

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ÇOCUK HEMATOLOJİ BİLİM DALI

BETA –TALASEMİ HASTALARINDA
GRANÜLOSİT APOPTOZU

Uzmanlık Tezi
Dr. Barış Şahin

108087

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Hale Ören
İzmir – 2001

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DEĞERLENDİRME VE YERLEŞTİRME BÜYÜK KURULU

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. HEMOGLOBİNİN YAPISI VE TİPLERİ	4
2.2. TALASEMİ SENDROMLARI.....	4
2.2.1. BETA-TALASEMİ	5
2.2.2. BETA-TALASEMİ MAJOR	5
2.2.2.1. Klinik bulgular ve tanı.....	5
2.2.2.2. Laboratuvar bulguları.....	6
2.2.2.3. Tedavi	7
2.2.3. BETA-TALASEMİ İNTERMEDİA	8
2.2.4. BETA-TALASEMİ TAŞIYICILIĞI.....	8
2.2.5. BETA-TALASEMİ MAJORDA ANEMİNİN NEDENLERİ	9
3.1. APOPTOZ	10
3.1.1. APOPTOZDA ROL ALAN GENLER	12
3.1.2. APOPTOZU ETKİLEYEN FAKTÖRLER.....	13
3.1.3. APOPTOZUN DEĞERLENDİRİLMESİ	14
3.1.4. BETA-TALASEMİ VE APOPTOZ İLİŞKİSİ	15
3. HASTALAR VE YÖNTEM.....	17
3.1. HASTALAR.....	17
3.2. YÖNTEM	17
3.2.1. Granülosit izolasyonu	17
3.2.1.1. Gerekli araç ve malzemeler	18
3.2.1.2. Yöntem	18
3.3.1. Annexin V-FITC ile granülosit apoptozunun gösterilmesi	19
3.3.1.1. Gerekli araç ve malzemeler	19
3.3.1.2. Yöntem	20
3.4. İstatistiksel yöntemler	21
4. BULGULAR.....	23
5. SONUÇLAR.....	27
6. TARTIŞMA	29
7. ÖZET.....	33
8. SUMMARY	34
9. KAYNAKLAR.....	35

10. EKLER	43
10.1 Hasta veri formu	44
10.2. Hastaların klinik ve laboratuvar verileri	45
10.3. Hastaların flow sitometredeki apoptoz sonuçları	50



KISALTMALAR

DFO: Desferrioxamine

DNA: Deoksiribonükleik Asit

EPO: Eritropoetin

FADD: Fas Associated Death Domain (Fas' a Bağlı Ölü Bölge)

FLIP: Flice Inhibitory Protein

G-CSF: Granulocyte Colony Stimulating Factor (Granülosit Koloni Stimulan Faktör)

Hb: Hemoglobin

HL: Human Leukemia (İnsan Lösemi)

ICAM: Intracellular Adhesion Molecule (Hücre İçi Adezyon Molekülü)

ICE: Interleukin-1 β Converting Enzyme (İnterlökin-1 β Dönüştürücü Enzim)

IL: Interleukin

IVS: Intervening Sequence (İntron)

MDR: Multiple Drug Resistance (Çoklu İlaç Direnci)

mRNA: Messenger Ribonükleik Asit

PARP: Poli Adenil Riboz Fosfat

PBS: Phosphate Buffer Saline (Fosfat Tampon Solüsyonu)

PI: Propidium Iodide

PS: Phosphatidyl Serine

TNF: Tumor Necrosis Factor (Tümör Nekrosis Faktör)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ülkemizde sıklıkla görülen ve önemli sağlık sorunlarına yol açan hemoglobinopati, beta-talasemidir (1-3). Beta-talasemi, hemoglobinin beta-globulin zincir sentezinin azalması (β^+ -talasemi) yada hiç sentezlenmemesi (β^0 -talasemi) sonucu oluşan ve otozomal resesif kalıtılan bir hastalıktır. Beta-talasemide aneminin üç farklı nedeni vardır: inefektif eritropoez, intramedüller hemoliz ve hemoglobin üretiminde azalma. Bu nedenlerden en önemlisi inefektif eritropoezdir (4). Yapılan çalışmalarda beta-talasemi majorlu hastalarda kemik iliğindeki eritroid öncüllerinde apoptozun artmış olduğu gösterilmiştir (5).

Apoptoz (Programlanmış hücre ölümü), selektif bir hücre delesyonu işlemidir. Apoptozun varlığı, normal ve anormal işlevlerin kontrolünde major rol oynar (6). Moleküler seviyedeki tanımı, klasik olarak DNA'nın endonukleazlar tarafından 180-200 baz çifti içerecek şekilde parçacıklara bölünerek nükleosomlar oluşturulmasıdır. Çekirdeksiz hücrelerde ise hücre membranında tomurcuklanma ve stoplazmik yoğunlaşma ile kendini gösterir (7). Bu DNA kırıklarının elektroforezle gösterilmesi apoptozun ortaya konmasında sık kullanılan eski bir yöntemdir (8). Ancak 1994'te Koopman ve arkadaşları yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Hücre membranındaki fosfolipid hücreler apoptoza girdikçe bozulmakta ve normalde hücre membranı iç yüzeyinde yer alan fosfotidilserin (PS) dış yüzeyden eksprese olmaya başlamaktadır. Anneksin-V fosfolipidlere, özellikle de PS'e kalsiyum-aracılı bağlanan bir proteindir. Anneksin-V'in PS'e bağlanması flow sitometrik yöntemle, kültür ortamında gösterilmiş ve apoptozu bu yöntemle değerlendirilebilme olanağı doğmuştur (9,10).

Talasemi majorlu hastalar hem splenektomi öncesi hem de sonrasında bakteriyel enfeksiyonlara yatkındır. Bu yatkınlık T-hücre alt grup anormallikleri ile aşırı demir yükü ve tekrarlayan transfuzyonların neden olduğu immün baskılanma ve bozulmuş nötrofil fagosit fonksiyonlarına bağlanmaktadır. Çeşitli çalışmalarda tedavide kullanılan desferoksaminin (DFO) aktive insan nötrofillerinin adezyon fonksiyonlarını bozduğu in-vitro olarak gösterilmiştir (11). Yine bir başka çalışmada talasemili hastalardan elde edilen serumun nötrofillere toksik olduğu ve bu toksisitenin ferritine bağlı demir yükü nedeni ile ortaya çıktığı bildirilmiştir (12). Ancak talasemili hastalardaki enfeksiyonlara olan yatkınlığın granülosit apoptozu ile ilişkisi bugüne kadar çalışılmamıştır.

DFO talasemili hastalarda transfüzyonel demir yükünün tedavisinde kullanılmaktadır. Bu ajan belirgin sitotoksiktir ve hücre proliferasyonunu S-fazında inhibe eder. Sağlıklı insandan elde edilen aktive periferel T-lenfositlerde ve HL60 promyelositik hücre serisinde DFO'nun çoğalmakta olan hücrelerde apoptoza neden olurken, aktive edilmemiş periferel lenfositlerde ve granüositlerde apoptoza neden olmadığı in-vitro 12-24-48 saatlik inkübasyonlar sonrası oligonükleer DNA parçacıklarının elektroforezle gösterilmesiyle ortaya konmuştur (8). HL60 hücreleri, DFO eklenen ortamda 24 saat tutulduğunda çok düşük dozlarda bile apoptoz indüklenmiştir. Aynı bulgu endotel hücrelerinde de gösterilmiştir (13,14). C-myc proto-onkogeni, apoptotik hücre ölümü, proliferasyon ve diferansiasyonu da içeren bir çok hücresel işlevde rol oynamaktadır. DFO alan talasemik hastalardan elde edilen periferel mononükleer hücrelerde c-myc onkoprotein ekspresyonunun sağlıklı kontrollere göre belirgin düşük olduğu bulunmuştur (15).

Tüm bu verileri değerlendirerek biz bu çalışmada, literatürde ilk kez talasemi majorlu hastalarda periferik kandaki granüositlerde apoptoz oranlarını Annexin-V yöntemi ile araştırmayı ve bu hastalardaki granüosit apoptoz oranı ile enfeksiyon sıklığı, DFO kullanımı ve serum ferritin düzeyi arasındaki ilişkiyi incelemeyi amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER:

2.1. HEMOGLOBİNİN YAPISI VE TİPLERİ

Hemoglobin, vertebralıların kırmızı kan hücrelerinde, bazı vertebrasızlarda ve legümlerin kök nodüllerinde bulunan, oksijen taşınması için gerekli bir proteindir. Molekül ağırlığı 63000-67000 mol kadardır ve küresel bir yapıya sahiptir. Hemoglobin molekülü her biri bir hem grubu taşıyan iki çift polipeptid zincirinden oluşan bir tetramerdir. %4 hem ve %96 globinden oluşan hemoglobin molekülünün globin parçası, iki alfa (α) ve birbirinin aynı olan iki non-alfa polipeptid zinciri içerir. Çeşitli hemoglobinlerin polipeptid zincirleri kimyasal olarak farklı tiptedirler. Embriyo, fetüs, çocuk ve yetişkin kırmızı kan hücreleri içerisinde normalde altı farklı hemoglobin tespit edilir: embriyonik hemoglobinler, Gower-1($\zeta_2\varepsilon_2$), Gower-2($\alpha_2\varepsilon_2$) ve Portland($\zeta_2\gamma_2$); fetal hemoglobin, Hb F ve yetişkin hemoglobinleri, Hb A ve Hb A₂. Embriyonik hemoglobinler gestasyonun sekizinci haftasına kadar predominant hemoglobin olmalarına rağmen üçüncü ay civarında kaybolarak yerlerini Hb F'e bırakırlar (1).

Fetal hemoglobin non-alfa polipeptidi olarak gama, " γ " polipeptid zinciri içerir ve $\alpha_2\gamma_2$ şeklinde tanımlanır. Altı aylık bir fetusta hemoglobinin %90'ını Hb F oluştururken bu oran doğumda düşer ve totalin %70'ine iner. Doğum sonrası dönemde HbF sentezi hızla azalır ve 6-12 aylık olduğunda sadece küçük bir miktar tespit edilebilir. Bu yaşın üzerindeki çocuklarda ve yetişkinde Hb F %2'nin altına iner.

Hemoglobinin normal erişkin eritrositlerindeki tipleri, Hb F, Hb A₂ ve predominant form olan Hb A'dır. Hb A, non-alfa polipeptidi olarak beta, " β " polipeptid zinciri içerir ve $\alpha_2\beta_2$ şeklinde tanımlanır.

Globin zincirleri, α ve β globin gen kümelerindeki yapısal genler tarafından kodlanır. Alfa globin gen kümesi 16. kromozomun ve beta globin gen kümesi 11. kromozomun kısa kolu üzerinde yer alır. Her iki kümede bulunan genler, gelişim sürecinde 5' den 3' ucuna doğru birbirini izleyerek eksprese olacak şekilde düzenlenmişlerdir (16,17). Doğumdan sonra 6. haftaya kadar süren ilk evrede Hb F ve Hb A'nın total hemoglobin içerisindeki yüzdeleri sabit kalırken ikinci evrede (6-25.haftalar) hemoglobin kompozisyonu değişir ve Hb F ile Hb A erişkin düzeyleri olan, sırasıyla %0,5 ve %96 seviyelerine ulaşır (16,18).

Diğer form olan Hb A₂ ise non-alfa polipeptid olarak, delta, "δ" polipeptid zinciri içerir. δ globin geni, βglobin geni tarafından kodlanan 146 amino asitten 10 amino asitinde farklılık gösteren bir globin kodlar. Ancak δ globin geninin "promotor" olarak adlandırılan kontrol bölgesi defektiftir ve fonksiyonel mRNA oluşumunu baskılar. Ayrıca δ mRNA β mRNA'dan daha az kararlıdır. Bu nedenlerle Hb A₂, eritrositlerdeki hemoglobinin ancak %2'sini oluşturur. Tablo 1'de farklı gelişim dönemlerindeki insan hemoglobin tipleri ve oranları verilmiştir (16,19).

Tablo 1. İnsanda farklı gelişim dönemlerindeki hemoglobin tipleri ve gözlenme oranları.

Gelişim dönemi		Hemoglobin tipi	Gözlenme oranı
Embryonik (8. haftaya kadar)	$\zeta_2\varepsilon_2$	Hb Gower 1	
	$\zeta_2\gamma_2$	Hb Portland	
	$\alpha_2\varepsilon_2$	Hb Gower 2	
Fetal	$\alpha_2\gamma_2$	Hb F	%85
	$\alpha_2\beta_2$	Hb A	%5-10
Erişkin	$\alpha_2\beta_2$	Hb A	%96
	$\alpha_2\delta_2$	Hb A ₂	%2.5-3.5
	$\alpha_2\gamma_2$	Hb F	%0.5

2.2. TALASEMİ SENDROMLARI

Hemoglobin yapısı ve sentezinde meydana gelen bozukluklar "hemoglobinopati" olarak adlandırılır. Ülkemizde hemoglobinopatilerden en sık rastlanılanları sırası ile beta-talasemi, orak hücreli anemi, alfa talasemi, Hb D, Hb O Arab ve Hb E'dir (2,3).

Talasemi sendromları bir yada daha fazla globin zincirinin sentezinde azalma sonucu oluşan ve çoğu kez hipokrom mikrositer anemiye neden olan en yaygın hemoglobin bozukluklarıdır (17,19). Talasemiler etkilenen globin zincirine göre sınıflandırılabilir: α-talasemi, β-talasemi, γ-talasemi, ζβ-talasemi, δ-talasemi, γδβ-talasemi, εγδβ-talasemi. En yaygın form β-talasemidir. 1925 yılında Detroitli pediatrist Thomas Cooley beta-talasemiyi, ağır anemi, karakteristik kemik değişiklikleri ve splenomegali ile birlikte "Çocukluk Çağı Eritroblastik Anemisi" yada "Cooley Anemisi"

olarak adlandırmıştır. İlk olgular İtalyan, Yunan ve Ermeni asıllı çocuklarda saptandığı için "Mediterranean Anemia" adı da verilmiş ve daha sonra "Thalassemia" olarak adlandırılmıştır. Yunan dilinde "Thalas" kelimesi "Büyük deniz" ya da "Akdeniz" anlamına gelmektedir (16,19,20). Beta-talasemi dünyanın her bölgesinde bulunabilir, dünya popülasyonunun %3'ü beta-talasemi taşıyıcısıdır. Akdeniz ülkeleri, Kuzey Afrika, Orta Doğu, Hindistan, Çin ve Güney Doğu Asya'da daha yaygın görülmektedir (20).

2.2.1. BETA-TALASEMİ

Beta-talasemi çoklu mutasyonlara bağlı tespit edilen ilk tek gen hastalığıdır. Bu durum hastalığın genetik ve klinik heterojenitesini açıklamaktadır (21).

β -globin zincirinin yapımından sorumlu olan beta gen kümesi ($\epsilon, \gamma, \delta, \psi, \zeta, \beta$) 11. kromozomun kısa kolunda 15.5 bölgesinde (11p15.5) yer alır ve 146 aminoasitten oluşur. Bu bölge yaklaşık 60kb. uzunluktadır. β -globin geni ise 1.6 kb.'lık küçük bir gendir (22,23).

β -globin geninde iki intron (intervening sequence, IVS) ve üç ekson bulunmaktadır. Globin zincirini sentezleyen gen bölgelerine ekson, proteine dönüşmeyen bölgelere intron adı verilmektedir. Beta talasemi bozukluklarının büyük çoğunluğu β -globin gen ekspresyonunu etkileyen nokta mutasyonları oluşturmaktadır. Homozigot durumlarda globin zincir sentez çalışmaları β -talaseminin 2 ana tipini ortaya çıkarır: β^+ -talasemi, β -globin zincirinin sentezindeki azalma sonucu oluşurken, β^0 -talasemi, β -globin zincirlerinin hiç sentezlenmemesi sonucu oluşur. Hastalık genetik temel ve klinik ağırlık göz önüne alınarak sınıflandırılmıştır (19). Homozigot durum, talasemi major ve intermedia; heterozigot durum ise talasemi minör ve minima şeklinde sınıflandırılmıştır.

2.2.2. BETA-TALASEMİ MAJOR (Homozigot β^0 -talasemi)

2.2.2.1. Klinik bulgular ve Tanı

Hayatın ilk 3 aylık döneminde hemoglobinin büyük çoğunluğunu Hb F oluşturduğu ve Hb F, β -globin zinciri içermediği için bu dönemde bebeklerde beta-talasemi anemiyle sonuçlanmaz. Ancak 4. Aydan sonra, γ -globin zincirinin çok azalması, β -globin zincirinin yapımının aktif hale geldiği devrede, ağır, progressif hemolitik anemi ortaya çıkar. Hastaların çoğunda hemoglobin seviyeleri ilk altı ay ile bir yıl

arasında transfüzyon gerektirecek düzeye iner (1,19,23,24). Beta-talasemi majorlu hastalar aileleri tarafından beslenme güçlüğü, irritabilite, ateş, diyare, kusma, karın şişliği, solukluk gibi farklı yakınmalarla doktora getirilebilirler. Anemi ve hepatosplenomegali en önemli klinik bulgulardır. Bu hastalar belirgin aneminin neden olduğu aşırı güçsüzlük ve kardiyak dekompanseasyonun önlenmesi için düzenli kan transfüzyonlarına ihtiyaç duyarlar. Tedavi edilmeyen ya da düzensiz transfüzyon alan hastalarda ağır anemi dönemlerinde medüller ve ekstra medüller alanlarda eritropoietik dokunun hipertrofisi gözlemlenir. Yüz ve kafa kemiklerindeki kemik iliğinin belirgin genişlemesi ile oluşan kemik değişiklikleri karakteristik yüz görünümünü oluşturur. Solukluk, hemosideroz ve ikter deride yeşilimsi kahverengi bir renk değişikliğine neden olur. Ekstramedüller hematopoez ve hemosideroz nedeniyle karaciğer ve dalakta büyüme oluşurken ikincil hipersplenizm gözlemlenebilir. Miyokardiyal hemosiderozisin neden olduğu, düzeltilemeyen aritmi ve kalp yetmezliği gibi kardiyak komplikasyonlar; pankreatik siderozisin neden olduğu diabetes mellitus; diğer endokrin anormalliklerin neden olduğu gecikmiş yada hiç oluşmamış puberte ve büyüme geriliği de diğer komplikasyonlardır (1).

2.2.2.2. Laboratuvar bulguları

Periferik yaymada eritrositlerde gözlemlenebilen morfolojik değişiklikler, ağır hipokromi, mikrositoz, anizositoz, poikilositoz, polikromazi, bazofilik noktalanma ve target hücrelerinin (hedef tahtası şeklinde eritrositler) görülmesidir. Özellikle splenektomi sonrası daha fazla gözlemlenen, çok sayıda çekirdekli eritrosit ve eritrositler içinde presipite olmuş α zincirlerinin oluşturduğu inklüzyon cisimcikleri tespit edilir. Transfüzyon verilmediğinde hastaların hemoglobin düzeyi 5 mg/dL'nin altına iner. Serum demir ve demir bağlama kapasiteleri yüksektir. Önemli diğer biyokimyasal bir özellik ise eritrositlerdeki fetal hemoglobin miktarındaki çok belirgin artıştır (1). β^0 -talasemilerde Hb A bulunmamakta, yalnız Hb A₂ ve Hb F bulunmakta, β^+ -talasemilerde ise Hb A₂, Hb F ve değişik miktarlarda Hb A bulunmaktadır (19).

Beta-talasemi major'lu hastalarda bu güne kadar 180'den fazla mutasyon tanımlanmıştır. Bu durum hastalığın genetik ve klinik heterojenitesini açıklamaktadır (25). En sık tespit edilen mutasyon tipi IVS1-110(G→A)'dur. Bu mutasyondan sonra sırası ile; kodon 39(C→T), IVS1-6(T→C) ve IVS1-1(G→A) mutasyonları yaygın olarak görülmektedir (26,27).

2.2.2.3. Tedavi

Hemoglobin düzeyini 10g/dL'nin üzerinde tutacak şekilde uygulanan, genellikle her 4-5 haftada bir 15-20 mL/kg eritrosit süspansiyonu kullanılarak yapılan düzenli kan transfüzyonları ile aneminin ağırlaşmasının önüne geçilir ve anormal eritropoez baskılanmaya çalışılır (1).

Hemosideroz, uzun dönem transfüzyon tedavisinin kaçınılmaz bir sonucudur. Çünkü, kullanılan her 500 mL kan, fizyolojik yollardan atılmayan 200 mg'lık demir yükünü dokulara verir. İnsan vücudunda demir atılım mekanizması yoktur. Talasemi major ve diğer düzenli kan transfüzyonu gerektiren refrakter anemili hastalarda en sık ölüm nedeni aşırı demir yüküdür. Özellikle myokardial hemosiderozis talasemi majorlu hastalarda erken ölüme katkıda bulunan önemli bir faktördür. Hemosideroz bir demir şelatörü olan desferrioxamine (DFO)'nin parenteral kullanımı ile azaltılabilir ve hatta önlenir (1).

DFO, *Streptomyces pilosis* tarafından üretilen ve ferrik demiri (Fe^{3+}) 1:1 oranında bağlayan bir hidrosilamindir (28). DFO, enzimatik olmayan düşük molekül ağırlıklı hücre içi demir havuzu ile beraber hücre içi ve dışı ortamdaki ferritin ve ferritin olmayan demiri şelate eder (29,30). Oral olarak kullanıldığında inaktif hale dönüşmesi nedeniyle 8-12 saatlik periodlar halinde subkütan infüzyonlar şeklinde, küçük taşınabilir bir infüzyon pompası kullanılarak, haftada 5-6 gece, genellikle uyku esnasında kullanılmaktadır. Bu kullanım rejimine uyan hastalarda serum ferritin seviyeleri toksik düzeyin altında, yani 1000 ng/mL altında tutulabilmektedir.

Diğer bir demir şelatörü olan Deferipron, şu anda DFO'ya alternatif oral bir seçenektir. Etkinliği DFO ile karşılaştırılabilecek ölçüde olmasına rağmen, kullanımı henüz çok yaygın değildir. Hayvanlarda lökopeni ve hastalarda agranülositoz, hepatik fibroz şeklinde yan etkilere neden olmaktadır (31,32).

Hipertransfüzyon rejimi ağır splenomegaliyi önlese de bazen organın aşırı büyük olması ya da sekonder hipersplenizme neden olması nedeniyle splenektomi gerekli olabilmektedir. Splenektominin ağır sepsis riskini arttırması nedeni ile mümkün olduğu kadar geciktirilmesi önerilmektedir. Ancak splenektomi için en önemli endikasyon transfüzyon miktarında artma ile kendini gösteren hipersplenizmdir. Yılda 240 mL/kg eritrosit süspansiyonundan daha fazla kan ihtiyacı hipersplenizm göstergesidir ve splenektomi endikasyonudur (1).

Kemik iliği transplantasyonu, bu hastalarda tamamıyla tedavi edicidir ve gittikçe artan oranlarda başarı ile uygulanmaktadır. Geniş hasta gruplarında uygun donörü olan, hepatomegali ve portal fibrozisi olmayan, iyi şelasyon tedavisi alan hastalarda %80-90 başarı ve %6 mortalite bildirilmiştir. Aşırı transfüzyon alanlarda dahi uygulanan bu yöntem, hipertransfüzyon rejimi ve uygun şelasyon tedavisi ile de hastaların normal yaşamlarını devam ettirebilmeleri ve transplantasyonun yüksek mortalite ve morbidite içermesi nedeniyle rutin uygulamaya girmemiştir (1,33,34).

Beta-talasemi majorda gen tedavisi için çalışmalar devam etmekte, ancak henüz uygulanmamaktadır. Tedavide hastalığa bağlı komplikasyonların uygun tedavileri, hasta ve ailelerine psikolojik yardım önemli diğer unsurlardır.

2.2.3. BETA-TALASEMİ İNTERMEDİA

Daha hafif β^+ -talasemi gen mutasyonlarının homozigot ekspresyonu Cooley Anemisi benzeri, ancak daha hafif şiddette klinik tablo yaratır ve beta-talasemi intermedia olarak adlandırılır. Bu hastaların hemoglobin seviyeleri transfüzyon almasalar dahi 7 g/dL'nin üzerindedir. Ancak hemoglobin elektroforezinde Hb A, Hb F ve Hb A₂ seviyeleri değişkenlik gösterir (23). Bazı hafif mutasyonların homozigotluğunun yanısıra hafif ve ağır moleküler defektlerin çift heterozigotluğu talasemi intermedia şeklinde klinik tablo oluşturabilir. Mutasyon tiplerine göre bazı hastalar normal büyüme, gelişme ve seksüel maturasyon gösterdikleri halde bazılarında kardiyomegali, hepatosplenomegali, hipersplenizm, artrit ve iskelet anomalileri gelişebilmektedir. Ağır anemisi olan ve hepatosplenomegalisi belirgin olan beta-talasemi intermedialı hastalarda ortaya çıkabilecek komplikasyonlar, beta-talasemi majordaki gibi hemoglobin seviyelerini normal düzeyde tutarak ve endojen eritropoezi bakılayacak şekilde transfüzyonlarla engellenebilmektedir (35,36). Hastalarda gastrointestinal sistemdeki artmış demir emilimi hemosiderozise neden olduğu için şelasyon tedavisi almayan hastalarda düşük demir içeren diyet önerilir (1).

Bu hastalarda tespit edilen mutasyon tipleri arasında en sık, β^+ mutasyonlardan homozigot IVS1-6(T→C) ve β^0 mutasyonlardan IVSII-1(G→A) görülür (35,36).

2.2.4. BETA-TALASEMİ TAŞIYICILIĞI

İki beta geninden yalnızca birisi beta talasemi geni taşıyorsa bu gruba talasemi taşıyıcıları denir. Genellikle klinik olarak asemptomatiktirler (23). Bu hastalarda Hb A₂

düzeyleri artmış olarak, %3,4 ile %7 arasında tespit edilir. Hb A₂ si normal olan, ancak genetik tetkik sonucu tespit edilebilen heterozigotlar ise "Talasemi minima" olarak adlandırılır; Hb F düzeyleri %1-5 dolayındadır. Periferik kan yaymalarında eritrositlerde hipokromi, mikrositoz, anizositoz, poikilositoz ve bazı hastalarda anemi bulunsa da kan transfüzyonuna ihtiyaç duyulmaz (23,37, 38).

B-talasemi taşıyıcılığı sıklığı Türkiye genelinde %2'dir. Bu oran bazı bölgelerde %10 (Antalya, Trakya), bazı bölgelerde ise %0.6 (Doğu Anadolu) olmak üzere farklılıklar gösterir (25).

2.2.5 BETA-TALASEMİ MAJORDA ANEMİNİN NEDENLERİ

Beta-talasemide aneminin patofizyolojisi incelendiğinde beta-globin sentezindeki azalmaya ya da yokluğuna ikincil hemoglobin miktarının azaldığı gözlemlenir. Ayrıca eritrositlerin hem periferde hem de intramedüller hemolizi anemiye neden olan major kinetik defektlerdir (4).

Beta-talasemili hastalarda eritrositlerde serbest α -zincirleri aşırı artmıştır. Serbest α -zincirleri kararlı tetramerler ve çözünebilen bir form oluşturamazlar; bu nedenle eritrositlerde ve öncüllerinde "inklüzyon cisimcikleri" oluşturacak şekilde çökeller. Kemik iliğinde yaşayan, içinde α -globin çökeltileri içeren bir kısım eritrositler dolaşıma salındığında kemik iliği, dalak, karaciğer gibi retikuloendotelial sistemde vaktinden önce yıkıma uğrarlar. Bu durum aneminin en önemli nedeni olan "inefektif eritropoez" in temelini oluşturur (39). Aneminin nedenleri incelenirken, talasemik eritrositlerin periferik kana verilmelerinde belirgin bir azalma dikkati çekmiştir. Bu da kemik iliğinde sıradışı bir eritroid hücre ölümünü işaret etmektedir. Kemik iliğindeki bu sıradışı ölümün nedenleri tam olarak açıklanamasa da beta-talasemi majorlu hastalarda eritroid öncüllerinde α -globin zincir depolanması yanında sitoplazmik vaküolizasyon ve nükleer membranında anomaliler gözlemlenmiştir. 1993'te İtalya Pesaro'dan Yuan ve arkadaşları (5), transplantasyon yapılan beta-talasemi majorlu hastalardan elde edilen kemik iliklerinde yaptıkları bir çalışmada α -globin zincir depolanmasının eritrosit öncüllerinde artmış apoptoza neden olduğunu göstermişlerdir.

3.1. APOPTOZ

Apoptoz ya da programlanmış hücre ölümü, selektif bir hücre delesyonu işlemidir. Apoptozun varlığı, normal ve anormal işlevlerin kontrolünde major rol oynar (6). Apoptotik hücreler morfolojik özellikleri ile, yani membran tomurcuklanması, sitoplazmanın büzülmesi, nükleer kondensasyon, nükleer matriksin marjinasyonu ve fragmente cisimciklerle (apoptotic bodies) karakterizedirler. Moleküler seviyedeki tanımı, klasik olarak DNA'nın endonukleazlar tarafından 180-200 baz çifti içerecek şekilde parçacıklara bölünerek nükleozomlar oluşturmasıdır (40).

Pulse jel elektroforez kullanarak fludarabinle apoptozun indüklendiği hücre serilerinde, 50.000 baz çiftlik yüksek moleküler ağırlıklı parçalar gözlemlenmiş ve bunun daha önce tarif edilen internükleozomal kırıklar öncesi bir parçalanma olduğu bildirilmiştir (7). Daha sonraki çalışmalar bu yüksek moleküler ağırlıklı moleküllerin DNA kıvrımları ve onların oligomerleri olduğunu göstermiştir. Fakat nükleus ve DNA kırıkları apoptoz için mutlak gerekli görülmemektedir. Özel bir bağlayıcı ile Fas antijenini tetikleyerek çekirdeksiz bir hücrede hücre ölümü oluşturulabilmiştir. Böylece DNA parçalanmasının sadece ikincil bir olay olduğu; sitoplazmik yoğunlaşma ve membran tomurcuklanmasının apoptoz için gerekli olaylar olduğu düşüncesine varılmıştır (41).

Apoptozun indüksiyonu başlıca üç evreden oluşmaktadır (42):

1. Hücre ile indüksiyon sinyalinin ilişkisi
2. Ölüm sinyalinin biyokimyasal iletimi
3. Apoptozun oluşması

Hücrelerde apoptozu uyaran çok sayıda fizyolojik ve fizyolojik olmayan uyarımın ulaştığı ortak nokta, hücre içinde proteolitik olaylar (katabolik enzimler) zincirini başlatmaları ve bunun sonucunda da hücrede birçok esansiyel makromolekülün parçalanmasıyla apoptoz için karakteristik biyokimyasal ve ultra-strüktürel fenotipin ortaya çıkmasıdır. Bu proteolitik olaylar sonucunda yıkıma uğrayan başlıca moleküller; hücre iskeleti ve organizasyonunda rol alan aktin, fodrin, familial poliposis proteini, DNA tamir proteinlerinden DNA-PF, poli adenil riboz fosfat (PARP), nükleer mitotik aparatüs proteini olan NuMA; nükleer membran entegrasyonunu sağlayan laminler ve hücre siklusunda rol oynayan retinoblastoma proteini. Protein yıkımını sağlayan proteolitik olaylar zinciri interlökin-1 β "converting" enzim (ICE), benzeri proteazların (sistein proteazlar) harekete geçmesiyle başlatılmaktadır. Sistein içeren aktif bölgesi olan ve dörtlü AA motifinde

fagositler tarafından tanınması sonrası apoptotik hücrelerin fagosite edilerek enflamasyon oluşmadan ortadan kaldırılmalarına neden olmaktadır (57,58).

Hücrelerde apoptozu uyaran çok sayıda fizyolojik ve fizyolojik olmayan uyarmı vardır. Fas reseptör ve ligand interaksyonu ile apoptoz indüksiyonu temel bir mekanizmayı oluşturmaktadır. Fas ve FasL moleküllerinin etkileşimi sonucu, yüzeyinde Fas bulunan hücrede apoptoz meydana gelmektedir. Fas (Fas reseptörü; CD95; APO-1) 45 kDa ağırlığında, tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör grubuna ait tip I membran proteini'dir. Bu gruptaki proteinlerin sisteinden zengin ekstrasellüler, transmembranöz ve intrasellüler olmak üzere üç kısmı (domain) vardır. Fas ligand (FasL; CD95L) ise Fas molekülünün doğal ligandıdır. Tip II membran proteini olup kodlama sekansı molekülün ekstrasellüler kısmında karboksi terminalindedir. Fas ligandın kendi reseptörü olan Fas ile interaksyonu sonucu apoptozis sinyali, yüzeyinde Fas molekülü bulunan hücrenin nükleusuna iletilmekte ve Fas ekspresyonu olan hücrede apoptozis ile ölüm meydana gelmektedir. FasL/ Fas reseptör trimerizasyonu bu mesaj iletimi için gerekmektedir. Reseptör trimerizasyonundan sonra Fas molekülünün intrastoplazmik kısmında bulunan Death Domain (DD; ölüm bölgesi) intrastoplazmik bir molekül olan FADD (Fas associated death domain) ile birleşmektedir. Bundan sonra sistein proteazlardan biri olan kaspaz 8 (FLICE/ MACH) aktive olmakta ve proteolitik olaylar zinciri başlamaktadır. Aşağı noktalarda yer alan kaspaz 3 (CPP32; YAMA) aktivasyonu da apoptotik hücre için tipik sayılan PARP proteolizine ve apoptozise yol açmaktadır (43,45,46,48,51,59-62).

Bir diğer apoptoz indüksiyon yolu; perforin/ granzim sistemidir. Sitotoksik T lenfositlerle hedef hücrelerin öldürülmesi, malign ve virüs ile enfekte hücrelere karşı savunmada önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca transplant rejeksiyonu ve otoimmün hastalıklara neden olmaktadır. Sitotoksik T hücre granüllerinde bulunan perforin ve serin proteaz granzim A ve B'nin serbestleşmesinden sonra ölüm gerçekleşmektedir. Perforin; hedef hücrenin plazma membranında bir kesecik yaparak, granzim B'nin sitozole girmesine izin vermektedir. Granzim B ise kaspaz sistemini aktive ederek apoptozu gerçekleştirmektedir (64-66).

3.1.1. APOPTOZDA ROL ALAN GENLER

Apoptozda rol oynayan bir çok gen bulunmakla beraber üç gen, bcl-2, c-myc ve p-53 detaylı çalışılmıştır. Bcl-2 nin apotozu suprese ettiği özellikle ilk gösterildiği folliküler lenfomada olmak üzere, sıklıkla bildirilmiştir. Çok çeşitli lösemi tiplerinde,

aspartik asit rezidüleri karboksi terminal kısmında kesen bu sistein proteazlar CASPASES (sistein içeren asp-ase'lar) (kaspazlar) olarak isimlendirilmektedir. Halen bilinen kaspazlardan önemlileri kaspaz 1(ICE), kaspaz 3 (CPP32/YAMA) ve kaspaz 8 (FLICE/MACH)'dir. Bu kaspazlar proenzim olarak sentezlenmekte, aktive olmaları için asp-x yerlerinde proteolitik aktivasyon gerekmektedir. Böylelikle zincir reaksiyonu ile bir sonraki proteaz aktive olmakta ve son ürün (substratların) yıkımı ortaya çıkmaktadır. Kaspaz 3 (CPP32)'ün apoptozis yolunda aşağıda (downstream) ve kritik bir noktada yer aldığı, DNA tamir proteinlerinden olan poli adenil riboz fosfatın (PARP) yıkımından sorumlu olduğu gösterilmiştir (43,44-51). Böylece birçok değişik stimulusun yol açtığı terminal proteolitik olaylar hücrede, nükleer kondansasyon ve DNA fragmentasyonu ile karakterize apoptotik fenotipi ortaya çıkarmaktadır.

Yakın zamanda tanımlanmış bir molekül olan FLIP (Flice inhibitor protein) ise kaspaz 8'i inhibe etmekte ve hücrede yaygın olarak bulunan proteolitik /apoptotik mekanizmanın sürekli aktivasyonunu engellemektedir (52). Hücrelerde doğal olarak bulunan bu anti-apoptotik moleküllerin dışında bazı viruslar ise proteaz inhibitörü anti-apoptotik genleri (CrmA, p35) sayesinde, enfekte ettikleri hücrelerin apoptozisini engelleyerek kendi yaşamları ve çoğalmalarını sağlayacak şartları temin etmektedirler (43,44,53).

Apoptotik hücrelerde erken değişikliklerden biri mitokondride görülmektedir. Transmembran potansiyelde azalma sonucu mitokondrial fonksiyonda bozulma olmaktadır. Mitokondriden pro-apoptotik maddelerin (örneğin sitokrom c) salgılanması ise kaspazların aktivasyonuna katkıda bulunmaktadır (54). Apoptoza uğrayan hücrelerdeki yüzey karbonhidrat ve diğer membran değişikliklerinin fagosit reseptörleri (fosfatidil serin, trombospondin, vitronektin) ve lektinler tarafından tanınarak apoptotik hücrenin çok hızlı ve etkili bir mekanizma ile ortadan kaldırılmasıyla apoptozis işlemi sonlanmaktadır (55). Spesifik proteaz inhibitörleri terminal kaspazları hedefleyerek hücre ölümünü bloke etmektedirler. Apoptoz inhibitör ailesinin proteinleri (IAP) kaspaz aktivitesini iptal ederek hücre ölümünü azaltabilmektedirler (56).

Apoptotik hücrelerde membran bütünlüğü bozulmamıştır, ancak fagositozu kolaylaştıracak membran değişiklikleri erken evrelerde bile gösterilmiştir. Normalde canlı hücrelerde, fosfatidil serin (PS) hücre membranının iç yüzeyinde bulunmaktadır. Ancak apoptozun indüksiyonu sonrasında bir çok hücre tipinde fosfolipitlerin organizasyonu değişmekte ve PS hücre yüzeyinde ekprese olmaktadır. PS'nin

bcl-2 nin aşırı ekspresyonu çoklu ilaç direnç geni (MDR-1) olaya katılmaksızın, apoptoz yokluğu ve kemoterapiye rezistans ile ilişkili bulunmuştur. Epstein-Barr virüsü de bcl-2'nin ekspresyonunu sağlayarak enfekte hücreleri apoptozdan koruyabilmektedir (7).

P-53, radio- yada kemo-indüklenmiş DNA lezyonlarını ve çeşitli fizyolojik durumlarda apoptozu uyarma yeteneğinde bir proteindir (67). Gende meydana gelen bir nokta mutasyon, hemen her zaman ilgili allelde bir delesyona neden olarak apoptozu karşı bir rezistans oluşturur (68-70). Fare modelinin kullanıldığı bir çalışmada p-53 ün yokluğunun karsinogenezle ilişkili olduğu gösterilmiştir (71).

C-myc, proteininin proliferasyon, diferensiyasyon ve apoptotik hücre ölümünü de içeren bir çok hücreli olayda görev aldığı iyi bilinmektedir (15). C-myc'in ektojik ekspresyonu hücre siklusunun G1 periyodunu kısaltarak yada hücrelerin G0/G1 büyüme duraklaması dönemine girmelerini önleyerek onkojenik potansiyele belirgin katkıda bulunabilmektedir (72,73). C-myc'in aşırı ekspresyonu ortamdan serumun çekilmesi yada DNA'ya toksik ajanların, transkripsiyonel olarak geni aktive etmeleri ile apoptoz oluşturabilmektedir (74-76). C-myc'in aşırı ekspresyonunun apoptoz oluşturduğunu gösterirken; böylece aşırı ekspresyonun aşırı çoğalma oluşturabilmek için yeterli, ancak apoptoz oluşturabilmek için yetersiz düzeyde gerçekleşmesi ile tumöral değişimin ortaya çıkabileceği gösterilmiştir (74).

3.1.2. APOPTOZU ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Apoptozun dört durumda oluşturulabileceğini bildirilmiştir: yaşam faktörlerinin yokluğu; düzenleyici sitokinlerin varlığı; Fas (yada APO-1 yada CD95) gibi hücre membranı antijenlerine karşı antikörlerin yada anti-kanser maddelerin varlığı, virusler yada sitokinlerin etkisi ile oluşan genomik modifikasyonlarında dahil olduğu sayısız olay apoptozu etkileyebilir (77).

Apoptozu düzenleyen reaksiyon zincirinde, hücre tipi, hücre siklusu dönemi ve patofizyoloji kombinasyonlarına bağlı olarak değişen bir çok mediatör yer alır. Apoptoz T-hücrelerinin (78) ya da B-hücrelerinin antijenik stimilasyonu ile olabildiği gibi, aslında daha sıklıkla bir membran reseptörünün (79), bir kimyasal madde, özellikle çok sayıdaki sitokin yada bir hücre interaksyonu ile de oluşabilir (80).

Son yıllardaki çalışmalarda oksidatif stresin de apoptozun fizyolojik bir uyararı olduğu ortaya konmuştur. Oksidatif stres timositler, fibroblastlar, endotelial hücreler, blastosit ve granüloza hücrelerinde apoptozu neden olabilmektedir. Sonuç olarak

birçok antioksidan (Örneğin: glutathione) madde, peroksi-nitritlerin oluşumunu (N-(2-mercaptoethyl)-1,3-propandiamine) önleyerek apoptozu engelleyebilir (81).

Eritrositik seri göz önüne alındığında, eritropoetin (EPO) bazı özel reseptörlere bağlanarak eritroid öncüllerinde proliferasyon ve diferensiyasyon oluşturmaktadır. Bittorf ve arkadaşları (82), EPO'nun bu özellikleri dışında anti-apoptotik özelliğinin de bulunduğunu göstermişlerdir.

Apoptoz, hücrelerin terminal diferansiyasyonlarındaki kronolojik gelişimin son basamağıdır. Her ne kadar, bu olayda yer alan sinyaller sonuçta birleşse de, farklılıklar olabilmektedir. Örneğin, miyeloid hücre serisinde, G-CSF reseptörleri ile iletilen iki ayrı sinyal belirlenmiştir: biri apoptozu önlerken diğeri myeloid serinin diferansiyasyonunu sağlamaktadır (83). Fizyolojik olarak birkaç gün içerisinde ölen granülositler, bu olayı geciktiren faktörler sayesinde aktive hale getirilebilir. Örneğin, interlökin-1 β (IL- β) ile önceden muamele edilmiş endotel hücrelerine yapışmanın, granülosit apoptozunu önlerken; bu ön muamale yapılmadığında apoptozun arttığı gösterilmiştir. IL- β 'nin bu etkisi lökosit integrinlerinin b zincirine karşı antikoların ya da anti-ICAM-1 monoklonal antikolarının spontan kullanımı ile önlenebilmektedir. Böylece enflamatuar sitokinler granülositlerin ömrünü uzatabilir ve enfeksiyonla savaşabilecek granülosit sayısını arttırabilir (84).

Demir ise vücuttaki tüm hücrelerin çoğalmalarının ve yaşamlarının devamı için hem in-vitro hem de in-vivo vazgeçilmez bir elementtir. Kültür ortamında HL60 promiyelositik hücre dizisi hücreleri bulunan ortama çok düşük miktarlarda bile olsa DFO eklemenin apoptoz oluşturduğu gösterilmiştir (13). Demir eksikliğinde endotel hücrelerinin radiosensitivitesinin ve apoptozunun arttığı da bildirilmiştir. Demir eksikliği yaratmak için insan umbilikal ven endotel hücreleri DFO eklenen ortamda kültüre edilmiş; bu durumda hücrelerin mitotik indeksleri değişmezken, apoptoz ve radyasyona olan hassasiyetlerinin (2.5 graylik irradiasyon sonrası) arttığı gösterilmiştir (14).

3.1.3. APOPTOZUN DEĞERLENDİRİLMESİ (85)

1. Apoptozis indüksiyonu için teknikler
 - Fas (CD95) aracılığı ile hücre ölümü
 - Camptothecin ile hücre ölüm indüksiyonu
2. Apoptozis olayının ölçülmesi

- Caspase'lar
- Annexin-V ölçümü
- 3. DNA Fragmentasyon ölçümleri
 - APO-BRDU™ Kit
 - APO-DIRECT™ Kit
- 4. Apoptozis ile ilişkili proteinlere karşı antikorların ölçülmesi
 - Bcl-2 Homologları
 - Caspase'lar
 - CrmA
 - Sitokrom c
 - Fas Ligand
 - Sinyal molekülleri
- 5. RN ase Protection ölçümü

3.1.4. BETA-TALASEMİ VE APOPTOZ İLİŞKİSİ

Beta-talasemi ile apoptoz arasındaki ilişkinin araştırılması fikri beta-talasemili hastalarda aneminin etyolojisine yönelik çalışmalarda öncelikli olarak eritrosit öncülleri için düşünülmüştür. İlk olarak beta-talasemili bir fare modeli üzerinde yapılan araştırmada splenik eritropoezde hücre ölümünün rolü çalışılmıştır. Bu modelde eritroid hiperplazinin büyük bir kısmı ve inefektif eritropoez, çok büyümüş haldeki dalakta meydana gelmiştir. Eritroid prekürsörlerinde bulunmayan CD45 ve bir vital boya olan Hoechst 33342 ile çift boyama yapılarak talasemik farelerin dalaklarında apoptotik hücrelerle eritroid öncüllerinin oranları saptanabilmiş ve normal kontrollerle karşılaştırabilmiştir. Talasemik farelerin dalaklarında çok belirgin olarak artmış eritroblastozisle beraber, normal farelerin dalaklarında % 0.5-2 ve talasemik farelerinkinde % 5-11 olmak üzere artmış apoptoz olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, aneminin şiddeti ile eritroid öncüllerindeki apoptoz seviyesi arasında bir korelasyon bulunmuştur (86). Aynı araştırmacılar normal insanlarda, heterozigot beta-talasemili ve beta-talasemi majorlu hastalarda jel elektroforezi yöntemi kullanarak kemik iliği eritroblastlarında DNA'nın yıkımını çalışmışlardır. Talasemi majorda çok belirgin, talasemi minörde orta derecede ve normal insanlarda neredeyse ölçülemeyecek seviyelerde eritroblastlarda apoptozun varlığını göstermişlerdir. Çalışmada beta-talasemi major ve minörlü hastalardan elde edilen

kemik iliği eritroid öncüllerinin in-vitro yıkımı ve elde edilen DNA'nın, agaroz jele yüklenip elektroforeze tabi tutulması ile majorlu hastalarda belirgin, minörlü hastalarda daha az olarak apoptoz için tipik olduğu kabul edilen DNA yıkım ürünlerinin "ladder (merdiven)" tipi görünümü elde edilmiştir. CD45, eritroid öncüllerde bulunmayan fakat myeloid ve lenfoid öncüllerde bulunan bir membran proteindir. Aynı hastalardan CD45+ hücreler alınmış ve DNA süpernatantları çalışıldığında tipik "merdiven" paterni elde edilememiştir (5).

C-myc genin araştırıldığı bir çalışmada, kültür ortamında HL60 ve K562 lösemik hücrelerinin DFO ile muamele edilmeleri ile demirden fakir ortam yaratılmasının c-myc RNA ve protein seviyelerinin düşmesinin, DNA sentezinin durmasına ve apoptozun ortaya çıkmasına eşlik ettiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada bu durum DFO ile rutin şelasyon tedavisi yapılan talasemili majorlü hastalardan elde edilen periferik mononükleer hücrelerde düşük c-myc seviyeleri bulunması ile de ortaya konmuştur (15).

Sağlıklı insandan elde edilen aktive periferik T-lenfositlerde ve HL60 promyelositik hücre serisinde DFO'nun çoğalmakta olan hücrelerde apoptoza neden olurken, aktive edilmemiş periferik lenfositlerde ve granülositlerde apoptozise neden olmadığı in-vitro 12-24-48 saatlik inkübasyonlar sonrası oligonükleer DNA parçacıklarının elektroforezle gösterilmesi yöntemi ile ortaya konmuştur (8).

Tüm bu verileri değerlendirerek biz bu çalışmada, literatürde ilk kez talasemi majorlu hastalarda periferik kandaki granülositlerde apoptoz oranlarını Annexin-V yöntemi ile araştırmayı ve bu hastalardaki granülosit apoptoz oranı ile enfeksiyon sıklığı, DFO kullanımı ve serum ferritin düzeyi arasındaki ilişkiyi incelemeyi amaçladık.

4. HASTALAR ve YÖNTEM

4.1. HASTALAR

Haziran 2001-Ağustos 2001 tarihleri arasında β -talasemi major tanısı ile Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji ve Tepecik SSK Eğitim Hastanesi Çocuk Kliniğinde izlenen, 6 ay-16 yaş grubunda, DFO ile şelasyon tedavisi alan ve almayan hastalar çalışmaya alındı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları polikliniklerine sağlam çocuk izlemi amaçlı başvuran 6 ay-16 yaş grubunda, enfeksiyon, kan hastalığı ve kronik bir hastalığı bulunmayan olgular kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi. DFO ile şelasyon tedavisi yapılan hastalardan son bir gün içinde DFO infüzyonu almış olanlar çalışmaya alındı. Yaşları <6 ay ve >18 yaş olan, son iki ay içerisinde enfeksiyon geçiren, son bir ay içinde DFO dışı ilaç kullanan, başka bir kan hastalığı olan ve akut malnütrisyonu bulunan vakalar çalışma dışı tutuldu. Hasta ve kontrol grubundan öykü alındı; fizik muayeneleri yapıldı. Son bir yıl içindeki enfeksiyon sıklıkları, enfeksiyon tipi ve şiddeti not edildi (Bakınız hasta veri formu, sayfa 44). Tüm olguların tam kan sayımı ve periferik yaymaları incelendi; demografik özellikleri, klinik bulguları, nötrofil hücre sayısı, SGPT, SGOT, total ve direkt bilirubin, ferritin ve nötrofil apoptozu analiz sonuçları kaydedildi. Hasta ve kontrol grubundan 5 ml periferik kan örneği EDTA'lı tüpe alınarak bir saat içinde soğuk muhafazalı kutularla dış merkezden çalışma laboratuvarına ulaştırıldı. Kontrol vakalardan alınan kan örnekleri de çalışma yapılana kadar aynı koşullarda, aynı sürelerde bekletildi. Tüm olguların ailelerinden çalışma hakkında bilgilendirildikten sonra, yazılı izin alındı.

Periferik kan örneklerinden granülosit izolasyonu Ficoll-Hypaque dansite gradienti kullanarak sağlandı ve flow sitometrede Annexin V-FITC ile granülositlerde kantitatif apoptoz analizi yapıldı.

4.2.YÖNTEM

4.2.1. Granülositlerin izolasyonu :

Periferik kan örneklerinden granülosit hücre izolasyonu Boyum tarafından tanımlanan ve English ve Anderson tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak yapılmaktadır (87,88). Bu yöntemde polisakkarit ve radiopak kontrast ortamın karışımları kullanılır. Her ikisi de polisükroz ve sodyum diatrizoattan oluşan

Histopaque-1119 ve Histopaque-1077 üst üste tabakalandırıldıktan sonra bunların üzerine EDTA'lı periferik kan yeni bir tabaka halinde eklenir. Santrifüj sonrası granülositik seri elemanları 1077/1119 interfazında toplanırken diğer kan elemanları plazma/1077 interfazında kalır. İzolasyonu tamamlanan granülositler ince uçlu pasteur pipeti ile ara tabakadan alınır.

4.2.1.1. Gerekli araç ve materyaller :

1. Histopaque-1119, Sigma Diagnostics Inc, ABD, Katalog no.1119-1.
2. Histopaque-1077, Sigma Diagnostics Inc, ABD, Katalog no.1077-1.
3. Fosfat tampon tuz solüsyonu (PBS), (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM NaHPO₄-7H₂O, 1.4mM KH₂PO₄).
4. Soğutmalı santrifüj, Beckman Instruments, Inc., Beckman J6-MI, CA 994304, ABD.
5. Propilen, dibi konik doku kültür tüpleri, Greiner Labortechnik, ABD, Katalog no:164160.
6. Otomatik kan sayım cihazı, STKS-Coulter inc, ABD, Seri no: S10180.
7. Pasteur pipetleri.
8. Ayarlanabilir otomatik mikropipetler, 5-20 µl ve 50-200 µl.

4.2.1.2. Yöntem:

1. Steril kültür tüpüne 2.5 mL Histopaque-1119 ilave edildi.
2. Histopaque-1119 üzerine dikkatlice Histopaque-1077 eklenerek tabakalandırıldı.
3. Yaklaşık 5 mL EDTA'lı periferik kan örneği her iki gradient üzerine dikkatlice tabakalandırıldı.
4. Oda ısısında (18-26°C) 700 × g'de 30 dakika santrifüje edildi.
5. Tüpler dikkatlice santrifüjden alındı.
6. Histopaque 1077/1119 interfazında toplanan hücreler, "granülositler " yeni steril kültür tüpüne aktarıldı. Hücrelere 10mL PBS eklenerek yeniden süspanse edildi. Ardından 200 × g'de 10 dakika santrifüje edilerek yıkama işlemi yapıldı. Süpernatant pipetle alınarak uzaklaştırıldı.
7. Yıkama işlemi aynı şekilde tekrarlandı.
8. Yıkama sonrası granülositler 1 ml PBS içinde süspanse edildi.

9. Otomatik kan sayım cihazında hücre sayımı yapıldı.

4.3.1. Annexin V-FITC ile Granülosit Apoptozunun Gösterilmesi:

Normalde canlı hücrelerde, fosfotidil serin (PS) hücre membranının iç yüzeyinde bulunmaktadır. Ancak apoptozun indüksiyonu sonrasında bir çok hücre tipinde fosfolipidlerin organizasyonunun değişmesiyle beraber PS'nin hücre membranının iç yüzeyinden dış yüzeyine çıkması, Annexin V-FITC ile granülosit apoptozunun gösterilmesi tekniğinin temel dayanağını oluşturur (57, 58). Aslında bir antikoagulan olan Annexin-V'in PS'e yüksek afinite ile bağlanması sayesinde, PS'nin hücre yüzeyinde eksprese olması tespit edilebilmektedir. PS'nin hücre yüzeyine translokasyonunun hücre çekirdeğindeki yıkım, DNA'nın fragmentasyonu ve apoptoz ile ilişkili moleküllerin ortaya çıkmasının öncesinde gerçekleşmesi, Annexin-V'i erken-dönem apoptozu göstermede duyarlı bir madde haline getirmektedir.

Bu işlemde Annexin-V'in fluorescein isothiocyanate (FITC) birleşimi flow sitometre ya da floresans mikroskopta apoptozun tespit edilebilmesini sağlamaktadır. Hücre nekrozu sırasında membran geçirgenliği arttığı için nekrotik hücreler de Annexin V-FITC bağlayacaklardır. Propidium iodide (PI) ise canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin ayrımında kullanılan vital bir boyadır. Nekrotik hücreler Annexin V-FITC'yi bağlayıp PI ile boyanırken, canlı hücreler (Annexin V-FITC negatif) ve erken apoptotik hücreler (Annexin V-FITC pozitif) PI'ı hücre dışında tutarak bu boya ile boyanmamaktadırlar. Eğer hücre fagosite edilmez ise, hücrede nekroz benzeri disintegrasyon gerçekleşmekte ve böylece geç apoptotik hücreler hem Annexin V-FITC, hem de PI ile boyanmaktadır (Şekil1).

Şekil 1. Apoptotik hücrelerin saptanmasında Annexin V-FITC ve PI ile boyamanın değerlendirilmesi.

	Canlı Hücre	Erken Apoptotik Hücre	Geç Apoptotik Hücre	Ölü Hücre
Annexin V-FITC	-	+	+	+
Propidium iodide (PI)	-	-	+	+

4.3.1.1. Gerekli araç ve materyal :

1. Annexin V-FITC: 200µg/ml fluorescein isothiocyanate (FITC) ile konjuge edilmiş recombinant Annexin V, 50 mMTris, pH 7.4, 0.1 M NaCl, 1% BSA,

0.02%NaN₃, Annexin V-FITC Kit. Bender Med Systems, Avusturya, Katalog No. BMS306F1.

2. Bağlama tamponu (4x): 50 mM Hapes, pH 7.4, 750mM NaCl, 125mM CaCl₂.
3. Propidium Iodide :PBS (fosfat tampon solusyonu) içinde 30µg/ml propidium iodide.
4. 12x75mm'lik polystrene flow sitometri test tüpleri, Falcon/ Katalog no:352052.
5. Soğutmalı santrifüj, Beckman Instruments, Inc., Beckman J6-MI, CA 994304, ABD.
6. Bidistile su.
7. Ayarlanabilir otomatik mikropipetler, 5-20 µl ve 50-200 µl.
8. Flow sitometri cihazı, Becton Dickinson, FACSCalibur, ABD, Seri no: E1914.

4.3.1.2. Yöntem :

1. Konsantre bağlama tamponu 1:4 oranında bidistile su ile dilüe edildi (50ml bağlama tamponu + 150ml bidistile su).
2. Granülosit izolasyonu ile elde edilen hücreler ortalama konsantrasyonları 2-5×10⁵ hücre/ml olacak şekilde, hazırlanan bağlama tamponunda tekrar süspanse edildi.
3. Hücre süspanسیونundan 195µ'lik alınarak polystren flow sitometri test tüpüne yerleştirildi.
4. Üzerine 5 µl Annexin V-FITC ilave edilerek karıştırıldı.
5. Hücreler 10 dakika oda ısısında (18-24°C) karanlıkta inkübe edildi.
6. Tüpe 2 ml bağlama taponu ilave edildi.
7. 200 x g 'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
8. Hücre pelleti 190 µl bağlama tamponunda yeniden süspanse edildi.
9. Aynı tüpe içinde 20 µl/ml propidium iodide bulunan solüsyondan 10 µl eklendi.
10. Flow sitometri cihazı ile hemen analiz yapıldı.

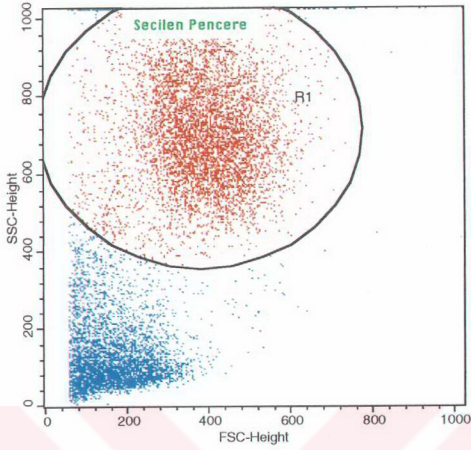
4.3.4. Flow Sitometrede Örneklerin Analizi :

1. Annexin V-FITC ve Propidium İodide sinyallerinin miktarını belirlemek için ışık kaynağı olarak 488 argon lazere sahip bir flow sitometri cihazı kullanıldı.
2. Analiz için kullanılan flow sitometrenin cihaz performansının ve kalite kontrolünün sağlanması ve doğru analiz elde edilebilmesi için önce sadece

Annexin V-FITC ile boyama ve analiz, sonra sadece Propidium İodide ile boyama ve analiz yapılarak her çalışma öncesi cihaz kontrolü yapıldı.

3. FITC ve Propidium İodide sinyalleri uygun dedektörler kullanılarak tespit edildi.
4. Forward Scatter (FSC) ve Side Scatter (SSC) sinyalleri ile standart görüntü elde edildi (Şekil 2a).
5. Bu görüntü üzerinden granülosit popülasyonunu içeren bir pencere alındı.
6. Pencere içindeki hücrelerden alınan sinyallerle Annexin V-FITC florasanı X-ekseninde ve propidium iodide florasanı Y-ekseni üzerinde gösterildi (Şekil2b).

4.4. İstatistiksel Yöntemler : "SPSS for Windows Release 8.0" istatistik programı kullanılarak sayısal değişkenler için gruplar arası ikili karşılaştırmalar öncesi, farklılığın önemliliği "Kruskal-Wallis 1-way Anova" varyans analizi yöntemiyle değerlendirildi. Sonrasında ikili grup ortalamalarının karşılaştırmaları "Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test" ile yapıldı ve istatistiksel anlamlılık için $p < 0,016$ alındı. Gruplar arasındaki oransal farklılığın önemliliği "Pearson Q Square" testi ve gözlenen değerlerden biri beşten küçük olduğunda "Fisher's Exact Test" ile belirlendi. Korelasyon analizi için Spearman korelasyon testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için $P < 0.05$ kabul edildi.

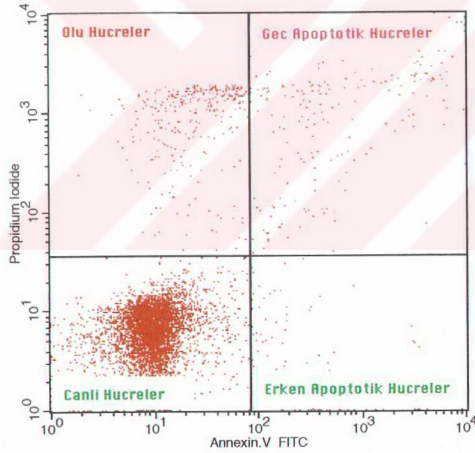


Region Statistics

Sample ID: PB.PNL
 Tube: Annexin.V/PI
 Panel: Apoptosis Paneli
 Total Events: 10000

Region	Events	% Gated
R1	5843	58.43
R2	10000	100.00

Şekil 2a. İzole edilen hücrelerin flow sitometrideki standart görüntüsü.



Tube: Annexin.V/PI

Quad	% Gated
UL	5.19
UR	3.41
LL	89.70
LR	1.71

Şekil 2b. Annexin-V ve Propidium İodide ile boyanma sonrası apoptotik hücrelerin flow sitometride değerlendirilmesi.

5. BULGULAR

Haziran 2001-Ağustos 2001 tarihleri arasında yaşları 6 ay ile 16 yaş arasında değişen, 35 (%70) beta-talasemi major hastası ve kontrol grubu olarak 15 (%30) sağlıklı çocuk çalışmaya alındı. Tüm olguların 28'i (%56) erkek, 22'si (%44) kızdı. Beta-talasemi majorlü DFO kullanan, kullanmayan ve kontrol grubundaki tüm olguların yaşları, boya göre ağırlık yüzdeleri, hemoglobin düzeyleri, granülosit sayıları, SGPT, SGOT, total ve direkt bilirubin, ferritin değerleri, son bir yılda geçirilmiş enfeksiyon sayıları, tedavi yolları ve granülosit apoptozu yüzdeleri tablo 2 ve tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmaya alınan tüm olguların klinik özellikleri.

Klinik Özellikler	DFO kullanan Talasemi Grubu (n: 22)	DFO kullanmayan Talasemi Grubu (n: 13)	Kontrol Grubu (n:15)	p
Yaş (yıl)	9.6 ± 4.1 (2.5-16)	1.7 ± 1.7 (0.6-7.5)	4.2 ± 3.1 (1-9.5)	0.001
Ağırlık (kg)	25.7 ± 9.4 (12-43.5)	12.3 ± 11.9 (7.2-52)	18.5 ± 8.6 (9.5-33.4)	0.001
Boy (cm)	123 ± 19.5 (90-155)	73 ± 8.3 (60-88)	101.4 ± 24 (73-138)	0.001
Boya göre ağırlık indeksi (%)	96.7 ± 6.4 (87.5-112)	93.9 ± 10 (75-113)	101.6 ± 10.9 (88.1-130)	0.061
Enfeksiyon Sayısı / yıl	3.4 ± 3.1 (0-12)	0.6 ± 1.26 (0-4)	0.8 ± 0.9 (0-2)	0.001

Tablo 1. Çalışmaya alınan tüm olguların laboratuvar sonuçları.

Laboratuvar Özellikleri	DFO kullanan Talasemi Grubu (n: 22)	DFO kullanmayan Talasemi Grubu (n: 13)	Kontrol Grubu (n:15)	p
Hemoglobin(g/dl)	8.7 ± 0.9 (5.3-10)	9.2 ± 0.75 (8.0-10.7)	12.3 ± 0.8 (11.2-14)	0.001
Granülosit Sayısı /ml	5239 ± 3192 (1764-12856)	5194 ± 2175 (9920-2760)	3904 ± 1649 (1770-8760)	0.268
SGOT(U/L)	41.5 ± 20.5 (83-15)	43.7 ± 18.1 (12-79)	32.8 ± 11.1 (18-50)	0.264
SGPT(U/L)	40.86 ± 25.6 (9-96)	24.3 ± 11.8 (4-46)	25.2 ± 9.4 (15-40)	0.043
Total bilirubin(mg/dl)	1.5 ± 0.7 (0.8-3.0)	1.3 ± 0.5 (0.4-2.7)	0.6 ± 0.17 (0.4-0.9)	0.001
Direkt bilirubin(mg/dl)	0.6 ± 0.28 (0.5-1.0)	0.38 ± 0.19 (0.16-0.70)	0.25 ± 0.1 (0.1-0.4)	0.001
Ferritin (ng/ml)	3037 ± 1580 (1300-5947)	714 ± 427 (133-1637)	35.7 ± 23.9 (11-100)	0.001
Granülosit apoptoz oranları (%)	11.3 ± 14.0 (1.6-66.0)	7.4 ± 5.3 (1.5-22.1)	8.9 ± 8.8 (2.85-33.44)	0.615

Hasta grubunun 22'si (%63) DFO ile şelasyon tedavisi almaktaydı. 13 (%37) hasta ise henüz DFO ile şelasyon tedavisine başlamamıştı.

DFO kullanan gruptaki 22 hastanın on ikisi (%54) erkek, onu (%46) kız idi. DFO kullanmayan gruptaki 13 hastanın yedisi erkek (%54), altısı kız (%46) idi. Kontrol grubundaki on beş hastanın ise dokuzu (%60) erkek, altısı kız (%40) idi. Gruplar arasında cinsiyet dağılımları açısından istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı (p=0.932). DFO ile şelasyon tedavisi başlama yaş ortalaması 2.6 yaş idi. Şelasyon tedavisi alan hastaların 6'sında (%27) splenektomi uygulanmıştı. Diğer iki gruptaki olguların hiçbirinde splenektomi uygulanmamıştı. Tüm gruplar için örneklem sırasındaki yaş ortalamaları karşılaştırıldığında, DFO kullanan hastaların yaş ortalaması kontrol grubuna ve DFO kullanmayan hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksekti (p=0.001, p=0.001). DFO kullanmayan grubun yaş

ortalaması ile kontrol grubu arasında ise istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.022$).

Grupların boya göre ağırlık oranları, granüosit sayıları, SGOT değerleri karşılaştırıldığında üç grup arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.061$, $p=0.268$, $p=0.264$). Gruplar arasında hemoglobin, SGPT, total ve direkt bilirubin değerleri, ferritin, enfeksiyon sayısı karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptandı ($p=0.001$, 0.043 , 0.001 , 0.001 , 0.001 , 0.001).

DFO kullanan ve kullanmayan hastalar arasında hemoglobin değerleri açısından fark bulunmadı ($p=0.121$). Ancak kontrol grubundaki olguların hemoglobin değerleri diğer iki gruba göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulundu ($p=0.001$, $p=0.001$). İkili grup karşılaştırmalarında ise SGPT değerleri açısından istatistiksel anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0,049$). Direkt bilirubin değerleri açısından DFO kullanan gruba kontrol grubu arasında fark gözlenmezken ($p=0.48$); DFO kullanan grupta DFO kullanmayan ve kontrol grubuna göre direkt bilirubin değerleri istatistiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek bulundu ($p=0.013$, $p=0.001$). DFO kullanan ve kullanmayan talasemili hastalarda total bilirubin değerleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek bulundu ($p=0.001$, $p=0.001$).

Ferritin değerleri DFO kullanan grupta diğer iki gruba göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek bulundu ($p=0.001$, $p=0.001$). DFO kullanan hastaların ferritin ortalamaları da kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksekti ($p=0.001$).

DFO kullanan ve kullanmayan hastalar arasında rutin kan transfüzyonuna başlama yaşları karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0.096$).

Enfeksiyon sıklığı DFO kullanan grupta DFO kullanmayan gruba ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek bulundu ($p=0.002$, $p=0.004$). DFO kullanan gruba kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0.235$).

Her üç grup arasında granüosit apoptoz oranı açısından istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0.615$).

Tüm gruplardaki olgular birlikte değerlendirildiğinde; granüosit apoptoz oranı ile klinik ve laboratuvar bulguları arasında korelasyon analizleri yapıldığında sadece enfeksiyon sayıları ile apoptoz arasında pozitif bir korelasyon saptandı ($p=0.39$; $r=0.292$). Yaş, cinsiyet, boya göre ağırlık yüzdeleri, hemoglobin düzeyi, ferritin,

granülosit sayıları, SGOT, SGPT, total ve direkt bilirubin düzeyleri ile apoptoz arasında ise anlamlı bir korelasyon tespit edilmedi (sırasıyla $p=0.64, 0.868, 0.65, 0.89, 0.90, 0.23, 0.64, 0.21, 0.84, 0.82$). DFO kullanan grupta DFO alım miktarı ve başlama yaşı ile apoptoz arasında da istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0.38, p=0.90$).

Her bir grup içinde aynı değişkenlerle granülosit apoptoz oranları karşılaştırıldığında, sadece kontrol grubunda SGPT değerleri ile granülosit apoptoz oranı arasında pozitif bir korelasyon bulundu ($p=0.09, r=0.646$).

6. SONUÇLAR:

- Haziran 2001-Ağustos 2001 tarihleri arasında yaşları 6 ay ile 16 yaş arasında değişen, 22'si DFO kullanan ve 13'ü DFO kullanmayan toplam 35 beta-talasemi major hastası ve kontrol grubu olarak 15 sağlıklı çocuk çalışmaya dahil edildi.
- Tüm olguların 28'i (%56) erkek, 22'si (%44) kızdı. 32 olgu (%64) İzmir Tepecik SSK Hastanesinde ve 18 olgu (%36) Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde izlenmekteydi.
- Hasta grubunun 22'si (%63) şelasyon tedavisi için DFO kullanmaktayken, 13 (%37) hastaya henüz DFO ile şelasyon tedavisi başlanmamıştı.
- DFO kullanan hastaların 6'sına (%27) splenektomi uygulanmıştı. DFO kullanmayan hastalarda splenektomili hasta yoktu.
- DFO kullanan gruptaki 22 hastanın on ikisi (%54) erkek, onu (%46) kız idi. DFO kullanmayan gruptaki 13 hastanın yedisi erkek (%54), altısı kız (%46) idi. Kontrol grubundaki on beş hastanın ise dokuzu (%60) erkek, altısı (%40) kız idi. Gruplar arasında cinsiyet dağılımları açısından istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.932$).
- Grupların yaş ortalamaları karşılaştırıldığında, DFO kullanan hastaların yaş ortalaması kontrol grubuna ve DFO kullanmayan hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksekti ($p=0.001$, $p=0.001$). DFO kullanmayan grubun yaş ortalaması ile kontrol grubu arasında ise istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.022$).
- Grupların boya göre ağırlık oranları, granülosit sayıları, SGOT değerleri karşılaştırıldığında üç grup arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.061$, $p=0.268$, $p=0.264$).
- Gruplar arasında hemoglobin, SGPT, total ve direkt bilirubin değerleri, ferritin, enfeksiyon sayısı karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptandı ($p<0.05$).
- DFO kullanan ve kullanmayan hastalar arasında hemoglobin değerleri açısından fark bulunmadı ($p=0.121$). Ancak kontrol grubundaki olguların hemoglobin değerleri diğer iki gruba göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulundu ($p=0.001$, $p=0.001$).
- İkili grup karşılaştırmalarında SGPT değerleri açısından istatistiksel anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0.049$).

- DFO kullanan ve kullanmayan talasemili hastalarda total bilirubin değerleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek bulundu ($p=0.001$, $p=0.001$).
- Direkt bilirubin değerleri açısından DFO kullanmayan grupla kontrol grubu arasında fark gözlenmezken ($p=0.48$); DFO kullanan grupta DFO kullanmayan ve kontrol grubuna göre direkt bilirubin değerleri daha yüksek bulundu ($p=0.013$, $p=0.001$).
- Ferritin değerleri DFO kullanan grupta diğer iki gruba göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek bulundu ($p=0.001$, $p=0.001$). DFO kullanmayan hastaların ferritin ortalamaları da kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksekti ($p=0.001$).
- DFO kullanan ve kullanmayan hastalar arasında rutin kan transfüzyonuna başlama yaşları karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0.096$).
- Enfeksiyon sıklığı DFO kullanan grupta DFO kullanmayan gruba ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha yüksekti ($p=0.002$, $p=0.004$). DFO kullanmayan grupla kontrol grubu arasında ise istatistiksel anlamlı fark yoktu ($p=0.235$).
- Her  grup arasında granülosit apoptoz oranı açısından istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0.615$).
- Tüm gruplardaki olgular birlikte değerlendirildiğinde; granülosit apoptozu oranı ile yaş, hemoglobin düzeyi, ferritin, granülosit sayıları, SGPT, total ve direkt bilirubin düzeyleri ile apoptoz arasında ise anlamlı bir korelasyon tespit edilmedi ($p>0.05$).
- Tüm gruplardaki olgular birlikte değerlendirildiğinde; granülosit apoptozu oranı ile son bir yılda geçirilen enfeksiyon sayıları arasında istatistiksel anlamlı pozitif bir korelasyon saptandı ($p<0.39$; $r=0.292$).
- Her bir grup içinde granülosit apoptoz oranları ile laboratuvar bulguları arasında korelasyon analizleri yapıldığında sadece kontrol grubunda SGPT değerleri ile granülosit apoptoz oranı arasında pozitif bir korelasyon bulundu ($p=0.09$, $r=0.646$).

7. TARTIŞMA:

Beta talasemili hastalarda aneminin tekrarlayan transfüzyonlarla tedavisi ciddi morbidite ve mortalite nedenidir (89,90). Aneminin en önemli nedeni ise inefektif eritropoezdir. Kemik iliğindeki eritroid öncüllerde aşırı α -globin birikimine ikincil olarak artan apoptoz, inefektif eritropoezin başlıca nedenidir. Son yıllarda yapılan bir araştırmada kemik iliğindeki eritroblastlarda talasemi majorda çok belirgin, talasemi minörde orta derece ve normal kişilerde çok düşük seviyelerde apoptoz varlığı gösterilmiş; lenfoid ve miyeloid öncüllerde bulunan fakat eritroid öncüllerde bulunmayan bir hücre membran proteini olan CD45 marker olarak kullanıldığında ise beta-talasemi majorlu hastaların kemik iliğinden alınan lenfoid ve miyeloid öncüllerde apoptozun artmamış olduğu bildirilmiştir (5). Ancak beta talasemi majorlü hastalarda perifere salınmış olan granülositlerde apoptoz bugüne kadar çalışılmamıştır.

Çalışmamızda her üç gruptaki çocuklar karşılaştırıldığında yaş, ağırlık, hemoglobin değerleri ve bilirubin değerleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur. Bunun nedeni DFO başlanmamış talasemili çocukların daha küçük yaşta olmaları, kontrol grubundaki çocukların daha geniş dağılımlı bir yaş grubunda alınmaları, hastalığın özelliği olarak hemoglobin ve bilirubin değerlerindeki farklılıklardır. Akut malnütrisyonun apoptoz oranını arttırdığı bilindiğinden akut malnütrisyonlu çocuklar çalışmaya dahil edilmemiş; gruplar arasında boya göre ağırlık oranları değerlendirildiğinde anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Kandaki oksidatif stresin apoptoza neden olduğu timositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, blastositler ve granüloza hücrelerinde yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (91-93). Talasemik hastaların serumlarında daha fazla oksidatif stres mevcuttur. Bu da yüksek düzeydeki lipid peroksidlerinin varlığı, düşük vitamin E düzeyi ve düşük antioksidan enzim seviyeleri ile kanıtlanmıştır (81). Kültür ortamında talasemi hastalarının serumları eklenerek oluşturulan ortamda inkübe edilen endotel hücrelerinde apoptozun morfolojik bulguları gösterilmiştir (81). Biz çalışmamızda talasemi majorlu hastalarda periferik kandan elde edilen granülositlerdeki apoptoz oranlarını sağlıklı kontrollerle karşılaştırdık ve granülositlerde apoptozda artma olmadığını bulduk. Bu da talasemik serumda oksidatif stres artmış olsa da, granülosit apoptoz oranlarını etkilemediğini; in-vitro ve in-vivo şartlarda farklı sonuçların ortaya çıktığını düşündürmektedir.

Çocukluk çağında insanlar bir çok kez non-spesifik viral veya bakteriyel bir ajanla enfeksiyon geçirmektedirler. Geçirilmekte olan enfeksiyonlar (örneğin, Epstein Barr virüs, Herpes virüs 34.5, Baculovirüs) apoptoz oranını etkilediği için (7) son iki ay içinde enfeksiyon öyküsü olan veya halen enfeksiyon geçirmekte olduğu tespit edilen vakalar çalışma dışı bırakılmıştır. Beta-talasemi majorlu hastalar ise hem splenektomi öncesinde hem de sonrasında enfeksiyonlara yatkındırlar (7,94,95). Bu yatkınlığın nedenlerinin T-hücre alt grup anormallikleri, vücuttaki aşırı demir yükü ve tekrarlayan transfüzyonların neden olduğu immün stimülasyonlarla ilişkili immünolojik bozukluklar ile nötrofillerin defektif migrasyon ve kemotaksis fonksiyonlarının olduğu bildirilmiştir (11). Ancak bu yatkınlığın granülosit apoptozu ile ilişkisi daha önce çalışılmamıştır. Bizim çalışmamızda DFO kullanan grupta, DFO kullanmayan gruba ve kontrol grubuna göre son bir yıl içinde geçirilmiş enfeksiyon sayısı belirgin daha yüksek saptandı. DFO kullanmayan talasemili hasta grubu ile kontrol grubu arasında ise istatistiksel anlamlı fark yoktu. Tüm gruptaki olgular birlikte değerlendirildiğinde; geçirilen enfeksiyon sayıları ile granülosit apoptozu oranı arasında istiksel anlamlı, pozitif bir korelasyon saptandı. Granülosit apoptoz oranı arttıkça yıllık enfeksiyon atağı sayısı da artmaktaydı. Bu sonuç diğer çalışmalarda bildirilen, enfeksiyona yatkınlığı açıklayıcı bir bulgu olabilirdi. Ancak her bir grup için korelasyon analizi yapıldığında granülositlerde apoptoz oranı ile enfeksiyon sayısı arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Bir çok sitotoksik ajana (methotrexate, hidroxyurea gibi) bağlı hücre ölümünün apoptoz yolu ile olduğu iyi bilinmektedir (8). Bir çok başka ajan da bu yolu modifiye edebilmektedir. İlaçların kullanımı apoptoz oranlarını etkileyebileceğinden, çalışmamızda DFO dışında herhangi bir ek ilaç tedavisi alan hasta çalışma dışı bırakılmıştır. DFO, transfüzyonel demir yükünün tedavisinde en geniş kullanıma sahip ajandır. Hem DFO'nun hem de oral şelatör deferipronun sitotoksik ajanlar oldukları ve çoğalmakta olan hücreleri S-fazında durdurdukları bilinmektedir. DFO hematopoetik hücreler üzerine in-vitro değişken etkilerde bulunmaktadır. DNA sentezinin önlenmesi, apoptozun indüksiyonu, monositlerde tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) reseptörlerinin salıverilmesi bunlardan bazılarıdır (15). Bu bulgulardan yola çıkılarak yapılan bir çalışmada sağlıklı kişiden alınan lenfosit ve granülositler DFO eklene ortamda kültüre edilmişler ve bu hücrelerin bir kısmının IL-2 ile aktive edilerek çoğalmaları sağlanmıştır. 12, 24 ve 48 saatlik kültürler sonrası granülosit apoptozu değerlendirilmiştir. DFO'nun, IL-2 ile aktivasyon sonrası çoğalmakta olan

lenfosit ve granülositlerde kültür ortamında apoptoza neden olurken, periferde dinlenen hücrelerde apoptoza neden olmadığı gösterilmiştir (8). Hücre çoğalması muhtemelen DNA sentezinin inhibisyonu nedeni ile demir şelasyonuna hassastır. Öne sürülen mekanizma, DNA sentezinde ribonükleotidleri deoksiribonükleotidlere indirmekle sorumlu anahtar enzim olan ribonükleotid redüktazın (RR) inhibisyonudur. RR'nin iki alt ünitesinden biri binükleer ferrik demir içerir. DFO demiri ortamdaki uzaklaştırarak proteinin demir merkezinin aktif olarak kaldırmak yerine demir içeren radikal merkezinin yeniden oluşumunu önlemektedir (96). Nitekim DFO'nun ferrik klorür ile önceden satüre edilmesi aktive hücrelerin DFO'ya bağlı artmış apoptozunu önlemiştir. Bu ise DFO'nun sitotoksik ve antiproliferatif etkisinin demir deprivasyonu yolu ile yaptığı teorisini desteklemektedir (8). DFO'nun demiri bağlayarak hücre içi ve dışı ortamdaki uzaklaştırması hücreler üzerine koruyucu etki gösterebilmektedir. Hücre içi demir-bağımlı toksik radikaller oluşturarak sitotoksik etki gösteren maddeler (H_2O_2 ve menadion gibi) ortamda DFO varlığında bu etkiyi gösterememiştir (97,98). Tüm bu çalışmalar kültür ortamında yapılmıştır.

Beta-talasemili hastalarda yapılan tek klinik çalışmada, hastalar DFO kullanan, kullanmayan ve sağlıklı kontrol grubu olarak üç gruba ayrılmış ve kan c-myc protein düzeyleri çalışılmıştır. DFO kullanan grupta c-myc protein düzeyleri belirgin düşük bulunmuştur. Aynı çalışmada HL60 lösemik hücre serisinin DFO eklenen ortamda 24 ve 36 saatlik kültürü yapılmış ve c-myc RNA ve protein düzeyleri ile DNA sentezinin eş zamanlı düştüğü ve apoptoz oluştuğu gösterilmiştir. Apoptoz tespiti hücrelerin acridine orange ile boyanması ve floresans mikroskopta çekirdek kondansasyonunun gösterilmesi yöntemi ile yapılmıştır. Böylece DFO ile apoptoz oluşturulan hücrelerde ve talasemili DFO kullanan hastaların serum c-myc düzeylerinin her ikisinin de düşüklüğü in vitro ve in vivo gösterilerek apoptoz arasında paralellik kurulmaya çalışılmıştır (15). DFO'nun etkisini in-vitro değil, in-vivo araştıran çalışmamız sonucunda bizim bulgularımız bu çalışma sonuçlarını desteklememektedir.

Talasemili hastalarda bugüne kadar granülosit apoptoz oranlarını araştıran bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada beta-talasemili majorlu DFO kullanan ve kullanmayan hastalar ile sağlıklı kontrollerde periferik kan örneklerinde granülosit apoptozu oranları literatürde ilk kez Annexin-V yöntemi ile çalışılarak araştırılmıştır. Bizim çalışmamızda beta-talasemi major hastası olup DFO ile şelasyon alan grupta almayan ve kontrol grubuna göre granülosit apoptozunun artmamış olduğu bulundu. Bu bulgu DFO'nun bu grupta zaten yüksek olan vücut

demiri ile doyurulmuş olmasına bağlı olabilir. Bizim bulgularımız daha önce beta-talasemi majorlu hastaların kemik iliğinden alınan lenfoid ve miyeloid öncüllerdeki apoptozun artmamış olduğunu bildiren (5) ve DFO'nun kültür ortamında, periferik, aktive edilmemiş granüositlerde apoptozu arttırmadığını bildiren (8) çalışmaların sonuçları ile uyumludur.

Ferritin, vücut demir yükünün indirekt bir göstergesidir. Aşırı demir yükünün beta-talasemi major hastalarında granüosit fonksiyonlarını bozan ve enfeksiyonlara yatkınlık yaratan etkenlerden biri olduğu bilinmektedir (99,100). Demir yükü artmış talasemili hastaların serumları incelendiğinde, dolaşımdaki demiri taşıyan diğer maddeler olan, transferrin, albumin ve düşük molekül ağırlıklı demir bileşiklerinin granüosit fonksiyonlarını bozmadığı, sadece ferritininin granüositlere toksik etki gösterdiği bildirilmiştir. Bu toksik etki ancak ortama demir şelatörü, DFO eklendiğinde ortadan kalkmaktadır (101). Çalışmamızda ferritin değerleri DFO kullanan grupta en yüksek, DFO kullanmayan grupta kontrol grubuna göre yüksek ve kontrol grubunda en düşük düzeyde bulundu. Tüm gruplar arası karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı oranda fark vardı. Ancak serum ferritin düzeyleri ile granüosit apoptozu arasında istatistiksel anlamlı bir korelasyon tespit edilmedi. Bu da ferritin değerlerinin en yüksek olduğu DFO tedavisi alan grupta DFO verilmesi ile ferritin granüositlere toksik etkisinin ortadan kalktığını in-vivo olarak desteklemektedir.

Granüosit apoptozu oranlarının hastaların yaşları, cinsiyetleri, DFO başlama yaşı, boya göre ağırlık oranları, splenektomi, hemoglobin değerleri, granüosit sayıları, serum SGPT, SGOT, total ve direkt bilirubin değerlerinin granüosit apoptozu oranları ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir. Sadece kontrol grubunda serum SGPT değerleri ile granüosit apoptozu arasında istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon tespit edilmişse de diğer gruplarda aynı bulguya rastlanmaması sonucun rastlantısal olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak; beta-talasemi majorlu hastalarda granüosit apoptoz oranlarının artmamış olduğu, granüosit apoptoz oranları ile enfeksiyon sıklığı, DFO kullanımı ve artmış serum ferritin düzeyleri arasında anlamlı bir ilişkili olmadığı bulundu.

8. ÖZET

BETA –TALASEMİ HASTALARINDA GRANÜLOSİT APOPTOZU

Beta talasemide aneminin en önemli nedeni inefektif eritropoezdir. Kemik iliğindeki eritroid öncüllerde aşırı α -globin birikimine ikincil olarak artan apoptoz, inefektif eritropoezin başlıca nedenidir. Bu hastaların kemik iliğinden elde edilen eritroblastlarında apoptoz oranı artmış olarak bulunurken lenfoid ve miyeloid öncüllerde apoptozun artmamış olduğu rapor edilmiştir. Oksidatif stres bir apoptoz nedenidir. Talasemik hastaların serumlarında oksidatif stresin artmış olduğu yüksek düzeydeki lipid peroksidlerinin varlığı, düşük vitamin E düzeyi ve düşük antioksidan enzim seviyeleri ile kanıtlanmıştır. Hastalarının serumları eklenerek oluşturulan ortamda inkübe edilen endotel hücrelerinde apoptozun morfolojik bulguları gösterilmiştir. Ayrıca bu hastalarda nötrofillerin migrasyon ve kemotaksis fonksiyonlarının defektif olduğu bildirilmiştir. Aşırı demir yükü beta-talasemi majorlu hastalarda granülosit fonksiyonlarını bozan ve enfeksiyonlara yatkınlık yaratan etkenlerden bir diğeridir. Demir yükü artmış talasemili hastaların serumlarında, dolaşımdaki demiri taşıyan maddelerden sadece ferritininin granülositlere toksik etki gösterdiği bildirilmiştir.

Desferoksamin (DFO), transfüzyonel demir yükünün tedavisinde kullanılmaktadır. DFO'nun sitotoksik bir ajan olduğu, çoğalmakta olan hücreleri S-fazında durdurduğu, DNA sentezini önlediği ve kültür ortamındaki hücrelerde apoptoza neden olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, literatürde ilk kez talasemi majorlu hastalarda periferik kandaki granülositlerde apoptoz oranlarının Annexin-V yöntemi ile araştırılması ve bu hastalardaki granülosit apoptoz oranı ile enfeksiyon sıklığı, DFO kullanımı ve serum ferritin düzeyi arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlandı. Haziran 2001-Ağustos 2001 tarihleri arasında yaşları 6 ay ile 16 yaş arasında değişen, 22'si DFO kullanan ve 13'ü DFO kullanmayan toplam 35 beta-talasemi major hastası ve kontrol grubu olarak 15 sağlıklı çocuk çalışmaya dahil edildi. Periferik kan örneklerinden Histopaque-1119 ve Histopaque-1077 kullanarak granülosit izolasyonu yapıldı. Annexin V-FITC yöntemi ile granülosit apoptoz oranları çalışıldı.

Sonuç olarak; beta-talasemi majorlu hastalarda granülosit apoptoz oranlarının artmamış olduğu, granülosit apoptoz oranları ile enfeksiyon sıklığı, DFO kullanımı ve artmış serum ferritin düzeyleri arasında anlamlı bir ilişkili olmadığı bulundu.

9. SUMMARY

GRANULOCYTE APOPTOSIS IN PATIENTS WITH THALASSEMIA

Ineffective erythropoiesis is the major defect that leads to anemia in beta-thalassemia patients. The enhanced apoptosis secondary to increased α -globin accumulation in erythroid progenitors is the main cause of ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia. In a recent study, enhanced apoptosis was clearly demonstrated in erythroid progenitors in patients with beta-thalassemia, but in lymphoid and granulocyte precursors, enhanced apoptosis could not be found.

Oxidative stress causes apoptosis in cells. Oxidative stress exists in thalassemic serum as evidenced by the presence of high level of lipid peroxides, low level of vitamin E and low level of antioxidant enzymes. Morphological signs of apoptosis are demonstrated on endothelial cells incubated with thalassemic serum. Also defective migration and chemotaxis functions of neutrophils of thalassemia patients were reported in the literature. Iron overload is one of the factors that causes defective granulocyte functions and susceptibility to infections. Serum ferritin, not the other iron carrying compounds exerts toxic effect on granulocyte membrane function.

Desferrioxamine (DFO) is widely used in the treatment of transfusion related iron overload. It's well known that DFO is a cytotoxic agent which inhibits S-phase of cell proliferation, prevents DNA synthesis and leads apoptosis of cells in culture. The aim of this study was to investigate apoptosis rate of peripheral granulocytes with Annexin-V method and to examine the association between the granulocyte apoptosis and frequency of infections, the role of DFO treatment, and serum ferritine levels. This study was performed between June 2001 and August 2001. Twenty two thalassemic children receiving DFO treatment, thirteen thalassemic children not receiving DFO treatment, and fifteen healthy children as the control group were included in this study. In all children, granulocytes were isolated by using Histopaque-1119 and Histopaque-1077 from peripheral blood samples. Granulocyte apoptosis was studied with Annexin V-FITC apoptosis detection method.

As a result of our study, we concluded that apoptosis of peripheral granulocytes is not increased in beta-thalassemia patients and there is no association between the granulocyte apoptosis and frequency of infections, role of DFO chelation therapy and high serum ferritine levels.

10. KAYNAKLAR

1. Honig GR. Thalassemia syndromes, In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB(eds). Nelson Textbook of Pediatrics, 16th edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2000; pp1484-1487.
2. Özer AS. The molecular basis of β -thalassemia in Turkey and prenatal diagnosis by DNA analysis. Boğaziçi Üniversitesi Doktora Tezi, İstanbul, 1992.
3. Beksaç MS. Fetal Tıp (Prenatal Tanı), Medical Network& Nobel. 1996; Bölüm 9:145-152.
4. Finch CA, Deubelbeiss K, Cook JD, et al. Ferrokinetics in man. Medicine 1970; 49:17.
5. Yuan J, Angelucci E, Lucarelli G, et al. Accelerated programmed cell death (Apoptosis) in erythroid precursors of patients with severe β -Thalassemia (Cooley's Anemia). Blood 1993; 82:374-377.
6. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. Nature 1992: 356-397.
7. Binet JL, Mentz F, Merle-Beral H. Apoptosis in blood diseases. Hematol Cell Ther 1996; 38: 253-264.
8. Hileti D, Panayiotidis P, Hoffbrand AV. Iron chelators induce apoptosis in proliferating cells. Br J Haematol; 1995; 89: 181-187.
9. Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, Van Oers MHJ. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. Blood 1994; 84: 1415-1420.
10. Homburg CHE, Haas M, Borne AEGKr, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CPM, Roos D. Human neutrophils loose their surface Fc γ RIII and acquire annexin V binding sites during apoptosis in-vitro. Blood 1995; 85: 532-540.
11. Kütükçüler N, Kutlu O, Nisli G, Öztop S, Çetingül N, Çağlayan S. Assessment of neutrophil chemotaxis and random migration in children with thalassemia major. Pediatric Hematol Oncol 1996; 13: 239-245.
12. Varani J, Dame MK, Diaz M, Stoolman L. Deferoxamine interferes with adhesive functions of activated human neutrophils. Shock 1996; 5: 395-401.
13. Fukuchi K, Tomoyasu S, Tsuruoka N, Gomi K. Iron deprivation-induced apoptosis in HL-60 cells. FEBS Lett 1994; 350: 139-142.

14. Juckett M, Shadley J, Zheng Y. Iron deprivation reduces clonogenic survival, induces apoptosis and enhances radiation toxicity in endothelial cells. *Blood* 1995; 86 [Suppl 1]: 976a.
15. Kyriakou D, Eliopoulos AG, Papadakis A, Alexandrakis M, Eliopoulos GD. Decreased expression of c-myc oncoprotein by peripheral blood mononuclear cells in thalassaemia patients receiving desferrioxamine. *Eur J Haematol* 1998; 60: 21-27.
16. Thompson MW, Mc Innes RR, Willard HF. *Genetics in medicine*. Saunders Company, 50, 1991; Chapter 16: pp 247-270.
17. Gelehrter TD, Collins FS, Ginsburg D. *Principles of medical genetics*, Waverly Company 2, 1998; Chapter 6: pp 91-116.
18. Ünsal E. İzmirin Çeşme, Alaçatı ve Urla ilçelerinde Beta talasemi taşıyıcılığı. Dokuz Eylül Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, İzmir, 1994.
19. Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW, Varmus H. *The molecular basis of blood diseases*. Saunders Company 2 section II 1994; 107-195.
20. Kazazian HH, Boehm CD. The molecular basis and prenatal diagnosis of β -Thalassemia. *Blood* 1988; 72: 1107-1116.
21. Tadmouri GO, Tüzmen Ş, Özçelik H, et al. Molecular and population genetic analysis of β -Thalassemia in Turkey. *Am J Hematol* 1998; 57: 215-220.
22. Corrons JIV, Pujades MA, Garjia AM, et al. Rapid detection of Spanish ($\delta\beta$)^o Thalassemia deletion by polymerase chain reaction. *Blood* 1992; 80:1582-1585.
23. Gümrük F, Altay Ç. *Katkı Pediatri Dergisi*, Hacettepe Üniversitesi Yayınları 1995; 307- 325.
24. Boletini E, Suobodova M, Divoki V, et al. Sick cell anemia, sick cell β -thalassemia and thalassemia major in Albania: Characterization of mutations. *Human Genetics* 1994; 93: 182-187.
25. Tadmouri GO, Tüzmen Ş, Özçelik H, et al. Molecular and genetic analysis of β -thalassemia in Turkey. *Am J Hematol* 1998; 57: 215-220.
26. Annotation: Dominant β -thalassemia: Molecular basis and pathophysiology. *Br J Haematol* 1992; 80: 273-277.
27. Efremov DG, Dimovski AJ, Baysal E, et al. Possible factors influencing the haemoglobin and fetal haemoglobin levels in patients with β -thalassemia due to

- a homozygosity for the IVS1-6(T→C) mutation. *Br J Haematol* 1994; 86: 824-830.
28. Gutteridge JMC, Richmond R, Halliwell B: Inhibition of iron-catalyzed formation of hydroxyl radicals from superoxide and of lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochem J* 1979; 184: 469-472.
29. Jacobs A. Low molecular weight intracellular iron compartments. *Blood* 1977; 50: 433-439.
30. Cazzola M, Bergamaschi G, Dezza L, Arosio P. Manipulations of cellular iron metabolism for normal and malignant cell proliferation: achievements and prospects. *Blood* 1990; 75: 1903-1919.
31. Porter JB, Hoyes KP, Abeysinghe R, Brooks PN, Huens ER, Hider RC. Comparisons of the subacute toxicity and efficacy of 3-hydroxypyrid-4-one chelators in overloaded and nonoverloaded mice. *Blood* 1991;78:2727-2734.
32. Al-Rafaie FN, Vets PA, Wilkes S, Wonke B, Hoffbrand AV. Agranulocytosis in a patient with thalassemia major during treatment with oral iron chelator 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one. *Acta Haematologica* 1993; 89:86-90.
33. Andreani M, Manna M, Lucarelli G, et al. Persistence of mixed chimaerism in patients transplanted for the treatment of thalassemia. *Blood* 1996; 87: 3494-3499.
34. Kapelushnik J, Naparstek E, Nagler A, et al. Second transplantation using allogeneic peripheral blood stem cells in a β -thalassemia major patient featuring stable mixed chimaerism. *Br J Haematol* 1996; 94:285-287.
35. Kulozik AE, Koch AB, Kohne E, et al. Thalassemia intermedia. *Blood* 1991; 77: 2054-2058.
36. Gasperini D, Perseu L, Melis MA, et al. Heterozygous β -thalassemia with thalassemia intermedia phenotype. *Am J Hematol* 1998; 57: 43-47.
37. Rosatelli C, Leoni GB, Tuveri T, et al: Heterozygous β -thalassemia: relationship between the hematological phenotype and the type of β -thalassemia mutation. *Am J Hematol* 1992; 39: 1-4.
38. Agorwal S, Wei L, Hattori Y, Agorwal SS. Codon 4 ACT→ACA, codon 5 CCT→TCT, and codon 6 GAG→TAG mutations in cis position: A form of thalassemia trait. *Am J Hematol* 1997; 56: 187-188.

39. Galanello R, . Molecular basis of thalassemia major. *Pediatr Hematol Oncol* 1995; 2: 383-396.
40. Vaux DL. Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 786-792.
41. Schulze-Osthoff K, Walczak H, Dröge W, Krammer PH. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol* 1994; 127: 15-20.
42. Wickremasinghe RG, Hoffbrand AV. Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood* 1999; 93: 3587-3600.
43. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997; 53: 451-465.
44. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267: 1445-1449.
45. Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2239-2244.
46. Rowan S, Fisher DE. Mechanisms of apoptotic cell death. *Leukemia* 1997; 11: 457-465.
47. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirer GG, Earnshaw WC. PrICE- like protease from apoptotic cells, cleaves poly (ADP-ribose) polymerase. *Nature* 1994; 371: 346-347.
48. Thornberry NA. The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull* 1997; 53: 478-490.
49. Casciola-Rosen LA, Nicholson DW, Chong T, et al. Apopain/ CPPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic cell death. *J Exp Med* 1996; 183: 1957-1964.
50. Nicholson DW, Ambereen A, Thornberry NA, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995; 376: 37-43.
51. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85: 817-827.
52. Irmeler M, Thome M, Hahne M, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997; 388: 190-195.
53. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.

54. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997; 18: 44-51.
55. Savill J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull* 1997; 53: 491-508.
56. Roy N, Devereaux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1997; 16: 6914.
57. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. J. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Immunology* 1992; 148: 2207-2216.
58. Martin SJ, Reutelingsperger CPM, McGahon AJ, et al. Early distribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 1995; 182: 1545-1556.
59. Nagata S. Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor. *Adv Immunol* 1994; 57: 129-144.
60. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267: 1449-1455.
61. Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: ipr and gld mutations. *Immunol Today* 1995; 16: 39-43.
62. Lynch DH, Ramsdell F, Anderson MR. *Immunol Today* 1995; 16: 569-573.
63. Flier JS, Underhill LH. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996; 334: 1717-1725.
64. Berke G. The CTL's kiss of death. *Cell* 1995; 81: 9.
65. Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T cell-derived granzyme B. *Nature* 1995; 377: 446.
66. Martin SJ, Amarantes-Mendes GP, Shi L, et al. The cytotoxic cell protease granzyme B initiates apoptosis in a cell free system by proteolytic processing and activation of the ICE/CED-3 family protease CPP32 via a novel two-step mechanism. *EMBO J* 1996; 15: 2407.
67. Lane DP. P53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-16.
68. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013-2026.

69. Henderson S, Rowe M, Gregory C, et al. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 1991; 65: 1107-1115.
70. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994;9: 1799-1804.
71. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, et al. P53 deficient mice are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992; 356: 215-221.
72. Kato GJ, Dang CV. Function of the c-myc oncoprotein. *Faseb J* 1992; 6: 3065-3072.
73. Cole MD. The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. *Ann Rev Genet* 1986; 20: 361-384.
74. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 1992; 69: 119-128.
75. Eliopoulos AG, Kerr DJ, Spandidos DA. The effect of doxorubicin, daunorubicin and 4'-epidoxorubicin on the exogenous c-myc promoter in mouse erythroleukemia cells. *Anticancer Res* 1991;11: 2153-2158.
76. Eliopoulos AG, Kerr DJ, Maurer HR, Hilgard P, Spandidos DA. Induction of the c-myc but not the c-Hras promoter by platinum compounds. *Biochem Pharmacol* 1995; 50:33-38.
77. Sachs L, Lotem J. Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: new implications for therapy. *Blood* 1993; 82: 15-21.
78. Smith CA, Williams GT, Kingston R, et al. Antibodies to CD3 / Tcells receptor complex induced by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* 1989; 337: 181-184.
79. Seki R, Mukai M, Iwata M. Regulation of T lymphocyte apoptosis. Signals for the antagonism between activation and glucocorticoid-induced death. *J Immunol* 1991; 147:4286-4292.
80. Roger R, Issaad C, Pallardy M, et al. Bcr-abl does not prevent apoptotic death induced by human natural killer or lymphokine activated killer cells. *Blood* 1996;87:1113-1122.

81. Banjerdpongchai R, Wilairat P, Fucharoen S, Bunyaratvej A. Morphological alterations and apoptosis of endothelial cells induced by thalassemic serum invitro. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997; 28 suppl 3:149-154.
82. Bittorf Th, Seiler J, Jaster R, Brock J. The role of protein kinases for erythropoietin-induced suppression of apoptosis in erthroid cell lines. *Blood* 1995; 86 [Suppl 1]: 659a.
83. Link DC, Roden JE. Suppression of apoptosis during cytokine deprivation of 32D cells is not sufficient to induce granulocytic differentiation. *Blood* 1995; 86 [Suppl 1]: 672a.
84. Ginis I, Faller DV. Integrin-mediated adhesion to activated endothelium protects human neutrophils from apoptosis. *Blood* 1995; 86 [Suppl 1]: 501a.
85. Apoptosis, applied reagents and technologies. Instruction manual. Pharmingen, A Becton Dickinson Company, Second edition. December 1998:pp 1-96.
86. Yuan J, Rubin E, Paszty C, Schrier SL. Programmed erythroid cell death in spleens of beta(b) thalassemic mice. *Blood* 1995; 86 [Suppl 1]:8a.
87. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Invest Suppl.* 1968; 97:7.
88. English D, Andersen BR. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradient of ficoll-hypaque. *J Immunol Methods* 1974; 5: 249.
89. The Thalassemias: Molecular Pathogenesis, in Bunn H. Forget BG (eds): *Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects.* Philadelphia. PA, Saunders 1986; 223.
90. Piomelli S, Loew T,. Management of thalassemia major (Cooley's anemia). *Hematol Oncol Clin North Am* 1991; 5: 557.
91. Sun XM, Snowden RT, Skilleter DN, et al. A flow-cytometric method for the separation and quantitation of normal and apoptotic thymocytes. *Anal Biochem* 1992; 204: 351-356.
92. Gentile V, Thomazy V, Piacentini M, et al. Expression of tissue transglutaminase in Balb-C 3T3 fibroblasts: effects on cellular morphology and adhesion. *J Cell Biol* 1992; 119: 463-474.
93. Polunovsky VA, Chen B, Henke C, et al. Role of mesenchymal cell death in lung remodeling after injury. *J Clin Invest* 1993; 92: 388-397.

94. Bassaris HP, Lianou PE, Skoutelis AT, Papavassiliou JT, Phair JP. Defective adherence of polymorphonuclear leukocytes to nylon induced by thalassemic serum. *J Infect Dis* 1982; 146: 52-55.
95. Speer CP, Gahr M, Schuff-Werner P, Schroter W. Immunologic evaluation of children with homozygous beta-thalassaemia treated with desferrioxamine. *Acta Haematol* 1990; 83: 76-81.
96. Nyholm S, Mann GJ, Jahansson AK, Bergeron RJ, Graslund A, Thelander L. Role of ribonucleotide reductase in inhibition of mammalian cell growth by potent iron chelation. *J Biol Chem* 1993a; 268: 26200-26205.
97. Varani J, Phan SH, Gibbs DF, Ryan US, Ward PA. H₂O₂ mediated cytotoxicity of rat pulmonary endothelial cells: Changes in adenosine triphosphate and purine products and effect of protective interventions. *Lab Invest* 1990; 63: 683-689.
98. Starke PE, Farber JL. Ferric iron and superoxide ions are required for the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide: evidence for the participation of hydroxyl radicals formed by an iron-catalyzed Haber-Weiss reaction. *J Biol Chem* 1985; 260: 10099-10105.
99. Cantinieaux B, Hariga C, Ferster A, De Maertelaere E, Toppet M, Fondu P. Neutrophil dysfunctions in thalassaemia major: the role of cell iron overload. *Eur J Haematol* 1987; 39: 28-34
100. Skoutelis ATH, Lianou E, Papavassiliou TH, Karamerou A, Politi K, Bassaris HP. Defective phagocytic and bactericidal function of polymorphonuclear leukocytes in patients with β -thalassaemia major. *J Infect* 1984; 8: 118-122.
101. Cantinieaux B, Janssens A, Boelaert JR, et al. Ferritin-associated iron induces neutrophil dysfunction in hemosiderosis. *J Lab Clin Med* 1999; 133:353-361.

11. EKLER

11.1 Hasta veri formu

11.2 Hastaların klinik ve laboratuvar verileri

11.3 Hastaların flow sitometredeki apoptoz sonuçları.



HASTA VERİ FORMU

Adı ve soyadı	
Doğum tarihi	
Ağırlık	
Boy	
Dosya no.	
Çalışma no.	
Tanı	
DFO dışı ilaç alıyor mu?	
DFO alıyor mu?	
DFO başlama tarihi	
DFO alım dozu	
Splenektomi durumu	
Tam kan sayımı Hg: Hct: Beyaz küre sayısı: Granülosit sayısı: Trombosit sayısı:	
Seroloji (HBV, HCV, CMV, HIV)	
Kan Biyokimyası SGOT: SGPT: Total bilirubin: Direkt Bilirubin:	
Serum Ferritin:	
Enfeksiyon sayısı/ yıl:	
Enfeksiyon tipi:	
Enfeksiyon şiddeti Oral tedavi sayısı Parenteral tedavi sayısı	

	hastano	grup	cins	yas	ağırlık	boy	wforh	splektmi	hemoglbın	beyazkr
1	3	thal+dfö	K	193.0	36.5	141	98.60	splenekto	10.0	24,600
2	4	thal+dfö	K	81.0	22.0	125	91.60	normal	8.6	7,600
3	5	thal+dfö	K	76.0	19.0	110	100.00	normal	8.5	8,800
4	6	thal+dfö	E	140.0	32.5	133	108.00	normal	5.3	9,000
5	7	thal+dfö	E	166.0	32.0	140	90.00	splenekto	8.3	27,400
6	8	thal+dfö	E	156.0	40.0	146	98.00	splenekto	8.5	37,800
7	9	thal+dfö	K	133.0	39.0	145	97.50	splenekto	8.4	15,700
8	10	thal+dfö	E	163.0	34.0	139	94.00	splenekto	9.9	18,300
9	13	thal+dfö	E	168.0	16.5	100	103.00	normal	8.1	5,300
10	14	thal+dfö	E	58.0	16.0	102	98.70	normal	9.1	7,100
11	15	thal+dfö	K	140.0	28.0	134	87.50	normal	9.6	7,800
12	16	thal+dfö	K	96.0	23.0	125	90.50	normal	9.0	4,200
13	17	thal+dfö	E	39.0	18.0	100	112.00	normal	8.7	11,300
14	18	thal+dfö	K	164.0	43.5	154	92.90	normal	8.4	4,100
15	20	thal+dfö	E	153.0	33.0	141	90.40	splenekto	9.4	16,500
16	22	thal+dfö	E	112.0	28.0	132	95.00	normal	8.3	6,100
17	25	thal+dfö	K	45.0	12.0	91	90.90	normal	9.6	6,100
18	26	thal+dfö	E	92.0	24.5	120	108.00	normal	8.7	8,000
19	27	thal+dfö	K	55.0	15.0	99	100.00	normal	9.5	10,400
20	28	thal+dfö	E	130.0	24.5	127	93.80	normal	9.1	8,900
21	31	thal+dfö	E	31.0	12.0	90	92.00	normal	8.5	6,800
22	32	thal+dfö	K	64.0	18.5	112	96.30	normal	9.9	7,500
23	1	thal	E	17.0	7.5	74	75.00	normal	10.7	9,700
24	2	thal	E	18.0	8.4	72	93.00	normal	9.0	6,800
25	11	thal	K	16.0	10.0	74	100.00	normal	9.1	10,300
26	12	thal	K	12.0	8.0	69	93.00	normal	9.2	10,600
27	19	thal	K	22.0	10.5	79	95.40	normal	8.0	13,100
28	21	thal	K	17.0	9.5	77	90.00	normal	8.6	8,500
29	23	thal	E	18.0	11.5	88	88.40	normal	9.2	9,200
30	24	thal	E	90.0	52.0	60	89.60	normal	10.4	12,100
31	29	thal	E	22.0	9.8	80	89.00	normal	9.0	14,000
32	30	thal	E	10.0	8.5	65	113.00	normal	10.1	12,300
33	33	thal	K	6.5	10.5	83	90.50	normal	9.8	12,400
34	34	thal	K	7.5	7.2	62	112.50	normal	8.9	10,400
35	35	thal	E	13.0	7.4	67	92.50	normal	8.8	13,300
36	36	kontrol	K	84.0	23.0	117	107.00	normal	12.6	9,000
37	37	kontrol	E	114.0	29.7	138	88.10	normal	14.0	7,000
38	38	kontrol	K	12.0	10.0	73	101.00	normal	12.0	7,700
39	39	kontrol	E	13.0	9.5	73	100.00	normal	12.1	6,800
40	40	kontrol	E	108.0	30.0	135	95.20	normal	13.0	7,800
41	41	kontrol	E	61.0	20.0	114	100.00	normal	12.0	8,900
42	42	kontrol	E	66.0	26.0	116	130.00	normal	14.0	8,100
43	43	kontrol	E	13.0	10.3	76	100.00	normal	11.2	5,600
44	44	kontrol	K	102.0	33.4	135	106.00	normal	12.2	7,300

	gran.sys	ast	alt	tbil	dbil	ferritin	enssys	p.o.ted	p.e.ted
	10,300	51	41	.99	.26	5,579	0	0	0
	3,192	37	24	1.48	.38	3,295	7	7	0
	5,280	44	41	.85	.25	3,567	6	6	0
	4,500	22	33	.98	.42	2,712	5	5	0
	12,056	80	96	1.01	.59	5,536	3	3	0
	12,856	51	47	1.70	.62	5,557	3	3	0
	7,850	34	22	1.20	.40	2,993	5	4	1
	8,418	41	43	1.20	.80	3,134	3	3	0
	1,908	26	20	.90	.40	1,356	0	0	0
	2,982	52	50	2.21	1.00	1,479	3	3	0
	4,836	83	95	3.03	.98	5,947	0	0	0
	1,764	23	30	1.92	.68	3,657	0	0	0
	4,520	30	20	2.00	.90	1,499	3	3	0
	1,968	44	47	.90	.30	1,783	2	2	0
	6,930	15	38	2.48	.76	3,262	0	0	0
	2,928	19	60	2.38	1.00	1,417	3	3	0
	3,050	25	16	1.20	.80	2,443	4	4	0
	3,840	24	33	.90	.50	1,369	2	2	0
	4,576	41	24	.80	.05	2,485	8	8	0
	4,628	68	95	1.07	.78	4,909	7	7	0
	2,992	79	9	2.21	.82	1,300	12	9	3
	3,900	24	15	2.80	.98	1,538	0	0	0
	2,910	36	4	1.74	.22	911	4	3	1
	3,440	30	22	2.71	.44	993	2	2	0
	5,150	39	20	.90	.70	197	0	0	0
	5,936	49	40	1.02	.60	450	0	0	0
	7,860	34	26	1.80	.70	663	0	0	0
	3,910	50	29	1.10	.34	901	0	0	0
	2,760	76	46	.98	.50	1,163	0	0	0
	7,986	12	24	1.16	.16	234	0	0	0
	5,040	31	36	1.20	.40	839	0	0	0
	3,936	79	12	1.53	.30	133	0	0	0
	9,920	39	23	.48	.21	1,637	0	0	0
	4,160	50	24	1.06	.29	465	0	0	0
	4,522	44	10	1.93	.17	707	2	1	1
	4,140	32	27	.40	.20	60	2	2	0
	2,940	33	16	.50	.20	100	0	0	0
	3,996	21	20	.70	.20	28	1	1	0
	3,400	25	20	.40	.10	36	1	1	0
	4,056	21	15	.90	.30	18	0	0	0
	3,560	20	16	.70	.20	47	0	0	0
	4,860	28	15	.80	.40	42	0	0	0
	3,696	46	20	.50	.10	15	2	2	0
	2,920	40	32	.60	.40	38	2	2	0

apoptoz	dfobşlma	dfomiktr
5.16	16.00	50.00
5.89	24.00	45.00
9.85	30.00	50.00
6.59	36.00	40.00
11.14	18.00	50.00
5.82	11.00	50.00
6.34	48.00	40.00
66.08	24.00	45.00
2.53	42.00	25.00
4.94	18.00	30.00
2.36	42.00	50.00
12.08	24.00	40.00
20.80	18.00	30.00
31.64	36.00	40.00
1.62	24.00	50.00
8.39	24.00	30.00
6.97	56.00	35.00
5.73	36.00	40.00
12.01	48.00	35.00
2.00	18.00	40.00
16.68	18.00	20.00
5.86	30.00	25.00
7.01	,	,
5.01	,	,
4.85	,	,
7.85	,	,
1.59	,	,
6.62	,	,
8.01	,	,
5.30	,	,
10.24	,	,
12.38	,	,
2.06	,	,
22.17	,	,
3.25	,	,
4.94	,	,
5.44	,	,
4.33	,	,
6.45	,	,
2.85	,	,
4.47	,	,
5.51	,	,
5.48	,	,
6.27	,	,



hastano	grup	cins	yas	ağırlık	boy	wforh	splekmi	hemogln	beyazkr
45	kontrol	K	60.0	25.5	117	119.70	normal	12.6	14,600
46	kontrol	E	36.0	15.0	96	101.00	normal	11.9	5,600
47	kontrol	E	18.0	9.7	78	90.60	normal	12.0	9,100
48	kontrol	E	14.0	10.0	74	90.20	normal	11.3	5,900
49	kontrol	K	18.0	11.5	84	96.60	normal	11.6	9,700
50	kontrol	K	36.0	14.0	95	100.00	normal	12.3	10,300



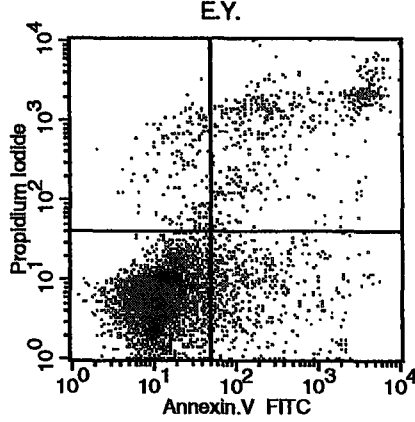
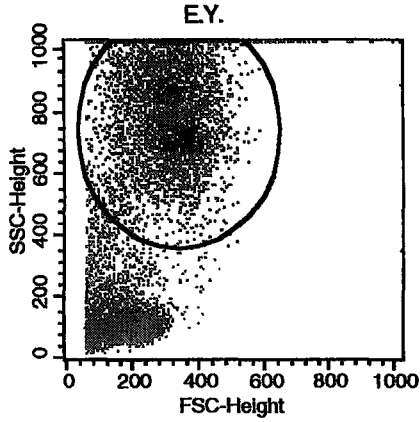
gran.sys	ast	alt	tbi	dbil	ferritin	ensys	p.o.ted	p.e.ted
8,760	26	22	.80	.20	60	1	1	0
2,240	40	36	.80	.40	11	2	0	0
4,550	47	40	.40	.20	12	0	,	,
1,770	18	22	.60	.40	23	0	0	0
2,522	46	40	.90	.30	30	0	0	0
5,150	50	38	.60	.20	16	2	2	0



apoptoz	dfobşlma	dfomiktr
4.84	,	,
33.44	,	,
10.80	,	,
3.78	,	,
8.92	,	,
26.30	,	,



Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

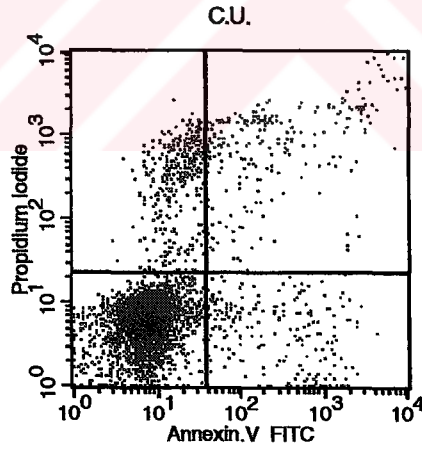
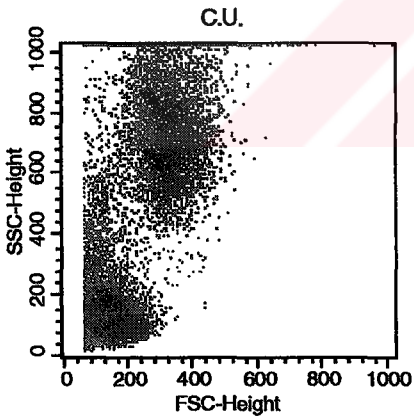
Tube: Annexin.V/PI

Region	Events	% Gated
R1	5281	52.81
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	2.99
UR	9.56
LL	77.03
LR	10.41

Sample No : 1

Erken Apoptotik Cells:% 10.4



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

Tube: Annexin.V/PI

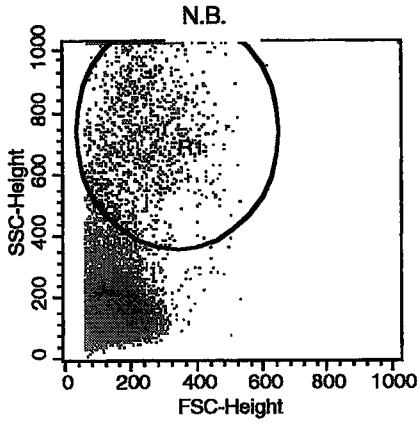
Region	Events	% Gated
R1	4894	48.94
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	7.27
UR	5.29
LL	82.84
LR	4.60

Sample No : 2

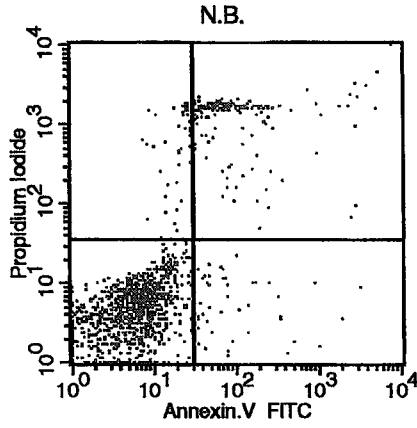
Erken Apoptotik Cells :% 4.6

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvari



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

Region	Events	% Gated
R1	1385	13.85
R2	10000	100.00

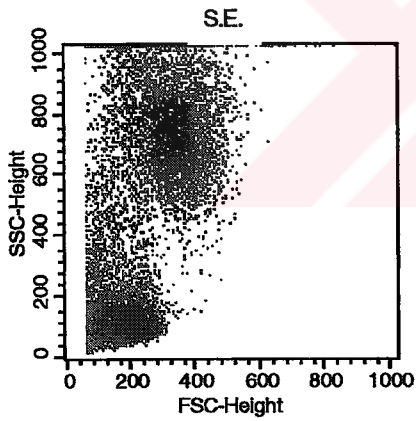


Tube: Annexin.V/PI

Quad	% Gated
UL	3.39
UR	13.36
LL	80.07
LR	3.18

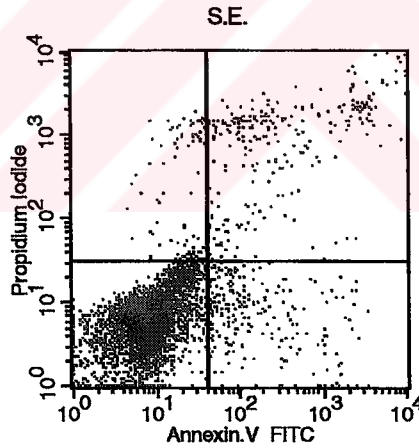
Sample No: 3

Erken Apoptotik Cells:% 3.2



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

Region	Events	% Gated
R1	5225	52.25
R2	10000	100.00



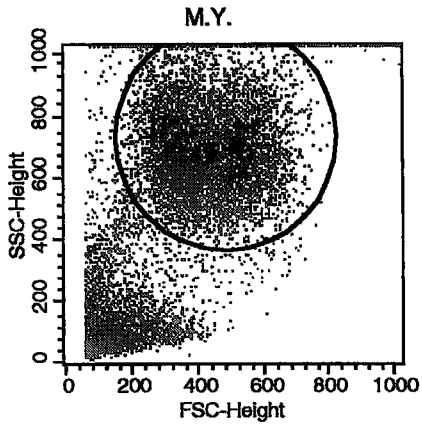
Tube: Annexin.V/PI

Quad	% Gated
UL	1.99
UR	5.19
LL	88.17
LR	4.65

Sample No: 4

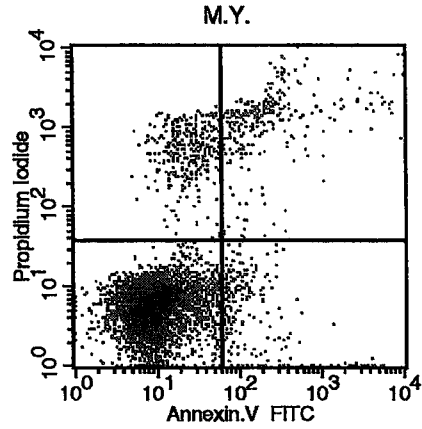
Erken Apoptotik Cells :% 4.7

Dokuz Eylul Universitesi Tıp Fakultesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvari



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

Region	Events	% Gated
R1	6549	65.49
R2	10000	100.00

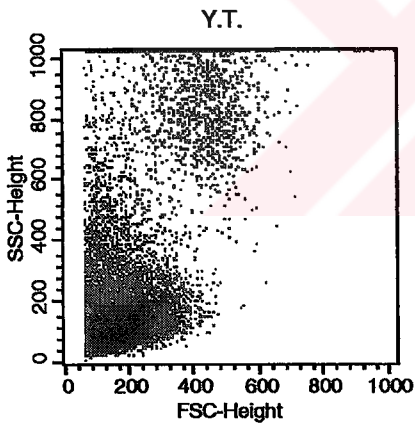


Tube: Annexin.V/PI

Quad	% Gated
UL	5.05
UR	4.60
LL	86.79
LR	3.56

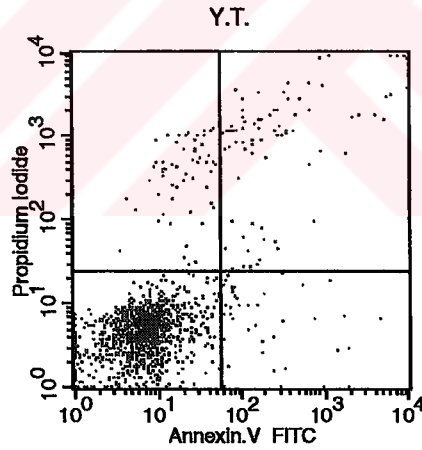
S a m p l e N o : 5

Erken Apoptotik Cells:% 3.6



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

Region	Events	% Gated
R1	1428	14.28
R2	10000	100.00



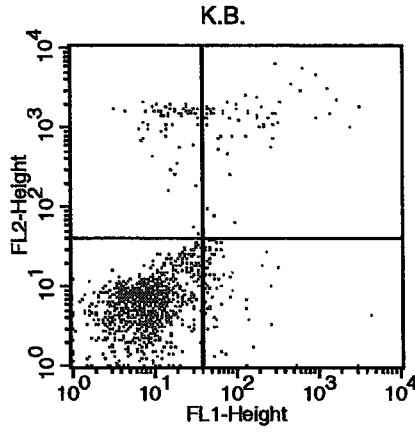
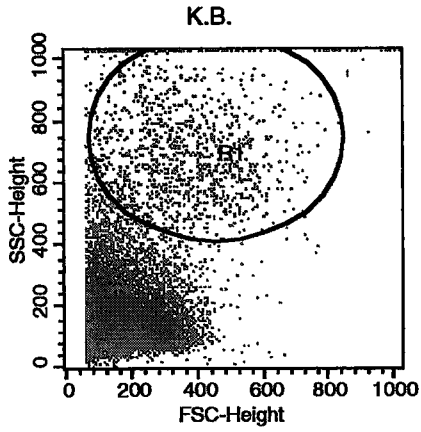
Tube: Annexin.V/PI

Quad	% Gated
UL	4.27
UR	5.88
LL	87.04
LR	2.80

S a m p l e N o : 6

Erken Apoptotik Cells :% 2.8

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvari



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

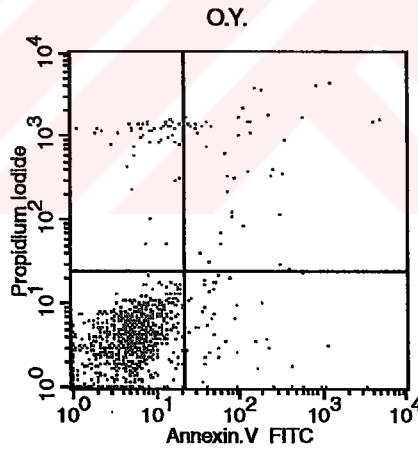
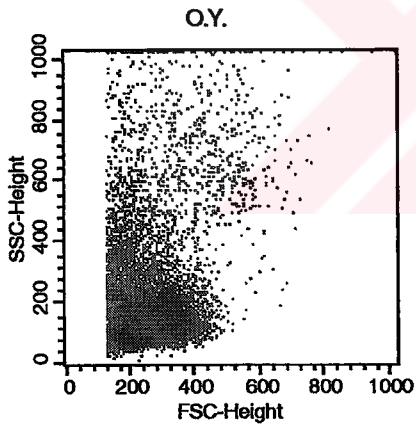
Tube: Annexin.V/PI

Region	Events	% Gated
R1	1165	11.65
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	5.49
UR	5.15
LL	83.43
LR	5.92

S a m p l e N o : 7

Erken Apoptotik Cells:% 5.9



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

Tube: Annexin.V/PI

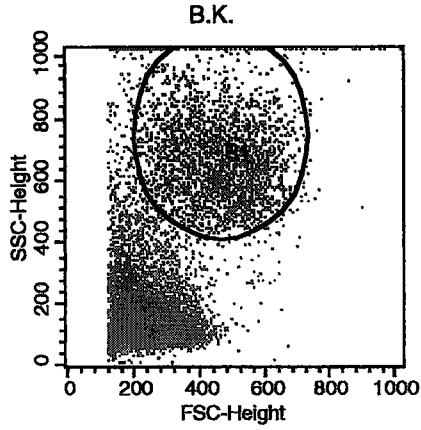
Region	Events	% Gated
R1	941	9.41
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	5.10
UR	4.78
LL	84.48
LR	5.63

S a m p l e N o : 8

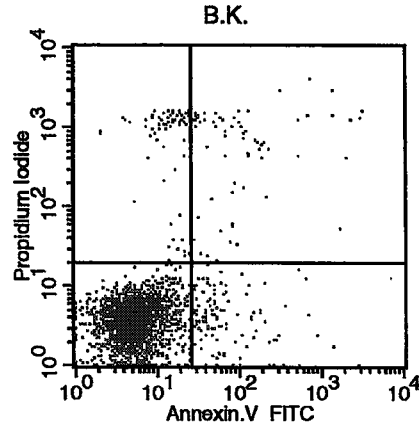
Erken Apoptotik Cells :% 5.6

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

Region	Events	% Gated
R1	2580	25.80
R2	10000	100.00

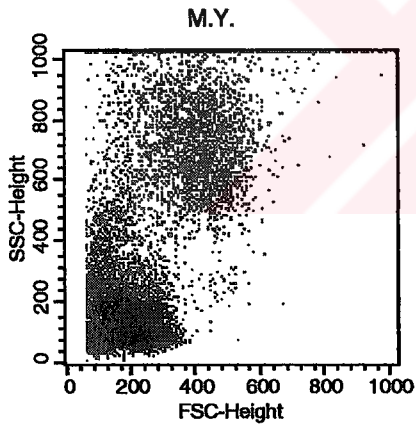


Tube: Annexin.V/PI

Quad	% Gated
UL	2.71
UR	2.75
LL	89.84
LR	4.69

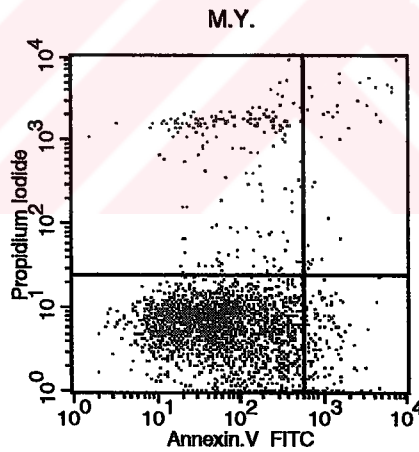
S a m p l e N o : 9

Erken Apoptotik Cells:% 4.7



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

Region	Events	% Gated
R1	2542	25.42
R2	10000	100.00



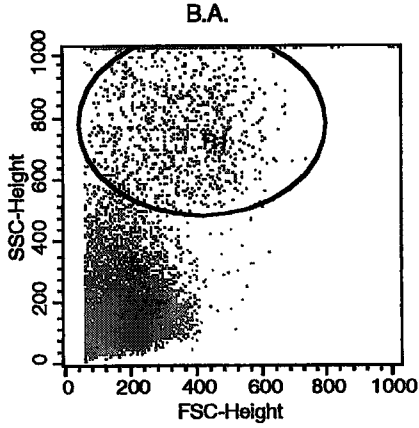
Tube: Annexin.V/PI

Quad	% Gated
UL	7.63
UR	1.42
LL	85.64
LR	5.31

S a m p l e N o : 10

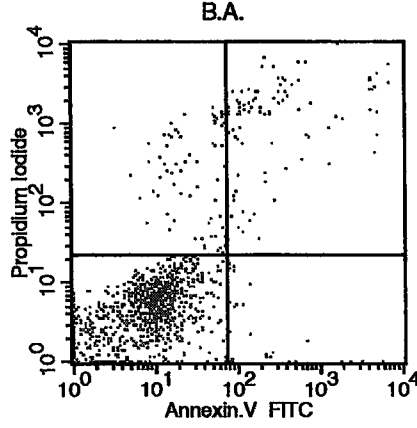
Erken Apoptotik Cells :% 5.3

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvari



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

Region	Events	% Gated
R1	1129	11.29
R2	10000	100.00

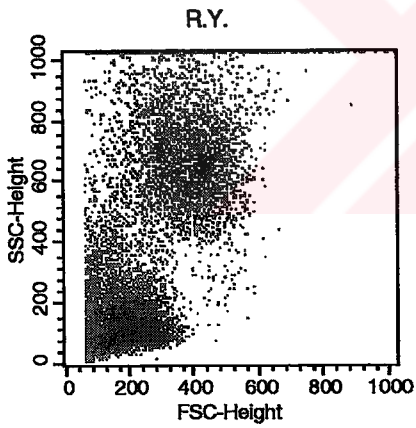


Tube: Annexin.V/PI

Quad	% Gated
UL	6.55
UR	7.88
LL	83.35
LR	2.21

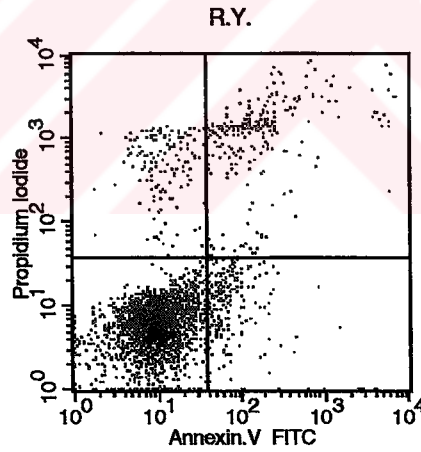
S a m p l e N o : 11

Erken Apoptotik Cells:% 2.2



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

Region	Events	% Gated
R1	3024	30.24
R2	10000	100.00



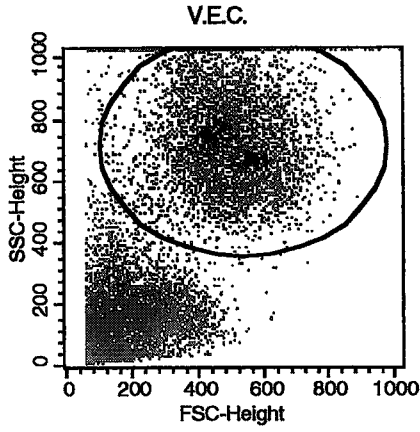
Tube: Annexin.V/PI

Quad	% Gated
UL	4.96
UR	8.76
LL	78.97
LR	7.31

S a m p l e N o : 12

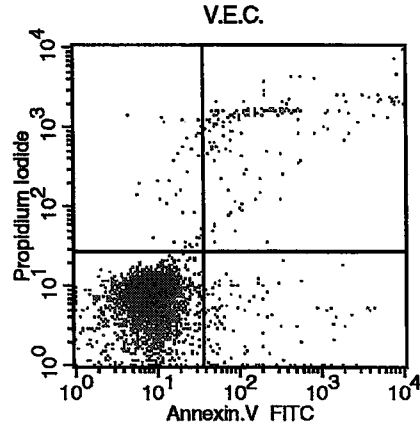
Erken Apoptotik Cells :% 2.7

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

Region	Events	% Gated
R1	4327	43.27
R2	10000	100.00

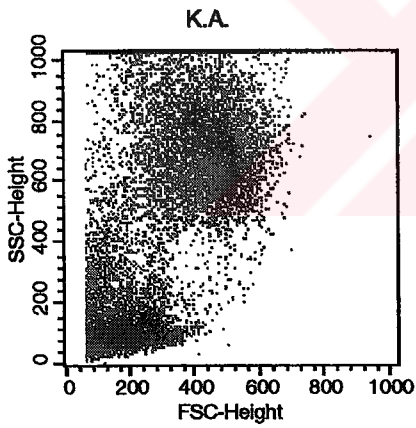


Tube: Annexin.V/PI

Quad	% Gated
UL	0.95
UR	3.88
LL	92.70
LR	2.47

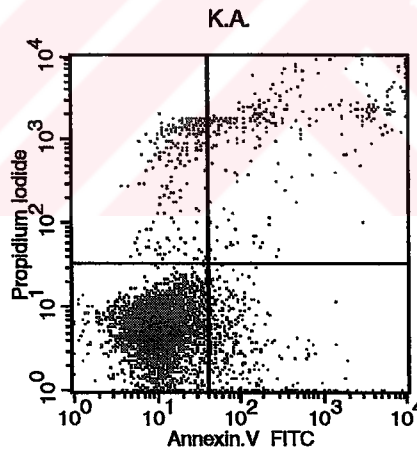
S a m p l e N o : 1 3

Erken Apoptotik Cells:% 2.5



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

Region	Events	% Gated
R1	5355	53.55
R2	10000	100.00



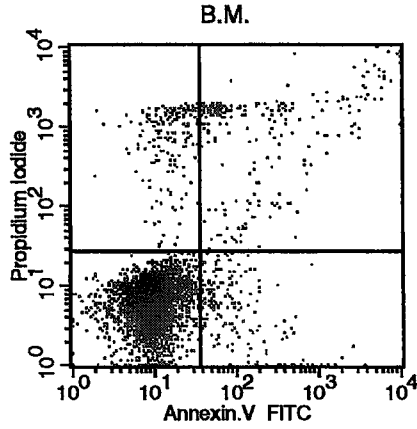
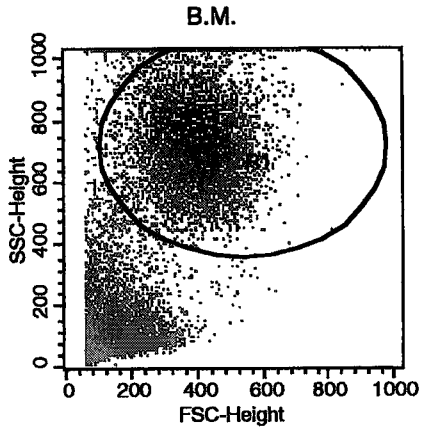
Tube: Annexin.V/PI

Quad	% Gated
UL	4.07
UR	5.28
LL	84.01
LR	6.63

S a m p l e N o : 1 4

Erken Apoptotik Cells :% 6.6

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvari



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Panel

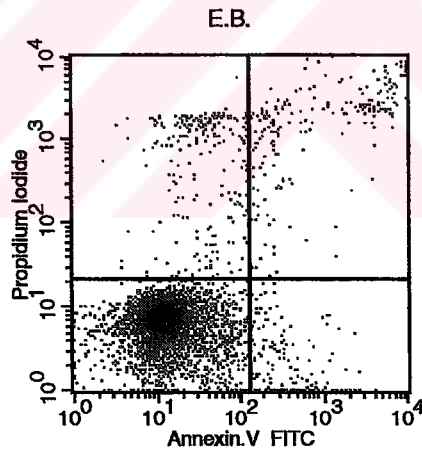
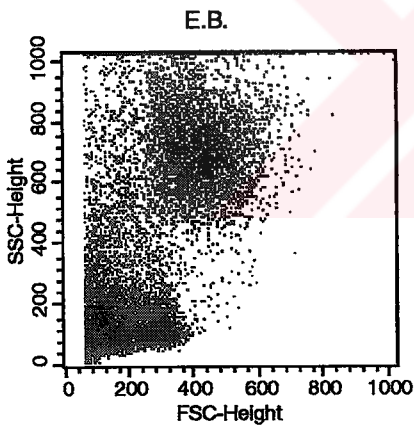
Tube: Annexin.V/PI

Region	Events	% Gated
R1	5515	55.15
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	3.41
UR	4.57
LL	88.70
LR	3.32

S a m p l e N o : 1 5

Erken Apoptotik Cells:% 3.3



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Panel

Tube: Annexin.V/PI

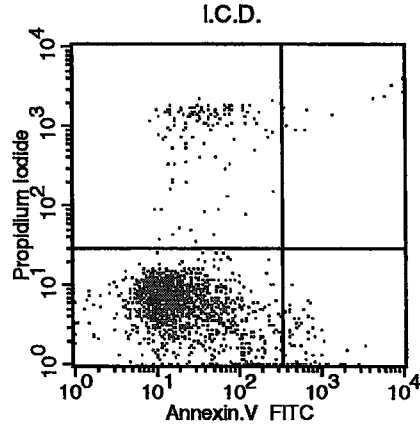
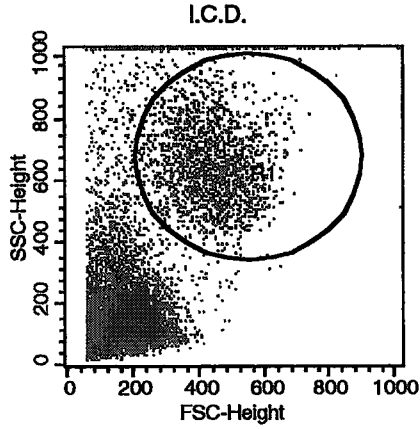
Region	Events	% Gated
R1	4295	42.95
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	5.68
UR	5.12
LL	85.54
LR	3.66

S a m p l e N o : 1 6

Erken Apoptotik Cells :% 3.7

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvari



Sample ID: PB.PNL
 Tube: Annexin.V/PI
 Panel: Apoptosis Paneli

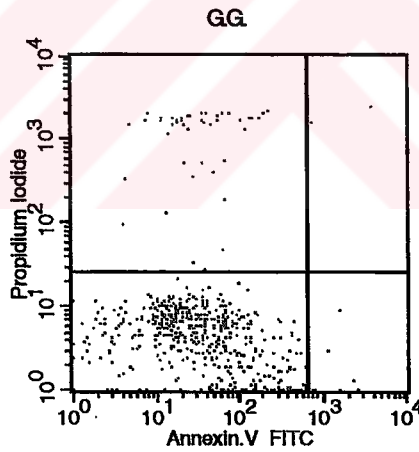
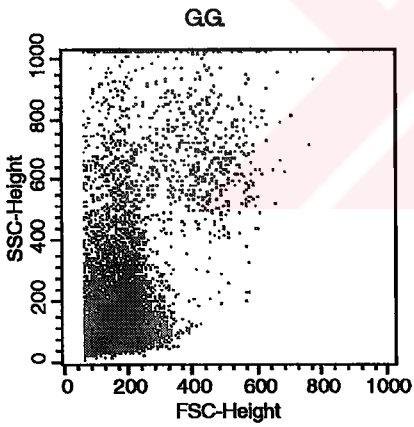
Tube: Annexin.V/PI

Region	Events	% Gated
R1	1753	17.53
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	7.30
UR	0.68
LL	88.19
LR	3.82

S a m p l e N o : 1 7

Erken Apoptotik Cells:% 3.8



Sample ID: PB.PNL
 Tube: Annexin.V/PI
 Panel: Apoptosis Paneli

Tube: Annexin.V/PI

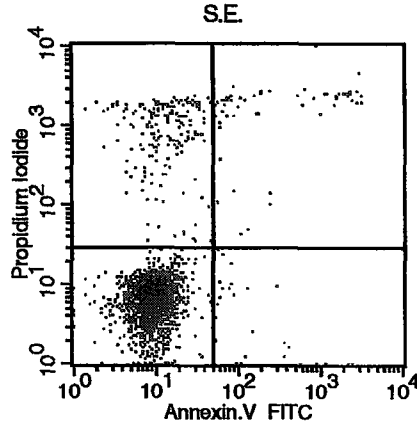
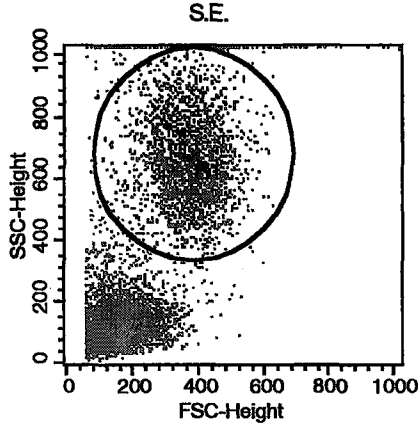
Region	Events	% Gated
R1	551	5.51
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	8.17
UR	0.36
LL	90.02
LR	1.45

S a m p l e N o : 1 8

Erken Apoptotik Cells :% 1.6

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvari



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

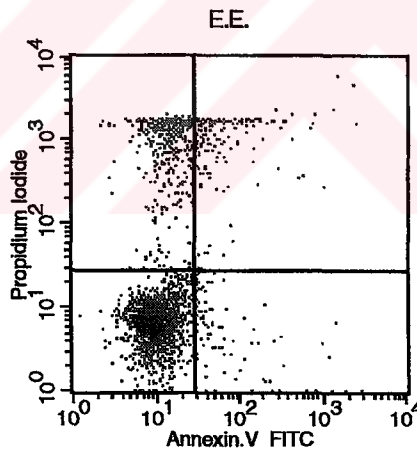
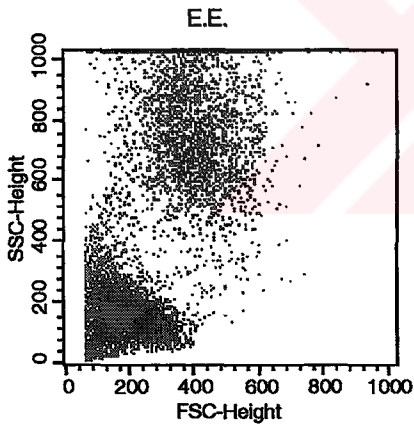
Tube: Annexin.V/PI

Region	Events	% Gated
R1	2246	22.46
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	8.64
UR	2.76
LL	87.40
LR	1.20

Sample No : 19

Erken Apoptotik Cells:% 1.2



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

Tube: Annexin.V/PI

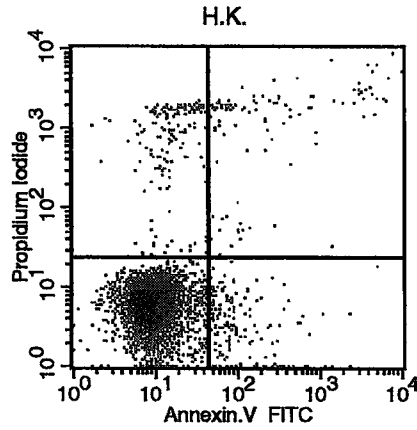
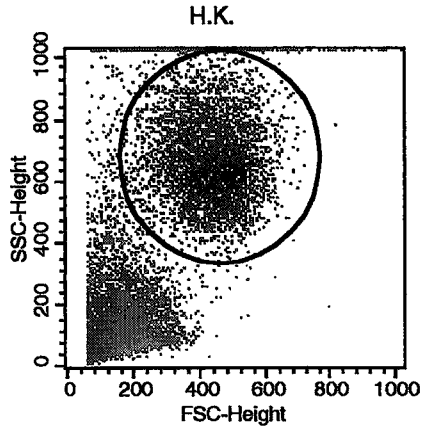
Region	Events	% Gated
R1	2227	22.27
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	18.10
UR	7.90
LL	69.60
LR	4.40

Sample No : 20

Erken Apoptotik Cells :% 4.4

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvari



Sample ID: PB.PNL

Tube: Annexin.V/PI

Panel: Apoptosis Paneli

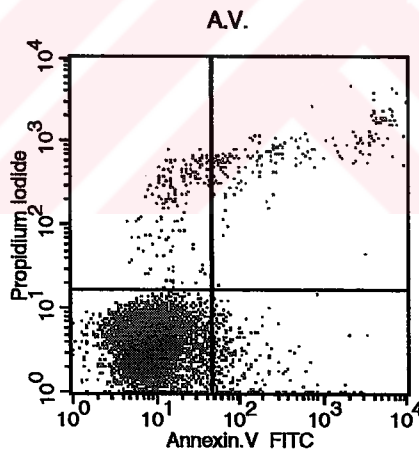
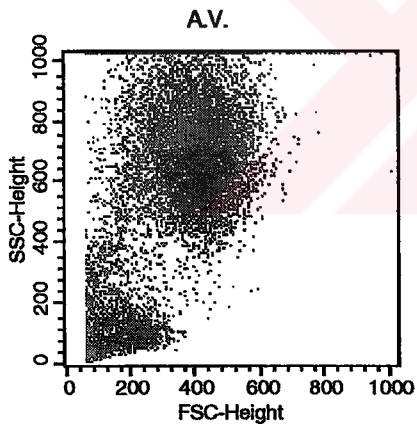
Tube: Annexin.V/PI

Region	Events	% Gated
R1	4597	45.97
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	3.55
UR	2.46
LL	90.19
LR	3.81

S a m p l e N o : 2 1

Erken Apoptotik Cells:% 3.8



Sample ID: PB.PNL

Tube: Annexin.V/PI

Panel: Apoptosis Paneli

Tube: Annexin.V/PI

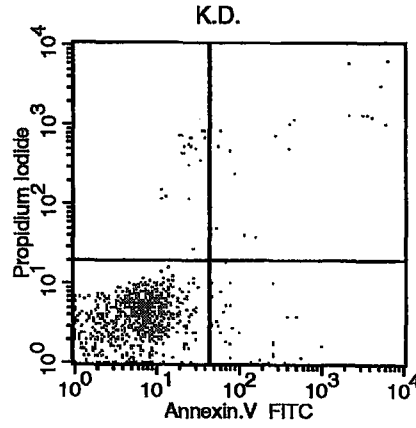
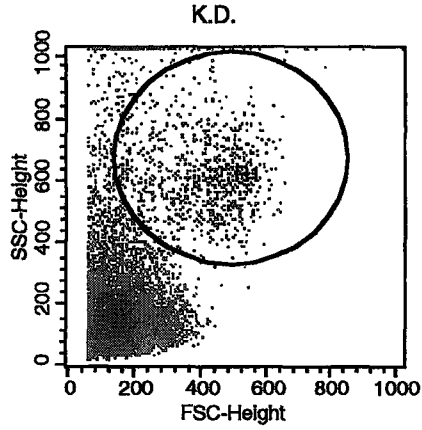
Region	Events	% Gated
R1	6884	68.84
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	2.44
UR	2.99
LL	90.80
LR	3.76

S a m p l e N o : 2 2

Erken Apoptotik Cells :% 3.9

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvari



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

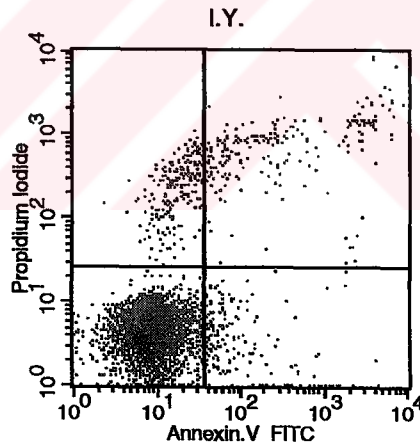
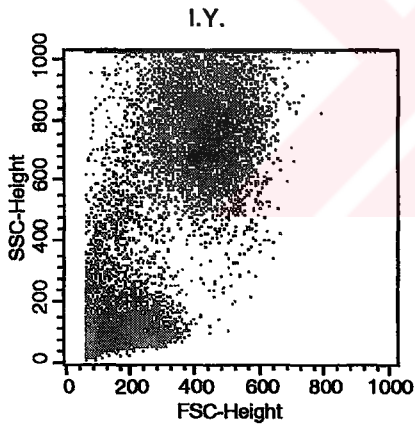
Tube: Annexin.V/PI

Region	Events	% Gated
R1	854	8.54
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	2.34
UR	2.46
LL	91.33
LR	3.86

Sample No : 23

Erken Apoptotik Cells:% 3.8



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

Tube: Annexin.V/PI

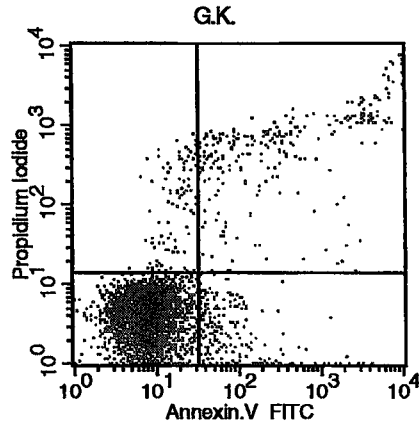
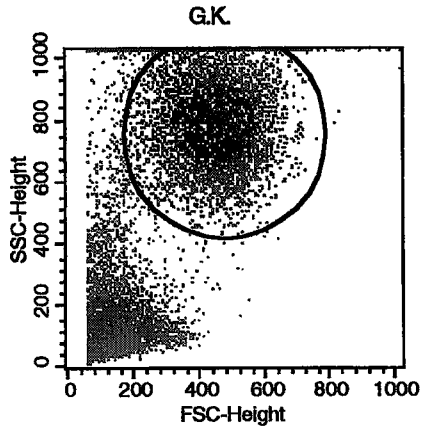
Region	Events	% Gated
R1	5189	51.89
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	4.20
UR	4.51
LL	87.72
LR	3.57

Sample No : 24

Erken Apoptotik Cells :% 3.6

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Panel

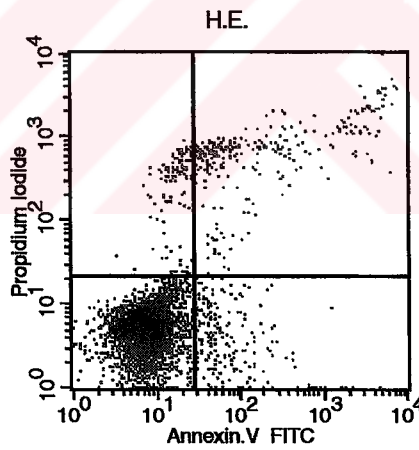
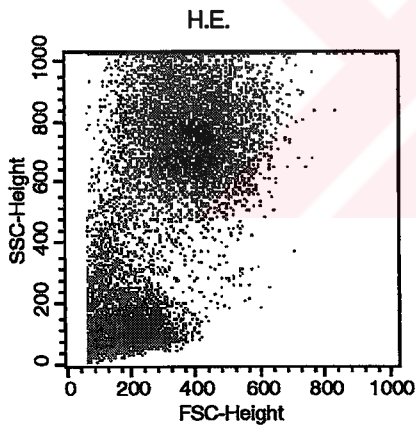
Tube: Annexin.V/PI

Region	Events	% Gated
R1	4896	48.96
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	1.98
UR	5.45
LL	88.11
LR	4.45

Sample No : 25

Erken Apoptotik Cells:% 4.4



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Panel

Tube: Annexin.V/PI

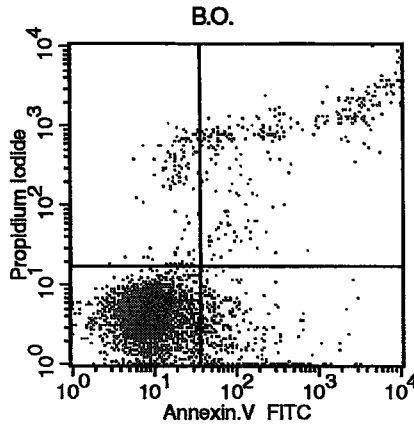
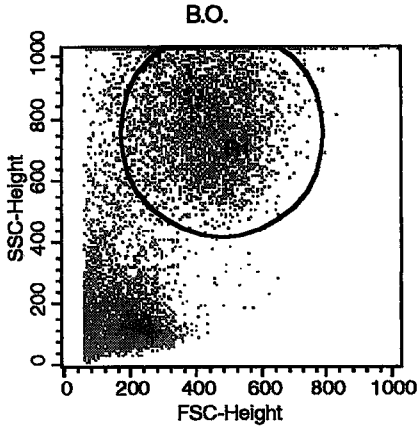
Region	Events	% Gated
R1	4900	49.00
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	2.82
UR	6.18
LL	86.73
LR	4.27

Sample No : 26

Erken Apoptotik Cells :% 4.2

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvari



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

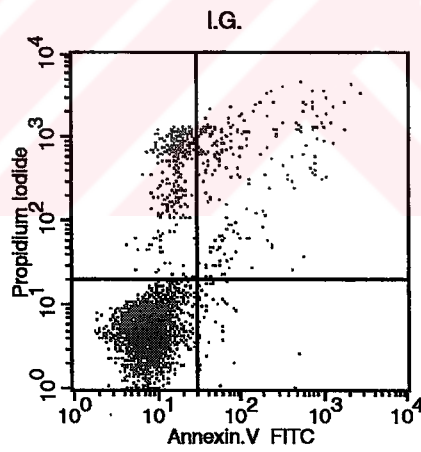
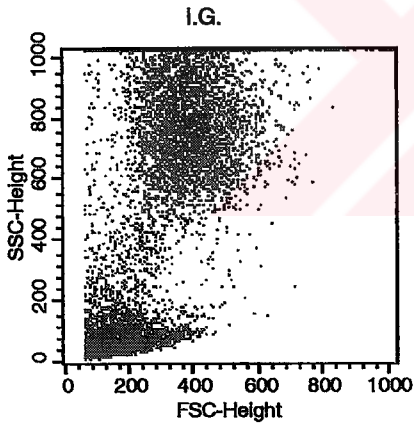
Tube: Annexin.V/PI

Region	Events	% Gated
R1	3879	47.54
R2	8160	100.00

Quad	% Gated
UL	2.66
UR	6.93
LL	82.21
LR	8.20

S a m p l e N o : 27

Erken Apoptotik Cells:% 8.2



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

Tube: Annexin.V/PI

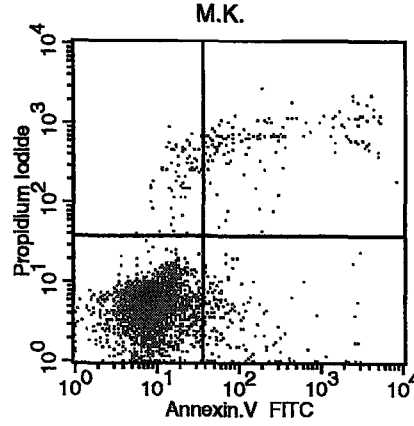
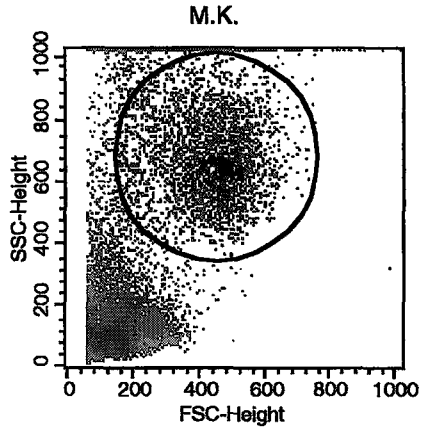
Region	Events	% Gated
R1	3762	45.93
R2	8190	100.00

Quad	% Gated
UL	8.40
UR	6.17
LL	84.24
LR	1.20

S a m p l e N o : 28

Erken Apoptotik Cells :%1.2

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvari



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

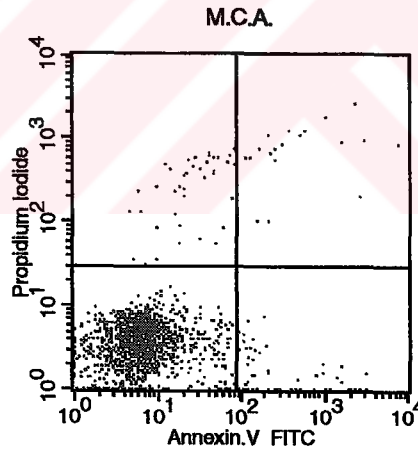
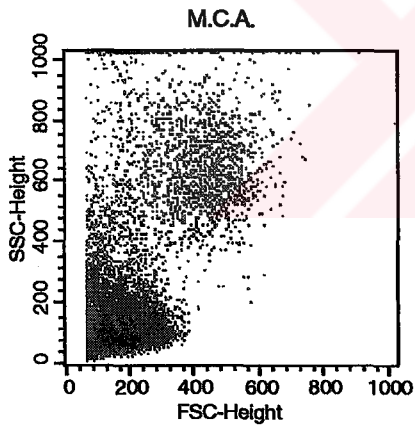
Tube: Annexin.V/PI

Region	Events	% Gated
R1	3129	31.29
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	2.21
UR	4.63
LL	87.92
LR	5.24

S a m p l e N o : 29

Erken Apoptotik Cells:% 5.2



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

Tube: Annexin.V/PI

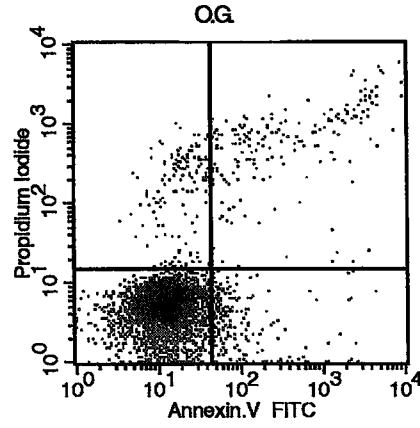
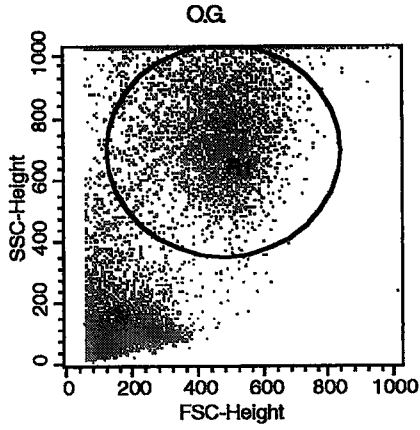
Region	Events	% Gated
R1	1496	14.96
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	2.74
UR	1.34
LL	92.05
LR	3.88

S a m p l e N o : 38

Erken Apoptotik Cells :% 3.8

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvari



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Panel1

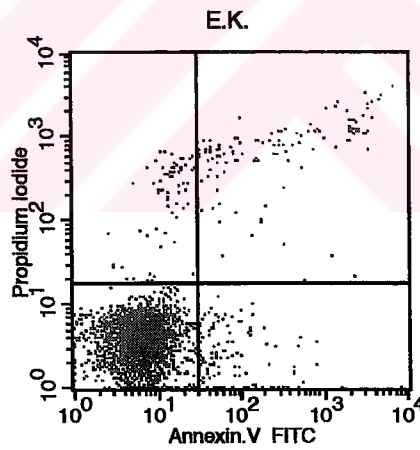
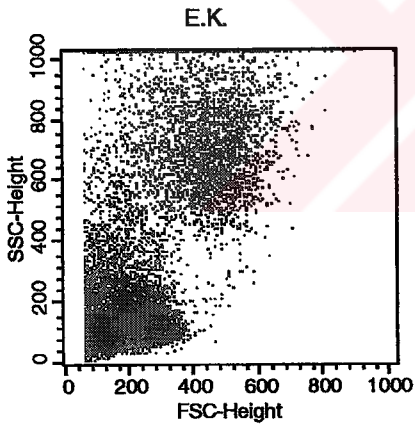
Tube: Annexin.V/PI

Region	Events	% Gated
R1	3818	45.29
R2	8430	100.00

Quad	% Gated
UL	4.06
UR	4.98
LL	84.94
LR	6.02

S a m p l e N o : 31

Erken Apoptotik Cells:% 6.0



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Panel1

Tube: Annexin.V/PI

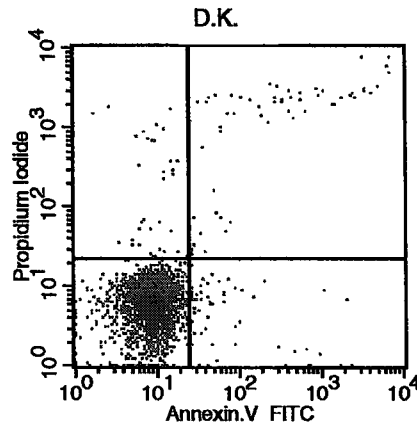
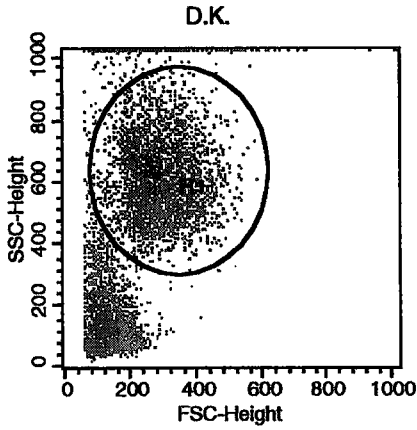
Region	Events	% Gated
R1	2887	28.87
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	2.60
UR	4.23
LL	88.71
LR	4.47

S a m p l e N o : 32

Erken Apoptotik Cells :% 4.4

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvari



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

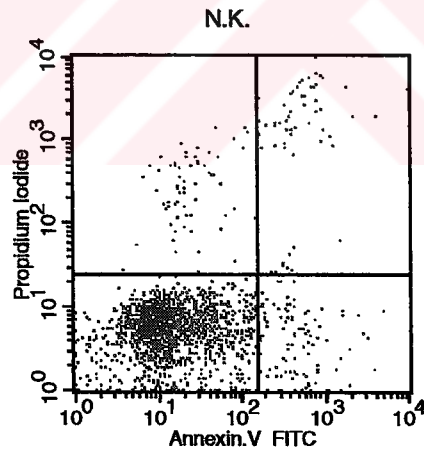
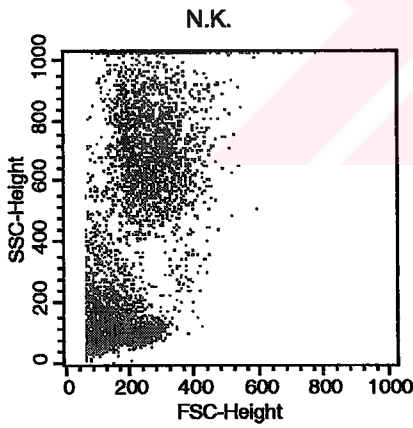
Tube: Annexin.V/PI

Region	Events	% Gated
R1	2898	57.96
R2	5000	100.00

Quad	% Gated
UL	1.31
UR	2.04
LL	94.51
LR	2.14

S a m p l e N o : 33

Erken Apoptotik Cells:% 2.1



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

Tube: Annexin.V/PI

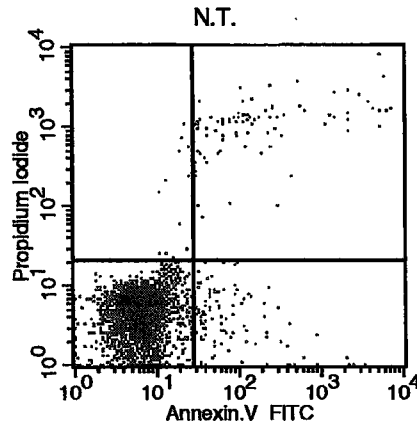
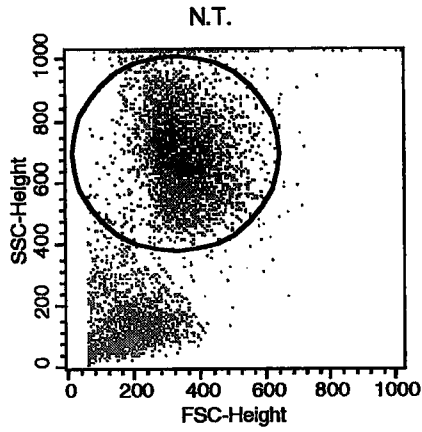
Region	Events	% Gated
R1	2008	40.16
R2	5000	100.00

Quad	% Gated
UL	3.14
UR	2.94
LL	88.60
LR	5.33

S a m p l e N o : 34

Erken Apoptotik Cells :% 5.3

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvari



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Panel

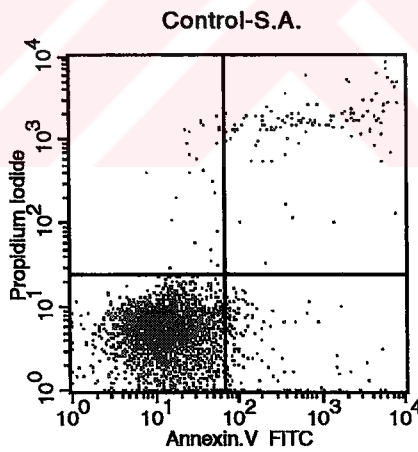
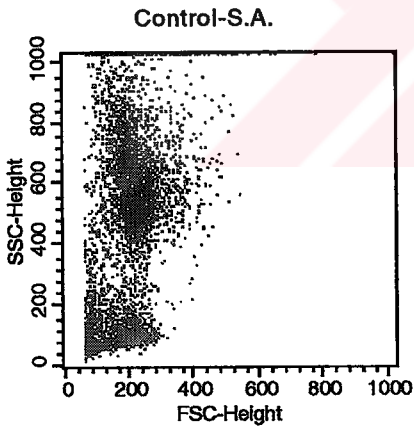
Tube: Annexin.V/PI

Region	Events	% Gated
R1	3197	63.94
R2	5000	100.00

Quad	% Gated
UL	0.44
UR	2.69
LL	93.62
LR	3.25

Sample No : 35

Erken Apoptotik Cells:% 3.3



Sample ID: PB.PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Panel

Tube: Annexin.V/PI

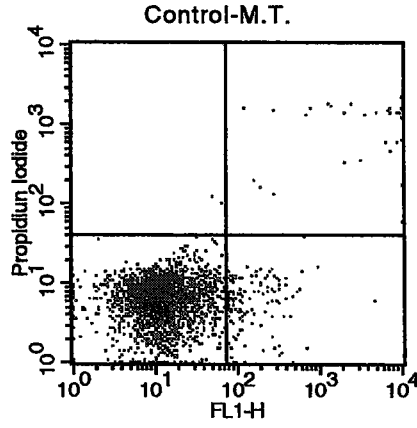
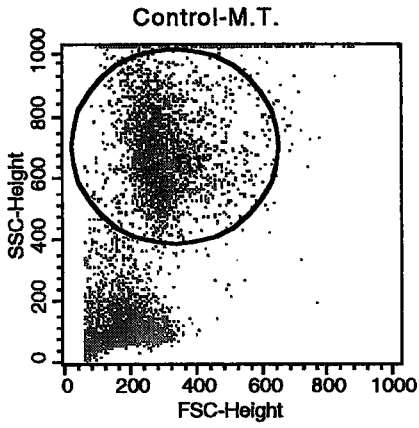
Region	Events	% Gated
R1	3077	61.54
R2	5000	100.00

Quad	% Gated
UL	0.91
UR	3.77
LL	90.87
LR	4.65

Sample No : 36

Erken Apoptotik Cells :% 4.7

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: PB.PNL

Tube: PI

Panel: Apoptosis Paneli

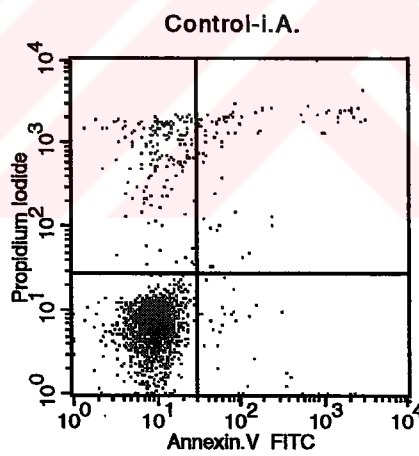
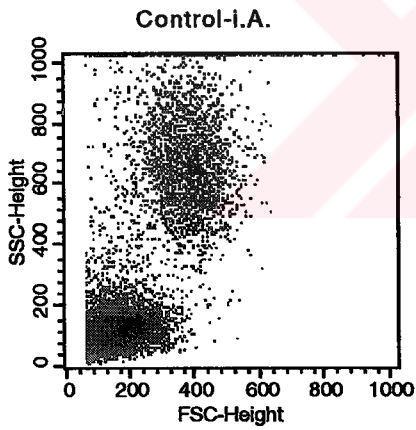
Region	Events	% Gated
R1	2542	50.84
R2	5000	100.00

Tube: PI

Quad	% Gated
UL	0.08
UR	1.18
LL	93.43
LR	5.31

S a m p l e N o : 37

Erken Apoptotik Cells:% 5.3



Sample ID: PB.PNL

Tube: Annexin.V/PI

Panel: Apoptosis Paneli

Region	Events	% Gated
R1	2214	22.14
R2	10000	100.00

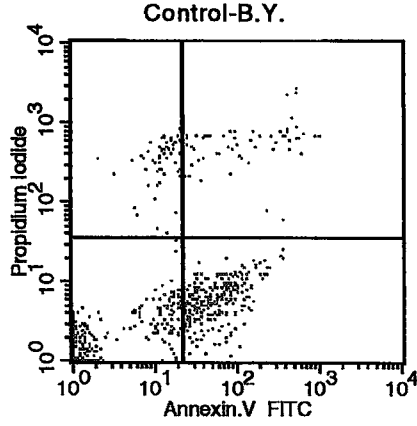
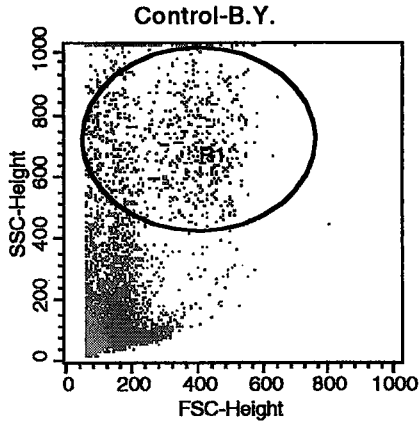
Tube: Annexin.V/PI

Quad	% Gated
UL	7.59
UR	3.79
LL	87.04
LR	1.58

S a m p l e N o : 38

Erken Apoptotik Cells :% 1.6

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvari



Sample ID: PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

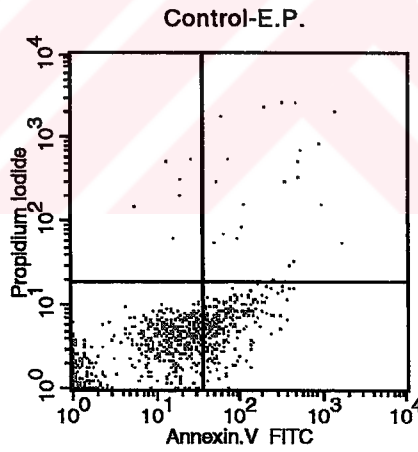
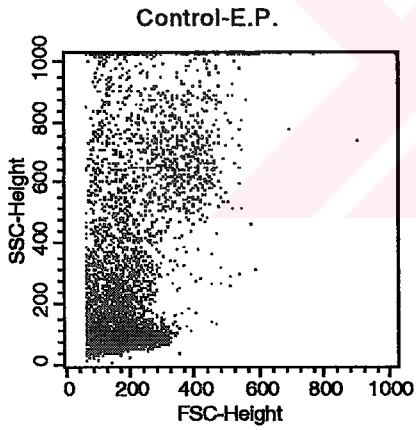
Tube: Annexin.V/PI

Region	Events	% Gated
R1	778	15.56
R2	5000	100.00

Quad	% Gated
UL	7.58
UR	7.97
LL	51.16
LR	33.29

S a m p l e N o : 39

Erken Apoptotik Cells:% 33.3



Sample ID: PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

Tube: Annexin.V/PI

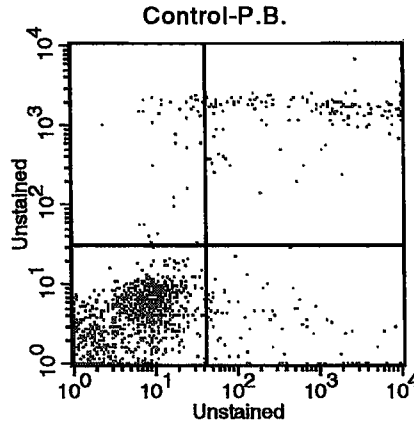
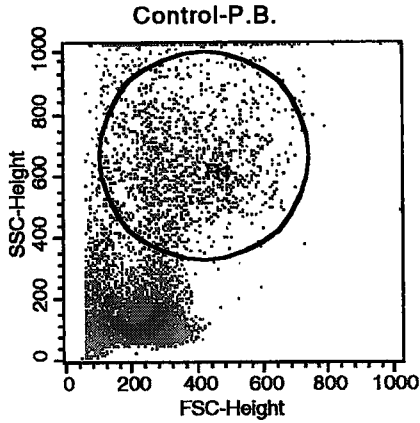
Region	Events	% Gated
R1	939	18.78
R2	5000	100.00

Quad	% Gated
UL	0.75
UR	2.34
LL	71.25
LR	25.67

S a m p l e N o : 48

Erken Apoptotik Cells :% 26.3

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvari



Sample ID: PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

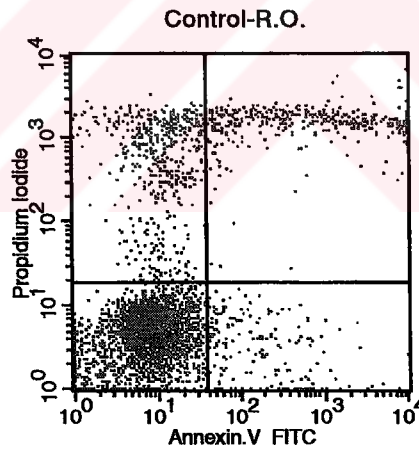
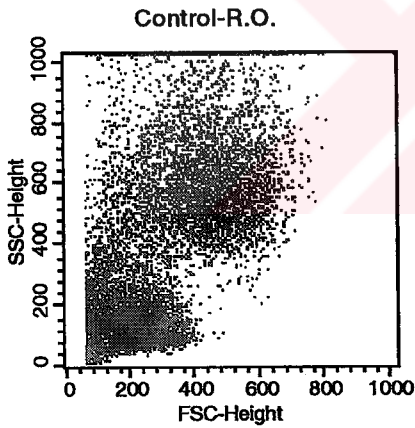
Tube: Annexin.V/PI

Region	Events	% Gated
R1	1326	20.18
R2	6570	100.00

Quad	% Gated
UL	2.71
UR	11.84
LL	79.26
LR	6.18

S a m p l e N o : 4 1

Erken Apoptotik Cells:% 6.2



Sample ID: PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

Tube: Annexin.V/PI

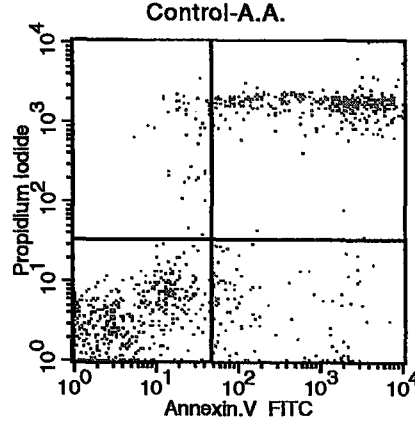
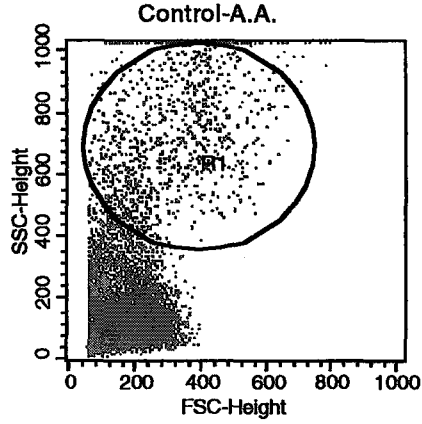
Region	Events	% Gated
R1	3933	39.33
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	13.07
UR	10.48
LL	71.70
LR	4.75

S a m p l e N o : 4 2

Erken Apoptotik Cells :% 4.8

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvari



Sample ID: PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Panel1

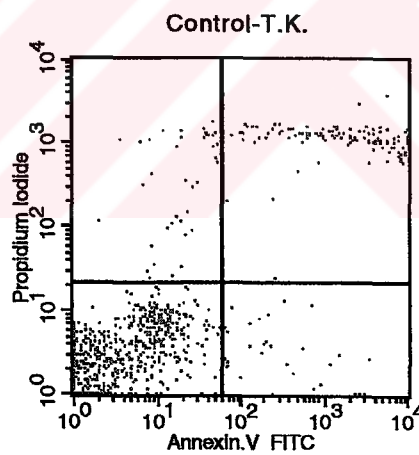
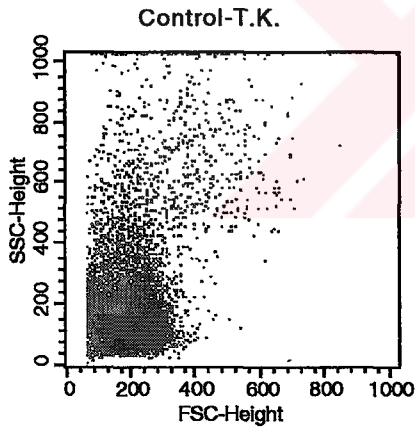
Tube: Annexin.V/PI

Region	Events	% Gated
R1	996	9.96
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	4.62
UR	35.64
LL	48.90
LR	10.84

S a m p l e N o : 4 3

Erken Apoptotik Cells:% 10.8



Sample ID: PNL
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Panel1

Tube: Annexin.V/PI

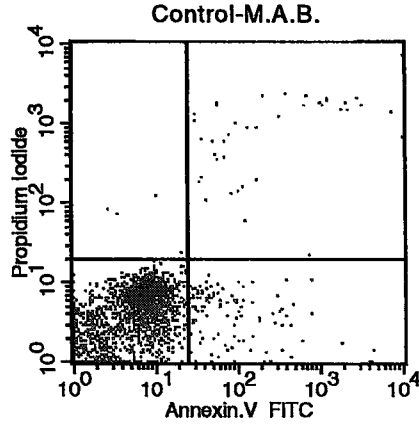
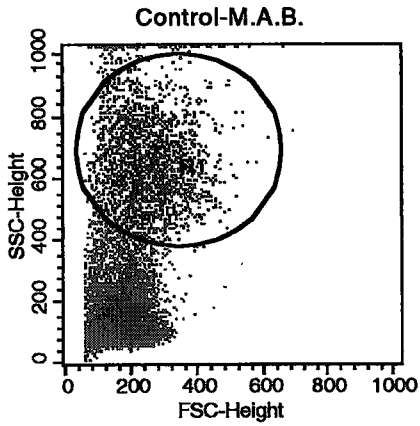
Region	Events	% Gated
R1	806	8.06
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	4.84
UR	14.89
LL	76.55
LR	3.72

S a m p l e N o : 4 4

Erken Apoptotik Cells :% 3.7

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvarı



Sample ID: P.N.L.
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

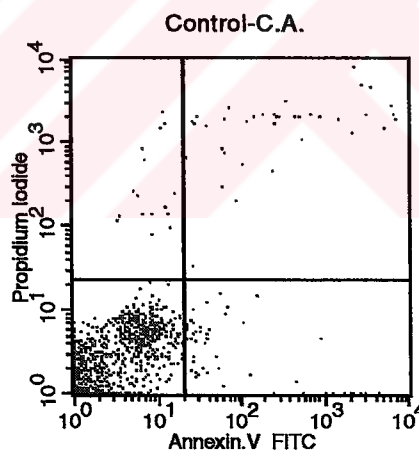
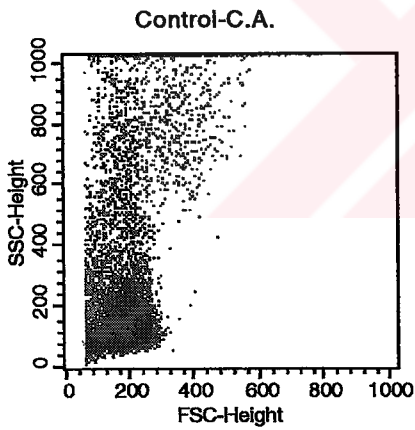
Tube: Annexin.V/PI

Region	Events	% Gated
R1	2106	21.06
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	0.28
UR	1.90
LL	92.45
LR	5.37

S a m p l e N o : 4 5

Erken Apoptotik Cells:% 5.4



Sample ID: P.N.L.
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Paneli

Tube: Annexin.V/PI

Region	Events	% Gated
R1	1141	11.41
R2	10000	100.00

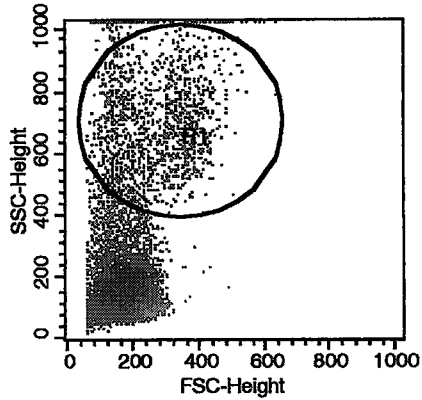
Quad	% Gated
UL	1.40
UR	3.33
LL	90.89
LR	4.38

S a m p l e N o : 4 6

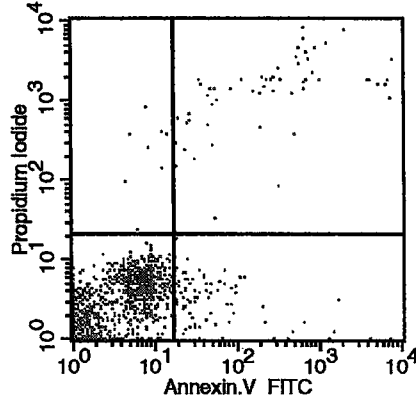
Erken Apoptotik Cells :% 4.3

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvari

Control-A.K.



Control-A.K.



Sample ID: P.N.L.

Tube: Annexin.V/PI

Panel: Apoptosis Panel

Tube: Annexin.V/PI

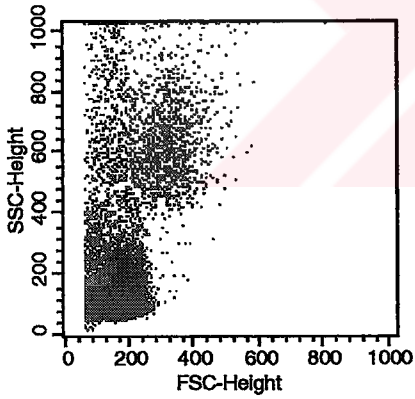
Region	Events	% Gated
R1	1292	12.92
R2	10000	100.00

Quad	% Gated
UL	0.70
UR	4.41
LL	88.54
LR	6.35

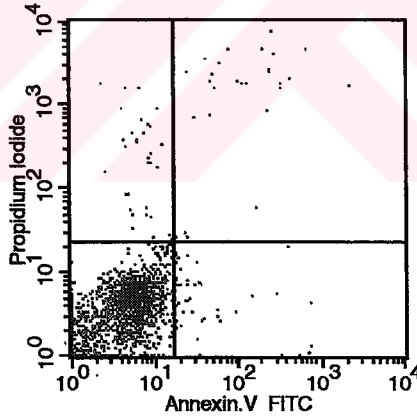
Sample No : 47

Erken Apoptotik Cells:% 6.4

Control-U.A.



Control-U.A.



Sample ID: P.N.L.

Tube: Annexin.V/PI

Panel: Apoptosis Panel

Tube: Annexin.V/PI

Region	Events	% Gated
R1	1686	16.86
R2	10000	100.00

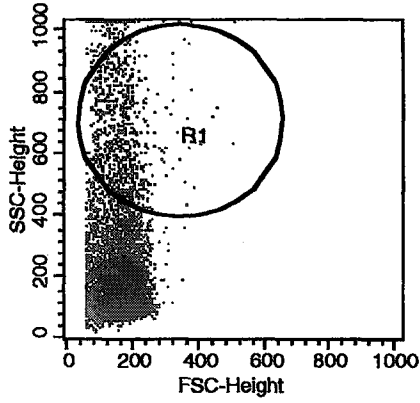
Quad	% Gated
UL	1.96
UR	1.72
LL	93.65
LR	2.67

Sample No : 48

Erken Apoptotik Cells :% 2.8

Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
Hematoloji - Onkoloji Laboratuvari

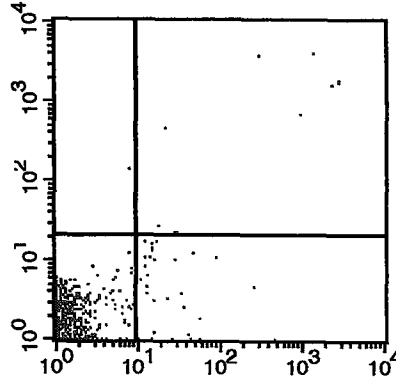
Control-O.A.



Sample ID: P.N.L.
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Panel

Region	Events	% Gated
R1	728	7.28
R2	10000	100.00

Control-O.A.



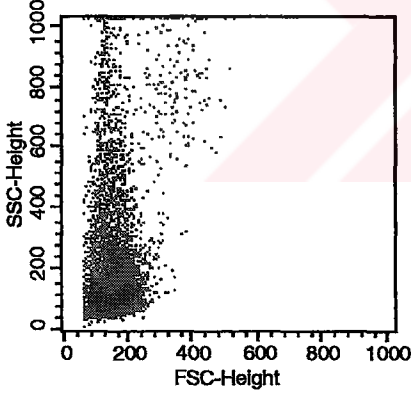
Tube: Annexin.V/PI

Quad	% Gated
UL	0.14
UR	1.37
LL	93.96
LR	4.53

S a m p l e N o : 4 9

Erken Apoptotik Cells:% 4.5

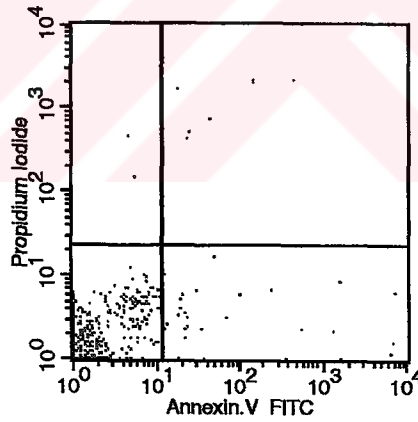
Control-M.Y.



Sample ID: P.N.L.
Tube: Annexin.V/PI
Panel: Apoptosis Panel

Region	Events	% Gated
R1	557	5.57
R2	10000	100.00

Control-M.Y.



Tube: Annexin.V/PI

Quad	% Gated
UL	0.36
UR	1.26
LL	92.82
LR	5.57

S a m p l e N o : 5 0

Erken Apoptotik Cells :% 5.5

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**