hastaların akut ve remisyon dönemleri ile kontrol grubunun Cyc-C değerleri arasındaki ilişki

Akut ve Remisyon döneminde Cyc-C değeri kontrol grubundan anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti.

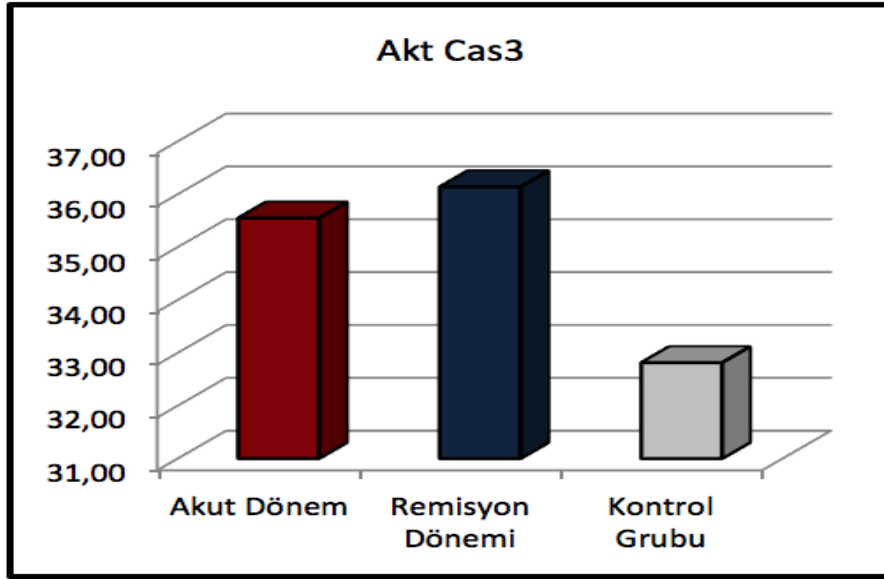
İTP’li hastaların akut ve remisyon dönemleri ile kontrol grubunun Bax değerleri arasındaki ilişki Şekil 5’te gösterilmiştir.



Şekil 5. İTP’li hastaların akut ve remisyon dönemleri ile kontrol grubunun Bax değerleri arasındaki ilişki

Akut ve Remisyon döneminde Bax değeri kontrol grubundan anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti.

İTP'li hastaların akut ve remisyon dönemleri ile kontrol grubunun Akt Cas 3 değerleri arasındaki ilişki Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6. İTP'li hastaların akut ve remisyon dönemleri ile kontrol grubunun Akt Cas 3 değerleri arasındaki ilişki

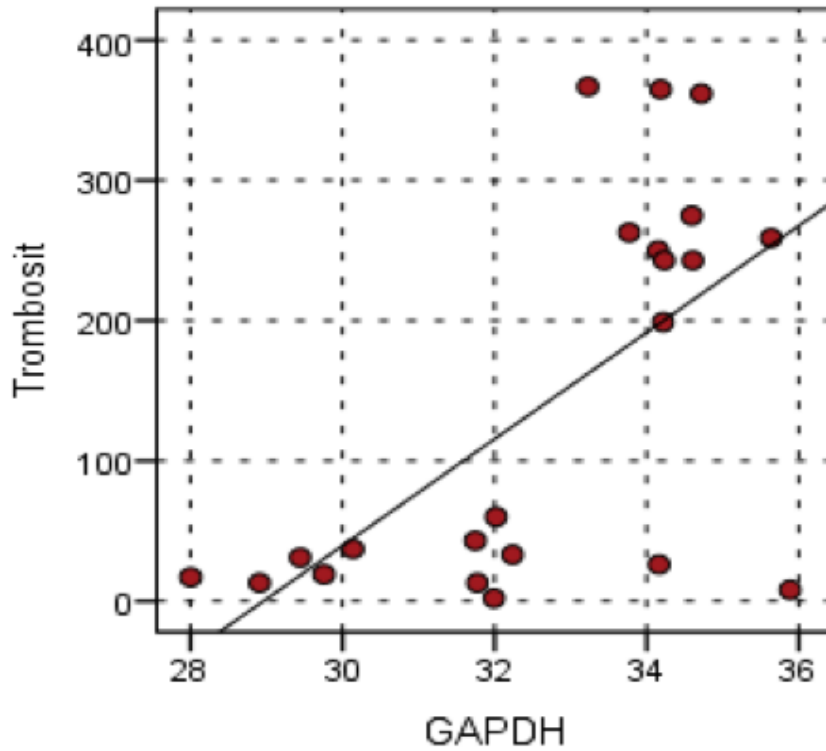
Akut ve Remisyon döneminde Akt Cas 3 değeri kontrol grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti.

Akut dönem trombosit değerleri ile akut dönem antioksidanlar ve apoptozis ile ilişkili genler arasındaki ilişki ve korelasyon katsayıları Tablo 12'de gösterilmiştir. Akut dönem trombosit değerleri ile akut dönem GAPDH değeri arasında anlamlı pozitif ($p < 0.05$) korelasyon gözlenmiştir (Şekil 7). Akut dönem trombosit değerleri ile akut dönem Cat değeri arasında anlamlı negatif ($p < 0.05$) korelasyon gözlenmiştir (Şekil 8). Akut dönem trombosit değerleri ile akut dönem Cyc-C değeri arasında anlamlı negatif ($p < 0.05$) korelasyon gözlenmiştir (Şekil 9). Akut dönem trombosit değerleri ile akut dönem akt-CAS3 değeri arasında anlamlı negatif ($p < 0.05$) korelasyon gözlenmiştir (Şekil 10). Akut dönem trombosit değerleri ile akut dönem B-actin, SOD, Bcl2, hsp 60, hsp70, bax, survivin, Bcl-XL değeri arasında anlamlı ($p > 0.05$) korelasyon gözlenmemiştir.

Tablo 12. Akut dönem trombosit değerleri ile akut dönem antioksidanlar ve apoptozis ile ilişkili genler arasındaki ilişki

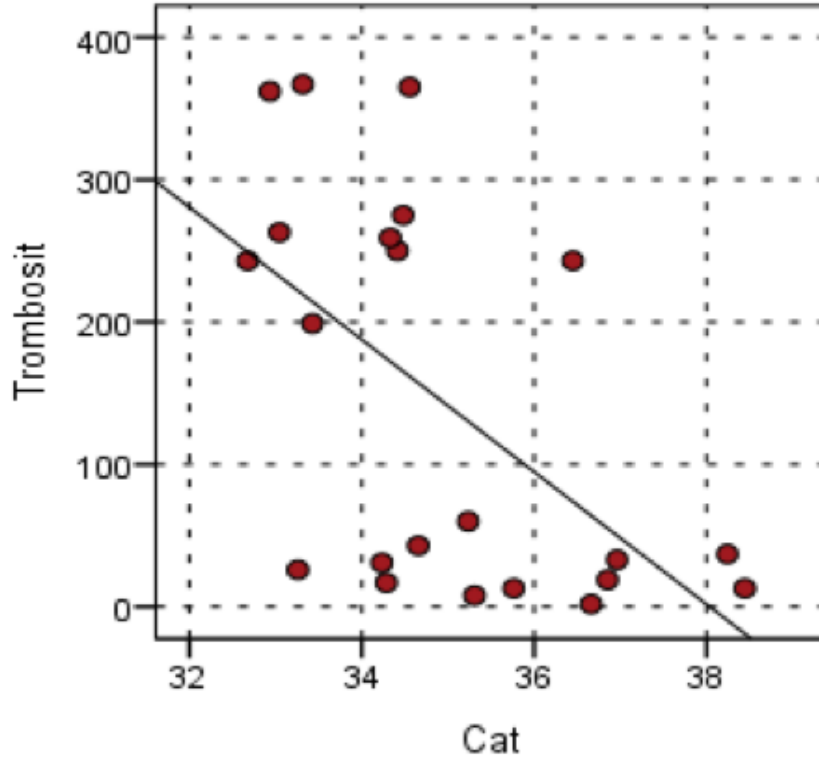
		GAPDH	B-Actin	SOD	Cat	Bcl2	Cyc-C
Trombosit	r	0,507	-0,110	-0,028	-0,534	0,324	-0,669
	p	0,016	0,627	0,903	0,010	0,142	0,001
		Hsp 60	Hsp 70	Bax	Survivin	Bcl-Xl	Akt
							Cas3
Trombosit	r	-0,184	0,103	-0,415	0,260	-0,104	-0,669
	p	0,412	0,647	0,055	0,243	0,645	0,001

Spearman Korelasyon



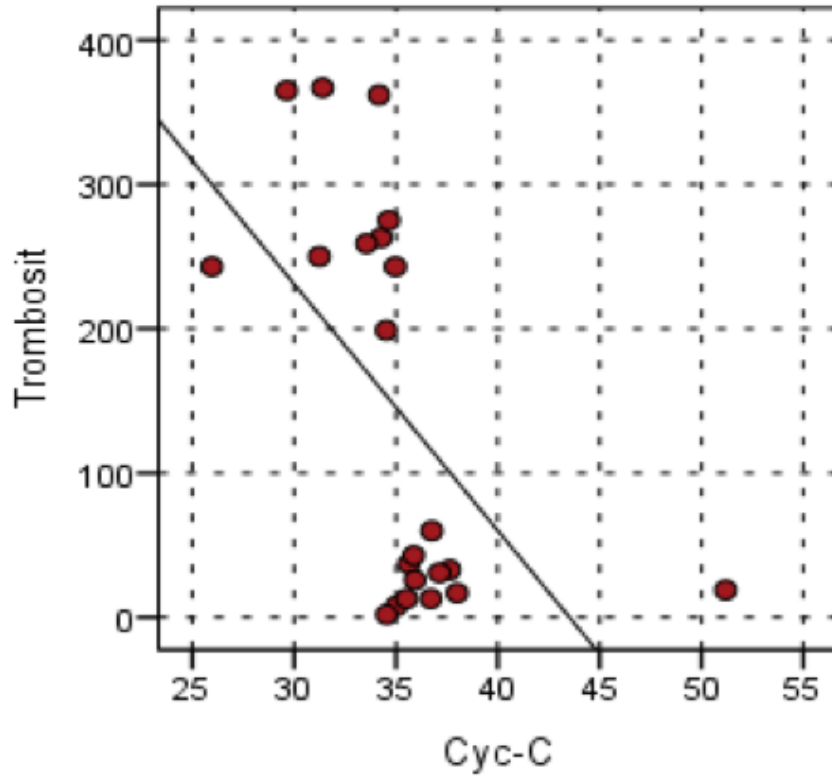
Şekil 7. Akut dönem trombosit değerleri ile akut dönem GAPDH değeri arasındaki ilişki

Akut dönem trombosit değerleri ile akut dönem GAPDH değeri arasında anlamlı pozitif ($p < 0.05$) korelasyon gözlenmiştir.



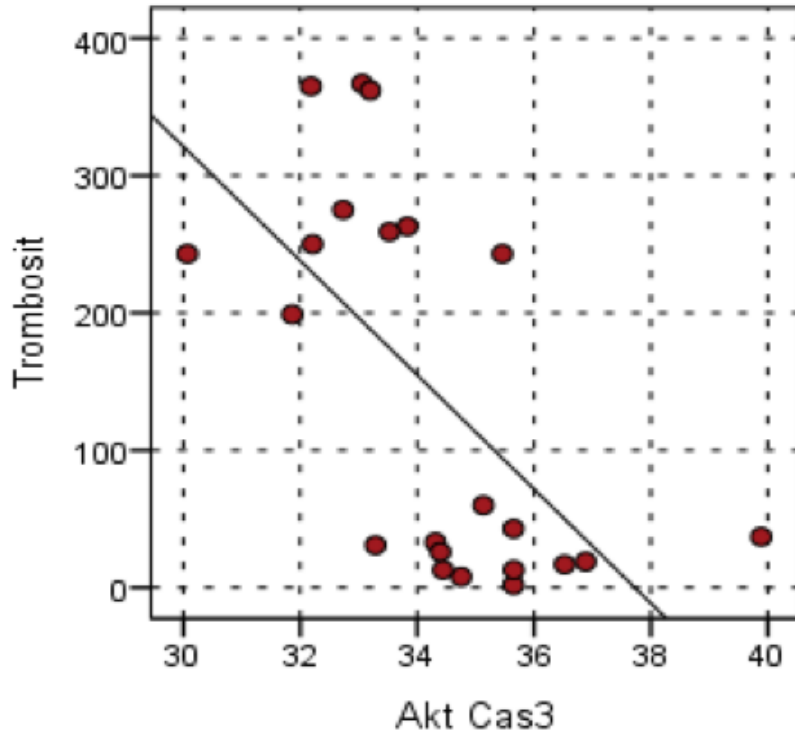
Şekil 8. Akut dönem trombosit değerleri ile akut dönem Cat değeri arasındaki ilişki

Akut dönem trombosit değerleri ile akut dönem Cat değeri arasında anlamlı negatif ($p < 0.05$) korelasyon gözlenmiştir.



Şekil 9. Akut dönem trombosit değerleri ile akut dönem Cyc-C değeri arasındaki ilişki

Akut dönem trombosit değerleri ile akut dönem Cyc-C değeri arasında anlamlı negatif ($p < 0.05$) korelasyon gözlenmiştir.



Şekil 10. Akut dönem trombosit değerleri ile akut dönem Akt-Cas3 değeri arasındaki ilişki

Akut dönem trombosit değerleri ile akut dönem Akt-Cas3 değeri arasında anlamlı negatif ($p < 0.05$) korelasyon gözlenmiştir.

ÇALIŞMAMIZDAKİ SINIRLAMALAR

Çalışmamızda homojen bir grup olması açısından 18- 75 yaş arası ve akut dönem İTP hastalarının olmasını amaçladık. İTP nin genel insidansının 3,2/100.000 olması nedeniyle bir yıl içerisinde kriterlere uygun hasta sayısının az olması çalışmamızın en önemli sınırlamasıdır. Çalışılmış olan 12 parametrelilik apoptoz/ antioksidan değerlendirilmesi , maliyet sınırlılığı nedeniyle 20- 25 hasta için yeterli olmuştur. Daha yüksek sayıda hasta ve kontrolün bulunduğu çalışmalar ile elde ettiğimiz verilerin sağlamasının yapılacağını tahmin etmekteyiz.

TARTIŞMA

İmmün trombositopeni, dolaşımdaki trombositlerin yıkımının artması ile tanımlanan, kendi kendini sınırlayabilen, otoimmün edinsel bir trombositopenidir. İmmün trombositopeni karmaşık bir patogenezele ortaya çıkan heterojen bir hastalıktır. İmmün patogenezin oksidatif etki, antioksidan mekanizma, apoptozis ve anti-apoptozis ile ilişkisini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (9, 100). Altta yatan mekanizmaların anlaşılması yapılan çalışmalarla yeni tedavi stratejileri gelişimine yol açabilir ve hasta alt gruplarının saptanması ile yeni tedavi yaklaşımlarına yarar sağlayabilir. Biz de çalışmamızda antioksidan ve apoptozis ilişkili gen ekspresyonlarını inceleyerek literatüre katkı yapmayı amaçladık.

Dolaşık ve ark. (101) yaptıkları çalışmada İTP'li hastalarda serum Hsp60, Hsp70, anti-Hsp60 ve anti-Hsp70 düzeylerini araştırmışlardır. Akut İTP hastalarında serum Hsp60 düzeyi, kronik İTP ve kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Trombosit sayısı 30000 *mm*³'ten yüksek olan İTP'li hastalarda Hsp60 düzeyi, trombosit sayısı 30000 *mm*³'ten düşük olan İTP'li hastalarla kıyaslandığında anlamlı derecede yüksek olup, serum Hsp60 düzeyi ile trombosit sayısı arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Düşük serum Hsp60 düzeyinin anti-inflamatuvar cevapta yetersizliğe yol açabileceği sonucuna varılmıştır. Bizim çalışmamızda ise akut ve remisyon döneminde hsp60 ve hsp70 tüm gruplarda istatistiki olarak anlamsız bulunmuştur. Ancak burada vurgulanması gereken önemli bir nokta da; Dolaşık ve ark. (101) İTP'li hastalarda serum protein düzeyini incelemişlerken, bizim çalışmamızda gen ekspresyonları incelenmiştir. Çalışmamızda denek sayısı az olmasından dolayı İTP patogenezinde Hsp'lerin rolünü anlamak ve İTP tanı, prognoz ve tedavisinde kullanılıp kullanılmayacağı ile ilgili karar vermek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.

Hücre içi Hsp koruyucu fonksiyona sahiptir. Isı şok proteinlerinin bu hücre koruyucu fonksiyonu anti-apoptotik özelliği ile açıklanır. Çalışmamızda Hsp 70 tüm gruplarda istatistiki olarak anlamsız bulunmuştur. Çalışmamızda Isı şok proteinlerinin anti-apoptotik patogeneze de etkisi gösterilememiştir fakat bunda asıl etkenin denek sayısının az olması olduğu düşünülmüştür.

İmmün trombositopeninin patofizyolojisinde bozulmuş hücrel immunitenin önemli olduğu kabul edilmiştir. Ancak T lenfositlerin polarizasyonu ve apoptotik profilleri anlaşılabilir kalmıştır. Chang-Lin WU ve ark. (102) T hücre alt gruplarının polarizasyonunu, T hücre alt gruplarında Fas/FasL, Bcl-2 ve Bax mRNA ifadelerini inceleyerek, İTP patogeneziindeki rollerini tartışmışlardır. Bcl-2 mRNA ifadesinin arttığını, Bax mRNA ise azaldığını göstermişlerdir. Bcl-2, Fas/FasL sisteme zıt olarak çalışan antiapoptotik proteindir. Bcl-2 ailesinde apoptozisle ilişkili birçok gen de bulunmaktadır. Bax geni hücre apoptozisini artırırken, Bcl-2 ise apoptozisi inhibe etmektedir.

Qiao ve ark. (103) yaptığı çalışmada Bcl-2 ailesine ait mitokondrial bir transmembran molekül olan Bcl-xl'in, apoptozu önleyerek sağkalımı önleyici bir protein gibi davrandığı gösterilmiştir. Bcl-xl; Bax ve Bcl-2 ile bir heterodimer oluşturulması yoluyla bir apoptotik aktivatör olarak işlev görür. Western blot ile ölçüldüğünde Bax protein ifadesi, İTP plazması ile inkübe edilen trombositlerde de daha yüksek olduğu bildirilmişti. Çalışmamızda tüm İTP'li olgularda Kontrol Grubu'na göre Bax istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p<0,05$). Çalışmaya dahil edilen gruplar arasında Bcl-2 ve Bcl-xl'de istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0,05$). Bax proteinin tüm İTP'li olgularda yüksek olması literatür ile uyumlu bir bulgu olup, İTP patogeneziinde apoptotik mekanizmaların etkisini göstermektedir. Anti-apoptotik gen ailesine mensup olan Bcl-2 ve Bcl-xl'de istatistiki olarak anlamlı farklılığın izlenmemesi literatür ile uyumlu değildir ve denek sayısının azlığı ile açıklanabilir.

Winkler ve ark. (104) yaptığı çalışmada akut İTP'li hastalarda kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 9 gibi apoptotik markerlar, fosfotidilserin maruziyeti ve mitokondriyal iç membran potansiyeli analiz edilmiştir. İTP'li hastalarda aktive kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 9, mikropartikül oluşumunun ve fosfotidilserin maruziyetinin arttığı ve mitokondriyal iç membran potansiyelinin azaldığı gösterilmiştir. IVIG tedavisi sonrası kaspaz 3, 8, 9 mikropartikül formasyonu ve fosfotidilserin maruziyetinin azaldığı, fakat mitokondri iç membran potansiyelinde değişiklik olmadığı gösterilmiştir. Çekirdekli hücrelerde membran tomurcuklanması, kromatin yoğunlaşması gibi morfolojik değişiklikler apoptozisin özelliklerindendir. Ayrıca apoptozisin iyi tanımlanmış bulguları kaspaz 3, 8 ve 9'un aktivasyonu, mitokondriyal iç membran potansiyelinin değişimi ve mitokondri iç

membranından sitokrom c gibi faktörlerin salınımıdır. Çekirdeksiz hücreler olan plateletlerde kaspaz 3, 8, 9 aktivasyonu, mitokondriyal iç membran potansiyelinde değişim ve mikropartikül oluşumunu saptamışlardır. Çalışmamızda Akut ve remisyon döneminde Akt Cas 3 değeri kontrol grubundan anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti. Bu da literatür ile uyumlu bir bulgu olup immün trombositopeni patogenezinde apoptozisin rolünü ortaya koymaktadır.

Artmış oksidatif stresin, inflamasyona olan katkısından ve apoptotik hücre ölümündeki rolünden dolayı otoimmün hastalıkların patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (105). Jin CQ ve ark. (106) yaptığı çalışmada serum NO, GSSG, MDA, TOS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ve serum SOD, CAT, GSH-Px, GSH, TAS düzeyleri kronik İTP'li hastalarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu bildirilmiştir ($p<0.05$). Bu çalışma oksijen serbest radikallerinin arttığını ve oksijensiz radikalleri temizlemek için antioksidan enzim kapasitesinin kronik İTP'li hastaların serumunda azaldığını göstermektedir. Trombosit sayısı ile NO, GSSG, MDA, TOS arasında da anlamlı negatif korelasyonlar bildirilmiştir ($p<0.05$). Bu arada, trombosit sayısı ile SOD, CAT, GSH-Px, GSH ve TAS arasında anlamlı pozitif korelasyon vardı ($p<0.05$). Bu bulgulara dayanarak, oksidatif stresin trombositlerin yapısal ve fonksiyonel hasarına ve kronik İTP'de trombositopeninin mekanizmasına etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, oksidatif stresin trombosit hasarında rolü olduğu düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda ise Cat tüm gruplarda istatistiki olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuşken, SOD tüm gruplarda istatistiki olarak anlamsız bulunmuştur. Jin CQ ve ark. (106) yaptığı çalışmada SOD ve Cat kronik İTP'li hastalarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı daha düşük bulunmuştur, bizim İTP'li hasta grubumuz akut ve remisyon dönemindeki hastaları kapsadığı için oksidatif stresin akut dönemdeki etkisinin henüz görülmediği yorumu yapılabilir.

İTP'li hastalarda apoptozisi önleme amacıyla PDGF-BB'nin verildiği bir çalışmada, p53 ve p21 seviyeleri azalırken survivin seviyesinin arttığı gösterilmiştir (107). Meme kanseri prognozunda survivin geninin rolünü araştıran bir çalışmada ise, survivin geni kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (108). Bizim çalışmamızda ise survivin gen ekspresyonu tüm gruplarda istatistiki olarak anlamsız bulunmuştur.

Her ne kadar uzun süreden beri İTP'nin trombosit yıkımında artışla seyreden bir hastalık olduğu bilinmesine rağmen, yeni çalışmalar aynı zamanda İTP'nin yetersiz trombosit üretimi ile karakterize olduğunu da göstermiştir. Bunun geçerli açıklaması, anti-platelet antikorun (ve muhtemelen sitotoksik kemik iliği lenfositlerinin) megakaryosit prekürsörlerinin çoğalmasını azaltması ve apoptozise neden olmasıdır. TPO, megakaryosit öncüllerinin ve megakaryositlerin apoptozisini önleyebildiğinden, TPO tedavisinin trombosit üretimini artırabileceği ve trombosit

sayısını arttırdığı hipotezleri ileri sürülmüştür (109). Bu ve benzeri çalışmaların sonucunda immün trombositopeni tedavisinde kullanılan Romiplostim ve Eltrombopag gibi trombopoietin reseptörlerini aktive ederek etkinlik gösteren moleküller geliştirilmiş ve tedavide kullanıma sunulmuştur (110). Bizim çalışmamızda da apoptozis ile ilişkili gen ekspresyonları araştırılarak benzer tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için literatüre katkı sağlanmaya çalışılmıştır.

Literatüre bakıldığı zaman İTP patogenezinde oksidatif etki, antioksidan mekanizma, apoptozis ve anti-apoptozisin etkisinin önemli bir rol oynadığı görülmektedir. Antioksidan ve apoptozis ilişkili gen ekspresyonlarını değerlendirdiğimiz bu çalışmada bazı bulgularımız literatür ile uyumlu iken istatistiki olarak anlamsız ve literatür ile uyumsuz verilerimiz de bulunmaktadır. Daha fazla sayıda hasta ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir. Benzer çalışmaların yapılması İTP patogenezinin aydınlatılması, tanı, tedavi ve prognoz açısından literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.

SONUÇLAR

Mart 2015 ile Mart 2016 tarihleri arasında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'nda, "İmmün Trombositopenili Hastalarda Antioksidan ve Apoptosis İlişkili Gen İfadelerinin Değerlendirilmesi" amacıyla yaptığımız çalışmamızda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. İTP patogenezinde oksidatif hasar ve apoptozisin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerin bir kısmı literatürle uyumludur.
2. Genel olarak literatüre bakıldığında hastaların ortalama yaşı 56 olarak belirtilse de bizim çalışmamızda hastaların yaş ortalaması 42,41 yıl idi. Akut İTP grubunun ortalama trombosit sayısı $24.000/\text{mm}^3$ iken steroid tedavisi sonrası remisyona giren grubun ortalama trombosit sayısı $186.000/\text{mm}^3$ 'tü.
3. Akut dönemde GAPDH değeri kontrol grubundan anlamlı ($p<0.05$) olarak daha düşüktü. Akut dönemde Cat, Cyc-c, Bax, Akt Cas 3 değeri kontrol grubundan anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti. Akut dönem ve kontrol grubunda B actin değeri, SOD değeri, Bcl-2 değeri, hsp 60 değeri, hsp 70 değeri, survivin değeri, bcl-xI değeri anlamlı ($p>0.05$) farklılık göstermemiştir.
4. Remisyon döneminde Cat, Cyc-C, Bax, Akt Cas 3 değeri kontrol grubundan anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti. Remisyon dönemi ve kontrol grubunda GAPDH B actin değeri, sod değeri, Bcl2 değeri, hsp 60 değeri, hsp 70 değeri, survivin değeri, bcl-XI değeri anlamlı ($p>0.05$) farklılık göstermemiştir.
5. Akut dönemde GAPDH değeri remisyon döneminden anlamlı ($p<0.05$) olarak daha düşüktü. Remisyon dönemi ve akut dönemde actin değeri, SOD değeri, Cat değeri, Bcl2

değeri, cyc-C değeri, hsp 60 değeri, hsp 70 değeri, bax değeri, survivin değeri, bcl-xI değeri, akt cas 3 değeri anlamlı ($p>0.05$) farklılık göstermemiştir.

6. Akut dönem trombosit değerleri ile akut dönem GAPDH değeri arasında anlamlı pozitif, akut dönem trombosit değerleri ile akut dönem Cat, Cyc-C, akt-CAS3 değerleri arasında anlamlı negatif ($p<0.05$) korelasyon gözlenmiştir. Akut dönem trombosit değerleri ile akut dönem B-actin, SOD, Bcl2, hsp 60, hsp79, bax, survivin, Bcl-XL değeri arasında anlamlı ($p>0.05$) korelasyon gözlenmemiştir.



ÖZET

İmmün trombositopeni tanısı konan hastalardan; akut ve kronik dönemlerde ve sağlıklı gönüllülerde antioksidan ve apoptozis ilişkili gen ifadelerinin trombosit düzeyleri ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Bölümü'ne Mart 2015–Mart 2016 arasında başvuran, 12 aktif, 12 remisyon döneminde hasta ve 10 sağlıklı gönüllü kullanılarak, İmmün trombositopenili hastalarda antioksidan ve apoptozis ilişkili gen ekspresyonları değerlendirilmiştir.

Çalışmaya alınan 12 hasta ve 10 sağlıklı gönüllünün; akut dönemde GAPDH değeri kontrol grubundan anlamlı ($p<0.05$) olarak daha düşüktü. Akut dönemde Cat, Cyc-c, Bax ve Cas 3 değeri kontrol grubundan anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti. Akut dönem ve kontrol grubunda B actin değeri, sod değeri, Bcl-2 değeri, hsp 60 değeri, hsp 70 değeri, survivin değeri, bcl-xI değeri anlamlı ($p>0.05$) farklılık göstermemiştir. Remisyon döneminde Cat, Cyc-c, Bax, Cas 3 değeri kontrol grubundan anlamlı ($p<0.05$) olarak daha yüksekti. Remisyon döneminde ve kontrol grubunda GAPDH, B actin, SOD, Bcl-2, hsp 60, hsp 70, survivin ve bcl-xI değerleri anlamlı ($p>0.05$) farklılık göstermemiştir.

Çalışmamızda Akut ve Remisyon dönemi hastalarında Cat, Cyc-c, Bax, Cas 3'ün istatistiki olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmış olup trombositlerin immün yıkımında apoptozisin ve gen ekspresyonlarının rolü olabileceği düşünülmüştür. Akut dönem, remisyon dönemi ve kontrol grubunda B actin değeri, SOD değeri, Bcl-2 değeri, hsp 60 değeri, hsp 70 değeri, survivin değeri, bcl-xI değeri anlamlı ($p>0.05$) farklılık göstermemiştir.

Bulgularımız, antioksidan kapasitedeki azalmanın patogeneizde yeri olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle asıl tedaviye antioksidan ilaçların eklenmesi veya antioksidan kapasiteyi arttırıcı önlemler alınması gerekmektedir. Ayrıca apoptozis artışına karşın proliferasyonu arttırıcı etkileri bilinen trombomimetik gibi ajanların kullanılmasının akılcı ilaç kullanımında ne kadar yeri olduğu bizim çalışmamızda da gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: İmmün trombositopeni, apoptosis, gen ekspresyonu



EVALUATION OF ANTIOXIDANT AND APOPTOSIS RELATED GENE EXPRESSIONS IN IMMUNE THROMBOCYTOPENIC PURPURATED PATIENTS

SUMMARY

The aim of this study was to investigate antioxidant and apoptosis related gene expressions in patients with immune thrombocytopenia. It was also planned to investigate whether there is a relationship between disease activity and gene levels by looking at the gene polymorphism in the acute-remission periods of patients and in healthy control cases with immune thrombocytopenia.

The present study included 12 acute patients, 12 remission period patients followed up in Hematology Division of Department of Internal Medicine of Medical School of Trakya University with the diagnosis of immune thrombocytopenia and 10 healthy subjects.

We evaluated antioxidant and apoptosis related gene expressions in immune thrombocytopenic patients.

We have 12 patients and 10 volunteers. GAPDH enzyme level analyzed in the acute phase which was found to be significantly lower ($p < 0.05$). In the acute phase, Cat, Cyc-c, Bax and Cas 3 values were significantly higher ($p < 0.05$) than the control group. In acute phase and control group, B-actin, sod, Bcl-2, hsp 60, hsp 70, survivin and bcl-xI value did not show significant difference ($p > 0.05$). In the remission period, values of Cat, Cyc-c, Bax, Cas 3 were significantly higher than control group ($p < 0.05$). In the remission period and control group, GAPDH, B-actin, SOD, Bcl-2, hsp 60, hsp 70, survivin and bcl-xI value did not differ significantly ($p > 0.05$). In our study, Cat, Cyc-c, Bax, Cas 3 were found to be statistically

significantly higher in patients with acute and remission period of immune thrombocytopenia, and it was thought that apoptosis and gene expression might play a role in the immunodeficiency of thrombocytes. In acute phase, remission period and control group, B actin value, SOD value, Bcl-2 value, hsp 60 value, hsp 70 value, survivin value, bcl-xI value did not show significant difference ($p>0.05$).

Our finding suggest that the antioxidant capacity is the place in the pathogenesis of reduction. Therefore it is necessary to addition of noble treatment antioxidant drugs. Antioxidant capacity- enhancing measures need to be taken. Besides, it is shown in our project the importance of using agents like thrombomimetic enhacing proliferation against to increase in apoptosis in smart medicine use.

Key Words: immune thrombocytopenia, apoptosis, gene expression

KAYNAKLAR

1. Türk Hematoloji Derneği. İmmün Trombositopeni Tanı ve Tedavi Rehberi; 2011
2. McMillan R. Autoantibodies and autoantigens in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 2000;37(3):239-48.
3. Escher R, Müller D, Vogel M, Miescher S, Stadler BM, Berchtold P. Recombinant human natural autoantibodies Against GPIIb/IIIa inhibit binding of autoantibodies from patients with AITP. *Br J Haematol* 1998;102(3):820-8.
4. Kunicki TJ, Newman PJ. The molecular immunology of human platelet proteins. *Blood* 1992;80:1386-404.
5. Kiefel V, Freitag E, Kroll H, Santoso S, Mueller-Eckhardt C. Platelet autoantibodies (IgG, IgM, IgA) against glycoproteins IIb/IIIa and Ib/IX in patients with thrombocytopenia. *Ann Hematol* 1996;72(4):280-5.
6. Cines DB, Blanchette VS. Immune thrombocytopenic purpura. *New Engl J Med* 2002; 346: 995-1008.
7. Chang M, Nakagawa PA, Williams SA, Schwartz MR, Imfeld KL, Buzby JS et al. Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 2003;102:887-95.
8. Houwerzijl EJ, Blom NR, Johannes JL, Mariet TE, Jan JK. Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2004;103:500-06.
9. Lanzkowsky P. Disorders of Platelets. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*, Fourth Edition. New York. Elsevier Inc. 2005; 250-63.
10. Kile BT. The role of apoptosis in megakaryocytes and platelets. *Br J Haematol* 2014; 165(2):217-26.

11. Polat G, Tamer L, Tanrıverdi K, Gürkan E, Başlamışlı F, Atık U. Levels of malondialdehyde, glutathione and ascorbic acid in idiopathic thrombocytopenic purpura. *East Afr Med J* 2002;79(8):446-9.
12. Varol Fİ. İdiyopatik trombositopenik purpura tanılı çocuklarda oksidatif stres ve antioksidan durum (tez). Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2007.
13. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood* 2009;113(11):2386-93.
14. Terrell DR, Beebe LA, Vesely SK, Neas BR, Segal JB, George JN. The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: A critical review of published reports. *Am J Hematol* 2010;85(3):174-80.
15. Koylu A, Pamuk GE, Uyanik MS, Demir M, Pamuk ON. Immune thrombocytopenia: epidemiological and clinical features of 216 patients in northwestern Turkey. *Ann Hematol* 2015;94(3):459-66.
16. Shulman NR, Marder VJ, Weinrach RS. Similarities between known antiplatelet antibodies and the factor responsible for thrombocytopenia in idiopathic purpura. Physiologic, serologic and isotopic studies. *Ann N Y Acad Sci* 1965 Jun 30;124(2):499-542.
17. van Leeuwen EF, van der Ven JT, Engelfriet CP, von dem Borne AE. Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. *Blood* 1982 Jan;59(1):23-6.
18. Anoop P. Immune thrombocytopenic purpura: historical perspective, current status, recent advances and future directions. *Indian Pediatr* 2012;49(10):811-8.
19. Zhou B, Zhao H, Yang RC, Han ZC. Multi-dysfunctional pathophysiology in ITP. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;54(2):107-16.
20. Gernsheimer T. Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: mechanisms of pathogenesis. *Oncologist* 2009;14(1):12-21.
21. Semple JW, Milev Y, Cosgrave D, Mody M, Hornstein A, Blancette V et al. Differences in serum cytokine levels in acute and chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: relationship to platelet phenotype and antiplatelet T cell reactivity. *Blood*. 1996;87(10):4245-54.
22. Neunert C, Lim W, Crowther M, Cohen A, Solberg L, Crowther MA. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood* 2011;21;117(16):4190-207.
23. Touchette N, Fogle S. Apoptosis: it chimes with mitosis. *JNE Res* 1991;3:75-8.
24. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35:495-516.
25. Lundberg AS, Weinberg RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 1999;35(4):531-9.

26. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124(1-2):1-6.
27. Lalier L, Cartron PF, Juin P, Nedelkina S, Manon S, Bechinger B, et al. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis* 2007;12(5): 887-96.
28. Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19(3-4):325-31.
29. Wang L, Li Y, Hou M. Idiopathic thrombocytopenic purpura and dysmegakaryocytopoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;64(2):83-9.
30. Leytin V, Mykhaylov S, Starkey AF, Allen DJ, Lau H, Ni H, et al. Intravenous immunoglobulin inhibits anti-glycoprotein IIb-induced platelet apoptosis in a murine model of immune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2006;133(1):78-82.
31. Griffiths HR: ROS as signalling molecules in T cells--evidence for abnormal redox signalling in the autoimmune disease, rheumatoid arthritis. *Redox Rep* 2005;10(6):273- 80.
32. Filipin L, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM: Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2008;152(3):415-22.
33. Zhang B, Lo C, Shen L, Sood R, Jones C, Cusmano-Ozog K, et al: The role of vanin-1 and oxidative stress-related pathways in distinguishing acute and chronic pediatric ITP. *Blood* 2011;117(17):4569-79.
34. Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol* 1999;34(3):631-8.
35. Yaylalı YT, Küçükaslan M. Endothelial dysfunction. *Pamukkale Tıp Dergisi* 2011;4(3):152-7.
36. Arrebola-Moreno AL, Laclaustra M, Kaski JC. Noninvasive assessment of endothelial function in clinical practice. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2012;65(1):80-90.
37. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001;54(3):176-86.
38. Kopáni M, Celec P, Danisovic L, Michalka P, Biró C. Oxidative stress and electron spin resonance. *Clin Chim Acta* 2006;364(1-2):61-6.
39. Çakatay U, Kayalı R. Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2006;37:162-7.
40. Reiter RJ. Oxidative process and antioxidative defence mechanism in the aging brain. *FASEB J* 1995;9(7):526-33.
41. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993;49(3):481-93.
42. Duthie GG, Wahle KW, James WP. Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. *Nutr Res Rev* 1989;2(1):51-62.

43. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984;15;222(1):1-15.
44. Weitberg AB, Weitzman SA, Clarck EP, Stossel TP. Effects on antioxidants on antioxidant-induced sister chromatid exchange formation. *J Clin Invest* 1985;75(6):1835-41.
45. Aksoy Y. Antioksidan Mekanizmadaki Glutasyonun Rolü. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2002;22:442-8.
46. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmadaki prooksidan- antioksidan dengesi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim* 1998;11:336-4.
47. Granot E, Kohen R. Oxidative stress in childhood--in health and disease states. *Clin Nutr* 2004;23(1):3-11.
48. Burton GW. Antioxidants action of carotenoids. *J Nutr* 1998;119(1):109-11.
49. Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(2 Pt 1):341-57.
50. Reznick AZ, Cross CE, Hu ML, Suzuki YJ, Khwaja S, Safadi A, et al. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *Biochem J* 1992;1;286(Pt 2):607-11.
51. Mccord JM. Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem* 1993;26(5):351-7.
52. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990;186:1-85.
53. Seven A, Seymen O, Hatemi S, Hatemi H, Yiğit G, Candan G. Antioxidant status in experimental hyperthyroidism: effect of vitamin E supplementation. *Clin Chim Acta* 1996;9;256(1):65-74.
54. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya: Mimoza Yayınları, 1995.
55. Ceballos-Picot I, Trivier JM, Nicole A, Sinet PM, Thevenin M. Age-correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem* 1992;38:66-70.
56. Aydın A, Orhan H, Sayal A, Ozata M, Sahin G, İşimer A. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clin Biochem* 2001;34(1):65-70.
57. Schwenke DC. Antioxidants and atherogenesis. *J Nutr Biochem* 1998;9:424-45.
58. Seven A, Seymen O, Hatemi S, Hatemi H, Yiğit G, Candan G. Antioxidant status in experimental hyperthyroidism: effect of vitamin E supplementation. *Clin Chim Acta* 1996;9;256(1):65-74.
59. Koca N, Karadeniz F. Gıdalardaki doğal antioksidan bileşikler. *Gıda* 2005;30(4):229-36.

60. Dawn BM, Allan DM, Colleen MS. Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach. First Edition. Baltimore, Maryland. Lippincott Williams and Wilkins. 1996.
61. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Third Edition. Utah. W.B. Saunders Company.1994.
62. Tietz NW. Clinical Guide to Laboratory Tests. Philadelphia, Pennsylvania. W.B. Saunders Company. 1995.
63. Mountz JD, Zhou T. Apoptosis and Autoimmunity. Koopman WJ (ed). A Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions. Fifteenth Edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
64. Keane RW, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea JR, Krajewski S, Reed JC, et al. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. J Neuropathol Exp Neurol 2001;60(5):422-9.
65. Duvall E, Wyllie AH. Death and the cell. Immunol Today 1986;7(4):115-9.
66. Wickremasinghe RG, Hoffbrand AV. Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. Blood 1999;1;93(11): 3587- 600.
67. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science 1998;28;281(5381):1322-6.
68. Boise LH, González-García M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, et al. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. Cell 1993;74(4):597-608.
69. Ng FW, Nguyen M, Kwan T, Branton PE, Nicholson DW, Cromlish JA, et al. p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. J Cell Biol 1997;20;139(2):327-38.
70. Schmitt E, Beauchemin M, Bertrand R. Nuclear colocalization and interaction between bcl-xL and cdk1(cdc2) during G2/M cell-cycle checkpoint. Oncogene 2007;26(40):5851-65.
71. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. Cell 1993;75(2):241-51.
72. Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, et al. Bcl- 2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. Science 1993;19;262(5137):1274-7.
73. Distelhorst CW, Bootman MD. Bcl-2interaction with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: role in Ca(2+) signaling and disease. Cell Calcium 2011;50(3):234-41.
74. Oakes SA, Scorrano L, Opferman JT, Bassik MC, Nishino M, Pozzan T, et al. Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;4;102(1):105-10.

75. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Kuwana T, Newmeyer DD, Green DR. PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* 2005;9;309(5741):1732-5.
76. Yi CH, Pan H, Seebacher J, Jang IH, Hyberts SG, Heffron GJ, et al. Metabolic regulation of protein N-alpha-acetylation by Bcl-xL promotes cell survival. *Cell* 2011;19;146(4):607-20.
77. Peddaboina C, Jupiter D, Fletcher S, Yap JL, Rai A, Tobin RP, et al. The downregulation of Mcl-1 via USP9X inhibition sensitizes solid tumors to Bcl- xl inhibition. *BMC Cancer* 2012;21;12: 541.
78. Bose P, Klimowicz AC, Kornaga E, Petrillo SK, Matthews TW, Chandarana S, et al. Bax expression measured by AQUAnalysis is an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2012;1;12:332.
79. Lin HX, Qiu HJ, Zeng F, Rao HL, Yang GF, Kung HF, et al. Decreased expression of Beclin 1 correlates closely with Bcl-xL expression and poor prognosis of ovarian carcinoma. *PLoS One* 2013;8(4):e60516.
80. Korkolopoulou P, Lazaris ACh, Konstantinidou AE, Kavantzias N, Patsouris E, Christodoulou P, et al. Differential expression of bcl-2 family proteins in bladder carcinomas. Relationship with apoptotic rate and survival. *Eur Urol* 2002;41(3):274-83.
81. Hinz S, Trauzold A, Boenicke L, Sandberg C, Beckmann S, Bayer E, et al. Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL- receptor-mediated apoptosis. *Oncogene* 2000;16;19(48):5477-86.
82. Zhou DH, Yang LN, Roder C, Kalthoff H, Trauzold A. TRAIL-induced expression of uPA and IL-8 strongly enhanced by overexpression of TRAF2 and Bcl-xL in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2013;12(1): 94-8.
83. Li JY, Li YY, Jin W, Yang Q, Shao ZM, Tian XS. ABT-737 reverses the acquired radioresistance of breast cancer cells by targeting Bcl-2 and Bcl-xL. *J Exp Clin Cancer Res* 2012;23;31:102.
84. Chiyomaru T, Yamamura S, Fukuhara S, Hidaka H, Majid S, Saini S, et al. Genistein up-regulates tumor suppressor microRNA-574-3p in prostate cancer. *PLoS One* 2013;8(3):e58929.
85. Li X, Marani M, Mannucci R, Kinsey B, Andriani F, Nicoletti I, et al. Overexpression of BCL-X(L) underlies the molecular basis for resistance to staurosporine-induced apoptosis in PC-3 cells. *Cancer Res* 2001;15;61(4): 1699- 706.
86. Altieri DC. Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer. *Prog Cell Cycle Res* 2003;5:447-52.
87. Kaya S, Kolorektal Kanserli Hastalarda Survivin Expresyonunun Sağkalım ve Histopatolojik Değişkenlerle İlişkisi (tez), Kartal Dr. Lutfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2008.
88. Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU. Pathways of chaperone-mediated protein holding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5(10):781-91.

89. Thomas X, Campos L, Le QH, Guyotat D. Heat shock proteins and acute leukemias. *Hematology* 2005;10(3):225-35.
90. Saibil HR. Chaperone machines in action. *Curr Opin Struct Biol* 2008;18(1):35- 42.
91. Fan CY, Lee S, Cyr DM. Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones* 2003;8(4):309-16.
92. Qiu XB, Shao YM, Miao S, Wang L. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci* 2006;63(22):2560-70
93. Cappello F, Conway de Macario E, Marasà L, Zummo G, Macario AJ. Hsp60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy. *Cancer Biol Ther* 2008;7(6):801-9.
94. Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev* 1994;58(4):686-99.
95. Bennett MR, Boyle JJ. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998;138(1):3-9.
96. Mayr M, Xu Q. Smooth muscle cell apoptosis in arteriosclerosis. *Exp Gerontol* 200;36(7):969-87.
97. Dybdahl B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi N. Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation* 2002;12;105(6):685-90.
98. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999;26;99(3):348-53.
99. Varbiro S, Biro A, Cervenak J, Cervenak L, Singh M, Banhidly F, et al. Human anti-60 kD heat shock protein autoantibodies are characterized by basic features of natural autoantibodies. *Acta Physiol Hung* 2010;97(1):1-10.
100. Golestan Jahromi M, Nabavizadeh F, Vahedian J, Nahrevanian H, Dehpour AR, Zare-Mehrjardi A. Protective effect of ghrelin on acetaminophen-induced liver injury in rat. *Peptides* 2010;31(11):2114-7.
101. Dolasik I, Birtas Atesoglu E, Tarkun P, Mehtap O, Keski H, Dogru A, ve Ark. Decreased serum heat shock protein 60 levels in newly diagnosed immune thrombocytopenia patients. *Platelets* 2015;26(3):220-3.
102. Chang-Lin WU, Jian-Cheng XU, Fang LI, Hong XI, Xue-Min ZH, Qun CH, et al. Polarization and apoptosis of T cell subsets in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Int J Lab Hem* 2007;29(3):177-84.
103. Qiao J, Liu Y, Li D, Wu Y, Li X, Yao Y, et al. Imbalanced expression of Bcl-xL and Bax in platelets treated with plasma from immune thrombocytopenia. *Immunol Res* 2016;64(2):604-9.

- 104.Winkler J, Kroiss S, Rand ML, Azzouzi I, Bang A, Speer O, et al. Platelet apoptosis in paediatric immune thrombocytopenia is ameliorated by intravenous immunoglobulin. *Br J Haematol* 2011;156(4):508–15.
- 105.Zhang B, Zehnder JL. Oxidative stress and immune thrombocytopenia. *Semin Hematol* 2013;50(3):e1-4.
- 106.Jin CQ, Dong HX, Cheng PP, Zhou JW, Zheng BY, Liu F. Antioxidant status and oxidative stress in patients with chronic ITP. *Scand J Immunol* 2013;77(6):482-7.
- 107.Zhang JM, Feng FE, Wang QM, Zhu XL, Fu HX, Xu LP, et al. Platelet-Derived Growth Factor-BB Protects Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Derived From Immune Thrombocytopenia Patients Against Apoptosis and Senescence and Maintains MSC-Mediated Immunosuppression. *Stem Cells Transl Med* 2016;5(12):1631-43.
- 108.Véquaud E, Desplanques G, Jézéquel P, Juin P, Barillé-Nion S. Survivin contributes to DNA repair by homologous recombination in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2016;155(1):53-63.
- 109.Kuter DJ. Romiplostim. *Cancer Treat Res* 2011;157:267-88.
- 110.Michele P. Lambert, Terry B. Gernsheimer. Clinical updates in adult immune thrombocytopenia. *Blood* 2017;129(21):2829-35.

EKLER



**T.C. TRAKYAÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye**

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2015/20	
	PROTOKOL ADI	İdiopatik Trombositopenik Purpura'lı Hastalarda Antioksidan ve Apoptozis İlişkili Gen Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Prof. Dr. Gülsüm Emel PAMUK	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 02/05	Tarih: 21.01.2015	
	Fakültemiz İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gülsüm Emel PAMUK'un sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Araş. Gör. Dr. Candemir AVCI'nın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödenmediği koşullarda gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcutun oy birliği ile karar verilmiştir.		
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi		

ÜYELER						
Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	HAYIR	EVET	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Başkan Yardımcısı	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	HAYIR	EVET	
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ Üye	Tıbbi Farmakoloji	T.Ü.T.F. Tıbbi Farmakoloji A.D.	E	HAYIR	EVET	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. Biyoistatistik A.D.	K	HAYIR	EVET	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	HAYIR	EVET	
Doç. Dr. Hasan ÜMIT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	HAYIR	EVET	
Doç. Dr. Selma Arzu VARDAR Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	K	HAYIR	EVET	
Doç. Dr. Salim DÖNMEZ Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	HAYIR	EVET	
Prof. Dr. Muzaffer ESKİOCAK Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	K	HAYIR	EVET	
Prof. Dr. Koray ELTER Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	HAYIR	EVET	
Yrd. Doç. Dr. Rugül KÖSE ÇINAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	HAYIR	-EVET	
Doç. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	E	HAYIR	EVET	
Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	HAYIR	EVET	
Prof. Dr. Berkan DEMİRAL Üye		T.Ü. İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi	E	HAYIR	HAYIR	
Avukat Baki KURNAZ Üye		T.Ü. Rektörlüğü	E	HAYIR	EVET	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Recep YAĞIZ
Dekan

EK 2

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bir araştırma projesine davet edilmektesiniz. Bu araştırmanın yürütülmesi, Trakya Üniversitesi Girişimsel olmayan klinik araştırmalar Etik Kurulu'nun 21.01.2015 tarih ve TÜTF-BAEK 2015/20 protokol no ve 02/05 karar no ile onaylanmıştır.

Araştırmaya katılmaya karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını anlamanız çok önemlidir.

Araştırmaya katılım tamamen gönüllülük ilkesine bağlı olup katılmayı reddetmeniz herhangi bir cezaya ya da elde edilecek herhangi bir yararın kaybedilmesine kesinlikle yol açmayacaktır.

Aynı şekilde araştırmaya katılmayı kabul ettikten sonra da araştırmanın herhangi bir yerinde hiçbir neden göstermeksizin herhangi bir zarar ya da elde edilmesi beklenen bir yarar kaybına yol açmadan araştırmadan çekilebilirsiniz.

Araştırma kapsamında yapılan işlemlerin mali giderleri araştırmacılar ya da destekleyici (Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Fonu (Proje no: TÜBAP 2015-40)) tarafından karşılanacak olup size ya da sosyal güvenlik kurumunuza hiçbir mali yük getirmeyecektir.

Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun ve araştırmaya katılmak isteyip istemediğinize karar vermek için lütfen biraz düşünün. Açık olmayan bir bölüm varsa ya da daha ayrıntılı bilgiye ihtiyaç duyuyorsanız ya da araştırmaya katılmaya gönüllü oluktan sonra soracağınız sorular varsa 0555 235 64 58 numaralı cep telefonundan Candeniz Avcı'ya başvurabilirsiniz.

1. Araştırmayla İlgili Bilgiler:

a. Araştırmanın bilimsel adı:

İmmün Trombositopenili Hastalarda Antioksidan Ve Apoptozis İlişkili Gen İfadelerinin Değerlendirilmesi

b. Araştırmanın anlaşılabilir basit adı:

Vücudumuzda pıhtılaşmayı sağlayan kan pulcuklarının (trombositlerin) düşüklüğü ile seyreden bir hastalıkta genlerin rolünün değerlendirilmesi

c. Sorumlu Araştırmacının adı ve görev yeri:

Prof. Dr. Ahmet Muzaffer DEMİR, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji BD.

d. Araştırmanın içeriği:

Çalışmamızda öncelikle merkezimizde trombositlerin (pıhtılaşmayı sağlayan kan pulcuklarının) düşüklüğü tanısıyla izlenen ve tedavi alan hastalarda genetik faktörlerin rolünü araştırmayı amaçladık. Hücrelerimizdeki bazı genlerin bu hastalık üzerindeki katkısının ne ölçüde olduğunu saptamayı hedef aldık. Bu amaçlar doğrultusunda merkezimizde tanı alan hastaların rutin kontrolleri sırasında alınan kanlardan bazı gen düzeylerini çalışmayı planladık.

a. Araştırmanın niteliği (Klinik, Laboratuvar, Epidemiyolojik-Tez çalışması vb):

Araştırmamız klinik bir araştırmadır.

b. Araştırmanın başlama tarihi ve öngörülen süresi:

Başlangıç tarihi Mart 2015 ve öngörülen süre 12 (oniki) aydır.

c. Araştırmaya katılması beklenen gönüllü sayısı:

12 (oniki) hasta ve 10 (on) sağlıklı kontrol grubu .

d. Katılımcının araştırmaya dahil edilme nedeni:

Hasta kişilerde antioksidan ve apoptosis ile ilişkili bazı genlerin bu hastalardaki rolünün araştırılması.

e. Araştırmada uygulanacak yöntemler:

Genetik çalışmalar kapsamında EDTA'lı kan tüpleri kullanılarak her denekten 1 tüp olmak üzere 5 cc kan alınacak EDTA'lı kan tüplerinde bulunan kan örnekleri vida kapaklı alüminyum cryotüp taşıma ataçmanına yerleştirilecek ve içinde sıvı azot bulunan dewar kabına daldırılacaktır. Örnekler dewar kabı ile laboratuvara götürülecek ve götürülen bu örnekler ile çalışma yapılacaktır.

2. Uygulama Sırasında Karşılaşabileceğiniz Riskler ve Rahatsızlıklar:

Kan alınan yerde hafif bir morarma olabilir.

3. Gönüllü İçin Araştırmadan Beklenen Yarar:

ITP hastalarında hastalıklarıyla ilgili neden sonuç ilişkisinin daha iyi anlaşılabilirliği.

4. Araştırmaya Seçenek Olan Diğer Girişimler:

Ek girişim yoktur.

5. Zararların Tazmini ve Araştırma Konusundaki Diğer Soruların Cevaplandırılması:

- a. Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ile bir hasta olarak hakları konusunda bilgi almak için bağlantı kurulacak kişinin adı-soyadı, ünvanı, görev yeri ve telefon numarası.

Arş. Grv. Dr. Candeniz Avcı, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji BD.
0555 235 64 58

6. Araştırma Giderleri ve Bütçesi:

Araştırmanın bütçesinin Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Fonu tarafından karşılanması planlanmaktadır.

7. Gönüllülük, Çalışmayı Reddetme ve Çalışmadan Çekilme Hakkı, Çalışmadan Çıkarılma:

Katılımcının çalışmayı reddetme hakkı olduğu gibi isteği halinde katıldığı çalışmadan her hangi bir haksızlığa maruz kalmayacak şekilde ayrılma hakkına sahiptir. Sağlıklı kontrol grubundan olan hastanın herhangi bir kronik hastalığının yada enfeksiyonun varlığının tespit edilmesi halinde katılımcıya bilgi verilerek katılımcının çalışma dışında kalması sağlanacaktır.

Kimlik bilgilerinin ve elde edilen verilerin gizliliği nasıl sağlanacak?

Elde edilen bilgilerin gizliliği global etik kurallarının doğrultusunda sonuçlar yalnız katılımcıların kendileri ile paylaşılması ile sağlanacaktır. Veriler sadece sorumlu araştırmacının gözetiminde kendine ait odada ve bilgisayarda depolanacaktır.

8. Araştırma sonunda gönüllülere bilgi verilecek mi?

Araştırmanın sonunda talep olması halinde gönüllülerin kendilerine ilişkili bilgi verilebilir.

GÖNÜLLÜNÜN ÇALIŞMAYA KATILMA ONAYI

Yukarıda açıkça tanımlanan çalışmanın ne amaçla, kimler tarafından ve nasıl gerçekleştirileceği anlayabileceğim bir ifade ile bana anlatıldı.

Bu araştırmadan elde edilen bilgilerin bana ve başka insanlara sağlayacağı yararlar bana anlatıldı.

Araştırma sırasında meydana gelebilecek riskler ve rahatsızlıklar bana anlayabileceğim bir dille anlatıldı.

Araştırma sırasında oluşabilecek zarar durumunda gerçekleştirilecek işlemler bana anlatıldı.

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ve haklarım konusunda 24 saat bilgi alabileceğim bir yetkilinin adı ve telefonu bana verildi.

Araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik ve testler ile tıbbi bakım hizmetleri için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyeceği bana anlatıldı.

Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.

Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.

Sorumlu araştırmacı / hekime haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.

Bu çalışmaya katılmayı reddetmem ya da sonradan çekilmem halinde hiçbir sorumluluk altına girmediğimi ve bu durumun şimdi ya da gelecekte gereksinim duyduğum tıbbi bakımı hiçbir biçimde etkilemeyeceğini biliyorum.

Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı / hekim ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmali nedeniyle, benim onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.

Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak, bu tür durumlarda kimliğim kesin olarak gizli tutulacaktır.

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren Gönüllü Bilgilendirme Formu adlı metni kendi anadilimde okudum.

Bu bilgilerin içeriği ve anlamı, yazılı ve sözlü olarak açıklandı.

Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım.

Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bu metnin imzalı bir kopyasını aldım.

Gönüllünün; (El yazısı ile)

Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....
.....

Tarih:

Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için; (El yazısı ile)

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....

.....

Tarih:

Açıklamaları Yapan Araştırmacının Adı- Soyadı: (El yazısı ile)

İmzası:

Tarih:

