

124023

**BENZENİN HEMOPOİETİK DOKULAR ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İN VİVO İNCELENMESİ**

Cevat AKTAŞ
Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Ağustos-2003

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Cevat AKTAŞ 'ın Benzenin Hemopoietik Dokular Üzerine Etkilerinin İn Vivo İncelenmesi başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 27.08.2003 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

Üye (Tez Danışmanı): Yrd. Doç. Dr. Melih ZEYTİNOĞLU

Üye : Doç. Dr. Süleyman Aydın

Üye : Yrd. Doç. Dr. Berrin Ayaz Tüylü

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 03.09.2003 tarih ve 28/8 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Orhan ÖZER
Fen Bilimleri Enstitüsü
M ü d ü r ü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi BENZENİN HEMOPOİETİK DOKULAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VIVO İNCELENMESİ

CEVAT AKTAŞ
Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Melih Zeytinoğlu
2003, 71 sayfa

Günümüzde benzen dünyada en çok kullanılan kimyasal maddedir. Günlük yaşantımızda yaşam alanlarımızın tümünde benzene sürekli olarak maruz kalmaktayız. Benzenin hematotoksik ve karsinojenik özelliğinden dolayı her yıl çok sayıda insan kanser riski altına girmektedir. Bu olasılığın oluşmasında yaşantımıza kolaylık getiren ürünlerin, yapım ve tüketim safhalarında benzenin kullanılmasıdır. Bu sebeple çalışmamızın konusu benzenin hemotopoietik dokular üzerine etkilerinin araştırılması olmuştur. Bu amaçla 10 hafta süre ile 4 adet sıçana benzen intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Benzen 0,2 ml/kg olarak saf zeytinyağı içinde hazırlanmıştır, hazırlanan karışımdan 0,1 ml haftada 3 kez olmak üzere enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda 0,1 ml saf zeytinyağı ve 0,1 ml serum fizyolojik farklı 8 sıçana (4 sıçan serum fizyolojik için, 4 sıçan saf zeytinyağı için) 10 hafta süreyle, haftada 3 kez enjekte edilmiştir. 10 haftalık süre sonunda sıçanlar disekte edilerek alınan kan, dalak ve kemik iliğinden mikropreparatlar hazırlanarak incelemeye geçilmiş, thoma lamı kullanılarak kan sayımı da gerçekleştirilmiştir. Deney sonucunda eritropeni, lökopeni, aplastik anemi, splenik hiperplazi ve hipersplenizm gibi sonuçlar ortaya çıkmıştır.

Anahtar kelimeler: Benzen, dalak, kemik iliği, anemi, hematotoxicity.

ABSTRACT
Master of Science Thesis
IN VIVO INVESTIGATION OF BENZENE EFFECTS
ON HEMOPOIETIK TISSUES

CEVAT AKTAŞ

Anadolu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Program

Supervisor: Asst. Prof. Melih Zeytinoğlu

2003, 71 pages

Today, benzene is the most commonly used chemical. People are constantly exposed to benzene in every field in their daily lives. Many people are getting the risk of having cancer each year due to the hematotoxic and carcinogenic nature of it. The reason for this high risk is the fact that benzene is used in production and consumption of products making our lives easier. Therefore, the purpose of the study was to investigate the effects of benzene on hematopoietic tissues. For this purpose, 4 rats were injected benzene intraperitoneal for 10 weeks. 0,2 ml/kg benzene was prepared in olive oil . From this mixture, 0,1 ml was injected to the rats 3 times. At the same time 0,1 ml pure olive oil was injected and 0,1 ml serum was injected to the 8 (4 rats for serum and 4 rats for olive oil) different rats for 10 weeks 3 times a week. By the end of the 10 week duration, the rats were investigated with the preparation of micropreparations from blood, spleen and bone marrow which were dissected while doing this, thoma lame was used for blood counting. As a result of the study, such conclusions as eritropenia, lökopenia, aplastic anemia, splenic hiperplazia and hypersplenizm were made.

Keywords: Benzene, spleen, anemia, bone marrow, hematotoxicity.

TEŞEKKÜR

Bu alışmamın yurütulmesinde tez hocam Yrd.Do.Dr. Melih Zeytinoğlu'na yardımlarından ve önerilerinden dolayı teőekkürü bir borç bilirim. Çalışmam sırasında her konuda bana yardımcı olan her isteğime gülyüzü ve yardımseverliği ile cevap veren Yrd.Doç.Dr. Ayőe Tansu Koparal'a teşekkür ederim. Ayrıca laboratuvar çalışmaları sırasında öneri ve yardımlarını gördüğüm Yrd.Doç.Dr. Berrin Tüylü'ye, Araő.Gör. Emel Ergene, Araő.Gör. R. Sulhi Özkütük ve arkadaşlarım H.Emre Özbek, Evrim İpek, Gülbin Kambur'a teşekkür ederim.

Eğitimimi sürdürememi sağlayan benden yardım ve desteklerini esirgemeyen aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL GİLGİLER	3
2.1 Hemopoitik Dokular	3
2.1.1 Dalak	3
2.1.1.1 Anatomik Yapı	3
2.1.1.2 Histolojik Yapı	4
2.1.1.2.1 Stroma	4
2.1.1.2.2 Parankima (Dalak Pulpası)	4
2.1.1.2.2.1 Beyaz Pulpa	5
2.1.1.2.2.2 Kırmızı Pulpa	5
2.1.1.3 Kan Dolaşımı	6
2.1.1.4 Fonksiyonları	7
2.1.1.4.1 Kan Yapımı (Hemopoiez)	7
2.1.1.4.2 Eritrosit Yıkımı Ve Kanın Filtrasyonu	8
2.1.1.4.3 Savunma	8
2.1.1.4.4 Kan Depolama	9
2.1.1.4.5 Trombosit Depolama	9
2.1.2 Kemik İliği	9
2.1.2.1 Stroma	10
2.1.2.2 Kan Damarları	11
2.1.2.3 Serbest Hücreler	11

2.1.2.4 Kemik iliğinin Fonksiyonları.....	12
2.1.2.4.1 Kırmızı İliğin Fonksiyonları...	12
2.1.2.4.2 Sarı İliğin Fonksiyonları.....	12
2.2 Kan Yapımı (Hemopoiez).....	12
2.2.1 Prenatal Hemopoiez.....	13
2.2.2 Postnatal hemopoiez.....	14
2.2.3 Hemopoieze İlişkin Kuramlar.....	14
2.2.4 Kan Hücrelerinin Gelişimi	14
2.2.4.1 Hemositoblast (Stem Cell)	14
2.2.4.2 Eritropoiez	15
2.2.4.3 Granülopoiez	17
2.2.4.4 Lenfopoiez	18
2.2.4.5 Monopoiez	19
2.2.4.6 Trombopoiez	19
2.2.4.7 Hemopoiezin Kontrol Edilmesi.....	20
2.3 Benzen.....	22
2.3.1 Benzenin Yapısı Ve Genel Özellikleri.....	22
2.3.2 Benzenin Metabolizması.....	24
3. MATERYAL VE METOD.....	26
3.1 Deney Hayvanları.....	26
3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	26
3.3 Kullanılan Malzemeler.....	26
3.4 Deney hayvanlarına Uygulanan Benzenin Hazırlanması.....	27
3.5 Kimyasal Maddeleri Uygulanma Süreç Ve Yöntemi.....	27
3.6 Diseksiyon Ve Doku Örneklerinin Alınması.....	28
3.6.1 Diseksiyon.....	28
3.6.2 Doku Örneklerinin Alınması.....	29
3.6.2.1 Kan Örneklerinin Alınması.....	29
3.6.2.2 Dalak Örneklerinin Alınması.....	29
3.6.2.3 Kemik İliği Örneklerinin Alınması.....	30
3.7 Mikropreparatların Hazırlanması.....	30
3.7.1 Kemik iliği Preparatlarının Hazırlanması.....	30

3.7.2 Kan Preparatlarının Hazırlanması.....	33
3.7.3 Dalak Preparatlarının Hazırlanması.....	34
3.7.3.1 Doku Takibi.....	34
3.7.3.2 Kesit Alma.....	36
3.7.3.3 Boyama.....	36
3.8 Mikroskopi Ve Mikrofotografî.....	38
4. BULGULAR.....	39
4.1 Kan Dokusu.....	39
4.1.1 Periferik Kan Parametreleri.....	39
4.1.1.1 Serum Fizyolojik Uygulanmış	
1.gruba Ait Kan Parametreleri.....	39
4.1.1.2 Saf Zeytinyağı Uygulanmış	
2.gruba Ait Kan Parametreleri.....	41
4.1.1.3 Benzen+Saf Zeytinyağı Uygulanmış	
3.gruba Ait Kan Parametreleri.....	50
4.1.2 Eritrosit Hücrelerinin Morfolojileri.....	48
4.2 Myeloid Doku (Kemik İliği).....	51
4.2.1 Serum Fizyolojik Ve Saf Zeytinyağı Uygulanmış	
1. Ve 2.gruba Ait Myeloid Dokuları.....	51
4.2.2 Benzen+Saf Zeytinyağı Uygulanmış 3.gruba Ait	
Myeloid Dokuları.....	51
4.3 Dalak Dokusu.....	53
4.3.1 Serum Fizyolojik Ve Saf Zeytinyağı Uygulanmış 1.	
Ve 2.gruba Ait Dalak Dokuları.....	54
4.3.2 Benzen+Saf zeytinyağı Uygulanmış 3.gruba Ait	
Dalak Dokuları.....	55
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	61
6. KAYNAKLAR.....	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. Benzenin halkasal yapısı	23
4.1. Serum fizyolojik uygulanmış gruba ait kan sayımlarını gösteren grafik	43
4.2. Saf zeytinyağı uygulanmış gruba ait kan sayımlarını gösteren grafik	43
4.3. Benzen+saf zeytinyağı uygulanmış gruba ait kan sayımlarını gösteren grafik	46
4.4. Eritrosit hücrelerinin genel morfolojileri	50
4.5. Kemik iliği yayma preparatlarından elde edilen görüntüler	53
4.6. Serum fizyolojik ve saf zeytinyağı uygulanmış dalakların görüntüleri	57
4.7. Benzen+saf zeytinyağı uygulanmış hayvanların dalak görüntüleri	58
4.8. Benzen+saf zeytinyağı uygulanmış hayvanların dalak görüntüleri	59
4.9. Benzen+saf zeytinyağı uygulanmış 4.deney hayvanına ait dalak görüntüleri	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

3.1.	Deney düzeneği	28
3.2.	Bouin fiksatifin hazırlanması	30
3.3.	%5'lik Giemsa boyasının hazırlanması	31
3.4.	Tampon A'nın hazırlanması	31
3.5.	Tampon B'nin hazırlanması	32
3.6.	PBS (Phosphate Buffer Saline) hazırlanması	32
3.7.	Giemsa boyasının hazırlanması	33
3.8.	Alkollü Eosinin hazırlanması	36
4.1.	Serum Fizyolojik uygulanmış 1.gruba ait kan parametre değerleri	40
4.2.	Saf Zeytinyağı uygulanmış 2.gruba ait kan parametre değerleri	42
4.3.	Benzen+Saf zeytinyağı uygulanmış 3.gruba ait kan parametre değerleri	45
4.4.	Tüm deney hayvanlarına ait kan parametrelerinin karşılaştırmalı değerleri	47
4.5.	Deneyde kullanılan hayvanlara ait dalak ağırlıkları	54

1. GİRİŞ

Benzen, çevremizde yaygın olarak bulunabilen aynı zamanda her alanda kullanılan bir hidrokarbon türevidir. Bu kimyasal madde, doğal ve insan eliyle olmak üzere iki yoldan da çevreye yayılmaktadır. Doğal olarak organik bileşiklerden meydana gelen benzen (Petrol bunlardan biridir) %1-4 ve deniz suyunda doğal petrol tortularında ve doğal gazların içinde de bulunabilir, 0,8 mg/lt) [1-9]. Endüstride önemli bir çözücü olarak da kullanılan benzen, benzin ve sigara dumanının da dahi bulunmaktadır [1-5].

Benzen sanayide; boya, tutkal, reçineler için çözücü olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle endüstriyel alanlarda çalışan insanların çalışma ortamlarında, özellikle benzenin buharlaşma özelliği nedeniyle havada çok yoğundur, bu nedenden dolayı benzene direk maruz kalırlar. Benzene yüksek oranda ve sürekli maruz kalma sonucu insanlarda karsinojenik ve hematotoksik bulgular gelişir [1-5].

İnsan eli ile çevreye benzen en çok araba eksozları aracılığı ile yayılmaktadır. Atmosferdeki benzen seviyesinin artmasında sigara dumanları, çeşitli yangınlar ve baca dumanları, önemli rol oynar [9]. Benzenin işlenmesi ile çevre kirliliği ortaya çıkmaktadır [2]. İnsanların benzene maruz kaldığı başlıca yollar ise kısaca şunlardır; özellikle trafiğin yoğun olduğu bölgelerde, petrol istasyonlarının çevrelerinde (dağıtım ve depolama bölgeleri) ve sigara dumanına maruz kalan aktif ve pasif içici gruplar [9]. Ayrıca endüstri alanlarının dışında ev, okul ve iş ortamına kadar hayatımızın tüm alanlarında yüksek oranlarda benzen bulunmaktadır. Sigara dumanı, temizlik maddeleri, sıvı deterjanlar, mobilya yenilenmesinde ve tahta ahşaplarda kullanılan vernikte, kullandığımız boyalar aracılığı ile benzene maruz kalınmaktadır [2].

Benzene maruz kalma sık olarak solunum yoluyla olmaktadır. Benzen ayrıca deriden de absorbe edilebilir. Ayrıca çok azda olsa oral yolla da benzene maruz kalınabilir. Solunum yoluyla alınan benzenin %40-50'si akciğerlerde tutunur kalan kısmı ise tekrar solunum yolu ile dışarı atılır. Geri kalan kısmı ise dokularda özellikle kemik iliğinde depo edilmektedir [6].

Benzene yüksek oranda maruz kalan insanlarda eritroit lösemi, non-Hodking lenfoma, myeloma ve myeloblastik lösemi olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca kan hücreleri sayısında değişiklikler, kromozom anomalileri, kemik iliğinde hasarlar, aplastik anemi ve lösemiye yol açmaktadır [7,8].

Günümüzde insan sağlığı üzerine olan bu etkileri nedeniyle bu çalışmamızda benzeni, deney hayvanları kullanarak intraperitoneal enjeksiyon yoluyla hemopoietik dokular, dalak ve kemik iliği üzerine etkilerini incelemeye çalıştık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HEMOPOİETİK DOKULAR

Kan hücreleri bölünerek çoğalmadıkları ve kısa ömürlü oldukları için sürekli azalan ve zarar görmüş hücrelerin yenilenmesi gerekmektedir. Kan hücrelerinin yapım olayına HEMOPOESİS, yapıldığı dokulara HEMOPOİETİK DOKU'lar denmektedir. Yüksek omurgalılarda kan hücreleri kemik iliği, dalak, lenf düğümleri ve timüs bezi gibi yapılarda gelişmektedir [22, 25].

2.1.1 DALAK

2.1.1.1 Anatomik Yapı

Mesogastrium dorsale içerisinde meydana gelmiş olan bu organın hemen her tarafı peritoneumla sarılı durumdadır. Yeri sol hypochondr bölgesinde diaphragma kubbesinin altına sokulmuş, midenin arka yüzünün fundus tarafında, sol böbrek ve böbrek üstü bezinin üstünde yer almaktadır [10-14].

Dalağın büyüklüğü, hayatın çeşitli dönemlerinde, farklı kişilerde ve aynı kişide farklı kondisyonlarda farklılık gösterdiği bilinmektedir. Erişkinlerde 12 cm uzunluğunda 7-8 cm genişliğinde ve 3-4 cm kalınlığında olan dalağın ağırlığı 1. yılda 17 gr veya daha az, 20 yaşında ise 170 gr kadardır. Bu yaştan sonra gittikçe azalarak 70-80 yaşında 122 gr'a iner. Erkeklerde biraz daha ağırdır. Erişkinlerde dalağın ağırlığı normalde 100-250 gr arasında olması gerekirken, bazen 50-400 gr arasında da olabilmektedir. Sindirimden sonra dalağın hacmi artar, yine vücudun beslenme durumuna göre dalağın büyüklüğü değişmektedir. Canlılarda koyu kırmızı renkte kadavrada ise morumsu kirli kahverengindedir [6, 10-14].

Diafragma yüzü (facies diafragmatic), mide yüzü (facies gastrica), böbrek yüzü (facies renalis) olmak üzere üç yüzü vardır. Diafragma yüzü: Diafragma ile komşu olan ve dışa bakan yüzüdür. Aynı zamanda diafragma ile plevra ve

akciğerlerle, 9-10 ve 11. kaburga ve kaburga aralıkları ile komşuluk gösterir. Böbrek yüzü: Sol böbrek ve sol böbrek üstü ile komşu olup dalağın iç-arka kısmıdır. Mide yüzü: Pankreas kuyruğu ve mide fundusunun arka ve dış kısmı ile komşu olup, dalağın iç-ön kısmıdır. Bu yüzde, iç kenara yakın olmak üzere içerisinde dalak damar ve sinirlerinin geçtiği (hilus linealis) dalak göbeği bulunur [10, 11].

2.1.1.2 Histolojik Yapı

Dalak sıkı bağ dokusundan yapıli bir kapsülle sarılı olup, kapsülden içeri giren bağ dokusu bölmeleri (trabekülalar) parankimayı yada dalak pulpasını eşit olmayan bölmelere ayırırlar [10-12, 16, 17].

2.1.1.2.1 Stroma

Dalak, periton altında her yanında fibröz bir kapsüle ile sarılıdır. Kapsüle organa damarların girip çıktığı hilus bölgesinde daha kalındır. Kapsüladan daha derine doğru dallanıp anostomozlaşan uzantılar veya trabekülalar, sıkı bağ dokusundan ve düz kas hücrelerinden yapılmıştır. Burada fibrositler ve kollojen demetler arasında zengin elastik ağlar yayılırlar. Bunlar trabekülalarda daha boldur. Düz kas hücrelerinin miktarı türe göre önemli farklılıklar gösterirler. İnsanlarda, mevcut olan düz kas hücreleri ve zengin elastik ağlar sayesinde, kontraktıl ve elastik bir organdır, hacmini değiştirebilir [10-12, 15-17].

2.1.1.2.2 Parankima (Dalak Pulpası)

Tespit edilmemiş taze dalağın kesit yüzeyinde beyaz noktalar şeklinde dağılımş bölgeler görülür. Bu bölgeler, lenf folikülleridir. Dalağın beyaz pulpasının bir bölümünü oluştururlar. Lenf foliküllerinin içine yataklandığı parankima ise kırmızı pulpa adını alır. Bu bölge koyu kırmızı renkli, kanla dolu bir lenfosit dokudur. Mikroskop altında, kırmızı pulpanın dalak kordonları (Billroth kordonları) denilen, uzun lenfosit doku bölgeleri ile bunların arasına

yerleşmiş sinuzoidlerden oluştuğu görülür. Sinuzoid duvarı , pencereleli yassı endotel hücreleri ile döşenmiştir. Böylece sinuzoid içindeki kırmızı pulpayla kolayca ilişki kurar [11, 18, 19].

2.1.1.2.2.1 Beyaz Pulpa

Beyaz pulpa B ve T-Lenfositleri içermektedir. B-hücre alanları, sekonder foliküllerde bulunan **germinal merkez** ve **marjinal bölge** den oluşmuştur. B-lenfositleri içeren bu bölgelerin özgül retikulum hücreleri foliküller dendritik hücreler (FDH; Follicular dendritic cell-FDC) dir. Germinal merkez, en dışta orta-boy lenfositler içeren marjinal bölge, içte ise **manto bölgesi** yada **korona** olarak adlandırılan küçük lenfositlerden oluşmuş bir halka ile çevrelenmiştir. Manto ve marjinal bölge lenfositleri yapısal ve immünofenotipik olarak farklılıklar gösterir. Manto bölgesi lenfositleri IgD pozitif ve alkalın fosfataz negatiftir, oysa marjinal bölge lenfositleri bunun tersini gösterir.

Sıçan dalağının ışık mikroskopik incelemelerinde, manto ve marjinal bölgeler kolaylıkla görülebilen **marjinal sinüs** tarafından ayrılmıştır. Marjinal sinüs, antijen ve lenfositlerin giriş alanı olarak dalak immün fonksiyonunda temel bir rol oynar. Bu sinüs insanda ışık mikroskobunda ayırt edilemez.

Marjinal bölge , beyaz pulpa ile kırmızı pulpa arasında, sinüslerin (marjinal sinüsler) bol bulunduğu gevşek lenfosit doku olarak bilinir. Burada bol miktarda aktif makrofaj ve az sayıda lenfosit (T ve B-lenfosit) bulunur. Ayrıca, plazma hücresi ve interdijitasyon yapan dendritik hücrede içerir. Kan kökenli antijenlerin yoğunlaştığı bu bölge dalağın immünolojik aktivitesinde önemli bir role sahiptir [17-23].

2.1.1.2.2.2 Kırmızı Pulpa

Dalağın %75'i kırmızı pulpadan yapılmıştır. Kırmızı pulpa venöz sinüsler (sinuzoidler) arasında dalak kordonları denilen, özel türde bir retiküler dokudan oluşur. Sinüs oranı kırmızı pulpanın yaklaşık olarak %30'u kadardır. Dalak sinuzoidleri uzun eksenleri sinuzoidin uzun eksenine koşut olarak yerleşik endotel

hücreleriyle döşelidir. Karaciğer sinuzoidlerinde olduğu gibi, endotel hücreleri arasına makrofajlar yerleşmiştir. Venöz sinüsler, bazal membranın retiküler iplikçikleri ile dıştan çevrenip desteklenmiştir. Bu iplikçikler, pulpa kordonları boyunca ilerleyerek retiküler bir ağ oluştururlar. Sinüsler, dalak kordonları içine kör uçlu soğana benzer uzantılar verirler.

Kırmızı pulpanın genelde yalnızca filtrasyon işlevi olduğu belirtilir. Ancak, filtrasyon yapmayan alanlarında olduğu saptanmıştır. Kesitlerde, kırmızı pulpa dokusunun kapiller sonlanmalar yada özellikle kapiller içermediği gözlenmektedir. Seri kesitlerde, bu alanlar yalnızca sinüslerde çevrenmiştir. T ve B lenfositler az miktardadır. Ayrıca, mononükleer fagositlerde bulunmaktadır. Filtrasyonla ilgili olmayan bu alanlar, dalağın lenfosit kompartımanının bir parçası olarak kabul edilmektedir. Kan hücreleri, bu alanlara yalnızca kırmızı pulpa dokusunun geniş alanlarını geçerek yada sinüs endotelinden ulaşır. Lenfositlerin sinüs lümeninden dalak dokusuna geri gelişini sağlayan dalağı için bilinmektedir. Bu bölge, beyaz pulpada marjinal sinüs olarak adlandırılan duvarlar boyunca lenfositlerin göç ettikleri yerdir. Bu tip sinüsler insan dalağının beyaz pulpasında yoktur. Sığıncı sinuzoidal dolaşım ve dalak lenfosit kompartımanları arasında lenfositlerin değişiminde marjinal sinüs tarafından oynanan rolün, insanlarda kırmızı pulpa sinüslerinin soğan biçimindeki ve yüksek endotelli venül özelliği gösteren uzantıları tarafından oynandığı düşünülmektedir [17-23].

2.1.1.3 Kan Dolaşımı

Hilus'dan organa giren splenik arter, dallanarak bağ dokusu bölmelerinde seyreden trabeküler arterleri oluştururlar. Trabeküler arterler bağ dokusunu terkedip lenfosit parankimaya girdiklerinde sentral arter yada pulpa arteri olarak adlandırılan damarın çevresi, lenfosit dokudan oluşmuş bir kılıfla sarılır. Buna, **periarteriyel lenfatik kılıf** (PALS-periarterial lymphatic sheets) denir.

Periarteriyel lenfatik kılıf, beyaz pulpanın damar çevresindeki seyri boyunca yer yer lenfatik foliküller oluştururlar. Sentral arter deyimini kullanılmakla

birlikte folikül içindeki arter çoğunlukla periferik bir yerleşim gösterir. Sentral arter seyri boyunca, lenfatik kılıfı besleyen uç dallar verir.

Beyaz pulpayı terkeden sentral arter dış çapı yaklaşık 24 mm olan düz arteriyolleri (penisillar arteriyol) oluşturur. Bazı penisillar arteriyoller sonlanmalarına yakın, retiküler hücreler, lenfosit hücreler ve makrofajlardan oluşan bir kılıfla çevrelenirler. Kılıfla çevrelenmiş penisillar arteriyoller (kabuklu arteriyol- sheated arteriyol) kanı kırmızı pulpa sinüslerine ya da sinuzoidlere taşıyan kapiller /terminal arteriyol kapiller) olarak devam ederler.

Kırmızı pulpanın sinüslerine doğru olan kan akımının ne şekilde olduğu henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bazı araştırmacılar kapillerin doğrudan sinuzoidlere açıldığını savunurlarken; diğerleri kanın önce kırmızı pulpa yayılıp, süzülerek sinuzoidlere ulaştığını ileri sürmektedirler. Birinci görüş kapalı dolaşım olarak bilinir. Yani kan daima damarların içinde seyreder. İkinci görüş açık dolaşım savunur. Bu görüşe göre kan önce kırmızı pulpa hücreleri arasından süzülerek venöz sinüslere döner. Hayvanlarda yapılan kinetik çalışmalar ve insan dalağında gerçekleştirilen perfüzyon çalışmaları her iki tür dolaşımında geçerli olduğunu ortaya koymuştur [17-24].

2.1.1.4 Fonksiyonları

2.1.1.4.1 Kan Yapımı (Hemopoezis)

Lenfosit beyaz pulpada yapılır. Yapılan lenfositler, kırmızı pulpa göç ederek venöz sinüs lümenine ulaşırlar ve böylece kan dolaşımına katılırlar. Lenfositin dalak parankimasından ters yönlü akımında söz konusudur. Kana işaretlenmiş lenfositlerin verilmesinden sonra çoğunun beyaz pulpada bulunduğu gösterilmiştir.

Monosit, kırmızı pulpa içinde hemositoblasttan farklılaşır.

Fötal dalak, granülositleri ve eritrositleride üretir. Fakat bu aktivite doğumdan önce sona erer. Erginde, normalde yalnızca lenfosit ve monosit yapılmaktadır. Bazı patolojik durumlarda (lösemi gibi) ergin dalak, kemik iliğine

benzer görünüm kazanır; yapısında miyelositler, eritroblastlar ve megakaryositler görülür [10, 12, 17, 22].

2.1.1.4.2 Eritrosit Yıkımı Ve Kanın Filtrasyonu

Eritrositler 120 günlük yaşam süreleri sonunda başlıca dalakta yıkılırlar. Dejenere eritrositlerin atılması kemik iliğinde de olmaktadır [10, 12, 17, 22, 24].

Kırmızı pulpa kordonlarındaki makrofajlar eritrositleri fagosite ederek, lizozomik aktivite ile sindirirler. Hemoglobinin parçalanma ürünleri, Bilürubin (demirsiz pigment) ve ferritin (demirli protein) dir. Demir geçici olarak retiküler hücrelerde depolanırlar, daha sonra kana verilir. Bilürubin karaciğer hücreleri tarafından safra içine verilir. Ferritin mobil bir demir bileşimidir, kemik iliğinde eritrosit yapımında yararlanır. Demiri ayrılarak tekrar hemoglobin sentezinde kullanılır. Böylece dalak bir demir deposu görevi yapmaktadır [22,24].

2.1.1.4.3 Savunma

Dalak; makrofajlar, T ve B-lenfositler bulunduğu vücut savunmasında rol alan bir organdır. Kandaki antijenlere karşı ilk yanıt dalak tarafından verilir [10, 12, 17, 24].

Uygun antijenik uyarma sonucu B-lenfosit çoğalır, antikor yapan plazma hücrelerine dönüşür. 4-5 gün sonra periarterial lenfatik kılıfta çok sayıda plazma hücresi görülür. Kandaki antijene karşı dalak yanıt olarak antikor düzeyini yükseltmektedir. Bunun belirtisi olarak da sentrum germinativumlarda değişiklik görülür; lenfoblast ve makrofaj sayısı artar. Ancak diğer lenfatik dokularda ve kemik iliğinde antikor yapıldıkça buradaki yapım azalır. Antijen verilmişinden 2 hafta sonra sentrum germinativumlar dışında dalak normal yapısına döner. Aynı antijene karşı ikinci yanıt hemen sentrum germinativumlar tarafından verilir.

Organizmanın diğer makrofajlarına kıyasla dalak makrofajları canlı ve hareketsiz partiküllere karşı en aktif fagositozu gösterirler [10, 12, 17, 24].

2.1.1.4.4 Kan Depolama

Kırmızı pulpa süngerimsi yapıda olduğundan, dalak kan deposudur. Yapılarındaki kasların kasılması ile kan tekrar dolaşıma verilmektedir. Ancak insanlarda trabeküla ve kapsüldeki düz kas miktarı az olduğundan hayvanlardaki önemli bir boşalma söz konusu değildir. Organizmadaki toplam eritrositin ancak %2-4 kadarı depolanır [10, 12, 17, 24].

2.1.1.4.5 Trombosit Depolama

Normal dalakta dolaşım kanındaki trombosit sayısının 1/3'ü bulunur. Özellikle sinozoidlerde toplanmışlardır.

2.1.2 KEMİK İLİĞİ

Kemik iliği uzun kemiklerin ortasındaki silindirik boşluklarda, omurların, kaburgaların, sternum'un (göğüs kemiği), kafatasının yassı kemikleri ile pelvis'in (leğen kemiği) süngerimsi kemiklerinin trabeküla denen ağsı boşluklarında bulunur. Vücut ağırlığının %4-6'sını oluşturur [22, 25-28].

Kemik iliğinin iki çeşidi vardır. Bunlar:

1. Kırmızı Kemik İliği: Aktif olarak kan hücrelerinin üretiminden sorumlu olanı, kırmızı kemik iliğidir ve bu esas iliği temsil eder. Doku kırmızı rengini, içerdiği eritrositlerden alır.
2. Sarı Kemik İliği: Kan hücrelerinin üretimi bakımından inaktiftir. Dokunun baskın yapısal unsuru, ünilocüler yağ hücreleridir. Bu hücrelerin içerdiği karoten, dokunun sarı rengini verir

Kırmızı kemik iliği yapısında, tek tek ve dağınık konumlu yağ hücrelerini içerir.

Sarı kemik iliğinin vücuttaki miktarı ve dağılımı, bireyin yaşı, kan hücrelerine olan gereksinim ve neonatal evrelerde canlılığın türüne göre değişiklik gösterir. Geç fetal ve neonatal evrelerde, bütün kemikler aktif kırmızı ilik içerirler. İnsan dahil iri gövdeli iri hayvanlarda, yaşın ilerlemesi ile, sarı ilik

kırmızı iliğin yerini alır. Olay, ilkin uzun kemiklerin diafizlerinde daha başlar. Erginlerde, ekstremitte kemiklerinin diafiz iliği, tamamen sarı iliktir. Kırmızı ilik, uzun kemiklerin epifizlerinde, kaburgalarda, göğüs kemiğinde, omurlarda, pelvis kemiklerinde ve kafa kemiklerinde bulunur. Küçük cüsseli hayvanlarda, sarı ilik çok yaygın olarak bulunmaz. Ancak yağ hücreleri, aktif kırmızı iliğin içinde dağınık olarak bulunurlar. Bu grup hayvanlarda, sarı kemik iliği total iliğin %10'unu, insanda ise %50'sini oluşturur [22, 25-28].

Kan hücrelerini üretme özelliği olmamasına rağmen, sarı kemik iliği, gerektiğinde kırmızı iliğe dönüşür. Deneysel yolla anemi oluşturulan köpeklerde, sarı kemik iliği, 48 saatte kırmızı kemik iliğine dönüşür. Şu halde, sarı kemik iliği vücudun kana ihtiyacı olduğu durumlarda, kan hücrelerini üretecek olan kırmızı kemik iliği verecek yedek bir doku olarak fonksiyon yapar. Sarı kemik iliğinin az bulunduğu hayvanlarda kana ihtiyaç olduğunda dalak, karaciğer ve lenf düğümlerinde kan hücrelerinin üretimi olur.

Kemik iliğinde yapılan kan üretimine medullar hemopoiez, kemik iliğinden başka yerlerdeki kan yapımına ekstramedullar hemopoiez denir. İnsanda ekstramedullar hemopoiez, ancak bazı patolojik durumlarda meydana gelir [22, 25-28].

2.1.2.1 Stroma

Yapısal olarak kemik iliği, içerdiği fibril çeşidine bağlı olarak retiküler bağ dokusunu temsil eder. Doku, esas olarak retiküler fibrillerden oluşur. Hücreler ve fibrillerin oluşturduğu destek görevi olan ağ şeklindeki iskeletin gözeneklerinde, çeşitli tip kan hücreleri, bunların öncül hücreleri, yağ hücreleri ve mast hücreleri yerleşmişlerdir. Retiküler hücreler, retiküler fibrilleri üretmekle görevlidirler. Retiküler hücreler soluk renkte boyanan bir nükleusa ve çok sayıda dallanmış, retiküler fibriller boyunca uzayan sitoplazmik çıkıntılara sahiptirler [22, 25-28].

2.1.2.2 Kan Damarları

Kemik iliğinin damarlanması kemik dokusunun besleyici atardamarından kaynaklanır. Damar dallanmaları, kemik içinde ilerlerken kemik iliği içinde kılcal damarlar ve ince damarlı sinuzoidler oluşmaya başlar. Kemik iliğindeki sinuzoidlerin çapı 50-75 mikrometre kadardır. Sinuzoidleri iç yüzeylerini döşeyen endotelin altına yerleşmiş olan retiküler hücreler ve retiküler fibrillerin oluşturduğu ağ şeklindeki bir örtü destekler. Hemopoitik hücrelerin biraraya gelerek oluşturdukları gruplar, sinuzoidler arasında yer alırlar. Eritrositler, sinuzoidlere yakın küçük adacıklarda gelişirler. Gelişmelerinin erken evrelerindeki hücreler, adacığın merkezinde, olgunları çevrelerinde yer alırlar. Plateletlerin öncü hücreleri, megakaryositler, hemen sinuzoidlerin duvarlarına değecek konumdadırlar. Gelişmekte olan granülositlerin oluşturdukları hücre kümecikleride, sinuzoidlere yakın bulunurlar.

Gelişen kan hücreleri, sinuzoid duvarını aşarak dolaşıma katılırlar. Kan hücrelerinin sinuzoidlere geçişini çeşitli faktörler kontrol eder. Bunlar bazı kan proteinleri ile glukokortikoidler, androgenler gibi steroid hormonlar ve bazı bakteri toksinleridir [22, 25-28].

2.1.2.3 Serbest Hücreler

Çoğunlukla gruplar halinde bulunurlar. Her grup, bir tip hücrenin değişik gelişim evrelerindeki hücrelerinden oluşur. Ayrıca tek tek dağılmış yağ hücrelerinin bulunuşu karakteristiktir. Hemopoeiesis kemik iliğinin periferinde daha aktiftir. Merkezi kısmında büyük damarların çevresinde, bu nedenle daha ziyade yağ hücreleri çoğunluktadır [22].

Lenfoid dokuda tek tip hücre (lenfosit) bulunmaktadır. Myeloid dokuda da değişik tip hücreler yer alır. Bunlar;

1. Matür (olgun) Hücreler:
 - Çekirdeksiz eritrosit,
 - Granülositler; Nötrofil, Eosonofil, Bazofil Lökositler.
2. İmmatür (olgunlaşmamış) Myeloid Hücreler

- Hemositoblast (Serbest Stem Cell),
- Eritrositer seri hücreler,
- Granülositler; Myelositer seri hücreleri,
- Megakaryosit [22].

2.1.2.4 Kemik İliğinin Fonksiyonları

2.1.2.4.1 Kırmızı Kemik İliğinin Fonksiyonları

1. Kan hücrelerinin yapımı,
2. Eritrositlerin yıkımı ve yıkım sonucu açığa çıkan demirin depolanması,

Demir, ferritin ve hemosiderin şeklinde retiküler hücre ve makrofajların sitoplazmasında depolanır. Kemik iliği dışında karaciğer hücrelerinde, çizgili kas fibrillerinde ve dalak makrofajlarında da demir depolanmaktadır.

3. İndefferensiye T ve B-lenfosit yapımı,

Lenfoid organları radyasyonla zedelenen hayvanlara kemik iliği inokulasyonu yapılmasından sonra lenfosit yapımının görülmesi ile lenfosit prekürsörlerinin, kemik iliğinden geldiğini göstermek olasıdır. Genel olarak, kemik iliğinde lenfosit yapımı yalnızca sentral organlar zedelenince görülür [22].

2.1.2.4.2 Sarı Kemik İliğinin Fonksiyonları

1. Depo organıdır; yağdan zengindir.
2. Yedek hemopoietik dokudur. Aşırı kanama, fazla eritrosit yıkımı gibi durumlarda kan yapımına başlar [22].

2.2 KAN YAPIMI

Memelilerde kan hücreleri doğumöncesi ve doğumsonrası farklı dokularda oluşur. Doğumöncesi kan yapımına **fötal (prenatal) hemopoiez**,

doğumsonrası kan yapımına ise **postnatal hemopoiez** denir. Doğumöncesi kan yapımında sırasıyla mezenşim, karaciğer, dalak ve kemik iliği işlev görürken, doğum sonrası kan yapımı sadece kemik iliğinde gerçekleşir. Lenf hücrelerinin üretimi ise lenfatik dokularda (dalak, lenf düğümü ve timus) olur [26].

Kanın yetişkin bir insandaki 5,5 lt kadardır. %55'i plazma, %45'i şekilli elemanlardır. Serumun plazmadan farkı kanın pıhtılaşmasına sebep olan maddelerin bulunmamasıdır (fibrinojen).

Plazmanın %90'ı su, %7'si protein, %3'ü de karbonhidrat ve lipittir. (protein; Albumin, Globülin, Fibrinojen). Kan önemli bir taşıyıcıdır. Bu yüzden plazmada artık maddeler, tuzlar, hormonlar ve iyonlar da mevcuttur [27].

Kanın %55'i plazmadır. Kanın şekilli elemanları kan hücreleridir. Bunlar:

1. Alyuvarlar; Eritrositler
2. Akyuvarlar; Lökositler
 - Granülositler (Polifonükleer); Nötrofil, Eozinofil, Bazofil
 - Agranülositler (mononükleer); Lenfosit, Monosit
3. Kan Pulcukları; Trombositler [27].

2.2.1 Prenatal Hemopoiez

İki haftalık insan embriyosunda kan oluşumu, ilk önce vücut sapının mezenşiminde ve vitellüs kesesinin duvarlarında meydana gelir. Mezenşimal hücreler bu bölgelerde yuvarlak gruplar (kan adacıkları) oluşturur. Halka şeklinde düzenlenen hücre damarı, halkanın içinde kalan hücreler ise oluştururlar. Buna hemopoiezin **mezoblastik evresi** denir.

Gebeliğin altıncı haftasında karaciğer doğumsonrası eritroblastları andıran alyuvar öncüllerini üretmeye başlar. Bu safhaya hemopoiezin **hepatik evresi** denir. İkinci ayda karaciğer sinuzoidlerinde az sayıda granüler lökositler ve magakaryositler görülmeye başlar. Bir müddet sonra da bu görevi dalak üstlenir.

Dördüncü ayda, kemiğin kıkırdaktan oluşan modelindeki kondrositlerin programlı hücre ölümleri ile oluşturdukları boşluklara kan damarları girer. Kan damarlarıyla birlikte buraya gelen mezenşimal hücreler, kemiği oluşturacak olan osteoblastlara ve kemik iliğinin stromasını yapacak olan retiküler hücrelere

farklılaşırlar. Kıkırdağımsı iskeletteki kemikleşme merkezlerinin belirmelerini takiben, ilkin kemik iliğinde kan oluşumu başlar. Bunada hemopoiezin **miyeloit evresi** denir [26].

2.2.2 Postnatal Hemopoiez

Ergin memeli hayvanlarda, hemopoiez esas olarak kemik iliğinde meydana gelir. Kan hücrelerinden eritrositler, trombositler, granülosit lökositler ve monositler kemik iliğindeki gelişirler. Lenfositlerin çoğu da kemik iliğinde üretilir. Ancak bunlar daha sonra gelişmelerinin devamı için sekonder olarak, lenfatik dokulara geçerler [25].

Dalak ve karaciğer erişkinlerde normal olarak kan üretmez; ancak kemik iliği işlevinin bozulduğu hastalıklarda yeniden kan yapmaya başlar ki buna kemik iliği dışında kan yapımı (ekstramedüller hemopoiez) denir [26].

2.2.3 Hemopoiesise İlişkin Kuramlar

- **Uniterian Görüş;** Tüm kan hücreleri tek bir STEM-CELL'den gelişir. Bu hücreye HEMOSİTOBLAST denmektedir.
- **Dualistik Görüş;** Lenfoid ve myeloid elemanlar için 2 ayrı stem-cell bulunur (lenfoblast ve myeloblast).
- **Trialistik Görüş;** Her tip kan hücresinin geliştiği ayrı bir stem-cell vardır [22].

2.2.4 Kan Hücrelerinin Gelişimi (Hemopoiez)

2.2.4.1 Hemositoblast (Stem Cell)

Hem kemik iliği ve hem de lenfoid organlarda bulunur. Uniterian görüşe göre farklılaşarak hem myeloid hem de lenfoid elemanları oluşturabilen ana hücredir. Yeni hemositoblastlar varolan hemositoblastların mitozu ile

oluşabildikleri gibi, pirimitif retikulum hücrelerinin farklılaşmasıyla gelişebilmektedir [22].

Olgun kan hücrelerinin değişik tiplerine farklılaşma özelliğine sahipse o zaman bunlara **pluripotent hemopoietik kök hücre, PHSC**, (çok potansiyelli kan hücresi üretebilen kök hücre) denir. Hemositoblast (PHSC) onbin kan hücresinin bulunduğu yerde ancak 2-3 tanedir. PHSC çok yavaş bölünerek diğer hücre tiplerini oluşturacak olan unipotent ikincil kök hücreleri yapar. Koloni oluşturan unipotent kök hücreler çok hızlı bölünme kapasitesine sahiptir [26].

Unipotent kök hücreler şunlardır:

- **CFU-E**; Eritrosit kolonisi oluşturan kök hücre,
- **CFU-MEG**; Megakaryosit kolonisi oluşturacak kök hücre,
- **CFU-GM**; Nötrofil lökosit ve monosit oluşturacak kök hücre,
- **CFU-EOS**; Eozinofil lökosit oluşturacak kök hücre,
- **CFU-BAS**; Bazofil lökosit oluşturacak kök hücre [26].

2.2.4.2 Eritropoiez

Eritrositik hücrelerin farklılaşma ve olgunlaşma evresinde; proeritroblast, bazofilik eritroblast, polikromatofilik eritroblast, normoblast (ortokromatik eritrosit), retikülosit ve eritrosit hücreleri görülür.

- **Proeritroblast (Pronormoblast)**

Hemositoblastın farklılaşması ile oluşan proeritroblast, prekürsör hücrelerin en büyüğüdür (14-20 mikron çapındadır). Protein sentezi yapan hücrenin karakteristik tüm elemanlarını içerir (Hemoglobin serbest ribozomlarda sentezlenir). Ribozomdan zengin olduğundan hemositoblasttan daha bazofil boyanır. Nükleus büyük (hücre hacminin %80'ini kaplar) sferik ve sentrik yerleşimlidir. Eukromatik nükleus 1-2 büyük nükleolus taşır. Proeritroblastlar hızla çoğaldıklarından, sitoplazma hacmini artırıcı protein sentezi gereklidir. Demir plazmada proteine bağlıdır (transferrin). Eritroblast membranında transferrin reseptörleri bulunur. Bağlanmadan sonra endositozis ile transferin sitoplazmaya geçer. Hemoglobin (protein) sentezi başlamış olmasına karşın, koyu

bazofilik sitoplazma içinde seçilebilecek miktarda hemoglobin bulunmaz. Ancak özel yöntemlerle (mikrospektrofotometri) hemoglobini göstermek mümkündür. Proeritroblast birkaç bölünmeden sonra bazofilik eritroblastlara farklılanır [22, 25-27, 29].

- **Bazofilik Eritroblast (Bazofilik Normoblast)**

Proeritroblastlardan biraz daha küçüktür. Kromatin yoğunlaştığından (heterokromatin) ve nukleoluslar küçülmeye başladığından, nukleolus seçilemez. Nukleus hücrenin 3/4'ünü kaplar. Hücre ve çekirdek şekli yuvarlaktır. Sitoplazma daha koyu bazofiliktir (bol ribozom taşır), iyi gelişmiş golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondri bulunur. Hemoglobin yapımı devam etse de bazofilik sitoplazma içinde maskelenmiştir. Birkaç kez mitotik bölünmeden sonra polikromatofil eritroblastta farklılaşırlar [22, 25-27, 29].

- **Polikromatofilik Eritroblast (Normoblast)**

Sitoplazmadaki asidofilik hemoglobin boyanabilecek miktara ulaşmıştır. Sitoplazma bazofilisine hemoglobin asidofilisi eklenince sitoplazmanın rengi grimsi pembeye döner. Bazofilik eritroblasttan daha küçüktür (genel kurala göre hücrelerin çapları giderek küçülür). Çekirdekte küçülmektedir. Hücre hacminin 1/2'sini kaplar. Kromatin daha da yoğunlaştığından dama tahtası görünümü alır. Sitoplazmik organeller azalmıştır. Mitozla çoğalır, bazı polikromatofilik eritroblastlar normoblast yaparken, bazılarıda ileride kullanılmak üzere yedek hücreler olarak kalırlar [22, 25-27, 29].

- **Normoblast (Ortokromatik eritroblast)**

Olgun eritrosittekiye yakın miktarda hemoglobin taşır. Sitoplazma asidofiliktir, hala ribozom bulunduğundan bazofilik izlere rastlanır. Hücre çapı ve çekirdeği polikromatofil eritroblasttan daha küçüktür, kromatin de buna bağlı olarak daha yoğundur. Çekirdek sitoplazmanın 1/4 kadarını kaplar, eksentrikleşir. Mitokondri ve golgi kompleksi çok küçülmüş, dejenere olmaya başlamıştır. 3 mitotik bölünmeden sonra, bölünme durur. Çekirdek piknotik olmaya başlar, daha sonra de sitoplazmadan atılır. Çekirdek çevresinde hemoglobin içeren ince bir

sitoplazma tabakası bulunur. Atılan çekirdeği kemik iliği makrofajları fagosite eder. Kapiller çevresindeki eritroblastik adalar makrofajlarla yakın komşuluktadır. Bu nedenle kemik iliğinde kusurlu eritrositleri yada atılan çekirdeği içine almış makrofaj çok sayıdadır. Nadiren küçük nukleus parçaları sitoplazmada koyu boyanan cisimler, Howell-Jolly Cisimcikleri şeklinde kalabilir [22, 25-27, 29].

- **Retikülosit (İmmatür Eritrosit)**

Çekirdeğini kaybetmiş en genç eritrosittir. Sitoplazmasında supravital boyalarla (krezil mavisi, nötral kırmızısı) kolayca gösterilebilen mavi boyalı (RNA'ya bağlı) ince bir ağ yapısı görüldüğünden retikülosit adı verilmiştir. Olgunlaşma sırasında tüm poliribozomlar kaybolmuş, ancak sitoplazmada az sayıda serbest ribozom dağınık olarak kalmıştır. Olgun eritrositlere oranla yaklaşık %20 kadarlık eksik hemoglobin açığı ribozomlarca kapatılır. Ancak nukleus kaybolduğundan, yeni poliribozom yapılamaz hemoglobin sentezi kısa bir süre sonra durur. Kan dolaşımı içinde retikülositin olgunlaşma zamanı 24-28 saattir, total yaşam süresi de 72 saattir. Retikülosit eritrositten biraz daha büyük çaptadır (9 mikron kadar). Normal olarak periferik kanda retikülosit sayısı eritrosit sayısının %1'inden daha azdır [22, 25-27, 29].

2.2.4.3 Granülopoiez

Diğer kan hücrelerinde olduğu gibi, granülositlerde çok potansiyelli kök hücreden oluşur. Bu hücrelerin, yüksek derecede kendilerini yenileyip diğer hücre tiplerini oluşturacak birimleri yapabilme özelliği vardır. CFU-GM (Granülosit-Monosit Kolonisi oluşturan birim) bu kök hücreden türer. CFU-GM'den nötrofil lökosit serisinin ilk tanımlanabilen hücresi olan **miyeloblastlar** oluşur. Miyeloblastlar üç veya daha fazla çekirdekçik içeren büyük çekirdekli nispeten küçük hücrelerdir. Kemik iliğindeki çekirdekli hücrelerin ortalama %12'sini oluştururlar. Miyeloblast farklılaşmasında çekirdek ön planda dikkati çeker. Sitoplazma bazofilik; ancak granülsüzdür. Daha ileri gelişmelerde hücre büyür ve küçük metakromatik azorofil granüller oluşmaya başlar. Bu hücrelere **promiyelosit** denir. Bu evreden sonra miyelosit evresine geçilir. Miyelositler, promiyelositlerden daha küçük olmaları ve kromatinlerinin daha yoğun

olmalarıyla ayırt edilirler. Sitoplazmalarında ikinci bir tip granül oluşmaya başlar. Bir sonraki evrede oluşan **metamiyositler** çekirdeklerinin şekli ile ayırdedilebilirler. Çekirdekteki şekil değişikliği devam eder ve bir müddet sonra ince uzun, düz veya hafif kıvrımlı bir çekirdek oluşur. Bu özellik yüzünden oluşan lökositlere **bant-form lökositler** denir. Son olgunlaşma evresinde çekirdek iyice kıvrılarak çok loblu hale gelir. Loblar ince kromatin iplikçikleri ile birbirlerine tutunur. Çoğunlukla olgun lökositler kemik iliğinden dolaşıma salınır; ancak enfeksiyon durumlarında bant-form ve hatta metamiyositler bile dolaşıma katılırlar. Eozinofil lökositler CFU-EOS'tan, bazofil lökositler ise CFU-BAS'tan oluşan miyeloblastların ileri farklılaşması ile meydana gelirler [22, 25-27, 29].

2.2.4.4 Lenfopoiez

Oluşum yerlerine göre **T** ve **B** lenfosit olmak üzere iki tip lenfosit vardır. Bu şekilde isimlendirilme nedeni T lenfositlerin timus kökenli, B lenfositlerin ise kemik iliği (bone marrow) kökenli olmalarıdır.

Lenfosit oluşturacak kök hücre, kemik iliğindeki hemositoblasttan kök alır. T lenfosit olacakların kök hücresi kemik iliğini terkederek kan yoluyla timusun korteksine gelir, burada çoğalır. Karakteristik yüzey belirleyicileri oluşuktan sonra, farklılaşıp organın medullasına geçer. Buradan kan yoluyla dalağa gider. Dalakta biraz daha olgunlaştıktan sonra yeniden kana geçip, uzun ömürlü T lenfositleri oluştururlar.

B lenfositlerin kök hücrede kemik iliğinde sürekli bölünerek olgunlaşmamış B lenfositleri ve NK (Doğal öldürücü hücreler) hücrelerini meydana getirir. B lenfositlerin gelişimi kemik iliğindeki stroma hücreleri ile ilişkilidir. Stroma hücrelerinin sitoplazmik uzantıları gelişmekte olan lenfositlere değer hatta onların etrafını sarar. Stroma hücreleri B lenfositlerin farklılaşmasını teşvik eden, bağışıklık sistemi hormonlarından interlökin-7 denen sitokini salgılar. Bu hormonun etkisi ile olgunlaşan B lenfositler ve NK hücreleri dolaşıma girip çevre dokulara göç eder. B lenfositlerin çoğu lenf düğümlerine, dalağa ve diğer lenfatik dokulara giderken, NK hücreleri tüm vücut boyunca dağılıp çevre dokularda vücut için yabancı hücreleri arar [22, 25-27, 29].

2.2.4.5 Monopoiez

Monositler, lenfositlerden farklı olarak sadece kemik iliğinde yapılır. Yapılan çalışmalar monosit-makrofaj hücre dizinin granülositlerle aynı kök hücreyi (Granülosit/monosit-makrofaj kolonisi oluşturan birim, CFU-GM) paylaştıklarını ortaya koymuştur. Bu unipotent ikincil kök hücreden önce **monoblastlar** meydana gelir. Monoblastların bölünmesiyle **promonositler** oluşur. Promonositler 15-20 mikrometre çaplarıyla, monoblastlardan biraz daha iri hücrelerdir. Azurofil granüller promonositlerde belirmeye başlar. Kemik iliğindeki promonositlerin yaklaşık yarısı hızlı bir şekilde bölünüp küçülerek, çoğalma kapasitesini kaybeden **monositlere** farklılaşırlar. Geri kalanlar ise doku makrofajlarına acilen ihtiyaç olduğunda, aktivite edilebilecek özellikte bir hücre deposu oluştururlar. Kök hücreden monosite dönüşme zamanı yaklaşık olarak 55 saat kadardır. Monositler dokulara göç etmeden önce 36 saat kadar dolaşımda kalırlar. Dokulardaki makrofaj ihtiyacı kandan sürekli monosit akımıyla gerçekleştirilir [22, 25-27, 29].

2.2.4.6 Trombopoiez

Erginde trombositler, kırmızı kemik iliğinde olgun megakaryosit sitoplazmasının parçalanması ile oluşur. Megakaryositler megakaryoblasttan farklılaşır.

Megakaryoblast;

Hemositoblasttan türeyen, 15-20 mikron çapındaki hücrelerdir. Hemositoblasttan çekirdeğinin özellikleri ile ayrılır: Nükleus büyük, çoğu at nalı şeklinde ve periferik yoğun heterokromatin bulunmakta, sitoplazması homojen ve çok bazofiliktir (serbest ribozomdan zengin). Megakaryosit, megakaryoblast çekirdeğinde en az 5-6 kez mitoz olduğu halde, sitoplazmanın bölünmemesi ve yeni çekirdeklerin kaynaşarak (kromozom sayısı 32N-64N olabilir) büyük loblu karakteristik megakaryosit çekirdeğini yapması ile gelişir.

Megakaryosit;

35-150 mikron çapta, düzensiz lobuler nukleuslu, nukleusu yoğun kromatinli, nukleoluslu seçilemeyen dev hücrelerdir. Sitoplazma büyük ve az bazofiliktir. Çok sayıda azürofilik granül taşır. Bu granüller trombositlerin kromomerlerini yapar. Sitoplazma serbest ribozomdan zengindir, az sayıda agranüler ve granüllü endoplazmik retikulum bulunur. Periferik sitoplazmasında granül ve diğer organeller yer almaz. Megakaryositin olgunlaşması ile birlikte, golgi kompleksinde sentezlenen azürofilik granüller tüm sitoplazmaya dağılır. Aynı zamanda agranüler ER aşırı gelişerek, sitoplazmayı küçük kompartımanlara ayırır (Demarkasyon Kanalları). Bu ayırıcı membranlar megakaryosit hücre membranına kadar uzanır. Kaynaşarak trombosit membranlarını oluştururlar ve trombosit kitleleri membranla kuşatılı dar aralıklar boyunca ilerleyerek hücre dışına atılırlar. Megakaryoblasttan, trombosit yapımı başlayana kadarki süre insanda yaklaşık 10 gündür. Megakaryosit erginde kemik iliğinde bulunur. Embriyoner evrede ise kan yapıcı diğer organlarda da (karaciğer, dalak) görülür [22, 25-27, 29].

2.2.4.7 Hemopoiezin Kontrol Edilmesi

Hemopoiezin düzenlenmesinde iki önemli faktör vardır. Bunlardan birisi hemopoietik çevre diğeri ise humoral kontroldur.

Hemopoietik çevre; Her ne kadar kök hücreler kan yoluyla tüm vücuda dağılabiliyorsa da, hücrelerin çoğalabilmesi için uygun olan doku ve organlar hemopoiez içinde uygun bir mikroçevre yaratırlar. Mikroçevre koşullarının değişikliği hemopoiezin olduğu organlarında değişmesine neden olur. Örneğin; kan fetal dönemde sırasıyla vitellüs kesesi, karaciğer ve dalak daha sonra da kemik iliği olmak üzere değişik yerlerde yapılır [26].

Kemik iliği ile yapılan çalışmalarda mikroçevrenin etkisi belirgin bir şekilde görülmüştür. Kemik iliği kültürlerinde granüositler, endotel hücreler, retiküler hücreler, yağ hücreleri ve makrofajlar ürer. Burada granülopoiezin gerçekleşebilmesi için ortamda mutlaka yağ hücrelerinin bulunması

gerekmektedir. Farklılaşan granülositlerin, yağ hücreleri ve retiküler hücrelerin uzantılarıyla çok yakın ilişkilerde buldukları tespit edilmiştir [26].

Humoral kontrol; Protein sentezi için gerekli olan aminoasitlerin, demirin, B12, B6 ve folik asit gibi vitaminlerin yeterli miktarlarda alınması durumunda eritropoiez, normal olarak miyeloit dokuda (kemik iliğinde) gerçekleşir. Bu maddelerin alınması engellenirse, eritrosit oluşturacak kök hücrelerin bölünmesi gerçekleşmez. Eritropoiez, eritropoietin ile doğrudan; tiroksin, androjenler ve büyüme hormonu gibi bir kaç hormonla dolaylı olarak uyarılır. Estrojen hormonları eritropoiez üzerine engelleyici etki yaparlar [26].

Eritropoiezi uyarıcı hormon (EPO) ya da başka bir deyişle eritropoietin, özellikle böbrek ve çevre dokular düşük oksijen konsantrasyonuyla (hipoksiya) karşı karşıya kaldığında plazmada görünen bir glikoproteindir. Ortamdaki uzun süren oksijen azlığında böbreklerden bu hormon salgılanır. Hormon kan yoluyla kemik iliğine taşınır. Burada iki önemli işlevi yerine getirir:

1. Eritroblastları oluşturan kök hücrelerin ve eritroblastların bölünme hızlarını artırır,
2. Özellikle hemoglobin sentez hızını artırarak, alyuvarların olgunlaşmasını hızlandırır.

Yapıldıkça miktarı artan eritrositler, eritropoietin salınımını engeller. Böylece kontrol sağlanmış olur [26].

Demir miktarı humorol kontrolde önem taşır. Kan yapımı için gerekli demir miktarı varsa kan yapılır, yoksa demir eksikliğinden kaynaklanan hastalıklar ortaya çıkar. Vücutta demir, ferritin şeklinde sınırlı miktarda bulunur. Demir, plazmada transferrin ile taşınır. Transferrin hemoglobin sentezini yapacak eritropoietik hücre yüzeyindeki özel transferrin reseptörleri tarafından tutulur. Uygun demir miktarı, kemik iliğinin eritropoietik uyarıya yanıtını sınırlayabilir [26].

Bir başka faktörde ortamda bakteri bulunmasıdır. Bakterilerin endotoksinleri nötrofil lökosit yapımını uyarıcı maddelerdir.

B12 vitamini kan hücrelerinin yapımında DNA sentezi için gereklidir. DNA sentezi için ayrıca folik asitte gereklidir.

Timus bezi tarafından üretilen timozinler olgunlaşmadan önce T hücrelerinin farklılaşmasını ve devamlılığını sağlar. Ergin bireylerde T ve B lenfositlerin üretimi antijenlerle (yabancı proteinler, hücreler veya toksinler) karşı karşı kalmayla düzenlenir. Organizmaya yabancı antijen girdiği zaman lenfosit üretiminde artar [26].

Diğer lökosit hücre popülasyonlarının düzenlenmesinde Koloni Uyarıcı Faktörler (CSF “ Colony-Stimulating Factors”) ve interlökin 3 (IL3) denilen bazı hormonlar görev alır. Bunların eritrositlerin oluşumunu da uyardığı saptanmıştır:

- **M-CSF**, Makrofajlardan, endotelden ve fibroblastlardan salgılanır. Monosit/makrofaj hattında aktiviteyi uyarır.
- **G-CSF**, Makrofajlardan, endotelden ve fibroblastlardan salgılanır. Granülositlerin üretimini uyarır. Genetik olarak üretilen G-CSF formları kanser kemoterapisindeki hastalarda nötrofil üretimini uyarmak için kullanılmaktadır.
- **GM-CSF**, Aktif T lenfositlerden, endotelden ve fibroblastlardan salgılanır. Hem granülositlerin hemde monositlerin üretimini uyarır.
- **Multi-CSF**, Aktif T lenfositlerden salgılanır. Granülositlerin, monositlerin, megakaryositlerin ve eritrositlerin üretimini hızlandırır.
- **İnterlökin 3 (IL3)**, T lenfositlerden salgılanır. Bütün miyeloid hücrelerin üretimini uyarır.

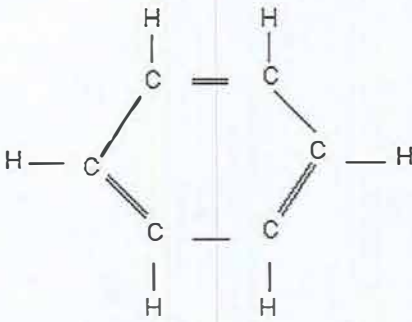
2.2 BENZEN

2.2.1 Benzenin Yapısı Ve Özellikleri

Benzen, benzol, kendine has keskin kokulu, renksiz, sudan hafif, kolay parlayabilen bir aromatik hidrokarbondur. Sudan hafif havadan yaklaşık 3 kat daha ağırdır. Yanıcı, parlayıcı, çok uçucu ve iyi bir eritcidir. Kaynama noktası 80,1 °C ve buharlaşma basıncı 100 mmHg dir. Bu özelliklerinden dolayı benzen çok uçucudur [30, 31].

Benzen ilk defa Faraday tarafından 1825 yılında yağ gazının kompresyonu ile meydana gelen sıvıdan ve daha sonra Hoffmann tarafından 1848 yılında kömür katranından elde edilmiştir. Mitscherlich, benzoik asidi kalsiyum oksit ile ısıtarak benzeni elde etmiş ve molekül formülünün C_6H_6 şeklinde olduğunu bulmuştur. Benzenin yapısını tayin eden bilgin ise Kekule'dir. Ancak yapısının doğruluğunun en sağlam isbatı Willstaetter tarafından yapılan sentez ile olmuştur [31].

Benzen molekülünün şekli düzgün bir altıgen olup karbon atomları arasındaki açılar herbiri 120° dir. Benzen halkasında üç tane tek ve üç tane çift bağ vardır, ortalama C-Carası bağ uzunluğu $1,39A^\circ$ dur [9, 31].



Şekil 2.1: Benzenin halkasal yapısı

Benzen alkol, kloroform, eter, aseton, glasiyal asetik asit, karbon disulfid ve karbon-tetraklorid gibi organik çözücülerde çok kolay çözünür. Özellikle kauçuk, lastik, reçine yağlı maddeler, ilaçlar, boyalar ve bazı plastikleri çok iyi eritir [9, 30, 31].

Benzenden elde edilen kimyasal maddelerin en önemlileri şunlardır:

Etilenbenzen ve styrene (styrol vinyl benzen); En çok üretilen kimyasal maddelerden biri olup çeşitli plastik ve lastik ürünlerin üretiminde kullanılır. Örneğin izolasyon malzemeleri, telefon ve radyo çerçeveleri, sert kablolar, plastik borular, otomobil lastikleri ve çeşitli ev aletleri.

Fenol ve cumene; Birçok maddenin başlangıç elemanı olan fenol, fenolik reçineler, naylon ve bazı plastiklerin yapımında kullanılır. Alkil fenolleri kimya ve ilaç sanayisinde de kullanılmaktadır.

Sikloheksan; Tekstil ürünlerinde ve plastik üretiminde esas maddedir.

Maleik anhidrid; Doymamış bir dibazik asittir ve plastik maddeler ile besinlere eklenen maddelerin elde edilmesinde kullanılır. Maleik hidrazid de tarımda kullanılan kimyasal maddelerin yapımında rol oynar.

Nitrobenzen ve metadiintrobenzen; Bu maddenin önemi, anilinin başlangıç elemanı olmasıdır. Anilin, lastik ve lastik ürünleri ile boya ve ilaç endüstrisinde kullanılır.

Alkil benzen (dodesil benzen); Bunların %90'ı deterjanların üretimi için kullanılır. Bu maddeler uzun süre değişmeden kalabilirler. Bu maddeler ayrıca insektisit (DDT), ilaç ve patlayıcı yapımında kullanılır [21].

Benzen benzin içinde total olarak %10'lara varan oranda bulunur. Ayrıca benzen çeşitli boyalara inceltici olarak karıştırılmakta, tiner ismi altında çeşitli işyerlerinde ve evlerde temizleyici olarak kullanılmaktadır. Benzenin kullanıldığı alanlar; ayakkabı ve deri yapımı, ilaç sanayi, basımevleri, boyahanaeler, boya vernik sanayi, kuru temizleyiciler vs. Benzen dünyada kullanım alanı en geniş olan kimyasal maddedir. Bu sebeple mesleki nedenlerle ve çevre kirliliği nedeni ile toplumun her kesiminin benzenden etkilenmesi büyük ölçüde söz konusudur [9, 30].

2.2.2 Benzenin metabolizması

Benzen sindirim sistemi, deri ve solunum yoluyla vücuda alınır. Sindirim sistemi ve deri yoluyla alınacak miktarlar organizmada önemli seviyelere ulaşamaz [9, 30-32].

Endüstride yetersiz veya yanlış havalandırılan iş yerlerinde, uçucu özelliği yüksek olan benzenin organizmaya başlıca giriş yolu solunum yoludur. Absorbe edilen benzenin hemen hepsi solunum yoluyla ile gerçekleşir. Solunum yoluyla alınan benzenin yaklaşık olarak %40'ı değişmemiş olarak yine solunum yoluyla geri verilir. Ancak bu oran yapılan iş ve çalışma şartlarına bağlı olarak %15-60 oranında değişir. Vücuda alınan benzen hızla kana karışır ve lipoproteinlerle dokulara iletilir. Kana karışan benzenin yaklaşık olarak %30'u dokularda özellikle başta kemik iliği olmak üzere lipoid dokularda toplanır. Kemik iliğinde kandan 20

kez daha fazla benzen toplanmasının nedeni, kemik iliğinin daha çok yağ ihtiva etmesi ve benzenin yağlı dokulardan atılımının uzamasıdır [9, 30-32].

Kişiden kişiye ve maruz kalma süresine göre benzenin %15-60 kadari organizmada özellikle başlıca dönüşüm yeri olan karaciğerde metabolize edilir. Burada nükleer oksidasyonla yıkılır veya detoksifiye edilir. Oksidasyonda ilk olarak benzen Arilhidrokarbon hidroksilaz enzimi (AHH) ile benzen epoksida dönüştürülür. Benzen epoksidin büyük bir kısmı kendiliğinden benzenin majör metaboliti olan fenole dönüşür. Ancak bu olay hepatik sitokrom P-450 enzim sistemine ihtiyaç gösterir. Benzen epoksidin geri kalan kısmı, epoxid hidraz enzimi ile benzen glikole çevrilir. Benzen glikolde dehidrogenazlar ile benzenin sekonder metaboliti olan katekole dönüşür. Karaciğerde oluşan bu oksidasyon aşamasından sonra fenol ve diğer oksidasyon ürünleri yine karaciğerde fenilsülfirikasit ve fenilglukronikasit meydana getirirler. Bu asitler alkale tuzlar halinde idrar ile dışarı atılırlar. Ayrıca fenolün az bir kısmı ileri oksidasyonla hidrokinaona çevrilirki buda konjuge olarak elimine olur. Oluşan katekolün çoğu konjugasyona uğrayarak dışarı atılırken az bir kısmında oksidasyonla hidroksihidrokinol'e dönüşür. Yan bir yol olarak glikolün oksidasyonu ile az miktarda trans-trans mukonik asit oluşur. İkinci bir yan yolda benzen epoksidin asetillenmiş sistein ile birleşerek fenilmerkaptünik asit meydana getirmesidir. Mukonik asit ve fenilmerkaptünik asit minör metabolitler olup, asıl önemli olan fenol bileşikleridir. Benzenin başlıca majör metaboliti olan fenolün oluşması için mitokondrilerde ki mikrozomal sitokrom P-450 enzim sistemi karaciğer dışında kemik iliği hücrelerindeki mitokondrilerin iç zarında da bulunur. Dolayısı ile benzen, metabolitlerine bu iki organda da dönüşebilir [9, 10, 15, 30-32].

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Deney hayvanları

Çalışmamızda, memeli kemirgen takımının Muridae familyasından olan sıçanlar (*Rattus norvegicus*) kullanılmıştır. Çeşitli koşullara verdiği cevaplar ve anatomik yapıları insanunkine benzediğinden çok tercih edilen bir deney hayvanı olmuştur. Dişilerde tam fiziksel gelişme 100 gün, erkeklerde ise 120-180 gün sürer. Senede ortalama 3-4 kez doğum yaparlar. Her seferinde 6-10 yavru verirler. Bu hayvanlarda safra kesesi bulunmaz [33]. Deney hayvanı olarak kullanılan tüm sıçanlar %23 ham protein, %3 ham yağ, %7.5 ham kül ve %13 su içeren hazır ticari yem (Eskişehir, Yem fabrikası) ile beslenmişlerdir [34]. Deneysel çalışmamızda ortalama ağırlıkları 150-200 gr olan 12 adet ergin sıçan kullanılmıştır.

3.2 Kullanılan kimyasal maddeler

Benzen, Saf zeytinyağı, Formaldehit (Merck), Eter (Merck), Etil Alkol (Carlo Erba), Ksilol, Hematoksilin (Sigma), Eosin (Merck), Entellan (Sigma), Pikric Asit (Riedel-de Haen), Glasiyal Asetik Asit (Carlo Erba), Serum Fizyolojik, Katı parafin.

3.3 Kullanılan malzemeler

Enjektörler (1 ml'lik), mikrotom (HM310), Manyetik karıştırıcı (Ikamag RCT), Santrifüj (Uniequip), Mikropipet (Biohit), Etüv (Nüve EN500), Buzdolabı (Ariston), Lam ve lameller, Boyama kapları, Cam malzemeler (Deney tüpleri, beher, erlen), Diseksiyon malzemeleri.

3.4 Deney hayvanlarına uygulanan benzenin hazırlanması

Deneyde kullanılmak üzere benzen saf zeytinyağı içinde çözülerek hazırlanmıştır. Her uygulamada, deney hayvanlarına hazırlanan bu karışımdan 0,1 ml intraperitoneal olarak verilmiştir. 0,1 ml karışımda 0,04 ml benzen ve 0,06 ml saf zeytinyağı içermektedir. Buda 0,2 ml/kg'a karşılık gelmektedir.

3.5 Kimyasal maddelerin uygulama süreç ve yöntemleri

Çalışmamız 3 grup sıçan üzerinde gerçekleştirilmiştir:

- 1. deney grubu: Serum fizyolojik enjekte edilen grup,
- 2. deney grubu: Safzeytinyağı enjekte edilen grup,
- 3. deney grubu: Deney maddemiz olan benzenin saf zeytin yağı ile karıştırılarak enjekte edilen grup.

1. deney grubu olarak belirlenen, serum fizyolojik uygulanan gruba 10 hafta süre ile serum fizyolojik enjekte edilmiştir. Bu amaçla, 0.1ml serum fizyolojik sıçanın intraperitoneal bölgesine haftada 3 kez olmak üzere enjekte edilmiştir. Enjeksiyonun her seferinde farklı enjektörler kullanılmıştır. Ayrıca enjeksiyonun günün aynı saat diliminde gerçekleştirilmesine dikkat edilmiştir. Bu grupta 4 adet sıçan kullanılmıştır.

2. deney grubu olarak belirlenen, saf zeytinyağı uygulanan gruba 10 hafta süre ile saf zeytinyağı enjekte edilmiştir. Bu amaçla, 0.1ml saf zeytinyağı sıçanın intraperitoneal bölgesine haftada 3 kez olmak üzere enjekte edilmiştir. Enjeksiyonun her seferinde farklı enjektörler kullanılmıştır. Çalışmamız sırasında enjeksiyonun günün aynı saat diliminde gerçekleştirilmesine dikkat edilmiştir. Bu grupta 4 adet sıçan kullanılmıştır.

3. deney grubu olarak belirlenen benzenin enjekte edildiği deney grubuna benzen+saf zeytinyağı karışımından 10 hafta süre ile uygulanmıştır. Bu amaçla, 0.2 ml/kg karışımdan 0,1ml benzen+saf zeytinyağı sıçanın intraperitoneal bölgesine haftada 3 kez olmak üzere enjekte edilmiştir. Enjeksiyonun her seferinde farklı enjektörler kullanılmıştır. Enjeksiyonun günün aynı saat diliminde uygulanmasına dikkat edilmiştir. Bu grupta 4 adet sıçan kullanılmıştır.

Deney maddelerimizin uygulanması sürecinde 1ml'lik enjektörler kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Deney Düzenegi

Deney Düzenegi	Denek sayısı	Deney süresi	Uygulanan miktar	Uygulanan madde
1. deney grubu (Serum fizyolojik uygulanan grup)	4	10 hafta	0.1ml	Serum fizyolojik
2. deney grubu (Saf zeytinyağı uygulanan grup)	4	10 hafta	0.1ml	Saf zeytinyağı
3. deney grubu (Benzen+Saf zeytinyağı uygulanan grup)	4	10 hafta	0.1ml	Benzen+saf zeytinyağı (0,2 ml/kg)

3.6 Diseksiyon Ve Doku Örneklerinin Alınması

3.6.1 Diseksiyon

Çalışmamız sonunda, kullandığımız deney hayvanlarından incelenecek olan dokuların alınması amacı ile diseksiyona geçilmiştir. Bu amaçla içinde eter

damlatılmış pamuk bulunan bayılma kabına deney hayvanları alınarak bayıtılmışlardır. Anesteziden hemen sonra hayvanların karın bölgelerinden başlanarak göğüs boşluğuna kadar operasyon makası ile açılmış ve kalbe kadar ulaşılmıştır. Bu aşamadan sonra dokuların alınmasına geçilmiştir.

3.6.2 Doku Örneklerinin Alınması

3.6.2.1 Kan Örneklerinin Alınması

Deney hayvanımızın kalbinin karıncık bölgesinden 1ml'lik steril enjektör yardımı ile 1-2 ml kan alınarak içinde antiqagülan madde bulunan tüplere aktarılmıştır. Bu amaçla EDTA'lı tüpler kullanılmıştır. (EDTA: Etilendiamin-tetraasetik asit). Kan örneğinin konulduğu tüp yavaşça hareket ettirilerek içindeki kan ve antiqagülan maddenin karışması sağlanmış ve diseksiyon tamamlanıncaya kadar saklanmıştır.

Daha sonra hayvanın tün kanın çıkması ve öldürülmesi amacı ile hayvanın kalbi kesilerek alınmıştır.

3.6.2.2 Dalak Örneklerinin Alınması

Çalışmamız sırasında dalağın dış morfolojik ve anatomik yapısında inceleneceği dalak pens, bistüri ve makas yardımı ile zedelenmeden çıkarılmıştır. Dalak örneği yeni hazırlanmış Bouin fiksatifine konularak 10 saat süre ile tespit edilmiştir [2].

Bouin'in hazırlanışı;

750ml distile su içine, su doyuncaya kadar kristal pikrik asit ile karıştırılmıştır. Sonra üzerine 250 ml %37'lik formaldehit ve 250 ml glasiyal asetik asit ilave edilmiştir [35].

Çizelge 3.2. Bouin Fiksatifin Hazırlanması

BOUIN FİKSATİF
<ul style="list-style-type: none">• <i>750ml Distile Su</i>• <i>Kristal Pikrik Asit</i>• <i>250ml %37'lik Formaldehit</i>• <i>250ml Glasiyal Asetik Asit</i>

3.6.2.3 Kemik İliği Örneklerinin Alınması

Kemik iliği deney hayvanlarımızın femurlarından elde edilmiştir. Bu amaçla deney hayvanlarının femurları vücutlarından bistüri ve makas yardımı ile ayrılmıştır. Daha sonra femur kemiğini saran kas tabakası bistüri ucu ile kemikten ayrılarak femur ortaya çıkarılmıştır. Femur kemiğinin ekleme yakın her iki ucu makas yardımı ile kesilerek kemik iliğinin çıkarılmasına hazır hale getirilmiştir. Femural kemik iliği steril enjektör yardımı ile incelenmek üzere çıkarılmıştır [34].

3.7 Mikropreparatların Hazırlanması

3.7.1 Kemik İliği Preparatlarının Hazırlanması

Deney hayvanlarımızdan almış olduğumuz kemik ilikleri ependorf tüplerine aktararak üzerlerine 0.5 ml seviyesine kadar serum fizyolojik ilave edilmiştir. 1000 devir/dk'da 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra supernatant atılıp yerine 0.5 ml PBS (Phosphate Buffer Saline) ilave edilmiştir. PBS ilavesinden sonra ikinci kez 1000 devir/dk'da 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra tekrar supernatant atılıp yerine Absolü metanol +Glasiyal asetik asit karışımından (3:1) ilave edilerek 1000 devir/dk'da 10dk daha santrifüj edilmiştir. Böylece kemik iliğinin fiksasyonu sağlanmıştır [36]. Fikse edilmiş

kemik iliği bulunan ependorf tüpü çalkalanarak, 1 damlası lam üzerine alınarak yayma preparat hazırlanmıştır. Havada kurutulan preparatlar %5'lik Giemsa boyası ile boyanmışlardır [38]. Preparatlar %5'lik giemsa bulunan şalelerde 30dk tutulduktan sonra sıra ile içinde distile su bulunan şalelerden geçirilerek fazla boyanın giderilmesi sağlanmıştır. Daha sonra preparatlar havada kurutulduktan sonra entellan ile kapatılarak incelenmeye hazır daimi preparat haline getirilmiştir [34].

% 5'lik Giemsa boyaması;

Fiksasyonu yapılmış yayma preparatları içinde % 5'lik Giemsa (Sigma) boyası bulunan şale içinde 30 dk tutarak boyanmaları sağlanmıştır. Daha sonra farklı 3 şale içindeki Distile sulardan sıra ile preparatlar geçirilerek fazla boyalarının gitmesi sağlanmıştır [38].

Çizelge 3.3. %5'lik Giemsa Boyasının Hazırlanması

%5'LİK GİEMSA
<ul style="list-style-type: none">• <i>5 ml Tampon A</i>• <i>5 ml Tampon B</i>• <i>5 ml Giemsa</i>• <i>85 ml Distile Su</i>

Çizelge 3.4. Tampon A'nın Hazırlanması

TAMPON A (100 mL)
<ul style="list-style-type: none">• <i>4,536 gr KH_2PO_4</i>• <i>100 ml Distile su</i>

Çizelge 3.5 Tampon B'nin Hazırlanması

TAMPON B (100 mL)	
•	5,392 gr $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$
•	100 ml Distile su

%5'lik boyanın hazırlanması;

100 ml Tampon A için 4,536 gr KH_2PO_4 tartılıp bir miktar distile su içinde çözüldükten sonra 100 ml'ye tamamlanır.

100 ml Tampon B için 5,392 gr $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ tartılıp bir miktar distile su içinde çözüldükten sonra 100 ml'ye tamamlanır.

5 ml Tampon A, 5 ml Tampon B, 5 ml Giemsa ve 85 ml distile su karıştırılır daha sonra dik bir şaleye filtre kağıdı ile süzülür. Yüzeyinde oluşan florasan tabaka filtre kağıdı ile alınır [38].

PBS (Phosphate Buffer Saline) hazırlanışı;

Sodyum klorür 8 gr, Potasyum klorür 0.2 gr, Disodyum hidrojen fosfat 1.15 gr ve Potasyum dihidrojenden 0.2 gr tartılarak içinde 1000 ml distile su bulunan bir kapta eritilerek karıştırılır. Daha sonra verilen miktar hazırlandıktan sonra pH; 7.4'e ayarlanmıştır [35, 37].

Çizelge 3.6. PBS (Phosphate Buffer Saline) Hazırlanması

PBS (Phosphate Buffer Saline)	
•	Sodyum Klorür 8gr
•	Potasyum Klorür 0.2gr
•	Disodyum Hidrojen Fosfat 1.15gr
•	Potasyum Dihidrojen 0.2gr
•	Distile Su 1000ml

3.7.2 Kan Preparatlarının Hazırlanması

Deney hayvanlarından alınan ve EDTA'lı tüplerde saklanan kan örneklerinden mikropipet yardımıyla birer damla lamlara damlatılmıştır. Daha sonra başka bir lam kullanılarak çok sayıda yayma preparat hazırlanmıştır [39]. Kan yaymaları sırasında her bir yayma için temiz lam ve mikropipet kullanılmıştır. Bundan sonraki aşamada yayma preparatlar 20-30 dk havada kurutulmuştur. Fiksasyonları amacı ile absöü methanol içinde 5 dk bekletilerek fikse edilmişlerdir [40]. Fiksasyondan sonra yayma preparatlar havada kurutulmuş ve preparatlar May-grünwald_Giemsas boyama yöntemi ile boyanmışlardır.

May-grünwald_Giemsas boyaması;

Önce hazır may-Grünwald (Fluka) boyası ile preparatlar 5 dk süre ile boyanmışlardır. Preparatlar bu boyamadan sonra Giemsa (Sigma) boyası ile 25 dk süre ile şale içinde boyanmıştır. Giemsa boyası; 0.6 gr kuru giemsa (Sigma), 50 ml absöü metil alkol ve 25 ml saf gliserin karıştırılarak hazırlanmıştır [34].

Çizelge 3.7 Giemsa Boyasının Hazırlanması

GIEMSA
<ul style="list-style-type: none">• <i>0.6 gr Kuru Giemsa (Sigma)</i>• <i>50 ml Absöü Metil Alkol</i>• <i>25 ml Saf Gliserin</i>

Boyamanın ardından kan yayma preparatları mikroskop altında incelenebilir hale gelmiştir.

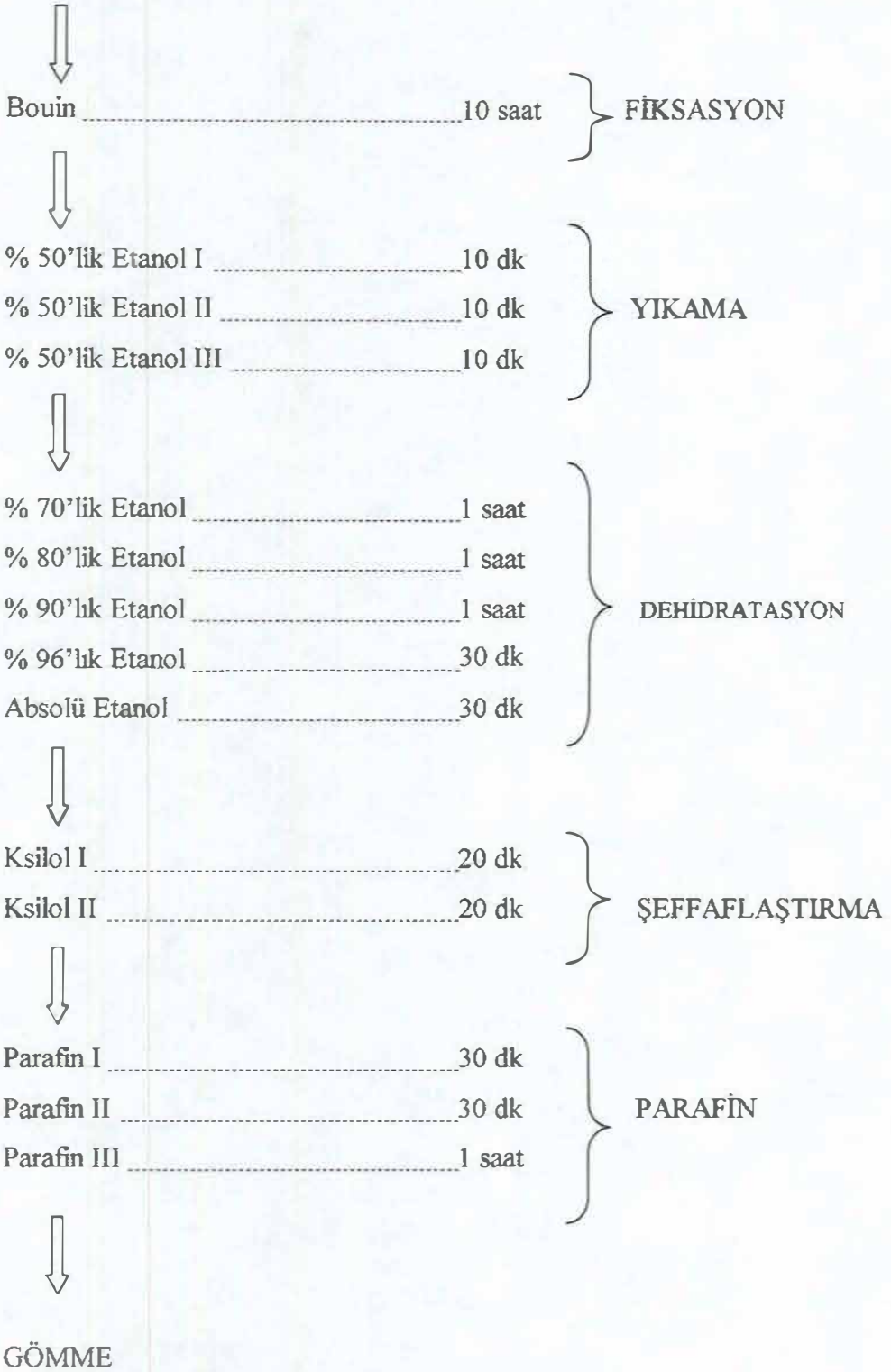
Deney hayvanlarına ait kan örneklerinin sayımları, hemositometrik yöntem ile Thoma Lamı kullanılarak yapılmıştır [39-41].

3.7.3 Dalak Preparatlarının Hazırlanması

3.7.3.1 Doku Takibi

Deney hayvanlarından alınan dalak dokuları bistüri ve makas yardımı ile küçük parçalara bölünmüşler ve tespit edilmeleri amacı ile Bouin fiksatifine atılmışlardır. Dalak dokusunun küçük parçalara bölünmesi ile fiksatifin hızlı ve iyi bir şekilde etkili olması amaçlanmıştır. Dalak dokusu fiksatif içinde 10 saat süre ile tutulmuştur. Süre sonunda doku parçaları 10'ar dk süre ile 3 defa olmak üzere % 50'lik etanolden geçirilerek yıkanmışlardır. Daha sonra doku parçaları % 70'lik etanolde 5 saat tutulmuştur. % 70'lik etanolden sonra 1'er saat süre ile % 80'lik, % 90'lık etanollerde ve 30'ar dk süre ile de % 96'lık ve absöü etanol içinde bekletilerek dalak dokularının dehidratasyonları sağlanmıştır. Dehidratasyondan sonra doku örnekleri şeffalaştırmak amacı ile 20'şer dk saf ksilolde bekletilmişlerdir. Daha sonra dalak parçaları 65 °C'ye ayarlanmış etüvde eritilmiş parafin içine alınarak doku içine parafinin işlemesi sağlanmıştır. Bu amaçla 30'ar dk süre ile parafin I ve parafin II içinde ve 1 saat süre ile de parafin III içinde bekletilmişlerdir. Bu işlemlerden sonra dalak doku takibi sona ermiş ve bu işlemlerin sonunda her bir doku parçası ayrı ayrı parafin içine gömülerek parafin bloklar halinde kesit almaya hazır hale getirilmişlerdir [2, 34].

Dalak dokuları



3.7.3.2 Kesit Alma

Kesit alınması için parafin blokların ve mikrotom bıçağı buzdolabından çıkarılarak mikrotoma yerleştirilir. Daha sonra mikrotom aracılığı ile 5'er mikrometre kalınlığında doku kesitleri alınmıştır. Kesitler 45 °C'ye ayarlı sıcak su banyosuna konularak doku örneklerinin açılması sağlanmıştır. Su banyosundaki kesitler lam üzerine alındıktan sonra 80 °C'ye ayarlı etüve konularak burada 1 saat süre ile tutulmuştur [42].

3.7.3.3 Boyama

Kesitlerin boyamasında Hematoksilin-Eosin ikili boyası kullanılmıştır [43]. Bu amaçla hazır Harris Alum Hematoksilin (sigma) ve alkollü eosin (Merck) boyası kullanılmıştır.

Alkollü eosinin hazırlanması;

Öncelikle stok solüsyon hazırlanmıştır. Bunun için 1gr Eosin Y (Merck), 80 ml %96'lık etanol ve 20 ml distile su içinde eritilmiştir. Daha sonra stok solüsyondan 20 ml alınıp 60 ml % 80'lik etanol içinde karıştırılarak üzerine 1 ml glasiyal asetik asit ilave edilmiştir. Hazırlanan boya süzülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir [35].

Çizelge 3.8 Alkollü Eosinin Hazırlanması

Alkollü Eosin (Stok solüsyonu)	Alkollü Eosin
<ul style="list-style-type: none">• <i>1 gr Eosin Y (Merck)</i>• <i>80 ml % 96'lık etanol</i>• <i>20 ml Distile su</i>	<ul style="list-style-type: none">• 20 ml Stok solüsyonu• 60 ml % 80'lik etanol• 1 ml Glasiyal asetik asit

1 saat 80 °C'de tutulan dalak kesitleri boyama kafesine yerleştirildikten sonra sırası ile aşağıdaki işlemlerden geçirilmişlerdir [42].

Yıkama Ksilolü I 3 dk
Yıkama Ksilolü II 2 dk
Yıkama Ksilolü III 1 dk



Yıkama Alkolü I 2 dk
Yıkama Alkolü II 1,5 dk
Yıkama Alkolü III 1 dk



AKARSU (Çeşme suyu) 3 dk



Hematoksilin (Çeşme suyu) 2 dk



AKARSU 2 dk



Eosin 4 dk



Alkol I 2 dk
Alkol II 1,5 dk
Alkol III 1 dk



Kurutma 1 dk



Ksilol I 2 dk
Ksilol II 2 dk
Ksilol III 3-4 dk

3.8 Mikroskopi Ve Mikrofotografi

Bu çalışmamızda hazırlanan kan, kemik iliği ve dalak preparatları Olympus BX50 araştırma mikroskobu altında değişik büyütmelede incelenmiştir. Deney sonuçlarına ait bölgelerin fotoğrafları, Olympus PM-30 otomatik mikrofotografi aracı kullanılarak çekilmiştir.

4.BULGULAR

Çalışmamızda kullanılan 6 adet sıçandan elde edilen doku örnekleri; periferik kan, miyeloid doku ve dalak örnekleri karşılaştırmalı olarak değişik büyütmelerde dikkatlice incelenmiştir. İncelemelerden elde edilen bulgular aşağıda verilmeye çalışılmıştır.

4.1 Kan Dokusu

Kontrol ve deney gruplarını oluşturan hayvanların kanları thoma lamı kullanılarak hemositometrik sayımları yapılmıştır. Sonraki aşamada May-Grünwald boyaması yapılarak hazırlanan yayma preparatlardan kan hücrelerinin morfolojik yapıları incelenmiştir.

4.1.1 Periferik Kan Parametreleri

4.1.1.1 Serum Fizyolojik Uygulanmış 1.gruba Ait Kan Parametreleri

Serum fizyolojik uygulanmış hayvanların kan sayımları yapılmıştır. Bu deney grubunda 4 adet deney hayvanı kullanılmıştır. Her 4 sıçan içinde 3'er sayım yapılmış ve daha sonra bunların ortalama değerleri alınmıştır.

Lökosit sayımı yapıldığında, ortalama lökosit sayısı sırasıyla 1.deney hayvanında mm^3 te 6100 adet, 2.deney hayvanında mm^3 te 6050 adet, 3.deney hayvanında mm^3 te 6000 adet, 4.deney hayvanında mm^3 te 6050 adet olduğu saptanmıştır. Bu grubun yapılan eritrosit sayımında ise 1.deney hayvanında mm^3 te $8,8 \cdot 10^6$ adet, 2.deney hayvanında mm^3 te $9 \cdot 10^6$ adet, 3.deney hayvanında mm^3 te $8,9 \cdot 10^6$ adet, 4.deney hayvanında mm^3 te $9,1 \cdot 10^6$ adet olduğu görülmüştür. (Çizelge 4.1.). Bu gruba ait eritrosit ve lökosit sayımlarının genel ortalamaları çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Serum fizyolojik uygulanmış 1.gruba ait kan parametre değerleri

SERUM FİZYOLOJİK UYGULANMIŞ GRUP			
	SAYIM	LÖKOSİT (mm³/adet)	ERİTROSİT (mm³/adet)
1.DENEY HAYVANI	1.	5900	9,4.10 ⁶
	2.	6300	8,1.10 ⁶
	3.	6100	8,9.10 ⁶
	Ortalama	6100	8,8.10 ⁶
2.DENEY HAYVANI	1.	5850	8,6.10 ⁶
	2.	5950	9,8.10 ⁶
	3.	6350	8,6.10 ⁶
	Ortalama	6050	9.10 ⁶
3.DENEY HAYVANI	1.	6300	8,8.10 ⁶
	2.	5700	8,7.10 ⁶
	3.	6000	9,2.10 ⁶
	Ortalama	6000	8,9.10 ⁶
4.DENEY HAYVANI	1.	6200	9,2.10 ⁶
	2.	6400	9.10 ⁶
	3.	6000	9,1.10 ⁶
	Ortalama	6200	9,1.10 ⁶

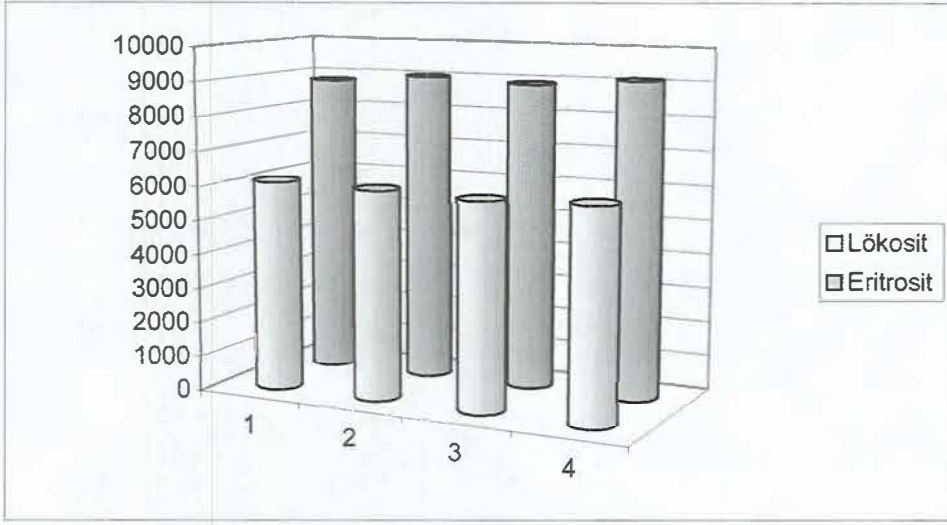
4.1.1.2 Saf Zeytinyağı Uygulanmış 2.gruba Ait Kan Parametreleri

Saf zeytinyağı uygulanmış hayvanların kan sayımları yapılmıştır. Bu deney grubunda 4 adet deney hayvanı kullanılmıştır. Her 4 sıçan içinde 3'er sayım yapılmış ve daha sonra bunların ortalama değerleri alınmıştır.

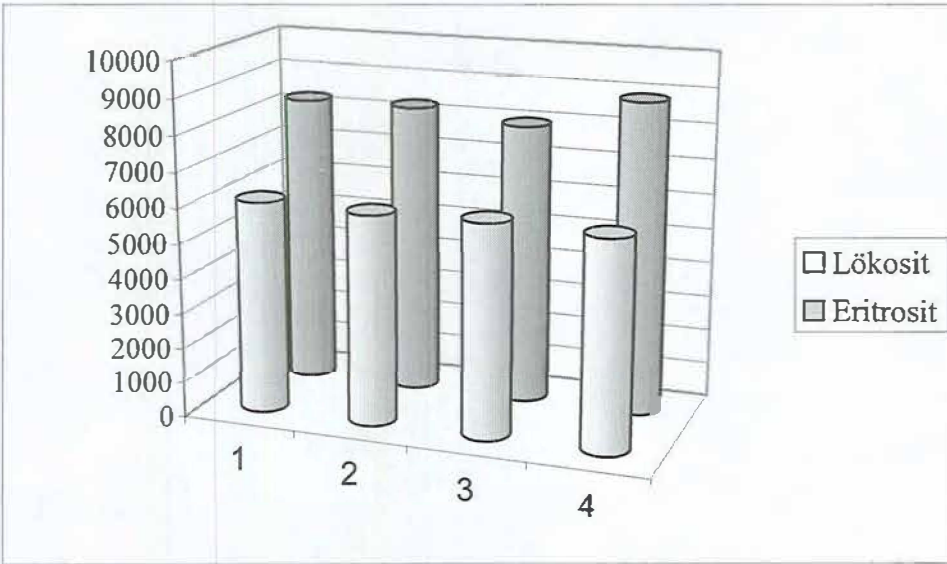
Lökosit sayımı yapıldığında, ortalama lökosit sayısı sırasıyla 1.deney hayvanında mm^3 te 6100 adet, 2.deney hayvanında mm^3 te 6000 adet, 3.deney hayvanında mm^3 te 6100 adet, 4.deney hayvanında mm^3 te 6000 adet olduğu saptanmıştır. Bu grubun yapılan eritrosit sayımında ise 1.deney hayvanında mm^3 te $8,3 \cdot 10^6$ adet, 2.deney hayvanında mm^3 te $8,3 \cdot 10^6$ adet, 3.deney hayvanında mm^3 te $8 \cdot 10^6$ adet, 4.deney hayvanında mm^3 te $8,9 \cdot 10^6$ adet olduğu görülmüştür. (Çizelge 4.1.). Bu gruba ait eritrosit ve lökosit sayımlarının genel ortalamaları çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Saf zeytinyağı uygulanmış 2.gruba ait kan parametre değerleri

SAF ZEYTİNYAĞI UYGULANMIŞ GRUP			
	SAYIM	LÖKOSİT (mm³/adet)	ERİTROSİT (mm³/adet)
1.DENEY HAYVANI	1.	5950	9.10 ⁶
	2.	6050	7,8.10 ⁶
	3.	6300	8,1.10 ⁶
	Ortalama	6100	8,3.10 ⁶
2.DENEY HAYVANI	1.	6000	8,3.10 ⁶
	2.	5900	8.10 ⁶
	3.	6100	8,6.10 ⁶
	Ortalama	6000	8,3.10 ⁶
3.DENEY HAYVANI	1.	5800	8.10 ⁶
	2.	6200	7,8.10 ⁶
	3.	6300	8,2.10 ⁶
	Ortalama	6100	8.10 ⁶
4.DENEY HAYVANI	1.	6250	9,2.10 ⁶
	2.	5750	8,8.10 ⁶
	3.	6000	8,7.10 ⁶
	Ortalama	6000	8,9.10 ⁶



Şekil 4.1. Serum fizyolojik uygulanmış gruba ait kan sayımlarını gösteren grafik
 Eritrosit: (mm³/adet)x1000, Lökosit: (mm³/adet), (1, 2, 3, 4 deney hayvanları)



Şekil 4.2. Saf zeytinyağı uygulanmış gruba ait kan sayımlarını gösteren grafik
 Eritrosit: (mm³/adet)x1000, Lökosit: (mm³/adet), (1, 2, 3, 4 deney hayvanları)

4.1.1.3 Benzen+Saf Zeytinyağı Uygulanmış 3.Gruba Ait Kan Parametreleri

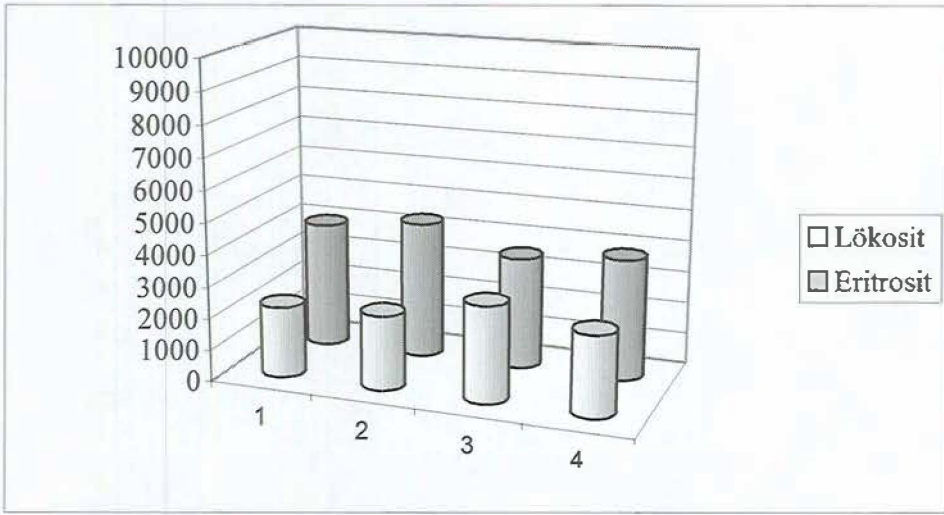
Deney hayvanlarına ait eritrosit sayım sonuçlarından elde edilen rakamsal değerler kendi aralarında karşılaştırıldığında en yüksek değer mm^3 te $4,35 \cdot 10^6$ eritrosit ile 2.deney hayvanına ait olduğu görülmüştür. Daha sonra mm^3 te $4 \cdot 10^6$ adet eritrosit ile 1.deney hayvanı, mm^3 te $3,85 \cdot 10^6$ eritrosit ile 4.deney hayvanı ve son olarak ta mm^3 te $3,55 \cdot 10^6$ adet eritrosit ile 3.deney hayvanına ait kan sayımı sonuçları olduğu görülmüştür. Her 4 sıçana ait kan kan sayımlarındaki eritrosit sayım sonuçları, kontrol gruplarına göre oldukça düşük değerde olduğu gözlemlenmiştir.

Deney grubundaki hayvanların kanlarından yapılan lökosit sayım sonuçlarında ise en düşük değer mm^3 te 2250 adet lökosit ile 1.deney hayvanına ait olduğu görülmüştür. Daha sonra sırasıyla mm^3 te 2350 adet lökosit ile 2.deney hayvanına, mm^3 te 2550 adet lökosit ile 4.deney hayvanı ve son olarakta mm^3 te 3050 adet lökosit ile 3.deney hayvanının geldiği görülmüştür (Çizelge 4.3.).

Deney grubundaki farklı bireyler arasında rakamsal değer bakımından büyük farkların olmadığı görülmüştür. Fakat eritrosit sayısında olduğu gibi lökosit sayısında da deney grubu ile 1. ve 2. gruplarla arasında rakamsal değer bakımından büyük farkların olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.2.). Bu gruba ait eritrosit ve lökosit sayımlarının genel ortalamaları çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Benzen+saf zeytinyağı uygulanmış 3.gruba ait kan parametre değerleri

BENZEN+SAF ZEYTİNYAĞI UYGULANMIŞ GRUP			
	SAYIM	LÖKOSİT (mm³/adet)	ERİTROSİT (mm³/adet)
1.DENEY HAYVANI	1.	2250	3,6.10 ⁶
	2.	2400	3,8.10 ⁶
	3.	2100	4,6.10 ⁶
	Ortalama	2250	4.10 ⁶
2.DENEY HAYVANI	1.	2450	4,55.10 ⁶
	2.	2200	4,15.10 ⁶
	3.	2400	4,35.10 ⁶
	Ortalama	2350	4,35.10 ⁶
3.DENEY HAYVANI	1.	2950	3,9.10 ⁶
	2.	3000	4.10 ⁶
	3.	3200	3,75.10 ⁶
	Ortalama	3050	3,55.10 ⁶
4.DENEY HAYVANI	1.	2700	3,55.10 ⁶
	2.	2350	3,8.10 ⁶
	3.	2800	4,2.10 ⁶
	Ortalama	2550	3,85.10 ⁶



Şekil 4.3. Benzen+saf zeytinyağı uygulanmış gruba ait kan sayımlarını gösteren grafik, Eritrosit: (mm³/adet)x1000, Lökosit: (mm³/adet), (1, 2, 3, 4 deney hayvanları)

Çizelge 4.4. Tüm deney gruplarına ait kan parametrelerinin karşılaştırmalı Değerleri

Deney Hayvanları	Serum Fizyolojik		Saf Zeytinyağı		Benzen+Saf Zeytinyağı	
	Lökosit	Eritrosit	Lökosit	Eritrosit	Lökosit	Eritrosit
1.deney Hayvanı	6100	8,8.10 ⁶	6100	8,3.10 ⁶	2550	4.10 ⁶
2.deney Hayvanı	6050	9. 10 ⁶	6000	8,3. 10 ⁶	2350	4,35. 10 ⁶
3.deney hayvanı	6000	8,9. 10 ⁶	6100	8. 10 ⁶	3050	3,55. 10 ⁶
4.deney Hayvanı	6200	9,1. 10 ⁶	6000	8,9. 10 ⁶	2550	3,85. 10 ⁶
Genel Ortalama	6087,5 ±42,69	8,9.10 ⁶ ±0,06.10 ⁶	6050 ±28,87	8,37.10 ⁶ ±0,18.10 ⁶	2550 ±177,95	3,93.10 ⁶ ±0,16.10 ⁶

4.1.2 Eritrosit Hücrelerinin Genel Morfolojileri

Çalışmamızın sonunda hazırlanan kan yayma preparatları incelenmiştir. İnceleme serum fizyolojik uygulanan 1.grup, saf zeytin yağı uygulanmış 2.grup ve benzen+saf zeytinyağı uygulanmış 3.grup olarak gerçekleştirilmiştir. 1. ve 2. gruba ait görüntüler Şekil 4.4.E ve şekil 4.4.F’de gösterilmiştir. Şekil 4.4.E, saf zeytin yağı uygulanmış 2.gruba , şekil 4.4.F ise serum fizyolojik uygulanan 1.gruba ait görüntülerdir.

Kontrol grubu ile deney grubu arasındaki en temel fark deney grubundaki eritrositlerde histopatolojik bulguların ortaya çıkmasıdır (Şekil 4.4.)

Deney grubundaki 4 ayrı uygulamada da deney hayvanlarının kanında bulunan eritrositlerin membrn yapılarının çıkıntılı ve yıldızsı bir görünümde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4. A, B, C, D). Bu hücreler fotoğraflar üzerinde oklarla belirtilmiştir. Bu çıkıntılı ve yıldızsı membran yapısı serum fizyolojik uygulanan ve saf zeytinyağı uygulanmış hayvanların eritrositlerinde görülmemiştir (Şekil 4.4.E ve Şekil 4.4.F).

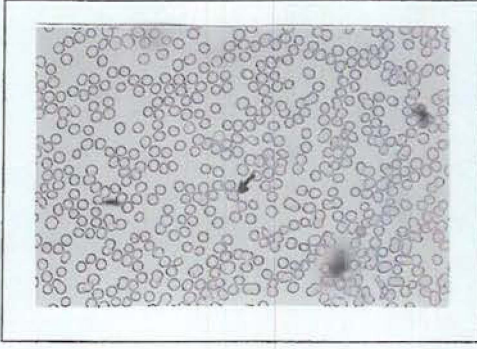
Tüm deney grubu hayvanlarının kan preparatlarında yapılan incelemeler eritrosit sayılarının bu gruplar arasında sayıca benzer olduğunu göstermiştir. Ancak oluşan bu değerler, eritrosit ve lökosit sayılarında normal değerlere oranla çok büyük azalma olduğunu göstermiştir (Şekil 4.2.). Buna karşın 1. Ve 2. grupta bulunan deney hayvanlarının eritrosit ve lökosit sayıları bakımından değerlendirildiğinde sonuçta bu değerlerin normal aralıkta olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1.).

Tüm deney hayvanlarının kan yaymaları eritrosit büyüklüğü açısından incelendiğinde, bu gruplar arasında bir farkın olmadığı görülmüştür. Benzen+saf zeytinyağı uygulanmış grubun eritrosit hücre çapları (Şekil 4.4.A, B, C, D) ile 1. ve 2. gruba ait eritrosit hücrelerinin çapları (Şekil 4.4.E, F) arasında bir değişiklik görülmemiştir.

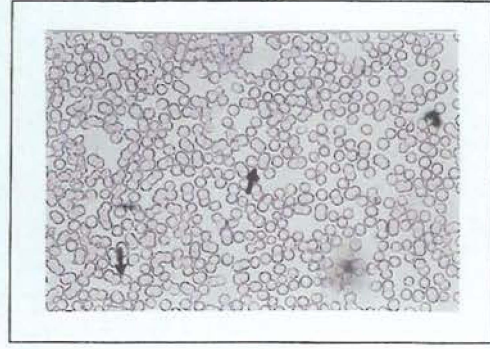
Benzen+saf zeytinyağı uygulanmış grup ile serum fizyolojik uygulanmış grup ve saf zeytinyağı uygulanmış grup arasında hücre büyüklüğü bakımından bir fark görülmemesine karşın deney grubundaki tüm hayvanların eritrositlerinde

deformasyonlar olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4.A, B, C, D). Oluşan bu deformasyonlar 1. ve 2. gruplarda gözlenmemiştir (Şekil 4.4.E, F)

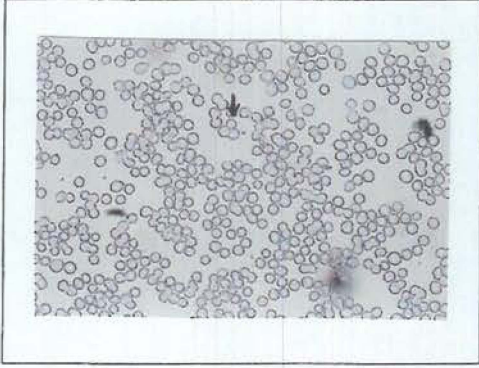
Tüm deney grubu hayvanlarının kan preparatlarında yapılan gözlemler, eritrosit hücrelerinin sitolojik olarak boyanma özellikleri arasında bir fark olmadığı görülmüştür.



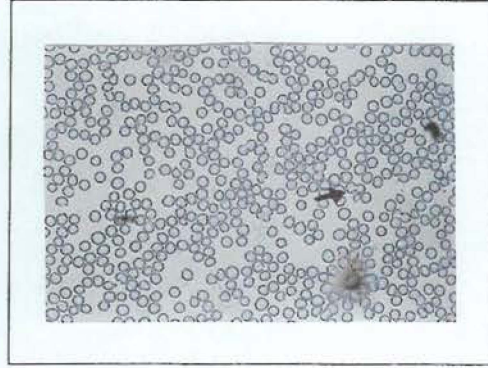
A



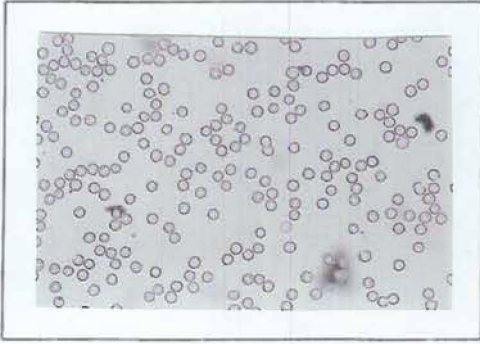
B



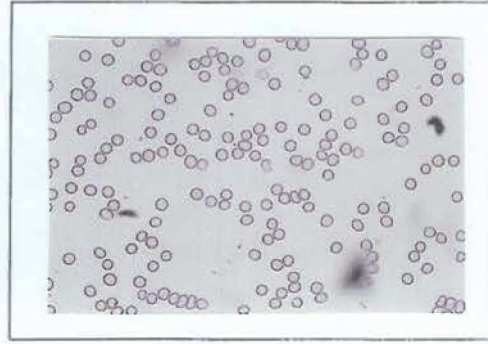
C



D



E



F

Şekil .4.4.Eritrosit Hücrelerinin Genel Morfolojileri, x40.

A: 1.Deney hayvanı, B: 2.Deney hayvanı, C: 3.Deney hayvanı, D: 4.Deney hayvanı (Benzen+saf zeytinyağı uygulanmış grup),

E: Saf zeytinyağı uygulanmış grup,

F: Serum fizyolojik uygulanmış grup.

4.2 Myeloid doku (Kemik İliği)

Çalışma sonunda tüm hayvanların kan yayma preparatlarının incelenmesi sonucunda kan hücreleri (eritrosit ve lökosit) arasında sayısal ve morfolojik farklar olduğu görülmüştür. Bu sebeple 1. ve 2. Gruplarla, benzen uygulanmış gruplarının kemik ilikleri incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. İncelemeler eritrositer seri ve lökositler seri hücreler baz alınarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.1 Serum Fizyolojik Ve Saf Zeytinyağı Uygulanmış 1. Ve 2.Gruba Ait Myeloid Dokular

1. ve 2. gruba ait kemik iliği yayma preparatları hazırlanmış ve önemli bulguların fotoğrafları çekilmiştir. Serum fizyolojik uygulanmış 1.gruba ait bulgular Şekil 4.5.F'de gösterilmiştir. Saf zeytinyağı uygulanmış 2.gruba ait bulgular şekil 4.5.E'de gösterilmiştir.

1.gruba ait ve 2.gruba ait kemik iliği preparatları incelendiğinde hücre sayıları arasında fark olmadığı ve bu iki kemik iliğinin, normosellüler kemik ilikleri oldukları görülmüştür. Her iki grup hücrelerin boyanma özelliklerine bakıldığında 1.gruba ait kemik iliği hücrelerinin (Şekil 4.5.F), 2.gruba ait kemik iliği hücrelerine oranla daha koyu boyandıkları görülmüştür. Tüm deney hayvanlarına ait kemik iliği preparatları incelendiğinde hücre sayıları ve morfolojileri arasında bir fark görülmemiştir (Şekil 4.5.A, B, C, D, E, F)

4.2.2 Benzen+Saf zeytinyağı Uygulanmış 3.Gruba Ait Myeloid Dokular

3.gruba ait hayvanların kemik iliklerine ait görüntüler Şekil 4.5.'de verilmiştir. Şekil 4.5.A 1.deney hayvanı, Şekil 4.5.B 2.deney hayvanı, Şekil 4.5.C 3.deney hayvanı, Şekil 4.5.D 4.deney hayvanına ait kemik iliği sonuçlarının gösterildiği resimlerdir.

Deney grubu hayvanlarının tümünün kemik iliği yayma preparatları incelendiğinde hücre sayılarında bir azalma olduğu görülmüştür. Bu azalma eritrositer seride de lökositler seride de gözlenmiştir. Bu sebeple, deney

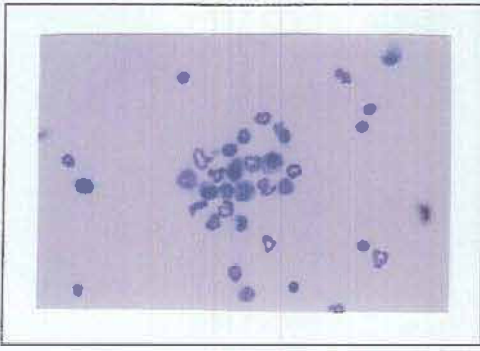
grubundaki tüm hayvanların kemik iliklerinin hiposellüler olduğu görülmüştür (Şekil 4.5.A, B, C, D).

Benzen uygulanmış hayvanlara ait kemik iliği preparatları mikroskop altında incelenmiş ve normoblast sayılarının 1. ve 2. gruba göre büyük oranda azaldığı görülmüştür (Şekil 4.5.). Normoblast hücrelerinin 1. ve 2. grupta düzgün, dairesel görünümüne karşın, benzen uygulanmış gruplarda normoblastların bazılarının deformasyona uğradığı görülmüştür (Şekil 4.5.A, B, C, D). Benzen uygulanmış grubun kemik iliğindeki normoblastların çekirdeklerinin yıldızsı ve çıkıntılı görünümü, 1. ve 2.gruptaki hayvanların kemik iliğindeki normoblastlarda gözlenmemiştir (Şekil 4.5.E, F).

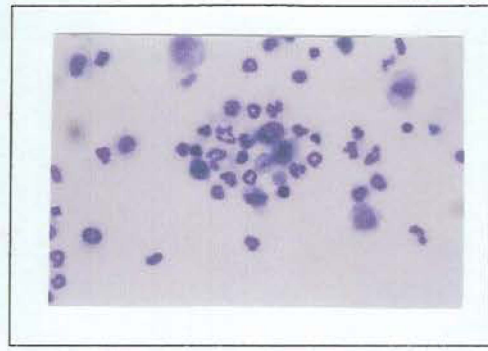
Benzen uygulanmış grubun hayvanlarının normoblast hücrelerinin bazofilik boyandığı görülmüştür. Ancak bu gruptaki 3.deney hayvanına ait hücreler (Şekil 4.5.C) ve 2.deney hayvanına ait hücreler (Şekil 4.5.B) benzen uygulanmış gruptaki diğer hücrelere oranla daha koyu bazofilik boyanmışlardır (Şekil 4.5.A,D).

Benzen uygulanmış gruptaki kemik iliği preparatlarında yapılan incelemelerde nötrofil metamiyelosit hücrelerinin grup içinde sayıca bir fark olmadığı görülmüştür. Ancak deney grubu nötrofil metamiyelositlerde deformasyon olduğu görülmüştür (Şekil 4.5.).

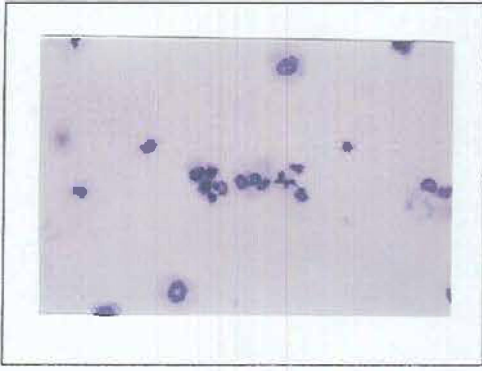
Kemik iliklerinde ki nötrofil metamiyelosit hücre nükleuslarının, benzen uygulanmış 3.gruba oranla 1. ve 2. gruptakilerinin daha düzgün ve daire biçimli halkasal oldukları görülmüştür (Şekil 4.5.E,F). Fakat benzen uygulanmış gruptaki nötrofil metamiyelosit hücrelerinin nükleuslarında deformasyon olduğu net olarak görülmüştür. Nükleusların girintili, çıkıntılı ayrıca yıldızsı bir görünüme sahip oldukları görülmüştür (Şekil 4.5.A, B, C). Ayrıca benzen uygulanmış gruptaki 2.deney hayvanı ve 4.deney hayvanına ait kemik iliğinde (Şekil 4.5. B ve D) nötrofil metamiyelositlerde nükleuslarının aşırı bant kalınlaşması gösterdiği görülmüştür.



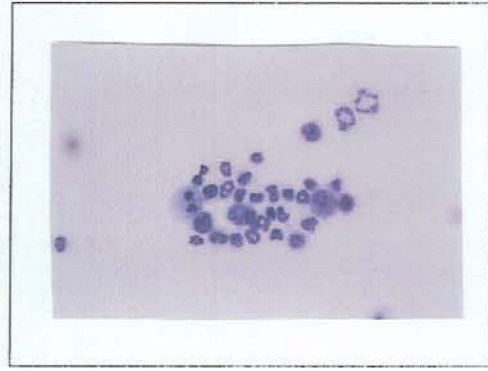
A



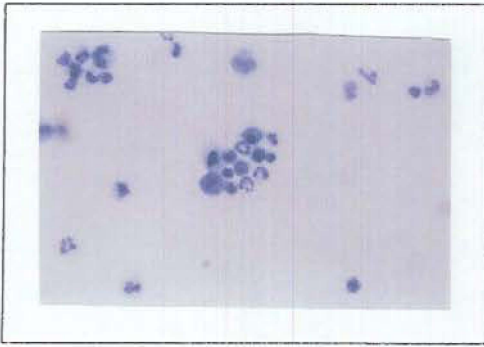
B



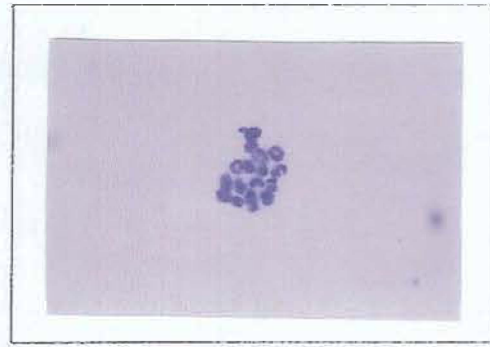
C



D



E



F

Şekil 4.5.Kemik iliği yayma preparatlarından elde edilen görüntüler, x400.

A: 1.Deney hayvanı, B: 2.Deney hayvanı, C: 3.Deney hayvanı, D: 4.Deney hayvanı (Benzen+saf zeytinyağı uygulanmış grup),

E: Saf zeytinyağı uygulanmış grup.

F: Serum fizyolojik uygulanmış grup.

4.3 Dalak Dokusu

Çalışma sonunda deney hayvanlarına ait dalaklar incelenmiştir. İnceleme sonucunda benzen uygulanmış gruba ait hayvanların dalaklarının, serum fizyolojik ve saf zeytinyağı uygulanmış gruplara ait hayvanların dalaklarına oranla hacimlerinde ve ağırlıklarında artış olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.5. Deneyde kullanılan hayvanlara ait dalak ağırlıkları

Deneyde Kullanılan Hayvanlara Ait Dalak Ağırlıkları			
Deney hayvanları	Serum fizyolojik uygulana grup	Saf zeytinyağı uygulanan grup	Benzen+Saf zeytinyağı uygulanan grup
1.Sıçan	0,67 gr	0,92 gr	1,78 gr
2.Sıçan	0,90 gr	1,10 gr	1,45 gr
3.Sıçan	0,85 gr	0,78 gr	1,52 gr
4.Sıçan	1,02 gr	0,90 gr	1,20 gr

4.3.1 Serum Fizyolojik Ve Saf Zeytinyağı Uygulanmış 1. Ve 2.Gruba Ait Dalak Dokuları

Serum fizyolojik ve saf zeytinyağı uygulanmış gruba (1. ve 2.grup) ait dalak görüntüleri Şekil 4.6'te gösterilmiştir. Şekil 4.6.A, B, E 1.gruba, Şekil 4.6.C, D, F ise 2.gruba ait görüntülerin gösterildiği fotoğraflardır.

1.gruba ve 2.gruba ait dalak görüntülerine bakıldığında nodüllerin çapları arasında fark olmadığı görülmüştür. Dalak kesitlerinin incelenmesinde lenf nodülü sayısı ve nodül çapları arasında fark görülmemiştir. Lenf nodüllerinin arterleri incelenmiş, lenf nodüllerinin arterleri arasında fark olmadığı, arter çaplarının hemen hemen aynı olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6.A, B, C, D)

Dalak kesitleri incelendiğinde 1.grubun kırmızı pulpasında 2.gruba göre daha çok bazofilik hücreler görülmüştür. Ayrıca lenf nodülleri arasındaki eosinofilik alanların daha çok ve dallanarak yer yer nodül içlerine kadar girdiği görülmüştür (Şekil 4.6.C, D)1. Ve 2.grupların sinuzoidal yapıları incelenmiş, buradaki hücrelerin hamajen dağıldıkları görülmüştür. 1.gruba ait dalak görüntülerinde bazofilik boyanmış hücreler yoğunlukta olduğu görülmüştür (Şekil4.6 E,F)

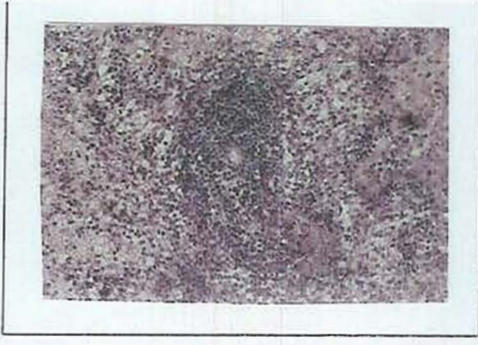
4.3.2 Benzen+Saf zeytinyağı Uygulanmış 3.Gruba Ait Dalak Dokuları

Benzen+saf zeytinyağı uygulanmış gruba ait hayvanların dalak dokularının görüntüleri Şekil 4.7 ve Şekil 4.8`te verilmiştir. Şekil 4.7.A, B, E 1.deney hayvanı, Şekil 4.7.C, D, F 2.deney hayvanı, Şekil 4.8.A, B,E 3.deney hayvanı, Şekil 4.8.C,D,F 4.deney hayvanına ait görüntülerdir. Şekil 4.9.A, B, C`de 4.deney hayvanına ait dalak dokularının görüntüleri verilmiştir.

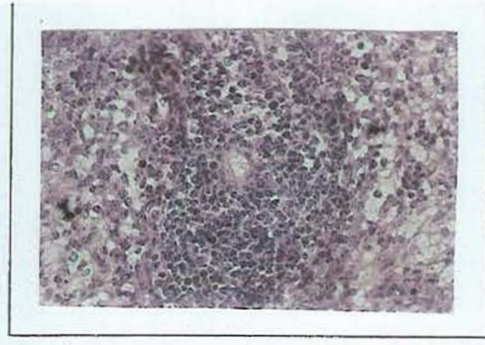
Tüm deney hayvanlarının dalak kesitleri incelendiğinde benzen uygulanmış gruba ait lenf nodüllerinin çaplarında 1. ve 2.gruptaki hayvanların lenf nodüllerine göre artış olduğu görülmüştür (Şekik 4.7, Şekil 4.8). Ayrıca yine benzen uygulanmış gruptaki lenf nodüllerinin arter çaplarında da 1. ve 2.grup hayvanlarına oranla yine aynı şekilde artış olduğu, lenf nodüllerinin arterlerinin çaplarında genişleme olduğu saptanmıştır (Şekil 4.7.C, D ve Şekil 4.8.A, B). Benzen uygulanmış gruptaki 3.deney hayvanına ait görüntülerde dalağın kırmızı pulpasının diğer hayvanlarinkine oranla daha çok bazofilik alanların olduğu görülmüştür. Diğer hayvanlarda ise bu alanların homojenlik gösterdiği görülmüştür. Tüm dalak dokularındaki hücre yoğunluğu azalmıştır. Buna rağmen benzen uygulanmış hayvanların dalaklarında eritrosit yoğunluğu artmıştır (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8).

Deney hayvanların sinuzoidal yapılarını gösteren yapılar incelendiğinde bu gruplar arasında bir fark olmadığı görülmüştür. 2.deney hayvanı ve 3.deney hayvanına ait dokularda bazofilik özellik gösteren hücre adacıkları gözlenmiştir (Şekil 4.7F, Şekil 4.8E)

Şekil 4.9'da gösterilen 4.deney hayvanına ait dalak dokusunda histopatolojik bir bulgu ortaya çıkmıştır. Bu yapı dalağın kapsül bölgesinde oluşmuştur (Şekil 4.9). Kapsül o bölgede kalınlaşma göstermiş ve hücre yoğunluğu artmıştır. Oluşan bu hücreler düzensiz bir şekilde fusiform yapıda oldukları gözlenmiştir. Bu kistik oluşum dalağın kırmızı pulpasına doğru uzanmış ve dalağın dışına doğru çıkıntı yapmıştır. Şekil 4.9A'daki x100'lük büyütmede net görülen bu yapı dalağa oranla büyük bir alan kaplamış olduğu görülmüştür (Şekil 4.9.A, B, C).



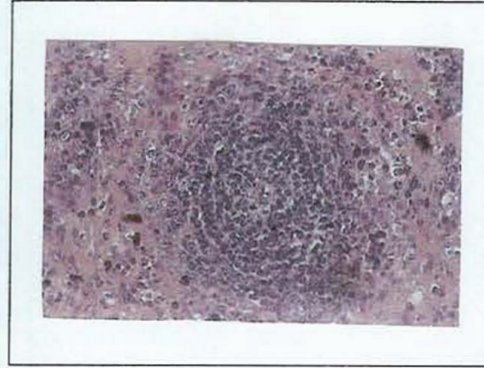
A



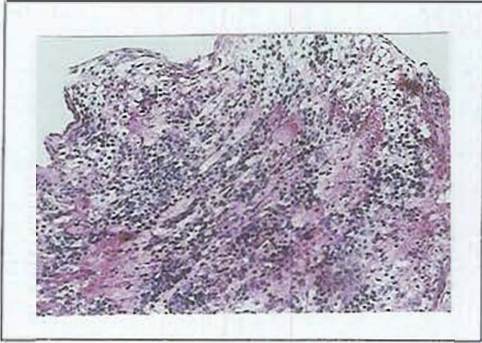
B



C



D



E



F

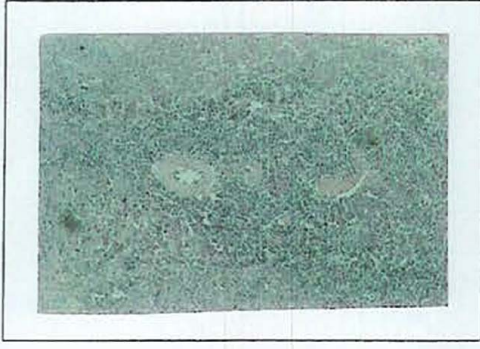
Şekil 4.6. Serum fizyolojik ve saf zeytinyağı uygulanmış dalakların görüntüleri

A-B: Serum fizyolojik uygulanmış lenf nodülü (A;x200, B;x400)

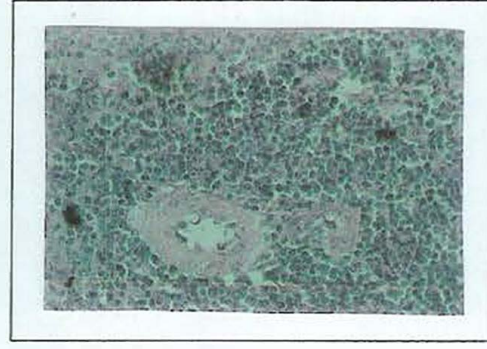
C-D: Saf zeytin yağı uygulanmış lenf nodülü (C;x200, D;x400)

E: Serum fizyolojik uygulanmış kırmızı pulpa (E;x200)

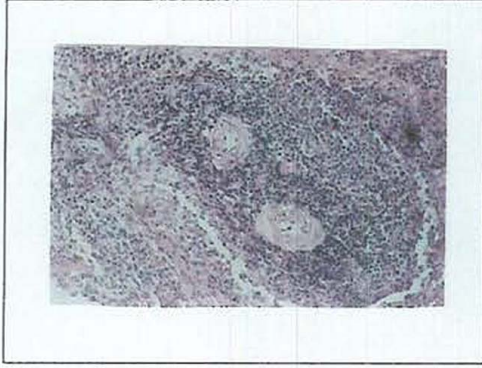
F: Saf zeytin yağı uygulanmış kırmızı pulpa (F;x200)



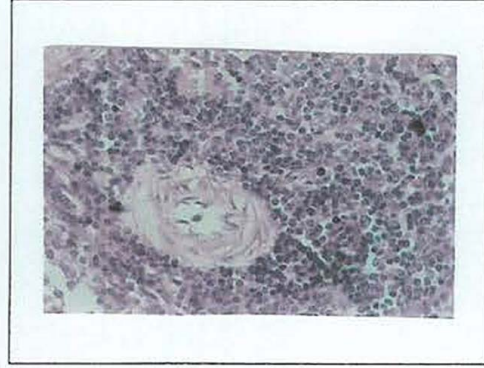
A



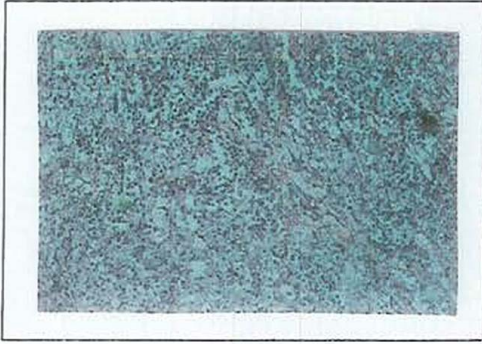
B



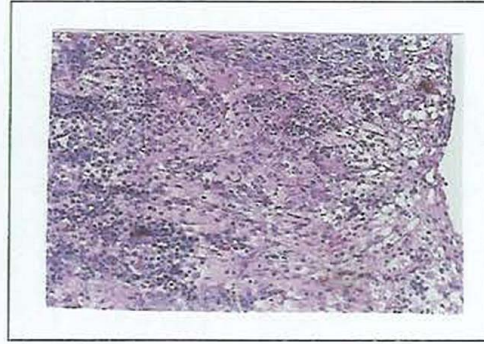
C



D



E



F

Şekil 4.7. Benzen+saf zeytinyağı uygulanmış hayvanların dalak görüntüleri

A-B: 1.deney hayvanı lenf nodülü (A;x200, B;x400)

C-D: 2.deney hayvanı lenf nodülü (C;x200, D;x400)

E: 1.deney hayvanı kırmızı pulpa (E;x200)

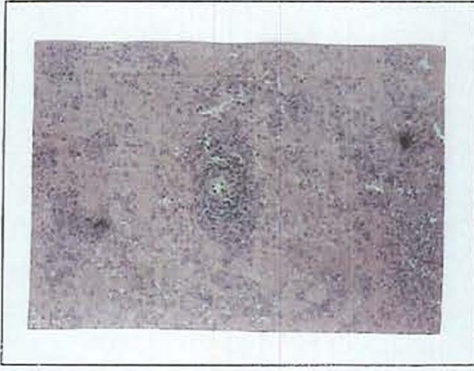
F: 2.deney hayvanı kırmızı pulpa (F;x200)



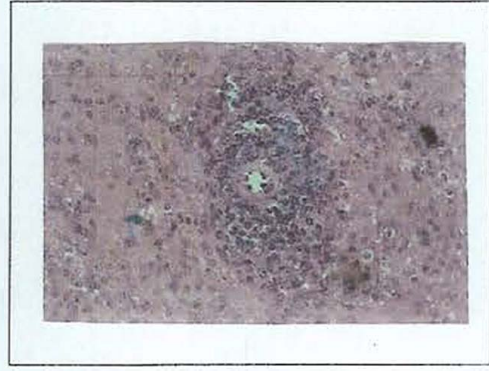
A



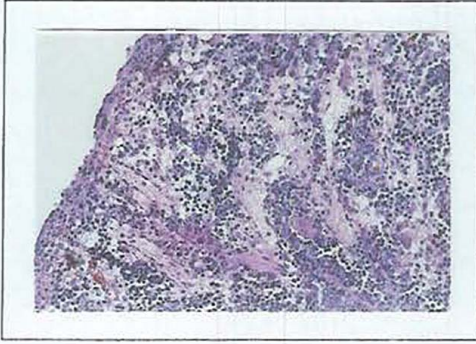
B



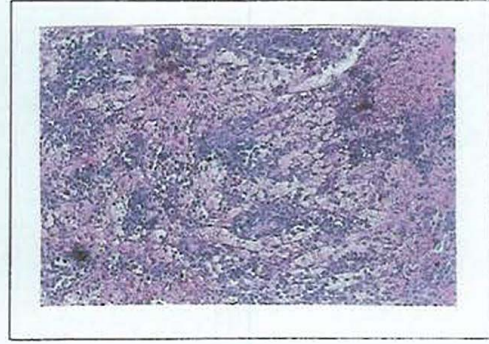
C



D



E



F

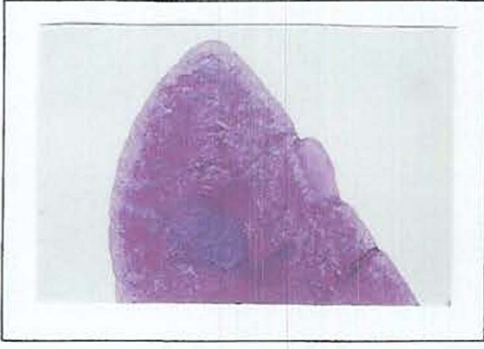
Şekil 4.8. Benzen+saf zeytinyağı uygulanmış hayvanların dalak görüntüleri

A-B: 3.deney hayvanı lenf nodülü (A;x200, B;x400)

C-D: 4.deney hayvanı lenf nodülü (C;x200, D;x400)

E: 3.deney hayvanı kırmızı pulpa (E;x200)

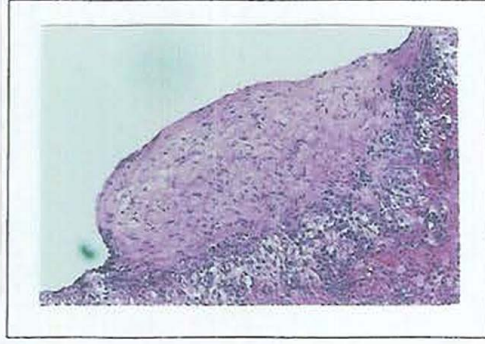
F: 4.deney hayvanı kırmızı pulpa (F;x200)



A



B



C

Şekil 4.9. Benzen+saf zeytinyağı uygulanmış 4.deney hayvanına ait dalak görüntüleri

A: 4.deney hayvanı, genel görüntü, x100

B: 4.deney hayvanı, x200

C: 4.deney hayvanı, x400

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde yaygın olarak kullanılmakta olan benzenin sağlığa zararlı olduğu 19.yy sonlarında fark edilmiştir [31]. Sanayinin ve endüstrinin çok çeşitli dallarında kullanılmakta olan benzen, yaşadığımız ortamlarda bulunan yaygın bir maddedir. Kullanım oranı çok yüksek olan bu kimyasal madde, hematotoksik ve karsinojenik bir ajan olduğu bilinmektedir [44-47].

Yaptığımız deneylerden elde ettiğimiz bulgular incelendiğinde deney hayvanlarının kan sayımlarında büyük düşüşlerin olduğu görülmüştür. Eritrosit ve lökosit hücre sayılarında belirgin azalma görülmüştür. Yapılan bir çok çalışmada benzenin eritropeni ve lökopeniye yol açtığı gösterilmiştir [49-58]. Eritrositlerdeki bu azalma eritropeni, lökositlerdeki bu azalmayıda lökopeni olarak tanımladık.

Kemik iliği yayma preparatları incelendiğinde eritrositer ve lökositler seri hücrelerde, periferik kan hücrelerinde ki gibi belirgin azalma olduğu da gözlenmiştir. Kemik iliği işlevlerinin baskılanması ile ortaya çıkan, çoğunlukla da kök hücrelerin yetersizliği ile veya baskılanması ile hiposellüler bir ilik oluşmaktadır. Hiposellüler ilik ile birlikte anemi de ortaya çıktığı bilinmektedir [57, 59]. Bu bulguların sonucunda aplastik aneminin geliştiği açıktır. Bizim yaptığımız bu çalışmanın bulguları sonucunda deney hayvanlarımızda aplastik aneminin geliştiği söylenebilir. Bazı ajanların yol açtığı kemik iliği zedelenmesi, doza bağımlı ve geri döneşebilen tipte olmaktadır. Bu deney grubunda antineoplastik ilaçlar (alkilleyici ajanlarve antimetabolitler), benzen ve kloromfenikol bulunmaktadır [57, 59]. Bizim çalışmamızda aplastik aneminin oluşum sebebi, myelotoksik bir ajan olan benzen olduğu açıktır.

Lezama ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; 2 ml/kg (1940 mg/kg) benzeni mısır yağı ile birlikte deney hayvanlarının deri altına enjekte edilmiştir. Enjeksiyonu 10, 15 ve 20 doz olarak gerçekleştirmişler, çalışma sonunda kan hücrelerindeki azalma, kemik iliği eritrositer ve lökositler seri hücrelerdeki azalmayı görmüşler ve çalışma sonunda benzenin aplastik anemiye sebep olduğunu göstermişlerdir [2]. Ayrıca yapılan bir çok çalışma da benzenin aplastik anemiye yol açtığı da gösterilmiştir [2, 8, 46, 48-51].

Wind ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada deney hayvanları 1, 10, 30, 300 ppm benzene günde 6 saat, haftanın 5 günü ve 13 hafta boyunca soluma yoluyla maruz bırakılmışlardır. 300 ppm benzene maruz kalan deney hayvanlarının eritrosit hücrelerinin morfolojilerinde değişiklik olduğunu gözlemişlerdir. Bu morfolojik değişimleri polichromia, anisocytosis, poiklocytosis, echinocytosis olduğunu bildirmişlerdir [58].

Çalışmamızda kan hücre sayımlarındaki azalmanın yanı sıra kan yayma preparatları incelendiğinde, eritrosit morfolojilerinde deformasyon olduğu gözlenmiştir. Deney sonucunda oluşan bu bulgular, yine birçok benzenin hematopoietik dokular üzerine etkilerini araştıran araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir [53-56].

Periferik kan ve kemik iliğinde yaptığımız yayma preparatlar üzerinde yaptığımız mikroskopik incelemeler sonucunda, tespit ettiğimiz bulgular, benzenin periferik kanda ve kemik iliğinde araştırmacılar tarafından ileri sürülen bulgularla benzerlik göstermektedir. Kemik iliği eritrositer ve lökositler seri hücrelerinde azalma, eritropeni, lökopeni ve hücre morfolojilerindeki anomaliler anisocytosis, poiklocytosis, echinocytosis, polichomia gibi bulgular bizim çalışmalarımızda da gözlemlediğimiz bulgulardır.

Çalışmamızda benzenin sıçanlara intraperitoneal enjeksiyonu 10. haftadan sonra kestiğimiz için, hiçbir kanser vakasına rastlanamamıştır. Bu nedenle kanserin oluşması için doz-süre bağlantısının önemli olduğunu düşünmekteyiz. Bu yaklaşımla uygulama süresi ve uygulanan dozların kanser oluşumunda önemli rol oynadığı sonucu çıkarılabilir.

Benzenin kansere yol açtığı özellikle lösemiye sebep olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir [7,8]. Fakat lösemi gibi ve diğer kanser tiplerinin oluşması, benzenin uzun süreli uygulanması ile görülmüştür.

Aksoy, benzenin lösemiye yol açtığını, benzen ile birebir maruz kalan insanlarda daha sık oranda rastlandığını, İstanbul'da ayakkabı sektöründe çalışan ve benzene çalışma koşulları nedeni ile soluma yolu ile yüksek oranda maruz kalan işçilerde lösemi vakalarının görüldüğünü istatistiksel olarak göstermiştir [6].

Araştırmacılar, çeşitli deney hayvanları üzerinde yaptıkları çalışmalarını ile benzenin lösemi başta olmak üzere, çeşitli tip kanser oluşturduğunu bildirmektedirler [60-64].

Snyder ve arkadaşları 300 ppm benzeni günde 6 saat, haftada 5 gün ve 32 hafta boyunca farelere solunum yolu ile vermiş ve bu çalışma sonucunda myeloblastik lösemi oluştuğunu gözlemişlerdir [56].

Maltoni ve Scarnata benzen ile yaptıkları bir çalışmada; deney hayvanlarına benzeni zeytinyağı içinde hazırlayarak ağız yolu ile hayvanlara uygulamışlardır. Günde 4-5 defa, haftada 7 gün ve 52 hafta boyunca 50 ve 250 mg/kg benzeni deney hayvanlarına verilen, çalışmanın sonunda, 144. haftadan sonra ratlarda zymbal gland carsinoma, mamary carsinoma ve lösemi geliştiğini tespit etmişlerdir [60].

Dünya sağlık örgütü tarafından yayınlanan bir çalışma da, deney hayvanlarına benzen (0,001 ml), 0,1 ml zeytinyağı içine konularak deri altı enjeksiyonu uygulanmıştır. Benzen (0,001 ml), 0,1 ml zeytinyağı içine konularak deney Bu şekilde deri altı enjeksiyonları deney hayvanları yaşadıkları sürece her hafta gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda yine deney hayvanları içinde lösemi vakaları ortaya çıkmıştır [64].

Yapılan bu tüm çalışmaların ortak olan özelliği benzenin bu çalışmalarda deney hayvanlarına uzun süreli uygulanmasıdır. Verdiğimiz üç örnekte benzenin uygulanış şekilleri farklı olmasına rağmen (inhalasyon, oral, subcutan), uzun süreli yapılan çalışmalar sonucunda, yani benzene uzun süreli maruz kalmalar neticesinde kanser vakaları ortaya çıkmaktadır. Bizim yaptığımız çalışmada lösemi oluşmamasının sebebi, deney hayvanlarımıza benzenin uzun süre uygulanmayıp 10. hafta sonunda kesilmesi gösterilebilir. Buna rağmen çalışmamız da kısa süreli benzen etkileri ortaya çıkmıştır.

Benzen bilinen diğer karsinojenler gibi DNA'ya bağlanıp nokta mutasyonlar yapmaz. Benzenin lösemiye nasıl sebep olduğu Smith tarafından 1996 yılında yayınladığı bir makalede verilmiştir. Benzen karaciğerde sitokrom P-450 yoluyla fenolik metabolitlerine ayrılır. Fenolik bileşikler kemik iliğinde peroksidaz enzimi ile quinonlara ve serbest radikallerine ayrılır. Bu bileşiklerin kemik iliğindeki moleküler hedefleri tubulin, topoizomeraz II, histonlar ve

DNA'dır. Bu bileşikler DNA ipliğinde kırılmalar, mitotik rekombinasyonlar, anöploidi ve kromozom translokasyonları oluştururlar. Bunun sonucunda kök hücrelerde gen füzyonları, supressör gen inaktivasyonu ve protooncogen aktivasyonu oluşur. Tüm bu olayların sonucunda lösemik klonlar ve lösemi oluşur [24].

Dalak dokusuna ait görüntülerden çıkan bulgular incelendiğinde en önemli bulgunun dalak kırmızı pulpasındaki eritrosit hücre yoğunluğunun artmasıdır. Ayrıca dalak hacminin artması benzen uygulanmasının sonucu olduğu söylenebilir. Dalakta yıpranmış, ömür süresi dolmuş ve hasara uğramış eritrositlerin parçalandığı göz önüne alınırsa, dalak fonksiyonlarında benzen ile birlikte artış olduğu gözlenmiştir. Büyümüş bir dalak, kanın şekilli elemanlarından biri veya birkaçını aşırı şekilde yok ederek anemi, lökopeni veya trombositopeni ile sonuçlanabilir. Bu durum hipersplenizm olarak bilinmektedir [57].

Yapılan birçok çalışmada, dalak hücre yoğunluğuna benzenin etkilediği ve hücre yoğunluğunu azalttığı ortaya çıkmıştır [65-67]. Robinson ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 4 hafta boyunca , haftada 5 gün ve günde 6 saat 400 ppm benzene deney hayvanları inhalasyon yolu ile maruz bırakılmışlardır. Deney sonucunda yapılan dalak incelemelerinde dalak hücre yoğunluğunun %29 azaldığı ortaya çıkmıştır [65]. Dalak hücre yoğunluğunun azalmasının sebebi vücutta ayrıştığı fenolik bileşiklerinin immünotoksik etkileri olduğu söylenebilir.

Benzenin dalak hücre yoğunluğunun azaltmasının yanısıra, dalakta histopatolojik etkiler yaptığı bilinmektedir [53]. Bizim yaptığımız çalışmada rat-4'e ait dalak dokusunun kapsüla bölgesinde kistik bir yapı gözlenmiştir. Bunun sonucu olarak benzenin dalakta hiperplazi oluşturduğu söylenebilir. Birçok araştırmacı tarafından benzenin dalakta hiperplazi oluşturduğu bildirilmiştir [56, 62].

Snyder ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada benzenin dalakta hiperplazi meydana getirdiğini göstermişlerdir. Bu amaçla deney hayvanlarına yaşam süreleri boyunca haftada 5 gün ve günde 6 saat boyunca 100 ppm benzeni soluma yolu ile uygulamışlar ve yaptıkları bu çalışma sonunda dalakta hiperplazi oluştuğunu görmüşlerdir [62]. Bizde rat-4'teki bu kistik yapıyı benzenin toksik

etkisi sonucu vücut tarafından verilmiş bir cevap olan hiperplazi oluşumu olarak tanımlayabiliriz.

Tüm bu çalışmanın sonucunda benzenin kansere sebep olabilmesi için benzene uzun süreli maruz kalınması gerektiği, ayrıca doza ve hassasiyete bağlı olarak değiştiği açık olarak görülmüştür. Bunun yanı sıra kısa süreli benzene maruz kalma sonucunda anemi, kemik iliği işlevlerinde bozukluklar ve hatta splenik hiperplazi gibi sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Benzen zehirlenmesine maruz kalmamak ve üzerimizde toksik etkilerinin oluşmaması için benzen inhalasyonunu minimuma düzeye çekmek gerekmektedir. Yapılan birçok çalışma ile birlikte bizim yaptığımız bu çalışmada da benzenin hematotoksik ve karsinojenik etkilere sahip bir kimyasal olduğu ortaya çıkmıştır. Ancak, benzen farklı amaç ve yollarla çalışmalara açık bir konu olmaya devam etmektedir.

KAYNAKLAR

1. MEDİNSKY, M. A., KEYON E. M., SCHLOSSER, P. M., Benzene; *A Case Study in Parent Chemical and Metabolite Interactions*, Toxicology, **105**, 225-233, (1995).
2. LEZAMA, R. V., ESCARCÍA, E. B., TARRES, A. M., *A Model for the Induction of Aplastic Anemia by subcutaneous Administration of Benzene in Mice*, Toxicology, **162**, 179-191, (2001).
3. MEDINSKY, M. A., SABOURIN, P.S., LUCIER, G., BIRNBOUM, L.S. ve HENDERSON, R.F., *A Physiological Model for Simulation of Benzene Metabolism by Rats and Mice*, Toxicol. Appl. Pharmacol, **99**, 193-206, (1989).
4. EASTMOND, D. A., SMITH, M.T. ve IRONS, R.D., *An Interaction of Benzene Metabolites Reproduces the Myelotoxicity Observed With Benzene Exposure*, Toxicol. Appl. Pharmacol, **91**, 85-95, (1987).
5. BARALE, R., MARAZZINI, A., BETTI, C., VANGELISTI, V., LAPRIENO, N. ANDBARRA, I., *Genotoxicity of Two Metabolites of Benzene: Phenol and Hydroquinone Show Strong Synergistic Effects In Vivo*, Mutat. Res., **244**, 15-20, (1990).
6. AKSOY, M., *Benzene as a Leukemogenic and Carcinogenic Agent*, American Journal of Industrial Medicine, **8**, 9-20, (1985).
7. FARRİS, G.M., ROBINSON, S.N., GAIDO, K.W., WONG, B.A., WONG, V.A., *Benzene Induced Hematotoxicity and Bone marrow Compensation in B6C3F1 Mice*, Fundamental and Applied Toxicology, **36**, 119-129, (1997).
8. ROSENTHAL, G.J. ve SNYDER, C.A., *The Effects of Ethanol and Role of the Spleen During Benzene-Induced Hematotoxicity*, Toxicology, **30**, 283-295, (1984).
9. McCANNEL, E., E., *Environmental health Criteria 150 Benzene*, IPSC (International Programme On Chemical Safety), World Health Organization Geneva, North Carolina, USA, (1993).

10. ULUTAŞ, İ., *Anatomi Ders Kitabı (Dolaşım Sistemi ve İç Salgı Bezlerinin Anatomisi)*, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, 4.Baskı, Rekfo-İzmir, (1984).
11. BİRVAR, K. ve DERGİN, Ç., *Topoğrafik Anatomi (Ders Kitabı)*, İstanbul Üniversitesi, Rektörlük No:3571, Fak. No:179.
12. ŞAMDAN, A.N., *Sıçanlarda Kastrasyon Sonrası Timus ve Dalakta Görülen Değişikliklerin Makroskopik ve Işık Mikroskopik Düzeyde Değerlendirilmesi*, Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Anatomi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ağustos, (1997).
13. SOLOMON, E.P., *İnsan Anatomisi ve Fizyolojisine Giriş*, Çeviri Editörü Doç. Dr.Bikem Süzen, Birol Basım Yayın Dağıtım ve Tic. LTD. ŞTİ., (1997).
14. ROITT, M.I, BROSTOFF, J. ve MOLE, D.K., *Immunology*, Gower Medical Publishing, London-New York, (1985).
15. AKTÜMSEK, A., *Anatomi ve Fizyoloji (İnsan Biyolojisi)*, 1. Basım, Nobel Yayın ve Dağıtım, Yayın no:171, Ankara, (2001).
16. ÇETİN, E.T., *İmmünoloji*, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Vakfı Yayını, No:1, İstanbul, (1981).
17. ERKOÇAK, A., *Özel Histoloji (Dolaşım/Lenfatik/İçsalgı/Üriner/Genital ve sinir sistemleri)*, Ankara Üniversitesi Tıp Fak. Yayınlarından, Sayı 389, Ankara Üniversitesi Basımevi, 3. Baskı, Ankara, (1980).
18. KARAÖZ, E., *Özel Histoloji*, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fak. Yayın No:29, Süleyman Demirel Üniversitesi Basımevi, Isparta, (2002)
19. ERBENGİ, T., *Histoloji-2*, 1.Basım, Beta Basım Yayıncılık A.Ş., İstanbul, (1985).
20. FAWCETT, D.W., *A Textbook of Histology*, Twelfth Edition, Chapman & Hall, New York-London, (1994).
21. GRAY, H., *Anatomy of the Human Body*, Thirteenth American Edition (Editor: Carmine D. Clemente), Leago Febiger, Philadelphia, (1985).
22. PAKER, Ş., *Histoloji*, Uludağ Üniversitesi Basımevi, Yayın No: 32, Bursa, (1990).
23. LEESON, T.S., LEESON, C.R. ve POPARO, A.A., *Atlas of Histology*, W.B. sounders Company, (1980).

24. NOYAN, A., *Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji*, 10. Baskı, Meteksan A.Ş., Mart (1998).
25. MURATHANOĞLU, O., *Histoloji*, İstanbul Üniversitesi Basımevi, İstanbul, (1996).
26. AKAY, M.T., *Genel Histoloji*, 5. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, (2001).
27. COŞKUN, A. ve ARAS, D., *Anatomi Histoloji Embriyoloji*, Nobel Tıp Kitapevleri LTD ŞTİ., (1998).
28. YILDIZ, E., *Ratlarda Formaldehitin Kemik İliği, Deri, Dalak, Karaciğer, Akciğer ve Böbrek Üzerine Etkisinin Histopatolojik Değerlendirilmesi*, Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fak., Patoloji ABD., Uzmanlık Tezi, Sivas, (1994).
29. ERBENGİ, T., ve ERDİNÇ, F., *Histoloji-1*, Editör Türkan Erbenği, Feryal mat., Güneş Kitapevi, (1992).
30. AYDIN, E.Y., *Benzen ve Hidrokinonun Megakaryositopoez ve Trombositopoeze Etkileri*, Anadolu Üniv., Sağlık Bilimleri Ens., Yüksek Lisans Tezi, 1-10, (Şubat 1989).
31. ÜNSAL, A., *Eskişehir'de Benzenli Materyal Kullanılan Çeşitli İş Yerlerinde Benzen Sorunu*, Anadolu Üniv., Tıp fak., Uzmanlık Tezi, 6-14, Esk., (1990).
32. SMITH, M.T., *The Mechanism of Benzene-induced Leukemia a Hypothesis and Speculations on the Causes Of Leukemia*, Environmental Health Perspectives, **104**, 6, 1-12, December , (1996).
33. ŞAHİNTÜRK, V., ERÇAKIR, M., KOYUNCU, D., UYSAL, O., SARIBOYACI, A.E., *Histoloji Ve Embriyoloji Laboratuvar Kılavuzu*, Osmangazi Üniv., Tıp Fak., Histoloji Embriyoloji ABD., 1-2, Esk., (1999).
34. UYANOĞLU, M., *Antimitotik Olduğu Düşünülen Bazı Kimyasalların Retikuloendotelial Sistem (RES) Üzerine Etkileri*, Anadolu Üniv., Fen Bilimleri Ens., Yüksek Lisans Tezi, Esk., (1997).
35. BANCROFT, J.D., ve STEVENS, A., *Theory and Practise of Histological Techniques*, New York, (1977).

36. SUQUAREZ, S., RUBIO, A., et al, *Sister Chromatid Exchanges and Micronuclei Analysis in Lymphocytes of Men Exposed to Simazine Through Drinking Water*, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, **537**, 2, 141-149, (2003).
- 37.ÇAKMAK, E.A, *Aflatoksin B₁ in İmmünoolojik Etkileri*, Anadolu Ün., Sağlık Bilimleri Ens., 27-30, Ocak, (1993).
- 38.TÜYLÜ, B.A., Bazı İlaç Öncül Maddelerinin Mutajenik Etkilerinin Bakteriyal ve Hücre Kültürü Testleri İle Araştırılması, Anadolu Ün., Fen Bilimleri Ens., Doktora Tezi, Eylül, (2001).
- 39.DÜNDAR, Y., ve ASLAN, R., *Hekimlik Temel Eğitiminde Biyokimya-Fizyoloji Laboratuvarı*, Afyon Kocatepe Ün. Yayınları, Yayın No:13, 122-126, 143-145, Afyon, (1998).
- 40.ONUR, M.A., *Fizyoloji Laboratuvar Kılavuzu*, Hacettepe Ün. Fen Fak. Basım evi, Ankara, (1991).
- 41.TAMER, A.Ü., UÇAR, F., ÜNVER, E., KARABAŞ, İ., BURSALIOĞLU, M., OĞULTEKİN, R., *Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu*, Anadolu ün., Eskişehir (1989).
- 42.KOPARAL, A.T., *Hücrelerdeki Transformasyon Gelişiminin moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi*, Anadolu ün., Fen Bilimleri Ens., Doktora Tezi, Eylül (2001).
- 43.YILDIZ, E., *Ratlarda Formaldehitin Kemik İliği, Deri, Dalak, Karaciğer, Akciğer ve Böbrek Üzerine Etkisinin Histopatolojik Değerlendirilmesi*, Cumhuriyet Ün., Tıp fak., Uzmanlık Tezi, (1994).
- 44.CRONKİTE, E.P., *Benzene Hematotoxicity and Leukemogenesis*, Blood Cells, **12**, 129-137, (1986).
- 45.SCHUURMAN, H., KUPER, C.F., VOS, J.G., *Histopatology of the Immune System as a Tool to Asses Immunotoxicity*, Toxicology, **86**, 187-212, (1994).
- 46.AKSOY, M., *Hematotoxicity and Carcinogenicity of Benzene*, Environmental Health Perspectives, **82**, 193-197, (1989).

49. DEİCHMANN, W.B., et al., *The hemopoietic Toxicity of Benzene Vapors*, Toxicol. Appl. Pharmacol., **5**, 201, 1963.
50. SNYDER, C.A., et al., *Hematotoxicity of Inhaled Benzene to Sprague-Dawley Rats and AKR Mice at 300 ppm*, Journal Toxicol. Environ. Health, **4**, 605, 1978.
51. DUPRAT, P. ve Gradijhi, D., *Benzene Poisoning the Rat Cytochemical Study of Peripheral Blood. Analysis of the Renewal of Marrow Cells*, Arch. Mol. , **39**, 445, 1978.
52. NAU, C.A., diğerleri, *Ca-C12 Fractions Obtained From Petroleum Distillates. An Evaluation of Their Potential Toxicity*, Arch. Environ. Health, **12**, 382, 1966.
53. WOLF, M.A., diğerleri, *Toxicological Studies of Certain Alkylated benzenes and benzene*, A.M.A. Arch. Ind: Health, **14**, 387, 1956.
54. GREEN, J.D., diğerleri, *Acute and Chronic Dose/Response Effects of Benzene Inhalation on the Peripheral Blood, Bone Marrow and Spleen Cells of CD-1 Male Mice*, Toxicol. Appl. Pharmacol, **59**, 204, 1981.
55. BEARSON, K.A., Snyder, C.A., Green, J.D., diğerleri, *The Hematotoxicity Effects of Inhaled Benzene on Pheripheral Blood, Bone Marrow and Spleen Cells are Increased By Ingested Ethanol*, Toxicol. Appl. Pharmacol, **64**, 393-404, 1982.
56. SNYDER, C.A., Goldstein, B.D., Sellakumar, A., diğerleri, *Toxicity of Chronic benzene inhalation: CD-1 Mice Exposed to 300 ppm*, Bull. Environ. Canton. Toxicol., **29**, 385-391, 1982.
57. KUMAR, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L., *Basic Patology*, Temel Patoloji, Editör: Uğur evikbağ, Nobel&Yüce, 5.baskı, 1992.
58. WIND, C.O., Kuna, R.A. ve Snyder, N.K., et al., *Subchronic Inhalation Toxicity of Benzene in Rats and Mice*, Am. J. Ind. Med., **7**, 457-473, 1985.
59. *Patoloji Ders Notları*, Metay Yayıncılık, 105, 1997.
60. MALTONİ, C. ve Scarnato, C., *First Experimental Demonstration of the Carcinogenic effects of Benzene. Long-term Bioassays on Sprague-Dawley Rats by Oral Administration*, Med. Lav., **70**, 352, 1979.

58. WIND, C.O., KUNA, R.A. ve SNYDER, N.K., et al., *Subchronic Inhalation Toxicity of Benzene in Rats and Mice*, Am. J. Ind. Med., **7**, 457-473, (1985).
59. *Patoloji Ders Notları*, Metay Yayıncılık, 105, (1997).
60. MALTONI, C. ve SCARNATO, C., *First Experimental Demonstration of the Carcinogenic effects of Benzene. Long-term Bioassays on Sprague-Dawley Rats by Oral Administration*, Med. Lav., **70**, 352, (1979).
61. GOLDSTEIN, B.D., SNYDER, C.A., LASKIN, S., et al., *Myelogenous Leukemia in Rodents Inhaling Benzene*, Toxicol. Lett., **13**, 169-173, (1982).
62. SNYDER, C.A., GOLDESTEIN, B.D., et al., *Evidence For Hematotoxicity and Tumorigenesis in Rats Exposed to 100 ppm Benzene*, Am. J. Ind. Med., **5**, 429-439, (1984).
63. MALTONI, C., CONTI, B. ve COTTI, G., et al., *Experimental Studies on Benzene Carcinogenicity at the Bologna Institute Of Oncology Current Results and Ongoing Research*, Am. J. Ind. Med., **7**, 415-446, (1985).
64. *Evaluations of the Carcinogenic Risk of Chemicals To Man*, IARC Monographs Index, **7**, WHO Publications Centre, U.S.A., Albany, NY., (1974).
65. ROBINSON, S.N., SHAH, R., et al., *Immunotoxicological Effects of Benzene Inhalation in Male Sprague-Dawley Rats*, Toxicology, **119**, 227-237, (1997).
66. FARRIS, G.M., ROBINSON, N.S., et al., *Effects of Benzene on Splenic, Thymic and Femoral Lymphocytes in Mice*, Toxicology, **118**, 137-148, (1997).
67. PLAPPERT, U., BARTHEL, N.S., et al., *Early Effects of Benzene Exposure in Mice. Hematological versus genotoxic effects*, **68**, 284-290, (1990).