

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

BETA TALASEMİ MAJOR HASTALARINDA T HÜCRE
APOPİTOZU ve PD-1'in ETKİSİ

Gizem YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2019-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

BETA TALASEMİ MAJOR HASTALARINDA T HÜCRE
APOPİTOZU ve PD-1'in ETKİSİ

Gizem YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman Alphan KÜPESİZ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2017-2471 proje numarası ile desteklenmiştir

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

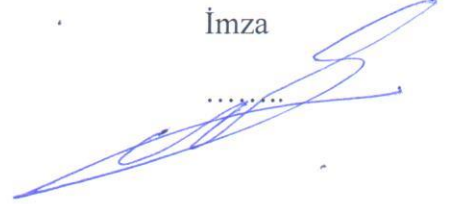
2019-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;


Bu çalışma jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Kalıtsal Kan Hastalıkları Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 29 / 05 / 2019

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Osman Alphan KÜPESİZ
Akdeniz Üniversitesi

İmza



Üye : Prof. Dr. Sadi KÖKSOY
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Erdal KURTOĞLU
Sağlık Bilimleri Üniversitesi



Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ETİK 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 çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrenci

Gizem YILMAZ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Alphan KÜPESİZ

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında çok önemli katkıları olan ve eğitimim süresince bana her aşamada destek sağlayan akademik danışmanım sayın Prof. Dr.Alphan KÜPESİZ'e,

Tezimin deneylerinin her aşamasında bana destek olan ve laboratuvarımı açan Akdeniz Üniversitesi Organ Nakli ve Araştırma Laboratuvarı'ndan sayın Prof. Dr. Sadi KÖKSOY'a,

Akdeniz Üniversitesi Organ Nakli ve Araştırma Laboratuvarı'ndan yardımlarını esirgemeyen Mesut COŐKUN'a, Nilüfer ÇİÇEK'e ve laboratuvar ekibine;

Yüksek lisans eğitimim boyunca her daim yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen Dr. Zeynep ÖZTÜRK (PhD), Uzm. Bio Pınar HOŐ, Uzm. Bio Aysun Yaşar ÇAY, Uzm. Dr. Ayşenur AKINEL, Uzm. Dr. Hilal AKBAŐ, Uzm. Dr. Ömür AKINEL sekreter Selma KUTLUCA ve tüm pediatrik hematoloji-onkoloji ekibine,

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen başta Turhan TAT ve Burhan ÇAKMAZ olmak üzere tüm Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Eğitim hayatım boyunca beni hep destekleyen annem Hülya YILMAZ'a ve bu süreçte her daim yanımda olan sevgili kardeşim Fatoő'a,

Bana bilimsel anlamda çok şey katan ve öğreten Uzm .Dr. Koray YALÇIN'a

Sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Talasemi major (TM) hastalarında T lenfosit aktivitelerinin ve apoptozun ölçüldüğü çalışmalar mevcuttur. Ancak, T lenfositlerin inhibe edilmesinde görevli bir monoklonal antikor olan PD-1 (Programlanmış Hücre Ölümü Proteini)'in çalışıldığı bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bu çalışmanın amacı, TM hastalarının enfeksiyona yatkın olmasında PD-1'in rolünün olup olmadığının belirlenmesidir.

Yöntem: Bu çalışmaya 58 olgu (31 TM, 27 kontrol) dahil edildi. Kontrol ve hasta gruplarındaki T lenfositlerindeki PD-1 düzeyleri ve apoptoz oranları hücre kültürü ve flow sitometri yöntemleri ile ölçüldü. Hemogloblin (Hb) Advia 120 cihazı ile ölçüldü. Serum ferritin immünolojik yöntemle kantitatif olarak Advia Centaur Cihazında ölçüldü.

Bulgular: Talasemi major ve kontrol grupları arasında stimüle edilen ve edilmeyen T lenfositlerinin apoptoz ve PD-1 düzeyleri arasında herhangi bir fark bulunamadı. Bu çalışmada TM grubunun ferritin değerleri, kontrol grubunun ferritin değerlerinden daha yüksek bulundu. Talasemili bireylerin hemogloblin değerleri sağlıklı bireylerin Hb değerlerinden daha düşük bulundu. Grupların hs-CRP düzeyleri normal aralıklarda bulundu.

Sonuç: Bu çalışma, talasemi hastalarının T lenfositlerinde apoptoz ve PD-1 molekülünün birlikte ölçüldüğü literatürdeki ilk çalışmadır. Talasemi hastaları ve kontrol grubunun T hücrelerinin PD-1 ve apoptoz düzeyleri arasında bir fark bulunamamıştır. Talasemi hastalarında görülen enfeksiyona yatkınlığında T hücre inhibitor yollarının aydınlatılması için daha detaylı çalışmalar yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, PD-1, talasemi, enfeksiyon

ABSTRACT

Objective: There are studies in which T lymphocyte activities and apoptosis are measured in patients with thalassemia major (TM). However, we could not find any study investigating PD-1, a monoclonal antibody which is responsible for inhibiting T lymphocytes. The aim of this study was to determine whether PD-1 plays a role in TM patients' susceptibility to infection.

Method: 58 patients (31 TM, 27 controls) were included in this study. PD-1 levels and apoptosis rates in T lymphocytes in control and patient groups were measured by cell culture and flow cytometry methods. Hemoglobin (Hb) was measured by Advia 120. Serum ferritin was quantitatively measured in the Advia Centaur Device by immunological method.

Results: There was no difference between thalassemia major and control groups in terms of apoptosis and PD-1 levels of T lymphocytes. In this study, ferritin values of TM group were higher than ferritin values of control group. Hemoglobin values of the individuals with thalassemia were lower than those of healthy individuals. The hs-CRP levels of the groups were within normal ranges.

Conclusion: This study is the first study in the literature in which apoptosis and PD-1 molecule of T lymphocytes of thalassemia patients were measured together. No difference was found between the levels of PD-1 and apoptosis of thalassemia patients and control group T cells. More detailed studies should be done to clarify the infectious complications seen in thalassemia patients.

Key words: Apoptosis, PD-1, thalassemia, infection

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ	
SİMGELER ve KISALTMALAR	
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hemoglobin	3
2.2. Talasemi	4
2.2.1. Alfa Talasemi	5
2.2.2. Beta Talasemi	5
2.3. Aşırı Demir Birikimi	8
2.4. İmmünoloji	9
2.4.1. T Lenfositler	11
2.4.2. CD28 Eş Uyarıcı ve İnhibitör Ailesi	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Olgular	17
3.2. Örneklerin Hazırlanması	17
3.3. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü	18
3.4. İstatistik	20
4. BULGULAR	21
4.1. T Lenfosit Parametreleri	23
4.1.1. T Lenfositlerindeki Active Caspase-3 Enzim İfadesinin Parametreleri	23
4.1.2. T Lenfositlerindeki PD-1 Antikor İfadesinin Parametreleri	24
4.1.3. T Lenfositlerdeki Apoptoz ve PD-1 İfadesinin uyarılmış olan ve olmayanlar arasındaki parametrelerin karşılaştırılması	25
4.2. Korelasyonlar	28

4.2.1. Talasemi Major Grubundaki Bireylerde Görülen Korelasyonlar	28
4.2.2. Kontrol Grubundaki Bireylerde Görülen Korelasyonlar	30
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	53



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Intrauterin ve bebeklik dönemlerinde sentezlenen globin zincirlerinin bölgeleri	4
Şekil 2.2	T hücre farklılaşması	10
Şekil 2.3	T lenfosit eş uyaranlar, ligandları ve etkileşimleri	13
Şekil 4.1	Kontrol grubu ve talasemi major grubu ferritin konsantrasyonları	23
Şekil 4.2	Kontrol grubu ve talasemi major grubu CD4S konsantrasyonları	25
Şekil 4.3	Kontrol grubu ve talasemi major grubu CD8S konsantrasyonları	26
Şekil 4.4	Kontrol grubu ve talasemi major grubu CD8US konsantrasyonları	27
Şekil 4.5	Kontrol grubu ve talasemi major grubu flow sitometri görüntüleri	28

TABLolar DİZİNİ

Tablo 4.1	Kontrol ve talasemi major gruplarındaki bireylerin laboratuvar bulgularının karşılaştırılması	22
Tablo 4.2	Kontrol grubu ve talasemi major grubundaki T lenfosit, caspase-3 enzim ve PD-1 konsantrasyonları	24
Tablo 4.3	Kontrol grubu ve talasemi grubu lenfositlerinin uyarılan ve uyarılmayan olarak grup içinde karşılaştırılması	27

SİMGELER ve KISALTMALAR

α	: Alfa
β	: Beta
ϵ	: Epsilon
γ	: Gamma
δ	: Delta
ζ	: Zeta
ASH / APC	: Antijen Sunan hücre
B7-1/2	: Kostimülatör B7 Ailesi
CD4	: T Yardımcı Hücreler
CD8	: T Sitotoksik Hücreler
CTLA-4	: T Lenfosit İlişkili Protein 4
CD	: Yüzey Farklılaşma Antijenleri
CD28	: Eş Uyarıcı Reseptörler Ailesi
ConA	: Concanavalin A
DC	: Dentrik Hücre
Erk2	: Dış sinyal Düzenleyici Kinaz 2
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
Fe³	: Demir
Hb	: Hemoglobin

hs-CRP	: Yüksek Duyarlıklı C-Reaktif Protein
HCT	: Hematokrit
HCV	: Hepatit C Virüsü
HIV	: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
HEPA	: Yüksek Etkinlikte Partikül
ICOS	: T Hücre Kostimulatör Sistemi
ITIM	: İmmün Reseptör İnhibisyon Motifi
IL-2	: İnterlökin 2
KİT	: Kök Hücre Transplantasyonu
MHC	: Major Histocompatibility Kompleks
MCV	: Ortalama Eritrosit Hacmi
MCH	: Ortalama Eritrosit Hemoglobini
MCHC	: Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu
MYPPPY	: Hekzapeptid
NK	: Doğal Öldürücü Hücreler
PD-1	: Programlanmış Hücre Ölümü Proteini
PD-L1	: Programlanmış Hücre Ölümü Protein Ligandı 1
PD-L2	: Programlanmış Hücre Ölümü Protein Ligandı 2
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-Kinaz
RAS	: Rat Sarkoma Viral Onkogen

RDW : Ortalama Eritrosit Dağılım Genişliği

S : Stimüle (uyarılmış)

TM : Talasemi major

TNF- α : Tümör Nekrozis Faktör Alfa

TH1 / TH2 : Yardımcı T Hücreleri Yanıtları

TCR : T Hücreleri Reseptörü

US : Unstimüle (uyarılmamış)

ZAP-70 : Zeta İlişkili Protein

1. GİRİŞ

Beta talasemi, hemoglobin molekülünün beta globin zincir sentezinin azalması veya yokluğu ile karakterize olan otozomal resesif geçiş gösteren bir kan hastalığıdır. Talasemi major (TM) hastalığın homozigot formudur. Talasemi major hastaları yaşamlarını devam ettirebilmek için düzenli olarak kan transfüzyonu almak durumundadırlar. Ancak, alınan transfüzyonlar nedeniyle vücuda giren demir zaman içinde doku ve organlarda birikir. Bunun yanı sıra, gastrointestinal sistemde demir emiliminde artış ve hücre içinde hemoglobinin denaturasyonu sonucu hem yapısından demirin serbestleşmesiyle de dokularda demir birikimi olur. Fazla demir dalak, karaciğer Kupffer hücreleri, kemik iliği retiküloendotelial hücreleri, miyokardiyum ve endokrin organlar gibi parankimal dokularda depolanır. Demir birikimine bağlı komplikasyonlardan dolayı hastaların yaşam süresi, kalitesi etkilenir ve düşer. Bu nedenle, hastaların düzenli olarak demir şelatör tedavisi almaları gereklidir. Talasemideki mortalite ve morbitide, düzenli transfüzyon ve şelasyon tedavisine uyumla yakından ilişkilidir. Güncel tedavilerle hastaların yaşam süreleri ve kaliteleri artmıştır. Ancak, hastalığa sekonder olarak gelişen komplikasyonlar bulunmaktadır. Beta talasemi majorda enfeksiyöz komplikasyonlar ikinci olarak görülen en sık ölüm nedenlerinden biridir (Ricerca ve ark., 2009; Bazrgar ve ark., 2011). Hem bakteriyel hem de viral enfeksiyonlar bu hastalarda sık görülmektedir (Bisharat ve ark., 2001; Vento ve ark., 2006). Talasemi hastalarında görülen enfeksiyonların çoklu kan transfüzyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiş ve bu transfüzyonların immün sistemde bozukluklara yol açtığı düşünülmüştür (Farmakis ve ark., 2003; Ricerca ve ark., 2009). Çoğul transfüzyonlar devamlı allo-antijenik uyarıya yol açarak T ve B lenfosit değişikliklerine yol açar (Hodge ve ark., 1999). Monosit ve makrofaj fonksiyon bozukluklarına sebep olduğunu gösteren bir çalışma da mevcuttur (Lombardi ve ark., 1994). Enfeksiyon sıklığını artıran bir diğer faktör de demirdir. Fazla demir oksidatif stresi artırır, immün savunma mekanizmasını azaltır ve direkt olarak mikroorganizmaların büyümesini artırır (Walker ve Walker, 2000).

Demir mikroorganizmaların patojenitesini artırarak makrofaj ve lenfosit fonksiyonlarını olumsuz yönde etkiler (Bonkovsky ve ark., 1996). Yapılan bir çalışmada TM

hastalarının nötrofil fagositozlarının da bozulduğu gösterilmiştir (Cantinieux ve ark., 1999). Mısırlı talasemili çocuklarda lökosit apoptozunu araştırdıkları bir çalışmada hastaların T lenfositlerde apoptozun sağlıklı kontrol grubuna oranla önemli ölçüde arttığını, bağışıklık sisteminin kronik uyarılara karşı T lenfosit üretimini arttırdığını ancak apoptoza sürüklediğini, yorgun T lenfositlerin oluşup tükendiğini bildirmişlerdir (Elsayh ve ark., 2016). Yorgun CD8+ T hücreleri IL-2 veya TNF- α üretmez ve enfekte hücreleri parçalayıp yok edemez. Bu T hücreleri enfekte olmuş hücreleri parçalayıp yok edemez. Bunun sonucunda, CD8+ T hücreleri tamamen cevapsız hale gelir ve apoptozise gider. Fonksiyonel cevabın kaybolması nedeniyle inhibitör hücre yüzey reseptörleri yorgun hücreler tarafından aktive eder Programlı hücre ölümü 1 (PD1, CD279) bu inhibitör hücrelerden en çok bilinenidir (Day ve ark., 2006). PD-1 aktif T hücre yüzeylerinde bulunur ve inhibitör etkisi göstererek T hücrelerin aktivasyonunu engelleyip onları yorgun T hücrelerine dönüştüren bir yüzey reseptörüdür. PD-1'in major rolü enfeksiyonlara karşı inflamatuvar bir yanıt olduğunda periferel dokularda T lenfositlerin aktivasyonunu ve otoimmüniteyi kısıtlamaktır (Okazaki ve Honjo, 2007). T hücreler aktive olduğunda PD-1 ekspresyonu artmaktadır (Ishida ve ark., 1992). PD-1 ligandlarından (PDL-1, PDL-2) birine bağlandığında T hücre aktivasyonu için gerekli olan kinazları inhibe eder (Freeman ve ark., 2000). Bu çalışmada, ilk kez talasemi major hastalarının uyarılan ve uyarılmayan T lenfositlerindeki PD-1 düzeylerinin ve apoptoza giden T hücre sayıları birlikte ölçülmüştür. Bu nedenle, bu çalışma orijinal bir çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Bu araştırmanın sonuçlarına göre, gruplar arasındaki uyarılan ve uyarılmayan T lenfositleri, apoptoz ve PD-1 düzeyleri arasında herhangi bir fark bulunamadı. Gruplar içindeki hs-CRP düzeyleri normal aralıklarda bulundu.

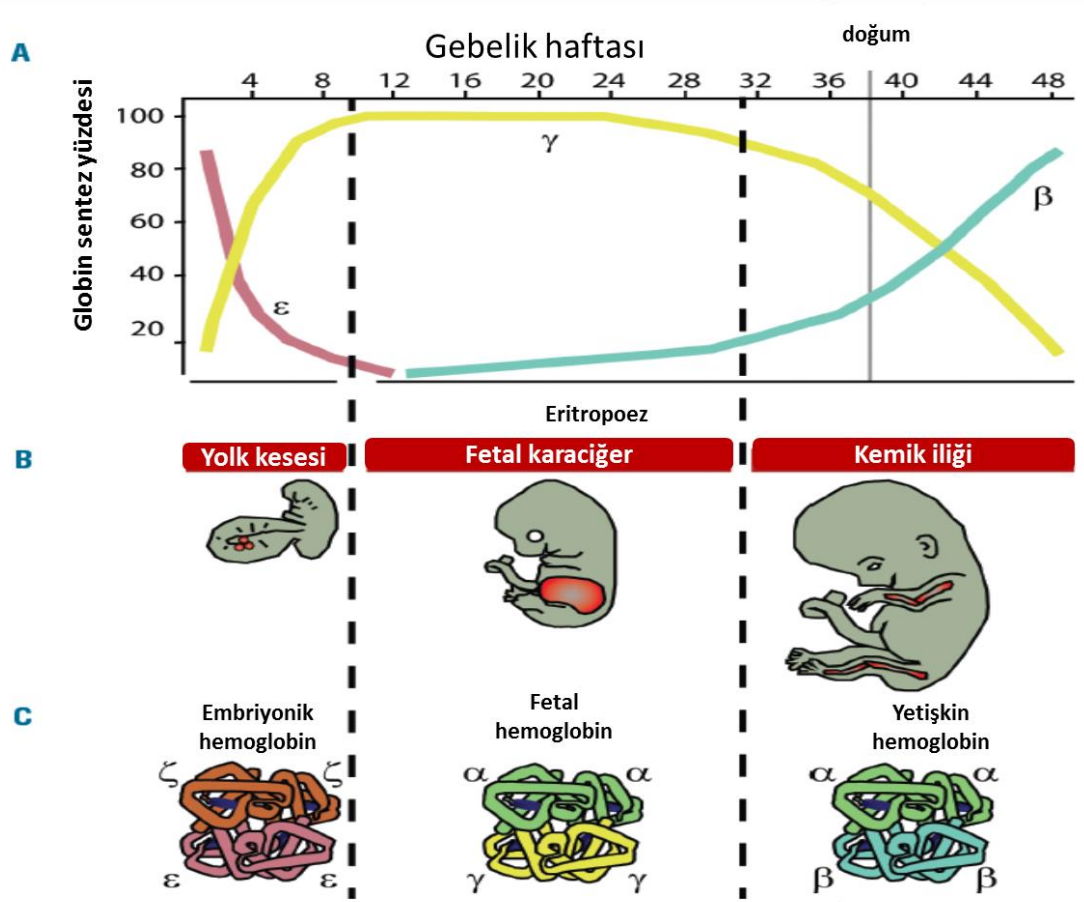
Sonuç olarak, talasemili bireylerin T lenfositlerinde ki apoptoz ve PD-1 düzeylerinin sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında bir fark bulunamamıştır, aşırı demir yükünün enfeksiyöz komplikasyonlarda ve immün sistemdeki rolünün aydınlatılabilmesi için daha detaylı çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu söylenebilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hemoglobin

Kanda eritrosit hücrelerinde bulunur. Hemoglobin vücudun neresinde ihtiyaç duyulursa oraya oksijen taşımaktadır. Her bir eritrositte yaklaşık 300 milyon hemoglobin bulunmaktadır. Hemoglobin molekülleri 2 parçadan oluşur. Bunlar “globin” adı verilen protein kısım ile “hem” denilen prostetik gruptur. Hemoglobinin globin kısmında dört polipeptid zinciri bulunur. Bu polipeptidlerin her biri, bir hem grubuna bağlıdır. Tüm hemoglobinlerde hem grubu aynı yapıdadır. Hem grubu ortasında Fe^{+2} bulunan 4 pirol halkasından oluşmaktadır. İnsandaki hemoglobinler, HbA₁, HbA₂, HbF, Hb Gower 1, Hb Gower 2 ve Hb Portland’dır(Huisman, 1993).

Demir (Fe^{+2}) ve protoporfirin kompleksinden oluşan hem grubu tüm Hb tiplerinde aynıdır. Hemoglobinlerdeki globin zincirleri, aminoasit sayı ve dizilimleri açısından farklılık gösterebilir ve globin zincirlerine göre farklı Hb tipleri oluşur. Alfa benzeri zincirler (zeta [ζ], alfa [α]) 16. kromozomda ve beta (β) globin benzeri zincirler (epsilon [ϵ], beta [β], delta [δ] ve gama [γ]) ise 11. kromozomda kodlanırlar. α ve β zincirleri sırasıyla 141 ve 146 aminoasit rezidularından oluşur. Beta globin zinciri, δ ve γ zincirlerinden sırasıyla 39 ve 10 aminoasit ile farklılık gösterir. Oluşan farklı globin zincirleri ile farklı Hb tipleri oluşur. Embriyonik globin sentezi yolk kesesinde gebeliğin üçüncü haftasından sekizinci haftasına kadar olan bölümde gerçekleşir. Beşinci haftada eritropoez fetal karaciğerde devam eder. Eritropoezin karaciğerde başlamasıyla fetal eritrositler oluşmaktadır. Gebeliğin onsekizinci haftasından sonra eritrosit yapımı kemik iliğine geçmektedir. Erken embriyonik dönemde Hb Gower1 ($\zeta_2\epsilon_2$), Hb Gower2 ($\alpha_2\epsilon_2$) ve Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$) hemoglobinleri sentezlenmektedir. 14. haftadan sonra bu embriyonik Hb’lerin yerini fetal hemoglobin (Hb F, ($\alpha_2\gamma_2$)) almaya başlar. Gestasyonun yaklaşık 38. haftasında Hb F yapımından erişkin hemoglobin (HbA) yapımına geçiş olur (Şekil 2.1). Sağlıklı bir yetişkinde Hb’in %95’i Hb A ($\alpha_2\beta_2$), <%3.5 Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) ve <%2 Hb F’dir (Zivot ve ark., 2018).



Şekil 2.1. Intrauterin ve bebeklik dönemlerinde sentezlenen globin zincirlerinin bölgeleri (Cantu ve Philipsen, 2014).

2.2. Talasemiler

Talasemiler, otozomal resesif geçiş gösteren, hemoglobin zincirlerinden birinin veya birkaçının sentezlenememesi sonucu oluşan bir kan hastalığıdır. Talasemi, hemoglobin zincirlerinin (α , β , γ , δ) az sayıda veya hiç sentezlenememesi sonucu oluşur. Talasemi de hangi zincirin eksik sentezlendiğine göre isimlendirilir. Alfa zincir yapımı azlığı alfa talasemi ve beta zincir yapım azlığı beta talasemi olarak adlandırılır. Beta talasemi taşıyıcılığı dünya nüfusunun %3'ünü oluşturur. Güneybatı Asya'nın %5-10'u alfa talasemi taşıyıcısıdır. Ülkemizde talasemi taşıyıcılığı Çukurova, Akdeniz kıyı şeridi, Ege ve Marmara bölgelerinde çok sık görülmektedir. Türkiye'de yaklaşık 1.300.000 beta talasemi taşıyıcısı ve 4000 civarında beta talasemi hastası vardır

(<http://www.thd.org.tr/thdData/Books/94/bolum-viii-beta-talasemi-tani-ve-tedavi-kilavuzu.pdf>, 14mart 2019).

2.2.1. Alfa Talasemi

Alfa talasemi 16. kromozom üzerinde bulunan alfa-globin genlerindeki mutasyonlar sonucunda oluşan bir talasemi tipidir. Mutasyonların büyük çoğunluğu gen delesyonlarıdır ancak alfa genindeki bazı nokta mutasyonları da alfa talasemiye yol açabilmektedir. Homolog kromozomların her birinde ikişer tane olmak üzere toplam dört alfa globin geni bulunmaktadır ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$). Alfa talasemilerde α -globin genlerinin biri, ikisi, üçü ya da dördü birden etkilenmiş olabilir. Bu nedenle, alfa talasemi çok değişken bulgularla seyredebilmektedir. Klinik bulgu vermeyen sessiz taşıyıcılar olabileceği gibi anne karnında ölüme yol açan ağır kansızlık bulgusu görülen hastalar da olabilir. Bir gen delesyonu ($-\alpha/\alpha\alpha$) sessiz alfa talasemi taşıyıcı, 2 gen delesyonu ($-\alpha/-\alpha$ veya $--/\alpha\alpha$) alfa talasemi taşıyıcılığı, 3 gen delesyonu ($--/-\alpha$) HbH, 4 gen delesyonu ($--/--$) Hb Barts Hidrops fetalis sendromu olarak adlandırılır. Bir veya 2 gen delesyonu görülen taşıyıcılarda herhangi bir tedaviye ihtiyaç duyulmaz. HbH orta veya ağır hemolitik anemiye yol açan klinik olarak çok değişken bir grup hastalıktır. Bu hastalarda β zincir üretimi fazladır ve bu beta zincirler tetramer yaparak hem ile birleşir ve HbH (β_4) oluşturur. HbH eritrositlerde birikerek bu hücrelerde inklüzyon cisimciklerinin oluşmasına neden olarak bu hücrelerin dalak tarafından ortadan kaldırılmasına yol açar ve anemiye neden olur. Hastaların bir kısmı transfüzyon bağımlı olabilmektedir. Homozigot α -talasemiler, dört α geninin delesyonunun neden olduğu en ağır alfa talasemi şeklidir ve genelde intrauterin veya erken neonatal dönemde ölüm ile sonuçlanmaktadır (hidrops fetalis) (Wu ve ark., 2015).

2.2.2. Beta Talasemi

Beta talasemi beta-globin zincir sentezinin eksik ya da hiç üretilmemesi ile oluşan kalıtsal kan hastalıkları grubudur. Mutasyonlar sonucu beta globin zincirinin azalması durumunda β^+ talasemi veya hiç üretilmemesi durumunda β^0 talasemi oluşur. Çok hafif formları ise β^{++} olarak ya da sessiz β talasemi olarak adlandırılır. Alfa/beta globin zincir oranı farklı oranlar da bozulacağından üretilen hemoglobin miktarına göre beta talasemi

linik olarak üçe ayrılır: talasemi minor veya talasemi taşıyıcısı, talasemi intermedia ve talasemi major (TM).

Talasemi minor

Talasemi minor kişilerde tek bir defektli beta-globin geni mevcuttur. Laboratuvar sonuçlarında hemoglobin değerinin hafif düşük, ortalama eritrosit hacminin (MCV) ve hemoglobin düzeylerinin azaldığı görülür. Periferik kan yaymalarında hipokrom, mikrositik eritrositler, anizositoz, bazofilik noktalanma ve target hücreleri, görülmektedir. Beta talasemi minörün en belirgin özelliği HbA₂ yüksekliğidir. HbA₂>3.5 olan kişiler β talasemi taşıyıcısı olarak kabul edilir. Talasemi taşıyıcılarının yaklaşık yarısında ise HbF yüksekliği de görülür. Talasemi taşıyıcılığı bir hastalık olmayıp, herhangi bir tedavi gerektirmez. Başka bir talasemi taşıyıcısı ile evlenmeleri durumunda doğacak olan çocukların %25'i homozigot talasemi olabilir (Canatan ve ark., 2006).

Talasemi intermedia

Homozigot talasemi olup, klinik bulgular Beta talasemi major hastalığı kadar ağır değildir. Cerrahi, enfeksiyon, bazı özel stres durumları dışında Hb: 6-10g/dl düzeyinde görülmektedir. İlerleyen yaş ile kemik iliği genişlemesine bağlı olarak kemik değişiklikleri görülür. Ekstramedüller hematopoez kitleleri saptanabilmektedir. Artmış demir emilimi sonucu olarak demir birikim bulguları görülebilir. Eritrosit sayısı, Hct ve eritrosit indekslerinde (MCV, MCH, MCHC) azalma, RDW'de artış gözlemlenir. Periferik yaymada; eritrositlerde mikrositoz, ağır hipokromi, anizositoz, poikilositoz, hedef hücreleri, polikromazi, basofilik noktalanma ve normoblastlar, retikülosit düzeyinde çok az artış (% 2-4) mevcuttur. Hemoglobin elektroforezi; HbA azalır (%10-20), HbF (%70-80) ve HbA₂ artar (<http://www.thd.org.tr/thdData/Books/94/bolum-viii-beta-talasemi-tani-ve-tedavi-kilavuzu.pdf>, 14mart 2019).

Talasemi major

Talasemi major her iki β globin zincir üretiminin seztezinin azalması ya da hiç olmaması sonucunda oluşur. β globin zincir yapımı azaldığı veya olmadığı için HbA sentezi azalır ve mikrositik anemi gelişir. Alfa globin zincirler β globin zincirleriyle eşleşemediğinden alfa zincir miktarı artar (Rivella, 2012). Talasemide yeterli β globin zinciri

üretilememesi sonucu mikrositoz gelişir (Rund ve Rachmilewitz, 2005). Alfa globin zincirleri tek başına hemoglobin oluşturamaz. Bunun yerine, α globin zincirleri büyük intraselüler inklüzyonlar oluştur ve kemik iliğinde olgunlaşmakta olan genç eritroid hücrelerde çöker. Bu hücrelerin bir kısmı kemik iliğinde olgunlaşmadan parçalanır (inefektif eritropoez). Hemikromların parçalanmasıyla demir açığa çıkar ve fazla demir oksidatif strese yol açarak eritrosit membranındaki lipid ve proteinlerin yapısını bozar. Alfa globin zincir inklüzyonları içeren eritrositlerden dolaşıma geçenler dalağın mikrosirkülasyonundan geçerken yıkılır. Bu nedenle, bu eritrositlerin yaşam ömürleri kısadır. Dalak tarafından bu anormal eritrosit hücreleri dolaşımdan uzaklaştırıldığı için zamanla splenomegali ve hipersplenizm gelişir. Bunun dışında, TM hastalarında ekstramedüller hematopoez uyarılması da hepatosplenomegali gelişmesine katkıda bulunur. Anemi eritropoetin yapımını artırır ve kemik iliğinin çok çalışmasına bağlı olarak kemik iliği aralığı genişler. Buna bağlı olarak da TM hastalarında kemik deformiteleri görülür (Cunningham, 2009). Eritroid hücrelerinin yaşlanmaya maruz kalması etkisiz eritropoezi sırasında fosfatidilserin gibi antijenler protrombotik potansiyel özelliği verir. Trombositlerdeki ve pıhtılaşma sistemindeki diğer anormalliklerin yanı sıra hiper pıhtılaşabilirlik, venöz tromboz ve pulmoner hipertansiyon gibi ilişkili vasküler tezahürler yaygın olarak talasemili hastalarda görülür (Cappellini ve ark., 2012).

Talasemi major hastaların klinik bulguları çoğunlukla 6 ay-2 yaş arasındaki dönemde ortaya çıkar. Hb F'in azalmasına bağlı olarak ilk 4-6 ayda kansızlık ve buna bağlı bulgular görülür. Genellikle solukluk, karında şişlik ve büyüme geriliği görülmektedir. Hafif sarılık ve hepatosplenomegali görülür. Muayene sırasında boy kısalığı, kafatasında büyüme ve abdomende belirginleşme göze çarpar. Maksiller hipertrofi ve hiperplazi, frontal ve zigomatik kemiklerde hipertrofi, dental deformite ve uzun kemiklerde patolojik kırıklar TM hastalarında görülen iskelet kusurları arasındadır. Genel olarak bu hastalarda Hb A sentezi azalmış ve Hb F total hemoglobinin %80'inden daha fazladır (<http://www.thd.org.tr/thdData/Books/94/bolum-viii-beta-talasemi-tani-ve-tedavi-kilavuzu.pdf>, 14 Mart 2019).

Talasemi hastalarının hemoglobin düzeyi ortalama 3-4 haftalık aralarla uygulanan eritrosit süspansiyonu transfüzyonları ile 10 g/dl'nin üzerinde tutulmalıdır. Düzenli transfüzyon alan hastalar yaşlıları puberte dönemine kadar sorunsuz büyürler. Sonraki durumları ise düzenli şelasyon tedavisi alıp almamalarına göre değişiklik gösterir. Çoklu kan transfüzyonları nedeniyle hastaların dokularında demir birikimi görülür. Bunun yanı sıra, gastrointestinal sistemden demir absorplanmasında artış nedeniyle dokularda demir birikir. Fazla demir dalak, karaciğer kupffer hücreleri, kemik iliği retikuloendotelyal hücreleri, miyokardiyum ve endokrin organlar gibi parankimal dokularda depolanır. Demir birikimi sonucunda serbest radikal oluşumundaki artış talasemi hastalarında oksidatif stres ve doku hasarının oluşmasına neden olur. Sonuç olarak büyüme geriliği, seksüel olgunlaşmada gecikme, farklı endokrin eksikliklere bağlı komplikasyonlar ve kardiyak komplikasyonlar görülebilir. Günümüzde transfüzyonel demir birikimini azaltmak amacı ile üç farklı şelatör kullanılmaktadır ve yeni şelatörler de geliştirilmeye devam edilmektedir (Rienhoff ve ark., 2011; Neufeld ve ark., 2012).

Talasemi hastalarının tedavisinde uygulanan güncel tedaviler; eritrosit transfüzyonu demir şelasyon tedavisi, splenektomi, seconder komplikasyonların izlemi ve tedavisidir. Bu hastalıkta küratif tek tedavi kök hücre transplantasyonudur.

2.3. Aşırı Demir Yükü

Talasemilerdeki aşırı demir yükünün ana nedenleri Hb dengesizliği, kan transfüzyonları ve gastrointestinal sistemden emilen demirdir. Vücuttaki demirin çoğu diğer moleküllere bağlanır. Plazmada, transferine bağlanır (J. Wang ve Pantopoulos, 2011). Transferrin demir bağlama kapasitesi doyurulduğunda (>% 80), transferrin bağlı olmayan demir formları görünür (Breuer ve ark., 2000).

Eritroid hücrelerinde, gelen demir esas olarak Hb molekülünü oluşturmak için hem molekülüne dahil edilir veya ferritin içinde depolanır (Konijn, 1994). Demirin bağışıklık yanıtı için temel bir mikro besin maddesi olması ve bağışıklık fonksiyonunun düzenlenmesinde demirin bir kofaktör olabileceğini gösteren spesifik etkiler tanımlanmış olmasına rağmen demirin etki mekanizmaları belirsizliğini korumaktadır (Feng ve ark., 1994; T. Walter ve ark., 1997). Bağışıklık yanıtı muhtemelen demirden birkaç seviyede etkilenir. Demir hem adaptif hem de doğal immün sistemler üzerinde

spesifik etkilere sahiptir (Feng ve ark., 1994; Omara ve Blakley, 1994). Demir eksikliği, sitotoksik efektör T lenfosit fonksiyonunun gelişmesini ve ekspresyonunu önler (Santos ve Falcao, 1990). Fazla demir oksidatif hasara neden olabilecek hücre içi serbest radikallerin oluşumunu teşvik eder (Cardier ve ark., 1995). Demir, anahtar sitokinlerin üretimini azaltarak ve fagositik fonksiyonu inhibe ederek hücre içi patojenlerin büyümesini destekleyebilir (Mencacci ve ark., 1997). Aşırı demir yükü ayrıca yardımcı ve sitotoksik T hücreleri arasındaki dengeyi etkiler ve proliferatif tepkileri bozar (Cardier ve ark., 1997). Ayrıca talasemi hastaları, hepatit C virüsü (HCV), hepatit G virüsü (HGV), B19 parvovirüs, sitomegalovirüs ve insan immün yetmezlik virüsü (HIV) tip 1 ve 2 gibi potansiyel kan kaynaklı patojenlere maruz kalmaktadır (de Montalembert ve ark., 1995; Zanella ve ark., 1995). Talasemide bağışıklık tepkisi için aşırı demir yükünün önemi, bakteriyel enfeksiyonların artmasıyla dolaylı olarak desteklenir (Jackson ve ark., 1997; Adamkiewicz ve ark., 1998). Bazı metallerin farmakolojik konsantrasyonlarda hem konsantrasyona bağlı immünomodülatör hem de immünotoksik etkileri olduğu görülmektedir (Zeromski ve Jezewska, 1995; Boscolo ve ark., 1999).

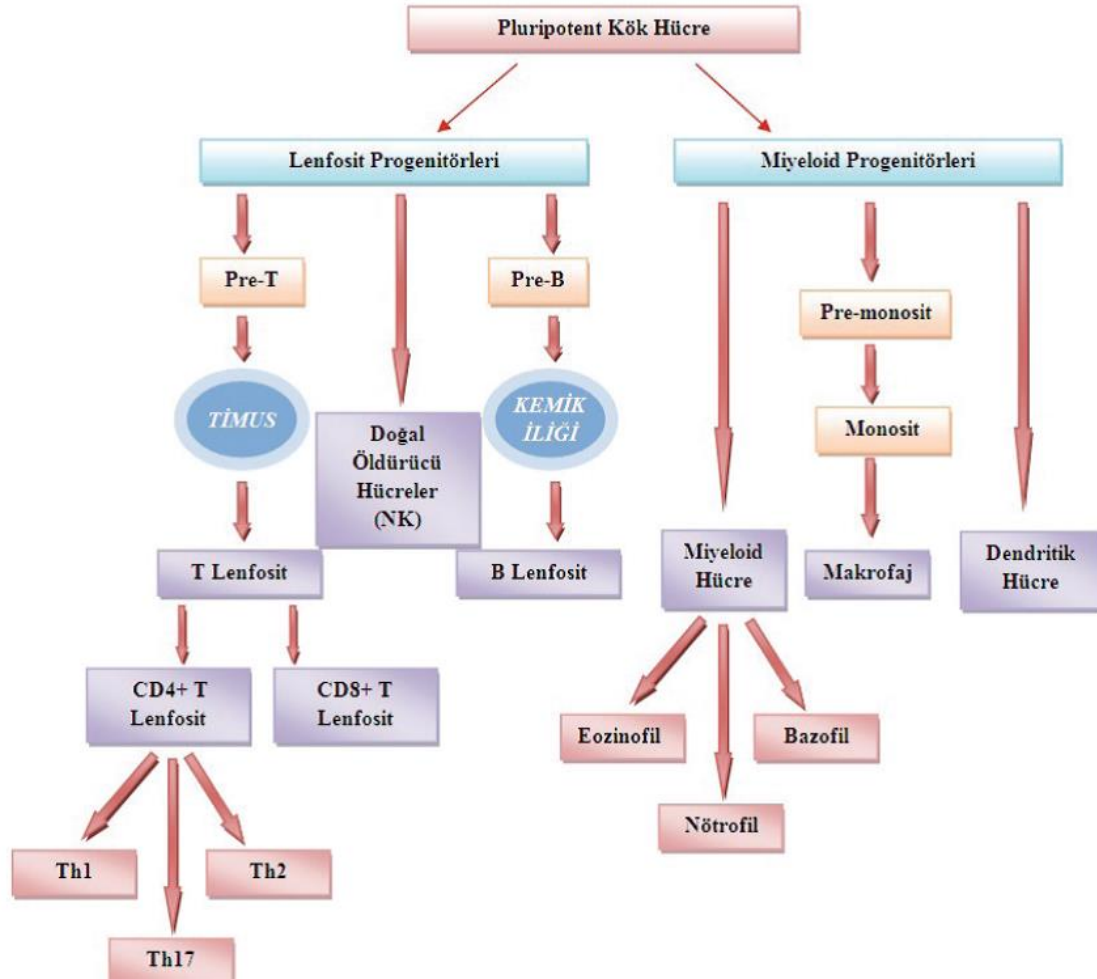
Demir, oksijen taşınmasındaki merkezi rolü nedeniyle metaller arasında benzersizdir. Bununla birlikte, aşırı demir ayrıca mikrobiyal büyümeyi destekler ve bağışıklık fonksiyonunu baskılayabilir. Bakterilerde demir bağımlı gen regülasyonu gözlenmiştir (Hill ve ark., 1998) ve çevreden demir alımını kontrol eden mekanizmalar tanımlanmıştır (Byers ve Arceneaux, 1998).

2.4. İmmün Hücreler

İmmün sistem, bir canlıdaki hastalıklara karşı koruma sağlamada görevli, patojen ve tümör hücrelerini tanıyan ve yok eden işleyişlerin bütünüdür. İmmün hücreler, vücuda giren her yabancı maddeyi tarar ve onları canlının kendi hücrelerinden ve dokularından ayırt eder. Vücutta belli aralıklarla ortaya çıkan anormal hücre ve molekülleri belirleyip bunlara yanıt vermek immün sisteminin görevlerindedir.

Lenfositler, lökositlerin %25-35'ini oluşturur ve kemik iliğindeki kök hücrelerden üretilirler. Bu farklılaşmamış hücreler lenfoid dokulara gitmekte ve burada belirgin lenfosit tipleri olarak olgunlaşmaktadırlar (B ve T lenfositler). Lenfositlerin aktive olması, antijen sunan hücreler tarafından antijenin uygun bir şekilde, işlenmesine ve T

lenfositlere sunulmasına bağlıdır. Antijenin tanınmasından sonra, T ve B lenfositleri hücre klonları oluşturmak üzere bölünürler ve antijenleri yok edebilen efektör hücrelere dönüşürler. Antijen ile gelecekteki karşılaşmaları için ihtiyaç duyulan hafıza hücrelerine farklılaşmaya devam ederler. Hüresel immünite de görevi olan hücrelerin tamamı kemik iliğinde bulunan pluripotent kök hücreden köken almaktadır. Kemik iliğinde yer alan pluripotent kök hücreler lenfoid ve miyeloid hücreleri oluşturmak üzere lenfoid ve miyeloid progenitörlere farklılaşırlar. Bu lenfoid progenitörler T hücre, B hücre ve doğal öldürücü hücreler (NK) olmak üzere üç gruba ayrılırlar. T hücre progenitörleri kemik iliğinden ayrılır ve timus bezine geçer ve olgun T hücreler olarak farklılaşırlar (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. T hücre farklılaşması (Karaselek ve Reisli, 2016).

Olgun T ve B hücreleri, (CD) olarak adlandırılan farklılaşma kümeleri yüzey moleküllerini sergilerler. Bu moleküller fonksiyonel olarak CD4+ T yardımcı hücreler (Th) ve CD8+ T sitotoksik hücreler (Tc) gibi farklı T hücre alt gruplarını tanımlama görevini görürler (Chinen ve Shearer, 2003). Hücrel immünitede, CD4+ Th hücreleri diğer T ve B hücrelerinin yanıtını artırırken; CD8+ Tc hücreler, virüsle enfekte hücreleri ve tümör hücrelerini öldürür.

2.4.1. T lenfositler

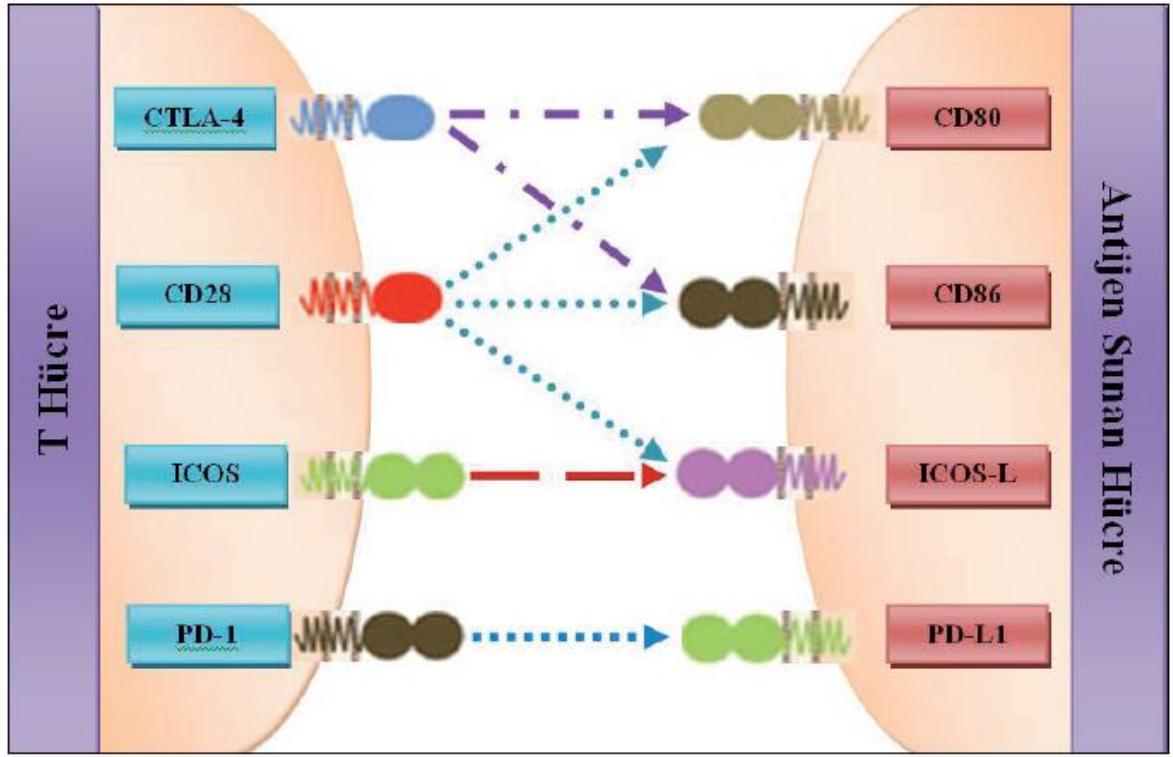
T lenfositler, viral enfeksiyonlarda vücudun savunmasında, yabancı doku greftlerinin reddinde ve gecikmiş hipersensitivitede ve diğer T ile B hücrelerinin aktive edilmesinde görev alırlar. Bu immün yanıtların hepsine birden hücrel immünite adı verilir (Agerberth ve Gudmundsson, 2006). T lenfositleri kemik iliği kök hücrelerinden gelişmekte olup B hücrelerinin tersine, pre-T hücreleri olgunlaşmak üzere timusa göç etmektedir. Timusta, immatür T lenfositleri, T hücre reseptörünü (T Cell Receptor, TCR) kazanırlar. Antijene yönelik TCR spesifik olarak antijen sunan hücrelerin ve hedef hücrelerin yüzeyindeki antijen-peptit-MHC komplekslerine bağlanarak T hücreleri arasındaki farklı antijen spesifitesini oluştururlar. Timusta olgunlaşan T hücreleri periferel lenfoid dokulara göç eder ve antijen ile karşılaşmaları halinde çoğalırlar ve hafıza T hücreleri ve çeşitli efektör hücreleri şeklinde farklılaşırlar. CD4+ Th hücreleri, immün sistemin temel yapıtaşlarından birisidir. Th hücreleri, aktivasyonlarını takiben, immün sistemin neredeyse tüm diğer hücrelerinin fonksiyonunu etkileyen sitokinleri salgılamaya başlarlar (Abbas ve ark., 1996). Bu sitokinler B hücrelerini, Tc hücrelerini, doğal öldürücü hücreleri, makrofajları ve diğer immün hücrelerini aktive ve regüle ederler (McHeyzer-Williams ve ark., 2006). Th hücrelerinin farklı alt popülasyonları (örn., Th1 ve Th2) belirlenmiş ve farklı sitokin paternleri salgıladıkları gösterilmiştir. CD8+ Tc hücreleri, virüsle enfekte olmuş veya kanser nedeniyle değişime uğramış vücut hücreleri ile aktive olurlar. CD8+ T hücreleri hedef hücreleri sitolitik enzimler, toksik sitokinler ve por-oluşturan moleküller (örn., perforinler) salgılayarak veya hedef hücrede programlanmış hücre ölümlerini (apoptoz) tetikleyerek yok ederler.

T hücrelerin enfeksiyona karşı yanıt oluşturabilmesi aktif olmasına bağlıdır. Bu aktivasyonun sağlanmasında iki sinyal görevlidir (Janeway ve Bottomly, 1994; Sharpe ve Abbas, 2006). İlk sinyal antijen tarafından sağlanmakta olup, ikinci sinyal ise; eş

uyaran molekülleri tarafından sağlanan sinyaldir. Antijenin kendisi aktivasyon için birinci sinyali sağlar ve T lenfosit aktivasyonunun gerçekleşebilmesi için ikinci bir sinyal olan eş uyaran moleküllerine ihtiyaç duyulmaktadır. İkinci sinyallerden olan eş uyaranlar, T hücrenin optimal yanıtının başlamasına yardımcı olur. CD4 ve CD8 reseptörleri antijen sunan hücrelerin (ASH) major doku uygunluk kompleksi (MHC) bağlanır, T hücre reseptörü (THR) üzerinde yer alan eş uyaran moleküller ASH üzerindeki ligandları ile etkileşime girip aktivasyon sağlanmış olur (Robert R. Rich MD 2008).

2.4.2. CD28 Eş Uyaran ve İnhibitör Ailesi

CD28 ailesinde yer alan üyeler, kısa sitoplazmik uzantılar içeren değişken immünooglobulin benzeri yapılardır (Riley ve June, 2005). CD28 ailesinin tanımlanmasından sonra başka eş uyaran moleküllerde bulunmuş ve 4 ana grup altında toplanmıştır. Bunlar CD28, indüklenebilir T hücre kostimulatör sistemi (ICOS), sitotoksik T lenfosit ilişkili protein 4 (CTLA-4) ve programlanmış hücre ölümü proteini 1 (PD-1) molekülleridir. CD28 ve ICOS moleküllerin T hücrelerin aktivasyonunda pozitif bir etkiye sahipken, CTLA-4 ve PD-1 molekülleri T hücrelerin inaktivasyonunda yer alan eş uyaran moleküllerdir. İnhibitör etkili eş uyaranlar, T lenfosit yanıtlarının negatif regülasyonunda görev alırlar (Watts ve DeBenedette, 1999; Frauwirth ve Thompson, 2002). İnsanlarda CD4+ T lenfositlerin büyük çoğunluğu ve CD8+ T lenfositlerin hemen hemen yarısı CD28 moleküllerini eksprese eder (Topp ve ark., 2003; Warrington ve ark., 2003). Kronik enfeksiyon ve ilerleyen yaşa bağlı olarak CD28 moleküllerin de kayıplar oluşabilir ve buda immün yanıtta bozukluklara sebep olabilir. T hücre yüzeyinde yer alan CD28 molekülü ile antijen sunan hücrenin yüzeyinde eksprese edilen ligandlara bağlanması ile T hücre yanıtı oluşur. B7-1 (CD80) ve B7-2 (CD86) CD28 ligandlarıdır (Carreno ve Collins, 2002; Sharpe ve Freeman, 2002). CD80 ve CD86 molekülleri eş uyaran ve eş inhibitör yollarında önemli bir role sahiptir. Antijen sunan hücre yüzeylerinde yer alan CD80 ve CD86 molekülleri CD28'in ligandı olmakla beraber CTLA-4 molekülünün de ligantıdır (Bour-Jordan ve ark., 2011; Dilek ve ark., 2013) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. T lenfosit eş uyarıcılar, ligandları ve etkileşimleri (Karaselek ve Reisli, 2016)

PD-1, değişken tek bir bölge ihtiva eden tip I transmembran proteinidir. Sitoplazmik kuyruklarında tirozin bazlı immün reseptör inhibisyon motifi (ITIM) vardır. CTLA-4 ile PD-1 %23 oranında benzerlik gösterir. PD-1 molekülünde CTLA-4 molekülünde yer alan MYPPY motifleri bulunmamakta ve aktive olmuş T lenfositler üzerinde ifade edilmektedir. Ayrıca PD-1'in B lenfositlerde eksprese edilmekte olup immün sistemde CTLA-4 molekülünden daha geniş bir spektruma sahip olduğunu düşündürmektedir (Agata ve ark., 1996). PD-1 ile yapılan çalışma sonuçları periferik toleransın indüklenmesinde görev aldığını düşündürmektedir. PD-1 molekülünün PD-L1 (B7-H1) ve PDL2 (B7-DC) olmak üzere iki ligandı bulunmaktadır. Bu ligandlar ASH'lerde eksprese edilirler. PD-1 eksikliği olan farelerle yapılan çalışmalarda, yüksek oranda otoantikor üretimi ile karakterize olan otoimmün hastalıkların, PD-1 ekspresyonu ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir. Başka bir çalışmada PD-1 molekülünün otreaktif B hücre reaksiyonlarını düzenlemede önemli bir rolü olduğu ortaya konulmuştur (Okazaki ve Honjo, 2006).

PD-1 ve ligandları olan PD-L1 ve PD-L2'nin ekspresyonları

PD-1, saf T hücrelerinde eksprese edilmezken, T hücresi reseptörünün (TCR) aracılı aktivasyonunu takiben yukarı doğru düzenlenir ve hem aktif hem de bitkin T hücrelerinde kolayca gözlenir (Agata ve ark., 1996; Barber ve ark., 2006). Bu "bitkin" T hücreleri, işlevsiz bir fenotipe sahiptir ve uyarılara uygun şekilde cevap verememektedir.

PD-L1 ifadesi çok daha çeşitlidir. PD-L1, T hücreleri, B hücreleri, monositler, makrofaj, dentrik hücreler üzerinde görülebilir ve tipik olarak aktivasyon ile düzenlenir. PD-L1, kalp, pankreas, plasenta, vasküler endotel, karaciğer, akciğer gibi birçok hematopoetik olmayan dokularda eksprese edilir (Dong ve ark., 1999; Freeman ve ark., 2000). Bu doku ekspresyonu, periferde immün yanıtların düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Keir ve ark., 2006; Scanduzzi ve ark., 2014). Birçok araştırmada, PD-1/PD-L1/L2 yolunun, çeşitli enfeksiyöz, otoimmün ve kanserde T hücresi regülasyonu için önemli olduğu gösterilmiştir (Francisco ve ark., 2010).

PD-1 sinyal yönetimi

PD-1 aracılığı ile sinyal yolağının aktive edilmesi, onun bilinen ligandları olan PD-L1 ve PD-L2 ile bağlanıp aktif olmasıyla başlar. Sinyal iletiminin birincil etkisi TCR ve temel kostimülator sinyallerinin inhibe edilmesidir (Şekil 2.2). Bağlanma gerçekleştiğinde, PD-1 TCR kompleksi üzerine kümelenir ve orada lokalize olur (Yokosuka ve ark., 2012). PD-1, TCR birleşmesinin ardından TCR CD3 ζ zincirlerinin ve Zap-70'in fosforilasyonunu inhibe edebilir (Sheppard ve ark., 2004; Parry ve ark., 2005; Yokosuka ve ark., 2012). Sağkalım ve proliferasyonun bir arttırıcısı olan Ras'ın akış aşağı aktivasyonu, PD-1 tarafından da inhibe edilmiştir (Patsoukis ve ark., 2012). Doğrudan TCR sinyalleriyle birlikte CD28, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/Akt yolunun aktivasyonu ile kostimülator uyarıcı sinyaller verir. PD-1 sinyalleri, PI3K aktivasyonunu (Parry ve ark., 2005) bloke ederek bu yolu bastırır. Bu etki, hücre içi immünoresptör tirozin esashı şalter motifinin (ITSM) ve immünoresptör tirozin bazlı inhibitör motifin (ITIM) fosforilasyonu ile başlar. ITSM bu iki motifden önemli olanı gibi görülmektedir (Chemnitz ve ark., 2004; Sheppard ve ark., 2004). Fosforile edilmiş ITSM, tirozin fosfataz olan SHP-2'yi alır (Parry ve ark., 2005; Yokosuka ve ark., 2012).

Bu fosfataz, PI3K'nın etkisizleşmesine ve Akt yolunun aşağı doğru inhibisyonuna yol açar. Her iki PD-1 ve CTLA-4'ün T hücrelerini inhibe etmesine rağmen, bu iki reseptörün mekanizmaları belirgindir (Parry ve ark., 2005).

PD-1 boyunca aşağı akış sinyalleşme etkileri çoktur. Diğer inhibitör reseptörlerde olduğu gibi, tümör nekroz faktörü a (TNF-a), interferon γ (IFN- γ) ve interlökin 2 (IL-2) dahil olmak üzere birkaç enflamatuar sitokinde bir düşüş ile birlikte T hücresi proliferasyonunda bir azalma görülür (Freeman ve ark., 2000; Latchman ve ark., 2001; Barber ve ark., 2006).

PD-L1 indüklenebilen regülatör T hücreleri (iTregs) farklılaşmasında in vitro ve in vivo olarak önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Francisco ve ark., 2009), sadece ASH'lar üzerinde değil aynı zamanda diğer hematopoietik olmayan dokularda PD-L1 ekspresyonu bu indüksiyonu yapabilir. PD-1 sinyalleşmesine, fosfo-Akt, rapamisinin mekanik hedefi (mTOR), S6 ve Erk2'nin aşağı regülasyonu ve fosfataz ve tensin homologunun (PTEN) yukarı regülasyonu eşlik eder (Francisco ve ark., 2009). Daha önceki çalışmalar, Akt sinyal yolunun, PD-L1 ile indüklenmiş Treg'lerin üretilmesi için önerilen mekanizmayı destekleyen iTreg gelişiminin güçlü bir inhibitörü olduğunu göstermiştir (Haxhinasto ve ark., 2008). PD-1, tükenmiş T hücrelerinde önemli bir rol oynar. İlk önce kronik viral enfeksiyonlarda, PD-1'in tükenmiş CD8 T hücrelerinde selektif olarak yukarı doğru düzenlendiği kaydedilmiştir (Barber ve ark., 2006). Bu gözlem hem farelerde hem de insanlarda çok sayıda kronik viral enfeksiyonda görülmüştür (Barber ve ark., 2006; Quigley ve ark., 2010; Hofmeyer ve ark., 2011; Kao ve ark., 2011). Tümör mikro ortamında T hücrelerinin PD-1 ekspresyonu da bitkin ve işlevsiz bir fenotip ile ilişkilidir (Ohaegbulam ve ark., 2015). En önemlisi, PD-1 sinyalleşmesinin blokajı, CD8 T hücre fonksiyonunu eski haline getirebilir ve tükenmiş fenotipten sitotoksik özelliklerin geri kazanılmasını sağlar (Pauken ve Wherry, 2015).

PD-1, sitoplazmik kuyruğunda hem bir hücre içi immünoresseptör tirozin bazlı şalter motifi (ITSM) hem de immünoresseptör tirozin bazlı inhibitör motifi (ITIM) içerir. SHP-2, fosforile edilmiş ITSM'ye bağlanabilir. Ligandlarla PD-1 ligasyonu, CD3 ζ zinciri fosforilasyonu ve Zap-70 birleşmesinin inhibisyonu yoluyla TCR sinyalinin genel olarak inhibe edilmesine yol açar. PD-1 sinyalleri, sırasıyla çoğalmayı ve hücre sağkalımını

etkileyen hem Ras hem de Bcl-xL'nin aşağı regülasyonuna neden olur. T hücrelerinin efektör fonksiyonunu bozan BATF'de bir artış görülebilir. PD-1 ayrıca PI3K aktivasyonunu inhibe ederek fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/Akt yolunu da inhibe eder. Bu rapamisinin (mTOR) mekanik hedefinin aşağı doğru düzenlenmesi ve FoxO1'in yarı ömrünün artması dahil olmak üzere aşağı yönde etkilere sahiptir. PD-1 sinyalleri ayrıca glikolizi inhibe ederek ve yağ asidi oksidasyonunu teşvik ederek hücrenin metabolizmasını etkiler. Birlikte bu etkilerin tümü T hücrelerinin daha az proliferatif olmasına, efektör fonksiyonlarını kaybetmesine, bitkin ve işlevsiz bir fenotip almasına neden olur.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgular

Bu proje için Akdeniz Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındı (Sayı: 70904504/10, Karar No: 22, Tarih: 11.01.2017). Çalışmaya dahil edilen tüm bireyler, çalışmanın içeriği ve çalışmanın aşamaları konusunda bilgilendirildi. Bireylerin her birinden yazılı onam formu alındı. 18 yaşından küçük bireylerin hem kendilerinden (okuma yazma bilenlerden) hem de yasal vasilerinden onam formu alındı. Çalışmaya dahil edilen talasemi major hastalarının yaş, cinsiyet, tanı yaşı, transfüzyona başlama yaşı, transfüzyon sıklığı ve splenektomi öyküsü olup olmadığı kaydedildi.

Bu araştırmaya dahil edilen bireyler almış oldukları tanıya göre 2 gruba ayrıldı:

Grup 1 (kontrol grubu): Kontrol grubu, hasta gruplarıyla aynı yaş ya da yaş aralığında, transfüzyon öyküsü olmayan, talasemi taşıyıcılığı gibi herhangi bir hemolitik anemi bulgusu göstermeyen ve kronik bir hastalığı olmayan 27 sağlıklı bireyden oluştu. Kontrol grubundaki bireylerin yaş ortalaması 12,14 yıldır. Bu grubu oluşturan kişilerin 12'i kız ve 15'i erkekti. Kontrol grubundaki bireyler çalışmaya alınmadan önce hemogram, ferritin ve CRP testleri çalıştırılarak bireylerde hemolitik anemi ve inflamasyon olup olmadığı araştırıldı. Anemisi ve enfeksiyonu olan bireyler bu gruba dahil edilmediler.

Grup 2 (talasemi major (Tm)): Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Pediatrik Hematoloji-Onkoloji Polikliniği'nde takip edilen transfüzyon bağımlı 31 talasemi major hastası bu gruba dahil edildi. Bu grubu oluşturan bireylerin yaş ortalaması 14 yıldır. Bu bireylerin 13'ü kız ve 18'i erkekti.

3.2. Örneklerin Hazırlanması

Talasemi hastalarının kan numuneleri, hematoloji polikliniğine başvurduklarında transfüzyon yapılmadan önce alındı. Çalışmaya dahil edilen bireylerin tümünden heparinli ve EDTA (etilendiamintetraasetik asit)'lı tüplere ve serum tüplerine kan numuneleri alındı.

Alınan heparinli kan CD4, CD8, CD3, PD1, CASPASE-3 ve izotiplerinin ölçümleri için aynı gün bekletilmeden kullanıldı.

EDTA'lı kan numuneleri hemogram ölçümü için kullanıldı. Serum numuneleri ferritin ve hs-CRP düzeylerinin ölçümü için kullanıldı. Bu testler için alınan kan numuneleri 20 dakika içinde laboratuara ulaştırıldı.

3.3. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

Tüm bireylerin tam kan sayımları (hemogram) EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinde Advia 120 cihazı kullanılarak yapıldı. Bireylerin serum ferritin konsantrasyonları Siemens Centaur XP cihazı kullanılarak kemilüminesans yöntemi ile kantitatif olarak ölçüldü. Bireylerin serum örneklerinde hs-CRP düzeyleri nefelometrik yöntem kullanılarak ölçüldü. Bu testlerin ölçümü Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'ndan hizmet alımı şeklinde yapıldı.

T lenfositlerde PD-1 Ölçümü

CD4 ve CD8 T lenfosit sayımı ve bu T lenfositlerdeki PD-1 ölçümü flow sitometri yöntemiyle yapıldı. Ayrıca, hücre kültürü yöntemi ile bu T lenfositlerin apoptoza gidip gitmedikleri ölçüldü. Ölçümler Akdeniz Üniversitesi Organ Nakli ve Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan BD FACSCanto II Flow Cytometer kullanılarak yapıldı.

Hücre Kültürü Yöntem

Araştırmaya dahil edilen kişilerden alınan heparinli kan 1:2 oranında PBS (Fosfat Tamponlu Tuz) ile dilüe edildi. Ardından falkon tüpüne 1.077 gr/ml'lik 3 ml Ficoll Hypaqua (hücrelerin ayrılması ve izolasyonu için yoğunluk ve gradyan ortamı sağlayan sıvı) eklendi. Üzerine tabaka oluşturacak şekilde kanların tamamı eklendi. 25 dk 1600 rpm'de santrifüj yapılarak buffy coat elde edildi. Lenfositleri içeren buffy coat tabakası diğer tabakalara dokunulmadan steril pipet yardımıyla ayrı temiz bir santrifüj tüpüne alındı ve tüpün tamamına PBS eklenip 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst kısmında kalan parçalanmış proteinlerden oluşan kısım atıldı. Bundan sonra aynı yıkama işlemi iki kez tekrarlandı. Süpernatant atıldıktan sonra tüpün dibinde kalan ve içerisinde lenfositlerin bulunduğu çökelti %10 fetal bovine serum (FBS), 40 mg/ml Gentomisin (Gibco) ve 2Mm L-Glutamin içeren RPMI-1640 (Gibco) medyumunu ile

süspanse edildi ($2,5 \times 10^6$ olacak şekilde hücreler ayarlandı). Araştırılan her birey için hücre kültürü öncesinde tüp başına 400 ml'lik süspanسیون hazırlandı ve pipetaj yapıldı. 24 kuyucuklu plak sterid (multiwell) kullanıldı. Her hasta için 4 kuyucuk kullanıldı. Hücre kültürü uygulamalarında mitotik aktiviteyi sağlayan (stimüle eden/uyaran) ve hücre kültürü uygulamalarının uygunluğunu belirleyen bir lektin olan concanavalin A (sigma) stoğu hazırlandı. $20 \mu\text{l}$ conA'ya $1980 \mu\text{l}$ PBS eklenerek stok hazırlandı. 24 kuyucuklu plakları her bir deney için stimüle olan ve stimüle olanların isotipleri ile stimüle olmayan ve stimüle olmayanların isotipleri olacak şekilde belirlendi. Stimüle olmayan hücreler 100'er μL eklenildi. Tüm bu işlemler havadaki partikülleri uzaklaştıran HEPA (high efficiency particible) filtreli laminar akımlı kabinde gerçekleştirildi. Ardından ekimi yapılan hücreler, %5 CO_2 'li etüvde 37°C 'de 96 saat inkübe edildi.

Flow Sitometri Yöntemi

Lenfositler ön saçılım ve yan saçılım özellikleri ile tanımlanarak, kapı içine alınarak analiz gerçekleştirildi. Her bir monoklonal antikorla reaksiyon verebilen lenfositler florasan özelliklerine göre ayrılıp sayıları yüzde olarak rapor edildi.

Kullanılan monoklonal antikorlar;

PE-Cy TM7 Mouse Anti-Human CD8 (BD Biosciences, 557746)

PE-Cy TM7 Mouse IgG1 K Isotype (BD Biosciences, 557872)

PE Mouse Anti-Human CD4 (BD Biosciences, 555347)

PE Mouse IgG1 K Isotype (BD Biosciences, 555749)

APC-H7 Mouse Anti-Human CD3 (BD Biosciences, 560176)

APC-H7 Mouse IgG1 K Isotype (BD Biosciences, 560167)

APC Mouse Anti-Human CD279 (BD Biosciences, 558694)

APC Mouse IgG1 K Isotype (BD Biosciences, 555751)

FITC Active Caspase-3 Apoptosis Kit (BD Biosciences, 550480)

Hücre kültüründe 96 saati tamamlayan hücreler 4 ayrı flow tüpüne kontamine olmayacak şekilde alındı ve isimlendirildi. Her tüpün üzerine $200 \mu\text{l}$ FBS'li PBS hazırlanıp eklendi. 10 dk 1600 rpm 'de santrüfjü edildi ve medyum hücrelerden uzaklaştırıldı. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı. Ardından PE-Cy TM7 Mouse Anti-

Human CD8, PE-Cy TM7 Mouse IgG1 K Isotype, APC-H7 Mouse Anti-Human CD3, APC Mouse IgG1 K Isotype antikorlarından 5'er µl, PE Mouse Anti-Human CD4, PE Mouse IgG1 K Isotype, APC-H7 Mouse IgG1 K Isotype, APC Mouse Anti-Human CD279, 20'şer µl üretici firmanın önerdiği şekilde eklendi. Pipetaj yapıp oda ısısında karanlık ortamda 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüplere 200 µl FBS'li PBS eklenip 1600 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip pellet kısmı döküldü. Ardından FITC Active Caspase-3 Apoptosis kitinin uygulanması için üretici firmanın önerdiği şekilde hücre porlarını açmak ve caspase-3 antikorunun bağlanması için kit içinden çıkan permeabilization solutiondan 500 µl eklenip pipetaj yapıp karanlık odada ve oda ısısında 30 dakika bekletildi. Ardından 20 µl FITC Active Caspase-3 Apoptosis antikorunu ekleyip pipetaj yapıp 20 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüplere 200 µl cellwash ekleyip flow sitometri cihazında lenfositleri belirleme işlemine geçildi.

Lenfositler ön saçılım ve yana saçılım özellikleri ile kapı içine alınarak analiz gerçekleştirildi. Her bir monoklonal antikorla reaksiyon verebilen lenfositler floresan özelliklerine göre ayrılıp sayıları yüzde olarak rapor edildi.

3.4. İstatistik

İstatistiksel analizler SPSS istatistik programı (Version 23.0, Chicago, IL, ABD) kullanılarak yapıldı. Her bir gruptaki olguların yaş ortalamaları Kruskal Wallis testi kullanılarak karşılaştırıldı. Gruplar arası hemoglobin ve hs-CRP değerleri Bonferroni Düzeltmiş Mann Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı. Ferritin, CD4, CD8, CD3, CD279 ve CAS-3 düzeylerinin analizlerinin yapılmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı. Sonrasında yapılan ikili karşılaştırmalarda Bonferroni Düzeltmeli Mann-Whitney U testi (α : 0.008) kullanıldı. Değişkenler arasındaki korelasyonları değerlendirmek için Spearman'ın Rho testi ve dağılım grafikleri kullanıldı. 0.05'ten küçük olan p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen kişilerin laboratuvar bulguları tablo 4.1’de belirtilmiştir. Gruplar da yer alan kişilerin yaşları arasında bir fark bulunamamıştır. Talasemi major tanılı olguların hemoglobin değerleri, kontrol grubundakilerin Hb değerlerinden daha düşük bulunmuştur ($p<0,001$). Kontrol grubundaki bireylerin hematokrit, eritrosit değerleri TM tanılı bireylerin değerlerinden daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Talasemi major grubundakilerin ferritin değerleri kontrol grubundakilere oranla anlamlı derece de yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

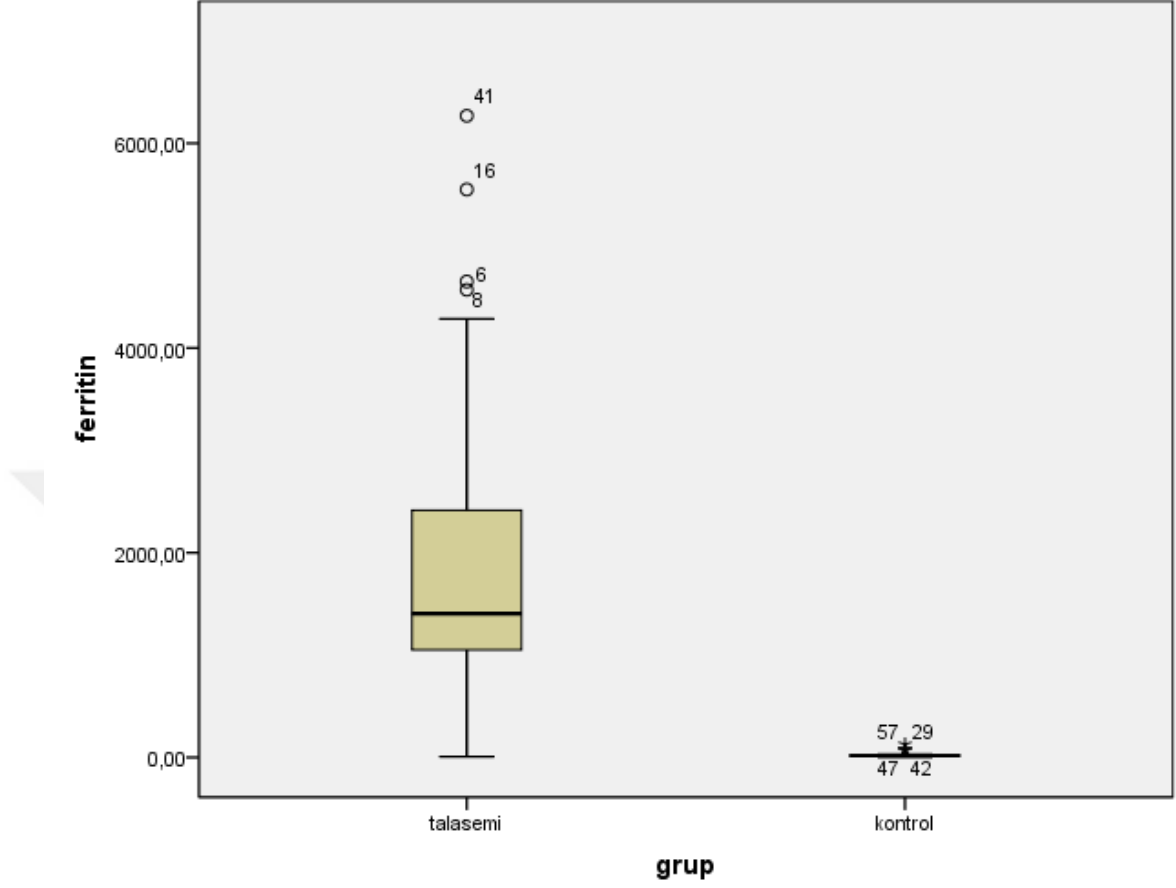
Talasemi major tanılı olguların MCV değerleri kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur ($p<0,017$). Talasemi major tanılı olguların luc% ($p<0,005$), luc ($p=0,012$), lenfosit ($p=0,033$), monosit% ($p=0,023$) değerleri, kontrol grubundaki bireylere oranla daha düşük bulunmuştur.

Çalışmaya dahil edilen 2 grubunda hs-CRP düzeyleri normal aralıklarda bulunmuştur.

Tablo 4.1. Kontrol ve talasemi major gruplarındaki bireylerin laboratuvar bulgularının karşılaştırılması.

Parametreler	Talasemi major (n:31)	Kontrol grubu (n:27)	p değerleri
Yaş (yıl, $\bar{x} \pm sd$)	14 \pm 7,18	12,15 \pm 6,44	
Hemoglobin (g/dL) (ortalama)			
ortalama $\bar{x} \pm sd$	9,59 \pm 0,87	12,85 \pm 1,15	p<0,001
Hematocrit (%) (ortalama $\bar{x} \pm sd$)	29,05 \pm 2,98	39,41 \pm 2,85	p<0,001
Eritrosit (milyon/mm ³) (ortalama $\bar{x} \pm sd$)	3,7 \pm 0,44	4,88 \pm 0,38	p<0,001
MCHC (g/dL) (ortalama $\bar{x} \pm sd$)	33,09 \pm 1,88	32,60 \pm 1,69	p=0,304
MCV (fL) (ortalama $\bar{x} \pm sd$)	78,64 \pm 3,51	81,09 \pm 6,25	p=0,017
MCH (pg/hücre) (ortalama $\bar{x} \pm sd$)	26,04 \pm 2,18	26,48 \pm 2,81	p=0,629
RDW (%) (ortalama $\bar{x} \pm sd$)	17,08 \pm 3,07	13,60 \pm 0,81	p<0,001
Lenfosit (BIN/mm ³) (ortalama $\bar{x} \pm sd$)	2521,29 \pm 1578,2 (800/9160)	2710,37 \pm 750,5 (1290/4780)	p=0,033
Lenfosit% (ortalama $\bar{x} \pm sd$)	36,06 \pm 10,73	36,79 \pm 8,88	p=0,159
Monosit% (ortalama $\bar{x} \pm sd$)	5,53 \pm 1,35	6,51 \pm 1,76	p=0,023
hs-CRP (mg/dL) (ortalama $\bar{x} \pm sd$)	0,11 \pm 0,13	0,14 \pm 0,28	p=0,876
Ferritin (ng/mL) (ortalama $\bar{x} \pm sd$)	1996,53 \pm 1568,16 (693/6269)	28,46 \pm 28,95 (4/128,1)	p<0,001

Hb, hemoglobin; MCV, ortalama eritrosit hacmi; MCH, ortalama eritrosit hemoglobin; MCHC, ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu; RDW, eritrosit dağılım genişliği; hs-CRP, yüksek sensitif C-reaktif protein; $\bar{x} \pm SEM$, ortalama \pm standart hata.



Şekil 4.1. Kontrol grubu ve talasemi major grubu ferritin konsantrasyonu.

4.1 T Lenfosit Parametreleri

Talasemi major tanılı bireylerin ve kontrol grubunda yer alan bireylerin concanavalin A mitojeni ile uyarılmış ve uyarılmamış olan CD4, CD8 lenfositleri ve active caspase-3 enzimi ile PD-1 antikor parametreleri Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Talasemi major grubundaki bireyler ile kontrol grubunda yer alan bireylerin uyarılmamış olan CD4 ve CD8 lenfosit yüzdeleri arasında bir fark bulunamadı. Uyarılmış olan CD4 ve CD8 lenfosit yüzdeleri arasında da bir fark bulunmamıştır. Grupların CD4 ve CD8 lenfosit ölçümleri Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

4.1.1 T Lenfositlerindeki Active Caspase-3 Enzim İfadesinin Parametreleri

Her iki grupta görülen active caspase-3 ifadesi yani apopitoza uğrayan T lenfositleri arasında herhangi bir fark bulunamadı. Apopitoza uğrayan T lenfosit ölçümleri Tablo 4.2’de sıralanmıştır.

Tablo 4.2. Kontrol grubu ve talasemi major grubundaki T lenfosit, caspase-3 enzim ve PD-1 konsantrasyonları.

Parametreler	Talasemi major (n:31)	Kontrol grubu (n:27)	p değerleri
CD4 S % ortalama ± sd	61,89±20,06	56,69±17,08	0,147
CD4 US % ortalama ± sd	64,83±16,32	58,83±15,28	0,082
CD8S % ortalama ± sd	18,87±8,52	22,17±9,20	0,161
CD8 US % ortalama ± sd	20,94±7,93	22,18±7,61	0,362
CD4+PD1+CAS3+ S % ortalama ± sd	0,50±0,88	0,52±0,69	0,868
CD4+PD1+CAS3+ US % ortalama ± sd	0,51±0,92	0,71±0,86	0,255
CD4+PD1+CAS3-S % ortalama ± sd	9,7±10,23	6,96±7,10	0,422
CD4+PD1+CAS3-US% ortalama ± sd	7,46±6,94	7,23±4,8	0,543
CD4+PD1-CAS3-S% ortalama ± sd	87,29±9,23	89,60±7,57	0,427
CD4+PD1-CAS3-US% ortalama ± sd	89,35±7,16	89,14±5,31	0,905
CD4+PD1-CAS3+S% ortalama ± sd	3,58±3,82	3,05±1,51	0,956
CD4+PD1-CAS3+US% ortalama ± sd	2,69±0,94	2,92±1,34	0,988
CD8+PD1+CAS3+ S% ortalama ± sd	1,60±4,46	0,60±0,85	0,372
CD8+PD1+CAS3+ US% ortalama ± sd	1,80±5,63	0,67±1,03	0,825
CD8+PD1+CAS3-S% ortalama ± sd	15,07±11,17	13,47±10,27	0,726
CD8+PD1+CAS3-US% ortalama ± sd	16,35±16	15,62±10,77	0,634
CD8+PD1-CAS3-S% ortalama ± sd	81,23±12,90	83,73±10,45	0,623
CD8+PD1-CAS3-US% ortalama ± sd	80,04±16,06	82,13±10,97	0,571
CD8+PD1-CAS3+S % ortalama ± sd	2,09±2,11	2,19±1,83	0,667
CD8+PD1-CAS3+US % ortalama ± sd	1,81±1,06	1,59±1,23	0,425

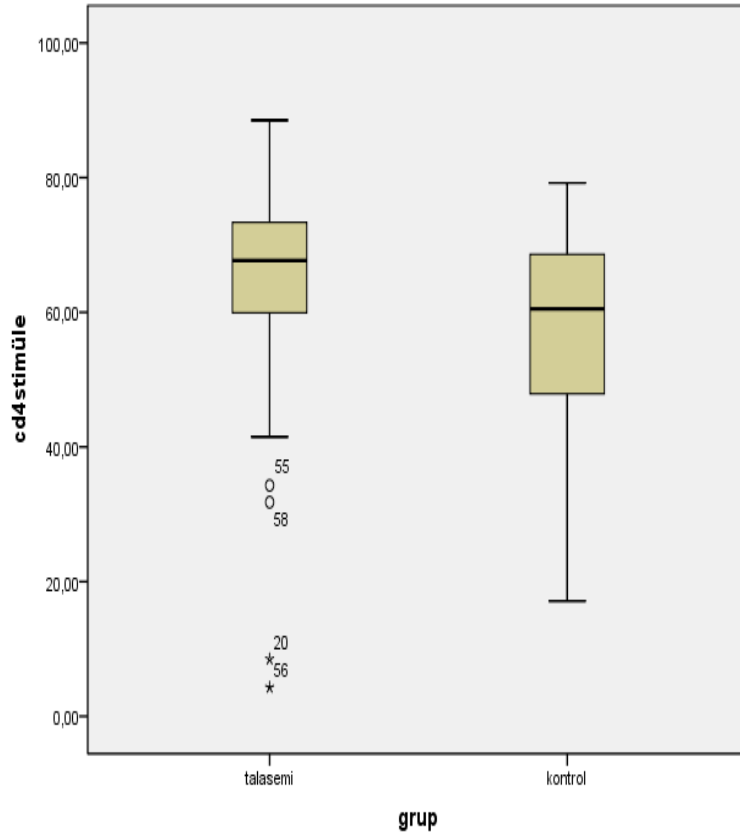
CD4+, T yardımcı hücreler; CD8+, T sitotoksik hücreler; PD-1, Programlanmış hücre ölümü proteini; CAS3, Kaspas-3;US, Stimüle edilmemiş (ConA ile uyarılmamış); S, Stimüle edilmiş (ConA ile uyarılmış); $\bar{x} \pm SEM$, ortalama ± standart hata.

4.1.2 T Lenfositlerindeki PD-1 Antikor İfadesinin Parametreleri

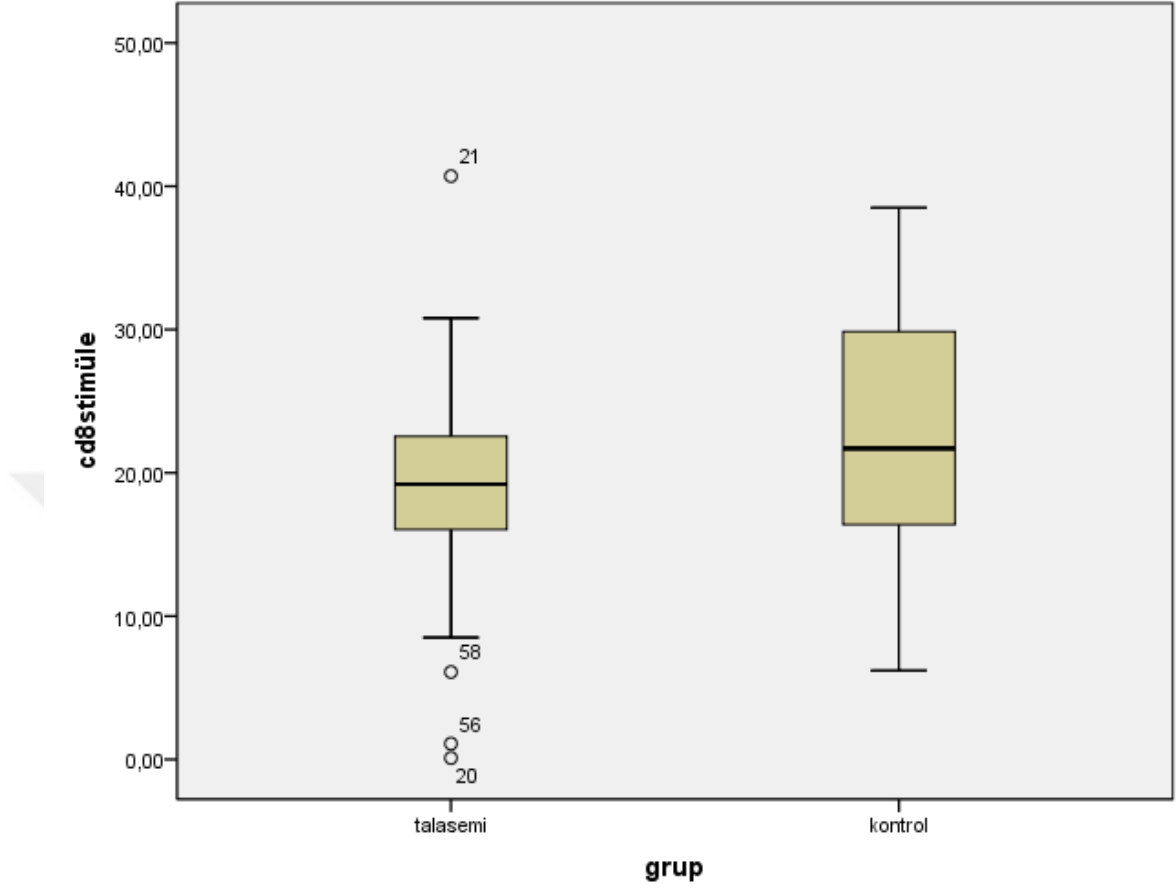
Tüm grupların T lenfositlerindeki PD-1 antikor ölçümleri arasında bir fark bulunamadı. Grupların PD-1 antikor ölçümleri Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

4.1.3 T Lenfositlerindeki Apoptoz ve PD-1 İfadesinin Uyarılmış Olan ve Olmayanlar Arasındaki Parametrelerin Karşılaştırılması

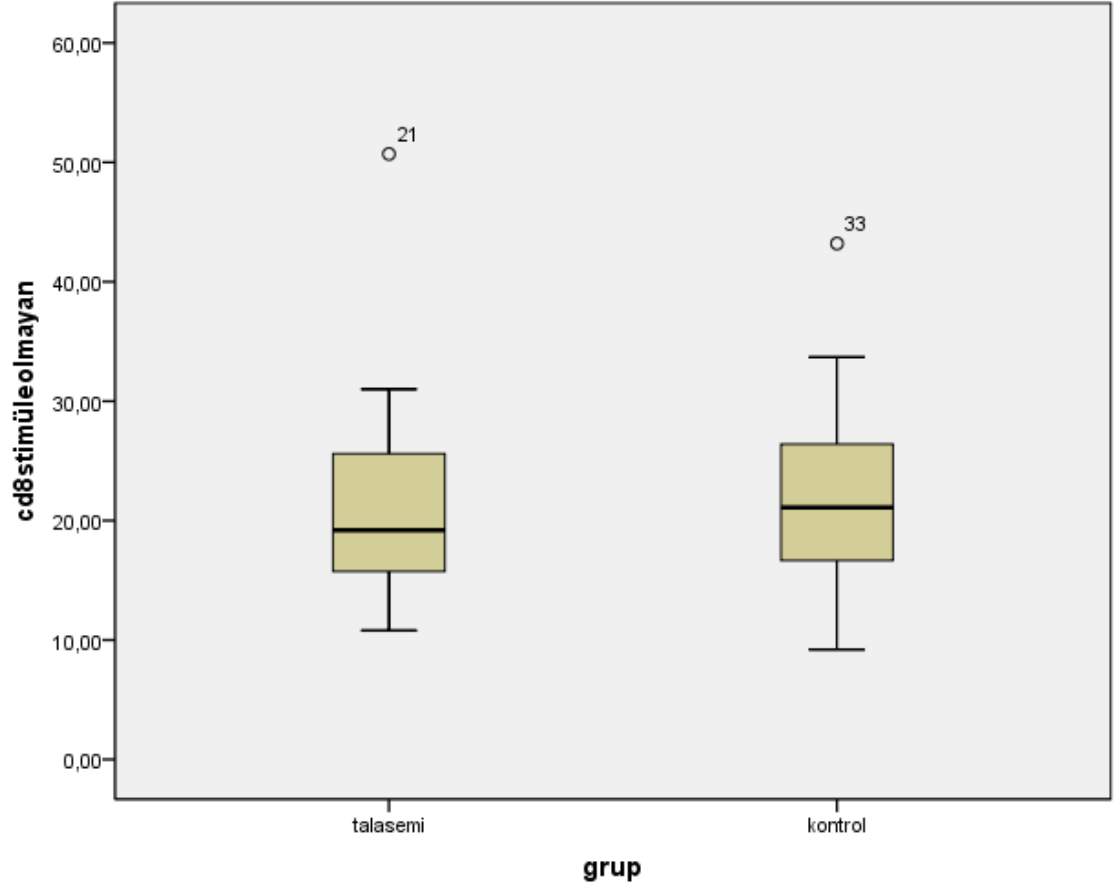
Concanavalin A isimli mitojen ile uyarılan T lenfositleri ve uyarılmamış olan T lenfositlerindeki apoptoz ve PD-1 antikorunun ifadesi grup içinde karşılaştırılmış olup, iki grup içinde de uyarılan ve uyarılmayan T lenfositleri arasında fark bulunamamıştır. Uyarılan ve uyarılmayan T lenfositlerindeki apoptoz ve PD-1 antikor ifadesinde de bir fark bulunamamıştır.



Şekil 4.2 Kontrol grubu ve talasemi grubu CD4S konsantrasyonları.



Şekil 4.3 Kontrol grubu ve talasemi grubu CD8S konsantrasyonları.

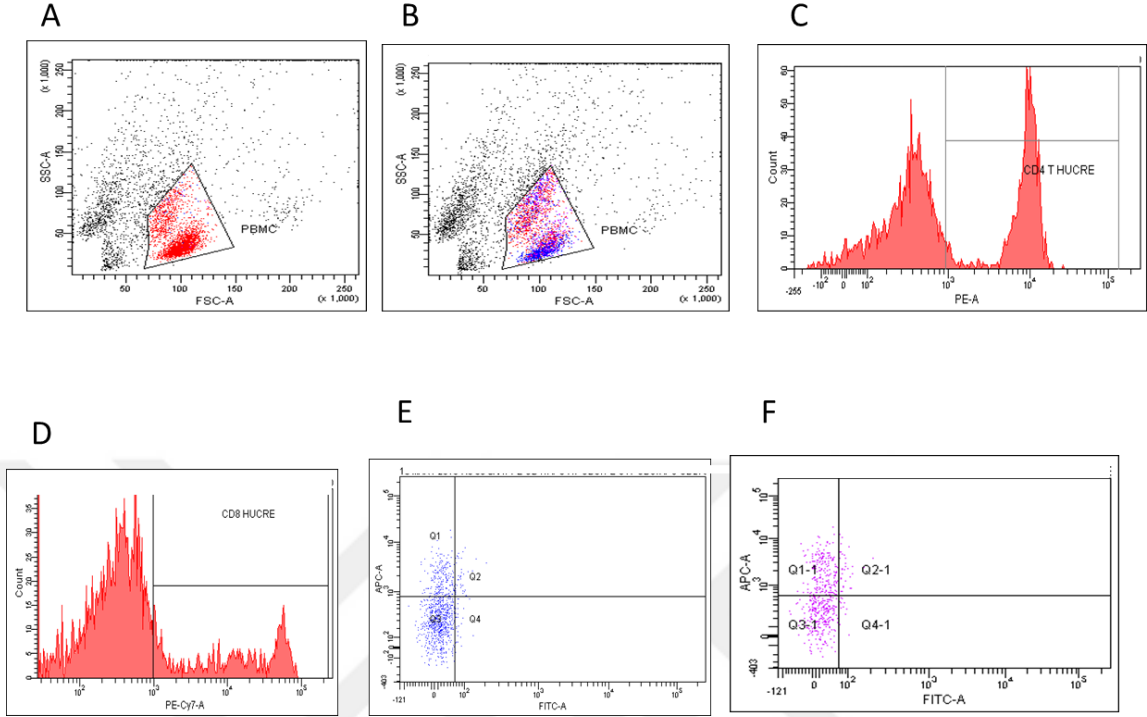


Şekil 4.4 Kontrol grubu ve talasemi grubu CD8US konsantrasyonları.

Tablo 4.3 Kontrol grubu ve talasemi grubu lenfositlerinin uyarılan ve uyarılmayan olarak grup içinde karşılaştırılması.

Parametreler	Talasemi major (n:31) p değeri	Kontrol grubu (n:27) p değeri
CD4S/CD4US	0,518	0,665
CD8S/CD8US	0,659	0,456
CD4+PD1+CAS3+S/CD4+PD1+CAS3+US	0,946	0,201
CD4+PD1+CAS3-S/CD4+PD1+CAS3-US	0,290	0,381
CD4+PD1-CAS3-S/CD4+PD1-CAS3-US	0,221	0,280
CD4+PD1-CAS3+S/CD4+PD1-CAS3+US	0,446	0,819
CD8+PD1+CAS3+S/CD8+PD1+CAS3+US	0,524	0,976
CD8+PD1+CAS3-S/CD8+PD1+CAS3-US	1	0,175
CD8+PD1-CAS3-S/CD8+PD1-CAS3-US	0,969	0,501
CD8+PD1-CAS3+S/CD8+PD1-CAS3+US	0,567	0,220

CD4+, T yardımcı hücreler; CD8+, T sitotoksik hücreler; PD-1, Programlanmış hücre ölümü proteini; CAS3, Kaspas-3;US, Stimüle edilmemiş(ConA ile uyarılmamış); S, Stimüle edilmiş(ConA ile uyarılmış).



Şekil 4.5 Kontrol grubu ve talasemi grubunun flow sitometri görüntüleri. A. Talasemi major olguların T lenfositleri, PBMC, T lenfositlerin bulunduğu kapı; B. Kontrol grubunda yer alan olguların T lenfositleri, PBMC, T lenfositlerin bulunduğu kapı; C. CD4+, T yardımcı hücreler; D. CD8+, T sitotoksik hücreler; E. PD-1, Programlanmış hücre ölümü protein (APC-A) ve CAS3, Kaspas-3 (FITC-A) Talasemi major olgularında; F. PD-1, Programlanmış hücre ölümü protein (APC-A) ve CAS3, Kaspas-3 (FITC-A) kontrol grubunda yer alan olgularda.

4.2 Korelasyonlar

4.2.1 Talasemi Major Grubundaki Bireylerde Görülen Korelasyonlar

Hb konsantrasyonu ile hematokrit konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($r=0,784$, $p<0,001$). Lökosit konsantrasyonu ile trombosit konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon ($r=0,531$, $p=0,002$), nötrofil konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon ($r=0,942$, $p<0,001$), lenfosit konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon ($r=0,754$, $p<0,001$) bulunmuştur. CD4S konsantrasyonu ile lenfosit konsantrasyonu arasında negatif korelasyon bulunmuştur ($r=-0,525$, $p=0,002$). CD4US konsantrasyonu ile eosinofil konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($r=0,578$, $p=0,001$).

Talasemi hastalarının CD4 S (uyarılmış olan) lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD4 US (uyarılmamış olan) lenfositlerinin konsantrasyonları arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($r=0,578$, $p=0,001$). CD4+PD1+CAS3+S lenfosit konsantrasyonları ile

CD8+PD1+CAS3-S lenfosit konsantrasyonları arasında pozitif korelasyon ($r=0,547$, $p=0,001$), CD8+PD1-CAS3-S lenfositleri arasında negatif korelasyon ($r=-0,548$, $p=0,001$) bulunmuştur. CD4+PD1+CAS3+US lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD8+PD1+CAS3+US lenfositlerinin konsantrasyonları arasında ($r=0,551$, $p=0,001$) pozitif korelasyon bulunmuştur. CD4+PD1+CAS3- S lenfositlerinin konsantrasyonu ile CD4+PD1-CAS3- S lenfosit konsantrasyonu arasında negatif ($r=-0,937$, $p<0,001$), CD8+PD1+CAS3- S lenfositleri arasında pozitif ($r=0,690$, $p<0,001$), CD8+PD1-CAS3- S lenfositleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur ($r=-0,691$ $p<0,001$). CD4+PD1+CAS3- US lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD4+PD1-CAS3- US lenfositlerinin konsantrasyonu arasında negatif ($r=-0,940$, $p<0,001$), CD8+PD1+CAS3- S lenfositleri ile pozitif korelasyon ($r=0,546$, $p<0,001$), CD8+PD1+CAS3- US lenfositleri ile pozitif korelasyon ($r=0,760$, $p<0,001$), CD8+PD1-CAS3-S lenfositleri ile negatif korelasyon ($r=-0,551$ $p<0,001$), CD8+PD1-CAS3- US lenfositleri ile negatif korelasyon ($r=-0,837$, $p<0,001$) bulunmuştur.

CD4+PD1-CAS3- S lenfositlerinin parametreleri ile CD4+PD1+CAS3- S lenfositlerinin parametreleri arasında negatif korelasyon ($r=-0,937$, $p=<0,001$), CD8+PD1+CAS3+S lenfositlerinin parametreleri arasında negatif korelasyon ($r=-0,495$, $p=0,005$), CD8+PD1+CAS3-S lenfositlerinin parametreleri arasında negatif korelasyon ($r=-0,677$, $p<0,001$), CD8+PD1-CAS3-S lenfositleri arasında ise pozitif korelasyon bulunmuştur ($r=0,727$, $p<0,001$).

CD4+PD1-CAS3- US lenfositlerinin parametreleri ile CD4+PD1+CAS3- US lenfositlerinin parametreleri negatif korelasyon ($r=-0,940$, $p<0,001$), CD8+PD1+CAS3- S lenfositlerinin parametreleri negatif korelasyon ($r=-0,552$, $p=0,001$), CD8+PD1+CAS3-US lenfositlerinin parametreleri negatif korelasyon ($r=-0,777$, $p<0,001$), CD8+PD1-CAS3-S lenfositleri ile pozitif korelasyon ($r=0,549$, $p=0,001$), CD8+PD1-CAS3-US lenfositleri ile pozitif korelasyon ($r=0,837$, $p<0,001$) bulunmuştur. CD8+PD1+CAS3+S lenfositlerinin parametreleri ile CD4+PD1-CAS3- S lenfositlerinin parametreleri negatif korelasyon ($r=-0,495$, $p=0,005$), CD8+PD1+CAS3- S lenfositlerinin parametreleri pozitif korelasyon ($r=0,586$, $p=0,001$), CD8+PD1-CAS3-S lenfositlerinin parametreleri negatif korelasyon ($r=-0,698$, $p<0,001$) bulunmuştur.

CD8+PD1+CAS3+US lenfositlerinin parametreleri ile CD4+PD1+CAS3+ US lenfositlerinin parametreleri pozitif korelasyon ($r=0,551$, $p=0,001$) bulunmuştur.

CD8+PD1+CAS3- S lenfositlerinin parametreleri; CD4+PD1+CAS3+ S ile pozitif ($r=0,547$, $p=0,001$) CD4+PD1+CAS3- S ile pozitif ($r=0,690$, $p<0,001$), CD4+PD1+CAS3-US ile pozitif ($r=0,546$, $p=0,001$), CD4+PD1-CAS3-S ile negatif ($r=-0,677$, $p<0,001$), CD4+PD1-CAS3- US ile negatif ($r=-0,552$, $p=0,001$), CD8+PD1+CAS3+S ile pozitif ($r=0,586$, $p=0,001$), CD8+PD1-CAS3-S ile negatif ($r=-0,964$, $p<0,001$), CD8+PD1-CAS3- US ile negatif ($r=-0,707$, $p<0,001$) korelasyonlar bulunmuştur.

CD8+PD1+CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonu ile CD4+PD1+CAS3-US ile pozitif ($r=0,760$, $p<0,001$), CD4+PD1-CAS3-US ile negatif ($r=-0,777$, $p<0,001$), CD8+PD1-CAS3-US ile negatif ($r=-0,843$, $p<0,001$) korelasyonlar bulunmuştur. CD8+PD1-CAS3-S lenfosit konsantrasyonları CD4+PD1+CAS3+S ile negatif korelasyon ($r=-0,548$, $p=0,001$), CD4+PD1+CAS3-S ile negatif korelasyon ($r=-0,691$, $p<0,001$), CD4+PD1+CAS3- US ile negatif korelasyon ($r=-0,551$, $p=0,001$), CD4+PD1-CAS3-S ile pozitif korelasyon ($r=0,727$, $p<0,001$), CD4+PD1-CAS3- US ile pozitif korelasyon ($r=0,549$, $p=0,001$), CD8+PD1+CAS3+ S ile negatif korelasyon ($r=-0,695$, $p<0,001$), CD8+PD1+CAS3- S ile negatif korelasyon ($r=-0,964$, $p<0,001$), CD8+PD1-CAS3-US ile pozitif korelasyon ($r=0,686$, $p<0,001$) bulunmuştur.

CD8+PD1-CAS3-US lenfosit konsantrasyonları; CD4+PD1-CAS3-S ile negatif korelasyon ($r=-0,837$, $p<0,001$), CD4+PD1-CAS3-US ile negatif korelasyon ($r=-0,837$, $p<0,001$), CD8+PD1+CAS3-S ile negatif korelasyon ($r=-0,707$, $p<0,001$), CD8+PD1+CAS3-US ile negatif korelasyon ($r=-0,843$, $p<0,001$), CD8+PD1-CAS3-S ile pozitif korelasyon ($r=0,686$, $p<0,001$) bulunmuştur.

4.2.2 Kontrol Grubundaki Bireylerde Görülen Korelasyonlar

Kontrol grubundaki bireylerin CD4 S (uyarılmış olan) lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD4 US (uyarılmamış olan) lenfositlerinin konsantrasyonları arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($r=0,824$, $p<0,001$). Kontrol grubundaki bireylerin CD8S lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD8US (uyarılmamış olan) lenfositlerinin

konsantrasyonları arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($r=0,692$, $p<0,001$). CD4+PD1+CAS3+ S lenfositlerin konsantrasyonları ile CD4+PD1+CAS3-S arasında pozitif ($r=0,539$, $p=0,004$), CD4+PD1-CAS3-S konsantrasyonları arasında negatif ($r=-0,590$, $p=0,001$), CD8+PD1-CAS3-S konsantrasyonları arasında negatif ($r=-0,526$, $p=0,005$) korelasyon bulunmuştur.

CD4+PD1+CAS3+U S lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD4+PD1-CAS3-US konsantrasyonları arasında negatif korelasyon bulunmuştur ($r=-0,682$, $p<0,001$). CD4+PD1+CAS3-S lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD4+PD1+CAS3+S konsantrasyonu ile pozitif ($r=0,539$, $p=0,004$), CD4+PD1+CAS3-US konsantrasyonu ile pozitif ($r=0,563$, $p=0,002$), CD4+PD1-CAS3-S konsantrasyonu ile negatif ($r=-0,934$, $p<0,001$), CD4+PD1-CAS3-US konsantrasyonu ile negatif ($r=-0,531$, $p=0,004$), CD8+PD1+CAS3-S konsantrasyonu ile pozitif ($r=0,888$, $p<0,001$), CD8+PD1+CAS3-US konsantrasyonu ile pozitif ($r=0,545$, $p=0,003$), CD8+PD1-CAS3-S konsantrasyonu ile negatif ($r=-0,992$, $p<0,001$), CD8+PD1-CAS3-US konsantrasyonu ile negatif ($r=-0,555$, $p=0,003$) korelasyon bulunmuştur.

CD4+PD1+CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD4+PD1+CAS3-S konsantrasyonu ile pozitif ($r=0,561$, $p=0,002$), CD4+PD1-CAS3-S konsantrasyonu ile negatif ($r=-0,484$, $p=0,011$), CD4+PD1-CAS3-US konsantrasyonu ile negatif ($r=-0,909$, $p<0,001$), CD8+PD1+CAS3-S konsantrasyonu ile pozitif ($r=0,638$, $p<0,001$), CD8+PD1+CAS3-US konsantrasyonu ile pozitif ($r=0,851$, $p<0,001$), CD8+PD1-CAS3-S konsantrasyonu ile negatif ($r=-0,549$, $p=0,003$), CD8+PD1-CAS3-US konsantrasyonu ile negatif ($r=-0,858$, $p<0,001$) korelasyonlar bulunmuştur. CD4+PD1-CAS3-S lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD4+PD1+CAS3+S lenfositlerinin konsantrasyonları arasında negatif ($r=-0,599$, $p=0,001$), CD4+PD1-CAS3-US konsantrasyonları arasında pozitif ($r=0,502$, $p=0,008$), CD8+PD1+CAS3-S konsantrasyonları arasında negatif ($r=-0,817$, $p<0,001$), CD8+PD1-CAS3-S konsantrasyonları arasında negatif ($r=-0,864$, $p<0,001$) korelasyon bulunmuştur. CD4+PD1-CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD4+PD1+CAS3+US konsantrasyonları arasında negatif ($r=-0,682$, $p<0,001$), CD4+PD1+CAS3-S konsantrasyonları arasında negatif ($r=-0,531$, $p=0,004$), CD4+PD1+CAS3-US

konsantrasyonları arasında negatif ($r=-0,909$, $p<0,001$), CD8+PD1+CAS3-S konsantrasyonları arasında negatif ($r=-0,636$, $p<0,001$), CD8+PD1+CAS3-US konsantrasyonları arasında negatif ($r=-0,740$, $p<0,001$), CD8+PD1-CAS3-S konsantrasyonları arasında pozitif ($r=0,556$, $p=0,003$), CD8+PD1-CAS3-US konsantrasyonları arasında pozitif ($r=0,774$, $p<0,001$) korelasyonlar bulunmuştur.

CD8+PD1+CAS3+S lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD8+PD1-CAS3-S lenfositlerinin konsantrasyonları arasında negatif korelasyon bulunmuştur ($r=-0,569$, $p=0,002$). CD8+PD1+CAS3-S lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD4+PD1+CAS3-S lenfositlerinin konsantrasyonları arasında pozitif ($r=0,888$, $p<0,001$), CD4+PD1+CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonları arasında pozitif ($r=0,638$, $p<0,001$), CD4+PD1-CAS3-S lenfositlerinin konsantrasyonları arasında negatif ($r=-0,817$, $p<0,001$), CD4+PD1-CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonları arasında negatif ($r=-0,636$, $p<0,001$), CD8+PD1+CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonları arasında pozitif ($r=0,696$, $p<0,001$), CD8+PD1-CAS3-S lenfositlerinin konsantrasyonları arasında negatif ($r=-0,948$, $p<0,001$), CD8+PD1-CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonları arasında negatif ($r=-0,700$, $p<0,001$) korelasyonlar bulunmuştur.

CD8+PD1+CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD4+PD1+CAS3-S lenfositlerinin konsantrasyonları arasında pozitif ($r=0,545$, $p=0,003$), CD4+PD1+CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonları arasında pozitif ($r=0,851$, $p<0,001$), CD4+PD1-CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonları arasında negatif ($r=-0,740$, $p<0,001$), CD8+PD1+CAS3-S lenfositlerinin konsantrasyonları arasında pozitif ($r=0,696$, $p<0,001$), CD8+PD1-CAS3-S lenfositlerinin konsantrasyonları arasında negatif ($r=-0,644$, $p<0,001$), CD8+PD1-CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonları arasında negatif ($r=-0,976$, $p<0,001$) korelasyonlar bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Enfeksiyöz komplikasyonlar, beta talasemi major hastalarda ikinci en yaygın ölüm nedenlerinden ve önemli bir morbidite nedeni olup prevalansı %12-13'dür (Elsayh ve ark., 2016). Talasemi major hastalarında enfeksiyon etkenleri çok fazladır. Hastalığın kendisi, tekrarlanan kan nakli, splenektomi, aşırı demir yükü, şelasyon tedavisi, kandaki allojenik antijenlere maruz kalma ve bağışıklık sistemindeki fonksiyon bozuklukları başlıca etkenlerdir (Kadam ve ark., 2014; Noulisri ve ark., 2014; Elsayh ve ark., 2016). Talasemi hastalarında hem humoral hem de hücre aracılı immünitenin anormallikleri bildirilmiştir. Bu anormallikler kantitatif ve işlevseldir ve bağışıklık sisteminin çok sayıda bileşenini içerir. Örneğin artan immünoglobulin üretimi, kompleman sisteminin zayıf etkinliği, opsonizasyon ve granülosit fagositozunun azalması, çoklu transfüzyonlu kan kaynaklı enfeksiyonlar, birlikte varolan bağışıklık sistemi anormalliklerin ayrıca bu hastaların duyarlılığını arttıran enfeksiyonlar bu bileşenler içinde sayılabilir (Kadam ve ark., 2014; Noulisri ve ark., 2014). Bu çalışmalarda, hastaların immünoglobulin üretimi, eksik aktivite kompleman sistemi, azalan opsonizasyon ve granülosit fagositozu gibi immün sisteminde artan anormallikler geniş bir spektrum göstermiştir (Wanachiwanawin ve ark., 1993; Ahluwalia ve ark., 2000). T hücresi gelişimi tamamen CD4+ CD8+ T hücrelerinin geliştiği timusta meydana gelir. Olgun CD4+ ve CD8+ T hücreleri daha sonra timustan çıkar ve sekonder lenfoid organlara girer. CD4+ ve CD8+ T hücreleri, enfeksiyonlara karşı adaptif hücresel immün yanıtın ana kısmıdır (Nascimbeni ve ark., 2004; Noulisri ve ark., 2014; Waschbisch ve ark., 2014). Ayrıca, tekrarlanan transfüzyonlar talasemi hastalarında immün dengesinin bozulmasına yol açan sürekli bir allo-antijen stimülasyonuna yol açar. Önceki araştırmalar fazla demirin, monosit-makrofaj sisteminin baskılanması, CD8'i arttıran T-lenfositlerinin alt popülasyonlarındaki değişimlerini, komplikasyon sisteminin işlevinin inhibe edilmesini içeren immünolojik fonksiyonlar üzerindeki olumsuz etkisini göstermiştir (S. C. Wang ve ark., 2003; Zahran ve ark., 2016). Talasemi major hastalarında sık transfüzyonlar, hemoglobinde değişikliklere ve transferrin bağlı olmayan demirin (NTBI) artmasına neden olur. Gelişmiş şelasyon tedavilerine rağmen aşırı demir yükünün, organ yetmezliği, enfeksiyon, oksidatif stres ve kronik enflamasyon riski vardır. Bu da tümör

nekroz faktörü a, interlökin (IL) 2, 10 ve pro- ve anti-enflamatuar protein seviyelerinin yükselmesine neden olur. C-reaktif protein (hsCRP) duyarlılığının yüksek olması gibi (Del Vecchio ve ark., 2002; P. B. Walter ve ark., 2008). Bu proteinler lökosit proliferasyonunu ve apoptotik hücre ölümünü dengeleyerek enfeksiyon ve doku hasarına tepki ve çözüme katkıda bulunur. Talasemi hastaları, transfüzyonlar, NTBI, şelasyon ve organ yaralanması ile kronik olarak immüno-stimüle edilir ve enflamasyonun çözünürlüğü olmadan kronik enflamatuar protein üretimi vardır. İnflamatuar bölgelerdeki immün hücrelerin kalıcılığı veya eksikliği veya β -talasemi hastalarında gözlenen kronik enflamasyonun gelişmesi apoptotik hücre ölüm yolunun düzensizliğinden kaynaklanabilir (Scheel-Toellner ve ark., 2004). Ayrıca, artan apoptoz nötrofil fonksiyonunu azaltır (Whyte ve ark., 1993) ve talasemi hastalarında artmış enfeksiyon riskine katkıda bulunabilir. Talasemi hastalarında ROS (malondialdehit, MDA gibi) ve inflamasyon (CRP ve IL10 gibi) belirteçleri artmıştır (P. B. Walter ve ark., 2008). Aşırı demir yükü lökosit mitokondriyal disfonksiyonunu artırır (P. B. Walter ve ark., 2002) ve ayrıca artan apoptotik mekanizmalara da neden olabilir (Ichii ve ark., 2012). Biz de çalışmamızda talasemi hastalarının T lenfositlerindeki apoptozu ve bu lenfositlerde ki PD-1 oranlarını sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırdık. Talasemi hastalarının T lenfositleri ile kontrol grubundaki bireylerin lenfositleri arasında bir fark bulunamadı. Apoptoza giden T lenfosit ölçümleri de iki grupta farklılık göstermedi. Ferritin ölçümleri sonucunda talasemi major tanılı olguların kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek bulundu.

Naif T hücreleri efektör hücrelere farklılaştığında, aktivasyon gereksinimlerini değiştirir. Naif T hücrelerinin aksine, efektör T hücreleri tek başına TCR sinyali ile aktive edilebilir (Dubey ve ark., 1996; Swain ve ark., 1996). Efektör T hücreleri kolayca aktive edilebildiğinden, negatif düzenleyici sistemleri, çevresel toleransın korunmasında hayati rol oynar. Bununla birlikte, periferde efektör T hücrelerinin istenmeyen veya aşırı aktivasyonunu önleyen mekanizma hakkında çok az şey bilinmektedir (Iwai ve ark., 2003). CD28 ailesinin bir üyesi olan PD-1, bağışıklık sisteminin negatif bir düzenleyicisidir (Nishimura ve Honjo, 2001). PD-1, T hücrelerinde, B hücrelerinde ve miyeloid hücrelerinde in vitro aktivasyon üzerine indüklenir (Agata ve ark., 1996) fakat ağırlıklı olarak in vivo aktif T hücrelerinde eksprese edilir (Iwai ve ark., 2002). Talasemi

hastalarında önemli bir sorun olan enfeksiyöz komplikasyonların demir birikimine bağlı olduğu düşünülerek bir çok çalışma yapılmış ancak olay döngüsünün mekanizması tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Biz de çalışmamızda demir birikimine bağlı olan immünolojik anormallikleri araştırırken T hücre aktivasyonunu negatif yönde up-regüle eden PD-1 molekülünün talasemi hastaları ile sağlıklı bireyleri karşılaştırıp enfeksiyöz komplikasyonlarında ki rolünü aydınlatmak istedik. Literatürde talasemi hastalarında PD-1 molekülünün çalışıldığı bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu sebeple çalışmamız literatürde ilk çalışma olarak yerini alacaktır. Talasemi hastalarının T lenfositlerindeki PD-1 ve apoptozis oranları ve bunlarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Hasta sayımızın yetersiz ve yaşlarının homojenize olamaması, yada demir birikimi farklılıkları sonuçları etkilemiş olabilir. Ayrıca PD-1 molekülü periferde ve dokularda daha farklı oranlarda da bulunabilir. Talasemi grubumuza immünolojik olarak farklılık gösterebilir diye splenektomi olmuş bireyler dahil edilmedi. Ancak, transfüzyon sıklığı veya demir birikimi farklılığı sonuçları etkilemiş olabilir. Talasemi major hastalarında artmış lökosit apoptozu bildiren çalışmaların (P. B. Walter ve ark., 2013) tersine çalışmamızda Tm hastalarında lökosit apoptozu normal olarak ve sağlıklı bireylerle aynı aralıklarda bulundu. Başka bir çalışmada talasemili hastalarda demir şelatörler olan defaroksamin ve deferipronun lökosit sitokin üretimini azalttığı belirtilmiştir (Del Vecchio ve ark., 2002). Yapılan bir çalışmada splenektomi olan ve olmayan talasemi hastalarının T lenfosit alt kümelerine bakılmış ve splenektomili olgularda T lenfosit alt kümeleri kontrol grubuna göre farklılık gösterirken splenektomi yapılmayan olgularda anlamlı bir fark bulunamamıştır. (Pattanapanyasat ve ark., 2000). Çalışmamıza splenektomi olmamış talasemili bireyler dahil edildi Kronik transfüzyonlu talasemi hastalarında CD8+ T hücre sayılarının arttığı CD4+/CD8+ T hücre sayılarının azaldığı bir çalışmada bu immün sistemdeki değişimlerin kan transfüzyonu miktarı ile ilgili olabileceği belirtilmiştir (Grady ve ark., 1985). Bizim çalışmamızda hem yeni transfüzyona başlamış talasemi hastaları hemde kronik transfuse edilen talasemi hastaları dahil edilmiştir. Çalışmamız talasemi hastalarının immün sistem hücrelerinde farklılık bulunamayan diğer çalışmaları destekler niteliktedir. Ancak, talasemi hastalarındaki klinik heterojenite sonuçlarda farklılık gösterebilir. Hem aşırı demir emilimi hem de kronik kan transfüzyonu lenfositlerin dalak ve lenf düğümlerinden dolaşım havuzuna ve

bunun tersine regülasyonu ve dağılımını etkileyebilir. Ayrıca kronik viral enfeksiyon, demir şelasyonu gibi faktörler de lenfosit gruplarını etkileyebilir. Bu durum, akış sitometri (Flow Sitometri) ölçümü yapılırken kapıda yer almayan lenfositlerin kontaminasyona uğradığının bir göstergesi olabilir. Talasemi hastalarının T lenfositlerindeki PD-1 inhibitör düzeyleri sağlıklı grubun PD-1 düzeyleri arasında farklılık bulunamadı. Ancak, talasemi major grubuna dahil edilen hastaların yaşları, toplam transfüzyon sayıları arasında farklılıklar bulunması çalışma sonuçlarımızı etkilemiş olabilir. Bu çalışma için daha homojen bir grup oluşturulup çalışma detaylandırılabilir. Talasemi hastalarında PD-1 düzeylerini ölçtük, PD-1 aktivitesini ölçmek için ligandlarından olan PD-L1'e bakılabilir. Periferde sayımı yapılan PD-1'in demir birikimin fazla olduğu karaciğer gibi dokularda ölçümleri yapılabilir. Bu şekilde demir birikimi ile PD-1 ilişkisi daha ayrıntılı olarak aydınlatılabilir. Aşırı demir birikimi bağışıklık fonksiyonunu baskıladığı gibi PD-1 fonksiyonunu da baskılayabilir, PD-1 fonksiyonunun belirteçleri olan sitokin ve ligandları birlikte bakılabilir. Yorgun CD8+ T hücreleri IL-2 ve TNF- α üretmez ve enfekte hücreleri parçalayıp yok edemez. CD8+ T hücreleri ile birlikte IL-2 ve TNF- α bakılabilir. Bu sebeple daha ayrıntılı çalışmalar yapılarak geliştirilebilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmanın sonuçlarını şu şekilde özetleyebiliriz:

1. Talasemi grubunda yer alan bireyler ile talasemi major grubunda yer alan bireylerin yaşları arasında bir fark bulunamamıştır.
2. Talasemi grubunda yer alan bireylerin hemoglobin değerleri, kontrol grubundakilerin Hb değerlerinden daha düşük bulunmuştur.
3. Kontrol grubundaki bireylerin hematokrit, eritrosit değerleri TM tanılı bireylerin değerlerinden daha yüksek bulunmuştur.
4. Talasemi major tanılı olguların MCV değerleri kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur.
5. Talasemi major tanılı olguların luc%, luc, lenfosit, monosit% değerleri, kontrol grubundaki bireylere oranla daha düşük bulunmuştur.
6. Çalışmaya dahil edilen 2 grupta hs-CRP düzeyleri normal aralıklarda bulunmuştur.
7. Talasemi major grubundakilerin ferritin değerleri kontrol grubundakilere oranla anlamlı derece de yüksek bulunmuştur.
8. Talasemi major grubundaki bireyler ile kontrol grubunda yer alan bireylerin uyarılmamış olan CD4 ve CD8 lenfosit yüzdeleri arasında bir fark bulunamadı.
9. Talasemi major grubundaki bireyler ile kontrol grubunda yer alan bireylerin uyarılmış olan CD4 ve CD8 lenfosit yüzdeleri arasında bir fark bulunamadı.
10. Her iki grupta görülen active caspase-3 ifadesi yani apoptoza uğrayan T lenfositleri arasında herhangi bir fark bulunamadı.
11. Tüm grupların T lenfositlerindeki PD-1 antikor ölçümleri arasında bir fark bulunamadı.
12. Concanavalin A isimli mitojen ile uyarılan T lenfositleri ve uyarılmamış olan T lenfositlerindeki apoptoz ve PD-1 antikorunun ifadesi grup içinde karşılaştırılmış olup, iki grup içinde de uyarılan ve uyarılmayan T lenfositleri arasında fark bulunamamıştır.

Talasemi Hastalarında Görülen Korelasyonlar

1. Hb konsantrasyonu ile hematokrit konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon bulunmuştur.

2. Lökosit konsantrasyonu ile trombosit konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon, nötrofil konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon, lenfosit konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon bulunmuştur.
3. CD4S konsantrasyonu ile lenfosit konsantrasyonu arasında negatif korelasyon bulunmuştur.
4. CD4US konsantrasyonu ile eosinofil konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon bulunmuştur.
5. Talasemi hastalarının CD4 S (uyarılmış olan) lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD4 US (uyarılmamış olan) lenfositlerinin konsantrasyonları arasında pozitif korelasyon bulunmuştur.
6. CD4+PD1+CAS3+S lenfosit konsantrasyonları ile CD8+PD1+CAS3-S lenfosit konsantrasyonları arasında pozitif korelasyon, CD8+PD1-CAS3-S lenfositleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur.
7. CD4+PD1+CAS3+US lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD8+PD1+CAS3+US lenfositlerinin konsantrasyonları arasında pozitif korelasyon bulunmuştur.
8. CD4+PD1+CAS3- S lenfositlerinin konsantrasyonu ile CD4+PD1-CAS3- S lenfosit konsantrasyonu arasında negatif, CD8+PD1+CAS3- S lenfositleri arasında pozitif, CD8+PD1-CAS3-S lenfositleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur.
9. CD4+PD1+CAS3- US lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD4+PD1-CAS3- US lenfositlerinin konsantrasyonu arasında negatif, CD8+PD1+CAS3- S lenfositleri ile pozitif korelasyon, CD8+PD1+CAS3- US lenfositleri ile pozitif korelasyon, CD8+PD1-CAS3-S lenfositleri ile negatif korelasyon, CD8+PD1-CAS3- US lenfositleri ile negatif korelasyon bulunmuştur.
10. CD4+PD1-CAS3- S lenfositlerinin parametreleri ile CD4+PD1+CAS3- S lenfositlerinin parametreleri arasında negatif korelasyon, CD8+PD1+CAS3+S lenfositlerinin parametreleri arasında negatif korelasyon, CD8+PD1+CAS3-S lenfositlerinin parametreleri arasında negatif korelasyon, CD8+PD1-CAS3-S lenfositleri arasında ise pozitif korelasyon bulunmuştur.
11. CD4+PD1-CAS3- US lenfositlerinin parametreleri ile CD4+PD1+CAS3- US lenfositlerinin parametreleri negatif korelasyon, CD8+PD1+CAS3- S lenfositlerinin

parametreleri negatif korelasyon, CD8+PD1+CAS3-US lenfositlerinin parametreleri negatif korelasyon, CD8+PD1-CAS3-S lenfositleri ile pozitif korelasyon, CD8+PD1-CAS3-US lenfositleri ile pozitif korelasyon bulunmuştur.

12. CD8+PD1+CAS3+S lenfositlerinin parametreleri ile CD4+PD1-CAS3- S lenfositlerinin parametreleri negatif korelasyon, CD8+PD1+CAS3- S lenfositlerinin parametreleri pozitif korelasyon, CD8+PD1-CAS3-S lenfositlerinin parametreleri negatif korelasyon bulunmuştur.

13. CD8+PD1+CAS3+US lenfositlerinin parametreleri ile CD4+PD1+CAS3+ US lenfositlerinin parametreleri pozitif korelasyon bulunmuştur.

14. CD8+PD1+CAS3- S lenfositlerinin parametreleri; CD4+PD1+CAS3+ S ile pozitif, CD4+PD1+CAS3- S ile pozitif, CD4+PD1+CAS3-US ile pozitif, CD4+PD1-CAS3-S ile negatif, CD4+PD1-CAS3- US ile negatif, CD8+PD1+CAS3+S ile pozitif, CD8+PD1-CAS3-S ile negatif, CD8+PD1-CAS3- US ile negatif korelasyonlar bulunmuştur.

15. CD8+PD1+CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonu ile CD4+PD1+CAS3-US ile pozitif, CD4+PD1-CAS3-US ile negatif, CD8+PD1-CAS3-US ile negatif korelasyonlar bulunmuştur.

16. CD8+PD1-CAS3-S lenfosit konsantrasyonları CD4+PD1+CAS3+S ile negatif korelasyon, CD4+PD1+CAS3-S ile negatif korelasyon, CD4+PD1+CAS3- US ile negatif korelasyon, CD4+PD1-CAS3-S ile pozitif korelasyon, CD4+PD1-CAS3- US ile pozitif korelasyon, CD8+PD1+CAS3+ S ile negatif korelasyon, CD8+PD1+CAS3- S ile negatif korelasyon, CD8+PD1-CAS3-US ile pozitif korelasyon bulunmuştur.

17. CD8+PD1-CAS3-US lenfosit konsantrasyonları; CD4+PD1-CAS3-S ile negatif korelasyon, CD4+PD1-CAS3-US ile negatif korelasyon, CD8+PD1+CAS3-S ile negatif korelasyon, CD8+PD1+CAS3-US ile negatif korelasyon, CD8+PD1-CAS3-S ile pozitif korelasyon bulunmuştur.

Kontrol Grubunda Görülen Korelasyonlar

1. Kontrol grubundaki bireylerin CD4 S (uyarılmış olan) lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD4 US (uyarılmamış olan) lenfositlerinin konsantrasyonları arasında pozitif korelasyon bulunmuştur.

2. Kontrol grubundaki bireylerin CD8S lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD8US (uyarılmamış olan) lenfositlerinin konsantrasyonları arasında pozitif korelasyon bulunmuştur.
4. CD4+PD1+CAS3+ S lenfositlerin konsantrasyonları ile CD4+PD1+CAS3-S arasında pozitif, CD4+PD1-CAS3-S konsantrasyonları arasında negatif, CD8+PD1-CAS3-S konsantrasyonları arasında negatif korelasyon bulunmuştur.
5. CD4+PD1+CAS3+U S lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD4+PD1-CAS3-US konsantrasyonları arasında negatif korelasyon bulunmuştur.
6. CD4+PD1+CAS3-S lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD4+PD1+CAS3+S konsantrasyonu ile pozitif, CD4+PD1+CAS3-US konsantrasyonu ile pozitif, CD4+PD1-CAS3-S konsantrasyonu ile negatif, CD4+PD1-CAS3-US konsantrasyonu ile negatif, CD8+PD1+CAS3-S konsantrasyonu ile pozitif, CD8+PD1+CAS3-US konsantrasyonu ile pozitif, CD8+PD1-CAS3-S konsantrasyonu ile negatif, CD8+PD1-CAS3-US konsantrasyonu ile negatif korelasyon bulunmuştur.
7. CD4+PD1+CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD4+PD1+CAS3-S konsantrasyonu ile pozitif, CD4+PD1-CAS3-S konsantrasyonu ile negatif, CD4+PD1-CAS3-US konsantrasyonu ile negatif, CD8+PD1+CAS3-S konsantrasyonu ile pozitif, CD8+PD1+CAS3-US konsantrasyonu ile pozitif, CD8+PD1-CAS3-S konsantrasyonu ile negatif, CD8+PD1-CAS3-US konsantrasyonu ile negatif korelasyonlar bulunmuştur.
8. CD4+PD1-CAS3-S lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD4+PD1+CAS3+S lenfositlerinin konsantrasyonları arasında negatif, CD4+PD1-CAS3-US konsantrasyonları arasında pozitif, CD8+PD1+CAS3-S konsantrasyonları arasında negatif, CD8+PD1-CAS3-S konsantrasyonları arasında negatif korelasyon bulunmuştur.
9. CD4+PD1-CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD4+PD1+CAS3+US konsantrasyonları arasında negatif, CD4+PD1+CAS3-S konsantrasyonları arasında negatif, CD4+PD1+CAS3-US konsantrasyonları arasında negatif, CD8+PD1+CAS3-S konsantrasyonları arasında negatif, CD8+PD1+CAS3-US konsantrasyonları arasında negatif, CD8+PD1-CAS3-S konsantrasyonları arasında pozitif, CD8+PD1-CAS3-US konsantrasyonları arasında pozitif korelasyonlar bulunmuştur.
10. CD8+PD1+CAS3+S lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD8+PD1-CAS3-S lenfositlerinin konsantrasyonları arasında negatif korelasyon bulunmuştur.

11. CD8+PD1+CAS3-S lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD4+PD1+CAS3-S lenfositlerinin konsantrasyonları arasında pozitif, CD4+PD1+CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonları arasında pozitif, CD4+PD1-CAS3-S lenfositlerinin konsantrasyonları arasında negatif, CD4+PD1-CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonları arasında negatif, CD8+PD1+CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonları arasında pozitif, CD8+PD1-CAS3-S lenfositlerinin konsantrasyonları arasında negatif, CD8+PD1-CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonları arasında negatif korelasyonlar bulunmuştur.

12. CD8+PD1+CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonları ile CD4+PD1+CAS3-S lenfositlerinin konsantrasyonları arasında pozitif, CD4+PD1+CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonları arasında pozitif, CD4+PD1-CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonları arasında negatif, CD8+PD1+CAS3-S lenfositlerinin konsantrasyonları arasında pozitif, CD8+PD1-CAS3-S lenfositlerinin konsantrasyonları arasında negatif, CD8+PD1-CAS3-US lenfositlerinin konsantrasyonları arasında negatif korelasyonlar bulunmuştur.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre önerilerimiz;

1. Talasemi hastalarının T lenfositlerindeki PD-1 inhibitör düzeyleri sağlıklı grubun PD-1 düzeyleri arasında farklılık bulunamadı. Ancak, talasemi major grubuna dahil edilen hastaların yaşları, toplam transfüzyon sayıları arasında farklılıklar bulunması çalışma sonuçlarımızı etkilemiş olabilir. Bu çalışma için daha homojen bir grup oluşturulup çalışma detaylandırılabilir.
2. Talasemi hastalarında PD-1 düzeylerini ölçtük, PD-1 aktivitesini ölçmek için ligandlarından olan PD-L1'e bakılabilir.
3. Periferde sayımı yapılan PD-1'in demir birikimin fazla olduğu karaciğer gibi dokularda ölçümleri yapılabilir. Bu şekilde demir birikimi ile PD-1 ilişkisi daha ayrıntılı olarak aydınlatılabilir.
4. Aşırı demir birikimi bağışıklık fonksiyonunu baskıladığı gibi PD-1 fonksiyonunu da baskılayabilir, PD-1 fonksiyonunun belirteçleri olan sitokin ve ligandları birlikte bakılabilir.
5. Yorgun CD8+ T hücreleri IL-2 ve TNF- α üretmez ve enfekte hücreleri parçalayıp yok edemez. CD8+ T hücreleri ile birlikte IL-2 ve TNF- α bakılabilir.

KAYNAKLAR

Abbas, A. K., Murphy, K. M., & Sher, A. Functional diversity of helper t lymphocytes. *Nature*. 1996; 383 (6603): 787-793.

Adamkiewicz, T. V., Berkovitch, M., Krishnan, C., Polsinelli, C., Kermack, D., & Olivieri, N. F. Infection due to yersinia enterocolitica in a series of patients with beta-thalassemia: Incidence and predisposing factors. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1998; 27 (6): 1362-1366.

Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., & Honjo, T. Expression of the pd-1 antigen on the surface of stimulated mouse t and b lymphocytes. *International immunology*. 1996; 8 (5): 765-772.

Agerberth, B., & Gudmundsson, G. H. Host antimicrobial defence peptides in human disease. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006; 306: 67-90.

Ahluwalia, J., Datta, U., Marwaha, R. K., & Sehgal, S. Immune functions in splenectomized thalassaemic children. *Indian journal of pediatrics*. 2000; 67 (12): 871-876.

Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Sharpe, A. H., . . . Ahmed, R. Restoring function in exhausted cd8 t cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006; 439 (7077): 682-687.

Bazrgar, M., Peiravian, F., Abedpour, F., & Karimi, M. Causes for hospitalization and death in iranian patients with beta-thalassemia major. *Pediatric hematology and oncology*. 2011; 28 (2): 134-139.

Bisharat, N., Omari, H., Lavi, I., & Raz, R. Risk of infection and death among post-splenectomy patients. *The Journal of infection*. 2001; 43 (3): 182-186.

Bonkovsky, H. L., Banner, B. F., Lambrecht, R. W., & Rubin, R. B. Iron in liver diseases other than hemochromatosis. *Seminars in liver disease*. 1996; 16 (1): 65-82.

Boscolo, P., Di Gioacchino, M., Sabbioni, E., Benvenuti, F., Conti, P., Reale, M., . . . Giuliano, G. Expression of lymphocyte subpopulations, cytokine serum levels, and blood and urinary

trace elements in asymptomatic atopic men exposed to an urban environment. *International archives of occupational and environmental health*. 1999; 72 (1): 26-32.

Bour-Jordan, H., Esensten, J. H., Martinez-Llordella, M., Penaranda, C., Stumpf, M., & Bluestone, J. A. Intrinsic and extrinsic control of peripheral t-cell tolerance by costimulatory molecules of the cd28/ b7 family. *Immunological reviews*. 2011; 241 (1): 180-205.

Breuer, W., Hershko, C., & Cabantchik, Z. I. The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism. *Transfusion science*. 2000; 23 (3): 185-192.

Byers, B. R., & Arceneaux, J. E. Microbial iron transport: Iron acquisition by pathogenic microorganisms. *Metal ions in biological systems*. 1998; 35: 37-66.

Canatan, D., Kose, M. R., Ustundag, M., Haznedaroglu, D., & Ozbas, S. Hemoglobinopathy control program in turkey. *Community genetics*. 2006; 9 (2): 124-126.

Cantinieaux, B., Janssens, A., Boelaert, J. R., Lejeune, M., Vermynen, C., Kerrels, V., . . . Fondu, P. Ferritin-associated iron induces neutrophil dysfunction in hemosiderosis. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1999; 133 (4): 353-361.

Cantu, I., & Philipsen, S. Flicking the switch: Adult hemoglobin expression in erythroid cells derived from cord blood and human induced pluripotent stem cells. *Haematologica*. 2014; 99 (11): 1647-1649.

Cappellini, M. D., Poggiali, E., Taher, A. T., & Musallam, K. M. Hypercoagulability in beta-thalassemia: A status quo. *Expert review of hematology*. 2012; 5 (5): 505-511; quiz 512.

Cardier, J. E., Romano, E., & Soyano, A. Lipid peroxidation and changes in t lymphocyte subsets and lymphocyte proliferative response in experimental iron overload. *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 1995; 17 (4): 705-717.

Cardier, J. E., Romano, E., & Soyano, A. T lymphocytes subsets in experimental iron overload. *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 1997; 19 (1): 75-87.

Carreno, B. M., & Collins, M. The b7 family of ligands and its receptors: New pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annual review of immunology*. 2002; 20: 29-53.

Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H., & Riley, J. L. Shp-1 and shp-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human t cell stimulation, but only receptor ligation prevents t cell activation. *J Immunol*. 2004; 173 (2): 945-954.

Chinen, J., & Shearer, W. T. Basic and clinical immunology. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003; 111 (3 Suppl): S813-818.

Cunningham, M. N., DG. Orkin, SH. (2009). Hematology of infancy and childhood. In W. Philadelphia (Ed.), *The thalassemias* (pp. 1015-1106).

Day, C. L., Kaufmann, D. E., Kiepiela, P., Brown, J. A., Moodley, E. S., Reddy, S., . . . Walker, B. D. Pd-1 expression on hiv-specific t cells is associated with t-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 2006; 443 (7109): 350-354.

de Montalembert, M., Girot, R., Mattlinger, B., & Lefrere, J. J. Transfusion-dependent thalassemia: Viral complications (epidemiology and follow-up). *Seminars in hematology*. 1995; 32 (4): 280-287.

Del Vecchio, G. C., Schettini, F., Piacente, L., De Santis, A., Giordano, P., & De Mattia, D. Effects of deferiprone on immune status and cytokine pattern in thalassaemia major. *Acta haematologica*. 2002; 108 (3): 144-149.

Dilek, N., Poirier, N., Hulin, P., Coulon, F., Mary, C., Ville, S., . . . Vanhove, B. Targeting cd28, ctla-4 and pd-l1 costimulation differentially controls immune synapses and function of human regulatory and conventional t-cells. *PloS one*. 2013; 8 (12): e83139.

Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., & Chen, L. B7-h1, a third member of the b7 family, co-stimulates t-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature medicine*. 1999; 5 (12): 1365-1369.

Dubey, C., Croft, M., & Swain, S. L. Naive and effector cd4 t cells differ in their requirements for t cell receptor versus costimulatory signals. *J Immunol.* 1996; 157 (8): 3280-3289.

Elsayh, K. I., Mohammed, W. S., Zahran, A. M., & Saad, K. Leukocytes apoptosis and adipocytokines in children with beta thalassemia major. *Clinical and experimental medicine.* 2016; 16 (3): 345-350.

Farmakis, D., Giakoumis, A., Polymeropoulos, E., & Aessopos, A. Pathogenetic aspects of immune deficiency associated with beta-thalassemia. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research.* 2003; 9 (1): RA19-22.

Feng, X. B., Yang, X. Q., & Shen, J. Influence of iron deficiency on serum igg subclass and pneumococcal polysaccharides specific igg subclass antibodies. *Chinese medical journal.* 1994; 107 (11): 813-816.

Francisco, L. M., Sage, P. T., & Sharpe, A. H. The pd-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological reviews.* 2010; 236: 219-242.

Francisco, L. M., Salinas, V. H., Brown, K. E., Vanguri, V. K., Freeman, G. J., Kuchroo, V. K., & Sharpe, A. H. Pd-l1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory t cells. *The Journal of experimental medicine.* 2009; 206 (13): 3015-3029.

Frauwirth, K. A., & Thompson, C. B. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *The Journal of clinical investigation.* 2002; 109 (3): 295-299.

Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., . . . Honjo, T. Engagement of the pd-1 immunoinhibitory receptor by a novel b7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine.* 2000; 192 (7): 1027-1034.

Grady, R. W., Akbar, A. N., Giardina, P. J., Hilgartner, M. W., & de Sousa, M. Disproportionate lymphoid cell subsets in thalassaemia major: The relative contributions of transfusion and splenectomy. *British journal of haematology.* 1985; 59 (4): 713-724.

Haxhinasto, S., Mathis, D., & Benoist, C. The akt-mtor axis regulates de novo differentiation of cd4+foxp3+ cells. *The Journal of experimental medicine.* 2008; 205 (3): 565-574.

Hill, P. J., Cockayne, A., Landers, P., Morrissey, J. A., Sims, C. M., & Williams, P. Sirr, a novel iron-dependent repressor in staphylococcus epidermidis. *Infection and immunity*. 1998; 66 (9): 4123-4129.

Hodge, G., Lloyd, J. V., Hodge, S., Story, C., & Han, P. Functional lymphocyte immunophenotypes observed in thalassaemia and haemophilia patients receiving current blood product preparations. *British journal of haematology*. 1999; 105 (3): 817-825.

Hofmeyer, K. A., Jeon, H., & Zang, X. The pd-1/pd-l1 (b7-h1) pathway in chronic infection-induced cytotoxic t lymphocyte exhaustion. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011; 2011: 451694.

Huisman, T. H. The structure and function of normal and abnormal haemoglobins. *Bailliere's clinical haematology*. 1993; 6 (1): 1-30.

Ichii, H., Masuda, Y., Hassanzadeh, T., Saffarian, M., Gollapudi, S., & Vaziri, N. D. Iron sucrose impairs phagocytic function and promotes apoptosis in polymorphonuclear leukocytes. *American journal of nephrology*. 2012; 36 (1): 50-57.

Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., & Honjo, T. Induced expression of pd-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal*. 1992; 11 (11): 3887-3895.

Iwai, Y., Okazaki, T., Nishimura, H., Kawasaki, A., Yagita, H., & Honjo, T. Microanatomical localization of pd-1 in human tonsils. *Immunology letters*. 2002; 83 (3): 215-220.

Iwai, Y., Terawaki, S., Ikegawa, M., Okazaki, T., & Honjo, T. Pd-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *The Journal of experimental medicine*. 2003; 198 (1): 39-50.

Jackson, N., Zaki, M., Rahman, A. R., Nazim, M., Win, M. N., & Osman, S. Fatal campylobacter jejuni infection in a patient splenectomised for thalassaemia. *Journal of clinical pathology*. 1997; 50 (5): 436-437.

Janeway, C. A., Jr., & Bottomly, K. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell*. 1994; 76 (2): 275-285.

Kadam, P. P., Manglani, M. V., Sharma, S. M., Sharma, R. A., & Setia, M. S. Immunoglobulin levels and cd4 / cd8 counts in beta- thalassemia major. *Indian pediatrics*. 2014; 51 (12): 1000-1002.

Kao, C., Oestreich, K. J., Paley, M. A., Crawford, A., Angelosanto, J. M., Ali, M. A., . . . Wherry, E. J. Transcription factor t-bet represses expression of the inhibitory receptor pd-1 and sustains virus-specific cd8+ t cell responses during chronic infection. *Nature immunology*. 2011; 12 (7): 663-671.

Karaselek, M. A., & Reisli, I. Co-stimulatory and inhibitory of t cell: Cd28 family. *Asim Allerji Immunol*. 2016; 14 (2): 49-55.

Keir, M. E., Liang, S. C., Guleria, I., Latchman, Y. E., Qipo, A., Albacker, L. A., . . . Sharpe, A. H. Tissue expression of pd-l1 mediates peripheral t cell tolerance. *The Journal of experimental medicine*. 2006; 203 (4): 883-895.

Konijn, A. M. Iron metabolism in inflammation. *Bailliere's clinical haematology*. 1994; 7 (4): 829-849.

Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., . . . Freeman, G. J. Pd-l2 is a second ligand for pd-1 and inhibits t cell activation. *Nature immunology*. 2001; 2 (3): 261-268.

Lombardi, G., Matera, R., Minervini, M. M., Cascavilla, N., D'Arcangelo, P., Carotenuto, M., . . . Musto, P. Serum levels of cytokines and soluble antigens in polytransfused patients with beta-thalassemia major: Relationship to immune status. *Haematologica*. 1994; 79 (5): 406-412.

McHeyzer-Williams, L. J., Malherbe, L. P., & McHeyzer-Williams, M. G. Helper t cell-regulated b cell immunity. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006; 311: 59-83.

Mencacci, A., Cenci, E., Boelaert, J. R., Bucci, P., Mosci, P., Fe d'Ostiani, C., . . . Romani, L. Iron overload alters innate and t helper cell responses to candida albicans in mice. *The Journal of infectious diseases*. 1997; 175 (6): 1467-1476.

Nascimbeni, M., Shin, E. C., Chiriboga, L., Kleiner, D. E., & Rehermann, B. Peripheral cd4(+)cd8(+) t cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood*. 2004; 104 (2): 478-486.

Neufeld, E. J., Galanello, R., Viprakasit, V., Aydinok, Y., Piga, A., Harmatz, P., . . . Rienhoff, H. Y., Jr. A phase 2 study of the safety, tolerability, and pharmacodynamics of fbs0701, a novel oral iron chelator, in transfusional iron overload. *Blood*. 2012; 119 (14): 3263-3268.

Nishimura, H., & Honjo, T. Pd-1: An inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends in immunology*. 2001; 22 (5): 265-268.

Noulsri, E., Lerdwana, S., Fucharoen, S., & Pattanapanyasat, K. Phenotypic characterization of circulating cd4/cd8 t-lymphocytes in beta-thalassemia patients. *Asian Pacific journal of allergy and immunology*. 2014; 32 (3): 261-269.

Ohaegbulam, K. C., Assal, A., Lazar-Molnar, E., Yao, Y., & Zang, X. Human cancer immunotherapy with antibodies to the pd-1 and pd-l1 pathway. *Trends in molecular medicine*. 2015; 21 (1): 24-33.

Okazaki, T., & Honjo, T. The pd-1-pd-l pathway in immunological tolerance. *Trends in immunology*. 2006; 27 (4): 195-201.

Okazaki, T., & Honjo, T. Pd-1 and pd-1 ligands: From discovery to clinical application. *International immunology*. 2007; 19 (7): 813-824.

Omara, F. O., & Blakley, B. R. The effects of iron deficiency and iron overload on cell-mediated immunity in the mouse. *The British journal of nutrition*. 1994; 72 (6): 899-909.

Parry, R. V., Chemnitz, J. M., Frauwirth, K. A., Lanfranco, A. R., Braunstein, I., Kobayashi, S. V., . . . Riley, J. L. Ctla-4 and pd-1 receptors inhibit t-cell activation by distinct mechanisms. *Molecular and cellular biology*. 2005; 25 (21): 9543-9553.

Patsoukis, N., Brown, J., Petkova, V., Liu, F., Li, L., & Boussiotis, V. A. Selective effects of pd-1 on akt and ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit t cell proliferation. *Science signaling*. 2012; 5 (230): ra46.

Pattanapanyasat, K., Thepthai, C., Lamchiagdhase, P., Lerdwana, S., Tachavanich, K., Thanomsuk, P., . . . Darden, J. M. Lymphocyte subsets and specific t-cell immune response in thalassemia. *Cytometry*. 2000; 42 (1): 11-17.

Pauken, K. E., & Wherry, E. J. Overcoming t cell exhaustion in infection and cancer. *Trends in immunology*. 2015; 36 (4): 265-276.

Quigley, M., Pereyra, F., Nilsson, B., Porichis, F., Fonseca, C., Eichbaum, Q., . . . Haining, W. N. Transcriptional analysis of hiv-specific cd8+ t cells shows that pd-1 inhibits t cell function by upregulating batf. *Nature medicine*. 2010; 16 (10): 1147-1151.

Ricerca, B. M., Di Girolamo, A., & Rund, D. Infections in thalassemia and hemoglobinopathies: Focus on therapy-related complications. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2009; 1 (1): e2009028.

Rienhoff, H. Y., Jr., Viprakasit, V., Tay, L., Harmatz, P., Vichinsky, E., Chirnomas, D., . . . Neufeld, E. J. A phase 1 dose-escalation study: Safety, tolerability, and pharmacokinetics of fbs0701, a novel oral iron chelator for the treatment of transfusional iron overload. *Haematologica*. 2011; 96 (4): 521-525.

Riley, J. L., & June, C. H. The cd28 family: A t-cell rheostat for therapeutic control of t-cell activation. *Blood*. 2005; 105 (1): 13-21.

Rivella, S. The role of ineffective erythropoiesis in non-transfusion-dependent thalassemia. *Blood reviews*. 2012; 26 Suppl 1: S12-15.

Robert R. Rich MD , T. A. F. M. F. F., William T. Shearer MD PhD , Harry Schroeder , Anthony J. Frew MD FRCP, Cornelia M. Weyand MD PhD *Clinical immunology: Principles and practice* (rich, clinical immunology) 4th edition: Saunders; 4 edition (December 26, 2012); 2008, p: 1323 pages.

Rund, D., & Rachmilewitz, E. Beta-thalassemia. *The New England journal of medicine*. 2005; 353 (11): 1135-1146.

Santos, P. C., & Falcao, R. P. Decreased lymphocyte subsets and k-cell activity in iron deficiency anemia. *Acta haematologica*. 1990; 84 (3): 118-121.

Scandiuzzi, L., Ghosh, K., Hofmeyer, K. A., Abadi, Y. M., Lazar-Molnar, E., Lin, E. Y., . . . Zang, X. Tissue-expressed b7-h1 critically controls intestinal inflammation. *Cell reports*. 2014; 6 (4): 625-632.

Scheel-Toellner, D., Wang, K., Craddock, R., Webb, P. R., McGettrick, H. M., Assi, L. K., . . . Lord, J. M. Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling. *Blood*. 2004; 104 (8): 2557-2564.

Sharpe, A. H., & Abbas, A. K. T-cell costimulation--biology, therapeutic potential, and challenges. *The New England journal of medicine*. 2006; 355 (10): 973-975.

Sharpe, A. H., & Freeman, G. J. The b7-cd28 superfamily. *Nature reviews. Immunology*. 2002; 2 (2): 116-126.

Sheppard, K. A., Fitz, L. J., Lee, J. M., Benander, C., George, J. A., Wooters, J., . . . Chaudhary, D. Pd-1 inhibits t-cell receptor induced phosphorylation of the zap70/cd3zeta signalosome and downstream signaling to pkctheta. *FEBS letters*. 2004; 574 (1-3): 37-41.

Swain, S. L., Croft, M., Dubey, C., Haynes, L., Rogers, P., Zhang, X., & Bradley, L. M. From naive to memory t cells. *Immunological reviews*. 1996; 150: 143-167.

Topp, M. S., Riddell, S. R., Akatsuka, Y., Jensen, M. C., Blattman, J. N., & Greenberg, P. D. Restoration of cd28 expression in cd28- cd8+ memory effector t cells reconstitutes antigen-induced il-2 production. *The Journal of experimental medicine*. 2003; 198 (6): 947-955.

Vento, S., Cainelli, F., & Cesario, F. Infections and thalassaemia. *The Lancet. Infectious diseases*. 2006; 6 (4): 226-233.

Walker, E. M., Jr., & Walker, S. M. Effects of iron overload on the immune system. *Annals of clinical and laboratory science*. 2000; 30 (4): 354-365.

Walter, P. B., Knutson, M. D., Paler-Martinez, A., Lee, S., Xu, Y., Viteri, F. E., & Ames, B. N. Iron deficiency and iron excess damage mitochondria and mitochondrial DNA in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99 (4): 2264-2269.

Walter, P. B., Macklin, E. A., Porter, J., Evans, P., Kwiatkowski, J. L., Neufeld, E. J., . . . Thalassaemia Clinical Research, N. Inflammation and oxidant-stress in beta-thalassaemia patients treated with iron chelators deferasirox (icl670) or deferoxamine: An ancillary study of the novartis cicl670a0107 trial. *Haematologica*. 2008; 93 (6): 817-825.

Walter, P. B., Porter, J., Evans, P., Kwiatkowski, J. L., Neufeld, E. J., Coates, T., . . . Thalassaemia Clinical Research, N. Increased leucocyte apoptosis in transfused beta-thalassaemia patients. *British journal of haematology*. 2013; 160 (3): 399-403.

Walter, T., Olivares, M., Pizarro, F., & Munoz, C. Iron, anemia, and infection. *Nutrition reviews*. 1997; 55 (4): 111-124.

Wanachiwanawin, W., Siripanyaphinyo, U., Fucharoen, S., Wasi, P., Mawas, F., Wiener, E., & Wickramasinghe, S. N. Activation of monocytes for the immune clearance of red cells in beta zero-thalassaemia/hbe. *British journal of haematology*. 1993; 85 (4): 773-777.

Wang, J., & Pantopoulos, K. Regulation of cellular iron metabolism. *The Biochemical journal*. 2011; 434 (3): 365-381.

Wang, S. C., Lin, K. H., Chern, J. P., Lu, M. Y., Jou, S. T., Lin, D. T., & Lin, K. S. Severe bacterial infection in transfusion-dependent patients with thalassaemia major. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2003; 37 (7): 984-988.

Warrington, K. J., Vallejo, A. N., Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. Cd28 loss in senescent cd4+ t cells: Reversal by interleukin-12 stimulation. *Blood*. 2003; 101 (9): 3543-3549.

Waschbisch, A., Sammet, L., Schroder, S., Lee, D. H., Barrantes-Freer, A., Stadelmann, C., & Linker, R. A. Analysis of cd4+ cd8+ double-positive t cells in blood, cerebrospinal fluid and multiple sclerosis lesions. *Clinical and experimental immunology*. 2014; 177 (2): 404-411.

Watts, T. H., & DeBenedette, M. A. T cell co-stimulatory molecules other than cd28. *Current opinion in immunology*. 1999; 11 (3): 286-293.

Whyte, M. K., Meagher, L. C., MacDermot, J., & Haslett, C. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J Immunol*. 1993; 150 (11): 5124-5134.

Wu, M. Y., Xie, X. M., Li, J., & Li, D. Z. Neonatal screening for alpha-thalassemia by cord hemoglobin barts: How effective is it? *International journal of laboratory hematology*. 2015; 37 (5): 649-653.

Yokosuka, T., Takamatsu, M., Kobayashi-Imanishi, W., Hashimoto-Tane, A., Azuma, M., & Saito, T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit t cell receptor signaling by recruiting phosphatase shp2. *The Journal of experimental medicine*. 2012; 209 (6): 1201-1217.

Zahran, A. M., Elsayh, K. I., Saad, K., Embaby, M., & Ali, A. M. Regulatory b cells (cd19(+)/cd38(hi)/cd24(hi)) in alloimmunized and non-alloimmunized children with beta-thalassemia major. *Blood cells, molecules & diseases*. 2016; 57: 91-96.

Zanella, A., Rossi, F., Cesana, C., Foresti, A., Nador, F., Binda, A. S., . . . Sirchia, G. Transfusion-transmitted human parvovirus b19 infection in a thalassemic patient. *Transfusion*. 1995; 35 (9): 769-772.

Zeromski, J., & Jezewska, E. Functional alterations of human blood monocytes after exposure to various nickel compounds in vitro: An effect on the production of hydrogen peroxide. *Immunology letters*. 1995; 45 (1-2): 117-121.

Zivot, A., Lipton, J. M., Narla, A., & Blanc, L. Erythropoiesis: Insights into pathophysiology and treatments in 2017. *Molecular medicine*. 2018; 24 (1): 11.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gizem	Uyruğu	TC
Soyadı	YILMAZ	Tel no	05335549881
Doğum tarihi	04/01/1990	e-posta	ylmzzgzmm0605@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Ömer Seyfettin Lisesi	2007
Lisans	Kırıkkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2012
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kalıtsal Kan Hastalıkları	2016-

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Biyolog	Akdeniz Üniversitesi Hastanesi	2014-

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildir