

54893

**DEMİRİN MEGAKARYOSİTOPOEZE  
OLASI ETKİLERİ**

**Selda DELİORMAN**

**Osmangazi Üniversitesi**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**  
Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği Uyarınca  
Fizyoloji Anabilim Dalı'nda  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
Olarak Hazırlanmıştır.

T 54893

**Danışman : Doç. Dr. Ruhi UYAR**

**Ocak 1996**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Selda DELİORMAN'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "DEMİRİN MEGAKARYOSİTOPOEZE OLASI ETKİLERİ" başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

26/01/1996

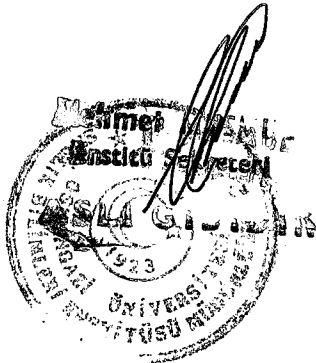
Üye : Prof. Dr. Günnur Yiğit (imza)

Üye : Prof. Dr. Zafer GÜLBAŞ (imza)

Üye : Doç. Dr. Ruhi UYAR (imza)

---

Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 08.02.1996 gün ve 347/770 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Neş'e TUNÇEL  
Enstitü Müdürü

## Ö Z E T

Megakaryositopoez megakaryosit öncü hücrelerinin çoğalmasını, poliploid bir çekirdeğin oluşmasını, sitoplazmik değişimleri ve trombosit oluşumunu içeren karmaşık bir olaydır. Bu olayların düzenlenmesinde pek çok etken rol oynamaktadır. Megakaryosit gelişimini düzenleyen etkenler üzerinde yoğun araştırmalar yapılmasına rağmen megakaryositopoezi nasıl etkiledikleri henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Demirin eritrositler, limfositler ve kanser hücrelerinin çoğalması için gerekli bir element olduğu öne sürülmüş fakat trombositopoezdeki rolü konusunda henüz tam bir görüş birliğine varılamamıştır. Demir eksikliği olan hastalarda çoğunlukla trombositoz görülürken, az da olsa trombositopeni de gözlenmektedir.

Çalışmamızda 8-10 haftalık sağlıklı görünümlü sıçanlardan elde edilen kemik iliği hücreleri plazma pıhtısı yöntemiyle in vitro olarak üretilmiştir. Kemik iliği hücrelerinin bulunduğu ortama deney gruplarından sırasıyla 50 µg/ml, 150 µg/ml ve 300 µg/ml demirle doyurulmuş insan transferrini, kontrol gruplarında ise serum fizyolojik eklenmiştir. Yapılan istatistiksel analizlere göre kullandığımız dozlardaki demirle doyurulmuş transferrinin kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, megakaryositik hücrelerin çoğalması üzerine fazla etkili olmadığı saptanmıştır. Geçmişte yapılan bazı çalışmalarda demirin megakaryosit oluşumuna etki ettiği şeklindeki açıklamalara rağmen in vitro bulgularımız, kullandığımız dozlardaki demirin megakaryositopoezi etkilemediğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler :** Demir, Transferrin, Megakaryositopoez, Kemik iliği, Megakaryositik hücreler.

## S U M M A R Y

Megakaryocytopoiesis is a complicated phenomenon which involves the proliferation of progenitor cells, formation of a polyploid nucleus, cytoplasmic changes and formation of thrombocytes. In the regulation of these events many factors have roles. Although intensive researches have been done on the factors that regulate the development of megakaryocytes, it has not been yet fully understood how they affect megakaryocytopoiesis. It has been suggested that iron is a required element for the proliferation of erythrocytes, lymphocytes and cancer cells, but no consensus has yet been reached about its role in thrombocytopoiesis. In patients with iron deficiency thrombocytosis is generally observed, although it is rare thrombocytopenia can also be found.

In this study, bone marrow cells which obtained from 8-10 weeks old rats with healthy appearance were incubated using plasma clot system in vitro. In experimental groups, iron-saturated human transferrin of 50  $\mu\text{g/ml}$ , 150  $\mu\text{g/ml}$  and 300  $\mu\text{g/ml}$  were added respectively to the medium, but serum physiologic was added in control groups. According to the statistical analyses, when experimental groups were compared with control groups, iron was found not to be effective on the proliferation of megakaryocytic cells. Although some, previous reports indicated that iron was effective on the formation of thrombocytes, our in vitro findings suggest that the doses of iron used did not stimulate megakaryocytes production.

**Key words :** Iron, Human Transferrin, Megakaryocytopoiesis,  
Bone marrow, Megakaryocytic cells.

## T E Ő E K K Ü R

Bu tezin gerekleŐmesinde büyük payı olan deneyler ve yazım sırasında fikir ve yorumlarıyla beni yönlendiren danışman hocam Doç.Dr. Ruhi UYAR'a, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen hocalarım Prof.Dr. NeŐe TUNÇEL'e, Prof.Dr. Ziya KAYGISIZ'a, Yard.Doç.Dr. Kubilay UZUNER'e, Prof.Dr. Kazım ÖZDAMAR'a, ÖĐr.Gör. Yasemin AYDIN'a, asistan arkadaŐım Yılmaz ALTUNER'e, arkadaŐlarım ArŐ.Gör. Murat ERAKIR'a, Dr. Levent YAPICI'ya, Bio. IŐıl ÖNCE'ye iten teŐekkürlerimi sunarım. GöstermiŐ oldukları sabır ve hoŐĐörü ile beni destekleyen aileme ve tüm yakınlarıma sevgilerimle.

# İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖZET .....	iii
SUMMARY .....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	viii
KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Megakaryositopoez .....	4
2.1.1. Öncü Hücreler .....	4
2.1.2. Düzenlenmesi .....	7
2.2. Demir .....	12
2.2.1. Demir Emilimi .....	13
2.2.2. Demir Transportu .....	14
2.2.3. Demirin Depolanması .....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	21
3.1. Sıçan Plazmasının Hazırlanması .....	21
3.2. Kemik İliği Hücre Kültürünün Yapılışı .....	21
3.3. Preparasyon .....	22
3.4. Boyama .....	23
4. BULGULAR .....	24
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	30
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	34
ÖZGEÇMİŞ	

## Ş E K İ L L E R D İ Z İ N İ

<b><u>Sekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1. Megakaryositopoezin düzenlenmesi . . . . .	7
2.2. K562 hücrelerinde transferrin döngüsünün şematik gösterimi . . . . .	15
4.1. 50 µg/ml Tf grubu ile kontrol grubunun günlere göre megakaryosit değerleri . . . . .	26
4.2. 150 µg/ml Tf grubu ile kontrol grubunun günlere göre megakaryosit değerleri . . . . .	26
4.3. 300 µg/ml Tf grubu ile kontrol grubunun günlere göre megakaryosit değerleri . . . . .	27
4.4. 50 µg/ml ve 150 µg/ml Tf gruplarının günlere göre megakaryosit değerleri . . . . .	28
4.5. 50 µg/ml ve 300 µg/ml Tf gruplarının günlere göre megakaryosit değerleri . . . . .	28
4.6. 150 µg/ml ve 300 µg/ml Tf gruplarının günlere göre megakaryosit değerleri . . . . .	29

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Cizelge

### Sayfa

4.1. Deney ve kontrol gruplarının ortalama megakaryosit sayıları . . . . .	25
---	----





## KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
Meg-CSF	Megakaryocyte Colony Stimulating Factor
TPO	Trombopoetin
IL-3	Interleukin-3
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
Tf	Transferrin
Hb	Hemoglobin
BFU-M	Burst Forming Unit-Megakaryocyte
CFU-M.	Colony Forming Unit-Megakaryocyte
LD-CFU-M	Light Density Colony Forming Unit-Megakaryocyte
SAChe <sup>+</sup>	Small Acetylcholine Esterase Positive
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
$\alpha$ 1-AT	$\alpha$ 1 Antitripsin
K562	Malignant eritrositik hücreler
Ga	Gallium
HIV	Human Immunodeficiency Virus
Fe <sup>+2</sup>	Ferro demir
Fe <sup>+3</sup>	Ferrik demir
RIA	Radioimmunoassay
HL60	İnsan promyelositik lösemik hücreler
L-15	Leibovitz medium

## 1. G İ R İ Ő

Megakaryositlerin çok değişik özelliklerinin olması hematologların, hücre biyologlarının, fizyologların, patologların, farmakologların ve kanser araştırmacılarının dikkatlerini çekmiştir. Kan pulcuklarını ve bazı pıhtılaşma faktörlerini sentezledikleri için megakaryositlerin gelişim evreleri iyi bilinmelidir. Ancak bu sayede kan pulcuklarının ve megakaryositlerin yapısal ve görevsel bozukluklarından dolayı oluşan hastalıkların tanı ve tedavisi kolaylaşabilir (73).

Megakaryositopoez, megakaryosit öncü hücrelerinin çoğalmasını, poliploid bir çekirdeğin oluşmasını, büyüklüklerinin artmasını, sitoplazmik değişmeleri ve trombosit oluşmasını içeren karmaşık bir olaydır. Bu olayların düzenlenmesinde sitokinler, hormonal faktörler ve hücreler arası etkileşimler yer almaktadır (30).

Megakaryocyte Colony Stimulating Factor (Meg-CSF), megakaryositik öncü hücrelere etki ederek, koloni oluşumunu arttıran bir maddedir. Kuter ve arkadaşları tarafından var olduğu ileri sürülen Megapoetin, megakaryositler ve trombositler arası döngüde fizyolojik aracı olarak davranan bir hormondur, fakat hakkında bilgi çok azdır (44). Meg-CSF ile Megapoetin aynı maddeler olması olasılığı vardır. Geç dönemde olgun megakaryositlerin trombositlere dönüşümünü kontrol eden başlıca hormon Trombopoetin (TPO) dir. Ayrıca Interleukin (IL)-3, IL-6, IL-11, Granulocyte-Macrophage Colony stimulating factor (GM-CSF), Leukemia Inhibitory Factor (LIF) gibi birçok hematopoetik faktör megakaryositik öncü hücrelerin çoğalma ve olgunlaşmasını etkilemektedir (16). Bu düzenleyici maddeler üzerinde yoğun araştırmalar yapılmasına rağmen moleküler yapıları belirlenememiş ve megakaryositopoeze ne şekilde etki ettikleri henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır.

Son zamanlarda megakaryositopoez ve eritropoez arasında benzerlikler olduğu ifade edilmiştir (37). Demir, eritrositlerin çoğalma, büyüme ve farklılaşması için gerekli bir elementtir (34, 39). Yapılan çalışmalar limfositler (2, 3, 13), kanser hücreleri ve neoplastik hücrelerin (10, 25, 47, 52) de çoğalmak için demire ihtiyaç duyduklarını göstermektedir. Demir, Transferrin (Tf) adı verilen transport proteini ile taşınmakta (10, 19, 24, 28, 33, 34, 39, 65) ve hücrelere reseptör aracılı endositoz yolu ile alınmaktadır (25, 32, 34, 39). Tf reseptörlerinin yalnızca hemoglobin (Hb) üreten ve plasental hücrelerde değil, başka hücrelerde de bulunduğu ortaya konması konuya olan ilgiyi arttırmıştır (69).

Yapılan literatür taramasında demir ve Tf'in hematopoetik orijinli hücrelere etkilerini ortaya koyan çalışmalar bulunmasına rağmen demir, Tf ve megakaryositler arasındaki ilişkiyi doğrudan araştıran çalışmalara rastlanmamıştır. Megakaryositlerin de Tf reseptörlerine sahip olabileceğini ve demiri hücre içine alarak demirin megakaryositlerin çoğalma ve gelişimi üzerine etkili olabileceğini varsaydık. Bu amaçla megakaryositik hücrelerin kültür ortamına değişik miktarlarda (50 µg/ml, 150 µg/ml ve 300 µg/ml) demir bağlı Tf ekleyerek megakaryositlerin çoğalmasını inceledik.

## 2. GENEL BİLGİLER

Pıhtılaşmada ve beden sıvısının kaybolmasını önlemede önemli role sahip olan kan pulcukları, megakaryositlerden köken almaktadır. Megakaryositler memeli kemik iliğinde çok az rastlanılan ve fiziksel olarak diğer hematopoetik hücrelerden çok farklı olan bir hücre çeşididir. Memelilerde yaşa ve türe bağlı olarak kemik iliğindeki tüm çekirdekli hücrelerin sadece % 0,01-0,3'ünü teşkil etmekte ve olgunlaşmalarını tamamladıktan sonra çapları 160 mikrona kadar ulaşabilmektedir (73). Elektron mikroskopik yapısında Golgi kompleksi, mitokondria, çok sayıda ribozom ve Golgi kompleksinin çevresinde lizozomal enzimleri içeren farklılaşmamış granüllerin bulunduğu tespit edilmiştir. Yoğun kromatin ağı oluşturan, düzensiz bir şekilde loblu, daire biçiminde ya da parçalı çekirdeğe sahiptir, çekirdekçik görülmemektedir (49). Megakaryositik öncü hücreler sayılarını bir dereceye kadar arttırdıktan sonra sitokinezi durdurmakta fakat DNA'nın kendini 4 (8N), 8 (16N), 16 (32N) hatta 32 (64N) kez eşlemesi ile (endomitoz) poliploid hücreler oluşturmaktadır (41). Endomitoz sona erdiğinde megakaryosit sitoplazmasında artışlar meydana gelmekte ve sonuçta megakaryosit sitoplazmasından birkaç bin tane çekirdeksiz trombosit oluşmaktadır (42).

Dölütün vitellüs kesesi, karaciğer, dalak ve kemik iliğinde bulunabilen megakaryositler, erişkinlerin kemik iliği ve dalağının dışında bazen dolaşım kanında da bulunabilirler. Megakaryositlere ya da parçalarına şiddetli anemi, kronik myelositik lösemi, polisitemi, cerrahi işlemlerden sonra, göğüs yaralanması ve enfeksiyon kökenli lökositozu olan kişilerden alınan rutin kan örneklerinde rastlanabilir. Ayrıca belki de kemik iliğinden gelen venöz kanla taşınmasının bir sonucu olarak pulmoner damarlarda da önemli sayıda bulunur (49).

## 2.1. Megakaryositopoez

Kemik iliğinde bulunan stem hücrelerinin yönlendirilmiş hücreleri, sonra geçiş hücrelerini, mikroskopta tanınabilen hücreleri ve trombositleri oluşturmak üzere geçirdikleri çoğalma ve farklılaşma süreci megakaryositopoez olarak isimlendirilir (72). Megakaryositopoezle ilgili çalışmaları kemik iliğindeki megakaryositlerin nadir oluşları engellemektedir (21, 73). Son zamana kadar insan megakaryositleri hakkındaki bilgilerin çoğu kan hastalıkları ve kanama bozuklukları olan kişilerden elde edilmiştir. Bunun dışında diğer bilgi kaynağı megakaryosit anomalilerine bağlı myeloproliferatifli hastaların kemik iliği hücrelerinin sitogenetik ve biyokimyasal analizleridir. Fakat bu hücrelerin çok düşük sayıda olması ve yeterince gelişmiş tekniklerin bulunmaması ile istenilen sonuca ulaşılamamıştır (73). Bu nedenle üretilen hücre dizileri homojen bir hücre topluluğu oluşturarak büyük avantaj sağlamıştır (31). Greenberg ve arkadaşları, megakaryoblastik lösemili bir hastanın kanından yeni bir megakaryositik hücre dizisi olan DAMI hücrelerini elde etmişlerdir (29). DAMI hücrelerinin dışında EST-IU, MEG-01 ve M-07 gibi hücre dizileri de üretilmiştir (30). Bu hücreler insan trombosit ve megakaryositlerinin biyokimyası, fonksiyonu ve farklılaşmasını araştırmak için bir model oluşturmuştur. Ayrıca megakaryositlerin Human Immunodeficiency Virus (HIV) enfeksiyonundan çabuk etkilendiği ortaya konmuştur (63). Bu nedenle megakaryositik orijinli hücre dizileri retrovirüslerin megakaryosit fonksiyonu üzerindeki etkilerini araştırmak için yararlı olabilir.

### 2.1.1. Öncü Hücreler

Megakaryositopoezin ve trombosit oluşumunun deney hayvanları ve insanlarda incelenmesi sonucunda megakaryositlerin kemik iliğinde bulunan pluripotent stem (ana, kök) hücrelerinden geliştiği ortaya konmuştur. Stem hücreleri, kendilerini yenileyemeyen kanın şekilli

elemanlarının kaynağını oluşturan, bölünme yeteneğine sahip ve farklılaşmamış hücrelerdir. Bunlar kemik iliğine gelen farklı uyaranların etkisiyle hematopoetik farklılaşma yollarından birini kullanarak gelişebilme yeteneğine sahiptir. Megakaryosit oluşumunu arttırıcı bir uyarı aldıklarında, ana hücreler hızla farklılaşarak megakaryosit öncülerini oluşturmaktadır.

Günümüzde Burst Forming Unit-Megakaryocyte (BFU-M), Colony Forming Unit-Megakaryocyte (CFU-M) ve Light Density Colony Forming Unit-Megakaryocyte (LD-CFU-M) olmak üzere en az 3 megakaryosit öncü hücre tipi saptanmıştır. İnsan ve kemirgenlerde yapılan çalışmalarda hem BFU-M hem de CFU-M'e rastlanırken, LD-CFU-M sadece farelerde belirlenmiştir. BFU-M'den köken alan kolonilerin daha uzun süre inkübasyona gerek duyduğu ortaya konmuştur. Özellikle in vitro şartlarda bu süre BFU-M için 21 gün ve CFU-M için 12 gündür. BFU-M'den oluşan kolonilerin CFU-M'in oluşturduğu kolonilerden daha büyük olduğu belirlenmiştir. LD-CFU-M hücreleri sedimentasyonlarına göre diğer megakaryositik progenitorlardan ayrılır. LD-CFU-M, CFU-M'den daha az çoğalma yeteneğine sahiptir (30).

Öncü hücrelerle morfolojik olarak tanınabilen megakaryositler arasında köprü görevi yapan hücreler bulunmaktadır. Small Acetylcholine Esterase Positive (SACHe<sup>+</sup>) hücreler olarak adlandırılan bu hücrelere küçük boyutları, yuvarlak çekirdekleri ve farklı asetilkolinesteraz aktiviteleriyle hem insanlarda hem de farelerde rastlanmıştır. Asetilkolinesteraz, olgunlaşmamış megakaryositlerin perinükleer sisterna, ER ve bazen de Golgi sisternalarında bulunmuştur (68). SACHe<sup>+</sup> hücreleri kemik iliğindeki megakaryositik hücrelerin %5'ini oluştururlar ve in vitro ortamda kendi başlarına koloni oluşturabilme yetenekleri yoktur. Young ve Weiss, bazı geçici hücrelerin aktif olarak DNA eşleme yeteneğine sahipken, çoğunluğunun endomitoza girmesi nedeninden çoğalamadığını ortaya koymuşlardır (79).

Kemik iliğinde megakaryosit oluşturmak üzere farklılaşmaya başlayan stem hücrelerinden meydana gelen BFU-M, CFU-M ve SACHe<sup>+</sup>

hücrelerindeki ploidi ve sitoplazmik olgunlaşma arttığında mikroskopta tanınabilen hücreler haline dönüşebilmektedir. Bu hücreler 4 farklı olgunlaşma basamağından geçmektedirler (73).

**I-) Megakaryoblast :** Morfolojik olarak SACH<sup>+</sup> hücrelerden sonra tanınabilir ilk öncüdür. Bu hücre 15-30 µm çapında olup; geniş, oval ya da böbrek biçimli çekirdeğe sahiptir. Yüksek çekirdek/sitoplazma oranına sahip olmaları nedeniyle megakaryositlerin tanınmasında anahtardır. Çoğunlukla uzantılar oluşturan sitoplazma çok az, granülsüz ve şiddetli bazofiliktir. Aktif olarak DNA sentezleme kapasiteleri vardır, ama bölünmezler.

**II-) Promegakaryosit :** Çapları 35-40 µm olup, çekirdeği U şeklinde görülür. Bu hücrelerde çekirdek/sitoplazma oranı 1:1 ya da 1:2'dir. Sitoplazmaları hala bazofiliktir.

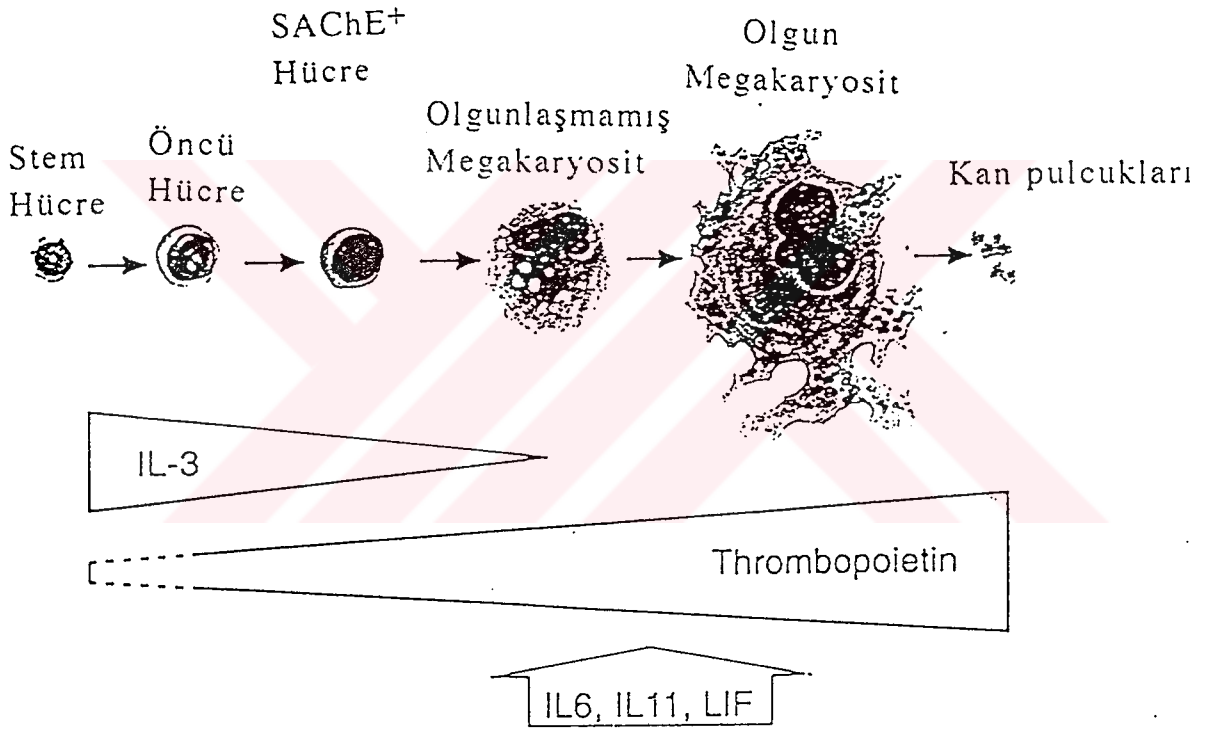
**III-) Megakaryosit :** 40-160 µm çapında olup, kemik iliğinin en büyük hücresidir.

**III-) Metamegakaryosit :** Bu hücrelerin sitoplazması eozinofilik olup, genelde depo megakaryositler olarak kabul edilirler. Megakaryositlere oranla daha küçük çaplıdır ve çekirdekleri fazla parçalı değildir.

Megakaryositopoez adı verilen olay ile gelişen megakaryositlerin parçalanması sonucu her birinden 4000-8000 adet trombosit meydana gelebilmektedir. Trombositlerin oluşumuna ait mekanizmalar henüz tam olarak açıklanamamıştır. Fakat megakaryositler oluşturdukları yalancı ayakları kemik iliği sinüzoidlerine uzattıkları ve endotel hücre gövdelerini parçalayarak, meydana gelen trombositleri kana verdikleri en çok kabul edilen görüştür (49).

### 2.1.2. Düzenlenmesi

Normal koşullar altında kandaki trombosit sayısının sabit düzeyde tutulması, gerek megakaryositlerin gerekse trombositlerin üretiminin çok dikkatli bir şekilde düzenlendiğini göstermektedir. Megakaryositopoezin düzenlenmesi sitokinleri, hormonal faktörleri ve kemik iliği ortamındaki hücreler arası etkileşimleri de içeren kompleks bir olaydır (30). Bu düzenleyici etkenlerin megakaryosit üretimi üzerindeki etkileri ve kontrollerini nasıl sağladıklarına dair mekanizmalar henüz tam olarak belirlenememiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Megakaryositopoezin düzenlenmesi (37)

Megakaryositopoezin düzenlenmesinde hormonal olarak görev alan Meg-CSF ün megakaryositlerin azalmasına cevap olarak özellikle CFU-M hücrelerinin koloni oluşturabilme yeteneğini arttırabildiği fakat olgunlaşmalarına etki etmediği ileri sürüldü. Hipomegakaryositik trombopenili hastalardan alınan idrar, serum ve plazmanın in vitro olarak megakaryosit koloni oluşumunu arttırdığını ve bu yeteneğin Meg-CSF ile



bağlantılı olduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda Meg-CSF'nin trombosit sayısı ile doğrudan ilişkisi olmadığı fakat tersine megakaryosit kütlesine etki ettiği gözlenmiştir (30, 72).

Trombositler ile kemik iliği megakaryositleri fizyolojik bir döngü ile bağlantılıdır. Trombosit sayısındaki değişiklikler, megakaryosit sayısındaki değişiklikleri indükler (42). Bu bilgilerin ışığında Kuter ve arkadaşları, trombositopenik tavşan plazmasının megakaryositlerin sayı ve ploidisini uyaran ve Megapoetin olarak isimlendirilen bir aktiviteyi içerdiğini ileri sürmüşlerdir (44). Megapoetin, trombositler ve megakaryositler arası döngüde fizyolojik bir aracı olarak davranmaktadır. Megapoetin;

- 1- Pozitif efektördür.
- 2- Belirli bir düzeyi vardır.
- 3- Trombositopeniden sonra yükselmek için en az 3 saate ihtiyaç duyar, en fazla etki oluşturması için 24 saat gereklidir.
- 4- Miktarı trombosit sayısı ile ters orantılı olarak değişir.
- 5- Trombositoz ile baskılanır.

Bu bilgilerin, megakaryositler ile dolaşımdaki trombositler arasında humoral bir maddenin fizyolojik aracı olabileceğinin ilk göstergesi olduğu ifade edilmiştir.

Megakaryositopoezi hormonal olarak etkileyen başlıca faktör Trombopoetin'dir. Trombosit sayısındaki değişikliklerin megakaryosit ploidi ile orantılı olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, sıçan veya farelerin trombosit sayısı değiştirilerek 48 saat sonra megakaryosit ploidisinin arttığı tespit edilmiştir. Deneyin sonucunda trombosit sayısını ve megakaryosit ploidisini değiştiren bir faktör ya da faktörlerin olabileceği öne sürülmüştür. Kemik iliğindeki megakaryositlerde bu değişiklikleri kontrol eden ve dolaşımdaki trombosit sayısını düzenleyen regülatörün, TPO denen hormonal bir dolaşım maddesinin sonucu olduğu tahmin edilmiştir (42). Yapılan son çalışmalar

TPO'in megakaryositik öncü hücrelerin hem farklılaşma hem de çoğalmasını uyardığını, megakaryositlerin tam olgunlaşması için gerekli olduğunu ve trombosit üretimini arttırdığını ortaya koymuştur (9, 37). Buna rağmen TPO'in düzenlenme mekanizması ve reseptörünün yapısı hala belirlenememiştir. Ayrıca TPO'in eritrositik ve granülosit/makrofaj öncüleri üzerine etkileri olduğu ileri sürülmektedir (37).

TPO'ü başarılı klonlama çalışmaları sıçan retrovirüsü olan myeloproliferatif lösemi virüsünün belirlenmesi ile başladı. Bu virüs klonlanarak transforme gen *mpl* belirlendi. Daha sonra viral onkogenin hücre sel homologu olan *c-mpl* geni insan eritrolösemik hücrelerinden klonlandı. Her iki genin incelenmesi, bunların ürününün hematopoetik sitokin reseptörü olarak fonksiyon gösterebileceğini ortaya koydu (37). Son zamanlarda *c-mpl* geni tarafından kodlanan sitokin reseptörünün megakaryositopoezin *in vivo* ve *in vitro* düzenlenmesinde görev aldığı gösterilmiştir (9). *Mpl* reseptörünün geç megakaryosit öncülerinin trombositlere farklılaşmasını sınırlayan sitokin reseptörü olduğu ve megakaryosit farklılaşmasının geç safhalarında etkili olabileceği ortaya konmuştur (22). Diğer bir çalışmada TPO'in yüksek düzeyde *c-mpl* reseptörlerini bulunduran bir hücre dizisinde çoğalmaya neden olduğu ileri sürülmüştür (51). Ayrıca insan embriyonik böbrek hücrelerinin *c-mpl* ligandı için mRNA içerdiği ve hücreleri çoğalmaya iten bir faktör ürettiği belirtilerek *c-mpl* ligandı ile TPO'in aynı faktör olduğu önerilmiştir (37). Bu bulguların ışığında *Mpl*/TPO sisteminin hematopoetik kök hücreler ve hematopoez üzerindeki rolünün tanımlanması gerekmektedir.

Son dönemde yapılan bir çalışmada eritropoez ve trombopoez arasında benzerlikler olduğu öne sürülmüştür. Buna göre, 2N megakaryosit öncülerinden CFU-E'ye fonksiyonel olarak eşit ve her iki hücre tipi de son hücre den önce yaklaşık 6-8 bölünme geçirerek tamamen olgunlaşır. Aralarındaki fark, megakaryositlerde mitozun yerini endomitozun almasıdır. Hem CFU-E hem de 2N megakaryositten önceki gelişim basamakları olan BFU-E ya da CFU-M'lerin küçük koloniler oluşturması geç dönemde etki eden hormonlar tarafından desteklenir.

Bununla beraber daha fazla çoğalma yeteneğinde olan eritrositik ve megakaryositik öncüler ek olarak sitokinlere ihtiyaç duyar (37).

Eritropoezin başlıca düzenleyicisi olan Eritropoetin (EPO) in in vitro ve in vivo çalışmalarda megakaryositopoezi ve trombosit üretimini stimüle ettiği gösterilmiştir. Eğer yeterli miktarda kullanılmış ise rekombinant insan EPO'ın in vivo olarak trombosit üretiminde uyarıcı etkilere sahip olduğu ifade edilmiştir (12, 41, 71). Bunun dışında uzun süreli oluşturulan hipoksinin kemik iliğindeki stem hücrelerinin megakaryosit serilerine farklılaşmasını azalttığı ortaya konmuştur. Hipoksi sonucu megakaryositopoezin baskılanması stem hücrelerinin eritrositik hücrelere farklılaşması için isteklerinin artması ile gerçekleştiği öne sürülmüştür (60).

Karmaşık bir olay olan megakaryositopoezin düzenlenmesinde hücrelerden salınan bazı maddelerin uyarıcı veya baskılayıcı etkilere sahip olduğu belirlenmiştir. Stem cell factor, IL-3, GM-CSF ve IL-6 gibi birçok hematopoetik büyüme faktörünün in vitro olarak megakaryosit öncülerinin çoğalma ve/veya olgunlaşmasını etkileyebileceği bildirilmiştir (16). Bunlardan IL-3'ün megakaryosit oluşumunu arttırdığı ortaya konmuştur (17). TPO'ın megakaryosit ve öncü hücrelerinin çoğalma, farklılaşma, olgunlaşma ve trombositlere dönüşümünü arttırdığı belirgin olmasına rağmen, megakaryosit ve trombosit üretiminin tamamen TPO'ye bağlı olup olmadığı henüz anlaşılammıştır. Bu hipotezi test etmek için megakaryositik öncü hücrelerin bulunduğu in vitro kültürlerinden tüm TPO'ı çekmek için Mpl reseptörleri kullanılmıştır. IL-6 ve IL-11 tek başlarına ya da birlikte verildiğinde kültürde hiç megakaryosit gelişmemiştir. Tersine, IL-3 bir sitokin kombinasyonu ile verildiğinde bloke edici ajana rağmen megakaryosit oluşumu kısmen görülmüştür. Bu veriler, TPO'ın olmadığına sadece IL-3'ün megakaryosit gelişiminin erken fazını etkileyebileceğini fakat tam olgunlaşma için mutlaka TPO'ye gerek olduğunu göstermiştir (37). GM-CSF de CFU-M'lerin çoğalmalarını hızlandıran, megakaryositlerin olgunlaşma safhalarını değiştiren bir sitokindir ve megakaryositlerin in vivo olarak GM-CSF reseptörlerine sahip olduğu gösterilmiştir (1).

IL-6 megakaryosit farklılaşmasında önemli görevi olan bir sitokindir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, trombopoezin uyarılması için IL-6'nın uzun süre tedavi edici olarak verilmesinin yararlı olduğunu ortaya koymuştur (56, 62). IL-6 monoklonal antikorlarının renal karsinomalı hastaya verilmesi, trombosit sayısını normal düzeye çıkartmıştır. LIF, IL-6 ile benzer özelliklere sahip hematopoetik hücreler üzerinde etkili bir diğer ajandır. LIF, IL-6 ve IL-11 ile birlikte CFU-M'lerin büyümesini arttırmış ve hayvanlara enjekte edildiğinde trombosit sayısında tutarlı bir yükselmeye neden olmuştur. IL-11'in de megakaryositlerin olgunlaşmasını arttırdığı ifade edilmiştir (37).

Megakaryositopoez üzerinde baskılayıcı etkileri olan maddeler de vardır. Örneğin, Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) birçok hücre tipinde çoğalma, farklılaşma ve diğer fonksiyonları kontrol eden çok fonksiyonlu bir peptiddir. Birçok hücre TGF- $\beta$ 'yı sentezler ve hepsi bu peptid için özel reseptörlere sahiptir. Kan pıhtılaştığı zaman trombositlerin  $\alpha$  granüllerinden salınan TGF- $\beta$  (67), megakaryositlerin sayı ve ploidisini baskılayan potansiyel bir inhibitördür (35, 36, 43). Bunun dışında rekombinant interferon  $\alpha$  ve  $\gamma$  insan megakaryositopoezini önemli derecede baskılayabilmektedir (27).

Megakaryosit oluşumunda kemik iliği mikroortamındaki hücreler arası etkileşimler de yer alır. Kemik iliğinin iki önemli stromal elementi olan fibroblast (6) ve endotel hücreleri de in vitro ortamda megakaryosit çoğalma ve farklılaşma programında değişik bölümleri etkileyebilirler. Fibroblastlar uzun yıllar ilik ortamında aktif role sahip olarak, hematopoetik öncüleri etkileyebilen büyüme faktörlerinin hücre kaynağı olarak tanınırlar. En önemli salgı ürünü bazik fibroblast büyüme faktörüdür (bFGF=basic fibroblast growth factor). Yapılan bir çalışmada bFGF'ün çeşitli megakaryosit populasyonları üzerindeki etkilerinin farklı olduğu ve bFGF'ün megakaryosit-stromal etkileşimlerini düzenleyerek ya da megakaryositlerden sitokin salınımını arttırarak megakaryositopoezi etkileyebileceği ortaya konmuştur (7).

Önceki bulgular kültürde kolinesteraz inhibitörlerinin megakaryositopoezi uyardığını göstermektedir. Ayrıca megakaryositlerin farklılaşmasını düzenlemede kolinesteraz genlerinin rolü olabileceği konusunda bulgular vardır ve kolinesteraz geni 3. kromozomda yer alan Tf ve Tf reseptörlerini kodlayan genin yakınında bulunmaktadır (66).

## 2.2. Demir

Normal ve neoplastik hücrelerin büyüme ve çoğalması, ribonükleotid redüktaz enzimi regülasyonu, DNA sentezi gibi birçok reaksiyonlar için demir gereklidir (13, 28). Hemoglobinin oluşumuna etki eden etkenlerin en önemlisi olan demir, Hb yapısında bulunur ve dolayısıyla retikulositlerin eritrositlere dönüşümünü sağlar (5, 28, 33, 54). Organizmada demirin bulunduğu yapılar arasında, Hb'deki hem molekülleri, kaslarda myoglobin molekülü, hücrelerde sitokrom oksidaz, peroksidaz ve katalaz gibi enzimler yer alır. Ayrıca hücrelerde oksidatif fosforilasyonda görevli sitokrom c redüktaz, NADH dehidrogenaz, Xantin oksidaz gibi hem içermeyen flavoprotein grubu enzimlerde de demir bulunmaktadır. Toplam 3-4 gr olmak üzere insan bedeninde en bol bulunan metal olan demirin %65'i Hb'de, %4'ü myoglobinde, %1'i hem içeren hücre içi enzimlerde yer alırken, plazmada taşıyıcı proteine bağlı demir miktarı %0,1, karaciğer-dalak gibi organların parankim hücrelerinde depolanmış formu ise %15-30 dolayındadır. Kan kaybı artışı ve dölütün demir gereksinimi nedeniyle adet gören ve hamile kadınların günlük ihtiyacı erişkin erkeklere oranla iki-üç kat fazladır (5, 55, 70).

Görüldüğü gibi demir organizmanın yaşamsal fonksiyonlarının sürekliliği için gerekli bir elementtir. Dokuların oksijenlenmesi ve hücre fonksiyonlarının yapılabilmesi demirin varlığına bağlıdır. Ancak hücrede fazla demir bulunması toksik etki yaptığından bu elementin emilimi ve atılımı son derece kontrollü olarak yapılır. Sindirim kanalındaki emiliminin sınırlı olması yanında kaybını engelleyecek her

türlü önlem de alınmıştır. Bu nedenle demirin kana geçişi, transportu, depolanması ve kullanımı ile ilgili sayısız çalışma yapılmıştır. Uzun süren araştırmalara rağmen hala güncelliğini korumaktadır (70).

### 2.2.1. Demir emilimi

Besinlerle alınan demir çoğunlukla +3 değerlikli inorganik bileşikler (ferrik demir) halinde bulunur. Ferrik demir mide özsuyunda özellikle HCl ile serbestleştikten sonra  $Fe^{+2}$  (ferro) halde emilir. HCl demirin ferrikhidroksit şeklinde çökmesini engeller ve iyonu emilebilecek forma dönüştürür. Hem demiri ise doğrudan ferro halinde emilir. Midedeki serbest demiri bağlayıp duodenuma taşıyan gastroferrin adlı bir protein bulunur. Emilim büyük ölçüde duodenumdan gerçekleşir. Duodenumun pH'ı hem ferro, hem de ferrik demirin absorpsiyonuna uygun olmasına rağmen ferro demirin daha hızlı emildiği uzun yıllar bilinmektedir. Sindirim sisteminde askorbat, laktat, piruvat, süksinat, fruktoz ve glukoz gibi maddeler demirin ferro şekline indirgenmesini kolaylaştırır ve çözülebilen kompleksler haline gelmesini sağlayarak demir emilimini arttırırken; oksalatlar, fosfatlar ve fitat demirle birleşip kolay çözünmeyen bileşikler oluşturarak emilimini engellerler (26, 55, 70).

Demir emilimine etki eden humoral faktörler tam anlamıyla açıklığa kavuşmamıştır, ama Eritropoetin'in dolaylı görev aldığı bir gerçektir. Bunun dışında bağırsak hücreleri de demir emiliminin kontrolünde görev almaktadır. Bağırsak mukozasında demirin arttığı durumlarda emilim daha az olmakta, demir bağırsak hücreleri içinde apoferritinle birleşerek ferritin oluşturmakta ve plazmaya geçişi azalmaktadır. Eksikliğinde ise durum tamamen değişmekte ve mukoza hücrelerine giren demirin büyük bir bölümü plazmaya geçmektedir. Eritroid hipoplazisi veya malabsorpsiyon sendromları gibi bedende demir miktarının arttığı durumlarda demir emilimi azalırken, demir yetmezliği anemisi, hemolitik anemiler, sideroblastik anemiler, hipoksi, hemokromatosis, siroz ve gebeliğin son trimestri gibi durumlarda ise demir emilimi artmaktadır (5, 49, 55, 70).

Bebeklerin beslenmesinde başlıca kaynak olan süt, demir açısından oldukça fakirdir ve sadece 0,28-0,73 mg/L demir içermektedir. Bununla beraber çocuklarda nadiren demir eksikliği anemisi gelişir, çünkü anne sütündeki demirin biyoyararlılığı oldukça yüksektir (59).

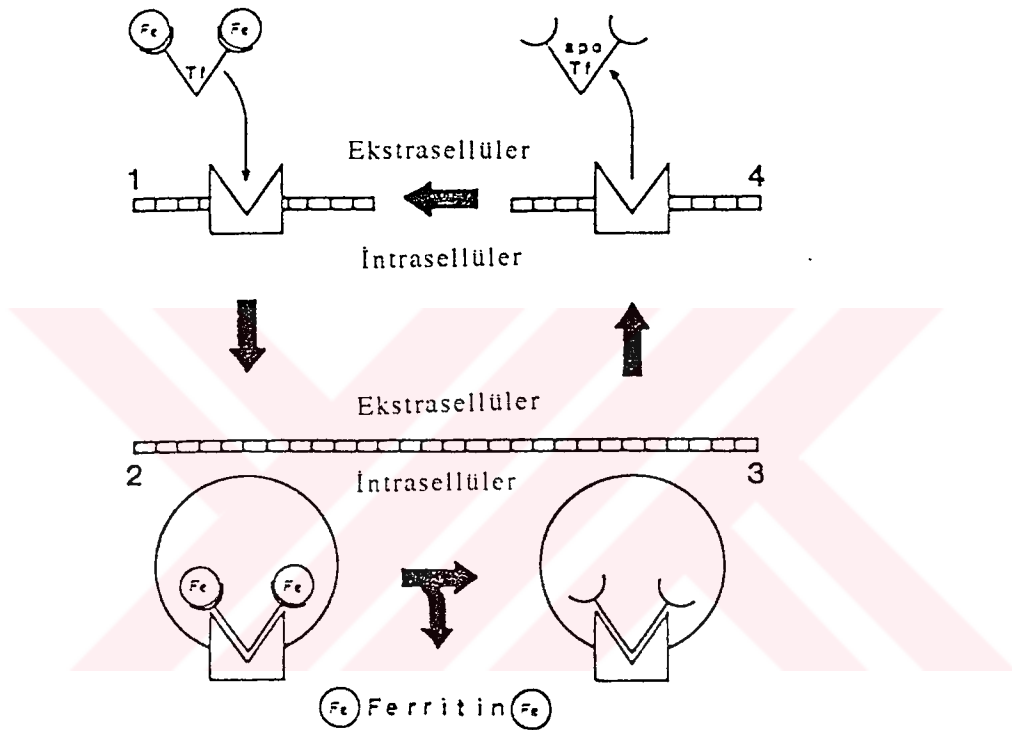
### 2.2.2. Demir transportu

Hücrelere demirin taşınmasına iki tane ferrik demir iyonu bağlayabilen ve bir serum glikoproteini olan Tf aracılık eder (10, 19, 24, 25, 28, 33, 34, 39, 65). Bu olayda ilk adım Tf'in hücre yüzeyinde bulunan spesifik reseptörüne bağlanmasıdır. Glikoprotein yapısında olan bu reseptör, birçok hücrede bulunur ve son zamanlarda izole edilmiştir (32, 34, 39).

Tf'in demirle bağlanmamış formu olan apotransferrin karaciğerde sentezlenir. Ayrıca merkezi sinir sistemi, lenf nodülleri, limfositler, makrofajlar ve fibroblastlarda da üretildiği belirtilmektedir (32). Tf duodenumda serbest demir veya hem moleküllerini bağlayarak mukozal hücrelerin yüzeylerine yönelir. Taşıdığı demir atomlarıyla birlikte pinositozla mukoza hücresine alınarak, oradan kana verilir (49, 70).

Plazmadaki Tf konsantrasyonu 2,5 g/L dir. Taşıyıcı protein olarak tanımlanan Tf'e bağlı demir miktarı yaklaşık 3 mg dır. Molekül ağırlığı 79570 Dalton, 678 aminoasitli, uzun  $\beta$  globulin zinciri halinde bulunur ve demir atomlarını uç kısımlardaki sialik asit moleküllerine bağlayabilir. Tf geni 3. kromozomun uzun kolunda lokalize olmuştur (3, 4, 49). Apotransferrin, 2 adet ferrik demiri bağlayabilme kapasitesindedir. Ferrik demir atomlarının moleküle bağlanması  $\text{HCO}_3$  iyonu ile sıkı bir şekilde olur ve Tf'e bağlı demir seruloplazmin tarafından yeniden oksitlenerek ferrik hale geçmiştir. Tf'in en az 19 farklı genetik tipi belirlenmiş olup, bunların demir bağlama ve kinetik özellikleri arasında büyük farklar bulunmamıştır (5, 55, 70). Yarı ömrü 8-10 gün dolayında olup (55), kolorektal neoplazilerin regülasyonunda da rolü olduğu gösterilmiştir (64).

Demirle doymuş Tf'in kendi reseptörüne bağlanmasından sonra gelişen olaylar hakkındaki çalışmalar bazı anlaşmazlıklara neden olmuşsa da son zamanlarda demirin hücreye reseptör aracılı endositoz yolu ile girdiği vurgulanmaktadır (25, 32, 34, 39). Tf, özgül reseptörüne bağlanarak hücre içine alınmakta, tanımlanamayan kısa yolculuğunu tamamladıktan sonra hücreden salınmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. K562 hücrelerinde Tf döngüsünün şematik gösterimi (39).

- 1- Demirle yüklenmiş Tf, hücre yüzeyinde bulunan özel reseptörlerine bağlanır.
- 2- Tf-reseptör ikilisi reseptör aracılı endositoz ile hücre içine alınır.
- 3- Demir, Tf den ferritine taşınır.
- 4- Apoferritin ve reseptör hücre yüzeyine tekrar döner ve apotransferrin hücre dışına salınır.



Demirin Tf'den ayrılabilmesi için pH: 5,5 civarında asit bir ortam önemlidir. Tf'e bağlı demir kararsız olduğundan lizozomların Tf'den salınım alanı olması mümkündür, çünkü lizozomların çevresi de düşük pH'dadır (34, 39, 45). Tf'in yaklaşık 1/3'ü demir ile doyurulmuştur ve proteinin geri kalan kısmı diğer metalleri bağlamak üzere özgürdür. Bakır, galyum, çinko, krom, manganez ve kobaltı daha az afinite ile bağlayabilir (19, 49).

Beden dokularına Tf'e bağlı demirin ulaşabilmesi için hücre zarında bulunan Tf reseptörlerine gereksinim vardır. Hücre içinde sentezlenerek zara geçen bu reseptörlerin sayısı demir emilim oranını belirlemektedir. Demir emilimindeki lineer oranın sürdürülebilmesi için Tf-reseptör birleşimi, yeni yüzey reseptörlerinin oluşumuna eşit olmalıdır. Fakat bulgular Tf'in hücreye alınım oranının hücreden Tf salınım oranına göre dört kat büyük olduğunu göstermektedir. Bu, internalize olmuş reseptörlerin hızla içteki işgal edilmemiş reseptörlerle yer değiştirdiğinin bir göstergesi olabilir (39). Ayrıca hem, demir ve protoporfirin IX'un Tf reseptörlerinin düzenlenmesinde başlıca moleküller olduğu önerilmektedir (50).

Tüm bunların yanısıra karaciğer ve dalağın bazı hücreleri verimsiz eritrositlerin parçalanmasında eritrofagositozun sonucu olarak demiri yapısına alabilme yeteneğindedirler. İnflamatuvar lezyonlarda makrofajlar da diğer demir içeren hücresel yıkıntıları fagositozla alabilirler. Makrofajlar ayrıca degranüle olmuş nötrofiller tarafından salınan laktoferrinden de demiri çekebilirler. Bunlara dayanarak Oria ve arkadaşları, birden fazla hücre içi demir taşıma sistemi olabileceğini önermişlerdir (57).

### **2.2.3. Demirin depolanması**

Barsak mukozal hücrelerince emilen veya Hb yıkım ürünü olarak açığa çıkan demir ya fonksiyon göreceği yapılara gitmek üzere plazmaya geçerek döngüye katılır ya da depolanır. Depo hücreleri başlıca dalak, karaciğer ve kemik iliğinde bulunur (5, 49, 70). Demir yetersizliği olan

dişi sıçanlar demirce zengin bir diyetle beslendiklerinde, daha birinci günden itibaren demiri depoladıkları belirlenmiş ve retikülositlerin oldukça fazlasında ferritin içeren siderozomlara rastlanmıştır. İlerleyen haftalarda kemik iliğindeki makrofajlar ve sinusoid endotel hücrelerinde aşırı demir birikimi görülmüş, son olarak sinüzoid endotel hücrelerinin sitozolü içinde önemsiz konsantrasyonda özgür ferritin molekülleri oluşmuştur (15).

Organizmada demirin ferritin ve hemosiderin olmak üzere iki tür depo formu vardır. Apoferritine demirin bağlanması ile ferritin oluşur. Apoferritin yaklaşık 4500 demir atomunu depolayabilen bir protein olup, molekül ağırlığı 430.000-480.000 arasındadır. Yapısında 24 adet benzer monomer içeren proteinin alt üniteleri arasında bağlantı bölgeleri ve özel kanallar bulunur. Demir atomları bu kanallardan geçerek merkezde toplanırlar. Bu şekilde oluşan ferritinin dış yüzeyinde yer alan ksantin oksidaz ve ferrokksidaz gibi oksitleyici enzimler, demir atomlarının oksitlenerek +3 değerlikli hale dönüşümünü sağlamakta ancak demirin moleküle bağlantısı zayıf olmaktadır. Kanallardan geçiş sırasında demirin hidrolizasyonu ve polimerizasyonu sonucunda güçlü bağlar kurulmaktadır. Zayıf bağlı demir atomları molekülün yüzeyinde yer aldıklarından kolayca Tf'e bağlanmaktadır. Depo halindeki demirin ferritinden çözünebilmesi için superoksit dismutaz ve katalaz gibi indirgeyici enzimlere ihtiyaç duyulur. Demirin bu enzimlerle ayrılması sonucunda hidroksil radikalleri açığa çıkmakta, ferritin molekülleri ise hücrelerde oluşan bu radikalleri katalize ederek nötrleştirmektedir (5, 70).

Fizyolojik koşullarda makrofajların depo demirini taşıması dışında sadece eritrositler ve eritroblastlar elektron mikroskopik olarak ferritin içeren siderosomlara benzeyen, çok küçük granül formlarında demiri bulundururlar. Böyle eritroblastlar sideroblast, eritrositlerde siderosit olarak isimlendirilirler (77).

Vücuttaki depo demiri ile ilgili bilgi edinmek için radioimmunoassay (RIA) yöntemleri kullanılarak serum ferritin düzeyi ölçülmektedir (70). Fakat demir tüketimini tahmin etmek ya da kemik iliği

demirinin düzeyini tespit etmek için eritrositik ferritinin ölçülmesi serum ferritinine göre daha etkili olduğu önerilmiştir (8). Normal durumlarda serum ferritin düzeyi erkeklerde 125 ng/ml, kadınlarda 55 ng/ml değerdedir (5). Serum ferritin düzeyinin ölçülmesi, demir eksikliğinin başlangıç safhasının belirlenmesi açısından da oldukça önemlidir. Çünkü demir eksikliği durumlarında kişilerde algılama ve öğrenmenin azaldığı, beyinde nörotransmitter sentezinde bozukluklara neden olduğu konusunda çalışmalar vardır. Ayrıca bağışıklık sistemi üzerinde olumsuz etki ederek, granulositlerin kemotaksis ve bakteriolisis işlevlerini azaltıp enfeksiyonlara yakalanma riskini arttırmaktadır (70).

Talassemi tedavisi için kemik iliği transplantasyonunu mümkün bir strateji olarak gösteren bir araştırmada, transplantasyondan sonra hastaların demir depolarında azalma görüldüğünden uzun olmayan demir tedavisine ihtiyaç duydukları belirtilmiştir. Tedavide kullanılan demir preparatları gözlem altında verildiğinde yüksek riskli talassemide dikkate değer iyileşme olduğu vurgulanmıştır (75)

Demirin ikinci depo formu olan hemosiderin, ferritinin kısmen su kaybetmiş ve çözülmeyen bir türüdür. Demir atomlarının çevresinde membranöz bir yapı bulunmakta ve ferritine oranla daha kararlı bir yapı göstermektedir. Fizyolojik koşullarda monosit ve makrofaj hücrelerinde, patolojik olarak da hemen tüm beden hücrelerinde bulunur ve suda çözünemezler. Ancak lipid çözücülerle molekülün yıkımı ve demir atomlarının serbestleşmesi sağlanır (5, 70).

Serum ferritini ölçümleri ve kemik iliği hemosiderin boyamaları sonucu saptanan depo demirinin miktarını karşılaştırmak ve arada bir uyum olup olmadığını araştırmak pek çok çalışmanın konusu olmuştur. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda saptanan hiperferritineminin depo demiri miktarı ile ilişkisinin olmadığı ileri sürülmüştür (78).

Demirin Tf'e bağlanmasını ya da salınımını engelleyen bazı etkenlerin bulunduğu ortaya konmuştur. K562 hücrelerinin büyüme ve çoğalması üzerine hepatositler, makrofajlar ve monositler tarafından sentezlenen bir protein olan  $\alpha$ 1antitripsin ( $\alpha$ 1-AT) in etkisinin araştırıldığı

bir çalışmada  $\alpha 1$ -AT'in doza bağımlı olarak Tf'in özel reseptörüne bağlanmasını inhibe ettiği, bunun sonucu olarak malign eritrositik hücrelerin (K562) büyüme ve çoğalmasını önemli ölçüde azalttığı anlaşılmıştır (28). Concanavalin A ve mikrotübül inhibitörleri de benzer etkilere sahiptir. Bunlar belki de hücre yüzeyinden Tf endositozunu ya da onun lizozom benzeri organellere transportunu engelleyerek, demir Emilimini azaltabilirler (34). Yine Suramin'in Tf'in hücre yüzeyinde bulunan reseptörüne bağlanmasını inhibe ederek, demir alımını engellediği ortaya konmuştur (25).

Deferoxamine'in in vitro ortamda insan B ve T limfositlerindeki DNA sentezini baskıladığı bulunmuştur. Bu inhibisyonu demirin bağlanmasını engelleyerek, ribonükleotid redüktaz enziminin aktivitesini bloke ederek hücre döngüsünün S fazında gerçekleştirdiği belirtilmiştir (14, 19, 38, 48). İnsan promyelositik lösemik hücrelerinin (HL60) gerekli bir madde olarak 25-150  $\mu\text{g/ml}$  Tf'e bağlı demir içeren serumsuz besi ortamında normal olarak çoğaldığı gösterildi. Bununla beraber hiç Tf eklenmediğinde ya da Gallium (Ga) bağlanmış Tf formunda eklendiğinde çoğalmanın inhibe olduğu belirtilerek, Tf reseptör yoğunluğunda bir artış meydana geldiği ve çoğalmanın durması ile hücre döngüsünün S ve G2+M fazlarında kaldığı ifade edildi (18, 20). Radyoaktif Ga geçmişte tümörlerin lokalizasyonu için teşhise ait bir ajan olarak ve son zamanlardaki bir çalışmada potansiyel bir kemoterapötik ajan olarak kullanıldı. Ayrıca klinik çalışmalar, lenfomaya karşı Gallium nitratın sürekli intravenöz infüzyonunun etkisinin tümörlerin in vivo olarak Tf reseptörlerini bulundurmalarından kaynaklandığını gösterdiler. Gallium nitrat ile tedavi edilen bazı hastalarda mikrositik hipokromik anemi gelişmesinin Ga'un hücrel demir metabolizmasına müdahale etmesi nedeniyle gerçekleşebileceğini önerdiler (76).

Başlangıçta demir taşıyıcısı olan Tf'e özgü reseptörlerin yalnızca Hb üreten ve plasental hücrelerde bulunduğu ifade edilirken (19, 46, 54), günümüzde bu reseptörlerin başka hücrelerde de var olduğunun ortaya

konması konuya olan ilgiyi artırmıştır (69). Yapılan çalışmalar, özellikle Hb sentezi, büyüme, çoğalma ve farklılaşma için eritrositlerin (34, 39), yine çoğalma için limfositler (2, 3, 13) kanser hücreleri ve neoplastik hücrelerin demire ihtiyaç duyduklarını göstermektedir (10, 47, 52). Limfositlerin çoğalmak için Tf reseptörlerine ihtiyaçları olduğunu göstermek amacıyla yapılan bir çalışmada, mitojenik bir uyarın ile çoğalmaları indüklenen limfositlerin Tf reseptörleri aracılığıyla S fazına girdikleri ve DNA sentezine başladıkları bildirilmiştir (13). Tf reseptörleri ve hücre çoğalması arasındaki ilişki ribonukleotid redüktaz enzimi için demirin gerekli bir element olması ile bağlantılıdır. Bu enzimin aktivitesi, S fazı sırasında DNA sentez oranı ile uyum göstererek, yüksek oranda arttırılır (2, 3, 13, 47). Araştırmalar, özellikle hematopoetik ve malign hücrelerde çoğalmanın devamlılığı için demirin çok önemli bir besin olduğunu ortaya koymuştur (19, 52, 58).

### 3. G E R E Ç V E Y Ö N T E M

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde ağırlığı 150-200 g olan *Sprague Dawley* sıçanların kemik iliği ve hücre kültüründe besi yeri olarak Leibovitz medium (L-15, Sigma) kullanıldı. L-15 kullanılmadan önce kontamine olmasını engellemek amacıyla por çapı 0,22 mikron olan filtreden geçirilerek, içerisine 20 U/ml Penicillin + 20 µg/ml Streptomycin (Sigma) eklendi. Stok solusyon daha sonra kullanılmak üzere 2-8°C de saklandı. Megakaryositlerin çoğalması üzerine etkileri araştırılacak olan demirle doyurulmuş Tf (Sigma), L-15 ile dilüe edilerek, 50 µg/ml, 150 µg/ml ve 300 µg/ml dozları hazırlandı ve 0°C de stok edildi (4, 19).

#### 3.1. Sıçan Plazmasının Hazırlanması

Sağlıklı ve 8-10 haftalık albino sıçanlar eterle anestezi edildikten sonra %3,8 sodyum sitrat içeren steril enjektörlerle doğrudan kalpten kan alındı. Steril ve dereceli polietilen tüplere aktarılan kan, 4°C, 3000 g de 15 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan plazma enjektörle dikkatli bir şekilde alınarak, 0,45 mikronluk filtreden geçirildi, küçük şişelerin her birine 1,3 ml olacak şekilde konup, 0°C de muhafaza edildi (41).

#### 3.2. Kemik İliği Hücre Kültürünün Yapılışı

Eterle anestezi edilen sıçanların her iki femuru açığa çıkarılarak üzerindeki dokular tamamen temizlendi. Steril bir pens ile tutulan femur steril kemik makasıyla iki ucundan (20-30 mm) kesildi. Önceden enjektör içine alınmış steril L-15, femurun bir ucundan basınçla fışkırtılarak iliğin

tamamının steril santrifüj tüpü içine geçmesi sağlandı. Tüpün içinde bulunan ilik ve L-15 steril bir enjektörle (22G, 30 mm uzunluk) homojenize edildi. Bu işlem yapılırken sıvının köpürmemesine dikkat edildi. Homojenatı içeren tüp 4°C, 380 g de 5 dk. santrifüjde çevrildi. Tüpün içinde 2 ml homojenat bırakılarak üstte kalan süpernatantın tamamı atıldı ve enjektörle birkaç kez çekilip boşaltılarak kalan homojenat içindeki hücrelerin homojen dağılımı sağlandı. Sonra homojenattan alınan bir damla, parafilm üzerine konarak Coulter Counter (MD8) ile sayıldı ve kültüre eklenecek hücre sayısı belirlendi.

Sıçan kemik iliği hücreleri, 96 gözenekli platelerin içinde inkübatörde 37°C, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> ortamında 7 gün boyunca inkübe edildi. Her bir gözenekte bulunan (0.3 ml) karışım:

- 1- %50 Leibovitz medium (L-15)
- 2- %20 sıçan serumu (Sigma) (74)
- 3- %10 kemik iliği hücresi (10<sup>6</sup> hücre/ml)
- 4- %10 demirle doyurulmuş Tf ya da serum fizyolojik
- 5- %10 sıçan plazması

içeriyordu. Bu özellikleri taşıyan kontrol, 50 µg/ml Tf, 150 µg/ml Tf ve 300 µg/ml Tf gruplarının deneyleri en az üç kez tekrar edildi.

### 3.3. Preparasyon

Ekimin yapıldığı ilk gün (0. gün) dahil olmak üzere yedi gün boyunca inkübatörde bulunan plate, steril kabine alınıp, gözeneklerdeki plazma pıhtılarından her gün 4 ile 6 tane çıkartılarak temiz lamalar üzerine yerleştirildi. Fazla sıvıyı ortamdan çekmek amacıyla üzerleri filtre kağıdı ile kapatıldıktan sonra %5 lik glutraldehitten (0,01 M sodyum fosfat tamponu pH: 7 ile dilüe edilmiş) 2-3 damla damlatıldı. On dakika bekletilerek pıhtıların ilk fiksasyonu gerçekleştirildi. Bu süre sonunda baş parmak ile filtre kağıdının üzerine hafifçe bastırılması ile pıhtıların lam üzerine tutunması sağlanarak, bir pens yardımıyla filtre kağıtları ortamdan

uzaklaştırıldı. Birkaç damla 0,1 M sodyum fosfat tamponu (pH: 6) damlatılarak 1 dk bekletildi. Sonra etüve alınan lamlar 50°C de kurutuldu. Preparasyon bu şekilde tamamlandıktan sonra boyama işlemine geçildi.

### 3.4. Boyama

Boyama için Kornovsky ve Roots'un tiyokolin metodu kullanıldı (40). Bu metoda göre,

- 1- 60 mg Asetiltiyokolin iyodür (Sigma)
- 2- 90 ml sodyum fosfat tamponu (0,1 M, pH: 6)
- 3- 6 ml sodyum sitrat (0,1 M)
- 4- 12 ml bakır sülfat (30 mM)
- 5- 12 ml bidistile su
- 6- 12 ml potasyum ferrosiyaniür (III) (5 mM)

içeren boya bir şaleye alınarak içerisine preparatlar yerleştirildi ve 4-5 saat boyunca bekletildi. Bu süre bitiminde biraz süzöldükten sonra 0.1 M sodyum fosfat tamponundan (pH: 6) ndan birkaç damla damlatılarak 1 dk tutuldu. Ardından sırasıyla %100 metanolde (Merck) 10 dk.ve %50 metanolde 30 sn bırakılarak ikinci fiksasyon sağlandı. Lamlar etüvde 50°C de 5 dk kurutuldu. Harris Hematoksilen'le 1 dk tekrar boyandıktan sonra hemen suyla yıkandı. Daha sonra %2 amonyum hidroksil ile muamele edildi ve 50°C ısıdaki etüvde kurutuldu. Pıhtıların kenarına birer damla entellan konup lamlar 45°C açılı ile kapatıldı ve daimi preparat haline getirildi. Hazırlanan plazma pıhtısı preparatlarında bulunan megakaryositler mikroskopta 40x10 büyütme ile sayıldı. Sayım pıhtı alanının bir kenarından diğer kenarına önce soldan sağa sonra bir görüntü aşağı kaydırılıp sağdan sola doğru şaryonun hareketiyle yapıldı. Bu şekilde sayılan tüm gruplardaki megakaryosit sayılarının istatistiksel değerlendirmesi student's t testi ile yapıldı.



#### 4. B U L G U L A R

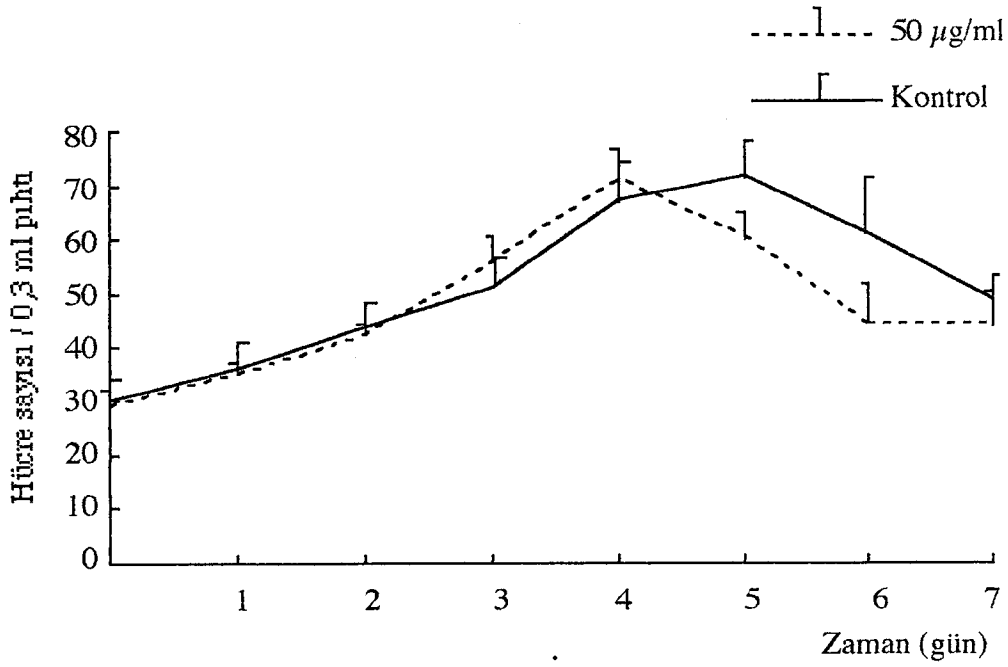
Sıçan kemik iliğinde bulunan megakaryositik hücrelerin kültür ortamında üretiminin yapıldığı bu çalışmada, 50 µg/ml, 150 µg/ml ve 300 µg/ml demir ile doyurulmuş Tf dozları uygulanarak üç ayrı deney grubu oluşturuldu. Tf yerine serum fizyolojik içermek üzere her deney grubu için birer tane olmak üzere üç adet kontrol grubu yapıldı. Kontrol gruplarının ve Tf içeren deney gruplarının deneyleri en az üçer kez tekrarlandı. Deney ve kontrol gruplarındaki megakaryosit sayılarının istatistiksel analizleri karşılaştırıldı. Deney ve kontrol gruplarının ortalama megakaryosit sayıları Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

50 µg/ml Tf bulunan deney grubunun 0. ve 5.günlerindeki hücre sayıları karşılaştırıldığında anlamlı bir artış kaydedilmiştir ( $p<0,01$ ). 50 µg/ml deney grubuna ait kontrol grubunun da 0. ve 5. günleri karşılaştırıldığında  $p<0.01$  olmak üzere anlamlı bir fark bulunmuştur. 50 µg/ml. Tf ve kontrol grubunun sadece 5. günlerindeki hücre sayıları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p>0,05$ ) Şekil 4.1, 50 µg/ml Tf grubu ile kontrol grubuna ait megakaryositlerin sayısal değerlerini göstermektedir.

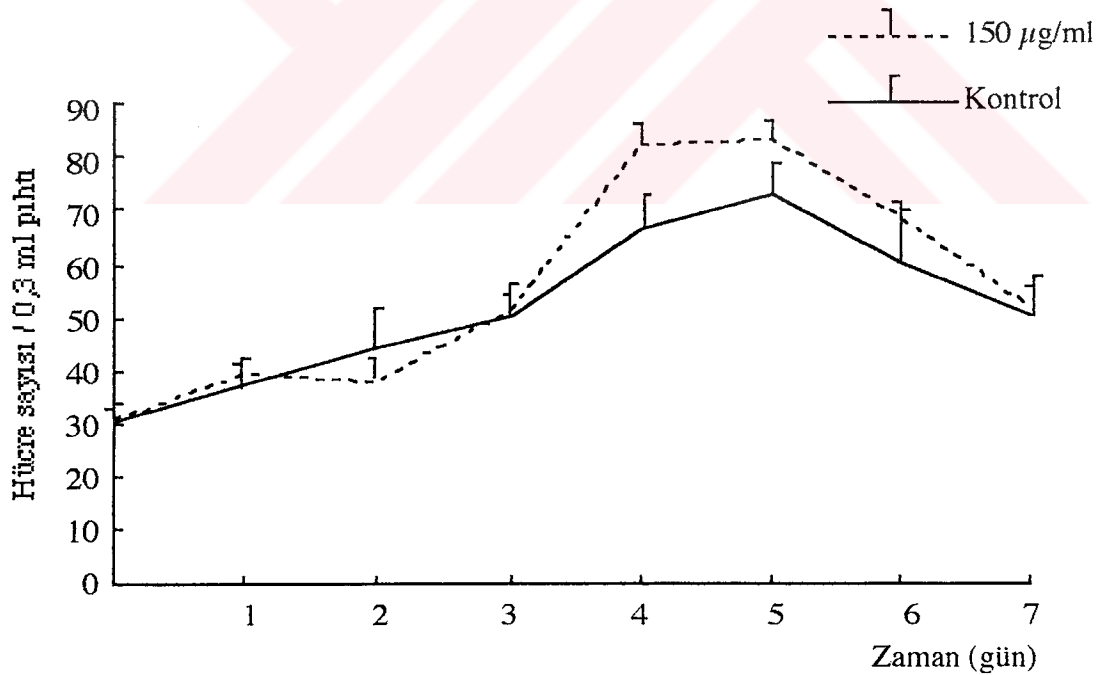
Çizelge 4.1. Deney ve kontrol gruplarının ortalama megakaryosit sayıları  
( $\bar{X}$  ort $\pm$ Standart hata)

	50 $\mu$ g/ml	Kontrol	150 $\mu$ g/ml	Kontrol	300 $\mu$ g/ml	Kontrol
0. GÜN	29,4 $\pm$ 2,16 n=5	30 $\pm$ 3,39 n=4	31 $\pm$ 2,66 n=5	30,5 $\pm$ 3,01 n=4	29 $\pm$ 3,73 n=5	29,5 $\pm$ 3,06 n=4
1. GÜN	35,2 $\pm$ 1,39 n=5	36 $\pm$ 6,17 n=4	39,4 $\pm$ 1,50 n=5	37 $\pm$ 4,98 n=4	41,4 $\pm$ 2,29 n=5	36,5 $\pm$ 7,1 n=4
2. GÜN	42,4 $\pm$ 1,86 n=5	44 $\pm$ 5,09 n=4	38,25 $\pm$ 3,53 n=5	44,5 $\pm$ 7,04 n=4	55 $\pm$ 4,73 n=5	44,75 $\pm$ 0,62 n=4
3. GÜN	56,2 $\pm$ 3,44 n=5	51,25 $\pm$ 4,87 n=4	51,6 $\pm$ 2,31 n=5	50,5 $\pm$ 6,43 n=4	56 $\pm$ 2,07 n=5	50,5 $\pm$ 1,32 n=4
4. GÜN	71,2 $\pm$ 5,44 n=5	67,25 $\pm$ 6,68 n=4	82,4 $\pm$ 3,39 n=5	66,75 $\pm$ 6,35 n=4	82,2 $\pm$ 13,39 n=5	65 $\pm$ 7,12 n=4
5. GÜN	60,4 $\pm$ 4,63 n=5	72 $\pm$ 6,48 n=4	83,2 $\pm$ 3,44 n=5	72,75 $\pm$ 5,89 n=4	86 $\pm$ 5,55 n=5	72,25 $\pm$ 7,29 n=4
6. GÜN	44,6 $\pm$ 7,11 n=5	61 $\pm$ 9,94 n=4	68,2 $\pm$ 3,09 n=5	60,25 $\pm$ 9,54 n=4	76,8 $\pm$ 5,39 n=5	59,75 $\pm$ 4,51 n=4
7. GÜN	44,4 $\pm$ 5,90 n=5	49 $\pm$ 4,56 n=4	51,6 $\pm$ 3,53 n=5	50,25 $\pm$ 7,48 n=4	65,4 $\pm$ 6,08 n=5	51,75 $\pm$ 1,31 n=4

150  $\mu$ g/ml Tf içeren grubun 0. ve 5. günlerindeki hücre sayısı kıyaslandığında  $p < 0,001$  olmak üzere önemli bir artış bulunmuştur. Bu gruba ait kontrol grubunun da 0. ve 5. günleri aynı şekilde karşılaştırıldığında anlamlı bir artış bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). 150  $\mu$ g/ml Tf ile kontrol grubunun sadece 5. günleri kıyaslandığında hücre sayısında bir miktar artış bulunmasına rağmen (Şekil 4.2), istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı görülmüştür ( $p > 0,05$ ).

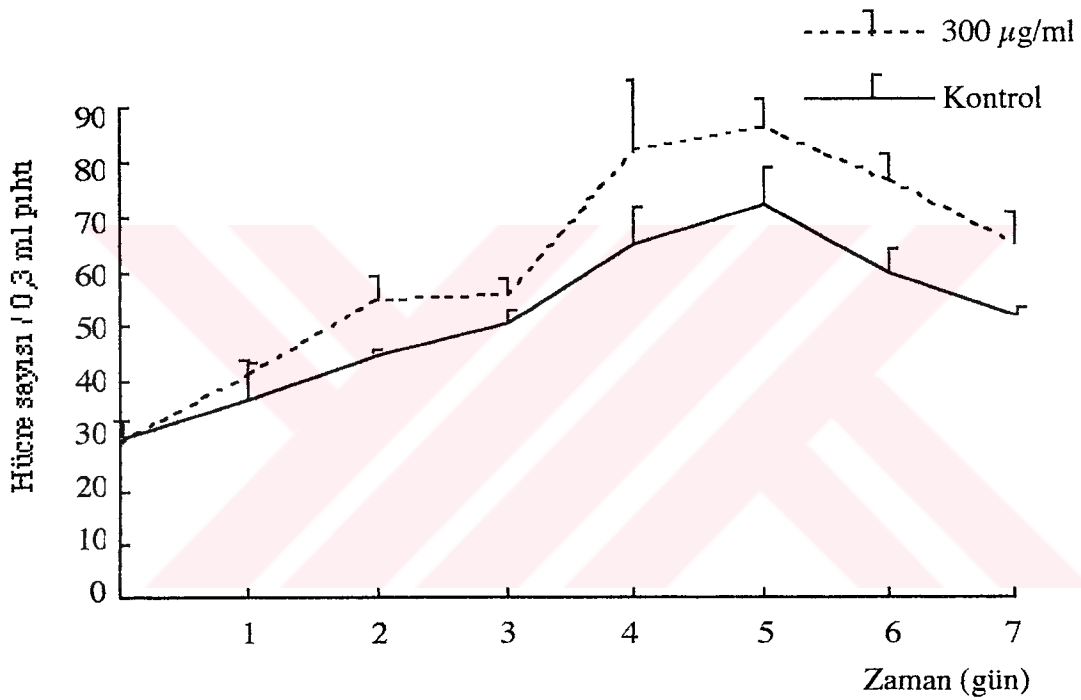


Şekil 4.1. 50 µg/ml Tf grubu ile kontrol grubunun günlere göre megakaryosit değerleri. ( $p > 0,05$ ) ( $X \text{ ort} \pm SH$  standart hata)



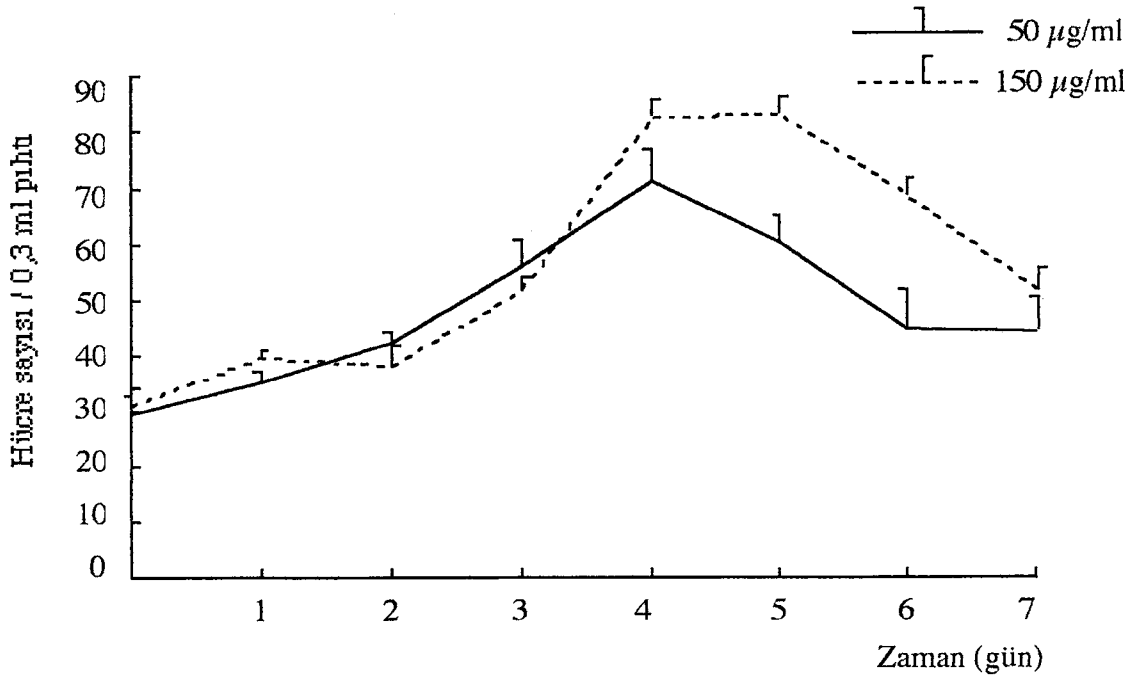
Şekil 4.2. 150 µg/ml Tf grubu ile kontrol grubunun günlere göre megakaryosit değerleri ( $X \text{ ort} \pm$  standart hata) ( $p > 0,05$ )

300  $\mu\text{g/ml}$  Tf bulunan deney grubumuzun 0. ve 5. günleri karşılaştırıldığında anlamlı bir artış gözlenmiştir ( $p<0,01$ ). Yine bu gruba ait kontrol grubunun da 0. ve 5. günleri arasında  $p<0,01$  oranında artış saptanmıştır. 300  $\mu\text{g/ml}$  Tf ve kontrol grubunun sadece 5. günleri karşılaştırıldığında hücre sayısında artış kaydedilmesine rağmen, aralarında istatistiksel açıdan bir fark bulunamamıştır ( $p>0,05$ ) Şekil 4.3, 300  $\mu\text{g/ml}$  Tf ve kontrol grubunun megakaryosit değerlerini göstermektedir.

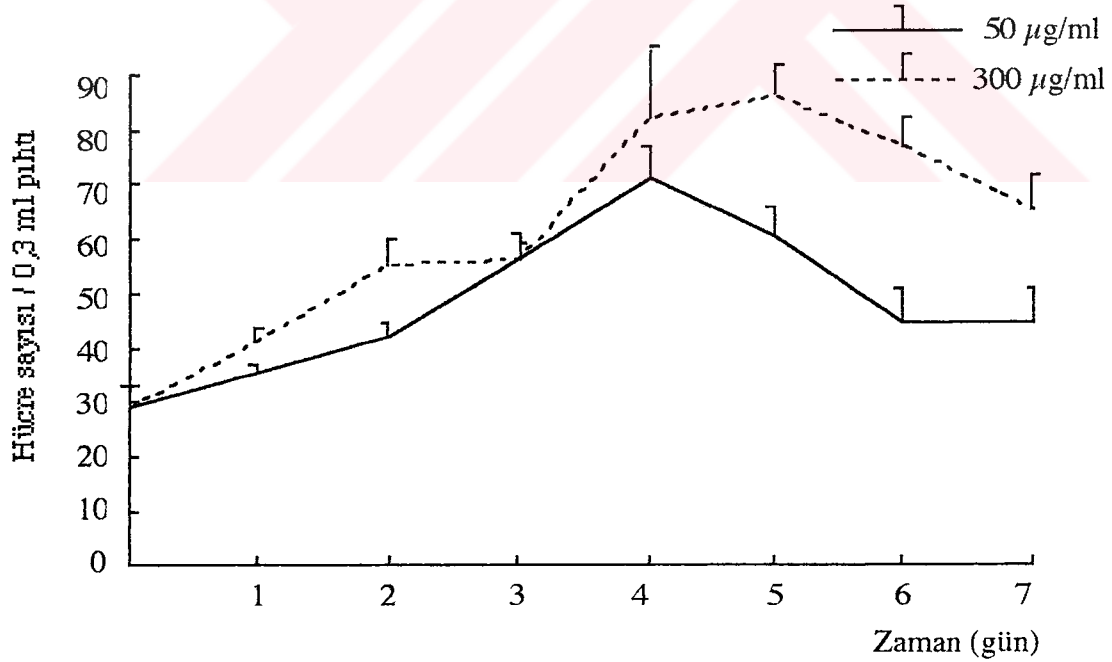


Şekil 4.3. 300  $\mu\text{g/ml}$  Tf grubu ile kontrol grubunun günlere göre megakaryosit değerleri ( $\bar{X}$  ort $\pm$  standart hata) ( $p>0,05$ )

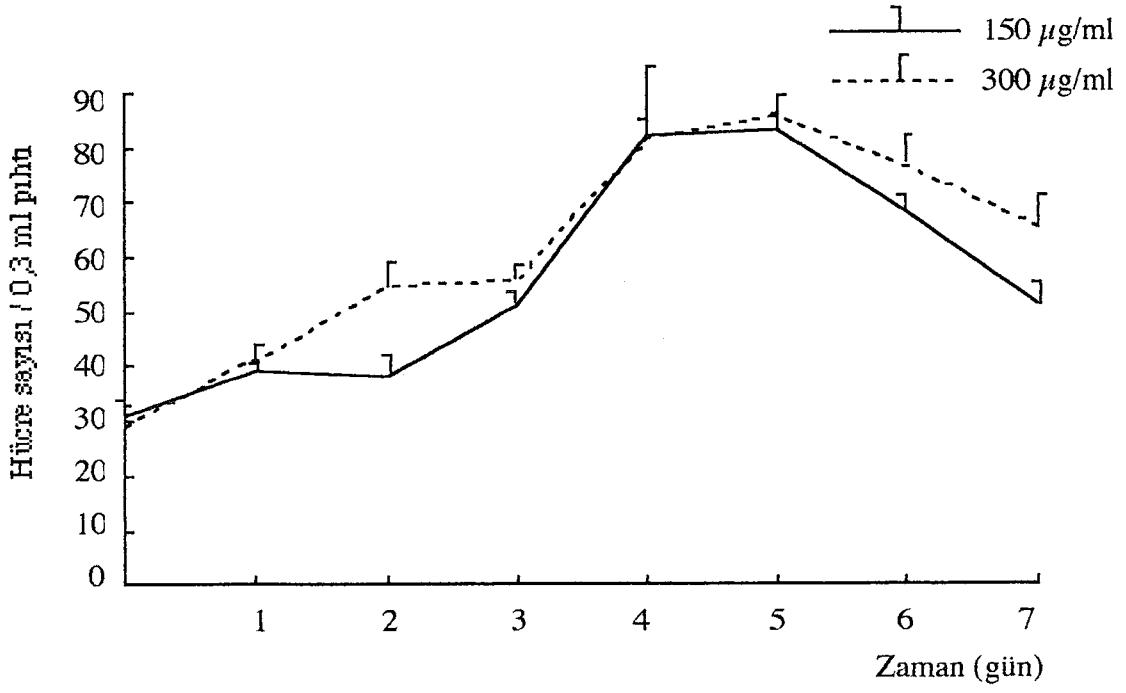
Kontrol grupları dikkate alınmaksızın deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, 0.ve 5.günlerde her üç grupta da (50  $\mu\text{g/ml}$ , 150  $\mu\text{g/ml}$ , 300  $\mu\text{g/ml}$ ) hücre sayısı açısından  $p>0,05$  olmak üzere bir fark yoktur. (Şekil 4.4, 4.5, 4.6).



Şekil 4.4. 50 µg/ml ve 150 µg/ml Tf gruplarının günlere göre megakaryosit değerleri (X ort± standart hata) (p>0.05)



Şekil 4.5. 50 µg/ml ve 300 µg/ml Tf gruplarının günlere göre megakaryosit değerleri (X ort± standart hata) (p>0.05)



Şekil 4.6. 150 µg/ml ve 300 µg/ml Tf gruplarının günlere göre megakaryosit değerleri ( $\bar{X}$  ort± standart hata) ( $p>0.05$ )

## 5. T A R T I Ő M A V E S O N U Ç

Normal ve neoplastik hücrelerin çoğalması için demir gerekli bir elementtir (13, 28). Eritrositik hücreler, Hb sentezi için olduğu kadar öncü hücrelerin çoğalması ve büyümesi için de demire ihtiyaç duymaktadır (34, 39). Bu ihtiyaç, hücre yüzeyinde bulunan transferrin reseptörleri aracılığıyla transferrine bağlı demirin hızla hücre içerisine alınması ile karşılanır (32, 54, 58). Transferrin reseptörlerinin hematopoetik ve malign hücrelerde oldukça fazla miktarda bulunması, bu hücrelerde transferrin reseptör geninin yüksek derecede aktif olduğunu göstermektedir (52). Yapılan çalışmalar limfositik hücrelerin de çoğalmak için demire gereksinim duyduklarını göstermektedir (2,3). Transferrin reseptörleri ve hücre çoğalması arasındaki ilişki, ribonükleotid redüktaz enzimi için demirin önemli olması ile bağlantılıdır. Bu enzimin aktivitesi hücre döngüsünün S fazında DNA sentez oranı ile birlikte yüksek oranda artmaktadır (13, 47).

Demirin hücre çoğalması üzerindeki etkisinin hücre aktiviteleri üzerinde rol oynamasından kaynaklandığı ifade edilmiştir. Alcantara ve arkadaşları limfoblastoid hücre dizisi olan CCRF-CEM hücrelerinde demir ile bağlanmış Tf kullanarak, Protein Kinaz C- $\beta$  (PKC- $\beta$ ) geninin etkisindeki artışı göstermişlerdir. PKC- $\beta$  geninin etkisinin arttığı sonucuna, mRNA'sının ve PKC enziminin aktivitesinin artmasını gözlemleriyle ulaşımlardır (3). İncelenen hücrelerde PKC- $\beta$ 'dan farklı olarak, PKC- $\alpha$  geninin etkisi demir ile düzenlenmemiştir. Ortamda demirin varlığına cevap olarak PKC izoformlarının etkilerinin farklı şekillerde düzenlenmesi, demirin belirli hücre aktivitelerinin kontrolüne katılabildiğini göstermektedir. Bu aktiviteler içinde hematopoetik

hücrelerin farklılaşması ve işlev görmesi de yer almaktadır. Fakat demirin gen regülasyonunda görev alma yeteneği sadece hematopoetik hücelere özgü olarak sınırlanamaz. Çünkü tavşan endometrial hücre dizisi (HRE H9) hücrelerinin de genetik düzenleme için Tf demirini kullandığı belirlenmiştir (4).

Demirin trombositopoezdeki rolü konusunda ise henüz tam bir görüş birliğine varılamamıştır. Demir eksikliği görülen hastalarda trombosit sayısının artması yanında seyrek olarak trombositopeni de görülmüştür (53). Michaeli ve arkadaşları demir yetersizliği anemisi olan, trombositopeni ve megakaryositopenili bir hastayı tanımlamışlardır. Bu hastanın geçmişte idiopatik trombositopenik purpuraya sahip olması mümkünse de, başlangıçta teşhis için göz önünde bulundurulmamıştır; çünkü idiopatik trombositopenik purpuranın tipik kemik iliği bulguları şiddetli demir yetersizliğiyle örtülmüştür. Hastaya demir verilmesini takiben trombosit sayısında gerçek bir artış meydana gelmiştir (53). Aynı şekilde demir eksikliği anemisinin bir sonucu olarak ortaya çıkan ve vaginal kanama ile şiddetlenen trombopenili ve megakaryositopenili bir hastaya günde 300 mg oral demir uygulanması ile trombositopeni ve megakaryositopeni tedavi edilmiştir (11). Yapılan genetik bir çalışmada, 62 yaşında, refrakter anemili, kemik iliğinde yüksek trombosit sayısı ve mikromegakaryositleri olan bir hasta sunulmuştur. Bozulmuş trombositopoez bulgularına ve kromozomal anomaliye sahip bu hasta üzerinde bir dizi araştırma yapılmış ve sonuçta bozulmuş trombopoeze öncülük eden olayın transferrin reseptörü genindeki değişmeden kaynaklandığı vurgulanmıştır (52). Bunların yanısıra kobaylarda akut kan kaybının trombosit sayısını bir-iki misli arttırdığı, akut kan kaybına ek olarak demir verilmesinin kan pulcuğu sayısında daha yüksek bir artışa neden olduğu belirtilmiştir. Bu durum, demirin megakaryositopoez ve trombositopoez için önemli olduğunu göstermektedir. Ayrıca demir içeren proteinler olan hem ve transferrinin kan pulcuğu ve megakaryosit üretiminde önemli maddeler olduğu ifade edilmiştir (53).

Tüm bu görüşlere rağmen demirin megakaryositik hücelere etkisiz



olduğu konusunda da bulgular vardır. “Belgrad laboratuvarı sıçanları” (b/b)’nin eritroblastlarının zarındaki demir taşınması bozukluğundan kaynaklanan kalıtsal hipokromik mikrositik anemi (23) ve eritroid öncülerinde proliferatif defekt tanımlanmıştır (58). Buna bağlı olarak Rolovic ve arkadaşları, b/b sıçanlarında megakaryositik makrositoz ve tanınabilir megakaryositlerde artmış olgunlaşmanın sebep olduğu hipomegakaryositik trombositopeniyi de göstermişlerdir. Bu sıçanlarda megakaryosit anomalilerinin altında yatan temel mekanizmaları tanımlamak ve özellikle blb sıçanlarındaki genetik defekte megakaryosit öncü hücrelerinin (CFU-M) katılıp katılmadığı veya megakaryosit anomalisinin ileri derecedeki aneminin bir sonucu olup olmadığını araştırmışlardır. Önce hipomegakaryositik trombositopeni, bu hayvanlarda olduğu bilinen vücut dokusunda demirin azalmasına bağlanmış ve megakaryosit konsantrasyonunun azalmasına şiddetli demir yetersizliği anemisinin sebep olduğu ifade edilmiştir (11). Fakat sonra b/b sıçanlarında megakaryositik hücre nesli anomalilerinin demir eksikliğinden değil, şiddetli anemiden kaynaklanan uzun süreli hipoksinin etkisiyle hematopoetik stem hücrelerinde oluşan bozukluk sonucu olduğunu belirtmişlerdir (61).

Yaptığımız çalışmada demir bağlanmış insan transferininin 50 µg/ml, 150 µg/ml ve 300 µg/ml miktarlarını sıçan kemik iliği hücre kültürüne ekledik. Kemik iliği hücre kültürü sonucunda transferrin dozlarını hem kendi içinde hemde kontrolleriyle karşılaştırdığımızda megakaryosit sayısında istatistiksel açıdan anlamlı bir artış olmadığını belirledik. Bu sonuçlar, çalışmamıza başlarken demirle doyurulmuş transferrinin in vitro şartlarda megakaryositopoez olayında mitotik bir etki yapabileceği konusundaki varsayımımızı desteklemedi. Bulduğumuz sonuçlar Rolovic ve arkadaşlarının bulgularını desteklerken (61), diğer araştırmacıların (11, 52, 53) elde ettiği sonuçlara ise ters düşmektedir.

Deneylerimizde kullandığımız insan Tf’inin sıçan kemik iliği hücreleri üzerinde etki yaratmamasının nedeni, Tf ve hücrelerin ayrı türlere ait olmasından kaynaklanabilir. İnsan Tf’i sıçan megakaryositik hücrelerinin reseptörlerine affinite göstermeyerek hücre içerisine demirin

alınımını tam olarak gerçekleştirememiş olabilir. Bu nedenle demirin sıçan megakaryosit hücreleri üzerinde etki gösterememesi muhtemeldir. Fakat belki de daha yüksek dozlarda Tf'in uygulanması megakaryositik hücrelerin çoğalması üzerine etki edebilecektir.

Bunların yanısıra megakaryositlerin gelişim basamaklarında stem hücrelerinden SChE<sup>+</sup> hücrelerine kadar olan öncü hücrelerde görülen mitozun megakaryoblast, promegakaryosit ve megakaryositlerde yerini endomitoza bırakması sonucu hücre sayısı aynı kalmakta ama poliploidide artış meydana gelmektedir. Demir bu gelişim basamaklarında öncü hücrelerin mitozuna etki etmeden poliploidide bir artışa da neden olmuş olabilir. Bunun belirlenebilmesi için özellikle hücrelerin poliploidilerini ölçme gibi daha kapsamlı araştırmaların yapılması gerekebilir.



## K A Y N A K L A R D İ Z İ N İ

1. Aglietta, M., Monzeglio, C., Sanavio, F., Apra, F., Morelli, S., Stacchini, A., Piacibello, W., Bussolino, F., Bagnara, G., Zavli, G., Stern, A.C. and Gavosto, F. : In vivo effect of human Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor on Megakaryocytopoiesis. *Blood*, **77**: 1191-1194, 1991.
2. Alcantara, O., Denham, C.A., Phillips, J.L. and Boldt, D.H. : Transcriptional regulation of transferrin receptor expression by cultured lymphoblastoid T cells treated with phorbol diesters. *J. Immunol*, **142**: 1719-1726, 1989.
3. Alcantara, O., Javors, M. and Boldt, D.H. : Induction of protein kinase C mRNA in cultured lymphoblastoid T cells by iron-transferrin but not by soluble iron. *Blood*, **77**: 1290-1297, 1991.
4. Alcantara, O., Obeid, L., Hannun, Y., Ponka, P., and Boldt, H.D. : Regulation of protein kinase C expression by iron: Effect of different iron compounds on PKC- $\beta$  and PKC- $\alpha$  gene expression role of the 5' flanking region of the PKC- $\beta$  gene in the response to ferric transferrin. *Blood*, **84**: 3510-3517, 1994.
5. Andreoli, M.E., Carpenter, C.C.J., Plum, F. and Smith, L.H.: Cecil Essentials of Medicine (çev. E. Bagatur, S. Baktirođlu, S. Çalangu). Second Ed., W.B. Saunders Company, U.S.A., s. 502-507, 1990.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

6. Avraham, H., Scadden, D.T., Chi, S., Broudy, V.C., Zsebo, K.M., and Groopman, J.E. : Interaction of human bone marrow fibroblasts with megakaryocytes : Role of c-kit ligand. *Blood*, **80**: 1679-1684, 1992.
7. Avraham, H., Banu, N., Scadden, D.T., Abraham, J. and Groopman, J.E. : Modulation of megakaryocytopoiesis by human basic fibroblast growth factor. *Blood*, **83**: 2126-2132, 1994.
8. Balaban, E.P., Sheehan, R.G., Demian, S.E., Cox, J.V., and Frenkel, E.P. : Evaluation of bone marrow iron stores in anemia associated with chronic disease: A comparative study of serum and red cell ferritin. *Am.J. Hematol.*, **42**: 177-181, 1993.
9. Banu, N., Wang, J., Deng, B., Groopman, J.E. and Avraham, H. : Modulation of megakaryocytopoiesis by Thrombopoietin: The c-mpl ligand. *Blood*, **86**: 1331-1338, 1995.
10. Berczi, A., Sizensky, J.A., Crane, F.L. and Faulk, W.P. : Diferric transferrin reduction by K562 cells. A critical study. *Biochem. Biophys. Acta*, **1073**: 562-570, 1991.
11. Berger, M. and Brass, L.F. : Severe thrombocytopenia in iron deficiency anemia. *Am. J. Hematol.*, **24**: 425-428, 1987.
12. Berridge, M.V., Fraser, J.K., Carter, J.M. and Lin, F.K.: Effects of recombinant human Erythropoietin on megakaryocytes and on platelet production in the rat. *Blood*, **72**: 970-977, 1988.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

13. Boldt, D.H., Phillips, J.L. and Alcantara, O : Disparity between expression of transferrin receptor ligand binding and non-ligand binding domains on human lymphocytes. *J. Cell Physiol.*, **132**: 331-336, 1987.
14. Bomford, A., Isaac, J., Roberts, S., Edwards, A., Young, S. and Williams, R. : The effect of desferrioxamine on transferrin receptors, the cell cycle and growth rates of human leukaemic cells. *Biochem. J.*, **236**: 243-249, 1986.
15. Braumann, A., Wulfhekel, U., Düllmann, J. and Nielsen, P. : Iron overload of the bone marrow by trimethylhexanoyl-ferrocene in rats. *Acta Anatomica*, **144**: 285-295, 1992.
16. Briddel, R., Brandt, J.E., Leemhuis, T.B. and Hoffman, R. : Role of cytokines in sustaining long-term human megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood*, **79**: 332-337, 1992.
17. Bruno, E., Miller, M.E. and Hoffman, R. : Interacting cytokines regulate in vitro human megakaryocytopoiesis. *Blood*, **73**: 671-677, 1989.
18. Chitambar, C.R., Massey, E.J. and Seligman, P.A. : Regulation of transferrin receptor expression on human leukemic cells during proliferation and induction of differentiation. *J. Clin. Invest.*, **72**: 1314-1325, 1983.
19. Chitambar, C.R. and Seligman, P.A. : Effects of different transferrin forms on transferrin receptor expression, iron uptake and cellular proliferation of human leukemic HL60 cells. *J.Clin. Invest.*, **78**: 1538-1546, 1986.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

20. Chitambar, C.R., Matthaeus, W.G., Antholine, W.E., Graff, K. and O'Brien, W.J. : Inhibition of leukemic HL60 cell growth by transferrin-gallium: effects on ribonucleotide reductase and demonstration of drug synergy with hidroxyurea. *Blood*, **72**: 1930-1936, 1988.
21. Choi, E.S., Nichol, J.L., Hokom, M.M., Hornkohl, A.C. and Hunt, P. : Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood*, **85**: 402-413, 1995.
22. Debili, N., Wendling, F., Cosman, D., Titeux, M., Florindo, C., Dusanter-Fourt, I., Schooley, K., Methia, N., Charon, M., Nador, R., Bettaieb, A. and Vainchenker, W. : The Mpl receptor is expressed in the megakaryocytic lineage from late progenitors to platelets. *Blood*, **85**: 391-401, 1995.
23. Edwards, J., Huebers, H., Kunzler, C. and Finch, C. : Iron metabolism in the Belgrade rat. *Blood*, **67**: 623-628, 1986.
24. Finch, C.A. : Erythropoiesis, Erythropoietin and iron. *Blood*, **60**: 1241-1246, 1986.
25. Forsbeck, K., Bjelkenkrantz, K. and Nilsson, K. : Role of iron in the proliferation of the established human tumor cell lines U-937 and K-562: Effects of Suramin and a lipophilic iron chelator. *Scand J. Haematol.*, **37**: 429-437, 1986.
26. Ganong, W.F. : *Tıbbi Fizyoloji* (edit. A. Doğan). Barış Kitabevi, 16. baskı: s. 521-523, 1995.
27. Ganser, A., Stella, C., Greher, J., Völkers, B. and Hoelzer, D. : Effects of recombinant interferons alfa and gamma on human bone marrow-derived megakaryocytic progenitor cells. *Blood*, **70**: 1173-1179, 1987.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

28. Graziadei, I., Gaggl, S., Kaserbacher, R., Braunsteiner, H. and Vogel, W. : The acute-phase protein  $\alpha$ 1-antitrypsin inhibits growth and proliferation of human early erythroid progenitor cells and of human erythroleukemic cells (K562) in vitro by interfering with transferrin iron uptake. *Blood*, **83**: 260-268, 1994.
29. Greenberg, S.M., Rosenthal, D.S., Greeley, T.A., Tantravahi, R. and Handin, R.I. : Characterization of a new megakaryocytic cell line: The Dami cell. *Blood*, **72**: 1968-1977, 1988.
30. Hoffman, R. : Regulation of megakaryocytopoiesis. *Blood*. **74**: 1196-1212, 1989.
31. Hu, Z.B., Ma, W., Uphoff, C.C., Quentmeier, H. and Drexler, H.G. : c-kit expression in human megakaryoblastic leukemia cell lines. *Blood*, **83**: 2133-2144, 1994.
32. Huebers, H.A. and Finch, C.A. : The physiology of transferrin and transferrin receptors. *Physiol. Rev.*, **67**: 520-582, 1987.
33. Huebers, H.A., Beguin, Y., Pootrakul, P., Einspahr, D. and Finch, C.A. : Intact transferrin receptors in human plasma and their relation to erythropoiesis. *Blood*, **75**: 102-107, 1990.
34. Iacopetta, B.J., Morgan, E.H. and Yeoh, C.T. : Receptor-mediated endocytosis of transferrin by developing erythroid cells from the fetal rat liver. *J. Histochem and Cytochem.*, **31**: 336-344, 1983.
35. Ishibashi, T., Miller, S.L., Burstein, S.A. : Type B transforming growth factor is a potent inhibitory murine megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood*, **69**: 1737-1741, 1987.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

36. Ishibashi, T., Kimura, H., Shikama, Y., Uchida, T., Kariyone, S., Hirano, T., Kishimoto, T., Takatsuki, F. and Akiyama, Y. : Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood*, **74**: 1241-1244, 1989.
37. Kaushansky, K. : Thrombopoietin : The primary regulator of platelet production. *Blood*, **86**: 419-431, 1995.
38. Kemp, J.D., Smith, K.M., Kanner, L.J., Gomez, F., Thorson, J.A. and Naumann, W.: Synergistic inhibition of lymphoid tumor growth in vitro by combined treatment with the iron chelator deferoxamine and an IgG monoclonal antibody against the transferrin receptor. *Blood*, **76**: 991-995, 1990.
39. Klausner, R.D., Renswoude, J., Ashwell, G., Kempf, C., Schechter, A.N., Dean, A. and Bridges, K.R.: Receptor-mediated endocytosis of transferrin in K562 cells. *J.Biol.Chem.*, **258**: 4715-4724, 1983.
40. Kornowsky, M.J. and Roots, L.: A direct-Cloring tiocholine method for cholinesterase. *J. Histochem. Cytochem.*, **12**: 219-221, 1964.
41. Kuter, D.J., Greenberg, S.M. and Resenberg, R.D. : Analysis of megakaryocyte ploidy in rat bone marrow cultures. *Blood*, **74**: 1952-1962, 1989.
42. Kuter, D.J. and Rosenberg, R.D. : Regulation of megakaryocyte ploidy in vivo in the rat. *Blood*, **75**: 74-81, 1990.
43. Kuter, D.J., Gminsky, D.M. and Rosenberg, R.D.: Transforming growth factor  $\beta$  inhibits megakaryocyte growth and endomitosis. *Blood*, **79**: 619-626, 1992.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

44. Kuter, D.J., and Rosenberg, R.D. : Appearance of a megakaryocyte growth-promoting activity, Megapoietin, during acute thrombocytopenia in the rabbit. *Blood*, **84**: 1464-1472, 1994.
45. Kühn, L.C. : mRNA-protein interactions regulate critical pathways in cellular iron metabolism. *British J. Haematol.*, **79**: 1-5, 1991.
46. Larrick, J.W. and Hyman, E.S. : Acquired iron-deficiency anemia caused by an antibody against the transferrin receptor. *The New England J. of Medicine*, **311**: 214-218, 1984.
47. Laskey, J., Webb, I., Schulman, H.M. and Ponka, P. : Evidence that transferrin supports cell proliferation by supplying iron for DNA synthesis. *Exp. Cell Res.* **176**: 87-95, 1988.
48. Lederman, H.M., Cohen, A., Lee, J.W.W., Freedman, M.H. and Gelfand, E.W. : Deferoxamine: A reversible S-phase inhibitor of human lymphocyte proliferation. *Blood*, **64**: 748-753, 1984.
49. Lee, G.R., Bithell, T.C., Foerster, J., Athens, J.W. and Lukens, J.N. : *Wintrobe's Clinical Hematology*. 9<sup>th</sup> Ed., Lea and Febrieger, Philadelphia, London, pp. 173-185, 522-539, 1993.
50. Louache, F., Testa, U., Pelicci, P., Thomopoulos, P., Titeux, M. and Rochant, H. : Regulation of transferrin receptors in human hematopoietic cell lines. *J. Biol. Chem.*, **259**: 11576-11582, 1984.
51. Mc Donald, T.P., Mac Carty, J.M., Jorgenson, M.J. and Kaushansky, K. : Thrombopoietin from human embryonic kidney cells is the same factor as c-mpl-ligand. *Blood*, **85**: 292-294, 1995.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

52. Mertens, F., Johansson, B., Billström, R., Engquist, L. and Mitelman, F. : A case of myelodysplastic syndrome with high platelet counts and a t(3;8) q(26;q24). *Cancer Genet Cytogenet*, **27**: 1-4, 1987.
53. Michaeli, J., Admon, D., Lugassy, G. and Matzner, Y. : Idiopathic thrombocytopenic purpura presenting as iron-responsive thrombocytopenia. *Haemostasis*, **7**: 105-108, 1987.
54. Muta, K., Nishimura, J., Ideguchi, H., Umemura, T. and Ibayashi, H. : Erythroblast transferrin receptors and transferrin kinetics in iron deficiency and various anemias. *Am. J. Hematol.*, **25**: 155-163, 1987.
55. Müftüoğlu, E. : Klinik Hematoloji ve İmmunoloji. 2. baskı, 1. Bölüm, Dicle Üniversitesi Tıp Fak. Yayınları, Diyarbakır, s. 33-36, 1987.
56. Navarro, S., Debili, N., Couedic, J.L., Klein, B., Breton-Gorius, J., Doly, J. and Vainchenker, W. : Interleukin-6 and its receptor are expressed by human megakaryocytes: In vitro effects on proliferation and endoreplication. *Blood*, **77**: 461-471, 1991.
57. Oria, R., Alvarez-Hernandez, X., Liceaga, J. and Brock, J.H. : Uptake and handling of iron from transferrin, lactoferrin and immune complexes by a macrophage cell line. *Biochem. J.*, **252**: 221-225, 1988.
58. Pavlovic-Kentera, V., Basara, N., Biljanovic-Paunovic, L. and Vasilijevska, M. : Erythroid progenitors in anemic Belgrade Laboratory (b/b) rats. *Exp. Hematol.*, **17**: 812-815, 1989.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

59. Pochedly, C. and May, S.L. : Iron deficiency anemia in children. *Am.Fam.Physician*, **35**: 195-200, 1987.
60. Rolovic, Z., Basara, N., Biljanovic-Paunovic, L., Stojanovic, N., Suvajdzic, N. and Pavlovic-Kentera, V. : Megakaryocytopoiesis in experimentally induced chronic normobaric hypoxia. *Exp. Hematol.*, **18**: 190-194, 1990.
61. Rolovic, Z., Basara, N., Stojanovic, N., Suvajdzic, N. and Pavlovic-Kentera, V. : Abnormal megakaryocytopoiesis in the Belgrade Laboratory rat. *Blood*, **77**: 456-460, 1991.
62. Ryffel, B., Car, B.D., Woerly, G., Weber, M., DiPadova, F., Kammüller, M., Klug, S., Neubert, R. and Neubert, D. : Longterm Interleukin-6 administration stimulates sustained thrombopoiesis and acute-phase protein synthesis in a small Primate-The Marmoset. *Blood*, **83**: 2093-2102, 1994.
63. Sakaguchi, M., Sato, T. and Groopman, J.E. : Human Immunodeficiency Virus infection of megakaryocytic cells. *Blood*, **77**: 481-485, 1991.
64. Sayek, I. : Temel Cerrahi. Güneş Kitabevi, 1. baskı: s. 831, 1991.
65. Shintani, N., Kohgo, Y., Kato, J., Kondo, H., Fujikawa, K., Miyazaki, E. and Niitsu, Y. : Expression and extracellular release of transferrin receptors during peripheral erythroid progenitor cell differentiation in liquid culture. *Blood*, **83**: 1209-1215, 1994.
66. Soreq, H., Zamir, R., Zevin-Sonkin, D. and Zakut, H. : Human cholinesterase genes localized by hybridization to chromosomes 3 and 16. *Hum. Genet.*, **77**: 325-328, 1987.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

67. Sporn, M.B., Roberts, A.B., Wakefield, L.M., and Assoian, R.K. : Transforming Growth Factor- $\beta$ : Biological function and chemical structure. *Science*, **233**: 532-534, 1986.
68. Stenberg, P.E. and Levin, J. : Ultrastructural analysis of murine megakaryocyte maturation in vitro : Comparison of big cell and heterogeneous megakaryocyte colonies. *Blood*, **70**: 1509-1518, 1987.
69. Taetle, R., Rhyner, K., Castagnola, J., To, D. and Mendelsohn, J. : Role of transferrin, Fe and transferrin receptors in myeloid leukemia cell growth. *J. Clin. Invest.*, **75**: 1061-1067, 1985.
70. Terzioğlu, M., Yiğit, G. ve Oruç, T. : Fiziyojji Ders Kitabı. İstanbul Üniversitesi Yayınları, 2. baskı: s. 70-81, 1993.
71. Tsukada, J., Misago, M., Kikuchi, M., Sato, T., Ogawa, R., Oda, S., Chiba, S. and Eto, S. : The effect of high doses of recombinant human erythropoietin on megakaryocytopoiesis and platelet production in splenectomized mice. *Br. J. Haematol.*, **76**: 260-268, 1990.
72. Uyar, R. : Regulation of megakaryocytopoiesis. *TU. J. Med. and Pharm.* **12**: 63-76, 1988.
73. Uyar, R. : Megakaryocyte ontogeny. *TU Tıp ve Ecz. D.C.*, **12**: 77-90, 1988.
74. Uyar, R. and Cooper, G. : The effect of serum, plasma and spleen cells on megakaryocytopoiesis. *TU.J.Med.Sci.* **13**: 191-201, 1989.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

75. Vreugdenhil, G., Smeets, M. and Broekhuysen, A.M. : Compliance with iron-chelation treatment after bone marrow transplantation. *The Lancet*, **343**: 604-605, 1994.
76. Warrel, R.P., Coonley, C.J., Straus, D.J. and Young, C.W. : Treatment of patients with advanced malignant lymphoma using Gallium nitrate administered as a seven day continuous infusion. *Cancer*, **51**: 1982-1987, 1983.
77. Wulfhekel, U. and Düllmann, J. : The diagnostic value of bone marrow iron. *Folia Haematol.* **117**: 419-434, 1990.
78. Yeğınboy, S., Büyükkeçeci, F. Özkılıç, H., Ayhan, M.E., Yaman, Ç. ve İşler, M. : Kronik böbrek yetmezlikli hastalarda serum ferritini konsantrasyonu ve demir depolarınının durumu. *Ege Üniversitesi Tıp Fak. Derg.*, **27**: 1521-1527, 1988.
79. Young, K.M. and Weiss, L. : Megakaryocytopoiesis: Incorporation of tritiated Thymidine by Small Acetylcholinesterase-Positive cells in murine bone marrow during antibody-induced thrombocytopenia. *Blood*, **69**: 290-295, 1987.

## Ö Z G E Ç M İ Ş

1972 yılında Eskişehir’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini aynı şehirde tamamladıktan sonra 1989 yılında Anadolu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü kazandı. 1993 yılında aynı bölümden mezun oldu ve Biyolog ünvanı aldı. Aynı yıl Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı, halen adı geçen anabilim dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

