

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CD247 GENİNE AİT rs858554 VE rs704848 POLİMORFİZMLERİNİN İMMÜN
TROMBOSİTOPENİK PURPURA HASTALIĞI İLE İLİŞKİSİ**

İBRAHİM KUTLUBAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. JÜLİDE TOZKIR

EDİRNE-2018

İBRAHİM KUTLUBAY'ın hazırladığı “CD247 GENİNE AİT RS858554 VE RS704848 POLİMORFİZMLERİNİN İMMÜN TROMBOSİTOPENİK PURPURA HASTALIĞI İLE İLİŞKİSİ” başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):

Doç.Dr.Jülide TOZKIR

Doç.Dr.Çiğdem KEKİK ÇINAR

Doç.Dr.Hakan GÜRKAN

İmza


.....

.....


Tez Savunma Tarihi: 07/ 12/ 2018

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylarım.

Doç. Dr. Jülide TOZKIR

Tez Danışmanı

İmza



Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

İmza


Prof. Dr. Murat YURTCAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

07.12.2018

İbrahim KUTLUBAY

Yüksek Lisans Tezi

CD247 Genine Ait rs858554 ve rs704848 Polimorfizmlerinin

İmmün Trombositopenik Purpura Hastalığı İle İlişkisi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

İmmün Trombositopenik Purpura (İTP), trombositlere karşı oluşan otoantikörler nedeniyle trombositlerin parçalanması ve ortadan kaldırılması sonucu trombositopeni gelişmesi ile karakterize edinsel bir hastalıktır. İTP hastalığının otoimmün mekanizmalar sonucu geliştiği bilinmesine rağmen hastalığın kesin sebebi henüz tam olarak bilinmemektedir. Trombositler kanama bölgesinde bir tıkaç oluşturarak kanamanın engellenmesinde rol oynamaktadırlar. Kanama olan bölgelerde birbirine yapışarak fizyolojik bir tıkaç oluştururlar. İTP çocuklarda çoğunlukla bir enfeksiyon hastalığı ya da aşı uygulaması sonrasında aniden ortaya çıkmakta, kısa sürede kendiliğinden iyileşmektedir. Fakat yetişkinlerde İTP genelde kronik bir hastalık şeklinde ortaya çıkmaktadır. Bu sebeple yetişkin ve çocuk hastalarda hastalığın tedavisi farklılıklar göstermektedir. Günümüz şartlarında İTP tanısını kesinleştirecek bir laboratuvar testi mevcut değildir. İTP tanısı ilk olarak diğer trombosit düşüklüğüne neden olan faktörlerin dışlanması ile konmaktadır.

İTP hastaları ile sağlıklı kontroller arasında yapılan karşılaştırmalarda T hücreleri ve sitokin profillerini içeren birçok immün parametrede farklılıklar olduğu bildirilmiştir. İTP hastalarında kontrollere göre T ve NK hücre sayılarında artış gözlenmezken, hücre aktivitesinde ve fonksiyonlarında azalma olduğu bildirilmiştir. T

ve NK hücrelerindeki aktivite azalması, B hücreden otoantikor yapımının tetiklenmesine neden olabilir. Çünkü T hücrelerinin B hücre fonksiyonları üzerinde düzenleyici etkiye sahip olduğu özellikle antikor yapım mekanizmaları üzerinde rolü olduğu bilinmektedir. T hücre reseptörü sinyal yollarından kaynaklanan aksaklıkların İTP patogenezindeki yeri henüz tam olarak açığa çıkartılmamıştır. Bu bağlamda yapılacak çalışmalar İTP patogenezinin açığa çıkartılmasına katkıda bulunacaktır. Bu tez çalışmasında T hücre reseptörünün antijenine bağlandığında hücre içine sinyal iletimi yapan CD3 zeta zinciri genindeki polimorfizmler araştırılacaktır. Bu gen üzerinde bulunan bu polimorfizmlerin romatoid artrit ve sistemik lupus eritematozus gibi otoimmün hastalıkların patogenezinin katkısı olabileceği yapılan çalışmalar ile ileri sürülmüştür. İTP gelişimine otoantikorlar sebebiyle trombosit yıkımı neden olmaktadır, bu nedenle otoimmün bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Otoimmün hastalık temelindeki otoantikor yapım süreçleri T hücre sinyal iletilisindeki bozukluklar nedeniyle olabilir.

Çalışma kapsamında 55 İTP' li, 53 sağlıklı kontrol grubu olmak üzere toplam 108 gönüllüden kan alınmıştır. Grupların DNA izolasyon işlemleri QIAGEN EZ1 Advanced XL (Seri No: L122A1010) DNA izolasyon cihazında yapılmıştır. Real-Time PCR analizleri ise AB Applied Biosystems PCR cihazında yapılmıştır (Seri No: 2720010807). Test analizleri IBM istatistik programında yapılmış olup çalışma yaptığımız gruplar arasında rs858554 ve rs 704848 polimorfizmleri için İTP patogenezi açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Çalışma kapsamında sağlıklı kontrol grupları ile İTP hastalarından elde edilen veriler karşılaştırılmış ve incelenen polimorfizmlerin hastalığın patogenezinin doğrudan katkısının olmadığı tespit edilmiştir.

Yıl : 2018

Sayfa Sayısı : x+56

Anahtar Kelimeler : İTP, Otoimmünite, İmmün Sistem, Trombosit, CD247, Polimorfizm

Master Thesis

The association of CD247 gene rs858554 and rs704848 polymorphisms with Immune Thrombocytopenic Purpura Disease

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Biotechnology and Genetics

ABSTRACT

Immune (idiopathic) Thrombocytopenic Purpura (ITP) is an acquired disorder characterized by thrombocytopenia due to destruction and removal of platelets caused by antiplatelet autoantibodies. Although it is known that ITP develops by autoimmune mechanisms, the precise cause of the disease is not fully known yet. Platelets play an essential role to stop bleeding. They form a plug by sticking each other in the bleeding areas. ITP usually occurs acutely in children after an infection or vaccination and tends to recover spontaneously in a short time. Whereas ITP is usually a chronic disease in adults. Therefore treatment approaches differ in adults and children. Currently, there is no laboratory test to confirm the diagnosis of ITP. The diagnosis of ITP is primarily based on the exclusion of other causes of thrombocytopenia. Comparisons between ITP patients and healthy controls have reported differences in many immunological parameters including T cells and cytokine profiles. It has been reported that there is no increase in number of T and NK cell, but there is a decrease in cell activity and function in ITP patients compared with controls. Decreased activity in T and NK cells may trigger production of autoantibodies by B cells. Because it is known that T cells have a regulatory role on B cell functions, especially on antibody production mechanisms. The role of disruptions caused by T-cell receptor signaling pathways, in the pathogenesis of ITP has not been fully elucidated yet. Studies in this area will contribute to the

clarification of pathogenesis of ITP. In this thesis study, we investigate polymorphisms in CD3 zeta-chain gene that transmit signals into the cell when it binds to T cell receptor antigens. It has been suggested that these polymorphisms on this gene may contribute to the pathogenesis of autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Because destruction of platelets due to autoantibodies causes ITP, it is considered as an autoimmune disease. Autoantibody production processes that cause autoimmune disease may be due to impairment in T cell signaling.

Blood samples were collected from 55 ITP and 53 healthy controls, a total of 108 volunteers. DNA isolation of the groups was performed on the DNA isolation device QIAGEN EZ1 Advanced XL (Serial No: L122A1010). Real-Time PCR analyzes were performed on the AB Applied Biosystems PCR (Serial No: 2720010807). Test analysis was performed in IBM statistics program and no significant difference was found between the groups in the pathogenesis of ITP for rs858554 and rs 704848 polymorphisms.

In the study, the data obtained from healthy control groups and ITP patients were compared and it was determined that the investigated polymorphisms did not directly contribute to the pathogenesis of the disease.

Year : 2018

Number of Pages : x+56

Keywords : ITP, Autoimmunity, Immune System, Platelets, CD247, Polymorphism

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince bilgi, destek ve yardımları ile yanımda olan Tez Danışmanım sevgili Doç. Dr. Jülide TOZKIR hocama, ders almış olduğum tüm Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerine, Hematoloji Bilim Dalı Dr. Öğr. Üy. Elif Gülsüm ÜMİT' e, laboratuvar çalışmalarını yapmış olduğumuz Tıbbi Genetik A.D. öğretim üyeleri Doç. Dr. Hilmi TOZKIR ve Doç. Dr. Hakan GÜRKAN hocalarıma ve Tıbbi Genetik A. D. çalışanlarına, bilgi ve desteği ile daima yanımda olan Tıp Fakültesi Nükleer Tıp A.D. Başkanı sevgili Prof. Dr. Gülay DURMUŞ ALTUN hocama ve iş arkadaşlarıma, eğitim sürem boyunca sabır ve desteği ile yanımda olan sevgili eşim Ayşen KUTLUBAY, oğlum İ.Kağan ve kızım Ece' ye, eğitim hayatım boyunca ilkokuldan bu yana yolumun eğitim ve bilgi adına kesiştiği herkese ve beni bugünlere getiren sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TUBAP 2017/05 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Saygılarımla

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1.1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. İmmün Sistem	4
2.1.1. Doğal ve Kazanılmış Bağışıklık	4
2.1.1.1. Doğal bağışıklık	5
2.1.1.2. Kazanılmış Bağışıklık	6
2.1.2. T lenfositler	8
2.1.2.1. T Lenfositler Tarafından Antijenin İşlenmesi ve Tanınması	10
2.1.2.2. T Lenfositlerin Antijeni Tanınması ve Aktivasyonu	11
2.1.3. B Lenfositler.....	12
2.2. MHC.....	13
2.3. Otoimmünite	15
2.3.1. İmmün Tolerans	17
2.3.1.1. Merkezi Tolerans	18
2.3.1.2. Periferik Tolerans.....	19
2.4. İTP.....	20
2.4.1. Trombosit	22
2.4.2. İTP Hastalığının Nedenleri	24
2.4.3. İTP Hastalığının Tanısı	26

2.5.4. İTP Hastalığında Tedavi	27
2.5. CD247 Geni	27
2.5.1. Genomik Yapısı	27
2.5.2. Görevleri	28
2.5.3. Polimorfizm	28
2.5.4. Tek Nükleotid Polimorfizmleri	29
2.5.5. VNTR Polimorfizmi	30
3.1. MATERYAL ve YÖNTEM.....	31
3.1.1. Real- Time PCR	33
3.1.2. Real- Time PCR Kullanım Alanları.....	33
3.1.3. Real- Time PCR Yöntemleri.....	34
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	37
4.1.Sonuçlar	37
4.2. Tartışma.....	41
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ.....	50
ETİK KURUL ONAYI.....	51
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ HASTA OLUR FORMU	52

KISALTMALAR DİZİNİ

APC : Antijen Sunucu Hücre

BiAbs : Bispesifik Antikorlar

GP : Glikoprotein

HLA : İnsan Lökosit Antijeni

Ig : İmmüoglobulin

İTP : İmmün Trombositopenik Purpura

MHC : Major Histocompatibility Komplex (Büyük Doku Uyum Kompleksi)

MK : Megakaryosit

NK : Natural Killer Cell (Doğal Öldürücü Hücre)

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PLT : Trombosit

SNPs : Tek Nükleotid Polimorfizmleri

TCR : T Hücre Reseptörü

Th : Yardımcı T hücreleri

Treg : T regülatör hücre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Doğal ve edinsel bağışıklığın özgüllüğü ve reseptörlerine ait önemli özellikler	7
Şekil 2.2. CD4 ve CD8 Yüzey Molekülü Taşıyan T lenfosit Tipleri	9
Şekil 2.3. T Lenfosit tarafından enfekte hücrenin tanınması-şematik	10
Şekil 2.4. Lenfosit aktivasyonu.....	11
Şekil 2.5. Lenfosit aktivasyonu.....	12
Şekil 2.6. Ig Sınıfları.....	13
Şekil 2.7. MHC gen bölgesi-şematik	15
Şekil 2.8. HLA sınıf I ve HLA sınıf II Moleküllerinin Yapısı.	15
Şekil 2.9. Otoimmünite	18
Şekil 2.10. Otoantikorların trombosit yüzey antijenlerine bağlanması.....	21
Şekil 2.11. Trombosit ışık mikroskobu görüntüsü.....	23
Şekil 2.12. Megakaryosit	23
Şekil 2.13. Ciltte morarmalar ve diş eti kanamaları.....	24
Şekil 2.14. İTP Patogenezi.....	25
Şekil 2.15. CD247 Geninin Yeri- şematik	27
Şekil 2.16. Tek Nükleotid Polimorfizmi- Şematik	29
Şekil 3.1.1. DNA İzolasyon Cihazı QIAGEN EZ1 Advanced XL.....	32
Şekil 3.1.2. DNA İzolasyon Cihazı QIAGEN EZ1 Advanced XL Real Time PCR Çalışma Akışı.....	33
Şekil 3.1.3. Real- Time PCR Cihazı AB Applied Biosystems PCR.....	35
Şekil 4.1.1. İTP' li ve Sağlıklı Kontrol Grupları Yaş Dağılımı Grafiği	38
Şekil 4.2.1. İTP ve Sağlıklı Kontrol Grupları Homozigot Genotip Karşılaştırması	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 İmmün Sistem.....	5
Çizelge 2.1 Doğal ve Edinsel immünite Karşılaştırma.....	8
Çizelge 3.1.1. Real Time PCR İşleminde Kullanılan VIC/FAM Alelleri ve İçerik Dizileri	36
Çizelge 4.1.1. İTP'li Grup Klinik Bulguları	38
Çizelge 4.1.2. rs8585545 ve rs704848 Polimorfizmlerinin İTP' li ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında Alel ve Genotip Frekansları Karşılaştırması	39

BÖLÜM 1

1.1. GİRİŞ

İmmün Trombositopenik Purpura (İTP), trombositlere karşı oluşan otoantikorlar nedeniyle trombositlerin parçalanması ve ortadan kaldırılması sonucu trombositopeni gelişimi ile karakterize bir hastalıktır. Trombositopeni trombosit sayısındaki düşüş olarak tanımlanmaktadır. Patogenezinde megakaryositlerden trombosit üretiminde bozuklukta görülmektedir. İTP hastalığının otoimmün mekanizmalar sonucu geliştiği bilinmesine rağmen hastalığın kesin sebebi henüz tam olarak bilinmemektedir (Rodeghiero vd., 2009).

İmmün sistemimiz vücudumuza yabancı organizmaları (bakteriler, virüsler, tümör hücreleri vb.) tanıyarak onları antikor adı verilen maddeler ile işaretlemektedir. Antikorlar ile işaretlenmiş hücreler savunma sistemi hücreleri tarafından yok edilmektedir. İTP’ de tam olarak henüz tam olarak bilinmeyen bir sebeple bağışıklık sistemi trombositleri yabancı olarak algılayarak onlara saldırmaktadır. Trombositlere özgü antikorlar trombositleri işaretleyerek trombositlerin dalak gibi savunmada görev alan organlarda parçalanmasına yol açmaktadır.

Çalışma kapsamında İTP hastalığının CD247 genine ait rs858554 ve rs704848 polimorfizmleri ile ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmaya 55 hasta, 53 kontrol grubu olmak üzere toplam 108 verici gerekli bilgilendirmeler yapılarak ve onam broşürleri onaylatılarak dahil edilmiştir. Çalışmanın bu amaç doğrultusundaki ilk hedefi öncelikli olarak CD247 genine ait rs858554 ve rs704848 polimorfizmlerinin hasta ve sağlıklı kontrol grubundaki dağılımlarını tespit etmektir. Gruplardan elde edilen veriler ile yapılacak istatistiki karşılaştırma sonucunda belirtilen polimorfizmlerin İTP patogenezindeki yerini açıklamaya yönelik bulgu elde edilmesi planlanarak çalışmaya başlanmıştır.

İTP hastaları ile sağlıklı kontroller arasında yapılan karşılaştırma çalışmalarında T hücreleri ve sitokin profillerini içeren birçok immün parametrede farklılıklar olduğu bildirilmiştir. İTP hastalarında kontrol gruplarına göre T ve NK hücre sayılarında artış gözlenmezken, hücre aktivitesinde ve fonksiyonlarında azalma olduğu bildirilmiştir. T ve NK hücrelerindeki aktivite azalması, B hücrelerinden otoantikor yapımının tetiklenmesine neden olabilmektedir. Çünkü T hücrelerinin B hücre fonksiyonları üzerinde düzenleyici etkiye sahip olduğu özellikle antikor yapım mekanizmaları üzerinde rolü olduğu bilinmektedir.

T hücre reseptörü sinyal yollarından kaynaklanan aksaklıkların İTP patogenezindeki yeri henüz tam olarak açığa çıkartılmamıştır. Bu konuda yapılacak çalışmalar İTP patogenezinin açığa çıkartılmasına katkıda bulunacaktır. Bu tez çalışmasında T hücre reseptörünün antijenine bağlandığında hücre içine sinyal iletimi yapan CD3 zeta zinciri genindeki polimorfizmler araştırılmıştır. Bu gen üzerinde bulunan bu polimorfizmlerin *romatoid artrit* ve *sistemik lupus eritematozus* gibi otoimmün hastalıkların patogenezinin katkısı olabileceği yapılan çalışmalar ile ileri sürülmüştür. İTP gelişimine otoantikorlar sebebiyle trombosit yıkımı neden olmaktadır, bu nedenle otoimmün bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Otoimmün hastalık temelindeki otoantikor yapım süreçleri T hücre sinyal iletilisindeki bozukluklar nedeniyle olabilmektedir. Çalışma kapsamında sağlıklı kontrol grupları ile İTP hastalarından elde edilecek veriler karşılaştırılarak incelenmiş ve çalışma kapsamında değerlendirilen polimorfizmlerin hastalığın patogenezi ile ilişkisi araştırılmıştır.

Deri, göz rengi, boy uzunluğu gibi fiziksel görünümde etkili olan polimorfizmler *fiziksel polimorfizm*’ lerdir. Protein, enzim, antijen gibi moleküller üzerinde etkili olan polimorfizmler *biyokimsal polimorfizmler*’ dir. Bunlar kan grubu, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase* (G6DP) aktivitesi gibi olayları etkilemektedirler. Kromozomların morfolojik özelliklerinde değişikliğe neden olan polimorfizmler ise *kromozomal polimorfizm*’ lerdir. Bunlarda satellit boyutunda değişiklik, Y kromozomunun uzun kolunun boyunda değişiklik ve sentromerik heterokromatin boyutunda değişikliklere neden olabilmektedirler. DNA düzeyinde nükleotid değişimleri ise *DNA polimorfizmi* olarak adlandırılmaktadır. Genel anlamda polimorfizm terimi DNA polimorfizmi için kullanılmaktadır. İnsan genomundaki genlerin çoğu polimorfik özelliktedir. Dolayısıyla aynı lokusta iki ya da daha çok farklı alel bulunabilmektedir.

Bu nedenle bir toplulukta farklı alellere bağlı iki ya da daha fazla fenotip görülebilmektedir. Genetik eşitlilik oranı yüksek olduğu için iki farklı insanın genetik olarak birbirinin aynısı olması tek yumurta ikizleri dışında mümkün değildir (Nussbaum, Mcinnes ve Willard, 2015).

Polimorfizmler içerisinde önemli bir yere sahip olan SNP' ler (*Single Nükleotid Polymophysim*, Tek Nükleotid Polimorfizmi) epidemiyolojik ve biyokimyasal araştırmalarda sağlıklı kontrol grubu ile hasta grupları karşılaştırılarak kullanılmaktadır. Günümüzde kanser, Alzheimer, migren vb. birçok hastalık ile ilişkilendirilmiş ve profilleri çıkarılmış SNP mevcuttur. Bu hastalıklarla ilgili yapılan çalışmalarda doğrudan çalışma grubu, hazır hastalık profilleri ile kıyaslanabilmekte ve tanı ya da yatkınlık belirleme çalışmaları kolayca yapılabilir.

Polimorfizmler, herhangi bir hastalık ya da patolojik durumla doğrudan ilişkili olmamakla birlikte genellikle protein kodlamayan (intron) DNA dizilerinde yer almaktadır. Polimorfizmlerin çoğu klinik olarak ortaya çıkmayabilir.

Laboratuvar alışmaları sonrasında yapılan analizler ve istatistik çalışmaları neticesinde rs858554 ve rs704848 polimorfizmlerinin İTP hastalığının patogenezi ile doğrudan ilişkili olmadığı tespit edilmiştir.

BÖLÜM 2

2.KAYNAK ÖZETLERİ

2. 1. İmmün Sistem (Bağışıklık Sistemi)

İmmün sistemin görevi konak bireye yabancı olan organizmaları tanımak ve onlara karşı bir bağışık yanıt oluşturmak üzere reaksiyona girmektir. Bağışıklık sisteminde özellikle T ve B lenfositler görev almaktadır. Lenfositler karşılaştıkları yabancı maddelere karşı üç tip reaksiyon vermektedirler (Abbas ve Lichtman, 2005).

1. Lenfositler (özellikle CD4 T lenfositler) tolerojenik antijenlerle karşılaştıklarında ya işlevsel yanıtsızlık göstermekte (anergi) ya da apoptoz sonrasında ölmektedirler (İmmün Tolerans).
2. Lenfositler immünojenik antijenlerle karşılaştıklarında aktive olarak bu yabancı antijenlere karşı bağışık yanıt oluşturmaktadırlar.
3. Lenfositler non-immün antijenlerle karşılaştıklarında ise antijeni yok saymaktadırlar.

İmmün sistemin amacı vücuda giren yabancı maddeleri engellemek ve varsa hastalık etkenlerini yok etmektir. Bağışıklık sistemi hücrelerinin yabancı maddelerle reaksiyon göstererek oluşturdukları cevaba “*immün yanıt*” adı verilmektedir. Bu sistemi inceleyen bilim dalı ise “*immünoloji*” adını almaktadır.

2.1.1. Doğal ve Kazanılmış Bağışıklık

İmmün sistem yabancı maddelere karşı doğal ve kazanılmış bağışıklık yolu ile savunma gerçekleştirmektedir. Çizelge 2.1’ de doğal ve kazanılmış bağışıklıkta hücresel ve humoral bağışıklık elemanları görülmektedir.

Çizelge 2.1. İmmün sistem

	Hüresel İmmünite	Hümorale İmmünite
Doğal Bağışıklık	<ul style="list-style-type: none">– Makrofajlar– Doğal Öldürücü Hücreler (NK)	<ul style="list-style-type: none">– Komplemanlar– Plazma Proteinleri
Kazanılmış Bağışıklık	<ul style="list-style-type: none">– Yardımcı T Hücreleri– Sitotoksik T Hücreleri	<ul style="list-style-type: none">– B Hücreleri– Plazma Hücreleri

2.1.1.1. Doğal Bağışıklık (İnnate)

Doğal bağışıklık hüresel ve biyokimyasal mekanizmalar aracılığı ile mikroorganizmalara ve hasar almış dokulara karşı bir bağışık yanıt oluşturmaktadır. Neredeyse bütün canlılarda çeşitli doğal bağışıklık mekanizmaları görev almaktadır. Doğal bağışıklığın öncelikle görevi vücuda yabancı olan organizmaları tanımak ve onlara karşı bir bağışık yanıt oluşturmaktır. Doğal bağışıklık konağa ait olan yapılar ile konağa ait olmayan yapıları birbirinden ayırt etmekte fakat bu mekanizma antijene özgül olarak işlememektedir. Mikroorganizmaların yapısında bulunan ve evrimsel olarak korunan temel molekülleri hedef alarak görev yapmaktadır (Mannoz, lipopolisakkarit vb.).

Doğal bağışıklık yabancı mikroorganizmalara karşı hızlı yanıt vermekte fakat bu reaksiyonlar için bir hafıza oluşturmamaktadır. Kompleman sistem elemanları, akut faz proteinleri ve sitokinler gibi bazı kimyasal medyatörlerde dokuların patojenlerin invazyonundan korunması için oluşan inflamatuvar yanıtta görev almaktadırlar. İmmün

cevabın hızlı olması ve erken oluşması bu cevabın özgüllüğünü ve uyarlanmış olmasını engellemektedir (Kılıçturgay, 1994).

Doğal bağışıklık sisteminin cevap kanallarının dağılık olması ve özgül olmaması sebebiyle bu immün cevap sırasında yakın dokularda bir miktar hasar meydana gelebilmektedir. Özgüllük olmasada doğal bağışıklık oldukça etkili olup genellikle mikrobik yayılmalardan vücudu korumakta ve patojenleri yok etmektedir. Mikroorganizmaların hastalık yapma yetenekleri genel olarak doğal bağışıklıktan kaçabilme ve ona karşı dayanıklılık yeteneklerine bağlı olarak değişmektedir.

Doğal bağışıklıkta;

- Fiziksel bariyerler ve epitel tabaka: Antibiyotik peptitler, mukus, deri, mide asidi vb.
- Fagositik hücreler: Monosit, makrofaj, nötrofil ve NK hücreleri
- Kompleman içeren kan proteinleri
- Sitokinler etkili olmaktadır.

2.1.1.2. Kazanılmış Bağışıklık (Edinsel, Adaptif)

Doğal bağışıklık elemanlarını bir şekilde atlatarak vücuda giren yabancı mikroorganizmalar edinsel bağışıklık mekanizmasını harekete geçirmektedir. Şekil 2.1 ve Çizelge 2.2' de doğal ve kazanılmış bağışıklıkta yanıt şekilleri ve bu iki bağışıklık tipi arasındaki farklar görülmektedir.

Edinsel bağışıklık mekanizması elemanları ise;

- T lenfositler
- B lenfositler
- Antikorlar
- Antijen sunan hücreler (APC)
- Sitokinlerdir.

Edinsel bağışıklıkta bağışık yanıt daha uzun sürede oluşmakta ancak bağışıklık bir hedef antijene özgü olmakta ve sonrasında bir hafıza oluşturarak daha sonra aynı antijenle vücut karşılaştığı zaman daha kısa sürede bir bağışık yanıt oluşturmaktadır.

	Doğal bağışıklık	Edinsel bağışıklık
Özgüllük	<p>Mikropların sınıfları (patojen-ilişkili moleküler örgüler) ve hasarlı hücreler (hasar-ilişkili moleküler örgüler) tarafından paylaşılan yapılar</p> <p>Farklı mikroplar</p> <p>Benzer mannoz reseptörleri</p>	<p>Mikrobiyal moleküllerin (antijenler) yapısal ayrıntıları için; mikrobiyal olmayan antijenleri tanıyabilir</p> <p>Farklı mikroplar</p> <p>Değişik antikor molekülleri</p>
Reseptörler	<p>Germline içinde kodlama; sınırlı çeşitlilik (Örgü tanıyan reseptörler)</p> <p>Toll-benzeri reseptör</p> <p>N-formil metionil reseptör</p> <p>Mannoz reseptörü</p> <p>Çöpçü reseptör</p>	<p>Gen segmentlerinin somatik rekombinasyonu ile oluşan genler tarafından kodlanır, daha fazla çeşitlilik</p> <p>Ig</p> <p>THR</p>
Reseptörlerin dağılımı	<p>Klonal olmayan; Aynı dizine ait hücreler üzerinde eş reseptörler</p>	<p>Klonal: Farklı özgüllüğe sahip lenfosit klonları yüzeylerinde farklı reseptörler sergilerler</p>
Öz olan ve olmayan ayırımı	<p>Evet; sağlıklı konak hücreleri tanınmaz veya bunlar yüzeylerinde doğal bağışıklık yanıtları engelleyici moleküller taşırlar</p>	<p>Evet; Öze tepkili lenfositlere karşı seçime dayanır; mükemmel olmayabilir (otoimmüniteye neden olabilen)</p>

Şekil 2.1. Doğal ve edinsel bağışıklığın özgüllüğü ve reseptörlerine ait önemli özellikler (Abbas ve Lichtman' dan aktaran Camcıoğlu ve Deniz 2007).

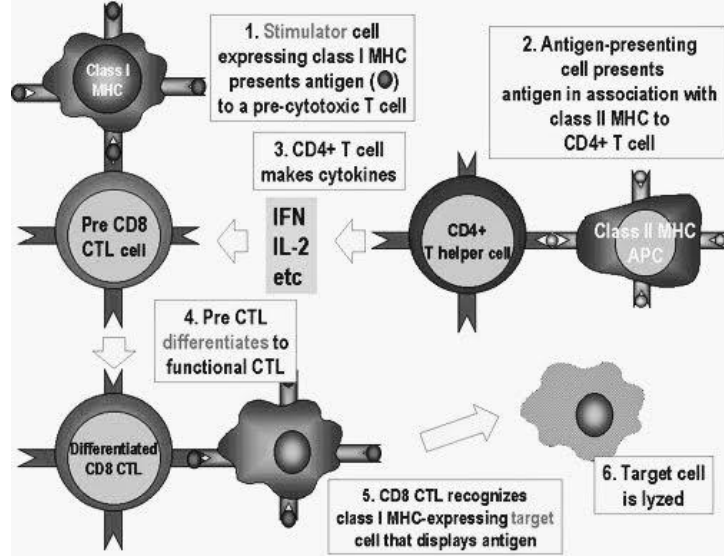
Hücre içi ve hücre dışı patojenlere karşı iki tip kazanılmış immünite devreye girmektedir. Hücre içi patojenlere karşı hücreli immünite özelleşmiş T lenfositler tarafından oluşturulmaktadır. Hücre dışı patojenlere karşı ise humoral immünite B lenfositler tarafından üretilen **“antikor”** adı verilen moleküller aracılığı ile sağlanmaktadır.

Çizelge 2.2. Doğal ve Edinsel İmmünite Karşılaştırması

Doğal Bağışıklık	Edinsel Bağışıklık
Fiziksel Bariyerler	
Deri ve mukoza	-
Hücreler	
Nötrofil, Monosit/Makrofaj, NK hücreleri	T ve B lenfositler
Soluble Faktörler	
Kompleman Proteinleri Akut Faz Proteinleri Sitokinler Enzimler	İmmünglobulinler Sitokinler
Gelişme Süreci	
Hızlı gelişir (saat)	Yavaş gelişir (gün)
Antijene Spesifiklik Durumu	
Antijene spesifik değil	Antijene spesifik
Hafız Oluşturma	
Yok	Var

2.1.2. T Lenfositler

Kemik iliğinden köken alan T lenfositler timusta gelişerek immün sistemde görev yapabilecek düzeye erişmektedirler. T lenfositler gelişimleri esnasında timusta T hücre reseptörü (TCR) kazanmaktadır. T lenfositler timusta öz (self) antijenleri yabancı antijenlerden ayırt edebilme yeteneği kazandıktan sonra periferik dolaşıma geçmektedirler. Olgunlaşan T hücrelerinin bir kısmı CD4 bir kısmında CD8 yüzey molekülü taşımaktadır. Periferik kanda bulunan lenfositlerin büyük bir kısmı CD4 yüzey antijeni taşıyan T lenfosit şeklinde bulunmaktadır. CD4 molekülü taşıyan T lenfositler Yardımcı T lenfositler (Th, T helper), CD8 molekülü taşıyan T lenfositler (CD8+ T) ise Sitotoksik T lenfositlerdir (Şekil 2.2). T lenfositler immün cevap sırasında anahtar rolü oynamaktadırlar (Janeway, Travers ve Walport, 2005).



Şekil 2.2. CD4 ve CD8 Yüzey Molekülü Taşıyan T lenfosit Tipleri (Abbas ve Lichman, 2007, s: 292)

T Lenfosit' ler;

- Yardımcı T Lenfosit
- Sitotoksik T Lenfosit
- Düzenleyici T Lenfosit alt gruplarından oluşmaktadır.

Hücre içi patojenlere karşı immünyetede sitotoksik T lenfositler görev almaktadır. Patojen ile enfekte olan hücre yüzeyinde patojeni tanıtan reseptörler ortaya çıkmaktadır. Bu reseptörleri tanıyabilen, yalnızca o reseptörlere özgü olan sitotoksik T lenfositler reseptörler ile temas etmektedir. Reseptörle temas eden T hücresi enfekte hücreye ölüm sinyali göndermektedir. Bu ölüm sinyali sonrasında konak hücrenin ölümü sonrasında enfeksiyon temizlenmektedir. T lenfositler ve ilgili reseptörler anahtar kilit ilişkisi ile birbirine bağlanmaktadır.

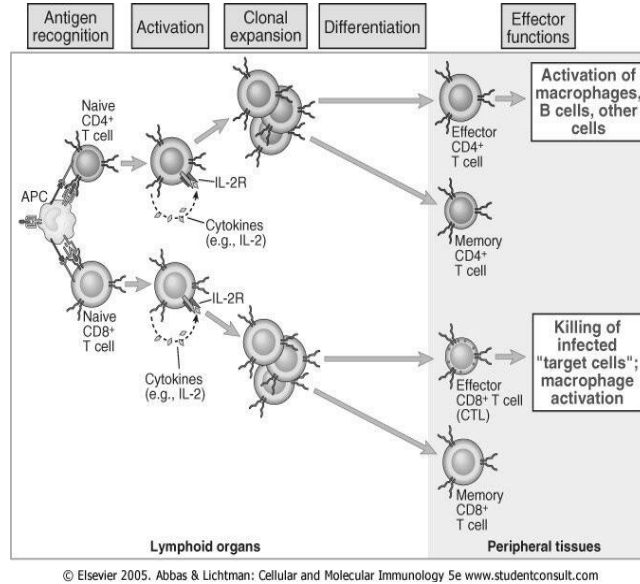
T hücrelerin gerekli immün yanıtı oluşturabilmeleri için antijenin uygun şekilde sunulması ve bu antijenleri tanıyabilmeleri gerekmektedir. T lenfositler antijeni TCR (T hücre reseptörü) ile tanımaktadırlar. TCR' ler özgül bağışık yanıt oluşturulmasını sağlamaktadır. TCR' ler taşıdıkları polipeptid zincirine göre gruplandırılmaktadır. Periferik kanda bulunan T lenfositlerin büyük bir kısmı (%90- 95) TCR $\alpha\beta$ taşımakta ve antijen ile ilişkileri MHC bağımlı olmaktadır. TCR $\alpha\beta$ hücreler CD4 veya CD8 yüzey molekülü taşımakta ve immün yanıtla doğrudan ilgilenmektedirler. T hücrelerin küçük

bir kısımda (%10- 15) TCR $\gamma\delta$ taşımaktadır. Bunlar epiderma ve mukozal yüzeylerde yoğun olarak bulunmaktadır. TCR $\gamma\delta$ ' lerin antijen tanınmaları MHC bağımlı olmamaktadır.

2.1.2.1. T lenfositler Tarafından Antijenlerin İşlenmesi ve Tanınması

Antijen sunan hücreler pinositoz ve fagositoz yolu ile aldıkları antijenleri vakuollerinde parçalamaktadırlar. 10-15 aminoasitlik parçalara ayrılan antijen parçacıkları HLA (*Human Leukocyte Antigen*; İnsan lökosit antijenleri) ile bağlanarak hücre yüzeyine taşınmakta ve T hücrelerine sunulmaktadırlar.

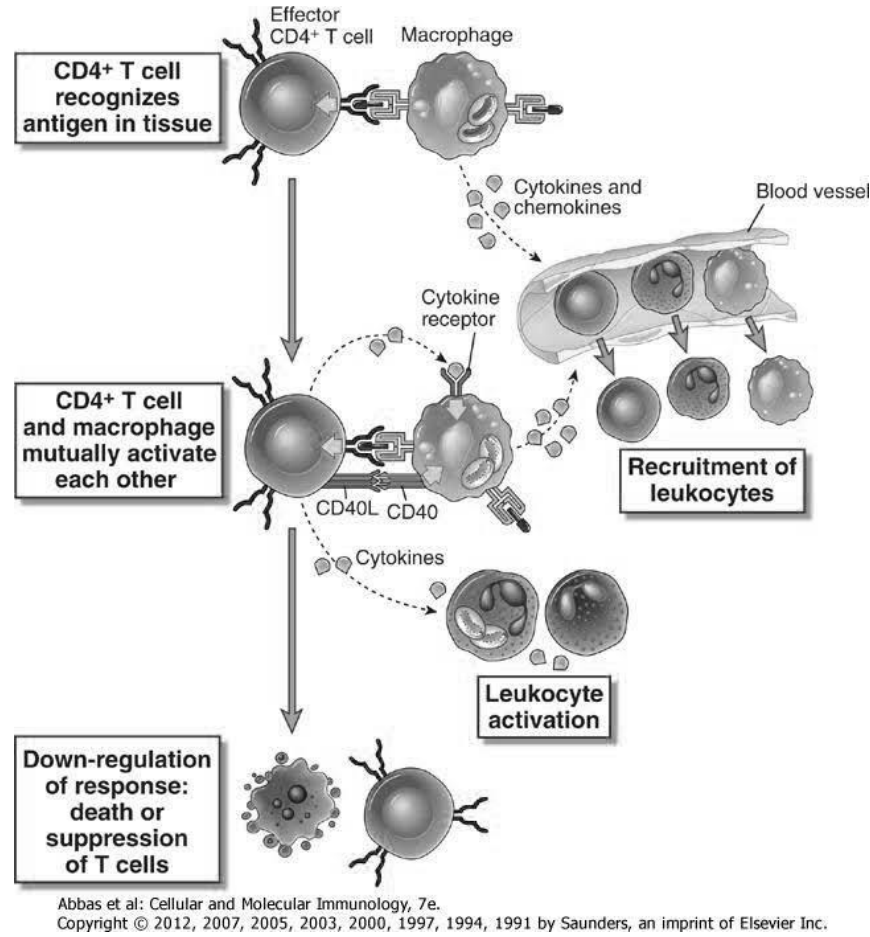
HLA molekülleri immün sistemin efektör hücrelerinden T lenfositlere antijen sunumu yapmakta ve antijene özgü immün cevabın oluşması için ilk adımı atmaktadırlar (Şekil 2.3). Eğer antijen sitoplazma içerisinde serbest halde bulunmakta ise proteozomlar tarafından 8- 9 aminoasitlik parçalara ayrılarak TAP (*Transport Antigen Processing*) molekülleri ile endoplazmik retikuluma taşınmakta ve sonrasında MHC sınıf I moleküllerine bağlanarak onlar aracılığı ile T hücrelerine sunulmaktadır (Jr Janeway, Travers ve Walport, 2005).



Şekil 2.3. T Lenfosit tarafından enfekte hücrenin tanınması-şematik (Abbas ve Lichtman, 2005)

2.1.2.2. T Lenfositin Antijeni Tanıması ve Aktivasyonu

T hücreleri sadece yapı taşı protein olan antijenleri tanımaktadırlar. T lenfositlerin aktivasyon işlemi lenf düğümlerinde gerçekleşmektedir (Jr Janeway, Travers ve Walport, 2005). T hücre aktivasyonu için Şekil 2.4' te de görülmekte olan ilk sinyal MHC sınıf I ya da sınıf II molekülünün antijen bağlama bölgesi ile TCR' nin bir anahtar kilit modeli oluşturarak etkileşimi ile gerçekleşmektedir. MHC molekülü insanda HLA adını almaktadır. MHC sınıf I molekülü ile birlikte sunulan antijenleri CD8⁺T lenfositler, MHC sınıf II molekülü ile birlikte sunulan antijenleride CD4⁺T lenfositler tanımaktadır.

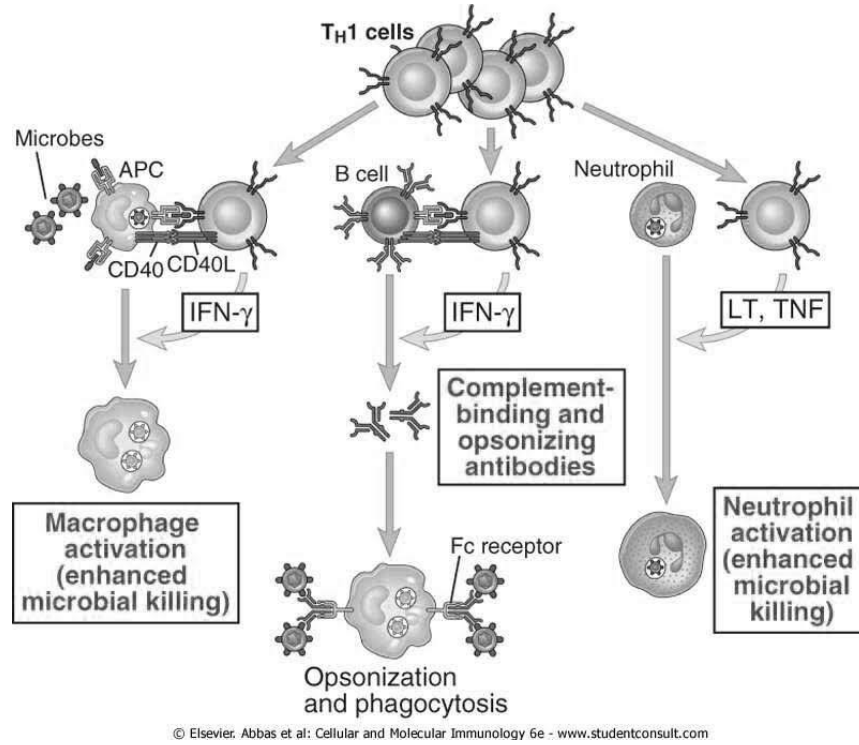


Şekil 2.4. Lenfosit aktivasyonu (Abbas ve Lichtman, 2005)

İkincil sinyal ise T hücrelerin yüzey kısımlarında bulunan bir **ko-stimülâtör** (yardımcı uyarıcı) olan CD28 molekülünün antijen sunan hücreler üzerindeki ligandları ile reaksiyonu sonrasında gerçekleşmektedir. Bu reaksiyon gerçekleşmeden sadece

birinci sinyal ile T hücresi yeterli aktive olmadığı için fonksiyon görememektedirler. Diğer bir yardımcı molekülde CD40 molekülüdür.

Üçüncü sinyal ise TCR' nin antijen ile etkileşimi sonrasında hücre içine giden sinyaller aracılığı ile çeşitli genlerin transkripsiyonunun ve sitokin sentezinin gerçekleşmesi ile olmaktadır. Bu olay sonrasında protein tirozin kinaz aktivitesi artmaktadır. Şekil 2.5' te aktivasyon için gerekli sinyal tipleri şematik olarak görülmektedir.



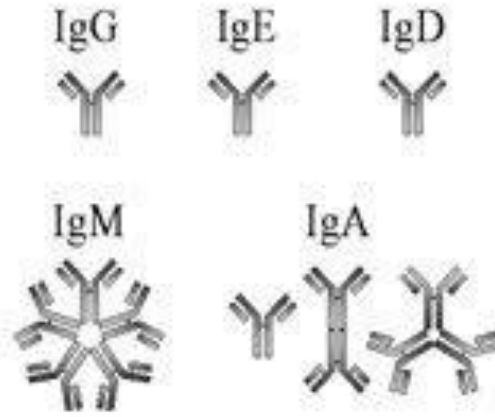
Şekil 2.5. Lenfosit aktivasyonu (Abbas ve Lichtman, 2005)

2.1.3. B Lenfosit

B hücreleri humoral immün yanıtta, diğer bir ifadeyle antikor oluşumundan sorumlu hücrelerdir. Öncül B hücreleri, kanatlılarda *Bursa Fabricus*' ta, memelilerde ise kemik iliğinde olgun B hücrelerine dönüşmektedir. B hücrelerinin yüzeyinde antijen reseptörleri, immüoglobulin reseptörleri, adezyon molekülleri ve MHC molekülleri bulunmaktadır. Bu moleküllerin bazıları diğer immün sistem hücrelerinde de bulunurken, bazıları sadece B hücrelerinde bulunmaktadır. Her bir B hücresi tek bir

antijene özgü antikor oluşturmaktadır. Antijenik bir uyarım sonucunda aktive olan B hücrelerinde bazı değişiklikler olmaktadır. Uyarılmış olan B hücrelerinin bazıları plazma hücresine dönüşürken, bazıları bellek B hücreleri halini almaktadır (Roitt ve Brostoff., 2001).

Plazma hücreleri tarafından üretilen ve hümmoral bağışıklığın temeli olan antikorların yapısında Şekil 2.6' da şematik olarak görülen hafif ve ağır zincirler yer almakta ve antikorlar yapılarında bulunan ağır zincire göre sınıflandırılmaktadır.



Şekil 2.6. Ig Sınıfları (şematik)

2.2. Büyük Doku uyumluluk Kompleksi (MHC)

MHC (Büyük doku uyumluluk kompleksi) molekülleri veya HLA (insan lökosit antijenleri; *human leukocyte antigens*) antijenleri T hücrelerine sunarak T hücrelerinin aktivasyonunu sağlayan ve T hücre aracılı immün cevabın yönünü belirleyen hücre yüzey molekülleri olarak bilinmektedir. MHC molekülleri spesifikliğı yüksek olmayan ve öz-yabancı antijen ayrımı yapamayan moleküllerdir. Antijene özgü immün yanıt oluşmasında yüzeydeki MHC molekülünün kendisi değil T hücrenin kendisi özgünlüğü oluşturan faktördür.

MHC ile ilgili çalışmalar 1940' lı yıllarda başlamıştır. Dr. George Snell ve arkadaşları genetik açıdan farklı olan fareler arasında doku nakli gerçekleştirmiş ve

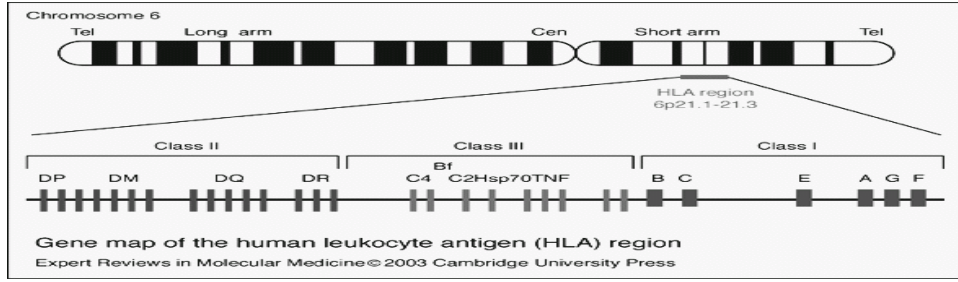
nakillerin rejeksiyon (vücudun nakil edilen dokuyu kabul etmemesi) ile sonuçlandığını, genetik olarak birbirinin aynısı olan gruplar arasında ise doku naklinin olumlu sonuçlandığını görmüşlerdir. Snell ve arkadaşları organ nakli ile ilgili olarak buldukları bu gen kompleksinin insanlarda da var olduğunu bularak bu gen gurubunu MHC olarak adlandırmışlardır. Yaptıkları ilk çalışmalardan yaklaşık 40 yıl sonra Dr. Snell ve çalışma arkadaşları MHC moleküllerinin asıl görevlerini tanımlamış ve 1980 yılında Nobel Tıp ödülü almışlardır (Snell, 1992).

MHC 6. kromozomun kısa kolu üzerinde eksprese olan, yaklaşık 4000 kbaz uzunluğunda bir bölgede bulunan ve Şekil 2.7' de şematik olarak görülen bir gen topluluğudur (Trowsdale, 2011). MHC genleri sınıf I, sınıf II ve sınıf III olmak üzere üç bölgeye ayrılmaktadır. MHC sınıf I ve sınıf II bölgelerinde kodlanan proteinler T hücrelerine antijen sunumunda görev almaktadır. MHC sınıf III gen bölgesinde sitokinler, kompleman faktörleri ve bir takım enzimleri kodlayan gen lokusları bulunmaktadır. MHC gen bölgesinde insan bağışıklık sistemi ile ilintili yaklaşık 200 gen belirlenmiştir.

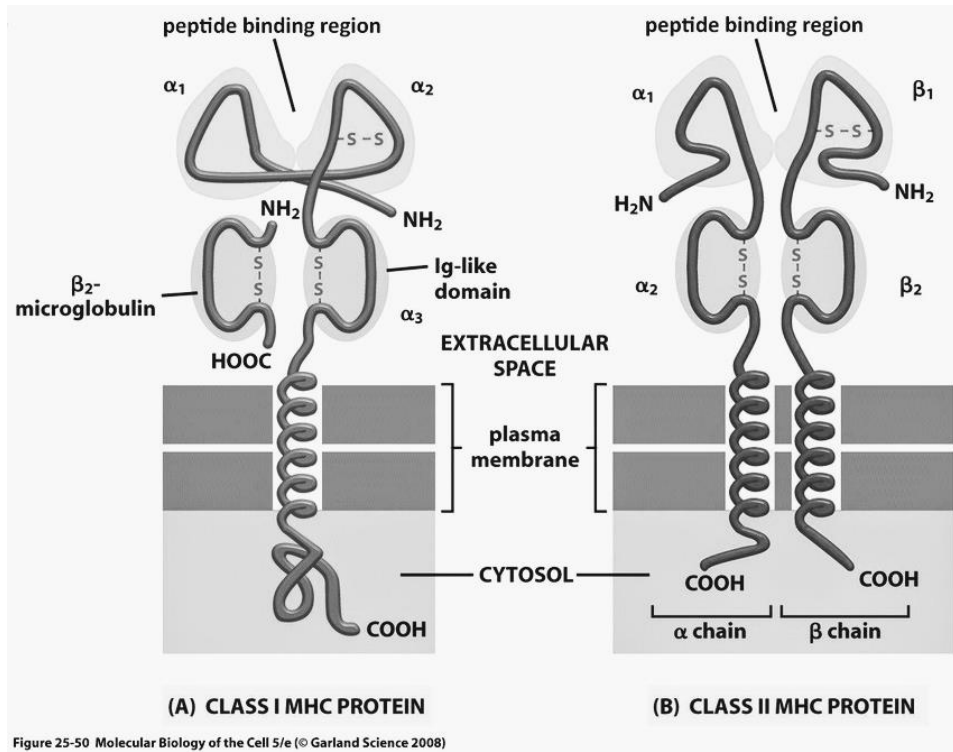
Sınıf I ve Sınıf II gen bölgelerinde kodlanan moleküller yapısal olarak çok benzemektedir. MHC sınıf I moleküllerinin asli görevi virüsler, tümör antijenleri gibi sitoplazma içerisinde bulunan antijenleri CD8⁺ yüzey antijeni taşıyan sitotoksik T hücrelerine sunmaktır. MHC sınıf II molekülleri ise endositoz yoluyla alınan antijenleri CD4⁺ yardımcı T hücrelerine sunmaktadır (Trowsdale, 2011).

MHC molekülleri vücutta en polimorfik gen bölgelerindedir. Polimorfizm özelliklerinin yüksek olmasına ilave olarak MHC genlerinin eşbaskın kalıtım göstermesi ve bu genlerdeki mutasyonların devam etmesi toplumdaki kişiler arasında immünolojik açıdan yüksek çeşitlilik oluşmasına katkı sağlamaktadır. Bu durum evrimsel açıdan dünya üzerindeki hayatın devamınıda sağlamaktadır. Fakat diğer yandan ortaya çıkan bu immünolojik çeşitlilik kişiler arasında enfeksiyon hastalıkları ile mücadelede ve otoimmün hastalıklara eğilimde önemli farklar ortaya çıkmasına sebep olmaktadır.

1950' li yıllarda doğum oranı yüksek olan kadınların serumlarında lökositlere karşı antikorların varlığının tespit edilmesi sonrasında MHC insanlarda yeni bir boyut kazanmıştır. İnsanda MHC gen bölgesinin kodladığı moleküllere "**Human leukocyte antigen, insan lökosit antijenleri (HLA)**", denilmektedir.



Şekil 2.7. MHC gen bölgesi-şematik (Cambridge Universty, 2003)



Şekil 2.8. HLA sınıf I ve HLA sınıf II Moleküllerinin Yapısı (Albert vd., 2008).

2.3. Otoimmünite

Sağlıklı bir immün sistem kendisine yabancı olan antijenleri (non-self) tanımakta ve yabancı antijenlere karşı bir immün yanıt oluşturmaktadır. Sağlıklı bir immün sisteme sahip olan kişiler kendilerine ait olan antijenlere karşı herhangi bir reaksiyon

göstermemektedirler. Bu duruma “yanıtsızlık” ya da “immün tolerans” adı verilmektedir. Her insanda potansiyel olarak immünojenik özellik taşıyabilecek “öz-antijenler” bulunmaktadır. Bu antijenler kişinin vücudunda lenfositlerle sıklıkla karşılaşmakta fakat sağlıklı bir immün sistemde lenfositler bu antijenlere karşı yanıt oluşturmamaktadır. Otoimmünite bilimsel anlamda ilk defa, Alman kimyacı Paul Ehrlich tarafından; “ototoksik korku (*horror autotoxicus*)” tanımlaması ile ortaya çıkmıştır. Bu durum teorik olarak bağışıklık sisteminin, yabancı antijenlere karşı reaksiyon göstermesi gerekirken öz antijenlerini hedef alması şeklinde tanımlanmaktadır (Abbas ve Lichtman’ dan aktaran Camcıoğlu ve Deniz, 2007).

Sağlıklı bir immün sistemin işleyişinin bozulması sonrasında immün sistem bireyin kendi doku ve hücrelerine saldırabilmektedir. Bu durum “otoimmünite” olarak adlandırılmaktadır. Otoimmünite ile ilgili hastalıklar ise “otoimmün hastalıklar ” adını almaktadır. Otoimmünite esnasında bireyin vücudunda kendi hücre ve dokularına karşı oluşan antikorlar ise “otoantikor” olarak adlandırılmaktadır.

Otoimmün hastalıkların ortaya çıkış nedenleri;

I. İmmünolojik etkenler

- Th hücre toleransından kaçış
- Poliklonal B hücre aktivasyonu
- T hücre görevlerindeki dengesizlikler
- Sessiz antijenlerin ortaya çıkması

II. Genetik etkenler

- Aile hikayesi
- Cinsiyet farklılıkları
- Belirli HLA antijenleriyle birlikte ortaya çıkma: Ankilozan Spondilit (HLA-B27), Addison hastalığı (HLA-B8), Romatoid artrit (HLA-DR4)

III. Enfeksiyon etkenleri

- Spesifik olmayan poliklonal B hücre çoğalması: Ebstein-Barr virusu
- T hücre ile ortak antijen: Kızamık virusu–T hücreleri (Thücre fonksiyonunda azalma)

IV. Çevresel faktörler;

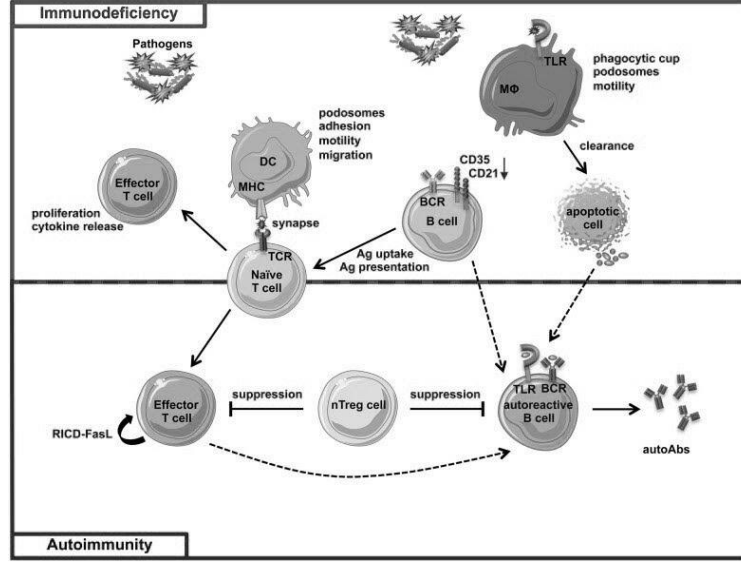
- X, UV ışınları
- Aşırı soğuk hava
- Fiziksel ve kimyasal nedenler neticesinde antijenlerinde oluşan değişiklikler
- Kullanılan ilaçlar (Abbas ve Lichtman' dan aktaran Camcıoğlu ve Deniz, 2007).

2.3.1.İmmün Tolerans

Bir önceki bölümde belirtildiği üzere sağlıklı bir immün sisteme sahip olan kişiler kendilerine ait olan antijenlere karşı herhangi bir reaksiyon göstermemektedirler. Bu duruma “yanıtsızlık” ya da “*immün tolerans*” adı verilmektedir. İmmün toleransın ortaya çıkması için self- antijenlere özgü reseptör taşıyan immün sistem hücrelerinin apoptozunun tetiklenmesi ve ölmesi gerekmektedir. İmmün tolerans mekanizması ya merkezi tolerans ya da periferik tolerans mekanizması ile sağlanmaktadır (Abbas ve Lichtman'dan aktaran Camcıoğlu ve Deniz, 2007). Merkezi tolerans kemik iliği ve timusla ilgilidir. İmmün tolerans ile ilgili ilk çalışmalar 1953 yılında Burnet ve Medawar tarafından başlatılmıştır.

İmmün tolerans mekanizması sürekli devam eden dinamik bir olaydır. Vücuttaki antijenlerin büyük bir kısmı T lenfosit bağımlı oldukları için immün tolerans mekanizmasının sağlıklı ve sürekli bir şekilde devamında T hücreleri birinci derecede ilgilidirler.

İmmün tolerans mekanizması organ nakli gibi özel ve hayati öneme sahip durumlarda önemli bir etkidir. Transplantasyon sonrası donörden alıcıya nakledilen organın alıcı tarafından reddedilmemesi immünsüpresif ilaçlarla immün sistem baskılanarak sağlanmaktadır. İmmünsüpresör ilaçlar immün tolerans mekanizmasını sağlayarak vücudun yeni organa adaptasyonunda önem taşımaktadır.



Şekil 2.9. Otoimmünite (Frontiers in Immunology)

2.3.1.1. Merkezi Tolerans

Embriyolojik dönemde timusta gelişimini sürdüren T lenfositlere ve kemik iliğinde gelişim gösteren B lenfositlerle gelişimleri esnasında sürekli öz antijenler sunulmaktadır. Bu esnada öz antijenlere karşı aşırı reaksiyon gösteren hücrelerin apoptozis mekanizması ile ölmesi sağlanmaktadır. Öz antijenlere karşı hiçbir tepki göstermeyen hücrelerde herhangi bir büyüme sinyali almadıkları için yok olmaktadır.

Timusta gelişen T hücreleri öz veya yabancı birçok tip antijeni tanıyabilen reseptörlere sahiptir. Olgunlaşmamış lenfositler MHC' ye bağlı olarak sunulan kendi antijenlerimizle, kuvvetli bir etkileşime girerse bu lenfositler apoptozisi tetikleyen bir sinyal almakta ve olgunlaşmadan ölmektedirler. Bu olaya “*negatif seçim*” adı verilmektedir. Negatif seçimden kurtulan lenfositler, olgunlaşma sürecine devam etmektedir. T lenfositlerin olgunlaşması için yalnızca antijen sunan hücreler tarafından self antijen sunulması yeterli değildir. T lenfositlerin olgunlaşabilmesi için aynı zamanda APC ve lenfositlerin yüzeyinde bulunan kostimülatör moleküllerinde uygun olarak bağlanması gerekmektedir. Yüksek yoğunluklu antijenler sürekli olarak özel T hücrelerini uyarmakta ve uyarılan T hücreleri kendi yüzeylerinde bulunan reseptörler aracılığı ile apoptoza yönlendirilmekte ve ölmektedirler. Bu mekanizmalarda meydana

gelen aksaklıkların otoimmüniteye neden olabileceği öne sürülmektedir (Abbas ve Lichtman'dan aktaran Camcıoğlu ve Deniz, 2007).

Olgunlaşmamış B lenfositlerde kemik iliğinde self antijenlerle kuvvetli bağlanırsa ya negatif seçim yoluyla ölmekte ya da reseptörlerin özgüllüğünü değiştirmektedirler. B hücreleri, kemik iliğinde self antijenleri tanıkları zaman immünoglobulin genleri yeniden düzenlenerek yeni bir Ig hafif zinciri yapabilmektedirler. Bu olay ise *“yeniden düzeltilme”* olarak adlandırılmaktadır.

B lenfositleri uyaracak antijen seviyesi T lenfositlere göre daha fazladır bu nedenle T lenfosit toleransı genellikle B lenfosit toleransı için bir anahtar rol oynamaktadır.

2.3.1.2. Periferik Tolerans

Merkezi tolerans mekanizmasından kaçabilen lenfositler ya da yalnızca periferde görevli olan gelişimleri esnasında timusta bezinde kendilerine sunulmamış öz antijenlere karşı nonaktif durumda olan lenfositler periferik dokularda öz antijenlere karşı reaksiyon gösterebilmektedirler. Böyle durumlarda CD80, CD86 gibi kostimulatör moleküllerin olmaması ve T hücrelerine sekonder sinyallerin (kostimulaör sinyal) iletilmemesi öz antijene karşı lenfositin reaksiyon göstermesini engellemektedir (Abbas ve Lichtman'dan aktaran Camcıoğlu ve Deniz, 2007).

Tolerans mekanizmasının bozulması, kendinden olan ve kendinden olmayan ayrımının ortadan kalkması, bağışıklık sistemi elemanlarının öz antijenlerine karşı reaksiyon vermesine sebep olmaktadır. Böylece otoantikorlar ya da otoreaktif T hücreleri aracılığı ile otoimmün hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Çeşitli patolojik durumlar toleransın ortadan kalkmasına ve otoimmüniteye yol açmaktadır. İTP' de tolerans mekanizmasının bozulduğu otoimmün bir hastalıktır.

2.4 İmmün İdiyopatik Trombositopenik Purpura (İTP)

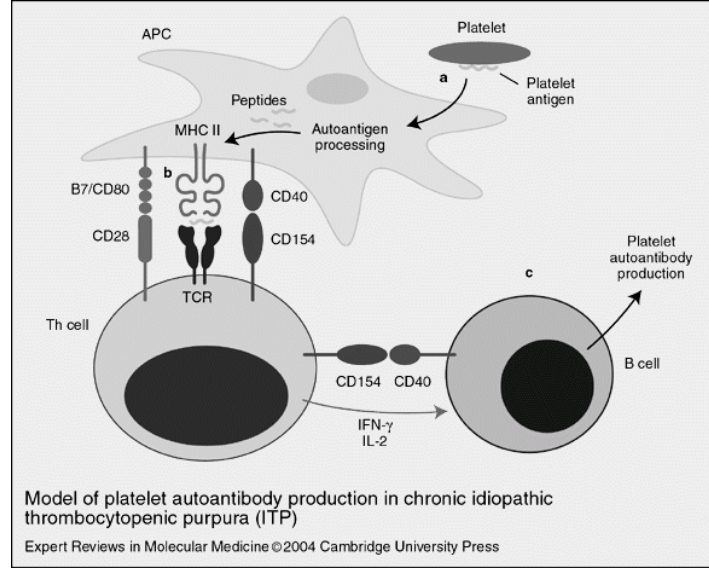
İTP trombosit sayısının azalması sonrasında görülen kanamalarla karakterize, kanamaya yatkınlık gösteren bir kan hastalığıdır. Hastalığın en önemli belirtileri deri içinde meydana gelen kanamalar sonrası görülen küçük kırmızı döküntüler ve ciltte görülen kolay morluklar olarak tanımlanmaktadır.

Hastalık daha önce “*İdiyopatik trombositopenik purpura*” olarak isimlendirilmiş ancak purpura belirtileri birçok hastada gözlemlenmediği için hastalığın kısa adı “*İmmün Trombositopeni*” olarak yeniden düzenlenmiştir. İdiyopatik kelimesi ise ‘*primer*’ olarak kabul edilmiştir. İTP trombositlere karşı oluşan otoantikörlerin trombositlerin yok edilmesine neden olarak PLT yaşam süresini kısaltması sonucu ortaya çıkan ve trombositopeni ile seyreden kazanılmış bir hastalıktır (Neunert vd., 2011; Stasi ve Newland, 2011).

İTP Hastalığı;

- Otoimmün bir hastalık olup otoimmün hastalıklar bağışıklık sisteminde oluşan bozukluklar sebebiyle vücudun öz yapılarını hedef aldığı hastalıklardır.
- İdiyopatik olarak ifade edilmesi nedeninin tam olarak bilinmediği anlamına gelmektedir.
- Trombositopeni ise trombosit sayısının düşüklüğünü ifade etmektedir. Trombositopeniye bağlı olarak vücutta purpura denen kırmızı-mor renkte döküntüler meydana gelmektedir (Semple, 2002).

İTP’de trombosit glikoprotein karışımlarına (GP IIb/IIIa, Ib/IX, Ia/IIa, V ve IV) karşı genellikle IgG, nadiren de IgM tipinde bir antikor oluşmaktadır. Periferik kanda dolaşan bu antikorlar trombosit membranlarına bağlanmaktadır. Trombosit yüzey antijenlerine karşı antikor üretiminin artması antikora bağlı mekanizmalar aracılığı ile trombosit yıkımını arttırmakta ve hastada trombosit sayısı giderek düşmektedir.



Şekil 2.10. Otoantikörlerin trombosit yüzey antijenlerine bağlanması (Cambridge University, 2004)

Vakaların yaklaşık %80' lik kısmında otoantikörler GPIIb-IIIa karışımına bağlanmaktadır. Antikor ile işaretli trombositler öncelikle dalak olmak üzere retikülendotelyal sistemde antijen sunan hücelere Fc reseptörleri aracılığı ile bağlanmaktadır. Trombositlerin parçalanması immün cevabın şiddetli olmasına neden olmaktadır. APC' ler trombosit antijenleri ile aktif hale geldiklerinde antijen özel T hücrelerini aktive etmektedir. Bu farklı antijenlere özel T hücre klonları ise farklı B hücre klonlarının aktivasyonuna neden olmaktadır. Böylece hastaların çoğunda özel bir hedef antijen ile başlayan immün reaksiyon, diğer trombosit antijenlerine karşı oluşan antikörlerle artarak devam etmektedir. PLT sayısı azalınca kemik iliği bu duruma trombosit yapımını artırarak cevap vermektedir. Genellikle İTP hastalarında kemik iliğindeki megakaryosit sayısı normal seviyede ya da bir miktar artmaktadır. Fakat oluşan antikör megakaryositlerde de paylaşılan bir antijene yönelik ise kemik iliğinde megakaryosit sayısı azalabilmektedir. Trombositopenik durumun şiddeti hastalığın belirtilerini doğrudan etkilemektedir. Ayrıca hastalarda mevcut olan ilave hastalıklar ve hastaların kullandığı ilaçlarda hastalığın prognozuna doğrudan katkıda bulunmaktadır (McMillan, Luiken, Levy, Yelenosky ve Longmire, 1978).

Yapılan son çalışmalar özellikle humoral immünitinin İTP hastalığının patogenezi ile daha çok ilişkili olduğunu göstermektedir. APC'ler, Th hücreleri ve

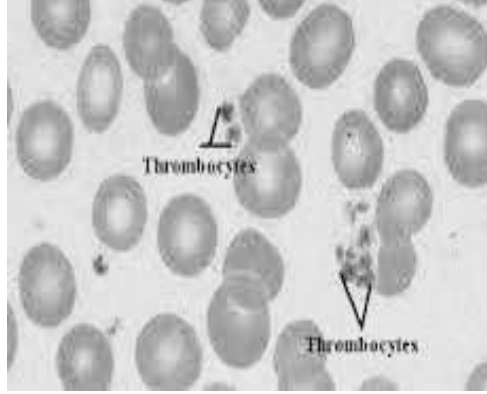
düzenleyici T hücreleri arasında bu süreçte karmaşık bir etkileşim ortaya çıkmaktadır. Yakın dönemde yapılan çalışmalar sitotoksik T hücrelerinin trombosit yıkımını arttırdığını göstermektedir. Yeni doğanda annenin otoantikörlerinin bebeğe geçmesi sonrasında bebekte trombositopeni gelişebilmektedir. Ayrıca çok sık kan transfüzyonu yapılan hastalarda da oluşan antikörler neticesinde trombosit sayısı düşebilmektedir. Bu iki durum İTP tanısına yönelik olarak yapılan tetkikler neticesinde İTP' den ayrılmaktadır. Hastalığın akut ve kronik olmak üzere iki tipi mevcuttur.

Akut tip, ani ve hızlı ortaya çıkan ve %85-90 oranında çocuklarda görülen hastalık tipidir. Akut tip İTP' de görülme sıklığı açısından cinsiyetler arasında anlamlı bir fark yoktur. Daha çok 2 ile 6 yaşlar arasında görülmekle birlikte en sık 3 yaş civarında görülmektedir. Bu tipte trombosit sayısı bir anda mm^3 kanda 2.000 ya da daha da altına düşebilmektedir (Türk Hematoloji Derneği, 2011).

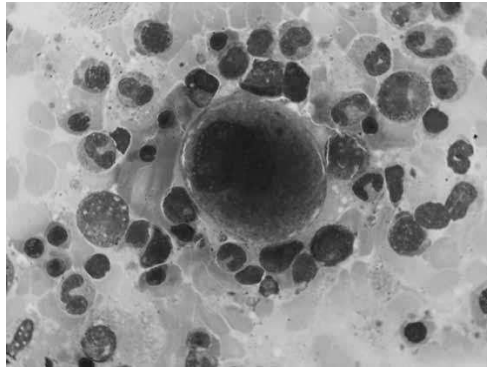
Kronik tip ise daha çok büyük çocuklarda ve orta yaşlarda görülmektedir. Akut tipe göre daha az belirti vermekte ve trombosit sayısı mm^3 kanda 40-50 bin civarında olmaktadır. Bu yüzden aylarca fark edilmeyebilmektedir (Türk Hematoloji Derneği, 2011).

2.4.1. Trombosit

Trombositler kan pulçukları olarak bilinmektedir ve kanın en küçük şekilli elemanlarıdır (Şeki2.11) ve kemik iliğinde megakaryositlerden köken alarak gelişmektedirler (Şekil 2.12) (Rabellino, Levene, Leung, Nachman, 1981). Çapları 1 ila 3 μm arasında değişmekte olup kendine özgü diskoid şekilleri olan küçük nükleusu olmayan hücreler olarak bilinmektedir.



Şekil 2.11. Trombosit ışık mikroskobu görüntüsü



Şekil 2.12. Megakaryosit

Trombositler hasar alan bölgelerde birbirlerine yapışarak fizyolojik bir tıkaç oluşturmakta ve böylece kanama kontrolünde görev almaktadırlar. Sağlıklı insanlarda 1 mm^3 kan içerisinde 150-400 bin adet trombosit bulunmaktadır. Trombosit sayısının 1 mm^3 kanda 150 binin altında olmasına trombositopeni adı verilmektedir. PLT sayısı azaldığı zaman PLT'lerin birbirine yapışmaları ve tıkaç oluşturmaları zorlaşmakta, buna bağlı olarak kanamalar daha uzun sürmektedir.

İTP hastalığı trombosit sayısı 1 mm^3 kanda 50 binin altına düşmedikçe genellikle olarak bir belirti vermemektedir. Trombosit sayısı 50 binin altında olduğu durumlarda darbe sonrası sonra ciltte çabuk morarmalar meydana gelebilmektedir. PLT sayısı 1 mm^3 kanda 30 binin altına indiğinde ise hastalık burun ve diş eti kanamaları ile ciltte morluklar şeklinde kendini ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.13). Ayrıca kadın hastalarda uzayan adet kanamaları görülebilmektedir.

Trombosit sayısı 1 mm^3 kanda 10 binin altında ise herhangi bir darbe olmadan, ciltte nokta görünümünde veya geniş morluklar şeklinde kanamalar görülebilmektedir.



Şekil 2.13. Ciltte morarmalar ve diş eti kanamaları

2.4.2. İTP Hastalığının Nedenleri

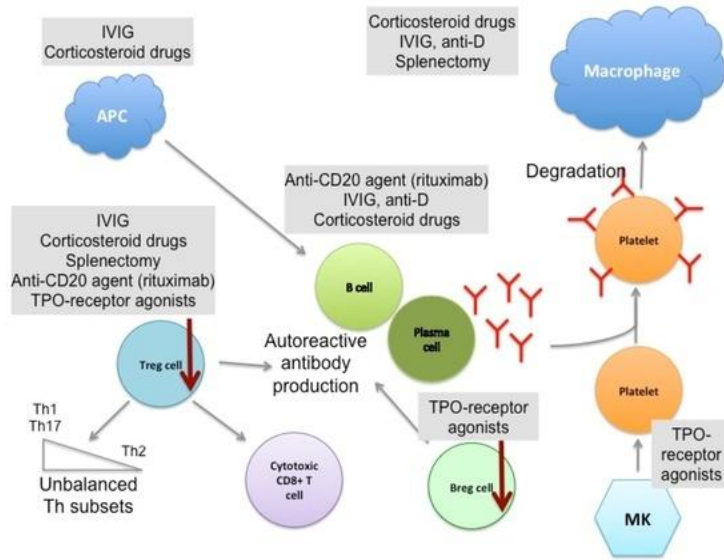
Hastalığın sebebi tam anlamıyla bilinmemektedir. Trombositler bağışıklık sistemi tarafından bilinmeyen bir sebeple yabancı olarak kabul edilmekte ve trombositlere özgü üretilen antikorlar trombositler üzerine bağlanmaktadır. Bu reaksiyon sonrası antikor aracılı reaksiyonlar nedeniyle trombositler parçalanmakta ve hızla sayıları düşmektedir. Hastalık yetişkin kadınlarda erkeklere oranla daha fazla görülmektedir. İTP hastalığı hamilelikte de sıkça görülmektedir. İTP tanısı olan kadınların hamilelik süreçlerinde PLT sayısının çok daha fazla azaldığı bildirilmiştir. Bu nedenle İTP tanısı alan hamile hastalar mutlaka hamilelikleri süresinde doktor tarafından takip edilmelidir. Bebeklerde ve çocuklarda kısa süren İTP görülebilmekte, ancak yetişkinlere kıyasla farklı tedavi uygulanmaktadır (Grainger, Bolton-Maggs, Godeau, 2010; Türk Hematoloji Derneği, 2011).

Hastalık sıklıkla ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde görülmektedir. Bunun da nedeni bu dönemlerde özellikle alerjik hastalıkların fazlaca görülmesi olarak düşünülmektedir. Genelde hastalığa eğilim söz konusu ise çocuklar bir enfeksiyon geçirdikten sonra iki üç hafta içerisinde İTP hastalığıda görülebilmektedir. Sıklıkla kızamık, suçiçeği gibi hastalıklar sonrası İTP görülebilmektedir. İTP’de ayrıca aşular, antibiyotikler, ağrı kesiciler ve kullanılan bazı ilaçlar uyaran olabilmektedir. Bazen İTP, sistemik lupus eritematozus(SLE), lenf bezi tümörleri, hepatit ve HIV virüsü ile oluşan

enfeksiyonlar gibi başka birtakım hastalıklarla birlikte de görülebilmektedir (Grainger, Bolton-Maggs ve Godeau, 2010).

İTP, APC 'ler, T hücreleri ve B hücrelerinde meydana gelen defektler sonrasında da görülebilmektedir (Şekil 2.14). APC defekti mevcut ve dentritik hücrelerde fazla miktarda CD86 ekspresyonu olan hastalarda yüksek oranda T hücre farklılaşması görülmektedir.

İTP' de dentritik hücrelerden salınan ve TLR7 ile birlikte hastalıkla ilişkilendirilen BAFF seviyesinde de artış görülmektedir. İTP' de ayrıca kan, kemik iliği ve dalakta Treg' lerin (CD4+CD25+FoxP3) seviyesinde azalmaktadır. Treg' lerin seviyesi azaldığı zaman dentritik hücre fonksiyonları baskılanmamakta ve trombositlere karşı tolerans azalmaktadır (Blanchette ve Freedman, 1998).



Şekil 2.14. İTP Patogenezi (Zufferey, Kapur ve Semple, 2017)

T hücrelerinde görülen aktivite bozuklukları ve sitokin anormallikleri birçok otoimmün hastalıkta ortaya çıkmaktadır. İTP' de T hücre değişimleri yaklaşık 30 yıl önce tespit edilmiştir. T hücre aracılı pro- inflamatuvar sitokinler İTP' de görülmekte olan immün bozukluğun temelidir. Periferik T hücre uyarımı;

- Sitokin salınımı yoluyla inflamatuvar cevaba
- B hücre aktivasyonuna
- Otoantikor üretimine neden olmaktadır.

2.4.3. İTP Hastalığının Tanısı

Hastalıkla ilgili hasta öyküsü, kan sayımı testleri, fiziki muayene bulguları ve periferik kan yayması incelenmesi ile İTP' de ön tanı konulabilmektedir. Kesin tanı konulabilmesi için diğer trombositopeniye neden olan durumları (dalağı büyüten hastalıklar, kemik iliğinin tümörleri, hepatitler vb.) bertaraf edilmesi gerekmektedir. Bu sebeple bazı biyokimya testleri, kemik iliği aspirasyon biyopsisi ve batin ultrasonografisi yapılmaktadır. Şüpheli hastalarda viral enfeksiyonların bertaraf edilmesi amacı ile gerekli kan tetkikleri yapılabilir. İTP tanısı başka bir hastalığı olmayan bir kişide kanda PLT sayısı düşüklüğü mevcut iken, kemik iliğinde anormal hücreler görülmemesi ve megakaryositlerin bulunması ile konmaktadır. PLT yüzeyine yapışan antikorların araştırılması, test yöntemlerinin çok güvenilir olmaması sebebiyle önerilmemekte ve uygulama da çok fazla tercih edilmemektedir (Blanchette ve Freedman, 1998; Türk Hematoloji Derneği, 2011).

İTP tanısı sekonder trombositopeni nedenlerinin dışlanması ile konulmaktadır. Sekonder immün trombositopeninin başlıca sebepleri aşağıda yer almaktadır. İTP hastalarının çoğunda kanama bulguları dışında fiziki muayene bulguları normaldir.

- Diğer otoimmün hastalıklar: Antifosfolipid sendrom, SLE
- İmmün Yetmezlik Sendromları: Yaygın kombine immün yetersizlik ve diğer immünyetersizlikler
- İlaçlar, aşılama, İnfeksiyonlar: Sitomegalovirüs, *H. Pylori*, HCV, HBV, HIV, CMV, Varisella Zoster, *H. pylori*: Helikobakter Pylori, HCV, HIV: Human Immunodeficiency Virus, CMV: Citomegalovirüs
- Lenfoproliferatif hastalıklar: kronik lenfositik lösemi, lenfomalar
- Kemik iliği nakilleri
- Solid tümörler

2.4.4.İTP Hastalığında Tedavi

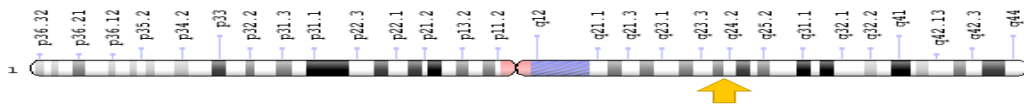
İTP’li hastaların çoğunda trombosit değeri normalin altına düşmektedir. Ancak bu durum tek başına tedaviyi gerektirmemektedir. Trombosit sayısı 1 mm^3 kanda 50 binin altında ve kanama bulguları mevcut ise tedavi planlanmaktadır (Türk Hematoloji Derneği, 2011).

Bağışıklık sistemi trombositleri hedef aldığı için tedavide öncelikli amaç immün sistemin baskılanması ve trombositlere karşı otoantikör gelişiminin engellenmesidir. Bu amaçla trombositler vücutta dalakta yıkıldığı için ilaç tedavisi ile bu yıkım engellenmektedir. Bu amaçla steroid ilaçlar, intravenöz immünglobulinler, Anti-D ve hayatı tehdit eden kanama durumlarında trombosit süspansiyonları tedavi amacı ile kullanılmaktadır. Eğer bu ilaçlar kullanılarak kalıcı bir tedavi sağlanamamış ise, trombositlerin başlıca yıkılımının gerçekleştiği organ olan dalağın ameliyatla çıkartılması gerekebilmektedir (splenektomi). Genellikle splenektomi sonrası PLT sayısı güvenli bir düzeye yükselmektedir. Nadir de olsa splenektomi sonrası kanamaya sebep olabilecek kadar düşük PLT değerlerine rastlanabilmektedir. Böyle durumlarda immün sistemi baskılayacak daha güçlü ilaçlar kullanılabilir (Türk Hematoloji Derneği, 2011).

2.5. CD247 Geni

2.5.1. Genomik Yapısı

CD247 geni Şekil 2.15’ te şematik olarak görüldüğü gibi negatif iplikçikteki 1q22-q25 lokusundaki kromozom 1 ' in uzun kolunda bulunmaktadır. CD247, 87.896 baz uzunluğundadır (CD247, 2007). Kodlanan protein 164 amino asit uzunluğunda ve tahmini ağırlığı 18.696 kiloDalton' dur. Ayrıca CD247, CD3-ZETA, CD3H, CD3Q, CD3Z, IMD25, T3Z ve TCRZ isimleri ile de adlandırılabilir.



Şekil 2.15. CD247 Geninin Yeri- şematik

2.5.2.Görevleri

T hücre reseptörü zeta, T hücre reseptörü alfa-beta ve gama-delta heterodimerler ve CD3 gama, delta ve epsilon ile birlikte Thücre reseptörü CD3 kompleksini oluşturmaktadır. CD247, özdeş proteinlerin bağlanmasında, protein homodimerizasyon aktivitesinde ve transmembran sinyal reseptörü aktivitesinde görev almaktadır. Düşük ekspresyonu bağışıklık sisteminde sorunlara neden olmaktadır (CD247, 2007).

2.5.3. Polimorfizm

Poli ve morfizmos kelimelerinin bir araya gelmesi ile oluşan polimorfizm, eski Yunanca'da "**çok şekillilik**" anlamına gelmektedir. Bir toplulukta farklı alellere bağlı olarak, genetik açıdan iki ya da daha çok alternatif fenotipin görülmesi "**genetik polimorfizm**" olarak tanımlanmaktadır. Popülasyon genetikçileri, bir gen bölgesi için, nadir aleller en az % 1 frekansına sahip ve bu aleller içinde heterozigot olanlar en az %2 oranında ise polimorfik olarak tanımlamaktadırlar. Polimorfizm için popülasyon genetiği açısından belli bir frekans gereksinim varken, moleküler genetik açısından frekansın önemi olmayıp, bir ailede dahi görülebilen varyantlar polimorfik olarak nitelendirilmektedir (Nussbaum, Mcinnes ve Willard, 2015).

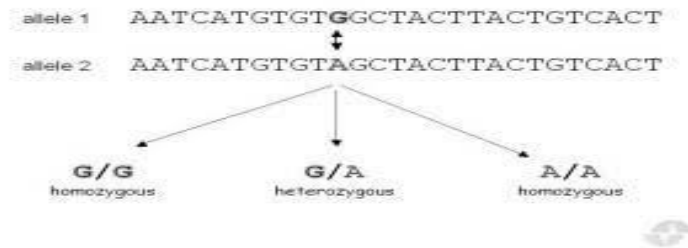
Polimorfizmler, türlerin yaşadıkları ortamlara uyumunu kolaylaştırarak, evrimsel süreçte hayatta kalabilmelerine imkan vermektedir. Polimorfizm, birey düzeyinde proteinlerin ve kan grubu bileşiklerinin varyant formlarında (biyokimyasal polimorfizm), kromozomların morfolojik (kromozomal polimorfizm) ya da DNA düzeyinde nükleotid farklılıkları (DNA polimorfizmi) şeklinde görülebilmektedir. Polimorfizmler iki tip olup birincisi insan genomunda en fazla bulunan polimorfizm olan Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNPs), ikincisi ise kısa DNA dizilerinin tekrarı şeklinde kendini gösteren değişken sayılı tekrarlı polimorfizmlerdir. (Variable Number Tandem Repeats- VNTR) (Nussbaum, Mcinnes ve Willard, 2015).

Genetik polimorfizmler, tıpta bazı hastalıklara karşı duyarlılıkta bireysel farklılıkların ortaya çıkarılmasında kullanılmaktadırlar. Bazı gen polimorfizmleri bir hastalığın ortaya çıkma riskini arttırırken, bazı polimorfizmler azaltabilmektedir. Bazı

polimorfik aleller ise yalnızca belirli bir çevresel faktörün etkisi altında hastalık riskini arttırmaktadır. Günümüzde SNP' lerin hastalıklarla ilişkisi, ilaca olan yanıtta etkili olup olmadıkları gibi birçok alanda yapılan çalışma sayısı günden güne artmaktadır.

2.5.4. Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNPs)

Adından da anlaşıldığı gibi bu polimorfizmden tek bir nükleotid değişimi sorumludur. SNP' lerin birçoğu, tek bir nükleotidin bir başka nükleotid ile yer değiştirmesi şeklinde görülmektedir. Fakat SNP tanımı, tek bir nükleotidin insersiyon ya da delesyonunu da içermektedir. Bazı SNP' ler ise kesim bölgelerinde baz değişimlerine yol açmaktadır. Bunlara '*Kesim Bölgesi Polimorfizmleri*' adı verilmektedir (RSP; *Restriction Side Polymorphism*). İnsan genomunun yaklaşık %1,5' i, kodlama yapan DNA dizileri içermekte ve SNP' lerin çoğu intron ve intergenik diziler gibi kodlama yapmayan DNA bölgelerinde görülmektedir. İnsan genomunda yaklaşık olarak 6 milyar nükleotid vardır. Yaklaşık her 1000-2000 nükleotidde bir SNP görülebilmektedir. Günümüzde SNP' lerin birçoğu yapılan çalışmalar neticesinde kanser, diyabet, Alzheimer gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (Battaloğlu ve Başak, 2010).



Şekil 2.16. Tek Nükleotid Polimorfizmi- Şematik

SNP' ler transisyonlar (pürin-rürin bazı, ya da pirimidin-pirimidin bazı değişimleri) ve transversiyonlar (pürin-pirimidin ya da pirimidin-pürin bazı değişimleri) gibi baz değişimlerini içermektedirler. G>A ve C>T transisyonları, insan genomundaki SNP' lerin yaklaşık %25' ini oluşturmaktadır. Tek nükleotid pozisyonundaki varyasyon

terminolojisi allel frekansı ile açıklanmaktadır. Bir populasyondaki tek baz değişiminin frekansı %1' den büyükse bu değişim SNP, %1' den küçük ise mutasyon olarak adlandırılmaktadır (Battaloğlu ve Başak, 2010).

-Sessiz SNP' ler; Genlerin fonksiyonlarını ve kalıtımı etkilememektedirler. SNP' lerin çoğu bu gruba girmektedir (Non coding region SNPs).

-Protein Fonksiyonlarını Etkileyen SNP' ler; Doğrudan aminoasit dizinini değiştirebildikleri gibi, indirekt olarak fonksiyon değişikliğine sebep olabilmektedirler (Coding region SNPs).

SNP verilerine ait uygulama alanları

- Hastalık tanı ve risk derecelendirmesi
- Gen haritalama
- Polimorfizm tetkikleri ve epidemiyoloji çalışmaları
- Farmakogenetik
- Adli genetik vb.

SNP insanda olduğu gibi pek çok diğer organizmada da en sık gözlenen polimorfizm tipidir. SNP'lerin pek çoğunun hücre fonksiyonları üzerine direkt etkisi yoktur fakat kişilerin bir hastalığa yatkınlığı ya da ilaçlara verdiği cevabı etkileyebilmektedir (Cargill vd., 1999; Kortunay, 2005). Kullanılmakta olan ilaçların farklı bireylere farklı etki ve yan etki gösterme sebeplerinden biride sahip olduğu SNP' ler olarak açıklanmaktadır. Aynı çevresel koşullarda yaşayan bireylerin bir enfeksiyon ajanına farklı şekillerde cevap vermesi de SNP ile ilişkilendirilmektedir (Cargill vd., 1999; Tulunay, 2006).

2.5.5. VNTR Polimorfizmi

DNA polimorfizmi, bazı durumlarda bir kromozom üzerinde belli bir bölgede art arda tekrarlayan kısa DNA parçalarının sayılarının değişmesi şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Bu şekilde kopya sayısına bağlı olarak ortaya çıkan genetik polimorfizm "**VNTR**" (**Variable Number of Tandem Repeats**) olarak adlandırılır. VNTR' ler insan genomunda sıklıkla görülmektedir (Dönbak, 2002).

BÖLÜM 3

3.1.MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışma için Trakya Üniversitesi Hastanesi Hematoloji Kliniği' nde takibi yapılan İTP hastalarına, alınan etik kurul onayı sonrasında yapılacak olan çalışma ile ilgili bilgilendirme yapılmış ve gönüllü olan hastalardan hastanın onayı alınarak ve onam formu imzalatılarak içerisinde antikoagülan olan tam kan sayımı tüplerine bir tüp kan alınmıştır.

İTP' li gruptaki gönüllüler çeşitli derecelerde kanama yakınmaları ile kliniğe başvurmuşlardır. Kanama değerlendirmesi son güncellemesi 19/07/2011 tarihinde yapılan Uluslararası Tromboz Hemostaz Birliği (ISTH) tarafından belirlenen kanama değerlendirme ölçeği ile majör ve minör kanama değerlendirme kriterlerine göre yapılmıştır.

Çalışmada İTP' li ve sağlıklı kontrol grubunda toplam 108 vericiden alınan kan ile yapıldı. İTP' li grubunda 34 kadın, 21 erkek verici olmak üzere 55, sağlıklı kontrol grubunda ise 31 kadın, 22 erkek olmak üzere toplam 53 vericiden kan alınmıştır. Real Time PCR analizi sonrasında Çizelge 4.1.2' de yer alan veriler elde edilerek analiz işlemlerine bu veriler üzerinden devam edildi. Verilerin analiz işlemleri khi-kare tablosu kullanılarak IBM istatistik programı ile yapılmıştır.

Gönüllülerin araştırmaya dahil edilme kriterleri aşağıdaki şartlar olarak belirlenmiş ve kan alma işlemleri bu kriterler sorgulanarak yapılmıştır.

İTP' li hastalar için;

- 19 yaşından gün almış olmak,
- Birbirileri ile akrabalık ilişkisinin olmaması,

-Hamile olmamak,

-İTP tanısı almış olmak.

Sağlıklı Kontroller için;

-19 yaşından gün almış olmak,

-Birbirileri ile akrabalık ilişkisinin olmaması,

-Herhangi bir otoimmün hastalık tanısı almamış olmak,

-Ailesinde en az üç kuşak öncesine kadar otoimmün hastalık tanısı alan birisinin olmaması

-Hamile olmamak.

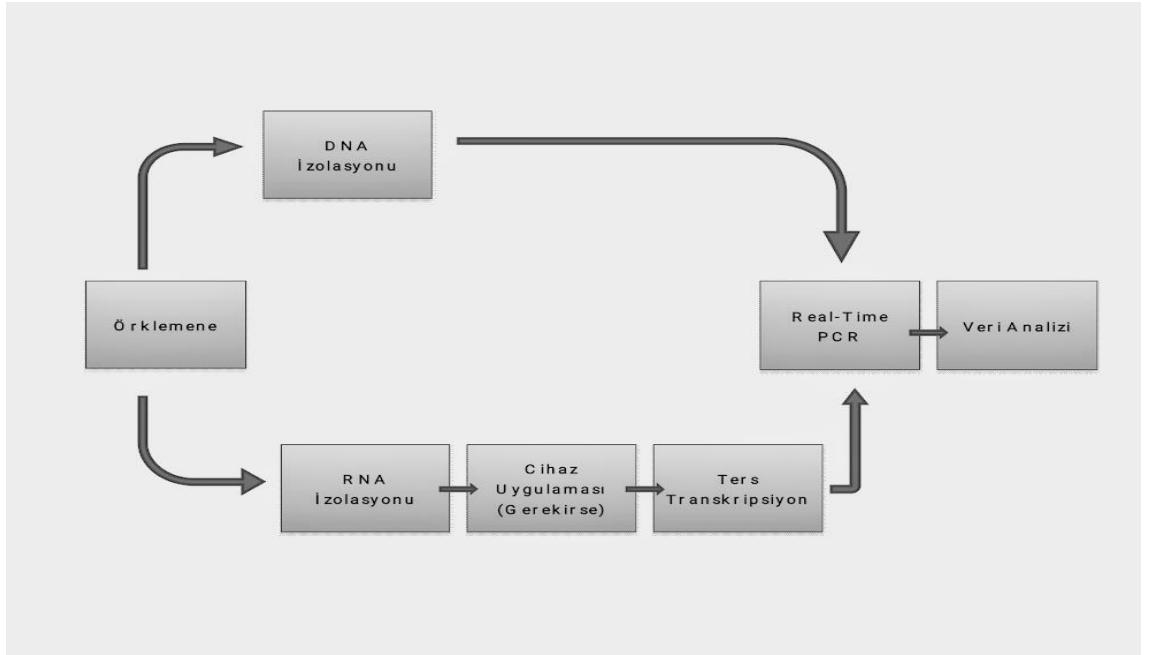
Alınan kanlar Trakya Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı' nda +4°C' de İTP' li ve sağlıklı kontrol çalışma gruplarına ayrılarak çalışma gününe kadar saklanmıştır. Kanlar karıştırıcı üzerinde 5 dakika homojenize edildikten sonra DNA izolasyon işlemine alınmıştır. İzolasyon işlemi kanlar 14' lü gruplara ayrılarak QIAGEN EZ1 Advanced XL (Seri No: L122A1010) DNA izolasyon cihazında yapılmıştır. İzolasyon işleminde 200 µl tam kan kullanılmış ve işlem sonucunda her verici için 200 µl DNA izole edilmiştir. Daha sonra izole edilen DNA' lar için miktar analizi yapılmıştır. İzole edilen DNA' lar içerisinde miktarı analiz için uygun olmayan İTP' li ve sağlıklı kontrol grubu kanları için yeniden izolasyon işlemi yapılmıştır. İzole edilen DNA' lar gruplar halinde Real-Time PCR işlemine alınmıştır.



Şekil 3.1.1. DNA İzolasyon Cihazı QIAGEN EZ1 Advanced XL (Seri No: L122A1010)

3.1.1.Real- Time PCR;

Real- Time PCR teknolojisi nükleik asitlerin (DNA, mRNA) çoğaltılmasını ve ürünlerin miktarının tek bir tüp içerisinde tespit edilebilmesini sağlayan son yıllarda popüler olarak kullanılmakta olan bir yöntemdir. Floresan ışımaya teknolojisinin moleküler genetik yöntemlerde kullanılmaya başlanması sonrasında bilinen PCR yöntemleri geliştirilerek oluşturulan yeni teknikler gen anlatım çalışmalarına hız kazandırmaktadır (Klein, 2002). Kullanılan teknikte PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitörize edebilen floresan işaretli prob ve boyalar kullanılmaktadır. Yöntem floresanın DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemi olması sebebiyle Sayımsal Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu (RT-PZR), İzlenebilir Polimeraz Zincirleme Tepkimesi (PZT), Floresan Sayımsal Polimeraz Zincir Reaksiyonu gibi farklı isimlerle de bilinmektedir. Şekil 3.1.2’ de Real Time PCR analiz işlemleri akışı şematik olarak görülmektedir.



Şekil 3.1.2. Real Time PCR Çalışma Akışı (Günel ve Aydın, 2009)

3.1.2. Real Time PCR Kullanım Alanları

- Biyolojik numunelerden sağlanan DNA’ nın kopya sayısını ve mRNA düzeyini kantitatif olarak belirleyebilme

- SNP analizleri
- Patojen tespiti
- DNA hasarı tespit etme
- Metilasyon tespiti
- Prenatal Tanı Çalışmaları
- Onkolojik Çalışmalar
- Genetiği Değiştirilmiş Organizmalarla İlgili Çalışmalar
- İlaç Endüstrisi
- Biyo-Terörizm
- Adli Tıp
- Kromozom bozukluklarının tespiti gibi birçok alanda kullanılabilmektedir (Kubista vd., 2006).

3.1.3. Real- Time Yöntemleri

TaqMan Probe Yöntemi: Tag-Man probe yöntemi “*Double-Dye Oligonucleotide*”, “*dual labeled probe*” veya “*5' nuclease probe*” olarak da adlandırılmaktadır. çoğaltılmak istenen DNA’ ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içermektedir (Gut, Leutenegger, Huder ve Pedersen, 1999).

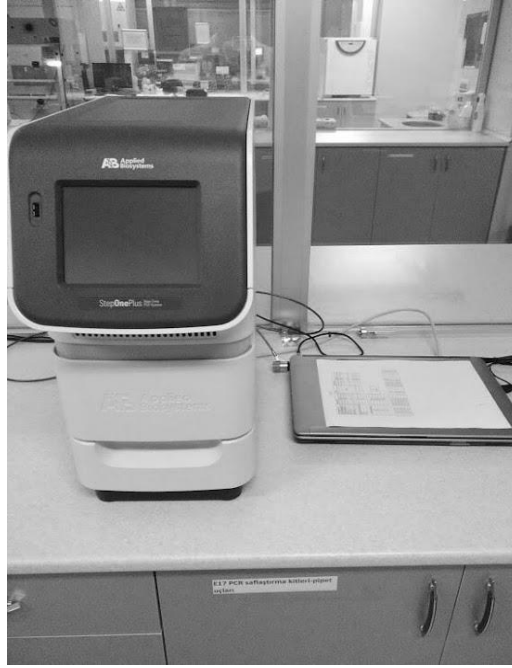
SYBR Green I Yöntemi: Spesifik olmayan iki zincirli DNA çoğaltımında SYBR Green I yöntemi kullanılmaktadır. Kullanılan floresan boya yalnızca iki zincirli DNA’ ya bağlandığı için çoğalan DNA miktarındaki artışa bağlı olarak PCR cihazında okunan floresanın seviyesi de eş zamanlı olarak artmaktadır (Kubista vd, 2006).

Moleküler Boncuk Yöntemi: Saç tokasına benzeyen yapının uç kısmında bulunan yuvarlak kısım çoğaltılacak DNA ile komplementer tek zincirli DNA dizisini içermektedir. Yapının düz olan uç kısımlarında iki adet florokrom boya bulunmaktadır. Bu boyalardan baskılayıcı florofor diğer boyanın floresansını engellemektedir (Bustin, 2000).

Hibridizasyon Probe Yöntemi: Bu yöntemde iki ayrı prob tasarlanmaktadır. 3' ucunda floresans işaretli boya, 5' ucunda ise alıcı boya bulunmaktadır. PCR reaksiyonu

sırasında bu iki prob hedef nükleik asit dizisine bağlanıp birbirine yaklaştığı zaman bir enerji yayılımı olmaktadır (Chaplin, Rasmussen, Bernard ve Wittwer, 1999).

Real- Time PCR analizleri AB Applied Biosystems PCR cihazında yapılmıştır (Seri No: 2720010807). Çalışmada TaqMan Probe Real-Time PCR yöntemi kullanılmıştır. Thermo Fisher marka TaqMan SNP Genotyping Assay rs858554 (Assay ID: C_8918095_10) ve TaqMAN SNP Genotyping Assay rs704848 (Assay ID: C_1680863_10) bölgeleri ve Master Mix kullanılmıştır.



Şekil 3.1.3. Real- Time PCR Cihazı AB Applied Biosystems PCR (Seri No: 2720010807)

Real- Time PCR işleminde ön hazırlık aşamasında numuneler gruplara ayrıldı ve her 100 numune için 500 µl Master Mix, 375 µl distile su, 25 µl rs858554 ya da rs704848 probu kullanılarak bir karışım hazırlandı. “rs” Referans SNP ID numarasını ifade etmektedir. Her örnek çalışması için, hazırlanan karışımdan PCR plaklarına 9 µl, izolasyon işleminden elde edilen DNA örneklerinden de 1µl dikkatlice otomatik pipet yardımı ile eklendi. Pipetleme esnasında hava kabarcığı kalmamasına ve kontaminasyon olmamasına özen gösterildi. Hazırlanan plaklar çalışmada floresan boyalar kullanıldığı için ön hazırlık aşaması sonrası bekletilmeden Real-Time PCR cihazına yerleştirilmiş ve program verileri girilerek işlem başlatılmıştır.

rs8585854 ve rs704848 polimorfizmleri için içerik dizileri Çizelge 3.1.1’ de yer almaktadır. Real Time PCR analizlerinde floresan işaretli VIC/FAM kanalları kullanılmıştır. VIC ve FAM floresan işaretli öncü boyları ifade etmekte ve PCR cihazı analizleri bu referanslara göre yapmaktadır. CD247 genine ait rs858554 polimorfizmi için A/G, rs704848 polimorfizmi için de C/G alelleri baz alındı. rs858554 probu için A aleli floresan işaretli VIC kanalından, G aleli ise floresan işaretli FAM kanalından okundu. rs704848 probunda ise C aleli VIC kanalından, G aleli ise FAM kanalından okundu. PCR cihazına VIC/FAM referans değerleri girildi ve probun içerdiği boyaya göre cihaz bir grafik oluşturarak analiz sonuçlarını vermiştir.

Çizelge 3.1.1. Real Time PCR İşleminde Kullanılan VIC/FAM Alelleri ve İçerik Dizileri

rs858554	VIC/FAM (A/G)
TCCCGGCATGGCTTACTAGGTGGTT -A/G- ACGCCAGGGCAGTTGGGAGGTAAAT	
rs704848	VIC/FAM (C/G)
ATTCGTAAGCCACCTCCCAAGCCCC -C/G- AATAGCCCCAGGTAGGGGACATCCC	

BÖLÜM 4

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Sonuçlar

Analizler IBM istatistik programında önce aleler, daha sonra homozigot ve heterozigot genotipler tek tek değerlendirilerek yapılmıştır.

İTP tanısı için en önemli verilerden biri hastanın PLT sayısıdır. Hastanın kliniğe başvurduğu zamandaki PLT sayısına göre tedavi sürecinin başladığı bildirilmiştir. İTP hastalarının büyük bir kısmı ciltte çeşitli derecelerde morarma ve kanama şikayeti ile Hematoloji Kliniklerine başvurmaktadır.

Hastalara yapılan tetkikler sonrasında İTP tanısı konulması sonrasında tedavi planlaması yapılmakta ve tedaviye olan yanıt düzeyleri belirlenmektedir. Hastalara yanıt tipleri belirlendikten sonra önce immünoglobulin tedavisi uygulanmaktadır. Hasta erken yanıt 1-2 gün olarak değerlendirilmektedir. Hastaların Ig yanıt sevipleri O yanıt yok, 1 erken yanıt, 2 ise geç yanıt olarak değerlendirilmektedir.

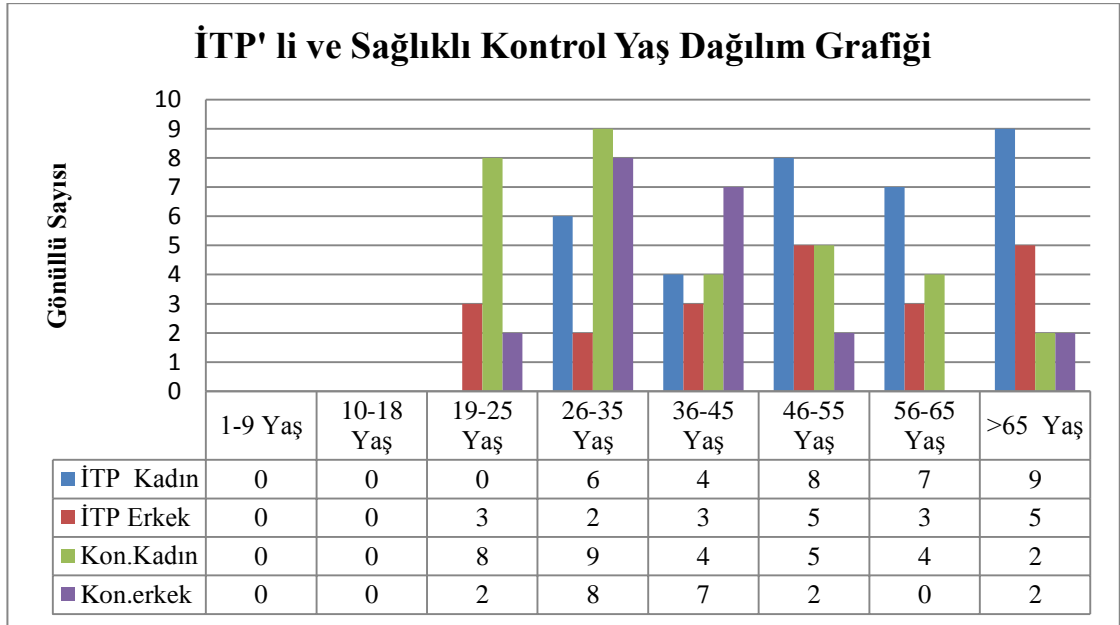
Hastalığın tedavisinde steroid tedavisi ve immün baskılayıcı tedavilere dirençli ya da splenektomi sonrası tekrarlayıp aynı tedavilere direnç gösteren kanama riski mevcut kronik İTP hastalarının trombosit sayısının artırılması amacıyla *Eltrombopag* etken maddeli ilaçlar kullanılmaktadır.

Daha az dirençli olan ve immüsupresiflere yanıt veren hastalar içinse steroid tedavisi uygulanmaktadır. Çizelge 4.1.1' de İTP' li gruba ait klinik bulgular yer almaktadır.

Çizelge 4.1.1. İTP' li Grup Hastalık Klinik Bulguları

	Klinik Veriler	Kadın	Erkek	Toplam
Major Kanama	+(Var)	3	1	4
	-(Yok)	32	19	51
Minör Kanama	+(Var)	16	5	21
	-(Yok)	18	16	34
Platelet Sayısı/mm3	<10000 mm3	12	6	18
	10000-20000 mm3	16	11	27
	>20000 mm3	5	5	10
IVIG Yanıtı	Yok	0	0	0
	Erken	16	15	31
	Geç	18	6	24
Tüm Yanıt Tipi	Kısmi Cevap	10	5	15
	Tam Cevap	24	16	40
Yanıt Veren Tedavi Tipi	Steroid	23	12	35
	Eltrombopag	12	8	20

Şekil 4.1.1 İTP' li ve sağlıklı kontrol gruplarında yer alan gönüllülerin yaş dağılımına aittir.



Şekil 4.1.1. İTP' li ve Sağlıklı Kontrol Grupları Yaş Dağılımı Grafiği

Çizelge 4.1.2’ de yer alan veriler göz önüne alındığında İTP’ li ve kontrol grupları arasında her iki polimorfizm açısından da anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 4.1.2. rs8585545 ve rs704848 Polimorfizmlerinin İTP’ li ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında Alel ve Genotip Frekansları Karşılaştırması

SNP			Sağlıklı Kontrol		İTP		<i>p</i>
			N	%	N	%	
rs858554	Alel Frekansları	A	56/106	52,8	49/110	44,54	$p=0,160$
		G	50/106	47,2	61/110	55,46	$p=0,576$
	Genotip Frekansları	AA	14/53	26,41	12/55	21,82	$p=0,576$
		AG	28/53	52,83	25/55	45,45	$p=0,443$
		GG	11/53	20,76	18/55	32,73	$p=0,160$
rs704848	Alel Frekansları	C	63/106	59,43	58/110	52,8	$p=0,198$
		G	43/106	40,57	51/110	47,2	$p=0,733$
	Genotip Frekansları	CC	19/53	35,84	18/55	32,72	$p=0,733$
		CG	25/53	47,16	22/55	40	$p=0,452$
		GG	9/53	17	15/55	27,28	$p=0,198$

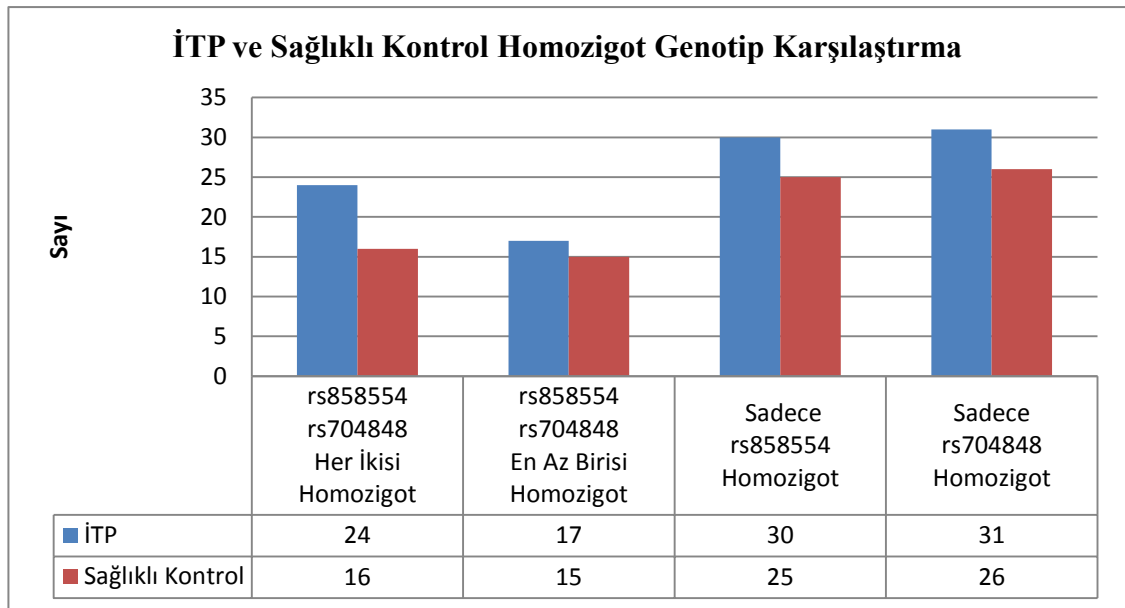
Çizelge 4.1.2’ de yer alan veriler göz önüne alındığında polimorfizmlerin çalışma grubu içerisindeki dağılımı hasta ve kontrol grupları arasında dengeli bir dağılıma sahiptir. Bu dağılımların literatür taraması sonrası Avrupa popülasyonu ile uyumlu olduğu görülmektedir. Önce alleller daha sonra homozigot ve heterozigot genotipler taranmış ve IBM istatistik programında *p* değerleri hesaplanmıştır. *p* değerleri 0,05’ ten büyük olduğu için %95’lik güvende *p* değerleri ile hastalık patogenezi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Çalışma grupları oluşturulurken cinsiyet dağılımlarının birbirine yakın olması sağlanmıştır. Polimorfizm dağılımlarının analizleri sırasında da hasta ve kontrol grupları cinsiyete göre polimorfik (heterozigot) olma ya da polimorfik olmama (homozigot)

sayıları belirlenmiştir. Cinsiyet açısından yapılan karşılaştırmada her iki polimorfizm için gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Analizler sırasında rs858554 ve rs704848 polimorfizmleri için hasta ve kontrol grupları bazında ayrı ayrı cinsiyete göre polimorfik (heterozigot) olma ya da polimorfik olmama (homozigot) sayıları belirlendi. Her iki cinsiyet açısından yapılan karşılaştırmada gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Şekil 4.1.2' de İTP' li ve sağlıklı kontrol grupları arasında yapılan karşılaştırmada, rs858554 ve rs704848 polimorfizmlerinin her ikisinin de mevcut olma durumu göz önüne alınacak olursa, kontrol grubunda 16 ($p=452$), hasta grubunda ise 24 ($p=0,659$) hastada her iki polimorfizm mevcuttur. Sayıların birbirine yakınlığı ve aradaki farkın istatistiki yönden anlamlı olmadığı düşünülürse bu verilerde rs858554 ve rs704848 polimorfizmlerin İTP hastalığının patogenezeine doğrudan katkı sağlamadığını düşündürmektedir ($p>0,05$).



Şekil 4.1.2. İTP ve Sağlıklı Kontrol Grupları Homozigot Genotip Karşılaştırması

Taramış olduğumuz polimorfizmlerin National Center For Biotechnology Information verilerine göre intronik bölgelerde olması ilgili polimorfizmlerin İTP ile doğrudan ilişkisinin tespit edilememesinde etili olabileceği düşünülmektedir.

4.2.Tartışma

İTP hastalığı günümüzde Hematoloji kliniklerinin iş yükünü gittikçe arttırmaktadır. Hastalığın çıkış mekanizması tam olarak bilinmediği için tedavi sürecinde bu nedenle uzun sürmektedir. Vücudun en önemli lenfoid organlarından birisi olan dalak, İTP tedavisinin yetersiz kalması ve immün sistemin trombositleri yıkmaya devam etmesi nedeniyle vücuttan cerrahi yolla çıkarılmaktadır. Bu da kişinin sonraki yaşamında savunma sistemini olumsuz etkilemekte ve desteğe muhtaç bırakmaktadır. Bu nedenle İTP hastalığının ortaya çıkış sebeplerinin ve genetik temellerinin tam olarak ortaya çıkarılması, hedef tam olarak saptandığı için tedavi sürecini de mutlaka olumlu etkileyecektir. Bu konuda yapılan çalışmalar hastalığın ortaya çıkışı, seyri ve tedavi sürecini mutlaka olumlu etkileyecektir. Yapmış olduğumuz çalışma gibi hastalığın genetik temeli konusunda yapılan ve yapılacak olan çalışmalar hastalık patogenezinin açıklanmasına katkı sağlamaktadır. Hastalık otoimmün bir karakterde olduğu için T hücresi sinyal yollarındaki olumsuzlukların belirlenmesi ve bu olumsuzlukların düzeltilmesi yönündeki tedavi seçeneklerinin belirlenmesi açısından kıymetli veriler sağlamaktadır. Bu bağlamda İTP hastalığın genetik temelini irdelemek ve THR' nün en önemli komponentlerinden birisi olan CD3' ün gen polimorfizmlerinin hastalığın patogenezinine katkısını araştırmak için bu tez çalışması planlanmıştır.

T hücre sinyal yollarındaki aksaklıkların ortaya çıkartılması hastalığın önemli tedavi seçeneklerinden birisi olan intravenöz immünglobulinlerin etkileri konusunda da ilerlemelere katkı sağlayabilir. Yaptığımız literatür taramalarında İTP hastalığının genetik temeli ve çalıştığımız polimorfizmlerle ilgili fazla çalışma bulunamamıştır. Ancak literatürde CD247 genine ait diğer polimorfizmlerle ilgili birçok çalışma bulunmaktadır.

T hücrelerin antijenik yapıları tanıyabilmeleri için mutlaka hücre- hücre teması gerekmektedir. T hücreleri plazmada serbest dolaşan antijenleri tanıyamamaktadır. Antijen lenfositler tarafından tanındıktan sonra ilk sinyal iletimi olmaktadır. Bu sinyal immün yanıtın olması için mutlaka gerekmektedir. Patojenler ile karşılaşan doğal immünite ikinci sinyali başlatmaktadır. İkinci sinyal ise immün yanıtı oluşturacak olan lenfositlerin aktive olması için gerekmektedir. İkinci sinyal edinsel immünite mekanizmasının yalnızca patojenlere karşı ortaya çıkmasını sağlamakta ve zararsız

patojenlere karşı gereksiz cevabı engellemektedir. T hücrelerinin sinyal mekanizmalarında yaşanacak olası bozukluklar immün sistemde aksaklıklara neden olacaktır.

Genetik polimorfizm; bir toplulukta farklı allellere bağlı olarak, genetik açıdan iki ya da daha fazla fenotipin ortaya çıkması olarak tanımlanmaktadır. Popülasyon genetiği yönünden belli bir frekansa ihtiyaç varken, moleküler biyoloji yönünden frekans önemli olmayıp yalnızca bir ailede de olsa görülen varyant polimorfik olarak tanımlanmaktadır. Polimorfizmler türlerin yaşadıkları ortama uyumunu kolaylaştırarak evölüsyon sürecinde türün devamına büyük katkı sağlamaktadır. Ayrıca tür içerisinde genetik çeşitliliği de zenginleştirmektedir. Polimorfizmler kişilerin hastalığa yakalanma risklerinin, hastalığa verdiği cevabın ve ilaçlara karşı gözlenen yan etkilerin farklı olmasında etkili olmaktadır (Nussbaum, Mcinnes, Willard, 2015).

Genlerin yaklaşık % 97-98' lik bir kısmını kodlama yapmayan gen bölgeleri yani '*intron*' lardan oluşturmaktadır. mRNA ve protein kodlaması yapan çok küçük bir orana sahip bölgeler ise '*ekzon*' olarak tanımlanmaktadır. Birkaç yıl öncesine kadar yapılmış olan bilimsel çalışmalarda DNA' nın büyük bir kısmını meydana getiren intron denen bu bölgeleri '*junk DNA (önemsiz DNA)*' olarak tanımlanmaktadır. Oysa son birkaç yıl içinde yapılan çalışmalar bu bölgelerde de küçük RNA sentezlerinin yapıldığını ve bu bölgelerinde birçok yaşamsal biyolojik faaliyete katkı sağladığını göstermektedir. Bu bölgeler doğrudan protein ve mRNA kodlamasına katılmasa da;

- Hangi genin hangi genle, ya da hangi proteinin hangi proteinle birleştirileceği, nereye taşınacağı
- Hangi hücre ve dokunun hangi organda ne kadar ve ne zaman yapılacağı
- Büyüme ve gelişmenin nerede nasıl düzenleneceği
- Kök hücrelerin nerede hangi hücre, doku ve organlara dönüşeceği
- Hangi genin hangi koşullarda susturulacağı ya da daha önce sessiz kalıp fonksiyon göstermeyen hangi genin hangi koşullarda yeniden çalışmaya başlatılacağı
- Bir gen okunurken hangi bölümün okunup hangi bölümün okunmayacağı, ne zaman, nereden nereye atlanacağı

- Hücrelerin hangi koşullarda çoğaltılıp ya da hangi koşullarda öldürüleceği, ne zaman kanser geliştirileceği,
- Hücre çoğalma ve bölünmesi, kromozom yapısı olayları gibi birçok biyolojik yaşamsal faaliyete katkı sağlamaktadırlar (Ateş, 2016).

Bu fonksiyonlar açısından bakıldığında intronik polimorfizmlerinde hastalık patogeneğinde etkin olabilecekleri belirgin bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle polimorfizm hastalık ilişkilerini inceleyen birçok çalışmada intronik polimorfizmler dikkatle incelenmektedir. GWAS (Genom Çapında İlişki Çalışması-*Genome-wide Association Studies*) çalışmalarında da SNP'lerin çoğu kodlama yapmayan gen bölgelerinde şekillenmektedir. GWAS çalışmaları SNP'lerin yakın komşuluğundaki fonksiyonel genlere etki edebileceklerini göstermektedir (Ahonen vd., 2009; Degner vd., 2012; Trynka vd., 2013).

Ayrıca son dönemlerde farmakogenetik bilim dalı da önem kazanmaya başlamıştır. '**Farmakogenetik**', ilaca verilen yanıtın genetik yapıya göre bireyler arasında farklılık göstermesi ve buna bağlı olarak ilaç etkinliğinin değişmesini inceleyen bir bilim dalı olarak tanımlanmaktadır. Bireylerin ilaçlara olan duyarlılığı ve ilaçların yan etkilerin değerlendirilmesi, hastanın genotipine göre bireysel tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi ve yeni terapötik hedeflerin belirlenmesi farmakoneetik çalışma alanlarıdır. İlaçlar genetik polimorfizme göre üç şekilde etki etmektedir.

1. Genetik polimorfizme bağlı olarak ilaç metabolizma hızı değişmektedir. Polimorfizm ilaç metabolizmasında etkili bir enzim sentezinde görevli ise ilgili enzim sentezindeki aksamalar metabolizma hızını değiştirmektedir.
2. Polimorfizmler ilacın etki şeklini değiştirebilmektedir. Örneğin Glukoz-6-P dehidrojenaz eksikliği kişilerin oksidan ilaçlara karşı duyarlılık düzeyini değiştirmektedir.
3. Polimorfizmler ilgili enzimlerin ilaçla olan etkileşimini değiştirmektedir (Perçin., 2007).

T hücre fonksiyonlarının başlaması için THR'ünden gelecek olan sinyal esastır. Bu reseptörün gen yapısı ile ilgili farklılıklar sinyal ileti fonksiyonlarında değişikliklere neden olabilir. CD247 genine ait intronik polimorfizmlerin molekülün fonksiyonel

etkinliği üzerine etkisini gösteren bir çalışma kolorektal kanser için öngörülen bir antikor tedavisi ile ilişkili olarak ortaya konmuştur. Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada immün düzenleyici polimorfizmlerin, M701 adlı antikor aracılı sitotoksisiteye etkisi araştırılmıştır. CD247 geninin intronik rs294955 polimorfizmini homozigot taşıyan bireylerde düşük sitotoksik kapasite bildirilmiştir (Zhang vd., 2018).

Bu tez çalışmasında CD247 geninin intronik varyantları olan rs858554 ve rs704848 polimorfizmleri incelenmiştir. Literatürde CD247 gen polimorfizmlerinin araştırıldığı makaleler bulunmaktadır. Bu makaleler içerisinde İTP gibi otoimmün hastalıkların araştırıldığı yayınlar da mevcuttur. Ancak İTP ve CD247 ilişkisini araştıran yayına rastlanmamıştır. Bu tez çalışması bu özelliği ile zgn bir araştırma alanına ışık tutmaktadır (rs858554, 2018, rs704848, 2018).

CD247 polimorfizmlerinin romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, sistemik skleroz gibi otoimmün temelli hastalıklarda çalışıldığı görülmektedir. Farklı hastalıklardan oluşturulan gruplar için yapılan çalışmalar da mevcuttur.

Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada romatoid artrit hastalarında CD247 gen polimorfizmleri 612 hasta ve 848 kontrolde çalışılmıştır. Bu çalışmada irdelenen polimorfizmlerden birisi de bu tez çalışmasında araştırılan rs858554 polimorfizmidir. Araştırmacılar bu polimorfizmle romatoid artrit hastalığı arasında anlamlı ilişki bildirilmiştir (Li vd., 2016).

Bir başka otoimmün hastalık olan *Systemic lupus erythematosus* (SLE) hastalığı ile ilgili yapılan çok merkezli çalışmada araştırılan CD247 polimorfizmleri arasında rs858554 ve rs704848 polimorfizmleri de bulunmaktadır. Bu çalışmada 8922 hasta, 8077 kontrol değerlendirildiği bildirilmiştir. Çalışmada değerlendirilen popülasyon çeşitli etnik kökenlerden oluştuğu için sonuçlar etnik kökenlere göre yapılmıştır. rs858554 polimorfizmi özellikle Asya kökenli SLE hastalarında kuvvetli bir *p* değerı vererek anlamlı ilişki göstermiştir. Ancak Avrupa kökenli SLE hastalarında böyle bir ilişki olmadığı bildirilmiştir (Martins vd., 2015). Bu bilgi toplumsal olarak paylaşılan genetik yükün hastalıklar ile ilişkisinin ortaya konmasının önemini de vurgulamaktadır.

Hristova ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Sistemik lupus eritematozus (SLE) hastalığı ile CD247 genine ait rs1052230 ve rs1052231 polimorfizmlerinin ilişkisi

araştırılmıştır. Çalışma toplam 52 hasta ve 95 sağlıklı kontrol grubu ile yapılmış ve sadece etnik kökeni Bulgar olan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Yapılan TaqMan genotiplendirme çalışmasında 837 C>G rs1052230, 844 A>T rs1052231 olarak tespit edilmiştir ve bu genotiplere göre her iki polimorfizmde hastalıkla ilişkisi tespit edilememiştir. Ancak 837GG aleli bazı hematolojik hastalıklar ve 837AA aleli ise ANA(Anti Nükleer Antikor) ve bazı immünolojik hastalıklarla bağlantılı bulunmuştur. Çalışmamız açısından burada dikkat çeken nokta CD247 genine ait polimorfizmlerinin etnik orijine bağlı olarak değişiklik gösterebileceğidir. Taradığımız polimorfizmlerin İTP ile doğrudan ilişkisinin tespit edilememesinde etnik kökenin etkili olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki etnik ve bölgesel farklılıklar polimorfizm hastalık ilişkisi açısından önem arz etmektedir (Hristova vd., 2017).

Holmberg ve arkadaşları, Tip 1 Diyabet mellitus ve otoimmün tiroid hastalıklarına sahip ailelerde yaptıkları çalışmada CD247 gen polimorfizmleri ile hastalık arasında ilişki bildirmişlerdir (Holmberg, Ruikk, Lindgren, Eliasson ve Mayans, 2016).

Yapılan çalışmalar CD247 gen polimorfizmlerinin hastalık patogenezi üzerindeki etkisinin değişken olduğunu ortaya koymaktadır. Yapmış olduğumuz bu çalışmada hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının sayıları görece oldukça düşüktür. Bunun başlıca nedeni katılımda gönüllülük esasına dayalı bir grup oluşturulmasıdır. Diğer bir neden ise Hematoloji polikliniğinde takip edilen İTP' li hasta sayısının çok yüksek olmamasıdır. Gruplar içerisindeki sayının az olması istatistiksel değerlendirmelerde yetersiz kalmış olabilir. İTP hastalığı daha çok çocuklarda görülen otoimmün bir hastalıktır. Çalışmamız sadece 18 yaşından büyük hasta ve sağlıklı kontrollerle yapıldığı için bu durumda ilgili polimorfizmlerin hastalığın patogeneze katkı sağlamadığını düşünmemizde etkili olduğu göz önüne alınabilir. Ayrıca hastalık uzun süre takip ve tedavi gerektirdiği için çalışma süremizin kısıtlı olması da sonuçlarımız açısından başka bir olumsuzluk olarak değerlendirilebilir.

İTP'nin patogenezi açıklamaya yönelik özellikle T hücre sinyal yollarının katkısı açısından genetik ve fonksiyonel çalışmalar ileriye dönük olarak planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., (2nd ed.). (2004). *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*. Philadelphia, W.B Saunders Co.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., (3rd ed.). (2007). *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia, W.B Saunders Co.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., (3rd ed.). (2007). Hümorale immün yanıtlar: B lenfosit aktivasyonu ve antikor üretimi, Çamcıoğlu, Y., Deniz, G., (eds), *Temel İmmünoloji: İmmün Sistemin İşlev Ve Bozuklukları*. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi
- Ahonen, T., Saltevo, J., Laakso, M., Kautiainen, H., Kumpusalo, E. and Vanhala, M., (2009). Gender differences relating to metabolic syndrome and proinflammation in Finnish subjects with elevated blood pressure. *Mediators Inflammation Journal*, 1(6). DOI:10.1155/2009/959281
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. Raff, M., Roberts, K., ve Walter, P., (5th ed.). (2008). *Molecular Biology of the Cell*, , *Garland Science*, New York, ISBN 978-0-8153-4105-5
- Ateş, K. (2016). *Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6(11), 43-49.
- Battaloğlu, E., Başak, A. N., (2010). Kompleks hastalık genetiği: güncel kavramlar ve nörolojik hastalıkların tanısında kullanılan genomik yöntemler. *Klinik Gelişim*. 1(23), 128-133.
- Blanchette, M., Freedman, J., (1998). The history of idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Transfusion Science*. 19, 231-236.
- Bustin, S. A., (2000). Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25, 169-93.
- Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J., Sklar, P., Ardlie, K., Patil, N., et al. (1999). Characterization of single nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *National Genetics*, 22(3), 231-238.

CD247. (2007). *Wikipedia, The Free Encyclopedia* içinde. 02 Şubat 2018 tarihinde <https://en.wikipedia.org/wiki/CD247> adresinden erişildi.

Chaplin, B. E., Rasmussen, R. P., Bernard, P. S., Wittwer, C. T., (1999). Light Cycler TM hybridization probes the most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection. *Biochemica. 1*, 5-8.

Degner, J. F., Pai, A. A., Pique-Regi, R., Veyrieras, J. B., Gaffney, D. J., Pickrell, J. K., De Leon, S., Michelini, K., Lewellen, N., Crawford, G. E., et al. (2012). DNase I sensitivity QTLs are a major determinant of human expression variation. *Nature*, 482, 390–394.

Dönbak, L. (2002). The short tandem repeat loci in forensic DNA analysis. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Science*, 22(2), 233-238.

E. Ferda, Perçin., (2007). Farmakogenetik- Hastalık ve Gen Tedavisi, , *Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi*, 5, 26-28.

Holmberg, D., Ruikka, K., Lindgren, P., Eliasson, M., Mayans, S., (2016). Association of CD247 (CD3ζ) gene polymorphisms with T1D and AITD in the population of northern Sweden, *BMC Medical Genetic*, 17, 70.

Hristova, M., Kamenarska, Z., Dzhebir, G., Kaneva, R., Vinkov, A., Mitev, V., Dourmishev, L., (2017). The Role of CD247 Polymorphisms in Bulgarian Patients with Systemic Lupus Erythematosus, *Acta Dermatovenerol Croatica*, 4(6), 267-270.

Gut, M., Leutenegger, C. M., Huder, J. B., Pedersen, N. C., Lutz, H., (1999). One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *Journal of Virol Methods*; 77, 37-46.

Grainger J. D., Bolton- Maggs, P. H. B., Godeau, B., et al. (2010). Diagnosis and management of chronic ITP: comments from an ICIS expert group. *Ann Hematology* 89, 11-17.

İTP Tanı ve Tedavi Kılavuzu. Türk Hematoloji Derneği, (2011). 1, 23

Jr Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J., (6th ed.). (2005). Antigen recognition by B-cell and T-cell receptors. *Garland Science*, 103-134. NewYork, USA.

Kılıçturgay, K. (3rd ed.). (1994). *İmmünolojiye Giriş* Bursa: Güneş ve Nobel Tıp Kitabevleri

- Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8, 257–260.
- Kortunay, S. (2005). The pharmacogenetics of central nervous system drugs. *Türkiye Klinikleri Journal of International Medicine Science*; 1(44), 76-80.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction, *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 95-125.
- Martins, M., Williams, A. H., Comeau, M., Marion, M., Ziegler, J. T., Freedman, B. I., Merrill, J. T., Glenn, S. B., Kelly, J. A., Sivils, K. M., James, J. A., Guthridge, J. M., Alarcon-Riquelme, M. E., Bae, S. C., Kim, J. H., Kim, D., Anaya, J. M., Boackle, S. A., Criswell, L. A., Kimberly, R. P., Alarcon, G. S., Brown, E. E., Vila, L. M., Petri, M. A., Ramsey-Goldman, R., Niewold, T. B., Tsao, B. P., Gilkeson, G. S., Kamen, D. L., Jacob, C. O., Stevens, A. M., Gaffney, P. M., Harley, J. B., Langefeld, C. D., Fesel, C., (2015). Genetic association of CD247 (CD3 ζ) with SLE in a large-scale multiethnic study. *Genes Immunity Nature*, doi: 10.1038/gene.2014.73.
- Mc Millan, R., Luiken, G. A., Levy, R., Yelenosky, R., Longmire, R. L., (1978). Antibody against megakaryocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura. *JAMA*; 239, 2460-2462, DOI: 10. 172/JCII13060.
- Neunert, C., Lim, W., Crowther, M., Cohen, A., Solberg, L Jr., Crowther, M. A., (2011). The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood Journal*, DOI:10.1182/blood-2010-08-302984.
- Peng Li, Xiu Wang, Meng-Qin Zhao, Lian-Ju Li, Chao Zhang, Bao-Zhu Li, Juan Liu, Xiao-Ke Yang, Rui-Xue Leng, Yin-Guang Fan, Hai-Feng Pan, Dong-Qing Ye, (2016). TCR-CD3 ζ gene polymorphisms and expression profile in rheumatoid arthritis, *Journal of Autoimmunity*, 49(7).
- Robert, L. Nussbaum, Roderick, R. McInnes, Huntington, F. Willard., (2015). *Thompson & Thompson Genetics in Medicine* 9(175), ISBN: 9781416030805, İstanbul: Güneş Kitabevi
- Rabellino, E. M., Levene, R. B., Leung, L. L., Nachman, R. L., (1981). Human megakaryocytes II. Expression of platelet proteins in early marrow megakaryocytes. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 15, 88-100.

Rodeghiero, F., Stasi, R., Gernsheimer, T., Michel, M., Provan, D., et al. (2009). Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood Journal*; 113, 2386-2393, doi: 10. 1111/j.1365- 2141. 2009. 07995. X.

Rodeghiero, F., Tosetto, A., Abshire, T., Arnold, D., Collier, B., James, P., et al. (2010). ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*; 9, 2063-2065.

Roitt, .I, Brostoff, J., (6th ed.). (2001), *Antibodies. In Immunology*, 65-85. Spain

rs704848. (2018). *National Center For Biotechnology Information/SNP* içinde 09 Nisan 2018 tarihinde <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs704848> adresinden erişildi.

rs858554. (2018). *National Center For Biotechnology Information/SNP* içinde 09 Nisan 2018 tarihinde <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs858554> adresinden erişildi.

Semple, J. W., (2002). Immune pathophysiology of autoimmune thrombocytopenic purpura. *Blood Journal Reviev*, 16, 9-12.

Snell, GD. (1980). The Nobel Lectures in Immunology. Lecture fort he Nobel Price for Physiology or Medicine, Studies in histocompatibility. *Scand Jornel Immunology*, 36, 513-526.

Stasi, R., Newland, A C., (2011). ITP: a historical perspective. *Journal of Haematology*. 153, 437- 450, doi: 10. 1111/j.1365-2141.2010.08562.x.

Trowsdale, J. (2011). The MHC, disease and selection. *Immunol Lecturest*, 138, 1-8.

Trynka, G., Sandor, C., Han, B., Xu, H., Stranger, B. E., Liu, X. S., and Raychaudhuri S., (2013). Chromatin marks identify criticalcell types for fine mapping complex trait variants. *Nature Genetics*, 45. 124–130.

Tulunay, M. (2006). Potential molecular targets in future sepsis therapy. *Türkiye Klinikleri Journal of Surgery and Medicine Science*, 32, 49-64.

Zhang, C M., Yu, L. Y., Lv, J. F., Gong, L., Zhou, H. H., Chen, X. P., Fan, L., (2018). Effects of immuno-related gene polymorphisms on a bispecific antibody targeting colorectal cancer cel, *Per Medicina*, DOI: 10.2217.

Zufferey, A., Kapur, R., ve Semple, J. W., (2017). Pathogenesis and Therapeutic Mechanisms in Immune Thrombocytopenia, *Jornel of. Clinice. Medicine*. 6(2), 16; Canada, DOI:10.3390/jcm6020016.

ÖZGEÇMİŞ

Ad:	İbrahim
Soyad:	KUTLUBAY
Doğum Yeri:	Tufanbeyli/ ADANA
Doğum Tarihi:	26.10.1980
Mesleği	Biyolog/ Trakya Üniversitesi Hastanesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı
Yabancı Dil:	İngilizce
E-Posta Adresi	ibrahimkutlubay@trakya.edu.tr
Tarih	Eğitim
2004	Trakya Üniversitesi S.H.M.Y.O. Tıbbi Laboratuvar
2008	Anadolu Üniversitesi İ.İ.B.F. Kamu Yönetimi
2015	T.Ü.Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (Üçüncülükle bitirdi)
2018	T.Ü.Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Aldığı Eğitimler ve Sertifikalar	
2006	Deney Hayvanlarında Temel Uygulamalar Kursu
2011	Hayvan Hücre Kültürü Kursu
2017	Uygulamalı Hücre Kültürü ve Kök Hücre İş. Teknikleri Kursu/GENKÖK
2017	Uyg. Radyofarmasi Kursu 9-12 Kasım 2017 TUBİTAK 2229 / Eğitimci
Ödüller	
2010	36.Ulusal Fizyoloji Kongresi Sözlü Sunum İkincilik Ödülü (Egzersinin Natriüretik Peptit Yanıtı ve Adiponektin Üzerine etkileri) Gülnur Öztürk, Selma Arzu Vardar,Levent Öztürk,Hakan Kunduracılar, İbrahim Kutlubay
Yazılan Ulusal Kitaplar veya Kitaplarda Bölümler	
2015	Deney Hayvanlarında Moleküler Görüntüleme: Nükleer Tıp ve Optik Görüntüleme (10.bölüm-Hücre İşaretleme Yöntemleri ve İşaretleme Hücreleri ile Hayvan Modellerinde Moleküler Görüntüleme)ISBN: 9786053351481 (Mayıs 2015)
2017	Nükleer Tıp Görüntüleme Teknikleri: Soru Çözümlü Ders Kitabı,Glomerüler Filtrasyon Hızı (GFR) ve Radyonüklidler Kullanılarak GFR Ölçülmesi (7.Bölüm),Lökosit İşaretleme Prosedürü (99mTc HMPAO ile) (10.Bölüm) ISBN:9786053353133 (Mayıs 2017)

ETİK KURUL ONAY FORMU

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2016/231	
	PROTOKOL ADI	C247 Genine Ait rs 858554 ve rs70488 No.lu Polimorfizmlerin İmmun Trombositopenik Purpura Hastalığı ile İlişkisi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI UNVANI/ ADI	Yrd. Doç. Dr. Jülide TOZKIR	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 17/08	Tarih: 02.11.2016	
	Üniversitemiz Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Öğretim Üyesi Jülide TOZKIR'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen çalışmanın araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekeceği amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödendiği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun ey birliği ile karar verilmiştir.		
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar-Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi			

Unvan/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	E H	E H	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Başkan Yardımcısı	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E H	E H	
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ Üye	Tıbbi Farmakoloji	T.Ü.T.F. Tıbbi Farmakoloji A.D	E	E H	E H	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. Biyoistatistik A.D.	K	E H	E H	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Hasan UMIT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Selma Arzu VARDAR Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Salim DÖNMEZ Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Muzaffer ESKİOÇAK Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E H	E H	
Yrd. Doç. Dr. Vedat UĞUREL Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E H	E H	
Yrd. Doç. Dr. Ruzul KOSE ÇINAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ ve Has. A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Şevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Berkan DEMİRAL Üye		T.Ü. İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi	E	E H	E H	
Avukat Baki KURNAZ Üye		T.Ü. Rektörlüğü	E	E H	E H	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Ahmet TEZEL
Dekan a.
Dekan Yard.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ HASTAOLUR FORMU

Bir araştırma projesine davet edilmektesiniz. Bu araştırmanın yürütülmesi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun **02/11/2016** tarih ve **17/08** sayılı kararı 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 **TÜBAP(Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları Birimi)** 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.

- **Araştırmanın bilimsel adı:** CD247 Genine Ait rs858554 ve rs704848 Polimorfizmlerinin İmmün Trombositopenik Purpura Hastalığı İle İlişkisi'
- **Araştırmanın anlaşılabilir basit adı:** İmmün trombositopenik Purpuralı Hastalarda CD247 isimli özel bir genin araştırılması
- **Sorumlu Araştırmacının adı ve görev yeri:** Jülide TOZKIR, Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma Uygulama Merkezi Doku Tiplendirme Laboratuvarı
- **Araştırmanın amacı:** İmmün trombositopenik Purpura (İTP): İTP vücudumuzdaki kanın pıhtılaşmasını sağlayan trombositlerin sayısının azalmasıyla oluşan iltihabi bir hastalıktır. Trombosit sayısındaki düşmenin seviyesine göre vücutta kanamalar yapılabilir.

Cd247 vücudumuzda iltihabi durumları düzenlemekle görevli hücreler üzerinde bulunan bir yapıdır. Bu yapının genindeki farklılıkların hastalık ile ilişkisi olup olmadığı araştırılacaktır.

- **Araştırmanın niteliği (klinik, laboratuvar, epidemiyolojik, tez çalışması vb.):** Laboratuvar çalışması.
- **Araştırmanın başlama tarihi ve öngörülen süresi:** 15/10/2016, Tahmini öngörülen süre 1 yıl
- **Araştırmaya katılması beklenen gönüllü sayısı:** 96 İTP Hastası, 96 Normal sağlıklı olgunun alınması planlandı.
- **Araştırma sırasında uygulanacak olan invaziv yöntemler dahil olmak üzere gönüllüye uygulanacak yöntem, girişim ve tedavilerin tümü:** Trakya Üniversitesi Hematoloji Polikliniği ve servisinde tedavi gören İTP hastalarından ve sağlıklı kontrol olgularından rutin kontrolleriniz için yapılan kan alımı sırasında bu çalışma için kan sayımı (hemogram) tüpüne bir tüp fazladan kan alınacaktır. Başka bir kan alımı yapılmayacaktır.
- **Araştırmanın deneysel kısımları:** Sizin gibi hematoloji polikliniğine gelmiş olan İTP hastası ya da hematoloji polikliniğine gelen normal sağlıklı kontrol olgularından laboratuvarda alınan kanlarda CD247 isimli gen araştırılacaktır. Planlanan hasta sayısına ulaşıldıktan sonra çıkan bu sonuçlar bir istatistik yöntem ile değerlendirilecektir.
- **Farklı uygulama ve girişimler için gönüllülerin araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığı:** Farklı uygulama ve girişimler için gönüllülerin araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığı yoktur.
- **Katılımcının araştırmaya dahil edilme nedeni:** Sizin gibi İTP hastaları veya sağlıklı gönüllüler çalışmaya alınacak.
- **Araştırmadan doğrudan gönüllü için beklenen yarar::** İTP hastalığında steroid, intravenöz immünglobulin G, splenektomi, vinkristin, ritüksimab gibi birtakım tedaviler verilse de bazı hastalar tüm bu tedavilere dirençli olabilmektedir. İTP hastalığı iltihabi bir hastalık olmasına rağmen kesin sebebi henüz tam olarak bilinmemektedir. Eğer hastalığın sebebine yönelik yeni bilgiler edinilebilirse bu yeni bilgilerin ışığında tedavide etkili yeni ilaçlar keşfedilebilir. Bu açıdan bilime önemli bir katkıda bulunmuş olacaksınız. Araştırmamızın doğrudan size veya yakınlarınıza yararı bulunmamaktadır.
- **Gönüllünün sorumlulukları:** Çalışmada hiç bir sorumluluğunuz bulunmamaktadır. İstedikleriniz anda ve herhangi bir gerekçe göstermeden çalışmadan ayrılabilirsiniz.

- **Gönüllünün (araştırma hamilelerde veya lohusalarda yapılacaksa ise embriyo, fetüs veya süt çocuklarının da) maruz kalabilecekleri riskler veya rahatsızlıklar:** Çalışmamızda hamileler, lohusalar, ve çocuklar yer almayacaktır.
- **Risklere karşı alınan önlemler:**Sizin gibi polikliniğe gelen İTP hastası yada sağlıklı gönüllülerden çalışmamız için alınacak kan, normal kontrolleriniz için yapılan kan alımı sırasında, deneyimli personel tarafından gerçekleştirileceğinden sağlığını olumsuz etkileyecek herhangi bir risk taşımamaktadır.
- **Gönüllüye alternatif olarak uygulanabilecek olan diğer yöntemler ve bunların olası yarar ve zararları:**Sizlere kontrol kan tahlili için verdiğiniz kan alma haricinde herhangi bir işlem yapılmayacaktır.
- **Araştırmaya bağlı olarak bir zarar oluştuğunda verilecek tazminat ve sağlanacak tedaviler:** Çalışmamız sizin gibi polikliniğe gelen İTP hastası yada sağlıklı gönüllülerden kontrol amacıyla yapılan kan alımı sırasında fazladan bir tüp alınacağından çalışmada sağlığını olumsuz etkileyecek herhangi bir risk yoktur. Bu nedenle sigorta yapılmayacak ve tazminat karşılanmayacaktır.
- **Gönüllülere yapılacak ulaşım, yemek gibi masraflara ilişkin ödemeler:** Gönüllülere her ne sebeple olursa olsun herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.
- **Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler:** Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek herhangi bir durum yoktur ama gönüllüler istedikleri zaman herhangi bir gerekçe göstermeden çalışmadan ayrılabilirler.
- **Araştırma sonunda gönüllülere bilgi verilecek mi?** Eğer isterlerse gönüllülere araştırma sonrasında bilgi verilecektir.
- **Gönüllülerin araştırma hakkında, kendileri hakkında ya da araştırmayla ilgili herhangi bir beklenmedik olay hakkında daha fazla bilgi edinebilmesi için temasa geçebileceği kişi ve kendisine günün 24 saatinde erişebileceği telefon numarası:** Jülide TOZKIR: 05333678225
- **Gönüllülerden elde edilecek olan biyolojik materyallerin hangi amaçlarla kullanılacağı:** Gönüllülerden elde edilecek biyolojik materyaller İTP hastalığının sebeplerini,CD247 isimli gen ile ilişkisini daha iyi anlamak ve ileride bu hastalığın tedavisinde kullanılabilecek yeni ilaçların geliştirilebilmesi için ipuçları araştırmak amacıyla kullanılacaktır.
- **Gönüllülerden elde edilecek biyolojik materyaller üzerinde genetik araştırma yapılabilmesi için onay:**

- “CD247 Genine Ait rs858554 ve rs704848 Polimorfizmlerinin İmmün Trombositopenik Purpura Hastalığı İle İlişkisi” **araştırması kapsamında alınan biyolojik örneklerimin (kan, idrar, vb...);**
- **Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.**
- **İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.**
- **Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.**

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 olduğum 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 çıkarabileceğini biliyorum.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun gerekli gördüğünde, gizliliğimin korunması ilkesine uygun olarak, araştırma konusuyla ilişkili orijinal tıbbi kayıtlarıma doğrudan erişimde bulunabileceğini biliyorum

İlgili yasal düzenlemeler gereğince kimliğimi ortaya çıkaracak kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanmayacağı; araştırma sonuçlarının bilimsel toplantılarda sunulabileceği ya da yayınlanabileceği, ancak, bu tür durumlarda kimliğimin kesin olarak gizli tutulacağı bana açıklandı.

Araştırma konusuyla ilgili olarak, çalışmaya devam etme isteğimi etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde bana ya da yasal temsilcime zamanında bilgilendirme yapılacağı bana açıklandı.

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

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

Yukarıda konusu belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı.

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

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu'nun tam imzalı bir kopyasını aldım.

Gönüllünün; (El yazısı ile)

Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya faks numarası):

.....
.....

Tarih:

Açıklamaları yapan araştırmacının

Unvanı, Adı- Soyadı: (El yazısı ile)

Görev yaptığı bölüm:

İmzası:

Tarih: