

71240



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

**TALASEMİ MAJORLÜ HASTALARIN PERİFERİK KAN
ERİTROBLASTLARINDA FAS (CD95) RESEPTÖRÜ
YOĞUNLUĞU**

71240/1-1

UZMANLIK TEZİ

Dr. O. Alphan KÜPESİZ

Tez Danışmanı : Prof.Dr. M. Akif YEŞİLİPEK

**“Bu tez, Akdeniz Üniversitesi araştırma fonu tarafından
96.03.0103.02 proje numarası ile desteklenmiştir”**

“Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir”

Antalya, 1999

**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
Merkez Kütüphanesi**

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde ve tezimde değerli katkılarından dolayı, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Olcay YEĞİN ve tez danışmanım Doç. Dr. M Akif YEŞİLİPEK başta olmak üzere tüm öğretim üyelerine, ayrıca tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Levent Ündar ve Tıbbi Biyolog Mesut CoŐkun'a teşekkür ederim.

Dr. O. Alphan Küpesiz

Antalya, 1999

İçindekiler

	<u>Sayfa No:</u>
Giriş ve Amaç	1 - 2
Genel Bilgiler	3 - 37
Olgular ve Yöntem	38 - 40
İstatistik	41
Sonuçlar	42 - 44
Tartışma	45 - 50
Özet	51
Sonuçlar	52 - 53
Kaynakça	54 - 60

GİRİŞ VE AMAÇ

Hemoglobin molekülünü oluşturan globin zincirlerinden birinin veya daha fazlasının yapılamaması veya az miktarda yapılması ile karakterize olan ve otozomal resesif geçiş gösteren bir grup hastalığa talasemi adı verilmektedir (1). Ağır talasemi formlarındaki anemi ve aneminin transfüzyonlarla tedavisiyle gelişen komplikasyonlar morbidite ve mortalite nedeni olmaktadır (2). Kemik iliğinde inefektif eritropoez ve eritrositlerin periferde hemolizi anemiye neden olur (2). Kemik iliğindeki bu artmış hemolizin nedeni tam aydınlatılamamıştır. Beta talasemili hastaların eritroid prekürsörlerinde α globin zincir depolanması, sitoplazmik vakuolizasyon ve nükleer membran anormallikleri gibi morfolojik ipuçları gösterilmiştir (4).

Apopitozis fizyolojik ve selektif olarak hücrenin intihar etme şeklidir. Apopitozisin hücre fizyolojisinde ve hastalıkların patogenezindeki etkin rolü tanımlanmıştır (5). Yuan ve arkadaşları talasemi majorlü hastaların kemik iliklerinde eritroblastlarda apopitozisin artmış olduğunu saptamışlardır (3). İn vitro eritroid hücre sistemlerinde ve normal eritropoezis sırasında da eritroid progenitör hücrelerde apopitozis gözlenmiştir (6,7).

Fas (CD95;APO-1); "Ölüm reseptörleri" olarak bilinen ailenin en önemli üyesidir (8). Fas reseptörünün Fas Ligand ile uyarılması sonucu hücrede apopitozis işlemi başlar. Dalak, lenf nodları, kemik iliği, kalp, akciğer, böbrek ve overler Fas eksprese ederler (9). Hematopoetik kök hücrelerde de Fas ekspresyonunu gösteren çalışmalar vardır. Hematopoetik hücrelerde Fas'ın fonksiyonu ve ekspresyonu doğrudan proliferasyon oranıyla değişmektedir. Bu da hematopoetik homeostazisin regülasyonunda Fas/FasL ilişkisinin potansiyel rolünü düşündürmektedir (10).

Eritroid progenitörlerin aktivitesinin kontrolünü araştıran bir çok çalışma vardır. Talasemideki inefektif eritropoez ve artmış hemolizin fizyopatolojisinde halen araştırma konusudur. Talasemi majorlü hastalarda eritroblastlarda Fas ekspresyonunu araştıran bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Bu çalışmada talasemi majorlü hastalarda periferik kan eritroblastları ve sağlıklı erişkinlerin kemik iliğindeki eritroblastların Fas ekspresyonuna bakılarak;

- a. Talasemi majorlü hastaların eritroblastlarında Fas ekspresyonu düzeyi
- b. Hastalardaki Fas ekspresyonunun sağlıklı erişkinlerle karşılaştırılması amaçlandı.

GENEL BİLGİLER

Hematopoezis

İnsan fetüsünde hematopoetik regülasyon erişkindekinden belirgin olarak farklıdır. Hematopoezisin gelişimi üç anatomik evrede olmaktadır. Bunlar mezoblastik, hepatik ve myeloid evrelerdir. Mezoblastik hematopoezis ekstraembriyonik yapılarda prensip olarak vitellus kesesinde (yolk sac) olmaktadır. Başlama zamanı gestasyonun 16- 19. günlerine karşılık gelir. Yaklaşık olarak gestasyonun 6. haftasında hematopoezisin ekstraembriyonik alanlardaki aktivitesi azalır ve hepatik hematopoezis aktif hale gelir. 10-12. haftalarda mezoblastik hematopoezis biter. Bu dönemde kemik iliğinde düşük düzeyde hematopoezis vardır. Karaciğer gebeliğin son trimesterine kadar predominant hematopoetik organ olarak devam eder (Şekil-1) (11).

Hematopoetik anatomik alanın yolk sac (vitellus kesesi), karaciğer ve kemik iliğine sırasıyla transferi kolaylıkla anlaşılır şekilde olmamaktadır. Her organda oldukça farklı hematopoetik hücre popülasyonu vardır. Anatomik alanlarda ki bu hematopoetik fonksiyon değişiminin mekanizması henüz anlaşılammıştır. Erişkin çağda hematopoezis bazı kemiklerde devam etmektedir. Kemik iliğinin bu görevi, normal koşullarda yaşamın sonuna kadar devam eder. Ancak myelofibrozis ve talasemi sendromlarının bazılarında kan yapımı kemik iliği dışında da (karaciğer ve dalak) gerçekleşebilir. Bu duruma ekstramedüller hematopoezis denir (11).

Eritropoezis:

Eritrosit yapımı için amino asitlere, lipitlere, demire, spesifik vitaminlere ve eser elementlere gereksinim duyulur. Eritrosit üretimi düzeyi eritropoetin hormonu tarafından kontrol altında tutulur. Eritropoetin (EPO) 30-39 kD ağırlığında glikoprotein olup eritroid prekürsörlerin yüzeyindeki spesifik

reseptörlere yapışarak matür eritrositlere farklılaşmasını ve klonal matürasyonunu uyararak etki gösterir. Fetüste eritropoetin karaciğerdeki monosit ve makrofajlar tarafından üretilir. Postnatal dönemde ise hemen hemen tümü böbreklerdeki peritübüler hücreler tarafından üretilir. EPO üretiminin karaciğerden böbreğe ardışık geçişinin regülasyonu halen bilinmemektedir. Kemik iliği hücrelerinden oluşan doku kültürü çalışmaları eritropoetin regüle edici rolünün anlaşılmasına yardımcı olmuştur (12).

Oksihemoglobin düzeyi ve dokuların oksijenizasyon oranı eritropoezis yapımını uyararak ana faktörlerdir. EPO etkisini eritroid progenitör hücreler ve eritroblastların yüzeyindeki reseptörler aracılığıyla gösterir (13). 3 yaşından büyük çocuklar ve erişkinlerde eritroid prekürsör ve eritroblast havuzu kemik iliği hücre popülasyonunun yaklaşık 1/3'nü oluşturur. Proeritroblastlar en erken tanımlanabilen formdur. Bu hücreler bölünerek matür formlara dönüşür ve hemoglobin birikimini yaparlar. Ortalama her eritroblast 8 retikülosite dönüşür. Bu dönüşümde kendini yenileme özelliği sınırlıdır. Total ilik proeritroblast miktarı ve günlük retikülosit üretiminin ölçümleriyle her gün retikülosit havuzunun %10'unu progenitör kompartmanın aktivitesiyle kendini yenilemektedir. İnsanlarda en primitif eritroid progenitör hücre BFU-E (burst forming unit, erythroid) dir. Bu hücrenin EPO, interlökin-3 ve GM-CSF'e yanıt verme özelliği vardır. BFU-E birkaç kez bölünerek CFU-E (colony forming cell, erythroid) popülasyonunu oluşturur. CFU-E popülasyonu en büyük matür eritroblast ve retikülosit oluşturan proeritroblast kolonisini oluşturur. Tüm proeritroblastlar sadece EPO varlığında farklılaşabilirler. Matür BFU-E ve CFU-E hücrelerinin membranlarında CD34, CD33 ve HLA-DR bulunmaktadır (12). Şekil 1'de eritropoezin şeması gösterilmiştir.

Hemoglobin:

Hemoglobin demir içeren hem grupları ve protein parçasından (globin) oluşan kompleks bir proteindir. Hem ve globin arasındaki dinamik ilişki hemoglobinin oksijeni reversibl taşıma özelliği verir. Hemoglobin molekülü iki ayrı polipeptid zincirinden oluşan tetramerdir. Her zincirde bir hem grubu vardır.

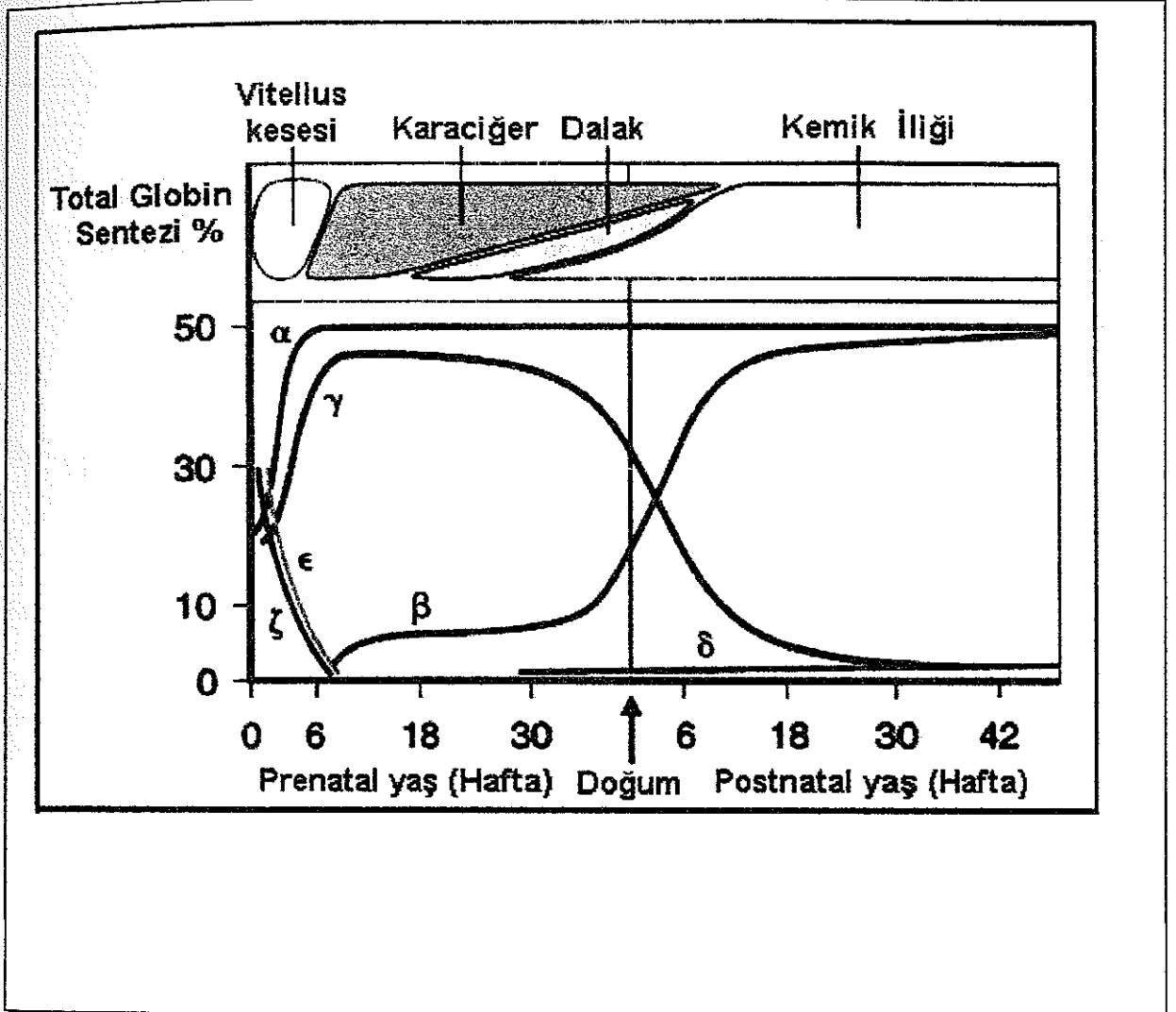
Farklı hemoglobin polipeptid zincirleri kimyasal olarak değişik tiplerdedir. Örneğin normal erişkinlerin major hemoglobini (Hb A₁) alfa ve beta polipeptid zincirlerinden oluşur. Hb A₁ dolayısıyla α₂β₂ olarak söylenebilir. α ve β zincirlerinin herbiri farklı sayıda ve dizilimde aminoasit içerirler. Bunların sentezleri değişik genler tarafından kontrol edilir (14).

Embriyo, fetüs, çocuk ve erişkinlerin eritrositleri içinde normalde 6 farklı hemoglobin saptanır. Embriyonik hemoglobinler Gower-1, Gower-2 ve Portland; fetal hemoglobin Hb F ve erişkin hemoglobinleri Hb A₁ ve Hb A₂ dir. Hemoglobinlerin elektroforetik mobiliteleri kimyasal yapılarına göre değişiklik göstermektedir.

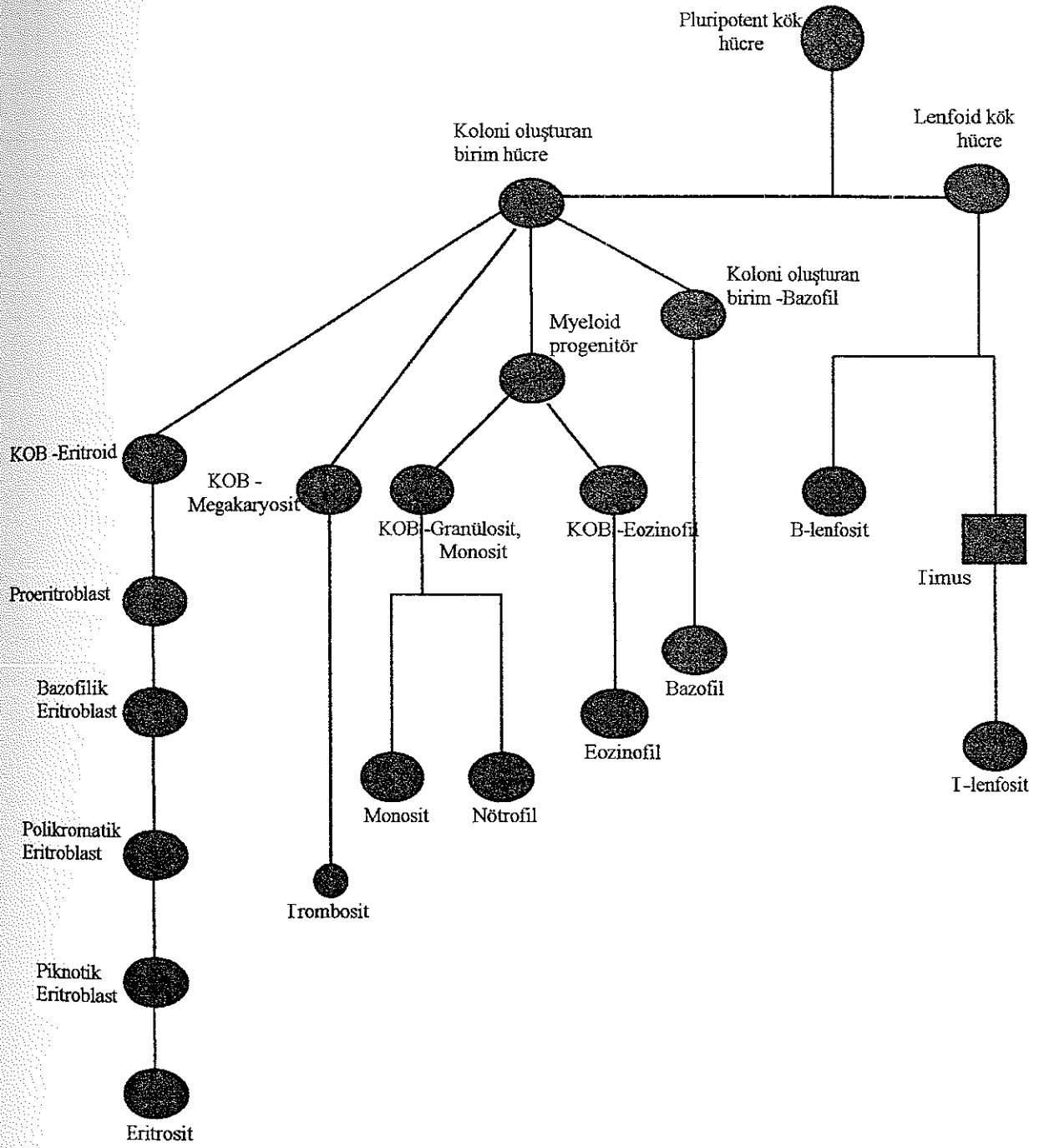
α polipeptid zincirlerinin genleri 16. kromozomda lokalizedir. β, γ ve δ genleri 11. kromozom üzerindedir. Allel çiftleri 16. kromozom üzerinde lokalizedir ve α zincir yapısı için genetik enformasyon sağlar (14).

Embriyonik hemoglobinler: Erken insan embriyosunun kanı iki yavaş göç eden hemoglobin içerir. Gower-1 ve Gower-2 , Hb Portland; Hb F mobilitesine sahiptir. Portland ve Gower-1 zeta (ζ) zincirleri yapısal olarak α zincirlerine benzerler. Her iki Gower hemoglobini tek polipeptid yapı içerir bu da epsilon (ε) zinciridir. Hb Gower-1 de ζ₂ε₂ ve Gower-2 α₂ε₂ vardır. Hb Portland ζ₂γ₂ yapısına sahiptir. 4-8 haftalık embriyolarda Gower hemoglobini hakimdir fakat 3. ayda kaybolur (14).

Fetal Hemoglobin: Hb F; Hb A daki beta zincirleri yerine gama zincirleri içerir (α₂γ₂). Alkali sıvılara karşı denatürasyon direnci kantitasyon düzeyinin belirlenmesinde kullanılır. Gestasyonun 8. haftasından sonra Hb F predominant hemoglobindir. 6 aylık fetüste total hemoglobinin %90'nını oluşturur. Daha sonrasında hızla azalma olur ve doğumda %70 olarak ölçülür. Postnatal evrede Hb F sentezi hızla azalarak 6-12 aylık bir infantta eser düzeyde kalır. Hb F gama zincirlerinin iki tipi nedeniyle heterojenözdür (HbF₁, HbF₂). Zincirler 136 pozisyonundaki glisin yada alaninin olmasından dolayı farklıdır (14).



Şekil 1 : Embriyo, fetüs ve erişkinde globin zincir sentez alanları ile globin zincir sentez değişimi.



Şekil-2: Pluripotent kök hücre ve diğer progenitör hücrelerden kaynaklanan olgun hücrelerin şematik gösterimi

KOB: Koloni oluşturan birim

Apoptozis

Organizmada homeostazisin devamı hücre proliferasyonu ile hücre ölümünün denge halinde olmasını gerektirir. Patolojik durumlarda, hücrenin ağır ve ani bir travmayla karşılaşması sonucu görülen nekrozisin tersine, apoptozis programlı ve fizyolojik bir ölüm şekli olması nedeniyle bu dengenin sürdürülmesinde önemli rol oynar. Yunanca kökenli bir kelime olan "apoptozis" sonbaharda yaprakların dökülmesine benzetilmiştir (15).

İlk olarak Wyllie ve arkadaşları (16) tarafından glukokortikoidlerle karşılaşan timositlerde önemi ortaya konmuşsa da, kanserle ilişkisi anlaşıldıktan sonra daha büyük önem vermeye başlanmıştır. Embriyonik hayatta yaygın olarak görülmesinin yanında gelişimini tamamlamış organizmalarda, özellikle immün regülasyonda kritik önemi vardır. Lenfositlerin negatif seleksiyonu veya pozitif seleksiyona uğramamış lenfositlerin delesyonu ve immün aktivasyon sonrası gelişen klonal genişlemenin baskılanması için çok sayıda hücrenin kendini feda etmesi gerekmektedir (17). Bu fizyolojik dengenin bozularak apoptozisin azalması durumunda otoimmün, lenfoproliferatif hastalıklar ve kanser; artması halinde ise dejeneratif hastalıklar ve organ zedelenmesi ortaya çıkabilir.

Hücre ölümü başlıca, nekrozis ve apoptozis olmak üzere iki şekilde meydana gelir. Bu iki ölüm şeklinin morfolojik olarak belirgin farklılıkları vardır. Ani ve ağır travma ile karşılaşan ve nekroz ile ölen hücrede şişme, membran geçirgenliğinde artma, ozmotik lizis; dokuda ise ağır yangısal zedelenme meydana gelir. Apoptotik hücrede, nekrozisin tersine en çarpıcı değişiklik nükleusta oluşur (Tablo-1). Hücre küçülür, mikrovillüs ve desmozomların kaybı sonucu komşu hücrelerden uzaklaşır. Hücre yüzeyinde "bleb"ler (sitoplazmik çıkıntılar) meydana gelir. Sitoplazmada yoğunlaşma, hücre dansitesinde artma, kromatinde yoğunlaşma ve nükleer "zarf" yakınında toplanma görülür. Daha sonra tüm nükleus kondanse olur ve DNA'nın yaklaşık

180 bp multimerleri büyüklüğünde fragmantasyonu meydana gelir. Hücre her biri membranla kaplı birçok apoptotik partiküle ayrılır. Apoptotik hücrelerde nekrozisin aksine membran bütünlüğü bozulmamıştır, ancak fagositozu kolaylaştıracak membran değişiklikleri erken evrede bile vardır. Komşu hücreler yada özel fagositler tarafından bu membran kaplı partiküller fagosite edilerek dokudan hızla uzaklaştırıldığı için yangısal reaksiyon görülmez. Bu nedenle apoptozis sessiz ölüm şeklinde ifade edilebilir (18).

Tablo-1: Apoptozis ve Nekrozun Farkları (16)

Bulgular	Nekroz	Apoptozis
Tutulum	Kitlesel	Tek tek hücreler
Gen ekspresyonu	Gerekmez	Gerekir
Hücre hacmi	Artar	Azalı
Kromatin kondansasyonu	Uniform	Granüler
Nükleolus görünümü	Kompakt	Granüler
Çekirdek zarı	Geç evreye kadar intakt kalır	Daha erken evrede parçalanır
Sitoplazma	Geç evrede parçalanır	Apoptotik yapılar oluşur
Hücre organelleri	Kaybolur	Geç evrelere kadar intakttır
DNA kırılması	Görülmez	Karakteristiktir
Agaroz jel elektroforezinde DNA görünümü	Nonspesifik	Merdiven görünümü
Çevre dokuda yangı	Vardır	Yoktur

Hücrelerde apoptozisi uyaran çok sayıda fizyolojik ve fizyolojik olmayan uyarımın ulaştığı ortak nokta, hücre içinde proteolitik olaylar (katabolik enzimler) zincirini başlatmaları ve bunun sonucunda da hücrede birçok esansiyel makromolekülün parçalanmasıyla apoptozis için karakteristik biyokimyasal ve ultrastrüktürel fenotipin ortaya çıkmasıdır. Bu proteolitik olaylar sonucunda yıkıma uğrayan başlıca moleküller; hücre iskeleti ve organizasyonunda rol alan aktin, fodrin, familyal poliposis proteini; DNA tamiri proteinlerinden DNA-PF, PARP; nükleer mitotik aparatüs proteini olan NuMA; nükleer membran

entegrasyonunu sağlayan, laminler ve hücre siklusunda rol oynayan retinoblastoma proteinidir. Protein yıkımını sağlayan proteolitik olaylar zinciri sistein proteazların harekete geçmesiyle başlatılır. Sistein içeren aktif bölgesi olan ve dörtlü AA motifinde olan aspartik asit rezidüleri karboksi terminal kısmında kesen bu sistein proteazlar kaspazlar (CASPASES: sistein içeren aspartik proteazlar) olarak isimlendirilmiştir. Bilinen kaspazlardan önemlileri kaspaz 1 (ICE), kaspaz 3 (CPP32/YAMA) ve kaspaz 8 (FLICE/MACH) dir. Bu kaspazlar proenzim olarak sentezlenir. Aktive olmaları için asp-x yerlerinde proteolitik aktivasyon gereklidir. Böylelikle zincir reaksiyonu ile bir sonraki proteaz aktive olur ve son ürün yıkımı ortaya çıkar. Kaspaz 3 apoptozis yolunda aşağıda kritik bir noktada yer alıp DNA tamir proteinlerinden olan poli adenil riboz fosfatın (PARP) yıkımından sorumludur. Böylelikle birçok değişik stimülusun yol açtığı terminal proteolitik olaylar hücrede, nükleer kondansasyon ve fragmantasyon ile karakterize apoptotik fenotipi ortaya çıkarır (17,18)

Apoptotik hücrelerde erken değişikliklerden biride mitokondride görülür. Transmembran potansiyelde azalma sonucu mitokondrial fonksiyonda bozulma olur. Mitokondriden pro-apoptotik maddelerin (örneğin sitokrom c) salgılanması ile kaspazların aktivasyonuna katkıda bulunur. Apoptozise uğrayan hücrelerdeki yüzey karbonhidrat ve diğer membran değişikliklerinin fagosit reseptörleri ve lektinler tarafından tanınarak apoptotik hücrenin çok hızlı ve etkin bir mekanizma ile ortadan kaldırılmasıyla apoptozis işlemi sonlanır (19,20).

Apoptotik moleküller hücrelerde yaygın olarak bulunduğu durumda aynı zamanda apoptozis inhibitörü genlerin aktive halde bulunması apoptotik olayı denge halinde tutmaktadır.

Apoptozisin Etkilediği Olaylar

Apoptozis vücutta birçok fizyolojik olayda rol oynamaktadır. Bu fizyolojik olayların başında hücre turnover'mın sağlanması gelir. Deri, barsak epiteli, kan hücreleri gibi turnover'ı hızlı olan yerlerde yaşılanan hücreler apoptozis ile ortadan kaldırılarak yeni hücrelere yer açılmaktadır. Normal

erişkinde günde $50-400 \times 10^7$ /kg polimorfonükleer hücre yapılmaktadır. Yaklaşık yarı ömrü 1-2 gün olan bu hücreler ortadan kalkmazsa yeni yapılan hücrelerle birlikte anormal bir hacme ulaşabilir (16).

Apoptozisin rol oynadığı diğer bir olay da endokrin hiperplazi ve involüsyondur. Uygun hormonal uyarı sonucu endokrin hücrelerde apoptotik ölüm engellenmekte ve hiperplazi gelişmektedir. Bu uyarı ortadan kalktığı zaman ise fazla olan hücre kitlesi apoptozise gitmekte ve böylece involüsyon gerçekleşmektedir. Örneğin laktasyon sırasında prolaktinin etkisiyle meme hücrelerinde apoptozis engellenirken, bu dönem sona erince apoptozis yoluyla involüsyon gelişmektedir. İskemik atrofide de iskemiye uğrayan hücreler apoptozise gitmektedir. Tam olarak dolaşım kesildiğinde ise daha çok nekroz gerçekleşmektedir.

Radyasyon, sıcak şoku ve kemoterapötikler de apoptozise yol açabilmektedir. Özellikle malign hücrelerde bu etkenlerle apoptozis indüklenebilmektedir. Ancak yine fazla dozlarda aynı etkenler nekroza neden olur (18).

İmmün sistemin şekillenmesinde de apoptozis çok önemli rol oynamaktadır. Apoptozis en klasik örneği sayılan yenidoğan timusunun involüsyonu sonucunda T lenfositlerin yaklaşık %98'i seleksiyona uğramaktadır (21). Ayrıca hafıza hücrelerinde apoptozisin baskılandığı belirtilmektedir. Bunun fizyolojik önemi, hafıza B lenfositlerinin duyarlı olduğu uyarının yeniden gelmesi durumunda hazır bulunmasını sağlamaktır (17).

Fas/Fas Ligand İlişkisi

Hücrelerde apoptozisi başlatan çok sayıda fizyolojik ve fizyolojik olmayan uyarım vardır. Fas reseptör ve ligand interaksyonu ile apoptozis indüksiyonu temel mekanizmayı oluşturur. Bu konudaki çalışmaların öncülüğünü, fare deneyleriyle Nagata yapmıştır (22).

Fas ve FasL moleküllerinin etkileşimi sonucu, yüzeyinde Fas bulunan hücrede apoptozis meydana gelir. Fas (Fas reseptörü; CD95; APO-1) 45 kDa ağırlığında, tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör grubuna ait tip I membran

proteinidir. İnsan Fas molekülü 325 aminoasitten oluşmuştur. Bu gruptaki proteinlerin sisteinden zengin ekstrasellüler, transmembranöz ve intrasellüler olmak üzere üç kısmı "domain" vardır. Fas ligand (FasL;CD95L) ise Fas molekülünün doğal ligandıdır. Tip II membran proteini olup kodlama sekansı molekülün ekstrasellüler kısmında karboksi terminalindedir. Fas ligandın kendi reseptörü olan Fas ile etkileşimi sonucu apopitozis sinyali, yüzeyinde Fas molekülü bulunan hücrenin nükleusuna iletilir ve Fas ekspresyonu olan hücrede apopitozis ile ölüm meydana gelir. FasL/Fas reseptör trimerizasyonu bu mesaj iletimi için gereklidir. Reseptör trimerizasyonundan sonra Fas molekülünün intrasitoplazmik kısmında bulunan Death Domain (DD; ölüm bölgesi) intrasitoplazmik bir molekül olan FADD (Fas associated death domain) ile bağlantı kurar. Bundan sonra sistein proteazlardan biri olan Kaspaz 8 aktive olur ve proteolitik olaylar zinciri başlar (23).

Fas ve FasL organizmada birçok lenfoid ve lenfoid olmayan dokuda saptanmıştır. Fas/FasL interaksiyonu, organizmada antijenik uyarım sonrası görülen aşırı immün aktivasyonun sonlandırılmasında veya "self reaktif" lenfositlerin apopitozisinde büyük önem taşır. Bu fizyolojik mekanizma organizmada homeostazın devamı için gereklidir. Ancak viral hepatitte olduğu gibi bazı patolojik durumlarda ise Fas/FasL interaksiyonundan organizma zarar görebilir (24).

Fas geni farede 19., insanda ise 10. kromozomda bulunur. Fas ligand geninin ise farede ve insanda birinci kromozoma lokalize olduğu gösterilmiştir (22). Her iki genin mutasyonları farelerde apopitozis defektine bağlı lenfoakümülyasyon sonucu ortak fenotip [jeneralize lenfadenopati, hepatosplenomegali, otoimmüniteye eğilim, periferal "double" negatif (CD4- ve CD8-) hücre artışı] ile karakterizedir. Son yıllarda insanlarda da Fas geninde farklı mutasyonlara bağlı apopitozis defekti sonucu faredekine benzer fenotip ile karakterize olgular bildirilmiştir (50).

Fas/FasL etkileşimi özellikle immün regülasyonda önemli rol oynar. T lenfosit gelişimi, negatif seleksiyondaki rolü iyi tanımlanmıştır. Normalde

timusta olgunlaşan timositlerin %95'inden fazlası hatalı "re-arrangement" veya "self reaktiviteye" bağlı negatif seleksiyon ile ya da pozitif seleksiyona uğramama sonucu apoptozis ile ölmektedir (18)

T lenfosit sitotoksitesinin önemli bir parçasını oluşturan Fas/FasL etkileşiminin transplantasyon immünolojisi ve immün dokunulmazlığın devamında rol oynadığı da gösterilmiştir (18,22). T lenfosit sitotoksitesi başlıca iki mekanizma ile meydana gelir. Perforin/granzim yolu (sekretuar) ya da Fas/FasL (nonsekretuar/reseptör) yolu aracılığıyla olmaktadır.

Hastalıkların Patogenezinde Apoptozisin Yeri

Çok hücreli canlılarda homeostazis hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengenin korunmasıyla sağlanır. Hücre çoğalması sayısız denge sistemleri ve kontrollerle düzenlenir. Büyüme faktörleri ve proto-onkojenler hücre döngüsünü uyarırken tümör süpressör genleri kontrolsüz hücre çoğalmasını baskılama yolunda etki gösterir. Differansiye bir hücre kendini yok etme kodunu üzerinde taşımaktadır (26). Apoptozis ekstrensek veya intrensek yollarla uyarılabilir. Apoptozisi uyaran ve inhibe eden faktörler Tablo 2 ve 3'de gösterilmiştir. Apoptozis ile ilişkili hastalıklar da Tablo 4 ve 5'de gösterilmektedir.

Tablo-2: Apoptozis Uyarıları (26)

Fizyolojik aktivatörler	Hasarla ilişkili uyarılar	Tedavi ajanları	Toksinler
TNF ailesi (FasL, TNF)	Sıcak şoku	Kemoterapötikler	Etanol
Kalsiyum	Besin yokluğu	Sisplatin, bleomisin, doxorubisin, sitozin	β -amyloid peptid
Transforming growth factor β	Viral enf	arabinozid, N-mustard, vinkristin, metotreksat	
Nörotransmitterler (glutamat, dopamin N- metil-D-aspartat)	Onkojenler (myc, rel, E1A)	Gamma radyasyon UV radyasyonu	
Glukokortikoidler	Tümör süpressörleri (p53)		
Büyüme faktörü azlığı	Sitolitik T hücresi Oksidanlar Serbest radikaller		
Matrix temasının olmaması			

Tablo-3: Apoptozis İnhibitörleri (26)

<u>Fizyolojik İnhibitörler</u>	<u>Viral Genler</u>	<u>Farmakolojik Ajanlar</u>
Büyüme faktörleri	Adenovirus E1B	Calpain inh
Ekstrasel. Matriks	Baculovirus p35	Sistein proteaz inh
CD40 ligand	Baculovirus IAP	Tümör uyarıları
Nötral aminoasitler	Cowpox virus crmA	-PMA
Çinko (endonükleaz inh)	EBV BHRF-1, LMP-1	-Fenobarbital
Östrojen	African swine virus	$-\alpha$ -hexaklorosikloheksan
Androjen	Herpesvirus γ 1 34.5	

Tablo-4: Apoptozis Artışı ile İlişkili Hastalıklar (26)

1. AIDS
2. Nörodejeneratif hastalıklar
 - Alzheimer hastalığı
 - Parkinson hastalığı
 - Amiyotrofik lateral skleroz
 - Retinitis pigmentosa
 - Serebellar dejenerasyon
3. Myelodisplastik sendrom
 - Aplastik anemi
4. İskemik hasar
 - Miyokard infarktüsü
 - Reperfüzyon hasarı
 - Stroke
5. Toksik karaciğer hst (Alkol)

Tablo-5: Apoptozisin İnhibisyonu ile İlişkili Hastalıklar (26)

1. Kanser
 - Foliküler lenfomalar
 - p53 mutasyonlu karsinomalar
 - Hormon bağımlı tümörler
 - Meme, prostat, over kanserleri
2. Otoimmün hastalıklar
 - SLE
 - Bazı glomerulonefritler
3. Viral enfeksiyonlar
 - Herpes
 - Poxvirüs
 - Adenovirüs

Apoptozis ve Kanser:

Malign hücre proliferasyonu ve birikimi hücre üretimi ve ölümü arasındaki dengeye bağlıdır. Son yıllardaki bulgular apoptozisin kanser gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Apoptozis mekanizmasındaki hasar hem çoğalan hücrelerin birikimine neden olarak hem de malign potansiyeli olan genetik materyalin ortadan kalkmasını azaltarak kanser gelişimine neden olabilir.

Apoptozis tedavi edilmemiş birçok tümörün büyümesinde rol oynar. Örneğin bazal hücreli karsinoma ve akut T lenfoblastik lösemi hücrelerinde aktif olarak bölünen hücrelerin çok fazla olmasına karşın büyüme hızının beklenenden düşük olması tümör hücrelerinin bir kısmının apoptozis ile ortadan kaldırılmasıyla açıklanabilir (27).

Son araştırmalar tümör hücrelerinin apoptozise direncinde birkaç genin kritik önemi olduğunu göstermiştir. Bu genlerden ilk saptanan Bcl-2 dir. Folliküler lenfomalı hastaların çoğunda 14 ve 18. kromozomlar arasındaki translokasyon bölgesinde bulunmuştur. Bcl-2 genine genel olarak hücre ölüm süpressör geni denmektedir. Bcl-2 yi fazla miktarda üreten hücrelerde DNA onarım hızında artış olmamakla birlikte Bcl-2 nin yüksek olması apoptozise gidişe engel olmakta ve diğer onkojenlerle temas olasılığını arttırmaktadır (28).

Bir protoonkogen olan c-myc özellikle proliferasyon ve apoptozis arasında yapılacak seçimde önemli bir rol oynar.

DNA hasarı sonucu gelişen hücre ölümlerinin çoğu apoptozis ile gerçekleşir. p53 gen ürünü genotoksik hasara yanıt olarak apoptozisin başlatılmasında gereklidir. Çoğu kanserlerde p53 geninde mutasyon veya delesyonlar vardır. Böylece tümör hücreleri apoptozise karşı direnç ve ölümsüzlük kazanırlar (29). Çoğu antikanser ilaçlar (alkilleyiciler, antimetabolitler, hormon antagonistleri) sensitif hücrelerde apoptozisi indükleyerek etki gösterirler.

Apoptozis ve AIDS:

AIDS'de virusun hedefi CD4 T lenfositleridir. CD4 T lenfositlerinin virüs tarafından enfekte edilmesinde CD4 bir reseptör olarak kullanılır. Sonuçta lenfopeni ve immün yetmezlik gelişir. Ancak çoğu T hücresi HIV ile enfekte edilmeden ölmektedir. Son araştırmalar HIV virüsüne ait gp120 adlı glikoprotein CD4 reseptörünü uyararak apoptozisi indüklediğini göstermiştir (30).

Apoptozis ve Otoimmün Hastalıklar:

Fizyolojik koşullar altında otoantijenlere bağlanan immatür T lenfositler apoptozis ile ölürlür. Bu mekanizmada herhangi bir defekt otoimmüniteye yol açar. Farelerde lpr gen mutasyonu lenfositlerde artmaya ve SLE'ye benzer bir tabloya neden olur. Lpr geni APO-1 veya Fas olarak bilinen hücre membran proteinini kodlar. Lpr geninde mutasyon olan fare Fas genini sunamadığı için otoreaktif T lenfositleri etkili olarak ortadan kaldırılamaz. İnsanlarda SLE'li hastalarda lpr genine ait mutasyon gösterilememiş ancak Fas/Fas ligand bağlantısını kompetitif olarak inhibe edecek düzeyde solubl Fas bulunmuştur ki bu da reaktif lenfositlerin apoptozisini önlemektedir. Özet olarak insanlarda apoptozis kontrolü yapan genlerle doğrudan ilişkili otoimmün hastalık yoktur ama araştırmalar bu yolla hastalıkların başlatılabileceğini göstermektedir (31).

Apoptozis Yaşlanma ve Nörodejeneratif Hastalıklar:

Vücuttaki hücre topluluğunun yaşla azalması genetik olarak kontrol ediliyor olması gerekir. Yaşlanma sırasında erken veya normalden daha fazla hücre kaybı organ disfonksiyonlarına yol açar. Bu konudaki en fazla çalışılan örnekler SSS'nin nörodejeneratif hastalıklarıdır. Bu hastalıklarda hücre ölümü herhangi bir yangısal reaksiyon yaratmadan büyük oranda apoptozis aracılığı ile olmaktadır.

Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, amyotrofik lateral skleroz, retinitis pigmentosa, spinal müsküler atrofi ve bazı serebellar dejenerasyon

tipleri apoptozisi kullanarak hücre kaybına neden olurlar Bcl-2'nin fazla sunulması halinde nörotoksik maddelerin (oksidatif stres, Ca, mitokondrial defektler, yaşam faktörlerinin yokluğu) hücre ölümü indükleyici etkisi azalır. Ayrıca nörotrofik büyüme faktörleri ve ekstrasellüler matriks nöronların apoptozis eşiğini değiştirir. Alzheimer hastalığında ilerleyici β -amiloid birikiminin apoptotik etkisi antioksidanlarla geri çevrilebilir (26).

Spinal müsküler atrofi resesif geçişli nörodejeneratif bir hastalıktır. Bu hastalıkla ilişkili son saptanan genlerden birisi nöronal apoptozis inhibitör proteindir (NAIP). Bu proteinin homoloğu baculavirus te bulunmaktadır ve böcek hücrelerinde apoptozisi önlemektedir. Bu bilgiler ışığında NAIP genindeki mutasyonlar SMA'lı hastaların nöronlarında apoptozise hassas olmasına yol açabilir (26).

Apoptozis ve Hematopoezis:

Matür kan hücreleri kemik iliğinde lokalize hematopoetik kök hücrelerden üretilirler. Hematopoezisin regülasyonuna trombopoetin, koloni stimulan faktörler, eritropoetin ve kök hücre faktörlerinin de yer aldığı büyüme faktörleri etki eder. Büyüme faktörleri proliferasyonu stimüle etmesine ek olarak hedef hücrelerin yaşam süresini de uzatırlar (32). Hematopoetik progenitör hücreler invitro ortamda büyüme faktörleri yoksa hızla apoptozise giderler. Büyüme faktörleri nötrofil gibi postmitotik kan hücrelerinin sağkalımının regülasyonunda önemlidir. Bcl-2 üretimi ve ekstrasellüler büyüme faktörlerinin yokluğuyla hücre bölünme hızı azalır ve hücreler diferansiyasyona yönelir (33).

Bazı kan hücreleri yapım bozukluklarında örneğin aplastik anemi ve myelodisplastik sendromun bazı formlarında kemik iliğinde artmış apoptozis saptanmıştır (1,2). Bu hastalıklarda apoptozis gen aktivasyonu, büyüme faktörleri azlığı, toksinlerin direk etkisi ve immün yanıt mediatörlerinin uyarısıyla gelişebilir. Eritropoetin, GCSF ve GMCSF gibi faktörler klinikte tedavi amacıyla kullanılmaktadır.

Hastalıkların Tedavisinde Apoptozis

Fizyolojik hücre ölümü fizik ve kimyasal faktörlerin dışında genlerin oluşturduğu kontrol mekanizmasıyla olmaktadır. Hastalıkların altta yatan önemli nedeninin apoptozis olduğu düşünülürse bu patolojilere getirilecek genetik bir yaklaşım tedavideki önemini ortaya çıkaracaktır.

Bazı tümörlerin apoptozis yoluyla tedavisi mümkün olmaktadır. Prostat kanserlerinde androjen etkisinin kaldırılmasıyla, meme kanserlerinde ise östrojen reseptör antagonistleri ile regresyona uğratarak tedavi edilebilmektedir (34). Son yıllarda B hücreli lenfomaların büyümesi Bcl-2 geni oligonükleotidlerine karşı etkiyle in vitro deneylerle inhibe edilebilmektedir (35).

Hücre kaybı ile bağlantılı hastalıklarda bu hücrelerin apoptozis eşiğini arttırarak tedavi olasıdır. Kanser tedavisi sonrası growth faktörlerle sitopeni düzeltilebilmektedir. Nörodejeneratif hastalıklarda nörotrofik faktörlerle nöronların, AIDS de ise n-asetil sisteinin antioksidan etkisiyle CD4+ T lenfositlerinin yaşam süresi arttırılabilmektedir. İskemik hasarın kalsiyum metabolizmasına etkili ajanlarla tedavisi hala test edilmektedir (26).

Hücre yüzey ölüm efektörlerini inhibe ederek apoptozis eşiğini değiştirmek olasıdır. Örneğin Fas ve TNF'e karşı antikörlerle Fas ligand ve TNF'in başlattığı hücre ölümü sınırlandırılabilir (36).

Otoimmün hastalıklar lenfositlerin vücudun kendi antijenlerine reaktivite kazanıp proliferasyonla gelişmektedir. Fare deneylerinde otoimmün ensefalitin tedavisinde hastalıkla ilişkili otoantijenin tekrar tekrar verilmesiyle spesifik lenfositlerin delesyonu sağlanabilmektedir (37). Bu bulgu spesifik antijenin saptanabildiği otoimmün reaksiyonlarda tedavi stratejisi olabilir.

Apoptozisi kontrol eden genlerin saptanması ve gen tedavisi ile farklı birçok hastalığın seyri değiştirilebilirken yaşlanmanında sınırları çözülebilecektir.

Talasemi

Talaseminin Tanımı: Hemoglobin molekülünü oluşturan globin zincirlerinden birinin veya daha fazlasının yapılamaması veya az miktarda yapılması ile karakterize olan ve otozomal resesif geçiş gösteren bir grup hastalığa talasemi adı verilmektedir. Normal erişkinde hemoglobinin %96'sını HbA₁, %2.5-3.5'nu HbA₂ ve %1'den azını HbF oluşturmaktadır. HbA₁ in yapısında 2 alfa ve 2 beta, HbA₂'nin yapısında 2 alfa ve 2 delta zinciri, HbF'in yapısında ise 2 alfa ile 2 gama zinciri bulunur. Normal erişkin hemoglobininin %96 kadarının HbA₁ ($\alpha_2\beta_2$) olması nedeniyle klinik olarak önemi olan talasemiler alfa ve beta globin zinciri ile ilgili talasemilerdir. HbA₂ ve HbF erişkinde total hemoglobinin çok az bir kısmını oluşturduğu için bu hemoglobin yapısına giren delta ve gama zincirlerinin yapım yokluğu veya azlığı sonucu oluşan delta ve gama talasemiler genellikle belirti vermezler (1,2).

Yaşamı devam ettirebilmek için düzenli ve sürekli kan transfüzyon ihtiyacı olan hastalara Beta talasemi major denilmektedir. Bu hastaların büyük çoğunluğunda her iki beta globin genide talasemi mutasyonuna uğradığı için "homozigot beta talasemi" adıda verilmektedir. Aile çalışmalarında β talasemi mutasyonları için homozigot görünen diğer hastalar infeksiyon, cerrahi veya diğer stresler dışında kan transfüzyonu olmadan hemoglobin konsantrasyonlarını 6-10 gr/dl düzeyinde tutabilirler (2,39). Bu hastalara Talasemi intermedia denir. T. intermedia hastanın transfüzyon durumunu tanımlayan klinik bir tanıdır.

Talaseminin Dağılımı ve Sıklığı:

Beta talasemiler otozomal resesif geçiş gösteren genetik hastalıklar arasında dünyada en sık görülenidir. En sık olarak Akdeniz bölgesinde ayrıca ekvator ve ekvatora yakın olan Uzak Doğu ülkelerinde ve Afrika'da bazı bölgelerde de rastlanmaktadır. Ülkemizde yapılan tarama çalışmaları ile beta talasemi taşıyıcılık insidansının Türkiye genelinde %2 olduğu ve yöresel farklılıklar gösterdiği (%0.6-%10.7) bildirilmiştir (1,2,40). Antalya yöresinde

yapılan bir çalışmada Talasemi taşıyıcılığı insidansı %10.4 olarak bulunmuştur (38).

Fizyopatoloji: Ağır beta talaseminin β globin üretimindeki azalmadan olduğu 1960 ortalarında retikülositlerdeki globin biosentezinin direk ölçümü ile saptanmıştır (41,42,43).

Beta talasemide beta globin zincirinin yapılamaması sonucu, alfa zincir yapımı normal düzeyde olduğu için alfa globin zincirinde relatif bir artma görülür. Artmış olan alfa zincirleri dimer şeklinde hücre içinde birikerek inklüzyon cisimlerini oluşturmaktadır. Alfa talasemide ise hücre içinde HbH (beta 4) veya Hb Barts (gama 4) birikir. Fonksiyonel Hb tetramerlerinin yapımında azalma sonucunda ise hemoglobin seviyesi düşer. Tüm talasemiler için karakteristik olan hipokromi, mikrositoz, target hücreleri, gözyaşı hücreleri, fragmanlar ve mikrosferositler periferik kan yaymasında görülür. Eritrosit hücre zarına yapışan inklüzyon cisimleri hücrede zedelenmeye yol açar. Bu hücrelerin dalaktan geçişleri sırasında bu kısımların alınmasıyla değişik şekilli eritrositler ortaya çıkar. İçinde inklüzyon ve membranda şekil bozukluğu olan hücrelerin internal iyonik dengeleri bozulur. Bu hücreler dalakta ve retiküloendotelial sistem dokularında parçalanırlar. Bu nedenle yaşam süreleri normal eritrositlere göre daha kısadır. Bunun sonucunda hemolitik anemi oluşur.

Inklüzyon içeren normoblastların normal gelişim evrelerine girmeden kemik iliğinde erkenden harabiyete uğramaları sonucunda inefektif eritropoez oluşur. İnefektif eritropoez nedeniyle periferik kanda retikülosit çok yüksektir. Fetal hayatta kan yapım yerleri olan karaciğer ve dalakta da kan yapımı devam eder. Artmış eritrosit yıkımı ve myeloid metaplazi nedeniyle dalak ve karaciğerde büyüme olur (2,44).

Talasemik eritrositlerde sayısız membran anormallikleri tanımlanmıştır. Bu tanımlamaların çoğu fazla globin zinciri ve presipite hemoglobin zincirlerinin degradasyonu sonrası hücre membranı ile hem-demir ilişkisinden olan oksidatif hasara atfedilebilir (45,46,47).

Talasemide Moleküler Patoloji :

α globin zincirinden sorumlu gen kümesi 16. kromozom, α dışı olanlar 11. kromozomdadır. β globin zincirinden sorumlu gen kümesi de 11. kromozomun kısa kolu üzerindedir. Beta gen kümesi 5' bölgesinden yani proksimalinden distaline doğru embriyonik epsilon geni, fetal hemoglobin genleri, psödobeta, delta ve beta genlerini içerir. Beta globin geninde 3 ekson ve 2 intron (Intervening sequence-IVS) bulunmaktadır. Globin zincirini şifreleyen dizilerin olduğu gen bölgelerine ekson, proteine dönüşmeyen bölgelere intron denilmektedir (2,48).

β talasemilerinde beta globin zincir sentezinin varlığı yada yokluğuna göre β^+ yada β^0 olarak adlandırılmaktadır β talasemilerdeki moleküler defektler;

1- Transkripsiyon defektleri,

2- Prosesing defektleri,

3- Translasyon defektleri;

a) Tek bir nokta mutasyonu (missense mutasyon)

b) Kodon dizi kayması (frame shift) mutasyon

c) Okunamayan anlamsız (nonsense) kodon mutasyonu

4-Delesyona bağlı mutasyonlar: Daha çok delta-beta talasemi, gama-delta-beta talasemiler.

Bugüne kadar 150'den fazla mutasyonun beta talasemiye yolaçtığı gösterilmiştir. En sık rastlanan IVS I-110 mutasyonudur. Türkiye'de ise en sık rastlanan mutasyonlar IVS I-110 ve IVS I-6 mutasyonlarıdır (48). Şekil 3'de DNA'dan β globin zinciri sentez basamakları gösterilmektedir.

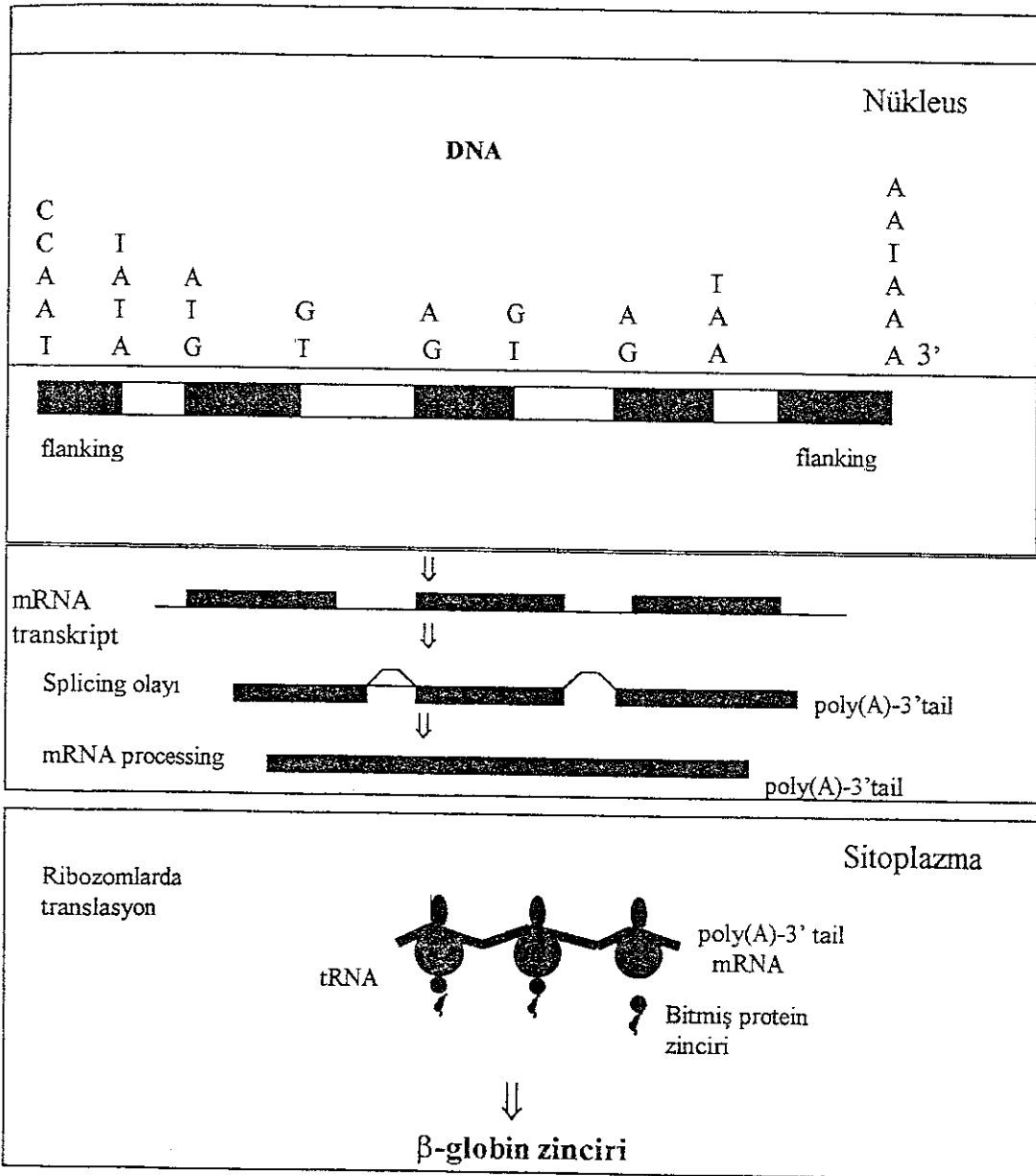
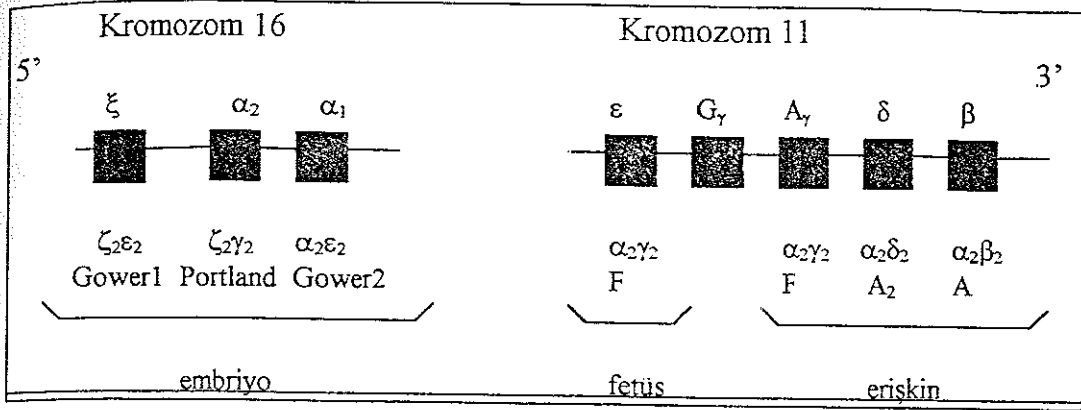
Edinsel ve genetik değiştirici faktörler olmasına karşın β talaseminin ağırlık derecesi α ve total non α -globin sentezi arasındaki dengesizliğin düzeyi ile doğrudan ilişkilidir. Hastalarda biyosentez oranını belirleyen üç major faktör ortaya çıkmaktadır:

1- Spesifik mutasyon ya da mutasyonların doğası

2- α globin ekspresyonunu azaltan veya arttıran α globin kümesindeki anormalliklerin varlığı

3- HbF sentezindeki genetik kapasite

Kısa ve uzun dönem kemik iliği hücrelerinin inkübasyonlarıyla α -non α biyosentez oranının karşılaştırmasında fazla α zincirlerinin proteolizisi hastalığın ağırlığını belirler (49,50). Ancak bu mekanizmayı açıklayan kantitatif çalışma yoktur.



Şekil 3 : DNA'dan β globin zinciri sentez basamakları gösterilmektedir.

Talasemi sendromları globin zincirlerinden biri veya daha fazlasının sentezinin olmaması yada azalmasıdır. α ve β talasemilerde sırasıyla α ve β globin zincir üretiminin eksikliği vardır (1).

β talasemiler artan şiddete göre dört klinik sendrom içerirler; Sessiz taşıyıcı, talasemi trait, talasemi intermedia ve talasemi major (51,52,53,54). α talasemilerin tersine β talasemilerin 4 sınıfı fonksiyonel gen sayısı ile ilişkili değildir. Çünkü tek fonksiyonel β globin geni 11. kromozom üzerindedir. Diploid hücre normalde iki β globin geni taşır. β talasemilerin klinik heterojenitesini β globin gen gösterimini değişik olarak etkileyen spesifik mutasyonların farklılığı gösterir. Çoğu mutasyonlar β globin gen ekspresyonunu (β^0) elimine eder. Oysa diğer nedenler β globin gen ekspresyonunda (β^+) değişken azalmaya yolaçar. Her hastanın γ globin sentez kapasitesi klinik şiddeti modüle eder. Talaseminin klinik ağırlığı α veya β globin sentezindeki gerçek düzeyden daha çok globin zincirindeki denge bozukluğu ile belirlenir (55,56). β talasemili bireylerin kemik iliği hücrelerinde γ globin sentezi zincir dengesizliği nedeniyle azaltılma eğilimindedir (57). β talasemide β globin geninde olan mutasyonlar γ globin gen ekspresyonunu doğrudan etkilemektedir. Buna karşın şiddetli β talasemili bazı bireylerde fetal hemoglobin sentezini arttıran ek genetik determinantlar birlikte kalıtılabilir. Her hastanın klinik ağırlığı bu kompleks genetik ilişkilerin sunucuna bağlıdır ve halen tam olarak bilinmemektedir (1).

Klinik

Beta Talasemi Taşıyıcılarında Klinik Bulgular

İki beta geninden yalnızca birisi beta talasemi geni taşıyorsa bunlara beta talasemi taşıyıcıları denilir (Talasemi minör). Bu olgular genellikle klinik olarak asemptomatiklerdir.

Beta Talasemi Majorda Klinik Bulgular

Beta talasemi majör ilk kez 1925 yılında Thomas Cooley tarafından tanımlanmıştır (58). Bu nedenle Cooley anemisi adı da verilmektedir. Yenidoğan evresinde hemoglobinin büyük çoğunluğunu (%70-90) HbF oluşturmaktadır. HbF β zinciri içermediği için yenidoğan bebekler normaldir. Genellikle 3 aylıktan sonra gama geni yapımının durdurulup β gen yapımının tam aktif hale geçtiği devrede anemi belirir ve hemoglobin düzeyleri çoğunda ilk altı ay ile bir yıl arasında transfüzyon gerektirecek düzeylere iner. Bazen HbA eksikliğini HbF'in iyi kompanse etmesi nedeniyle 3-5 yaşlarında tanı konulabilir bu duruma talasemi intermedia adı verilmektedir.

Talasemi majörlü hastalar aileleri tarafından büyüme geriliği, gelişme geriliği, kilo alamama, beslenme güçlüğü, irritabilite, karın şişliği, solukluk gibi çok değişik yakınmalar ile getirilirler. Klinik bulgular olarak sıklıkla anemi ve hepatosplenomegaliye rastlanır. Gerekli transfüzyon ve şelasyon tedavisi almayan hastalarda yaşam süresi 5 yıl civarındadır. Bu hastalar genellikle anemi, kalp yetmezliği, karaciğer yetmezliği ve diğer endokrin organ yetmezlikleri ile splenektomi yapılanlar ise septisemiden kaybedilirler. Uygun transfüzyon yapılmayan hastalarda talasemi majorun tipik bulguları ortaya çıkar. Bunlar büyüme-gelişme geriliği, burun kökünde basıklık, maksillanın belirginleşmesi ve talasemik yüz görünümü şeklinde olabilir. Diploe mesafelerinde genişleme, fırçalaşma, uzun kemiklerde ve el parmaklarında trabekülasyonda artma karakteristik iskelet yapısındaki radyolojik bulgulardır. Düzenli tedavi almayan hastalarda hepatosplenomegali, demirin melanin pigmentini stimüle etmesi

sonucu cilt pigmentasyonunda artma gözlenir. Kemik iliği genişlemesine bağlı uzun kemik kortekslerindeki osteopeni nedeniyle spontan kırıklar olabilir. Maksiller kemikteki deformitelere bağlı olarak diş problemleri ile ısırma ve çiğneme bozuklukları gelişir. Ekstamedüller hematopoetik dokuların lokalizasyonlarına bağlı karaciğer yetmezliği ve diğer endokrin organ yetmezlikleri ile nörolojik bulgular görülebilmektedir. Splenomegaliye sekonder olarak gelişen hipersplenizm nedeniyle trombositopeni ve lökopeni gelişmekte, buna bağlı enfeksiyonlara yatkınlık ve kanama problemleri görülebilmektedir. Epistaksis ve hemostatik diğer problemler karaciğer fonksiyonlarındaki bozulmaya da bağlı olarak gelişir. Hemosiderozis ve hipertüremiyle ilişkili olarak omuz ve diz eklemlerinde ödem, artropati, sinovit, artralji, kas zayıflığı gelişebilir. Demir depolanmasına bağlı olarak renal tübuler dilatasyona bağlı böbreklerde büyüme, orta derecede proteinüri ve mikroskopik hematüri, interstisyel nefrit meydana gelmektedir. Böbrek fonksiyonlarındaki azalmaya bağlı hiponatremik ve hipokloremik alkaloz da gelişebilir. Büyük yaşlardaki hastalarda safra taşları, kolesistit ve diyare oluşabilir. Pubertal gelişme gecikmesi veya olmaması, diabetes mellitus, adrenal yetmezlik, tiroid ve paratiroid fonksiyon bozuklukları da olabilecek endokrin bozukluklardır.

Talasemi majörlü hastalardaki en sık ölüm nedeni kalp yetmezliğidir. Tekrarlayan transfüzyonlara bağlı olarak yaşamın ikinci dekadında kardiyak hemosiderozis gelişmektedir. Şelasyon yapılmaksızın 100 ünite eritrosit süspanasyonu verilmesiyle önemli düzeyde kardiyak demir depolanması olduğu gösterilmiştir. Makroskopik olarak atrial ve ventriküler boşluklarda genişleme, miyokardial tabakada kalınlaşma sonucunda kalbin ağırlığı 2-3 kat artar. Demir birikimi ile kalp ritminde ve miyokardial kontraksiyonda fonksiyonel problemler başlamakta, aritmi ve dirençli kalp yetmezliğinden dolayı hastalar kaybedilmektedir. Kalpte gelişen patolojiye talasemik kardiyomiyopati denilmektedir (1,2).

Kan transfüzyonları ile hemoglobin düzeyi normal sınırlarda tutulan ve iyi şelasyon alan olgularda hemosiderozis komplikasyonları nadir görülür (59).

Beta Talasemi İntermediada Klinik Bulgular

Homozigot β -talasemilerin yaklaşık %10 kadarında klinik seyir beta talasemi majorden daha hafif ve talasemi taşıyıcılardan daha ağırdır. Talasemi intermedia olarak adlandırılan bu grup çok geniş bir klinik spektrum ile karakterizedir. Bu hastaların kan transfüzyon gereksinimi olmaksızın hemoglobin düzeyleri 7 gr/dl veya üzerindedir. Bilinen bazı hafif mutasyon tiplerinin homozigotluğu veya hafif ve ağır moleküler defektlerin çift heterozigotluğu talasemi intermedia klinik seyri ile karakterize olabilir. Talasemi intermedia'lı hastaların bazıları normal büyüme, gelişme ve seksüel matürasyon göstererek erişkin yaşa kadar ulaştıkları halde bazı T. intermedia'lı hastalarda kardiyomegali, osteoporoz, kırıklar, artrit, splenomegali ve hipersplenizm gibi komplikasyonlar gelişebilmektedir. Bu komplikasyonlar T. majordeki gibi hemoglobin seviyesini normal düzeylerde tutarak ve endojen eritropoezi süprese edecek transfüzyon programları ile önlenmektedir.

Talasemilerin Sınıflandırılması

Klinik Sınıflama

Talasemi major

Transfüzyon bağımlı homozigot β^0 -talasemi
Homozigot β^+ -talasemi (bazı tipleri)

Talasemi intermedia

Hafif form $\beta^+ \alpha^+ \beta^0/\beta^+$ talasemi
Hemoglobin Lepore sendromları
Homozigot δ β -talasemi ve herediter fetal hemoglobin devamlılığı
 α^- & β^+ - talasemi kombinasyonları
Üç kopyalı α genli heterozigot β -talasemi
Dominant β -talasemi
Heterozigot β -talasemi ve β zincir varyantları (Hb E/ β -talasemi)
Hemoglobin H hastalığı

Talasemi minör

β^0 -talasemi trait
 δ β -talasemi trait
Herediter fetal hemoglobin devamlılığı
 β^+ -talasemi trait
 α^1 (α^0)-talasemi trait
 α^2 (α^+)-talasemi trait

α -talasemiler

Tanımlama	Haplotip	Heterozigot	Homozigot
α^0 -talasemi trait	--/	α^0 -talasemi;düşük MCH ve MCV	Hidrops fetalis
Disfonksiyonel α -talasemi	$-\alpha^0/$	α^0 -talasemi;düşük MCH ve MCV	Hidrops fetalis
α^+ -talasemi trait	$-\alpha/$	α^+ -talasemi;minimal hematoljik anormallik	Heterozigot α^0 -talasemi
Delesyonsuz α -talasemi	<u>α</u> <u>α</u>	değişken	Bazı olgularda Hb H hastalığı
Hb-constant spring		Hb CS %0.5-1	Heterozigot α^1 -talasemi

β -talasemiler

Tip	Heterozigot	Homozigot
β^0	Talasemi minör;Hb A ₂ :>%3.5	Talasemi major; Hb F:%98 Hb A ₂ :%2; Hb A yok
β^+	Talasemi minör;Hb A ₂ :>%3.5	Talasemi major; Hb F:%70-80 Hb A:%10-20; Hb A ₂ :değişken
$\delta \beta$ herediter fetal hb devamlılığı	Talasemi minör; Hb F:>%5-20 Hb A ₂ : normal veya düşük	Talasemi intermedia; Hb F:%100
Hb Lepore	Talasemi minör;Hb A:>% 80-90; Hb Lepore:%10; Hb A ₂ :azalmış	Talasemi major ve intermedia; Hb F:%80; Hb Lepore: %10-20; Hb A, Hb A ₂ : yok

Laboratuvar Bulguları

β -Talasemi Taşıyıcılığı (β -TT)

Periferik kan yaymasında eritrositlerde hipokromi, mikrositoz, anizositoz, poikilositoz, bazofilik noktalanma ve bazılarında anemi olabilir. Ortalama eritrosit hacmi ve ortalama eritrosit Hb konsantrasyonu gibi eritrosit indekslerinde azalma olurken eritrosit sayımında artış gözlenir. HbA₂'nin yüksek olması tanı koydurucu bir bulgudur. HbF düzeyide az miktarda yükselebilir. α/β globin zincir sentez oranı ise 1.5-2 arasındadır.

β -Talasemi Major

β -talasemi majorde ağır anemi yanında periferik yaymada eritrositlerde hipokromi, mikrositoz, anizositoz, poikilositoz, polikromazi, target hücresi, bazofilik noktalanma, fragmantasyon vardır. Anemi ne kadar ağırsa periferde o oranda normoblast sayısında artış olur. Başvuruda transfüzyon yapılmamış olgularda genotiple değişmekle birlikte HbF %20-100, HbA₂ %2-7 ve HbA₁ %0-80 arasındadır. β^0 talasemili hastalarda Hb A düzeyleri çok fazla düşükken Hb F düzeyi çok yüksek, β^+ talasemili hastalarda ise bir miktar Hb A düzeyine rastlanmaktadır (1).

Kemik iliği yayma incelemesinde eritroid/myeloid seri oranı 20/1'e eşit yada daha fazladır (1).

β -Talasemi İntermedia

Hemoglobinleri 7 gr/dl'nin üzerindedir. Periferik kan bulguları ve eritrosit indeksleri β -talasemi majorde olduğu gibidir. Hemoglobin elektroforezinde HbA, HbF ve HbA₂ seviyeleri değişkenlik göstermektedir.

β -Talasemide Tedavi

Beta talasemili hastalarda önerilen güncel tedavi şekli WHO'nun önerdiği şekilde hipertransfüzyon tedavisidir (60). Hipertransfüzyon tedavisinde amaç; pretransfüzyon Hb değerinin 9 gr/dl düzeyinde tutulması ve mümkün olduğu kadar genç eritrosit verilmesidir. Transfüzyonlara bağlı gelişen

hemosiderozisi önlemek için demir şelatör ilaç olarak desferrioksamin (DFO) kullanılmaktadır.

Transfüzyon Tedavisi:

Hb değerinin 9 gr/dl'nin altına düşmeyecek şekilde kan transfüzyonu uygulanması ile eritropoez tama yakın bir şekilde baskılanmaktadır. Endojen eritropoezin baskılanması ile kemik deformiteleri ve bunun neden olduğu komplikasyonlar önlenmektedir. Erken transfüzyona başlanması ve uygun transfüzyon rejimi ile kardiyomegali önlenmektedir. Transfüzyonlarla birlikte Fe şelasyon tedavisi verilmez ise kardiyomegali olmaksızın myokarda Fe birikimine bağlı kalp yetmezliği ve ölüm meydana gelebilir (61).

Transfüzyon tedavisindeki ana amaç hipoksiyi azaltmak ve bununla ilişkili gelişen kemikler ve kalpteki komplikasyonları önlemek, hiperkatabolizmayı ve intestinal Fe absorpsiyonunu azaltarak sonuçta büyüme-gelişmeyi normale yakın düzeye getirmektir. Bu bazı yazarlar tarafından önerildiği gibi endojen eritropoezi baskı altında tutabilmek için "süpertransfüzyon" programı ile mümkün olmaktadır. Bu programda hedef pretransfüzyon hemoglobin konsantrasyonunun 12 gr/dl'nin üzerinde tutulmasıdır (62).

Genel kanı ve öneri hemoglobini yüksek bir bazal hemoglobin düzeyinde tutmak için ortalama 3-5 hafta aralıklarla transfüzyon uygulanmasıdır. Transfüzyon aralığı hastalar arasında farklılık göstermektedir. Antilökosit antikor yapımını önlemek için yıkanmış eritrosit süspansiyonu veya lökosit filtresi kullanılmalıdır. Post-transfüzyon hemoglobin viskozite artışı, tromboz riskinde artış ve doku oksijenizasyonunda azalma nedeniyle 16 gr/dl'nin üzerine çıkarılmamalıdır (1).

Son yıllarda, özel tekniklerle hazırlanan genç eritrositler (neositler) verilmeye başlanmıştır. Böylece eritrositlerin daha uzun süre dolaşımında kalmaları sağlanarak transfüzyon sıklığı azaltılmıştır. Aynı zamanda hemosiderozis düzeyinde de azalma sağlanmaktadır. Ancak bu işlemin pratik olmaması özel alet ve sistemlere gereksinim nedeniyle pek kullanılmamaktadır (63).

Uygun transfüzyon rejimlerine karşın ortalama 8-9 yaş civarında hipersplenizm gelişmektedir. Hastaların yıllık transfüzyon ihtiyacı 250 ml/kg/yılı geçtiği zaman splenektomi önerilmektedir. Splenektomi sonrası eritrosit ömrü daha uzun olmaktadır (64). Splenektomi transfüzyon ihtiyacını 150-180 ml/kg/yıla indirebilmektedir. Splenektomi 5-6 yaşlarından önce önerilmemekte ve splenektomili hastalarda pnömokok sepsisi olasılığı nedeniyle splenektomiden 3-4 hafta önce polivalan pnömokok aşısı ve yaşam boyu penisilin profilaksisi önerilmektedir (65). Önerilen diğer aşilar ise H. influenza tip B ve meningokok aşilarıdır.

Transfüzyon komplikasyonları arasında uzun dönemde çıkan ve en önemlisi demir birikimi ve bunun sonucunda parankimal organ hasarıdır. Ayrıca minör kan grup antijenlerine karşı gelişen alloimmünizasyon, transfüzyon yoluyla bazı viral enfeksiyonların bulaştırılması, lökosit antijenik determinantlarına karşı febril reaksiyon, plazma komponentlerine karşı allerjik reaksiyonlar diğer komplikasyonlar arasındadır.

Şelasyon Tedavisi:

Şelasyon tedavisi yapılmayan β -talasemi homozigot hastalarda transfüzyonlara bağılı olarak demir yüklenmesi yani sekonder hemosiderozis gelişmektedir. Hemosiderozis gelişen hastalar yaşamlarının 2. yada 3. on yılında organ yetmezliği ile ölürler. Talasemili hastalarda en sık ölüm nedeni myokardda demir birikimine bağılı gelişen kalp yetmezliği, ikinci sırada ölüm nedeni ise transfüzyonlarla geçen viral enfeksiyonlar ve demir depolanması nedeniyle gelişen karaciğer yetmezliğidir.

Her bir ünite kan transfüzyon ile hastalara yaklaşık 180 mg Fe verilmektedir. Bir hastanın yılda ortalama 25-30 ünite transfüzyon aldığı kabul edilirse hastalarda her yıl ortalama 4.5-5.5 gr kadar Fe yüklenmesi olacaktır. Şelasyon tedavisi almayan bir çocuk 10 yaş civarında Fe'in myokard fibrillerinde birikip, myokardial hemosiderozise sebep olmasıyla kalp yetmezliğinden kaybedilmektedir. Demir düzeyi dokularda ve dolaşımda demir bağlama

kapasitelerini aşınca serbest demir ortaya çıkmaktadır. Serbest demir oksijen radikallerinin yapımını arttırmakta, artmış oksijen radikalleri, hücre membran lipidlerini peroksidederek DNA ve diğer hücre organellerinde harabiyet yapabilmektedir (1).

1960'lı yıllarda Fe'in vücuttan atımı için demir bağlayıcı ajan olarak desferrioksamin (DFO) kullanılmaya başlanmıştır. Şelasyon tedavisinde amaç hastalarda demir yüklenmesini en aza indirerek negatif demir dengesi yaratmaktır. DFO intravenöz infüzyon ve subkutan yavaş infüzyon yoluyla kullanılmaktadır. DFO tedavisinin 3 yaş altında uygulanması büyüme geriliği yapması nedeniyle önerilmemektedir. DFO tedavisi ferritinin ortalama 1000 ng/ml düzeylerinde olduğunda başlanmakta, bu da pratik olarak 12-14 transfüzyona eşdeğer olmaktadır. Teorik olarak 100 mg DFO 9 mg Fe bağlamaktadır. Subkutan infüzyon yapan pompa aracılığıyla önerilen ortalama doz 30-40 mg/kg/8-10 saatte ve haftada 5-6 gün uygulanmalıdır. Sürekli subkutan infüzyon ile anlamlı plazma ve doku ilaç konsantrasyonu sağlanabilmektedir (66). İdrarla demir atımını arttırması nedeniyle DFO infüzyon günlerinde başlangıçta 100 mg/gün dozunda, daha büyük çocuklarda ise 200 mg/gün dozunda ağızdan C vitamini de önerilmektedir. DFO tedavisi ile serum ferritin düzeyinin 1000 ng/ml altında tutulması amaçlanmalıdır.

Desferrioksamin yüksek dozlarda önemli yan etkilere sahiptir (67). Lokal reaksiyonlar olarak infüzyon alanında şişlik, kaşıntı, döküntü ve hiperemi görülebilir. Anaflaktoid reaksiyonlar olabilir. Gözde görülen toksik etkiler katarakt, görme alanında azalma, gece körlüğü uzun ve yüksek doz DFO kullanımı sonucunda gelişebilir. Yine aynı kullanım şekliyle işitme problemleri meydana gelebilir.

DFO'nin etkinliğinin yanında sadece subkutan ve intravenöz kullanılması dezavantajdır. Etkin oral şelatör ajan olarak sadece L1 (deferiprone) bulunmaktadır (68). L1, 75-100 mg/kg/gün dozunda etkin olarak hepatik ve retiküloendotelial sistemden demir şelasyonu yapmaktadır. DFO'den farklı şekilde demire olan afinitesi ilaç konsantrasyonu ile yakından ilişkilidir. Bu

nedenle uzun dönemde demirin kardiyak toksisitesini önleyecek etkili kan düzeyi kesin bilinmemektedir (69). L1'in yan etkileri arasında idiosenkrozik agranülositoz (%2 sıklıkta), artropati, çinko eksikliği, gastrointestinal yan etkiler, karaciğer fonksiyon testlerinde bozulma bulunmaktadır (70). Yayınlanmamış gözlemler L1'in etkinliğinin daha az olduğunu göstermektedir (1).

Prenatal Tanı

Her iki ebeveyninde taşıyıcı olduğu durumlarda prenatal tanı ile sağlıklı veya taşıyıcı çocuk sahibi olunabilir. Son yıllarda hemoglobinopatilerin prenatal tanısında DNA yöntemleri rutin olarak kullanılmaktadır. Gebeliğin 9-10. haftalarında alınan koriyonik villustan DNA izole edildikten sonra mutasyonun olduğu bölge, bu mutasyonu tanıyan proba PCR tekniğiyle çoğaltılmaktadır. Aynı bölge normal prob kullanarak da çoğaltılmakta ve DNA'nın özelliğine göre tanı konulmaktadır. Talasemi mutasyonunun bilinmediği durumlarda gen haritalama yöntemi ile tanı konulmaktadır (1).

İn vitro hemoglobin sentezi için fetal kan gebeliğin 18-20. haftalarında ultrasonografi eşliğinde kordosentez ile alınmaktadır. Kolon kromatografisi ile hemoglobin alfa, beta ve gama globin zincirlerine ayrılır. Bu bölgelerdeki radyoaktivite oranına bakılarak fetüsün normal, taşıyıcı veya hasta olup olmadığına karar verilir. Bunların dışında gen dizi analizide yapılabilmektedir (2).

Talasemide Yeni Tedavi Yaklaşımları

Kemik İliği Transplantasyonu

İlk kez 1982 yılında talasemide kemik iliği transplantasyonu başarı ile yapılmıştır (71). Galimberti ve arkadaşları (72,73) 802 hastayı içeren serilerinde hepatomegali, biopside portal fibrozis ve düzensiz demir şelasyon tedavisini risk faktörleri olarak kabul etmişlerdir. Yalnız bir risk faktörü içeren grup Class I, iki risk faktörü olan Class II ve üç risk faktöründe bulunanları Class III olarak

ayırımışlardır. Sağkalım yüzdesi Class I, II, III'de sırasıyla %95, %84, %79 olarak bildirilmiştir. Elde olan veriler iyi şelasyon yapılan ve karaciğer hastalığı olmayan olguların çoğunda kemik iliği transplantasyonu ile tam kür olabileceğini göstermektedir.

Gen Tedavisi

Kemik iliği kök hücrelerine normal globin geni transferi ile talasemide tedavi amacıyla kullanılması hayvan deneyleri düzeyinde devam eden araştırmaların sonuçlarıyla gelecekte açıklığa kavuşacaktır (74).

Hemoglobin F Yapımının Arttırılması

Fetal hayatta aktif fakat daha sonra süprese olan gamaglobin reaktivasyonunu sağlayarak HbF sentezinde artış yapan bazı ilaçlar vardır. Bu ilaçlarla tedavide amaç gama zincir yapımını arttırarak çöken alfa zincirlerini azaltmaktır. Deneysel olarak hayvanlarda ve bazı hastalarda kullanılan sitoredüktif ajanlar 5-azacytidine, hidroksiüre, vinblastine ve sitarabindir (75). Hidroksiüre; orak hücreli anemide yaygın olarak kullanıldığı halde çok kısıtlı sayıda talasemi intermedia ve talasemi majorlü hastalara uygulanmış ancak toksik etkileri ve hemoglobin düzeylerini çok fazla arttırmamaları ve minimal olan artışın kısa süreli devam etmesi gibi nedenlerden dolayı geniş kullanım alanı bulmamıştır. Oral yolla güvenle kullanılabilen L-Carnitine'in taalsemi majorlü hastalarda transfüzyon sıklığını azalttığı Yeşilipek ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (76). Kanser tedavisinde kullanılan 5-azacytidine HbF yapımını arttırması nedeniyle β -talasemi majör'de ve orak hücreli anemide kullanılmışsa da ilacın karsinojenik etkileri ve HbF artımını uzunsüreli sağlamaması nedeniyle bu tedavi de bırakılmıştır. Diğer ajanların bu amaçla insanlarda kullanımı mümkün olmamıştır.

Akış Sitometri Çalışma İlkeleri

Akış sitometre, sıvı bir ortam içinde dağılmış olarak bulunan hücre veya partiküllerin özelliklerinin incelendiği bir tekniktir. Partikül veya hücreler tek sıra şeklinde özel bir bölmeden istenen hızda akarak geçerler. Bu sırada incelenecek olan hücrelerin üzerine belirli bir dalga boyunda laser ışığı gönderilir ve hücrelerden yansıyan ışığın özellikleri alıcılar tarafından kaydedilerek, değerlendirilmek üzere bilgisayara aktarılır. Alıcılardan biri hücrelerin büyüklüklerini, diğeri granülaritesini ve bir diğeri ise yansıtıkları flouresans yoğunluğunu algılar. Bu bilgiler bilgisayar yardımı ile histogramlar şeklinde korele edilerek incelenebilmektedir. Hücreler tek sıra halinde alıcıların önünden geçtiği için, çok kısa bir süre içinde binlerce hücrenin her birinin özellikleri tek tek kaydedilebilmektedir. Histogramlar üzerinde büyüklük ve granülaritelerine göre değişik alanlarda toplanan hücre popülasyonlarının etrafına çizilen pencereler ile sadece istenilen popülasyonlar üzerinde değerlendirme yapmak mümkündür. Flouresans ile bağlanmış monoklonal antikolar kullanılarak incelenen hücrelerin üzerindeki antijenik yapılar tanınabilmektedir. Böylece hücre yüzey işaretleri saptanarak normal veya patolojik hücrelerin tiplendirilmesi yapılabilmekte ve hastalık durumlarında tedavilere verdikleri yanıtlar monitörize edilebilmektedir. Akış sitometre ile süspansiyon haline getirilebilen her hücre popülasyonu üzerinde çalışma yapmak mümkündür (77).

OLGULAR VE YÖNTEM

Denekler:

Çalışma Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Bilim Dalında Ocak 1998-Mart 1999 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Çalışmada, Pediatrik Hematoloji Bilim Dalında talasemi major tanısıyla izlenen 9 hasta hasta grubunu oluşturmuştur. Bu hastalarda periferik kanda normoblastemi olması çalışmaya alınma kriteri kabul edildi. Talasemi komplikasyonu dışında akut veya kronik sistemik hastalığı olanlar çalışmaya alınmadı.

Kontrol grubu olarak akut veya kronik sistemik hastalığı olmayan, elektif şartlarda Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim dalında ameliyat edilen, yaşları 17 ile 40 arasında değişen hastalar alındı. İşlemden önce bireylerden izin alındı. Kemik iliği aspirasyonu genel anestezi başladıktan sonra steril koşullarda uygulandı.

Bu özelliklere uygun talasemi major tanısıyla izlenen 9 hasta çalışmaya alındı. Hastaların yaşları 6-20 yaş arasında değişmekteydi. Cinsiyetleri 5 erkek ve 4 kızdı. Hastalar Pediatrik Hematoloji Bilim Dalında tanı aşamasından itibaren veya en az 4 yıldır izlenmekteydi. Kontrol grubuna 8 sağlıklı erişkin alındı.

Kan ve Kemik İliği Örneklerinin Alınması:

Talasemi majorlu hastaların periferik kanda normoblastemi saptananlardan kan transfüzyonu yapılmadan önce 10 ml venöz kan EDTA-K3'lü deney tüpüne alındı. Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalında ameliyat edilecek erişkinlerden operasyon sırasında spesifik iğneyle kemik iliği aspirasyonu uygulandı. Alınan ilik materyeli EDTA-K3'lü tüpe konuldu. Alınan kan ve kemik ilikleri hızla akış sitometri analizi öncesi hazırlık işlemine alındı.

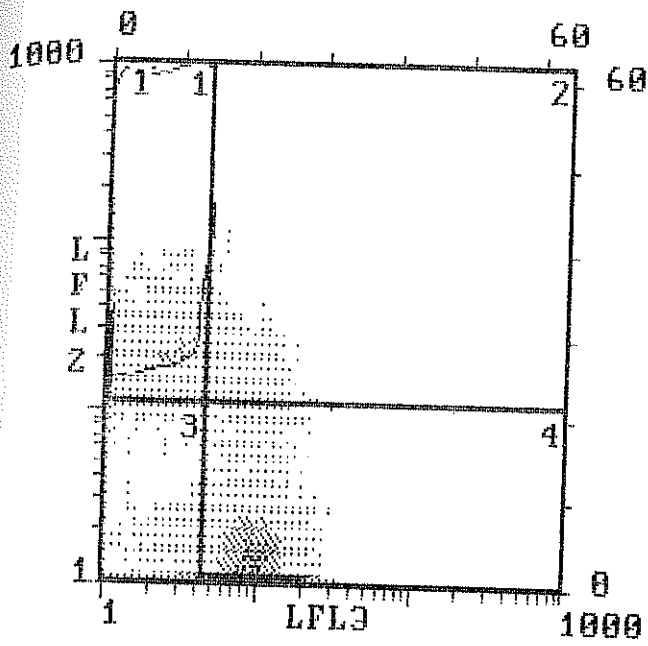
Örneklerin Çalışılması:

Steril olarak alınan kemik iliği aspirasyonu 1:1 RPMI-1640 ile dilüe edildi. Ficoll Separating Solution (Seromed) ile mononükleer hücreler ayrıldı.

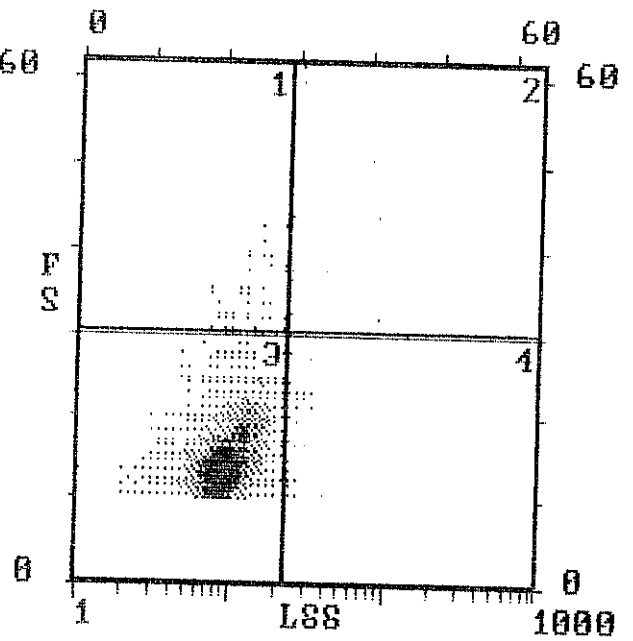
Hücreler 3 kez RPMI-1640 ile yıkandı. Hücre sayısı 5×10^6 hücre/test olarak hesaplandı. Test tüpüne 5×10^6 hücre ve 20 μ l CD 95 (monoclonal antibody, CD95-FITC, Immunotech Company, France) 20 μ l CD45 (monoclonal antibody, CD45, PE-Cy5, Immunotech Company, France) 20 μ l anti-Glycophorin A-PE (monoclonal antibody, Immunotech Company, France) eklendi. 15 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda geçirilerek akış sitometri cihazı ile değerlendirildi.

Akış Sitometri Analizi

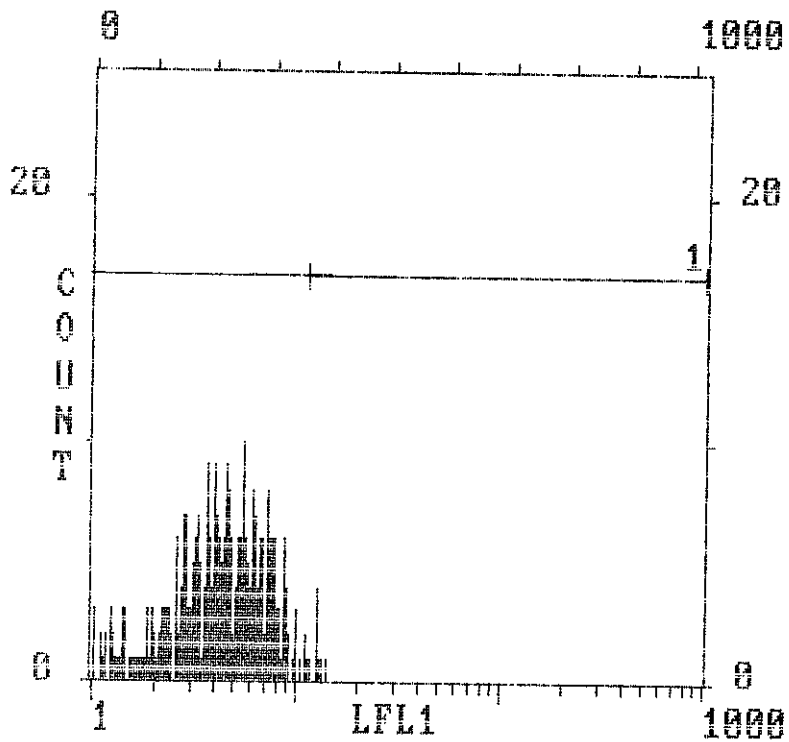
Akış sitometri ile yapılan analizler Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Özel Hematoloji Laboratuvarında bulunan akış sitometri cihazı (Epics Profile II, Coulter Electronics, Inc., FL, U.S.A) kullanılarak gerçekleştirildi. Akış sitometri cihazı 15 μ çapındaki boncuklar (Immunocheck, Coulter Electronics, Inc., FL, U.S.A.) ile kalibre edildi. Periferik kan eritroblastları analiz etmek için akış sitometri cihazında Glukoforin A (+), CD45 (-) hücre popülasyonuna kapı alındı (Şekil 4). Alınan bu kapının ön (forward) saçınım ve 90⁰ yan saçınım (right-angle light scatter) histogramında mononükleer hücre popülasyonu içinde olduğu kanıtlandı (Şekil 5). Bu hücre popülasyonunun CD95 bağlaması tek renk histogramda hücre başına düşen ortalama reseptör yoğunluklarının arbitrary ünitesi olarak ortalama fluoresan kanal numarası (OKFN) kullanıldı. CD95 ekspresyonu gösteren hücre popülasyonu Şekil 6'da gösterilmektedir.



Şekil 4.



Şekil 5.



Şekil 6.

İstatistik

İstatistik analizler SPSS hazır istatistik paket programı (SPSS for Windows, Version 5.0.1, SPSS Inc., IL, U.S.A) kullanılarak gerçekleştirildi. Talasemili hastaların periferal kanından ve sağlıklı erişkinlerin kemik iliğinden elde edilen eritroblastlardaki CD95 reseptör yoğunluğunun bir göstergesi olan ortalama fluoresan kanal numarası (OKFN) arası karşılaştırmalar "*Mann-Whitney U*" testi ile yapıldı. Gruplar arasında eritroblast CD95 yoğunluğu korelasyonları "*Spearman korelasyon katsayısı*" ile test edildi. Metin içerisinde, tablolarda geçen değerler ortanca (minimum-maksimum) değeri olarak alındı. p değerinin 0.05'den küçük olması anlamlı olarak kabul edildi.

SONUÇLAR

1. Talasemi majorlü hastalarda periferik kan eritroblastların hücre başına düşen CD95 (Fas) reseptör yoğunluğunun bir göstergesi olarak kullanılan ortalama OKFN 2.988 (2.380-4.970) olarak saptandı (Tablo-6).

2. Sağlıklı erişkinlerin kemik iliği eritroblastlarında hücre başına düşen CD95 (Fas) reseptör yoğunluğunun bir göstergesi olarak kullanılan ortalama OKFN 8.578 (3.151-10.880) olarak saptandı (Tablo-6 ve 7).

Tablo-6: Normal kemik iliği ve T. majorlu hastaların eritroblastlardaki CD95 reseptör yoğunluğu değerleri

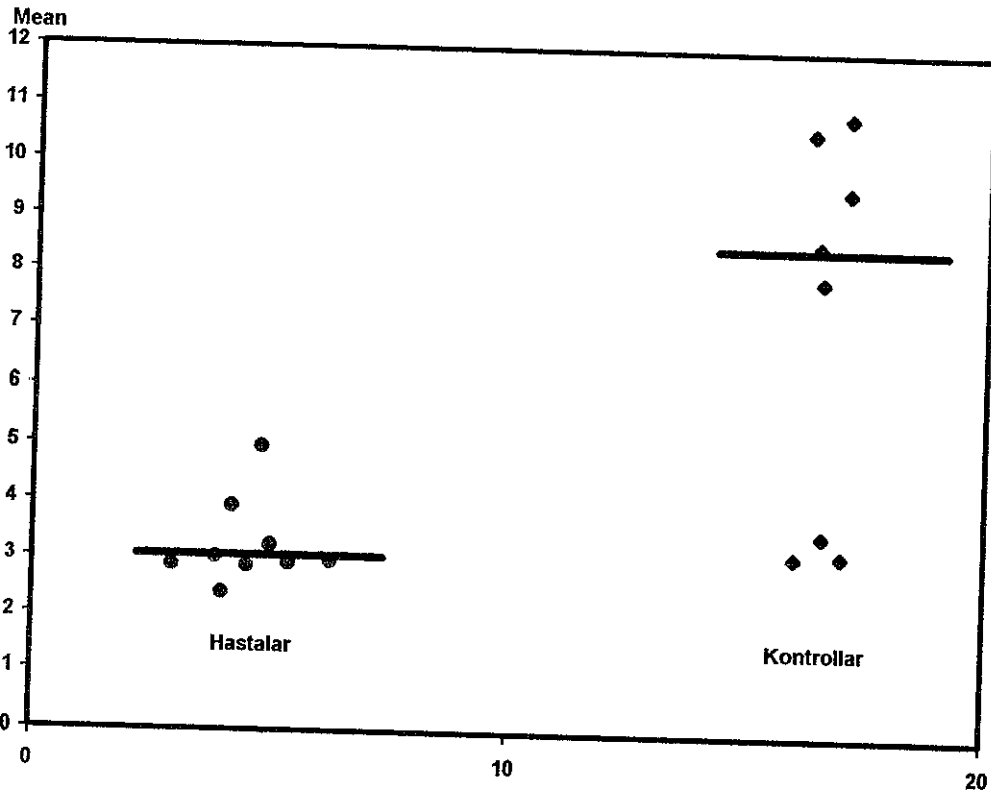
CD95 reseptör	Ortanca	Minimum	Maksimum
Yoğunluğu (OKFN)			
T. majorlu hastaların	2.988	2.380	4.970
Periferik kanı (Vaka)			
Sağlıklı erişkin	8.578	3.151	10.880
Kemik iliği (Kontrol)			

3 Erişkin kemik iliği ve T. majorlu hastaların periferik kan eritroblastlarda CD95 reseptör yoğunlukları (OKFN) arasında anlamlı fark bulundu ($p=0.0084$) (Şekil 7). Bu farka göre CD95 (Fas) reseptör yoğunluğu sağlıklı erişkinlerin oluşturduğu kontrol grubunda daha yüksek saptandı.

Tablo-7: Hasta ve kontrol grubu olgularının her birinde eritroblastlarında CD95 (Fas) reseptör yoğunlukları

Olgu No	CD95 reseptör yoğunlukları (OKFN)	
	Hasta	Kontrol
1	2.868	3.526
2	3.016	7.922
3	2.855	10.6
4	4.97	9.569
5	3.24	8.578
6	2.913	3.151
7	2.959	3.175
8	2.38	10.88
9	3.909	

Şekil-7 : Sağlıklı erişkin ve talasemi majorlu hastaların CD95 reseptör yoğunluklarının şematik olarak karşılaştırılması (Ortanca değer:—).



TARTIŞMA

Talasemi majorde gelişen moleküler ve fizyopatolojik olayların tüm basamakları tam olarak hala bilinmemektedir. Talasemi major hastalarında tedavinin amacı; yaşamlarını daha kaliteli şekilde idame ettirmektir. Daha iyi ve kaliteli yaşam için kan transfüzyonu ve şelasyon tedavileri dışında yeni tedavi yöntemleri araştırılmaktadır (1). Kemik iliği transplantasyonu başarı oranının yüksek olmasına karşın uygun donör olmayınca yapılamayan etkin bir tedavi şeklidir.

Organizmada gelişen birçok farklı fizyolojik olaylar zincirinde programlanmış hücre ölümü (apoptozis) değişik noktalarda önemli yönlendirici ve sonuçlandırıcı rol oynamaktadır. Yapılan birçok çalışmada ise hastalıklardaki rolü kanıtlanmıştır. Apoptozisin hücre bölünmesinin ileri düzeyde olduğu kemik iliğinde hücre proliferasyonu, matürasyonu ve yaşam süresinin belirlenmesinde önemli role sahiptir (15,16,17,18).

Apoptozisin hematolojik hastalıkların patogeneğinde rol oynaması talasemi major gibi hematopoezis aşamasında gelişen genetik sentez yetersizliğinde de etkin olabileceğini düşündürmektedir (78).

27 yıl önce Kerr ve arkadaşları (79) tarafından apoptozis nekrozdan ayırt edilmiştir. Bu saptamanın ardısıra apoptozisin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri tanımlanmaya başlamıştır. Prenatal yaşamdaki bazı sistemlerin gelişmesinde ve involüsyonunda önemli rol oynar (80). Prenatal hematopoeziste vitellus kesesi, karaciğer ve kemik iliğinde hemoglobin üretim zincirlerinin geçişlerinde de olasılıkla etkin rolü kurgulanmıştır. Postnatal yaşamda yaşlanmayla kemik iliği sellüleritesinin kaybında yine olası rolü olabileceği düşünülmektedir (81).

Koury ve arkadaşları (6) eritroid prekürsörlerde eritropoetin yokluğunda apoptozisde karakteristik olarak görülen DNA fragmanlarının oluştuğunu gözlemişlerdir. Bunun sonucunda eritropoetin apoptozisi önleyerek eritrosit üretimini kontrol ettiklerini öne sürmüşlerdir. Hematopoetik büyüme faktörleri

(EPO, GM-CSF, G-CSF, IL-3) kemik iliği kök hücrelerinin apoptozise gidişini engeller (82). Normal insanlarda milyarlarca hergün eritrosit öncü hücrelerin yüzlercesi EPO bağımlı evreye ulaşan eritroid kök hücrelerinin bir kısmıdır. EPO, GM-CSF, G-CSF, IL-3 büyüme faktörleri dışında trombopoetinde apoptozisi inhibe ederek eritropoezi stimüle ettiği rapor edilmiştir (83). Antiapoptotik genlerin az ekspresyonu nedeniyle immatür eritroblastlar özellikle EPO yokluğunda kaybedilmektedir. EPO'nin "Bcl XL" (Birçok sistemde hücre ölümünden korunmada Bcl-2 ailesinin bir üyesi) indüksiyonu yoluyla apoptozisi baskıladığı gösterilmiştir (84).

Fas antijeni reseptör olarak çalışarak doğal ligandlar veya agonistik antikolar ile kaskadı başlatarak apoptozise yol açar. Fas reseptörünün organizmada ki doğal ligandı tip II membran proteini olan FasL (Fas ligand)'dır. Fas ile FasL ilişkisi potansiyel olarak zararlı ve gereksiz hücrelerin fizyolojik olarak yok edilmesinde önemlidir. Azalmış Fas ekspresyonu hücre birikimine sebep olurken uygunsuz ekspresyon veya artmış Fas aktivitesi doku hasarıyla sonuçlanmaktadır (23).

Normal insan eritroid koloni oluşturan ünite hücrelerinin çok azında Fas ekspresyonu bulunmaktadır. Bu bulgu Northern blotting ile Fas mRNA incelemesi veya spesifik fare monoklonal antikoru kullanılarak Fas proteininin akış sitometrik analizi ile gösterilebilmektedir (85).

Nagafuji ve ark. (86) yaptığı çalışmada kültür ortamındaki sadece medyum içinde bulunan CD34+ hücrelerinde düşük düzeyde Fas ekspresyonu gözlemişlerdir. CD34+ hücrelerde ki Fas ekspresyonu TNF- α (tümör nekrozis faktör) ve İnterferon- γ ile artırılmıştır. Çalışmanın sonucunda İFN- γ ve TNF- α negatif hematopoetik regülatör olarak bilindiği ve bu etkiyi de progenitör hücrelerde fonksiyonel Fas indüksiyonu yoluyla yaptığını ileri sürmüşlerdir.

Fas-Fas ligand ilişkisi hematopoetik hücre homeostazisinin korunması ve devamlılığında önemli rol oynamaktadır. T ve B lenfositleri, granüositler ve doğal katil hücrelerin fizyolojik delesyonu homosellüler veya heterosellüler FasL üretimini takiben Fas reseptör etkileşimi sonucunda olmaktadır (9).

De Maria ve ark. (7) yaptıkları çalışmada eritropoezis regülasyonunda Fas ve Fas ligand ilişkisini araştırmışlardır. Normal kemik iliğinde immatür eritroblastların major apopitotik popülasyon olduğu bulunmuştur. İn situ apopitozisi saptamak için sağlıklı donörlerden alınan kemik iliği örnekleri normal koşullar altında değerlendirilmiş. İmmatür eritroblastların çoğunlukla bazofilik evrede eritropoetin bağımlı olduğu ve EPO yokluğunda apopitozise gittikleri görülmüştür. İmmatür eritroblastların matür eritroblastlara göre daha fazla (immatür eritroblastların %90'ı) Fas eksprese ettikleri matürasyon süreci boyunca bu ekspresyonun azaldığı akış sitometri analizi ile gösterilmiştir. FasL ekspresyonunun ise %60-70 hücrede olduğu ve bu hücrelerin büyük çoğunluğunun matür eritroblastlar olduğu bulunmuş. Bu da FasL ekspresyonunun eritroid farklılaşma işlemi sırasında gerçekleştiğini düşündürmektedir. İmmatür eritroblastlar Fas eksprese ederler ve FasL üreten matür eritroblastlar varlığında apopitozise giderler. Bu süreç ancak eritropoetinin yüksek düzeyleri ile engellenebilmektedir. Matür eritroblastlar Fas'ın indüklediği apopitozise rezistanlardır. Bu çalışmaya göre apopitozise en hassas hücrelerin prebazofilik ve bazofilik evre olduğu gözlenmiştir. Sonuçta kemik iliğinde ki eritropoetik adanın etrafında yoğun bulunan matür eritroblastlar tarafından masif FasL üretimiyle eritropoetik adanın ortasında yer alan immatür eritroblastlar apopitozise giderek homeostazise katkıda bulunmaktadır. De Maria ve ark.nın (7) bu çalışması eritropoezisin Fas/FasL etkileşimi yoluyla regüle edildiğinin önemli bir kanıtıdır.

Bu bulgular; matür eritroblastlarda ki fonksiyonel FasL'in yüksek seviyelerde olmasıyla diseritropoezis ve anemi ile sonuçlanan hastalıklarda önemli patogenetik rol oynayabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde immatür eritroblastlarda ki Fas reseptör ekspresyonunun artışı da aynı patolojiyle sonuçlanabilir. Sitokinler, inflamatuvar faktörler veya bazı kalıtsal kan hastalıkları Fas/FasL ilişkisi üzerine etki ederek kendilerini gösterebilirler.

Kalıtsal kan hastalıkları arasında dünyanın belirli bölgelerinde oldukça sık görülen Talasemi sendromlarının moleküler fizyopatolojisinde halen tam açıklanamayan basamaklar bulunmaktadır (1,2).

Talasemili majorlü hastalarda ise apoptozisin varlığına ilişkin ilk veri Yuan J. ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır (3). Denek olarak ağır β -talasemi (Cooley anemisi) tanısıyla izlenen ve kemik iliği transplantasyonu planlanan hastaları ve kontrol grubu olarak kemik iliği donörlerini almışlardır. Her iki grubun kemik iliğinden CD45 (-) hücreler ayırt edilerek %95'den fazla sayıda eritroblastlardan oluşan süspansiyon elde edilmiş. Eritroblastların lizise uğratılmasından sonra hücre çekirdeklerinin parçalanması sonucunda süpernatant sıvıda biriken DNA zincirlerini agaroz jel elektroforezinde incelemişler. β -talasemili hastalarda apoptozis için tipik merdiven paternini elektroforezde saptamışlardır. Bu bulgu sağlıklı bireylerde görülmemesine karşın Talasemi trait olgularında hafif düzeyde elektroforez ile gösterilmiş CD45 (+) hücreler (lenfoid ve myeloid prekürsörler) ise süpernatant elektroforezinde merdiven paternini göstermemiştir. Araştırmacılar talasemi majorlü hastalarda eritropoezin erken evrelerinde hücrelerde α -globin zincir birikimini saptamışlardır. Bu birikim hücrenin matürasyon sürecinde giderek artmaktadır. Çalışma sonunda anormal α -globin birikiminin bir sonucu olarak apoptozisin meydana geldiği vurgulanmaktadır. Apoptozisin belki de intramedüller hemolizi açıklayabileceği yorumlanmaktadır.

Talasemi majorlü hastalarda apoptozisin varlığını gösteren bu çalışmadan sonra kendi araştırmamızda T. majorlü olguların periferik kan eritroblastlarında ki Fas ekspresyon düzeyini göstermeyi amaçladık. Normal insanlarda eritrosit progenitörlerinde Fas ve Fas ligand ekspresyonu De Maria ve ark. ları (7) tarafından araştırılmış olmasına karşın Talasemili hastalarda benzer çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Çalışmamızda sağlıklı erişkin kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda talasemi majorlü hastaların periferik kan eritroblastlarında daha düşük düzeyde

Fas ekspresyonu olduğu bulundu. Bu bulgu istatistik değerlendirilme sonucunda anlamlı kabul edildi ($p=0.0084$).

Çalışmamıza talasemi major tanısı ile Pediatrik Hematoloji Bilim Dalında izlenen ve kriterlere uygun 9 hasta alındı. Hasta grubuyla karşılaştırmak için normal eritroblastların elde edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla ortopedi operasyonuna elektif koşullarda alınan sağlıklı erişkin bireylerin kemik iliği kullanıldı. Bu bireylere işlem anlatıldıktan sonra izin alındı. Kontrol grubunu 8 kişi oluşturdu. Etik kurallara uygun olmadığı düşünülerek talasemi majorlu hastalardan kemik iliği aspirasyonu yapılmadı. Çalışmanın ideal koşullara uygunluğu en iyi her iki grubun kemik iliğinden alınan eritroblastları karşılaştırarak olabilirdi.

Kontrol grubu kemik iliği eritroblastlarında daha yüksek Fas ekspresyonu beklenen sonuç ile uyumsuzluk gösteriyordu. Talasemi majorlü hastalarda sağlıklı insanlarla karşılaştırıldığında kemik iliğinde artmış apoptozis önceki araştırmada raporlanmıştır (3). Apoptozisi tetikleyen ve "Ölüm reseptörleri" arasında bulunan Fas (CD95) ekspresyonunun kontrol grubuna göre daha yüksek düzeyde olması kabul edilebilir bir sonuçtur. Beklenen sonuçtan farklı veriler bulunması birkaç şekilde açıklanabilir:

1. Çalışmada talasemi majorlü hastaların periferik kan eritroblastları ile sağlıklı erişkin kemik iliği eritroblastları karşılaştırılmıştır. Kemik iliğinde daha fazla eritroid prekürsör bulunması, immatür hücre oranının daha yüksek olması bunda etkin olabilir. De Maria ve ark. nın (7) çalışmasında immatür eritroblastlarda daha fazla Fas ekspresyonu ve matürasyon süreci sonunda Fas ekspresyonunda azalma olurken FasL ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir. Periferik kanda dolaşan eritroblastların kemik iliğinde ki hücrelere göre daha fazla matür olduğu düşünülecek olursa Fas ekspresyonundaki azlık bu şekilde açıklanabilir.
2. Talasemi majorde artmış kemik iliği hücre yapımı dışında ekstramedüller hematopoez varlığı bilinmektedir. Hastaların transfüzyon randevularına geç gelmeleri sonucunda belirgin normoblastemi olanlar çalışmaya alınmıştır.

Bu hastalarda ekstramedüller hematopoezin başlamış olması olasıdır. Kemik iliği dışında yapılmış eritroblastların Fas ekspresyonu hakkında bilgi yoktur. Dolayısıyla Talasemili hastalarda ek kan yapım kaynağı olan bu organlarda (karaciğer, dalak, retiküloendotelial sistem) daha az Fas eksprese edilen eritrosit yapımı olabilir.

3. T. majorlülerde kemik iliğinde artmış apoptozisten düşük düzeyde Fas ekspresyonu nedeniyle kurtulan eritroid prekürsörlerin değerlendirilmesiyle bu sonuçlara ulaşılmış olabilir.
4. Tüm bunların dışında belki de bilinmeyen nedenlerle talasemi majorlü hastalarda zaten artmış olan intramedüller hemoliz sonucunda kısalan eritrosit ömrünü uzatmak için Fas ekspresyonu azaltılarak organizma apoptozisten kaçış yolunu seçmektedir. Bu yorumu destekler bir çalışma bulunmamaktadır.

İlk ve ikinci olasılığın test edilmesi için hasta ve kontrol gruplarında kemik iliği kaynaklı eritroblastların kullanılması gereklidir. Bu şekilde farklı matürasyon sürecinde ve benzer sayıda progenitör hücreler değerlendirilmiş olur.

Talasemi major hakkında sahip olduğumuz bilgilerin artışı, apoptozis varlığına ve hangi yolla başlatıldığına dair yapılacak araştırmalar konuya açıklık getirecektir. Tüm bunların sunucunda T. majorün tedavisinde yeni gelişmelerin olması olasıdır.

SONUÇLAR

1. Talasemi majorlü hastalarda hemolitik aneminin fizyopatolojisi tam olarak açıklanamamıştır. Apoptozis fizyopatolojik basamaklarda rol oynayabilir. Apoptozisi uyaran Fas (CD95) reseptörü birçok farklı hastalığın patogenezinde önemli bir role sahiptir. Bu çalışmada eritroid prekürsörlerde ki Fas reseptör yoğunluğu karşılaştırması amaçlandı.
2. Hasta grubuna talasemi majorlü hastalar (9 hasta), kontrol grubuna ise sağlıklı erişkin bireyler (8 erişkin) alındı.
3. Kontrol grubu kemik iliği eritroid prekürsörlerde ki Fas reseptör yoğunluğu hasta grubu periferik eritroid prekürsör Fas reseptör yoğunluğuna göre daha fazla saptandı. Bu sonuç istatistik olarak da anlamlı bulundu ($p=0.0084$).
4. Çalışmamızın sonucu apoptozisin talasemi major fizyopatolojisine olan etkisinin ve Fas reseptör yoğunluğunun bu etkideki rolünün araştırılması gerektiğini vurgulamaktadır.

ÖZET

Beta talasemi major; yaşamı devam ettirebilmek için düzenli ve sürekli kan transfüzyon ihtiyacı olan kalıtsal hastalıkların bir grubuna denilmektedir. Otozomal resesif geçiş gösteren bu hastalığın fizyopatolojisinde halen bilinmeyen basamaklar bulunmaktadır. Talasemi majorün tam olarak anlaşılması hastalığın genetik özelliklerinin ve patogenezinin araştırılmasıyla olacaktır.

Özellikle son yıllarda üzerinde oldukça sık durulan apopitozis, hücrelerin proliferasyon, matürasyon ve yok olmasında fizyolojik rol oynamaktadır. Birçok sistemin fizyolojisinde ve hastalıkların patogenezinde apopitozisin etkin rol oynadığı çalışmalarla gösterilmiştir. Benzer araştırmalar hematopoezis sırasındaki apopitozis içinde olmasına karşın talasemi majordeki etkinliği hakkındaki bilgiler sınırlıdır.

Talasemi majorde kemik iliği eritroblastlarında artmış apopitozisin varlığı saptanmıştır. Fas (CD95;APO-1); "Ölüm reseptörleri" olarak bilinen ailenin en önemli üyesidir. Fas reseptörünün Fas Ligand ile uyarılması sonucu hücrede apopitozis işlemi başlamaktadır.

Bu çalışma ile talasemi majorlü hastalardaki periferik kan eritroblastların Fas ekspresyon düzeyleri sağlıklı erişkinlerin kemik iliğinde bulunan eritroblastlar ile karşılaştırıldı. Bu amaçla 9 talasemi majorlü hasta ve 8 sağlıklı erişkin çalışmaya alındı. Hastalarda periferik kan eritroblast Fas reseptör yoğunluğu ile sağlıklı erişkin kemik iliği eritroblast Fas reseptör yoğunluğu karşılaştırıldı.

Çalışmanın sonucunda beklenenden farklı olarak talasemi majorlü hastaların periferik kan eritroblastlarında sağlıklı erişkin kemik iliğindeki eritroblastlara göre daha az düzeyde Fas eksprese ettiği saptandı. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu sonucun nedenlerinden birisi periferik kanda bulunan eritroblastların matürasyon düzeyindeki farklılıktan dolayı daha

az Fas eksprese etmesi olabilir. Talasemi majorlü hastalarda ekstramedüller hematopoez ile yapılan eritroblastların Fas ekspresyonları hakkında bilgi yoktur. Ekstramedüller hematopoez ile yapılan eritroblastlar daha az Fas eksprese edebilir. Talasemi majorde, periferde bulunan eritroblastlar kemik iliğinde artmış olan apoptozisten daha az Fas yoğunluğuna sahip olduğu için kurtulan hücreler olabilir.

Daha önce bu çalışmaya benzer bir çalışma olmadığı için literatür ile karşılaştırma yapılamadı. Bu nedenle elde edilen sonuçların yorumlanabilmesi benzer çalışmaların yapılması ile mümkün olacaktır. Tüm bunların sonucunda talasemi majorlü hastaların tedavisinde farklı bakış açıları ortaya çıkabilecektir.

KAYNAKÇA

1. Orkin SH, Nathan DG. The Thalassemias, in: Nathan DG, Orkin SH, Hematology of Infancy and Childhood. Philadelphia: WB Saunders, 1998; 811-886
2. Weatherall DJ. The Thalassemias. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA (eds). Hematology (4th ed), New York : Mc Graw-Hill, 1990:510-539
3. Yuan J. et al. Accelerated programmed cell death in erythroid precursors of patients with severe beta thalassemia. Blood, Vol 82, No 2, 1993: 374-377
4. Wickramasinghe SN, Bush V. Observations on the ultrastructure of erythropoietic cells and reticulum cells in the bone marrow of patients with homozygous β -thalassemia. Br J Haematol 1975;30: 395.
5. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. Science 1995;267:1445-1449.
6. Koury MJ, Bondurant MC: Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. Science 1990;248:378.
7. De Maria R, et al. Apoptotic role of Fas/FasL system in the regulation of erythropoiesis. Blood, 1999;Feb 1;93(3):796-803.
8. Nagata S. Fas and Fas ligand: a death factor and its reseptor. Adv Immunol 1994;57:129-144.
9. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. Science 1995;267:1449-1455.
10. Krammer PH. The CD95 receptor ligand system: Death signals and disease. Cell Death Differ 1996;3:159.
11. Hoffbrand AV, Pettit JE. Blood cell formation. Essential Hematology, Blackwell Scientific Publications, London. 1993;1-11.
12. Sieff CA, Nathan DG. The anatomy and physiology of hematopoiesis, Hematology of Infancy and Childhood. Philadelphia: WB Saunders, 1998;156-215

13. Sawyer S, Krantz S, et al. Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. *Blood* 1989;74:103.
14. Christensen RD, Ohls R. Development of the Hematopoietic System, *Textbook of Pediatrics*. WB Saunders, 1996; 1375-1378.
15. Cohen JJ. Apoptosis, *Immunol Today* 1993; 14:126-130.
16. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68:251-305.
17. Ekert PG, Vaux DL. Apoptosis and the immun system. *Br Med Bull* 1997;53:591-603.
18. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997;53:451-465.
19. Savill J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull* 1997;53:491-508.
20. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995;267:1445-1449.
21. Golstein P, Ojcius DM, Young D. Cell death mechanisms and the immun system. *Immunol Rev* 1991; 121:29-65.
22. Nagata S. Fas and Fas ligand: a death factor and its reseptor. *Adv Immunol* 1994;57:129-144.
23. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449-1455.
24. Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. *Immunol Today* 1995;16:569-573.
25. Bertinardi A, Brugnani D, Quiros-Roldan E, et al. Missense mutations in the Fas gene resulting in autoimmune lymphoproliferative syndrome: a molecular and immunological analysis. *Blood* 1997;89:902-909.
26. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-1462.
27. Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *The Lancet* 1993; 341:1251-1254.
28. Korsmeyer SJ. Bcl-2: an antidote programmed cell death. *Cancer Surveys* 1992;15:105-118.

29. Majno C, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis: an overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146:3-13.
30. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1993;328:327-35.
31. Cohen PL, Eisenberg RA. The lpr and gld genes in systemic autoimmunity: life and death in the Fas lane. *Immunol Today* 1992;13:427-428.
32. Muta K, et al. Apoptosis of human erythroid colony forming cells is decreased by stem cell factor and insulin like growth factor I as well as erythropoietin. *J. Cell Physiol.* 1993; 156(2): 264-71.
33. Kelley LL., et al. Survival or death of individual proerythroblasts results from differing erythropoietin sensitivities: a mechanism for controlled rates of erythrocyte production. *Blood* 1993 Oct 15; 82(8):2340-52.
34. Colombel M, et al. Hormone-regulated apoptosis results from reentry of differentiated prostate cells onto a defective cell cycle. *Cancer Res.* 1992 Aug 15;52(16):4313-9.
35. Reed JC, et al. Antisense-mediated inhibition of BCL2 protooncogene expression and leukemic cell growth and survival: comparisons of phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Cancer Res.* 1990 Oct 15;50(20):6565-70.
36. Clement MV, et al. Fas and tumor necrosis factor receptor-mediated cell death: similarities and distinctions. *J Exp Med.* 1994 Aug 1;180(2):557-67.
37. Critchfield JM, et al. T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 1994 Feb 25;263(5150):1139-43.
38. Bircan İ, Şişli S, Güven A, Çalı Ş, Yeğin O, Ertuğ H, Güven AG, Akar N. Hemoglobinopathies in the district of Antalya, Turkey. *Ped Hematol and Oncology* 1993, 10;289-291.
39. Wainscoat JS, Thein SL, et al: *Thalassemia intermedia.* *Blood Rev* 1987; 1:273.
40. Altay Ç, Gürgey A. β -Thalassemia in Turkey. *Hematol Reviews* 1992;6:77

41. Heywood JD, Karon M, et al: Amino acid incorporation into alpha and beta chains of hemoglobin by normal and thalassemic reticulocytes. *Science* 1964; 146:530.
42. Weatherall DJ, Clegg JB, et al: Globin synthesis in thalassemia: an invitro study. *Nature (Lond)* 1965; 212:1198.
43. Bargellesi A, Pontremoli S, et al: Absence of beta-globin synthesis in homozygous beta thalassemia. *Eur J Biochem* 1967; 1:73.
44. Gürgey A. Talasemi ve Hemoglobinopatilerde Yeni Görüşler. Tübitak Yayınları 1986, No:628, Ankara.
45. Rachmilewitz E, Shiner E, et al: Erythrocyte membrane alterations in beta thalassemia. *Clin Hematol* 1985; 14:163
46. Shinar E, Rachmilewitz E: Haemoglobinopathies and red cell membran function. *Baillieres Clin Haematol* 1993; 6:357.
47. Schrier SL: Thalassemia: pathophysiology of red cell changes. *Annu Rev Med* 1994; 45:211.
48. The beta and delta thalassemia repository. *Hemoglobin* 1992; 16:237-258.
49. Kan YW, Nathan DG, et al: Equal synthesis of alpha and beta globin chains in erythroid precursors in heterozygous beta-thalassemia. *J Clin Invest* 1972; 51:1906
50. Schwartz E: Heterozygous beta-thalassemia: Balanced globin synthesis in bone marrow cells. *Science* 1970; 167:1513.
51. Weatherall DJ, Clegg JB: *The Thalassemia Syndromes*. 3rd ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, Inc, 1981.
52. Kazazian HH Jr: The thalasseia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol* 1990;27:209.
53. Nienhuis AW, Anagnou NP, et al: Advances in thalassemia research. *Blood* 1984 Apr;63(4):738-58.
54. Orkin SH, Kazazian HH Jr: Mutation and polymorphism of the human beta-globin jenerasyon and its surrounding DNA. *Annu Rev Genet* 1984; 18:131.

55. Nathan DG, Gunn RB: Thalassemia: the consequences of unbalanced hemoglobin synthesis. *Am J Med* 1966; 41:815.
56. Fessas P, Loukupoulos D: The beta-thalassemia. *Clin Haematol* 1974; 3:411.
57. Wood WG, Weatherall DJ, et al: Interaction of heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin with beta thalassemia and sickle cell anemia. *Nature* 1976; 264:247.
58. Cooley TB, Lee P: Series of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes. *Trans Am Pediatr Soc* 1925;37:29.
59. Schwartz E, Benz EJ: The thalassemia syndromes, In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ et al (eds), *Hematology Basic Principles and Practice*, Churchill Livingstone, 1991,pp. 368-392.
60. Aksoy M, Birdwood GFB. Hypertransfusion and iron chelation in thalassemia. Hans Huber Publisher, Switzerland, 1985;9-48.
61. Model B, Letsky EA, Flynn DM, et al. Survival and Desferrioxamine in thalassemia major. *Br J Med* 1982; 284: 1081.
62. Propper RD, Button LN, et al. New approaches to the transfusion management of thalassemia. *Blood* 1980;55:55.
63. Cohen AR. Treatment of transfusional iron overload. *Am J Ped Hematology Oncology*, 1990,12:4.
64. Blendis LM, Modell CB, et al: Some effects of splenectomy in thalassemia major. *Br J Haematol* 1974; 28:77.
65. Piomelli S. Management of thalassemia major. *Hematol Reviews*. 1992; 6:137.
66. Propper RD, Cooper B, et al: Continuous subcutaneous administration of desferrioxamine in patients with iron overload. *N Engl J Med* 1977; 297:418.
67. Hershko C, Weatherall DJ: Iron-chelating therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1988; 26:303.
68. Nathan DG, Piomelli S: Introduction: oral iron chelators. *Semin Hematol* 1990;27:83.
69. Nathan DG: An orally active iron chelator. *N Engl J Med* 1995;332:953.

70. Hoffbrand AV: Oral iron chelation. *Semin Hematol* 1996;33:1.
71. Thomas ED, Buckner CD, et al: Marrow transplantation for thalassemia. *Lancet* 1982;11:8292.
72. Lucarelli G, Galimberti M, et al: Bone marrow transplantation in patients with thalassemia. *N Engl J Med* 1990; 322:417.
73. Galimberti M, Angelucci E, Sadorciani D, Giardini C, Polchi P, Erer B, Gaziev DJ, Pazzaglia C, Ciaroni A, Baldogari M, Martinelli F, Lucarelli G. Bone marrow transplantation in thalassemia 1997; 19(2): 45-47.
74. Friedmann T: Progress toward human gene therapy. *Science* 1989; 244:1275.
75. Hajjar FM, Pearson HA: Pharmacologic treatment of thalassemia intermedia with hydroxyurea. *J Pediatr* 1994;125:490.
76. Yeşilipek MA, Hazar V, Yeğin O. L-Carnitine treatment in beta thalassemia major. *Acta Haematol* 1998; 100: 162-163.
77. Laerum OD. *Flow Cytometry in Hematology*. Ed. Laerum OD, Robert B. Academic Press: 1992:3-8.
78. Binet JL, et al. Apoptosis in blood diseases. *Hematol Cell Ther* 1996;Jul;38(3):253-264.
79. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972;26:239.
80. Oppenheim RW et al. Reduction of naturally occurring motoneuron death in vivo by a target-derived neurotrophic factor. *Science* 1988; 240:919.
81. Koury MJ. Apoptosis in Hematopoiesis. *Experimental Hematology* 1992;Vol:20, 391-394.
82. Williams GT et al. Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature*, 1990;343:76.
83. Ratajczak MZ et al. rTPO stimulates erythropoiesis by inhibiting erythroid progenitor cell apoptosis. *Br J Haematol* 1997: Jul;98(1):8-17.
84. Reed JC: Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 1997; 387:773.

85. Barcena A et al. Expression of Fas and Bcl-2 by primitive hematopoietic progenitors freshly isolated from human fetal liver. Blood 1996; 88:2013.
86. Nagafuji K et al. Functional expression of Fas antigene on hematopoietic progenitor cells. Blood 1995;86:883

AKDENIZ
Mektep