

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(DOKTORA TEZİ )**

**BETA TALASEMİ MAJÖRLÜ HASTALARDA NK  
(NATURAL KILLER ) AKTİVİTESİNİ ETKİLEYEN  
FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI**

**BELKIS ATASEVER**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. SERAP ERDEM KURUCA**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI  
FİZYOLOJİ PROGRAMI**

**İSTANBUL-2008**



**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(DOKTORA TEZİ )**

**BETA TALASEMİ MAJÖRLÜ HASTALARDA NK  
(NATURAL KILLER ) AKTİVİTESİNİ ETKİLEYEN  
FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI**

**BELKIS ATASEVER**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. SERAP ERDEM KURUCA**

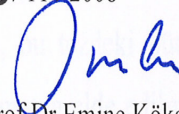
**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İSTANBUL-2008**

**TEZ ONAYI**

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

25/11/2008

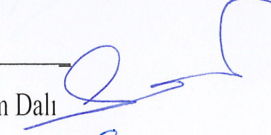

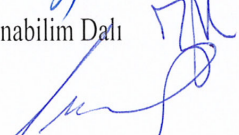




Prof. Dr. Emine Kökoğlu  
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
 Program Adı : Fizyoloji  
 Programın seviyesi : Yüksek Lisans  Doktora   
 Anabilim Dalı : Fizyoloji  
 Tez Sahibi : Belkıs Ataserver  
 Tez Başlığı : Beta Talasemi Majörlü Hastalarda NK (Natural Killer) Aktivitesini Etkileyen Faktörlerin Araştırılması  
 Sınav Yeri : İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı  
 Sınav Tarihi : 20 / 11 / 2008

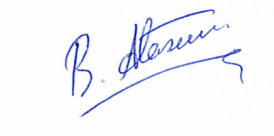
Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Serap Erdem Kuruca İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı 
2. Prof. Dr. Sacit Karamürsel İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı 
3. Prof. Dr. Zeynep Karakaş İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağ. ve Hast. Anabilim Dalı 
4. Prof. Dr. Şule Tamer İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı 
5. Prof. Dr. Batu Erman Sabancı Ü. Müh. Fak. Biyolojik Bilm. Biyühend. Böl. 

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

**BELKIS ATASEVER**

## İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

## TEŞEKKÜR

Fizyoloji kürsüsünde yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince asistanlığımı yapma fırsatı yakaladığım, beni fizyoloji alanında yetiştiren ve destekleyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Serap Erdem Kuruca'ya,

Doktora tezimin deneylerini yapabilmem için Sabancı Üniversitesi'nde laboratuvar olanakları sağlayan, flow sitometri analizlerinde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Sayın Doç. Dr. Batu Erman'a,

2001 yılından bu yana birlikte çalışma fırsatı yakaladığım, her zaman ilgi ve destek gösteren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Zeynep Karakaş'a,

Çalışmalarımızın gerçekleşmesi için olanak sağlayan ve doktora eğitimime katkıda bulunan, Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Sacit Karamürsel başta olmak üzere Fizyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine,

Fizyoloji Anabilim Dalı'nda aynı laboratuvarında çalıştığım arkadaşım Bio. Sabriye Karadenizli'ye,

Sabancı Üniversitesi'nde aynı laboratuvarında çalıştığım arkadaşlarım Dr. Ceren Tunçer, Kim. Müh. Gamze Günal, MSc. Işıl Nalbant, Bio. İlçim Özlü, Bio. Serkan Belkaya, Erkin Kuru, MSc. Khaled Ibraheem Saleh Qabaha ve Bio. Abdalsalam Omer Mohammed Kmail'e

Tez dönemim boyunca manevi desteğinden dolayı Elek.Yük.Müh. Alper Arslan'a

Bana her türlü maddi, manevi desteği sağlayan ve yanımda olan babam İrfan Atasever'e ve annem Zeynep Atasever'e,

En içten TEŞEKKÜRLERİMİ sunmayı bir borç biliyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-830.

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İV
BEYAN.....	V
İTHAF.....	VI
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER .....	VIII
TABLolar LİSTESİ.....	XI
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	XII
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	XV
ÖZET .....	XIX
ABSTRACT.....	XX
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. $\beta$ -Talasemi Majör .....	3
2.1.1. $\beta$ -Talasemi Majör' ün Tanımı.....	3
2.1.2. $\beta$ -Talasemi Majör'ün Klinik Özellikleri .....	5
2.1.3. Demir Yığılımı .....	7
2.2. $\beta$ -Talasemi Majör Hastalarında İmmun Sistem .....	9
2.2.1. NK Hücreleri .....	10
2.2.1.1. NK Reseptörleri .....	16
2.2.1.2. Doğal Sitotoksik Reseptörler (NCR).....	19
2.2.1.3. NKG2D (CD314).....	21
2.2.2. T Lenfositleri .....	23
2.2.3. B Lenfositleri.....	25
2.2.4. Monositler .....	26
2.3. Sitokinler .....	28
2.3.1. İnterferonlar (IFNs) .....	28
2.3.2. Tümör Nekrozis Faktör (TNF).....	30
2.3.3. Tümör Büyüme Faktörü (TGF- $\beta$ 1).....	31
2.3.4. İnterlökin 2 (IL2) .....	32
2.3.5. İnterlökin 10 (IL10) .....	33



2.3.6. İnterlökin 12 (IL12).....	34
2.3.7. İnterlökin 15 (IL15).....	36
2.3.8. İnterlökin 18 (IL18).....	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	39
3.1. Talasemi Tanısında Kullanılan Parametreler .....	39
3.1.1. Tam Kan Sayımı.....	39
3.1.2. HbF Tayini .....	39
3.1.3. Serum Ferritin Düzeyi: .....	40
3.2. Deney Gruplarının Planlanması Ve İlgili Parametreler.....	40
3.2.1. NK Aktivitesi .....	42
3.2.1.1. NK Aktivitesi DeneYlerinde Kullanılan Malzemeler Ve Hazırlanışı.....	42
3.2.1.2. Mononükleer Hücrelerin Elde Edilmesi.....	43
3.2.1.3. Hücrelerin Sayılması.....	45
3.2.1.4. NK Hücrelerinin İzole Edilmesi.....	45
3.2.1.5. Doğal Öldürücü (NK) Sitotoksisite Testi .....	46
3.2.2. Flow Sitometri Ölçümü .....	47
3.2.3. Sitokin Ölçümü.....	49
3.2.4. İstatiksel Analiz .....	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. İzole Edilmiş NK İle Mononükleer Hücreler Arasındaki NK Hücrelerinde Sitotoksisite Deneyi.....	51
4.2. NK Sitotoksisitesi Deneyinin Öncesi Ve Sonrası NK Hücrelerinin Aktivatör Reseptörlerinin Düzeyi.....	54
4.2.1. Lenfosit Populasyonu İçinde NK Hücrelerinin Seçilmesi Ve Alt Gruplarına Ayrılması.....	55
4.2.2. NK Alt Gruplarının Yüzde Oranları .....	56
4.2.3. $\beta$ -Talasemi Majörlü Hastaların Ve Kontrollerin NK Hücrelerinde Aktivatör Reseptörler .....	57
4.2.3.1. İzole Edilmiş NK Hücrelerinde Aktivatör Reseptörler.....	57
4.2.3.2. Mononükleer Hücreler Arasındayken NK Hücrelerinde Aktivatör Reseptörler .....	58
4.3. Sitokin Düzeyi.....	72
5. TARTIŞMA .....	76

6. KAYNAKLAR .....	85
7. ETİK KURUL KARARI.....	104
8. ÖZGEÇMİŞ .....	105
8.1. Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri .....	106
8.1.1. Ödüller.....	106
8.1.2. Yayınlar.....	106
8.1.3. Bilimsel Atıflar .....	107
8.1.4. Uluslararası Kongre Bildirileri .....	108
8.1.5. Ulusal Kongre Bildirileri .....	109

**TABLolar LİSTESİ**

Tablo 3-1. Flow Sitometri analizinde kullanılan antikorlar. ....	48
Tablo 3-2. Sitokin ölçümünde kullanılan ELISA kitleri .....	49
Tablo 4-1. $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda ve kontrollerde izole edilmiş NK hücrelerinin sitotoksitesi ve anlamlılıklar .....	52
Tablo 4-2. $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda ve kontrollerde mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin sitotoksitesi ve anlamlılıklar. ....	53
Tablo 4-3 İzole edilmiş NK hücrelerinde deneyden önce ve sonra aktivatör reseptör düzeyi.....	60
Tablo 4-4. Mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinde deneyden önce ve sonra aktivatör reseptör düzeyi .....	61
Tablo 4-5. $\beta$ -talasemi majörlü hastaların ve kontrollerin mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin, NK sitotoksitesi deneyinden önce ve sonra süpernatant sitokin düzeyleri.....	73

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1. Hemoglobinin embriyonel gelişim süresince ekspresyonu (14). .....	4
Şekil 2-2. NK hücrelerinin aktivatör reseptörleri (6). .....	21
Şekil 3-1. Tez çalışmasında kullanılan parametrelerin şeması. ....	41
Şekil 4-1. $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda ve kontrollerde, izole edilmiş NK hücresi sitotoksitesite sonuçlarının ortalamaları ve standart hataları. ....	52
Şekil 4-2. $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda ve kontrollerde mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin sitotoksitesitesi. ....	53
Şekil 4-3. Sırasıyla bir hasta ve bir kontrol örneğinde; mononükleer hücre populasyonu içinde lenfosit populasyonunun kapılanması. ....	54
Şekil 4-4. Sırasıyla bir hasta ve bir kontrol örneğinde; izole edilmiş NK hücre populasyonu içinde NK populasyonunun kapılanması. ....	55
Şekil 4-5. Mononükleer hücreler arasındaki lenfosit populasyonunda NK hücrelerinin seçilmesi ve alt gruplarına ayrılması. ....	56
Şekil 4-6. İzole edilmiş NK hücrelerinde, NK hücrelerinin seçilmesi ve alt gruplarına ayrılması. ....	56
Şekil 4-7. $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda ve kontrollerde NK hücrelerinin CD56 <sup>sönük</sup> ve CD56 <sup>parlak</sup> alt gruplarının NK populasyonu içindeki yüzde oranları. ....	57
Şekil 4-8. $\beta$ -talasemi majör hastası (A) ve kontrol (B) örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin CD56 <sup>sönük</sup> alt grubunda; C ve D' de ise sırasıyla $\beta$ -talasemi majör hastası ve kontrol örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin CD56 <sup>parlak</sup> alt grubunda; K562 ile uyarılan NK aktivitesi deneyinden önce (DÖ) ve sonra (DS), CD16 aktivatör reseptör düzeyi. ....	62
Şekil 4-9. $\beta$ -talasemi majör hastası (A) ve kontrol (B) örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin CD56 <sup>sönük</sup> alt grubunda; C ve D' de ise sırasıyla $\beta$ -talasemi majör hastası ve kontrol örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin CD56 <sup>parlak</sup> alt grubunda; K562 ile uyarılan NK aktivitesi deneyinden (DÖ) ve sonra (DS), NKG2D aktivatör reseptör düzeyi. ....	63
Şekil 4-10. $\beta$ -talasemi majör hastası (A) ve kontrol (B) örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin CD56 <sup>sönük</sup> alt grubunda; C ve D' de ise sırasıyla $\beta$ -talasemi majör hastası ve kontrol örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin CD56 <sup>parlak</sup> alt grubunda; K562 ile	

uyarılan NK aktivitesi deneyinden (DÖ) ve sonra (DS), NKp30 aktivatör reseptör düzeyi.....	64
Şekil 4-11. NK hücrelerinin CD56 <sup>sönük</sup> alt grubunda; C ve D' de ise sırasıyla $\beta$ -talasemi majör hastası ve kontrol örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin CD56 <sup>parlak</sup> alt grubunda; K562 ile uyarılan NK aktivitesi deneyinden (DÖ) ve sonra (DS) NKp44 aktivatör reseptör düzeyi. ....	65
Şekil 4-12. $\beta$ -talasemi majör hastası (A) ve kontrol (B) örneğinde mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin CD56 <sup>sönük</sup> alt grubunda; C ve D' de ise sırasıyla $\beta$ -talasemi majör hastası ve kontrol örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin CD56 <sup>parlak</sup> alt grubunda; K562 ile uyarılan NK aktivitesi deneyinden (DÖ) ve sonra (DS) CD16 aktivatör reseptör düzeyi. ....	66
Şekil 4-13. $\beta$ -talasemi majör hastası (A) ve kontrol (B) örneğinde mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin CD56 <sup>sönük</sup> alt grubunda; C ve D' de ise sırasıyla $\beta$ -talasemi majör hastası ve kontrol örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin CD56 <sup>parlak</sup> alt grubunda; K562 ile uyarılan NK aktivitesi deneyinden (DÖ) ve sonra (DS) NKG2D aktivatör reseptör düzeyi. ....	67
Şekil 4-14. $\beta$ -talasemi majör hastası (A) ve kontrol (B) örneğinde mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin CD56 <sup>sönük</sup> alt grubunda; C ve D' de ise sırasıyla $\beta$ -talasemi majör hastası ve kontrol örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin CD56 <sup>parlak</sup> alt grubunda; K562 ile uyarılan NK aktivitesi deneyinden (DÖ) ve sonra (DS) NKp30 aktivatör reseptör düzeyi. ....	68
Şekil 4-15. $\beta$ -talasemi majör hastası (A) ve kontrol (B) örneğinde mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin CD56 <sup>sönük</sup> alt grubunda; C ve D' de ise sırasıyla $\beta$ -talasemi majör hastası ve kontrol örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin CD56 <sup>parlak</sup> alt grubunda; K562 ile uyarılan NK aktivitesi deneyinden (DÖ) ve sonra (DS) NKp44 aktivatör reseptör düzeyi. ....	69
Şekil 4-16. $\beta$ -talasemi majörlü hastaların ve kontrollerin izole edilmiş NK hücrelerinde deneyden önce ve sonra CD16 (A), NKG2D (B), NKp30 (C) ve NKp44 (D) aktivatör reseptör düzeylerinin ortalamaları ve standart hataları. ....	70
Şekil 4-17. $\beta$ -talasemi majörlü hastaların ve kontrollerin mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinde deneyden önce ve sonra CD16 (A), NKG2D (B), NKp30 (C) ve NKp44 (D) aktivatör reseptör düzeylerinin ortalamaları ve standart hataları. ....	71

Şekil 4-18.  $\beta$ -talasemi majörlü hastaların ve kontrollerin mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin, NK sitotoksitesi deneyinden önce ve sonra süpernatantta sırasıyla IL2 (A), IL10 (B), IL12 (C) ve IL15 (D) düzeyleri. ....74

Şekil 4-19.  $\beta$ -talasemi majörlü hastaların ve kontrollerin mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin, NK sitotoksitesi deneyinden önce ve sonra süpernatantta sırasıyla  $TNF\alpha$  (A),  $IFN\gamma$  (B) ve  $TGF-\beta 1$  (C) düzeyleri. ....75

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

**$\alpha$** : Alfa

**$\beta$** : Beta

**$\gamma$** : Gama

**$\delta$** : Delta

**$\epsilon$** : Epsilon

**$\zeta$** : Zeta

**$\theta$** : Teta

**$\kappa$** : Kappa

**$\lambda$** : Lamda

**$\mu$** : Mü, mikro

**$\omega$** : Omega

**ADCC**: Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (Antikora Bağımlı Hücresel Sitotoksosite)

**ALCAM**: Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (Aktive Edilmiş Lökosit Hücre Adezyon Molekülü)

**AML**: Acute myeloid leukemia (Akut Miyeloid Lösemi)

**APC**: Antigen-Presenting Cell (Antijen Sunan Hücreler)

**BAFF**: B cell-activating factor belonging to the TNF family (TNF ailesine ait olan B hücre aktive edici faktör)

**BCR**: B Cell Receptor (B hücre reseptörü)

**CD**: Cluster of Differentiation

**CLIR**: C-type Lectin Inhibitory Receptor (C-tip lektin inhibitör reseptör)

**CMV**: Cytomegalovirus.

**cNK-IS**: Cytotoxic Natural Killer Cell Immune Synapse. (Sitotoksik NK Hücre İmmun Sinaps).

**CRACC**: CD2-like Receptor Activating Cytotoxic Cells (CD2 Benzeri Reseptör Aktive Edici Sitotoksik Hücreler).

**CSIF**: Cytokine Synthesis Inhibitory Factor (Sitokin Sentezini İnhibe Edici Faktör).

**DC**: Dendritic Cell (Dendritik Hücre).

- DNAM:** DNAX accessory molecule (DNAX aksesuar molekülü).
- EBV:** Epstein-Barr virus.
- EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic Acid.
- ERK:** Extracellular signal-regulated kinases (Ekstraselüler sinyal düzenleyen kinazlar).
- FoxP:** Forkhead box protein
- GM-CSF:** Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör).
- GVHD:** Graft--versus-host hastalığı.
- Hb:** Hemoglobin.
- HIV:** Human İmmundeficiency Virus.
- HLA:** Human leukocytes antigen (İnsan lökosit antijeni).
- IFN:** İnterferon
- Ig:** Immunoglobulin
- IKDC:** Interferon-Producing Killer Dendritic Cell (IFN üreten Öldürücü Dendritik Hücreler).
- IL:** Interleukin
- ILT:** Ig-like. transcripts (Ig benzeri transkriptler).
- IMDM:** Iscove's Modified Dulbecco Medium.
- IRS:** Inhibitory Receptor Superfamily (İnhibitör Reseptör Süperailisi).
- ITAM:** Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs (İmmunoreseptör Tirozine dayalı Aktivatör Motif).
- ITIM:** Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs (İmmunoreseptör Tirozine dayalı İnhibitör Motif)
- KARAP:** Killer cell-Activating Receptor-Associated Protein (Öldürücü Hücre Aktive Edici Reseptör Protein).
- KIR:** Killer Ig-like receptors (Öldürücü hücrenin immunoglobulin benzeri reseptörleri).
- LAIR:** Inhibitory Leukocyte-Associated Ig-like Receptor (Lökositle İlişkili Ig benzeri Reseptörler).
- LAM:** Leukocyte adhesion molecule (Lökosit Adezyon Molekül)
- Leu-7/ CD57:** Leukocyte marker 7
- LFA:** **Leukocyte** Function-Associated Antigen (Lökosit Fonksiyonuyla İlişkili Molekül).
- LIR:** Leukocyte Ig-like Receptors (Lökosit Ig benzeri reseptörler).



- LPS:** Lipopolisakkarid
- LT:** Lenfotoksin
- MCP:** Monocyte Chemotactic Protein (Monosit Kemotaktik Protein).
- MHC:** Major Histocompatibility Complex
- MICA:** MHC Class I-related chain A (MHC sınıf I ile ilişkili gen dizisi A).
- MICB:** MHC Class I-related chain B (MHC sınıf I ile ilişkili gen dizisi B).
- MIP:** Macrophage Inflammatory Proteins (Makrofaj İnflamatuar Proteinler).
- MTT:** Methyl-thiazol-tetrazolium
- N-CAM:** Neural Cell Adhesion Molecule (Nöral Hücre Adezyon Molekülü).
- NCR:** Natural Cytotoxicity Receptors (Doğal Sitotoksik Reseptörler).
- NF- $\kappa$ B:** Nükleer faktör kapa B
- NK:** Natural Killer (Doğal Öldürücü)
- NKG:** Doğal Öldürücü grup
- NKG2D:** Doğal Öldürücü grup 2, D üyesi
- NKSF:** Natural killer cell stimulatory factor (NK Hücresi Stimülatör Faktör):
- NTB-A:** NK, T- and B-cell antigen (NK, T ve B Hücre Antijeni).
- NTBI:** Non-Transferrin-Bound Plasma Iron (Transferine Bağlanmamış Demir).
- PAF:** Platelet-Activating Factor (Platelet Aktive Edici Faktör).
- PBS:** Phosphate Buffered Saline (Fosfatla Tamponlanmış Tuz Solüsyonu).
- PHA:** Phytohaemagglutinin
- PIR:** Paired Ig-Like Receptor (Eşleşmiş Ig Benzeri Reseptörler).
- SH:** Src-homoloji.
- SHP:** Src Homology Region 2-Containing Protein Tyrosine Phosphatase (Src-homoloji 2(SH2) Domaini İçeren Tirozin Fosfotaz).
- SMAC:** Supra Molecular Aktivation Cluster
- SDS:** Sodyum Dodesil Sülfat
- STAT:** Signal transducers and activators of transcription (Transkripsiyonun Sinyal Taşıyıcıları ve Aktivatörleri).
- TCR:** T Cell Receptor (T hücre reseptörü).
- Teff:** Efektör T hücreleri.
- TGF:** Transforming growth factor (Transforme Edici Büyüme Faktörü).
- Th:** T Helper Cells (Yardımcı T hücreleri).
- TNF:** Tumor Necrosis Factor.

**TRAIL:** TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TNF ile İlişkili Apoptoza Neden Olan Ligand).

**Treg:** Düzenleyici T hücreleri

**TYROBP:** Tyrosine Kinase Binding Protein (Tirozin Kinaza Bağlanan Protein).

**ULBP:** UL16 Binding Proteins (UL16' ya bağlanan protein).

## ÖZET

Atasever B. Beta Talasemi Majörlü Hastalarda NK (Natural Killer ) Aktivitesini Etkileyen Faktörlerin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, FİZYOLOJİ ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2008.

Beta-talasemi majör hemoglobinde  $\beta$ -globin zincirinin üretilmemesiyle karakterize, kalıtsal bir hastalıktır. Çoğu hastada, tedavi için gerekli olan çoklu kan transfüzyonları lenfosit alt gruplarında ve sitokin düzeylerinde immun modifikasyonlara yol açar. NK hücreleri patojenlere ve tümör hücrelerine karşı doğal bağışıklık yanıtında önemli bir lenfosit alt grubudur. NK hücrelerinin aktivitesi, hücre yüzeyinde bulunan aktivatör ve inhibitör reseptörlerin hücre içine ilettiği sinyaller ve immün hücreler tarafından salgılanan sitokinler ile düzenlenir.

Çalışmamızda 27 beta-talasemi majör hastasının ve 18 gönüllünün NK aktivitesi ve bu aktiviteyi etkileyen faktörler araştırıldı. İzole ve mononükleer hücreler içindeki NK hücrelerinin K562 hücrelerine karşı sitolitik fonksiyonu deney öncesinde ve sonrasında, flow sitometride CD56<sup>sönük</sup>, CD56<sup>parlak</sup> alt gruplarına ayrılarak CD16, NKp30, NKp44, NKG2D reseptörleri ölçülerek incelendi.

Beta-talasemi hastalarının izole ve mononükleer hücreler içindeki NK aktivitesi kontrollerden daha düşük bulundu. Kontrollerde mononükleer hücreler içindeki CD56<sup>sönük</sup> NK hücrelerinde deneyden sonra anlamlı olarak CD16 artarken, beta-talasemi hastalarında CD56<sup>parlak</sup> alt grubunda arttı. İzole NK hücrelerinde ise değişmedi. Fakat bu değişiklik beta-talasemi hastalarında kontrole göre daha azdı. NKG2D reseptörü her iki grupta değişmedi. İzole ve mononükleer içinde CD56<sup>sönük</sup> NK hücrelerinde NKp30 düzeyi deneyden sonra kontrollerde azalırken, beta-talasemi majörlü hastalarda sadece izole NK hücrelerde azaldı ve kontrollere göre bu değişiklik daha düşük bulundu. İzole NK hücrelerinde, CD56<sup>parlak</sup> alt grubunda NKp44 reseptörü beta-talasemi hastalarında deneyden sonra anlamlı olarak artarken, kontrollerde değişmedi fakat gene hastalara göre anlamlı olarak daha yüksekti. Mononükleer hücreler içindeki NK'ları K562 ile uyarmadan önce ve sonra toplanan süpernatantlardaki sitokin ölçümünde, beta-talasemi hastaları ve kontrollerde IL2, IL12, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  miktarları değişmezken, hastalarda IL10, IL15 ve TGF- $\beta$ 1 miktarları kontrollere göre anlamlı olarak daha yüksekti. Bu sonuçlara göre, beta-talasemi hastalarının NK aktivitesindeki azalmanın, NK hücrelerinde ve monositlerde fonksiyonel yetersizliklerin ve sitokin üretiminin düzenlenmesindeki bozuklukların bir sonucu olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler :** Beta-talasemi majör, NK hücreleri, NK aktivatör reseptörleri, Sitokinler, Doğal bağışıklık.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-830.

## ABSTRACT

Atasever B. Investigation of Factors Influencing NK (Natural Killer) Activity in Beta-Thalassemia Major Patients. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Physiology. PhD Thesis. İstanbul. 2008.

Beta-thalassemia major is a hereditary disease characterized by the absence of beta-globin chain production. In most patients, multiple blood transfusions can induce immunomodifications in lymphocyte subsets and cytokine levels. NK cells are lymphocyte subpopulations that are important effectors of innate immune responses against infectious pathogens and tumor cells. The cytotoxic activity of NK cells is regulated by positive and negative signals from multiple receptors expressed on their cell surface and cytokines that are secreted from other immune cells.

This study was carried out to investigate the details of NK cell function of 27 patients with beta-thalassemia and 18 controls. We analyzed the cytolytic function of from these blood donors against K562 cells (both pure NK cells and PBMC). Before and after the experiment, CD16, NKp30, NKp44, NKG2D receptors were examined in CD56<sup>dim</sup>, CD56<sup>bright</sup> NK subsets by flow cytometry.

We observed that beta-thalassaemia patients had lower activities of pure NK cells and PBMC. While CD16 levels of CD56<sup>dim</sup> NK subsets was significantly increased in controls PBMC after experiment, it was increased in CD56<sup>bright</sup> subsets of beta-thalassemia patients but wasn't changed in pure NK cells. These differences were lower in beta-thalassemia patients than controls. NKG2D receptor wasn't changed in both groups. While NKp30 receptor of CD56<sup>dim</sup> subset in pure NK and inside PBMC was decreased in controls after experiment it was only decreased in pure NK cells of beta-thalassemia patients and this difference was low compare with controls. NKp44 receptor of CD56<sup>bright</sup> subset in pure NK cells was significantly increased in beta-thalassemia patients after experiment and it wasn't changed in controls however it was higher than patients as significantly. The supernatants of NK cells inside PBMC were collected before and after induced K562 and were measured cytokine levels by ELISA. IL2, IL12, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  levels weren't changed but IL10, IL15, TGF- $\beta$ 1 levels were significantly high in patients compare to controls.

These findings demonstrate that environmental factors such as ineffective cytokine production and defective function of monocytes and NK cells, may cause low NK activity in beta-thalassaemia patients.

**Key Words:** Beta-thalassemia major, NK cells, NK activator receptors, Cytokines, Innate immunity.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. T-830.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Talaseminin tanımı ilk kez; 1925' de Eritroblastik ya da Akdeniz Anemisi olarak "American Pediatric Hematology" de Dr. Thomas E. Cooley tarafından yapılmıştır. Talasemi hastalığı, hemoglobini (Hb) oluşturan  $\alpha$  ya da  $\beta$  globin zincirlerinden birinin sentezindeki azalma ya da hiç yapılamamasından ortaya çıkar. Talasemi sınıflandırması, hangi globin zincirin yapımının azaldığına ya da yapılamadığına göre yapılır. Tedavi edilmediğinde ölümcül bir hastalık olan  $\beta$ -talasemi majör'de eritrositlerde beta globulin zinciri üretilmez.  $\beta$ -talasemi majörde,  $\beta$  globinlerin yapılamaması sonucu,  $\alpha$  globinleri tetramerler oluşturarak eritroblastta birikir. Bu agregatlar hücre membranına zarar verir ve hemolize neden olur (50, 172).

Tedavi yapılmaksızın, hastaların sadece birkaç yıl yaşadığı görülmüştür. Düzenli yapılan kan transfüzyonları yaşam süresini uzatır. Ancak,  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda; düzenli kan transfüzyonları, etkin olmayan eritropoez nedeniyle intestinal sistemde demir absorpsiyonunun tetiklenmesi ve eritrositlerin hemolizi demir yığılımına yol açmaktadır (27, 38, 39).

$\beta$ -talasemi majör hastalarında enfeksiyonlar mortalitenin en önemli nedenlerinden biridir. Hastaların yaklaşık %12-46'sının direkt olarak ölümünden sorumludur. Son yapılan çalışmalarda; monosit ve nötrofillerin aktivitesinin zayıfladığı, poliklonal immunoglobulin sentezinin arttığı, kompleman alternatif yolağının aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca lenfosit alt gruplarının fonksiyonel ve sayısal olarak değiştiği bulunmuştur (85, 99, 156). Sitotoksik T (CD8) hücre sayısının arttığı, yardımcı T (CD4) hücre sayı ve fonksiyonunun azaldığı, bununla birlikte natural killer (NK) hücrelerinin aktivasyonunun zayıfladığı gösterilmiştir. Bu anormalliklerin transfüzyonlar, demir yığılımı ya da splenektomiden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak, bu immunolojik modifikasyonların altında yatan temel mekanizma hala açık değildir (2, 7, 153).

NK hücreleri genel olarak patojen mikroorganizmalarla enfekte olmuş hücrelerin, özellikle enfeksiyonun erken fazında yok edilmesinde ve tümör hücrelerinin öldürülmesinde de önemli rol oynarlar. Ayrıca, kemokin ve IFN $\gamma$  ve TNF $\alpha$  gibi inflamatuvar sitokinleri üretirler. (21, 116).

$\beta$ -talasemi majörlü hastalarda NK aktivitesinin azalma nedenlerini ayrıntılı olarak araştırmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında; bu hastalarda meydana gelen patolojik değişikliklerin NK hücrelerini nasıl etkilediği araştırılmıştır. NK aktivitesi; mononükleer hücreler arasında ve izole NK hücrelerinde olmak üzere 2 farklı şekilde incelenmiştir. NK sitotoksitesi üzerine lenfositler ve monositler gibi diğer immun hücrelerin etkisinin anlaşılması için NK aktivitesi, mononükleer hücrelerle birlikte veya saflaştırılmış NK hücreleri, tümör hücreleri ile ayrı ayrı uyarılarak araştırılmıştır. Böylece direkt NK hücre defektlerini reseptör veya sitokin salgısı düzeyinde anlamak mümkündür. NK hücrelerinin, K562 hücreleriyle uyarılmadan önce ve deneyin sonunda alınan örneklerde; NK hücreleri alt gruplarına ayrıldıktan sonra, CD16, NKG2D, NKp30 ve NKp44 aktivatör reseptörlerinin flow sitometride analizi yapılmıştır. NK aktivitesi deneyinin sonunda; K562 ile uyarılmamış mononükleer hücrelerin ve K562 ile uyarılmış mononükleer hücrelerin süpernatantları, sitokin ölçümü için toplanmıştır. Çeşitli çalışmalarda  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda serum sitokin düzeylerine bakılmış ama NK hücrelerinin kanser hücresiyle stimülasyonundan sonra sitokin düzeyindeki değişiklikler incelenmemiştir.

Talasemi hastalarında NK aktivitesini etkileyen faktörlerin spesifik olarak araştırılması, bu hastalarda kanser ve enfeksiyon riskini azaltmak amacıyla uygulanacak tedavi için büyük önem taşımaktadır. Teknik anlamda; NK aktivitesi 2 farklı şekilde araştırılmış ve bunlar birbirleriyle karşılaştırılmıştır. NK aktivitesine; izole NK ile ve mononükleer hücrelerle birlikte bakılması diğer kan hücrelerinin rollerinin değerlendirilmesi açısından da önemlidir. Böylece NK aktivitesini, hangi çevresel faktörün ne kadar etkileyebileceği anlaşılmaya çalışılmıştır. Bulunan sonuçlar sağlıklı kişilerle karşılaştırılarak değerlendirme yapılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

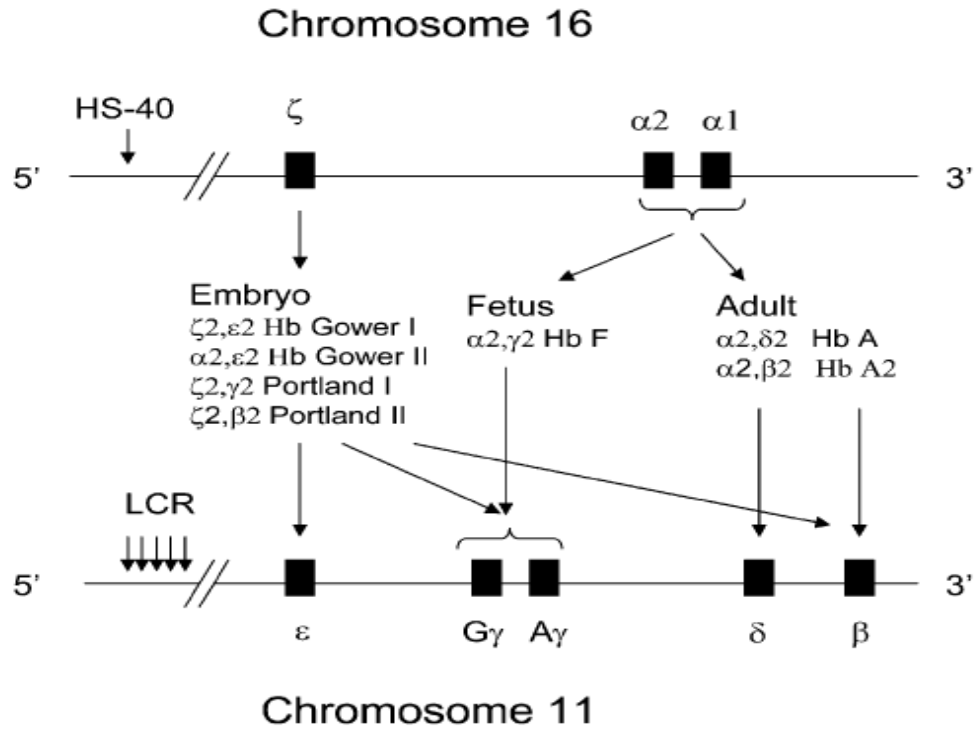
### 2.1. $\beta$ -Talasemi Majör

#### 2.1.1. $\beta$ -Talasemi Majör' ün Tanımı

Talasemi sendromu; Akdeniz bölgesinde, Orta Doğu, Hindistan, Uzak Doğu ve tropikal Afrika' da görülen endemik kalıtsal bir hastalıktır. Dünya popülasyonunun genişlemesi nedeniyle son yüzyılda, talasemi endemik olmayan ülkelerde de yüksek sıklıkta meydana gelmektedir. İskandinav ülkelerde homozigot talasemi halen nispeten seyrek görülmektedir. Dünya popülasyonunun yaklaşık %3 ü heterozigot  $\beta$  -talasemidir ve genel olarak 270 milyon insan, talasemi ve hemoglobin varyantlarını içeren mutant  $\beta$ - globin geni taşımaktadır. Dünyada her yıl 300 000 den fazla çocuk  $\beta$ - globin gen hastalığı ile doğmaktadır. Ayrıca en az bir milyon insan  $\alpha$ -talasemi (HbH, HbH-Constant Spring ve homozigot  $\alpha^0$ -talasemi) taşımaktadır (14,34,113).

Talasemi, 1952 yılında Cooley'nin anemisi olarak tanımlanmıştır (35).  $\beta$ -talasemi majörde; eritrositlerde  $\beta$ -globin zinciri üretimi olmadığından, aşırı  $\alpha$ -globin zinciri üretilir.  $\alpha$ -globin zinciri stabil değildir ve eritrositlerde çökelti oluşturur. Etkin olmayan eritropoez, kemik iliğinde eritrosit prekürsörlerinin hızlı apoptozuna neden olur ve eritrositlerin yaşam süresini kısaltır. Oksijen radikalleri ve serbest demir düzeyinin artışı hücre iskeletinde hasara yol açar.  $\alpha$  globin zincirinden ayrılan hem ve hemikrom bileşikleri hücre membranı ve hücre iskeletinde birikir. Anemi, eritropoetin düzeyini artırır ve bu da kemik iliği aktivitesinde eritropoetik aktivite ve proliferasyonun artmasına yol açar. Osteopeni, osteoporoz gibi çeşitli iskelet anormallikleri gelişir. Bazı hastalarda akciğer ve omurgada ekstramedullar eritropoetik aktivite meydana gelir. Eritropoetik doku artışı, splenomegalinin ana nedenidir. İnfektif eritrositlerin hemolizi ve eritrositlerin birikimi buna katkıda bulunur (11, 14, 35).

İnsan hemoglobini,  $O_2$ ' ye bağlanan hem ile kombine iki globulin zinciri içerir. Yetişkinlerde hemoglobinin %97' si Hemoglobin A (HbA)' dır. HbA; 2  $\alpha$  ve 2 $\beta$  globin zincirinden oluşur. Hemoglobinin %3.5' dan daha azı ise HbA<sub>2</sub>' dir. HbA<sub>2</sub>' de  $\beta$  globin zinciri yerine  $\delta$  globin zinciri bulunmaktadır ve  $O_2$  taşıyamaz. İnsan embriyosunda,  $O_2$ ' nin taşınmasını  $\zeta$  ve  $\epsilon$  globin zincirlerinden oluşan embriyonik hemoglobinler gerçekleştirir (Hb Gower I [  $\zeta_2, \epsilon_3$ ], Hb Gower II [ $\alpha_2, \epsilon_3$ ] ve Hb Portland [  $\zeta_2, \gamma_2$ ]). Gestasyonun 6. haftasından sonra ve kalan fetal dönem boyunca major komponent fetal hemoglobin (HbF)' tir ( $\alpha_2, \gamma_2$ ). Doğumdan sonra HbA aşamalı olarak HbF ile yer değiştirir ve 2 yaşında kandaki hemoglobinin sadece %1' i HbF' tir (14, 34, 113). Şekil 2-1' de embriyonik, fetal ve yetişkin Hb'leri gösterişmektedir.



**Şekil 2-1.** Hemoglobinlerin embriyonel gelişim süresince ekspresyonu (14). Erişkin Hb'inde  $\beta$  globulin zinciri bulunmaktadır.  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda doğumdan sonra HbF'in azalmasıyla düzenli kan transfüzyonu olmaya başlamaktadırlar.



$\alpha$  ve  $\zeta$  globin zincirleri 16. kromozomun kısa kolunda lokalizedir.  $\epsilon$ ,  $G\gamma$ ,  $A\gamma$ ,  $\delta$  ve  $\beta$  genleri ise 11. kromozomun kısa kolunda lokalizedir.  $\beta$  globin geninde  $\beta$  talasemiye neden olan 200 mutasyon tanımlanmıştır. Mutasyonlardan bazıları  $\beta$  globin geninin ekspresyonu tamamen engellerken, bazıları ise ekspresyonu azaltır.  $\beta$  globin zincirinin eksprese edilmediği duruma  $\beta^0$ -talasemi, ekspresyonun azaldığı duruma ise  $\beta^+$ -talasemi denir (11, 14, 45).

### 2.1.2. $\beta$ -Talasemi Majör'ün Klinik Özellikleri

Kemik iliği transplantasyonu; genetik hastalıklar, aplastik anemi ve hematolojik malinitelerin tedavisinde kullanılır. Genetik hastalıklar arasında  $\beta$ -talasemi majör; dünyanın çoğu yerinde çocuklarda halen önemli bir ölüm nedenidir. 1981' den beri, talasemi majörlü hastalar; HLA-identik ya da haploidentik donörlerden kemik iliği grafları ile tedavi edilmektedir. Ancak bunun bazı riskleri vardır ve transplantla ilgili komplikasyonlar oluşabilir, özellikle bu hastalarda hepatomegali ve portal fibrozis görülebilir. Hastaların %80'i tedavi edilebilmesine rağmen %5'inde meydana gelen kronik graft-versus-host hastalığının (GVHD) tedavisi gerekmektedir. Sonuçlar 8 yaşın altındakiler için daha iyi olduğunu göstermektedir. Son 10 yılda, hematopoetik hücre kaynağı olarak plasental kanın kullanılması artmıştır (56, 82, 151).

Uzun süreli çok sayıda yapılan kan transfüzyonları sonucunda; transfüzyon reaksiyonları, demir yığılması ve enfeksiyon gibi çeşitli komplikasyonlara yol açabilmektedir. Yabancı antijenlere maruz kalma sonucu alloimmunizasyon ve immunomodulasyon formunda sekonder etkiler meydana gelir. Transfüzyona bağımlı  $\beta$ -talasemi hastalarında B lenfositlerinde, NK aktivitesinde, HLA-DR eksprese eden hücrelerde ve T yardımcı/baskılayıcı hücre oranlarında değişiklikler olduğu gösterilmiştir (80). Bu hastalarda NK düzeyinin azaldığı, lenfositlerde IL2 reseptör (CD25), HLA-DR ve CD45RO ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Serum sitokin düzeylerinde ve soluble antijenlerde artış olduğu gösterilmiştir (82).

Talasemi majörün tedavisinde her 2-4 haftada bir düzenli eritrosit transfüzyonu yapılır. Bunun başlıca amacı; eritropoezi baskılamak ve intestinal demir absorpsiyonunu azaltmaktır. Hemogloblin düzeyi 70 g/L' nin altında olan çocukların düzenli kan transfüzyonuna gereksinimi vardır. Transfüzyon olan hastaların alloantikorları ve enfeksiyon olup olmadığı düzenli olarak takip edilmelidir. Bugün, çoğu  $\beta$  talasemi majörlü hastada kronik Hepatit C enfeksiyonu görülmektedir. Hastaların yıllık eritrosit toplam volümü hesaplanmalıdır. Eğer yıllık birikim 200-220 ml  $\text{kg}^{-1}$   $\text{yıl}^{-1}$ ' i aşarsa alloantikorlara ya da splenektomiye neden olabilir (14).

Karaciğer demir düzeyi  $< 7 \text{ mg g}^{-1}$  kuru ağırlık ise şelasyon tedavisine izin verilir ama  $> 15 \text{ mg g}^{-1}$  kuru ağırlık ise ciddi karaciğer ve kardiyak komplikasyon riski taşıdığını gösterir. Desferoksamin (Desferrioxamine=etken madde, ticari ad=Desferal), transfüzyona bağlı talasemide genel olarak kullanılan demir şelatörüdür. Standart dozu 20-40 mg  $\text{kg}^{-1}$ ' dir. Doza karar verilirken serum ferritin düzeyine bakılır. 1,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  olmalıdır. Ferritin düzeyi, günlük desferoksamine bölünerek terapatik indeks hesaplanır. Bu değer 0.025' in altında olması gerekmektedir. Yüksek doz desferoksamin, duyma kaybına, retinal hasara, kemik büyüme anormalliklerine neden olabilir (14).

Bir diğer şelatör olarak deferriprone (Ferriprox) kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar onun miyokardiyumdan demir uzaklaştırılmasında desferalden daha etkili olduğunu göstermektedir. Genellikle 75 mg  $\text{kg}^{-1}$   $\text{gün}^{-1}$  kullanılır. Ferriprox' un yan etkileri agranülositoz ( $< \%1$ ), nötropeni ve gastrointestinal semptomlardır (14, 45).

$\beta$  talasemide aneminin derecesi, eritrosit prekürsörlerindeki  $\alpha$  globin zinciri ile  $\gamma$  ve  $\beta$  globin zinciri arasındaki dengesizlik düzeyine bağlıdır. Genellikle HbF düzeyi ölçülerek anlaşılır (14). Tedavi olarak; allojenik kök hücre transplantasyonu, 5-azasitidin, butirat derivasyonları gibi fetal hemogloblin indükleyicileri, rekombinant insan eritropoetini, antioksidanlar ve gen tedavisi kullanılmaktadır (11).

### 2.1.3. Demir Yığılımı

Vücut demir düzeyi, başlıca demir absorpsiyonu ve kemik iliğinin eritropoetik aktivitesi olmak üzere çok sayıda düzenleyici mekanizma tarafından kontrol edilir. Normal bir bireyin besinlerden alınan 1-2 mg arasında elementer demire ihtiyacı vardır. Transferin, doğal olarak metal şelatör proteindir, demirin bütün hücre ve dokulara taşınmasında rol oynar. Hücre ve dokulara taşınan demir ya depo edilir ya da demir içeren enzimler tarafından kullanılır. Transferin demir dışında çok sayıda diğer metal iyonlarını da bağlayabilir ve taşıyabilir. Transferinin 2 demir bağlayan bölgesi vardır. Transferinin demir alımına; nitrilotriasetik asit gibi sentetik demir şelatörler ya da sitrat, okzalit, asetat ve bikarbonat gibi doğal demir şelatörler aracılık edebilirler. Transferinin aynı zamanda ferrokسيدaz aktivitesi vardır (71).

Normal bireylerde, transferin demir saturasyonu %20-35 arasında tahmin edilir. Transfüzyonel demir yığılımında ve diğer demir biriktiği şartlarda, transferin demir saturasyonu %100 ü aşmaktadır. Bu şartlarda, transferin tarafından demir taşınması normal bireylere göre 2-3 kat daha yüksektir. Hepsidin, demir homeostazının düzenlenmesinde önemlidir ve demir yığılımı sendromlarının gelişmesinde rol oynar. Hepsidin demir taşınmasında regülatördür (12).

1981 yılında Sullivan, vücuttan demirin uzaklaştırılmasının iskemik kalp hastalığında koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir. Bu hipotez; erkek cinsiyet riskini açıklar. Kadınlarda menstrual siklus sırasındaki demir kaybı riski azaltmakla birlikte, menopoza bu koruyucu etkinin kaybına ve koroner kalp hastalıklarına neden olmaktadır. Besinde demir alımı ile kardiovasküler hastalıklar arasında ilişki bulunmaktadır (89).

$\beta$  talasemi majörlü hastalarda demir yığılımının iki önemli nedeni vardır. Bunlar; düzenli kan transfüzyonları ve etkin olmayan eritropoez nedeniyle intestinal

demir absorpsiyonunun tetiklenmesidir. Bu hastalarda; yaklaşık eritrosit 1-3 ünite transfüzyon 2-4 haftada bir tekrarlanır. Bu yaklaşık 15-20 mg/gün demir birikimine ve Hb katabolizmasından açığa çıkan demirin salınmasına neden olur. Daha sonra transferin tarafından bağlanan demir kalp gibi organlara taşınır. Kardiyak hasar, düzenli transfüzyon olan talasemi hastalarında demir depozisyonuna ve hasara neden olur. Bu şartlar altında demir depozisyonu miyofibrillerin kaybına ve kalp kasında miyositlerin bozulmasına neden olabilir (71). Bugün halen demir yığılımı,  $\beta$  talasemi majörlü hastalarda mortalite ve morbiditenin ana nedenidir. Demirin indirgeyici özelliği yüzünden proteine bağlı olmayan demirlerin oluşturduğu demir yığılımı toksik oksijen radikallerinin üretimine yol açar. Bu oksijen radikalleri protein hasarına, hücre membranındaki ve lizozom, mitokondri gibi diğer organellerdeki lipidlerin peroksidasyonuna aracılık ederek hücre ölümü ve organ yetmezliğine neden olur. Organlar demir toksisitesine çok hassastır. Bu nedenle demir yığılımı, kalp yetmezliği, siroz ve endokrin anormalliklere yol açar (14).

Hereditör hemokromatozis, talaseminin yanı sıra malarya ve tüberküloz gibi infeksiyöz hastalıklar demir yığılımı ile ilişkilendirilir. Normalde, plazmada demir transferinle güvenli olarak taşınır. Ancak demir yığılımı olan anemilerde transferine bağlanmamış demir (NTBI) plazmada saptanmaktadır. İn vitro deneyler, NTBI'nın hidroksil radikalleri meydana getirebildiğini ispatlamıştır. NTBI'nın tam kimyasal yapısı bilinmiyor ama bazı moleküler türleri bulunmaktadır. Talasemi hastalarında serbest hemoglobin, haptoglobulin bağlanma kapasitesini artırır ve bu durum NTBI'ya benzer hatta daha kötü etkilere neden olmaktadır (89).

Hücrel demir homeostazı immün fonksiyonlar için önemlidir. Hem demir eksikliği hem de demir yığılımı immün sistemde T ve B lenfositlerinin proliferasyonunu değiştirerek immün sistemi etkilemektedir. Demir, fagolizozomlar içindeki reaktif oksijen türlerinin üretimini katalize ederek makrofaj aracılı sitotoksitede kritik rol oynamaktadır. Aynı zamanda mononükleer-fagosit sistem hücrelerinin immün cevabında önemlidir. Hücre içinde ferritine bağlanmamış demirin artışı, mononükleer fagositler üzerine IFN $\gamma$ 'nın etkisinin azalmasına yol açar (56, 162).

Demir yığılımı; monosit ve makrofajlar tarafından antikor aracılı fagositozun azalmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda T lenfosit alt gruplarında değişikliğe yol açar. Ayrıca kompleman sistemin klasik ve alternatif yolağının baskılanmasıyla da ilişkilidir (153).

## 2.2. $\beta$ -Talasemi Majör Hastalarında İmmun Sistem

$\beta$ -talasemi majörlü hastalarda, kalp yetmezliği ve enfeksiyonlar mortalitenin ana nedenleridir. Enfeksiyonlar, hastaların yaklaşık %12-46'sının ölüme yol açmaktadır. Tayvan ve Tayland'da yapılan çalışmalarda talasemili hastalarda ciddi bakteriyel enfeksiyonların en az yarısından gram negatif mikroorganizmaların sorumlu olduğu bildirilmiştir. *Klebsiella pneumoniae* bunların en sık görüleni olup, diğerlerinin *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio vulnificus*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus intermedius*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Salmonella* türleri olduğu saptanmıştır. Klinik olarak da karaciğer absesi, sepsis, yumuşak doku enfeksiyonları, osteomyelit, korneal ülser, enterit ve akciğer, böbrek, intra abdominal bölge, retrofarinks, dişeti ve kalçada abseler bildirilmiştir. Splenektomi ve demir şelasyon tedavisinde gecikme enfeksiyon gelişiminde bağımsız risk faktörü olarak bulunmuştur (39, 156).

$\beta$ -talasemi majörlü hastalarda; monosit ve nötrofillerin aktivitesinin zayıfladığı, poliklonal immunoglobulin sentezinin arttığı, kompleman alternatif yolağının aktivitesinin bozulduğu gösterilmiştir. Ayrıca lenfosit alt gruplarının fonksiyonel ve sayısal olarak değiştiği bulunmuştur. Splenektomi olan hastalarda lenfosit fenotipinde değişiklik olduğu ve C reaktif protein düzeyinde artış görüldüğü bildirilmiştir. Çin'de yapılan bir çalışmada;  $\beta$ -talasemili çocukların NK hücre sayısının kontrollere göre daha düşük olduğu bulunmuştur. Bellek T lenfositlerinin bu hastalarda arttığı gösterilmiştir. NK hücrelerinin sayısı ile transfüzyon sayısı arasında ters orantı olduğu, CD25'in ise transfüzyon ile birlikte artış gösterdiği bulunmuştur. Bu anormalliklerin transfüzyonlar, demir yığılımı ya da splenektomiden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak, bu immunolojik modifikasyonların altında yatan temel mekanizma hala açık değildir (80, 85, 99).

### 2.2.1. NK Hücreleri

Virüsle enfekte edilmiş hücreleri ve tümörleri, elimine edebilecek sitotoksik hücrelerin varlığı, 100 yıl önce ilk kez Paul Ehrlich tarafından keşfedilmiştir. 1950'li yıllarda MacFarlane Burnet; immun sistemin, hücresel transformasyonun düzenlenmesinde ve tümörlerin gelişiminin engellenmesinde rol oynadığını göstermiştir (55). NK hücrelerinin tanımlanması ise ilk olarak yaklaşık 30 yıl önce Rolf Kiessling tarafından yapılmıştır (6).

İnsanlarda, T ve B'lerden sonra lenfosit popülasyonunun 3. alt grubunu NK'lar oluşturur ve periferal kanda toplam lenfositlerin %5-15' i kadardır. NK hücreleri klasik olarak CD56<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup> yüzey markırlarıyla tanımlanır. Ayrıca, lökosit marker 7 (Leu-7/ CD57), interlökin 2 reseptör  $\beta$  zinciri (IL-2R $\beta$ / CD122), Fc reseptörleri,  $\beta_1$  ve  $\beta_2$  integrinler, HLA-DR, transferin reseptör (CD71), CD69, hedef hücreye bağlanan çeşitli aktivatör reseptörler ve öldürücü hücre lektin benzeri reseptör B1(KLRB1/CD161) de NK markırları olarak tanımlanır (163). Ancak bu moleküller aynı zamanda bazı T hücrelerinde ve NKT hücrelerinde de eksprese edilir (4, 6, 8, 46, 73, 90). NK hücrelerinin inaktif durumdayken çapı yaklaşık 7-8  $\mu$ m kadardır, aktive olduklarında 10-12  $\mu$ m olabilmektedir (163).

NK hücreleri genel olarak patojen mikroorganizmalarla enfekte olmuş hücrelerin, özellikle enfeksiyonun erken fazında yok edilmesinde önemli rol oynarlar. Ayrıca tümör hücrelerinin öldürülmesinde de önemlidirler. Özellikle herpes virüs ve adenovirüs gibi sitopatik virüslere karşı savunmada hayati rol oynarlar (2, 46, 90, 154). NK hücreleri doğal immun sistemin bir elemanı olsalar da, direkt olarak adaptif immun cevapta da rol oynarlar ve bunu dendritik hücrelerle etkileşime girerek yaparlar. Bu etkileşim, dendritik hücrelerinin aktivitesinin pozitif ya da negatif yönde düzenlenmesini sağlar. Dendritler, antijen sunan hücrelerdir ve T hücre cevabı için önemlidirler. NK'ların dendritik hücrelerle etkileşimi, T hücre

aracılı immun cevabın feedback regülasyonuna katkıda bulunur. T hücre aracılı aktivasyonda NK hücrelerinin hem tetikleyici hem de baskılayıcı olarak rol oynadığı düşünülmektedir. Çünkü, NK hücreleri T lenfositleriyle direkt etkileşime girerek hücre ko-stimülasyonu yapabilmektedirler. NK hücrelerinin eksprese ettikleri CD40L (CD154) ve OX40L ligandları onun, T ve B lenfositlerine ko-stimülatör sinyal sağlamasına izin verir. Böylece doğal ve adaptif bağışıklık arasında bir köprü oluşturur. NK' ların bu fonksiyonu dendritik hücrelerin uyarısıyla gerçekleşir **(8, 112, 106, 116)**. NK hücreleri, hücrel sitotoksositeye aracılık eder, kemokin ve IFN $\gamma$  ve TNF gibi inflamatuvar sitokinleri üretirler **(21, 116)**.

NK hücrelerinin antijenik uyarı olmaksızın spontan olarak hedef hücreyi öldürebilmelerini, hücre yüzeyindeki inhibe edici ve aktive edici sinyaller belirler **(29, 42, 105)**. MHC, normal hücreleri NK aracılı lizisten koruyan moleküllerdir. NK hücreleri yüzeyinde taşıdıkları İnhibitör Reseptör Süperaillesinin (IRS), kendi MHC sınıf I' ini tanması sayesinde otolog hücrelere zarar vermez. MHC moleküllerinin ekspresyonu virüsle enfekte olmuş hücrelerde ya da tümör hücrelerinde azalır ve bu da NK aracılı lizise eğilimi arttırır. Çünkü, NK hücreleri MHC molekülünün allotipik determinantlarını tanıyabilir. MHC-spesifik reseptörlerin eksikliği hedef hücrenin lizisine neden olur. Sonuç olarak NK hücreleri, MHC sınıf I molekülünü etkin olmayan miktarda eksprese eden ya da bu molekülü olmayan hedef hücreleri öldürür Bu konseptte göre Ljunggren ve Kare tarafından “missing self” (kendine ait olanı görmemezlikten gelme) hipotezi oluşturulmuştur. **(4, 22, 73, 96, 106, 112)**. NK hücreleri kemik iliği transplantasyonunda ve graft-versus-host hastalığında da önemli rol oynar **(163)**.

NK yüzeyinde bulunan CD16 ve CD32' ün ligandı IgM' dir.  $\beta_2$  integrinler, sinyal iletimi ve NK aktivasyonu için önemlidirler.  $\beta_1$  integrinler arasında fibronektin reseptörü olan VLA-4, VLA-5 ve laminin reseptörü olan VLA-6; NK' ların solid substratlara, ekstraselüler matriks komponentlerine ve hedef hücreye bağlanmalarını sağlarlar.  $\beta_1$  integrinler, NK aktive olduktan sonra eksprese edilirler. NK' nın hedef hücreyi tanması ve onunla etkileşiminin moleküler mekanizması hala çok az bilgi bulunmaktadır **(163)**.

NK aracılı sitotoksite için adezyona ve immunolojik sinapsa ihtiyaç duyulur. İnhibitör ve aktivatör sinyaller arasındaki dengede eğer inhibitör sinyaller baskınsa immunolojik sinaps yok olur. Eğer aktivatör sinyaller baskınsa kalıcı bir sinaps oluşturulur. Bu sinapsta, NK üzerindeki lökosit fonksiyonuyla ilişkili molekül (LFA-1), aktin ve talin ile birlikte stimulatör reseptör sinyalleri arasında bir halka oluşturur (8). Src-homoloji 2(SH2) domaini içeren tirozin fosfotaz (SHP-1); erken immunolojik sinapsta önemlidir (8). Aktivatör sinyallerin yarıda kesilmesi için NK hücrelerinde fiziksel çevreyi sağlar. Hematopoetik-spesifik Rho- GTP değiştirici faktör ailesinin bir üyesi olan Vav1, sinapsın oluşmasında oldukça önemlidir. Vav1' in defosforilasyonu, immunolojik sinapsın kaybolmasına yol açar (8). İmmun sinapslar, supramoleküler markerlardır ve immün sistemin hücreleri arasında hücre içi iletişimi sağlarlar (119). İmmün sistemin fonksiyonları, sitokinler, kemokinler ve hücre yüzeyi ile ekstrasellüler matriks vasıtasıyla düzenlenir (119). İmmunolojik sinaps, naif hücrelerin farklılaşmasını sağlayan etkileşimler için gerekli bir platform olarak rol oynar (119). NK hücrelerinin sitolitik işlemlerinin sitotoksik NK hücre immün sinapsta (cNK-IS) de meydana geldiği gösterilmiştir. Bu sinapsta supra moleküler aktivasyon cluster (SMAC) bulunur. SMAC; integrin benzeri LFA-1 ve talin gibi hücre iskeleti komponentlerinden oluşur. Merkezi ise cSMAC, periferal ise pSMAC olarak adlandırılır. Aktivatör reseptör olan NKG2D nin cSMAC lokalizasyonu ile reseptör aracılı NK sitotoksitesi paraleldir (72, 119).

NK hücreleri morfolojik olarak sitozolik granüller içeren büyük granüler lefositler olarak tanımlanırlar. Granüllerde perforin, granzim A ve granzim B molekülleri bulunur. Bu moleküller, tümör hücrelerinin osmotik ve apoptotik öldürülmesine katılırlar. NK' nın sitolitik fonksiyonunun; sitoplazmik kinazların kaskadları gibi, nukleusdan bağımsız olduğu düşünülür. NK hücreleri ile hedef hücre arasında oluşturulan immunolojik sinapsta, adaptör proteinler, Ca salınımına yol açar ve perforin içeren sitolitik granüller salınır. Perforin, hücre aracılı sitotoksiste reaksiyonlarında salgılanan primer mediatördür. Salgılandıktan sonra hedef hücreye girer ve Ca varlığında hızla polimerize olarak transmembran porları oluşturur. Poliperforin porları, diğer granül komponentleri olan granzim A ve granzim B moleküllerinin hücre membranına girişini kolaylaştırır. Perforin, granzim aracılı apoptoza yol açar ama tek başına apoptoza neden olmaz. Hedef hücredeki



ölüm reseptörlerine, NK yüzeyinde bulunan (FasI, TRAIL v.s.) ligandlarıyla bağlanır (**107, 133, 158**). NK hücrelerinin hedef hücreleri lizisinde majör mekanizma perforine bağımlı lizistir. Bunun dışında daha az etkinlikte ve daha uzun sürede olsa da FAS ligandı, TNF ya da TNF ile ilişkili apoptoza neden olan ligand (TRAIL) aracılığıyla da perforinden bağımsız bir yol olarak lizis gerçekleştirebilmektedirler (**106**).

NK hücrelerinin diğer önemli efektör fonksiyonu; proinflamatuvar sitokinler ve kemokinler sekrete ederek inflamatuvar yanıtı neden olurlar, ayrıca monosit ve granülositlerin efektör fonksiyonları ile proliferasyonlarını modüle ederler (**2**). Bu sitokinler; IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , Lenfotoksin  $\alpha$  (LT $\alpha$ ), GM-CSF, IL5, IL13, IL10 makrofaj inflamatuvar protein(MIP-1( $\alpha$  ve  $\beta$ ))/CCL3' tür (**73, 106, 109, 154, 174**). IFN $\gamma$ , immun savunma için merkezi rol oynar. İmmun sistemin fonksiyonu ile ilişkili yüzlerce genin düzenlenmesi ve enfeksiyonlara dirençte önemli rol oynar. IFN $\gamma$ ; makrofaj ve nötrofilleri aktive eder, Th1 CD4<sup>+</sup> lenfositlerin farklılaşmasını uyarır, MHC ve onunla ilişkili proteinlerin ekspresyonunu arttırarak antijen sunumunu arttırır ve IgG' nin B hücreleriyle etkileşimine neden olur. Bu nedenle doğal ve adaptif bağışıklığı birbirine bağlayıcı fonksiyonları vardır (**6, 73**). IL2, IL12, IL15, IL18, TNF  $\alpha$  ve IFN $\alpha/\beta$ ; NK hücrelerinin aktivasyonuna katkıda bulunur. Oysaki IL4, IL10 ve TGF- $\beta$ ; NK hücre fonksiyonunu baskılar. IL12, IL18 ile birlikte NK aracılı immun cevabın tetiklenmesinde önemli rol oynar. IL12 ve IL18' in de sekresyonu, IFN $\gamma$  düzeyinin artmasına neden olur. NK hücrelerinin aynı zamanda antijen sunan hücre olarak T hücre aktivasyonunu düzenledikleri gösterilmiştir. NK hücreleri IL18 ile uyarılarak, non-sitotoksik yardımcı hücreler olarak fonksiyon görebilirler (**6, 73, 154**). NK hücreleri dendritik hücrelerin IL18 sekrete etmesini tetikler. Bu sitokin, NK aktivitesini arttırıcı diğer faktörlerden farklı olarak NK' nin sitolitik aktivitesini arttırmaz ama onun "yardımcı" yönde farklılaşmasına neden olur (**128**). NF- $\kappa$ B' nin farmakolojik inhibitörlerinin NK aktivitesini azalttığı gösterilmiştir. IL2, IL18 ya da TLR2 ligandları NF- $\kappa$ B'ye bağlı aktiviteye neden olur. NF- $\kappa$ B' nin alt ünitesi olan RelB' nin eksikliği ya da I $\kappa$ B' nin dominant negatif bir formunun aşırı ekspresyonu NK hücrelerinin aktivasyonunu ve fonksiyonunu

zayıflatabilir. NKp30; hızlı İκB degradasyonuna ve NF-κB nukleusa translokasyonuna neden olur (107).

CD56 (Nöral hücre adezyon molekülü, N-CAM), bütün NK hücrelerinde eksprese edilmesine rağmen fonksiyonel rolü henüz anlaşılamamıştır. NK hücreleri fonksiyonel olarak 2 alt gruba ayrılır. Bu gruplandırma yüzey markerı olan CD56'nın yoğunluğuna göre tanımlanır. CD56<sup>sönük</sup> düşük yoğunlukta, granüler ve klasik sitotoksik NK hücreleridir. Densitesi 5-10 kat daha yüksek NK hücreleri CD56<sup>parlak</sup> olarak adlandırılır. Granül içermez ve sitotoksik değildir ama daha fazla sitokin üretme kapasitesi vardır. Bu hücreler IL12/IL1, IL12/IL15 ya da IL12/IL18 ile uyarıldıklarında yüksek düzeyde IFNγ, TNFβ, IL10, IL13 ve GM-CSF sekrete ederler. İmmun regülasyonda görev alırlar (31, 106, 154, 165). CD56<sup>sönük</sup> NK hücreleri “hedef hücreye cevap veren”, CD56<sup>parlak</sup> NK hücreleri ise “sitokine cevap veren” hücrelerdir (152).

CD56<sup>sönük</sup> NK hücreleri, yüksek düzeyde CD16 (FcγRIII) ve perforin eksprese eder. Oysaki CD56<sup>parlak</sup> NK' lar CD16<sup>-/düşük</sup> ve perforin<sup>-/düşük</sup> tür. CD56<sup>sönük</sup> NK hücreleri ve CD56<sup>parlak</sup> NK' lar farklı dokularda dağılım gösterirler. Periferel kandaki NK ların %95 i CD56<sup>sönük</sup> CD16<sup>+</sup> perforin<sup>+</sup>, kalanı ise CD56<sup>parlak</sup> CD16<sup>-</sup> perforin<sup>-</sup> tir. Dalaktaki NK' ların %85' i CD56<sup>sönük</sup> CD16<sup>+</sup> tir (31, 41, 28, 139, 154).

CD56<sup>sönük</sup> ve CD56<sup>parlak</sup> alt gruplarında, migrasyonu sağlayan farklı yüzey molekülleri bulunur. Adezyon molekülleri arasındaki farklılıklar NK alt gruplarının farklı dokulara migrasyonu tercih etmesinde rol oynar. Örneğin, CD56<sup>parlak</sup> NK hücrelerinin başlıca bulunduğu yer lenf düğümleridir. CD44 ve L-selektin (CD62L) her iki alt grupta da bulunur ama CD56<sup>parlak</sup> NK hücrelerinde daha yüksek orandadır. CD31 stimülasyondan sonra CD56<sup>parlak</sup> NK hücrelerinde yüksek oranda bulunur. Bu hücre grubu, L-selektin ile CCR7 eksprese ederler ve daha çok lenf düğümlerinde bulunurlar. CCL19 ve CCL21 kemokinleri CCR7' nin ligandıdır. Granzim K, CD56<sup>parlak</sup> hücrelerinde bulunur. Lenf düğümlerinde CD56<sup>parlak</sup> hücreleri, olgunlaşmamış dendritik hücrelerin seçiminde rol oynar. Granzim K düşük sitotoksik kapasitesiyle bu fonksiyonda önemli rol oynayabilir (41, 165). NK' nın

her 2 alt grubunda IL2R, IL12R ya da IL18R komponentleri arasında fark bulunmazken hücre proliferasyonu ya da aktivasyonunda rol oynayan IL7R ve IL12R $\beta$ , CD56<sup>parlak</sup> NK hücrelerinde daha yüksek oranda bulunur (165).

CD56<sup>sönük</sup> NK hücreleri, inflamatuvar kemokinler için reseptörler eksprese ederler. İnflamasyonda, bazı kemokinler vasıtasıyla kandan periferal dokulara geçebilirler (31, 139, 154). Aktive edilmiş lökosit hücre adezyon molekülü ALCAM(CD166) ya da ICAM2(CD102) sadece stimülasyondan sonra görülebilir ve CD56<sup>sönük</sup> NK hücrelerinde daha yüksek miktardadır. ICAM1 (CD54) ise uyarılmamış NK hücrelerinde bulunur ve aktivasyondan sonra azalır. ICAM3 (CD50) hem uyarılmamış hem de aktive olmuş NK hücrelerinde bulunur (165). CD3 $\zeta$ , DAP10, DAP12 ve Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  gibi aktive edici adaptör proteinler arasında sadece CD3 $\zeta$ , CD56<sup>sönük</sup> hücrelerinde daha fazla eksprese edilir. Bunun nedeninin yine yüksek miktarda bulunan CD16' nın sinyal iletici adaptör molekülü olmasına bağlanır. Granzim B, CTLA1, granzim M de CD56<sup>sönük</sup> hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilmektedir (165).

İnsanlarda ve farelerde NK ve T hücrelerinin ortak bir prekürsöre (CD7+CD34+) sahip olduğu gösterilmiştir (96). İn vitroda, NK hücrelerinin olgunlaşması için besleyici hücelere ya da IL15 e gereksinimi vardır (96). NK hücreleri kemik iliği kökenlidir. Bu nedenle stromal hücrelerle etkileştiği düşünülebilir. Kemik iliği stromal hücreleri; hemopoetik kök hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında rol oynar (112, 132). NK hücreleri, T lenfositlerinde olduğu gibi spesifik reseptörlerin yeniden düzenlendiği bir seçilime girmezler. NK hücrelerinin kendi vücut hücrelerine toleransını kazandıran süreç tam olarak anlaşılmış değildir. Son çalışmalar NK nın olgunlaşması için inhibitör reseptörleriyle uygun MHC sınıf I moleküllerinin etkileşmesinin gerektiğini göstermektedir. Olgunlaşmış NK hücreleri çoğunlukla kanda, dalakta, karaciğerde ve uterusunda bulunmaktadır. Düşük sayıda lenf düğümlerinde de bulunmaktadır. NK hücrelerinin hedef hücreleri tanımalarının altında yatan mekanizma halen tam olarak açıklanamamıştır (6). İnsanlarda, erken gelişimsel dönemde KIR reseptörlerinden önce baskın olan reseptör NKG2A/CD94' tür. Yetişkin dönemde ise NK hücrelerinde, NKG2A ekspresyonu azalırken KIR ekspresyonu artar (139). NK hücre prekürsörleri 2B4 ve

düşük düzeyde CD16, NKp46 ve NKp30 eksprese ederler. İlk yüzeyde eksprese edilen inhibitör reseptör CD94, NKG2A' dır. NK prekürsörleri inhibitör aktivitesi ile karakterize edilen 2B4' ün ekspresyonu yüzünden normal otolog hücreleri öldürmezler (150). CD34<sup>+</sup> progenitor hücrenin NK hücrelerine doğru farklılaşmasında IL15 rol oynar (53). NK hücreleri; TNF $\alpha$  ve GM-CSF gibi sitokinler üretirler. Bu sitokinler; miyeloid ve lenfoid prekürsörlerin olgunlaşması/farklılaşmasının düzenlenmesinde rol oynarlar (109).

$\beta$ -talasemi majörlü hastalarda anlamlı olarak NK aktivitesinin, sağlıklı kişilere göre daha düşük olduğu bulunmuştur (2, 7, 80). NK hücrelerine in vitro şartlarda desferrioxamine ya da 2,3-dihidroksibenzoik asit (DHB) şelatörlerinin eklenmesinin, NK aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (2, 3). Bizim yaptığımız önceki çalışmada ise C vitamininin bu hastalarda NK aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (7). Yapılan çalışmalar  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda düşük NK aktivitesinin modüle edilebilir olduğunu, demir yığılımı ve oksidatif stresle ilişkili olabileceğini göstermektedir. Ancak demir yığılımı ve oksidatif stresin direkt olarak mı NK hücrelerini etkilediği, yoksa NK hücrelerinin homeostazında rol oynayan diğer immün sistem elemanlarını etkileyerek indirekt olarak mı NK aktivitesini değiştirdiği tam olarak anlaşılmış değildir.

### 2.2.1.1. NK Reseptörleri

NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesi, hücre yüzeyi üzerinde eksprese edilen reseptörlerin pozitif ve negatif sinyalleri arasındaki dengeye göre düzenlenir (22, 119). NK hücreleri; hedef hücre ile etkileşiminde, çoklu reseptör tanıma stratejisini kullanır. NK hücrelerinin düzenlenmesi, immün sistemin diğer hücrelerinde olduğu gibi tek bir antijene seçici spesifite gösteren dominant bir reseptör tarafından gerçekleşmez. Onun yerine, çoklu hedefleri tanıyabilme ve öldürebilme yeteneğine sahiptirler. Bunu çok sayıda inhibitör ve aktivatör reseptörleriyle başarırlar (6, 31). İmmunolojik sinapsta, çeşitli reseptörlerden bağımsız olarak ya da reseptör kombinasyonu halinde tetiklenebilirler. Aktivasyon ve inhibisyon spasyal olarak regüle edilir. Tek bir NK hücresi normal bir hücreyle ya da simultan olarak

öldürebildiği bir malign hücreyle etkileşiyor olabilir (119). Ayrıca, NK reseptörleri T hücreleri ve miyeloid kökenli hücreler tarafından da eksprese edilir ve bu hücrelerin fonksiyonlarını etkileyebilir (116).

NK hücreleri klasik ve klasik olmayan MHC sınıf I molekülleri için farklı reseptörler eksprese ederler. Bu reseptörlere inhibitör süper aile reseptörleri (IRS) denir. IRS; Öldürücü Ig benzeri reseptörler (KIR) ve C-tip lektin benzeri inhibitör reseptör (CLIR) olmak üzere ikiye ayrılır. Ly49 ve CD94/NKG2 reseptörleri, C-tip lektin benzeri reseptör ailesine aittir (8, 111). Major inhibitör reseptörler, lektin benzeri heterodimer CD94/NKG2A ve öldürücü hücre immunoglobulin reseptörler (KIR)' dir (5, 96, 119, 159, 166). İnhibitör reseptörlerin çoğunluğu KIR ailesine aittir (5, 96, 75). Bu reseptörlerin sitoplazmik ucunda immunoreseptör tirozin inhibitör motif (ITIM) bulunur. İnhibitör reseptörler etkilerini, ITIM üzerinden gerçekleştirir. Ligand reseptöre bağlandığı zaman ITIM' da tirozin fosforilasyonu olur. Onun fosforilasyonu SHP-1 ve SHP-2 fosfotazların aktivasyonuna neden olur ve NK aktivitesi baskılanır (8, 66, 174).

KIR reseptörleriyle homolog reseptör aileleri; Ig benzeri transkriptler (ILT) veya Lökosit Ig benzeri reseptörler (LIR), lökosit ile ilişkili Ig benzeri reseptörler (LAIR), eşleşmiş Ig benzeri reseptörler (PIR)' dir. Bunların gen dizilerinin %35-50' si KIR reseptörleriyle aynıdır. Bu nedenle KIR süper ailesi olarak adlandırılır. Ayrıca Ig benzeri Fc reseptörleri (Fc $\alpha$ R, Fc $\gamma$ R-I, -IIa, -IIb, -III ve Fc $\epsilon$ RI) bulunur. Bu reseptörlerin KIR ile ortak gen dizileri ise %20' nin altındadır. KIR reseptörlerinin KIR2DL1, KIR2DL2 ve KIR2DL3 olmak üzere 3 üyesi vardır. LIR1 inhibitör reseptörü; monositler, B hücreleri, dendritik hücreler ve NK ile T hücrelerinin alt gruplarında eksprese edilir (114).

C-tip lektin benzeri reseptörler; kalsiyuma bağlı karbonhidrat bağlayan protein ailesidir (114). Bu reseptörlere, NKG ailesi reseptörleri denir (23). NKG2; C tip lektin benzeri reseptör ailesindedir. NKG2C, NKG2E ve NKG2D aktive edici özelliğe sahiptirler. NKG2C ve NKG2E reseptörleri ve inhibiör NKG2A reseptörü adaptör protein CD94' e bağlanır. CD94/NKG2A reseptörü HLA-E için spesifiktir (5, 37, 46, 96, 98).

Aktivatör reseptörler ligandlarını tanıyarak sitoliz ve sitokin üretimine aracılık ederler. NK hücrelerinin majör aktivatör reseptörleri; NKG2D (CD314), Fc $\gamma$ RIIIA reseptör CD16 ve doğal sitotoksik reseptörlerdir (NCRs). NCR reseptörleri; NKp46, NKp44 ve NKp30' dan oluşur. Ayrıca NK hücrelerinde; DNAM-1, 2B4 (CD244), NTB-A, CRACC (CS1) ve NKp80 gibi sinyal gücünü arttıran ama tek başına hücre lizisine aracılık edemeyen ko-stimulatör reseptörler de mevcuttur (**6, 13, 20, 48, 98, 125, 147**). Aktivasyon reseptörleri için ligandlar, viral proteinler, stres ve transformasyona neden olan moleküllerdir. NCR reseptörlerinin bilinen ligandları; NKp44 ve NKp46 için influenza hemaglutinin, NKp30 için sitomegalovirüs (CMV) kodlanan pp65' tir (**48**). CD16 için IgG antikorunun Fc kısmıdır (**48, 66**).

İmmunoreseptör tirozine dayalı aktivatör motif (ITAM) içeren sinyal verici adaptör moleküller CD3 $\zeta$ , DAP12 ve Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ ' dır. NKp30, NKp46 ve CD16 için adaptör moleküller CD3 $\zeta$  ve FcR $\gamma$ ' dır. NKp46 ve NKG2D için ise; öldürücü hücre aktive edici reseptör protein /DNAX aktive edici protein 12 kDa/ tirozin kinaza bağlanan protein(KARAP/DAP12/TYROBP) ve DAP10' dur. İnsanda; NKp30, NKp46 ve CD16' nin yolağının aynı olduğu düşünülür (**36, 48, 66, 139, 142**).

CD16; periferik kandaki NK hücrelerinin çoğunluğunda eksprese edilir. CD16' nin aktivasyonu hedef hücredeki spesifik IgG antikorlarının varlığına bağlıdır. IgG ile kuşatılmış hedef hücrenin antikora bağımlı hücresel sitotoksitesine (ADCC) aracılık eder (**23, 26, 174**).

DNAX aksesuar molekül-1 (DNAM-1), 2B4 (CD244), NTB-A, CRACC (CS1) ve NKp80; NK sitotoksitesini arttıran ko-reseptör olarak görev yaparlar. Hedef hücrede ligandlarına bağlandıklarında ko-stimulatör etki gösterirler (**97, 124**) 2B4/CD244; CD2 süperailisine aittir ve bütün sitolitik lenfositler tarafından eksprese edilir. Bu reseptör özellikle Epstein-Barr virüs (EBV)' ye karşı savaşta önemlidir. 2B4' ün ligandı olan CD48, EBV ile enfekte edilmiş hücrelerde ekspresyonu artar. 2B4 reseptörü CD48 e bağlanır ve reseptör üzerinden, adaptör protein olan sinyal verici lenfosit aktivasyon molekülü ile ilişkili proteini (SAP) fosforile eder (**22, 26, 40, 119**). Şekil 2-2' de NK hücrelerinin sitotoksitesinden sorumlu activator reseptörler gösterilmiştir.

### 2.2.1.2. Doğal Sitotoksik Reseptörler (NCR)

NCR'nin ekspresyon düzeyi bireyler arasında farklılık gösterir. NCR yüzey yoğunluğu, immunofloresan ışık yoğunluğuna bakılarak ölçüldüğünde bu fark tespit edilmektedir. NCR<sup>parlak</sup> fenotipe sıklıkla rastlanır. NCR<sup>sönük</sup> ise nadirdir ve sadece NK' nın bir alt grubunda bulunabilir. NCR<sup>parlak</sup> ve NCR<sup>sönük</sup> ; çeşitli tümör hedef hücrelerine karşı farklı lizis edebilme potansiyeline sahiptirler. NCR yoğunluğu ile NK aracılı sitotoksosite arasında korelasyon vardır. NKG2D reseptörü ise NCR' lere kıyasla ekspresyon bakımından farklılık göstermezler (6, 22, 30, 149).

NCR reseptörleri; NKp46/CD3 $\zeta$ , NKp30/CD3 $\zeta$  ve NKp44/DAP12' den oluşmaktadır (22, 25, 62, 119, 136). Bunlar NK hücrelerine spesifik Ig benzeri transmembran glikoproteinleridir. NKp30 ve NKp46; hem aktif hem de inaktif NK hücrelerinde eksprese edilirken, NKp44 sadece NK aktivasyonu sırasında eksprese edilir (22, 62, 107, 136). NCR' lerin transmembran bölgeleri pozitif yüklü amino asitler içerir. Bu amino asitler, ITAM gibi adaptör moleküllerle non-kovalent olarak ilişki kurulmasına izin verirler. ITAM; NKp46 ve NKp30 reseptörlerinde adaptör protein olarak CD3 $\zeta$  ve FcR $\gamma$  polipeptidlerini taşır. NKp44 reseptöründe ise KARAP/DAP12 adaptör proteinini taşımaktadır. Bu adaptör proteinler sitotoksosite ve/ ya da sitokin sekresyonu için sinyal yolağına katılır. NK hücrelerinin sitolitik fonksiyonunun azalması, NKp46, NKp30 ve NKp44 reseptörlerinin azalmasıyla belirlenir (22, 26, 86, 124).

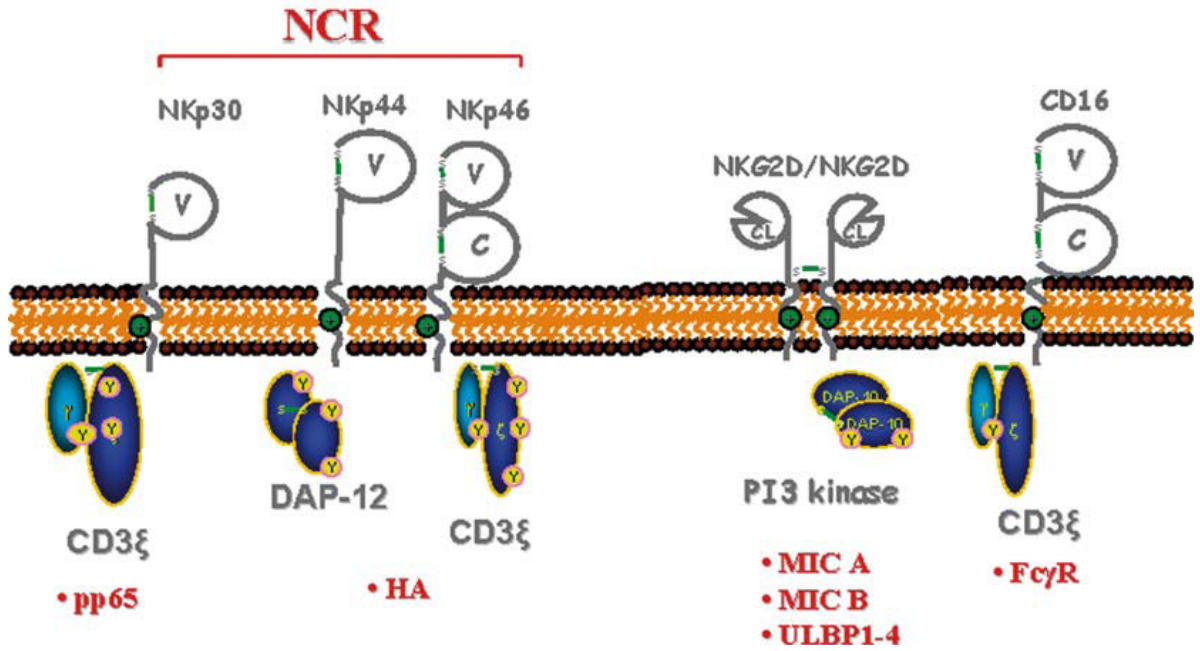
NKp30; tümör immunitesinde ve dendritik hücre (DC) olgunlaşmasında görevlidir. NKp30; hedef hücreye karşı sitotoksitenin indüksiyonunda hem NKp46 ve NKp44 ile işbirliği içinde olduğu gibi aynı zamanda nispeten onlardan bağımsız olarak da farklı ligandları tanıdığı gösterilmiştir. Dendritik hücrelerle etkileşimi nedeniyle diğer aktivatör reseptörlerden ayrılır (15, 24, 66, 91, 110). NK-DC etkileşimi, olgunlaşmamış dendritik hücrenin eliminasyonuna ya da olgunlaşmasına

karar verir. NKp30 bu etkileşimde majör rol oynar. Dendritik hücrenin öldürülmesine ya da TNF ve IFN $\gamma$  vasıtasıyla olgunlaşmasına aracılık eder (6, 44, 66, 110). NKp30' un uyarılması IFN $\gamma$  üretimine yol açar. TGF- $\beta$ 1' in NK hücreleri ile inkübasyonu NKp30 ve NKG2D yüzey ekspresyonunu azaltır. Bu azalma NK hücrelerinin bazı hedeflere karşı sitotoksitesini de azaltır. IL2; NKp30 ekspresyonunu arttırabilir. Alloaktivasyondan sonra NK hücrelerinde NKp30 reseptörü artar. CMV protein pp65' e karşı viral immunitede önemli olduğu düşünülmektedir (15, 24, 66, 91, 110).

NKp44; aktive olmuş NK hücreleri tarafında eksprese edilir (77). NKp46 ve NKp30 sadece NK hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilir. NKp44 ise aktive edilmiş NK hücrelerinde bulunur ve aynı zamanda plazmastoid dendritik hücrelerinin yüzeyinde de eksprese edildiği gösterilmiştir. Plazmasitoid dendritik hücrelerde NKp44' ün ekspresyonu, bu hücrenin IFN $\gamma$  sekresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. NCR' lerin ligandları hakkında çok az bilgi vardır (6). NKp44 ve NKp46; influenza ve sendai viral hemagglutinin gibi viral ligandları tanır ve virüsle enfekte olmuş hücrelerin ölümüne yol açar (15, 24, 66, 110). NKp44' ün sitoplazmik uzantısında tirozine dayalı motif gösterilmiş olmasına rağmen, fonksiyonu bilinmemektedir. NKp44' ün aktivasyonu ve ekspresyonu DAP 12 adaptör molekülüne bağlıdır. NKp44' ün ekspresyonu için IL2 ile NK' ların aktivasyonu gereklidir (6, 43).

NKp30 ve NKp46' nın aktive edici sinyalinde fosfotidilinositol 3 kinaz aracılık eder (112). Bu iki reseptör tarafından hedefin tanınmasında sülfatlanmış glikozaminoglikan ve heparan sülfatın rol oynadığı gösterilmiştir (159). CMV, Human Immundeficiency Virus (HIV) ve Akut Miyeloid Lösemi (AML) hastalarında NCR yüzey ekspresyonu azalır ama bunun mekanizması hala bilinmemektedir (66).





**Şekil 2-2.** NK hücrelerinin aktivator reseptörleri (6). NK hücrelerinin sitotoksitesinden sorumludurlar. NKp30, NKp44 ve NKp46 reseptörlerinin ligandları halen tam olarak bilinmemektedir.

### 2.2.1.3. NKG2D (CD314)

NKG2 gen ailesi, tip II lektin benzeri proteinler olarak bilinir. Bu ailenin üyeleri; NKG2A,B,C,D,E ve F' dir. NKG2A,B,C ve E %94-95 düzeyinde amino asit homolojisi gösterirler. NKG2D ise sadece %21 oranında homoloji gösterir. NKG2D hariç bütün NKG2 proteinleri CD94 ile heterodimer oluştururken, NKG2D homodimerik yapıdadır (114). NKG2D (CD314) hem primer reseptör hem de koreseptör olarak rol oynayabilir. Böylece hem sitotoksiteyi, hem de IFN $\gamma$  sekresyonunu tetikler (174).

NKG2D ( Doğal Öldürücü grup 2, D üyesi) homodimeri, NK aktivasyonuna katılan bir diğer önemli hücre yüzey reseptörüdür ama direkt olarak ITAM la bağlantılı değildir. Bu reseptör non-kovalent olarak DAP10 adaptör proteini, integrinler ve sitokin reseptörleri ile ilişkilidir. Ligandlarına bağlanması hücre içinde PI3K ve Grb2 nin aktivasyonuna yol açar. Aktivator reseptörler oldukça spesifikler ve genellikle 1 ya da 2 farklı proteine bağlanırlar. Örneğin; 2B4 sadece

CD48 bağlanır. CD226 (DNAM1) ise nectin-2 ve poliovirüs reseptöre (PVR) bağlanır. Ancak, NKG2D bu kuralın dışındadır ve kendi proteinlerinin farklı kısımlarıyla rastgele etkileşimler kurmaktadır (22, 33, 119).

NKG2D' nin ligandları yapısal olarak MHC sınıf I moleküllerine benzeyen proteinlerdir. İnsanda bu ligandlar;

- 1- MHC sınıf I ile ilişkili gen dizisi A ve B (MICA ve MICB) ailesi
- 2- Sitomegalovirüs UL16' ya bağlanan protein (ULBP/RAET1) ailesidir.

ULBP/RAET1 ailesinin; ULBP1-4 ve RAET1G olmak üzere 5 üyesi vardır. NKG2D ligandlarının hem amino asit dizileri hem de domain yapısı oldukça çeşitlilik gösterir. MICA ile ULBP molekülleri arasında %20-25 oranında benzerlik vardır. Bu ligandlar fonksiyonel olarak eş değerde değildir (33, 112, 140).

MICA ve MICB, 1994 yılında MHC sınıf I bölgesi içindeki genlerin bir grubu olarak tanımlanmıştır. MICA ve MICB oldukça fazla glikozillenmiş proteinlerdir ve yapısal olarak birbirlerine benzerler. Klasik MHC sınıf I molekülleri (HLA-A, -B, -C) ile gen dizilimleri %18-30 oranında homoloji gösterir (18). MICA ekspresyonu; epitelial ve fibroblast hücre dizilerinde ve onların primer kültürlerinde, farklı doku tiplerinin tümörlerinde, timik medullada ve gastrointestinal epitelyumda bulunmuştur. Keratinositlerde de MICA ekspresyonu vardır ama hücre yüzeyinde bu ekspresyon gözlenmez. Aktive edilmiş CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücrelerinde de düşük düzeyde MICA eksprese edildiği gösterilmiştir. MICA ekspresyonunun; çoğu tümörlerde, malign transformasyonun bir sonucu olduğu gösterilmiştir. DNA hasarı MICA ve diğer NKG2D ligandlarının ekspresyonuna neden olmaktadır. NKG2D reseptörünün ligandları sağlıklı hücrelerde ya çok düzeyde eksprese edilir ya da hiç edilmez ama stres altında artar. Kemik iliğinde bazı NKG2D ligandları vardır. MICA aynı zamanda normal gebelik süresince trofoblastlarda eksprese edilir. Makrofajların uyarılması NKG2D ligand ekspresyonuna neden olabilir Bu nedenle NKG2D ligandları stresin neden olduğu antijenler olarak tanımlanır (18, 22, 33, 174).

NKG2D reseptörü; NK, NKT, CD8<sup>+</sup> T,  $\gamma\delta$  T ve İnterferon üreten Öldürücü Dendritik Hücreler (IKDC) tarafından eksprese edilir. Ama CD4<sup>+</sup> T hücrelerinde ve

monositlerde bulunmaz (57, 86, 94). Bazı literatürlerde CD4<sup>+</sup> T hücrelerinde de eksprese ettiği söylenmektedir (18).

NKG2D' nin aşırı ekspresyonu; romatoid artirit, otoimmün diabet gibi otoimmün hastalıklara neden olmaktadır (19, 22, 33, 55, 86). NKG2D reseptörü, CD8<sup>+</sup> T hücrelerinde kostimülâtör reseptör olarak rol oynar. Efektör T lenfositlerinin tam aktivasyonu için T hücre reseptörü(TCR) aracılı sinyal iletiminde gereklidirler (94). CD8 T lenfositleri, antijenle uyarıldıktan sonra inhibitör KIR ve CD94-NKG2A reseptörlerini eksprese ederler.

Kanser hücreleri tarafından üretilen TGFβ, lenfositlerde NKG2D ekspresyonunu azaltır. K562 hücrelerinde bcr-abl onkogeninin inhibisyonu MICA' nın downregülasyonuna neden olurken, ULBP1 ve ULBP2' de değişiklik olmaz. NKG2D' nin bazı ligandlarla etkileşimi sıcaklığa bağlıdır. Vücut sıcaklığının artması, NKG2D' nin liganda bağlanabilirliğini değiştirir. NK ile hedef hücrenin oluşturduğu immunolojik sinapsta NKG2D ligandları lipidce zengin (lipid raft) bölgede birikim gösterir (33).

### 2.2.2. T Lenfositleri

T hücreleri majör histokompabilite kompleks (MHC) molekülleri tarafından kendi hücrelerinin yüzeyi üzerinde sunulan antijenik peptidleri tanır. MHC sınıf I ve MHC sınıf 2 olmak üzere 2 tip MHC molekülü vardır. MHC sınıf II sadece makrofaj, B hücreleri ve dendritik hücreler gibi profesyonel antijen sunan hücreler (APC) üzerinde bulunur. Bu moleküller, yardımcı T hücrelerine eksojen antijen sunarlar. MHC sınıf I molekülleri ise bütün nükleus içeren hücrelerde bulunur ve CD8<sup>+</sup> sitotoksik T hücrelerine endojen proteinlerin peptidlerini sunarlar.

T hücreleri hedef hücrenin yüzeyindeki peptid repertuarını denetler. Eğer hedef hücrede endojen patojenler ya da mutasyona uğramış proteinlerden gelen yabancı peptidler varsa hücreyi öldürür. Sitotoksik T lenfositleri enfekte edilmiş ya da mutasyona uğramış hücreleri öldürür (84). T hücre reseptörleri (TCR), peptid

tanıyan bölümdür ve 2 sınıfa ayrılır. Altünitesi  $\gamma\delta$  olanlar TCR1 ya da  $\alpha\beta$  olanlar TCR2 olarak adlandırılır.  $\gamma\delta$  T hücreleri, periferik kandaki toplam T lenfositlerinin %0,5-15'ini oluşturur (**78, 84**).

CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> düzenleyici T hücreleri (Treg); immun toleransın korunmasından sorumlu tek T hücresi popülasyonudur. Organa spesifik otoimmün hastalıkların baskılanmasında hayati önemi vardır. Enfeksiyon sırasında, allojenik transplantasyonda ve tümörün hem başlangıç hem de efektör fazına verilen immun cevabın baskılanmasında dominant bir toleransa katkıda bulunur (**131, 146**).

Ayrıca, immun sistem aracılı doku hasarının ya da otoimmün hastalıkların engellenmesini sağlamak için efektör T hücreleri (Teff) gereklidir. Teff' in immun cevabının kontrolü, immun baskılayıcı olan Treg tarafından sağlanır. Treg' ler 2 alt gruba ayrılırlar. Timustan kökenler “doğal olarak meydana gelen Treg”, periferde indüklenenler ise “adaptif Treg” olarak adlandırılır. CD4<sup>+</sup> T hücre popülasyonunun %5-15'ini oluştururlar. Aktive olduklarında T hücre proliferasyonunu ve sitokin üretimini baskırlar. Ayrıca antijen sunan hücrelerin fonksiyonunu da inhibe ederler. Bu hücrelerin aktivasyonu için MHC sınıf II molekülünün sunduğu kendi ya da kendinin olmayan peptidler tarafından TCR' nin tetiklenmesi gerekmektedir. Treg' lerin baskılayıcı etkisinde antijenin non spesifik olduğu ve hücre kontağına bağlı mekanizmaların dahil olduğu bilinir (**145, 148**).

TGF $\beta$ , Treg hücrelerinin forkhead box protein (FoxP3) transkripsiyon faktörünü eksprese etmesini tetikler. Bu transkripsiyon faktörü Treg'lerin gelişimi ve fonksiyonu için önemlidir. Adaptif Treg'ler 2 tipe ayrılır. Tip I regülatör T hücreleri (Tr1); IL10 varlığında TCR uyarısından sonra oluşur. Bunlar FoxP3 eksprese etmezler, yüksek miktarda IL10 sekrete ederek immun baskılayıcı fonksiyon gösterirler. Adaptif Treg hücrelerinin 2. tipi ise Th3 hücreleridir. Yüksek miktarda TGF $\beta$  sekrete ederler. Treg hücrelerinin fonksiyonunun kontrolü IL1, IL6 ve IL12 tarafından gerçekleştirilir (**17, 145**).

KIR reseptörlerinin ve Ly49' un CD8 T lenfositlerinin canlılığında rol oynadığı gösterilmiştir. KIR reseptörleri antiapoptotik protein kinazı aktive ederler.

Ly49A ligasyonu, T hücrelerinin apoptozunu inhibe eder. CD94 ligasyonu ise NK hücrelerinin apoptozunda rol oynar. CD94/NKG2 reseptörü NK hücreleri dışında CD8 T hücrelerinin küçük bir grubunun yüzeyinde de eksprese edilir. Çeşitli enfeksiyöz ajanlar CD8 T hücrelerinde CD94/NKG2 reseptör ekspresyonunu anlamlı derecede arttırmışlardır. Ancak CD8 T lenfositlerinin aktivasyonunu azalttığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (60).

İran'da yapılan bir çalışmada  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda lenfosit sayısının ve özellikle aktive edilmiş T hücre sayısının kontrollere göre anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir. Ancak fitohemaglutinin (PHA) ile in vitro olarak uyarıldıklarında T hücrelerinin proliferasyonunun, IL2, IFN $\gamma$  ve IL4 üretiminin baskılandığı bulunmuştur. Serum ferritin düzeyi yüksek olan hastalarda daha az düzeyde IL2 ve IFN $\gamma$  olduğu gösterilmiştir. Splenektomili hastalarda serum TNF $\alpha$  düzeyi ile B ve T hücrelerinin yüzdesinin splenektomi olmayanlara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (49).

Lombardi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada;  $\beta$ -talasemi majörlü hastaların; TNF, CD8, CD23 ve CD25 düzeyinin artmış olduğu, CD4'ün ise kontrollere göre azaldığı bulunmuştur. Splenektomili hastalarda CD8 ve CD23 oranı daha düşük bulunmuştur. Bu hastalarda CD8 sitotoksik T lenfositlerinin artışı ve CD4 yardımcı T lenfositlerinin azalması CD4/CD8 oranının değişmesine ve fonksiyonel olarak immun yetmezliğe neden olmaktadır. Bu bozuklukta transfüzyonların sonucu olan allo-antijenik stimülasyonun, ana neden olarak rol oynadığı düşünülmektedir. Ancak fonksiyonel olarak immunolojik dengesizlikle hastanın klinik sonuçları arasında ilişki bulunamamıştır (38, 85).

### 2.2.3. B Lenfositleri

CD20; B lenfositlerinin spesifik molekülüdür. Pre-B' den olgunlaşmamış B hücresine geçiş sırasında hücre yüzeyinde eksprese edilir ama plazma hücrelerine farklılaştığında kaybolur. B hücreleri, erken progenitör dönemden plazma hücrelerine farklılaşmaları sırasında oldukça sıkı bir şekilde kontrol edilir. Bu geçiş döneminde B hücrelerinin pozitif ve negatif seleksiyonu hem kemik iliğinde hem de periferik lenfoid dokularda meydana gelir. Kendine reaktif olan B lenfositleri

negatif seleksiyonla kemik iliğinde elimine edilir. Antijen aracılı negatif seleksiyon B hücre reseptörü (BCR) üzerinden gerçekleşir. Self reaktif BCR apoptoza yol açacak sinyalleri indükler. İkinci negatif seleksiyon periferde gerçekleşir. Kendine reaktif olmayan B hücreleri yüksek afiniteli efektör antikolar üretir. Antijenle uyarılmış B hücreleri uzun dönemde bellek hücreleri olarak görev yapar ve aynı antijenle tekrar karşılaştığında hızlı cevap verilmesini sağlarlar (169). IL10 üreten B hücreleri otoimmün ve inflamatuvar hastalıkların baskılanmasında önemli rol oynar (169).

B hücre aktive edici faktör (BAFF), TNF ailesine aittir. Makrofaj/monosit, dendritik hücreler ve T lenfositleri gibi çeşitli hücreler tarafından üretilir. BAFF-R, TACI ve BCMA reseptörleri vasıtasıyla T ve B lenfositlerinin proliferasyon ve fonksiyonunu düzenler. BAFF' ın aynı zamanda NK aktivitesini de arttırdığı gösterilmiştir. T lenfositleri IL2 ve IFN $\gamma$  üretir. IFN $\gamma$ ,NK aktivitesini artırır ve makrofajların çeşitli fonksiyonlarını düzenler. BAFF; T lenfositlerini aktive etme özelliği vasıtasıyla indirekt olarak NK aktivitesini artırır (127, 170).

#### 2.2.4. Monositler

Mononükleer fagosit sistem, immün sistemin majör hücre popülasyonunu oluşturur. Primer fonksiyonu, enfeksiyon ve kanser hücrelerine karşı hücresele immüneye katılmaktır. Monositler aktive edilmemiş efektör hücrelerin bir grubudur. Lokal olarak T ve NK hücrelerini aktive etmek için sitokin sentezlerler. Ayrıca kemokin üreterek vaskular endotelial hücrelere adezyonu gerçekleşir. Adezyon; lökosit adezyon molekül-1 (LAM-1) ya da L-selektin gibi selektinlerin aktivasyonu ile yapılır (117). İmmunolojik hastalıklarda enfeksiyonlara karşı savunmada önemli rol oynarlar. Yüzeylerinde CD16, CD45 ve CD14 ekspres ederler (9, 115). CD14<sup>+</sup> monositler kemik iliğinden salınır. Periferde, makrofaj, Kupffer hücreleri, Langerhans hücreleri, dendritik hücreler ve osteoklast olmak üzere farklılaşırlar (92).

Monositlerin bakteri ya da bakteriyel hücre duvarı ürünleri (lipopolisakkarid (LPS), peptidoglikanlar, lipoteikoik asit) ile etkileşimi çeşitli sitokinler tarafından stimüle edilir. Uyarılmış monositler; IL1, IL6, IL18, IL12 ve TNF $\alpha$  gibi aktive edici sitokinleri ve TGF $\beta$ , IL10 gibi inhibe edici sitokinleri üretirler (**144, 164**).

Monositler aynı zamanda hücrel immunitede antijen sunan hücreler olarak görev yaparlar. MHC sınıf II vasıtasıyla T ve B lenfositlerine yabancı antijen sunarlar. Aktive edilmiş monositler sitokin salgılayarak T lenfositlerini aktive ederler. Aktive olmuş T lenfositleri IL2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  ve CSF salgılayarak monositlerin daha fazla aktive olmasını sağlar (**117**).

Makrofajlar, dokularda ve vücut kavitesinde sınırlı sayı ve lokalizasyondadır. Ancak, enfeksiyon ve doku hasarı durumunda, monositler ilgili dokuya geçip farklılaşarak makrofajları oluştururlar. Doku hasarı sırasında IL1, IL8, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  sitokinleri ile C5a, lökatrien B4, N-formil peptidler (fMLP), monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) ve platelet aktive edici faktör (PAF) gibi kemoatraktanlar; monositlerin endotelial hücrelere adezyonunu ve migrasyonunu modüle ederler (**74, 144**).

T lenfositleri ve NK hücreleri IFN $\gamma$  ve granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) üreterek monositlerin aktivasyonunu sağlarlar. Monositlerin sekonder stimülasyonu Monositler IgG'nin Fc porsiyonu için Fc $\gamma$  reseptörü (Fc $\gamma$ R) eksprese ederler. Bu reseptör fagositoz, patojenlerin hücre içi ölümü, reaktif oksijen türlerini üretimi, inflamatuvar araçların üretimi/salınımı, antikora bağımlı hücrel sitotoksiste, antijen sunumu gibi biyolojik fonksiyonları başlatır (**104, 117**).

Mikroorganizmalar IgG ve C3b tarafından kaplanarak opsonizasyon gerçekleşir. Böylece monositlerdeki Fc $\gamma$  reseptörlerine ve CD35' e bağlanabilirler. Bu internalizasyonla mikroorganizmanın hücre içine alınmasını sağlar. Proteolitik enzimler içeren granüllerde mikroorganizmaların yıkımı gerçekleşir (**117**).

### 2.3. Sitokinler

Sitokinler ilk olarak lenfosit aktivasyonunun aracıları olarak 1953' te tanımlanmıştır. İlk lenfokin/sitokin olarak tip I IFN' lar karakterize edilmiştir. Sitokinler genel olarak küçük proteinlerdir. 2 alt üiteden oluşurlar. Sitokinler parakrin ya da otokrin etki gösterebilen düzenleyici proteinlerdir (36).

#### 2.3.1. İnterferonlar (IFNs)

IFN' lar ilk olarak 1957' de isimlendirilmişlerdir. Üç majör gruba ayrılır. IFN' un 2 orijinal grubu tip I ve tip II' dir. Tip I; immun olmayan IFN ve tip II immun IFN olarak adlandırılır. Tip II (IFN $\gamma$ ), spesifik immun reaksiyonlarda yüksek miktarda üretilir. Oysaki tip I IFN' lar non-spesifik uyarı ile çoğu hücre tarafından üretilebilirler. Tip I IFN' ler; IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\epsilon$ , IFN $\kappa$ , IFN $\omega$ , IFN $\delta$ , IFN $\tau$ , IFN $\xi$ /limitin' den oluşmaktadır. Antiviral ve antiproliferatif etkiler gösterirler. T hücrelerini, NK hücrelerini, monositleri, makrofajları ve dendritik hücreleri uyarırlar. MHC sınıf I ekspresyonunu ve pro-apoptotik genlerin aktivasyonunu arttırlar. IFN $\xi$ /limitin'in antiviral ve antitümör etkilerinin olduğu gösterilmiştir ama lenfobaskılayıcı etkisi IFN $\alpha$ ' dan daha düşüktür (36).

Tip II IFN' nun tek üyesi IFN $\gamma$ ' dır. NK hücrelerinde IFN $\gamma$  üretiminin indüksiyonunda IL12 önemlidir. IFN' nun 2 geleneksel grubunun yanı sıra IFN benzeri sitokinlerden oluşan yeni bir grup tanımlanmıştır. Bu grubun üyeleri; IL28A (IFN $\lambda$ 2), IL28B (IFN  $\lambda$ 3) ve IL29 (IFN $\lambda$ 1)' dir (36).

IL18, makrofajlar tarafından üretilir. Sinerjistik olarak IL12 ile birlikte farklılaşmış Th1 hücreleri tarafından üretilen IFN $\gamma$ ' nın miktarını artırır. Aynı zamanda NK hücrelerinde IFN $\gamma$  üretimine neden olur. IL12 ile IL18' in kombinasyonu hatta antijen sunan hücrelerde de IFN $\gamma$  üretimine neden olabilir (63, 160).



Diğer taraftan IFN $\gamma$ ; IL12'yi pozitif feedback ile kontrol eder. IL10, IL11, IL13 ve tip I IFN' lar ise IL12' yi inhibe eder. IL4' ün IL12' yi inhibe edip etmediği tartışmalıdır. IL12' nin başlıca fonksiyonu NK, B ve T hücrelerinde IFN $\gamma$  üretimine neden olmaktır. IL12 aynı zamanda IL18 reseptörünün ekspresyonunu da artırır. IFN $\gamma$ , fagositik hücrelerin bakterilere karşı aktivitesini uyarır **(103, 160)**. ,

Tip I IFN' lar, NK hücreleri tarafından IFN $\gamma$ ' nın üretimini arttırabilirler. TNF $\alpha$  tek başına NK hücrelerinin IFN $\gamma$  üretimini uyarmada başarısız olurken IL12 ile birlikte sinerjistik etki göstermektedir. IL1' in de IL12' nin indüklediği IFN $\gamma$  üretimini arttırıcı etkisi vardır. Ama IL18, IL1' e göre daha fazla uyarıcıdır. CD44; IL12 ve IFN $\gamma$  üretimini arttırabilme yeteneği nedeniyle doğal bağışıklığın düzenlenmesinde önemli rol oynar. NK hücrelerinin IL2 ve IL15 ile inkübasyonu CD44 düzeyinin artmasına ve aktivasyonuna yol açar **(79)**.

IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  ve IL12 parazitlere karşı savunmada önemlidirler. NK hücrelerinin salgıladığı IFN $\gamma$ , makrofajları aktive eder ve onların NO üretmesine neden olur. IFN $\alpha$  ve IFN $\beta$ ; NK sitotoksitesini artırır **(143)**. IFN $\alpha$ , immun cevabı direkt olarak ve Th1 sitokinlerin üretimini destekleyerek modüle eder. Çünkü Th1 sitokinleri, koruyucu antitümör hücrel immun reaksiyonların artmasına yol açar. Böylece periferik kanda lenfosit alt gruplarının yeniden düzenlenmesine neden olur. Tümör antijenlerinin ekspresyonu ve NK ile T lenfositlerinin sitotoksik aktivitesi artar. Ayrıca IL2, IL12 ve IFN $\gamma$ ' nın üretimini artırır **(70)**.

IL6 ve IFN $\gamma$ ; tümör hücreleri üzerinde MHC antijen ekspresyonunu artırırken, TGF $\beta$ 1 ise IFN $\gamma$ ' nın indüklediği MHC sınıf I ve II antijen ekspresyonu üzerine inhibitör etkiye sahiptir **(64)**.

IFN $\alpha$ , kronik hepatit C' li talasemi hastalarının tedavisi için kullanılmaktadır. IFN alımından 20 saat sonra tedaviye cevap vermeyen hastalarda CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin arttığı, cevap verenlerde ise azaldığı bulunmuştur. CD8<sup>+</sup> T lenfositleri ve NK hücreleri ise hem tedaviye cevap veren hem de cevap vermeyen hastalarda azaldığı bulunmuştur **(93, 123)**. Başka bir çalışmada ise; kronik hepatit C'li talasemi

hastaları 12 ay IFN $\alpha$  tedavisi gördükten sonra, hem tedaviye cevap veren hem de cevap vermeyen hastalarda in vitro olarak NK hücreleri IFN $\alpha$  ile inkübe edildiklerinde her iki grupta NK aktivitesinin arttığı ama bu artışın kontrollerden daha az derecede olduğu bulunmuştur. Tedaviye cevap veren hastalarda CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> lenfositlerin anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (87).

### 2.3.2. Tümör Nekrozis Faktör (TNF)

TNF; proinflamatuvar sitokindir ve hem nonspesifik hem de spesifik immun cevapta önemlidir (36, 59). TNF $\alpha$ ; hücre metabolizması, proliferasyon, sitokin üretimi ve apoptoz gibi çoğu biyolojik fonksiyonu düzenler (135). IL4 sitokini; TNF ve IL1 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini baskılar. IL4 ve IL13; proinflamatuvar sistemi inhibe ederler ve böylece ROS ile NO'yu inhibe ederler (36). IL17; aktive edilmiş T hücreleri tarafından üretilir ve makrofajlar tarafından TNF $\alpha$  ile IL1 sekresyonuna neden olur (63). IL18; IL12 ile kombinasyonu sonucu T ve NK hücrelerinden IFN $\gamma$  üretimine neden olur. IFN $\gamma$ ; NK ve Th1 hücrelerinde Fas ligandına bağlı sitotoksiteyi artırır. Aynı zamanda Th1 hücrelerinin proliferasyonunda rol oynar ve IL2, GM-CSF üretimine ya da TNF $\alpha$  ekspresyonuna neden olur (103). IL1, IL18, TNF $\alpha$ , ayrıca CD44 ve CD28 üzerinden sinyal yolağı NK- $\kappa$ B' nin aktivasyonu ile ilişkilidir (79).

TNF ile ilişkili apoptozu indükleyici ligand (TRAIL/APO-2L); TNF ailesinin bir üyesidir. TRAIL' in bilinen 5 reseptörü bulunmaktadır. Bunlar; TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4 ve TRAILR5/OPG' dir. IFN $\gamma$ , NK hücreleri yüzeyinde TRAIL indüksiyonuna aracılık eder TRAIL-R1/DR4 ve TRAIL-R2/DR5 transmembran reseptörlerine bağlanarak apoptozu yürütür. TRAIL, aktive olmuş NK hücreleri tarafından aracılık edilen sitotoksiteye katılır (130, 135).

FasL; TNF ailesinin tip II proteindir ve NK ve sitotoksik T hücreleri tarafından eksprese edilir. Çeşitli tümörlerde aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir. Hem membranda hem de mikrosesikülle ilişkili fraksiyonlar halinde eksprese edilir. İnflamatuvar cevabı tetikler ve tümör reddine yol açar. İnflamasyon süresince Fas

aracılı apoptozu düzenler. TGF $\beta$  üretimindeki artış sitotoksik T hücrelerinde FasL'nin azalan yönde düzenlenmesine neden olabilir (68).

TNF $\alpha$ , IL6 ve Fas ligandı; immun fonksiyonun baskılanması ile ilişkilidir. TNF $\alpha$ 'nın artmış sekresyonu ile NK hücrelerinde hücre ölümü indüksiyonun artışı arasında korelasyon bulunmaktadır. TNF $\alpha$  antikoru ya da TNF bağlayan protein NK kültürüne eklendiğinde NK hücrelerinin ölümünün engellendiği gösterilmiştir. TNF $\alpha$ 'nın kanserde paradoksal bir rolü vardır. Lokal olarak yüksek dozda güçlü antikanser etkiye sahiptir. Ancak, kemokinleri ve fibroblast büyüme faktörünü indükleyerek karsinogenezde rol oynayabilir. Ayrıca, tümör hücrelerinin farklılaşması, proliferasyonu ve canlılığını n korunmasında da etkilidir (121).

Wanachiwanawin ve arkadaşları yaptıkları çalışmada,  $\beta$ -talasemi majör hastalarının %33'ünün serumda IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  ve IL1 $\alpha$  düzeyinin arttığını göstermiştir (155).

### 2.3.3. Tümör Büyüme Faktörü (TGF- $\beta$ 1)

TGF $\beta$ 1; çeşitli tümör tiplerinden alınan doku örneklerinde tespit edilmiştir ve büyüme faktörü olarak görev yapar. Memelilerde TGF $\beta$ 'nin TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 ve TGF $\beta$ 3 olmak üzere benzer fonksiyonlara sahip 3 izoformu bulunur Proliferasyon, farklılaşma, migrasyon, apoptoz ve ekstraselüler matriksin yeniden şekillenmesi gibi çok yönlü etkileri bulunmaktadır. Aynı zamanda B ve T lenfositlerinin proliferasyonunu inhibe eden güçlü bir immun baskılayıcı etkiye sahiptir. Bazı hücrelerde proliferasyonu daha fazla uyarırken, diğer hücrelerde büyümeyi inhibe eder. Bu nedenle bazı kanserleşmiş hücrelerin gelişimi ya da bağışıklık sisteminden kaçışı için kritik rol oynar. Ayrıca tümör hücreleri tarafından sekrete edilir ve tümör mikroçevresinde parakrin etki tümör proliferasyonunu uyarır. IL6; TGF $\beta$ 1'i antagonize eder. TGF $\beta$ 1; IFN $\gamma$  üzerine inhibitör etkiye sahiptir (64, 68).

TGF- $\beta$ 1; antjen sunan hücrelerin olgunlaşmasını engelleyerek otoagresif T hücre cevabını sınırlandırır. Naif CD4 T hücrelerinin Th1 ya da Th2 efektör hücrelerine farklılaşmasını inhibe edebilir. Bunu polarizasyon için gerekli olan

anahtar transkripsiyon faktörleri, T-bet ve GATA-3' ü inhibe ederek gerçekleştirir. Ancak, TGF- $\beta$ ; farklılaşmış CD4<sup>+</sup> hücrelerin yayılımını destekleyebilir. Bazen Th1 cevabının inhibisyonuyla Th2 cevabını yürütür (63).

TGF $\beta$ 1; NK hücrelerinin sitolitik aktivitesini ve IFN $\gamma$  üretimini inhibe eder ve bu hücrelerinin homeostazını kontrol ederler. NK hücrelerinde, IL2 ya da IL12 tarafından indüklenen IFN $\gamma$  ekspresyonunun antagonistidir. Aynı zamanda IFN $\alpha$  reseptörü ile IL2 reseptörünün  $\alpha$  zincirini azaltıcı yönde düzenler. NKp30 ve NKG2D reseptörlerinin ekspresyonunu inhibe eder (81). Bazı kanser hücreleri tarafından IL6 sekrete edilir. TGF $\beta$ ' nın T hücre proliferasyonu üzerine immun baskılayıcı etkilerini, IL6 antagonize eder (65). TGF $\beta$ 1'in NK hücrelerinin, IL2 ya da IL12 ile aktive edilmiş NK hücrelerinin sitokin üretimi ve sitotoksitesini inhibe ettiği ve aynı zamanda tümör büyümesini stimüle ettiği in vitro olarak gösterilmiştir (10, 76, 88, 108, 122).

$\beta$ -talasemi majörlü hastalarda serum TGF düzeyinin kontrollerden daha düşük çıktığı bulunmuştur (134). Ancak farklı bir çalışmada, Salsaa ve arkadaşları IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  ve TGF- $\beta$ 'nın serumda görülmediği ancak lenfositlerin in vitro mononükleer hücrelerle stimülasyondan sonra kontrol grubuna göre daha fazla sitokin ürettiklerini göstermiştir (126). Bir diğer çalışmada ise splenektomili hastalarda TGF- $\beta$ 'nın kontrollere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (99).

#### 2.3.4. İnterlökin 2 (IL2)

NK hücrelerinin optimal proliferasyonu için IL2 gereklidir ama tek başına yeterli değildir. Örneğin, TNF $\alpha$ , NK proliferasyonuna neden olmamasına rağmen, IL2' nin proliferasyonu edici etkisini artırır. Lenfokinle aktive edilmiş öldürücü hücrelerde (LAK), TNF $\alpha$  ve IL2' nin agonistik etkisi vardır. İkisi hem proliferasyonu hem de sitotoksitesite için gereklidir. Aynı zamanda ikisi de LAK hücrelerindeki aktivasyon antijeni CD25 için gereklidirler (100).

IL2 ve IL15, NK ve T hücrelerinin proliferasyonunu, canlılığını ve sitolitik aktivitesini düzenlerler. Ets1; NK hücre farklılaşmasının erken aşamasında eksprese

edilen bir transkripsiyon faktörüdür. NK' nın gelişimi ve fonksiyonu için temel bir mediyatördür. IL2 ve IL15, Ets1 protein düzeyini artırır. IL2 ve IL15 reseptörleri;  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  olmak üzere 3 alt üiteden oluşur. Bu 3 alt ünite de farklı sinyal iletici ve ligand bağlayıcı özelliklere sahiptir. IL2R $\alpha$  ve IL15R $\alpha$  spesifik olarak IL2 veya IL15' e bağlanır.  $\beta$  alt ünitesi IL2 ve IL15' e bağlanmaya katılır. Oysaki  $\gamma$  alt ünitesi; IL2,IL4, IL7, IL9 ve IL15' e bağlanmada rol oynar (**58, 120**).

IL2 ile aktive edilmiş NK hücreleri, hedef hücreyle etkileştikten sonra CD18 aracılı apoptoz meydana gelir. Bunun NK hücrelerinin sitotoksik fonksiyonunun kontrolü için bir feedback mekanizma olduğu düşünülmektedir. IL15 ile aktive edilmiş NK hücreleri ise tümör hücrelerinin neden olduğu apoptoza karşı, IL2' ye kıyasla daha az hassastır (**120**). IL2 ile uyarılmış NK hücrelerinin K562 ile etkileştikten sonra apoptoza uğradığı gösterilmiştir. Bunun NK cevabını azaltıcı yönde düzenleyen bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Uyarılmamış NK hücrelerinde bu durum gözlenmemiştir (**83**).

IL21 ile IL2' nin kombinasyonu; NK ve CD8<sup>+</sup> T hücreleri ile kültüre edildiğinde, yalnız IL2 ile kültüre edilenlere kıyasla NKG2D' nin yüzey ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. IL21; NK hücrelerinin olgunlaşmasına ve NKp46, NKp30 ve CD16 aktivatör reseptörlerinin artırıcı yönde düzenlenmesine neden olduğu gösterilmiştir (**19**). Ayrıca, IL2 ve IL15; B lenfositlerinden Ig sekresyonuna ve proliferasyonuna neden olur (**120**).

$\beta$ -talasemi majör hastalarında yapılan bir çalışmada, IL2 ve IL10 düzeyinin kontrollere göre farklı olmadığı bulunmuştur (**99**). Ancak bir diğer çalışmada, IL2 ve IL6' nın bütün hastalarda normal düzeyin altında olduğu gösterilmiştir (**155**).

### 2.3.5. İnterlökin 10 (IL10)

1988 yılında Mossmann ve Coffman tarafından sitokin sentezini inhibe edici faktör (CSIF) olarak keşfedilmiştir. IL10 önceleri sitokin sentezini inhibe edici faktör olarak adlandırılmıştır. Th2 hücreleri, makrofajlar, B hücreleri ve CD8<sup>+</sup> T hücreleri tarafından üretilir. Aynı zamanda mast hücreleri, keratinositler ve bazı

tümör hücreleri tarafından da üretilmektedir. IL10' un immun cevaba etkisi çoğunlukla T hücrelerini inhibe etmektir (63).

IL10 sitokin ailesi; IL10, IL19, IL20, IL22, IL24, IL26, IL28 $\alpha$ , IL28 $\beta$  ve IL29' dan oluşmaktadır. IL28 $\alpha$ , IL28 $\beta$  ve IL29 ise aynı zamanda IFN $\lambda$ s olarak tanımlanmışlardır ve tip I IFN' larla amino asit dizisi bakımından oldukça benzerlik göstermektedirler. Yapısal olarak IL10 ile ilişkili yeni sitokinler keşfedilmiştir. Bunlar; AK155 ve melanoma farklılaşmasıyla ilişkili gen (mda)<sup>2-7</sup> dir (28, 101, 168). IL10' un aynı zamanda immunostimülatör özelliği vardır. CD8<sup>+</sup> T lenfositlerinin ve NK hücrelerinin proliferasyon ve sitotoksitesini arttırabilir. Özellikle IL18 ile kombinasyonunda bu fonksiyonunu gerçekleştirir (63, 95). NK1 hücreleri IL10 ile birlikte Th1 sitokinleri üretirken, NK2 hücreleri IL13 gibi Th2 sitokinlerini üretir (70).

Makrofajlarda IL10; TNF $\alpha$ , IL6, IL12 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe eder. IL10' nun majör fonksiyonu NF- $\kappa$ B' nin inhibisyonu üzerinden kemokinlerin ve sitokinlerin üretimini baskılamaktır. IL10; GM-CSF' yi inhibe eder (28, 101).

TGF- $\beta$  ve IL10' nun fonksiyonu inflamasyonu baskılamaktır ve immun toleransın indüksiyonu için önemlidirler. TGF- $\beta$  ve IL10, otoreaktif lenfositlerin aktivasyonunu ve yayılmasını engeller. IL10; IL12' nin, TNF $\alpha$ ' nın, ko-stimülatör moleküllerin ve antijen sunan hücrelerin MHC sınıf II molekül ekspresyonunu inhibe eder. Antijen sunan hücreler tarafından IL10 salgılanır ve T hücrelerinin farklılaşmasına neden olabilir. Naif T lenfositlerinin proliferasyonunu inhibe edebilir. IL10' nun varlığında dendritik hücrelerin lenf düğümlerine migrasyonu ve proinflamatuvar kemokinlerin üretimi engellenir (63).

### 2.3.6. İnterlökin 12 (IL12)

IL12; çeşitli hücrelerde IFN $\gamma$  üretimine neden olan bir sitokindir. İlk olarak NK hücresi stimülatör faktör (NKSF) olarak tanımlanmıştır. Monositler, makrofajlar, dendritik hücreler, nötrofiller ve B hücreleri tarafından üretilir. NK, T ve dendritik hücreler üzerinde reseptörü vardır. IL12' nin p35( $\beta$ 1) ve p40( $\beta$ 2)

olmak üzere 2 alt ünitesi bulunur. P40 alt ünitesi, sitokin reseptörleriyle homologtur. P35 ise IL6 ve G-CSF ile benzerlik gösterir (**36, 67, 160**).

IL12' nin primer etkisi NK ve T hücrelerinde IFN $\gamma$  üretimine neden olmak ve onların sitotoksik potansiyelini aktive etmektir. Makrofaj ve NK hücreleri IFN $\gamma$  tarafından uyarıldığında antimikrobial kapasitesi artacak şekilde aktive olur. IL12 ve IFN $\gamma$  arasında ilişki Th1 tarafından kontrol edilen adaptif hücresel immun cevabın aktivasyonuna neden olan bir faktördür ve uzun süreli hücreiçi patojenlerin kontrolü için önemlidir. IL12; naif T lenfositlerinin proliferasyonunu stimüle eder. IFN $\gamma$  ile birlikte Th2 hücre farklılaşmasını ve Th2 sitokinlerinin (IL4, IL5, IL13) üretimini inhibe eder. Bu nedenle Th1 hücrelerinin kontrolü ve indüksiyonunda anahtar rol oynar. T hücreleri aktive olduğu zaman IL12' nin  $\beta$ 1 ve  $\beta$ 2 alt üniteleri ekspres edilir. IL12R $\beta$ 2; Th' nin yönelmesinde karar verici bir unsurdur. Çünkü bu alt ünite sadece Th1 hücrelerinde ekspres edilir. IFN $\gamma$ ; IL12R $\beta$ 2 ekspresyonunu arttırırken, IL4 inhibe eder. Aralarındaki bu zıt etki nedeniyle Th1/Th2 farklılaşmasına katkıda bulunurlar T hücreleri, proinflamatuvar TNF ailesi üzerinden IL12 üretimini arttırır. Th2 sitokinlerinden IL4 ve IL13 stimülasyonun erken fazında, IL12'yi inhibe eder ama sonra IL12 üretimini arttırırlar (**16, 36, 67,160**).

IL12' nin neden olduğu IFN $\gamma$  üretimi sinerjistik olarak TNF ve IL1 gibi sitokinleri arttırır. IL12, IL18' in ko-stimülasyonu ile makrofajlarda IFN $\gamma$  üretimine neden olabilir. IL18, tek başına majör IFN $\gamma$  üretici kapasiteye sahip değildir. IL12' nin IFN $\gamma$  yı pozitif feedback ile kontrol etmesi tehlikeli bir durumdur ve antiinflamatuvar özelliğe sahip sitokinler tarafından inhibe edilir. IL10 ve TGF $\beta$  sitokini, IL12' nin inhibisyonunda önemlidir. Makrofajlar tarafından apoptotik hücrenin fagositozu IL12 üretimini inhibe eder. Bu düzenleyici mekanizma, kontrol edilemeyen savunma mekanizmasına neden olabilecek bozukluğun sınırlandırılması için önemlidir (**36, 67**).

IL12 sitokin ailesinin diğer 2 üyesi IL23 ve IL27' dir. IL23' ün fonksiyonu IL12 ile oldukça benzerdir ama IL23 bir tek bellek T hücrelerini proliferate edici kapasiteye sahiptir. IL23, NK hücrelerinin IL17 üretimini kontrol eder. IL17; IL1,

IL6 ve TNF gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini düzenler ve nötrofilleri mobilize eder. IL27 ise yeni tanımlanmış bir sitokindir ve fonksiyonu tam olarak belirlenememiştir. IFN $\gamma$  üretimi ve NK aktivasyonu sadece IL12 tarafından düzenlenmez aynı zamanda IL15 te bu hücrelerin gelişimi, fonksiyonu ve aktivasyonu için önemlidir. Genel olarak IL12, viral enfeksiyonlara karşı erken savunma önemlidir. Virüs ve diğer hücreiçi patojenlere karşı adaptif immun cevapta düzenleyici rol oynar **(36, 160)**.

IL12, heterodimerik yapıdayken oldukça düşük miktardadır ama p40 alt ünitesi tek başına aşırı miktarda üretilmektedir. P35 ise hücrelerden setbest olarak sekrete edilmez. IL12 dışında diğer p40' a bağlı moleküller de Th1 cevabında önemli rol oynarlar. P40 ve IL12' nin reseptörüne bağlandığı için aynı zamanda IL12' nin antagonistidir. P40 aynı zamanda p35 ile ilişkili protein olan p19'a kovalent bağlanarak IL23'ü oluşturur. IL23, bellek T hücrelerini aktive eder. P40 ile ilişkili protein Epstein-Barr virüse neden olunan gen 3, EB13; p35 ile ilişkili protein p28'e bağlanarak IL27' yi oluşturur. IL27, Th1'in erken gelişim evrelerinde fonksiyoneldir. Makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından IL12' nin alt üniteleri IL12' ye göre 10-1000 kat daha fazladır. IL12, derideki Langerhans hücrelerinin olgunlaşmasında rol oynar **(16, 160)**.

### 2.3.7. İnterlökin 15 (IL15)

IL15, 1994 yılında keşfedilmiştir ve IL2 benzeri aktiviteye sahiptir. IL15R alfa zinciri dendritik hücre gibi antijen sunan hücrelerde bulunur **(52)**. IL15'in mRNA' sı hem hemopoetik hem de hemopoetik olmayan dokuların büyük bir kısmında bulunmuştur. Normal şartlar altında IL15 protein düzeyini tespit etmek oldukça zordur. Çünkü yarılanma süresi oldukça kısadır. Ayrıca sıkı bir transkripsiyonel ve translasyonel kontrol altındadır. IL15 reseptörü 3 polipeptidten oluşur. IL15R $\alpha$ , IL2/IL15R $\beta$  ve genel  $\gamma$  zinciri  $\gamma$ C. IL15R $\alpha$ ; hücre tiplerinin büyük bir çoğunluğu tarafından eksprese edilir. Ama IL2/IL15R $\beta$  ve  $\gamma$ C ile bağlanmış olması gerekmez **(137)**.

IL15; IL2 reseptör  $\beta$ ' ya bağlanma özelliğine sahiptir ve T hücre klonlarının proliferasyonuna neden olabilir. IL2 ve IL15' in özellikle doğal bağışıklıkta ayrı



rolleri vardır. T hücre aracılı immün cevapta ise zıt fonksiyonları vardır. IL2; T hücre cevabının büyüklüğünü sınırlandırır ve bellek CD8 T hücre canlılığını azaltır. IL15 ise T lenfositlerinde IL2 aracılı aktivasyonun neden olduğu hücre ölümünü engeller ve bellek hücrelerinin üretimini ile canlılığını korur (47).

IL15; NK hücrelerinin gelişmesi ve olgunlaşmasında oldukça etkilidir. Fibroblastlar, epitelial hücreler ve stromal hücreler tarafından üretilirler. Ayrıca IFN $\alpha/\beta$  ya da tehlikeli bir sinyale karşı cevapta olgun dendritik hücreler tarafından üretilirler. IL15; hem doğal hem de adaptif bağışıklığın hücrelerinin homeostatik korunmasında ve onların aktivasyonunda önemlidirler. Bellek CD8 T hücreleri ve naif T hücrelerinin proliferasyonu ile canlılığının kontrolünde önemli rol oynarlar. IL15 eksikliğinde NK ve bellek CD8 T hücrelerinin soyunda defekt görülür. Bu hücrelerin gelişiminde IL15 zorunludur (51, 93).

Antijen sunan hücrelerin IL12, IFN $\gamma$  ve NO salınımı için IL15 sitokini oldukça önemlidir. NK ve NKT hücrelerinin IFN $\gamma$  üretimi ve sitotoksik aktivitesini güçlü bir şekilde artırır (52). Bellek CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin antijenden bağımsız proliferasyonunu ve canlılığını destekler. Aynı zamanda dendritik hücreleri aktive ederek CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin antijene spesifik cevabını yürütür. IL21, aktive edilmiş T hücreleri tarafından üretilir ve naif NK hücrelerinin IL15 tarafından yayılımını inhibe ederken, allojenik uyarıya cevapta T hücrelerinin efektör cevabını ve yayılımını artırır (63).

IL15, NK ve NKT hücreleri intravajinal HSV-2 enfeksiyonlarına karşı doğal bağışıklıkta hayati önem taşırlar. NK/NKT hücrelerinin gelişimi, olgunlaşması ve aktivasyonu IL15 tarafından düzenlenir (52). IL15; NK hücrelerinde IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF, makrofaj inflamatuvar protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) ve MIP-1 $\beta$  üretimini indükler. Ancak, IL15' in NK hücreleri üzerinde düzenleyici mekanizmaları hala açık değildir. IL15, NK hücrelerinde NKG2D' nin yüzey ekspresyonunu artırır. Ayrıca sitotoksik efektör moleküller olan TRAIL ve perforinin ekspresyonunu, bununla birlikte STAT1 ve ERK1/2' nin fosforilasyonunu artırır (171).

### 2.3.8. İnterlökin 18 (IL18)

IL18 ilk olarak *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) ve LPS' ye karşı IFN $\gamma$  indükleyici faktör olarak tanımlanmıştır. Sitotoksik lenfositler tarafından IL1, TNF $\alpha$ , GM-CSF, IFN $\gamma$  gibi sitokinlerin üretilmesini indükleyebilen proinflamatuvar bir sitokindir. Ayrıca bazı kemokin reseptörlerinin ekspresyonunu artırır. IL18, naif T lenfositlerinin Th2 hücrelerine farklılaşmasına yol açar. NK hücreleri, mast hücreleri ve bazofiller tarafından IL4 ve/veya IL13 üretimine neden olur (102). NK hücrelerinin sitotoksitesini ve T hücrelerinin proliferasyonunu artırır. IL12 ile birlikte sinerjistik olarak Th1 hücreleri tarafından IL2 ve IFN $\gamma$  üretilmesini uyarır. Ayrıca IL10 üretimini azaltır (54, 69).

IL18 yapısal olarak IL1' e benzer. Ancak, biyolojik fonksiyonu IL12 ile benzerdir. IFN $\gamma$  indükleyici etkisini IL12 ile sinerjistik olarak meydana getirir. Ayrıca NK hücrelerinde ve Th1 hücrelerinde Fas liganda bağlı sitotoksisiteye aracılık eder. Kordon kanında T lenfositlerinin çoğu naif olduğu için IL18' e karşı düşük düzeyde cevap vermektedir. Oysaki kordon kanı NK hücreleri, yetişkin periferik kanına göre IL18 anlamlı olarak daha yüksek düzeyde cevap vererek IFN $\gamma$  üretirler (32, 103).

IL18 mRNA'sı kupfer hücreleri, makrofajlar, T hücreleri, B hücreleri, osteoblastlar, keratinositler, dendritik hücreler, astrositler ve mikroglialar tarafından eksprese edilir. Aynı zamanda IL18, osteoklastlar tarafından eksprese edilir ve osteoklast üretimini inhibe eder. Stres durumunda adrenal kortekste IL18 indüklenebilmektedir (102, 138).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya gönüllü olarak katılan hasta ve kontrol grubu; İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Hematoloji/Onkoloji Bilim Dalı'na başvuran  $\beta$ -talasemi majör tanısı almış 27 hasta ile 18 sağlıklı kişiden oluşturuldu. 9'u erkek ve 18'i kız olan  $\beta$ -talasemi majörlü hastaların yaş ortalaması  $18,48 \pm 7,59$ , 6'sı erkek ve 12'si kız olan sağlıklı kişilerin yaş ortalaması  $19,38 \pm 4,79$  idi. Kontrol ve hasta grubu yaşları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Tez çalışmasına katılan gönüllüler, çalışma hakkında bilgilendirildi, etik kurul onayı alındı ve gönüllü olur formu imzaladılar. Her gönüllüden 1 kez heparinli tüpte 10 ml periferik kan alındı.

#### 3.1. Talasemi Tanısında Kullanılan Parametreler

##### 3.1.1. Tam Kan Sayımı

EDTA' lı plastik tüpe en az 1 ml venöz kan steril enjektör ile alınarak ilk 1-2 saat içinde MEDONIC CA 610 (Cell counter) ile 18 parametre ölçülerek yapıldı.

##### 3.1.2. HbF Tayini

EDTA' lı kan 3000 devirde santrifüj edilerek plazması atıldı. Dipte kalan eritrositler 3 kez serum fizyolojik ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra arta kalan eritrosit hacmi kadar distile su eklenip üzerine 1 ml  $\text{CaCl}_4$  ilave edilerek 3000 devirde santrifüj edildi. 1.6 ml alkali solüsyon bir tüpe konup, üzerine 0.1 ml hemolizat ilave edildi. 1 dakika sonra 3,4 ml çöktelci solüsyon tüpe ilave edilip reaksiyon durdurularak süspansiyon filtre kağıdından süzüldü. Süzüntüden 2 ml alınıp üzerine 2 ml fetal hemoglobin solüsyonu ilave edilerek karıştırıldı. Fetal ve toplam hemoglobinlerin optik dansitesi, spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda distile su kontrol kabul edilerek okundu.

$$\text{HbF(\%)} = (\text{ODHbF} / \text{ODToplam Hb}) \times 0,203 \times 100$$

### 3.1.3. Serum Ferritin Düzeyi:

Ferritin tayini Eurogenetics firmasının monoklonal antikor sandwich prensibine dayanan (Ferritin Coated mikrotiter strips) kit kullanılarak yapıldı. Laboratuardaki normal değerler kadınlar için 11-94 ng/ml, erkekler için 43-246 ng/ml olarak kabul edildi.

## 3.2. Deney Gruplarının Planlanması Ve İlgili Parametreler

### Deney grupları

1- $\beta$ -talasemi majörlü hastalar n=27

1a- izole NK

1b- mononükleer NK

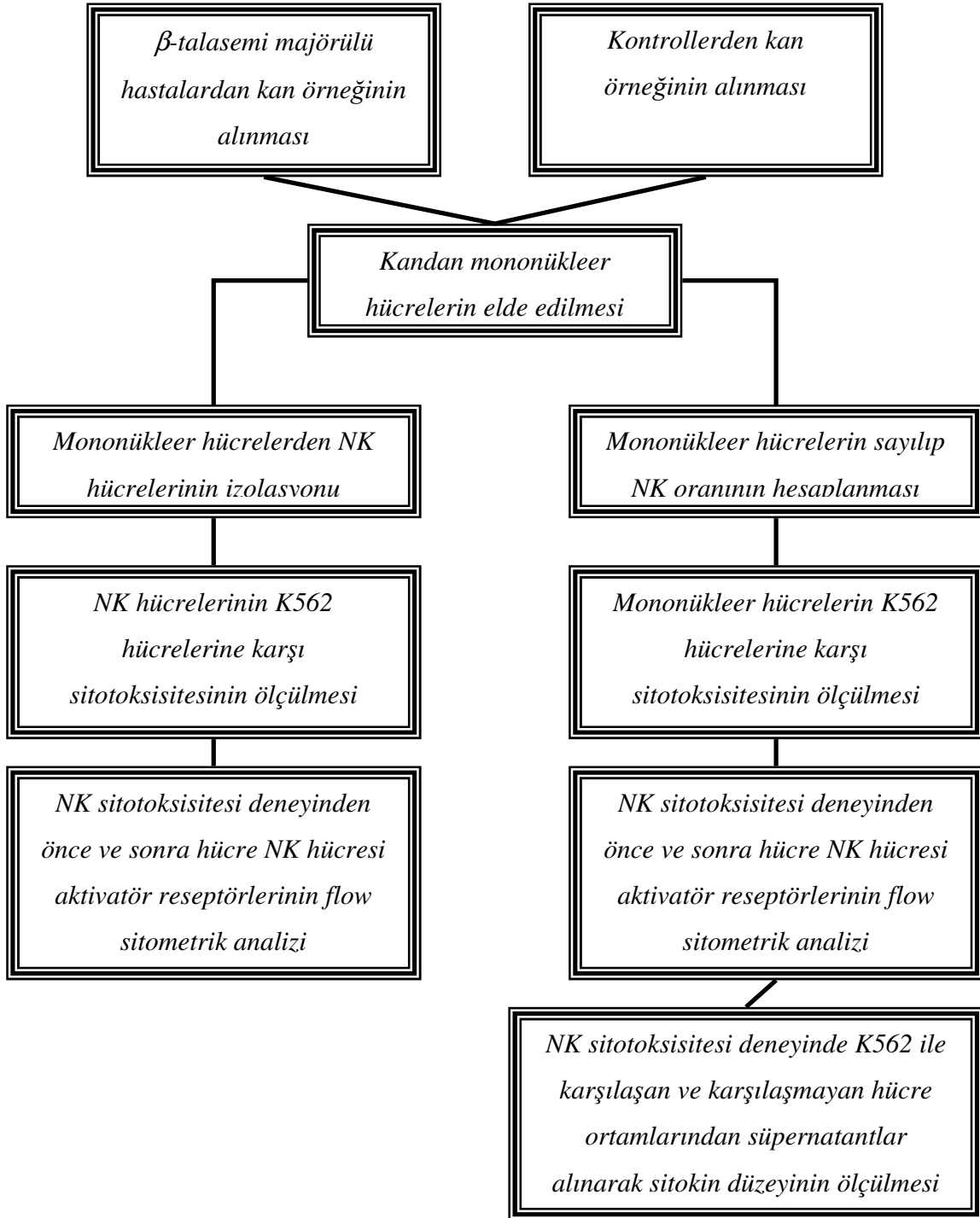
2- Kontrol n=18

2a- izole NK

2b- mononükleer NK

Deney ve kontrol grupları 2 ana grup olmasına rağmen NK aktivitesi her gruptan 2 ayrı biçimde bakıldığı için 4 grup olarak düşünüldü. Bu gruplar ve gruplarda incelenen parametrelerin ayrıntıları aşağıda şema halinde gösterildi (Şekil 3-1).

$\beta$ -talasemi majörlü hastalardan ve kontrollerden alınan kanlar önce fikle mononükleer hücreler elde edildi. Elde edilen hücrelerin bir bölümü NK izolasyonu için ayrıldı ve RosetteSep kitiyle izole edildi. İzole NK' dan ve mononükleer hücrelerden flow sitometride reseptör analizi için örnek alındı. Her iki durumda NK hücrelerinin K562 hücrelerine karşı sitotoksitesi ölçüldü ve deneyden sonra tekrar flow sitometride reseptör analizi için örnek alındı. Ayrıca mononükleer hücreler arasında yapılan sitotoksite deneyinin sonunda, K562 ile inkübe olmuş hücreler ile inkübe olmamış hücrelerin bulunduğu kuyulardan süpernatant alınarak sitokin ölçümü yapıldı.



**Şekil 3-1. Tez çalışmasında kullanılan parametrelerin şeması.**

### 3.2.1. NK Aktivitesi

Çalışmamıza katılan gönüllü kişilerin NK aktivitesine, hem mononükleer hücreler içinde, hem de NK hücreleri izole edilerek bakıldı. Sonuçlar analiz edilirken, NK hücrelerinin izole ve mononükleer hücreler arasındaki sitotoksitesi değerlendirildi. Ayrıca Talasemi hastaları ve sağlıklı kişilerin her iki durumdaki NK aktiviteleri karşılaştırmalı olarak analiz edildi.

#### 3.2.1.1. NK Aktivitesi Deneylerinde Kullanılan Malzemeler Ve Hazırlanışı

##### **Iscoves' Modified Dulbecco Medium (IMDM, Sigma I-7633)**

1000 ml medyum hazırlamak için 17,7 gr IMDM, 0,3 gr L-Glutamin ve 3,024 gr sodyum bikarbonat hazırlandı. Her biri 100 ml saf suda eritildi. Steril bir erlenmayere konarak, saf su ile bu karışım 1000 ml'ye tamamlandı. Medyumu süzmek için; 47 mm'lik ve 0,22 µm çapındaki Millipore marka durapore membran filtresi (GVWP04700) kullanıldı. Filtre edilmiş medyuma %10 oranında Fetal Dana Serumu (FCS) ve 62,5 mg/l gentamisin eklendi.

##### **Fetal Dana Serumu (FCS, Sigma)**

10 ml' lik stoklara bölünerek -20°C'de saklandı.

##### **Fikol (Histopague 1077 Sigma)**

Standart olarak 100 ml' lik şişelerde bulunan fikol +4°C'de saklandı.

##### **MTT (methyl-thiazol-tetrazolium) (M-5655, Sigma)**

MTT; 5 mg/ml olacak şekilde fosfat tamponunda(PBS) çözüldü ve +4°C'de saklandı.

### **İzopropilli SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)**

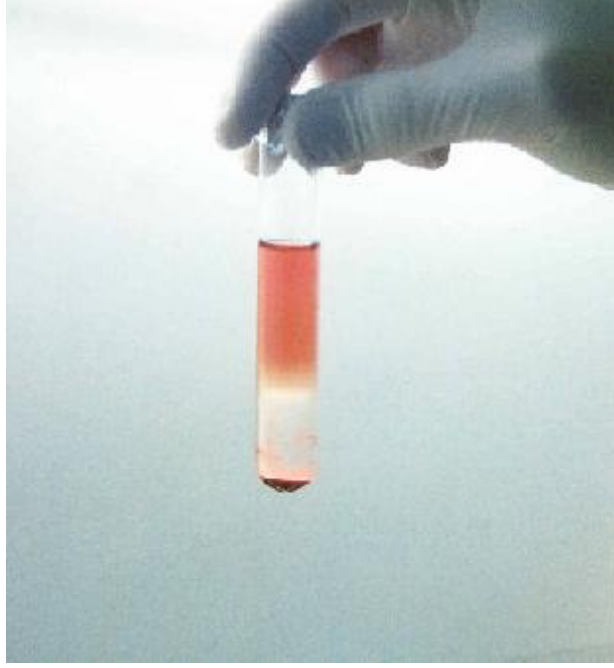
10 gr SDS hazırlandı. 100 ml'lik şişeye konuldu. Üzerine 50 ml saf su, 50 ml propanol ve 1 N HCl'den 0.8 ml eklendi. Şişe karıştırıldıktan sonra pH' sı 5.5'e ayarlandı. Oda ısısında saklandı.

#### **3.2.1.2. Mononükleer Hücrelerin Elde Edilmesi**

Çalışmamıza gönüllü olarak katılan  $\beta$ -talasemi majörlü hastalardan ve sağlıklı kişilerden alınan heparinli periferik kan; IMDM medyumu ile 1:1 dilüe edildi. 15 ml'lik konik tabanlı 2 falkon tüpe, 3 ml fikol eklendi. Hazırlanan kan, enjektör ile yavaşça tüpün kenarından sızdırarak tabakalandırıldı (iki sıvı birbirine karışmayacak şekilde) (Şekil 3-2).



**Şekil 3-2. Kanın fikol üzerine enjektörle yayılması**



**Şekil 3-3. Santrifüj sonrası.**

Tüpler  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, 2000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Mononükleer hücreler yoğunluk gradientine göre fikolle ayrıldı. Santrifüj sonunda, en altta eritrosit çökeltisi, çökeltinin üzerinde fikol tabakası, en üstte plazma/medyum tabakası ve fikol ile en üst tabaka arasında ise sarı renkte olan mononükleer hücrelerin oluşturduğu tabaka meydana geldi (**Şekil 3-3**).

Mononükleer hücrelerin oluşturduğu tabakanın diğer tabakalarla karışmamasına dikkat edilerek pipetle çekilip bir tüpe kondu. Tüp 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı ve üzerine bir miktar medyum koyularak tekrar 10 dakika santrifüj edildi. Bu şekilde hücreler yıkanarak fikol uzaklaştırıldı. Yıkanan hücrelerin süpernatantı atılarak yeni medyum koyuldu ve karıştırıldı.



### 3.2.1.3. Hücrelerin Sayılması

Hazırlanan hücre süspansiyonundan 10 µl alınıp, üzerine 10 µl ölü hücreleri boyayan %4'lük Tripan mavisi (Sigma Cat. No: T8154) eklendi ve pipetaj yapıldı. Pipetajdan sonra homojen karışımdan 10 µl alındı ve Neubauer lamında 10X40 büyütmeyle sayım yapıldı. Sayım yapılırken Tripan mavisi ile boyanmamış olan canlı ve düzgün hücre morfolojisine sahip hücreler dikkate alındı. Hücre sayımından sonra lökositler, ml' de  $10^7$  olacak şekilde ayarlandı.

### 3.2.1.4. NK Hücrelerinin İzole Edilmesi

Deneklerden elde edilen mononükleer hücreler 2 tüpe bölündü. 1.tüp mononükleer hücreler içinde NK aktivitesi ölçülmek için ayrıldı, diğer tüp ise NK izolasyonu için kullanıldı. Mononükleer hücrelerden NK izolasyonu, RosetteSep metodu (StemCell Technologies) kullanılarak yapıldı. Bu kit; NK dışındaki hücreleri ayıran (negatif seleksiyon) ve bu hücrelerin eritrosite bağlanarak, rozet oluşturmasını sağlayan, tetramerik antikör kompleksi kokteyli içermektedir. Kokteyl içinde CD3, CD4, CD19, CD36, CD66b ve Glikoforin A monoklonal antikoru bulunmaktadır.

Santrifüjle çöken mononükleer hücreler üzerine 1 ml medyum ve 20 µl eritrosit süspansiyonu ilave edilerek vorteksle karıştırıldı. Üzerine 50 µl RosetteSep NK izolasyon kiti eklenip pipetaj yapıldı ve 20 dak. bekletildi. Bu solusyon, 20 dak. sonunda 3ml fikol konulan bir falkon tüp içine damla damla aktarıldı ve +4°C'de, 2000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda, fikolün üzerinde bulunan NK hücrelerinin oluşturduğu tabaka dikkatli bir şekilde alınarak 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı ve üzerine bir miktar medyum koyularak tekrar 10 dakika santrifüj edildi. Bu şekilde hücreler yıkanarak fikol uzaklaştırıldı. Yıkanan hücrelerin süpernatantı atılarak yeni medyum koyuldu ve karıştırıldı. İzole edilen NK hücreleri sayılarak ml'de  $10^6$  olacak şekilde hazırlandı.

### 3.2.1.5. Doğal Öldürücü (NK) Sitotoksosite Testi

NK aktivitesi 4 saatlik MTT inkübasyonu sonucu, boyanın spektral analizi ile ölçüldü. Hedef olarak eritrolösemi hücreleri (K562) kullanıldı. K562; blast krizinde kronik miyeloid lösemili bir hastadan elde edilen multipotansiyelli hemopoetik standardize edilmiş hücre dizisidir. Çalışma boyunca %10 FCS'li medyunda ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde K562 hücreleri inkübe edildi. K562; MHC sınıf I negatif olan bir hücre dizisi olduğu için, NK hücreleri bu hücre dizisine karşı doğal sitotoksik aktivite gösterebilmektedir (**161**).

NK sitotoksosite testlerinde, NK hücreleri (efektör=E) ve NK'ya duyarlı olan eritrolösemi hücreleri (K562, target=T) farklı oranlarda karşılaştırılarak, NK' nın bu oranlarda K562' yi öldürebilme potansiyeline bakıldı. E:T oranları olarak 1:1, 10:1 ve 20:1 kullanıldı. Ölçüm 96 kuyulu U tabanlı mikropleytlerde yapıldı. K562 mikropleyte, kuyuda 5000 hücre/ml olacak şekilde eklendi.

Çalışmamızda NK aktivitesine mononükleer hücrelerde ve izole olmak üzere 2 farklı şekilde ama aynı E:T oranlarında bakıldı. Mononükleer hücrelerde NK aktivitesine bakarken; E:T oranları için efektör hücre sayısını hesaplarken mononükleer hücrelerin (bireysel farklılıklar göz önünde bulundurularak) yaklaşık %10'u NK hücresi kabul edildi. Hesaplamalarda NK hücresinin sayısı üzerinden efektör oranları hesaplandı. İzole NK'da ise direkt olarak hücre sayısı, efektör hücre sayısı olarak hesaplandı. K562 sayısı tüm oranlarda sabit tutuldu. Oranların yapılabilmesi için efektör hücrenin sayısı her oranda değiştirildi. Bu nedenle her E:T oranında farklı efektör kontrolü kullanıldı. Mikropleyte hücrelerin ekimi yapıldıktan sonra 4 saat %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi. Deneyin sonunda sitokin ölçümü için süpernatantlar alınıp üzerine aynı miktarda medyum ilave edildi ve kuyulara 10 µl MTT(methylthiazoltetrazolium) kondu (**1, 61, 118**).

Canlı hücreleri boyayan MTT; hücre içine endositoz ile alınır ve asidik vesiküllerde birikir. Canlı hücrelerin sitoplazmik ve mitokondrial dehidrogenazları tarafından formazana indirgenir ve ekzositoz ile bu formazan hücre yüzeyine formazan kristalleri şeklinde taşınır. 3 saat sonra yaklaşık MTT formazanının

%90'ını ekzositoz ile dışarı atar. İzopropilli SDS; insoluble MTT' yi çözerek onu spektrofotometrede okunabilir partiküllere dönüştürür **(157, 173)**

MTT' nin konulmasından sonra mikropleyt 3 saat etüvde bekletildi. 3 saat sonunda her kuyudan 130 µl süpernatant çekildi ve 100 µl izopropilli SDS( Sodyum dedosilsülfat) çözeltisi kondu. Alkolün uçmasını engellemek için pleyt ile kapağının arası peçete ile sıkıştırıldı. 1 gün karanlıkta bekletildi. Ertesi gün ELISA spektrofotometresinde, 655 nm referans dalga boyuna göre 570 nm' de okundu. Hesaplama yapılırken NK/K562' nin birlikte bulunduğu 3 kuyunun ortalaması alınıp, NK kontrollerinin ortalama değerinden çıkartılarak K562' nin absorbansı bulundu. Bulunan değer, K562 kontrollerinin ortalamasına bölünerek bu hücrelerin ne kadarının canlı kaldığına bakıldı ve 1' den çıkartılarak 100 ile çarpıldı **(1, 141, 173)**.

$$\% \text{ NK sitotoksitesi} = (1 - [ (\text{NK} + \text{K562}_{\text{OD}}) - (\text{NK}_{\text{OD}}) ] / (\text{K562}_{\text{OD}})) \times 100 \quad \text{(118)}$$

### 3.2.2. Flow Sitometri Ölçümü

Talasemi hastalarında ve sağlıklı kişilerde; NK aktivitesi deneyinden önce ve sonra NK hücrelerinin yüzey markerları ve NK aktivatör reseptörlerin (CD16, NKG2D, NKp30, NKp44) ekspresyonu flow sitometri ile tayin edildi.

**Tablo 3-1. Flow Sitometri analizinde kullanılan antikolar.**

<i>ANTİKORLAR</i>	<i>ÜRÜN MARKASI</i>	<i>KATALOG NO</i>
<i>APC/Cy7 anti-human CD3</i>	<i>Biolegend</i>	<i>300426</i>
<i>FITC anti-human CD56 (NCAM)</i>	<i>Biolegend</i>	<i>318304</i>
<i>PE anti-human CD16</i>	<i>Biolegend</i>	<i>302008</i>
<i>PE anti-human CD336 (NKp44)</i>	<i>Biolegend</i>	<i>325103</i>
<i>APC anti-human CD337 (NKp30)</i>	<i>Biolegend</i>	<i>325210</i>
<i>APC anti-human NKG2D (CD314)</i>	<i>Biolegend</i>	<i>320808</i>

Deneylerin analizi Flowjo software ile yapıldı. Hücreler polipropilen sitometri tüplerine kondu. Florosanzitiosiyanat (FITC, 518 nm) ile konjuge CD56, allofikosiyenin (APC, 660 nm) ile konjuge NKG2D, NKp30, fikoeritrin (PE, 575 nm) ile konjuge CD16, NKp44 ve allofikosiyenin-siyenin-7 (APC-Cy7, 785 nm) ile konjuge CD3 antikolarıyla işaretlendi (Tablo 3-1). Negatif kontrol olarak antikolarla işaretlenmemiş hücreler kullanıldı. 20 dak. karanlıkta inkübe edildi. 2 ml Phosphate buffered saline (%1 Bovine serum albumin, %0,1 sodium azide) (PBS) eklendi. 1000 g 5 dak +4°C' de santrüfjü edildi. Bu işlem 2 kez yapıldı.

Lenfosit popülasyonunun tanımlanabilmesi için Forward scatter (FSC) ve side scatter (SSC) plotları kullanıldı. Her data set için 10000 hücre sayıldı. Floresan yoğunluğuna göre sonuçlar analiz edildi. CD3<sup>-</sup> olan hücre popülasyonunda CD56<sup>+</sup> hücreler olan NK hücrelerinin CD56<sup>parlak</sup> ve CD56<sup>sönük</sup> alt grupları kapılarak (gating) ayrıldı. NKp30, NKp44, NKG2D ve CD16 reseptörlerinin ekspresyonu, her 2 alt grupta tayin edildi (22, 124).

### 3.2.3. Sitokin Ölçümü

$\beta$ -talasemi majörlü hastalar ve sağlıklı kişilerde; mononükleer hücreler arasındaki NK aktivitesi deneyinin sonunda sitokin ölçümü için süpernatantlar alındı. Efektör kontrollerinin bulunduğu kuyulardan alınan süpernatantlar uyarılmamış hücrelerin sitokin düzeyi olarak, K562 hücreleri ile uyarılmış ve 20:1 E:T oranındaki hücrelerin süpernatantı deneyden sonraki sitokin düzeyi olarak kabul edildi.

**Tablo 3-2. Sitokin ölçümünde kullanılan ELISA kiti**

<i>ELISA KİTLERİ</i>	<i>ÜRÜN MARKASI</i>	<i>KATALOG NO</i>
<i>IL12+p40</i>	<i>Biosource</i>	<i>KHC0121</i>
<i>IL15</i>	<i>Biosource</i>	<i>KHC0152</i>
<i>IFN<math>\gamma</math></i>	<i>Biosource</i>	<i>KHC4021</i>
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	<i>Biosource</i>	<i>KHC3011</i>
<i>IL2</i>	<i>Biosource</i>	<i>KHC0022</i>
<i>IL10</i>	<i>Biosource</i>	<i>KHC0101</i>
<i>TGF-<math>\beta</math>1</i>	<i>Biosource</i>	<i>KAC1688</i>

Deneyden önceki ve deneyden sonraki süpernatantların içindeki sitokin konsantrasyonları ELISA kitleri aracılığıyla pg/ml olarak ölçüldü (Tablo 3-2). Her sitokin miktarı; kullanılan ELISA kitinin protokolüne uyularak tayin edildi (128). Supernatantlar ölçülecek sitokine göre çeşitli miktarlarda 96 kuyulu pleytlere kondu. Üzerine biotin konjugat eklendi. 2 saat oda ısısında bekletildi. Streptavidin-HRP solusyonu eklenip oda ısısında yarım saat inkübe edildi. Daha sonra stabilize edici kromojen eklenip 30 dak. bekletildi. Son olarak stop solusyon konduktan sonra, Absorbanslar 490 nm de Biotek Instruments Mikropleyt Reader’da okundu. 96 kuyulu mikro ELISA striplerin, ilk 12 tanesi kontrol için, kalan diğer kuyular ise test süpernatantları için kullanıldı.

#### **3.2.4. İstatiksel Analiz**

Çalışmaya katılan  $\beta$ -talasemi majörlü hastalar ile kontrollerin, mononükleer hücreler arasında ve izole olarak NK aktivitesinin karşılaştırılması “Independent samples t test” ile yapılmıştır. Aktivatör reseptörler ve sitokin düzeyleri analiz edilirken; hasta ve kontrol gruplarının kendi içinde NK aktivitesi deneyinden önce ve sonraki düzeyleri arasındaki fark “paired samples t test” ile ölçülmüştür. Ayrıca kontrollerle hastalar arasındaki aktivatör reseptör ve sitokin düzeyi farkı “Independent samples t test” ile analiz edilmiştir. Anlamlılık değeri  $p < 0,050$  olan sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir. Kullanılan testlerin her ikisi de parametrik testlerdir.

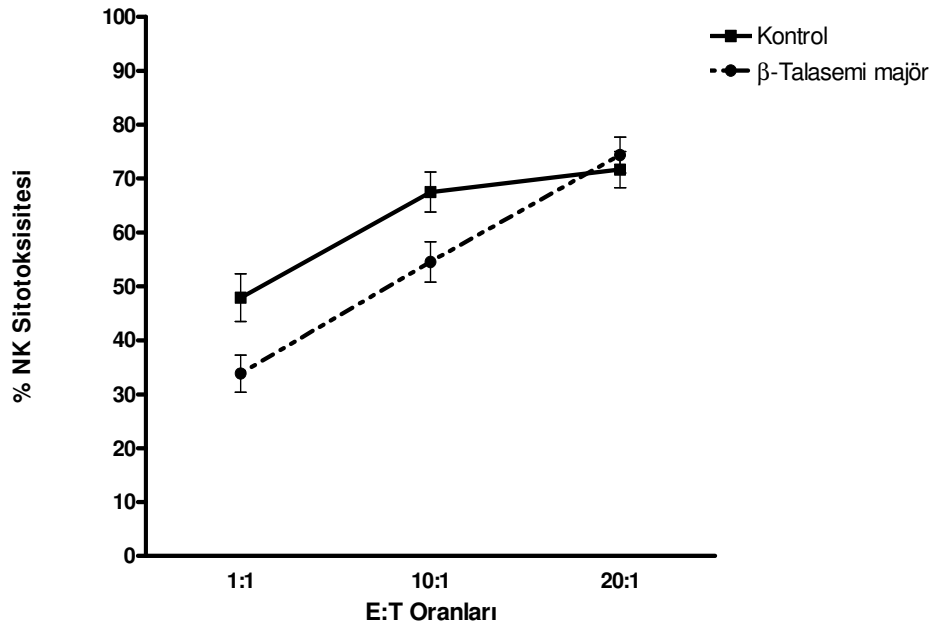
## 4. BULGULAR

### 4.1. İzole Edilmiş NK İle Mononükleer Hücreler Arasındaki NK Hücrelerinde Sitotoksisite Deneyi

$\beta$ -talasemi majörlü hastalarda ve kontrollerde hem izole edilmiş NK hücrelerinin hem de mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin, K562 hücrelerine karşı 1:1, 10:1, 20:1 olmak üzere üç E:T oranında sitotoksisitesi ölçüldü. Kontrollerde izole hem edilmiş NK hücrelerinin hem de mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin sitotoksisitesi, anlamlı olarak  $\beta$ -talasemi majörlü hastalardan daha yüksek bulundu.

Kontrollerin izole edilmiş NK hücrelerinin sitotoksisitesi, 1:1 ( $p<0,020$ ) ve 10:1 ( $p<0,025$ ) E:T oranlarında  $\beta$ -talasemi majörlü hastalardan anlamlı olarak daha yüksek iken (Şekil 4-1, Tablo4-1), mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin sitotoksisitesi ise 1:1 ( $p<0,050$ ) ve 10:1 ( $p<0,050$ ) E:T oranlarında  $\beta$ -talasemi majörlü hastalardan anlamlı olarak daha yüksekti (Şekil 4-2, Tablo 4-2).

Şekil 4-1' de izole edilmiş NK hücrelerinin hasta ve kontrollerde sitotoksisitesi gösterilmektedir. İzole durumdayken de NK aktivitesinin bu hastalarda düşük bulunması, çevresel faktörler dışında genetik faktörlerin de var olabileceğini işaret etmektedir. Şekil 4-2' de mononükleer hücreler arasıdayken NK aktivitesi yine talasemi hastalarında düşük bulunmuştur. Mononükleer hücreler NK aktivitesini modüle eden hücrelerdir ancak  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda kontrollere göre NK hücrelerinin modüle edilemediği görülmüştür.

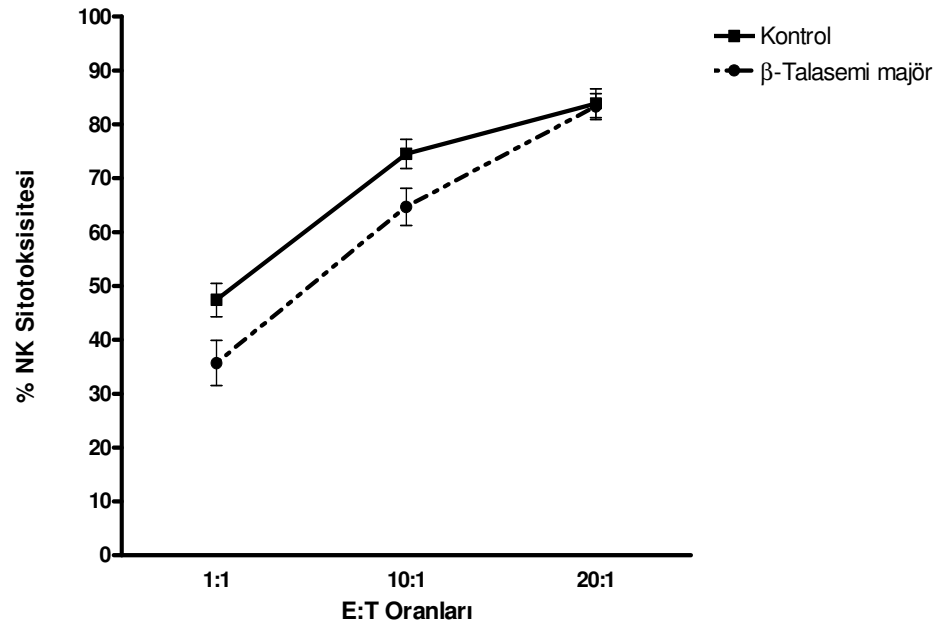


**Şekil 4-1.** β-talasemi majörlü hastalarda ve kontrollerde, izole edilmiş NK hücresi sitotoksosite sonuçlarının ortalamaları ve standart hataları. β-talasemi majörlü hastalarda 1:1 ve 10:1 E:T oranlarında NK aktivitesi kontrollere göre daha düşük bulunmuştur. NK sitotoksitesi, öldürülen K562 hücrelerinin % oranlarını göstermektedir.

**Tablo 4-1.** β-talasemi majörlü hastalarda ve kontrollerde izole edilmiş NK hücrelerinin sitotoksitesi ve anlamlılıklar. Hasta ve kontroller karşılaştırılırken Independent samples t test kullanılmış ve p değeri <0.050 olanlar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

<i>E:T Oranları</i>	<i>% NK Sitotoksitesi</i>		<i>Talasemi- Kontrol Anlamlılık (p&lt;0.050)</i>
	<i>Kontrol</i>	<i>β-Talasemi majör</i>	
<i>1:1</i>	<i>47.93±18.76</i>	<i>33.83±17.88</i>	<i>0.015</i>
<i>10:1</i>	<i>67.50±15.67</i>	<i>54.51±19.40</i>	<i>0.022</i>
<i>20:1</i>	<i>71.64±14.25</i>	<i>74.36±17.31</i>	<i>&gt;0.050</i>





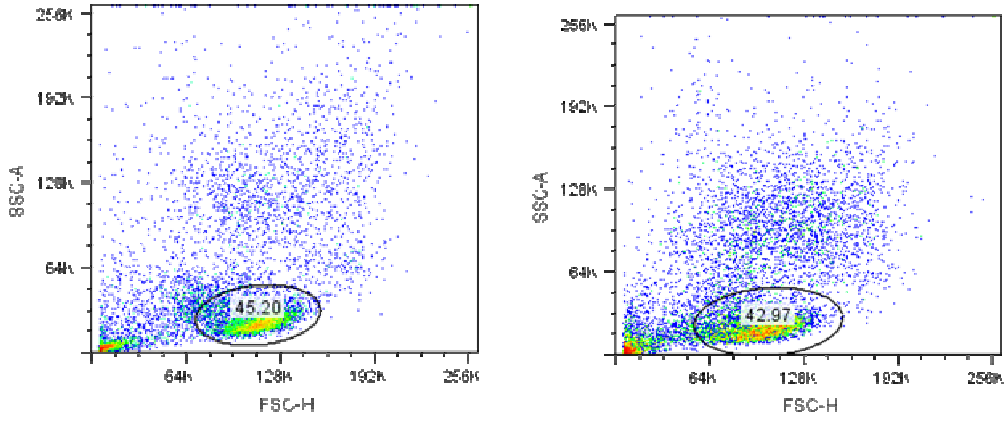
**Şekil 4-2.** β-talasemi majörlü hastalarda ve kontrollerde mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin sitotoksitesisi. β-talasemi majörlü hastalarda 1:1 ve 10:1 E:T oranlarında NK aktivitesi kontrollere göre daha düşük bulunmuştur. NK sitotoksitesisi, öldürülen K562 hücrelerinin % oranlarını göstermektedir.

**Tablo 4-2.** β-talasemi majörlü hastalarda ve kontrollerde mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin sitotoksitesisi ve anlamlılıklar. Hasta ve kontroller karşılaştırılırken Independent samples t test kullanılmış ve p değeri <0.050 olanlar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

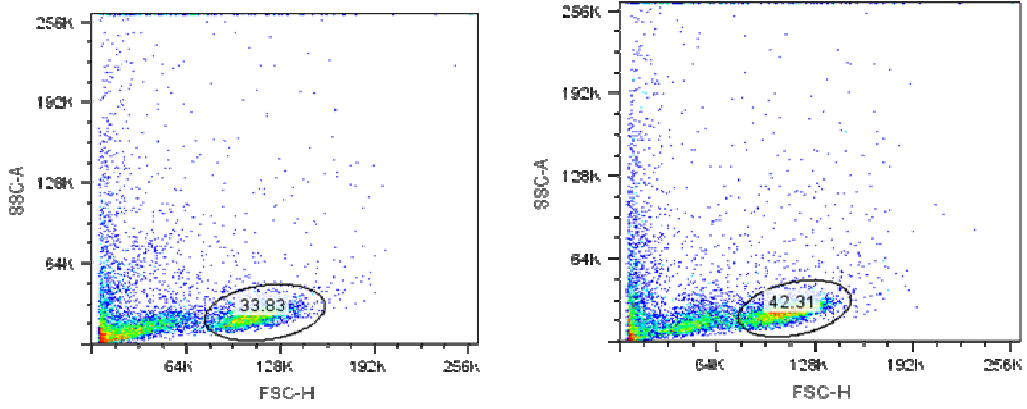
<i>E:T Oranları</i>	<i>% NK Sitotoksitesisi</i>		<i>Talasemi- Kontrol Anlamlılık (p&lt;0.050)</i>
	<i>Kontrol</i>	<i>β-Talasemi majör</i>	
<i>1:1</i>	<i>47.40±13.16</i>	<i>35.68±21.75</i>	<i>0.047</i>
<i>10:1</i>	<i>74.53±11.36</i>	<i>64.67±17.89</i>	<i>0.044</i>
<i>20:1</i>	<i>83.93±11.44</i>	<i>83.33±12.53</i>	<i>&gt;0.050</i>

#### 4.2. NK Sitotoksitesi Deneyinin Öncesi Ve Sonrası NK Hücrelerinin Aktivatör Reseptörlerinin Düzeyi.

Çalışmaya katılan gönüllülerin hem izole iken hem de mononükleer hücreler arasında iken NK hücrelerinin, K562 eritrolösemi hücrelerine karşı sitotoksitesini ölçmeden önce ve ölçtükten sonra aktivatör reseptörlerindeki değişimi anlamak amacıyla flow sitometride reseptör analizi yapıldı. Flow sitometride hücre büyüklüğü ve granüler yapısı dikkate alınarak lenfositlerin bulunduğu bölge kapılandı (Şekil 4-3 ve 4-4).



**Şekil 4-3.** Sırasıyla bir hasta ve bir kontrol örneğinde; mononükleer hücre popülasyonu içinde lenfosit popülasyonunun kapılanması.

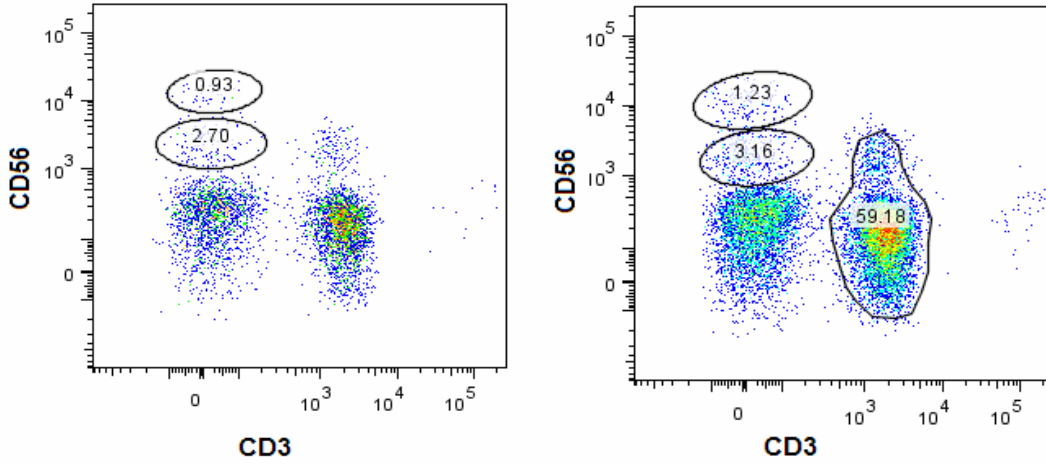


**Şekil 4-4.** Sırasıyla bir hasta ve bir kontrol örneğinde; izole edilmiş NK hücre popülasyonu içinde NK popülasyonunun kapılanması.

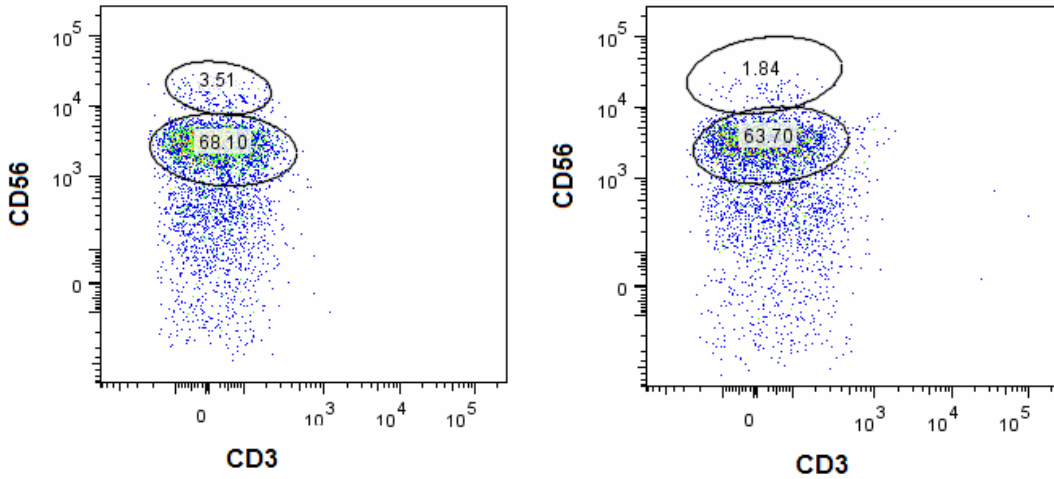
#### 4.2.1. Lenfosit Popülasyonu İçinde NK Hücrelerinin Seçilmesi Ve Alt Gruplarına Ayrılması

Flow sitometride lenfosit popülasyonu kapıldıktan sonra, bu popülasyon içindeki NK hücrelerini diğer lenfositlerden ayırabilmek için, spesifik olarak  $CD56^+$   $CD3^-$  olma özelliğinden faydalandı. Kontrol olarak antikorla işaretlenmemiş hücreler kullanıldı. Kontrolde hücrelerin otoflerasanı tespit edilip sınırlandırdıktan sonra, bu sınırın dışındaki floresan düzeyine bakılarak analiz yapıldı. T lenfositleri  $CD3^+$  olması nedeniyle  $CD3$  antikorunu NK hücrelerinin T lenfositlerinden ayrılması için kullanıldı (Şekil 4-5 ve 4-6).

$CD3^-$  ve  $CD56^+$  olan NK popülasyonu belirlendikten sonra, alt gruplarına ayırmak için  $CD56$  yüzey markerının floresan yoğunluğuna bakılarak; daha düşük yoğunlukta olan  $CD56^{\text{sönük}}$  NK hücreleri ve daha yüksek yoğunlukta olan  $CD56^{\text{parlak}}$  NK hücreleri kapılanarak birbirinden ayrıldı (Şekil 4-5 ve 4-6). Daha sonra her iki popülasyondaki aktivatör reseptör düzeyi ayrı ayrı analiz edildi.



**Şekil 4-5.** Mononükleer hücreler arasındaki lenfosit popülasyonunda NK hücrelerinin seçilmesi ve alt gruplarına ayrılması.

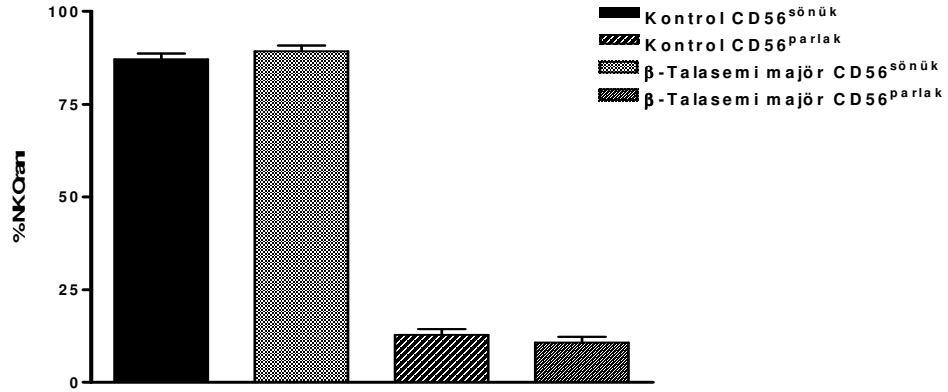


**Şekil 4-6.** İzole edilmiş NK hücrelerinde, NK hücrelerinin seçilmesi ve alt gruplarına ayrılması. CD56<sup>sönük</sup> NK hücre sayısı CD56<sup>parlak</sup> NK hücrelerine göre daha yüksek olduğu şekilde görülmektedir.

#### 4.2.2. NK Alt Gruplarının Yüzde Oranları

NK hücreleri alt gruplarına ayrıldıktan sonra her iki alt grubunun NK popülasyonundaki yüzde oranı hesaplandı. Kontrollerde CD56<sup>sönük</sup> NK hücrelerinin yüzde oranının ortalaması  $87,16 \pm 6,48$ , CD56<sup>parlak</sup> NK hücrelerinin yüzde oranının ortalaması  $12,82 \pm 6,48$  bulundu.  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda CD56<sup>sönük</sup> NK hücrelerinin yüzde oranının ortalaması  $89,24 \pm 8,12$ , CD56<sup>parlak</sup> NK hücrelerinin yüzde oranının ortalaması  $10,74 \pm 8,11$  bulundu.  $\beta$ -talasemi majörlü hastaların ve

kontrollerin NK alt grupları karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 4-7).



**Şekil 4-7.** β-talasemi majörlü hastalarda ve kontrollerde NK hücrelerinin CD56<sup>sönük</sup> ve CD56<sup>parlak</sup> alt gruplarının NK populasyonu içindeki yüzde oranları. Hasta ve control arasındaki farklılığa independent samples t test ile bakılmış ve anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

#### 4.2.3. β-Talasemi Majörlü Hastaların Ve Kontrollerin NK Hücrelerinde Aktivatör Reseptörler

NK hücreleri alt gruplarına ayırdıktan sonra her alt grupta NK aktivitesi deneyinin öncesinde ve sonrasında NKG2D, CD16, NKp30 ve NKp44 aktivatör reseptörlerinin düzeyine bakıldı. Talasemi ve kontrol grubunun deneyden önceki ve deneyden sonraki reseptör düzeyleri analiz edildikten sonra ayrıca her iki grubun sonuçları birbirleriyle karşılaştırılarak analiz edildi. İzole edilmiş NK hücrelerinin ve mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin alt gruplarının aktivatör reseptör düzeylerinin ortalaması  $\pm$  standart sapması ve anlamlılıkları Tablo 4-3 ve 4-4' te gösterilmiştir.

##### 4.2.3.1. İzole Edilmiş NK Hücrelerinde Aktivatör Reseptörler

İzole edilmiş NK hücrelerinin alt gruplarının CD16 ve NKG2D aktivatör reseptörlerine bakıldığında NK sitotoksitesi deneyinin öncesinde ve sonrasında hem kontrollerde hem de β-talasemi majörlü hastalarında anlamlı bir farklılık

bulunmadı. Her iki grubunun deney öncesi ve sonrası sonuçları birbirleriyle karşılaştırıldığında da anlamlı bir sonuç bulunmadı (Şekil 4-8 ve 4-9).

NKp30 aktivatör reseptörünün kontrollerde CD56<sup>sönük</sup> NK alt grubunda deneyden sonra anlamlı olarak ( $p<0.001$ ) azaldığı bulundu.  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarında hem CD56<sup>sönük</sup> ( $p<0.050$ ) hem de CD56<sup>parlak</sup> ( $p<0.010$ ) NK alt grubunda anlamlı olarak azaldı. İki grup birbirleriyle karşılaştırıldığında; kontrollerin CD56<sup>parlak</sup> NK alt grubunun NKp30 düzeyinin deneyden önce ( $p<0,020$ ) ve sonra ( $p<0.050$ )  $\beta$ -talasemi majörlü hastalardan anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulundu (Şekil 4-10, Tablo 4-3).

NKp44 aktivatör reseptörünün düzeyi ise  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarının CD56<sup>parlak</sup> NK alt grubunda deneyden sonra anlamlı olarak ( $p<0,005$ ) arttı. Kontrollerin CD56<sup>parlak</sup> NK alt grubunun NKp44 düzeyinin deneyden önce ( $p<0.025$ ) ve sonra ( $p<0.005$ )  $\beta$ -talasemi majörlü hastalardan anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulundu (Şekil 4-11, Tablo 4-3).

#### **4.2.3.2. Mononükleer Hücreler Arasındayken NK Hücrelerinde Aktivatör Reseptörler**

Mononükleer hücreler arasındayken NK hücrelerinin K562 hücrelerine gösterdiği sitotoksisite ölçülmeden önce ve sonra aktivatör reseptör düzeyine bakıldığında CD16 reseptörünün düzeyi; kontrollerin CD56<sup>sönük</sup> NK alt grubunda deneyden sonra anlamlı olarak ( $p<0.001$ ) artarken  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda CD56<sup>parlak</sup> NK alt grubunun deneyden sonra anlamlı ( $p<0.050$ ) artışı vardı. Deneyden sonra kontrollerin ve  $\beta$ -talasemi majörlü hastaların sonuçları karşılaştırıldığında, kontrollerin CD16 düzeyinin anlamlı olarak ( $p<0.010$ ) daha yüksek olduğu bulundu (Şekil 4-12, Tablo 4-4 ).

NKG2D ve NKp44 aktivatör reseptörlerinin düzeyinde; NK sitotoksisitesi deneyinin öncesi ve sonrası hem kontrollerde hem de  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Her iki grubunun deney öncesi ve

sonrası sonuçları birbirleriyle karşılaştırıldığında da anlamlı bir sonuç yoktu (Şekil 4-13, Tablo 4-4 ).

NKp30 aktivatör reseptörünün kontrollerde CD56<sup>sönük</sup> NK alt grubunda deneyden sonra anlamlı olarak ( $p<0.001$ ) azaldığı bulundu.  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarında hem CD56<sup>sönük</sup> hem de CD56<sup>parlak</sup> NK alt grubunda anlamlı değişiklik olmadı. İki grup birbirleriyle karşılaştırıldığında; kontrollerin CD56<sup>parlak</sup> NK alt grubunun NKp30 düzeyinin deneyden sonra  $\beta$ -talasemi majörlü hastalardan anlamlı olarak ( $p<0.005$ ) daha yüksek olduğu bulundu (Şekil 4-14, Tablo 4-4).

Şekil 4-8, 4-9, 4-10 ve 4-11' de bir  $\beta$ -talasemi majörlü hasta ile bir kontrolün izole edilmiş NK hücrelerinde NK sitotoksitesi deneyi öncesinde ve sonrasındaki, sırasıyla CD16, NKG2D, NKp30 ve NKp44 düzeyleri gösterilmiştir.

Şekil 4-12, 4-13, 4-14 ve 4-15' te ise bir  $\beta$ -talasemi majörlü hasta ile bir kontrolün mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinde NK sitotoksitesi deneyi öncesinde ve sonrasındaki, sırasıyla CD16, NKG2D, NKp30 ve NKp44 düzeyleri gösterilmiştir. İstatistiksel analizler tüm hasta ve kontrollerin ortalama ve standart sapma değerlerine göre yapılmıştır. Bu şekiller sadece örnek olarak sunulmuştur.

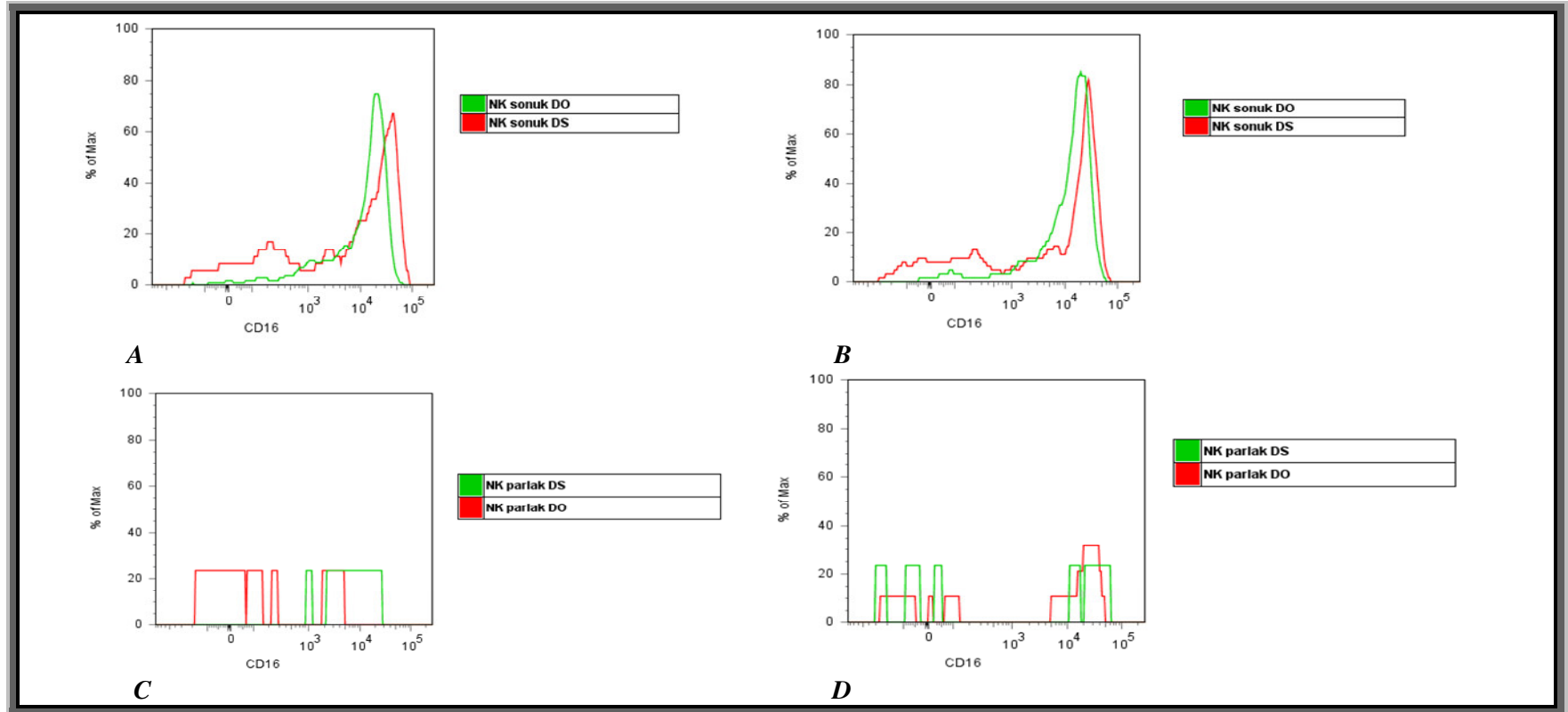
**Tablo 4-3** İzole edilmiş NK hücrelerinde deneyden önce ve sonra aktivatör reseptör düzeyi. NK hücreleri K562 hücrelerine karşı sitotoksitenin ölçüldüğü deneyden önce ve sonra aktivatör reseptör düzeyleri arasında anlamlı farklılık bulunanlar gösteriştir. Hasta ve kontroller karşılaştırılırken Independent samples t test kullanılmıştır. Hastaların ve kontrollerin kendi içinde deneyden önce ve sonraki aktivatör reseptör düzeyleri farklılığına ise paired samples t test ile bakılmıştır ve her iki test için p değeri <0.050 olanlar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

<i>Aktivatör</i>		<i>Talasemi- Kontrol</i>					
		<i>Kontrol</i>		<i>β-Talasemi majör</i>		<i>Anlamlılık</i> ( <i>p&lt;0.050</i> )	
<i>Reseptörler</i>		<i>CD56<sup>sönük</sup></i>	<i>CD56<sup>parlak</sup></i>	<i>CD56<sup>sönük</sup></i>	<i>CD56<sup>parlak</sup></i>	<i>CD56<sup>sönük</sup></i>	<i>CD56<sup>parlak</sup></i>
<i>NKp30</i>	<i>Deneyden</i>	1336.27±513.50	1293.22±643.47	1342.96±578.19	945.22±308.54	>0.050	<b>0.019</b>
	<i>Önce</i>						
	<i>Deneyden</i>	1038.38±508.65	1129.88±798.42	1260.14±634.10	793.77±240.83	>0.050	<b>0.045</b>
	<i>Sonra</i>						
<i>Anlamlılık</i> ( <i>p&lt;0.050</i> )		<b>0.001</b>	>0.050	<b>0.044</b>	<b>0.005</b>		
<i>NKp44</i>	<i>Deneyden</i>	918.22±466.88	599.66±556.44	1156.44±330.16	328.03±155.11	>0.050	<b>0.020</b>
	<i>Önce</i>						
	<i>Deneyden</i>	924.55±475.77	725.16±445.83	1194.88±451.45	416.48±203.17	>0.050	<b>0.003</b>
	<i>Sonra</i>						
<i>Anlamlılık</i> ( <i>p&lt;0.050</i> )		>0.050	>0.050	>0.050	<b>0.002</b>		

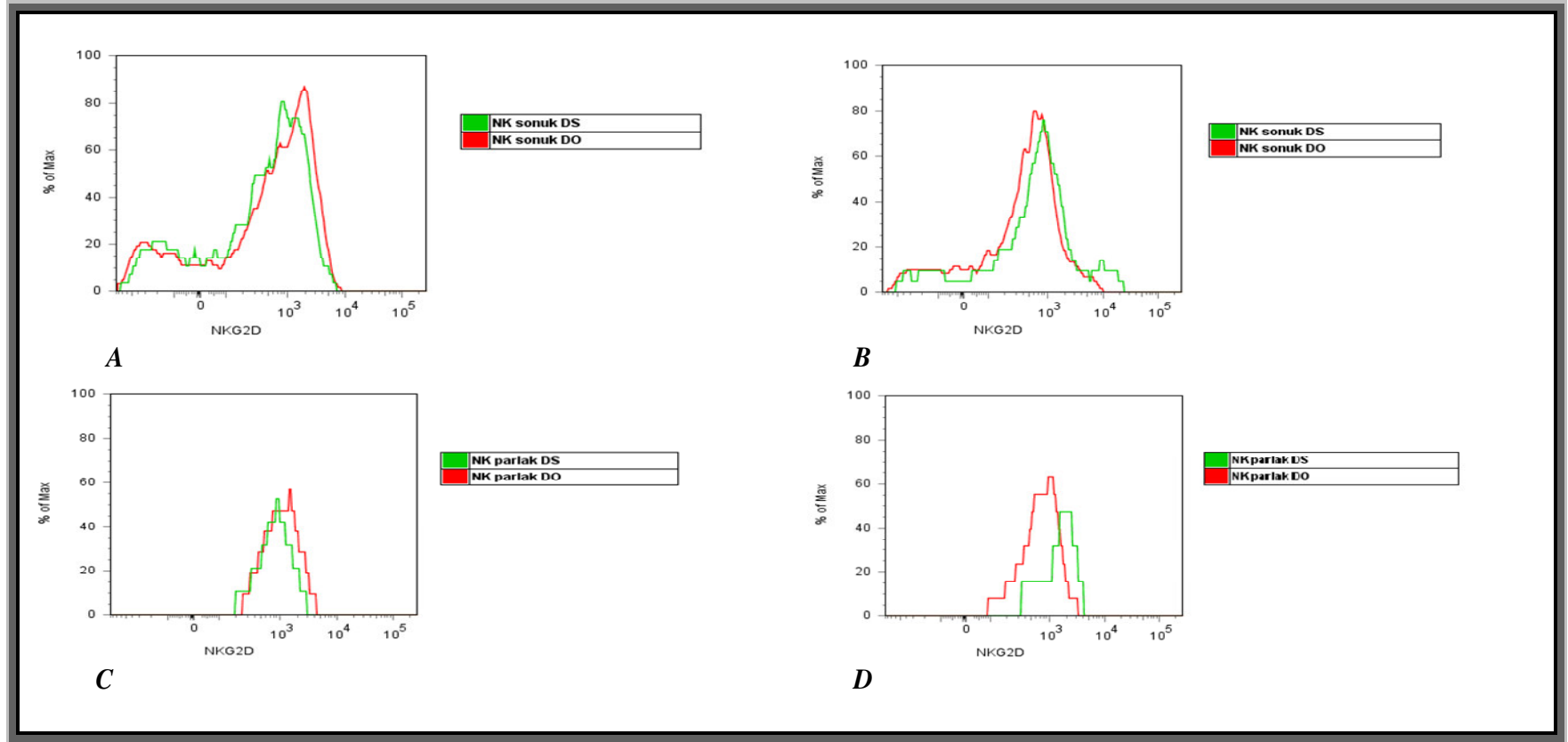


Tablo 4-4. Mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinde deneyden önce ve sonra aktivatör reseptör düzeyi. NK hücreleri K562 hücrelerine karşı sitotoksitenin ölçüldüğü deneyden önce ve sonra aktivatör reseptör düzeyleri arasında anlamlı farklılık bulunanlar göstermiştir. Hasta ve kontroller karşılaştırılırken Independent samples t test kullanılmıştır. Hastaların ve kontrollerin kendi içinde deneyden önce ve sonraki aktivatör reseptör düzeyleri farklılığına ise paired samples t test ile bakılmıştır ve her iki test için p değeri <0.050 olanlar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

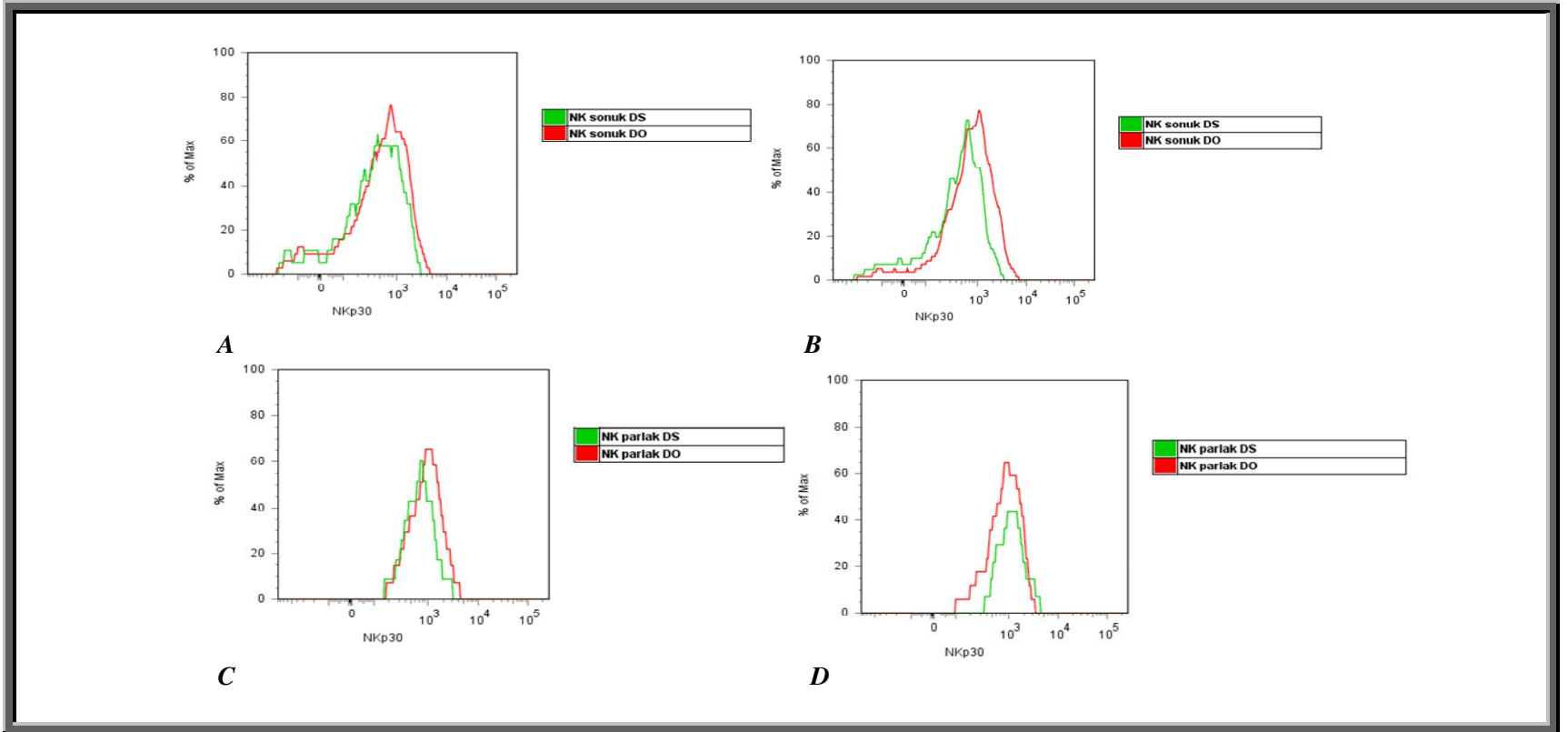
<i>Aktivatör</i>		<i>Talasemi- Kontrol</i>					
		<i>Kontrol</i>		<i>β-Talasemi majör</i>		<i>Anlamlılık</i>	
						<i>(p&lt;0.050)</i>	
<i>Reseptörler</i>		<i>CD56<sup>sönük</sup></i>	<i>CD56<sup>parlak</sup></i>	<i>CD56<sup>sönük</sup></i>	<i>CD56<sup>parlak</sup></i>	<i>CD56<sup>sönük</sup></i>	<i>CD56<sup>parlak</sup></i>
<b>CD16</b>	<i>Deneyden</i>	10867.67±5511.65	2039.44±3091.56	8657.07±8667.50	732.92±1390.79	>0.050	>0.050
	<i>Önce</i>						
	<i>Deneyden</i>	16421.83±8334.88	4572.27±6910.53	10099.96±6585.63	2025.74±3103.01	<b>0.007</b>	>0.050
	<i>Sonra</i>						
<i>Anlamlılık</i>		<b>&lt;0.001</b>	>0.050	>0.050	<b>0.048</b>		
<i>(p&lt;0.050)</i>							
<b>NKp30</b>	<i>Deneyden</i>	1263.77±560.59	1086.55±472.66	988.66±407.01	862.81±435.63	>0.050	>0.050
	<i>Önce</i>						
	<i>Deneyden</i>	969.38±352.97	1387.83±1056.49	910.51±702.18	684.96±387.25	>0.050	<b>0.003</b>
	<i>Sonra</i>						
<i>Anlamlılık</i>		<b>0.001</b>	>0.050	>0.050	>0.050		
<i>(p&lt;0.050)</i>							



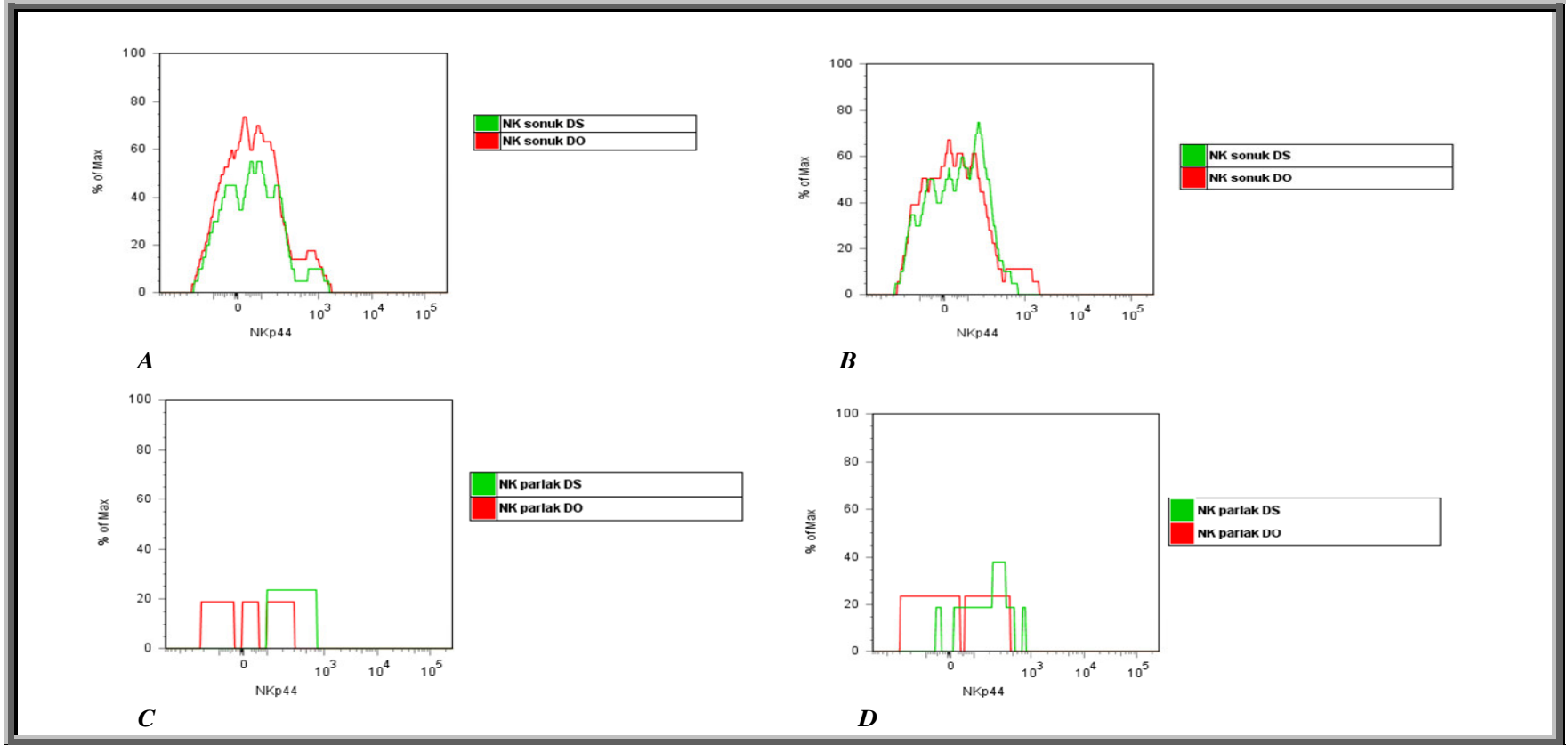
Şekil 4-8.  $\beta$ -talasemi majör hastası (A) ve kontrol (B) örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin CD56<sup>sönük</sup> alt grubunda; C ve D' de ise sırasıyla  $\beta$ -talasemi majör hastası ve kontrol örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin CD56<sup>parlak</sup> alt grubunda; K562 ile uyarılan NK aktivitesi deneyinden önce (DÖ) ve sonra (DS), CD16 aktivatör reseptör düzeyi.



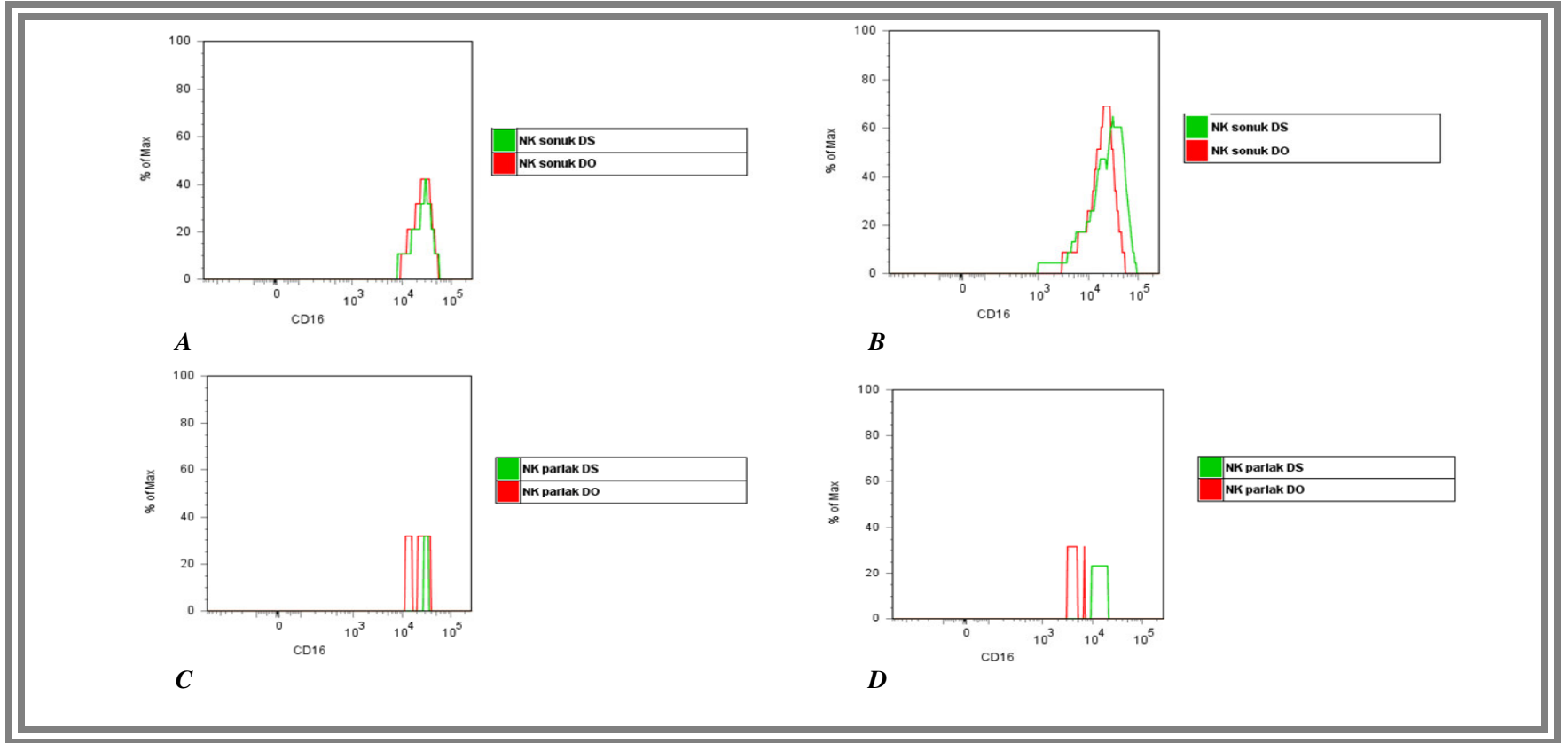
Şekil 4-9.  $\beta$ -talasemi majör hastası (A) ve kontrol (B) örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin CD56<sup>sönük</sup> alt grubunda; C ve D' de ise sırasıyla  $\beta$ -talasemi majör hastası ve kontrol örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin CD56<sup>parlak</sup> alt grubunda; K562 ile uyarılan NK aktivitesi deneyinden (DÖ) ve sonra (DS), NKG2D aktivator reseptör düzeyi.



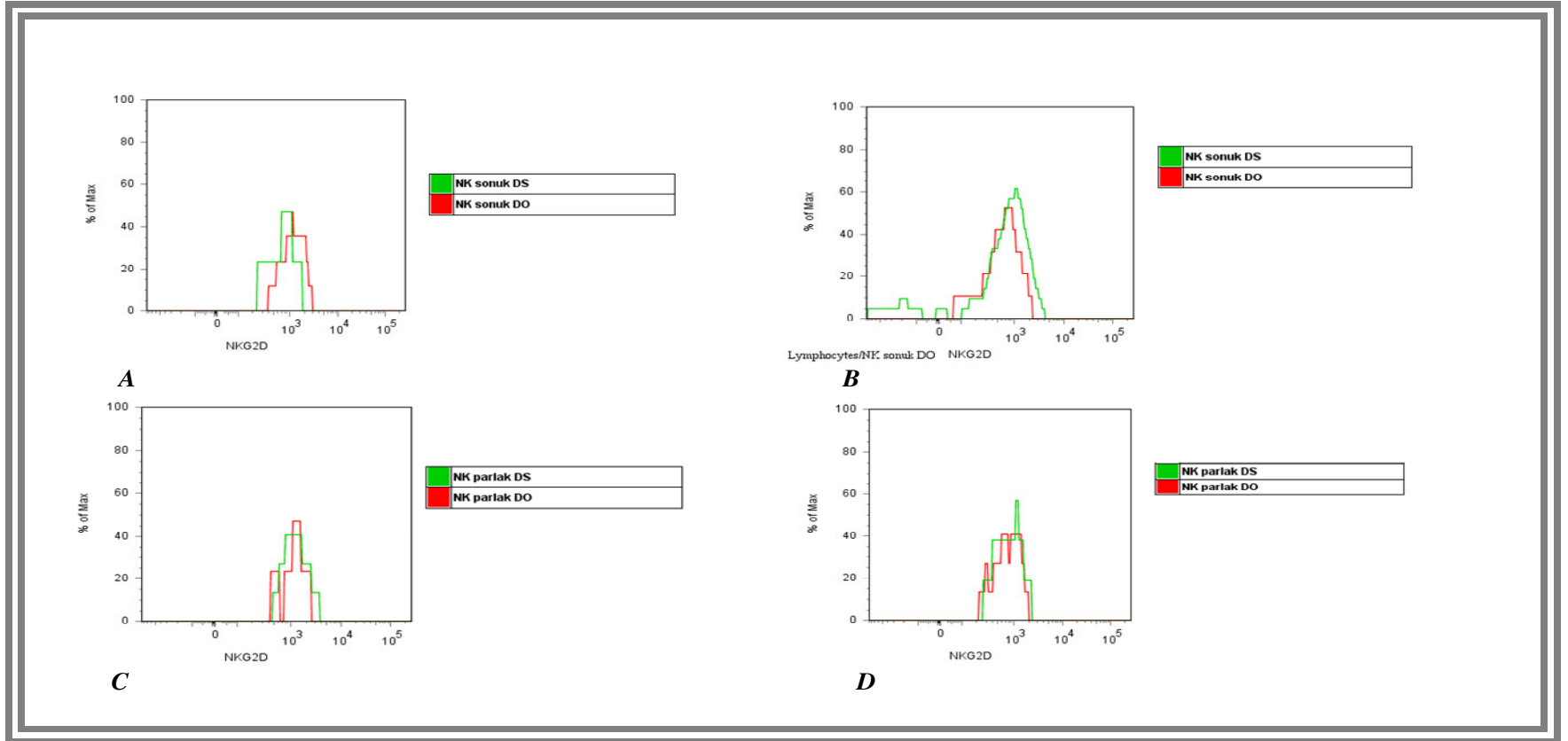
Şekil 4-10.  $\beta$ -talasemi majör hastası (A) ve kontrol (B) örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin CD56<sup>sönük</sup> alt grubunda; C ve D' de ise sırasıyla  $\beta$ -talasemi majör hastası ve kontrol örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin CD56<sup>parlak</sup> alt grubunda; K562 ile uyarılan NK aktivitesi deneyinden (DÖ) ve sonra (DS), NKp30 aktivatör reseptör düzeyi.



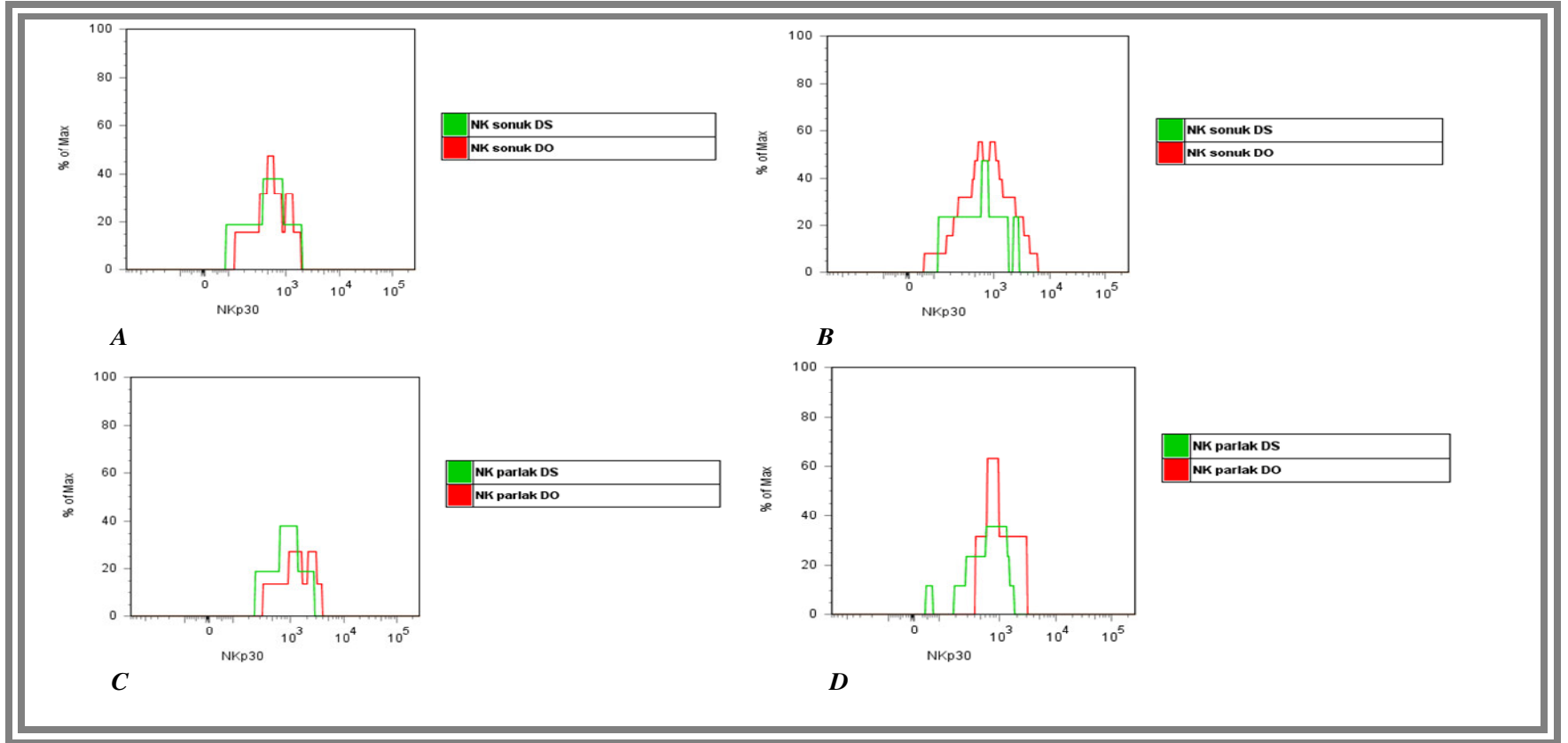
Şekil 4-11. NK hücrelerinin CD56<sup>sönük</sup> alt grubunda; C ve D' de ise sırasıyla  $\beta$ -talasemi majör hastası ve kontrol örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin CD56<sup>parlak</sup> alt grubunda; K562 ile uyarılan NK aktivitesi deneyinden (DÖ) ve sonra (DS) NKp44 aktivatör reseptör düzeyi.



Şekil 4-12.  $\beta$ -talasemi majör hastası (A) ve kontrol (B) örneğinde mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin CD56<sup>sönük</sup> alt grubunda; C ve D' de ise sırasıyla  $\beta$ -talasemi majör hastası ve kontrol örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin CD56<sup>parlak</sup> alt grubunda; K562 ile uyarılan NK aktivitesi deneyinden (DÖ) ve sonra (DS) CD16 aktivatör reseptör düzeyi.

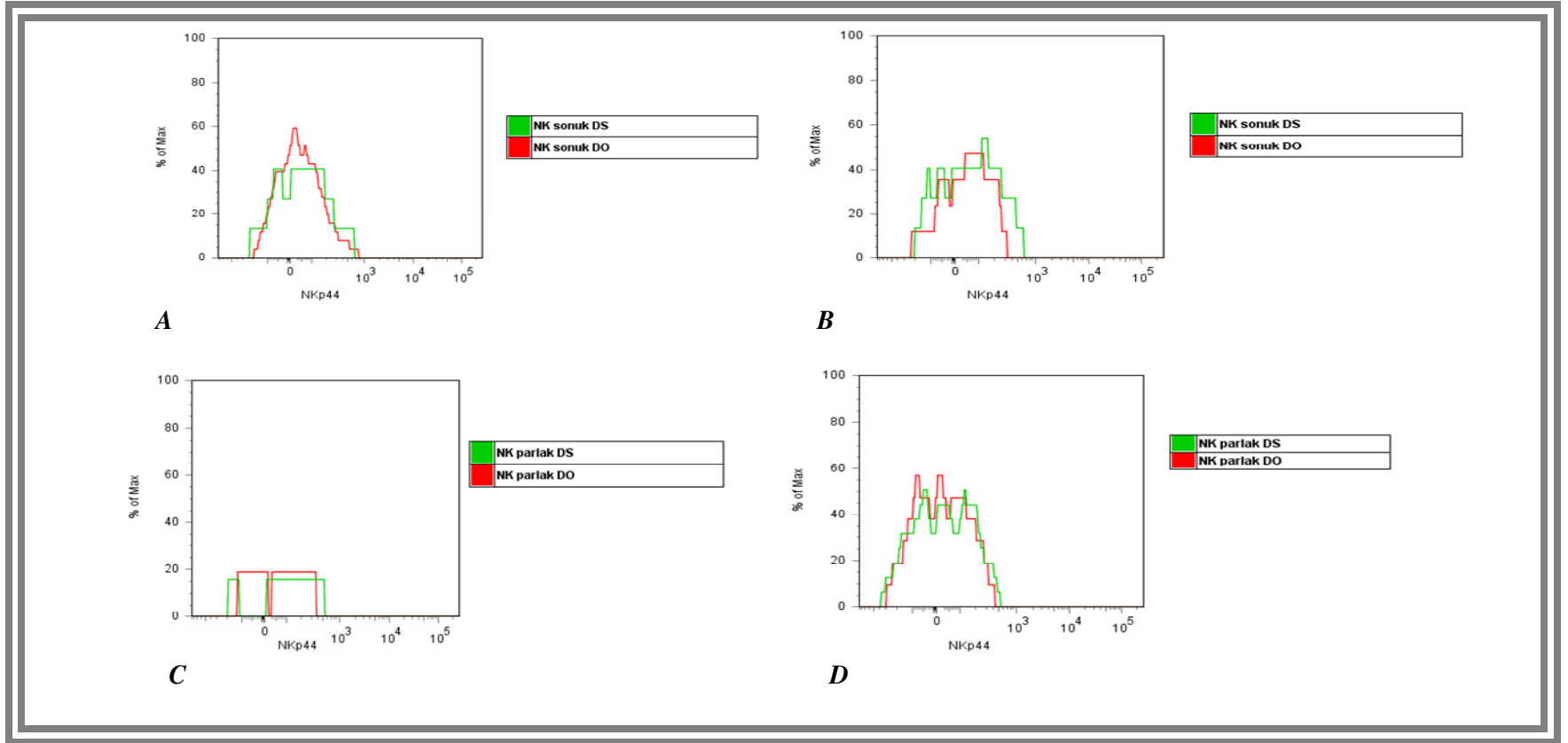


Şekil 4-13.  $\beta$ -talassemi majör hastası (A) ve kontrol (B) örneğinde mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin CD56<sup>sönük</sup> alt grubunda; C ve D' de ise sırasıyla  $\beta$ -talassemi majör hastası ve kontrol örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin CD56<sup>parlak</sup> alt grubunda; K562 ile uyarılan NK aktivitesi deneyinden (DÖ) ve sonra (DS) NKG2D aktivatör reseptör düzeyi.

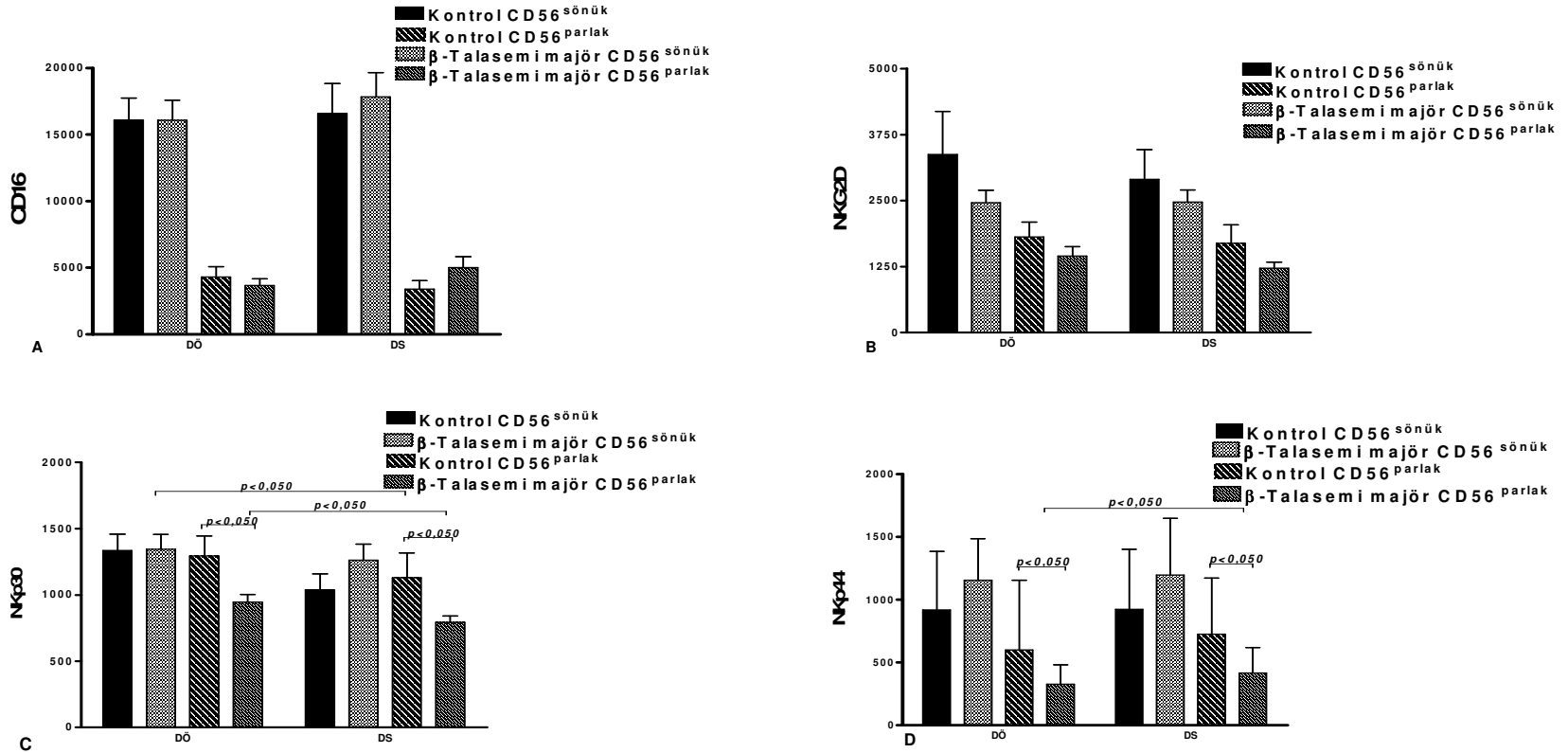


Şekil 4-14.  $\beta$ -talasemi majör hastası (A) ve kontrol (B) örneğinde mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin  $CD56^{\text{sönük}}$  alt grubunda; C ve D' de ise sırasıyla  $\beta$ -talasemi majör hastası ve kontrol örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin  $CD56^{\text{parlak}}$  alt grubunda; K562 ile uyarılan NK aktivitesi deneyinden (DÖ) ve sonra (DS) NKp30 aktivatör reseptör düzeyi.

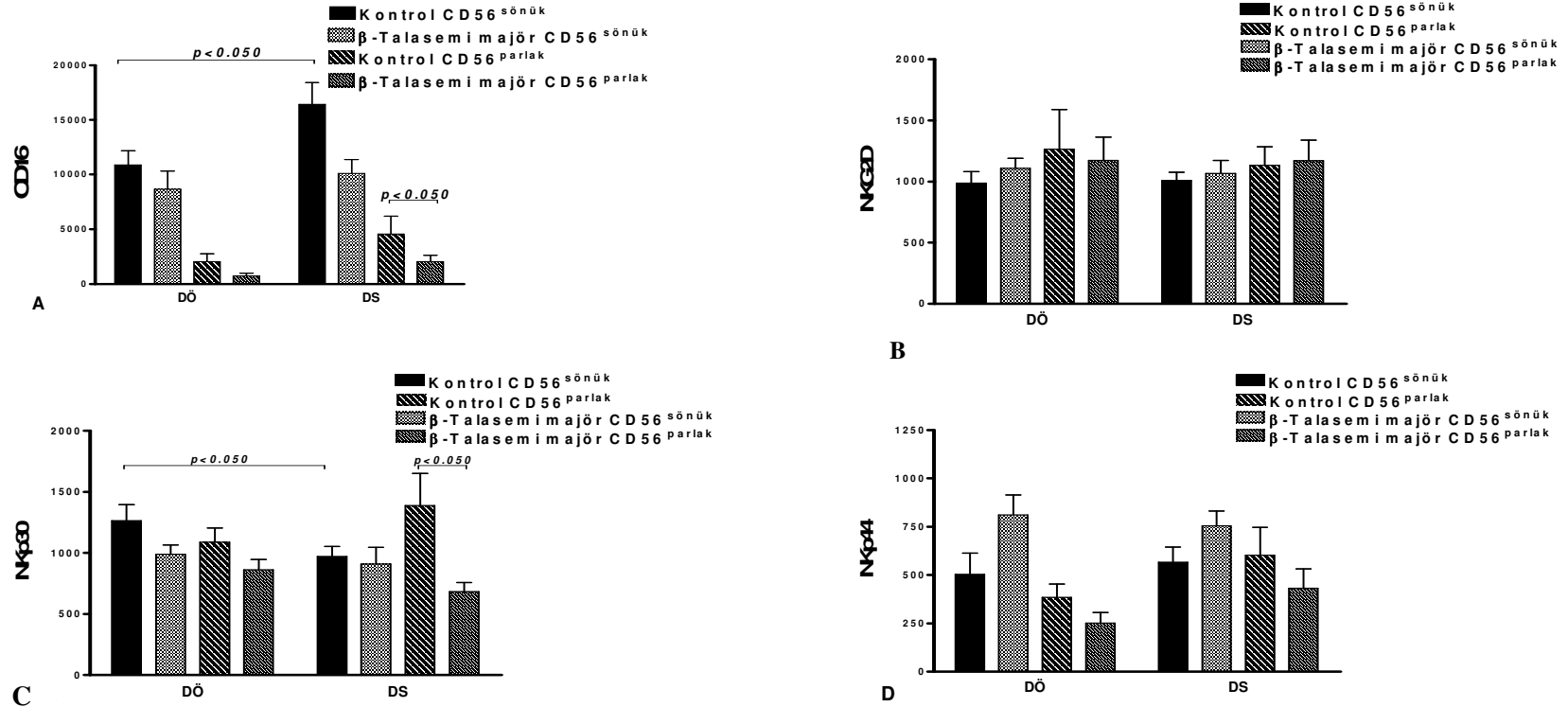




Şekil 4-15.  $\beta$ -talassemi majör hastası (A) ve kontrol (B) örneğinde mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin CD56<sup>sönük</sup> alt grubunda; C ve D' de ise sırasıyla  $\beta$ -talassemi majör hastası ve kontrol örneğinde izole edilmiş NK hücrelerinin CD56<sup>parlak</sup> alt grubunda; K562 ile uyarılan NK aktivitesi deneyinden (DÖ) ve sonra (DS) NKp44 aktivatör reseptör düzeyi.



Şekil 4-16. β-talasemi majörlü hastaların ve kontrollerin izole edilmiş NK hücrelerinin CD56<sup>sönük</sup> ve CD56<sup>parlak</sup> alt gruplarında deneyden önce (DÖ) ve sonar (DS) CD16 (A), NKG2D (B), NKp30 (C) ve NKp44 (D) aktivator reseptör düzeylerinin ortalamaları ve standart hataları.



Şekil 4-17. β-talasemi majörlü hastaların ve kontrollerin mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerin in CD56<sup>sönük</sup> ve CD56<sup>parlak</sup> alt gruplarında deneyden önce (DÖ) ve sonar (DS) CD16 (A), NKG2D (B), NKp30 (C) ve NKp44 (D) aktivator reseptör düzeylerinin ortalamaları ve standart hataları.

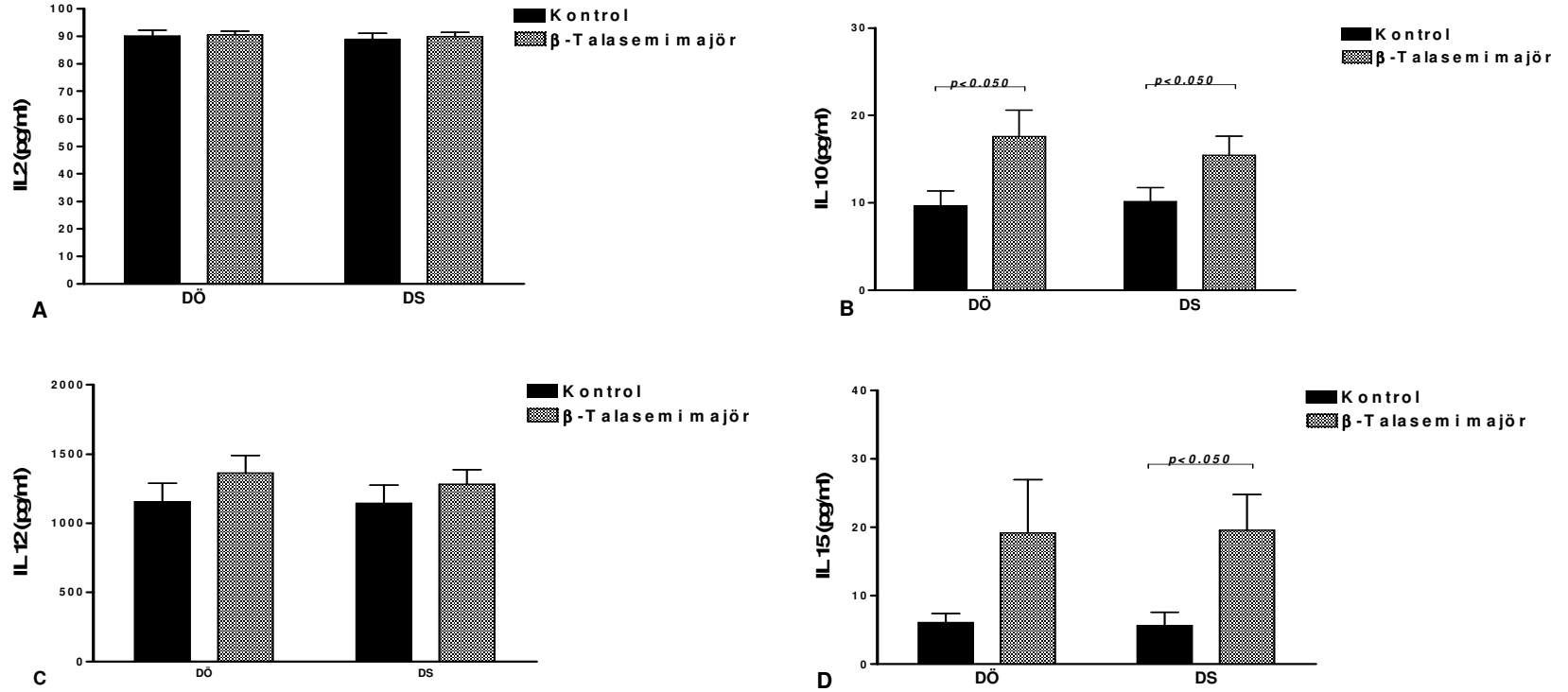
### 4.3. Sitokin Düzeyi

NK hücreleri mononükleer hücreler içindeki NK hücre sitotoksitesi ölçülmeden önce ve sonra toplanan süpernatantlarda,  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda ve kontrollerde IL2, IL10, IL12, IL15, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1 sitokinlerinin düzeyleri ölçüldü. Mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin deneyden önce ve sonra sitokin düzeylerinin ortalaması  $\pm$  standart sapması ve anlamlılıkları Tablo 4-5' te gösterilmiştir. IL2, IL12, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  sitokinlerinin düzeyinde; NK sitotoksitesi deneyinin öncesi ve sonrası hem kontrollerde hem de  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda anlamlı bir farklılık bulunmadı. Her iki grubunun deney öncesi ve sonrası sonuçları birbirleriyle karşılaştırıldığında da anlamlı bir sonuç yoktu (Şekil 4-18 ve 4-19).

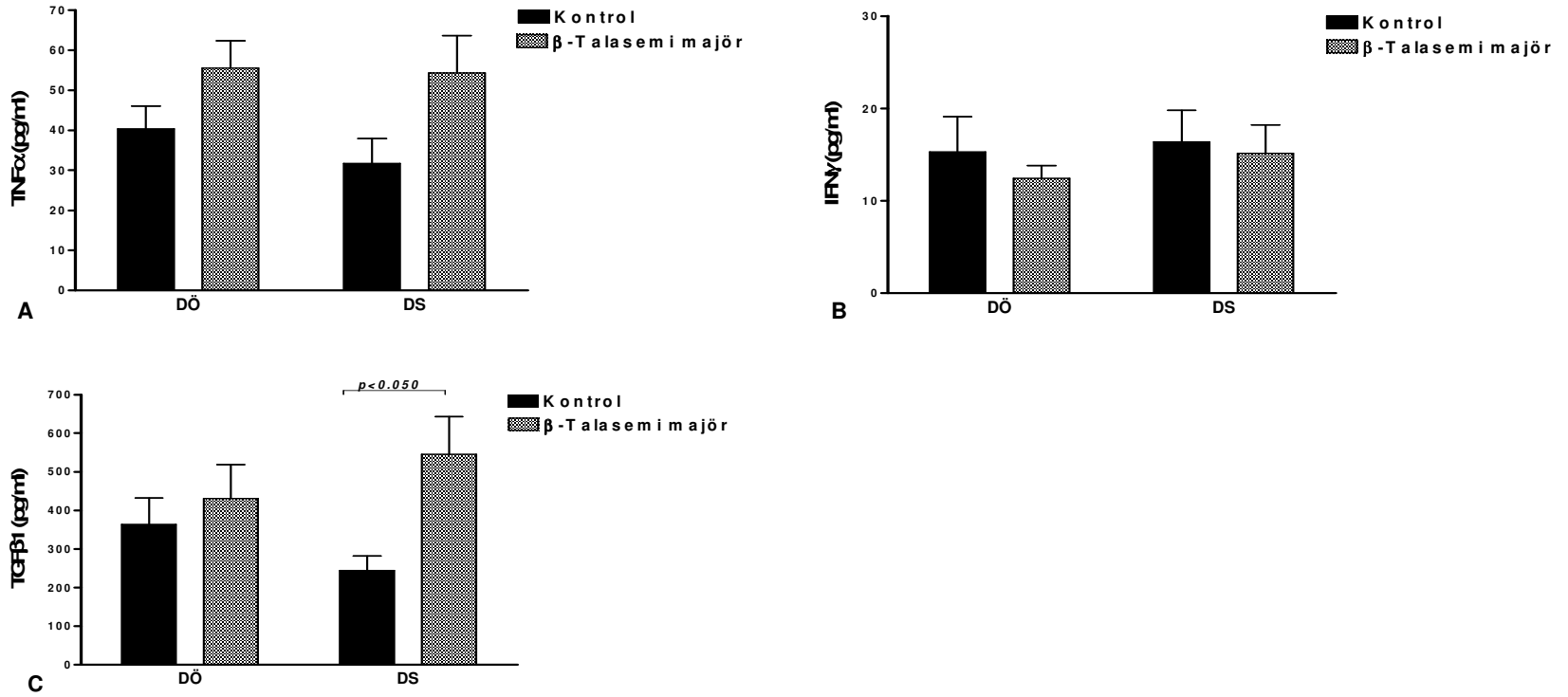
$\beta$ -talasemi majörlü hastalarda IL10; hem deney öncesi ( $p<0.050$ ) hem de deney sonrası ( $p<0.050$ ) kontrollere göre anlamlı olarak daha yüksek bulunurken, IL15 ( $p<0.050$ ) ve TGF- $\beta$ 1 ( $p<0.025$ ) ise deneyden sonra kontrollerden anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulundu (Şekil 4-18 ve 4-19).

**Tablo 4-5.**  $\beta$ -talasemi majörlü hastaların ve kontrollerin mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin, NK sitotoksitesi deneyinden önce ve sonra süpernatant sitokin düzeyleri arasında anlamlı farklılık bulunanlar gösterilmiştir. Hastalar ve kontroller karşılaştırılırken Independent samples t test kullanılmıştır. Hastaların ve kontrollerin kendi içinde deneyden önce ve sonraki sitokin düzeyleri farklılığına ise paired samples t test ile bakılmıştır ve her iki test için p değeri  $<0.050$  olanlar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

<i>Sitokinler</i>		<i>Sitokin Düzeyi (pg/ml)</i>		<i>Talasemi- Kontrol</i>
		<i>Kontrol</i>	<i><math>\beta</math>-Talasemi majör</i>	<i>Anlamlılık (p&lt;0.050)</i>
<b>IL10</b>	<i>Deneyden</i>	9.66±7.12	17.60±15.63	<b>0.047</b>
	<i>Önce</i>			
	<i>Deneyden</i>	10.15±6.72	15.45±11.30	<b>0.048</b>
	<i>Sonra</i>			
	<i>Anlamlılık (p&lt;0.050)</i>	>0.050	>0.050	
<b>IL15</b>	<i>Deneyden</i>	6.08±5.65	19.17±40.35	>0.050
	<i>Önce</i>			
	<i>Deneyden</i>	5.65±8.14	19.54±27.31	<b>0.045</b>
	<i>Sonra</i>			
	<i>Anlamlılık (p&lt;0.050)</i>	>0.050	>0.050	
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	<i>Deneyden</i>	363.50±290.66	430.63±456.17	>0.050
	<i>Önce</i>			
	<i>Deneyden</i>	243.51±160.79	545.17±508.37	<b>0.021</b>
	<i>Sonra</i>			
	<i>Anlamlılık (p&lt;0.050)</i>	>0.050	>0.050	



**Şekil 4-18.** β-talasemi majörlü hastaların ve kontrollerin mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin, NK sitotoksitesi deneyinden önce ve sonra süpernatantta sırasıyla IL2 (A), IL10 (B), IL12 (C) ve IL15 (D) düzeyleri. IL10 ve IL15 sitokinlerinde anlamlı farklılık bulunmuştur. Talasemi hastalarında deneyden önce yalnız IL10, deneyden sonra ise hem IL10 hem de IL15 düzeyi kontrollere göre daha yüksek bulunmuştur.



**Şekil 4-19.** β-talasemi majörlü hastaların ve kontrollerin mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinin, NK sitotoksitesi deneyinden önce ve sonra süpernatantta sırasıyla TNFα (A), IFNγ (B) ve TGF-β1 (C) düzeyleri. TGF-β1 sitokin düzeyi Talasemi hastalarında deneyden sonra kontrollere göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.

## 5. TARTIŞMA

$\beta$ -talasemi majörlü hastalarda, kalp yetmezliği ve enfeksiyonlar mortalitenin ana nedenleridir. Enfeksiyonlar, hastaların yaklaşık %12-46'sının ölüme yol açmaktadır (39, 156). Dolayısıyla bu hastalarda enfeksiyonlara olan hassasiyetin artması, immun yetmezliğin önemli bir göstergesidir. Eritrositler, immun sistem homeostazında önemli rol oynarlar. Eritrositlerde bulunan NK aktivitesini arttırıcı faktör, NK hücrelerinin optimal şartlarda aktivite gösterebilmesi için önemli bir immun sistem elemanıdır. Ayrıca eritrositlerde bulunan antioksidan enzimler, oksidatif stresle ve kalp yetmezliği başta olmak üzere organ yetmezliği ile mücadelede temel savunma mekanizmalarındandır.  $\beta$ -talasemi majörlü hastalar, kalıtsal olarak doğdukları ilk yıldan itibaren fetal hemoglobinin baskınlığının azalması ile bu önemli savunma mekanizmasından mahrum kalırlar (129, 167). Yapılan kan transfüzyonları etkin bir tedavi yöntemi olmasına rağmen sekonder bozukluklara yol açmaktadır (85, 99, 166).

Düzenli kan transfüzyonları ve etkin olmayan eritropoez,  $\beta$ -talasemi majör hastalarında demir yığılımına neden olur. Demirin indirgeyici özelliği yüzünden proteine bağlı olmayan demirlerin oluşturduğu demir yığılımı toksik oksijen radikallerinin üretimine yol açar. Bu oksijen radikalleri protein hasarına, hücre membranındaki ve lizozom, mitokondri gibi diğer organellerdeki lipidlerin peroksidasyonuna aracılık ederek hücre ölümü ve organ yetmezliğine neden olur (14). Demir yığılımı; monosit ve makrofajlar tarafından antikor aracılı fagositozun azalmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda T lenfosit alt gruplarında değişikliğe yol açar. Ayrıca kompleman sistemin klasik ve alternatif yolağının baskılanmasıyla da ilişkilidir (153).

İmmun sistem elemanlarının homeostazı etkin bir şekilde fonksiyon görebilmeleri için önemlidir. İmmun sistemde her bir elemanın fonksiyonu, bir diğer elemanın aktivitesini arttırıcı ya da azaltıcı yönde etkileyebilmektedir. Çünkü hücresel elemanların düşük aktivite göstermesi enfeksiyonlara ve kansere yol açabildiği gibi yüksek aktivitesi de otoimmun hastalıklara neden olabilmektedir. Her elemanın aktivitesi belirli bir düzeyden sonra çevresel faktörler tarafından sınırlandırılır. Dolayısıyla immun sistem hücrelerinin bir ya da daha fazla elemanında meydana gelen



bozukluk veya dengesizlik, tüm immün sistemin işleyişinde önemli modifikasyonlara yol açmaktadır.

$\beta$ -talasemi majörlü hastalarda anlamlı olarak NK aktivitesinin, sağlıklı kişilere göre daha düşük olduğu bulunmuştur (2, 7, 80). Ancak bu aktivite düşüklüğünün altında yatan temel mekanizma halen açık değildir. Yaptığımız bu çalışmada NK hücrelerindeki düşük sitotoksitenin nedenlerini araştırdık. Düşük sitotoksitenin, NK fonksiyonunun zayıflamasından mı kaynaklandığı ya da çevresel faktörlerinin bunu ne kadar etkilediğini anlamak amacıyla NK hücrelerini izole durumdayken ve mononükleer hücreler arasındayken sitotoksitesini ölçtük. Her iki durumda da NK aktivitesinin  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda, kontrollere göre anlamlı olarak daha düşük olduğunu bulduk. Bugüne kadar  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda yapılan NK aktivitesi araştırmalarında sadece mononükleer hücreler arasındayken sitotoksiteye bakılmış, böyle bir karşılaştırma yapılmamıştır.

Çalışmamızda, NK hücrelerinin sitotoksitesinden sorumlu olan CD16, NKG2D, NKp30 ve NKp44 aktivatör reseptörlerinin hem izole NK hücrelerinde hem de mononükleer hücreler arasındayken NK hücrelerinde düzeyini araştırdık ve NK hücreleri K562 eritrolösemi hücreleriyle uyarıldıktan sonra aktivatör reseptörlerdeki değişikliği inceledik. Talasemi hastalarında bugüne kadar reseptör düzeyinde NK hücrelerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

İzole edilmiş NK hücrelerinin alt gruplarının CD16 ve NKG2D aktivatör reseptörlerine bakıldığında NK sitotoksitesi deneyinin öncesinde ve sonrasında hem kontrollerde hem de  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Her iki grubunun deney öncesi ve sonrası sonuçları birbirleriyle karşılaştırıldığında da anlamlı bir fark görülmemiştir. Mononükleer hücreler arasındayken NK hücrelerinin, K562 hücreleri ile uyarılmadan önce ve sonra aktivatör reseptör düzeyine bakıldığında; kontrol grubunda CD16 reseptörü, CD56<sup>sönük</sup> populasyonunda deneyden sonra anlamlı olarak ( $p<0.001$ ) artarken  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda ise tersine CD56<sup>parlak</sup> populasyonunda deneyden sonra daha az oranda ama yine anlamlı ( $p<0.050$ ) olarak artmıştır. Deneyden sonra CD56<sup>sönük</sup> populasyonunda CD16 reseptöründeki artış, kontrol ve  $\beta$ -talasemi grubu karşılaştırıldığında, kontrollerdeki artışın anlamlı olarak

( $p < 0.010$ ) daha yüksek olduğu bulunmuştur. CD16 aktivatör reseptörü antikora bağımlı hücrel sitotoksistide görev alır. NK hücrelerinin adaptif bağışıklıktaki fonksiyonunda önemlidirler. Dolayısıyla CD16 reseptörünün uyarılmasında monositler gibi diğer immün sistem hücrelerinin rolü vardır. İzole durumdayken anlamlı bir fark görülmezken mononükleer hücreler arasındayken reseptör düzeyinde artış görülmektedir.

CD56<sup>sönük</sup> NK alt grubu, NK hücrelerinde sitotoksisteden sorumludur. Dolayısıyla bu alt grupta aktivatör reseptörler CD56<sup>parlak</sup> NK alt grubuna göre daha yüksek düzeyde eksprese edilmektedirler. CD56<sup>parlak</sup> NK alt grubu ise T lenfositlerine antijen sunan dendritik hücrelerin kontrolünden sorumludur. Bu nedenle otoimmün hastalıklar için önemlidirler (**72, 106, 154, 165**). Ayrıca NK hücreleri direkt olarak T lenfositlerini düzenleme özelliğine sahiptirler (**112**). Dolayısıyla  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda; sürekli antijenik uyarı T lenfositlerinde fonksiyon bozukluğu ve dengesizliğe yol açarak NK hücrelerini baskılaması ya da diğer yandan NK hücrelerindeki aktivite yetersizliğinin T lenfositlerinin düzenlenmesini etkilemesi iki önemli olasılıktır.

NKG2D aktivatör reseptörü hem izole NK hücrelerinde hem de mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinde, sitotoksistite deneyinin öncesi ve sonrası kontrollerde ve  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Her iki grubunun deney öncesi ve sonrası sonuçları birbirleriyle karşılaştırıldığında da anlamlı bir fark yoktu.

NKp30 aktivatör reseptörü, izole edilmiş NK hücrelerinde, kontrollerde CD56<sup>sönük</sup> NK alt grubunda deneyden sonra anlamlı olarak ( $p < 0.001$ ) azaldığı bulundu.  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarında hem CD56<sup>sönük</sup> ( $p < 0.050$ ) hem de CD56<sup>parlak</sup> ( $p < 0.010$ ) NK alt grubunda anlamlı olarak azaldı. İki grup birbirleriyle karşılaştırıldığında; kontrollerin CD56<sup>parlak</sup> NK alt grubunun NKp30 düzeyinin deneyden önce ( $p < 0,020$ ) ve sonra ( $p < 0.050$ )  $\beta$ -talasemi majörlü hastalardan anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulundu. Mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinde ise, kontrollerde CD56<sup>sönük</sup> NK alt grubunda deneyden sonra anlamlı olarak ( $p < 0.001$ ) azaldığı bulundu.  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarında hem CD56<sup>sönük</sup> hem de CD56<sup>parlak</sup> NK alt grubunda anlamlı değişiklik olmadı. İki grup birbirleriyle karşılaştırıldığında; kontrollerin CD56<sup>parlak</sup> NK

alt grubunun NKp30 düzeyinin deneyden sonra  $\beta$ -talasemi majörlü hastalardan anlamlı olarak ( $p<0.005$ ) daha yüksek olduğu bulundu.

Kontrollerin izole NK hücrelerinde NKp30 düzeyi daha yüksek olduğu halde,  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda düşük olması, sadece çevresel faktörlerin etkili olmadığını aynı zamanda NK hücrelerinin kendisinde de bir defekt olabileceğini işaret etmektedir. Mononükleer hücreler içinde NK aktivitesi ise sadece CD56<sup>parlak</sup> NK alt grubu kontrollerde daha yüksek bulunmuştur. NKp30 aktivatör reseptörü, CD56<sup>parlak</sup> NK alt grubunun fonksiyonunda çok önemlidir. NK hücreleri, dendritik hücreleri kontrol ederken, fonksiyonel olarak bozuk dendritik hücrelerini NKp30 reseptörüyle öldürmektedir (**15, 24, 66, 91, 110**). Bu reseptörün daha düşük düzeyde eksprese edilmesi antijenik uyarıya karşı T lenfositlerinin etkin cevap verememesinde önemli rol oynuyor olabilir. NK hücreleri K562 hücreleriyle uyarıldıktan sonra NKp30 düzeyinin azalması, aktive olmuş reseptörün aktivasyonundan sonra downregüle olmasından kaynaklanıyor olabilir.

NKp44 aktivatör reseptörü, izole olmuş NK hücrelerinde  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarının CD56<sup>parlak</sup> NK alt grubunda deneyden sonra anlamlı olarak ( $p<0,005$ ) arttı. Kontrollerin CD56<sup>parlak</sup> NK alt grubunun NKp44 düzeyinin deneyden önce ( $p<0.025$ ) ve sonra ( $p<0.005$ )  $\beta$ -talasemi majörlü hastalardan anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulundu. Mononükleer hücreler arasındaki NK hücrelerinde ise NK sitotoksitesite deneyinden önce ve sonra hem kontrollerde hem de  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Her iki grubunun deney öncesi ve sonrası sonuçları birbirleriyle karşılaştırıldığında da anlamlı bir sonuç yoktu.

İzole durumdayken NK hücrelerinde NKp44 reseptörü hücrelerinde  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarının CD56<sup>parlak</sup> NK alt grubunda deneyden sonra anlamlı olarak artmasına rağmen kontrollerden anlamlı olarak daha düşük olduğu bulunmuştur. K562 ile NK hücrelerinin uyarılmasında NKp44 reseptörü NKp30 reseptörüne göre daha az etkin rol oynuyor olabilir.

NK aktivitesi deneyinin sonunda; K562 ile uyarılmamış mononükleer hücrelerin ve K562 ile uyarılmış mononükleer hücrelerin süpernatantları, sitokin ölçümü için alınmıştır.  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda ve kontrollerde NK hücreleri mononükleer hücreler arasındayken K562 hücrelerine gösterdiği sitotoksite deneyinden önce ve sonra IL2, IL10, IL12, IL15, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1 sitokinlerinin düzeyleri ölçüldü. IL2, IL12, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  sitokinlerinin düzeyinde; NK sitotoksitesi deneyinin öncesi ve sonrası hem kontrollerde hem de  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda anlamlı bir farklılık bulunmadı. Her iki grubunun deney öncesi ve sonrası sonuçları birbirleriyle karşılaştırıldığında da anlamlı bir sonuç yoktu.

IFN $\alpha$ , kronik hepatit C' li talasemi hastalarının tedavisi için kullanılmaktadır. Ancak bu tedavi yönteminin; hastaların yaşam kalitesini negatif yönde etkilediği şeklinde yan etkileri olduğu belirtilmektedir. IFN alımından 20 saat sonra tedaviye cevap vermeyen hastalarda CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin arttığı, cevap verenlerde ise azaldığı bulunmuştur. CD8<sup>+</sup> T lenfositleri ve NK hücrelerinin ise hem tedaviye cevap veren hem de cevap vermeyen hastalarda azaldığı bulunmuştur (123). Başka bir çalışmada ise; kronik hepatit C'li talasemi hastaları 12 ay IFN $\alpha$  tedavisi gördükten sonra, hem tedaviye cevap veren hem de cevap vermeyen hastalarda NK aktivitesinin arttığı bulunmuştur. Ayrıca in vitro olarak NK hücreleri IFN $\alpha$  ile inkübe edildiklerinde yine NK aktivitesinin anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. Tedaviye cevap veren hastalarda CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> lenfositlerin anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (87). Wanachiwanawin ve arkadaşları yaptıkları çalışmada,  $\beta$ -talasemi majör hastalarının %33'ünde; IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  ve IL1 $\alpha$ 'nın arttığı göstermiştir (155).  $\beta$ -talasemi majör hastalarında yapılan bir çalışmada, IL2 ve IL10 düzeyinin kontrollere göre farklı olmadığı bulunmuştur (99). Ancak farklı bir çalışmada, IL2 ve IL6' nın bütün hastalarda normal düzeyin altında olduğu gösterilmiştir (155).

Bu çalışmalar serumda bakılmıştır ve serumda birçok faktör sitokin üretiminin düzenlenmesine katılmaktadır. Yaptığımız çalışmada NK hücrelerinin spesifik bir fonksiyonunu inceledik. Yani NK hücrelerini, K562 eritrolösemi hücreleriyle uyardıktan sonra in vitro şartlarda sadece bu uyarıya karşı cevabı araştırdık.

$\beta$ -talasemi majörlü hastalarda IL10; hem deney öncesi ( $p<0.050$ ) hem de deney sonrası ( $p<0.050$ ) kontrollere göre anlamlı olarak daha yüksek bulunurken, IL15 ( $p<0.050$ ) ve TGF- $\beta$ 1 ( $p<0.025$ ) ise sadece deneyden sonra kontrollerden anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulundu.

Çeşitli çalışmalarda  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda serum sitokin düzeylerine bakılmış ama NK hücrelerinin kanser hücresiyle stimülasyonundan sonra sitokin düzeyindeki değişiklikler incelenmemiştir. NK hücrelerinin diğer fonksiyonlarından bağımsız olarak spesifik bir şekilde tek bir fonksiyonunun incelenebilmesi önemlidir. Serumda bakılan sitokin düzeyinde birçok fizyolojik sistem sitokin düzeyini etkiler. İn vitro şartlarda ise spesifik olarak kanser hücresinin uyarısına karşı hücrelerin verdiği maksimum cevap görülebilmektedir.

TGF- $\beta$ 1 ve IL10' nun fonksiyonu inflamasyonu baskılamaktır ve immun toleransın indüksiyonu için önemlidirler. TGF- $\beta$  ve IL10, otoreaktif lenfositlerin aktivasyonunu ve yayılmasını engeller. IL10; IL12' nin, TNF $\alpha$ ' nın, ko-stimülatör moleküllerin ve antijen sunan hücrelerin MHC sınıf II molekül ekspresyonunu inhibe eder. Antijen sunan hücreler tarafından IL10 salgılanır ve T hücrelerinin farklılaşmasına neden olabilir. Naif T lenfositlerinin proliferasyonunu inhibe edebilir (63).  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda kan transfüzyonlarından dolayı sürekli antijenik uyarı, inflamasyonu baskılayan sitokinlerin daha fazla üretilmesine neden oluyor olabilir. Bu hastalarda T ve B lenfositlerindeki fonksiyon bozukluğu nedeniyle fazla IL10 üretmeleri ya da IL10'un homeostazında görevli olan çevresel faktörlerdeki bozukluk nedeniyle baskılanamaması da bu artışa yol açabilir.

TGF- $\beta$ 1, güçlü bir immun baskılayıcı etkiye sahiptir. T, B ve NK hücrelerini inhibe eder. Bu nedenle bazı kanserleşmiş hücrelerin gelişimi ya da bağışıklık sisteminden kaçışı için kritik rol oynar. Ayrıca tümör hücreleri tarafından sekrete edilir ve tümör mikroçevresinde parakrin etki tümör proliferasyonunu uyarır (64, 68). Bu sitokin hem immun sistem hücreleri tarafından homeostaz için hem de kanser hücreleri tarafından immun sistemden kaçış için üretilmektedir.  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda deneyden sonra kontrollere göre daha yüksek bulunması artan TGF- $\beta$ 1 düzeyinin

baskılanamadığını göstermektedir. İmmun sistem hücreleri tarafından daha fazla üretildiği de bir diğer olasılıktır.

$\beta$ -talasemi majörlü hastalarda TGF- $\beta$ 1 düzeyi kontrollerden daha düşük çıktığı bulunmuştur (134). Ancak farklı bir çalışmada, Salsaa ve arkadaşları IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  ve TGF- $\beta$ 'nin serumda görülmediği ancak mononükleer hücrelerle stimülasyondan sonra kontrol grubundan daha fazla sitokin ürettikleri göstermiştir (126). Bu çalışmanın sonucu, artan TGF- $\beta$ 1 düzeyinin  $\beta$ -talasemi majörlü hastalardaki immün sistem hücreleri tarafından daha fazla üretildiği olasılığını desteklemektedir. Bir diğer çalışmada ise splenektomili hastalarda TGF- $\beta$ 'nin kontrollere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (99).

IL15' in NK hücreleri üzerinde düzenleyici mekanizmaları hala açık değildir (171). IL15; IL2 reseptör  $\beta$ ' ya bağlanma özelliğine sahiptir ve T hücre klonlarının proliferasyonuna neden olabilir. IL2 ve IL15' in özellikle doğal bağışıklıkta ayrı rolleri vardır. T hücre aracılı immün cevapta ise zıt fonksiyonları vardır. IL2; T hücre cevabının büyüklüğünü sınırlandırır ve bellek CD8 T hücre canlılığını azaltır. IL15 ise T lenfositlerinde IL2 aracılı aktivasyonun neden olduğu hücre ölümünü engeller ve bellek hücrelerinin üretimini ile canlılığını korur(47). IL15'in IL2 reseptörüne bağlanma özelliği nedeniyle  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda deneyden sonra kontrollere göre daha yüksek olması, NK hücrelerinin IL2 aracılı aktivasyonun neden olduğu hücre ölümünü engellemiş olabilir.

NK sitotoksitesinin hem izole durumda hem de mononükleer hücreler arasındayken  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda kontrollere göre düşük bulunması, NK hücrelerinin aktivitesinde sadece çevresel faktörlerin değil genetik faktörlerin de etkili olabileceğini düşündürmektedir. Kontrollerde NKp30 düzeyi daha yüksek bulunmuştur. Gelecek çalışmalarda NKp30 reseptör polimorfizmi araştırılmalıdır. Mononükleer hücreler NK hücrelerini module etmektedirler ancak  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda bu modülasyonun olmadığı görülmektedir.

Baskılayıcı sitokinler olan IL10 ve TGF- $\beta$ 1 düzeyi de kontrollere göre oldukça artmıştır. TGF- $\beta$ 1 sitokinin düzeyi IL6 tarafından düzenlenmektedir. IL6, TGF- $\beta$ 1' baskılayan sitokindir. Ancak IL10 ise IL6' yı baskılar. Dolayısıyla IL10' un artmasına bağlı olarak TGF- $\beta$ 1 düzeyi artmış olabilir. Çıkan sonuçlar bu hastalarda sitokin düzenlenmesinde bir dengesizlik olduğunu göstermektedir. Hastaların düzenli kan transfüzyonu olması nedeniyle sürekli antijenik uyarıya maruz kalmaktadırlar. T lenfositlerin bu kronik aktivitesini baskılamak amacıyla diğer hücreler daha yüksek düzeyde baskılayıcı sitokin üretecek şekilde düzenlenmiş olabilirler. T lenfositlerini baskılamak amacıyla üretilen bu sitokinler NK gibi diğer immun system hücrelerinin de fonksiyonunun zayıflamasına yol açıyor olabilir.

CD16 aktivatör reseptörü, antikora bağımlı hücrel sitotoksiste için oldukça önemlidir. Kontrollerde mononükleer hücreler arasındaki NK' da deneyden sonar artarken hastalarda değişiklik bulunmamıştır. CD16 reseptörünün düzenlenmesinde monositler rol oynamaktadır. Dolayısıyla,  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda monosit fonksiyonunun zayıfladığı görülmektedir. Demir yığılını monosit fonksiyonunu etkileyen önemli bir unsurdur. Antioksidan tedavisi, monosit fonksiyonunun düzeltilmesi ve bundan etkilenen NK hücrelerinin de aktivitesinin artışı için önemlidir. Ancak antioksidanlar belirli bir dozdan sonra pro-oksidan etki gösterebilmektedirler. Bazı antioksidanları geri dönüştürebilmek için başka antioksidanların kombinasyonları kullanılmak zorundadır. Bu nedenle hastalarda ne dozda ve hangi kombinasyon da antioksidan kullanılması gerektiği halen netleştirilememiş bir sorudur.  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda hangi dozda antioksidan verilmesi ile ilgili daha spesifik araştırmalar yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Baskılayıcı sitokinlerin düzeyinin azaltılması da hücrelerin normal fonksiyonunu görebilmesi için önemlidir. Baskılayıcı sitokin düzeylerini azaltıcı tedavi yöntemlerinin uygulanması da immun sistemin normal fonksiyon görebilmesi için önemlidir.

$\beta$ -talasemi majörlü hastaların yaşam kalitesini arttırabilmek için onların ana mortalite nedenlerinden biri olan enfeksiyon riskini en aza indirilmesi gerekmektedir. Hastalarda demir yığılımı ve Hb gereksinimi klinik olarak kontrol altına alınabilmektedir ancak enfeksiyonlarla mücadele bu hastaların tedavisinde önemli bir sorundur ve bu konuda oldukça sınırlı sayıda araştırma yapılmıştır. Bu sonuçlar, beta-talasemi hastalarının NK aktivitesindeki azalmanın, NK hücrelerinde ve monositlerde fonksiyonel yetersizliklerin ve sitokin üretiminin düzenlenmesindeki bozuklukların bir sonucu olabileceğini düşündürmektedir.



## 6. KAYNAKLAR

1. Abuharfeil N, Sarsour E, Hassuneh M. The effect of sodium nitrite on some parameters of the immune system Food and Chemical. *Toxicology* 2001; **39**: 119-124.
2. Akbar A.N., Fitzgerald-Bocarsly P.A., De Sousa M., Giardina P.J., Hilgartner M.W., Grady R.W. Decreased natural killer activity in thalassemia major: a possible consequence of iron overload. *J Immunol* 1986; **136(5)**: 1635-1640.
3. Akbar AN, Fitzgerald-Bocarsly PA, Giardina PJ, Hilgartner MW, Grady RW. Modulation of the defective natural killer activity seen in thalassaemia major with desferrioxamine and alpha-interferon. *Clin Exp Immunol* 1987; **70(2)**: 345-53.
4. Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, Goldfarb RH, Nagelkerke JF, Nannmark U, Kuppen PJK. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends Immunol* 2003; **24(11)**: 603-609.
5. Arnon TI, Markel G, Bar-Ilan A, Hana J, Fima E, Benchetrit F, Galili R, Cerwenka A, Benharroch D, Sion-Vardy N, Porgador A, Mandelboim O. Harnessing Soluble NK Cell Killer Receptors for the Generation of Novel Cancer Immune Therapy. *PLoS ONE* 2008; **3(5)**: e2150.
6. Arnon TI, Markel G, Mandelboim O. Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors. *Semin Cancer Biol* 2006; **16**: 348–358.
7. Atasever B, Ertan NZ, Erdem-Kuruca S, Karakaş Z. In vitro effects of vitamin C and selenium on NK activity of patients with beta-thalassemia major. *Pediatr Hematol Oncol* 2006; **23(3)**: 187-97.
8. Backström E, Kristensson K, Ljunggreny HG. Activation of Natural Killer Cells: Underlying Molecular Mechanisms Revealed. *Scand J Immunol* 2004; **60**: 14–22.

9. Bassøe CF, Smith I, Sørnes S, Halstensen A, Lehmann AK. Concurrent Measurement of Antigen- and Antibody-Dependent Oxidative Burst and Phagocytosis in Monocytes and Neutrophils. *Methods* 2000; **21**: 203-220.
10. Bellone GM, Aste-Amezaga M, Trinchieri G, Rodeck U. Regulation of NK cell functions by TGF- $\beta$ 1. *J Immunol* 1995; **155**: 1066.
11. Benetatos L, Alymara V, Vassou A, Bourantas KL. Malignancies in  $\beta$ -thalassemia patients: a single-center experience and a concise review of the literature. *Int Jnl Lab Hem* 2008; **30**: 167–172.
12. Beutler E. Iron storage disease: Facts, fiction and progress. *Blood Cells Mol Dis* 2007; **39**: 140–147.
13. Biassoni R, Cantoni C, Pende D, Sivori S, Parolini S, Vitale M, Bottino C, Moretta A. Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev* 2001; **181**: 203–214.
14. Birgens H, Ljung R. The Thalassaemia Syndromes. *Scand J Clin Lab Invest* 2007; **67**: 11–26.
15. Bloushtain N, Qimron U, Bar-Ilan A, HersHKovitz O, Gazit R, Fima E, Korc M, Vlodaysky I, Bovin NV, Porgador A. Membrane-Associated Heparan Sulfate Proteoglycans Are Involved in the Recognition of Cellular Targets by NKp30 and NKp46. *J Immunol* 2004; **173**: 2392–2401.
16. Brombacher F, Kastelein RA, Alber G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends Immunol* 2003; **24**(4): 207-212.
17. Brusko TM, Putnam AL, Bluestone JA. Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol Rev* 2008; **223**: 371–390.
18. Burgess SJ, Maasho K, Masilamani M, Narayanan S, Borrego F, Coligan JE. The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications. *Immunol Res* 2008; **40**: 18–34.

19. Burgess SJ, Marusina AI, Pathmanathan I, Borrego F, Coligan JE. IL-21 Down-Regulates NKG2D/DAP10 Expression on Human NK and CD8<sub>T</sub> Cells. *J Immunol* 2006; **176**: 1490–1497.
20. Byrd A, Hoffmann SC, Jarahian M, Momburg F, Watzl C. Expression Analysis of the Ligands for the Natural Killer Cell Receptors NKp30 and NKp44. *PLoS ONE* 2007; **2(12)**: e1339.
21. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood* 2008; **112**: 461-469.
22. Celis RD, Feria-Velasco A, Bravo-Cuellar A, Hicks-Go´mez JJ, Garc´ıa-Iglesias T, Preciado-Mart´ınez V, Mun˜oz-Islas L, Gonz´alez-Unzaga M. Expression of NK cells activation receptors after occupational exposure to toxics A preliminary study. *Immunol Lett* 2008; **118**: 125–131.
23. Chen X, Trivedi PP, Ge B, Krzewski K, Strominger JL. Many NK cell receptors activate ERK2 and JNK1 to trigger microtubule organizing center and granule polarization and cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104(15)**: 6329–6334.
24. Chisholm SE, Howard K, Go´mez MV, Reyburn HT. Expression of ICP0 Is Sufficient to Trigger Natural Killer Cell Recognition of Herpes Simplex Virus–Infected Cells by Natural Cytotoxicity Receptors. *J Infect Dis* 2007; **195(8)**: 1160-1168.
25. Chisholm SE, Reyburn HT. Recognition of Vaccinia Virus-Infected Cells by Human Natural Killer Cells Depends on Natural Cytotoxicity Receptors. *J Virol* 2006; **80(5)**: 2225–2233.
26. Chiossone L, Vitale C, Cottalasso F, Moretti S, Azzarone B, Moretta L, Mingari MC. Molecular analysis of the methylprednisolone-mediated inhibition of NK-cell function: evidence for different susceptibility of IL-2– versus IL-15–activated NK cells. *Blood* 2007; **109**: 3767-3775.
27. Consolini R, Calleri A, Legitimo A, Massei F. Immunological evaluation of patients with beta-thalassemia major. *Acta Haematol* 2001; **105**: 7-12.

28. Conti P, Kempuraj D , Kandere K , Gioacchino MD, Barbacane RC, Castellani ML, Felaco M, Boucher W, Letourneau R, Theoharides TC. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunol Lett* 2003; **86**: 123-129.
29. Costello RT, Fauriat C, Sivori S, Marcenaro E, Olive D. NK cells: innate immunity against hematological malignancies? *Trends Immunol* 2004; **25(6)**: 328-333.
30. Costello RT, Sivori S, Marcenaro E, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci MJ, Reviron D, Gastaut JA, Pende D, Olive D, Moretta A. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2002; **99**: 3661-3667.
31. Diefenbach A, Raulet DH. Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunol Rev* 2001; **181**: 170–184.
32. Dinarello CA. Interleukin-18. *Methods* 1999; **19**: 121-132.
33. Eagle RA, Trowsdale J. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat Rev Immunol*. 2007; **7(9)**: 737-744.
34. Efremov GD. Dominantly Inherited  $\beta$ -Thalassemia. *Hemoglobin* 2007; **31(2)**: 193–207
35. Efremov GD. Thalassemias and Other Hemoglobinopathies in the Republic of Macedonia. *Hemoglobin* 2007; **31 (1)**: 1–15.
36. Ellermann-Eriksen S. Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. *Virol J* 2005; **2**: 59.
37. Epling-Burnette PK, Painter JS, Chaurasia P, Bai F, Wei S, Djeu JY, Loughran Jr TP. Dysregulated NK receptor expression in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood* 2004; **103**: 3431-3439.
38. Ezer Ü, Gülderen F, Çulha VK, Akgül N, Gürbüz Ö. Immunological status of thalassemia syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002; **19**: 51-58.

39. Farmakis D, Glakoumis A, Polymeropoulos E, Aessopos A. Pathogenetic aspects of immune deficiency associated with  $\beta$  thalassemia. *Med Sci Monit* 2003; **9(1)**: RA19-22.
40. Fauriat C, Just-Landi S, Mallet F, Arnoulet C, Sainty D, Olive D, Costello RT. Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood* 2007; **109**: 323-330.
41. Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL, Goodman K, Morandi B, Muller WA, Moretta A, Mu'nz C. The Abundant NK Cells in Human Secondary Lymphoid Tissues Require Activation to Express Killer Cell Ig-Like Receptors and Become Cytolytic. *J Immunol* 2004; **172**: 1455–1462.
42. Fischer L, Hummel M, Burmeister T, Schwartz S, Thiel E. Skewed expression of natural-killer (NK)-associated antigens on lymphoproliferations of large granular lymphocytes (LGL). *Hematol Oncol* 2006; **24**: 78–85.
43. Forte P, Lilienfeld BG, Baumann BC, Seebach JD. Human NK Cytotoxicity against Porcine Cells Is Triggered by NKp44 and NKG2D. *J Immunol* 2005; **175**: 5463–5470.
44. Fuller CL, Ruthel G, Warfield KL, Swenson DL, Bosio CM, Aman MJ, Bavari S. NKp30-dependent cytolysis of filovirus-infected human dendritic cells. *Cell Microbiol* 2007; **9(4)**: 962–976.
45. Galanello R. Deferiprone in the treatment of transfusiondependent thalassemia: a review and perspective. *Ther Clin Risk Manag* 2007; **3(5)**: 795-805.
46. Gati A, Rocha SD, Guerra N, Escudier B, Moretta A, Chouaib S, Angevin E, Caignard A. Analysis Of The Natural Killer Mediated Immune Response In Metastatic Renal Cell Carcinoma Patients. *Int J Cancer* 2004; **109**: 393–401.
47. Gatza E, Okada CY. Adjuvant IL-15 does not enhance the efficacy of tumor cell lysate-pulsed dendritic cell vaccines for active immunotherapy of T cell lymphoma. *Cancer Immunol Immunother* 2006; **55**: 420–432.

48. Gazit R, Aker M, Elboim M, Achdout H, Katz G, Wolf DG, Katzav S, Mandelboim O. NK cytotoxicity mediated by CD16 but not by NKp30 is functional in Griscelli syndrome. *Blood* 2007; **109**: 4306-4312.
49. Gharagozloo M, Karimi M, Amirghofran Z. Double-faced cell-mediated immunity in  $\beta$ -thalassemia major: stimulated phenotype versus suppressed activity. *Ann Hematol* 2008.
50. Giardina PJ, Hilgartner MW. Update on Thalassemia. *Pediatr Rev* 1992; 13(2): 55-62.
51. Gill N, Ashkar AA. Adaptive immune responses fail to provide protection against genital HSV-2 infection in the absence of IL-15. *Eur J Immunol* 2007; **37**: 2529–2538.
52. Gill N, Rosenthal KL, Ashkar AA. NK and NKT Cell-Independent Contribution of Interleukin-15 to Innate Protection against Mucosal Viral Infection. *J Virol* 2005; **79(7)**: 4470–4478.
53. Giuliani M, Giron-Michel J, Negrini S, Vacca P, Durali D, Caignard A, Bousse-Kerdiles CL, Chouaib S, Devocelle A, Bahri R, Durrbach A, Taoufik Y, Ferini S, Croce M, Mingari MC, Moretta L, Azzarone B. Generation of a Novel Regulatory NK Cell Subset from Peripheral Blood CD34+ Progenitors Promoted by Membrane-Bound IL-15. *PLoS ONE* 2008;**3(5)**:e2241.
54. Golab J. Interleukin 18—Interferon  $\gamma$  Inducing Factor—A Novel Player In Tumour Immunotherapy? *Cytokine* 2000;**12(4)**:332–338.
55. Gomes AQ, Correia DV, Silva-Santos B. Non-classical major histocompatibility complex proteins as determinants of tumour immunosurveillance. *EMBO Rep* 2007; **8**: 1024–1030.
56. Gordeuk VR, Delanghe JR, Langlois MR, Boelaert JR. Iron status and the outcome of HIV infection: an overview. *J Clin Virol* 2001; **20**: 111–115.

57. Groh V, Bruhl A, El-Gabalawy H, Nelson JL, Spies T. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100(16)**: 9452-9457.
58. Grund EM, Spyropoulos DD, Watson DK, Muise-Helmericks RC. Interleukins 2 and 15 Regulate Ets1 Expression via ERK1/2 and MNK1 in Human Natural Killer Cells. *J Biol Chem* 2005; **280(6)**: 4772–4778.
59. Guilloton F, Thonel A, Jean C, Demur C, Mansat-De Mas V, Laurent G, Quillet-Mary A. TNF $\alpha$  stimulates NKG2D-mediated lytic activity of acute myeloid leukemic cells. *Leukemia* 2005; **19**: 2206–2214.
60. Gunturi A, Berg RE, Forman J. Preferential Survival of CD8 T and NK Cells Expressing High Levels of CD94. *J Immunol* 2003; **170**: 1737–1745.
61. Heo DS, Park JG, Hata K, Day R, Herberman RB, Whiteside TL. Evaluation of Tetrazolium-based Semiautomatic Colorimetric Assay for Measurement of Human Antitumor Cytotoxicity. *Cancer Res* 1990; 50: 3681-3690.
62. Hershkovitz O, Jarahian M, Zilka A, Bar-Ilan A, Landau G, Jivov S, Tekoah Y, Glicklis R, Gallagher JT, Hoffmann SC, Zer H, Mandelboim O, Watzl C, Momburg F, Porgador A. Altered glycosylation of recombinant NKp30 hampers binding to heparan sulfate: a lesson for the use of recombinant immunoreceptors as an immunological tool. *Glycobiology* 2008; **18(1)**: 28–41.
63. Hill N, Sarvetnick N. Cytokines: promoters and dampeners of autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2002; **14**: 791–797.
64. Hsiao YW, Liao KW, Chung TF, Liu CH, Hsu CD, Chu RM. Interactions of host IL6 and IFN $\gamma$  and cancer-derived TGF- $\beta$ 1 on MHC molecule expression during tumor spontaneous regression. *Cancer Immunol Immunother* 2008; **57**: 1091–1104.
65. Hsiao YW, Liao KW, Hung SW, Chu RM. Tumor-Infiltrating Lymphocyte Secretion of IL-6 Antagonizes Tumor-Derived TGF- $\beta$ 1 and Restores the Lymphokine-Activated Killing Activity. *J Immunol* 2004; **172**: 1508–1514.

66. Hsieh CL, Nagasaki K, Martinez OM, Krams SM. NKp30 is a functional activation receptor on a subset of rat natural killer cells. *Eur J Immunol* 2006; **36**: 2170–2180.
67. Kaiser P, Rothwell L, Avery S, Balu S. Evolution of the interleukins. *Dev Comp Immunol* 2004; **28**: 375–394.
68. Kim R, Emi M, Tanabe K, Uchida Y, Toge T. The Role of Fas Ligand and Transforming Growth Factor  $\beta$  in Tumor Progression. *Cancer* 2004; **100**: 2281–91.
69. Kojima S, Nagamine Y, Hayano M, Looareesuwan S, Nakanishi K. A potential role of interleukin 18 in severe *falciparum* malaria. *Acta Trop* 2004; **89**: 279–284.
70. Konjević G, Jović V, Jurišić V, Radulović S, Jelić S, Spužić I. IL-2-mediated augmentation of NK-cell activity and activation antigen expression on NK- and T-cell subsets in patients with metastatic melanoma treated with interferon- $\alpha$  and DTIC. *Clin Exp Metastasis* 2003; **20** (7): 1–9.
71. Kontoghiorghes GJ. Iron Mobilization From Transferin And Non-Transferin-Bound-Iron by Deferiprone. Implications in the Treatment of Thalassemia, Anemia of Chronic Disease, Cancer and Other Conditions. *Hemoglobin* 2006; **30**(2): 183–200.
72. Kopcow HD, Allan DSJ, Chen X, Rybalov B, Andzelm MM, Ge B, Strominger JL. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**(43): 15563–15568.
73. Korbel DS, Finney OC, Riley EM. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. *Int J Parasitol* 2004; **34**: 1517–1528.
74. Lambert JM, Lopez EF, Lindsey ML. Macrophage roles following myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2008 In press.
75. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nature Immunol* 2008; **9** (5): 495-502.



76. Lee JC, Lee KM, Kim DW, Heo DS. Elevated TGF- $\beta$ 1 Secretion and Down-Modulation of NKG2D Underlies Impaired NK Cytotoxicity in Cancer Patients. *J Immunol* 2004; **172**: 7335–7340.
77. Lee SJ, Son YO, Kim H, Kim JY, Park SW, Bae JH, Kim HH, Lee EY, Chung BS, Kim SH, Kang JD. Suppressive Effect of a Standardized Mistletoe Extract on the Expression of Activatory NK Receptors and Function of Human NK Cells. *J Clin Immunol* 2007; **27(5)**: 477-485.
78. Leen AM, Heslop HE. Cytotoxic T lymphocytes as immune-therapy in haematological practice. *Br J Haematol* 2008 In press.
79. Lieberman LA, Hunter CA. Regulatory pathways involved in the infection-induced production of IFN- $\gamma$  by NK cells. *Microbes Infect* 2002; **4**: 1531–1538.
80. Li K, Li CK, Wong RPO, Wong A, Shing MMK, Chik KW, Yuen PMP. Transfusion-Related Immunomodulation in Chinese Children with Thalassaemia. *Vox Sang* 1997; **73**: 167–173.
81. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AKL, Flavell RA. Transforming Growth Factor- $\beta$  Regulation of Immune Responses. *Annu Rev Immunol* 2006; **24(4)**: 1–48.
82. Li K, Wong A, Li CK, Shing MMK, Chik KW, Tsang KS, Lai H, Leung TF, Yuen PMP. Granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood stem cells in  $\beta$ -thalassaemia patients: kinetics of mobilization and composition of apheresis product. *Exp Hematol* 1999; **27**: 526–532.
83. Lin SJ, Cheng PJ, Huang YJ, Kuo ML. Evaluation of cytotoxic function and apoptosis in interleukin (IL)-12/IL-15-treated umbilical cord or adult peripheral blood natural killer cells by a propidium-iodide based flow cytometry. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; **15(1)**: 79–85.
84. Liu Q, Gao B. Manipulation of MHC-I/TCR Interaction for Immune Therapy. *Cell Mol Immunol* 2008; **5(3)**: 171-182.

85. Lombardi G, Matera R, Minervini MM, Cascavilla N, D'Arcangelo P, Carotenuto M, Di Giorgio G, Musto P. Serum levels of cytokines and soluble antigens in polytransfused patients with beta-thalassemia major: relationship to immune status. *Haematologica* 1994; **79(5)**: 406-12.
86. Lo'pez-Larrea C, Sua'rez-Alvarez B, Lo'pez-Soto A, Lo'pez-Va'zquez A, Gonzalez S. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol Med* 2008; **14(4)**: 179-189.
87. Malaponte G, Passero E, Leonardi S, Monte V, Lauria C, Mazzarino C, Sciotto A, Russo Mancuso G, Di Gregorio F, Musumeci S. Effect of alpha-interferon on natural killer cell activity and lymphocyte subsets in thalassemia patients with chronic hepatitis C. *Acta Haematol* 1997; **98(2)**: 83-88.
88. Malygin AM, Meri S, Timonen T. Regulation of natural killer cell activity by transforming growth factor- $\beta$  and prostaglandin E2. *Scand J Immunol* 1993; **37**: 71.
89. Marx JJM, Kartikasari AER, Georgiou NA. Can Iron Chelators Influence the Progression of Atherosclerosis? *Hemoglobin* 2008; **32 (1-2)**:123-134.
90. Matsushita N, Aruga A, Kobayashi Y, Tanigawa K, Yamamoto M. Separation Methods of T Cells, Natural Killer, and Dendritic Cells from Peripheral Blood of Cancer Patients using Interleukin-2 and Functional Analysis of Natural Killer Cells after Separation. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2007; **29(1)**: 31-47.
91. Mavoungou E, Held J, Mewono L, Kremsner PG. A Duffy Binding-Like Domain Is Involved in the NKp30-Mediated Recognition of *Plasmodium falciparum*-Parasitized Erythrocytes by Natural Killer Cells. *J Infect Dis* 2007; **195**:1521-1531.
92. Mclean K, Buckanovich RJ. Myeloid cells functioning in tumor vascularization as a novel therapeutic target. *Transl Res* 2008; **151**: 59 - 67.
93. Meier UC, Owen RE, Taylor E, Worth A, Naoumov N, Willberg C, Tang K, Newton P, Pellegrino P, Williams I, Klenerman P, Borrow P. Shared Alterations

- in NK Cell Frequency, Phenotype, and Function in Chronic Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus Infections. *J Virol* 2005; **79(19)**: 12365–12374.
94. Mistry AR, O'Callaghan CA. Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. *Immunology* 2007; **121**: 439–447.
95. Mocellin S, Panelli MC, Wang E, Nagorsen D, Marincola FM. The dual role of IL-10. *Trends Immunol* 2003; **24(1)**: 36-43.
96. Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Cantoni C, Pende D, Mingari MC, Moretta A. Human NK cells and their receptors. *Microbes Infect* 2002; **4**: 1539–1544.
97. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. Activating Receptors And Coreceptors Involved in Human Natural Killer Cell-Mediated Cytolysis. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**: 197–223.
98. Moretta L, Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J* 2004; **23**: 255–259.
99. Moshtaghi-Kashanian GR, Gholamhoseinian A, Hoseinimoghadam A, Rajabalian S. Splenectomy changes the pattern of cytokine production in  $\beta$ -thalassemic patients. *Cytokine* 2006; **35**: 253–257.
100. Myoeliwska J, Bryl E, Trzonkowski P, Myoeliwski A. Compensatory effect of TNF $\alpha$  on low natural killer activity in the elderly. *Acta Biochim Pol* 2000; **47(2)**: 301-311.
101. Nagalakshmi ML, Murphy E, McClanahan T, Malefyt RW. Expression patterns of IL-10 ligand and receptor gene families provide leads for biological characterization. *Int Immunopharmacol* 2004; **4**: 577–592.
102. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; **12**: 53–72.

103. Nomura A, Takada H, Jin CH, Tanaka T, Ohga S, Hara T. Functional analyses of cord blood natural killer cells and T cells: a distinctive interleukin-18 response. *Exp Hematol* 2001; **29(10)**: 1169–1176.
104. Oberling F. Monocyte/Macrophages as Effector Cells in Cancer Immunotherapy. *Transhas Sci* 1997; **18(2)**: 243-250.
105. Ogbomo H, Michaelis M, Kreuter J, Doerr HW, Cinatl Jr J. Histone deacetylase inhibitors suppress natural killer cell cytolytic activity. *FEBS Lett* 2007; **581**: 1317–1322.
106. Orange JS, Ballas ZK. Natural killer cells in human health and disease. *Clin Immunol* 2006; **118**: 1 – 10.
107. Pandey R, DeStephan CM, Madge LA, May MJ, Orange JS. NKp30 Ligation Induces Rapid Activation of the Canonical NF- $\kappa$ B Pathway in NK Cells. *J Immunol* 2007; **179**: 7385–7396.
108. Pierson BA, Gupta K, Hu WS, Miller JS. Human natural killer cell expansion is regulated by thrombospondin-mediated activation of transforming growth factor- $\beta$ 1 and independent accessory cell-derived contact and soluble factors. *Blood* 1996; **87**: 180.
109. Poggi A, Prevosto C, Massaro AM, Negrini S, Urbani S, Pierri I, Saccardi R, Gobbi M, Zocchi MR. Interaction between Human NK Cells and Bone Marrow Stromal Cells Induces NK Cell Triggering: Role of NKp30 and NKG2D Receptors. *J Immunol* 2005; **175 (10)**: 6352–6360.
110. Poggi A, Zocchi MR. Antigen presenting cells and stromal cells trigger human natural killer lymphocytes to autoreactivity: Evidence for the involvement of natural cytotoxicity receptors (NCR) and NKG2D. *Clin Dev Immunol* 2006; **13(2–4)**: 325–336.
111. Poggi A, Zocchi MR. Cyclosporin A regulates human NK cell apoptosis induced by soluble HLA-I or by target cells. *Autoimmun Rev* 2005; **4**: 532–536.

112. Poggi A, Zocchi MR. Human natural killer lymphocytes through the engagement of natural cytotoxicity receptors and NKG2D can trigger self-aggression. *Autoimmun Rev* 2007; **6**: 295–299.
113. Quek L, Thein SL. Molecular therapies in  $\beta$ -thalassaemia. *Br J Haematol* 2006; **136**: 353–365.
114. Radaev S, Sun PD. Structure And Function Of Natural Killer Cell Surface Receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2003; **32**: 93–114.
115. Randolph GJ, Jakubzick C, Qu C. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Curr Opin Immunol* 2008; **20**: 52–60.
116. Raulet DH. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol* 2004; **5 (10)**: 996-1002.
117. Rhoades CJ, Williams MA, Kelsey SM, Newland AC. Monocyte–macrophage system as targets for immunomodulation by intravenous immunoglobulin. *Blood Rev* 2000; **14**: 14–30.
118. Ribeiro-Dias F, Barbuto JAM, Tsujita M, Jancar S. Discrimination between NK and LAK cytotoxic activities of murine spleen cells by MTT assay: differential inhibition by PGE<sub>2</sub> and EDTA. *J Immunol Meth* 2000; 241(1-2): 121-129.
119. Roda-Navarro P, Reyburn HT. Intercellular protein transfer at the NK cell immune synapse: mechanisms and physiological significance. *FASEB J* 2007; **21**: 1636–1646.
120. Rodella L, Zamai L, Rezzani R, Artico M, Peri G, Falconi M, Facchini A, Pelusi G, Vitale M. Interleukin 2 and interleukin 15 differentially predispose natural killer cells to apoptosis mediated by endothelial and tumour cells. *Br J Haematol* 2001; **115**: 442-450.
121. Romero-Reyes M, Head C, Cacalano NA, Jewett A. Potent induction of TNF- $\alpha$  during interaction of immune effectors with oral tumors as a potential mechanism for the loss of NK cell viability and function. *Apoptosis* 2007; **12**: 2063–2075.

- 122.** Rook AH, Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Sporn MB, Burlington DB, Lane HC, Fauci AS. Effects of transforming growth factor  $\beta$  on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J Immunol* 1986; **136**:3916.
- 123.** Russo-Mancuso G, Di Gregorio F, Passero E, Sciotto A, Mazzarino MC, Malaponte G, Schilirò G. Efficacy of an analysis of lymphocyte subsets in predicting the clinical response to alpha-interferon therapy in thalassaemia patients with chronic infection by hepatitis C virus: a pilot study. *Br J Haematol* 1995; **89**(2): 291-298.
- 124.** Rutjens E, Mazza S, Biassoni R, Kopman G, Radic L, Fogli M, Costa P, Mingari MC, Moretta L, Heeney J, De Maria A. Differential NKp30 Inducibility in Chimpanzee NK Cells and Conserved NK Cell Phenotype and Function in Long-Term HIV-1-Infected Animals. *J Immuno*, 2007; **178**: 1702–1712.
- 125.** Ryan CJ, Naper C, Hayashi S, Daws MR. Physiologic functions of activating natural killer (NK) complex-encoded receptors on NK cells. *Immunol Rev* 2001; **181**: 126–130.
- 126.** Salsaa B, Zoumbos NC. A distinct pattern of cytokine production from blood mononuclear cells in multitransfused patients with betathalassaemia. *Clin Exp Immunol* 1997; **107**: 589–92.
- 127.** Scapini P, Bazzoni F, Cassatella MA. Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils. *Immunol Lett* 2008; **116**: 1–6.
- 128.** Semino C, Ceccarelli J, Lotti LV, Torrisi MR, Angelini G, Rubartelli A. The maturation potential of NK cell clones toward autologous dendritic cells correlates with HMGB1 secretion. *J Leukoc Biol* 2007; **81**: 92–99.
- 129.** Shau H, Butterfield LH, Chiu R, Kim A. Cloning and sequence analysis of candidate human natural killer-enhancing factor genes. *Immunogenetic*. 1994; **40**(2): 129-134.

130. Smyth MJ, Takeda K, Hayakawa Y, Peschon JJ, van den Brink MRM, Yagita H. Nature's TRAIL— On a Path to Cancer Immunotherapy. *Immunity* 2003; **18**: 1–6.
131. Smyth MJ, Teng MWL, Swann J, Kyparissoudis K, Godfrey DI, Hayakawa Y. CD4<sub>+</sub>CD25<sup>+</sup> T Regulatory Cells Suppress NK Cell-Mediated Immunotherapy of Cancer. *The J Immunol* 2006; **176**: 1582–1587.
132. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell–natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2–induced NK-cell proliferation. *Blood* 2006; **107**: 1484-1490.
133. Spitzer JH, Meadows GG. Modulation of Perforin, Granzyme A, and Granzyme B in Murine Natural Killer (NK), IL2 Stimulated NK, and Lymphokine-Activated Killer Cells by Alcohol Consumption. *Cell Immunol* 1999; **194**: 205–212.
134. Sritippayawan S, Lekhanont P, Harnruthakorn C, Samransamruajkit R, Deerojanawong J, Seksarn P, Poovorawan Y, Prapphal N. Restrictive lung disease and serum TGF-beta1 in thalassemia major children. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2005; **23(2-3)**: 121-126.
135. Srivastava RK. TRAIL/Apo-2L: Mechanisms and Clinical Applications in Cancer. *Neoplasia* 2001; **3(6)**: 535 – 546.
136. Srivastava BIS, Srivastava MD. Expression of natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44, and NKp46 mRNAs and proteins by human hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Leuk Res* 2006; **30**: 37–46.
137. Stoklasek TA, Schluns KS, Lefrançois L. Combined IL-15/IL-15R $\alpha$  Immunotherapy Maximizes IL-15 Activity In Vivo. *J Immunol* 2006, **177**: 6072–6080.

- 138.** Sugawara I. Interleukin-18 (IL-18) and infectious diseases, with special emphasis on diseases induced by intracellular pathogens. *Microbes Infect* 2000; **2**: 1257-1263.
- 139.** Sundström Y, Nilsson C, Lilja G, Kärre K, Troye-Blomberg M, Berg L. The Expression of Human Natural Killer Cell Receptors in Early Life. *Scand J Immunol* 2007; **66**: 335–344.
- 140.** Sutherland CL, Chalupny NJ, Comsan D. The UL16-binding proteins, a novel family of MHC class I-related ligands for NKG2D, activate natural killer cell functions. *Immunol Rev* 2001; **181**: 185–192.
- 141.** Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Meth* 1986; **93**: 157-165.
- 142.** Tomasello E, Vivier E. KARAP/DAP12/TYROBP: three names and a multiplicity of biological functions. *Eur J Immunol* 2005; **35**: 1670–1677.
- 143.** Une C, Andersson J, Örn A. Role of IFN $\alpha/\beta$  and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Clin Exp Immunol* 2003; **134**: 195–201.
- 144.** van Furth R. Human monocytes and cytokines. *Res Immunol* 1998; **149**: 719-720.
- 145.** van Maren WWC, Jacobs JFM, de Vries IJM, Nierkens S, Adema GJ. Toll-like receptor signalling on Tregs: to suppress or not to suppress? *Immunology* 2008; **124**: 445–452.
- 146.** van Oosterhout AJM, Bloksma N. Regulatory T-lymphocytes in asthma. *Eur Respir J* 2005; **26**: 918–932.
- 147.** Vankayalapati R, Garg A, Porgador A, Griffith DE, Klucar P, Safi H, Girard WM, Comsan D, Spies T, Barnes PF. Role of NK Cell-Activating Receptors and Their Ligands in the Lysis of Mononuclear Phagocytes Infected with an Intracellular Bacterium. *J Immunol* 2005; **175(7)**: 4611–4617.

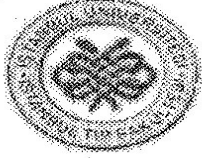


- 148.** Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008; **8(7)**: 523-32.
- 149.** Vitale C, Chiossone L, Cantoni C, Morreale G, Cottalasso F, Moretti S, Pistorio A, Haupt R, Lanino E, Dini G, Moretta L, Mingari MC. The corticosteroid-induced inhibitory effect on NK cell function reflects down-regulation and/or dysfunction of triggering receptors involved in natural cytotoxicity. *Eur J Immunol* 2004; **34**: 3028–3038.
- 150.** Vitale C, Chiossone L, Morreale G, Lanino E, Cottalasso F, Moretti S, Dini G, Moretta L, Mingari MC. Analysis of the activating receptors and cytolytic function of human natural killer cells undergoing *in vivo* differentiation after allogeneic bone marrow transplantation. *Eur J Immunol* 2004; **34**: 455–460.
- 151.** Vitucci A, Lucivero G, Locatelli F, Capocasale M, Tannoia N, Pietrapertosa A. Lymphocyte subset reconstitution after HLA-identical placental blood transplantation (PBT) or PBT plus bone marrow transplantation (BMT) in three children with b-thalassemia major. *Bone Marrow Transplant* 2000; **26**: 743–747.
- 152.** Vivier E. What is natural in natural killer cells? *Immunol Lett* 2006; 107: 1–7.
- 153.** Walker EM, Walker SM. Review: Effects of iron overload on the immune system. *Ann Clin Lab Sci* 2000; **30(4)**: 354-365.
- 154.** Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 2005; **106**: 2252-2258.
- 155.** Wanachiwanawin W, Wiener E, Siripanyaphinyo U, Chinprasertsuk S, Mawas F, Fucharoen S. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, and interferon-gamma in beta(o)-thalassemia/ HbE and their clinical significance. *J Interferon Cytokine Res* 1999; **19**: 105–111.
- 156.** Wang SC, Lin KH, Chern JPS, Lu MY, Jou ST, Lin DT, Lin KS. Severe Bacterial Infection in Transfusion-Dependent Patients with Thalassemia Major. *Clin Infect Dis* 2003; **37**: 984–8.

- 157.** Wang X, Quinn PJ. Vitamin E and its function in membranes *Progr Lipid Res* 1999; **38**(4): 309-336.
- 158.** Wang Y, Xu H, Zheng X, Wei H, Sun R, Tian Z. High Expression of NKG2A/CD94 and Low Expression of Granzyme B Are Associated with Reduced Cord Blood NK Cell Activity. *Cell Mol Immunol* 2007; **4**(5): 377-382.
- 159.** Warren HS, Jones AL, Freeman C, Bettadapura J, Parish CR. Evidence That the Cellular Ligand for the Human NK Cell Activation Receptor NKp30 Is Not a Heparan Sulfate Glycosaminoglycan. *J Immunol* 2005; **175** (1): 207–212.
- 160.** Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O’Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; **14**: 361–368.
- 161.** Weichold FF, Jiang Y, Dunn DE, Bloom M, Malkovska V, Hensel NF, Barrett AJ. Regulation of a Graft-Versus-Leukemia Effect by Major Histocompatibility Complex Class II Molecules on Leukemia Cells: HLA-DR1 Expression Renders K562 Cell Tumors Resistant to Adoptively Transferred Lymphocytes in Severe Combined Immunodeficiency Mice/Nonobese Diabetic Mice. *Blood* 1997; **90**(11): 4553-4558.
- 162.** Weiss G. Iron and immunity: a double-edged sword. *Eur J Clin Invest* 2002; **32**(1):70-8.
- 163.** Whiteside TL, Herberman RB. Role of Human Natural Killer Cells in Health and Disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994; **1**(2): 125-133.
- 164.** Wick MJ. Monocyte and dendritic cell recruitment and activation during oral *Salmonella* infection. *Immunol Lett* 2007; **112**: 68–74.
- 165.** Wilk E, Kalippke K, Buyny S, Schmidt RE, Jacobs R. New aspects of NK cell subset identification and inference of NK cells’ regulatory capacity by assessing functional and genomic profiles. *Immunobiology* 2008; **213**: 271–283.
- 166.** Wilkinson GWG, Tomasec P, Stanton RJ, Armstrong M, Prod’homme V, Aicheler R, McSharry BP, Rickards CR, Cochrane D, Llewellyn-Lacey S, Wang

- ECY, Griffin CA, Davison AJ. Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J Clin Virol* 2008; **41**: 206–212.
- 167.** Winterbourn CC, Stern A. Human red cells scavenge extracellular hydrogen peroxide and inhibit formation of hypochlorous acid and hydroxyl radical. *J Clin Invest* 1987; **80**: 1486-1491.
- 168.** Wolk K, Sabat R. Interleukin-22: A novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; **17**: 367–380.
- 169.** Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Magro CM, St.Clair EW, Tedder TF. B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunol Rev* 2008; **223**: 284–299.
- 170.** Zhang W, Wen L, Huang X, Liang J, Gao W, Zhang S, Chen L. hsBAFF enhances activity of NK cells by regulation of CD4+ T lymphocyte function. *Immunol Lett* 2008 In press.
- 171.** Zhang C, Zhang J, Niu J, Zhang J, Tian Z. Interleukin-15 improves cytotoxicity of natural killer cells via up-regulating NKG2D and cytotoxic effector molecule expression as well as STAT1 and ERK1/2 phosphorylation. *Cytokine* 2008; **42**: 128–136.
- 172.** Zipursky E. History of Pediatric Hematology Oncology. *Pediatr Res* 2002; **52**: 979-992.
- 173.** Zoban P, Cerny M. Immature Lung and Acute Lung Injury. *Physiol Res* 2003; **52**: 507-516.
- 174.** Zwirner NW, Fuertes MB, Girart MV, Domaica CI, Rossi LE. Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: Role of the MICA-NKG2D system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; **18**: 159–170.

## 7. ETİK KURUL KARARI



### İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI

Toplantı Tarihi : 22/11/2006

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Pembe Salon

Toplantı Sayısı : 11

Sorumlu araştırmacılığını Fakültemiz Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Serap Erdem KURUCA'nın üstlendiği Doktora Öğrencisi Bio.Belkıs ATASEVER'in yürüteceği 2006/2055 protokol numaralı "Beta Talasemi majörlü hastalarda NK aktivitesini etkileyen faktörlerin araştırılması" başlıklı çalışma Araştırma Fonundan desteklendiği takdirde kurulumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Zafer ARI

Etik Kurul Başkanı ( Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Ahmet GÜL

İç Hast. A.D, Romatoloji-Bilim Dalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN

Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Cahide GÖKKUŞU

Biokimya A.D

Prof.Dr. Kamil PEMBECİ

Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM

Tıp tarihi ve Deontoloji A.D.

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN

Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pınar SAİP

I.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Sevinç EMRE

Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Ümit TÜRKÖĞLU

Biokimya A.D

Prof.Dr. Veli UYSAL

Patoloji A.D.

Prof.Dr. Yeşim ERBİL

Genel Cerrahi A.D.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Belkıs	<b>Soyadı</b>	Atasever
<b>Doğ.Yeri</b>	İstanbul	<b>Doğ.Tar.</b>	07.05.1980
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kim No</b>	34126744180
<b>Email</b>	belkisatasever@yahoo.com	<b>Tel</b>	05352475535

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı	
<b>Yük.Lis.</b>	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı	2004
<b>Lisans</b>	İ.Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2001
<b>Lise</b>	Otakçılar Lisesi	1997

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Öğretim Görevlisi	Okan Üniversitesi	2007
Bursiyer	Sabancı Üniversitesi Doç. Dr. Batu Erman'ın Avrupa Birliği FP6 Marie Curie Projesi	2007-
		-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
<b>İngilizce</b>	Çok İyi	Orta	Çok İyi	67	
<b>Almanca</b>	Orta	Zayıf	Orta		

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>			
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

## 8.1. Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

### 8.1.1. Ödüller

- 1- *S. Gökçe, Z. Karakaş, G.Y. Demirel, S.Erdem Kuruca, A. Akçay, B. Atasever, Y.Yıldırım, G. Aydoğan, A. Üniivar, E.T.Sarıbeyoğlu, U. Özbek, G. Deniz* Yeni tanımlı akut lenfoblastik lösemili çocuklarda DNA indeksi ve ilaç direnci ilişkisi **Cihat Tahsin Gürsoy Vakfı ikincilik ödülü.**
- 2- *Bal T, Atasever B, Solakoglu Z, Erdem-Kuruca S, Ulkuseven B.* Synthesis, characterisation and cytotoxic properties of the N(1),N(4)-diarylidene-S-methylthiosemicarbazone chelates with Fe(III) and Ni(II). *Eur J Med Chem.* 2007 Feb;42(2):161-167. **TÜBİTAK Uluslararası Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü 2007.**
- 3- *Atasever B. İ.Ü. Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi “Başarılı Araştırmacı Belgesi” (2 kez alındı).*

### 8.1.2. Yayınlar

1. *B. Atasever, NZ. Ertan, S. Erdem-Kuruca, Z. Karakaş.* In vitro effects of vitamin C and selenium on NK activity of patients with beta-thalassemia major. *Pediatr Hematol Oncol.* 2006 Apr-May;23(3):187-97.
2. *Bal T, Atasever B, Solakoglu Z, Erdem-Kuruca S, Ulkuseven B.* Synthesis, characterisation and cytotoxic properties of the N(1),N(4)-diarylidene-S-methylthiosemicarbazone chelates with Fe(III) and Ni(II). *Eur J Med Chem.* 2007 Feb;42(2):161-167
3. *N. Turan, K. Akgün-Dar, S. Erdem Kuruca, T. Kılıçaslan-Ayna, V. G Seyhan, B. Atasever, F. Meriçli, M. Çarin.* Cytotoxic effects of leaf, stem and root extracts of *Nerium oleander* on leukemia cell lines and role of the p-glycoprotein in this effect. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*, 2006;6(1):31-38
4. *S. Erdem Kuruca, B. Atasever, E. Ademoğlu, Z. Karakaş, M.C. Akyolcu, K. Akgün-Dar, B. Aydemir, S. Toplan* Effects of iron overload on cellular immunity in patients with beta thalassemia major *Macro and Trace Elements* 22.

Workshop 2004 Main Building of the Friedrich Schiller University Jena (Tam metin olarak yayınlanmıştır.)

5. **B. Atasever, K. Akgün Dar, S. Kuruca, N. Turan, V. Seyhanlı, A. Meriçli** *Cynara Syriaca*'dan elde edilen flavonoidlerin lösemi hücreleri üzerine etkisi Ankara Ecz. Fak. Derg. 32(3) 143-150,2003
6. **B. Atasever, S.Erdem Kuruca Normal ve Lösemik Hematopoez.** Sendrom Ocak 2004. Vol: 16(1). S: 93-99

### 8.1.3. Bilimsel Atıflar

#### 1. *Cynara Syriaca*'dan elde edilen flavonoidlerin lösemi hücreleri üzerine etkisi

**B. Atasever, K. Akgün Dar, S. Kuruca, N. Turan, V. Seyhanlı, A. Meriçli** Ankara Ecz. Fak. Derg. 32(3) 143-150,2003

A.H. Meriçli, G.V. Seyhan Constituents of *Cynara syriaca* Leaves Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy) Vol.44:643 - 645 (2006)

#### 2. Synthesis, characterisation and cytotoxic properties of the N(1),N(4)-diarylidene-S methyl-thiosemicarbazone chelates with Fe(III) and Ni(II).

**Bal T, Atasever B, Solakoglu Z, Erdem-Kuruca S, Ulkuseven B** Eur J Med Chem. 2007 Feb;42(2):161-167

**Bal-Demirci T.** Synthesis, spectral characterization of the zinc(II) mixed-ligand complexes of N(4)-allyl thiosemicarbazones and N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, and crystal structure of the novel [ZnL<sub>2</sub>(tmen)] compound. Polyhedron, 2008, Vol: 27(1) , pp: 440-446

#### 8.1.4. Uluslararası Kongre Bildirileri

- 1- Z. Karakas, S.Erdem Kuruca, A. Akcay, **B. Atasever**, G. Aydogan, A. Bulbul, B. Goksan, G. Gedikoğlu; In vitro drug resistance in childhood all and its relation with the prognostic factors 5th International Symposium on Leukemia and Lymphoma 12-15 March 2003 Amsterdam (*Leukemia 2003 March;17(3):675-89' da poster özeti yayınlanmıştır.*)
- 2- Z. Karakas, S.Erdem Kuruca, S.Anak, **B. Atasever**, H. Bilgen, E.Saribeyoğlu, G. Gedikoğlu Can in vitro drug resistance predict the outcome of childhood myelodysplastic syndromes and acute myeloblastic leukemia? III. International Symposium on MDS in Childhood April 27/28/29. 2003 Italy (Abstracts book)
- 3- Z. Karakas, S.Erdem Kuruca, **B. Atasever**,\_H. Bilgen, E.Saribeyoğlu, A. Bulbul, S.Anak, G. Gedikoğlu Clinical significance of in vitro drug resistance in childhood myelodysplastic syndromes and acute myeloblastic leukemia Abstracts/ Leukemia Research 27 Suppl No.1 (2003) S1-S123
- 4- **B. Atasever**, S. Erdem Kuruca, Z. Karakaş, L. Agaoglu. In vitro modulation of cellular immunity with antioxidants in patients with thalassemia major. 46th ASH Annual Meeting 2004-12-27
- 5- Z. Karakas, SE Kuruca, A Akcay, **B Atasever**, G Aydogan, S Gökce, L Agaoglu, G Gedikoglu. In vitro drug resistance in childhood ALL and effect on prognosis. XXX. World Congress of the International Society of Hematology 2005 Istanbul, Turkey.
- 6- Z. Karakas, SE Kuruca, **B Atasever**, A Akcay, G Aydogan, S Gökce, G Gedikoglu. In vitro anthracycline resistance in childhood ALL. World Congress of the International Society of Hematology 2005 Istanbul, Turkey.
- 7- SE Kuruca, **B Atasever**,\_Z. Karakas, E Ademoglu, L Agaoglu. Effect of antioxidants on oxidative stress in patients with Thalassemia Major: in vitro study. World Congress of the International Society of Hematology 2005 Istanbul, Turkey.



- 8- *S. Pirildar, B. Atasever, B. Yesiltepe, S. Erdem-Kuruca, N. Sutlupinar.* Cytotoxic effects of seeds of *Colchicum Baytopiorum* and *Colchicum Bivonae* on K562 cells. International Symposium "Chemistry, Pharmacology and Biosynthesis of Alkaloids." 2006 Antalya, Turkey
- 9- *T. Bal, B. Atasever, Z. Solakoğlu, S. Erdem-Kuruca, B. Ülküseven.* Cytotoxic effects of four new thiosemicarbazones on K562 and ECV 304 cells. 31<sup>st</sup> FEBS Congress. Abstracts/ The FEBS Journal Vol 273 Suppl No.1, S: 345-346, 2006 Istanbul, Turkey.
- 10- *S. Erdem-Kuruca, Z. Karakas, A Akcay, B. Atasever, G Aydogan.* In vitro drug resistance in childhood ALL and effects on prognosis. Abstracts/ Chinese Journal of Pathophysiology Vol 22 Suppl No.13, S: 390, 2006
- 11- *S. Pirildar, B. Atasever, B. Yesiltepe, S. Erdem-Kuruca, N. Sutlupinar.* Cytotoxic effects of different parts of *Colchicum Baytopiorum* on K562 and HL60 cells. A Young Scientists Symposium "Future Trends in Phytochemistry" 2006 Olomouc, Czech Republic.
- 12- *B. Atasever.* Cytotoxicity tests in leukemia. (Lecture). 2<sup>th</sup> Congress of Molecular Medicine. 2007 Istanbul, Turkey.

#### 8.1.5. Ulusal Kongre Bildirileri

- 1- *B. Atasever, K. Akgün Dar, S. Kuruca, V. Seyhanlı, A. Meriçli* Flavonoidlerin lösemi hücreleri üzerine etkisi 28. *Ulusal Fizyoloji Kongresi 24-27 Eylül 2002.*
- 2- *N.Turan, K. Akgün Dar, S. Kuruca, F. Meriçli, F. Süzergöz, B. Atasever.* *Nerium Oleander* bitkisinden elde edilen ekstratların antilösemik etkileri 28. *Ulusal Fizyoloji Kongresi, 24-27 Eylül 2002.*
- 3- *S. Gökçe, Z. Karakaş, G.Y. Demirel, S.Erdem Kuruca, A. Akçay, B. Atasever, Y.Yıldırım, G. Aydoğan, A. Ünüvar, E.T.Sarıbeyoğlu, U. Özbek, G. Deniz* Yeni tanımlı akut lenfoblastik lösemili çocuklarda DNA indeksi ve ilaç direnci ilişkisi 26. *Pediatric Günleri 20-22 Nisan 2004, İstanbul.*
- 4- *S. Gökçe, Z. Karakaş, S.Erdem Kuruca, B. Atasever, A. Akçay, G. Aydoğan, Y.Yıldırım, L. Ağaoğlu, S. Anak, Ö. D evcioğlu* Çocukluk çağı akut

lenfoblastik lösemilerinde in vitro ilaç direnci 26. Pediatri Günleri 20-22 Nisan 2004, İstanbul.

- 5- **B. Atasever** ,*S. E. Kuruca, Z. Karakaş, S. Şentürk* Talasemili hastalarda NK aktivitesinin antioksidanlarla modülasyonu 30. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 31 Ağustos- 3 Eylül 2004, Konya. Genel Tıp Dergisi 2004;14 (ek) s:71.
- 6- **B. Atasever** ,*S. E. Kuruca, Z. Karakaş, N. İnce*  $\beta$ -talasemi majörlü hastalarda hücrel immunité 30. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 31 Ağustos- 3 Eylül 2004, Konya. Genel Tıp Dergisi 2004;14 (ek) s:71.
- 7- *SE Kuruca, Z. Karakas, B Atasever, A Akcay, G Aydoğan, G Gedikoglu.* Akut lenfoblastik lösemide kromozom translokasyonlarının ilaç direncine etkileri. 31. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 27-30 Eylül 2005, Gaziantep.
- 8- *SE Kuruca, Z. Karakas, B Atasever, A Akcay, G Aydoğan, G Gedikoglu.* Çocukluk çağı lösemilerinde in vitro ilaç direncinin prognostik faktörlerle ilişkisi. 31. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 27-30 Eylül 2005, Gaziantep.