

T1393



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

+
**ÇOCUKLUK ÇAĞININ LENFOPROLİFERATİF
MALİGNİTELERİNDE sFas/sFasL DÜZEYİ VE
KLİNİK SEYİR İLE İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Zafer BERBER

T1393 /1-1

Tez Danışmanı : Doç.Dr. Volkan HAZAR

"Tezimden Kaynakça Gösterilerek Faydalanılabilir"

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ KÜTÜPHANESİ

"Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonunca 20.01.0103.13 Proje No İle Desteklenmiştir"

Antalya, 2001

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II. GENEL BİLGİLER.....	2-22
1 Apoptozisin tanımı ve tarihçesi.....	2
2 Apoptozisin fizyolojik ve patolojik olaylardaki yeri.....	3-4
3 Apoptozisin morfolojisi.....	4
4 Apoptozisin mekanizması.....	5
5 Apoptozis ve nekrozisin farkları.....	6
6 Apoptozisin tetikleyici ve inhibitörleri ile hücre içi sinyal iletimi.....	6-10
7 Apoptozisde Fas/FasL ara yolu ve patolojideki rolü.....	10-13
8 Fas/FasL ara yolunun moleküler mekanizması.....	13-15
9 Tetiklenmiş hücre ölümü aktivasyonunda Fas ligandının rolü.....	15-16
10 Sitotoksik T hücrelerinin hedef hücreyi yok etmede Fas/FasL rolü.....	16-19
11 Fas/FasL ara yolunun uygunsuz aktivitesi ile ilişkili patolojiler.....	19-20
12 DNA hasarı ve diğer hücresele lezyonlarda Fas sunumu.....	20-21
13 Apoptozis ve kanser.....	21-22
III. OLGULAR VE YÖNTEMLER.....	23
1. Olgular.....	23
2. Kan ve doku örneklerinin alınması.....	23-24
3. Örneklerin çalışılması.....	25-28
4. sFas ligand Kiti.....	28-30
5. sFas Kiti.....	30-32
6. ROCHE/HitachiCRP Kiti.....	32
7. Kemik iliği ve doku biyopsilerinin patolojik değerlendirilmesi.....	32-34
IV. BULGULAR.....	35
1. sFas serum düzeyleri.....	35-39
2. sFasL serum düzeyleri.....	39-43
3. sFas ile CRP arasındaki ilişki.....	43-44
4. sFasL ile CRP arasındaki ilişki.....	44-45
5. ALL grubunun tanı zamanındaki sFas-beyaz küre ilişkisi.....	46
6. ALL grubunun tanı zamanındaki sFasL-beyaz küre ilişkisi.....	46
7. sFas/sFasL sunumu ile sağkalım hızı arasındaki ilişki.....	47-48
8. Kemik iliği ve doku örneklerinde Fas/FasL sunumu.....	48-52
V. TARTIŞMA.....	53-57
VI. SONUÇLAR.....	58-60
VII. ÖZET.....	61-62
VIII. KAYNAKLAR.....	63-73

KISALTMALAR

Ab	Antibody
Ag	Antigen
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
Ara-C	Cytarabine
ALPS	Autoimmune lymphoproliferative syndrome
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CRP	C-reactive protein
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Edetate calcium-disodium
GLD	General Lymphoproliferative disorders
HIV	Human immunodeficiency virus
HRG	High risk group
IL	Interleukin
KC	Karaciğer
k.Da	Kilo dalton
LDH	Lactate dehydrogenase
LPR	Lymphoproliferative reaction
MCH	Major histocompatibility antigen
MRG	Medium risk group
NK	Natural killer
RNA	Ribonucleic acid
SLE	Systemic lupus erythematosus
SRG	Standard risk group
TGF	Transformin growth factor

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Tümör hücrelerinin kemoterapiye duyarlı oluş ya da direnç geliştirme mekanizmaları kısmen anlaşılmıştır. Kemosensitif lösemi ve solid tümörlerde, kemoteröpetik ajanların apoptozisi uyardıkları gösterilmiştir (1). Tümör nekrozis faktör reseptör (TNFR) süper ailesinde yer alan Fas'ın (CD95/Apo-1), Fas Ligandı (FasL) ya da spesifik antikörlerle uyarıldığı zaman apoptozis oluşturabilmektedir (2). Fas'ın, solubl formu (sFas) bulunmakta ve Fas molekülünün transmembran protein kısmından ayrılmasıyla oluşmaktadır (3). sFas formunun FasL aracılı apoptozisi bloke ettiği gösterilmiştir (4). Fas/Fas ligand ilişkisi, tümör hücrelerine karşı hücreölürmede önemli rol oynar. FasL, intrastoplazmik ve ekstrasellüler kısımlar içeren transmembran (tm-FasL) bir proteindir. Fas-L'nin ekstrasellüler kısmının, Zn^{+2} bağımlı bir metalloproteinaz tarafından ana yapıdan koparılıp ekstrasellüler ortama dökülmesiyle solubl FasL (sFasL) oluşur. Hem sFasL hem de tm-FasL, Fas ile birleşip apoptozisi indükleyebilir. Fas, vücutta bir çok hücre yüzeyinde (T hücreleri dahil) sunulurken, FasL'nin sadece aktive T hücrelerinde, makrofajlarda, endotel hücrelerinde ve immün ayrıcalıklı hücrelerde (testis, göz, beyin, plasenta), hücre yüzeyinde sunuldukları gösterilmiştir (5). Son zamanlarda bazı tümörlerin FasL sundukları, sitotoksitede rol oynayan ve Fas Ag'i taşıyan hücrelerde apoptozisi uyararak, immün denetimden kaçtıkları yayınlanmıştır (6).

Bu çalışma ile "çocukluk çağı lenfoid malignitelerinde serumda sFasL yüksekliği agresif klinik seyire neden olur" hipotezine yanıt aranmıştır.

II. GENEL BİLGİLER

1-Apoptozisin Tanımı ve Tarihçesi

Apoptozis (fizyolojik hücre ölümü ya da programlanmış hücre ölümü), organizmada fizyolojik koşullarda pek çok sistemin homeostazını sağlayan önemli ve önemli olduğu kadar da ilginç bir mekanizmadır. Hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri programlı, aktif RNA/protein sentezine ve enerjiye ihtiyaç gösteren bu fizyolojik ölüm formu, patolojik bir hücre ölüm formu olan nekrozisten tamamen farklıdır. İlk olarak 1972 yılında Kerr ve arkadaşları (7), V. porta'yı bağlayarak yaptıkları çalışmada, karaciğerde merkeze yakın hücrelerde beliren klasik nekrozis bulgularına karşın periferde tamamen farklı bir morfolojinin olduğuna dikkat çekmişlerdir. Hücre şişmesi, hücre parçalanması ve hücre patlamasının yer aldığı nekrozis bulgularının yerine, periferde hücrelerde bir büzüşme durumunun oluştuğunu, membranların ZEİOZİS denilen buruşuk ve kabarcıklı bir görünüm aldığını saptamışlardır. Daha önceleri "büzüşme nekrozisi" olarak adlandırılan bu olay, Kerr ve arkadaşları tarafından ilk defa "fizyolojik hücre ölümü" olarak tanımlanmış ve APOPTOZİS adı verilmiştir. Yunanca'da APO (=ayrı) ve PTOZİS (=düşen) kelimelerinden oluşan apoptozis, sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan bir kelimedir.

Kerr ve arkadaşlarından tam 8 yıl sonra deneysel apoptozis ilk defa Wyllie ve arkadaşları (8) tarafından başarılmıştır. Glukokortikoidlere maruz bırakılan olgunlaşmamış timus hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü gerçekleştiren bu araştırmacılar, apoptotik hücre DNA'sının elektroforetik jel ayırımını yaparak, DNA bütünlüğünün kalmadığını, DNA'nın bantlardan oluşan bir merdivene parçalandığını kanıtlamışlardır.

2-Apoptozisin Fizyolojik ve Patolojik Olaylardaki Yeri

Apoptozisin, embriyonik hayatta yaygın olarak görülmesinin yanısıra gelişimini tamamlamış organizmalarda, özellikle immün düzenlenmede kritik önemi vardır (9). Apoptozis aşağıda belirtilen bir çok fizyolojik ve patolojik olayda etkin rol oynamaktadır (10-12).

2.1-Fizyolojik Olaylardaki Yeri

- Embriyogenezis ve metamorfoz sürecinde programlı hücre yıkımı. (Fetüs implantasyonu, organogenezis ve gelişim sürecinde yaşanan involüsyon)
- Erişkinde hormona bağlı involüsyon. (Menstrüal siklуста endometrial hücre yıkımı, menapozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin regresyonu)
- Sürekli çoğalan hücre gruplarında hücre azaltılması. (Bağırsak kripta epiteli)
- İmmün hücrelerin seçimi. (Hem B, hem de T hücrelerinde sitokin deplesyonundan sonra ve timusun gelişimi sırasında otoreaktif T hücrelerinin ortadan kaldırılması)

2.2-Patolojik Olaylardaki Rolü

- Tümörde hücre ölümü. (Hem regresyon, hem de büyüme aşamasında)
- Hormona bağımlı dokularda patolojik atrofi. (Kastrasyondan sonra prostat atrofisi ya da glukokortikoid kullanımından sonra timusta lenfosit kaybı)
- Parankimatöz organlarda duktus tıkanmasından sonra patolojik atrofi. (Pankreas, tükürük bezi, böbrek tübülüsleri)
- Sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümü. (İmmün rejeksiyon ve Graft Versus Host Reaksiyonu)

- Bazı viral hastalıklardaki hücre hasarı . (Viral Hepatit vs.)
- Bazı incitici etkenlerle oluşan hücre ölümü (Hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekrozis oluşturabilen etkenler hafif dozlarda apoptozis meydana getirirler.)

3-Apoptozisin Morfolojisi

Apoptozise giden hücrelerin morfolojisi en iyi şekilde elektron mikroskobu ile görüntülenebilir (13).

- *Yüzey organellerinin kaybı:* Mikrovillüsler, bağlantı noktaları gibi özelleşmiş yapılar ortadan kalkar ve yüzeyi yuvarlaklaşan hücrenin komşuları ile bağlantısı kesilir.
- *Hücre büzülmesi:* Apoptotik hücre komşu normal hücreye göre daha küçük, sitoplazması daha yoğun, organelleri normal görünüşte olmakla birlikte daha sıkışık biçimde bir araya gelmiştir.
- *Kromatin yoğunlaşması:* Apoptozisin en tanıtıcı bulgusudur. Kromatin periferde nükleus membranı altında yoğunlaşır. Nükleus parçalanarak birkaç bölüme ayrılır.
- *Sitoplazmik baloncuklar ve apoptotik cisimlerin oluşması:* Apoptotik hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlar ayrılarak bazıları nükleus parçacıklarını da barındıran sitoplazma ile sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan membran ile sarılı apoptotik cisimlere dönüşür.
- *Apoptotik hücre ve cisimciklerin fagositozu:* Komşu normal parankimal hücreler ya da makrofajlarda gerçekleşir.

4-Apoptozisin Mekanizmaları

Apoptozis olayının başında hücre hacmi yarıya düşer. Hücre, su ve elektrolitlerini kaybederek daha yoğun olan yapısal moleküler topluluğa dönüşür. Tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır. Bu yolla sitozolik proteinler arasında epsilon-gama glutamil lizin, çapraz bağların oluşmasına ve dolayısıyla protein polimerizasyonuna yol açarak, proteinlerin güçlü kimyasal maddelere karşı dayanıklılığını arttırmaktadır. Transglutamine proteinler, membranın altında, keratinize sağlam bir kabuk oluştururlar. Bu işlem hem şekil bozukluğunu hem de küçülmeyi açıklar niteliktedir.

Kromatin yoğunlaşması, kromatinin nükleozomlar arasındaki bağlantı bölgelerinden ayrılması ile oluşur. 180-200 baz çifti ve katlarından oluşan bir dizi oligonükleozomal parçalar oluşur. Bunlar elektroforezdeki tipik merdiven görüntüsünden sorumludur. Bu olay kalsiyuma duyarlı ENDONÜKLEAZLAR ile oluşmaktadır. Endonükleazlar, nötral pH'da aktiftirler ve sitozolik serbest kalsiyuma ve magnezyuma bağımlıdır. Çinko ile inhibe edilirler (14).

Apoptotik cisimlerin fagositler tarafından tanınması, immünolojik olmayan bir mekanizma ile olmaktadır. Makrofajlar üzerinde bulunan ve hücre adhezyon molekülü ailesinden bir beta-3 integrin olan VITRONECTİN reseptörünün, apoptotik nötrofillerin fagositozunu sağladığı gösterilmiştir. Vitronectin'in yanında trombospondin, CD36, N-asetilglukozamin, N-asetilkitobioz, glukozamin, mannozamin, fosfotidilserin gibi moleküllerin de rol aldıkları gösterilmiştir. Bu moleküller hücre membranında gizlenmiş ya da korunmuşlardır. Apoptozis sırasında belirgin hale gelmektedirler (15-17).

5-Apoptozis ve Nekrozisin Farkları

Hücre ölümü başlıca, nekrozis ve apoptozis olmak üzere iki şekilde meydana gelir. Bu iki ölüm şeklinin morfolojik olarak belirgin farklılıkları vardır. Ani ve ağır travma ile karşılaşan, nekrozis ile ölen hücrede, şişme, membran geçirgenliğinde artma, ozmotik lizis; dokuda ise, ağır yangısal zedelenme meydana gelir. Apoptotik hücrede, nekrozisin tersine en çarpıcı değişiklik nükleusta oluşur (Tablo 1). Hücre küçülür, mikrovillüs ve desmozomlarının kaybı sonucu komşu hücrelerden uzaklaşır. Hücre yüzeyinde "bleb"ler (sitoplazmik çıkıntılar) meydana gelir. Sitoplazmada yoğunlaşma, hücre dansitesinde artma, kromatide yoğunlaşma ve nükleer zarf yakınında toplanma görülür. Daha sonra tüm nükleus yoğunlaşır ve DNA'da yaklaşık 180-200 bp multimer büyüklüğünde parçalanma meydana gelir. Hücre, her biri membranla kaplı bir çok apoptotik partiküle ayrılır. Apoptotik hücrelerde nekrozisin aksine, membran bütünlüğü bozulmamıştır. Fagositozu kolaylaştıracak membran değişiklikleri erken evrede bile vardır. Komşu hücreler ya da özel fagositler tarafından bu membran kaplı partiküller fagosite edilerek dokudan hızla uzaklaştırıldığı için yangısal reaksiyon görülmez. Bu nedenle apoptozis sessiz ölüm şeklinde ifade edilebilir (18).

6-Apoptozisin Tetikleyici ve İnhibitörleri ile Hücre İçi Sinyal İletimi

Hücrelerde apoptozisi indükleyen ya da inhibe eden bir çok ajan tanımlanmıştır. Bunlar Tablo 2 ve Tablo 3'te gösterilmiştir. Bu ajanlar hücre içi sinyaller oluşturarak yeni gen ve gen ürünlerinin sunumuna yol açarlar. Bu sinyaller arasında, hücre içi kalsiyum, protein kinazlar, gen sunumundaki değişiklikler ve transkripsiyon faktörleri sayılabilir (20, 21).

Tablo 1: Apoptozis ve Nekrozis Farkları (8)

BULGULAR	NEKROZİS	APOPTOZİS
TUTULUM	KİTLESEL	TEK TEK HUCRESEL
GEN İFADESİ	GEREKMEZ	GEREKİR
HÜCRE HACMİ	ARTAR	AZALIR
KROMATİN YOĞUNLAŞMASI	UNIFORM	GRANÜLER
NUKLEOLUS GÖRÜNÜMÜ	KOMPAKT	GRANÜLER
ÇEKİRDEK ZARI	GEÇ EVREYE KADAR KORUNUR	ERKEN EVREDE PARÇALANIR
SİTOPLAZMA	GEÇ EVREDE PARÇALANIR	APOPTOTİK YAPILAR OLUŞUR
HÜCRE ORGANELLERİ	KAYBOLUR	GEÇ EVREYE KADAR KORUNUR
DNA KIRILMASI	GÖRÜLMEZ	KAREKTERİSTİKTİR
AGAROS JEL ELEKTROFOREZİ	NON SPESİFİK	MERDİVEN GÖRÜNÜMÜ
ÇEVRE DOKUDA YANGI	VAR	YOK

Tablo 2: Apoptozis İnhibitörleri (19)

Fizyolojik	Viral Genler	Farmako-Ajanlar
<ul style="list-style-type: none">• Büyüme faktörleri• Ekstrasellüler Matriks• CD40 ligand• Nötral aminoasitler• Çinko(endonükleaz inhibitörü)• Östrojen• Androjen	<ul style="list-style-type: none">• Adenovirus E1B• Baculovirus p35• Baculovirus IAP• Cowpox virüs c1mA• EBVBHRF-UMP-1• African swine virüs• Herpesvirus y134.5	<ul style="list-style-type: none">• Calpain inhibitörleri,• Sistein proteaz inhibitörleri,• Tümör uyarıcıları:<ul style="list-style-type: none">- PMA-Fenobarbital-Hexaklorosiklo heksan

Tablo 3: Apoptozis Uyarıları (19)

Fizyolojik	Hasarla İlişkili	Tedavi Ajanları	Toksinler
<ul style="list-style-type: none">• TNF ailesi FasL, TNF• Kalsiyum• TGF-beta• Transmitterler Glutamat, Dopamin, n-metil-d aspartat Glukokortikoidler• Büyüme faktör azlığı• Hücrel temasın kaybolması	<ul style="list-style-type: none">• Sıcak şoku• Besin yokluğu• Viral enfeksiyonlar• Bakteriyel toksinler• Onkogenler: myc, rel, E1A• Tümör süpresörjeni p53,• Sitolitik T hücreleri• Oksidanlar• Serbest radikaller	<ul style="list-style-type: none">• Kemoterapötikler: Sisplatin, Bleomisin, Doksorubisin, Ara-C, Methotreksat• Gama radyasyon• UV radyasyonu	<ul style="list-style-type: none">• Etanol• Beta-amiloid peptid

KALSIYUM: Apoptozisin erken dönemlerinde sitozolik iyonize kalsiyum düzeylerinde artış olduğu gösterilmiştir (11). Bu artış bazı latent enzimleri aktive ederek apoptotik hücrelerde bir takım yapısal değişikliklere yol açar. Bu enzimler arasında kalsiyum bağımlı endonükleaz ve doku transglutaminazları vardır (22,23). Bunun yanında kalsiyum bağlayıcı protein KALMODİLİN'nin de cAMP'yi arttırarak protein kinaz A'yı aktive ettiği ve apoptozise yol açtığı gösterilmiştir (21). Bunlara ek olarak KALBİNDİN D28K da örnek verilebilir (24).

PROTEİN KINAZLAR: Protein fosforilasyonunda rol oynayan membran ve sitozolik enzimlerin, apoptotik sinyallerin iletiminde önemli

oldukları kanıtlanmıştır. Bu enzimlerden protein kinaz A (PKA) apoptozisi indüklerken, protein kinaz C (PKC) inhibe etmektedir (21,25).

GEN SUNUMUNDAKİ DEĞİŞİKLİKLER VE NÜKLEER TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ: Apototik hücrelerde sunumu değişen bir çok gen tanımlanmıştır; bcl-2, p53, c-myc.

Bcl-2 Geni: B cell lymphoma/leukemia-2 genin kısaltılmış adıdır. Folliküler non-Hodgkin lenfomalarda, 18q21'deki normal yerinden, immünglobulin ağır zincir lokusuna yakın 14q32'ye kromozomal translokasyon (t14;18) saptanmıştır. Yer değiştiren bcl-2 geni, bu translokasyon sonucunda, kodladığı proteinin aşırı yapımına yol açmaktadır. Bcl-2 varlığı tek başına lenfoma öncüsü değildir. Ancak yatkınlık yapmaktadır. Bcl-2 apoptozisi durdurmaktadır (26). Bcl-2 nükleus membranı, endoplazmik retikulum ve mitokondrial membranın dış yaprağında bulunur. Membranlar üzerinde bulunması iyon dengesi ile (Ca^{+2}) ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (27). Hücrede bcl-2 kendisi ile göreceli olarak daha zayıf homoloji gösteren bir başka gen, BAX, ile heterodimer oluşturabilir. Oluşan bcl-2/bax heterodimeri, bcl-2'nin apoptozisi önleyici etkisi için zorunlu görülmektedir (28).

p53 Geni: DNA hasarı oluştuğu zaman, G₁'den S fazına geçişi bloke ederek hasarın tamirine zaman tanıyan bir nükleer/matriks proteindir. Molekül ağırlığının 53 kDa olması nedeniyle bu adla anılan p53, hücrede DNA hasarı kritik seviyenin üzerine çıktığı zaman apoptozise yol açmaktadır (29,30). p53, spesifik DNA dizilimine bağlanabilmekte ve aralarında p21 ve GADD45'in de bulunduğu spesifik genlerin transkripsiyonunu arttırmaktadır. GADD45 ve p21'in, "cdk-cyclin" moleküler kompleksine bağlanarak kinaz aktivitesini inhibe ettikleri, bu şekilde pRB fosforilasyonu ve S fazına geçişin inhibe olduğu, GADD45'

in aynı zamanda DNA'nın kesip-çıkarma tamirini arttırdığı gösterilmiştir (30,31).

p53, ağırlıklı olarak DNA hasarı sonucu apoptozisi uyarmakla birlikte, belirgin DNA hasarı olmayan hücrelerin uygunsuz olarak çoğalmaya itilmeleri durumunda da S fazındaki hücrelerin apoptotik ölümüne yol açabilmektedir (30,31). Diğer taraftan S fazındaki hücrelerde DNA hasarı oluşturulmasının p53'ten bağımsız olarak da apoptozis yaratabildiği gösterilmiştir. Go'daki hücrelerde görülmeyen bu kapasite, tümör tedavi stratejileri yönünden önemli görünmektedir (32,33).

Ayrıca p53'ün, hem bcl-2 hem de bax genlerinin sunumunu etkilediği, ancak bcl-2 ve bax'ın farklı yönlerde etkilendikleri bulunmuştur (34).

c-myc Geni: Çoğalma ile ilgilidir. EA1'e benzemekte olup, dual etkilidir. Hem çoğalmayı hem de apoptozisi uyarır. p53 bloke edilen farelerin c-myc'nin tetiklediği apoptozise dirençli olduğu gösterilmiştir. İnsan kaynaklı tümörlerde bu genin, ya düzensizleştiği ya da mutasyona uğradığı gösterilmiştir. Büyüme faktörlerinin ortamdaki çekilmesi ile apoptozise neden olmaktadır (35).

7-Apoptozisde Fas/FasL Ara Yolu ve Patolojideki Rolü

Fas/FasL Geni: 1989 yılında iki farklı grup araştırmacı birbirinden bağımsız olarak, değişik hücre serileri üzerinde sitolitik etki gösteren fare kaynaklı antikolar izole etmişlerdir. Antikolar tarafından tanınan hücre yüzey proteinleri Fas olarak adlandırılmıştır. İnsanda Fas geninin 10. kromozomda, FasL geninin 1.kromozom üzerinde olduğu gösterilmiştir (36). Fas/FasL etkileşimi, immün sistemin ayrıcalığının devamı ve homeostazı için önemlidir (37). FasL'nın ya da anti-Fas monoklonal Ab'nin hücre ölüm yüzey reseptörü olan Fas'a bağlanması,

Fas taşıyan hedef hücrelerde APOPTOTİK hücre ölümüyle sonuçlanır (38,39). Bu olaya CASPASE (Cys catalytic Asp targeting protease) enzim sistemi aktivasyonu eşlik eder (40).

Fas/FasL yolu ile öldürme, sitotoksik T hücreleri için öldürmenin önemli bir yolunu oluşturur (41). Hücrede oluşan bir hasar sonrasında, özellikle DNA hasarı, Fas reseptörü artışı oluşmaktadır. Bunu takiben bu hücrelerde Fas/Fas-L bağımlı yol ile apoptozis meydana gelmektedir. Bu olayda Fas reseptör artışının p53 bağımlı olduğu gözlenmiştir (42).

7.1-Fas Antijeni ve Solubl Fas Antijeni

Hücre yüzey reseptörü olan Fas, APO-1 ya da CD95 olarak isimlendirilir. Fas, tümör nekrozis faktör (TNF) ve sinir büyüme faktörü reseptörü (NGFR) ailesinin bir üyesidir. Sisteinden zengin tip I transmembran glikoproteinidir. 46-48 kDa ağırlığında olup, 335 amino asitten oluşmaktadır (43,44). Ayrıca Fas'ın solubl (sFas) formu mevcuttur ve transmembran formundan 63 baz segmenti kadar eksiktir (3). sFas'ın, FasL tarafından indüklenen apoptozu bloke ettiği gösterilmiştir (4). Anormal yükselmesi "Fas ve FasL molekülleri tarafından indüklenmiş olabilir" denilmektedir (45). Ayrıca sFas, yüzey Fas'ından bağımsız olarak idare edilmektedir.

7.2-Fas Ligandı ve Solubl Fas Ligandı

Son zamanlarda Fas gibi artış gösteren Fas ligandı molekülüne işaret edilmiştir. FasL'nin değişik durumlardaki artışı hücre ölümleri ile sonuçlanmaktadır. FasL, tip II transmembran glikoproteinini olup, TNF ailesi üyesidir. Sitoplazmik amino terminali ve ekstrasellüler karboksi terminali vardır. Amino terminali prolinden zengindir. Matriks metalloproteinazları tarafından inhibe edilebilmektedir. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 37-42 kDa'dur (2). Bu protein 278 aminoasitten oluşmaktadır (44). Çoğunlukla aktive T hücreleri tarafından sunulduğu

düşünülmüştür. Ancak aktive B ve T hücrelerinde, monositlerde, makrofajlarda, endotel hücrelerinde, immün ayrıcalıklı hücrelerde; göz, testis, over, hamile uterusu, beyin ve plasentada sunulduğu gösterilmiştir (2,5). Son çalışmalarda FasL dışında serumda solubl FasL (sFasL) saptanmıştır. FasL'in ekstrasellüler kısmının Zn^{+2} bağımlı metaloproteinaz tarafından ana yapıdan koparılıp ekstrasellüler ortama dökülmesi ile sFasL oluşmaktadır (2). İnsan sFasL 23-26 kDa ağırlığında bir glikoprotein olup, FasL'in ekstrasellüler formundan oluşmaktadır. Apoptozis oluşumunda her iki formu da Fas'a bağlanmaktadır (2,46). Dolaşımdaki yüksek düzeydeki FasL'nin insanda hastalığa neden olup olmadığı bilinmiyor (47).

7.3-CASPAS Sistemi

Hücrede Fas/FasL yolunun aktive olması ile görülen ölümler, "APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜ" özelliği göstermektedir. Apoptozisin ilerlemesinde ve sonuçlanmasında "CASPAS SİSTEMİ" adı verilen anahtar oyuncular vardır. Bunlar bir seri proteazlardır. Memelilerde 13 caspas tanımlanmıştır (Tablo 4). Fas/FasL sisteminin tetiklediği apoptozisde de çeşitli caspas sistemi aktive olmaktadır (48).

Tablo 4: Memelilerdeki CASPAS Sistemi (49)

Caspas / Eski ismi	Fonksiyonu	Hedefi	Substratı
Caspas 1, ICE	İnflamasyon	WEHD	Pro-IL-1beta, kendi
Caspas 2, ICH-1/NEDD-2	Başlatıcı?	DQQD	Kendi ?
Caspas 3, CPP32 β /YAMA/apopain	Etkin	DEV	PARP, U1-70K, PK
Caspas 4, IX/ICH-2	İnflamasyon	WVRD	Pro-IL-1 β , kendi
Caspas 5	İnflamasyon	WVRD	Kendi ?
Caspas 6, MCH-2,	Etkin	VEHD	Laminler
Caspas 7, MCH-3	Etkin		PARP
Caspas 8, FLICE/MACH/Mch-5	Başlatıcı	VEID	PARP, kendi
Caspas 9, ICE-LAP6/Mch-6	Başlatıcı	PEPD	PARP, kendi
Caspas 10, Mch4	Başlatıcı ?	IEID	Procaspas 3,7
Caspas 11	İnflamasyon		
Caspas 12	İnflamasyon		
Caspas 13	İnflamasyon		

CASPAS'lar; 3 domain içeren proenzim olarak sunulurlar (30).

1. NH2 terminal domaini
2. Büyük subunit (20 kDa)
3. Küçük subunit (10 kDa)

Önce büyük ve küçük subunitler bir araya gelir ve 2 heterodimer tetramer oluşturmak üzere birleşirler. Bağımsız görev yapan 2 tane katalitik bölge içerirler. NH2 terminali, aktivasyonun düzenlenmesinde görev almaktadır (50). Substratlarından bir aspartat rezidüsünü ayırırlar. Bazı caspaslar başlatıcı, bazı caspaslar ise etkin olarak görev almaktadırlar. Etkiledikleri bölgedeki dört residü için spesifik olan üç grup tanımlanmış (40):

- Grup-1: İnterlökin 1-beta converting (ICE/caspas-1) içerir. WEHD substratına sahiptir.
- Grup-2: CASPAS 2, 3, 7 ve CED-3 (C. Eleganstaki Ced-3 geni tarafından üretilir). Bunlar DexD ile birliktelik gösterir.
- Grup-3: CASPAS 6, 8, 9 içerir. ExD (İVL) ile birliktelik gösterir.

Grup 2'teki üyelerden Caspas-3 ya da CPP32'nin, hücre sel hedeflere aktivasyonun akmasında baş sorumlu caspas olduğu düşünülmektedir. DNA tamir proteinlerinden olan "Poly (ADP-ribose) Polymerase" (PARP)'ın yıkımından sorumludur. Grup 1 caspasların apoptozis sürecinde önemli bir rol oynadıkları düşünülmüyor. Grup 3 ise grup 2 ve diğer caspaslarının aktivasyonunda rol aldığı düşünülmektedir (50).

8-Fas/FasL Ara Yolunun Moleküler Mekanizması

Fas'ın sunumunu takiben hücrede meydana gelen ölüm, muhtemelen Fas trimerizasyonu ile olmaktadır. p53 gen aktivasyonu,

Fas sunumuna ve hücre yüzeyine taşınmasına neden olmaktadır (51). Fas-L' in Fas'a çapraz olarak bağlanması ile Fas reseptörü trimerik bir yapı kazanır. FasL homotrimerik bir moleküldür. Her bir FasL'ı 3 tane Fas molekülü bağlar. Fas ligasyonu, reseptörün birleşme eğiliminde olan DD (Death Domain) bölgelerinin kümelenmesini sağlar. Daha sonra FADD (Fas Activated Death Domain), TRADD (TNF- Reseptor-Associated Death Domain), MORT-1 (Mediator Of Reseptor-induced Toxicity) adaptör proteinleri olarak adlandırılan proteinler, kendi bölgeleri üzerinden, kümelenmiş DD bölgelerine bağlanır. FADD aynı zamanda DED (Death Effector Domain) denilen bölgeler içerir (53). DED bölgesinde Fas'ın sitozolik ölüm bölgesi bulunur. FADD efektör bölgesinin caspas-8 ve caspas-10 içerdiği gösterilmiştir. DED'ler caspas-8' in bulunduğu domainlere bağlanır. Olasılıkla FADD üzerinden caspas-8 aktive olmakta ve caspas kaskadı aşağı doğru ilerlemektedir (49). Bu olayda caspas-8'in proenzim formunun ölüm kompleksinin üyesi olarak rol oynadığı düşünülmektedir. Son zamanlarda Fas'ın sitoplazmik bölgesi ile ilişkili 3 genden oluşan protein kodu tanımlanmıştır. Bunlar FADD, Receptor-Interacting Protein (RIP), Factor of Apoptosis (FAP-1)'dir. FADD ve RIP proteinleri hücrede aşırı sunulduklarında apoptozise neden olmaktadır (52). FADD geni olmayan fare çalışmalarında, FADD'ın, Fas'ın neden olduğu apoptoziste önemli rol oynadığı ve FADD eksik olan farelerde embriyonal ölüme neden olduğu gösterilmiştir (53). Fas bağımlı ölüme rezistans hücrelerde ise FAP-1 sunulduğu gösterilmiştir (54).

FLICE inhibiting proteinler (V-FLIP) : Herpes virüs ve Pox virüs'te bulunmaktadır ve Fas aracılı apoptozisi inhibe etmektedir (55). Hücrel FLIP, FLAME, CASH, I-ELICE, USURPIN, CLRP olarak da bilinmektedir. FADD ve caspas-8'deki karşılıklı birleşen DED

bölgelerine benzer DED içerir. FLIP'in rolü 2 yönlüdür. Apoptozisi inhibe ya da aktive eder (56).

SPI-2 proteini (Cytokine Response Modifier= CrmA), ilk olarak pox virüste tanımlanmıştır (57). Bu aynı zamanda ICE, Caspas-3 (CPP-3), Caspas-8 inhibitörüdür ve değişik iflamatuvar yanıtta sahiptir (58). SPI-2 proteinleri Fas yolu ile hedef hücrelerin T hücre aracılığı ile oluşan liziste genel olarak rol almaktadır. Ayrıca SPI-2 proteini DNA parçalanmasını sağlayan granüler eksositoz (Granzim-B) yolunun komponentlerini taşıdığı gösterilmiştir (59). Bacula virüs tarafından üretilen p35'in caspasları inhibe ederek apoptozisi durdurduğu gösterilmiştir (60). Son zamanlarda Inhibitor of Apoptoz (IAP) tanımlanmıştır. IAP endojen memeli hücre ölüm inhibitörüdür ve CrmA ve p35'den farklıdır (61). Ancak çalışma mekanizması hakkında tam bilgi elde edilememiştir.

Son olarak tanımlanmış olan DEDD (DED-containing DNA-binding protein), Fas'ın neden olduğu apoptozis süresince nükleusa transloke olmakta ve biyosentez aktivitelerini durdurmaktadır (62).

9-Tetiklenmiş Hücre Ölümü Aktivasyonunda (Activation-Induced Cell Death-AICD) Fas Ligand Sunumunun rolü

Fas tarafından Fas-L'in bağlanması ile tetiklenen apoptotik hücre ölümü, immün fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynayan AICD'de önemli rol oynamaktadır.

AICD iki fonksiyona hizmet etmektedir (63):

1. Antijenin uzaklaştırılmasından sonra T hücre klonlarının artmasının sınırlanması,
2. Oтореaktif periferel T hücrelerinin inaktivasyonu. Bu hücreler timüsün negatif seçiciliğinden kaçmaktadır.

AICD, T hücrelerinde Fas/FasL aracılığı ile oluşmaktadır. Hücre yoğunluğuna bağımlı değildir. Elde edilen deliller, ölümün otokrin olarak, benzer şekilde Fas reseptörü taşıyan hücrelerde FasL tarafından tetiklendiğini göstermiştir (41). Fas/Fas-L sisteminin AICD'ki rolü Lpr (Fas) ve gld (FasL) defektli farelerde net bir şekilde rapor edilmiştir (64,65). Lpr defektli farelerdeki olgun T hücreler antijen ya da anti CD3 ile stimüle olduğu zaman hücre ölüme gitmemekte ve bu farelerde otoimmün hastalıklar gelişmektedir. Denek farelerde, splenomegali, hipergammaglobulinemi, otoimmün hemolitik anemi, trombositopeni, nötropeni görülmektedir (66).

Fas/FasL ile ölüm, immün ayrıcalığın idame ettirilmesi için önemlidir. Vücutta belli bölgeler immün kontrolün dışında tutulmuştur. Örneğin immün süpresör kullanmadan başarılı korneal transplantasyon yapılması, immün ayrıcalığı ortaya koymaktadır. Bu gibi immün ayrıcalıklı bölgeler arasında testis, beyin, plasenta, göz sayılabilir (67). Bu bölgeler FasL'ı sunarak Fas (+) hücreleri, lenfositler dahil, ölüme götürmektedir (68).

Bu bölge hücreleri gibi bazı tümör hücreleri de (melanoma, multibil myelom, hepatoma, kolon CA, astrositoma) yüksek oranda FasL sunarak büyümelerine devam etmekte ve immün sürveyanstan kaçmaktadırlar (2,6). Çünkü tümör hücrelerine karşı aktive olmuş sitotoksik T hücreleri, FasL nedeniyle yok olmakta ve görevini yerine getirememektedirler. Efektör T hücrelerinde Fas sunumunun olması efektif immün sürveyans için büyük bir bataklık oluşturmaktadır (69).

10-Sitotoksik T Hücrelerinin Hedef Hücreyi Yok Etmede Fas/FasL Ara Yolunun Rolü

Fas/FasL sistemi patolojik olmayan durumlarda immün hücrelerin homeostazisinde rol almaktadır. Fas'a bağlı öldürme, yabancı antijenin

indüklediği CD8 (+) T hücrelerinin öldürme yolunun bir formudur. İmmünolojik etkin hücreler olan NK hücreleri ve sitotoksik T hücreleri, sitotoksisiteye katılarak, hedef hücrede apoptozisi tetiklerler (70). Malign hücrelerin yok edilmesinde sitotoksik T hücrelerinin esas olarak rol oynadığı gösterilmiştir. NK hücreleri ise ikinci derecede rol almaktadırlar ve önceden uyarılmalarına gerek duyulmamaktadır (71). Son zamanlarda allojenik kemik iliği transplantasyonu sonrası DLI (Donor Lymphocyte Infusion) ile rölapsların tam remisyona girmesi, verilen donör lenfositleri tarafından tümör hücrelerinin yok edildiğini düşündürmektedir (72). Bazı olgularda GVL (Graft Versus Leukemia) devam etmesine rağmen rölaps meydana gelmesi bazı hücrelerin immün sürveyanstan kaçtıklarını düşündürmektedir (6).

Hedef hücrelerin sitotoksik T hücreleri tarafından öldürülmesinde 2 esas yol kullanılmaktadır (73):

1. Ca bağımlı granül boşaltımı
 - Perforinler (protein yapılı porlar)
 - Granzimler (serin proteaz ailesi)
2. Ca bağımsız Fas/Fas-L öldürme yolu

Sitotoksik T hücrelerinde granül derivelerinin salınımı hedef hücrelerdeki MHC Class I molekülü ile olduğu önceden bilinmektedir. Bu granüller sitotoksik komponentlerinin bir çoğunu içermektedir. Bunlar PERFORİN (protein yapılı polar) ve proteazlar (GRANZİM-A ve GRANZİM-B)'dir (74). Bu proteazlar serin proteaz ailesindedirler (75).

PERFORİNLER (protein yapılı porlar): Hücre lizisinden sorumludur. Bu basit olarak şu şekilde açıklanabilir: Ca^{+2} bağımlı perforinlerin toplanması hedef hücre membranı içinde "por forming unit"leri (CYTOLYSİN) oluşturur (71). Cytolysin, Ca^{+2} bağımlı,

membrana bağı ve polimerize olan 70 kDa ağırlığında bir proteindir. Perforin ilk olarak hedef hücreye sokularak geri dönüşümsüz olarak polimerize olur. Perforin ve granzimin farklı olarak idare edildiği düşünülmektedir. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra yaklaşık 20 kadar protein, membranda toplanır ve bir kanal oluştururlar. Oluşan bu kanalın, büyük moleküllerin, çeşitli mediatörlerin, Ca^{+2} 'nin intrasellüler ortama geçişine izin verdiği düşünülmektedir. Bu fonksiyonun bozuk olduğu farelerde normal sayıya sahip lenfosit ve NK'ların, enfekte hücreleri temizlemede yetersiz kaldıkları gösterilmiştir. Ancak hücrelerin bu sistemin etkilerinden nasıl korundukları bilinmemektedir (44).

GRANZİMLER (serin proteaz ailesi): Granzim A ve B' den oluşmaktadır. Hedef hücre DNA parçalanmasından sorumludur. En az 8 grup serin proteazından oluştuğu saptanmıştır (44). Yapılan deneylerde granzim eksikliğinde CD8 (+) sitotoksik T hücrelerinin sitotoksitelerini kısmen de olsa devam ettirdikleri ancak NK hücrelerinin bunu başaramadıkları gösterilmiştir (71,44). Yine aynı çalışmada, CD4 (+) T hücrelerinde ise hiç azalma görülmemiştir (71). Granzim, depolandığı granüllerde pH'ın düşük olmasına bağlı olarak, enzim aktivitesi göstermemektedir. pH'ın, salgılanımdan hemen önce yükseldiği sanılmaktadır (44). Aktivasyonu için perforin gereklidir. Granzimlerin hücre içine girişlerinin perforin tarafından kolaylaştırılmış olarak basit bir şekilde olduğu sanılmaktaydı. Ancak yapılan son çalışmalarda perforin ve granzim aktiviteleri arasındaki ilişkinin çok ince ve hassas bir yapıya sahip olduğu gösterilmiştir (76).

Çalışmalarda perforin mekanizması bloke edilen farelerdeki sitotoksik T hücrelerinin, hücreleri lizise uğratma ve DNA'yı parçalarına ayırma kapasitelerinin korunduğu gösterilmiştir. Bu, perforin bağımsız

sitotoksite yolunun Fas/Fas-L yoluna bağılı olarak oluştuğunu göstermektedir (77).

Sonuç olarak:

- CD8 (+) T hücreleri her iki yolu (Fas/FasL ve Perforin/Granzim) başarılı bir şekilde kullanmaktadır.
- CD4 (+) T hücreleri primer olarak Fas/FasL sistemini kullanmaktadır .
- NK hücreleri Perforin/Granzim yolağını kullanmaktadır (71).

11-Fas/FasL Ara Yolunun Uygunsuz Aktivitesi ile İlişkili Patolojiler

Pek çok hastalık durumlarında, hücre ölümünde, Fas/FasL karşıtı aktivitenin rol oynadığı belirtilmektedir. Lpr (Fas) ve gld (FasL) mutant farelerde, Lenfoproliferatif Hastalıklar (LPH) artmaktadır. AICD'nin katıldığı HIV enfeksiyonlarında CD4 (+) hücrelerinin tükendiği gözlenmektedir. Bu olayda, CD4 (+) ile gp120/anti-gp120 kompleksi çapraz bağlantı yapmakta ve Fas bağımlı yol aktive olarak CD4 (+) hücreler apoptozis ile ölmektedir (78). Ayrıca HIV enfekte renal tübüler hücreler Fas aşırı sunumuna bağılı olarak ölmektedir (79). Ancak bunlarda Fas-L seviyelerinin etkilenmediği gösterilmiştir. Anti-Fas Ab verilen farelerde fulminan KC yetmezliğinin geliştiği bildirilmektedir (80). Bunun Fas bağımlı olduğu, Kupffer hücrelerinden sekrete edilen IL-18 tarafından Fas indüksiyonunu takiben Fas/FasL yolu aracılığı ile oluştuğu rapor edilmiştir (81). Bir çok otoimmün hastalığın etyolojisine yönelik yapılan Fas ile ilgili deneylerde, Fas defektif farelerde gelişen glomerulonefrit, artrit ve diğer sistemik otoimmün hastalıkların Anti-Fas Ab verilerek önlenebildiği gösterilmiştir (82).

Ani bebek ölümü sendromunda da Fas sunumunun arttığını gösteren deliller bulunmaktadır (83). Bu bulgular Sjögren sendromu,

myozitis, down sendromu, insan yaşlanmasında da gösterilmiştir (84-87). Fas gen (ALPS-1a) ve FasL (ALPS-1b) mutasyonlu farelerdeki ALPS, insan modellerinde de gösterilmiştir (88).

12-DNA Hasarı ve Diğer Hücresel Lezyonlarda Fas Sunumu

HeLa hücreleri ya tam olarak mitokondrial DNA'dan yoksun ya da mutant mt-DNA'ya sahiptirler. Bu hücrelerde Fas düzeylerinde artış ve anti-Fas Ab'ye duyarlılık olduğu ve apoptozisin tetiklendiği gösterilmiştir (89). Fas'ın bağlanması, elektron transportunu sitokrom-c'de bozmaktadır. Caspasların aktivasyonu sitokrom-c salınına bağlıdır. Apoptozis süresince sitokrom-c, mitokondriden salgılanır. Bcl-2 varlığı ile inhibe edilir. Sitosolik sitokrom-c APOPTOZOM (sitokrom-c + Apoptosis activated factor-1(APAF) + procaspas-9)'un büyük kısmını oluşturur. Sorun sitokrom-c'nin bir kez salındıktan sonra geri dönüşümünün olmamasıdır. Zira hücre ya apoptozise ya da nekroze gidecektir (90). Mitokondriyal ensefalomyopati, kas ve beyin hücrelerinde mitokondrilerin fonksiyonel olarak anormal olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar Fas sunumundaki artışın, fonksiyon görmeyen hücrelerin uzaklaştırılmasında bir mekanizma olarak Fas/FasL yolağının kullanılmasına bağlı olarak gerçekleştiğini savunmaktadırlar (89).

Benzer olarak DNA hasarına yol açan ajanların, FasL kadar Fas sunumunu da arttırdığı ve hücrelerin Fas bağımlı apoptozise gittikleri gösterilmiştir. Bazı ilaçlar hem DNA parçalanmasına hem de caspase sisteminin aktive olmasına neden olmaktadır (48). Çalışmalarda, Fas/FasL yolunun dirençli olduğu hücrelerde, kemoteröpetik ajanlarda da direnç görülmektedir (91). Doksorubisin, sisplatin ve VP-16 ile yapılan çalışmalarda, bu ilaçların etkilerini Caspas aktivitesi aracılığı ile gösterdikleri bildirilmiştir. Daunorubisinin CERAMİDE artışına yol

açarak Fas ya da FasL sunumunu arttırdığı ve Fas bağımlı ölüme yol açtığı gösterilmiştir (92). Lpr mutant farelerde radyasyona hassasiyetin azaldığı rapor edilmiştir. DNA hasarını takiben Fas/FasL'in her ikisinin sunumunun düzenlenmesinin p53 tarafından idare edildiğini gösterir inandırıcı deliller mevcuttur. İnsan p53-null hücreleri H558 ve K562'de Fas aşırı sunumu gösterilmiştir. Ancak bunlardan K562 hücreleri enteresan olarak Fas aracılı ölüme rezistans saptanmıştır (93).

Sisplatin, mitomisin, metotreksat, mitoksantron, doksorubisin, bleomisin, FasL sunumunu arttırmaktadır. Ancak yapılan diğer çalışmalarda ilaçların tetiklediği apoptozisde Fas/FasL yolağı ve caspas-1 ve 8 (CrmA ile) bloke edildiği halde apoptozisin gerçekleştiği gözlenmiştir. Bu olay başka yolların olaya karıştığını ya da bir parakrin/otokrin mekanizmasının olabileceğini düşündürmektedir (50,94). Başka bir çalışmada Fas/Fas-L sisteminde herhangi bir değişikliğe yol açamadıkları gösterilmiştir (1)

13-Apoptozis ve Kanser

Tümör hücrelerinin büyümesi sırasında normal hücrelerin bölünme ve dönüşümlerini düzenleyen homeostatik mekanizmaların kontrolü kaybolmuştur. Son yıllarda sürdürülen çalışmalarda onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerinin programlı hücre ölümünü kontrol ettiğine dikkat çekilmektedir. Bunlardan fos, jun, myc, bcl, rb, p53 genleri apoptozis sürecinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca kanser tedavisinde kullanılan kemoteröpetik ajanların da, hedef tümör hücrelerinde gelişen apoptozis üzerine önemli etkileri olduğu gösterilmiştir (95).

Kanser gelişimi sürecinde hücrelerin büyüme ve farklılaşmasına yol açan eksojen büyüme faktörlerinin varlığı ve yokluğu ile apoptozis arasında bir ilişki olduğu üzerinde durulmuştur. Bazı hücreler büyüme faktörleri yokluğunda istirahat fazına geçerken, bazı hücreler apoptozis

sürecine girebilmektedir. Örneğin c-myc onkogeni ile yapılan çalışmalarda, c-myc onkogenin büyüme faktörüne bağımlılık hali yarattığı ve büyüme faktörü ortadan kaldırılınca apoptozisin başladığı gösterilmiştir (96).

Onkogenler arasında c-myc ve p53 genleri apoptozisi değişik noktalarda kolaylaştırırken bcl protoonkogeni apoptozisi inhibe edici özellik göstermektedir. Bcl-2 molekülü in vivo şartlarda bax proteini ile heterodimer oluşturmaktadır. Bax proteini bcl-2'nin hücre ölümünü baskılayan aktivitesini önlemekte ve bax/bax homodimerleri fazlaca bulunduğu zaman apoptozis hücre içinde hızlanmaktadır (97).

p53 süpresör geni de apoptozis sinyalini kontrol etmektedir. p53 ile uyarılan apoptozisin de bcl-2 ile düzenlendiği anlaşılmıştır. Folliküler lenfomada sık görülen (14;18) translokasyonu sonucunda, bcl-2 protoonkogeni yer değiştirmekte, bcl-2 aktivitesinde belirgin artış sonucu hücrenin programlı ölümü engellenmekte ve lenfoid hücrelerin yaşamları uzamaktadır (98).

Aynı şekilde Philadelphia kromozomu pozitif kronik myeloid lösemide bcr-abl gen düzenlenmesi sonucunda, myeloid hücredeki apoptozisin hücre içi moleküler mekanizmaları ile bloke edilmesi veya sürecin tamamlanamaması, neoplastik hücre gelişimine bir izah olabilir (99).

III. OLGULAR VE YÖNTEMLER

1-Olgular

Çalışma Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji/Onkoloji Bilim Dalında, Şubat 1999-Şubat 2001 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

Çalışma grubu; Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) ve Non-Hodgkin Lenfoma (NHL) tanısı alan, 17 yaşından gün almamış ve daha önce tanıya yönelik hiçbir tedavi uygulanmamış 25 bireyden oluşmaktadır. Ayrıca hasta grupları ile aynı yaş-cinsiyette olan, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniğine başvuran malignite, immünolojik (SLE, bazı glomerulonefritler vs), AISD, nörodejeneratif hastalıklar, myelodisplastik sendrom, toksik KC hastalığı gibi apoptoz-Fas/FasL sistemi ile ilişkisinin olduğu gösterilmiş hastalıklardan herhangi birisinin tanımlanmadığı bilinen ve diğer anabilim dallarından operasyon öncesi bölümümüzce anestezi alabilmesi açısından değerlendirilmesi istenen olgulardan oluşturulmuştur.

Bu özelliklere uygun bir yıl süre ile pediatrik hematoloji/onkoloji bölümünce takip ve tedavi edilen 25 olgunun kan örneklerinde (plazma) sFas, sFasL, CRP ve beyaz küre, kemik iliği aspirasyon örneklerinde ve alınan doku örneklerinde Fas, FasL çalışılmıştır. Çalışma içeriği hakkında her bir olgunun ailesine bilgi verilerek onayları alınmıştır.

Olguların demografik özellikleri Tablo 5'te gösterilmiştir.

2-Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

ALL ve NHL tanısı konulan olguların tedavi öncesi, remisyon ve rölaps dönemlerinde 5 ml venöz kanları EDTA K3 deney tüplerine alındı. 2500 devirde 7 dakika santrifüj edilen kan örnekleri, plazmaları

ayrılarak çalışma zamanına kadar korunmak üzere -70C'de derin dondurucuda saklandı.

ALL tanısı almış olguların tedavi öncesi, remisyon ve rölaps dönemlerinde alınan kemik iliği aspirasyon yayma örnekleri, asetonda 3 dakika fikse edildikten sonra çalışma zamanına kadar korunmak üzere -70C'de derin dondurucuda saklandı.

Tablo 5: Çalışma grubunun demografik özellikleri

Özellik	Sayı
Cinsiyet	
Erkek	13
Kız	12
Yaş	
Ortalama	6,16 ± 4,13
Ortanca	6,00 (0-16 yaş)
Klinik evre (NHL için)	
Evre I	-
Evre II	-
Evre III	6
Evre IV	1
Tedavi risk grubu (ALL için)	
SRG	8
MRG	7
HRG	3
Histoloji	
NHL	
-T hücreli	3
-B hücreli	4
ALL	
-T hücreli	5
-B hücreli	10
-Sınıflandırılmayan	3

Parafinle fikse edilen dokularda ve ALL kemik iliği aspirasyon yayma örneklerinde, hem Fas Ag hem de FasL sunumları Patoloji

Anabilim Dalı tarafından immünohistokimyasal yöntemlerle çalışılmıştır. Çalışma grubunu oluşturan olguların tanı anında, klinik-radyolojik olarak remisyona sağlandıktan sonra ve (eğer gelişmişse) rölaps sırasında alınan plazma örnekleri, kontrol grubu plazma örnekleri ELIZA yöntemiyle sFasL ve sFas düzeyleri Pediatrik İmmünoloji Bilim Dalı tarafından çalışılmıştır. Yöntemin uygulamaları arası değişikliği ortadan kaldırmak, farklı zaman uygulamalarından doğabilecek aksamaları en aza indirmek için tüm materyaller aynı zamanda çalışılmıştır.

ALL olgularına, BFM-95 SRG/MRG/HRG tedavi protokolünden uygun olanı başlanmış olup (Tablo 6) hücum tedavisi sonunda yapılan kemik iliği aspirasyonu değerlendirilmesinde %5 altında blastik aktivitesi olan ve klinik olarak düzelme gösteren olgular remisyonda kabul edilmiştir. Tedavi sırasında ya da tedavi sonrasında klinik olarak kötüleşen ve kemik iliği aspirasyonu değerlendirmesinde % 5 üstünde blastik aktivite saptanan olgular, rezistans-progresif hastalık, remisyona sonrası klinik veya laboratuvar olarak hastalık tekrarlama da rölaps olarak kabul edilmiştir.

NHL olgularına, LMT+89 ya da LMB-89 tedavi protokolünden uygun olanı başlanmış olup (Tablo 6), klinik ve radyolojik düzelme saptanan olgular remisyona olarak değerlendirildi. Klinikte kötüleşme ve radyolojik görünümde düzelme saptanmayan olgular rezistans hastalık, tam remisyona sonrası hastalığın klinik ya da laboratuvar tekrarlama da rölaps olarak değerlendirildi.

3-Örneklerin Çalışılması

Olgulardan alınan plazma örneklerinden ELISA YÖNTEMİ İle sFasL, sFas ve CRP çalışılmıştır.

Tablo 6: Çalışma grubunun tedavi protokolü ve beyaz küre değerleri

SIRA	AD-SOYAD	YAŞ(Yılı)	CİNS	TANI	TEDAVİ PROTOKOLÜ	BEYAZ KÜRE (mm ³)	SONUÇ
1	HAMI YALÇIN	2,5	E	ALL	BFM-95/SRG	16000	R
2	OGUZ ŞENGÜN	4	E	ALL	BFM-95/SRG	5500	R
3	HÜSEYİN TALAN	9,5	E	ALL	BFM-95/SRG	222000	EX
4	MUSLU ZAVLAK	2,5	E	ALL	BFM-95/SRG	100000	R
5	HAKKI SAZAK	16	E	ALL	BFM-95/MRG	400	R
6	EGECAN KIROĞLU	1,5	E	ALL	BFM-95/MRG	1610	EX
7	BARAN GAYGUSUZ	4 ay	E	ALL	BFM-95/MRG	4830	R
8	NADIR AVCI	11ay	E	ALL	BFM-95/MRG	85000	R
9	TUNAHAN SARI	4	E	ALL	BFM-95/HRG	217000	R
10	MELİKE KURAMA	5	K	ALL	BFM-95/SRG	10500	R
11	SENA SULAK	2,5	K	ALL	BFM-95/SRG	10900	EX
12	ECEM KISALAR	2,5	K	ALL	BFM-95/HRG	220400	R
13	YAREN GÜLSEN	3	K	ALL	BFM-95/SRG	13700	R
14	KUBRA CANSIZ	6	K	ALL	BFM-95/MRG	17000	R
15	SUNA MAMEDOV	9	K	ALL	BFM-95/SRG	7300	R
16	HAZNE KAYA	7	K	ALL	BFM-95/HRG	3820	R
17	HAVVA AYDOĞDU	13	K	ALL	BFM-95/MRG	72500	R
18	GULBEDEN ÇOT	7	K	ALL	BFM-95/MRG	205000	R
19	YASİN ÖZER	10	E	NHL	LMB-89/grup-B	7150	R
20	ENGİN BAMBAL	12	E	NHL	LMB-89/grup-B	12800	R
21	GÖKHAN AYDIN	6	E	NHL	LMB-89/grup-B	9000	R
22	KEMAL METİN	7	E	NHL	LMB-89/grup-B	14600	R
23	KEZBAN DİLEKCAN	5	K	NHL	LMT-89/grup-B	8400	R
24	AŞKIN UYHAN	10	K	NHL	LMT-89/grup-B	10600	EX
25	GAMZE ÖZ	9	K	NHL	LMT-89/grup-B	41000	R

(R) remisyon, (EX) eksitüs, (E) erkek, (K) kız, (T) tanı

3.1-ELISA Yöntemi

Enzimli immün deney, antijen-antikor ilişkisini antikorlara bağlanmış bir enzimin aktivitesini izlemekle araştırma temeline dayanır. Homojen ve heterojen olmak üzere iki büyük katagorisi vardır. Heterojen enzim, immün deney bağlanmış ve bağlanmamış reaktanların fiziksel ayrılmalarını temel alır. Homojen enzim immün deneyde, buna gerek yoktur. En çok kullanılan şekli, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) dır. ELISA heterojen enzim immün deneye örnektir. ELISA ile antijen ve antikor aranabilir.

3.2-ELISA ile Antikor Aramak

Bilinen antijen plastik bir yüzeye yapıştırılır. Plastik tüp, plastik platelin çukurları, plastik boncuklar bu iş için kullanılmaktadır.

Antikor aranacak serum eklenir. Bir süre beklendikten sonra, dökülür ve yıkanır. Serumda, antijene yönelik antikor varsa, antijene bağlanacak ve yıkama ile gitmeyecektir.

Bir enzim ile işaretlenmiş insan antiglobulini seruma eklenir. Bir süre beklenir, yıkanır. İncelenmekte olan serumda antijene yönelik antikor varsa, antijene yapışmış olacağından, son eklenen ve enzim ile işaretlendirilmiş, insan antiglobulini tutacak ve yıkama ile gitmeyecektir. Şimdi antijenli yüzeyde, antijen-antikor-enzimli insan antiglobulini yapışmış durumdadır. Enzime uygun bir kromojen substrat eklenir. Sisteme yapışmış enzim, bu substratı parçaladığında ortaya çıkan renk, yapılacak kalorimetrik ölçümlerde ölçülerek, bağlanmış olan enzim, dolayısıyla bağlanmış olan antikor hakkında bilgi verir.

3.3-ELISA ile Antijen Aramak

Bu defa plastik yüzeye bilinen antikor yapıştırılır. Antijen aranacak materyal eklenir. Bir süre beklenir ve yıkanır. Bu materyalde, uygun

antijen varsa, plastik yüzeydeki antikora bağlanacağından yıkama ile gitmez.

Enzim ile işaretlenmiş antikor eklenir. Bir süre beklendikten sonra yıkanır. İlk işlemde antikor antijen ile bağlanmış ise eklenen enzimli antikorda sisteme bağlanır ve yıkama ile gitmez. Aranmakta olan antijenin en az 2 determinantı olmalıdır.

Eklenen enzim substratı sisteme bağlanmış enzim ile reaksiyon verir. Reaksiyonda oluşan rengin kalorimetrik olarak ölçülmesiyle bağlanmış enzimli antikor dolayısıyla varsa mevcut antijenin miktarı hakkında bilgi edinilir.

Burada aranacak her antijen için ayrı enzim ile bağlanmış bir antikorun elde bulunması zorunluluğu vardır. ELISA'da kullanılan başlıca enzim ve substratları, peroksidaz, alkalen fosfataz, beta galaktosidaz'dır.

Bu çalışmada MBL (MEDICAL AND BIOLOGICAL LABORATORIES) firmasının geliştirdiği sFas Ligand ELISA KIT'i, sFas ELISA KIT'i ve ROCHE/Hitachi 704 KIT'i kullanıldı.

4-sFas Ligand Kiti

Bu kitin çalışma prensibi şöyledir: farklı 2 epitopa karşı Fas ligand monoklonal antikorlar kullanarak solubil Fas ligandını ölçer. 4H9 anti-Fas ligand ile kaplanmış kuyucuklara, ölçülecek örnek eklenir ve inkübasyona bırakılır. Daha sonra yıkanır. Bir peroksidaz ile konjuge edilmiş 4A5 anti-Fas ligand monoklonal antikor eklenir ve inkübe edilir. Kompleks tekrar yıkanır. Gelişen rengi stabilize etmek için enzim reaksiyonunun sonunda asit solüsyonu eklenir. Daha sonra her bir kuyucuğun optik yoğunluğu mikropalak okuyucuda 450 nm'de okunur.

4.1-Materyal ve Gereçler

- Mikroplak okuyucu
- Yıkama şişesi
- Mikro ayarlama pipeti
- Çoklu değişkenli mikropipet
- Polivinil 96 kuyucuklu mikroplak
- Mikroplak kutusu
- Aktif madde kutusu
- Distile su

4.2-Örneklerin Hazırlanması

Çalışmada EDTA'lı plazma kullanıldı. Her bir örnek 1:2 oranında çalışma solüsyonu ile seyreltildi.

1. Basamak (Örneklerin inkübasyonu)

96 kuyucuklu polivinil plağa standart ve çalışma örneklerinden 150 µl eklendi. Sonra çok kanallı pipet kullanılarak eşzamanlı olarak antikor ile kaplı kuyucuklara 100 µl transfer edildi. Oda ısısında (20°C~25°C) 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

2. Basamak (Yıkama)

Oda ısısında (20°C~25°C) mikroplak yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkanır.

3. Basamak (Konjugat ile inkübasyon)

100mcl konjugat solüsyonu, çok kanallı pipet ile her bir kuyucuğa eklenerek oda ısısında (20°C~25°C) 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

4. Basamak (Yıkama)

Oda ısısında (20°C~25°C) mikroplak yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkanır.

5. Basamak (Substrat inkübasyonu)

Her bir kuyucuğa substrat solüsyonundan 100 µl eklendi ve oda ısısında (20°C~25°C) 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

6. Basamak (Reaksiyonu durdurma)

Her bir kuyucuğa durdurma solüsyonundan 100 µl eklenir.

4.3-Okunma

Her bir kuyucuktaki absorbands 450 nm'de okutuldu.

4.4-Testin Hassasiyeti

Serumda 0.1 ng/ml' ye kadar ölçüm yapabilmektedir. Çalışmada hesaplanan standart ortalama değerlerine göre 0,315 ng/ml'nin altındaki değerler negatif olarak kabul edildi.

5-sFas Kit'i

Bu kitin çalışma prensibi şöyledir: sFas ELISA KIT'i sFas proteinini ölçer. Analizde Fas antikorlarına karşı 2 farklı epitop kullanılır. Antikorların bir tanesi, poliklonal antikor ve intrasellüler bölgeyi tanımlar diğeri ise, monoklonal antikor olup ekstrasellüler bölgeyi tanımlar. Anti Fas ile duvarları kaplanmış kuyucuklara ölçülecek materyal yada standart eklenir ve inkübe edilir. Kompleks yıkanır. Yıkandıktan sonra peroksidaz ile konjuge edilmiş anti-Fas monoklonal antikorlar eklenir ve inkübe edilir. Sonra tekrar yıkanır. Gelişen rengi stabilize etmek için enzim reaksiyonunun sonunda asit solüsyonu eklenir. Daha sonra her bir kuyucuğun optik yoğunluğu mikropalak okuyucuda 450 nm'de okunur.

5.1-Materyal ve Gereçler

- Mikropalak okuyucu
- Yıkama şişesi

- Mikro ayarlama pipeti
- Çoklu değişkenli mikropipet
- Polivinil 96 kuyucuklu mikroplak
- Mikroplak kutusu
- Aktif madde kutusu
- Distile su

5.2-Örneklerin Hazırlanması

1. Basamak (Örneklerin inkübasyonu)

96 kuyucuklu polivinil plağa standart ve çalışma örneklerinden 150 µl eklendi. Sonra çok kanallı pipet kullanılarak eşzamanlı olarak antikor ile kaplı kuyucuklara 100 µl transfer edildi. Oda ısısında (20°C~25°C) 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

2. Basamak (Yıkama)

Oda ısısında (20°C~25°C) mikroplak yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkanır.

3. Basamak (Konjugat ile inkübasyon)

100mcl konjugat solüsyonu, çok kanallı pipet ile her bir kuyucuğa eklenerek oda ısısında (20°C~25°C) 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

4. Basamak (Yıkama)

Oda ısısında (20°C~25°C) mikroplak yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkanır.

5. Basamak (Substrat inkübasyonu)

Her bir kuyucuğa substrat solüsyonundan 100 µl eklendi ve oda ısısında (20°C~25°C) 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

6. Basamak (Reaksiyonu durdurma)

Her bir kuyucuğa durdurma solüsyonundan 100 µl eklenir.

5.3-Okunma

Her bir kuyucuktaki absorbans 450 nm'de okutuldu.

5.4-Testin Hassasiyeti

Serumda 0.5 ng/ml'ye kadar ölçüm yapabilmektedir. Çalışmada hesaplanan standart ortalama değerlerine göre 1,25 ng/ml'nin altındaki değerler negatif olarak kabul edildi.

6-ROCHE/Hitachi CRP Kiti

İnsan serum ve plazmasında invitro olarak immunoturbidimetrik yöntem ile kalitatif olarak CRP düzeylerinin ölçülmesini sağlar. Bu kit ile CRP ölçümü immünolojik olarak aglütinasyon esasına dayanır.

6.1-Preparatların hazırlanması

- Örneklere sıra ile tampon (TRIS/HCL) ve anti-CRP antikor eklenir.
- Oluşan antijen /antikor kompleksi aglütinasyona uğrar.
- Bu yapı daha sonra turbidimetrik olarak ölçülür.

6.2-Değerlendirme

Test 0,3-24 mg/dl arasında ölçüm yapabilmektedir. Çalışmada 1 mg/dl'nin altındaki değerler negatif olarak kabul edildi.

6.3-Testin hassasiyeti

Testin hassasiyeti 0,3 mg/dl' dir.

7-Kemik İliği ve Doku Biyopsilerinin Patolojik Değerlendirilmesi

Olgulara ait kesitlere immünohistokimyasal olarak "HRP (Horse Radish Peroksidase)-streptavidin complex" yöntemiyle Fas (APO-1,CD95) (C-20K: sc 715K Santa Cruz) ve FasL ((N-20)K: 834K, Santa Cruz) ve LSAB+ yöntemiyle monoklonal P27 KİP1 (M7203, Dako) immun boyaları uygulandı.

Fas ve FasL boyları, içerisinde dilüsyon öncesi primer antikor, "peroksidase blocking", "serum block", ikincil antikor, HRP-Streptavidin kompleksi ve DAB kromojeni bulunduran hazır set kullanıldı.

7.1-Preparatların Hazırlanması

İmmünohistokimyasal olarak boyanacak dokular, 4-5µ kalınlığında kesilerek, "Dako ChemMate TM 500 capillary Gap microscope slides (75micro)" isimli hazır kromaliumlu lamlar üzerine alındı. 56°C'de etüvde yaklaşık 2 saat eritilip, ksilolde 2 kez 5'er dakika deparafinize edildi. Daha sonra azalan derecelerde alkolden geçirilip, 1 dakika distile suya alınarak hidrate edildi. Lamlar üzerindeki suyun fazlası dokuya zarar vermeden kurutma kağıdı ile alındı ve doku örneklerinin çevresi dakopen ile çizilerek sınırlandırıldı. Daha sonra kesitlere antijenlerin yeniden kazandırılması amacıyla "Antigen Retrieval" işlemi uygulandı. Bu işlem, 0,01M sitrat solusyonu (trisodyum sitrat) içinde pH: 6.0'da sıvı seviyesi lamların üzerini kapatacak ve kesitler kurumayacak şekilde 95°C'de 5 dakika mikrodalga fırında kaynatılması ile gerçekleştirildi. Daha sonra oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakıldı. 2 kez 2 dakika distile su ile yıkanarak fazla suyu kurulandı.

Fas ve FasL değerlendirilmesi yapılacak ALL olgularına ait kemik iliği yayma örnekleri, kendi boya seti içinde yer alan "peroksidase blocking" den 3'er damla damlatılıp, 5 dakika bekletilip, 2 kez PBS ile 2'şer dakika yıkanıp kurulandı ve "serum block" 3' er damla damlatılarak 20 dakika bekletildi ve yıkanmadan kurulanıp, hemen dilüsyon öncesi birincil antikordan 3'er damla uygulanarak 2 saat oda sıcaklığında kapalı "hümidifier chamber"de inkübe edildi. Daha sonra benzer şekilde yıkanıp, ikincil antikor ile 30 dakika inkübe edildi. Bu işlemden sonra yıkanan preparatlar "HRP-Strepavitin complex" uygulanarak 30 dakika bekletilip yıkandı. Daha sonra DAB hazırlanıp, kesitlerin üzerini kapatacak miktarda damlatılarak kahverengi renk değişikliği gözlemlendi. Bu aşamada 5 dakika tutulan preparatların soluk

boyandığı görülerek bekletme süresi 15 dakikaya çıkarıldı. Daha sonra preparatlar distile suyla 2 dakika 2 kez yıkandı ve 10 saniye Hemotoksilen ile zıt boyama yapıldı. eşme suyunda yıkanan preparatlar dereceleri gittikçe artan alkolden geçirilerek 2 kez 1'er dakika xylolde bekletilip, değerlendirilmek üzere balsam ile kapatıldı.

Pozitif kontrol olarak lenf düğümü kesitleri, negatif kontrol için birincil antikor yerine PBS damlatıldı.

7.2-Değerlendirme

Fas ve FasL boyalarında sitoplazmik boyanma pozitif kabul edildi. Semikantitatif yöntem ile boyanan alan yzdeleleri ve boyanma Őiddetleri saptandı.

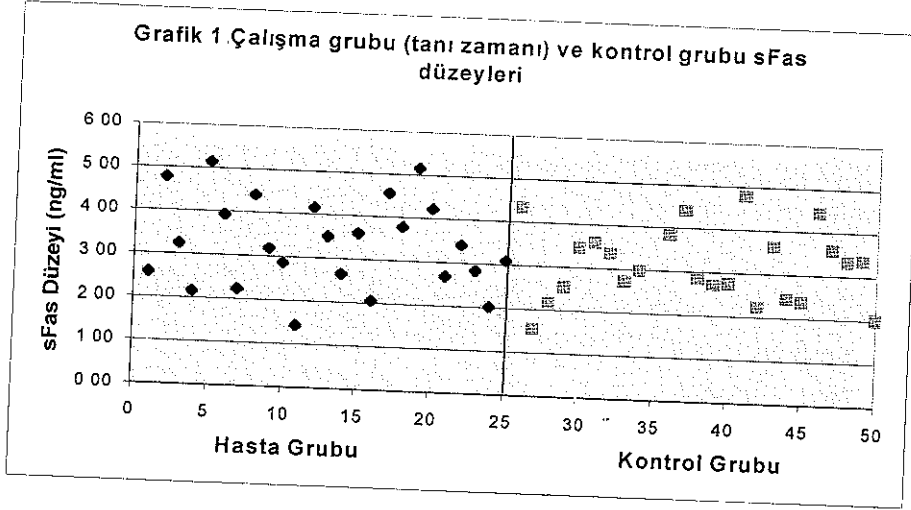
Çalışmamızda istatistiksel analiz testleri olarak; birbirinden bağımsız iki grubu karşılaştırmada Mann Whitney U testi, aynı hastaların tanı ve remisyon dönemindeki bulgularına ait karşılaştırmada nonparametrik Wilcoxon işaretlenmiş sıra testi, parametrik eşleştirilmiş t testi, değişkenler arası ikili ilişkileri saptamada nonparametrik Spearman korelasyon testi kullanılmıştır. İstatistiksel analiz SPSS 10.0.1 yazılımı ile yapılmıştır.

IV. BULGULAR

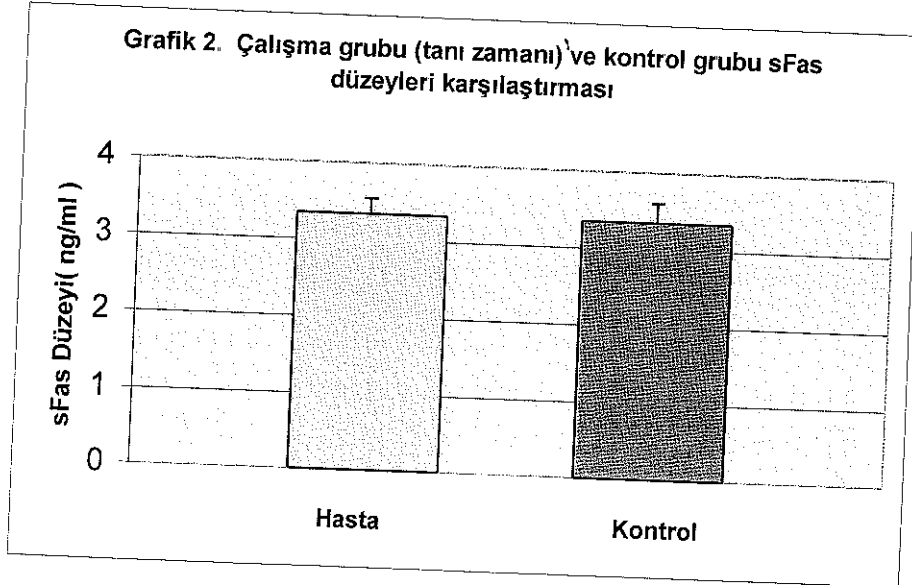
Çalışma grubunun verileri Tablo 7'de gösterilmiştir.

1. sFas serum düzeyleri

1.1. Çalışma grubu (tanı zamanı) ve kontrol grubu sFas düzeyleri (Grafik 1).



Çalışma grubu (tanı zamanı) ile kontrol grubu sFas düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktu (3.34 ± 1.02 ng/ml v 3.14 ± 0.84 ng/ml, $p > 0.05$, Mann-Whitney U testi, Grafik 2).



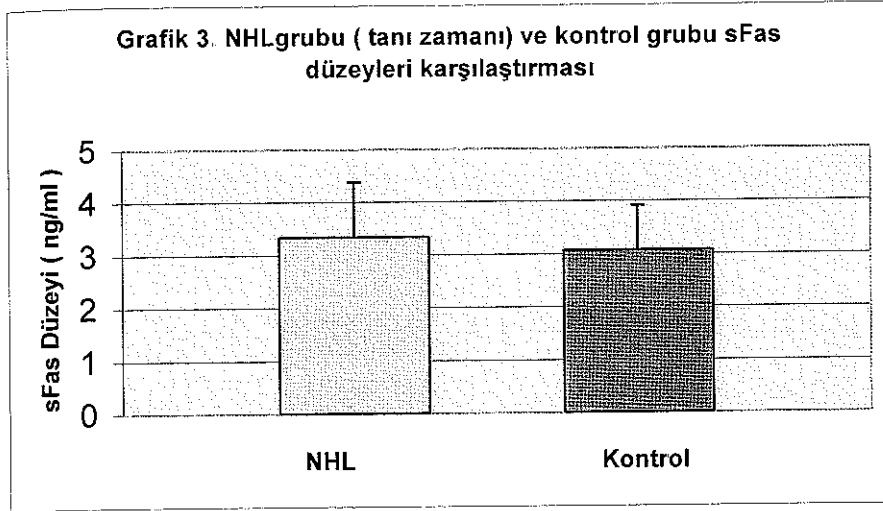
Tablo 7: Çalışma ve kontrol gruplarının toplu sonuçları

SIRA	AD-SOYAD	sFas(T)	sFas(R)	sFasL(T)	sFasL(R)	Fas/FasL(T)	Fas/FasL(R)	Fas/FasL(T)	Fas/FasL(R)	CRP(T)	CRP(R)	TANI	sFas(k1)	sFasL(k2)
1	HAMI YALÇIN	2,57	5,31	0,315	0,315	- / -	- / -	- / -	- / -	0,62	0,19	ALL	4,33	0,62
2	OĞUZ ŞENGÜN	4,77	4,1	1,16	0,315	- / -	%50 / %5	%50 / %5	%50 / %5	4,37	1,44	ALL	1,56	0,315
3	HÜSEYİN TALAN	3,24	3,2	0,315	0,315	- / %1	%1 / -	%1 / -	%1 / -	3,38	0	ALL	2,17	0,315
4	MUSLU ZAVLAK	2,16	2,41	0,315	0,315	%1 / -	- / -	- / -	- / -	0,1	1,19	ALL	2,54	0,315
5	HAKKI SAZAK	5,14	4,92	1,92	0,315	%1 / -	%80 / %1	%80 / %1	%80 / %1	0,45	0,21	ALL	3,45	0,315
6	EGECAN KIROGLU	3,93	3,56	6,16	0,315	- / -	- / -	- / -	- / -	7,33	0,46	ALL	3,59	0,315
7	BARAN GAYGUSUZ	2,23	5,04	0,315	0,315	%1 / -	%50 / -	%50 / -	%50 / -	1,04	0,11	ALL	3,34	0,315
8	NADIR AVCI	4,41	3,57	4,6	0,315	- / -	- / -	- / -	- / -	0,31	0,05	ALL	2,72	0,315
9	TUNAHAN SARI	3,18	3,06	0,315	0,315	%5 / -	- / -	- / -	- / -	2,97	15,2	ALL	2,97	0,315
10	MELİKE KURAMA	2,86	1,83	0,315	0,315	- / %1	- / -	- / -	- / -	0,33	0,07	ALL	8,31**	0,315
11	SENA SULAK	1,43	1,6	0,315	0,315	- / -	- / -	- / -	- / -	1,64	0,17	ALL	3,83	0,315
12	ECEM KISALAR	4,16	4,43	0,315	0,315	- / -	%80 / %80	%80 / %80	%80 / %80	13,1	0	ALL	4,4	0,315
13	YAREN GÜLSEN	3,5	2,32	0,315	0,315	- / -	- / -	- / -	- / -	0,12	0	ALL	2,83	0,315
14	KÜBRA CANSIZ	2,64	3,45	0,315	0,315	- / %70	- / -	- / -	- / -	2,23	2,25	ALL	2,71	0,315
15	SUNA MAMEDOV	3,6	4,37	2,1	0,315	- / %1	- / -	- / -	- / -	3,41	0,88	ALL	2,75	0,315
16	HAZNE KAYA	2,06	3,29	1,84	0,315	- / -	- / -	- / -	- / -	23	1,02	ALL	4,77	1,22
17	HAVVA AYDOĞDU	4,55	4,7	0,315	0,315	- / -	%1 / -	%1 / -	%1 / -	0,11	0,03	ALL	2,23	0,315
18	GÜLBEDEN ÇOT	3,78	6,17	0,315	0,315	%5 / -	- / -	- / -	- / -	1,46	0,11	ALL	3,63	0,315
19	YASIN ÖZER	5,15	2,14	0,315	0,315	%80 / %20	- / -	- / -	- / -	0,17	1,7	NHL	2,43	0,315
20	ENGİN BAMBAL	4,22	3,37	0,315	0,315	%70 / -	- / -	- / -	- / -	1,03	0,14	NHL	2,36	0,315
21	GÖKHAN AYDIN	2,68	4,11	1,1	0,315	%80 / -	- / -	- / -	- / -	1,03	0,11	NHL	4,45	0,315
22	KEMAL METİN	3,42	3,05	0,315	0,315	%70 / -	- / -	- / -	- / -	0,32	0	NHL	3,6	0,315
23	KEZBAN DİLEKCAN	2,83	5,15	0,315	0,315	%10 / %5	- / -	- / -	- / -	0,16	0,3	NHL	3,32	0,315
24	AŞKIN UYHAN	2,02	*	2,02	*	%70 / -	- / -	- / -	- / -	0,37	*	NHL	3,34	0,315
25	GAMZE ÖZ	3,08	3,37	0,315	0,315	- / %90	- / -	- / -	- / -	0,41	0,49	NHL	2,01	0,315

(*) Remisyona girmeden kaybedildi. (**) kontrol olup beklenenden yüksek değere sahip olduğu için çalıtma dışı bırakılmıştır. sFas, sFasL (ng/ml), CRP (mg/dl), (T) tani, (R) remisyon, (K₁) kontrol-1, (K₂) kontrol-2,

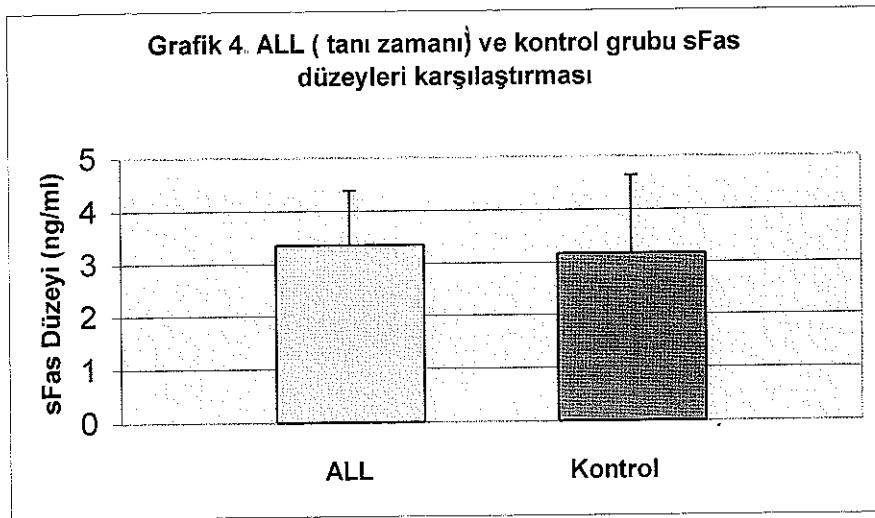
1.2. NHL grubu (tanı zamanı) ve kontrol grubu sFas düzeyleri

NHL grubu (tanı zamanı) ile kontrol grubu sFas düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktu (3.34 ± 1.05 ng/ml v 3.07 ± 0.85 ng/ml, $p > 0.05$, Mann-Whitney U testi, Grafik 3).



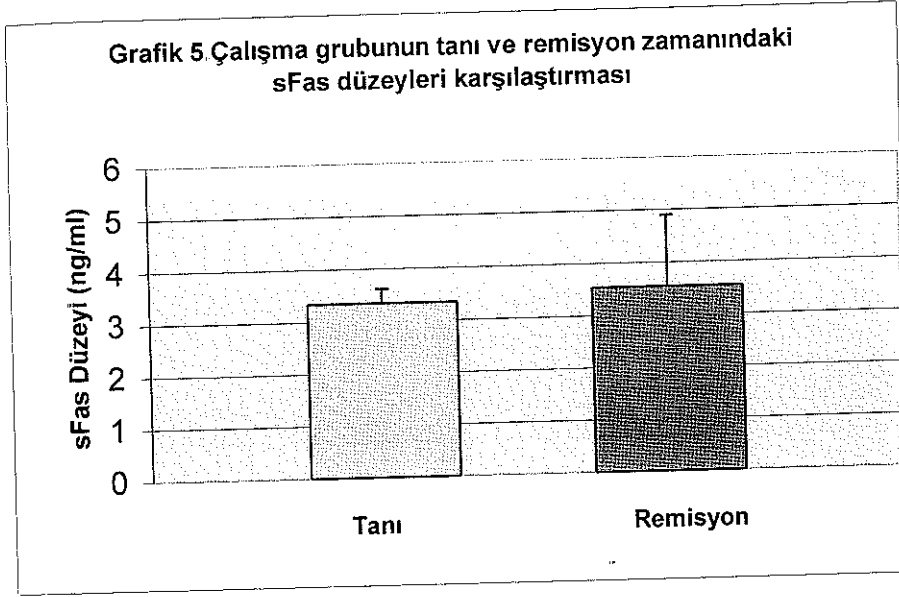
1.3. ALL grubu (tanı zamanı) ve kontrol grubu sFas düzeyleri

ALL grubu (tanı zamanı) ile kontrol grubu sFas düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktu (3.35 ± 1.04 ng/ml v 3.17 ± 0.86 ng/ml, $p > 0.05$, Mann-Whitney U testi, Grafik 4).



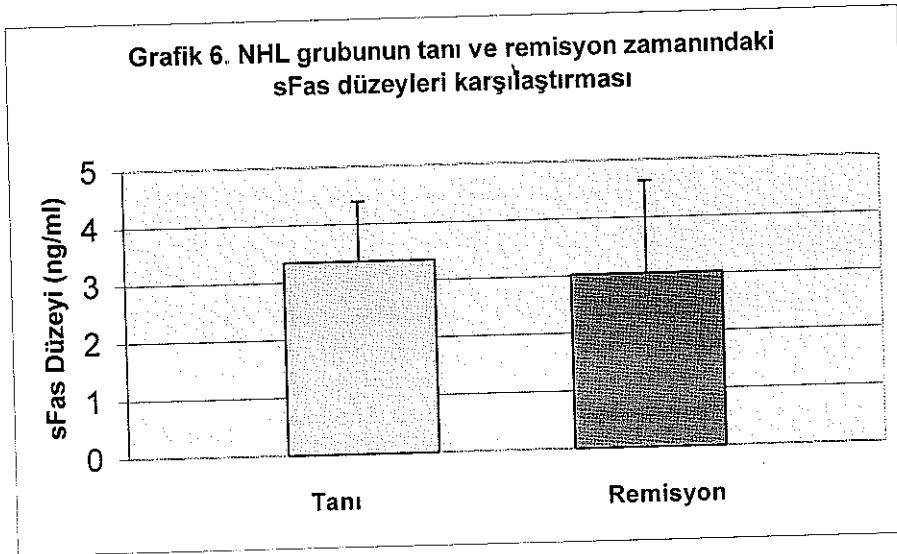
1.4. Çalışma grubunun tanı ve remisyon zamanındaki sFas düzeyleri

Çalışma grubunun tanı ve remisyon zamanındaki sFas düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktu (3.34 ± 1.02 ng/ml v 3.54 ± 1.37 ng/ml, $p > 0.05$, Eşleştirilmiş t testi, Grafik 5).



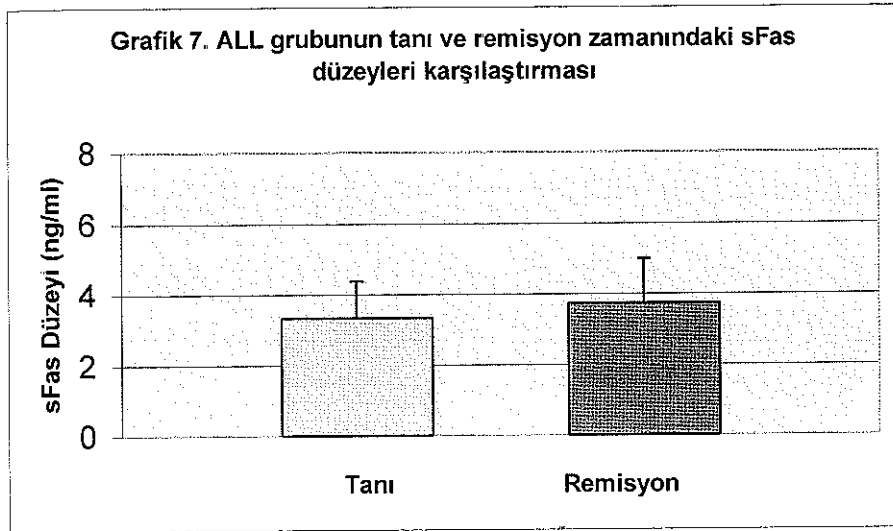
1.5. NHL grubunun tanı ve remisyon zamanındaki sFas düzeyleri

NHL grubunun tanı ve remisyon zamanındaki sFas düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktu (3.34 ± 1.05 ng/ml v 3.02 ± 1.62 ng/ml, $p > 0.05$, Wilcoxon işaretlenmiş sıra testi, Grafik 6).



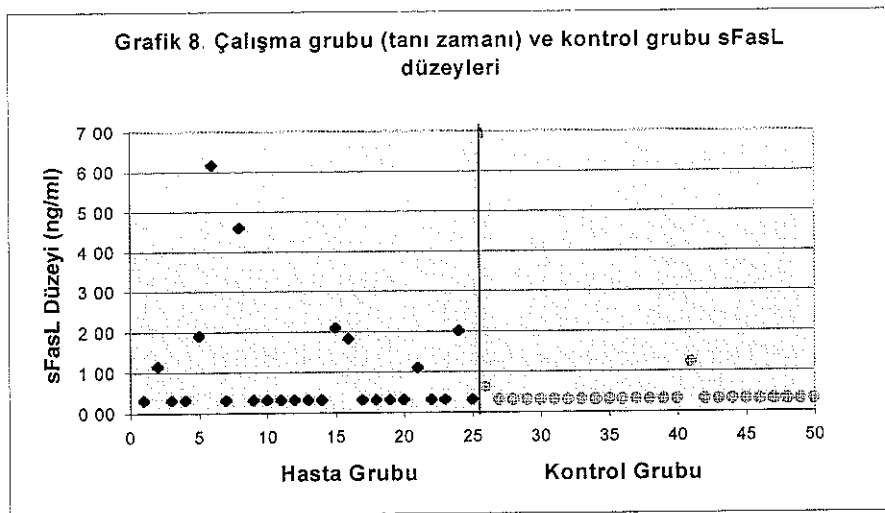
1.6. ALL grubunun tanı ve remisyon zamanındaki sFas düzeyleri

ALL grubunun tanı ve remisyon zamanındaki sFas düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktu (3.34 ± 1.04 ng/ml v 3.74 ± 1.25 ng/ml, $p > 0.05$, eşleştirilmiş t testi, Grafik 7).

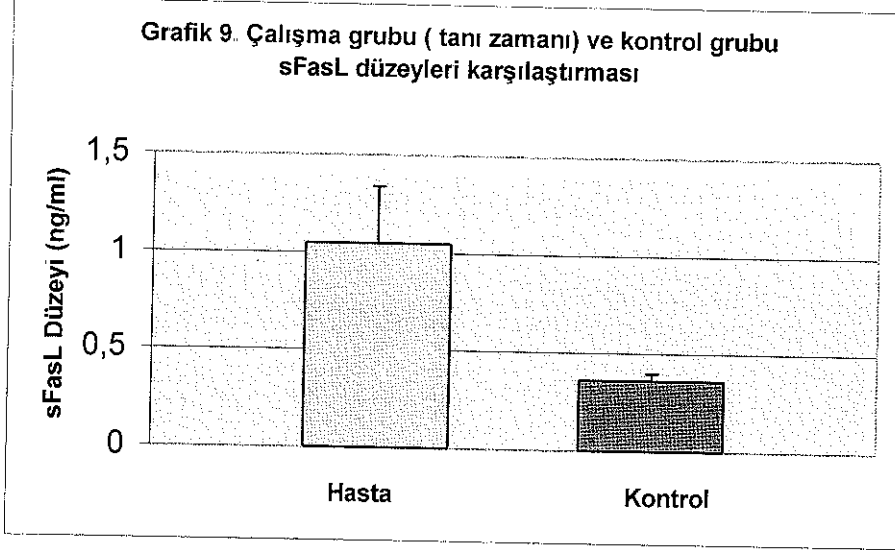


2. sFasL serum düzeyleri

2.1. Çalışma grubu (tanı zamanı) ve kontrol grubu sFasL düzeyleri (Grafik 8).

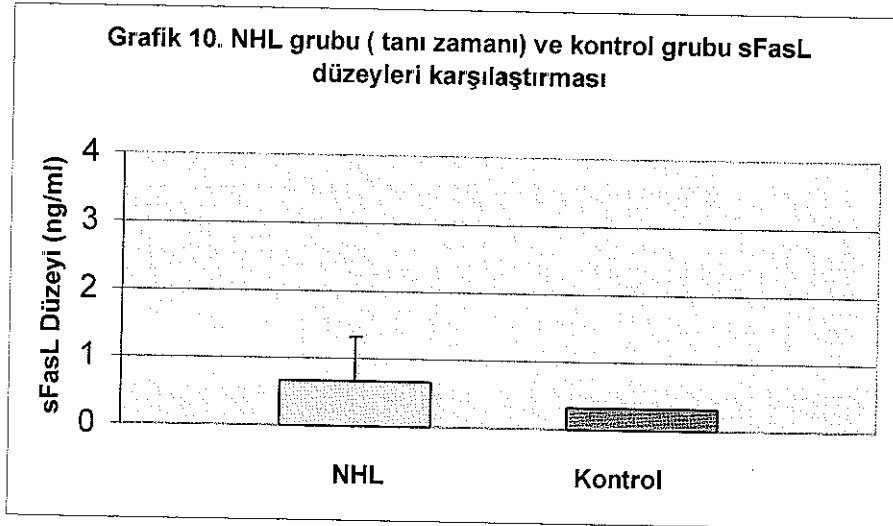


Çalışma grubu (tanı zamanı) ile kontrol grubu sFasL düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark vardı (1.05 ± 1.46 ng/ml v 0.37 ± 0.19 ng/ml, $p=0.029$), Mann-Whitney U testi, Grafik 9)



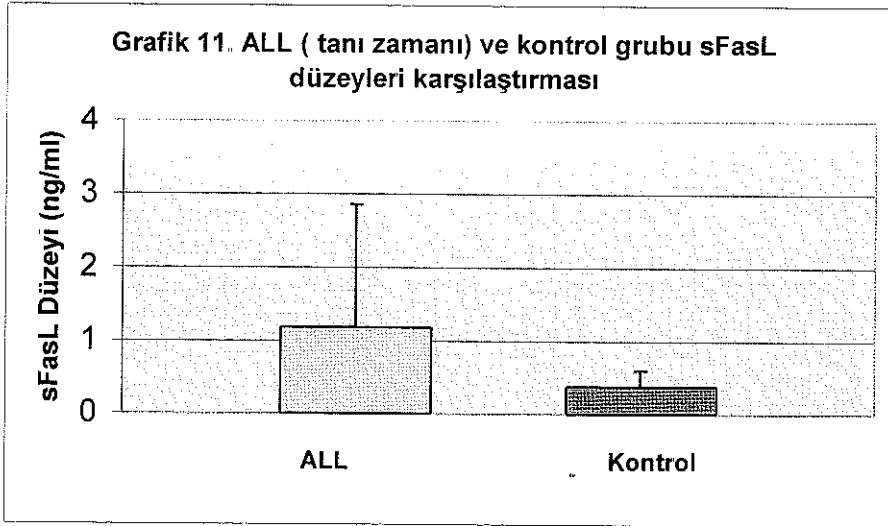
2.2. NHL grubu (tanı zamanı) ve kontrol grubu sFasL düzeyleri

NHL grubu (tanı zamanı) ile kontrol grubu sFasL düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktu (0.67 ± 0.66 ng/ml v 0.32 ± 0.00 ng/ml, $p>0.05$, Mann-Whitney U testi, Grafik 10).



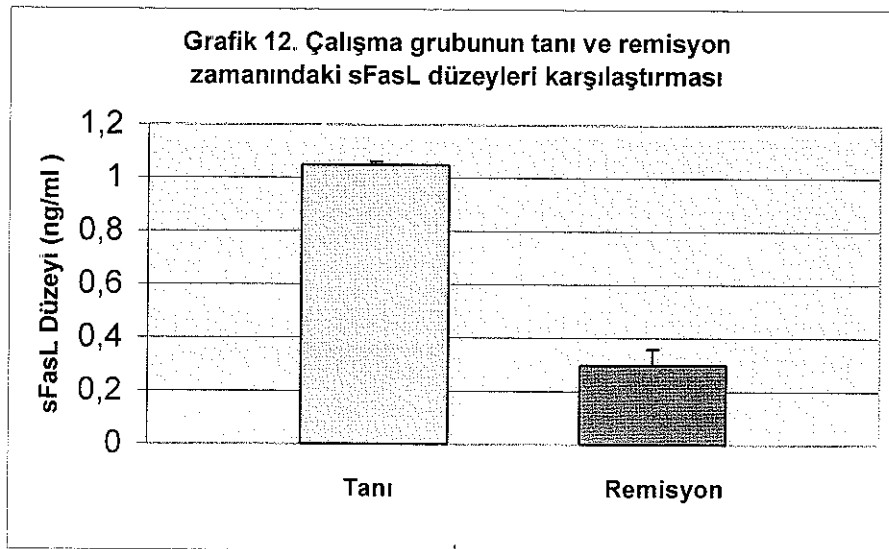
2.3. ALL grubu (tanı zamanı) ve kontrol grubu sFasL düzeyleri

ALL grubu (tanı zamanı) ile kontrol grubu sFasL düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktu (1.19 ± 1.67 ng/ml v 0.39 ± 0.23 ng/ml, $p > 0.05$, Mann-Whitney U testi, Grafik 11).



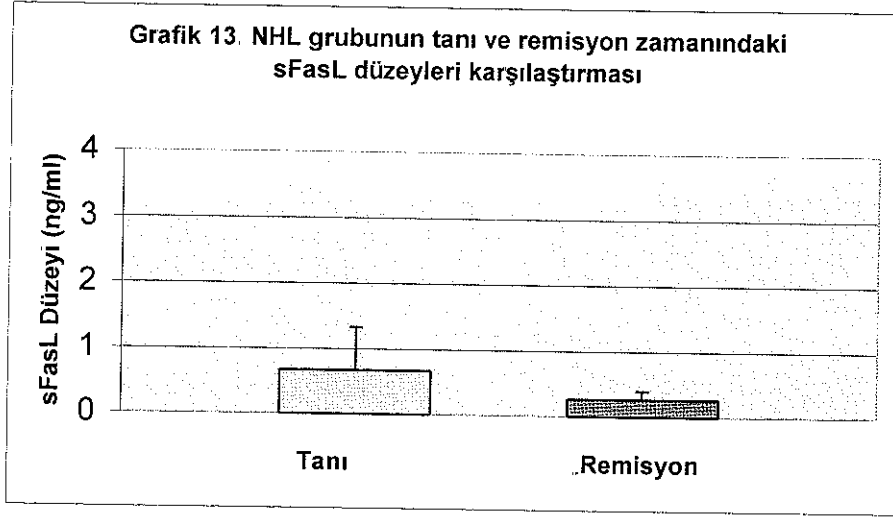
2.4. Çalışma grubunun tanı ve remisyon zamanındaki sFasL düzeyleri

Çalışma grubunun tanı ve remisyon zamanındaki sFasL düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark vardı (1.05 ± 1.46 ng/ml v 0.30 ± 0.06 ng/ml, $p = 0.012$, Wilcoxon işaretlenmiş sıra testi, Grafik 12).



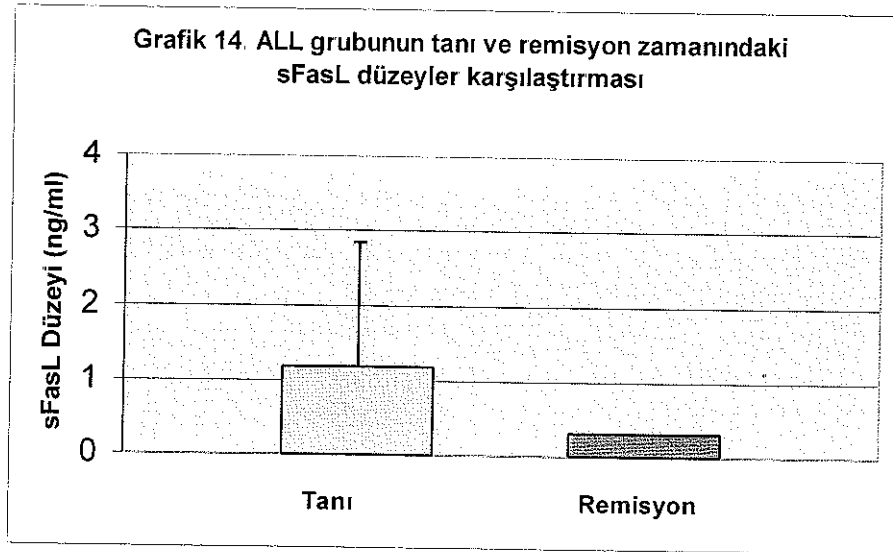
2.5. NHL grubunun tanı ve remisyon zamanındaki sFasL düzeyleri

NHL grubunun tanı ve remisyon zamanındaki sFasL düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktu (0.67 ± 0.66 ng/ml v 0.27 ± 0.12 ng/ml, $p > 0.05$, Wilcoxon işaretlenmiş sıra testi, Grafik 13).



2.6. ALL grubunun tanı ve remisyon zamanındaki sFasL düzeyleri

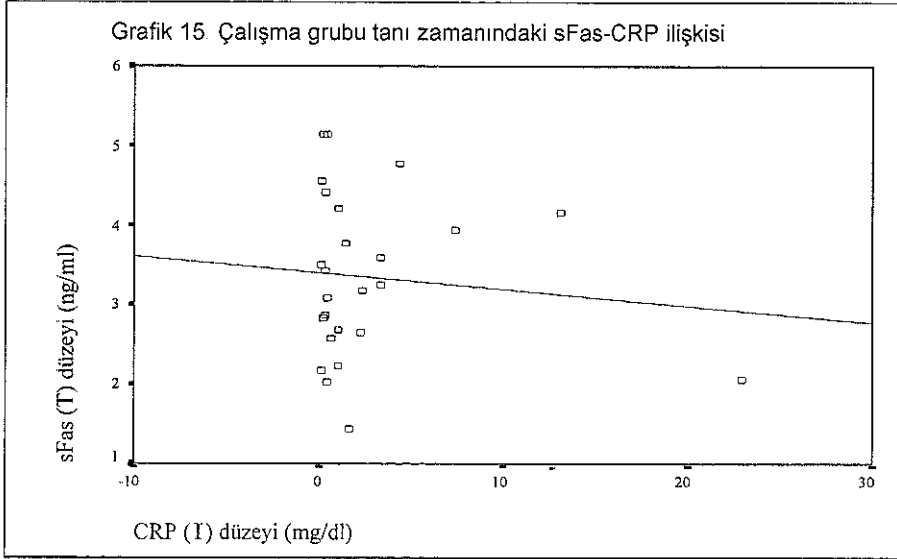
ALL grubunun tanı ve remisyon zamanındaki sFasL düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark vardı (1.19 ± 1.66 ng/ml v 0.31 ± 0.00 ng/ml, $p = 0.028$, Eşleştirilmiş t testi, Grafik 14).



3. sFas ile CRP arasındaki ilişki

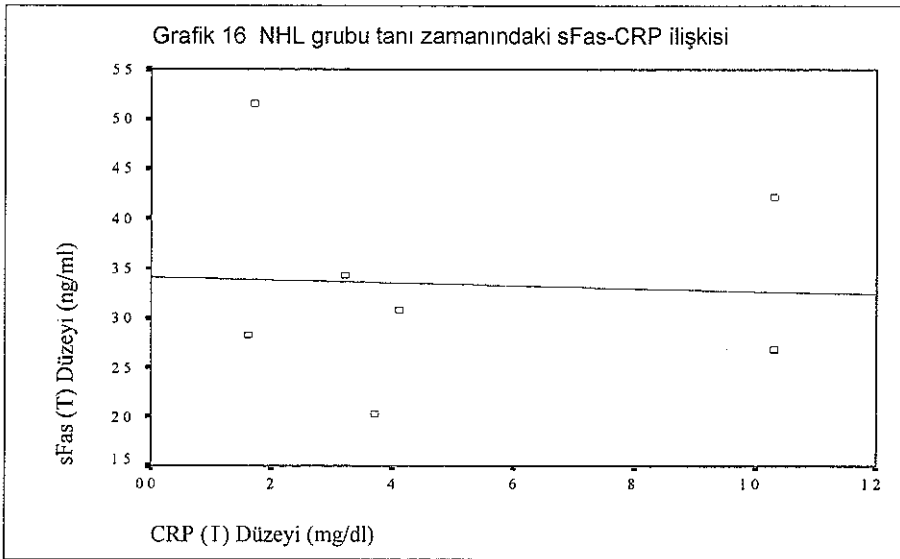
3.1. Çalışma grubunun tanı zamanındaki sFas-CRP ilişkisi

Çalışma grubu (tanı zamanı) sFas düzeyleri ile CRP değerleri arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($r: -0.046$, $p>0.05$, Spearman korelasyon analiz testi, Grafik 15)



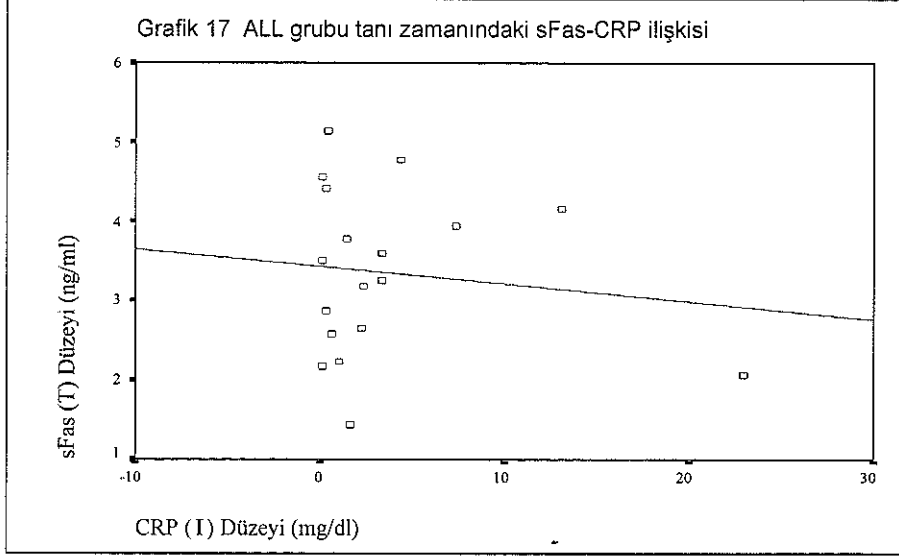
3.2. NHL grubunun tanı zamanındaki sFas-CRP ilişkisi

NHL grubu (tanı zamanı) sFas düzeyleri ile CRP değerleri arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($r:-0.050$, $p>0.05$ Spearman korelasyon analiz testi, Grafik 16).



3.3. ALL grubunun tanı zamanındaki sFas-CRP ilişkisi

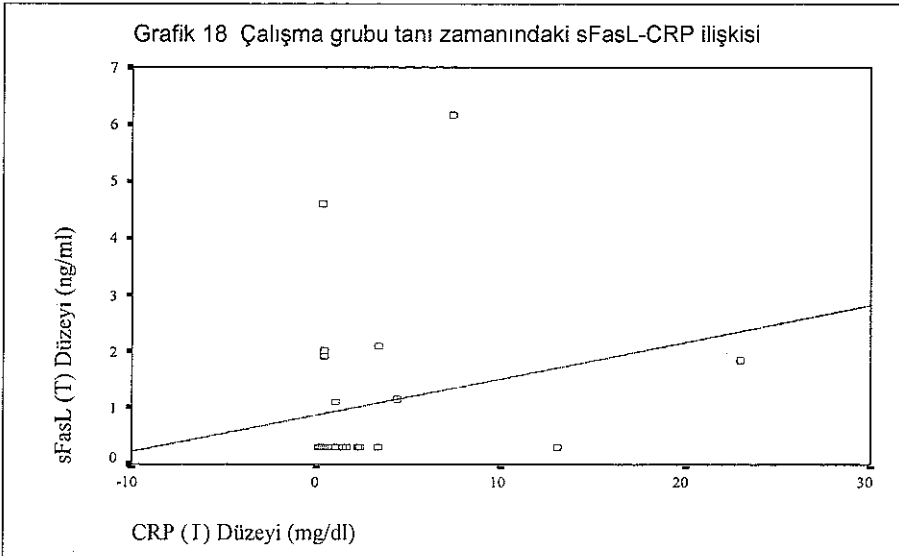
ALL grubu (tanı zamanı) sFas düzeyleri ile CRP değerleri arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($r:-0.13$, $p>0.05$, Spearman korelasyon analiz testi, Grafik 17)



4.sFasL ile CRP arasındaki ilişki

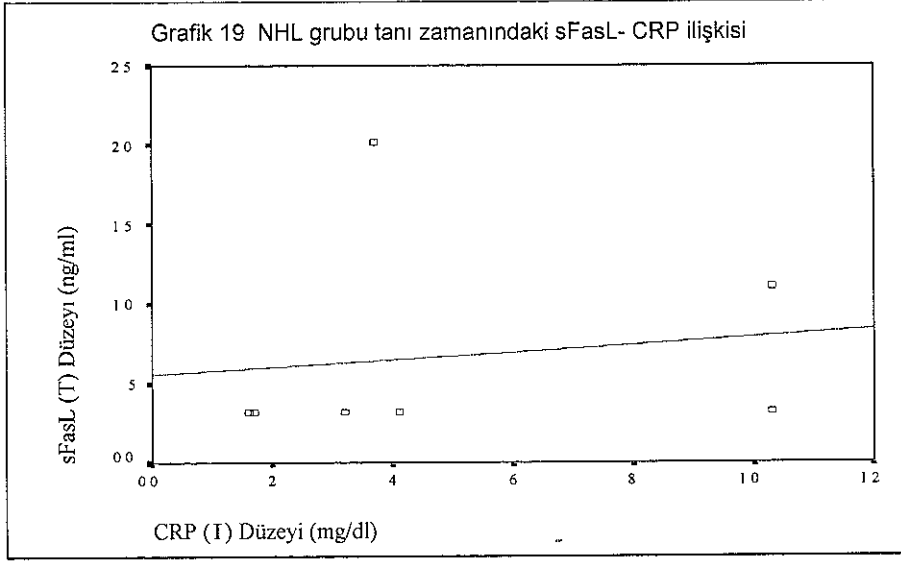
4.1. Çalışma grubunun tanı zamanındaki FasL-CRP ilişkisi

Çalışma grubu (tanı zamanı) sFasL düzeyleri ile CRP değerleri arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($r:-0.290$, $p>0.05$, Spearman korelasyon analiz testi, Grafik 18)



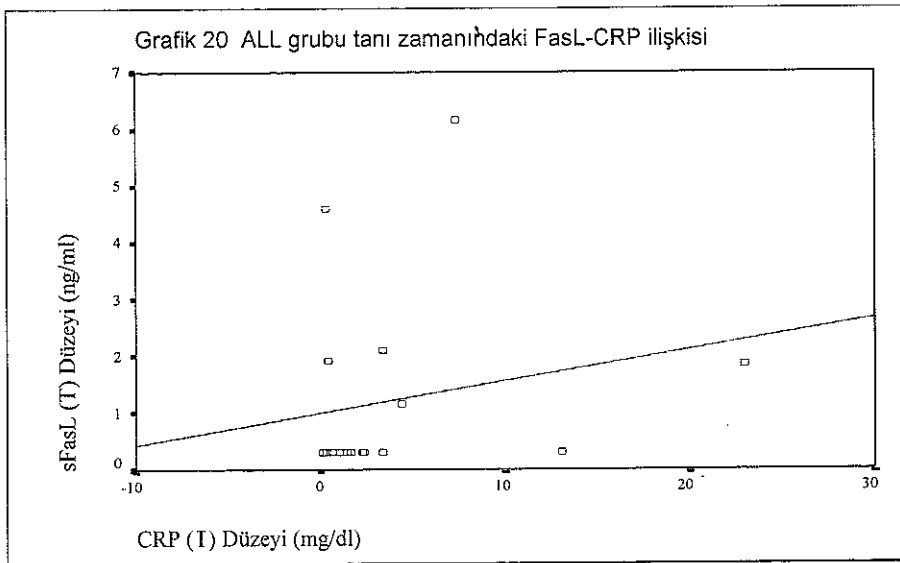
4.2. NHL grubunun tanı zamanındaki sFasL-CRP ilişkisi

NHL grubu (tanı zaman) sFasL düzeyleri ile CRP değerleri arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($r: -0.340$, $p>0.05$, Spearman korelasyon analiz testi, Grafik 19)



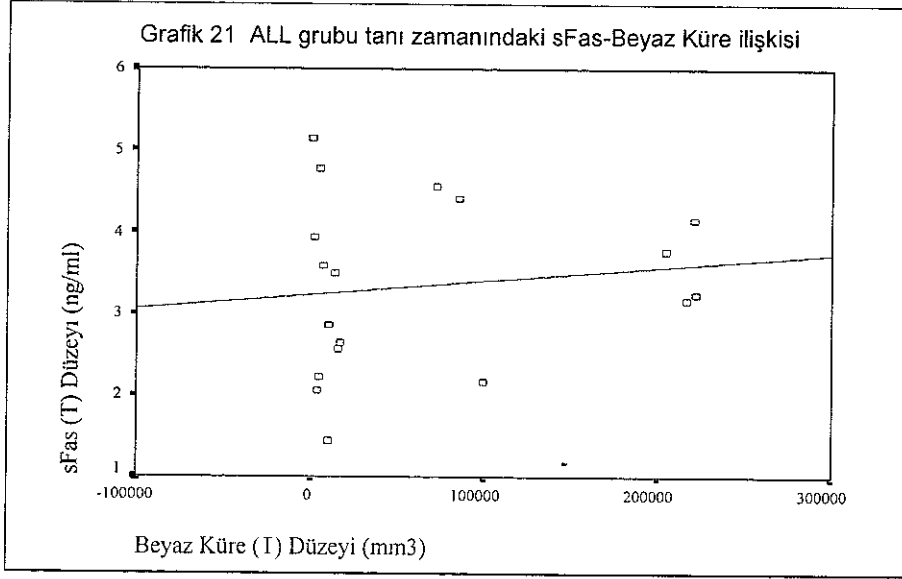
4.3. ALL grubunun tanı zamanındaki sFasL-CRP ilişkisi

ALL grubu (tanı zamanı) sFasL düzeyleri ile CRP değerleri arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($r: -0.320$, $p>0.05$, Spearman korelasyon analiz testi, Grafik 20)



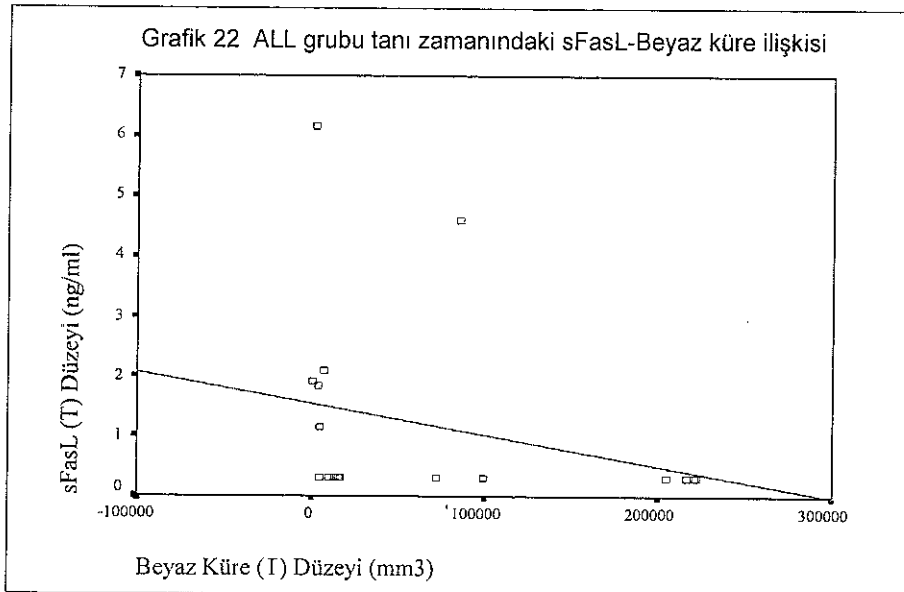
5.ALL grubunun tanı zamanındaki sFas-Beyaz küre ilişkisi

ALL grubu (tanı zamanı) sFas düzeyleri ile beyaz küre değerleri arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($r:-0.015$, $p>0.05$, Spearman korelasyon analiz testi, Grafik 21).



6.ALL grubunun tanı zamanındaki sFasL- Beyaz küre ilişkisi

ALL grubu (tanı zamanı) sFasL düzeyleri ile beyaz küre değerleri arasında anlamlı bir ilişki vardı ($r:-0.570$, $p=0.013$, Spearman korelasyon analiz testi, Grafik 22).



7.sFas/sFasL sunumu ile sağkalım hızı arasındaki ilişki

Çalışma süresince 25 olgunun 4'ü kaybedilmiştir. Bu olguların 3'ü ALL grubunda, 1'i NHL grubundadır. ALL olgularının 2'i tedavi sürecinde meydana gelen komplikasyonlar nedeniyle (ağır nötropeni, sepsis), 1'i primer hastalığının tedaviye yanıt vermemesi sonucunda kaybedilmiştir. Tedaviye yanıt vermeyen olgumuzun bakılan sFasL değeri cut-off değerimizin (0.315 ng/ml) altındaydı ve kemik iliği Fas/FasL sunumu negatifti. Komplikasyondan kaybedilen 2 olgumuzun doku FasL sunumları negatif, serum sFasL düzeyleri bir olgumuzda cut-off değerimizin altında, diğer olgumuzda ise en yüksek değerimize (6.16 ng/ml) sahipti. Kaybedilen diğer olgu NHL grubundadır. Bu olgu primer hastalığının tedaviye yanıt vermemesi sonucunda kaybedilmiştir. NHL grubunda kaybedilen bu olgumuzun serum sFasL düzeyi cut-off değerimizin üzerindeydi (2.02 ng/ml) ancak doku FasL sunumu negatifti.

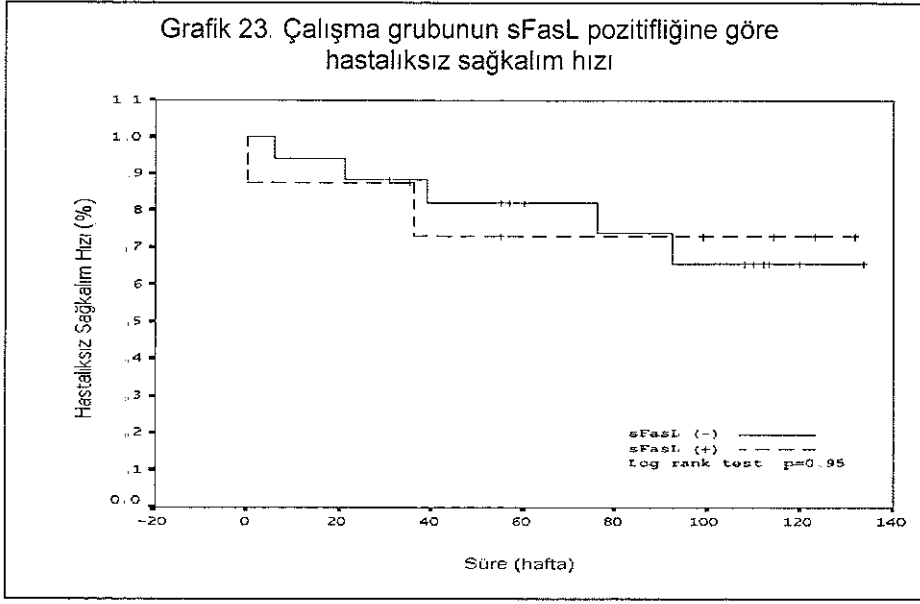
Diğer olgularımız tedavi sonrasında remisyona girmişlerdir.

7.1. Çalışma grubunda sFas pozitifliği ile hastalıksız ve genel sağkalım hızı ilişkisi

Çalışma grubunda sFas değerlerimizin tamamı pozitif saptanmıştır. Değerlerimizde negatif sFas değeri olmadığı için, çalışma grubumuzda sFas pozitifliği ile hastalıksız ve genel sağkalım hızı analizi yapılamamıştır.

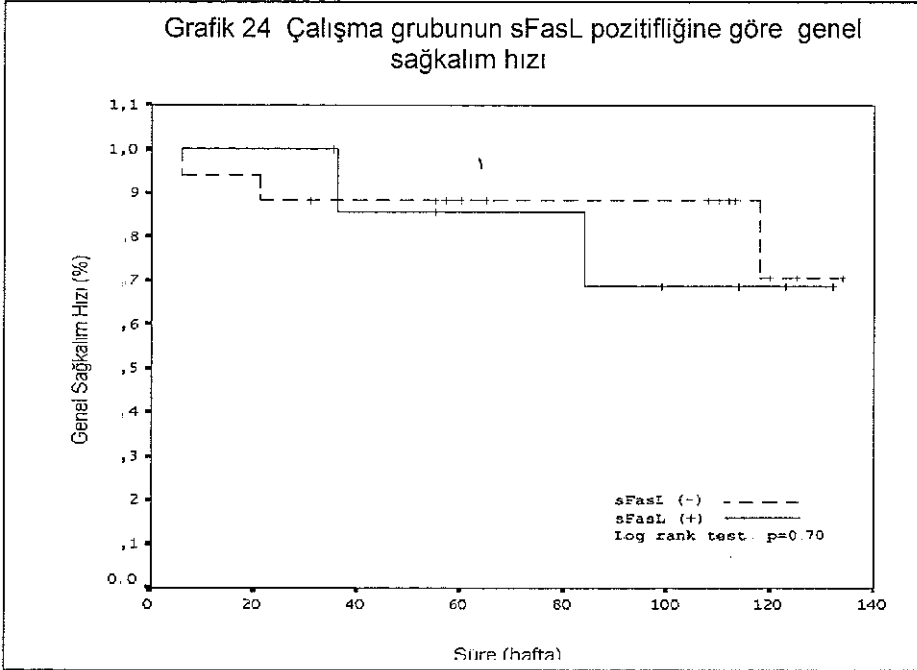
7.2. Çalışma grubunda sFasL pozitifliği ile hastalıksız sağkalım hızı ilişkisi

Çalışma grubunda sFasL pozitifliği ile hastalıksız sağkalım hızları arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p > 0.05$, Grafik 23). sFasL (+) olan olgularda hastalıksız sağkalım hızı %72.9 saptanırken, sFasL (-) olan olgularda %65.5 saptandı.



7.2. Çalışma grubunda sFasL pozitifliği ile genel sağkalım hızı ilişkisi

Çalışma grubunda sFasL pozitifliği ile genel sağkalım hızları arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$, Grafik 24). sFasL (-) olan olgularda genel sağkalım hızı %70.5 saptanırken, sFasL (+)olan olgularda %68.5 saptandı.



8. Kemik iliği aspirasyon ve patolojik doku örneklerinde Fas/FasL sunumu

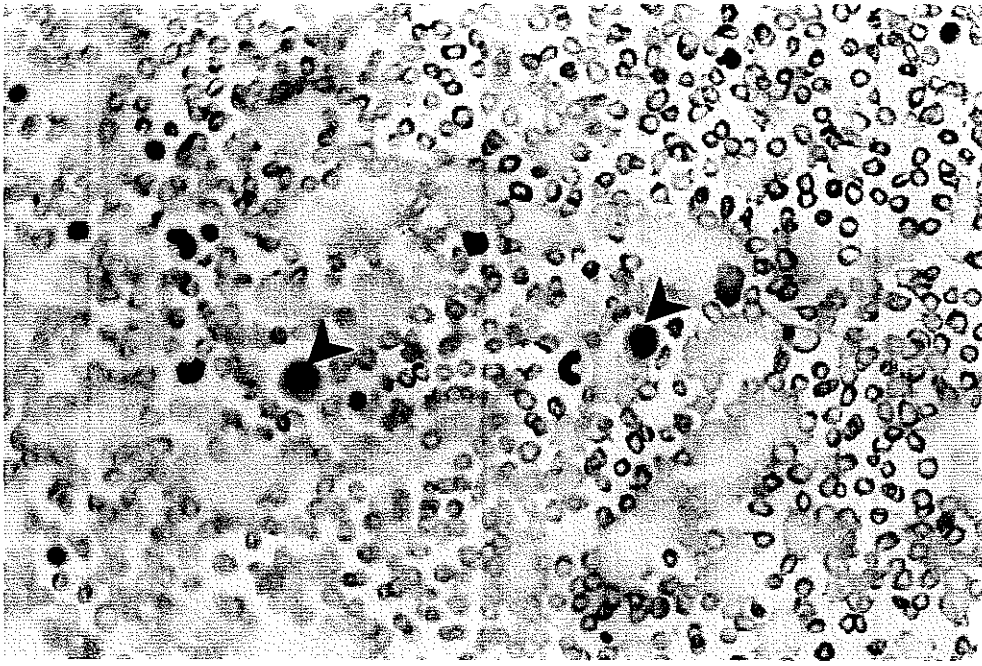
Olguların çalışılan doku Fas/FasL'ı sunumları tablo 8'de gösterilmiştir. Çalışılan kemik iliği örneklerindeki Fas/FasL sunumları Resim 1 ve 2'de ve patolojik doku örneklerindeki Fas/FasL sunumları Resim 3 ve 4'de gösterilmiştir. Çalışmamızda 17 ALL olgusunun kemik iliği aspirasyon değerlendirmesi yapılmıştır. Tanı zamanında Fas sunumu 4 olguda pozitiflik gösterirken, remisyon zamanında 6 olguda gösterilmiştir. Tanı ve remisyon zamanında FasL sunumuna bakıldığında, tanı zamanında 4 olgu pozitiflik gösterirken, remisyon zamanında 3 olgu pozitiflik göstermiştir. NHL olgularının ve 1 ALL olgusunun doku Fas/FasL sunumları, remisyon zamanı doku örnekleri olmadığı için sadece tanı zamanında değerlendirilebilmiştir. Bakılan 8 olgudan, Fas sunumu 7 olguda pozitiflik gösterirken, FasL sunumu 3 olguda pozitiflik göstermiştir.

Tablo 8: Çalışma grubunun dokuda Fas/FasL gösterimi

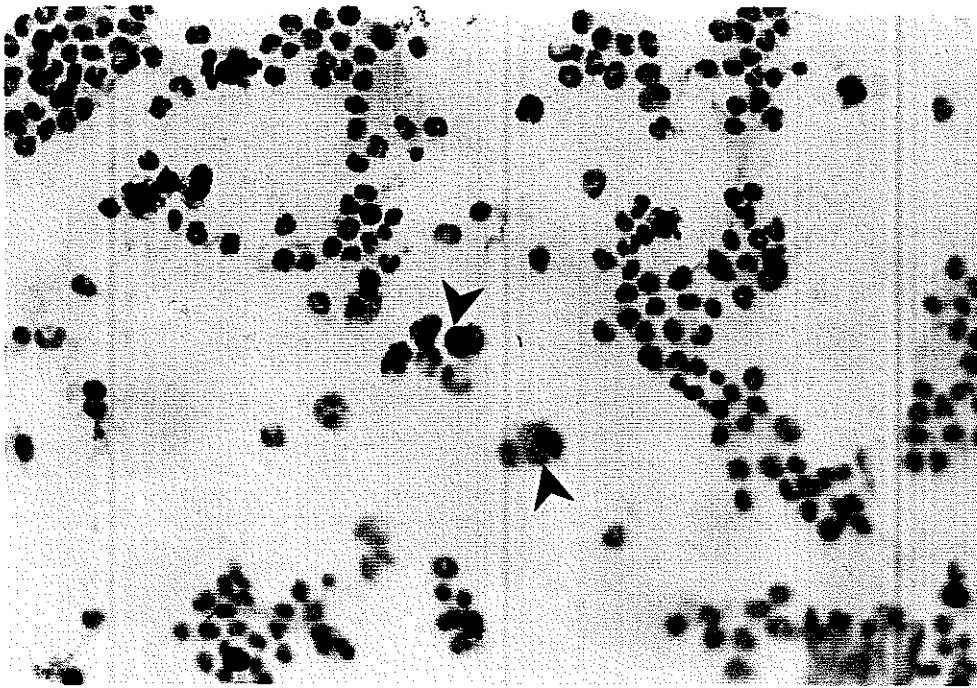
SIRA	AD-SOYAD	YAŞ(yılı)	CİNS	TAMI	Fas/FasL(T)	Fas/FasL(R)	SONUÇ
1	HAMI YALÇIN	2,5	E	ALL	- / -	- / -	R
2	OGUZ ŞENGÜN	4	E	ALL	- / -	%50 / %5	R
3	HÜSEYİN TALAN	9,5	E	ALL	- / %1	%1 / -	EX
4	MUSLU ZAVLAK	2,5	E	ALL	%1 / -	- / -	R
5	HAKKI SAZAK	16	E	ALL	%1 / -	%80 / %1	R
6	EGECAN KIROGLU	1,5	E	ALL	- / -	- / -	EX
7	BARAN GAYGUSUZ	4 ay	E	ALL	%1 / -	%50 / -	R
8	NADIR AVCI	11ay	E	ALL	- / -	- / -	R
9	TUNAHAN SARI	4	E	ALL	%5 / -	- / -	R
10	MELİKE KURAMA	5	K	ALL	- / %1	- / -	R
11	SENA SULAK	2,5	K	ALL	- / -	- / -	EX
12	ECEM KISALAR	2,5	K	ALL	- / -	%80 / %80	R
13	YAREN GÜLSEN	-3	K	ALL	- / -	- / -	R
14	KUBRA CANSIZ	6	K	ALL	- / %70	- / -	R
15	SUNA MAMEDOV	9	K	ALL	- / %1	- / -	R
16	HAZNE KAYA	7	K	ALL	- / -	- / -	R
17	HAVVA AYDOĞDU	13	K	ALL	- / -	%1 / -	R
18	GULBEDEN ÇOT	7	K	ALL	%5 / -	- / -	R
19	YASİN ÖZER	10	E	NHL	%80 / %20	- / -	R
20	ENGİN BAMBAL	12	E	NHL	%70 / -	- / -	R
21	GÖKHAN AYDIN	6	E	NHL	%80 / -	- / -	R
22	KEMAL METİN	7	E	NHL	%70 / -	- / -	R
23	KEZBAN DİLEKCAN	5	K	NHL	%10 / %5	- / -	R
24	AŞKIN UYHAN	10	K	NHL	%70 / -	- / -	EX
25	GAMZE ÖZ	9	K	NHL	- / %90	- / -	R

(T) tanı, (R) remisyon, (EX) eksitüs, (E) erkek, (K) kız,

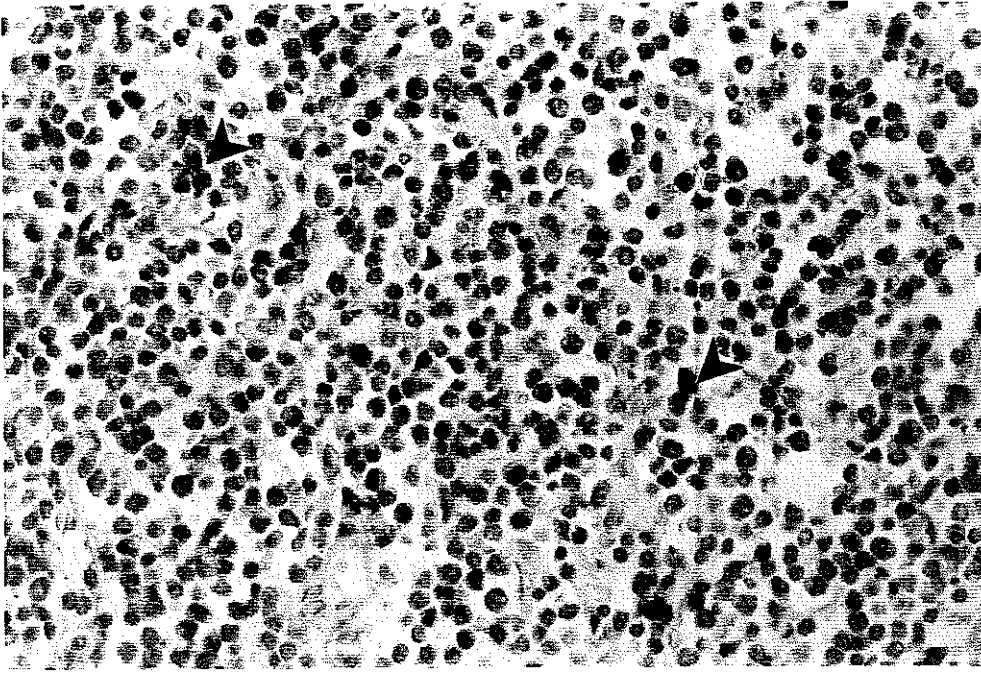
Fas/FasL Dokuda
çalışıldı



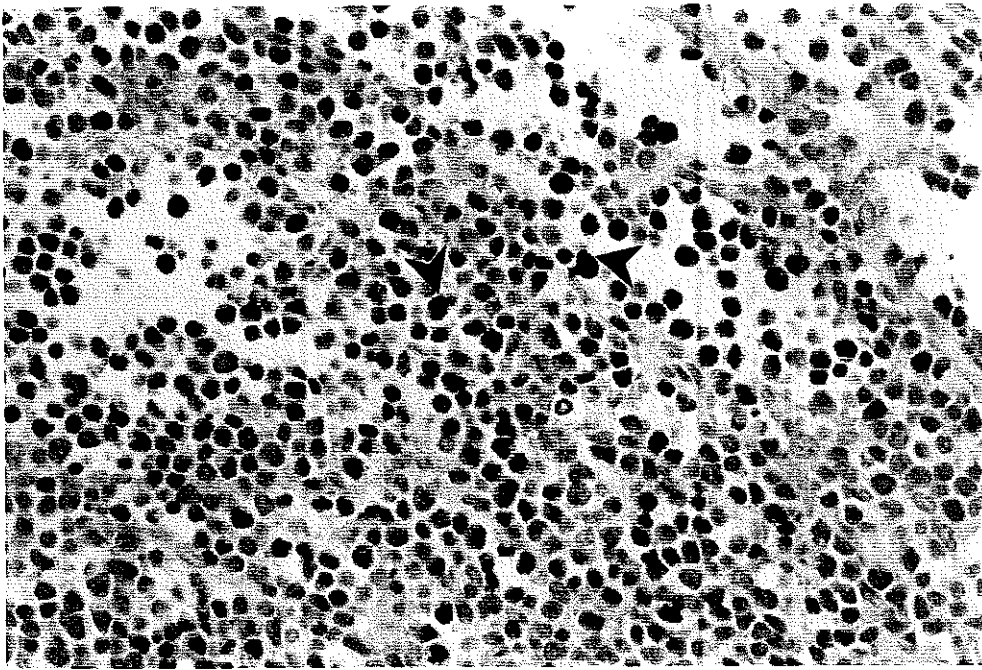
Resim - 1 : Kemik iliği (ALL) FasL sunan hücre örneği ok ile gösterilmiştir



Resim -2 : Kemik iliği (ALL) Fas sunan hücre örneği ok ile gösterilmiştir



Resim -3 : Dokuda (NHL) FasL sunan hücre örneği ok ile gösterilmiştir



Resim -4 : Dokuda (NHL) Fas sunan hücre örneği ok ile gösterilmiştir.

V. TARTIŞMA

Fas/FasL sisteminin rol aldığı apoptozisdeki defektlerin lenfoproliferatif hastalıklara yol açtığı bildirilmiştir (88). Fas/FasL sisteminin çocukluk çağı lenfoproliferatif malignitelerinin etyopatogenezindeki rolü ve prognostik değeri hakkında literatürde oldukça sınırlı veri vardır. Bu çalışmada, TNF süper ailesi üyelerinden olan Fas ve FasL'nın solubl formları ve bu reseptörlerin hücresele sunumları araştırılmıştır.

sFas'ın fizyolojik fonksiyonları henüz tam olarak açıklığa kavuşmamasına rağmen, artmış sFas düzeyleri, Fas veya FasL molekülü anormallikleri tarafından indüklenen ve duyarlı hücrelerde apoptozis inhibisyonu ile sonuçlanan klinik tablolara benzer bir kliniğe yol açabileceği düşünülebilir. Çalışmamızda sFas düzeyleri, yaş-cins eşleştirilmiş kontrol grubu düzeylerinden farklı değildi. Yufu ve arkadaşlarının (45), hasta yaşlarının belirtilmediği, alt gruplara bakıldığında erişkin hastalar olduğu izlenimi alınan, 77 olguluk NHL grubundaki sFas düzeyleri çalışmasında, sadece angioimmünoblastik T hücreli lenfomada sFas serum düzeyinin yüksek bulunduğu, T-B ve NK hücreli NHL'lı hastalarda kontrol grubuna göre bir farklılık olmadığı belirtilmektedir. Buna karşılık Knipping ve arkadaşları (100), B ve T hücreli lösemi ve B hücreli lenfomalı hastalarda kontrol grubuna göre daha yüksek sFas düzeyleri olduğunu rapor etmişlerdir. Yine erişkin, düşük ve orta grade NHL hasta grubunda yapılan sFas düzeylerini saptama çalışmasında, arada istatistiksel bir fark olmamasına karşın, hasta grubunda daha yüksek sFas düzeyleri saptandığı fakat prognozu etkileyip etkilemediği açısından B semptomlarının (uzun süren ateş, gece terlemeleri, vücut ağırlığının %10'a varan sebepsiz kilo kaybı) varlığı, klinik evre, histolojik alt tip, LDH düzeyi, β -2 mikroglobülin düzeyi, CRP düzeyi, tedaviye yanıt ve yanıtın süreleri ile karşılaştırıldığında, hiç bir prognostik

değeri olmadığı vurgulanmaktadır (101,108). Adölesan hastaların da dahil edildiği erişkin hasta ağırlıklı agresif NHL grubundaki sFas değerlerinin, kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu ve klinik yakınmalar ve prognoz üzerine etkili olduğu belirtilmektedir (102). Bizim çalışmamızda sFas düzeylerinin hasta ve kontrol gruplarında farklı çıkmaması, çalışma grubumuzda malign transformasyona uğrayan lenfositlere karşı yanıt olarak aktive olan normal lenfositlerin yeterli ya da etkin olmadığı veya blastik hücrelerin Fas gösterimini azaltarak immün denetimden kaçtığını düşündürebilir. Her iki durumda da sFas düzeyi düşük olan olgularda prognozun daha kötü olması beklenirdi ancak verilerimiz bunu desteklememektedir. Bu bulgular ışığında, sFas'ın çocukluk çağı lenfoproliferatif malignitelerinin fizyopatolojisinde, en azından bağımsız bir role sahip olmadığı yorumu yapılabilir.

Membrana bağlı FasL'nın özel bir metalloproteinaz tarafından koparılarak dolaşıma katılmasıyla oluşan sFasL'nın, solid tümörlerdeki biyolojik önemi henüz bilinmemektedir. Biz bu çalışmada sFasL düzeylerinin çocukluk çağı lenfoproliferatif malignitelerinin prognozundaki rolünü araştırdık. Çalışma öncesinde, yukarıdaki veriler ışığı altında, FasL sunumu artışıyla seyreden çocukluk çağı lenfoproliferatif malignitelerinin daha agresif seyirli olacağı hipotezini kurarak, artmış FasL sunumlarının solubl forma nasıl yansıyacağını araştırmayı planlamıştık. Çalışmamızda, tanı sırasında hasta grubundaki FasL sunumu immünohistokimyasal teknikle 7/25 olarak saptanırken, sFasL düzeyleri, 8/25 hastada cut-off değerinin (0.315 ng/ml) üzerinde bulundu. Hasta grubunun sFasL ortalama değeri kontrol grubundakinden anlamlı olarak yüksekti ($p=0.029$). Hastalarımızı NHL ve ALL olarak iki gruba ayırıp kontrol gruplarıyla karşılaştırdığımızda, hem NHL hem de ALL gruplarının sFasL düzeyleri ortalamaları kontrol gruplarının ortalamalarından yüksek olmasına karşın, anlamlı bir fark

saptanamadı. Bunun, hastaları alt gruplara ayırınca çalışma gruplarındaki sayıların azalmasına bağlı olabileceği düşünülebilir. Çalışma grubundaki tüm NHL'lı hastalar ileri evreli (evre III-IV) oldukları için, artmış sFasL düzeylerinin tümör progresyonuna eşlik edebileceğini akla getirmesine karşın, hem hasta sayılarının oldukça az olması, hem de ALL grubundaki hastaların çoğunun tümör yükü fazla olduğu kabul edilen HRG grubunda olmamaları (3HRG, 7MRG, 3SRG) nedeniyle böyle bir iddialı yorum hatalı olabilir. Hastalar remisyona girince, sFasL düzeylerinde anlamlı bir azalma saptandı ($p=0.012$). Hastalar alt gruplara göre değerlendirildiğinde, ALL grubundaki azalma istatistiksel bir anlam taşıırken ($p=0.028$), NHL grubunda istatistiksel bir anlam yoktu. Bu nedenle başlangıçta sFasL düzeyi yüksek saptanan bir hastanın izleminde sFasL düzeyleri, özellikle ALL tanıli olgularda, güvenilir bir parametre olarak kullanılabilir. Hasta grubunda saptadığımız sFasL yüksekliği, aynı gruptaki sFas değerleriyle ilişkili olabilir. Yeterli oranda sFas ile birleşemeyen sFasL'in serum klirensinin gecikmesi de gözlediğimiz sFasL yüksekliğine yol açmış olabilir. Ancak hasta grubumuzda saptadığımız sFasL düzeylerindeki artışın, tümör hücresi üzerindeki FasL'dan mı yoksa aktive T hücresi ya da NK hücrelerinden mi kaynaklandığını bilemiyoruz.

Volm ve arkadaşları (103), yeni tanı almış ve tedavi görmemiş çocukluk çağı ALL vakalarının %86'sında FasL sunumu saptamışlardır. Bu oran bizim saptadığımız oranın çok üstündedir. Fakat kullanılan tekniklere bakıldığında, bizim çalışmamızda kemik iliği aspirasyonu ile alınan örnekler direk lama yayılıp kurutulup alkol fiksasyonundan sonra saklanırken, yukarıdaki çalışmada Ficoll-Hypaque dansite gradient santifrünü sonrasında ayrılan blastik hücreler lama yayılmıştır. Dolayısıyla bizim çalışmamıza göre daha yoğun ve antijenik yapıları daha iyi korunmuş hücrelere immünohistokimya uygulanarak değerlendirilmiştir. Farklılık bundan kaynaklanıyor olabilir. Lenfoid malignitelerde doku Fas/FasL sunumu değerlendirilmesinin, hücre

süspansiyonları hazırlanarak akış sitometrisi ile en az iki belirteç kullanılarak (birinci belirteç, malign hücreyi belirlemek için, ikinci belirteç; Fas veya FasL için veya her ikisi için) yapılmasının daha uygun olacağı görüşünderiz.

Yaptığımız çalışmada, arada istatistiksel bir anlam olmasa da, sFasL yüksek olan hasta grubunda kemoterapi altında hastaliksız sağkalım hızları daha yüksek bulunmuştur. sFasL yüksek olan olgularda prognozun iyi olduğunu gösteren bu verilerimiz, sFasL'in tümör kaynaklı olmayıp tümöre yanıt veren sitotoksik T hücreleri ya da NK hücreleri kaynaklı olduğunu düşündürmektedir. Volm ve arkadaşlarının (103) çalışmasında, FasL sunumu yapan hastaların yapmayanlara göre daha uzun hastaliksız yaşama sahip oldukları belirtilmekte ve Fas/FasL sistemi tarafından yürütülen sinyal işlemlerinin, kemoterapötik ilaçların başlattığı apoptozisde, olayı başlatan aşama olabileceği ve bu sistemle ilgili apoptozisin farklı histolojideki çeşitli hücrelerde antikanser ilaçların sitotoksitesinde genel bir rol oynayabileceği yorumu yapılmaktadır. Fakat bazı çalışmalarda da kemoterapötik ilaçların indüklediği apoptozisin Fas/FasL sisteminden bağımsız olduğu, Fas/FasL sisteminin indüklediği apoptozis için gerekli olmamasına karşın, anti-Fas-IgM ile kemoterapi kombinasyonlarının da sinerjistik sitotoksik etki oluşturdukları bildirilmektedir (1,48).

Fas/FasL sisteminin yer aldığı ve kemoterapi altındaki hastaların yaşam hızlarına etkili olabilecek diğer bir konu da ilaç direncidir. Bazı invitro çalışmalara göre, Fas ve FasL'ı ilaç direncinde önemli rol oynayabilir (94,104-106). FasL'nın ilaç tedavisinde sunumunun arttığı ve insan T hücre lösemili hücre dizilerinde apoptozisin başlatılmasında önemli rol oynadığı belirtilmektedir (107).

ALL'li çocuklardaki prognozu etkileyen en önemli faktörlerden biri de başlangıçtaki blastik hücre sayısıdır. Çalışmamızda sFasL ile ALL hastalarımızdaki beyaz küre sayıları arasında negatif bir korelasyon saptandı

(r: -0.57, p=0.013). ALL'li olgularımızda yükselen beyaz küre sayısı dolaşımdaki blastik hücrelerden kaynaklandığından bu bulgu, ALL'li hastalarımızdaki s-FasL'nin kaynağının, blastik hücrelerden dökülen FasL'ı olmayıp tümöre yanıt veren sitotoksik T hücreleri ya da NK hücreleri kaynaklı olduğunu düşündürmektedir. Hasta sayımızın çok az olması bu konuda sağlıklı bir yorum yapmamızı engellemektedir.

VI. SONUÇLAR

1. Çalışma grubu (tanı zamanı) ile kontrol grubu sFas düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktu (3.34 ± 1.02 ng/ml v 3.14 ± 0.84 ng/ml, $p > 0.05$).
2. NHL grubu (tanı zamanı) ile kontrol grubu sFas düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktu (3.34 ± 1.05 ng/ml v 3.07 ± 0.85 ng/ml, $p > 0.05$).
3. ALL grubu (tanı zamanı) ile kontrol grubu sFas düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktu (3.35 ± 1.04 ng/ml v 3.17 ± 0.86 ng/ml, $p > 0.05$).
4. Çalışma grubunun tanı ve remisyon zamanındaki sFas düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktu (3.34 ± 1.02 ng/ml v 3.54 ± 1.37 ng/ml, $p > 0.05$).
5. NHL grubunun tanı ve remisyon zamanındaki sFas düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktu (3.34 ± 1.05 ng/ml v 3.02 ± 1.62 ng/ml, $p > 0.05$).
6. ALL grubunun tanı ve remisyon zamanındaki sFas düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktu (3.34 ± 1.04 ng/ml v 3.74 ± 1.25 ng/ml, $p > 0.05$).
7. Çalışma grubu (tanı zamanı) ile kontrol grubu sFasL düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark vardı (1.05 ± 1.46 ng/ml v 0.37 ± 0.19 ng/ml, $p = 0.029$).
8. NHL grubu (tanı zamanı) ile kontrol grubu sFasL düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktu (0.67 ± 0.66 ng/ml v 0.32 ± 0.00 ng/ml, $p > 0.05$).

9. ALL grubu (tanı zamanı) ile kontrol grubu sFasL düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktu (1.19 ± 1.67 ng/ml v 0.39 ± 0.23 ng/ml, $p > 0.05$).
10. Çalışma grubunun tanı ve remisyon zamanındaki sFasL düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark vardı (1.05 ± 1.46 ng/ml v 0.30 ± 0.06 ng/ml, $p = 0.012$).
11. NHL grubunun tanı ve remisyon zamanındaki sFasL düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktu (0.67 ± 0.66 ng/ml v 0.27 ± 0.12 ng/ml, $p > 0.05$).
12. ALL grubunun tanı ve remisyon zamanındaki sFasL düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark vardı (1.19 ± 1.66 ng/ml v 0.31 ± 0.00 ng/ml, $p = 0.028$).
13. Çalışma grubu (tanı zamanı) sFas düzeyleri ile CRP değerleri arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($r: -0.046$, $p > 0.05$).
14. NHL grubu (tanı zamanı) sFas düzeyleri ile CRP değerleri arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($r: -0.050$, $p > 0.05$).
15. ALL grubu (tanı zamanı) sFas düzeyleri ile CRP değerleri arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($r: -0.13$, $p > 0.05$).
16. Çalışma grubu (tanı zamanı) sFasL düzeyleri ile CRP değerleri arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($r: -0.290$, $p > 0.05$).
17. NHL grubu (tanı zamanı) sFasL düzeyleri ile CRP değerleri arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($r: -0.340$, $p > 0.05$).
18. ALL grubu (tanı zamanı) sFasL düzeyleri ile CRP değerleri arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($r: -0.320$, $p > 0.05$).
19. ALL grubu (tanı zamanı) sFas düzeyleri ile beyaz küre değerleri arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($r: -0.015$, $p > 0.05$).

20. ALL grubu (tanı zamanı) sFasL düzeyleri ile beyaz küre değerleri arasında anlamlı bir ilişki vardı ($r: -0.570, p=0.013$).
21. Çalışma grubunda sFasL pozitifliği ile hastalısız sağkalım hızları arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$).
22. Çalışma grubunda sFasL pozitifliği ile genel sağkalım hızları arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$).

VII. ÖZET

Fas hücre yüzey reseptörünün FasL ile birleşmesi, caspase aktivasyonu tarafından düzenlenen apoptotik hücre ölümüne neden olur. Fas/FasL etkileşimi ile meydana gelen apoptotik hücre ölümü, immün sistemdeki hücrelerin homeostazı ve vücutta immün ayrıcalıklı bölgelerin oluşturulması için gereklidir. Biz bu çalışmada çocukluk çağı lenfoproliferatif malignitelerinde (ALL ve NHL), sFas/sFasL düzeylerini ve klinik seyirle ilişkisini araştırdık.

Çalışmada, yaş ve cins olarak birebir kontrol grubu ile eşleştirilmiş çocuk yaş grubundaki 25 olgunun (18 ALL ve 7 NHL), tanı ve remisyon dönemlerindeki sFas ve sFasL düzeyleri ELIZA yöntemi ile çalışıldı. Ayrıca olguların tanı dönemindeki sFas/sFasL düzeyleri ile CRP pozitifliği ve beyaz küre değerleri arasındaki ilişkisi de değerlendirildi.

Hasta grubunun tanı sırasındaki sFas düzeyleri ortalaması ile kontrol grubu ortalamaları arasında anlamlı bir fark bulunamazken, sFasL düzeyleri ortalaması arasında anlamlı bir fark bulunmaktaydı ($p=0.029$). Çalışma grubu ayrıca tanı ve remisyon dönemlerine göre değerlendirildi. sFas düzeylerinde, tanı dönemine göre remisyon dönemindeki düşme anlamlı bulunmazken, sFasL düzeylerindeki düşme belirgin olarak anlamlı bulundu ($p=0.012$). Alt gruplara bakıldığında, ALL olgularında, tanı anına göre remisyon sFasL düzeylerindeki düşme istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.028$). Olguların sFas ve sFasL düzeyleri ile CRP pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı. ALL olgularının tanı dönemlerindeki sFasL düzeyleri ile beyaz küre değerleri arasındaki ilişki ise anlamlı bulundu ($p=0.013$).

Hasta sayısı oldukça sınırlı olan çalışmamızda, sFas'ın çocukluk çağı lenfoproliferatif malignitelerinin fizyopatolojisinde bağımsız bir role sahip olmayabileceği, sFasL'ı yüksek saptanan olguların remisyon

değerlendirmelerinde, sFasL taramasının güvenilir bir parametre olarak kullanılabileceği söylenebilir. Ayrıca sFasL, lenfoproliferatif maligniteli çocuk hastalara sFasL'ı yüksek olmayanlara göre daha uzun hastaliksız yaşam avantajı sağlama eğilimindedir. sFasL kaynağı tam olarak bilinmemektedir. Verilerimiz ALL'li olgularda, bu kaynağın malign hücre kökenli olmayabileceğini düşündürmektedir.

VIII. KAYNAKLAR

- 1) Mc Gahan AJ, Pereira CAP et al. Chemotherapeutic drug-induced apoptosis in human leukemic cells is independent of the Fas (APO-1/CD 95) reseptor/ligand system. *Br J Haematol* 1998; 101: 539-547.
- 2) Mitsiades N, Poulaki V et al. Fas ligand is present in tumors of the Ewing's sarcoma family and is cleaved into a soluble form by a metalloproteinase. *Am J Pathol* 1998; 153: 1947-1956.
- 3) Li Q, Tsuruda K et al. Qualitative and quantitative charecterization of Fas (CD95) expression and its role in primary human acute leukemia cells. *Leukemia Res* 2000; 24: 437-444.
- 4) Papoff G, Cascino I et al. An N-terminal domain shared by Fas/APO-1 (CD95) soluble variants prevents cell death in vitro. *J Immunol* 1996;156:4622-1630.
- 5) Griffith TS and Ferguson TA. The role of FasL induced apoptosis in immune privilege. *The Immunol Today* 1997; 18: 240-244.
- 6) Buzyn A, Petit P et al. Membrane-bound fas (APO-1/CD95) ligand on leukemic cells: A mechanism of tumor immune escape in leukemia patients. *Blood* 1999; 94: 3135-3140.
- 7) Kerr JFR, Wyllie AH et al. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
- 8) Wyllie AH, Kerr JFR et al. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-305.

- 9) Ekert PG and Vaux DL. Apoptosis and the immun system. *Br Med Bull* 1997; 53: 591-603.
- 10) Wyllie AH. Apoptosis and regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: An overview. *Cancer Metas Rev* 1992; 11: 95-103.
- 11) Carson DA and Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993; 341: 1251-1254.
- 12) Tenniswood MP, Guenette RS et al. Active cell death in hormone-dependent tissues. *Cancer Metas Rev* 1992; 11: 197-220.
- 13) Cohen J. Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. *Chest* 1993; 103: 99-101.
- 14) Dransfield I, Savill J et al. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 1990; 343: 170-173.
- 15) Savill J, Hogg N et al. Macrophage vitronectin receptor, CD 36 and thrombospondin cooperate in recognition of neutrophils undergoing programmed cell death. *Chest* 1991; 99: 33.
- 16) Duvall E, Wyllie AH et al. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunol* 1985; 56: 351-358.
- 17) Savill J, Henson PM et al. Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism. *J Clin Invest* 1989; 84: 1518-1527.
- 18) Wyllie AH. Apoptosis: An overview. *Br Med Bull* 1997; 53: 451-465.
- 19) Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.
- 20) Bowen ID. Apoptosis or programmed cell death? *Cell Biol Int* 1993; 17: 365-380.
- 21) Lee S, Christakos S et al. Apoptosis and signal transduction, clues to molecular mechanism. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 286-291.

- 22) Arends MJ, Morres RG et al. Apoptosis the role of endonuclease. *Am J Pathol* 1990; 136: 593-608.
- 23) Fesus L, Thomazy V et al. Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action. *FEBS Lett* 1989; 245: 150-154.
- 24) Christakos S, Gabrielides C et al. Vitamin-D dependent calcium binding protein: Chemistry, distribution, functional considerations and molecular biology. *Endoc Rev* 1989; 10:3-26.
- 25) Schwartzman RA and Cidlowski JA. Apoptosis, the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endoc Rev* 1993; 14:133-151.
- 26) Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124:1-6.
- 27) Jacobson MD, Burne JF et al. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 1993; 361 365-369.
- 28) Nunez G, Merino R et al. Bcl-2 and bcl-x: regulatory switches for lymphoid death and survival. *Immunol Today* 1994; 361: 582-588.
- 29) Vogelstein B and Kinzler KW. X-rays strike p53 again. *Nature* 1994;370:174-175.
- 30) Clarke AR, Purdie CA et al. Tymocyte apoptosis induced by p53 dependent pathways. *Nature* 1993;362:849-852.
- 31) Hunter T. Braking the cycle. *Cell* 1993;75:839-841.
- 32) Strasser A, Harris AW et al. DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cell via p53 independent mechanism inhibitable by Bcl-2. *Cell* 1994;79:329-339.
- 33) Sakhi S, Bruce A et al. P53 induction is associated with neuronal damage in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:7525-7529.

- 34) Miyashita T, Krajewski S et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of Bcl-2 and Bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994;9:1799-1805.
- 35) Gerard E and Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998;281:1317-1322.
- 36) Nagata S. Fas and Fas ligand: A death factor and its reseptor. *Adv Immunol* 1994; 57: 129-144.
- 37) Lynch DH, Ramsdell F et al. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol Today*1995; 16: 569-574.
- 38) Traut BC, Klas C et al. Monoclonal antibody mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989; 245: 301-305.
- 39) Yonehara S, Ishii A et al. A cell killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the reseptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1989; 169: 1747-1756.
- 40) Nicholson DW and Thornberry NA. Caspases: Killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 299-306.
- 41) Ju S-T, Panka DJ et al. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995; 373: 444-448.
- 42) Muller M, Wilder S et al. P53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med* 1998;188: 2033-2045.
- 43) Komada Y, Zhou YW et al. Fas/APO-1 (CD 95) mediated cytotoxicity is responsible for the apoptotic cell death of leukemia cell induced by interleukin-2 activated T cell. *Br J Haematol* 1997; 96: 147-157.
- 44) Male D, Cooke A, Michael O, Trowsdale J, Champien B. Cytotoxic Effector Cells. Male D, Cooke A, Michael O, Trowsdale J. *Advenced Immunology*, 1996 Mosby, Haly. pp. 15.1-15.13.

- 45) Yufu Y, Choi I et al. Soluble Fas in the serum of patients with non-hodgkin's lymphoma; higher concentrations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Haematol* 1998; 58: 334-336.
- 46) Tanaka M, Suda T et al. Fas ligand in human serum. *Nat Med* 1996; 2: 317-322.
- 47) Liu JH, Wei S et al. Chronic neutropenia mediated by Fas ligand. *Blood* 2000; 95: 3219-3222.
- 48) Eischen CM, Kottke TJ et al. Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cell: Chemotherapy induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interaction. *Blood* 1997; 90: 935-943.
- 49) Thornberry NA, Rana TA et al. Combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme b functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 18: 17907-17911.
- 50) Thornberry NA and Lazenbrik Y. Caspase. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
- 51) Chinnaiyan AM, O'Rourke K et al. FADD, a novel death domain containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995; 81: 505-512.
- 52) Stanger BZ, Leder P et al. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas (APO-1/CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 1995; 81: 513-523.
- 53) Ashkenazi A and Dixit VD. Death reseptor: Signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-1308.
- 54) Suda T, Okazaki T et al. Expression of the Fas ligand in cells of the cell lineage. *J Immunol* 1995; 154: 3806-3813.
- 55) Thome M, Schneider P et al. Viral FLICE-inhibitory protein (FLIPS) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 1997; 386: 517-521.

- 56) Irmeler M, Thome M et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997;386: 190-195.
- 57) Ray CA, Black RA et al. Viral inhibition of inflammation: Cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 1992; 69: 597-604.
- 58) Medema J, Scaffidi C et al. FLICE is activated by association with the CD95 death inducing signaling complex. *EMBO J* 1997; 16: 2794-2804.
- 59) Müllbacher A, Wallich R et al. Poxvirus encoded serpins do not prevent cytolytic T cell mediated recovery from primary infections. *J Immunol* 1999; 162: 230-236
- 60) Daveraux Q, Takahashi R et al. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell death proteases. *Nature* 1997; 388: 300-304.
- 61) Xue D and Horvitz HR. Inhibitions of the *Caenorhabditis elegans* cell death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p53 protein. *Nature* 1995; 377: 248-251.
- 62) Stegh AH, Schickling O et al. DEDD, a novel effector domain containing protein, targeted to the nucleolus. *EMBO J* 1998; 17: 5974-5986.
- 63) Nagata S and Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267: 1449-1456.
- 64) Watanabe -Fukunaga R, Brannan CI et al. Lymphoproliferative disorders in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992; 356: 314-317.
- 65) Takahashi T, Tanaka M et al. Generalized Lymphoproliferative disorders in mice caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 1994; 76: 969-976.
- 66) Lamy T, Liu HJ et al. Dysregulation of CD95/CD95 ligand – apoptotic pathway in cd3+ large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 1998; 92: 4771- 4777.

- 67) Griffith TS, Brunner T et al. Fas ligand induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995; 270: 1189-1192.
- 68) O'Connell J, O' Sullivan GC et al. The Fas counter attack: Fas mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 1996; 184:1075-1082.
- 69) Krammer PH. The tumor strikes back new data on the expression of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system may cause paradigm changes in our view on drug treatment and tumor immunology. *Cell Death Differ* 1997; 4: 363-364
- 70) Mehta BA, Schimidt-Wolf IGH et al. Two pathways of exocytosis of cytoplasmic granule contents and target cell killing by cytokine induced CD3+ CD56+ killer cells. *Blood* 1995; 86:3493-3499.
- 71) Granbert TA and Ley JL. How do lymphocytes kill tumor cell? *Clin Cancer Res* 1996; 2: 785-789.
- 72) Soiffer R J and Murray C. Effect of low dose interleukin-2 on disease relapse after T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1994; 84: 964-971.
- 73) Henkart PA. Lymphocyte mediated cytotoxicity: Two pathways and multible effector molecules. *Immunity* 1994; 1: 343-346.
- 74) Young JD-E, Podack ER et al. Properties of purified poreforming protein (perforin 1) isolated from H-2-restricted cytotoxic T cell granules. *J Exp med* 1986; 164: 144-155
- 75) Shi LF, Mai S et al. Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB localization. *J Exp Med* 1997; 185: 866-885.

- 76) Froelich CJ, Dixit VM et al. Lymphocyte granule mediated apoptosis matters of viral mimicry and deadly proteases. *Immunol Today* 1998; 19: 30-36.
- 77) Kagi D, Lederman B et al. Cytotoxicity mediated by T cell and natural killer cells is greatly impaired in perforin deficient mice. *Nature* 1994; 369: 31-37.
- 78) Oyaizu N, McCloskey TW et al. Accelerated apoptosis in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from human immunodeficiency virus type-1 infected patients and in CD4 cross-link PBMCs from normal individuals. *Blood* 1993; 82: 3392-3400.
- 79) Conaldi PG, Biancone L et al. HIV-1 kills renal tubular epithelial cells in vitro by triggering an apoptotic pathway involving caspase activation and fas upregulation. *J Clin Invest* 1998; 102: 2041-2049.
- 80) Suzuki A. The dominant role of CPP 32 subfamily in Fas mediated hepatitis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 217: 450-454.
- 81) Tsutsui H, Matsui K et al. IL-18 accounts for both TNF-alpha and ligand mediated hepatotoxicity pathways in endotoxin-induced liver injury in mice. *J Immunol* 1997; 159: 3961-3967.
- 82) Nishimuramori Y, Nose M et al. Amelioration of systemic autoimmune disease by the stimulation of apoptosis promoting receptor Fas with anti-Fas mab. *Int Immunol* 1997; 9: 1793-1799.
- 83) Beurton F, Gueret G et al. Transcriptional activation of CYP2C, MxA and Fas in sudden infant death syndrome. *Int J Mol Med* 1999; 3: 33-39.
- 84) Saito I, Haruta K et al. Fas ligand mediated exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in mice transgenic for IL-10. *J Immunol* 1999; 162: 2488-2494.

- 85) Fyhr IM and Oldfors A. Upregulation of Fas/Fas ligand in inclusion body myositis. *Ann Neurol* 1998; 43:127-130.
- 86) Seidel R, Frang-Kircher S et al. Apoptosis associated proteins p53 and APO-1/Fas (CD95) in brains of adult patients with Down syndrome. *Neurosci Lett* 199;260: 9-12.
- 87) Potestio M, Caruso C et al. Apoptosis and ageing. *Mech Ageing Dev* 1998;102: 221-237.
- 88) Rieux-Laucat F, Le Diest F et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995; 268: 1347-1349.
- 89) Asoh S, Mori T et al. Expression of the apoptosis mediator Fas is enhanced by dysfunctional mitochondria. *J Biochem* 1996; 120: 600-607.
- 90) Green DR and Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-1312.
- 91) Micheau O, Solary E et al. Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to Fas mediated cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:783-789.
- 92) Bose R, Verheij M et al. Ceramide synthase mediated daunorubicin induced apoptosis an alternative mechanism for generating death signals. *Cell* 1995; 82: 405-414.
- 93) Owen-Schaub LB, Zhang W et al. Wild-type human p53 and a temperature sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 3032-3040.
- 94) Villunger A, Egle A et al. Drug induced apoptosis is associated with enhanced Fas (APO-1/CD95) ligand expression but occurs independently of Fas (APO-1/CD95) signaling in human T acute lymphocytic leukemia cell. *Cancer Res* 1997; 57: 3331-3334.

- 95) Vaux DL. Towards an understanding of the molecular mechanism of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 786-789.
- 96) Tanaka S, Saito K et al. Structure-function analysis of the bcl-2 oncoprotein. *J Biol Chem* 1993; 268: 10920-10926.
- 97) Oltvai ZN, Korsmeyer SJ et al. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-619.
- 98) Bedi A, Zehnbauser BA et al. Inhibition of apoptosis by bcr-abl in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1994; 83:2038-2044.
- 99) Bissonnette RP, Echeverri F et al. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Blood* 1992; 359: 554-556.
- 100)Knipping E, Debatin K.M, et al. Identification of soluble APO-1 in supernatants of human B- and T-cell lines and increased serum levels in B-and T-cell leukemias. *Blood* 1995; 85: 1562-1569.
- 101)Munker R, Younes A, et al. Soluble CD95 in the serum of patients with low and intermediate grade malignant lymphomas: Absence of prognostic correlations. *Leukemia and Lymphoma* 1997; 27: 517-521.
- 102)Hara T, Tsurumi H, et al. Serum-soluble Fas level determines clinical symptoms and outcome of patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol* 2000; 64: 257-261.
- 103)Volm M, Zintl F, et al. Expression of Fas ligand in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Res* 1999; 19: 3399-340.
- 104)Cai Z, Stancou R, et al. Impairment of Fas antigen expression in adriamycin-resistant but not TNF-resistant MCF7 tumor cells. *Int J Cancer* 1997; 4: 535-546.

- 105)Hickman JA. Apoptosis and chemotherapy resistance. Eur J cancer 1996; 6: 921-926.
- 106)Friesen C, Fulda S, et al. Deficient activation of the CD95 (APO1/Fas) system in drug-resistant cells. Leukemia 1997; 11: 1833-1841.
- 107)Friesen C, Herr I, et al. Involvement of the CD95 (APO1/Fas) receptor/ligand system in leukemic cells. Nature Med 1996; 2: 574-577.
- 108)Legouffe E, Rodriguez C, et al. C-reactive protein serum level is a valuable and simple prognostic marker in non-Hodgkin' s lymphoma. Leuk Lymphoma 1998; 31 351-357.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SEKTÖRLÜĞÜ KÜTÜPHANESİ