

I

T.C.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI ISI DERECELERİNİN KAN HÜCRELERİNİN MORFOLOJİSİ VE YAŞAM
SÜRESİNE OLAN ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

SERPİL ERDEM

HİSTOLOJİ – EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. MURAT TOSUN

Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından
07.TIP.18 Proje Numarası İle Desteklenmiştir.

Tez No: 2009-001

2009 - AFYON

KABUL ve ONAY

Aydın Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışmaya aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.
Tez Savınma Tarihi: 14.01.2009



Doç. Dr. Kağan UÇOK
ÜYE



Yrd. Doç. Dr. Murat YAĞMURCA
ÜYE



Yrd. Doç. Dr. Murat TOSUN
ÜYE

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans programını öğrencisi Serpil ERDEM'in
"Farklı İri Derececelerinin Kan Hücrelerinin Morfolojisi ve Yaşam Süresine Olan Etkisinin
Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 21.01.09 günü saat 14:00'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve
Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Fatma AKTEPE
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisansa başladığım günden bu yana derslerimde ve tez çalışmamın belirlenmesinde, planlanmasında ve yürütülmesinde bana yol gösteren ve yardımını esirgemeyen tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Murat TOSUN'a, fikirleriyle tezime destek veren ve yardımını esirgemeyen çok değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Murat YAĞMURCA'ya, çalışmamın biyokimyasal analiz bölümünde bilgilerini ve tecrübelerini benden esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Tülay KÖKEN ve Araştırma Görevlisi Ayhan VURMAZ'a, tez çalışmamın örnek toplanması aşamasında bana yardımcı olan Biyokimya Anabilim Dalı'nın değerli çalışanları Biyolog Deniz KOLSUZ ve Laborant Haktan SAYAR'a saygılarımı sunar teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca eğitim hayatım boyunca değerli destekleriyle hep yanımda olan sevgili aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
Önsöz	III
İçindekiler	IV
Simgeler ve Kısaltmalar	V
Şekiller	VII
Tablolar	VIII
ÖZET	
SUMMARY	
1. GİRİŞ AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kan Dokusu	5
2.1.1. Kan Doku Embriyolojisi	5
2.1.2. Kan Doku Histolojisi	6
2.1.3. Hematopoez	21
2.1.4. Kan Doku Fizyolojisi	28
2.2. Hücre Ölümü	29
2.2.1. Nekroz Tanımı	29
2.2.2. Apoptozis Tanımı ve Tarihçesi	29
2.3. Heat Shock Proteins	44
3. MATERYAL METOT	46
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	53
5. BULGULAR	54
6. TARTIŞMA	69
7. SONUÇ	79
8. KAYNAKLAR	80

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIDS	:Acquired Immuno Deficiency Syndrome (Kazanılmış İmmun Yetmezlik Sendromu)
AIF	:Apoptosis Inducing Factor (Apoptozis Uyarıcı Faktör)
APAF -1	:Apoptotik Protease Activating Factor-1 (Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör)
ATP	:Adenosine Triphosphate (Adenozin Trifosfat)
Bcl	:B Cell Leukemia / Lymphoma
CED	:Caenorhabditis Elegans Death Genes
CFU-Ly	:Colony Forming Unit- Lymphocyte
CFU-S	:Colony Forming Unit-Spleen
CSF	:Colony Stimulating Factor (Koloni Uyarıcı Faktör)
DISC	:Death Inducing Signaling Complex (Ölüm Uyarıcı Sinyal Kompleks)
FADD	:Fas Adapter Protein Death Domain
FGF-2	:Fibroblast Growth Factor-2 (Fibroblast Büyüme Faktörü-2)
G-CSF	:Granülosit Colony Stimulating Factor (Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör)
GM-CSF	:Granülosit Macrophage Colony Stimulating Factor (Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör)
GRP	:Glucose Regulated Protein (Glukoz Düzenleyici Protein)
Hb	:Hemoglobin
HIV	:Human Immuno Deficiency Virus
HSP	:Heat Shock Protein (Isı Şoku Proteini)
Htc	:Hematokrit
IAP	:Inhibitor of Apoptosis Protein
ICE	:Interleukin-1 β Converting Enzyme
IL	:Interleukin
IF	:Intrinsic Factor (İntrensek Faktör)
IFN	:Interferon
MIP- α	:Macrophage Inhibitory Protein- α
NF- κ B	:Nuclear Factor- κ B (Nükleer Faktör Kappa B)
PDGF	:Platelet Derived Growth Factor (Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü)

TGF-B1	:Transforming Growth Factor B1
TNF	:Tumor Necrosis Factor (Tümör Nekroze Edici Faktör)
TRADD	:TNFR Associated Death Domain (TNFR İlişkili Ölüm Bölgesi)
VEGF	:Vascular Endothelial Growth Factor
VWF	:Von Willebrand Factor (Von Willebrand Faktör)

RESİMLER-ŞEKİLLER DİZİNİ

Resim	Sayfa No
Resim 1. Santrifüj Edilmiş Tüpte Kan Hücre Elemanları	7
Resim 2. Eritropoetin Etki Mekanizması	12
Resim 3. Eritrosit Hücre Membranı ve İskeleti	13
Resim 4. Lökositlerin Mikroskopik Görünümü	14
Resim 5. Hematopoez	23
Resim 6. Kemik İliğinde Kan Hücrelerinin Gelişimi ve Farklanması	26
Resim 7. Apoptozisde Etkin Ekstrensek ve İntrensek Moleküller ve Mekanizmalar	34
Resim 8. TRAIL Aracılı Apoptozis	36
Resim 9. Sitotoksik T Lenfositlerde Fas FasL Etkileşimi Aracılı Apoptozis	36
Resim 10. Apoptozisde Mitokondrial Yol İşleyişi	37
Resim 11. Ca ⁺² ve Apoptozis	38
Resim 12. Apoptozisde Görülen Morfolojik Değişiklikler	39
Resim 13. Hb Ölçümü İçin Kullanılan Kalibrasyon Grafiği	51
Resim:14. Grup 1'den alınan örneklerin periferik yaymaları	56
Resim:15. Grup 2'den alınan örneklerin periferik yaymaları	57
Resim:16. Grup 4'den alınan örneklerin periferik yaymaları	58
Resim:17. Grup 6'dan alınan örneklerin periferik yaymaları	59
Resim:18. Grup 3'den alınan örneklerin periferik yaymaları	60
Resim:19. Grup 5'den alınan örneklerin periferik yaymaları	61
Resim:20. Grup 7'den alınan örneklerin periferik yaymaları	62

Şekil	Sayfa No
Şekil: 1. Periferik Yayma İnceleme Metodu	52

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa No
Tablo 1. Apoptozis ve Nekrozun Morfolojik Kriterleri	31
Tablo 2. Apoptozis ve Nekrozun Biyokimyasal Kriterleri	31
Tablo 3. Çalışmada oluşturulan grupların Özellikleri ve Uygulanan Analiz Metotları	48
Tablo 4. Spektrofotometrik Ölçüm İçin Kör ve Numune Hazırlama Hacimleri	51
Tablo 5. Çalışmada İmmunohistokimyasal boyama ve Giemsa boyama sonucu elde edilen ortalama apoptotik hücre değerleri için tanımlayıcı veriler.	54
Tablo 6. Boyamalar sonucu elde edilen apoptotik hücre sayılarının gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılması (One Way ANOVA (PostHoc Test:Tukey)).	55
Tablo 7. CBC ölçümü sonucunda elde edilen tanımlayıcı veriler.	63
Tablo 8. Deneklerden elde edilen örneklerdeki HSP değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması (One Way ANOVA (Post Hoc Test:Tukey)).	64
Tablo 9. HSP ölçümü sonucunda elde edilen tanımlayıcı veriler	65
Tablo 10. Kadın ve erkek deneklerden alınan kan örneklerinde tespit edilen ortalama apoptotik hücre değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması. Grup:1’de her iki cinste de apoptotik hücre olmadığı için değerler karşılaştırılmamıştır (Mann-Whitney-U testi).	65, 66
Tablo 11. Kadın ve erkek deneklerden alınan kan örneklerinde tespit edilen CBC değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması (Mann-Whitney-U testi).	66, 67
Tablo 12. Kadın ve erkek deneklerden alınan kan örneklerinde tespit edilen HSP değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması (Mann-Whitney-U testi).	67, 68

Farklı Isı Derecelerinin Kan Hücrelerinin Morfolojisi Ve Yaşam Süresine Olan Etkisinin Değerlendirilmesi

ÖZET

Giriş: Apoptozis birçok vücut hücresinde olduğu gibi kan hücrelerinde de yaygın olarak görülen bir hücre ölüm şeklidir. Kan hücrelerinde apoptozisi uyaran etkenlerden bir tanesi de ısıdır. Bu çalışmada amacımız vücut ısısının değişimi ile lökositlerde görülen apoptotik hücre ölümünü incelemek, bu süreçte HSP70 proteininin rolünü değerlendirmek ve değişen ısının tüm kan hücreleri oranları arasındaki olası etkisini ölçmek ve bu kriterlerin cinsler arasında farklılık gösterip göstermediğini ortaya koymaktır.

Materyal Metot: Çalışmada yaşları 18-25 arasında değişen tamamen sağlıklı 6 kadın ve 6 erkek denekten alınan kan örnekleri kullanıldı. Alınan örnekler kendi içlerinde 7 alt gruba ayrıldı ve ısı dereceleri her saatte 2 °C arttırılmak suretiyle tüm örneklerin ısıları 37 °C' den 43 °C' ye çıkarıldı. Isıtma sırasında 39 °C' ye ısıtılan örneğin bir kısmı 1 saat sonunda 37 °C'ye soğutulurken aynı işlem 41 °C ve 43 °C' ye dek ısıtılmış örneklerde uygulandı. Sürelerin sonunda kan örneklerinden 1 adet Giemsa ve 1 adet İmmunohistokimyasal boyama için 2 adet periferik yayma alındı. Aynı şekilde aynı örneklerden deneyin her basamağında alınan kan örneklerinden tam kan sayımı ve biyokimyasal olarak HSP70 titresi ölçüldü. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular: Deney sonunda artan ısı derecelerinin yüksek ısılarda daha anlamlı olmak üzere lökositlerde apoptotik hücre ölümünü arttırdığı tespit edildi. Diğer yandan ısının düşürüldüğü gruplarda ilginç olarak yüksek ısılardan hızla 37 °C' ye soğutma olduğunda apoptotik hücre ölümünün arttığı gözlemlendi. Bununla birlikte, tüm gruplarda HSP70 düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edildi. Aynı şekilde kan şekilli elemanlarının oranlarında da artan apoptotik hücre ölümüne rağmen anlamlı değişiklik olmadığı tespit edildi. Elde edilen tüm verilerin kadın ve erkek arasında anlamlı bir farklılık göstermediği belirlendi.

Sonuçlar: Elde edilen sonuçlar bize artan ısı derecelerinin kanda lökositlerde apoptotik hücre ölümünü arttırdığı, buna karşın bu artışın kan hücre profilinde anlamlı bir etki yapmadığını ortaya koymuştur. Bu ısı değişimlerinin HSP70 ekspresyonuna gereksinim olmayacak kadar az yan etkisi olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler:

- Apoptozis
- Hipertermi
- HSP70
- Isı Şoku Proteinleri
- Kan dokusu
- İmmunohistokimya
- Programlı Hücre Ölümü

SUMMARY**Evaluation of the Effects of Different Temperatures on Blood Cell's Morphology And Life Time.**

Introduction: As seen in most of the body cells, Apoptosis is the most common cellular death form in the blood cells. One of the factors that affect apoptosis in blood cells is temperature. Our aim of this study is to analyze apoptotic cell death related with the change of the temperature in vitro, evaluate the role of HSP70 protein during this process and measure the potential effect between the changing heat and the rate of all blood cells and display whether these criteria make differences between the genders.

Materials and Methods : In this study, blood samples taken from quite healthy 6 women and 6 men from 18 to 25 years old have been used. These samples were assembled into 7 sub-groups within itself and by increasing the temperature 2 °C per hour, all the samples' heat was raised from 37 °C to 43 °C. During the heating, some part of the sample that was heated to 39 °C was cooled to 37 °C after an hour, this same process was applied on the samples that were heated to 41 °C and 43°C. At the end of the period, 2 smears were taken from the blood samples for Giemsa and Immunocytochemical stainings. From the same blood samples taken with the same method at the each steps of the experiment, complete blood cells counted and, biochemically, HSP70 titer was measured. All the data were evaluated statistically.

Results: At the end of the study, it was confirmed that temperature, especially at higher temperature, raised apoptotic cellular death rate in leukocytes. On the other hand, it was seen that in the groups with decreasing temperature – surprisingly, when cooled to 37 °C from higher temperature rapidly- the death of the cells increased. Besides, there were no significant differences between the levels of HSP70 in all groups. Likewise, despite apoptotic rate was increased in higher temperature, there were no significant increasing in the proportion of blood elements. At last, all of the data got from all criteria revealed that there were no significant differences between women and men.

Discussion: All the data revealed that increasing temperature triggers apoptotic cell death in blood leukocytes but this increasing did not affect the number of blood cells clearly. On the other hand, in this model, HSP70 expression is not triggered by changing of temperature.

Key Words:

- Apoptosis
- Hyperthermia
- HSP70
- Heat Shock Proteins
- Blood
- Immunohistochemistry
- Programmed Cell Death

1. GİRİŞ AMAÇ

Hücre organizmanın en küçük yaşamsal birimidir. Yapısının %70'ini su oluşturmaktadır. Geri kalan %30'luk kısım içinde ise hidrojen, potasyum, sodyum, kalsiyum, demir gibi inorganik katyonların yanında klorid, bikarbonat, hidroksil gibi anyonlar ve ayrıca hücrenin canlılığı ve fonksiyonları için gerekli olan enerji ve enzim sistemlerinin bulunduğu protoplazma mevcuttur. Bu bileşim içinde farklı görevlere sahip mitokondri, ribozom, lizozom, Golgi aygıtı, sentriol gibi organeller de bulunmaktadır. İnsanların ve hayvanların büyük kısmının yaşamı ovum ve spermatozoa adı verilen iki adet germ hücresinin birbirleriyle birleşip bölünmesi, çoğalması ve büyümesi sonucu başlar (1). Çoğalma hücrelerin mitoz bölünmeyle 2 kardeş hücre oluşturmasıyla gerçekleşir. İki mitoz bölünme arasındaki dönem hücre döngüsü olarak tanımlanır ve hemen hemen tüm hücrelerin yaşamı boyunca bir veya birkaç kez gerçekleşir (2). Örneğin epitel dokusunda bu döngü sadece 2-3 gün olmasına karşın, gelişmiş hücreler olan kas ve sinir hücrelerinde bu döngü yıllar boyunca sürebilir. Vücuttaki birçok hücre sürekli olarak yenilenir. Bu hücrelere verilebilecek en iyi örneklerden biride kan hücreleridir (1).

Özelleşmiş bir bağ dokusu olan kan dokusu, parlak kırmızı renkte, yapışkan, hafif alkali (pH=7.35-7.45) karakterde, ara maddesi sıvı olan bir dokudur. Yetişkin bir bireyde ortalama kan hacmi 5 litre kadardır (3). Kanın bileşenleri iki kısımda incelenmektedir. Birincisi sıvı kısım olan plazmadır ve kan volümünün %55'ini oluşturur. İkinci kısım ise geriye kalan % 45'lik kısmı oluşturan katı kısım olup, şekilli elemanlar adı verilen eritrositler, lökositler ve trombositlerden oluşmaktadır (4). Yaşam için mutlak gerekli olan kan dokunun, hormonların, besin maddelerinin, metabolitlerin, elektrolitlerin taşınması, oksijen (O₂) ve karbondioksit (CO₂) transportu, osmotik basınç düzenlenmesi, asit-baz dengesinin sağlanması ve vücut ısısının korunması gibi birçok önemli hayati fonksiyonları vardır (3,5). Ayrıca inflamatuvar reaksiyonlarda enflamasyon alanında kan akımı yoğunlaşmak suretiyle içindeki lökositlerin diapedez süreci ile enflamasyon bölgesine geçişini sağlayarak vücut savunmasına önemli katkı yapar. Tüm kan hücrelerinin yaşam sürelerinin kısıtlı olmasına karşın dolaşımda sürekli aynı oranlarda bulunmaları bu hücrelerin sürekli yenilendiklerini ortaya koymaktadır. Kan hücrelerinin şekillenmesinde ve

yenilenmesinde prekürsör hücreler (hematopoetik kök hücreler) görev alır ve bu olay hematopoezis olarak tanımlanır (3). Bu hücrelerin yıkımları ise fizyolojik süreç içinde başlıca lenfoid organlarda ve diğer yerleşik oldukları bağ doku merkezlerinde olmaktadır. Ancak enflamasyon, hipertermi, toksisite, malignite v.b. gibi bazı süreçlerde yıkım ve/veya yapım artabilmektedir.

Her hücre doğar, çoğalır (proliferasyon), gerektiğinde farklılaşır (diferensiyasyon) ve ölür. Bütün bu olaylar doğal bir denge halinde sürekli meydana gelir (6). Canlılığın temel karakterlerinden biri olan ölüm gerek hücre gerekse organizma bazında her zaman karşılaşılan bir olaydır (7). Nekrotik hücre ölümü ve programlı hücre ölümü (apoptozis) olmak üzere iki tip hücre ölümü vardır (8). Hücre ölümü ile ilgili ilk bilgiler ışık mikroskopunun ve yeni boyama yöntemlerinin keşfiyle başlamış ve ilk olarak nekroz adı verilen hücre ölüm tipi tanımlanmıştır (9). Nekroz uzun yıllar detaylı araştırmalara konu olduğu halde, fizyolojik hücre ölümü olan apoptosis bu süreçte ihmal edilmiş ve/veya bilim adamlarınca ilgi çekici bir konu olarak görülmemiştir (7). Oysa embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca apoptotik hücre ölümü vardır (9).

Apoptosis, 19. yüzyılın sonlarında tanımlanmış, Yunancada apo (ayrı) ve ptozis (düşen) kelimelerinden oluşan ki sonbaharda yaprak dökümünü tanımlamak içinde kullanılır, fizyolojik özellikte programlı hücre ölümüdür. Bu mekanizma hücrelerin fizyolojik yaşam sürelerini düzenleyen, organizmaya zararlı olması muhtemel hücreleri ortadan kaldıran ve yetişkin organizmada doku homeostazisinde görev alan bir hücre ölüm şeklidir (10-14).

İlk olarak Kerr, Wyllie ve Currie adlı patologların detaylı olarak tanımladığı apoptosis, erken mitokondriyal değişiklik, hücre büzüşmesi, kromatin yoğunlaşması, nükleer kırılma, hücre zar şişmesi, kaspaz aktivasyonu, phosphatidylserin'in hücre zarı dış yüzeyine çıkması ("eat me" signaling) çekirdek parçalanması ve bunun sonucunda apoptotik cisimciklerin oluşması gibi ardarda birçok morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle karakterizedir (15,16). Bununla birlikte, önemli olarak, apoptotik hücre veya cisimciklerin hücre zarları hasarlanmadığı için ve hemen savunma hücreleri tarafından fagosite edildiği için bölgede enflamasyon oluşmamaktadır (17). Apoptozis dokulardaki hücre sayısını belirleyici homeostatik mekanizma olarak embriyogenez ve fetogenez sırasında normal gelişimin

sağlanabilmesi amacıyla, işlevlerini yerine getiremeyecek ya da bir tümör şeklinde gelişebilecek, yaşlı hasar görmüş ya da anormal hücrelerin ortadan kaldırılmasında, erişkinde hormona bağlı involüsyon durumlarında, sürekli çoğalan hücre gruplarının azaltılmasında (Örneğin; barsak kript epiteli), hücrelerin hastalık ve zararlı ajanlara bağlı zedelenmesinde, pankreas, parotis ve böbrek gibi organlarda kanal obstrüksiyonlarına bağlı gelişen atrofilerde, hücrel immün red (graft versus host) reaksiyonlarında görülür (12,18-20). Bununla birlikte iyonize radyasyon, oksidatif stres, sitotoksik antikanser ilaçları, sitokinler, hafif hipoksi ve hipertermi durumlarında da apoptozisin indüklendiği gözlenmiştir (21-23).

Heat Shock Protein (HSP) adı verilen ısı şoku proteinleri vücutta bazı fizyolojik veya patolojik streslerde ortaya çıkan proteinlerdir. Bu nedenle bu proteinler Protein Şaperonlar veya Molecular Guardians olarak da adlandırılırlar. Hücrel fonksiyonların sürdürülmesi ve yapısal proteinlerin bütünlüğünün korunmasına yardımcı olan bu proteinler sitoplazma ve nükleusta yer alırlar (24,25). Bu proteinlerin ısı dışında iskemi, hipoglisemi, hipoksi ve hücrel toksinler gibi stres kaynakları da harekete geçirilebildikleri belirtilmiştir (26). Bununla birlikte, stressiz durumlarda fizyolojik düzenleyici olarak görev yapabilirler ve hücre siklusunda, farklılaşmada, embriyogenezde ve büyüme faktörlerinin uyarılmasında da etkin rol oynarlar (27).

Kan dokusu insan organizmasındaki en önemli dokulardan bir tanesidir. Vücut içinde gelişen fizyolojik ve nonfizyolojik süreçlerin hemen tamamı kan dokusu aracılığı ile de efektör organları uyarmakta ve bu uyarana bağlı olarak organizmayı korumak için organizma uygun yanıtlar üretmektedir. Ancak bazen bu yanıtlar organizmayı bizzat tehlike altına da sokabilir (Örneğin; hipersensitivite reaksiyonları). Vücut içinde sık olarak görülen nonfizyolojik süreçlerden bir tanesinde vücutta ısı artışıdır. Bu artış, şiddetine bağlı olarak, organizma üzerinde ciddi hasarlar oluşturabilir. Genellikle enfeksiyon kökenli etkenlere bağlı olarak fizyolojik olarak artan vücut ısısı organizma tarafından yeterli miktarda kontrol altında tutulamazsa vücut hücrelerinde hasarlanmalara ve ölüme neden olabilir ve nonfizyolojik bir etki karşımıza çıkabilir.

Hazırladığımız bu tez çalışmamızda amacımız vücut sıcaklığında görülen yükselmelere bağlı olarak artan kan dokusu ısısının kan dokusu hücreleri üzerinde ne

tür etki yaptığını inceleyebilmektir. Bu etkinin incelenmesinde öncelikle lökositlerin fizyolojik ölümü ve eritrositer seride görülen değişiklikler ve tüm kan hücrelerinin genel sayılarında ve oranlarında görülen değişiklikler erkek ve kadın deneklerde karşılaştırmalı olacak şekilde incelenmiştir. Ayrıca vücudu ısı şokuna karşı koruyan faktörlerden biri olan HSP70 isimli şaperonunda bu ısı değişim sürecindeki etkisi ve kan düzeylerindeki değişimi incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kan Dokusu

İnsan vücudunu oluşturan çeşitli dokuların, değişik tip hücrelerden meydana geldiği ve yaklaşık 200 farklı hücre tipinin insan organizmasında var olduğu bilinmektedir (28,29). Bu farklı hücre gruplarından biri de kan hücreleridir. Kan dokusu; içeriğindeki eritrositler, lökositler ve trombositler gibi şekilli elemanlar ve plazma gibi şekilsiz elemanlarla öncelikle solunum sistemindeki fonksiyonlarıyla organizma için hayati öneme sahiptir (3,4). Total vücut kitlesinin yaklaşık % 7'sini oluşturur (3). Damarlarda kapalı bir sistem içinde bulunan kan hücreleri plazma içinde süspansiyon halindedir (30). Kan kalpten damar sistemiyle diğer bütün dokulara pompalanmak suretiyle iletilerek hücre ve dokuların oksijenlenmesi, beslenmesi ve hormon gibi değişik mediatörlerin etkisinin gerçekleştirilmesi sağlanır (5).

2.1.1. Kan Doku Embriyolojisi

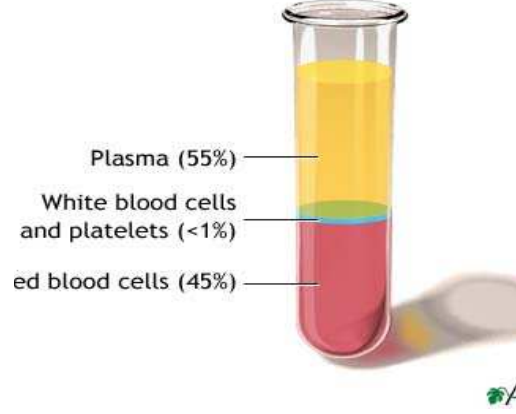
İnsanda embriyonik gelişimin çok erken dönemlerinde mezenşimden köken alan anjioblastların bir araya toplanıp oluşturdukları hücre kümeleri, gelişimin 3. haftasında yolk kesesini çevreleyen ekstraembriyonik mezoderm içerisinde ve kısa bir süre sonra da lateral plak mezodermine kan adacıkları şeklinde görülmeye başlar (31,32). Anjioblastlardan kan adacıklarının gelişiminden sonra hücreler arası boşlukların birleşmesi ile kan adacıklarının kanalize olup lümen kazandığı görülür (31). Fibroblast büyüme faktörü 2'nin (FGF-2) uyarısı ile adacık periferindeki hücreler (hemanjioblastlar) yassılaşıp anjioblastlara dönüşerek kan damarlarını yani endoteli oluştururken, merkezi bölgeden ise hematopoetik kök hücrelerine dönüşen hemanjioblastlardan kanın bütün şekilli elemanlarının oluştuğu görülür (31,32). Özetle gerek damar yapımının, gerekse kan hücrelerinin oluşumu embriyonik dönemde yolk kesesini saran ekstraembriyonik mezodermden köken almaktadır (33). Embriyogenezde ortaya çıkan ilk kan hücrelerinin ömrü oldukça kısadır. Kalıcı hematopoetik kök hücreler aorta çevresindeki aorta-gonad-mezonefroz bölgesi adı verilen mezodermden gelişir (32). Bu hücreler karaciğerde kolonize olarak fetal

yaşam boyunca karaciğeri önemli hematopoetik organ durumuna getirirler (32). Fetal karaciğer dışında intrauterin gelişim süresince yolk kesesi, dalak, timus ve son olarak kemik iliği gibi çeşitli anatomik bölgelerde hematopoezisin gerçekleştiği görülür (34). Gelişimin ilerleyen dönemlerinde hematopoezisin başlıca kaynağı kemik iliği olur (32). Hematopoez ilerleyen bölümlerde detaylı olarak anlatılacaktır. Embriyoda kan damar şekillenmesi (vaskülogenezis) incelendiğinde, gelişimin 18. gününde intraembriyonik splanknik mezoderimde başladığı ve yolk kesesinden biraz farklı bir yolla geliştiği görülür (31,35). Endoderm hücrelerinden salınan FGF-2 gibi indükleyici maddelerin etkisiyle bazı splanknoplirik mezoderm hücreleri, anjioblastlara dönüşürler, anjioblastlar yassılaşırlar, proliferer olurlar ve çevrelerindeki mezodermal hücreler tarafından salgılanan Vascular Endothelial Growth Factor'ün (VEGF) etkisi ile endotel hücreleri halini alırlar (31,32). Endotel hücrelerde birbirleriyle birleşerek kese benzeri anjiokistleri oluştururlar (31). Anjioblastlar kümeleşerek ve büyüyerek uzun tüpleri ya da anjioblast kordonları adı verilen damarları oluşturacak biçimde birleşirler (31,35). Tüm bu olaylar in situ vezikül oluşması ve birleşme ya da vaskülogenezis olarak tanımlanır (31). Ayrıca Transforming Growth Factor β (TGF- β) ve Platelet-Derived Growth Factor'ün (PDGF) vaskülogenezise etki eden ve damara son şeklini veren diğer iki önemli faktör olduğu görülür (32).

2.1.2. Kan Doku Histolojisi

Yetişkin bir bireyde ortalama 5 litre kadar kan bulunur (36). Bu oran erkekte 5-6 lt'ye kadar çıkabilirken, kadında 4-5 lt arasında değişebilmektedir (4). Kanın %55'lik sıvı kısmı plazma adını alır. Plazmanın %92'si sudan, %7'si ise protein, tuz, O₂, diğer çözülmüş gazlar, glukoz, lipid, çeşitli besin maddeleri, metabolik atıklar ve hormonlardan meydana gelir (37). Geriye kalan % 45'lik kısım ise şekilli elemanlar olarak adlandırılan; eritrositler, lökositler ve trombositlerden oluşmuştur (4). Şekilli elemanların %98'lik kısmı eritrositlerden oluşmasına karşın, % 1'lik kısım ise lökosit ve trombositlerden meydana gelir (5). Kan antikoagülanlı bir tüpe alınıp santrifüje edildikten sonra Resim:1'deki görünüm karşımıza çıkar (Resim:1). Kandaki şekilli elemanlar ve plazma miktarı arasında bir denge vardır. Bu iki parametrenin birbirine

oranı hematokrit (Htc) olarak adlandırılır (5). Normal Htc değeri kadınlarda %42, erkeklerde ise %45'dir (39). Bu değer azalması anemi, artması ise polisitemi olarak adlandırılır. Parlak kırmızı renkte ve yapışkan olan kan dokusunun pH'ı hafif alkali olup 7.35-7.45 arasında değişir. Kanın viskozitesi yani akışkanlığı ortalama 3.5-5.5 poise ($\text{dyne s/ cm}^2 = \text{g/ cm s}$) ve dansitesi 1045-1065 gr/cm^3 'dir (3,4).



sim: 1. Santrifüj Edilmiş Tüpte Kan İçerile Elemanları (38 No'lu kaynaktan)

2.1.2.1. Kan Doku Bileşenleri;

Kan dokusunun temel olarak 2 bileşeni vardır (Resim:1).

- a) Plazma
- b) Şekli elemanlar

2.1.2.1a. Plazma: Santrifüj sonrası antikoagülanlı tüpün üstünde kalan sarı, şeffaf, hafifçe kıvamlı kısımdır. Bununla birlikte, antikoagülanlı tüpte pıhtılaşma sonrası tüpün üst kısmında oluşan sarımsak renkli, yapışkan kısım ise serum adını alır (30). Plazma ve serum arasındaki en önemli fark, plazmada fibrinojen bulunmasına karşın, serumda olmamasıdır. Plazmanın içeriğinde en fazla su ve bunun yanında proteinler, inorganik tuzlar, iyonlar, nitrojen, besinler ve gazlar bulunmaktadır (3,40). Plazmanın düşük molekül ağırlıklı bileşenleri ile dokuların interstisyel sıvısı arasında kapiller damarların endoteli aracılığı ile kontrol edilen bir denge mevcuttur. Bu nedenle plazmanın bileşimi, genel olarak hücre dışı sıvısının bileşiminin bir göstergesi olarak kabul edilebilir (41). Plazma bileşenlerindeki değişiklikler dokuda ödem veya kan volümü artmasıyla sonuçlanabilir.

Plazma bileşenleri içinde değişik bileşikler bulunmaktadır.

1. Plazma Proteinleri: Fibrinojen, albumin ve globulinler olmak üzere temel olarak 3 tipdir (4). Ayrıca lipoproteinler ve kan pıhtılaşmasında yer alan protrombinde plazma proteinleri içinde verilebilecek diğer örneklerdir (41).

▪ Fibrinojen: Karaciğerde sentezlenen ve plazma proteinlerinin ortalama %4'ünü oluşturan bir proteindir. Kan pıhtısını oluşturan temel elemandır. Vitamin K, trombin ve kalsiyum iyonları ile birlikte fibrine dönüşerek kan pıhtısını meydana getirir (4,42).

▪ Albumin: Kanda en fazla miktarda bulunan, plazma proteinlerinin %60'ını oluşturan ve karaciğerde 3-4 g/gün olarak biyosentezlenen bir proteindir (4,42). Kılcal damarlardan dokulara su ve suda çözünür maddelerin geçmesine neden olan kolloid osmotik basınç veya onkotik basıncı düzenleyen başlıca proteindir (43). Onkotik basınç su ve tuz tutulumunu sağlamak suretiyle kan volümünü ve dolayısıyla basıncını kontrol altında tutar. Eğer kanda albümin miktarı azalır ise kanın akışkanlığında azalma ve dokuda ödem ortaya çıkar (4). Albüminin diğer bir özelliği de taşıyıcı olarak rol oynamasıdır. Çözünmeyen birçok bileşikle özgül olmayan çözünen bileşikler vererek onların kan akımı ile taşınmasını sağlar. Bunlara örnek olarak bilirubin, yağ asitleri, aspirin türevleri, digital ilaçlar v.b. verilebilir. Bunun yanında kalsiyum gibi genelde tuzları az çözünen katyonlarla kompleks yaparak taşınmalarını sağlarlar (42).

▪ Globulinler: Plazma proteinlerinin %36'sını oluşturan gruptur. Yapı ve fonksiyonlarına göre α , β ve γ globulinler olmak üzere 3'e ayrılırlar (4).

1. α ve β Globulinler: Karaciğer tarafından sentezlenip, yağların ve eriyebilir vitaminlerin taşınmasında görev alırlar. Bu taşıyıcı moleküllerin bir formu Düşük Yoğunluklu Lipoproteinlerdir (LDL= Low Density Lipoproteins) ve kolesterolü karaciğerde sentezlendiği bölgeden çeşitli vücut bölgelerine taşırlar. Başka bir taşıyıcı molekül ise Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein (HDL= High Density Lipoproteins) olup kanda kolesterol ve trigliserid'i taşıdığı ve arterlerde koagülasyonu önlediği görülür (4).

2. γ Globulinler: Molekül ağırlıkları ortalama 150.000-160.000 dalton olan, kandaki bağışıklık ve savunmada görevli proteinlerdir. Bunlara immünglobülin veya antikor adı da verilmektedir. Lenf dokularında biyosentezlenirler. Sentezlenen antikorlar vücutta zararlı etki gösterebilecek antijenlerle kompleks oluşturarak onun zararlı etkisini

ortadan kaldırırlar. Kızamık, tetanoz gibi birçok hastalıklardan korunmada önem arzederler. Ig'lerin (immunglobulin) 5 farklı tipi bulunmaktadır. Bunlar; %80' lik kısmı oluşturan Ig G, %13' lük kısmı oluşturan Ig A ve toplamda %7' lik kısmı oluşturan Ig D, Ig M ve Ig E' dir (4).

2. Plazma Elektrolitleri: Elektrolitler, vücut sıvısının bileşenleri arasında en önemli olan kısmı oluşturmaktadır. Eriyik halde bulunan inorganik maddelerdir. Suda eridikleri zaman negatif (anyon) ya da pozitif (katyon) yüklü iyonlar halini alırlar. Plazmada önemli bir katyon olan sodyum, sinir ve kaslara uyarı iletiminde önemli bir fonksiyona sahiptir, osmotik basınç ve sıvı akışkanlığı üzerine de etkileri vardır. Eksikliğinde koma tablosuna varan sonuçlar ortaya çıkabilir. Önemli bir anyon olan klor osmotik basınç farklarını düzenlemeye yardım eder ve pH dengesini sağlar. Diğer bazı önemli iyonlar içinde sinir ve kas fonksiyonları için önemli olan potasyum ve magnezyum, kan pıhtılaşması, sinirsel ileti ve kemikler için önemli kalsiyum bulunmaktadır (4,44).

3. Besin Maddeleri: Besin maddeleri içerisinde bulunan en önemli bileşik glikozdur. Plazmada düşük konsantrasyonda bulunan glikoz (70-110 mg/dl), vücuda enerji sağlayan temel maddedir ve özellikle karbohidrat içeren besinlerle temin edilir (4).

4. Aminoasitler: Plazmada düşük konsantrasyonda bulunurlar ve vücutta hücreler tarafından hızlıca tüketilirler. Protein sentezinde önem taşırlar (4).

5. Yağlar: Plazmada fosfolipid, trigliserid, serbest yağ asitleri ve kolesterol olarak bulunurlar. Bazı enzimlerin aktivasyonunda, hücre zarı yapısının oluşturulmasında, hücrelerde bilgi iletişimi sağlanmasında, metabolik yakıt oluşturulmasında etkindirler ve bazı biyokimyasal sentezlerin ürünü olarak karşımıza çıkarlar (4).

6. Gazlar: O₂, CO₂ ve N (azot) ise plazmada çözünen gazlardır (4).

2.1.2.1b. Şekilli Elemanlar: Şekilli elemanlar kanın plazma dışında kalan kısmı olup, 3 grupta incelenir:

1. Eritrositler
2. Lökositler
3. Trombositler

1. Eritrositler; temel görevleri, akciğerlerden aldıkları O_2 'yi dokulara, dokulardan aldıkları CO_2 'yi ise akciğerlere taşımaktır. Bikonkav disk şeklinde son derece esnek yapıda olan bu hücreler bu sayede en küçük dokulara dek ulaşip mikrodolaşıma katılabilirler (45). Ortalama 7.5μ çapında, dış kısımda 2μ merkezde 1μ kadar kalınlıktadır. Eritrositlerin tümünün yüzey alanları toplamının ortalama $3500 m^2$ kadar olması ve bikonkav yapıları gaz alışveriş alanının çok yoğun olmasına imkan sağlar (3,5,30). Her ne kadar eritrosit sayısı $1 mm^3$ kanda 4-5 milyon civarında olsada yüksek rakımlı yerlerde sürekli yaşayanlarda sayının arttığı görülür. Çapları 6μ 'dan küçük olan eritrositlere mikrosit, 9μ 'dan büyük olan eritrositlere ise makrosit ya da megalosit adı verilir (36). Sağlıklı bir insanda eritrositler hemen hemen aynı büyüklüktedir bu durum izositoz olarak bilinir. Bazı patolojik durumlarda ise eritrositlerin irili ufaklı farklı ebatlarda olduğu görülür ki bu durumda anizositoz olarak tanımlanır. Kemik iliğinden köken alan eritrositlerin yaşam süreleri 120 gün kadardır ve bu süre sonunda dalak, karaciğer ve lenfoid organlarda parçalanırlar. Azalan hücrelerin yerine konması, kemik iliğinde vücudun ihtiyacına göre saatte $1-5 \times 10^9$ eritrositin yapılarak dolaşıma verilmesi ile sağlanır (30,46). Kemik iliğindeki retikülositlerin dolaşıma geçme aşamasında organellerini ve çekirdeklerini kaybetmesiyle oluşan eritrositler bu sayede en uygun O_2 taşıyabilecekleri şekile farklılaşmış olurlar (36). Histolojik olarak organellerinin ve çekirdeğinin olmamasının yanında sitoplazmasında az miktarda protein, lipid, potasyum ve magnezyum gibi inorganik maddeler ve karbonik anhidraz enzimi bulundurulur (3,30). En önemlisi sitoplazmalarında demirli bir protein olan, gaz alışverişinde görev alan hemoglobin (Hb) maddesi içermeleridir (30). Eritrositlere alınan CO_2 'nin büyük bir kısmı karbonik anhidraz enziminin katalizör etkisiyle su ve karbonik asiti (H_2CO_3) meydana getirir ve sonrasında bu bileşik hidrojen (H^+) ve bikarbonat (HCO_3^-) iyonlarına ayrılır. Böylece dokulardan akciğerlere taşınan CO_2 'nin %70'inin bikarbonat formunda, %15-30'unun ise Hb'e bağlanarak karbaminohemoglobin formunda taşındığı görülür. O_2 'nin Hb'e bağlanması ile oluşan oksihemoglobin O_2 'nin dokulara iletilme şeklidir (3,30). Eritrosit sentezi için çeşitli maddelerin varlığına ihtiyaç duyulur. Bunların içinde aminoasitler,

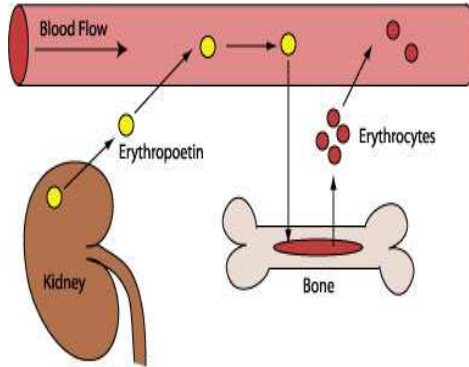
karbohidratlar, lipidler dışında 4 temel yapı olan demir, vitamin B12, folik asit ve eritropoetin bulunmaktadır (39).

- Demir: O₂ ve CO₂'nin taşınmasında gerekli olan bir elementtir. Yaşayan her hücre normal fonksiyonları ve metabolizması için demir'e ihtiyaç duyar (47). Eritrositlerde bulunan Hb ve kaslarda bulunan miyogloblin demir elementini depolar ve taşır. Demir eksikliğinde tampon görevi gören, özellikle karaciğerde demir stoku yapan protein ferritindir. Tek bir ferritin molekülü yaklaşık 4500 Fe⁺⁺ iyonu saklama kapasitesine sahiptir (48). Karaciğerde üretilen bir serum proteini olan transferrin ve anne sütünde bulunan laktoferrin ise demir taşınmasında rol oynayan nonhem proteinlerdir. Transferrin yaşlanan ve fonksiyonu sona eren ve karaciğer ve dalakta yıkılan eritrositlerin plazmada açığa çıkardıkları demir'i yakalar. Tüm bu demir elementleri kemik iliğinde yeni eritrosit üretimi için kullanılırlar. Transferrin'in demir'den yoksun formu ise apotransferrin olarak bilinmektedir (39,48).

- Folik Asit: Yeşil bitkilerde, mayada, böbrek ve karaciğerde fazla miktarda; süt, süt ürünleri ve ette az miktarda bulunan bir vitamin olan folik asit, özellikle DNA sentezinde ve hücre bölünmesinde gereklidir. (39). Barsak bakterileri tarafından sentezlendiğinden çoğu kez noksanlığı görülmemekle birlikte eksikliği olan durumlarda hücre bölünmesinde bozukluk ve fetal dönemde gelişimsel defektler gözlenebilir (39,49).

- Vitamin B₁₂: Diğer bir adı Kobalamin'dir. Tüm B vitaminleri bitkiler tarafından sentezlendiği halde, B₁₂ vitamini mikroorganizmalarda biyosentezlenir (49). B₁₂ vitamini özellikle hayvansal besinlerden (Örneğin; böbrek, karaciğer, az miktar süt ve süt ürünleri, yumurta) temin edilir. Folik asit aktivasyonu için gereklidir. Özellikle vejeteryan diyetle beslenenlerde vitamin B₁₂'nin düşük olduğu görülür (39). Dışarıdan besinler aracılığı ile alınan B₁₂ vitamininin ince barsak çeperlerinden geçebilmesi için mide mukozasında paryetal hücrelerden sentezlenen bir protein olan İntrinsik Faktöre (IF) ihtiyaç vardır. B₁₂ vitamini IF'ye bağlanarak aktif olarak kana geçer. Vitamin B₁₂ eksikliğinde sinir hücrelerinde myelin yapımında bozukluklar ve buna bağlı çeşitli nörolojik semptomlar gözlenebilir (39,49). Bu vitamin karaciğerde 6 yıla kadar depo edilebildiğinden eksikliği nadir görülmektedir (48).

▪ Eritropoetin: Renal kortekste tübüller arasındaki dar interstisyel aralıklarda yer alan fibroblast benzeri hücreler tarafından sentezlenir (Resim:2).

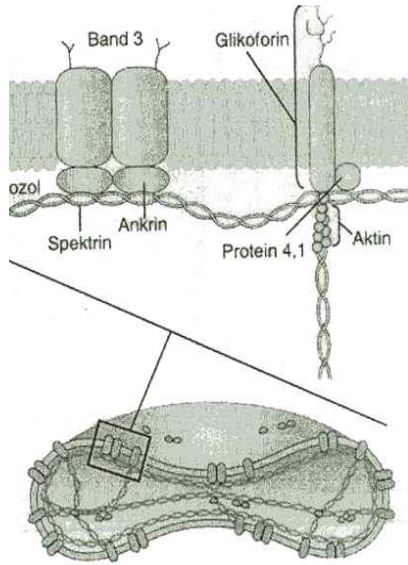


Resim:2. Eritropoetin Etki Mekanizması
(50 No'lu kaynaktan alınmıştır)

Sentezlendiği hücreden salınırken yapısına eklediği karbohidrat zinciri ile biyolojik aktivitesini ve antijenitesini artırır (47). 32.000 mol ağırlığında, serum glikoprotein hormonu olan eritropoetin eritrosit progenitör hücrelerin farklılaşması, çoğalması ve yaşamlarının devam ettirilmesinde önemli görevler

üstlenmektedir. Bu sayede kanda eritrosit sayısının sabit değerler arasında tutulması sağlanmış olur (51). Böbrek yetmezliği gibi durumlarda eritropoetin üreten hücrelerin hasara uğraması sonucu ağır anemik tablolar ortaya çıkar (47).

Eritrosit Hücre Zarı; güçlü, ince ve esnek bir membran yapısına sahip olup spesifik polisakkaritler, lipid ve proteinler gibi bileşenlerden oluşmaktadır (39). Ortalama %50 protein, %40 lipid ve %10 karbohidrattan oluşmaktadır (3). Eritrosit zarı, genel unit membran yapısına uygun şekilde iç lipid tabakasında fosfatidiletanolamin ve fosfatidil serin içerirken, dış lipid tabakasında fosfatidilkolin ve sfingomiyelin içerir. Ayrıca zarın dış yüzü oligosakkaritlerce oldukça zengindir (52). Zar proteinleri pek çok hücresel işlevinin yanında, hücrenin şeklinden de sorumludur. Bu zar proteinlerinin belirgin kısmı (%35), zarın şeklinin korunmasından ve dayanıklılığından sorumlu spektrinden oluşmaktadır (53) (Resim:3). Spektrinin yapısal bozuklukları çeşitli konjenital ve herediter hemolitik anemilerde ortaya çıkmaktadır (55). Hücre iskeletinde yer alan spektrin, hücre zarındaki çeşitli bileşenlerle ve hücre iskeleti öğeleriyle güçlü bir ağ oluşturarak membran esnekliğini desteklemektedir (41). Zardaki diğer protein yapılarının daha çok transmembran protein tipinde olduğu görülür. Özellikle Glikoforin A (ayrıca B, C, D formları) iyon kanalları (Kalsiyum bağımlı Potasyum kanalları ve Na-K ATPaz) ve Anyon Taşıyıcı Band 3 protein bu gruba örnektir. Band 4.1, Band 4.9, Ankrin (Band 2.1), Aktin (Band 5) ise sayılabilecek diğer zar proteinleridir (3). Sayılan tüm bu protein yapılarının hücre zarının altında yer aldığı, hücre iskeletinin



im:3. Eritrosit Hücre Membranı ve İskeleti (54 No'lu kaynaktan alınmıştır)

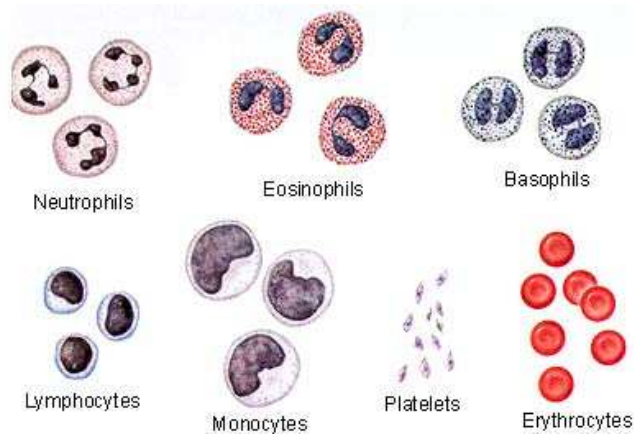
şekil ve kararlılığını sağladığı görülür (41) (Resim:3). Eritrosit zarında oluşabilecek bir bozukluk hücrenin şeklini bozarak retiküloendotelyal sistem hücreleri tarafından fagosite edilmesine neden olur (56,57).

Hemoglobin: 68.000 Dalton molekül ağırlığında, kana kırmızı rengi veren geniş tetramerik bir proteindir. Her bir eritrosit ortalama 200-300 milyon Hb molekülü içerir (3,39,42). Hem ve globin olarak ayrıldığında Hem'in demir içeren, bileşiğin %5'lik kısmını oluşturan ve O₂ bağlayan kısım olduğu görülürken, globinin ise bileşiğin %95'ini

oluşturan protein kısmı olduğu görülür. Erkeklerde bir miktar daha fazla olan Hb miktarı kadında ortalama 14 g/dl, erkekte ise 16 g/dl' dir (4,39). Hb'nin dokularda en önemli görevi O₂ ve CO₂ transferini sağlamaktır. O₂'yi oksihemoglobin, CO₂'yi ise karbominohemoglobin olarak taşır (3,41). O₂ kapasitesinin azaldığı hipoksik durumlarda dokularda 2,3 diphosphoglyceride açığa çıkması ile Hb'nin O₂'ye olan eğilimi azalır ve eritrositlerden O₂ serbestleşmesinin kolaylaştığı görülür. Hb'lerde α , β , γ ve δ olmak üzere 4 adet polipeptit zinciri tanımlanır (3). Hb'nin, fetal hemoglobin (HbF) ve yetişkin hemoglobin (HbA) olmak üzere 2 tipi vardır (5). HbF 2 α ve 2 γ zincirinden oluşur ve intrauterin hayatta doğuma kadar en fazla bulunan Hb'dir. Doğumdan bir süre sonra HbF'nin yerini HbA alır. HbA'nın HbA₁ (α_2 , β_2) ve HbA₂ (α_2 , δ_2) olmak üzere 2 tipi vardır. HbA₁ erişkinde görülen başlıca Hb'dir. HbA₂ (α_2 , δ_2) ise minör bir Hb olup, erişkinde nadir görülen bir tip olarak bilinir. Normal bir bireyde %96 HbA₁, %2 HbA₂ ve %2 HbF mevcuttur (3).

2. Lökositler; kanda bulunan diğer bir hücre grubu olup, temel olarak vücut savunmasında görev alırlar. Farklı morfolojik tipleri olan lökositler vücut savunmasında farklı görevler üstlenmiştir. Yetişkin bir bireyde ortalama 6.500-

10.000 kadar lökosit bulunur (3). Ancak enfeksiyon durumlarında bu sayı 25.000'e kadar ulaşabilir (4). Lökosit sayısının 12.000'in üzerinde olması lökositozis olarak adlandırılırken, sayının 5000'in altına düşmesi lökopeni olarak bilinir (36). Kemik iliğindeki hemanjioblastlardan şekillenmişlerdir (4). Mikroskop altında incelendiklerinde yapı ve farklı boyanmaları ile dikkat çekerler (39). Bu özellikleri gözönüne alındığında lökositler granülositler ve agranülositler olarak iki grupta ele alınırlar (Resim: 4).



Resim: 4. Lökositlerin Mikroskopik Görünümü (58 No'lu kaynaktan alınmıştır.)

Granülositler; sitoplazmalarında granüller mevcut olan ve çok loblu çekirdekleri bulunan lökositlerdir. Nötrofiller, eozinofiller ve bazofiller olmak üzere 3 tiptir (4).

1. Nötrofiller; Polimorfonükleer lökositler olarak da bilinirler (5). Lökositler içerisinde en fazla sayıda bulunan hücreler olup, tüm lökositlerin % 60 -70'ini oluştururlar. Bakteriyel enfeksiyon durumlarında sayılarının arttığı görülür (3). Çapları ortalama 9-12 μ 'dur. İnce kromatin iplikleri ile bağlanan 2-5 loblu çekirdek içerirler (41). Lob sayısının folik asit eksikliğinde ve yaş ile birlikte arttığı görülür. Kadınlarda normal lob sayısına ek olarak uçtaki bir lobun hemen ucunda içinde inaktif X kromozomunun bulunduğu davul tokmağı şeklinde bir yapı daha mevcuttur. Bu yapı Barr Body (Barr cisimciği) ya da Sex Chromosome (Cinsiyet kromozomu) olarak isimlendirilir (3,5).

Nötrofiller çeşitli uyarılarla enflamasyon bölgesine göç etme (kemotaksi) yeteneğine sahiptirler. Sitoplazmalarında granül bulunduran ve lökositler içerisinde

oldukça kısa bir yaşam süresine sahip olan nötrofiller, dolaşımında yaklaşık 12 saat kadar kaldıktan sonra kemotaktik uyarılarla (örneğin; inflamasyonda) dokulara göç edebilirler (59,60). Apoptozis ile yaşamlarının sonlandığı bağ dokusunda 1-4 gün kadar yaşamlarını sürdürebilirler (41). Üç tip granül içerirler;

a. **Spesifik Granüller:** Küçük ve çok sayıdadırlar. Çapları 0.1 μ kadardır. Işık mikroskopunda zor seçilirler. Elektron mikroskopunda ise dikdörtgen şekline benzer şekilde seçilirler (3). Alkalen fosfataz ile boyandıklarında antibakteriyel enzimlere (Örneğin; lizozim, laktoferin ve fagositin) sahip oldukları görülür. Bununla birlikte antimikrobiyal fonksiyonlarına yardım eden farmakolojik ajanlarda içerirler (3,30,41).

b. **Azurofilik Granüller:** Geniş çaplı ve az sayıdadırlar. Çapları ortalama 0.5 μ kadardır (41). Bunlara spesifik olmayan primer lizozomlarda denebilir. Granül oluşumunda erken görünen tiplerdir ve tüm granüllü hücrelerde meydana gelirler. Asit hidrolaz, myeloperoksidaz, bakteriyel permeabilite indükleyici faktör (BPI), kathepsin G, elastaz ve nonspesifik kollegenaz içerirler (3).

c. **Tertiary (üçüncü) Granüller:** En son tespit edilen üçüncü ve yeni granül tipi olup jelatinaz ve kathepsin içerdikleri bilinmektedir (3).

Kan içinde inaktif durumda olan nötrofillerin dokulara geçtiklerinde aktif rol aldıkları ve fagositik karakter kazandıkları görülür. Metabolik aktiviteleri oldukça fazladır. Hem aerobik hemde anaerobik glikoliz yapabilirler. O₂ yokluğunda fonksiyon yapabilmeleri nekrotik ve enflamasyonlu bölgelerde bakterileri öldürüp onları fagosite edebilmeleri açısından büyük avantaj sağlar (41). Ayrıca proenflamatuar bir sitokin olan IL-8, fagositleri aktive eden ve nötrofilleri uyaran monosit ve aktif T hücreleri tarafından sentezlenen IFN- γ yardımıyla ve C5a gibi kemotaktik faktörler sayesinde enflamasyon sürecine etki ederler (61). Mikroorganizmaların ve vücut için yabancı maddelerin bulunduğu bölgeye göç ile vücudun savunmasını yaparlar (5). Ayrıca araşidonik asid metabolitleri olan lökotrienlerinde nötrofillerin fagositozuna yardımcı olduğu görülür (3). Mikroorganizmalarla savaş anında yuvarlak şekilli olan nötrofiller, birden psödopod adı verilen uzantılarını çıkararak fagosite edecekleri yabancı maddelerin etrafını sararlar. Psödopod uçlarının birbirleriyle kaynaşması sonucu yabancı maddeler bir membranla çevrili hale gelirki bu yapı "fagozom" olarak adlandırılır. Spesifik ve

azurofilik granüllerin içeriklerini fagozom üzerine vermeleri ile de fagositoz gerçekleşmiş olur (3,5,41).

2. Eozinofiller; Lökositlerin % 4'ünden daha azını oluştururlar. 10-14 μ büyüklükte dirler (3). En önemli ayırt edici özelliği eozinofilik ve çok sayıda büyük ve uzun reaktif granüller içermesidir (41). Nükleusu tipik olarak at eğeri şeklini andıran iki loblu bir yapıdadır (3,5). Heterokromatinler daha çok zar tarafında, ökromatinler ise daha çok merkezi yerleşimlidir (5). Az sayıda organelle sahiptirler. Bunlara örnek olarak küçük merkezi lokalizasyonlu golgi aparatı, kısıtlı miktarda endoplazmik retikulum ve mitokondriler verilebilir. Spesifik ve azurofilik olmak üzere 2 tip granül yapısı içerirler. Bu granüller Giemsa ve Wright boyası ile koyu pembe renkte görülürler. Elektron mikroskopunda incelendiğinde spesifik granüllerin ortalarında kristal yapıların varlığı dikkat çeker (3). Bu kısımlar merkezde internum alanlarıdır. Bu alanlar majör basic protein (MBP), eozinofilik katyonik protein (ECP) ve eosinophil-derived neurotoxin (EDN) gibi yapılar içerir. Çevrede daha az elektron yoğun alanlar ise eksternum veya matriks olarak isimlendirilmiştir (3,41). Nonspesifik azurofilik granüller ise lizozomlar tarzında olup nötrofillere benzer hidrolitik enzimler içerirler (3). Granüller aynı zamanda peroksidaz, histaminaz, arilsülfataz gibi maddeler içerirler (5). Tipik olarak hipersensitivite durumlarında aktifleşerek vücudu koruyucu yönde etki gösterdikleri görülür (3). Antijen antikor kompleksiyle fagositoz olayını kolaylaştırırlar (5).

Mast hücreleri, nötrofiller ve bazofillerden serbestleşen eozinofil kemotaktik faktör (ECF), histamin ve lökotrien eozinofil hücre zarı reseptörlerine bağlanarak eozinofilin allerjik veya inflamatuvar reaksiyonun olduğu bölgeye çekilmesini sağlarlar (3). Özellikle allerjik reaksiyonlarda, parazitik enfeksiyonlarda, otoimmün hastalıklarda ve değişik tip kanserlerde sayıları artar (5). İmmünolojik cevaplara katılıp, fagositoz yapabilen eozinofiller kemik iliğinde üretilip, sitokin ailesinin bir üyesi olan IL- 5'in etkisiyle prolifer olurlar ve olgun hücrelere dönüşürler (3).

3. Bazofiller; Tüm lökositlerin %1'inden daha azını oluştururlar. Bu nedenle normal kan yaymalarında görülmeleri oldukça güçtür. Çapları yaklaşık olarak 12 -15 μ 'dur (3,41). Nükleusları "S" harfi şeklinde düzensiz loblara bölünmüştür. Genellikle bazofilik boyanan iri granülleri ile seçilirler. Bazofilik granüller 0.5 μ kadar çapta olup heparin içerikleri nedeniyle bazik boyalarla metakromazi gösterirler (41).

Granüllerde ayrıca histamin, ECF, nötrofil kemotaktik faktör ve peroksidazda bulunur (3,41). Elektron mikroskopik olarak, küçük golgi aparatı, az sayıda mitokondri, endoplazmik retikulum ve arada glikojen depoları belirgin olarak seçilir (3,5). Aşırı duyarlılık reaksiyonlarında bağ dokuya göç ederek mast hücrelerinin işlevlerine katkıda bulunurlar (41). Bununla birlikte, her ne kadar bazofiller ile benzer özelliklere sahip olsalarda mast hücrelerinin kemik iliğinde farklı kök hücreden gelişmesi ve mast hücrelerinin kendine has triptaz enzimi ve ayrıca serotonin içermeleri farklılıklarıdır (3,41,48). Bazofillerin hücre zarında bulunan IgE için spesifik reseptörler hücredeki granüllerin gerektiğinde serbest bırakılmasında etkindir (3,30).

Agranülositler; lenfositler ve monositler olmak üzere iki tiptir.(3).

1. Monositler; Monositler kan dolaşımında bulunan büyük hücrelerdir. Çapları 12-15 μ arasındadır. Lökositlerin % 3-8'ini oluştururlar (3). Nükleusları geniş, özellikle eksentrik yerleşimli, oval, at nalı ya da böbrek şekillidir (4,36,39). Elektron mikroskopunda incelendiğinde nükleusta ökromatik ve heterokromatik alanlar seçilir (3). Sitoplazması geniş, mavimsi gri renkte boyanır. Spesifik granül taşımazlar fakat lizozomik granüller içerirler. Nükleusun çentikli olduğu ve çentik bölgesine yakın yerde nötral kırmızısı ile boyanan vakuoller görülür (3,36). Golgi aparatı nükleusun yakın bölgesine yerleşiktir. Bunun yanında, az miktarda granüllü endoplazmik retikulum, bir miktar mitokondri, serbest ribozom ve lizozom, hücre periferinde mikrotübüller, mikroflamentler ve pinositik veziküller bulunur. Kemik iliğinde monoblastlardan gelişen monositler 30-70 saat içinde dolaşıma geçerler. Dolaşımda bir kaç gün kaldıktan sonra, diapedezle dokulara göç ederek, çaplarını 5-10 kat daha arttırıp makrofaj adını alırlar (3,4).

Makrofajlar, mononükleer fagositik sistemin bir üyesi olup vücuttaki ölü hücreleri, antijenleri, bakteriler gibi yabancı partikülleri fagosite ederler. TNF α (Tumor Necrosis Factor), IL-1 gibi çeşitli sitokinleri sentezleyerek inflamasyon cevabı oluştururlar. Hücrelerin çoğalmasını, olgunlaşmasını sağlarlar. Ayrıca yabancı cisimleri epitoplarna kadar parçalayan antijen sunucu hücreler olarak bilinirler. Yabancı cisimlerle karşılaştıklarında birleşerek yabancı vücut dev hücrelerini oluştururlar (3).

2. Lenfositler; yuvarlak şekilli, tek nükleuslu, agranüler hücrelerdir (41). Lökositlerin % 20-25'ini oluştururlar (3). Çapları 6-18 μ arasında değişir. Çaplarına göre 3 grup altında incelenir.

- Küçük lenfositler; çapları 6-8 μ arasında değişen dolaşımda en fazla bulunan lenfosit tipidir. Nükleuslarının yuvarlak bazen çentikli olduğu, kaba yığınlar halinde kromatin içerdiği görülür (36,41). Sitoplazmaları oldukça az olup kan yaymalarında nükleusu saran ince bir çizgi gibi görünür ve hafif bazofilik boyanır (36). Sitoplazmalarında çok sayıda serbest ribozom, az sayıda mitokondri ve küçük bir golgi kompleksi içerir (3,41).
- Orta boy lenfositler; çapları 6-12 μ arasında değişir. Dolaşımda az sayıda bulunurlar (5,41).
- Büyük boy lenfositler; çapları 18 μ 'a kadar ulaşabilen lenfositlerdir (41).

Lenfositlerin boyutları arasındaki bu fark işlevsel bir önemin varlığını gösterir. Özellikle büyük lenfositlerin özgül antijenler ile uyarıldığı düşünülmektedir (41). Hareket açısından inaktif olan lenfositler kemik iliğinde hemocytoblastlardan köken alırlar ve lenf nodları, timus, dalak, tonsil gibi lenfoid dokularda çok sayıda bulunurlar (4). Yaşam süreleri 1-2 gün olabildiği gibi dolaşımda birkaç yılda yaşayabilirler. Önemli bir özellikleri de diapedez ile bağ dokudan dolaşıma dönebilen tek lökosit grubu olmalarıdır (41). Organizmanın immün cevabı ile ilgili başlıca hücreler olup enfektif mikroorganizmalara, yabancı moleküllere, kanser hücrelerine karşı savaşırlar ama fagositoz yapamazlar (4).

Belirleyici yüzey moleküllerine göre T ve B lenfositler olarak 2 grupta incelenirler (3).

- a. T-Lenfositler;** Kan lenfositlerinin % 65-75'ini oluşturan T lenfositler, kemik iliğinde yapıldıktan sonra timusa gelip orada çoğalıp eğitilerek olgunlaştıktan sonra kan yoluyla lenfoid dokulara taşınırlar (62). Periferik lenfoid organlarda aylarca hatta yıllarca yaşayabilirler (3). Lenfoid organlarda; lenf düğümü parakortikal zonu, dalakta beyaz pulpa içindeki periarteriyel kılıflar, ince barsakta Peyer plakları gibi özel alanlara yerleşirler (36). Hücrel immünitede rol alırlar (5). Olgunlaşmış T lenfositlerin 3 tipi vardır.

- **Sitotoksik T Hücreleri:** CD8 yüzey molekülüne sahip olan sitotoksik T lenfositler (CTL) virüsle enfekte hücrelere ve yabancı maddelere (Örneğin; mantar, virüs, bakteri, parazit) karşı iki yolla savaşır (5,62). Bunlardan biri perforin adı verilen proteinlerle hedef hücre zarında delikler oluşturup, hedef hücreyi parçalamak diğeri ise apoptotik genlerin uyarımı ve hedef hücrenin öldürülmesidir (62).
 - **Yardımcı T Hücreleri (T Helper Cells):** Antijenlere karşı makrofaj gibi görev yapan T helper hücreleri, membranlarında CD4 yüzey molekülü taşırlar. Aktive olarak lenfokinleri (IL-2, 3, 4, 5, 6, IF) sentezlerler. T helper'lardan salgılanan IL-4,5 ve 6, B lenfositlerini uyararak plazma hücrelerine dönüşmelerini ve yüksek titrede antikor sentezlemelerini sağlarlar (30).
 - **Baskılayıcı T Hücreleri (T Suppressor Cells):** CD8 yüzey molekülüne sahip olmalarıyla sitotoksik T lenfositlere benzerler. Salgıladıkları çeşitli lenfokinlerle, B hücrelerin gelişimini bloke ederek antikor yapımını önlerler (30). Böylelikle B hücre aktivitesinin önüne geçerek, immün sistemi baskılamış olurlar (5).
- b. **B Lenfositler;** Dolaşımdaki lenfositlerin yaklaşık % 5-10'unu oluştururlar (62). Kemik iliğinde lenfoid stem hücrelerden orijin alır ve gelişirler (4). Humoral bağışıklıkta görev alan B lenfositler, T lenfositlerden farklı olarak hücre membranlarında antijenle direkt bağlanabilen immunglobulin reseptörlerine (IgM ve IgD) sahiptirler. T hücreleri yıllarca yaşayabilirken, B hücrelerinin ömrü sadece birkaç aydır (3). Antijenle direkt uyarılabilenlerde etkili uyarım için makrofajların ve T lenfositlerin salgıladığı lenfokinlerin yardımına ihtiyaç duyarlar (30). Kemik iliğinden köken alan B lenfositler orada olgunlaşarak uyarılıp, antikor sentezleyen B hücrelerinden daha geniş sitoplazmalı plazma hücrelerine farklılaşırlar. Antikor sentezleyerek vücudu antijenlere karşı savunmasında görev alırlar (4). Bazı B hücreleri ise plazma hücrelerine dönüşmek yerine aynı antijenle ikinci kez maruz kalma ile Bellek B hücrelerine (B memory) farklılaşırlar (30).

3. Trombositler; Kan plaketleri adıda verilen trombositler pıhtılaşmada görev alan 2-4 μ çapında, nükleus içermeyen oval veya bikonveks disk biçiminde, hücre

parçacıklarıdır (3,4,41). Hücre zarlarında kollajen damar duvarı Von Willebrand Faktörü (VWF=trombosit aktive edici faktör) ve fibrinojene ait reseptörler bulunur (63). VWF 12. kromozomda kodlanan endotel hücrelerinde ve megakaryositlerde sentez edilen ve trombositlerde α granüllerinde depolanan bir bileşiktir (64). Trombosit, zar dış yüzeyinde glikozaminoglikan ve glikoproteinden zengin, 15-20 nm çapında bir hücre yüzey örtüsü bulundurur. Bu örtü trombositlerin yapışmasından sorumludur. Kemik iliğinden geniş poliploid hücreler olan megakaryositlerden kopan parçalar olan trombositler 1 mm^3 kanda 200-400 bin kadardır (41). Günde 200 milyar kadar üretilirler (4). Ortalama yaşam süreleri 10 gündür ve kan yaymalarında genellikle kümeler halinde görülürler (41). Periferde soluk mavi renkte yoğun tübüler sistem içeren hiyalomer, merkezde ise mor renkte granül içeren granülomer adı verilen bölgeler içerirler (5). Hiyalomerin esas yapıları mikrotubuller ve aktin filamentleridir (3). Granülsüz olan hiyalomer 2 tübüler sistem içerir.

1. Surface opening (connecting) system; labirent gibi şekillenmiş dış ortamla iletişimin sağlandığı kompleks sistemdir (3). Plazma zarının involüsyonu ile sitoplazmaya doğru uzanan parmaksı girintilerden oluşan bu sistem açık kanaliküler sistem olarakda bilinir ve trombositlerin depoladıkları aktif moleküllerin serbest bırakılmasını kolaylaştırır (5,41)
2. Yoğun tübüler sistem (dense tubuler system) (5).

Granülomer ise; az sayıda mitokondri, glikojen depoları, peroksizomlar ve α , δ ve λ gibi çeşitli tip granüller ve lizozomlar içerir. Enzimlerin bulunduğu yer olan granülomer, glikojenin yıkılmasına, O_2 'nin tüketilmesine, ATP meydana getirilmesine izin verir (3). Hemostazisle ilgili hücreler olan trombositler, yapışkan oluşları nedeniyle özellikle damar yaralanmalarında bir araya gelerek kanamayı durdurucu kapatıcı plak oluştururlar (3,36). Damar yaralanmasında açığa çıkan laminin, VWF'ye yapışarak trombositlerin aktivasyonunu başlatır. Aktive olmuş trombositler psödopodlarını çıkararak şekil değiştirirler ve içerdikleri granülleri dışarı boşaltarak kanama alanındaki diğer trombositlerin kendisine yapışmasını sağlarlar (3,63).

2.1.3. Hematopoez

2.1.3.1. Prenatal Hematopoez

Kan hücrelerinin oluşumu gelişimin ikinci haftasında yolk kesesini çevreleyen ekstraembriyonik mezodermin içinde, mezenşimal kökenli kan hücre adacıklarının oluşması ile başlar. Prenatal hematopoezde periferal hücrelerin ve damar duvarlarının şekillenmesinin görüldüğü ilk aşama mezoblastik faz olarak bilinir. Gebeliğin 6. haftasında ise karaciğer geçici olarak hematopoetik doku fonksiyonu üstlenir ve bu dönem hepatik faz adını alır. 2. trimester boyunca devam eden ve dalağın fonksiyonunun hâkim olduğu faz ise splenik fazdır. Bu aşamada hepatik fonksiyonunda devam ettiği görülür. Gelişimin devamı ile birlikte özellikle klavikulanın kemikleşmeye ve içindeki kemik iliğini oluşturmaya başlamasıyla kemik iliğinde hematopoez başlar. Bu faz ise myeloid faz adını alır (3).

2.1.3.2. Postnatal Hematopoez

Yaşam sürelerinin sınırlı olması ve gelişmiş fonksiyonları nedeniyle kan hücreleri yüksek yenilenme yeteneğine sahip hücrelerdir. Her gün bol miktarda eritrosit, lökosit ve trombosit fizyolojik veya patolojik yollarla kaybedilmekte ancak hemen yeni hücreler yerlerine konulmaktadır (65). Doğum sonrası dönemde yaşam süreleri dolan yaşlanan hücrelerin yerine kemik iliğinde yer alan ve çoğalma yetenekleri yüksek olan hematopoetik kök hücrelerden yenileri üretilir. Bu yapım ve yıkım mekanizması belirli bir denge içinde devam eder. Günlük 10^{11} den fazla sayıda kan hücresinin, yıkılan kan hücrelerinin yerini alması bu yapım yıkım mekanizmasının kanıtıdır (3,65).

2.1.3.3. Hematopoetik Kök Hücreler

Yapılan çeşitli deneysel çalışmalar sonucu tüm kan hücrelerinin ortak bir atadan hematopoetik kök hücreden geliştiği belirlenmiştir (65). Kök hücreler toplam hematopoetik hücrelerin yaklaşık % 0.05'i olduğundan kök hücreleri tanımlamak ve ayırt etmek oldukça zordur. Morfolojileri ayırt edilmese de hücre yüzey belirleyicileri olan c-kit ve Thy-1 ile kolayca tanımlanabilirler (48). Tüm kan hücrelerinin kökeni olan pluripotent kök hücreler kendini yenileyebilme ve farklılaşabilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Bu hücrelerin bölünmesiyle myeloid

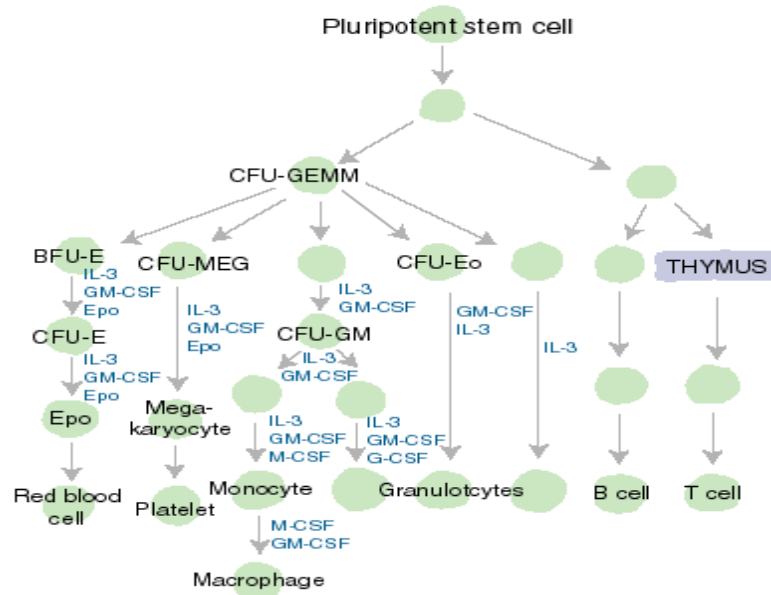
kök hücreler ve lenfoid kök hücreler olmak üzere 2 tip multipotent kök hücre oluşumu gözlenir. Bu hücre grupları yüksek mitotik aktiviteye sahip olan ve kendini yenileyebilen CFU oluşturan çeşitli progenitör hücrelere dönüşürler. Bunlardan biri Colony Forming Unit-Spleen (CFU-S), diğeri ise Colony Forming Unit-Lymphocyte'dir (CFU-Ly) (3).

2.1.3.4. Progenitör ve Prekürsör Hücreler

Multipotent kök hücreler farklılaşarak yetenekleri kısıtlanmış unipotent veya bipotent progenitor hücrelere dönüşürler ve bu hücrelerde farklılaşarak ileride dönüşecekleri olgun hücre tiplerinin prekürsörlerini meydana getirirler. Progenitör hücreler hızla defalarca bölünebilir sayılarını arttırabilirler (3,30). Mitoz bölünme aktiviteleri ve farklanmaları spesifik hematopoetik faktörlerce kontrol edilir (3). Kanda ve lenfoid organlardaki hücrelerin yapımını üstlenmişlerdir. Myeloid progenitör hücrelerden; eritrosit CFU, megakaryosit CFU, bazofil CFU, eozinofil CFU, granülosit ve makrofaj CFU'nun farklılandığı görülür (48). Lenfoid progenitör hücrelerden CFU lenfosit oluşumunda ise T hücre öncüllerinin timusta, B hücre öncüllerinin ise kemik iliğinde geliştiği gözlenir (3,48). Prekürsör hücreler yüksek mitotik aktiviteye sahip olmalarına karşın kendilerini yenileyebilme potansiyeline sahip değildirler. Kan yapımının gerçekleşebilmesi için minimal çevresel koşullara, çoğalma, farklılaşma, olgunlaşma ve yaşayabilirliği kontrol eden düzenleyici molekülere, hücresel olaylarda negatif ve pozitif etkilere sahip olan sitokinlere ve çeşitli büyüme faktörlerine ihtiyaç vardır (65,66). Büyüme faktörleri hematopoetik sitokinler olarak da bilinirler (48). Geniş bir aile olan sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin hücre farklılaşmasında üstlendiği roller üzerinde oldukça fazla durulmaktadır (67). Bu faktörler kemik iliğinde endotel hücreler, stromal hücreler, fibroblastlar, lenfositler, makrofajlar tarafından üretilirken, kemik iliği dışında da üretilebildiği görülmüştür (48). Çevresel koşullar sağlandığında, büyüme faktörleri öncelikle olgunlaşmamış hücreleri mitozla çoğalmaya yönlendirerek, erişkin haldeki hücreleri ise farklılaşmasını destekleyerek ve etkinliklerini arttırarak etki gösterirler. CSF, IL'ler ve eritropoetinler olmak üzere 3 çeşit büyüme faktörü vardır (68). Kan yapımı için gerekli düzenleyici moleküller negatif ve pozitif regülatörler olarak bilinirler. Macrophage Inhibitory Protein- α (MIP- α), TNF ve TGF- β negatif

düzenleyiciler olarak bilinirken, büyüme faktörleri ise pozitif düzenleyiciler olarak kabul edilir (66). CSF progenitör hücreleri uyararak birçok hücre grubunun veya kolonisinin büyümesini sağlar (48). IL'ler, lökositler ve bilhassa lenfositler tarafından üretilirler ve otokrin mekanizma veya parakrin mekanizma ile diğer hücreleri etkilerler. IL1, IL3 ve IL6 gibi bazı grupları pluripotent ve multipotent kök hücrelerin proliferasyonunu uyarırken, G-CSF, IL3, IL7, IL8, IL11, IL12, MIP- α ve eritroid seri hücrelerini aktive eden bir glikoprotein olan eritropoetin'in mobilizasyon ve farklılaşmasında görev aldıklarına inanılır (3,48). Sayılan bu faktörlerin hematopoezde etkin oldukları yerler Resim 5'de ayrıntılı olarak özetlenmiştir.

Hematopoiesis



Resim:5. Hematopoezis

(69 No'lu kaynaktan alınmıştır)

2.1.3.5. Kemik İliği

Kemik iliği uzun kemiklerin medüller kanallarında, spongiöz kemiklerin ise süngerimsi boşluklarında yer alır. Total vücut ağırlığının %5'ini oluşturup, kan hücrelerinin gelişiminde görev alırlar (3). İntrauterin gelişimin 5. ayından, kişinin ölümüne kadar fonksiyon gösterirler. Stromal bölüm ve hemopoetik bölüm olmak üzere iki bölüm içerirler. Stromal bölüm yağ hücreleri, fibroblastlar, stromal hücreler, damar endotel hücreleri, makrofajlar ve kan damarları ağından oluşur. Kemik iliğinin periferine yerleşik hematopoetik bölüm ise besleyici arterlerden, periostal kapiller ağdan ve özelleşmiş sinüzoidlerden gelen damarlar tarafından iyi

beslenen ve yeterli sayıda, farklı tipte hücrelerin fizyolojik ihtiyaçlarına cevap verebilen bölümdür (48).

Kemik iliği kırmızı kemik iliği ve sarı kemik iliği olmak üzere iki tiptir (68). Yeni doğanda kemik iliği çok sayıda eritrosit üretiminin görülmesi ile kırmızı kemik iliği adını alır (3). Çocuk büyüdükçe kemik iliğinin çok sayıda yağ hücresi içeren sarı kemik iliğine dönüştüğü görülür (3,68). Kırmızı kemik iliği stroması, hematopoetik kordonlar ve sinüzoidal kapillerleri içerirken, kemik iliği matriksi tip I ve tip III kollajen, fibronektin, laminin ve proteoglikanları içerir. Laminin, fibronektin ve hemonektin'in ise hücreleri matrikse bağlama fonksiyonları olduğu görülür. Kırmızı kemik iliğinin işlevlerinin başında; kan hücre üretimi, hasarlanmış eritrositlerin yok edilmesi ve yıkılan Hb'den elde edilen demirin depolanması gibi fonksiyonlar bulunmaktadır (68). Kırmızı kemik iliğinde temel olarak 3 tip seri hücre üretilir.

1. Eritroid seri üretimi (eritropoez)
2. Lökositler seri hücreleri üretimi (granülositopoez ve lenfopoez)
3. Trombositler seri üretimi (trombositopoez)

1. **Eritropoez:** Eritropoezde temel prensip Hb sentezi ve eritrositin oluşumudur (68). Eritropoezde ilk fark edilen prekürsör hücreler proeritroblastlardır. Bunu bazofilik eritroblastlar, polikromatofilik eritroblastlar, ortokromatofilik eritroblastlar ve retikülositler takip eder (3).

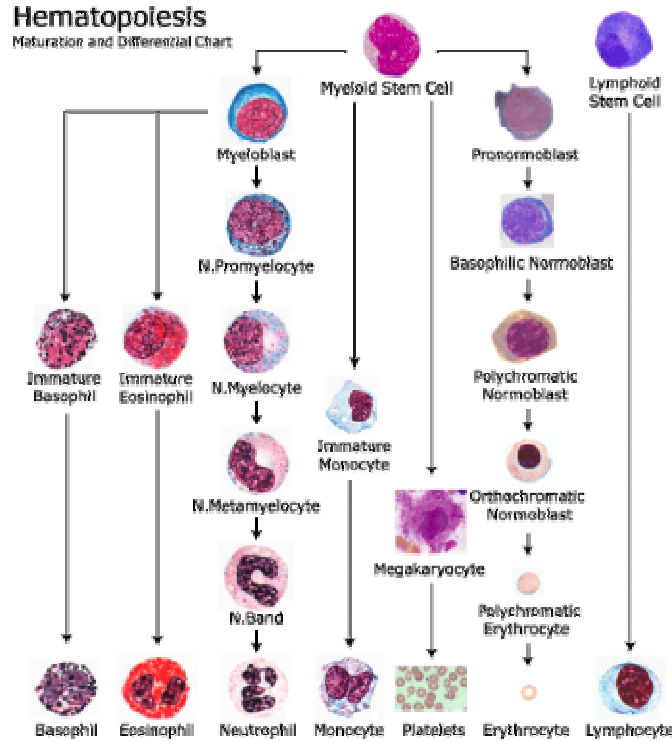
- **Proeritroblastlar:** 12 -15 μ çapında, gevşek dantelimsi kromatin içeren, küresel nükleuslu ve 1-2 adet nükleolus bulunduran geniş hücrelerdir. Sitoplazmaları orta derecede bazofiliktir. Kemik iliği yaymalarında tanımlanmaları kolay değildir. Peşisıra birkaç defa bölünüp bazofilik eritroblastlara farklılaşırlar (5,30).
- **Bazofilik Eritroblastlar:** Nükleusları daha küçük ve daha heterokromatiktir. Hb sentezinde rol alan çok sayıda poliribozom taşıdıkları için koyu bazofilik boyanırlar. Mitoz geçirerek polikromatofilik eritroblastlara farklılaşırlar (5,30).
- **Polikromatofilik Eritroblastlar:** Bu evrede poliribozomların azaldığı ve sitoplazma alanlarının Hb ile dolduğu görülür. Mitotik olarak aktiftirler. Sitoplazma ribozomdan dolayı bazofilik, Hb'den dolayı eozinofilik boyandığından çok renkli bir görünüm arz ederler (5).

- **Ortokromatofilik Eritroblastlar:** Normoblastlar olarak da bilinirler. Hücre nükleuslarının daha koyu, daha küçük ve kenara itilmiş olduğu görülür. Sitoplazmalarında bazofili oldukça azaldığından asidofili hâkim hale gelmeye başlar (5,30). Üç defa bölünebilirler ve sonrasında replikasyon durur, nükleus dışarı atılır ve makrofajlar tarafından parçalanır. Nükleusunu atan normoblastlar daha da küçülürler ve psödopodlarıyla sinüzoidlere geçerler ve retikülosit adını alırlar (30).
- **Retikülositler:** Retikülositlerde bir miktar ribozom olmasına karşın protein sentezi tamamen durmuştur. Bu genç eritrositler periferik kanda ortalama 3 gün içinde ribozomlarından arınıp olgun eritrosit halini alırlar. İnsanda periferik kana günde 200-250 milyar retikülosit geçtiği halde, total kandaki miktarı tüm eritrositlerin % 1-2'si kadardır. Kanda artan retikülosit sayısı kan kaybının tamponlanmasında etkin bir mekanizma olarak bilinir. (5,30).

2. **Granülositopoiesis:** Granülosite farklılaşacak progenitör hücreler bölünüp, çoğalarak miyeloblastlara farklılaşırlar. Bunlar 10-18 μ çapında, sitoplazmaları bazofilik, nükleusları koyu renkte iri hücrelerdir. Miyeloid seride en olgunlaşmamış olarak tanınabilen ve her üç tip granülositin prekürsörleri olan miyeloblastlar, mitoz geçirerek çoğalırlarken bir yandanda farklılaşarak promiyelositleri meydana getirirler (30,68).

- **Promiyelositler:** Miyeloblastlardan daha iri hücrelerdir. Nükleusları ufalmış, yuvarlak ve heterokromatik bir hal almıştır. İnsanda ve hayvanda azurofil granüllerin ilk olarak bu dönemde ortaya çıktıkları, lizozomal enzimler ve miyeloperoksidaz içerdikleri görülür. Bölünüp çoğalarak miyelositlere farklılaşırlar (3,30,68).
- **Miyelositler:** Promiyelositler'den daha küçük hücreler olup nükleuslarının ufak ve heterokromatik olduğu görülür. cis-Golgi'den spesifik, trans-Golgi'den azurofilik granüller ortaya çıkar. Spesifik granüller ilk defa myelosit sitoplazmasında ortaya çıkarlar (30). Granüllerin özelliğine göre miyelositler nötrofil miyelositler, eozinofil miyelositler ve bazofil miyelositler olmak üzere 3 gruba ayrılırlar. Bazofil ve eozinofiller birbirinden bağımsız olarak eozinofil ve bazofil CFU'dan farklılaşırlarken, nötrofillerde monositlerle aynı öncü hücrelerden farklılaşırlar (48) (Resim:6). Gelişim

sırasında her bölünme ile azurofil granüller miktar olarak azalırken, spesifik granüller ortalama 4 kat artar. Nükleusun orta hattında artan çukurlaşma ile böbrek ya da at nalı şeklini aldığı görülür. Bölünme yeteneğini kaybeden bu hücreler metamiyelositlerdir (5,30).



Resim:6. Kemik iliğinde kan hücrelerinin gelişimi ve farklılaşması (70 No'lu kaynaktan alınmıştır)

- **Metamiyelosit**'lerin nükleuslarının sitoplazmaya oranla daha fazla ufaldığı ve loblanmaya başladığı görülür. Bu görünüşleriyle metamiyelositler birer genç granülosit haline gelmişlerdir. Kırmızı kemik iliğinde bir süre geliştikten sonra olgun hücreler olarak sinüzoidlere geçerler. Ancak bir ayrıcalık olarak nötrofiller band formu içerirler. Nükleusların eninin değişmeyip boyunun uzadığı ve lob sayısının 3-5 arasında değiştiği görülür (30).
- Polimorfonükleer nötrofiller olarakta bilinen nötrofillerin özellikle inflamasyon durumlarında band formlarının olgun nötrofillerle birlikte dolaşımında yer aldığı görülür (5).

Lenfopoez

Dolaşımdaki lenfositler esas olarak timus ve dalak, lenf nodları, tonsilla gibi lenfoid organlardan köken alırlar. Bunun yanında tüm öncül lenfosit hücreleri aslen

kemik iliğinden köken alır. CFU-Ly'den 2 unipotent progenitör hücre oluştuğu görülür. Bunlar CFU-Ly T ve CFU-Ly B'dir (3,5).

- CFU-Ly T; mitoz geçirerek şekillenen hücrelerdir. Kemik iliğinden timusa göç ederek orada olgunlaşıp, farklılaşarak dolaşıma geçerler. Hücre yüzeylerinde eksprese ettikleri CD4, CD8 gibi yüzey reseptörleri ile tanınırlar (3).
- CFU-Ly B; kemik iliğinde olgunlaşıp diğer lenfoid organlara göç eden hücrelerdir (48).

Lenfoid hücrelerin ilk saptanabilen progenitörü lenfoblastlardır.

- Lenfoblastlar 12-15 μ çapında yuvarlak hücrelerdir (30). İki ya da üç kez bölünebilme yeteneğine sahip olan bu hücreler olgun lenfositlerin gelişimi sırasında bir ara basamak olan prolenfositlere farklılaşırlar (48,68).
- Prolenfositler; göreceli olarak daha küçük ve daha belirgin kromatine sahiptir. Fakat prolenfositleri T veya B lenfositleri olarak işaretleyen hücre yüzey antijenlerinin hiç biri yoktur. Kemik iliğinde ve timusta bu hücreler kökenlerinin özelliğini oluşturan hücre yüzey reseptörlerini sentezlerler. Fakat histolojik incelemelerde ayrı T veya B lenfositleri olarak tanınmazlar. Prolenfositler bölünmeksizin farklılaşarak lenfositleri meydana getirirler (30,68).

Monositopoez

Hem nötrofil hemde makrofaj serilerine ait hücreleri veren granülosit-makrofaj progenitör CFU'dan farklılaşırlar. CSF tarafından özgün olarak uyarılma sonucunda her bir progenitör hücre kendi serisinde farklılaşmaya devam eder. G-CSF granülosit öncül hücreleri miyeloblast yönünde farklılaşırken, GM-CSF monosit öncüleri monoblast yönünde farklılaşır. Monoblastlar monositlerin öncüleridir. Miyeloblastlara oldukça benzerlik gösterirler. Bölünüp çoğalarak bazofilik sitoplazmalı, 16-18 μ çapta, girintili nükleusa sahip olan promonosite farklılaşırlar (3,30,48,68). Azurofil granüllerin ilk belirlendiği hücre olan promonositler 2 kez bölünmeye uğrayarak monositleri oluştururlar.

Trombositopoez

Trombositlerin öncü hücresi megakaryoblastlar, megakaryosit CFU'dan farklılaşırlar. Megakaryoblastlar 15-50 μ çapında olabilen böbrek şekilli nükleus ve

birden fazla nükleolus içeren hücrelerdir. Sitokinezis ve karyokinezis görülmezsizin nükleuslarında peş peşe DNA replikasyonu yani endomitoz görülür. Yüksek derecede görülen protein sentezi ile çapları büyüyerek 100 μ 'a dek ulaşır ve megakaryositlere dönüşürler (3,5,30,48,68). Megakaryositler 35-160 μ çaplarında olabilen, düzenli boğumlu nükleusları olan, heterokromatin içeren ve görünür nükleolusları bulunmayan hücrelerdir (48,68). Sitoplazmalarında sayısız mitokondri, iyi gelişmiş granüler endoplazmik retikulum ve geniş bir golgi kompleksi bulunur. Sitoplazmadan içeriye parmaksı girintileri vardır. Bu girintiler sitoplazmanın her tarafına dağılarak demarkasyon kanallarını oluşturur. Bu sistem trombositlerin içerdiği maddeleri dolaşıma salınmasını kolaylaştıran megakaryosit sitoplazması alanlarını tanımlar. Ayrıca eritropoetin ile yapısal olarak benzerlik gösteren, karaciğerde üretilen trombopoetinin de megakaryositlerin farklanmasında etkin olduğu bilinmektedir (5,48,68).

2.1.4. Kan Doku Fizyolojisi

Vücudun dış ortamla ilişkisini kontrol eden önemli dokulardan biri olan kan vücutta damarlar içinde kalp atımı yardımıyla dolaşır ve öncelikli olarak dış ortamdan alınan O₂'nin vücut hücrelerine ulaştırılmasını ve bu hücrelerde oluşturulan atık maddeler yanında CO₂'nin vücut dışına atılımını dengede tutar. Genel anlamda incelendiğinde kanın organizmada oldukça önemli görev ve fonksiyonlara sahip olduğu görülür. Bunlar, taşıma, düzenleme, savunma ve korumadır (4,63).

▪ **Taşıma Görevi:** Kan vücudun ihtiyacı olan O₂ ve besin maddelerini ilgili organlara ve dokulara ileterek metabolizma sonucu oluşan metabolitleri ve CO₂'yi dokulardan uzaklaştırmak suretiyle taşıma görevini yerine getirir (4). Ayrıca hormonların, antikörlerin, çeşitli kimyasalların, enzimlerin ve ısının iletimi de kanın taşıma görevleri arasında yer alır (5,63).

▪ **Düzenleme Görevi:** Kanın vücudun iç ortamını dengede tutucu fonksiyonları vardır. Pıhtılaşma, sıvı elektrolit dengesinin düzenlenmesi, asit-baz dengesinin sağlanması, osmotik basıncın düzenlenmesi, metabolizma sonucu oluşan ısının bütün vücuda yayılması ve vücut ısısının belirli bir dengede tutulması, düzenleme fonksiyonu için verilebilecek örneklerdir (3,4).

▪ **Koruma Görevi:** Kanama kontrolü bu göreve örnek verilebilir(63).

▪ **Savunma Görevi:** Kan antijenik maddelere karşı homing mekanizmaları, fagositik hücre göçü, kan hücrelerince sentezlenen antikorların taşınmasını sağlamak ve hücre sinyal iletiminde aracı olmak suretiyle vücudu savunur. (4,63).

2.2. Hücre Ölümü

Erişkin bir insanda ortalama hücre sayısı 10^{13} olmasına karşın bazal şartlarda dakikada 10^7 granülositin kemik iliğinden dolaşıma çıkması kan dokusunun önemini ortaya koymaktadır. Kendini yenileyen dokular veya organizmanın bütünlüğü düşünüldüğünde bir yıl içinde gerçekleşen hücre yapımının tüm vücut kitlesi kadar olduğu söylenebilir (71). Bu nedenle organizmanın bütünlüğünün ve homeostazisinin korunmasında hücre çoğalması ve farklılaşmasının yanında hücre ölümünde gereklidir. Canlılığın temel karakteristik özelliklerinden biri olan hücre ölümü esas olarak 2 tipte tanımlanmaktadır

1. Patolojik hücre ölümü (nekroz)
2. Fizyolojik hücre ölümü (apoptozis) (72).

2.2.1. Nekroz

Nekroz fizyolojik bir ölüm şekli olmayıp, patolojik etkenler sonucu ortaya çıkan hasarlı hücre ölüm şeklidir. Hücre enerji kaynaklarında azalmayı, hücresel çözünmeyi ve bunları izleyen içsel homeostasis'in yıkımını içerir (7). Hücre çevresinde meydana gelen iskemi, fiziksel travma, hipertermi, kompleman aktivasyonu, UV ışını gibi zararlı uyaranlar sonucu oluşan istenmeyen bir süreçtir (9,14). Patolojik bir hücre ölümü olan nekrozda morfolojik olarak zar geçirgenliğinin bozulmasına bağlı sitoplazmada şişme ve organel yapısında bozulma görülür. Ancak kromatin yapısı erken dönemlerde normaldir. Hücre zarı yırtılması sonrası çevreye yayılan hücre artıkları enflamatuvar süreci uyararak çevredeki diğer hücrelere zarar verir ve süreç giderek şiddetlenerek artar (6).

2.2.2 Apoptozis Tanımı ve Tarihçesi

Her hücrenin yaşam süresi hücre tipine göre değişiklik gösterir. Örneğin barsak hücrelerinde bu süre 3-5 gün kadar kısa olmasına karşın derinin epidermal hücreleri 20-25 günü bulmakta ve postmitotik karakterdeki myositlerde ve nöronlarda yılları

bulabilmektedir (17). Bununla birlikte, tüm hücrelerin yaşam süresi organizmanın durumuna göre değişiklik gösterebilir. Örneğin nöronların sayısı doğum anında oldukça belirgin şekilde azalır. Bu sayede uygun sinaptik ağın sağlanabilmesi için optimum sayıda nöron geri kalır ve sağlıklı sinir sistemi ağı gelişimi sağlanmış olur. Öte yandan intrauterin gelişim dönemi içinde diğer tüm organların şekillenmesinde ve fonksiyonlarını kazanmasında apoptozis fizyolojik bir düzenleyicidir. Örneğin immün sistemde gelişimsel süreçte oluşan aşırı B ve T hücrelerinin ölümü ile bu hücrelerden salınabilecek sitokin türü toksinlerin azaltılması ve oluşabilecek olası fetotoksik zarar önlenir (19). Ayrıca, intrauterin gelişim sırasında tübüler yapıların lümenlerinin gelişiminde, ekstremitelerin ortaya çıkmasında, el ve ayak parmak aralarının açılmasında, damak füzyonu sonrasında kalıntı epitel hücrelerinin ortadan kaldırılmasında apoptozis etkindir. Embriyonel gelişimin erken evrelerinde de izlenmekte olan apoptozis böbrek taslaklarının dejenerasyonlarında ve fetal testis önünde Müller kanalın gerilemesinde de önemli roller üstlenmektedir (19,73).

Apoptozis sadece embriyonik gelişim sırasında değil normal yetişkinde de görülür. Organizmadaki tanımlanmayan, hasarlı ve ölü hücrelerin ortadan kaldırılmasında, retinanın büyüme ve gelişmesinde, timusta lenfositlerin olgunlaşmasında etkindir. Ayrıca hormon yetersizliğine bağlı gelişen organ gerilemelerinde, menstrüasyonda endometrial hücre yıkımında, menopozda ovaryum follüküllerinin atrezisi gelişiminde, laktasyon sonrası meme bezi gerilemesinde, Adreno Cortico Tropic Hormon geri çekilmesinden sonra adrenal atrofi, kastrasyon sonrası prostat atrofisinde de hücreler apoptozis ile vücuttan uzaklaştırılarak organizmaya zararları önlenir (15,19,25).

Bununla birlikte, değişik viral enfeksiyonlarda, aşırı hücre çoğalması sırasında oluşan hatalı DNA'ya sahip hücrelerde, malignite sonucu DNA yapısı bozulan hücrelerde hücre organizmayı korumak için değişik intrinsek ve/veya ekstrinsek mekanizmaları aktive ederek kendini öldürür yani apoptozise gider (17,74). Bunlara örnek olarak pankreas, parotis ve böbrek gibi organlarda kanal tıkanmalarına bağlı olarak gelişen atrofiler, viral hepatit de karaciğerde görülen apoptotik hücreler (Concilman cisimcikleri) verilebilir. Ayrıca yüksek ateş sonucu görülen aşırı nöron yıkımında apoptotik süreç tetiklenmesiyle olmaktadır. Kansere gibi malign hastalıklarda tedavi amacıyla kullanılan hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser

ilaçlar, hipoksik ajanlar gibi değişik etkenlerde hasarlı hücrelerde apoptozisi arttırmak suretiyle tedaviyi sağlamaya çalışırlar (19).

İlk kez 1972’de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından tanımlanmış olan apoptozis, önceleri büzüşme nekrozu olarak tanımlanmış ama sonrasında sürecin nekrozdan tamamen farklı olduğu ortaya konmuş ve fizyolojik bir süreç olduğu ispatlanmıştır (12). Nitekim, apoptoziste görülen morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler nekrozdan tamamen farklıdır. Bu farklar Tablo:1 ve 2’de karşılaştırılmıştır.

APOPTOZİS	NEKROZ
Tek hücrenin kaybı	Hücre gruplarının ölümü
Membran bütünlüğü bozulmadan hücre kabarcıklaşması	Membran bütünlüğünün kaybı
Hücre büzülmesi ve apoptotik cisimlerin oluşumu	Hücre şişmesi ve lizis
Enflamasyon yok	Enflamasyon belirgindir
Makrofajlar tarafından fagositoz	Makrofajlar ve diğer enflamatuvar hücrelerce fagositoz
Lizozom yapısı sağlamdır	Lizozomal sızıntı mevcuttur
Kromatinin yoğun kitleler haline gelmesi	Kromatin kümeleşmesi, belirsiz toplanma

Tablo 1. Apoptozis ve nekrozun morfolojik kriterleri (75)

APOPTOZİS	NEKROZ
Fizyolojik uyarı bozukluğu	Fizyolojik olmayan uyarı
Sentetik ve aktivasyon basamakları ile sıkı ilişkili süreç	İyon dengesinin düzenlenmesinin kaybı
Enerji gerektirir	Enerji gerektirmez
Makromolekül sentezi gerektirir	Protein ya da nükleik asit sentezi gerekmez
Yeniden gen transkripsiyonu gerektirir	Yeniden gen transkripsiyonu gerektirmez
DNA’ nın belirli uzunlukta oligonükleozomlara parçalanması	DNA’ nın rastgele sindirimi

Tablo 2. Apoptozis ve nekrozun biyokimyasal kriterleri (75).

Apoptotik hücre ölümünde görülen temel morfolojik değişiklikler; hücre büzülmesi (cell shrinkage), nükleer membranın altında kromatin yoğunlaşması (chromatin condensation), hücre zar yüzeyinde cepçiklerin (blebs) oluşması, DNA kırıklarının gözlenmesi, hücre iskeletinin yıkılması ve apoptotik cisimciklerin (apoptotic bodies) oluşmasıdır (76,77).

Apoptozis sürecinin genetik temelleri ilk olarak bir nematod olan *Caenorhabditis Elegans* (CE) üzerinde çalışılmış ve elde edilen veriler tıp alanında önemli açılımlar sağlamıştır (78). Bu çalışmada keşfedilen genler “*Caenorhabditis Elegans Death*” sözcüklerinin baş harflerinden dolayı “ced genleri” olarak isimlendirilmiştir. CE’de apoptozisten sorumlu 4 gen vardır. Bunlar; egl-1, ced-3, ced-4 ve ced-9’dur. Bu genlerin insanlardaki homologları da belirlenmeye devam etmektedir. CE’de egl-1, ced-3 ve ced-4’ün apoptozisi sağladığı ancak ced-9’un ced-3 ve ced-4’ün aktivasyonunu inhibe ederek apoptozisi baskıladığı belirlenmiştir (79). CE’de görülen apoptozis modelinin insanlarda da benzer olduğu ancak bu sürecin çok daha kompleks bir yapıda işlediği görülür (16).

Organizmada apoptozisi uyaran veya baskılayan değişik faktörler vardır. Uyaran faktörler 4 ana grupta sınıflanabilir (80);

- **Fizyolojik Aktivatörler:** Glutamat, dopamin gibi nörotransmitter maddeler, TNF ailesi, TGF- β , Kalsiyum ve glikokortikoidler
- **Hasar İle İlgili Uyarıcılar:** Isı şoku, viral enfeksiyonlar, bakteriyel toksinler, onkogenler, tümör baskılayıcıları, sitotoksik T hücreleri, oksidanlar, serbest radikaller, beslenme eksikliği ve antimetabolitler.
- **Tedavi İle İlgili Ajanlar:** Sisplatin, doksorubisin, bleomisin ve vinkristin gibi kemoterapötik ajanlar, γ ışınları ve UV ışınları.
- **Toksinler:** β -amiloid peptid ve etanol.

Baskılayan faktörler ise 3 grupta sınıflanabilir (80);

- **Fizyolojik Baskılayıcılar:** Büyüme faktörleri, ekstrasellüler matriks, CD40 ligand, doğal aminoasitler, çinko, östrojen ve androjenler.
- **Viral Genler:** Adenovirüs E1B, Bakülo virüs p53 ve IAP, Çiçek virüsü, crmA, Epstein Barr virüs, BHRFI, LPM-1, Afrika domuz ateşi virüsü, LMWS-HL, Herpes virüs, y1 34.5
- **Farmakolojik Ajanlar:** Forbol 12 miristat asetat (PMA), fenobarbital, α heksaklorosiklo-hekzan gibi tümör baskılayıcıları, sistein proteaz inhibitörleri ve kalpain inhibitörleri (80).

2.2.2.1. Apoptozis Gelişim Basamakları

Apoptozis hücre içi (intrensek) veya hücre dışı (ekstrensek) belirli uyarılarla başlatılan moleküler olayların enerjiye bağımlı döngüsünün son noktasıdır. Üç ardışık basamağı vardır (19).

- A. Ekstra ve intrasellüler sinyallerle apoptozisin başlatılması ve hücre içi proteazların aktivasyonu (apoptozisin interfaz fazı)
- B. Hücrede morfolojik, biyokimyasal ve metabolik değişiklikler
- C. Fagositoz

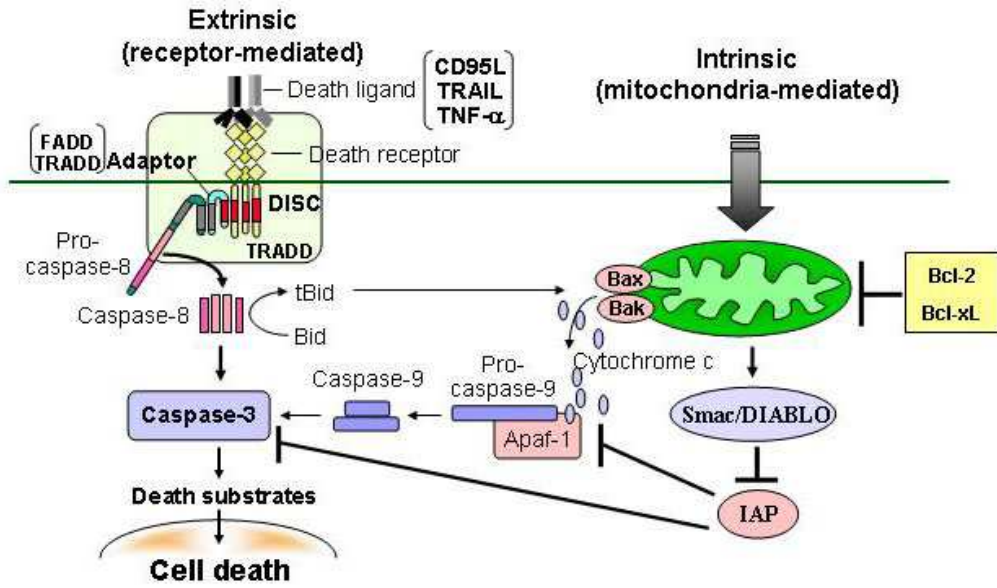
A. Apoptozisi Başlatan Sinyal Yolları

Hücrenin apoptozise girebilmesi için öncelikle ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek apoptotik sinyallere gerek vardır. Ekstrensek apoptotik sinyaller hücre düzenleyici moleküllere hücre zarını geçtikten sonra intrensek sinyaller ise hücre içinde bulunan hedeflere direkt olarak ulaşarak etki gösterirler (Resim:7) (18).

Hücre Dışından (Ekstrensek) Kaynaklanan Sinyaller;

Bu sinyaller iki grupta incelenir.

1. Çevresel yaşam sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin yetersizliği; Bu sinyaller apoptozisin negatif ya da pozitif belirleyicisi olabilirler. Bazı hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinler önceden var olan ölüm programını baskılayarak iletim döngüsünü oluştururlar. Bu faktörlerin eksikliği ya da yokluğunda ise ölüm programı baskılanamaz ve apoptozis tetiklenir. Örneğin; nöronlarda Neural Growth Factor yetersizliğinde apoptozis gözlenmiştir (18,19).
2. Reseptör ligand etkileşimi; TNFR ailesinin hücre zarı reseptörlerine spesifik ölüm ligandlarının bağlanması ile başlatılan ölüm yolu hücre dışından kaynaklanan sinyallere verilebilecek önemli bir örnektir (13,18).



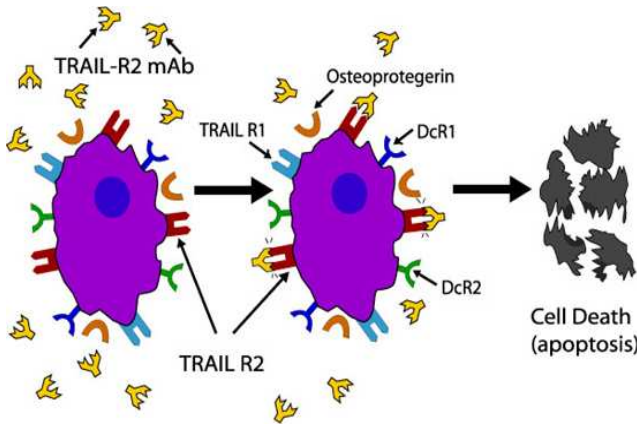
Resim:7. Apoptozisde etkin ekstrensek ve intrensek moleküller ve mekanizmalar
(81 No'lu kaynaktan alınmıştır)

Hücre dışı sinyal molekülleri içinde TNF, Fas, TRAIL ve Sitotoksik T lenfosit aracılı apoptozis önemli yer tutmaktadır.

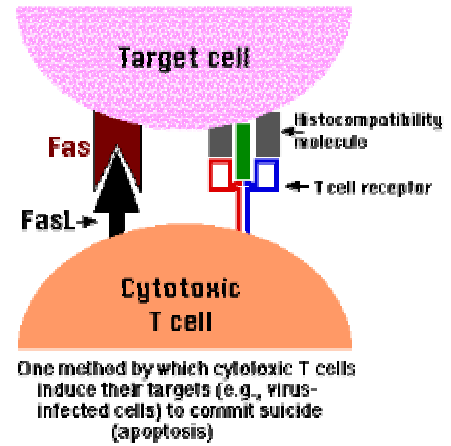
- TNF Aracılı Apoptozis; Proenflamatuar bir sitokin olan TNF aktif T hücreleri ve monosit makrofajlar tarafından üretilir (82). İnflamatuar cevabın düzenlenmesinin yanında hücre proliferasyonu, diferensiyasyonu ve apoptozisde de çok önemli rol oynar. TNFR süper ailesi apoptoziste rol alan en önemli membran reseptörleridir ve kaspazlar üzerinde etki gösterirler. Bu reseptör grubunun 19'dan fazla üyesi vardır. Bunların arasında TRAILR, TNFR 1,2 ve 3, Osteoprotegerin ve CD40 yer almaktadır (19). TNF-R1 kendi başına apoptozisi tetikleyebilmesine karşın TNF-R2 ise ölüm domaini içermediği için Nükleer Faktör Kappa B'nin (NF κ B) aktivasyonuna aracılık eder (6).
- Fas/FasL Aracılı Apoptozis; Fas insanlarda TNFR ailesinin Tip I membran hücre yüzey proteini olup, doğal ligandı olan Tip II membran proteini Fas L ile apoptozisi gerçekleştirir (6,21). Lenfoid hücrelerin yanısıra, bazı kanser hücreleri karaciğer, akciğer, timus ve over gibi dokularda da eksprese edilirler (6,83). Fas L'nin Fas'a bağlanmasından sonra oluşan moleküler kompleks, hücre içi sitoplazmik kuyruğun ölüm domainine özgün adaptör protein olan FADD (Fas adapter protein with a death domain) ile birleşir.

FADD doğrudan ICE (Interleukin 1 β Converting Enzyme) ailesinin bir üyesi olan FLICE/MACH ile etkileşir. Fas'ın FADD ve FLICE ile trimerize olması sonucunda DISC (death inducing signaling complex) şekillenmesi gözlenir. DISC'in ICE proteazların aktivasyonunu sağlamasıyla apoptozisin gerçekleştiği gözlenir (19).

- TRAIL reseptörleri aracılı apoptozis; TNF reseptörlerinin diğer bir alt grubu olan TRAIL reseptörleri (TNF related apoptosis inducing ligand receptors) APO-2L olarak da bilinir ve bu tip ligandlar spesifik ölüm reseptörleri ile birbirini etkileyerek hücre ölümünü indükleyebilirler (84). TRAIL 5 farklı reseptöre bağlanır. Bunlar; TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3 (DcR1), TRAIL-R4 (DcR2) ve OPG'dir (osteoprotegerin). TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 dışındakiler 'decoy receptors' olarak bilinirler. Bunun sebebi TRAIL' in indüklediği apoptozisi baskılayabilmeleridir (85). DR4 ve DR5 ise ölüm reseptörleri olarak bilinir ve prokaspaz 8 ve FADD' ın varlığında DISC şekillenmesi ve kaspazların aktivasyonu ile hücrede apoptozisi uyarırlar (85) (Resim: 8). TRAIL ve TRAIL-R normal doku ve tümürlü dokularda eksprese edilirler. Bununla birlikte TRAIL'in kanser hücreleri için toksik, normal hücreler için ise toksik olmayan tarzda hareket etmesi kanser tedavisindeki yerini giderek önemli hale getirmektedir (84).
- Sitotoksik T-Lenfosit (CTL) Aracılı Apoptozis; CTL'ler enfekte olmuş konakçı hücrelerin yüzeylerinde bulunan yabancı antijenleri spesifik olarak tanırlar. Ana görevleri bakteri ve virüsle enfekte hücreleri ve malign hücreleri öldürmektir (6). CTL'ler yabancı bir antijenle karşılaştıklarında yüzeylerinde FasL eksprese ederler ve hedef hücrelerin Fas reseptörüne tutunurlar. CTL'lerin hedef hücreyi öldürmesi 2 yolla olur. Bunlardan biri Fas L'nin hedef hücredeki Fas ile bağlanması ve kaspaz aktivasyonu ile diğeri sitoplazmalarında perforin ve granzyme adı verilen proteinler içeren sitoplazmik granüllerin ekzositozudur. Perforin transmembran por oluşturan bir protein olmakla birlikte perforin/granzyme yolu ile apoptozis tetiklenir, membranda oluşturulan porlardan içeriye ekzositozla verilen granzyme B başta kaspaz 3 olmak üzere kaspazları aktive ederek apoptozis gelişimine neden olur (6,19) (Resim: 9).



Resim:8 TRAIL aracılı apoptozis
(86 No'lu kaynaktan alınmıştır)



Resim:9: Sitotoksik T Lenfositlerde Fas FasL etkileşimi aracılı apoptozis
(87 No'lu kaynaktan alınmıştır)

- Diğer ekstrensek faktörlere bağlı apoptozis; radyasyon, hipoksi, γ ve UV ışınlar, ısı şoku ve sitotoksik ilaçlar gibi değişik dış etkenlerde hücrede farklı apoptotik mekanizmaları uyararak hücrenin fizyolojik ölümüne neden olabilirler (19,21).

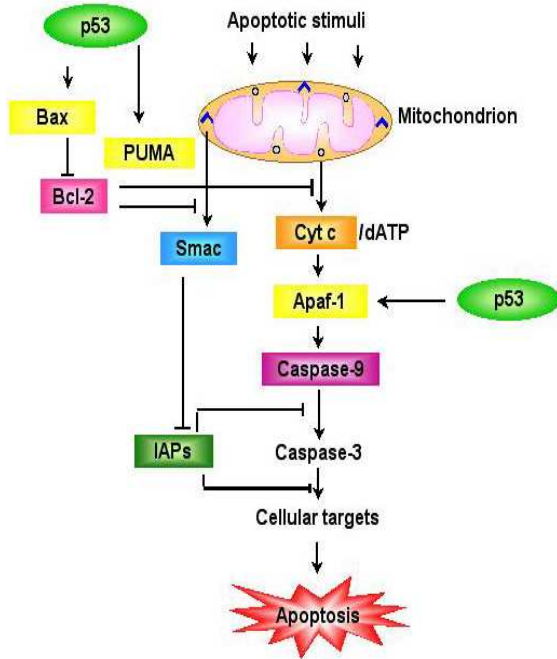
Hücre İçinden (İntrensek) Kaynaklanan Sinyaller;

DNA hasarı, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış, hücre içi pH'da düşme, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları hücreyi apoptozise götürebilen intrinsek ölüm sinyallerini başlatabilirler (19). Hücrede bulunan intrinsek sinyaller farklı ve oldukça çeşitlidir.

- Kaspazlar (caspase=cysteine containing aspartate specific proteases); hücre içi ve dışı ortamdaki sinyallerle aktive olan bir grup proteazdır (19). Kaspazlar inaktif proenzimler olarak bulunmuşlardır (17). Proteolitik ayrılma sonucu aktive olurlar veya prokaspaz moleküllerinin bir araya gelerek multiprotein apoptozom kompleksini oluşturması ile otokatalitik sürece girerler (13,14). Merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteaz olarak adlandırılırlar (17). İlk olarak memeli ailesinde keşfedilen enzim olan kaspaz 1 (ICE) inflamasyon sürecinde etkin olup homologu ced-3'dür. 14 farklı kaspaz belirlenmiştir (6,14). Proapoptotik sinyaller ile tetiklendiğinde aktif enzimler

şeklini alan kaspazlar özellikle apoptozisin morfolojik özelliklerinin oluşmasında etkindirler (13,88). Başlatıcı (initiator) ve etkileyici (efektör) olmak üzere iki alt grupta incelenirler. Kaspaz 2, 8, 9 ve 10 başlatıcı, kaspaz 3, 6 ve 7 ise efektör kaspazlar olarak bilinirler. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletirlerken, Efektör kaspazlar ise proteolitik etkisiyle proteinleri (Örneğin; laminin A, fodrin, aktin) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin oluşmasına neden olurlar(17).

Mitokondrial Yol; mitokondriye bağımlı alternatif sinyal yollarını çeşitli etkenler uyarabilir. CD95 ligasyonuna bağlı bu tip uyarım sonucu prokaspaz 8'in küçük bir miktarı DISC'te toplanır. Ancak kaspaz 8 miktarı kaspaz döngüsünü tetiklemek için yetersizdir. Bununla birlikte, bcl-2 ailesinin

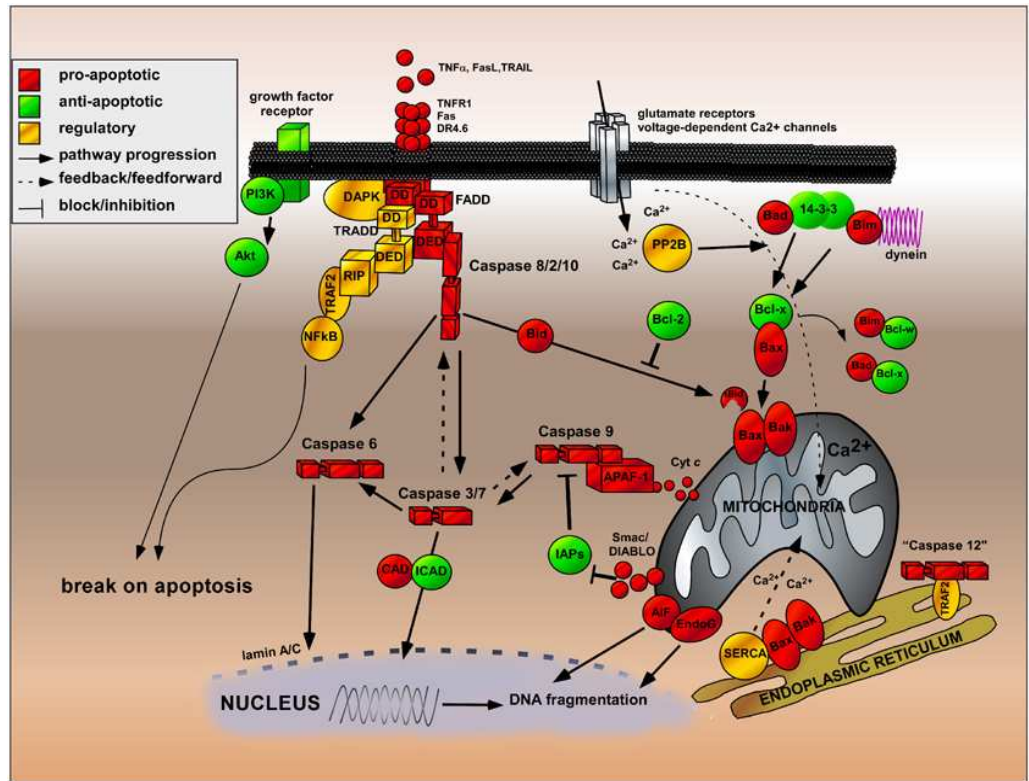


Resim:10 Apoptoziste mitokondriyal yol işleyişi
(89 No'lu kaynaktan alınmıştır)

proapoptotik proteinini içeren bölgesini parçalayarak apoptotik yolağı aktive edebilir. Öte yandan, bcl-2 yolağında bir protein olan BID'in mitokondride parçalanması BID'in translokasyonunu sağlar. Parçalanmış t(BID)'in C terminal ürünü nükleus çevresinde mitokondrilerin kümelenmesini indükleyerek mitokondriyal membran bütünlüğü bozar ve elektron transport zincirinin bir proteini olan ve mitokondrinin çift zarları arasında bulunan sitokrom C'nin sitozole salınmasına neden olur. Bu salınım hücrede apoptozisi uyaran çok önemli bir süreçtir (17) (Resim:10). Sitokrom C'nin sitozole salınımı 2 farklı mekanizma ile ele alınmıştır.

Bununla birlikte, bcl-2 ailesinin proapoptotik proteinini içeren bölgesini parçalayarak apoptotik yolağı aktive edebilir. Öte yandan, bcl-2 yolağında bir protein olan BID'in mitokondride parçalanması BID'in translokasyonunu sağlar. Parçalanmış t(BID)'in C terminal ürünü nükleus çevresinde mitokondrilerin kümelenmesini indükleyerek mitokondriyal membran bütünlüğü bozar ve elektron transport zincirinin bir proteini olan ve mitokondrinin çift zarları arasında bulunan

- Kalsiyum bağımlı yol; hücre içi kalsiyum seviyesinin artması ile nükleer porlardaki kalsiyum geçirgenliğinde geçici olarak artış olur. Bunun sonucu mitokondriyal fonksiyon bozukluğu oluşur ve hücrenin yaşamsal enerji kaynakları hızla tüketilir ve bu süreçte nükleusta artan permeabiliteye bağlı olarak nükleus yapısı bozulur ve DNA fragmentasyonu gelişir ve bu süreç apoptozis ile sonlanır (90) (Resim:11).



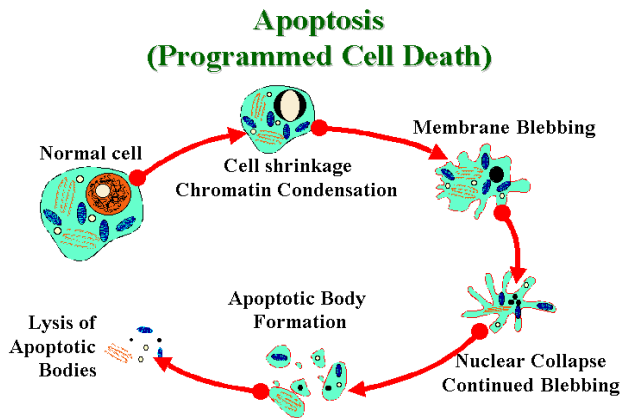
Resim:11. Ca²⁺ ve Apoptozis (91 No'lu kaynaktan alınmıştır)

- Kalsiyum bağımsız yol; bcl-2 ailesinin bir üyesi olan proapoptotik Bax, bcl-2 ile heterodimer oluşturabilmektedir. Bu oluşum bcl-2'nin mitokondri üzerindeki porları kapamasını önler. Bax'ın etkisi ile mitokondri zarları arasından sitozole salınan sitokrom C, sitoplazmada bulunan APAF-1 (Apoptosis Protease Activating Factor-1), başlatıcı bir kaspaz olan prokaspaz 9 ve ATP ile birlikte

moleküler bir kompleks olan “apoptosom” oluşur. Bu birleşme sonrasında öncelikle prokaspaz 3 ve diğer kaspazlar (özellikle kaspaz 6 ve 7) aktive olur ve mitokondriyal yolla apoptozis gerçekleşir (19). Apoptozis gelişimi sürecinde Sitokrom C dışında mitokondriden salınan SMAC/Diablo, AIF (Apoptosis Inducig Factor) ve çeşitli prokaspazlarda sürecin gelişimini kontrol altında tutar (13,84) (Resim:10).

B: Hücrede Oluşan Biyokimyasal, Morfolojik ve Metabolik Değişiklikler

- Morfolojik Değişiklikler; Apoptozis sürecinde meydana gelen birçok morfolojik değişiklik vardır (Resim:12). Bu hücreler özelleşmiş yüzeysel yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Su kaybettikleri için, küçülürler, büzüşürler, sitoplazmalarının yoğunluğunun artar ve organelleri birbirlerine yaklaşır.



Resim:12. Apoptozisde görülen morfolojik değişiklikler
(92 No'lu kaynaktan alınmıştır)

Organellerde çok fazla bir değişiklik olmamakla birlikte endoplazmik retikulumda geçici genişlemeler görülür. Bu genişlemelerin hücre sitoplazmasındaki suyun endoplazmik retikuluma geçmesi ile oluştuğu düşünülmektedir. Dilatasyona

uğrayan sisternalar hücrenin yüzeyi ile birleşerek “krater manzarası” şekli yansıtırlar (15). Hücre membranların da kabarcıklanma oluştuğu gözlenir (14). Nükleer membran çevresinde kromatin toplanması ve kromatin yoğunlaşması görülür. Kromatinlerin buldukları bölgeye göre değişik şekil ve büyüklükte çöktüğü gözlenir. Elektron mikroskopik incelemede kromatin yoğun granüller yarımay, hilal veya yüzük şeklinde nükleer membranın iç yüzeyine yerleşmiş şekilde gözlenir (15). Çekirdeklerin piknotik oldukları gözlenir (93). Bütün bu süreçler sonrasında içlerinde sitoplazma ve organellerinde yer aldığı membranla

çevrili küçük parçalar oluşur ki apoptotik cisimler adı verilen bu yapılar apoptozisin belirgin morfolojik bulgusudur (9).

- **Biyokimyasal Değişiklikler;** apoptotik süreç içinde hücrede birçok biyokimyasal değişiklikler görülür. Bunlar içinde DNA kırıkları oluşması, hücre iskeleti yıkılması, hücre zarı yapısı değişiklikleri ve hücre içi protein çapraz bağlanmaları gibi değişik özellikler bulunmaktadır (19).
 - **DNA Kırıklarının Oluşması;** apoptotik süreçte hedef proteinlerden bir tanesi DNA nükleaz ile çapraz bağ yapan bir proteindir. Kaspazların bu proteini yıkacak endonükleazları serbestleştirmesi ile nükleus içine giren kalsiyum ve magnezyum bağımlı endonükleazlar DNA'da kırıklara neden olur (15). DNA'nın endonükleazlarca internükleozomal bölgelerinden fragmanlara ayrılması "fragmentation laddering" adı verilen DNA bandlarını ortaya çıkarır (73). DNA'nın 180-200 bp'lik fragmanlara ayrılması sürecine "internucleosomal fragmentation" adı verilir (73).
 - **Hücre İskeletinin Yıkılması;** özellikle aktinin yıkılması sonucu hücrenin normal konturlarında bozulma meydana gelir ve hücre normal görüntüsünü ve şeklini kaybeder (19).
 - **Hücre Membran Değişiklikleri;** kaspazların litik etkisi ile hücre membran asimetrisi bozulur. Plazma zarının iç yüzeyinde bulunan anyonik fosfolipid olan fosphatidylserine yer değiştirir ve hücre zarının dış yüzeyine yerleşir (19,94). Hücre zarının dış yüzeyine yerleşen fosphatidylserine "eat me" sinyali vererek apoptotik hücrelerin tanınmasını ve fagositler tarafından temizlenmesini sağlar (13). Bunun yanında zar yüzeyinde yer alan adheziv bir glikoprotein olan thrombospondin ve ICAM-3 gibi bazı hücre adhezyon moleküleride apoptotik hücrede tanınmayı kolaylaştırıcı zar değişiklikleridir (19).
 - **Protein Çapraz Bağlanması;** transglutaminaz aktivasyonu ile protein çapraz bağlanması sağlanır ve apoptotik yapı sabitleştirilir. Böylece hücre içeriğinin dışarıya sızması ve olası inflamatuvar cevap önlenmiş olur (15).

- Metabolik Değişiklikler; apoptozis sürecinde çoğu hücre tipinde erken dönemde sitozolde iyonize kalsiyumun sürekli arttığı gözlenir. Kalsiyum apoptozis sürecinde yapısal değişikliklere neden olan enzimleri aktive eder (Resim:11). Bu enzimler kalsiyum bağımlı nükleer endonükleaz, sitozolik proteinleri bağlayan transglutaminaz ve kalpain gibi kalsiyum bağımlı hücre iskeletini yıkabilen proteinaz ve lipid modifiye edici enzimlerdir (9).
 - Kalsiyuma Bağımlı Nükleer Endonükleaz; apoptozise giden hücrelerde görülen tüm nükleer morfolojik değişiklikler DNA'nın üç şekilde parçalanması ile ilişkilidir. Bunlardan ilki DNA'nın 180-200 bp oligonükleozomal parçalara ayrıldığı ve DNA merdiveninin görüldüğü formdur. Bir diğeri ise Pulsed Field Elektforezi ile DNA'nın 30-50 bp'lik parçalardan oluştuğu ve bunların kromatin ilmeklerinin A-T'den zengin yapışma parçaları sayesinde nükleer iskelete bağlandığı formdur. DNA yıkılışının bu şekli için kesin bölünme mekanizması henüz gösterilememiştir. Üçüncü formu ise DNA'nın 300 kb'lik DNA parçalarının görüldüğü formdur. Hücrelerde DNA kırıkları tek zincir ya da çift zincir kırığı şeklinde olabilmektedir (95).
 - Transglutaminaz; sitoplazmik proteinlerin çapraz bağlanmasında görev alan enzimdir. Apoptoziste hücre içeriğinin dışarı sızmasını önleyerek, inflamasyonun tetiğinin çekilmesini engeller (96).
 - Lipid Modifiye Edici Enzimler; apoptoziste membranın fosfolipid asimetrisinde görülen değişimler bazı hücrelerde ATP bağımlı fosfolipid translokaz tarafından sağlanır. Apoptozisin başlaması ile bu enzimin aktifleşir ve fosfolipid asimetrisinin kaybolması sonucu makrofajlar apoptotik hücreyi tanır ve fagositoz gerçekleşir (96).
 - Kalsiyuma Bağımlı Proteaz; sitotoksik hücreler hedef hücrelerdeki endojen apoptotik programı tetikleyen granüllerdeki salgılar ile ölümü gerçekleştirirler. İlk bulunan granül protein olan perforin, hedef hücre zarında geniş su dolu porlar oluşturur ve bu porlar iyonlara özgün olmayan bir geçirgenliğe sahip olurlar. Perforinin bu özelliği nedeniyle proteazların ve özellikle kalsiyumun sitoplazmaya ve

nükleusa geçişine izin verilir. Proteazlar histonları ve kromatin yapısının stabilizasyonunu sağlayan diğer proteinleride degrade eder. Kalsiyum bağımlı nötral protein olan kalpain ise hücre iskeletinin bozulmasına yol açar (96).

C: Fagositoz

Hücre zarında meydana gelen değişiklikler sayesinde apoptotik cisimler ve fragmanları, parankim hücreleri, fagositler ve doku makrofajları tarafından tanınırlar ve fagosite edilerek dokudan temizlenirler. Apoptotik cisimlerin sindiriminde fagositik hücrelerin lizozomal enzimlerinin rol aldığı görülür (19,97).

2.2.2.2. Apoptozis Düzenleyici Genler

Bcl-2: Lymphoma-leukemia-2 geninin kısaltılmış adıdır ve 25 kD ağırlığındadır. İsminden de anlaşıldığı gibi ilk olarak insan folliküler B lenfomalarda kromozomal kırılma noktalarında keşfedilmiştir (14). Dış mitokondriyal zar, endoplazmik retikulum ve nükleer zarıda yer alan zar bağlayıcı bir proteindir (17). Apoptozis düzenleyici genlerin içinde önemli bir grubu temsil eder. Bu grup içinde bir kısım apoptozisi indüklemesine karşın, bir kısmı da baskılayabilir. Hücrenin ölmesinde ya da yaşayabilirliğin sürdürülmesinde önemli bir role sahiptir (14). Hücrenin yaşayabilirlik durumu bu ailenin proapoptotik ve antiapoptotik üyelerinin relatif oranına bağlıdır (17). Antiapoptotik fonksiyon DNA parçalanmasını bloke etmek suretiyle gerçekleştirilir. Oldukça geniş sayıda bcl-2 ailesi üyesi olduğu bilinmektedir. Antiapoptotik bcl-2 ailesi üyeleri içinde Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, bfl-1 bulunmasına karşın proapoptotik bcl-2 ailesi üyeleri içinde Bik, Bid, Bim, Blk, Bad, Bak, Bax, Bcl-Xs bulunmaktadır (9,14).

P53: Nükleer fosfoprotein bir tümör baskılayıcı gen olup, transkripsiyon faktör gibi davranır. Moleküler ağırlığı 53 kD olması nedeniyle bu adı alan p53 proteini, nükleer matriks proteinidir (25). Hücre nükleusunda normal koşullarda inaktif halde bulunan p53 geni hipoksi, UV ışınları, radyasyon, kimyasal ajanlar gibi stres ajanlarına bağlı DNA'da hasar oluştuğunda hızla eksprese olur ve hücre siklusunda G1-S fazları arası geçişi geciktirerek DNA tamiri için hücreye zaman kazandırır (18,19,74). DNA hasarı tamir olursa hücre siklusundaki blok ortadan kalkar. Ancak hasar tamir

edilemez ise p53 geni Bax proteinini aktive ederek ve Insulin Like Growth Factor Binding Protein 3'e (IGF-BP3) bağlanarak hücrenin apoptozise giderek ölmesini sağlar ve malignite gelişimini engellemiş olur (19,18). Tüm hücrelerde bcl-2 ve Bax ekspresyonlarının önemli bir düzenleyicisidir. Uzun yıllar P53 tek bir gen olarak bilinirken, 1990'lı yıllarda 2 gen daha bulunmuştur. Bunlar P63 ve P73 genleridir (74). P73 geninin P53'le benzerlik gösterdiği, hücre siklusunun durmasında ve uygun koşullarda hücrenin apoptozise gitmesinde rol aldığı belirlenmiştir (18).

Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) Ailesi Genleri: Virüslerden memelilere kadar birçok farklı organizmada bulunan ve bcl-2 ailesi gibi apoptozisin düzenlenmesinde, baskılanmasında görev alan bir antiapoptotik molekül ailesidir (98). Prokaspazlara ve aktif kaspazlara (kaspaz 3,7 ve 9) bağlanarak inhibisyonlarını gerçekleştirirler (77). IAP gen ailesinin bir üyesi olan survivin proteini normalde hücrelerde bulunmamasına karşın insan tümörlerinde belirgin şekilde eksprese edilir. Bazı hastalıklarda survivin düzeyinin yüksek olması prognozunu kötü olduğunun bir kanıtıdır (99).

C-myc: Bir protoonkojen olan c-myc geni "janus" geni olarak bilinir. Hücre çoğalması veya apoptozisi uyarabilir. Hücre siklusunda kritik rolleri vardır. Örneğin; büyüme faktörlerinin uyarımına bağlı olarak hücrenin mitozunu sağlarken, bu faktörlerin veya sinyallerin yokluğunda apoptotik süreci tetiklerler (80).

2.3. Heat Shock Proteinler (HSP)

Farklı streslere cevap olarak iki büyük grup stres proteini tanımlanmıştır; HSP ve GRP (Glucose Regulated Proteins). Dokuda farklı HSP'lerin düzeyi hipertermi, ağır metaller, alkol, metabolik inhibitörlerle ve protein denaturasyonu ile artış göstermektedir. GRP'nin ise glikoz yokluğunda, protein transportunda ve kalsiyum metabolizmasında düzensizlik durumlarında sentezlendiği görülür (100). Evrim süresince kendilerini korumuş bir intersellüler protein ailesi olan HSP'lerin stres altında sentezlenipdemi salındığı yoksa doku içinde normalde mevcut olup stres durumundamı aktifleştiği halen tartışmalıdır. (101). HSP'ler hemen hemen tüm hücrelerde artan strese cevap olarak ortaya çıktıkları için "Protein Şaperonlar" veya "Molecular Guardians" olarak adlandırılırlar. Hücresel fonksiyonların sürdürülmesi ve yapısal proteinlerin bütünlüğünün korunmasına yardımcı olurlar (24). Canlı için stres yaratan herhangi bir durum karşısında normal protein sentezinin baskılanıp, koordine bir şekilde HSP'lerin sentezlendiği görülmüştür (100). Her ne kadar ısı şoku proteinleri olarak literatürde yer alıyorlar olsalarda bu hücre içi protein ailesinin, ısı dışındaki farklı hücresel streslerle ekspresyonlarının oldukça arttığı görülür (25,26). Bu etkenlere örnek olarak iskemi, hipoglisemi, hipoksi ve hücrel toksinler verilebilir (26). Bunun yanında çeşitli virüslerle de (Örneğin; Castle Disease Virus, Sindbis Virus, Vesicular Stomatitis Virus, Herpes Simplex Virus, Epstein Barr Virus, Human İmmunodeficiency Virus) indüklenibildikleri görülmüştür (25). Bununla birlikte HSP/HSC 70 ve HSP 90 gibi bazı HSP'ler stressiz durumlarda örneğin hücre siklusu, farklılaşma, embriyogenez ve büyüme faktörlerinin uyarılması gibi durumlarda fizyolojik düzenleyici olarak görev alırlar (27). Moleküler ağırlık ve fonksiyonlarına göre farklı hücre gruplarında farklı tipte HSP'ler tanımlanmıştır (25). Bu HSP'lere bazı örnekler aşağıda verilmiştir.

- HSP 27; küçük moleküler ağırlığa sahip olan HSP 27, hücrede hazır olarak bulunan bir moleküldür. Sıcaklıkla güçlü bir şekilde indüklenen bir şaperon'dur. Ubiquitin, moleküler ağırlıklı en küçük üyesidir. Sıcakla indüklenir ve hasarlı proteinleri indirgenmeleri için bağlar (100).
- HSP 47; son zamanlarda stres proteini olarak tanımlanmıştır. Serpin grubunun bir üyesidir. Endoplazmik Retikulumda yerleşiktir ve Tip 1 ve Tip 5 kollajeni bağladığı görülür (100).

- HSP 70; artışının apoptozise karşı hücreyi koruyucu yönde etki gösterdiği kabul edilir. Stres altındaki hücrelerde, apoptotik programın baskılandığı, DNA hasarının tamirinin yapılmaya çalışıldığı görülür (102). Hücrel hasarla arttığı görülen bu proteinin hasarlı hücre için bir fagositik işaret oluşturduğu kabul edilmektedir. Dikkatli incelendiğinde HSP 70'in antijen sunucu bir rolü olduğu ve apoptozise gidecek hücrenin tanınmasını sağladığı görülür (103). Antiapoptotik bir protein olan HSP 70 özellikle sıcaklığın indüklediği apoptotik hücre ölümünü, Bcl-2 ailesinin bir üyesi olan ve mitokondriden Sitokrom C'nin sitoplazmaya salınmasında temel rol üstlenen Bax proteininin fonksiyonunu baskılayarak gerçekleştirmektedir (102).
- HSP 90; normal stressiz durumlarda oldukça geniş bir miktarda sitozolde hazır olarak bulunmaktadırlar. Fonksiyonları net olmayıp molecular şaperon gibi rol oynarlar. Özellikle nöroektoderm farklılaşmasında, G₀ fazında yüksek oranda eksprese edilirler. Sıcak stresle hafif indüklenirler. Steroid reseptörleri, aktin ve tubulinle etkileşme yanında interfazda mikrotübüllerle ve mitotik hücrelerin iğ iplikleriyle geçici bir süre etkileşimleri oldukları bilinmektedir (100).

3. MATERYAL VE METOT

Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması:

Çalışmada toplanacak materyal ve uygulanacak metodun uygunluğunun belirlenmesi bakımından Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Etik Kurulundan onay alındı. (Onay No:08.03.2007-47).

Çalışmada yaşları 18-25 arasında olan; herhangi bir kronik hastalığı veya akut tedavi gerektiren bir rahatsızlığı bulunmayan, 2 haftadır herhangi bir ilaç kullanmamış, tamamen sağlıklı 6 kadın ve 6 erkek'ten alınan kan örnekleri kullanıldı. Kan örneklerinin alınmasından önce etik kurul tarafından kabul edilmiş "Hasta Gönüllü Olur Formu" deneyde kan örnekleri kullanılacak olan tüm kişilere (deneklere) okutturularak imzalatıldı.

Deneklerin herbirinden 5'er adet 2 cc'lik kan örneği, içinde antikoagülan mevcut olan tüplere (Vacutainer, Beliver Ind. Est. Plymouth, UK) alındı. Alınan örnekler hemen 37 °C'lik etüv içine konarak inkübasyona alındı. 1 saatlik inkübasyon sonunda her bir denekten alınan 5'er adet kan örneğinden 1'er tanesi inkübasyondan çıkartıldı ve etüv derecesi hemen 39°C'ye çıkartılarak diğer 4'er adet kan örneğinin inkübasyonlarına devam edildi. Bu anda 37 °C'lik inkübasyondan alınan kan örneklerinden 2 adet lama (Superfrost, Thermo Fisher Scientific Inc, USA) periferik yayma yapıldı. Yaymalar dış ortamda kurutulduktan sonra %70 metil alkol ile 10 dakika fiksasyon yapıldı. 10 dakika sonunda, lamlardan 1 tanesine May Grünwald-Giemsa metodu ile direkt boyama yapılırken; diğer lam TBS (Tris Buffered Solution, Labvision) içine konarak 15 dakika inkübe edildi ve sonrasında immunohistokimyasal olarak apoptozis'in tespiti amacıyla ticari bir kit olan Fragel QIA33 (Calbiochem, Darmstadt) ile boyandı. En son olarak aynı kan örneği CBC (Complete Blood Cell) ölçüm cihazı (Roche Diagnostics Sysmex XT-2000 I, Japan) ile analiz edilerek örneklerdeki eritrosit ve lökosit sayıları, lökosit alt grup oranları ve trombosit sayıları tespit edildi. Bu kan örneklerinin oluşturduğu veri grubu Grup 1 olarak isimlendirildi.

Etüvde 39 ° C inkübasyonu devam eden diğer örneklerden her deneğe ait bir grup kan örneği 1 saatlik inkübasyon sonunda etüvden çıkartıldı ve yukarıda anlatılan metodun aynısı kullanılmak suretiyle direkt periferik yayma ve immunohistokimyasal boyama lamları hazırlandı ve CBC profilleri ortaya kondu. Bu

gruptan elde edilen veriler ise Grup 2 olarak isimlendirildi. Kan örnekleri etüvden alındıktan hemen sonra, etüv derecesi artırılarak diğer kan örnekleri 41 °C'de inkübe edilmeye devam edildi. Bununla birlikte, 39 °C'deki Grup 2'ye ait kan örneklerinden lamalar hazırlanıp CBC sayımı için örnek alındıktan hemen sonra bu kan örneği bu kez 37 °C'lik etüve kondu ve burada 1 saat daha inkübe edildi. 1 saat sonunda bu kan örneklerinden yine 2 adet lama periferik yayma yapıldı ve CBC kan sayımı yapıldı. Bu örneklerden elde edilen veriler Grup 3 olarak isimlendirildi.

41 °C'lik 1 saatlik inkübasyonu tamamlanan kan örneklerinden yine yukarıda anlatıldığı şekilde periferik yaymalar hazırlandı ve CBC kan sayımları yapıldı. Buradan elde edilen veriler Grup 4 olarak isimlendirildi. Yine aynı şekilde bu gruptan yayma ve CBC için kan örneği alındıktan sonra aynı kan örneği bu kez 37 °C'lik inkübatöre konularak 1 saat daha inkübe edildi. Buradan elde edilen veriler ise Grup 5 olarak isimlendirildi. Kan örnekleri etüvden alındıktan hemen sonra etüv derecesi artırılarak diğer kan örnekleri bu kez 43 °C'te inkübe edilmeye devam edildi.

43 °C'lik 1 saatlik inkübasyonu tamamlanan kan örneklerinden yine periferik yaymalar hazırlandı ve CBC kan sayımları yapıldı. Buradan elde edilen veriler Grup 6 olarak isimlendirildi. Bu gruptan da periferik yayma ve CBC için kan örneği alındıktan hemen sonra aynı kan örneği bu kez 37 °C'lik inkübatöre konularak 1 saat daha inkübe edildi. Inkübasyon sonunda bu örnekten de yapılan yayma ve CBC sayımlarından elde edilen veriler Grup 7 olarak isimlendirildi.

Tüm grupların özellikleri Tablo:3’de özetlenmiştir.

	Uygulanan ısı derecesi ve süresi	Yapılan analizler
Grup:1 (37)	37 °C’de 1 saat enkübe edildi.	<ul style="list-style-type: none"> • Tam kan sayımı • Direkt periferik yayma • İmmunohistokimyasal olarak apoptozis tespiti • HSP düzeyi tespiti
Grup:2 (39)	39 °C’de 1 saat enkübe edildi.	
Grup:3 (39-37)	Grup:2’deki örnekler 37 °C’de 1 saat daha enkübe edildi	
Grup:4 (41)	41 °C’de 1 saat enkübe edildi.	
Grup:5 (41-37)	Grup:4’deki örnekler 37 °C’de 1 saat daha enkübe edildi	
Grup:6 (43)	43 °C’de 1 saat enkübe edildi	
Grup:7 (43-37)	Grup:6’deki örnekler 37 °C’de 1 saat enkübe edildi	

Tablo:3. Çalışmada oluşturulan grupların özellikleri ve uygulanan analiz metotları.

Histolojik Analiz:

1. Histokimyasal Metot:

Örneklerden alınan kan yaymaları direkt olarak May Grünwald-Giemsa metodu ile histokimyasal olarak boyandı. Boyama metodu basamakları aşağıda sıralanmıştır.

1. Periferik yayma hazırlandı.
2. Havada kurutuldu.
3. %70 metil alkol ile 10 dakika fikse edildi.
4. 2cc Giemsa solüsyonuna 18 cc distile su eklenerek preparatların üzeri bu karışımla kapatıldı ve 20 dk bekletildi.
5. Hafif akan musluk suyu ile preparatlar hafifçe yıkandı ve kurumaya bırakıldı.

2. İmmunohistokimyasal metot:

Deneklerden alınan kan örneklerinde olması muhtemel olan apoptotik hücrelerin tespiti amacıyla alınan kan örneklerinden periferik yayma yapılarak, immunohistokimyasal olarak Fragel QIA33 ticari kiti ile boyama yapıldı. Boyama metodu basamakları aşağıda sıralanmıştır.

1. Rehidratasyon

- a. Lamlar 1x TBS'te oda ısısında 15 dk inkübe edildi.
- b. Yayma üstünde lamın orta kısımlarını içine alacak şekilde 2 cm çapında sınırlayıcı kalem ile işaretleme (Pappen, Sigma) yapıldı.

2. Örnek Permeabilizasyonu

- a. 2 mg/ml Proteinase K 10 mM Tris pH8'le 1/100 oranda sulandırıldı.
- b. Tüm örnek bu hazırlanan 50-100 µg/ml Proteinase K ile kaplandı ve oda ısısında 5 dk bekletildi.
- c. 1 x TBS'de yıkandı.
- d. Lam etrafındaki fazla sıvı dikkatlice silkelendi ve doku etrafı dikkatlice kurulandı.

3. Endojen Peroksidaz İnaktivasyonu

- a. %30 H₂O₂ metanolle 1/10 oranda sulandırıldı.
- b. Lamlar bu sıvıda oda ısısında 5 dk inkübe edildi.
- c. 1 x TBS'de çalkalandı.
- d. Lam etrafındaki fazla sıvı dikkatlice silkelendi ve doku etrafı dikkatlice kurulandı.

4. Denge Ve İşaretleme Reaksiyonu

- a. 5x TdT equilibration Buffer ile deiyonize su 1/5 oranda karıştırıldı.
- b. Tüm örnek 100 µl bu 1x TdT equilibration Buffer'ı ile kaplandı. Oda ısısında 10-30 dk inkübe edildi.
- c. Bu inkübasyon sırasında bir yandan da işaretleme reaksiyon karışımı hazırlandı.
- d. TdT işaretleme reaksiyon karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı.
 - i. TdT işaretleme reaksiyon karışım (TdT Labeling Reaction Mix) tüpü vortekste hafifçe çalkalandı.
 - ii. TdT enzim tüpü açmadan önce mikrosantrifüjle pulse-spin yapıldı.
 - iii. İşaretlenecek her örnek için temiz bir mikrosantrifüj tüpü buz üzerine kondu ve yavaşça karıştırıldı: 57 µl TdT işaretleme reaksiyon karışımı (TdT Labeling Reaction Mixture) +3 µl TdT enzim.

- e. 1x TdT equilibration Buffer'ı örnekten dikkatlice uzaklaştırıldı.
- f. Hemen sonrasında her örneğe yukarıda hazırladığımız 60 µl TdT işaretleme reaksiyon karışımını (TdT Labeling Reaction Mixture) konuldu.
- g. Evaporasyona bağlı kaybı önlemek için örnek parafilm parçacığı (örnekten az büyük boyutta) ile örtüldü.
- h. Lamlar nemli ortamda 37 derecede 1.5 saat bekletilerek inkübe edildi.

5. İşaretleme Reaksiyonunu Sonlandırma

- a. İnkübe edilmiş lamlardaki parafilm kaldırılıp ve lamlar 1x TBS'te çalkalandı.
- b. Tüm örnek 100 µl Stop Buffer'la kaplandı ve oda ısısında 5 dakika bekletildi.
- c. 1 x TBS'de çalkalandı.
- d. Lam etrafındaki fazla sıvı dikkatlice silkelendi ve doku etrafı dikkatlice kurulandı.

6. Belirleme (Detection)

- a. Tüm örnek 100 µl Blocking Buffer ile kaplandı. Oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
- b. Diğer taraftan 50x Conjugate Blocking Buffer'da 1/50 oranda sulandırıldı ve 1x Conjugate oluşturulmuş oldu.
- c. Blocking Buffer örnekten dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra 1x Conjugate örneğe uygulandı.
- d. Lamlar nemli ortamda oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.
- e. 1 x TBS'de çalkalandı.
- f. Lam etrafındaki fazla sıvı dikkatlice silkelendi ve doku etrafı dikkatlice kurulandı.
- g. Tüm örnek 100 µl DAB solüsyonu ile kaplandı. Oda ısısında 10-15 dakika bekletildi.
- h. Deiyonize su ile lamlar çalkalandı.

7. Zıt Boyama

- a. Tüm örnek 100 µl metil green counterstain ile kaplandı.
- b. Oda ısısında 3 dk bekletildi.

- c. Boya süzüldü.
- d. % 100 alkole 2-4 kez batırılıp çıkarıldı.
- e. Emici havluyla kısa sürede temizleme yapıldı.
- f. Xylene (Sigma) 2-4 kez batırıp çıkarıldı.
- g. Lam arkası ve örnek etrafı xylene ile temizlendi.
- h. Entellan (Sigma) ile kapatıldı.

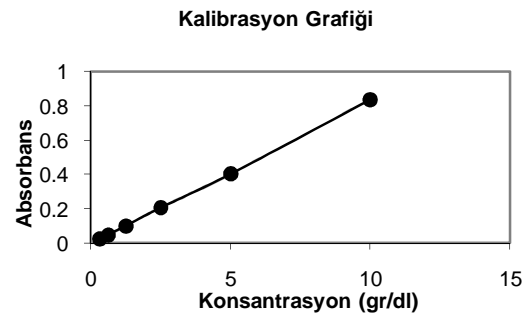
Biyokimyasal Analiz:

HSP70 ölçümü için gerekli numune eritrosit paketinden sağlanmıştır. HSP70 değerleri ticari bir kit (Human Assay Designs MI, USA) ile ELISA yöntemi ELISA ölçüm cihazı (Captia Reader, Trinity Biotech, Winooski, Vermont, USA) kullanılmak suretiyle tespit edildi.

1. Eritrosit paketi hazırlanması; Antikoagülanlı tüplere alınan kan örnekleri 4⁰C’de 3000 rpm de 5 dakika santrifüj edilir. Plazma ve beyaz küre tabakası aspire edilip atıldı. Eritrositler daha sonra üç kez izotonik NaCl ile muamele edilip santrifüj edildi. Her santrifüj sonrası süpernatant aspire edilerek atıldı. Hazırlanan eritrosit paketinden 50 µl alınıp bir başka eppendorf tüpe aktarıldı.
2. Hemolizat Hazırlanması; Eritrositleri hemolize etmek için; eppendorf içerisine alınmış olan 50 µl hacimli eritrosit paketinden 20 µl alındı ve içerisinde 480 µl soğuk distile su bulunan tüp içerisine karıştırıldı. Hemolizat Hb’in ölçümü aşağıdaki gibi yapılmıştır:

	<u>Kör</u>	<u>Numune</u>
Hemolizat	-	50 µl
Drapkin	2,5	2,5 ml
Çözeltilisi	ml	

Tablo:4. Spektrofotometrik ölçüm için kör ve numune hazırlanma hacimleri



Resim: 13. Hb ölçümü için kullanılan kalibrasyon grafiği.

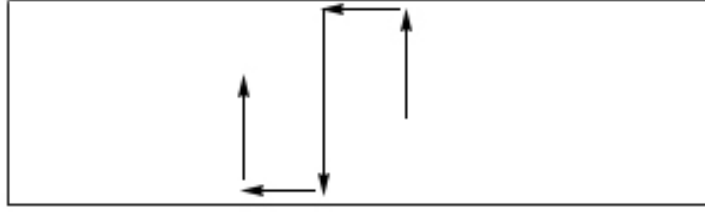
Tüpler altüst edildi ve 10 dakika oda ısısında bekletildi. Numune köre karşı 546 nm’de okundu. Okunan absorbans kalibrasyon grafiğinden (Resim: 13) % Hb

değeri olarak tespit edildi.

3. HSP70 değerinin hesaplanması; HSP70 analizinden elde edilen değerler hemolizattan elde edilen Hb değerine oranlanmak suretiyle ng/g Hb cinsinden değerler hesaplanmış oldu.

Görüntü Değerlendirme:

Yapılan histokimyasal ve immunohistokimyasal boyamalar sonucu hazırlanan lamalar ışık mikroskobu (Nikon Eclipse E600, Nikon, Japan) altında incelendi. İnceleme sırasında klasik periferik yaymalar rutin periferik yayma metodu değerlendirme sürecinde olduğu gibi (Şekil:1) değerlendirilerek toplam 200 lökosit sayıldı. İmmunohistokimyasal olarak boyanan lamalarda ise işaretli bölgede bulunan toplam 100 lökosit sayıldı. Her iki metottada sayılan lökositler arasında mevcut olan apoptotik hücrelerin yüzdesi alınarak apoptotik indeks hesaplandı. Son olarak her iki apoptotik indeksin ortalaması alınarak istatistiksel analiz uygulandı.



Şekil:1. Periferik yayma inceleme metodu

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışma sonucu histolojik gözlem ve biyokimyasal değerler olarak elde edilen veriler birbirleriyle karşılaştırılarak istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı farklılık olup olmadığı incelendi.

Bulgular kısmında detaylı olarak açıklanan tüm parametrelerin, gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesi için One Way ANOVA metodu ve Post hoc test olarak da Tukey testi uygulandı. Öte yandan elde edilen verilerin erkek ve kadınlar arasında farklılık gösterip göstermediğini belirlemek için Mann-Whitney-U testi uygulandı. Gruplar arasındaki farklılık 0.05'den küçükse farklılık anlamlı olarak kabul edildi. Testlerin uygulanması için SPSS for Windows 15.0 istatistiksel analiz programı kullanıldı.

5.BULGULAR:

Çalışma sonucu elde edilen materyallerin ışık mikroskobu altında değerlendirilmesinden elde edilen veriler ve kan örneklerinden biyokimyasal olarak elde edilen veriler, istatistiksel olarak grup içi ve/veya gruplar arası olarak karşılaştırıldı. Çalışmada göz önüne alınan parametreler, aşağıda sırasıyla belirtilmiştir.

1. IHC ve klasik periferik yayma ile hesaplanan ortalama apoptotik indeksin gruplar arasındaki farklılığının istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı (Tablo:5-6),
2. CBC sayımıyla elde edilen verilerin değerlendirilmesi suretiyle grupların arasında eritrosit, lökosit ve trombosit sayılarının ve lökosit alt gruplarının oranlarının arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı (Tablo:7),
3. HSP düzeyleri arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı (Tablo:8-9),
4. Cinsiyete bağlı olarak gruplar arasında mevcut olan farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı (Tablo:10-12),

Apoptotik indeksin değerlendirildiği ilk parametrede; apoptotik indeksin artan ısıya bağlı artış gösterdiği tespit edildi. Grup 1’de (Resim:14) hiç apoptotik hücre olmamasına karşın, ısının giderek arttırıldığı diğer gruplarda (Grup:2 (Resim:15), Grup:4 (Resim:16) ve Grup: 6 (Resim:17)) giderek artan bir apoptotik hücre sayısı tespit edildi. Ancak, artış Grup:1 ile Grup:2 arasında istatistiksel olarak anlamlı olmamasına karşın ($p>0.05$), Grup: 1 ile Grup:4 ve Grup:6 arasında anlamlıydı (sırasıyla $p=0.007$ ve $p=0.000$). Öte yandan Grup:2 ve Grup:4 ile sadece Grup:6

Descriptives								
Number	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	12	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
2.00	12	5.8333	3.18614	.91976	3.8090	7.8577	2.00	12.00
3.00	12	4.1667	2.24958	.64940	2.7374	5.5960	1.00	8.00
4.00	12	9.4167	4.35803	1.25805	6.6477	12.1856	3.00	17.00
5.00	12	35.7500	9.07669	2.62022	29.9829	41.5171	22.00	53.00
6.00	12	17.7500	5.95628	1.71943	13.9656	21.5344	8.00	29.00
7.00	12	50.0000	10.96275	3.16467	43.0346	56.9654	27.00	67.00
Total	84	17.5595	18.33185	2.00017	13.5813	21.5378	.00	67.00

Tablo: 5. Çalışmada İmmunohistokimyasal boyama ve Giemsa boyama sonucu elde edilen ortalama apoptotik hücre değerleri için tanımlayıcı veriler.

arasında anlamlı farklılık vardı (sırasıyla $p=0.000$, ve $p=0.026$). Isının giderek arttırıldığı diğer tüm grup karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik mevcut değildi ($p>0.05$).

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Number
Tukey HSD

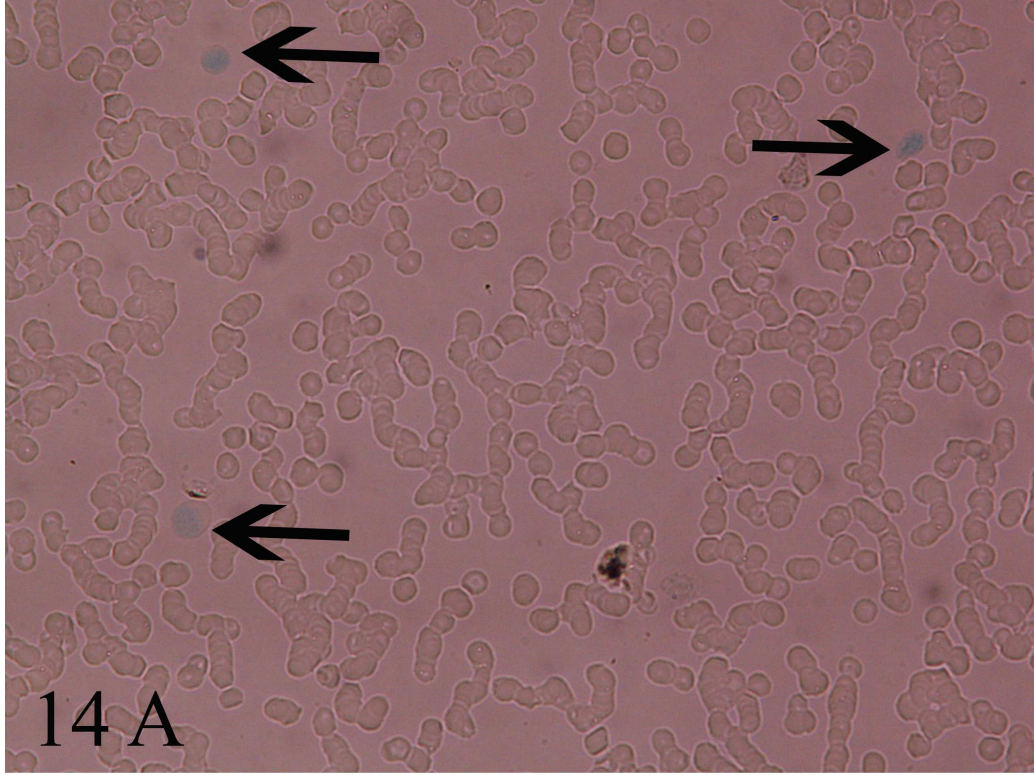
(I) Groups	(J) Groups	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-5.83333	2.54601	.262	-13.5418	1.8751
	3.00	-4.16667	2.54601	.659	-11.8751	3.5418
	4.00	-9.41667*	2.54601	.007	-17.1251	-1.7082
	5.00	-35.75000*	2.54601	.000	-43.4584	-28.0416
	6.00	-17.75000*	2.54601	.000	-25.4584	-10.0416
	7.00	-50.00000*	2.54601	.000	-57.7084	-42.2916
2.00	1.00	5.83333	2.54601	.262	-1.8751	13.5418
	3.00	1.66667	2.54601	.995	-6.0418	9.3751
	4.00	-3.58333	2.54601	.796	-11.2918	4.1251
	5.00	-29.91667*	2.54601	.000	-37.6251	-22.2082
	6.00	-11.91667*	2.54601	.000	-19.6251	-4.2082
	7.00	-44.16667*	2.54601	.000	-51.8751	-36.4582
3.00	1.00	4.16667	2.54601	.659	-3.5418	11.8751
	2.00	-1.66667	2.54601	.995	-9.3751	6.0418
	4.00	-5.25000	2.54601	.385	-12.9584	2.4584
	5.00	-31.58333*	2.54601	.000	-39.2918	-23.8749
	6.00	-13.58333*	2.54601	.000	-21.2918	-5.8749
	7.00	-45.83333*	2.54601	.000	-53.5418	-38.1249
4.00	1.00	9.41667*	2.54601	.007	1.7082	17.1251
	2.00	3.58333	2.54601	.796	-4.1251	11.2918
	3.00	5.25000	2.54601	.385	-2.4584	12.9584
	5.00	-26.33333*	2.54601	.000	-34.0418	-18.6249
	6.00	-8.33333*	2.54601	.026	-16.0418	-6.249
	7.00	-40.58333*	2.54601	.000	-48.2918	-32.8749
5.00	1.00	35.75000*	2.54601	.000	28.0416	43.4584
	2.00	29.91667*	2.54601	.000	22.2082	37.6251
	3.00	31.58333*	2.54601	.000	23.8749	39.2918
	4.00	26.33333*	2.54601	.000	18.6249	34.0418
	6.00	18.00000*	2.54601	.000	10.2916	25.7084
	7.00	-14.25000*	2.54601	.000	-21.9584	-6.5416
6.00	1.00	17.75000*	2.54601	.000	10.0416	25.4584
	2.00	11.91667*	2.54601	.000	4.2082	19.6251
	3.00	13.58333*	2.54601	.000	5.8749	21.2918
	4.00	8.33333*	2.54601	.026	.6249	16.0418
	5.00	-18.00000*	2.54601	.000	-25.7084	-10.2916
	7.00	-32.25000*	2.54601	.000	-39.9584	-24.5416
7.00	1.00	50.00000*	2.54601	.000	42.2916	57.7084
	2.00	44.16667*	2.54601	.000	36.4582	51.8751
	3.00	45.83333*	2.54601	.000	38.1249	53.5418
	4.00	40.58333*	2.54601	.000	32.8749	48.2918
	5.00	14.25000*	2.54601	.000	6.5416	21.9584
	6.00	32.25000*	2.54601	.000	24.5416	39.9584

*. The mean difference is significant at the .05 level.

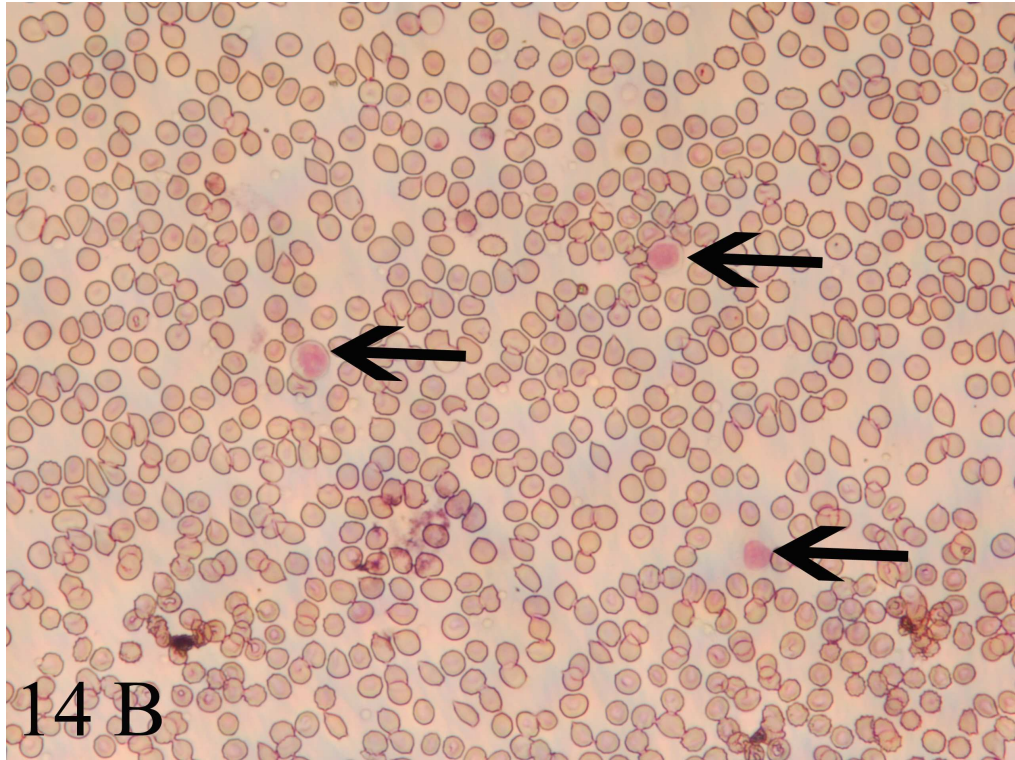
Tablo: 6. Boyamalar sonucu elde edilen apoptotik hücre sayılarının gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılması (One Way ANOVA (PostHoc Test:Tukey)).

Bununla birlikte, ısının düşürüldüğü gruplarda Grup:3’de (Resim:18) apoptotik hücre sayısının azalmasına karşın ($p>0.05$); diğer 2 grup olan Grup:5 (Resim:19) ve

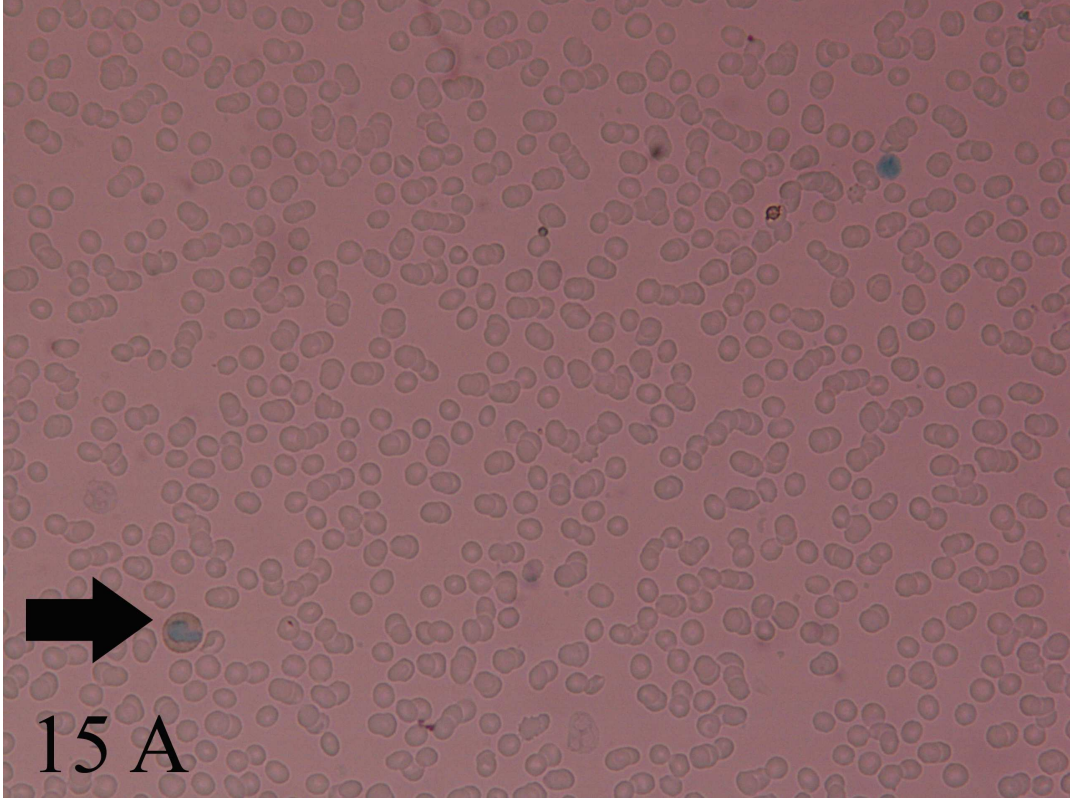
Grup:7 (Resim:20)'de anlamlı olarak hızla artması dikkat çekiciydi (tüm diğer gruplarla karşılaştırıldığında hepsi için sırasıyla $p=0.000$ ve $p=0.000$).



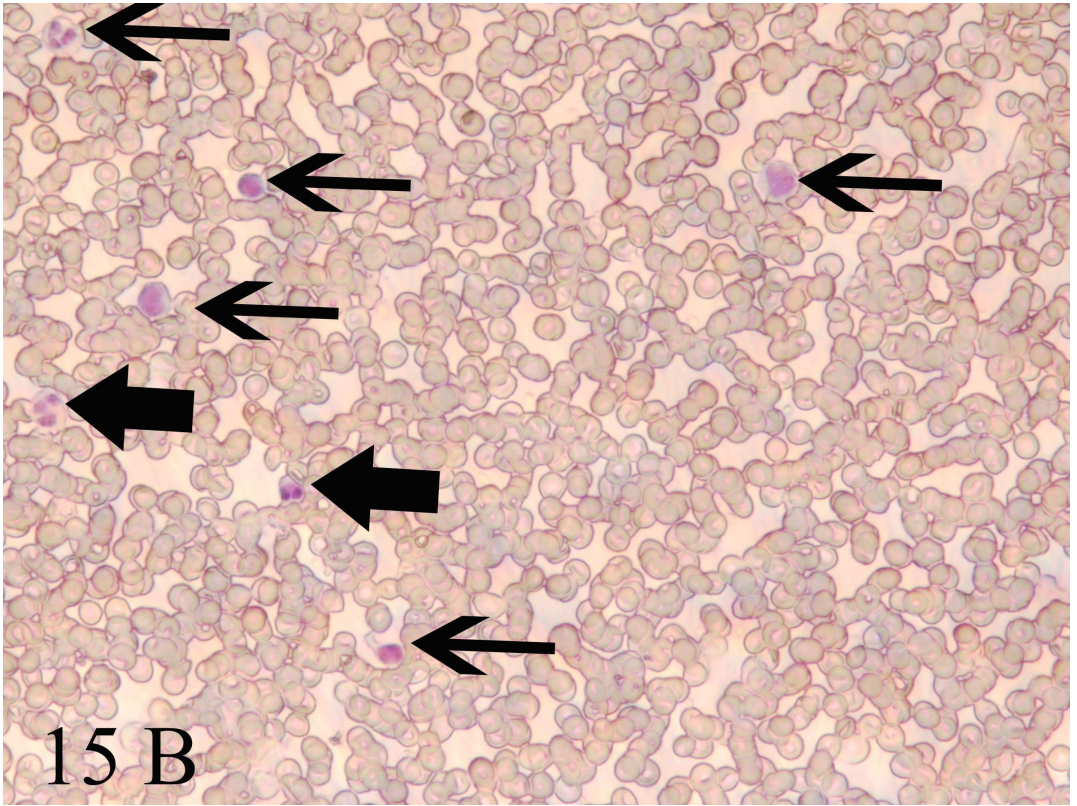
Resim:14A. Grup:1'de periferik yaymada sağlıklı hücreler (İnce oklar). Fragel. X400



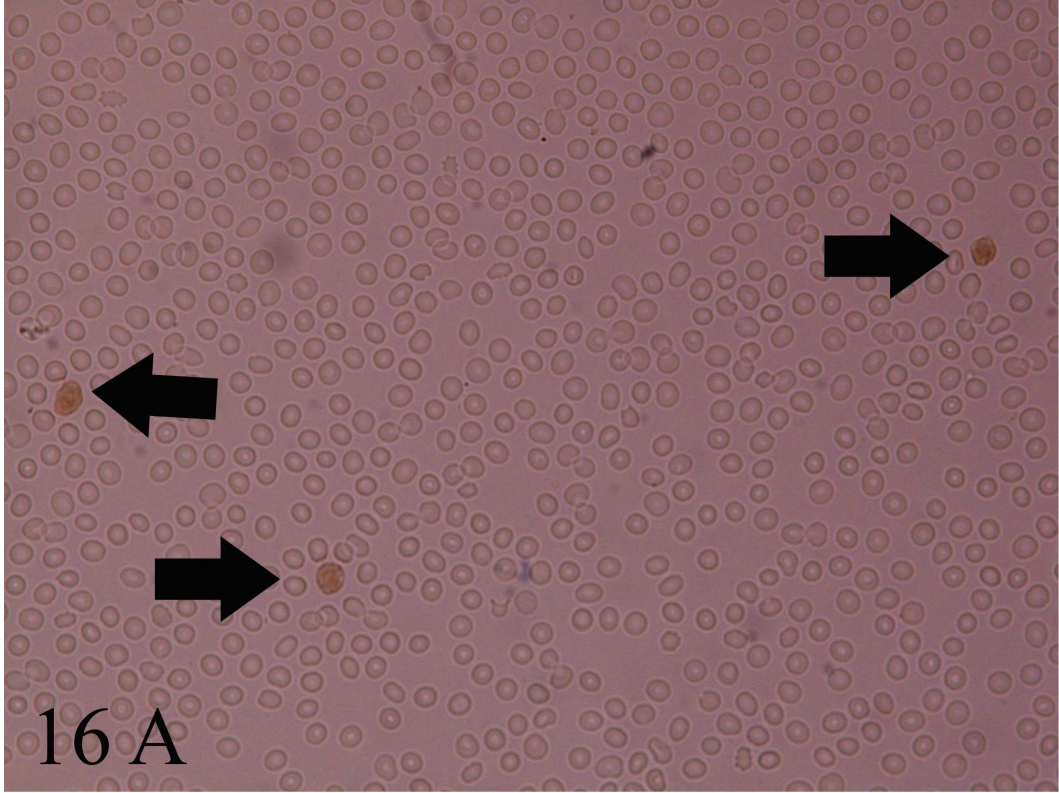
Resim:14B. Grup:1'de periferik yaymada sağlıklı hücreler (İnce oklar). Giemsa. X400



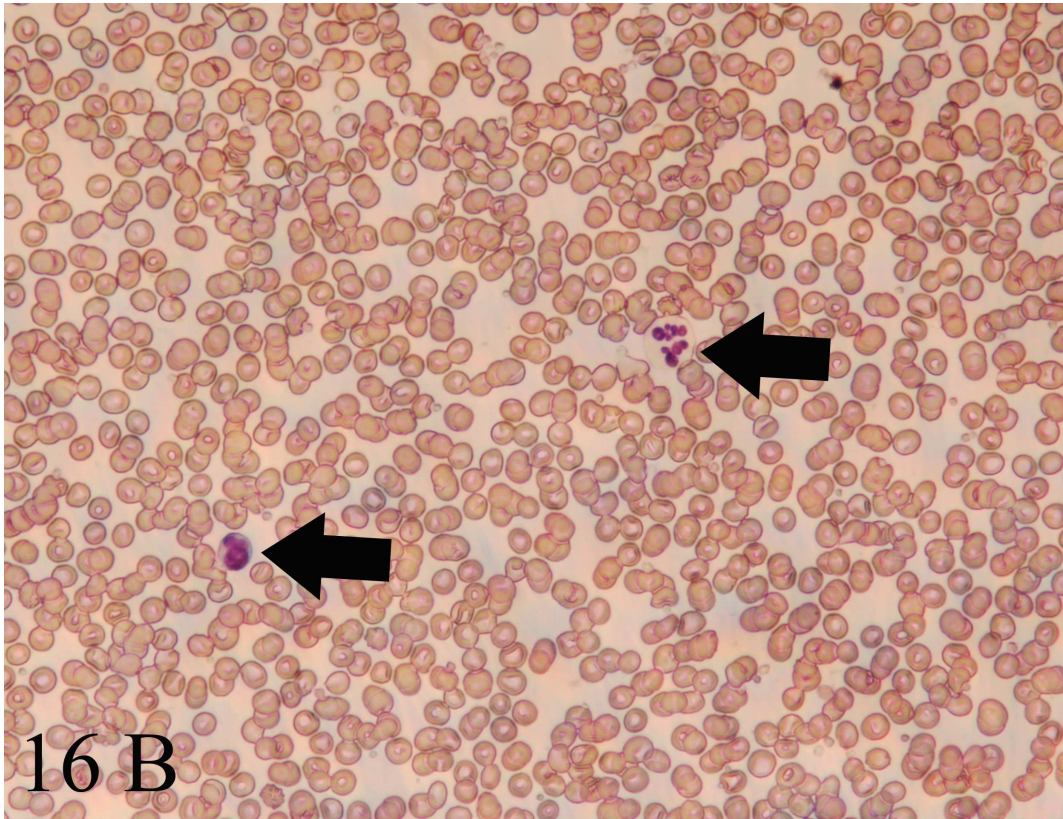
Resim:15A. Grup:2'de periferik yaymada apoptotik hücre (Kalın ok). Fragel. X400



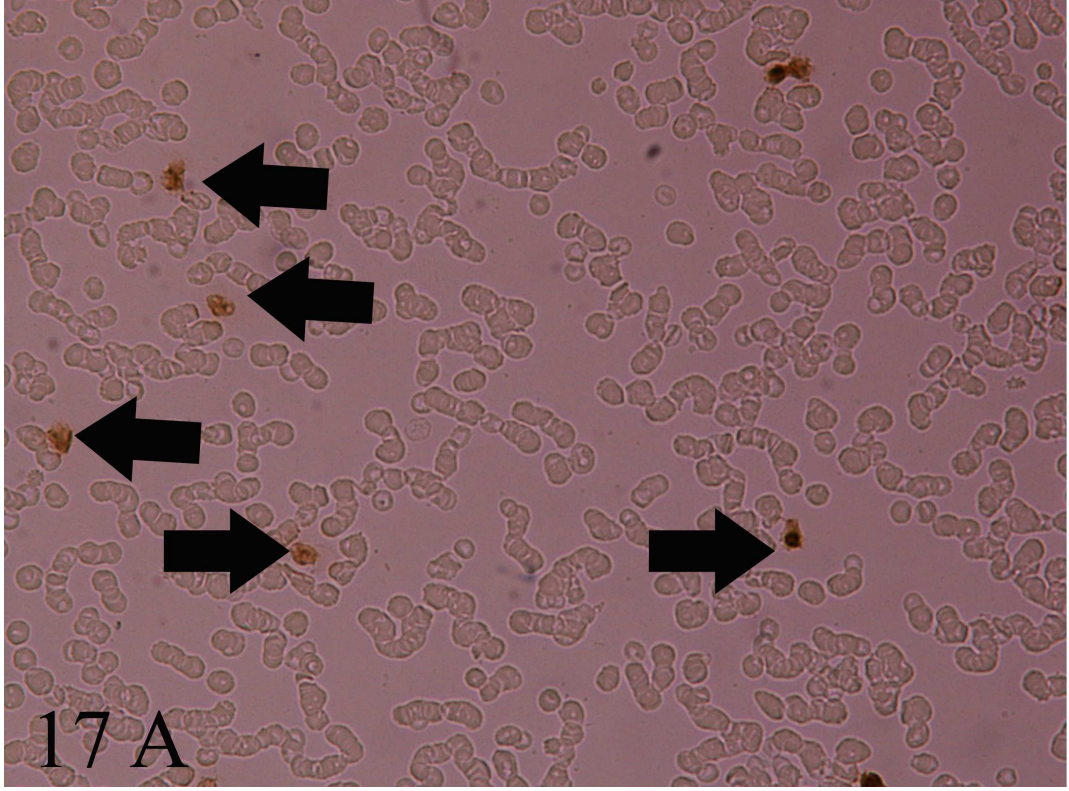
Resim:15B. Grup:2'de periferik yaymada sağlıklı hücreler (İnce oklar)ve apoptotik hücreler (Kalın oklar). Giemsa. X400



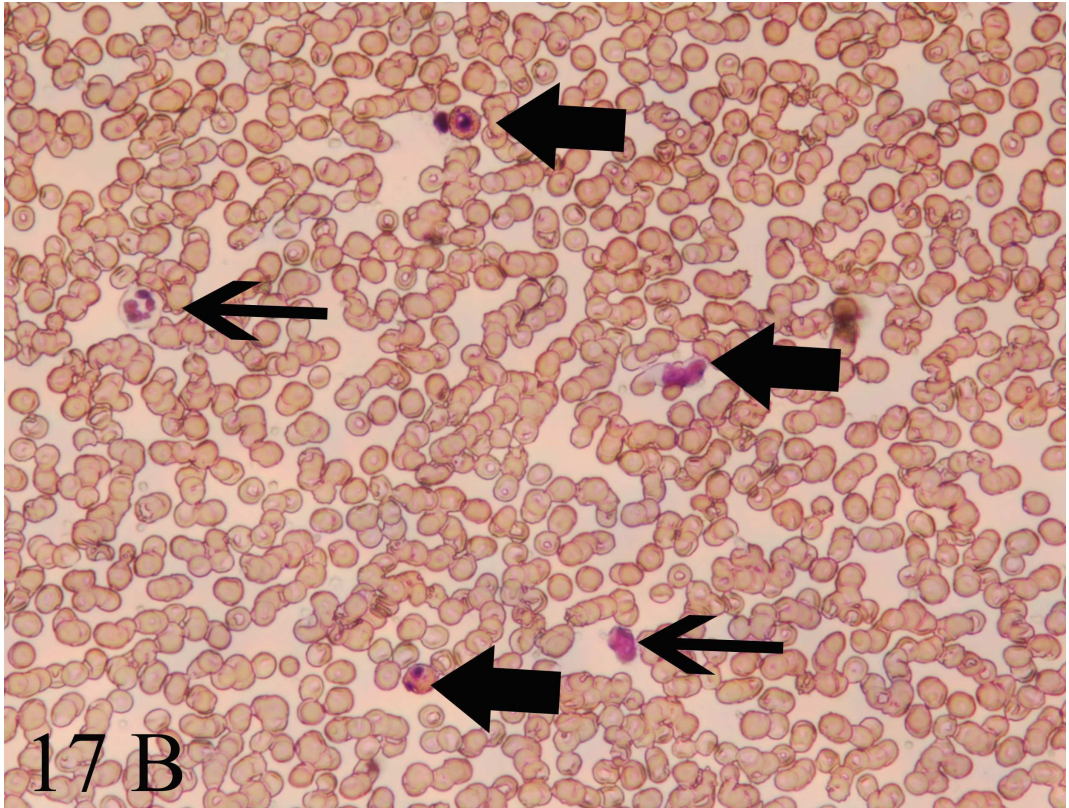
Resim:16A. Grup:4'de periferik yaymada apoptotik hücreler (Kalın oklar). Fragel. X400



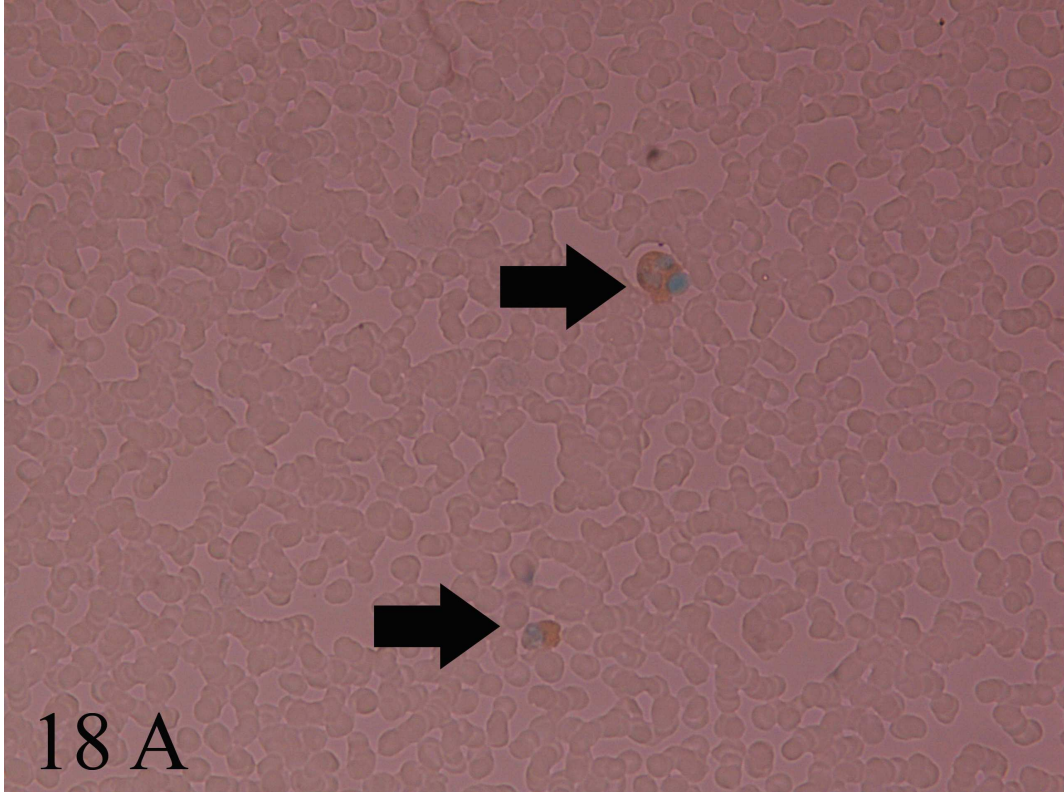
Resim:16B. Grup:4'de periferik yaymada apoptotik hücreler (Kalın oklar). Giemsa. X400



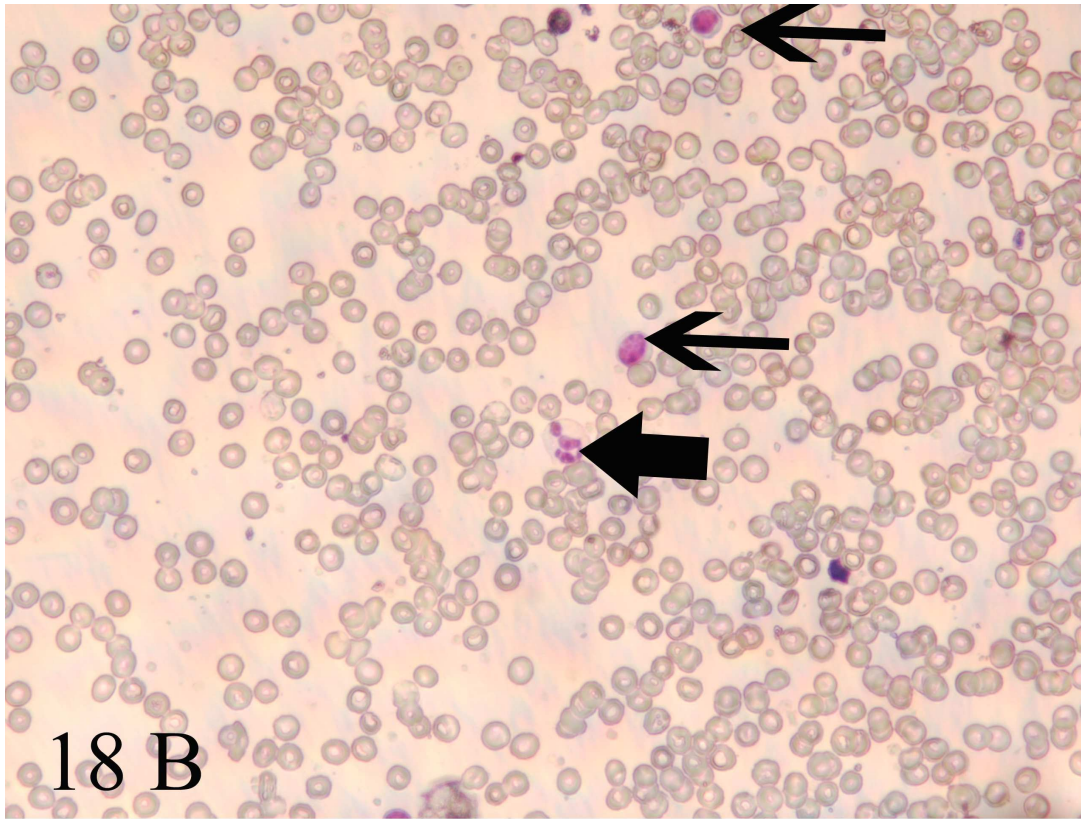
Resim:17A. Grup:6'da periferik yaymada apoptotik hücreler (Kalın oklar). Fragel. X400



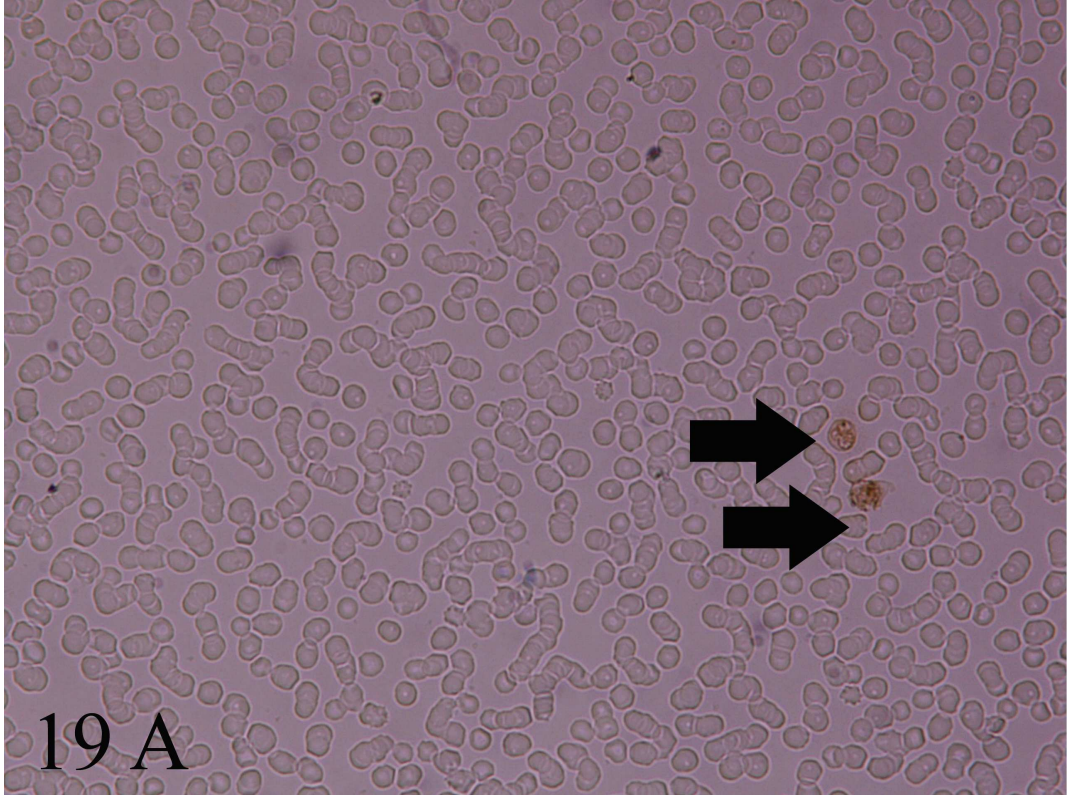
Resim:17B. Grup:6'da periferik yaymada sağlıklı hücreler (İnce oklar)ve apoptotik hücreler (Kalın oklar). Giemsa. X400



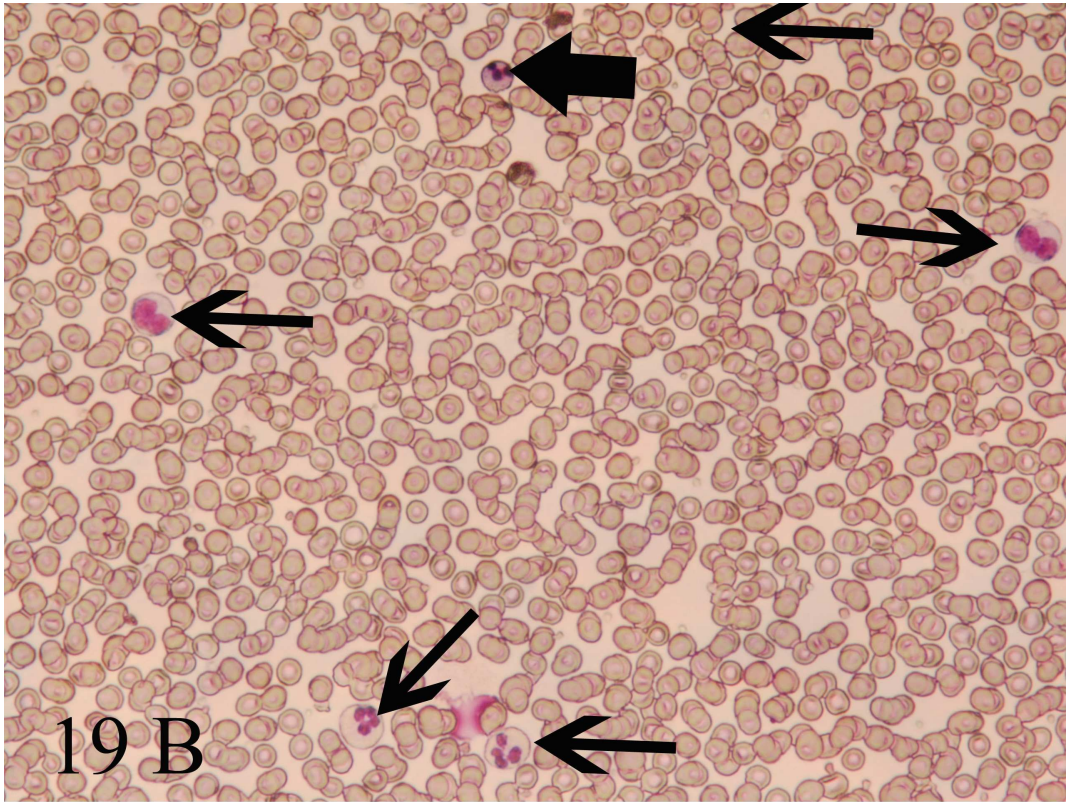
Resim:18A. Grup:3'de periferik yaymada apoptotik hücreler (Kalın oklar). Fragel. X400



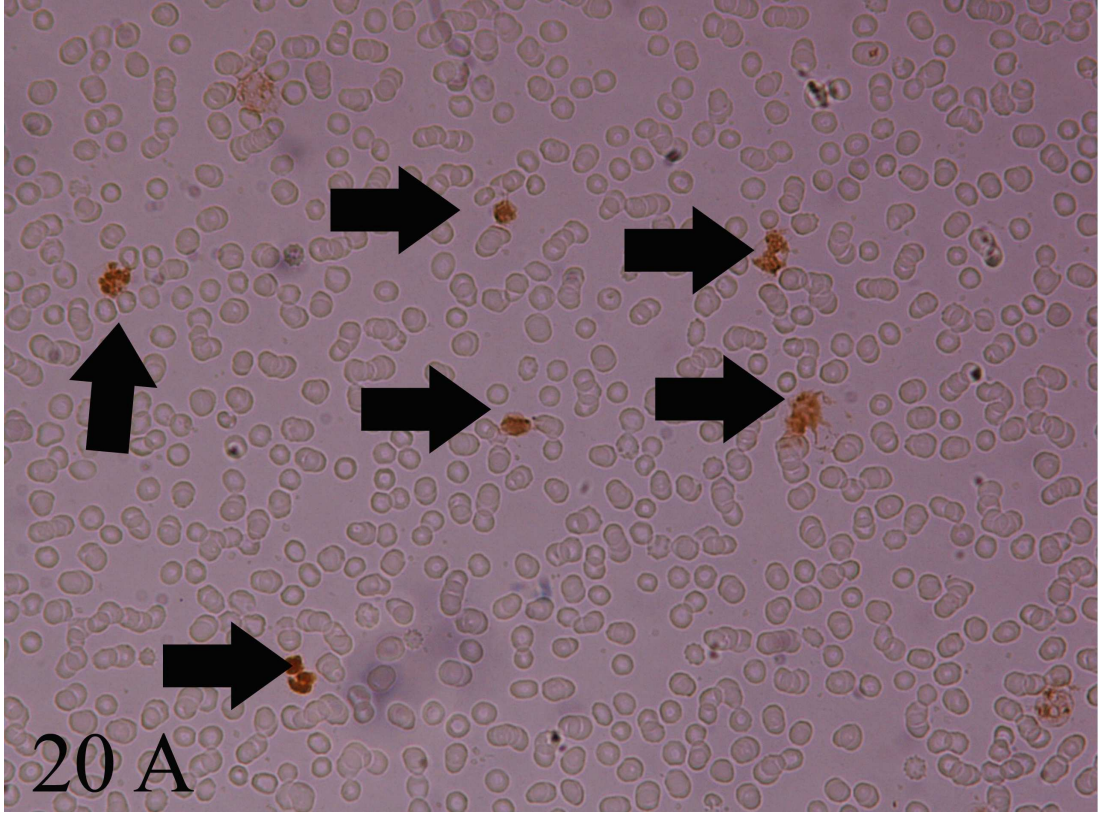
Resim:18B. Grup:3'de periferik yaymada sağlıklı hücreler (İnce oklar)ve apoptotik hücreler (Kalın ok). Giemsa. X400



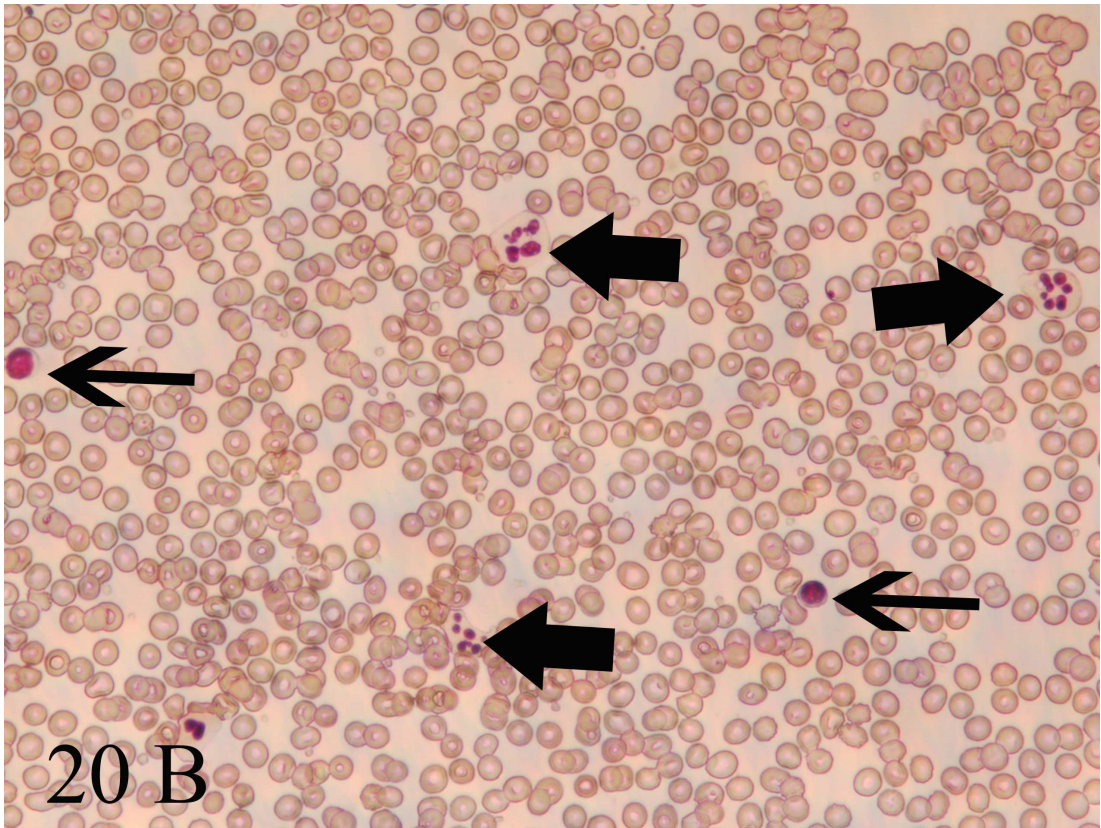
Resim:19A. Grup:5'de periferik yaymada apoptotik hücreler (Kalın ok). Fragel. X400



Resim:19B. Grup:5'de periferik yaymada sağlıklı hücreler (İnce oklar)ve apoptotik hücreler (Kalın ok). Giemsa. X400



Resim:20A. Grup:7'de periferik yaymada apoptotik hücreler (Kalın oklar). Frasel. X400



Resim:20B. Grup:7'de periferik yaymada sağlıklı hücreler (İnce oklar)ve apoptotik hücreler (Kalın oklar). Giemsa. X400

gruplardaki örneklerden elde edilen veriler arasında eritrosit, lökosit ve trombosit sayılarının ve lökosit alt gruplarının oranlarının arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı araştırıldı. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda elde edilen değerlerin ortalamalarının arasında belirgin bir farklılık olmadığı ve tüm gruplar arasında artan ısı derecelerine veya ısı düşürmelerine bağlı hiçbir anlamlı değişim olmadığı tespit edildi ($p>0.05$).

HSP düzeylerinin karşılaştırıldığı 3. parametrede ise, yine tüm gruplar arasında HSP70 değerleri ortalamalarında belirgin bir değişiklik olmadığı ve bu değerlerde artan ısı derecelerine veya ısı düşürmelerine bağlı hiçbir anlamlı değişim olmadığı tespit edildi ($p>0.05$).

Multiple Comparisons

Dependent Variable: HSP
Tukey HSD

(I) Groups	(J) Groups	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1,00	2,00	-,13083	,99142	1,000	-3,1325	2,8708
	3,00	1,04417	,99142	,940	-1,9575	4,0458
	4,00	-,57500	,99142	,997	-3,5767	2,4267
	5,00	2,06917	,99142	,371	-,9325	5,0708
	6,00	2,27417	,99142	,260	-,7275	5,2758
	7,00	1,24500	,99142	,870	-1,7567	4,2467
2,00	1,00	-,13083	,99142	1,000	-2,8708	3,1325
	3,00	1,17500	,99142	,898	-1,8267	4,1767
	4,00	-,44417	,99142	,999	-3,4458	2,5575
	5,00	2,20000	,99142	,298	-,8017	5,2017
	6,00	2,40500	,99142	,202	-,5967	5,4067
	7,00	1,37583	,99142	,807	-1,6258	4,3775
3,00	1,00	-1,04417	,99142	,940	-4,0458	1,9575
	2,00	-1,17500	,99142	,898	-4,1767	1,8267
	4,00	-1,61917	,99142	,662	-4,6208	1,3825
	5,00	1,02500	,99142	,944	-1,9767	4,0267
	6,00	1,23000	,99142	,876	-1,7717	4,2317
	7,00	-,20083	,99142	1,000	-2,8008	3,2025
4,00	1,00	-,57500	,99142	,997	-2,4267	3,5767
	2,00	-,44417	,99142	,999	-2,5575	3,4458
	3,00	1,61917	,99142	,662	-1,3825	4,6208
	5,00	2,64417	,99142	,121	-,3575	5,6458
	6,00	2,84917	,99142	,074	-,1525	5,8508
	7,00	1,82000	,99142	,529	-1,1817	4,8217
5,00	1,00	-2,06917	,99142	,371	-5,0708	,9325
	2,00	-2,20000	,99142	,298	-5,2017	,8017
	3,00	-1,02500	,99142	,944	-4,0267	1,9767
	4,00	-2,64417	,99142	,121	-5,6458	,3575
	6,00	-,20500	,99142	1,000	-2,7967	3,2067
	7,00	-,82417	,99142	,981	-3,8258	2,1775
6,00	1,00	-2,27417	,99142	,260	-5,2758	,7275
	2,00	-2,40500	,99142	,202	-5,4067	,5967
	3,00	-1,23000	,99142	,876	-4,2317	1,7717
	4,00	-2,84917	,99142	,074	-5,8508	,1525
	5,00	-,20500	,99142	1,000	-3,2067	2,7967
	7,00	-1,02917	,99142	,943	-4,0308	1,9725
7,00	1,00	-1,24500	,99142	,870	-4,2467	1,7567
	2,00	-1,37583	,99142	,807	-4,3775	1,6258
	3,00	-,20083	,99142	1,000	-3,2025	2,8008
	4,00	-1,82000	,99142	,529	-4,8217	1,1817
	5,00	-,82417	,99142	,981	-2,1775	3,8258
	6,00	1,02917	,99142	,943	-1,9725	4,0308

Tablo: 8. Deneklerden elde edilen örneklerdeki HSP değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması (One Way ANOVA (Post Hoc Test:Tukey)).

Descriptives

HSP	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					1,00	12		
2,00	12	13,0242	1,85039	,53416	11,8485	14,1999	9,82	16,26
3,00	12	11,8492	1,76558	,50968	10,7274	12,9710	7,86	13,70
4,00	12	13,4683	2,84722	,82192	11,6593	15,2774	8,83	20,53
5,00	12	10,8242	2,13313	,61578	9,4688	12,1795	7,78	14,11
6,00	12	10,6192	1,52558	,44040	9,6499	11,5885	7,88	13,45
7,00	12	11,6483	3,80742	1,09911	9,2292	14,0675	5,94	19,66
Total	84	12,0467	2,55820	,27912	11,4915	12,6018	5,94	20,53

Tablo:9. HSP ölçümü sonucunda elde edilen tanımlayıcı veriler

Elde edilen verilerin kadın veya erkek arasında anlamlı bir değişiklik gösterip göstermediğinin araştırıldığı 4. ve son parametrede ise; IHC ve Giemsa boyama ile elde edilen ortalama apoptotik indeks değerlerinin erkek ve kadınlar arasında anlamlı farklılık göstermediği tespit edildi. Diğer yandan, CBC ölçümlerinin karşılaştırıldığı analizlerde tüm gruplarda RBC sayılarının, Hb ve Htc oranlarının kadın deneklerde erkek deneklere göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). Bununla birlikte, diğer parametreler arasında anlamlı farklılık mevcut değildi ($p > 0.05$). HSP70 değerlerinin karşılaştırılmasında da kadın ve erkek deneklerden elde edilen veriler arasında anlamlı farklılık olmadığı belirlendi ($p > 0.05$).

Test Statistics^b

	Male	Female
Mann-Whitney U		17.500
Wilcoxon W		38.500
Z		-.081
Asymp. Sig. (2-tailed)		.936
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.937 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Group2

Tablo:10a. Grup:2'deki kadın ve erkek denekler arasında ortalama apoptotik hücre değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel analizi

Test Statistics^b

	Male	Female
Mann-Whitney U		17.500
Wilcoxon W		38.500
Z		-.083
Asymp. Sig. (2-tailed)		.934
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.937 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Group2

Tablo:10b. Grup:3'deki kadın ve erkek denekler arasında ortalama apoptotik hücre değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel analizi

Test Statistics^b

	Male	Female
Mann-Whitney U		7.500
Wilcoxon W		28.500
Z		-1.690
Asymp. Sig. (2-tailed)		.091
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.093 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Group2

Tablo: 10c. Grup:4'deki kadın ve erkek denekler arasında ortalama apoptotik hücre değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel analizi

Test Statistics^b

	Male	Female
Mann-Whitney U		14.000
Wilcoxon W		35.000
Z		-.645
Asymp. Sig. (2-tailed)		.519
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.589 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Group2

Tablo: 10d. Grup:5'deki kadın ve erkek denekler arasında ortalama apoptotik hücre değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel analizi

Test Statistics^b

	MaleFemale
Mann-Whitney U	9.500
Wilcoxon W	30.500
Z	-1.366
Asymp. Sig. (2-tailed)	.172
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.180 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Group2

Tablo: 10e. Grup:6'daki kadın ve erkek denekler arasında ortalama apoptotik hücre değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel analizi

Test Statistics^b

	MaleFemale
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	29.000
Z	-1.604
Asymp. Sig. (2-tailed)	.109
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.132 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Group2

Tablo: 10f. Grup:7'deki kadın ve erkek denekler arasında ortalama apoptotik hücre değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel analizi

Tablo: 10. Kadın ve erkek deneklerden alınan kan örneklerinde tespit edilen ortalama apoptotik hücre değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması. Grup:1'de her iki cinstede apoptotik hücre olmadığı için değerler karşılaştırılmamıştır. (Mann-Whitney-U testi).

Test Statistics^b

	Rbc	Hb	Hct	Plt	Wbc	neutrophyl	lymphocyte	monocyte	basophyl	eosinophyl
Mann-Whitney U	.000	1.000	3.500	9.000	16.000	17.500	15.000	18.000	14.500	5.000
Wilcoxon W	21.000	22.000	24.500	30.000	37.000	38.500	36.000	39.000	35.500	26.000
Z	-2.887	-2.727	-2.342	-1.441	-.320	-.080	-.484	.000	-.572	-2.082
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004	.006	.019	.150	.749	.936	.629	1.000	.568	.037
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^a	.004 ^a	.015 ^a	.180 ^a	.818 ^a	.937 ^a	.699 ^a	1.000 ^a	.589 ^a	.041 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Group2

Tablo: 11a. Grup:1'deki kadın ve erkek denekler arasında CBC değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel analizi

Test Statistics^b

	Rbc	Hb	Hct	Plt	Wbc	neutrophyl	lymphocyte	monocyte	basophyl	eosinophyl
Mann-Whitney U	2.000	.000	.000	12.000	13.000	10.000	16.000	15.000	8.000	10.500
Wilcoxon W	23.000	21.000	21.000	33.000	34.000	31.000	37.000	36.000	29.000	31.500
Z	-2.562	-2.887	-2.887	-.961	-.801	-1.281	-.321	-.480	-1.716	-1.203
Asymp. Sig. (2-tailed)	.010	.004	.004	.337	.423	.200	.748	.631	.086	.229
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.009 ^a	.002 ^a	.002 ^a	.394 ^a	.485 ^a	.240 ^a	.818 ^a	.699 ^a	.132 ^a	.240 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Group2

Tablo: 11b. Grup:2'deki kadın ve erkek denekler arasında CBC değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel analizi

Test Statistics^b

	Rbc	Hb	Hct	Plt	Wbc	neutrophyl	lymphocyte	monocyte	basophyl	eosinophyl
Mann-Whitney U	.000	.000	.000	9.000	13.000	8.000	11.000	14.000	15.000	9.500
Wilcoxon W	21.000	21.000	21.000	24.000	28.000	23.000	32.000	35.000	30.000	24.500
Z	-2.739	-2.745	-2.745	-1.100	-.365	-1.278	-.730	-.183	.000	-1.006
Asymp. Sig. (2-tailed)	.006	.006	.006	.271	.715	.201	.465	.855	1.000	.314
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.004 ^a	.004 ^a	.004 ^a	.329 ^a	.792 ^a	.247 ^a	.537 ^a	.931 ^a	1.000 ^a	.329 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Group2

Tablo: 11c. Grup:3'deki kadın ve erkek denekler arasında CBC değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel analizi

Test Statistics^b

	Rbc	Hb	Hct	Plt	Wbc	neutrophyl	lymphocyte	monocyte	basophyl	eosinophyl
Mann-Whitney U	.000	.000	.000	14.000	15.500	16.000	12.000	9.500	7.500	7.500
Wilcoxon W	21.000	21.000	21.000	35.000	36.500	37.000	33.000	30.500	28.500	28.500
Z	-2.882	-2.887	-2.887	-.641	-.401	-.320	-.961	-1.363	-1.422	-1.372
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004	.004	.004	.522	.688	.749	.337	.173	.155	.170
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^a	.002 ^a	.002 ^a	.589 ^a	.699 ^a	.818 ^a	.394 ^a	.180 ^a	.177 ^a	.177 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Group2

Tablo: 11d. Grup:4'deki kadın ve erkek denekler arasında CBC değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel analizi

Test Statistics^b

	Rbc	Hb	Hct	Plt	Wbc	neutrophyl	lymphocyte	monocyte	basophyl	eosinophyl
Mann-Whitney U	.000	.000	.000	14.000	14.000	10.000	12.500	15.000	14.000	9.500
Wilcoxon W	21.000	21.000	21.000	35.000	35.000	31.000	33.500	36.000	35.000	30.500
Z	-2.887	-2.882	-2.882	-.641	-.641	-1.281	-.882	-.480	-.716	-1.366
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004	.004	.004	.522	.522	.200	.378	.631	.474	.172
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^a	.002 ^a	.002 ^a	.589 ^a	.589 ^a	.240 ^a	.394 ^a	.699 ^a	.589 ^a	.180 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Group2

Tablo: 11e. Grup:5'deki kadın ve erkek denekler arasında CBC değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel analizi

Test Statistics^b

	Rbc	Hb	Hct	Plt	Wbc	neutrophyl	lymphocyte	monocyte	basophyl	eosinophyl
Mann-Whitney U	1.500	4.000	.000	14.000	15.000	10.000	5.500	3.000	12.500	11.000
Wilcoxon W	16.500	19.000	15.000	35.000	36.000	31.000	20.500	18.000	27.500	32.000
Z	-2.470	-2.018	-2.745	-.183	.000	-.913	-1.738	-2.196	-.460	-.730
Asymp. Sig. (2-tailed)	.013	.044	.006	.855	1.000	.361	.082	.028	.646	.465
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.009 ^a	.052 ^a	.004 ^a	.931 ^a	1.000 ^a	.429 ^a	.082 ^a	.030 ^a	.662 ^a	.537 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Group2

Tablo: 11f. Grup:6'daki kadın ve erkek denekler arasında CBC değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel analizi

Test Statistics^b

	Rbc	Hb	Hct	Plt	Wbc	neutrophyl	lymphocyte	monocyte	basophyl	eosinophyl
Mann-Whitney U	.000	.000	.000	13.000	13.000	10.000	12.500	14.000	5.000	8.500
Wilcoxon W	21.000	21.000	21.000	34.000	34.000	31.000	33.500	35.000	26.000	29.500
Z	-2.887	-2.903	-2.882	-.801	-.801	-1.281	-.882	-.641	-2.115	-1.524
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004	.004	.004	.423	.423	.200	.378	.522	.034	.128
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^a	.002 ^a	.002 ^a	.485 ^a	.485 ^a	.240 ^a	.394 ^a	.589 ^a	.041 ^a	.132 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Group2

Tablo: 11g. Grup:7'deki kadın ve erkek denekler arasında CBC değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel analizi
Tablo:11. Kadın ve erkek deneklerden alınan kan örneklerinde tespit edilen CBC değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması. (Mann-Whitney-U testi).Test Statistics^b

	HSP70
Mann-Whitney U	10.000
Wilcoxon W	31.000
Z	-1.281
Asymp. Sig. (2-tailed)	.200
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.240 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Group2

Tablo: 12a. Grup:1'deki kadın ve erkek denekler arasında HSP70 değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel analizi

Test Statistics^b

	HSP70
Mann-Whitney U	14.000
Wilcoxon W	35.000
Z	-.641
Asymp. Sig. (2-tailed)	.522
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.589 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Group2

Tablo: 12b. Grup:2'deki kadın ve erkek denekler arasında HSP70 değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel analizi

Test Statistics^b

	HSP70
Mann-Whitney U	13.000
Wilcoxon W	34.000
Z	-.801
Asymp. Sig. (2-tailed)	.423
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.485 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Group2

Tablo: 12c. Grup:3'deki kadın ve erkek denekler arasında HSP70 değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel analizi

Test Statistics^b

	HSP70
Mann-Whitney U	16.000
Wilcoxon W	37.000
Z	-.320
Asymp. Sig. (2-tailed)	.749
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.818 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Group2

Tablo: 12d. Grup:4'deki kadın ve erkek denekler arasında HSP70 değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel analizi

Test Statistics ^b	
	HSP70
Mann-Whitney U	9.000
Wilcoxon W	30.000
Z	-1.441
Asymp. Sig. (2-tailed)	.150
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.180 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Group2

Tablo:12e. Grup:5'deki kadın ve erkek denekler arasında HSP70 değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel analizi

Test Statistics ^b	
	HSP70
Mann-Whitney U	9.000
Wilcoxon W	30.000
Z	-1.441
Asymp. Sig. (2-tailed)	.150
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.180 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Group2

Tablo:12f. Grup:6'deki kadın ve erkek denekler arasında HSP70 değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel analizi

Test Statistics ^b	
	HSP70
Mann-Whitney U	10.000
Wilcoxon W	31.000
Z	-1.281
Asymp. Sig. (2-tailed)	.200
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.240 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Group2

Tablo:12g. Grup:7'deki kadın ve erkek denekler arasında HSP70 değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel analizi

Tablo:12. Kadın ve erkek deneklerden alınan kan örneklerinde tespit edilen HSP değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması. (Mann-Whitney-U testi).

Çalışmamızda dikkati çeken bir diğer nokta, artan ısı derecelerine paralel olarak eritrosit dış zarlarının görünümünde bozulma, tırtıklı bir yapılanma, birbirlerine birçok bölgede sıkı sıkıya tutunma ve hatta bazı yerlerde yapışma gözlenmiş olup, anizositoza kadar değişen yapısal görünüm bozuklukları tespit edilmiştir (Resim 17 B).

6.TARTIŞMA

Embriyonik dönemde dokuların şekillenmesi ve organların gelişiminde birçok fizyolojik fonksiyonların aktif hale gelmesinde aracı olan apoptozis, postnatal hayat sürecinde de birçok fizyolojik ve patolojik sürecin kontrolünde çok büyük öneme sahiptir (104). Vücutta faydalı olmayacak her türlü hücrenin elimine edildiği bir ölüm şekli olan apoptozis, bu sayede vücudu malign hastalıklardanda koruyabilmektedir (7). Birçok intrinsek ve ekstrinsek faktörün etkisi altında ilerleyen ve/veya durdurulan apoptozis süreci radyasyon, yüksek ısı, toksik kimyasallar gibi farklı eksojen stres faktörlerinin etkisi altında aşırı uyarılmaktadır (15). Bununla birlikte, bu uyaranlar bazı durumlarda diğer bir ölüm şekli olan nekrozda sonlanabilirler (12). Örneğin, yukarıda saydığımız faktörlerin dozu hafif olduğunda apoptozis tetiklenirken, aynı faktörlerin dozunun artırıldığında nekrozun tetiklendiği görülür (18). Bizim yapmış olduğumuz çalışmamızda da yukarıda sayılan stres faktörlerinden biri olan hipertermi ile hiperterminin şiddetine paralel olarak apoptotik hücre ölümünün arttığı sonucuna varılmıştır.

Değişik ölüm sinyallerine maruz kalan hücrenin hangi tip ölümü seçeceği, ilgili sinyalin türü, şiddeti ve süresi ile yakından ilgilidir. Nekroza neden olan ölüm sinyallerinin tüm hücreleri etkilemesine karşın apoptozise neden olan sinyallerin belli bir sayıda hücreyi etkilemesi önemlidir. Bunun yanında, nekroz sürecine giren hücrenin geriye dönüşü mümkün olmamakla birlikte; apoptozis sürecine giren bir hücre mitokondrial transmembran potansiyeli etkilenmedikçe apoptotik uyarının kalkması durumunda normal yapısına geri dönebilir (11,105,106). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada 39 °C'den 37 °C'ye ısı düşürülmesi ile apoptotik hücre ölümünde azalma görülürken, 43 °C'den 37 °C'ye azalma görülmemiş olup, bilhassa artma gözlenmiştir. Buda bize çalışmamızda apoptotik uyarın olarak kullanılan hiperterminin hücreyi apoptozise götürme aşamasında belli basamakta geri dönüşüm olabildiğini göstermektedir. Bu geri dönüşümün bilhassa 39 °C'den 37 °C'ye ısı düşürülmesi basamağında olmasına karşın 43 °C'den 37 °C'ye azaltılma durumunda olmaması ve hatta tam aksine hücre ölümünün artması bize yüksek ısı derecelerinde hücrelerin zar yapısının ve bilhassa mitokondrial zarın yapısının tamir edilemez düzeyde hasarlanmış olduğunu düşündürmektedir.

Stres, organizmanın normal işleyişine aykırı bir durumdur. Genel sıkıntı ve emosyonel düzensizlik vücutta birçok patofizyolojik durumun altında yatan esas etkenlerdir. Bu tür durumların sosyal aktiviteyi ve yaşam kalitesini azalttığı bilinir. Ayrıca psikoemosyonel bozukluğun, güçlü stres faktörleri ve adaptasyon sıkıntısı ile eşlik ettiği görülür (107). Bununla birlikte, bu tip psişik etkenler yanında daha birçok somatik etkende organizmada strese neden olabilir ki bunlara örnek olarak hipertermi, oksidatif hasar, hipoksi, hipoglisemi, ağır metaller, etanol, metabolik zehirlenmeler, protein denaturasyonu verilebilir (27,100). Stresle hücrelerde koruyucu bir mekanizma olarak ısı şoku proteinleri eksprese edilir. Buna zıt olarak stres ciddi derecede ise apoptozisin tetiklendiği görülür. Bu hasarlanmış hücrelerin organizmadan uzaklaştırılması için iyi bir yöntemdir (108). Bizim çalışmamızda ise uygulamış olduğumuz stres faktörünün vücutta HSP koruma tamponunu aktive edecek kadar yeterli stres oluşturmadığı ortaya konmuştur. Bu durum bize çalışmamızda kullanılan kan örneklerinin ısıtılma sürecinin progressif bir şekilde olması yani şok ısıtma uygulanmaması ve/veya tüm stres faktörünün örneklere toplam en fazla 4 saat uygulanması sonucu yeterli HSP ekspresyonu oluşmadığını düşündürmektedir.

Tezimizin ana konusunu oluşturan hipertermi kavramı bu stresler içinde oldukça önem arz eden kavramlar içinde yer almaktadır. Çalışmamızda kan dokusunun tercih edilmesi apoptozisin polimorfonükleer lökositlerde kolaylıkla indüklenebilmesi ve çeşitli faktörlerin etkisi altında hücre ölüm mekanizması için elverişli bir model olarak hizmet etmesinden dolayıdır. Bu faktörlerden biri olan hiperterminin kan kültüründe apoptozisi güçlü bir şekilde tetiklediği görülmüştür. Heparinize kan numuneleri alınarak sağlıklı ve hasta bireylerde prednizolon ve hipertermi ile ayrı ayrı uygulamalar yapıldığında uzun süre sığağa maruz kalan nötrofillerde yaşayabilirliğin azaldığı görülmüştür. Prednizolonla birlikte daha yüksek ısıda nükleer kromatinde azalma gözlenmiştir. Prednizolon ve hipertermi nükleer maddenin lenfositlerde azalmasına neden olmuştur. Kromatin fragmantasyonu görülmüştür. Sağlıklı bireylerde de lenfositlerde ve nötrofillerde değişiklikler benzerdir. Ayrıca hiperterminin (43 °C'de, 1 saatte) timositlerde apoptozis oluşturduğu ve bunun protein sentezi ve ATP'den bağımsız farklı bir metabolik yolla gerçekleştiği belirtilmiştir (107). Bizim çalışmamızda da sağlıklı

bireylerden alınan kan örneklerinde yüksek ısılarda (41 °C, 43 °C) apoptotik hücre ölümünün oluştuğu görülmüştür.

Tüm organizmalar için fizyolojik değerlerin üzerinde ısıya maruz kalınması durumu olan hipertermi organizma için hayati önem arz eden stres durumudur. Hücreler stresle uyarıldıklarında ya da hasarlandıklarında intrinsek apoptotik yol hücrenin kendi yıkımında daha cazip bir seçenek halini alır (101.102). Sağlıklı bireylerde normalde inaktif olan sistein proteazların yani kaspaz ailesinin uyarımıyla hücrede yıkım başlar. Bu aktivasyonlarda apoptosom oluşumu, başlatıcı kaspaz 9, efektör kaspaz 3,6 ve 7 önemlidir. Sitokrom C'nin ve AIF gibi diğer proapoptotik faktörlerin mitokondriden translokasyonu ve apoptosomun şekillenmesi ile apoptotik süreç devam eder. Hücre stresle uyarıldığında ikinci bir seçenekte apoptotik programın baskılanması durumudur. Bu seçenekte moleküler şaperonlar olarak bilinen HSP'nin ekspresyonudur. Yapılan deneysel çalışmada sıcakla indüklenen apoptotik hücre ölümünün engellenmesini HSP'lerin Bax proteinini baskılayarak ve proapoptotik faktörlerin salınmasını önleyerek gerçekleştirdiği ortaya çıkmıştır (102).

Hiperterminin tanımlamasında, genellikle fizyolojik olmayan sıcaklık dereceleri 42-43 °C olarak belirtilirken; orta derecede hiperterminin fizyolojik ölçüleri 39-40 °C olarak belirtilmiştir. İnsan kan örneğinden steril bir teknikle alınan lökositlerin ayrılarak PBMC'lerin (Peripheral blood mononuclear cell) orta derecede hipertermiye maruz bırakılması ile yapılan çalışma da 39-41 °C'de 90 dakikada, B hücre aktivasyonunun arttığı ve aynı zamanda IgG, IgA, IgM sekresyonunda belirgin artışın olduğu görülmüştür. Ancak 42 °C'de bu etkilerin olmadığı, hatta zıt olarak baskılanmış etkilerin oluştuğu görülmüştür. Buda bize orta derecede hiperterminin immun yanıt oluşturduğunu gösterirken, daha yüksek ısı derecelerinde hücresel faaliyetlerin baskılandığını gösterir. Aynı zamanda 42-43 °C de HSP sentezinin indüklendiği görülmüş olup, orta dereceli hipertermi ilede benzer sonuçlar elde edilmiştir (109).

Burada önemli bir nokta bir anda yüksek ısıya (47-48 °C) maruz bırakılan hücrelerin kısa süre içinde apoptozis yerine nekroz ile öldüğünün gözlenmiş olmasıdır. Bu bulgu bize sıcaklık derecesi yanında ve sıcaklığa maruz kalınan sürenin önemli olduğunu göstermektedir (110). Bizim çalışmamızda literatürde

mevcut çalışmaların aksine tüm gruplarda artan ısı derecelerine paralel olarak HSP değerlerinin tüm gruplarda değişme olmadığını belirledik.

Vücudun aşırı güç sarfedebildiği durumlar olan metabolizma artışı, egzersiz ve çevresel durumlarda ısı artışına neden olabilir (24). Ancak çoğu kez bunlar yaşamı tehdit edici bir durum olan aşırı hipertermi ile sonuçlanmazlar. Bununla birlikte hücre düzeyinde bir stres olan hipertermi ile hücrelerin çoğalmasına veya ölümüne karar verilir (102). Bazı durumlarda hipertermi organizmada delirium, konvülsiyon ve hatta koma gibi çeşitli nörolojik belirtilere neden olabilir. Hemoraji ile birlikte kalp, karaciğer, böbrek ve beyinde nekroz ve ölüm görülebilecek tipik özellikler içinde yer alırlar (111). Memeli hücre kültüründe ve deneysel hayvan modellerinde ısıya maruz kalınması durumunda (41.5 -42 °C) karaciğer, dalak, timus, lenf nodu ve ince barsak mukozasında birkaç dakika içinde apoptotik hücre ölümü görülmüş olup, 43 °C ve daha yüksek ısılarda kritik enzimlerin denatüre olduğu görülmüştür (24).

Hiperterminin insan lenfositleri üzerindeki etkileri 1980'lerden önce çalışılmıştır. Çeşitli deneysel çalışmalarda *in vitro* olarak sıcaklığın kısıtlı bir şekilde hücresel aktiviteyi ve sitotoksiteyi arttırdığı ayrıca immünolojik reaksiyonları tetiklediği görülmüştür. Yüksek ısıya maruz bırakılan *in vivo* ortamdaki periferik kan hücrelerinde farklı değişiklikler gözlenmiştir. Kanser hastalarında uygulanan hipertermi ile CD4+ T ve CD8+ T hücrelerinde anlamlı bir azalma görülmüştür. Bu NK hücrelerinde de görülebilmektedir. Az sayıda kanser hastasında uygulanan tüm vücudun yüksek ısıya bırakıldığı *whole body hyperthermia* tedavi metodu ile CD4+ T hücre sayılarında azalma, NK hücrelerinde artma gözlenmiştir. Yapılan çalışmada hipertermi uygulaması sürecinde ve sonrasında değişikliklere bakılmıştır. Hipertermi uygulaması boyunca lökositlerde azalma görülmüştür. CD4+ T hücreleri belirgin şekilde azalmıştır. CD8+ T hücreleri hipertermi boyunca değişmemiştir. Fakat bir süre sonra anlamlı bir şekilde azalmıştır. B hücrelerinde ise uygulama boyunca ve sonrasında değişiklik olmamıştır. NK hücreleri ise uygulama sırasında ve sonrasında farklı özellik göstermiş önce artmış sonra anlamlı bir şekilde azalmıştır. Yapılan başka çalışmalarda da 42 °C'de sıcaklıkta sağlıklı insan lenfositlerinde apoptozisin indüklendiği görülmüştür (*in vitro*) (112).

Lenfosit popülasyonunun homeostatik düzenlenmesinde sürekli olarak üretilmeleri yanında fazla, gereksiz veya yaşlanıp farklılaşmış olanların apoptozis

yoluyla ortadan kaldırılmaları önem arzeder. Yapılan bir çalışmada insan PBMC'ler üzerinde çeşitli apoptojenler (Örneğin; camthecin, cisplatin, dexamethasone, hyperthermia v.b.) kullanılarak nicel parametrelerle apoptozis, nekrozis ve canlı hücre oranlarına bakılmıştır. Hiperterminin etkisi ile bu hücrelerde % 13-29 oranında apoptozisin gözleendiği sonucu alınmıştır (113). Embriyogenezde, yetişkin organlarının homeostatik kontrolünde ve bilhassa T lenfositlerin timusta elimine edilmesinde apoptozis genel bir fenomendir. Fare timositlerine ısı uygulanması sonucu DNA fragmentasyonu oluştuğu ve orantılı olarak hücre ölümü gerçekleştiği görülmüş olup yaşayabilen hücrelerin ise apoptoze dirençli hücreler olduğu belirlenmiştir (25)

Apoptozis immün sistem işleyişi, T ve B hücrelerinin fizyolojik kontrolü, otoimmün cevabın önlenmesi ve patolojik immün cevapta merkezi bir role sahiptir. Dalakta yer alan T ve B lenfositlerin spontan ve sıcaklığa maruz bırakılması suretiyle oluşturulmuş 2 grup arasında yapılan bir çalışmada T ve B hücrelerinin sıcaklığa verdiği cevabın farklı olduğu ortaya çıkmıştır. Artan ısı ile apoptozisin anlamlı bir şekilde artmasına karşın özellikle T hücrelerinin B hücrelerine oranla sıcaklığa daha duyarlı olduğu görülmüştür. Kontrol grubu olan hücreler de gözlenen spontan apoptotik ölüm oranı %15, 6 saat sıcak uygulamaya maruz kalmış hücrelerin apoptotik ölüm oranı %36, 24 saat sıcak uygulamaya maruz kalmış hücrelerin ise apoptotik ölüm oranı %50' den fazla bulunmuştur (114). Bizim çalışmamızda her ne kadar genel anlamda tüm lökositlerdeki apoptotik hücre ölümü değerlendirilmiş olsa da elde ettiğimiz verilerde de apoptotik hücre ölümünün artan süreye bağlı olarak arttığını tespit ettik. Ancak burada ölümün artma nedeninin süreye mi yoksa ısı derecesine bağlı mı olduğu konusunda bir yön gösterici bilgi elde edilememiştir.

İnflamatuvar cevapta hafif hiperterminin nötrofiller üzerine aktive edici etki yaptığı ancak 42 °C üstünde ve hipotermi durumlarında bu aktivasyonun inhibisyona dönüştüğü görülmüştür (115). Yapılan diğer bir deneysel çalışmada ise 15 °C'den itibaren giderek artan ısı dereceleriyle 20 saat süre ile in vitro olarak kültüre edilen nötrofillerde apoptotik fazın indüklenmesi 37 °C'ye ulaşmaya dek gerçekleşmemiştir. 37 °C'nin üzerinde ise sitoplazmik bir protein olan Bax proteininin nötrofil membranında ilerlediği ve beraberinde prokaspaz 3'ün proteolitik ayrılması ve apoptozis indüklenmesi gözlenmiştir. Bu çalışmada sitokrom C'nin

mitokondriden sitoplazmaya serbestleşmesi ki 15 °C'de serbestleşme olmazken, 37 °C üstü belirginleşmiştir ve kaspaz aktivasyonunun başlatılması ile apoptozisin gerçekleştiği görülmüştür. Sitokrom C'nin nasıl serbest kaldığı tam olarak bilinmemekle birlikte, sıcağa hassas olan membran kanallarının açılması ya da şekillenmesi ile olduğu düşünülmektedir (76).

Hiperterminin çeşitli hücrelerde apoptozise neden olduğu bilinmektedir. Benign Prostat Hiperplazisi hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada hiperterminin prostat dokusu üzerinde etkisi incelendiğinde; alınan prostat dokusu üzerinde hipertermi uygulamasından birkaç saat sonra anlamlı morfolojik değişikliklerin olduğu tespit edilmiştir. TEM ile yapılan incelemede 3 saat içerisinde % 35 olan apoptotik hücre ölüm oranının 24 saat sonunda %76'ya yükseldiği görülmüştür.(110).

Nükleer bir fosfoprotein olan p53 DNA hasarı ile eksprese olmaktadır. Guan ve ark. yaptıkları bir çalışmada yüksek ısılarda (41-44 °C) p53 aracılı apoptozis ile hücre ölümünün gerçekleştiğini in vitro olarak göstermişlerdir (116).

Kanser, hücre çoğalmasının aşırı artışı yanında apoptozisin baskılanması veya bu iki sürecin birlikte görülmesi sonucu dokuda atipik hücrelerin ortadan kaldırılamamasına bağlı olarak ortaya çıkan ağır bir hastalık grubudur. Bu nedenle apoptozis hem kanser patogenezi hemde uygulanan kemoterapötik tedavilere karşı direnç gelişimi açısından önemlidir. Genlerde meydana gelen mutasyonlar doğrudan ya da dolaylı olarak apoptozisi baskılayabilir. Örneğin insan kanserlerinin % 55-70'inde p53 geni ya da onun düzenleyici genlerinde mutasyonlar saptanmıştır. Ayrıca p53'den yoksun hücrelerin radyoterapi ve kemoterapiye daha dirençli oldukları saptanmıştır. Kansere karşı kullanılacak yeni tedavi metodlarında özgün olarak kanser hücrelerinde apoptozisin uyarılması hedeflenmektedir. Hem tümör hücrelerinin ortadan kaldırılması hemde kanserin seyri ve tedaviye yanıtı açısından değerlendirilmede bir belirteç olarak kullanılması nedeniyle apoptozis onkolojik çalışmaların odak noktası haline gelmiştir (20). Bu bağlamda hipertermi günümüzde tümörlerin tedavisi için yaygın olarak kullanılan bir tedavi şekli haline gelmiştir. Tümör dokusundaki sıcaklıkta bir artış elde etmek için iki farklı metod uygulanır. Bunlardan bir tanesi tüm vücut hipertermisi olup özel bir cihaz içerisinde kızılötesi ışınlama aracılığıyla derinin üzerinden vücudun tamamına ısı artışı yapmaya

dayanmaktadır. Diğeri ise, lokorejiyonal hipertermidir ve bu metotta belli problemler yardımıyla seçilen vücut kısmında hipertermi oluşturacak cihazlar kullanılmaktadır. Maksimum bir tümör yok edilmesinin sağlanabilmesi için genellikle hastalar toksisite sınırına kadar kemoterapi ve radyoterapi ile tedavi edilmektedirler. Ancak bu çalışma metodları genelde yeterli gelmemektedir. Bu tedavilere destek olarak hipertermi uygulanması surviyi arttırıcı etki yapmaktadır (117,118). Hipertermi tedavisinin kanser hücrelerinde ve diğer genomun hasarlandığı hücrelerde etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada bu hücrelerin hipertermiye normal vücut hücrelerine göre daha duyarlı oldukları ortaya konmuştur. Bu çalışmada 42 °C'de 1 saat bekletilen lösemik T hücrelerinde görülen apoptozis oranının normal T hücrelerine göre çok fazla olduğu görülmüştür (77). Son yıllarda, kronik lenfositik lösemili hastalarda lösemik T lenfositlere ve promyelotik hücrelere hafif sıcak şok (42 °C'de 1 saat) uygulandığında sürekli uyarımla TRAIL aracılı apoptozisin indüklendiği görülmüştür. Buna ek olarak, normal T lenfositlerde bu etkilerin kaydedilmediği belirtilmiştir. Kanser hastalarına radyoterapi ve kemoterapiye ek olarak birde termal terapi, sıcak teknik olarak hipertermi kullanılması geliştirilmiştir (84)

HSP'ler başta ısı ve diğer bazı streslere bağlı olarak hücrelerde ekspresyonu artan fonksiyonel proteinlerdir (119). Isının aşırı artışı ısı şok cevabının önemli bir parçasını oluşturur ve esas olarak HSF tarafından uyarılır (120). HSP'ler tüm canlılarda bulunan bir protein grubudur. Molekül ağırlıklarına göre isimlendirilen bu moleküller içinde HSP70 hücrelerin ısıya karşı termotoleransını sağlarken, HSP100 çok yüksek ısılarda aktif olan bir şaperondur (121). HSP70 hipertermideki etkilerine ilaveten immün sistemde antijene bağlanıp sunumundada etkin rol oynar (122). HSP70 aktivasyonunda HSF1'in transkripsiyon faktörü olarak görev yaptığı bilinmektedir (123).

Yukarıda bahsedilen çalışmalar gibi daha birçok çalışmada kullanılan kan örnekleri veya diğer tipte doku örneklerinde apoptozis oluşturmak için örneğin normal vücut ısısından bir anda yüksek ısı derecelerine konulduğu görülmektedir. Bu özellikleri nedeniyle bu tip çalışmalar genel anlamda sadece deneysel özellikli çalışmalardır. Oysa bizim çalışmamızda, ısı artışının fizyolojik düzeydeki etkileri de

araştırıldığı için, bilhassa küçük çocuklarda sık görülen başta enfektif nedenlere bağlı progressif bir ateş yükselmesinin neden olacağı sonuçlar klinik ile bağlantı kurulmasında oldukça faydalı olacaktır. Kabul etmek gerekir ki normal yaşamda progresif ateş yükselmesi malign hastalıklara göre çok daha fazla gözlenmektedir. Buna ek olarak artan ateşin düşürülmesi sırasında vücutta görülebilecek olası hücre apoptozis indekslerinde değişimde yine tedavilerin etkinliği ve hatta olası yan etkilerinde yön gösterici olabilecektir. Ayrıca ısı derecelerinde görülen bu değişimlerin kan hücre elemanlarının sayısı üzerine etkisi, cinsler arasında bu kriterler arasında farklılık olup olmadığının araştırılması, vücudun önemli tampon mekanizmalarından biri olan HSP koruma kalkanının bu süreçte yeri ve öneminin vurgulanması açısından çalışmamız birçok farklı özellikler arz etmektedir.

Çalışmamızda ortaya çıkan sonuçların değerlendirilmesinde birçok veriler elde etmiş bulunmaktayız. Bununla birlikte, bu verilerin içinde en önemli olanı progresif olarak artan ısının vücutta HSP koruma sistemini aktive edecek kadar yeterli stres oluşturmamasıdır. Bu etki hem kadın hemde erkek deneklerde kontrol ve deney örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir. Yine bu değerler kadın ve erkek arasında karşılaştırıldığında da arada anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Bu veriler, literatürde elde edilen verilere zıt özellik arz etmektedirler. Bununla birlikte, literatürde mevcut verilerin yukarıda bahsedildiği üzere örneklere geniş ısı aralıkları arasında ısı uygulanması ile elde edilmesi nedeniyle elde ettiğimiz verilerin literatüre zıt olması yerine yeni bir veri olarak kabul edilmesinin daha mantıklı olduğunu ileri sürmekteyiz. Yani çalışmamızın sonuçlarından biri olarak progresif ısı artımının kan hücrelerinde HSP tamponunu aktive edecek kadar ciddi bir stres oluşturma durumu yoktur diyebilmekteyiz.

Öte yandan çalışmamızın hedeflerinden biri olan apoptotik hücrelerin sayısının artan ve/veya azalan ısı derecelerine bağlı olarak değişiminin incelendiği kısımda elde ettiğimiz verilerde önem arz eder nitelikteydi. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler artan ısı derecelerinin kanda lökositler üzerinde apoptotik ölüm uyarımına neden olduğunu ve apoptotik lökosit sayısının artan ısı derecelerine paralel olarak artış gösterdiğini ortaya koymuştur ki bu literatürde mevcut olan ve yukarıda belirttiğimiz makaleler ile uyumlu verilerdir. Bununla birlikte, burada ısının 37 °C'den 39 °C'ye çıkarıldığı örnekler arasında apoptotik hücre sayısında artışın

anlamli olmaması da çalışmamızda elde ettiğimiz önemli sonuçlardan bir tanesidir. Bu veri bize ‐hafif hiperterminin kan hücrelerinde apoptozisi uyarıcı etki yapmadığı ancak yüksek ısılarda apoptotik yolların aktive olduğunu göstermektedir‐ ve bu verilerde literatürde mevcut olan ve yukarıda belirtilen birçok çalışmadaki verilerle uyumluluk göstermektedir. Ancak diğer çalışmalardan daha farklı olan ve çalışmamızın özgün yönlerinden biri olan yüksek ısılardan düşük ısıya düşme durumunda apoptotik hücre sayısında görülecek değişimin incelendiği bölümde elde edilen veriler ilginç özellikler taşımaktadır. Elde edilen sonuçlar göstermektedir ki ‐orta ve yüksek hipertermi durumundaki kan örneklerinin hızla 37 °C’ye soğutulması beklenen aksine apoptotik hücre ölümünün daha fazla artışına neden olmaktadır. Bununla birlikte, hafif hipertermi uygulanan örneğin soğutulması beklendiği üzere apoptotik hücre sayısının azalmasına neden olmaktadır.‐ Burada da elde edilen verilerin oldukça önemli olduğunu düşünmekteyiz. Elde edilen veriler progresif ateş yükselmesiyle artan apoptotik hücre sayısının hızlı soğutmaya bağlı daha da artmasına neden olduğunu ortaya koyduğu için progresif ateş yükselmesi nedeniyle kliniğe gelen vakaların tedavisi sırasında çok hızlı soğutmanın bazı yan etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir. Çünkü lökositlerde artan apoptotik hücre ölümü immun sistemi baskılayıcı bir etki oluşturabilir ve enfeksiyona sekonder bir katkı sağlayabilir. Ancak burada belirtilmesi gereken önemli bir nokta ileride tartışacağımız üzere lökosit sayısının tüm deneklerden alınan tüm kan örneklerinde değişen ısı derecelerine bağlı olarak anlamlı bir değişim göstermemesidir. Bu nedenle hızlı soğutmayla artan apoptotik lökosit ölümünün immun sistemi baskılayacak düzeyde olmadığını söyleyebiliriz.

Çalışmamızın diğer bir kısmını oluşturan farklı ısı derecelerinde tüm kan bileşenleri olan eritrosit, lökosit ve trombosit sayıları ile lökosit alt grupları oranlarının ve sayılarının karşılaştırılmasında ise deneklerin kan örneklerindeki bu değerlerin farklı ısı gruplarında anlamlı değişiklik göstermediği ortaya konmuştur. Bunun anlamı ‐hiperterminin yan etkilerinin hipertermi hangi şiddette olursa olsun kan bileşenleri sayısına ve oranına önemli bir etki yapmadığıdır‐.

Çalışmamızın son hedefi olan elde edilen verilerin kadın ve erkek cinsler arasında farklılık gösterip göstermeyeceği konusunun araştırılmasında elde edilen ‐farklı ısı dereceleri uygulanan gruplarda HSP değer değişimleri, kan bileşenleri

değişimleri ve apoptotik hücre sayısındaki değişimler kadın ve erkek cinsler arasında anlamlı bir farklılık göstermemektedir”. Bununla birlikte burada belirtilmesi gereken önemli bir nokta verilerden görüldüğü üzere kanda eritrosit, Hb ve hematokrit değerlerinin kadın ve erkek cinsler arasında anlamlı farklılık göstermesiydi. Ancak genel yapısal özellik olarak kadınlarda bu değerlerin erkeklere göre daha düşük olması, toplumda bu farklılığın belirgin olması, erkeklerin kendi grupları arasında ve kadınların kendi grupları arasında bu verilerinde anlamlı değişiklik olmaması nedeniyle bu veriler normal olarak kabul edilmiştir.

7. SONUÇ

Elde edilen verilere göre çalışmamızın sonuçlarını özetleyecek olursak;

- Progresif ısı artımının kan hücrelerinde HSP tamponunu aktive edecek kadar ciddi bir stres oluşturma durumu gözlenmemiştir.
- Hafif hipertermi kan hücrelerinde apoptozisi uyarıcı etki yapmamakta ancak yüksek ısılarda apoptotik yolları aktive etmektedir.
- Orta ve yüksek hipertermi durumundaki kan örneklerinin 37 °C'ye soğutulması beklenenin aksine apoptotik hücre ölümünün daha fazla artışına neden olmuştur. Bununla birlikte, hafif hipertermi uygulanan örneğin soğutulması beklendiği üzere apoptotik hücre sayısının azalması ile sonuçlanmıştır.
- Hiperterminin yan etkileri, hipertermi hangi şiddette olursa olsun kan bileşenleri sayısına ve oranına önemli bir etki yapmamaktadır.
- Farklı ısı dereceleri uygulanan gruplarda HSP değer değişimleri, kan bileşenleri değişimleri ve apoptotik hücre sayısındaki değişimler kadın ve erkek cinsler arasında anlamlı bir farklılık göstermemektedir.

Çalışmamızda kullanılan parametrelerin özgün olması yanında, spesifik ve beraberinde kontrollü teknikler nedeniyle elde edilen verilerin önem arz eder nitelikte olduğu düşünülmektedir. Ancak çalışmanın amacına yönelik daha kesin sonuçların elde edilebilmesi için daha geniş vaka gruplarının kullanıldığı, farklı ısı derecelerinin marjının daha fazla olduğu, farklı subgrupların oluşturulabildiği ve hatta hücre subgruplarının ayrı ayrı çalışılabildiği, flow sitometri gibi daha kantitatif sonuçların elde edilebileceği, yüksek teknolojilerle çalışmanın desteklenmesinin bilim dünyasına ve kliniğe önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Tosun M., Tosun E., Avunduk M.C., (2001) Hücre Çoğalma Belirleyicilerinin Önemi Ve Kullanım Alanları, *Hekimler Birliği Vakfı Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, **21**, 235-244.
2. Can A.(2006) Epitel In: Demir R. (ed) *Histoloji Ve Hücre Biyoloji* 0-323-01639-1 Ankara, Palme Yayınları.
3. Gartner L. P., Hlatt J. L. (2001) Blood and Hemopoiesis In: Gartner L. P., Hlatt J. L. *Color Textbook Of Histology* 0-7216-8806-3 Saunders.
4. Carola R., Harley J. P., Noback C. R. (1992) The Cardiovascular System Blood In: Carola R., Harley J. P., Noback C. R. (eds). *Human Anatomy Physiology* 0-07-112561-2 Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.
5. Ross M., H., Romrell L. J., Kaye G. I. (1995) Blood In: Ross M., H., Romrell L. J., Kaye G. I. *Histology A Text And Atlas* 0-683-07369-9 Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.
6. Erdoğan B.B., Uzaslan E. K., (2003) Apoptozis Mekanizmaları: Tümör Gelişiminde Fas-FasL Bağımlı Apoptozis, *Akciğer Arşivi*, **4**, 165-174.
7. Çalışkan M., (2000) Apoptosis: Programlanmış Hücre Ölümleri, *Türk J Zool*, **24**, 31-35.
8. Korsmeyer SJ. (1995) Regulators Of Cell Death, *Trend Genet*, **3**, 101-105.
9. Öktem S., Özhan M.H., Özol D., (2001) Apoptozisin Önemi, *Toraks Dergisi*, **2**, 91-95.
10. Hockenbery D.,(1995) Defining Apoptosis. *Am J Pathol*, **146**, 16.
11. Majno G. J.I, (1995) Apoptosis, Oncosis and Necrosis: An Overview Of Cell Death, *Am J Pathol*, **146**, 3-15.
12. Aral H., (1996) Apoptozis, *Sendrom Tıp Dergisi*, 33-37.
13. Leytin V., Freedman J., (2003) Platelet Apoptosis In Platelet Concentrates And Other Models, *Transfusion And Apheresis Science*, **28**, 285-295.
14. Fadeel B., Orrenius S., (2005) Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wide-Ranging Implications In Human Disease, *Journal Of Internal Medicine*, **258**, 479-517.

15. Turgut B., Demir T., Çeliker Ü., (2006) Oftalmolojide Apoptoz, *Firat Tıp Dergisi*, **11**, 1-5.
16. Gougeon L., (2002) Evaluation Of Apoptosis, *Journal Of Immunological Methods*, **265**, 1-2.
17. Ulukaya E., (2003) Apoptozis Ders Notları, Biyokimya Anabilim Dalı, 1-19. www.20.uludag.edu.tr/biokimya.
18. Cotran R.S., Kumar V, Collins T. (1999) Robbins Pathologic Basis Of Disease, Philadelphia: W. B.Saunders Company.
19. Öztürk F., (2002) Apoptoz, *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **9**, 143-148.
20. Kuan N.K.BS., Passaro E.J.,(1998) Apoptosis: Programmed Cell Death, *Archives Of Surgery* **7**, 773-775.
21. Reap E. A., Roof K., Maynor K. et al. (1997) Radiation And Stress-İnduced Apoptosis: A Role For Fas/Fas Ligand İnteractions, *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, **94**, 5750-5755.
22. Wu H. J., Chan W. H., (2006) Genistein Protects Methylglyoxal-İnduced Oxidative DNA Damage And Cell İnjury İn Human Mononuclear Cells, *Toxicology İn Vitro xxx(2000) xxx-xxx*.
23. Reed JC., (1994) Bcl-2 and The Regulation Of Programmed Cell Deat, *J Cell Biol*, **146**, 3.
24. Johnson S. I., McMichael M., White D., White G., (2006) Heat Stroke in Small Animal Medicine: A Clinical Practice Review, *Journal Of Veterinary Emergency And Critical Care*, **16**,112-119.
25. Poccia F., Pselli P., Vendetti S., Bach S., Amendola A., Placido R., Colizzi V., (1996) Heath Shock Protein Expression On The Membrane Of T Cells Undergoing Apoptosis, *Immunology*, **88**, 6-12.
26. Pelham H.(1998) Heat Shock Proteins Coming İn From The Cold. *Nature* 332-766.
27. Guzik K., Bzowska M., Dobrickı J., Pryjma J., (1999) Heat-Shock Monocytes Are Resistant To Staphylococcus Aureus-İnduced Apoptotic DNA fragmentation Due To Expression of HSP72, *İnfectin And Immunity*, **67**,8, 4216-4222.

28. Özden M. (1999) Hücre Fizyolojisi In: Özden M. *Fizyoloji* 430-38-24 Somgür Yayıncılık.
29. Junqueira L. C., Carneiro J.(2006) Sitoplazma In: Junqueira L. C., Carneiro J (eds).*Temel Histoloji*, 975-420-467-5 Nobel matbaacılık.
30. Aştı R.N.(1997) Kan Dokusu (In): Sağlam M., Aştı R. N., Özer A.(eds) *Genel Histoloji*, Yorum matbaacılık sanayi.
31. Şeftalioğlu A(1998) Kardiovasküler sistem In: Şeftalioğlu A. (ed), *Genel Ve Özel İnsan Embriyolojisi* 975-94823-1-2 Tıp Teknik Yayıncılık.
32. Sadler T. W., (2005) Üçüncü ve Sekizinci Haftalar Arası: Embriyonik Dönem In: Sadler T. W. (ed) *Langman Medikal Embriyoloji* 0-7817-4310-9 Ankara, Palme Yayıncılık.
33. Auerbach R., Huang H., Lu L., (1996) Hematopoietic Stem Cell in The Mouse Embryonic Yolk Sac, *Stem Cells*, **14**, 269-280.
34. Qu C-K., Yu W-M., Azzarelli B., et al (1998) Biased Suppression Of Hematopoiesis And Multiple Developmental Defects in Chimeric Mice Containing Shp-2 Mutant Cells, *Molecular And Cellular Biology*, **18**,10, 6075-6082.
35. Larsen W. J. (1993) Development of The Vasculature In: Larsen W. J. (ed) *Human Embryology*, 0-443-08724-5 Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.
36. Paker Ş., (1993) Kan In: Paker Ş. (ed) *Histoloji*, 975-7657-17-4, Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayınları.
37. Solomon E. P., (2000) Kan In: Solomon E. P.(ed) *İnsan Anatomisi Ve Fizyolojisine Giriş*,0-7216-3966-6 Birol Basın Yayın.
38. www.pennhealth.com/health_info/images/19432.jpg
39. Dorothy S.,Luciano, Arthur J. Vander, James H. Sherman (1994) Circulation In: Dorothy S.,Luciano, Arthur J. Vander, James H. Sherman (eds), *Human Physiology International Edition*, 0-07-066992-9. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.
40. Birol L., Akdemir N., Bedük T., (1997) Kan Lenf Nodu Hastalıkları ve Hemşirelik Bakımı (In): Birol L., Akdemir N., Bedük T. (eds) *İç Hastalıkları Hemşireliği*, 975-7078-14-X Vehbi Koç Vakfı Yayınları.

41. Junqueira L. C., Carneiro J.(2006) Kan Hücreleri In: Junqueira L. C., Carneiro J. (eds) *Temel Histoloji*, 975-420-467-5 Nobel matbaacılık.
42. Tüzün C. (1997) Amino asitler peptitler ve proteinler In: Tüzün C. (ed) *Biyokimya*, 975-7477-32-X, Palme Yayınları.
43. Johnson A. M., Rohlf E. M.,(2005) Proteinler In: Burtis C. A., Ashwood E. R.,(eds) *Klinik Kimyada Temel İlkeler* 0-7216-8634-6 Ankara Palme Yayıncılık.
44. Solomon E. P., (2000) Vücut Sıvıları ve Elektrolitler (In): Solomon E. P.(ed) *İnsan Anatomisi Ve Fizyolojisine Giriş*, 0-7216-3966-6 Birol Basın Yayın.
45. Bayık M., (2003) Kan, *Bilim Ve Teknik Dergisi*, 1-15.
46. Kansu E., (2006) Kök Hücre Biyolojisi Ve Plastisitesinde Güncel Kavramlar, *Ankem Dergisi*, **20**, 1-8.
47. Bakkaloğlu S., Tumer N., Ekim M., ve ark (1998) Kronik Böbrek Yetmezliğinde Anemi Ve Eritropoetin Kullanımı, *Türk Nefroloji Diyaliz Ve Transplantasyon Dergisi*, **2**, 54-58.
48. Vatansever S. (2006) Kan ve Hematopoez In: Demir R. (ed) *Histoloji Ve Hücre Biyoloji* 0-323-01639-1 Ankara, Palme Yayınları.
49. Tüzün C. (1997) Vitaminler ve Koenzimler In: Tüzün C. (ed) *Biyokimya*, 975-7477-32-X, Palme Yayınları.
50. <http://www.biosbcc.net/doohan/sample/images/blood%20cells/erythropoiesis.jpg>
51. Longmore G. D., Watowitch S.S., Hilton D. J., et al (1993) The Erythropoietin Receptor: Its Role İn Hematopoiesis And Myeloproliferative Diseases, *The Journal Of Cell Biology*, **123**, 6, 1305-1308.
52. Lehninger A.L.,(1982). Principles Of Biochemistry, *Worth Publishers*, Inc New York, 303.
53. Pençe S., Çiftçi M., Küfrevioğlu Ö.İ., (2000) İnsan Eritrosit Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Antibiyotiklerin İn Vitro Etkileri, *Genel Tıp Dergisi*,**10**, 4, 141-145.
54. Aslan D., (2006) Kan Biyokimyası (In): Onat T., Emerk K., Sözman Y. E., *İnsan Biyokimyası*, 975-8624-20-2, Palme Yayıncılık.
55. Knowles, W., Marchesi, S.L., Marchesi V.T., (1983) Spectrin: Sutstructure, Function, and Abnormalities, *Seminars in Hematology* **20**, 159.

56. Sheetz, M.P. (1983) Membrane Skeletal Dynamics: Role in Modulation of Red Cell Deformability, Mobility of Transmembrane Proteins and Shape, *Seminars in Hematology* **20**, 175.
57. Palek J, Lux S.E., (1983) Red cell membrane skeletal defects in hereditary and acquired hemolytic anemias, *Seminars in Hematology* **20**, 189.
58. [http://www.biosbcc.net/doohan/sample/images/blood cells/0281blood.jpg](http://www.biosbcc.net/doohan/sample/images/blood%20cells/0281blood.jpg)
59. Choi K.S., Park J.T., Dumler J.S., (2005) Anaplasma Phagocytophilum Delay Of Neutrophil Apoptosis Through The p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Pathway, *Infection And Immunity*, **73**,12, 8209-8218.
60. Cendoroglo M., Jaber B. L., Balakrishnan V. S., et al (1999) Neutrophil Apoptosis And Dysfunction İn Uremia, *Journal Of The American Society Of Nephrology*, **10**, 93-100.
61. Moulding D. A., Walter C., Hart C.A., Edwards S. W., (1999) Effects Of Staphylococcal Enterotoxins On Human Neutrophil Functions And Apoptosis, *Infection And Immunity*, **67**, 5, 2312-2318.
62. Junqueira L. C., Carneiro J.(2006) Bağışıklık Sistemi ve Lenfoid Organlar In: Junqueira L. C., Carneiro J. (eds) *Temel Histoloji*, 975-420-467-5 Nobel matbaacılık.
63. Özden M. (1999) Kan ve Dolaşım Fizyolojisi In: Özden M., *Fizyoloji* 430-38-24 Somgür Yayıncılık.
64. Koç Haluk (2000) Hemostaz In: Candan İ., Gögüş O., Duman M. (eds) *Klinik Bilimlere Giriş*. 975-7226-11-4 Antıp A. Ş. Yayınları.
65. Smith C., (2003) Hematopoietic Stem Cells And Hematopoiesis, *Cancer Control*, **10**, 1, 9-16.
66. Aglietta M., Bertolini F., Stella C. C., et al (1998). Ex Vivo Expansion Of Hematopoietic Cells And Their Clinical Use, *Haematologica*, **83**, 824-848.
67. Tenen D. G., (2003) Disruption Of Differentiation In Human Cancer: Aml Shows The Way, *Nature Publishing Group*, **3**, 89-101.
68. Junqueira L. C., Carneiro J.(2006) Hematopoez In: Junqueira L. C., Carneiro J., (eds) *Temel Histoloji*, 975-420-467-5 Nobel matbaacılık.
69. http://www.fhcrc.org/science/education/courses/cancer_course/basic/img/hematopoiesis.gif

70. <http://www.flaming.gr/Strouboulis/sh/strouboulis1.jpg>
71. Cairns J., (1975) Mutation Selection and the Natural History of cancer, *Nature*, **255**, 197-200.
72. Cohen JJ., (1993) Apoptosis, *Immunol Today*, **14**, 126-130.
73. Plunkett W.(1995) Apoptosis:The Story of Suicide in the Cell, *CBC Oxford* 5-27.
74. Jacobs W. B., Walsh G. S., Miller F. D., (2004) Neuronal Survival And p73/p63/p53:A Family Affair, *The Neuroscientist*, **10**, 443-455.
75. Oncor, (1998) The Complete Apop Tag Manual, *Edition 1*.
76. Pryde J. G., Walkers A., Rossi A. G., Hannah S., Haslett C., (2000) Temperature Dependent Arrest of Neutrophil Apoptosis, *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 33574-33584.
77. Moulin M., Arrigo A. P., (2006) Long Lasting Heat Shock Stimulation Of TRAIL Induced Apoptosis In Transformed T lymphocytes, *Experimental Cell Research*, **312** , 1765-1784.
78. Mevorach B. D., Mascarenhas J. O., Gershov D., Elkon K. B., (1998) Complement Dependent Clearance Of Apoptotic Cells By Human Macrophages, *J. Exp. Med.* **188**,12, 2313-2320.
79. Hettis S.W.(1998) Today or not Today, *Jama* **279**, 300-307.
80. Cotter T.G. (1995) Bcr-Abl:An Anti-apoptosis Gene in Chronic Myelogenous Leukemia, *Leukemia and Lymphoma*, **18**, 231-236.
81. <http://www.dkfz.de/en/phd-program/images/Krebsshelf.jpg>
82. Yonehara S., Ishii A I., Yonehara M,(1989) Acell Killing Monoclonal Antibody (anti fas) to a Cell Surface Antigen Co Downregulated With The Receptor of Tumor Necrosis Factor, *J Exp Med*, **169**, 1747-1756.
83. Orlinick J.R., Waishnaw A.K., Elkon K.B.(1999) Structure and Function of Fas/FasL Ligand. *Int Rev Immuno.* **18**, 293-308.
84. Moulin M., Dumontet C., Arrigo A. P., (2006) Sensitization Of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells To TRAIL-Induced Apoptosis By Hyperthermia, *Canser Letters xxx(2006)xxx-xxx*.
85. Renshaw S. A., Parmar J. S., Singleton V. et al (2003) Acceleration Of Human Neutrophil Apoptosis By TRAIL, *The Journal Of Immunology*, **170**, 1027-1033.
86. http://www.abthrax.com/products/TRAIL-R2_mAb.jpg

87. <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/C/Costimulation.gif>
88. Nicolai B. K., Savil J., Brown S. B., (1998) Constitutive Apoptosis In Human Neutrophils Requires Synergy between Calpains and Proteasome Downstream of Caspases, *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 30530- 30536.
89. http://www.weizmann.ac.il/home/ligivol/apoptosis_project/apoptosis.jpg
90. Mason P. (1999) Effects of Calcium Channel Blockers on Cellular Apoptosis, *Cancer*. **85**, 2093-2103.
91. <http://www.nature.com/jcbfm/journal/v25/n12/images/9600149f1.jpg>
92. <http://www.microbiologybytes.com/virology/kalmakoff/baculo/pics/Apoptosis.gif>
93. Zhou P., Streutker C., Brojevic R., Wang Y., Croitoru K., (2007) IL-10 Modulates Intestinal Damage And Epithelial Cell Apoptosis In T Cell-Mediated Enteropathy, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **287**, 599-604.
94. Hart S. P., Jackson C., Kremmel L. M., et al (2003) Specific Binding Of An Antigen-Antibody Complex To Apoptotic Human Neutrophils, *American Journal Of Pathology*, **162**,3, 1011-1018.
95. Woodle E.S., Kurkarni,S. (1998). Programmed Cell Death, *Transplantation*, **6**, 681-691.
96. Sungurluoğlu A. Erdemli, E.A., Tekelioğlu, M., (1996) Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz, *T. Klin. Tıp. Bilimleri*, **16**, 333-337.
97. Schagat T. L., Wofford J. A., Wright J. R., (2001) Surfactant Protein A Enhances Alveolar Macrophage Phagocytosis Of Apoptotic Neutrophils, *Journal Of Immunology*, **166**, 2727-2733.
98. Lucas M., Rose P. E., Morris A.G., (2000) Contrasting Effects Of HSP72 Expression On Apoptosis In Human Umbilical Vein Endothelial Cells And An Angiogenic Cell Line, ECV 304, *British Journal Of Haematology*, **110** , 957-964.
99. Brude O. P. B., Mesri M., Wall N. R., Plescia J., Dohi T., Altieri D. C., (2003) Therapeutic Targeting Of The Survivin Pathway In Cancer: Initiation Of Mitochondrial Apoptosis And Suppression Of Tumor-Associated Angiogenesis, *Clinical Cancer Research*, **9**, 2683-2692.

100. Walsh D., Li Z., Wu Y., Nagata K., (1997) Heat Shock And The Role of The HSPs During Neural Plate Induction In Early Mammalian CNS And Brain Development, *CMLS, Cellular And Molecular Life Sciences*, **53**, 198-211.
101. Lindquist S., (1986) The Heat Shock Response, *Annu. Rev. Biochem.*, **55**:1151
102. Stankiewicz A. R., Lachapelle G., Foo C. P. Z., Radicioni S. M., Mosser D. D., (2005) Hsp 70 Inhibits Heat-Induced Apoptosis Upstream Of Mitochondria By Preventing Bax Translocation, *The Journal Of Biological Chemistry*, **280**, 46, 38729-38739.
103. Ishiyama T., Koike M., Akimoto Y. et. al. (1996) Heat Shock –Enhanced T Cell Apoptosis With Heat Shock Protein 70 On T Cell Surface In Multicentric Castleman' s Disease, , *Clin Exp Immunol*, **106**, 351-356.
104. Suh Y. (2002) Cell Signaling in Aging and Apoptosis. *Mech Ageing Dev.*, **123**, 881-90.
105. Green DR., Kroemer G. (1998) The Central Executioners of Apoptosis Caspases or Mitochondria, *Trend in Cell Biology*, **7**, 267-271.
106. Green Dr. (2000) Apoptotic Pathways: Paper Wraps Stone Blunts Scissors, *Cell*, **102**: 1-4.
107. Chernykh E. I., Yazykov K. G., Semke V. Y., (2002) Apoptosis In Peripheral Blood Leukocytes Induced By Hyperthermia And Prednisolone In Patients With Dysadaptation, *General Pathology And Pathological Physiology*, **134**,6, 531-533.
108. Meinander A., Söderström T. S., Kaunisto A. (2007) Fever Like Hyperthermia Controls T Lymphocyte Persistence by Inducing Degradation of Cellular FLIPs. *The Journal Of Immunology* **178**, 3944-3953.
109. Huang Y. H., Haegerstrand A., Forestgard., (1996) Effects Of In Vitro Hyperthermia On Proliferative Responses And Lymphocyte Activity, *Clin Exp Immunol*, **103**, 61-66.
110. Brehmer M., Svensson I., (2000) Heat- Induced Apoptosis In Human Prostatic Stromal Cells, *BJU International*, **85**, 535-541.
111. Lin M., (1999) Pathogenesis of an Experimental Heatstroke Model, *Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology*, **26**, 826-827.

112. Dieing A., Ahlers O., Kerner T. et al., (2003) Whole Body Hyperthermia Induces Apoptosis In Subpopulations Of Blood Lymphocytes, *Immunobiol*, **207**, 265-273.
113. Potter A., Kim C., Gollahon K. A., Rabinovitch P S., (1999) Apoptotic Human Lymphocytes Have Diminished CD4 And CD8 Receptor Expression, *Cellular Immunology*, **193**, 36-47.
114. Sodja C., Brown D. L., Walker P. R., Chaly N., (1998) Splenic T Lymphocytes Die Preferentially During Heat-Induced Apoptosis: NuMa Reorganization As A Marker, *Journal Of Cell Science*, **111**, 2305-2313.
115. Muzino T., Kannan Y., Tokunago M., (2000) Role Of Hypothermia Induced By Tumor Necrosis Factor On Apoptosis And Function Of Inflammatory Neutrophils In Mice, *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, **278**, 157-165.
116. Fukuda A., Fukuda H., Jönsson M. et al., (2005) Progenitor cell injury after irradiation to the developing brain can be modulated by mild hypothermia or hyperthermia, *Journal Of Neurochemistry*, **94**, 1604-1619.
117. Storm FK, Moreton DL, Kaiser RL, et al., (1982) Clinical Radiofrequency Hyperthermia, *Natl Cancer Inst Monographs*, **671**, 343-50.
118. Urano M, Douple E, (1989) Hyperthermia and Oncology, *Biology of Thermal Potentiation of Radiotherapy*, VSP Utrecht, The Netherlands, **2**.
119. De Maio A (January 1999). "Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams". *Shock (Augusta, Ga.)* **11** (1): 1–12.
120. Wu C (1995). "Heat shock transcription factors: structure and regulation". *Annual review of cell and developmental biology* **11**: 441–69. doi:10.1146/annurev.cb.11.110195.002301.
121. Schlesinger, MJ (07/25/1990). "Heat shock proteins". *The Journal of Biological Chemistry* **265** (21): 12111–12114.
122. Nishikawa M, Takemoto S, Takakura Y (2008). "Heat shock protein derivatives for delivery of antigens to antigen presenting cells". *Int J Pharm* **354** (1-2):23–7.
123. Xu D, Zalmas LP, La Thangue NB (2008). "A transcription cofactor required for the heat-shock response". *EMBO Rep*. **9** (7): 662–9. doi:10.1038/embor.2008.70.