

## Farklı Isı Derecelerinin Kan Hücrelerinin Morfolojisi ve Yaşam Süresine Olan Etkisinin Değerlendirilmesi

Evaluation of the Effects of Different Temperatures on Blood Cells' Morphology and Life Time.

Serpil ERDEM<sup>1</sup>, Murat TOSUN<sup>1</sup>, Ayhan VURMAZ<sup>2</sup>, Tülay KÖKEN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji Embriyoloji AD, Afyonkarahisar

<sup>2</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya AD, Afyonkarahisar

Geliş Tarihi / Received: 08.07.2013 Kabul Tarihi / Accepted: 18.07.2013

### ÖZET

**Amaç:** Kandaki ısı değişikliklerinin kan hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişiklikleri incelemek apoptotik ölümlerini değerlendirmektir.

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

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

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

**Anahtar Kelimeler:** Apoptozis; hipertermi; ısı şoku proteinleri; immunohistokimya; programlı hücre ölümü.

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study is to evaluate the effects of heat changes in blood tissue on blood cells' morphology and apoptotic cell death.

**Material and Methods:** The blood samples taken from quite healthy 6 women and 6 men from 18 to 25 years old have been used. These samples were assembled into 7 subgroups within itself and by increasing the temperature 2°C per hour, all the samples' heat was raised from 37°C to 43°C. During the heating, some part of the sample that was heated to 39°C was cooled to 37°C after an hour; this same process was applied on the samples that were heated to 41°C and 43°C. At the end of incubations 2 smears was prepared and stained with Giemsa and TUNEL based kit. Also, all of blood samples' content was counted and biochemically, HSP70 titer was measured.

**Results:** It was confirmed that high temperature induced apoptotic cellular death rate in leukocytes. It was also seen that in the groups with decreasing the death of the cells increased. Besides, there were no significant differences between the levels of HSP70 in all groups. At last, all of the data got from all criteria revealed that there were no significant differences between women and men.

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

**Keywords:** Apoptosis; hyperthermia; heat shock proteins; immunohistochemistry; programmed cell death.

## GİRİŞ

Vücutta hemen her hücre yaşam döngüsü içinde doğar, çoğalır, gerektiğinde farklılaşır ve ölür. Bütün bu olaylar doğal bir denge halinde sürekli meydana gelir (1). Canlılığın temel karakterlerinden biri olan ölüm gerek hücre gerekse organizma bazında her zaman karşılaşılan bir olaydır (2). Nekrotik hücre ölümü ve programlı hücre ölümü yani apoptozis olmak üzere temel olarak iki tip hücre ölümü vardır (3). Son yıllarda yeni hücre ölüm tipleri tanımlanmakla birlikte literatürde temel olarak kabul edilmiş bu hücre ölüm şekilleri organizmanın farklı durumlarında farklı yollardan aktive edilmek suretiyle organizma içindeki hücrel yaşam döngüsünü değiştirirler. Hücre ölümü ile ilgili ilk bilgiler ışık mikroskopunun ve yeni boyama yöntemlerinin keşfiyle başlamış ve ilk olarak nekroz adı verilen hücre ölüm tipi tanımlanmıştır (4). Nekroz uzun yıllar detaylı araştırmalara konu olduğu halde, fizyolojik hücre ölümü olan apoptozis bu süreçte uzun yıllar üzerinde az durulmuş fizyolojik bir süreç olarak kalmıştır. İlk olarak Kerr, Wyllie ve Currie adlı patologların detaylı olarak tanımladığı apoptozis, erken mitokondriyal değişiklik, hücre büzüşmesi, kromatin yoğunlaşması, nükleer kırılma, hücre zar şişmesi, kaspaz aktivasyonu, fosfatidylserin'in hücre zarı dış yüzeyine çıkması ("eat me" signaling) çekirdek parçalanması ve bunun sonucunda apoptotik cisimciklerin oluşması gibi art arda birçok morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle karakterizedir (5, 6). Bununla birlikte, önemli olarak, apoptotik hücre veya cisimciklerin hücre zarları hasarlanmadığı ve hemen savunma hücreleri tarafından fagosite edildiği için bölgede enflamasyon oluşmamaktadır (6). Apoptozis patolojik süreçlerde koruyucu görev görme yanında fizyolojik gelişim sürecinde de çok önemli bir süreçtir. Dokulardaki hücre sayısını belirleyici homeostatik mekanizma olarak kabul edilen apoptozis embriyogenez ve fetogenez sırasında normal gelişimin sağlanabilmesi amacıyla, işlevlerini yerine getiremeyecek ya da bir tümör şeklinde gelişebilecek, yaşlı hasar görmüş ya da anormal hücrelerin ortadan kaldırılmasında, erişkinde hormona bağlı involüsyon durumlarında, sürekli çoğalan hücre gruplarının azaltılmasında, hücrelerin hastalık ve zararlı ajanlara bağlı zedelenmesinde, pankreas, parotis ve böbrek gibi organlarda kanal obstrüksiyonlarına bağlı gelişen atrofilerde, hücrel immün red reaksiyonlarında aktif olarak görülür (7- 10). Bununla birlikte iyonize radyasyon, oksidatif stres, sitotoksik antikanser ilaçları, sitokinler, hafif hipoksi ve hipertermi durumlarında da apoptozisin indüklendiği gözlenmiştir (11- 13).

Heat Shock Protein (HSP) adı verilen ısı şoku proteinleri vücutta bazı fizyolojik veya patolojik streslerde ortaya çıkan proteinlerdir. Bu nedenle bu proteinler Protein Şaperonlar veya Moleküler Gardiyanlar olarak da adlandırılırlar. Hücrel fonksiyonların sürdürülmesi ve yapısal proteinlerin bütünlüğünün korunmasına yardımcı olan bu proteinler sitoplazma ve nükleusta yer alırlar (14, 15). Bu proteinlerin ısı dışında iskemi, hipoglisemi, hipoksi ve hücrel toksinler gibi stres kaynaklarınca da harekete geçirilebildikleri belirtilmiştir (16). Bununla birlikte, stressiz durumlarda fizyolojik düzenleyici olarak da görev yapabilirler ve hücre siklusunda, farklılaşmada, embriyogenezde ve büyüme faktörlerinin uyarılmasında da etkin rol oynarlar (17).

Kan dokusu insan organizmasındaki en önemli dokulardan bir tanesidir. Vücut içinde gelişen fizyolojik ve nonfizyolojik süreçlerin hemen tamamı kan dokusu aracılığı ile efektör organları uyarmakta ve bu uyarana bağlı olarak organizmayı korumak için organizma uygun yanıtlar üretmektedir. Ancak bazen hipersensitivite gibi durumlarda bu yanıtlar organizmayı bizzat tehlike altına da sokabilir. Vücut içinde sık olarak görülen nonfizyolojik süreçlerden bir tanesi de vücutta ısı artışıdır. Bu artış, şiddetine bağlı olarak, organizma üzerinde ciddi hasarlar oluşturabilir. Genellikle enfeksiyon kökenli etkenlere bağlı olarak fizyolojik olarak artan vücut ısısı organizma tarafından yeterli miktarda kontrol altında tutulamazsa vücut hücrelerinde hasarlanmalara ve ölüme neden olabilir ve nonfizyolojik bir etki karşımıza çıkabilir. Bununla birlikte günümüzde malign hastalıklarda kan dokusu ısısının artırılması prensibine dayanan hipertermi tedavisi uygulanmak suretiyle başta lösemi olmak üzere bazı tümörlerin gelişimi oldukça azaltılmakta ve hatta uzun süreli remisyonlar sağlanabilmektedir.

Bu çalışmamızda amacımız vücut sıcaklığında görülen yükselmelere bağlı olarak artan kan dokusu ısısının kan dokusu hücreleri üzerinde oluşturduğu morfolojik etkileri ışık mikroskopik düzeyde inceleyebilmektir. Bu etkinin incelenmesinde öncelikle lökositlerin fizyolojik ölümü ve eritrositer seride görülen değişiklikler ve tüm kan hücrelerinin genel sayılarında ve oranlarında görülen değişiklikler erkek ve kadın deneklerde karşılaştırmalı olacak şekilde incelenmiştir. Ayrıca vücudu ısı şokuna karşı koruyan faktörlerden biri olan HSP70 isimli şaperonunda bu ısı değişim sürecindeki etkisi ve kan düzeylerindeki değişimi incelenmiştir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması:

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

Çalışmada yaşları 18-25 arasında olan; herhangi bir kronik hastalığı veya akut tedavi gerektiren bir rahatsızlığı bulunmayan, 2 haftadır herhangi bir ilaç kullanmamış, tamamen sağlıklı 6 kadın ve 6 erkek'ten alınan kan örnekleri kullanıldı. Kan örneklerinin alınmasından önce etik kurul tarafından kabul edilmiş "Hasta Gönüllü Olur Formu" deneyde kan örnekleri kullanılacak olan tüm kişilere (deneklere) okutturularak imzalatıldı. Deneklerin her birinden 5'er adet 2 cc'lik kan örneği, içinde antikoagülan mevcut olan tüplere (Vacutainer, Beliver Ind. Est. Plymouth, UK) alındı. Alınan örnekler hemen 37°C'lik etüv içine konarak inkübasyona alındı. 1 saatlik inkübasyon sonunda her bir denekten alınan 5'er adet kan örneğinden 1'er tanesi inkübasyondan çıkartıldı ve etüv derecesi hemen 39°C'ye çıkartılarak diğer 4'er adet kan örneğinin inkübasyonlarına devam edildi. Bu anda 37°C'lik inkübasyondan alınan kan örneklerinden 2 adet lama (Superfrost, Thermo Fisher Scientific Inc, USA) periferik yayma yapıldı ve bunlardan biri May-Grünwald Giemsa boyası ile boyanıp ışık mikroskopunda hücre morfolojileri değerlendirildi. Diğer lam ise immunohistokimyasal olarak boyanarak apoptotik lökositlerin tespiti yapıldı. En son olarak aynı kan örneği tam kan sayımı (CBC) yapılmak suretiyle analiz edildi. Bu kan örneklerinin oluşturduğu veri grubu Grup 1 olarak isimlendirildi.

Etüvde 39°C inkübasyonu devam eden diğer örneklerden her deneğe ait bir grup kan örneği 1 saatlik inkübasyon sonunda etüvden çıkartıldı ve yukarıda anlatılan metodun aynısı kullanılmak suretiyle direkt periferik yayma ve immunohistokimyasal boyama lamları hazırlandı ve CBC profilleri ortaya kondu. Bu gruptan elde edilen veriler ise Grup 2 olarak isimlendirildi. Kan örnekleri etüvden alındıktan hemen sonra, etüv derecesi arttırılarak diğer 3 kan örneği 41°C'de inkübe edilmeye devam edildi. Bununla birlikte, 39°C'deki Grup 2'ye ait kan örneklerinden lamlar hazırlanıp CBC sayımı için örnek alındıktan hemen sonra bu kan örneği bu kez 37°C'lik etüve kondu ve burada 1 saat daha inkübe edildi. 1 saat sonunda bu kan örneklerinden yine 2 adet lama periferik yayma

ya yapıldı ve CBC kan sayımı yapıldı. Bu örneklerden elde edilen veriler Grup 3 olarak isimlendirildi.

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

Kan örnekleri etüvden alındıktan hemen sonra etüv derecesi arttırılarak diğer kan örnekleri bu kez 43°C'te inkübe edilmeye devam edildi. 43°C'lik 1 saatlik inkübasyonu tamamlanan kan örneklerinden yine periferik yaymalar hazırlandı ve CBC kan sayımları yapıldı. Buradan elde edilen veriler Grup 6 olarak isimlendirildi. Bu gruptan da periferik yayma ve CBC için kan örneği alındıktan hemen sonra aynı kan örneği bu kez 37°C'lik inkübatöre konularak 1 saat daha inkübe edildi. Inkübasyon sonunda bu örnekten de yapılan yayma ve CBC sayımlarından elde edilen veriler Grup 7 olarak isimlendirildi. Yapılan tüm metodoloji Tablo 1'de özetlenmiştir.

### Histolojik Değerlendirme:

#### Histokimyasal Boyama:

Örneklerden hazırlanan kan yaymaları % 70 metanolle tespit edildi ve May Grünwald-Giemsa boyaması ile histokimyasal olarak boyandı ve ışık mikroskobu altında hücre morfolojisi değerlendirildi.

#### Immunohistokimyasal Boyama:

Örneklerden hazırlanan kan yaymalarında lökositlerde görülmesi muhtemel apoptotik hücre ölümünün tespiti için ticari bir kit kullanılmak suretiyle preparatlar boyandı. Bu amaçla TUNEL bazlı DNA fragmentasyonunun tespitini sağlayan bir kit kullanıldı (Fragel QIA33, Calbiochem, Darmstadt). Boyama sürecinde öncelikle 1xTBS'te inkübe edilen yaymalar bu rehidratasyon işlemi sonrası Proteinase K 2 mg/ml ile permeabilize edildi ve diğer boyama protokolleri kit içeriğinde mevcut kılavuza göre yapılarak ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

**Tablo I:** Çalışmada oluşturulan grupların özellikleri ve uygulanan analiz metotları.

Gruplar	Uygulanan Isı Derecesi ve Süresi	Yapılan Analizler
Grup 1 (37 °C)	37 °C'de 1 saat inkübasyon	• Tam kan sayımı
Grup 2 (39 °C)	39 °C'de 1 saat inkübasyon	• Direkt periferik yayma
Grup 3 (39-37)	Grup:2'de örnekler 37 °C'de 1 saat daha inkübasyon	• İmmunohistokimyasal olarak apoptozis tespiti
Grup 4 (41 °C)	41 °C'de 1 saat inkübasyon	• HSP düzeyi tespiti
Grup 5 (41-37 °C)	Grup:4'de örnekler 37 °C'de 1 saat daha inkübasyon	
Grup 6 (43 °C)	43 °C'de 1 saat inkübasyon	
Grup 7 (43-37 °C)	Grup:4'de örnekler 37 °C'de 1 saat inkübasyon	

**Biyokimyasal Değerlendirme:****Biyokimyasal Analiz:**

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

Örneklerdeki eritrosit ve lökosit sayıları, lökosit alt grup oranları ve trombosit sayıları tespit edilmesi için gerekli CBC ölçümleri CBC ölçüm cihazı (Roche Diagnostics Sysmex XT-2000 I, Japan) kullanılmak suretiyle analiz edildi.

**İstatistiksel Analiz:**

Çalışma sonucu histolojik gözlem ve biyokimyasal değerler olarak elde edilen veriler birbirleriyle karşılaştırılarak istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı farklılık olup olmadığı incelendi. Bu amaçla One Way ANOVA metodu ve Post hoc test olarak da Tukey testi uygulandı. Öte yandan elde edilen verilerin erkek ve kadınlar arasında farklılık gösterip göstermediğini belirlemek için Mann-Whitney-U testi uygulandı. Gruplar arasındaki farklılık 0,05'den küçükse farklılık anlamlı olarak kabul edildi. Testlerin uygulanması için SPSS for Windows 15.0 istatistiksel analiz programı kullanıldı.

**BULGULAR**

Çalışma sonucu elde edilen materyallerin ışık mikroskopu altında değerlendirilmesinden elde edilen veriler ve kan örneklerinden biyokimyasal olarak elde

edilen veriler, istatistiksel olarak grup içi ve/veya gruplar arası olarak karşılaştırıldı.

Apoptotik indeksin değerlendirildiği ilk parametrede; apoptotik indeksin artan ısıya bağlı artış gösterdiği tespit edildi. Grup 1'de (Şekil IA-B) hiç apoptotik hücre olmamasına karşın, ısının giderek arttırıldığı diğer gruplarda (Grup:2 (Şekil IC-D), Grup:4 (Şekil IG-H) ve Grup: 6 (Şekil IIC-D)) giderek artan bir apoptotik hücre sayısı tespit edildi. Ancak, artış Grup:1 ile Grup:2 arasında istatistiksel olarak anlamlı olmamasına karşın ( $p>0,05$ ), Grup:1 ile Grup:4 ve Grup:6 arasında anlamlıydı (sırasıyla  $p=0,007$  ve  $p=0,000$ ). Öte yandan Grup:2 ve Grup:4 ile sadece Grup:6 arasında anlamlı farklılık vardı (sırasıyla  $p=0,000$ , ve  $p=0,026$ ). Isının giderek arttırıldığı diğer tüm grup karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik mevcut değildi ( $p>0,05$ ). Bu parametrenin değerlendirildiği tanımlayıcı veriler Tablo II'de verilmiştir.

Bununla birlikte, ısının düşürüldüğü gruplarda Grup:3'de (Şekil IE-F) apoptotik hücre sayısının azalmasına karşın ( $p>0,05$ ); diğer 2 grup olan Grup:5 (Şekil IIA-B) ve Grup:7 (Şekil IIE-F)'de anlamlı olarak hızla artması dikkat çekiciydi (tüm diğer gruplarla karşılaştırıldığında hepsi için  $p=0,000$ ).

CBC ölçümlerinin değerlendirildiği 2. parametrede; CBC sayımı sonucu gruplardaki örneklerden elde edilen veriler arasında eritrosit, lökosit ve trombosit sayılarının ve lökosit alt gruplarının oranlarının arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olup

**Isı Değişikliklerinin Kan Hücrelerine Etkisi**  
*The Effects of Heat Changes on Blood Cells*

olmadığı araştırıldı. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda elde edilen değerlerin ortalamalarının arasında belirgin bir farklılık olmadığı ve tüm gruplar arasında artan ısı derecelerine veya ısı düşürmelerine bağlı hiçbir anlamlı değişim olmadığı tespit edildi ( $p>0,05$ ).

HSP düzeylerinin karşılaştırıldığı 3. parametrede ise, yine tüm gruplar arasında HSP70 değerleri ortalamalarında belirgin bir değişiklik olmadığı ve bu değerlerde artan ısı derecelerine veya ısı düşürmelerine bağlı hiçbir anlamlı değişim olmadığı tespit edildi ( $p>0,05$ ). Bu parametrenin değerlendirildiği tanımlayıcı veriler Tablo III'de verilmiştir.

HSP70 değerlerinin karşılaştırılmasında da kadın ve erkek deneklerden elde edilen veriler arasında anlamlı farklılık olmadığı belirlendi ( $p>0,05$ ).

Elde edilen verilerin kadın veya erkek arasında anlamlı bir değişiklik gösterip göstermediğinin araştırıldı.

4. ve son parametrede ise; immunohistokimyasal ve Giemsa boyama ile elde edilen ortalama apoptotik indeks değerlerinin erkek ve kadınlar arasında anlamlı farklılık göstermediği tespit edildi ( $p>0,05$ ). Diğer yandan, CBC ölçümlerinin karşılaştırıldığı analizlerde tüm gruplarda RBC sayılarının, Hemoglobin ve Hematokrit oranlarının kadın deneklerde erkek deneklere göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ( $p<0,05$ ). Bununla birlikte, diğer parametreler arasında anlamlı farklılık mevcut değildi ( $p>0,05$ ).

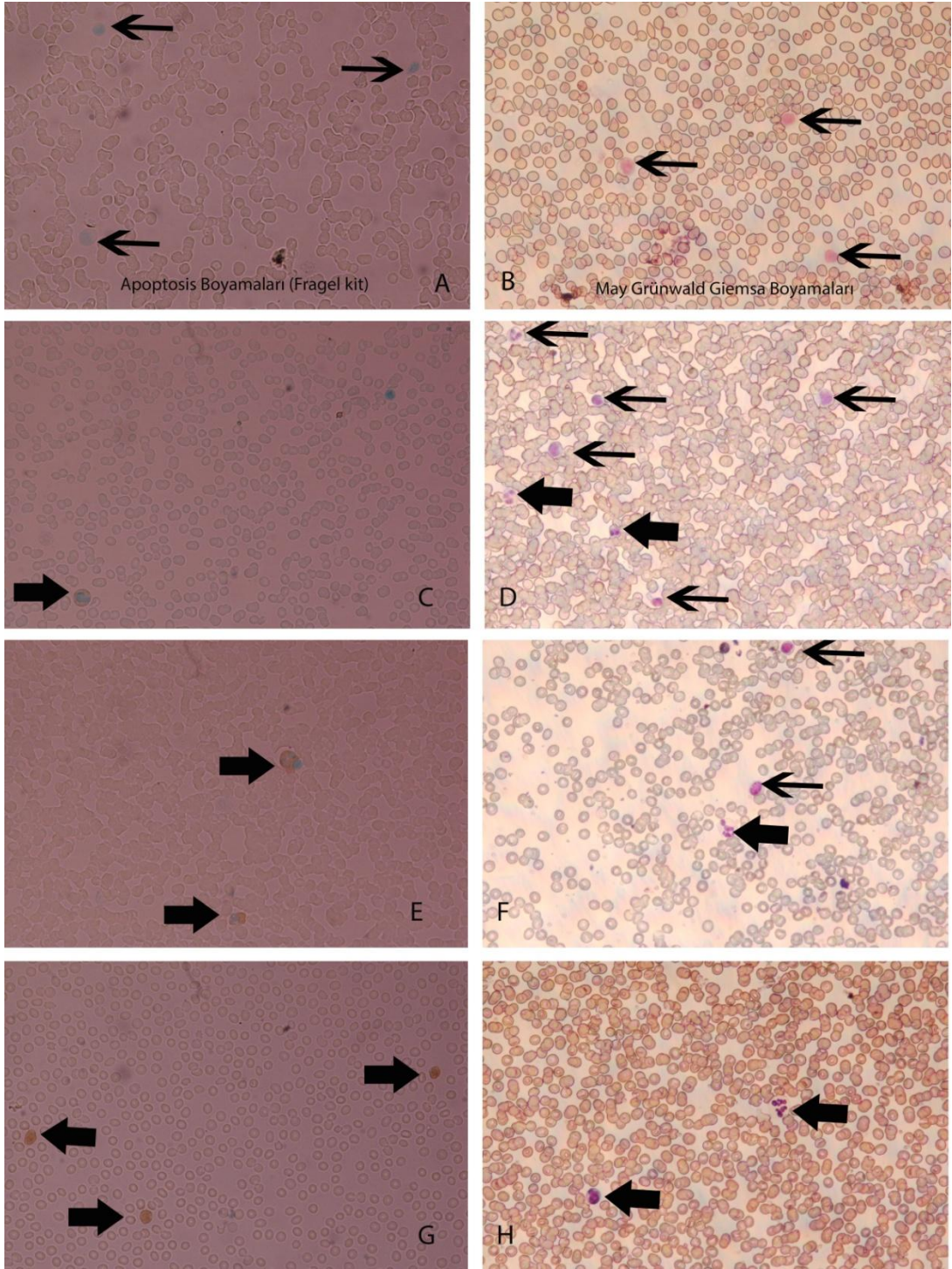
Çalışmamızda dikkati çeken bir diğer nokta, artan ısı derecelerine paralel olarak eritrosit dış zarlarının görünümünde bozulma, tırtıklı bir yapılanma, birbirlerine birçok bölgede sıkı sıkıya tutunma ve hatta bazı yerlerde yapışma gözlenmiş olması ve anizositoza kadar değişen yapısal görünüm bozuklukları tespit edilmiş olmasıydı.

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

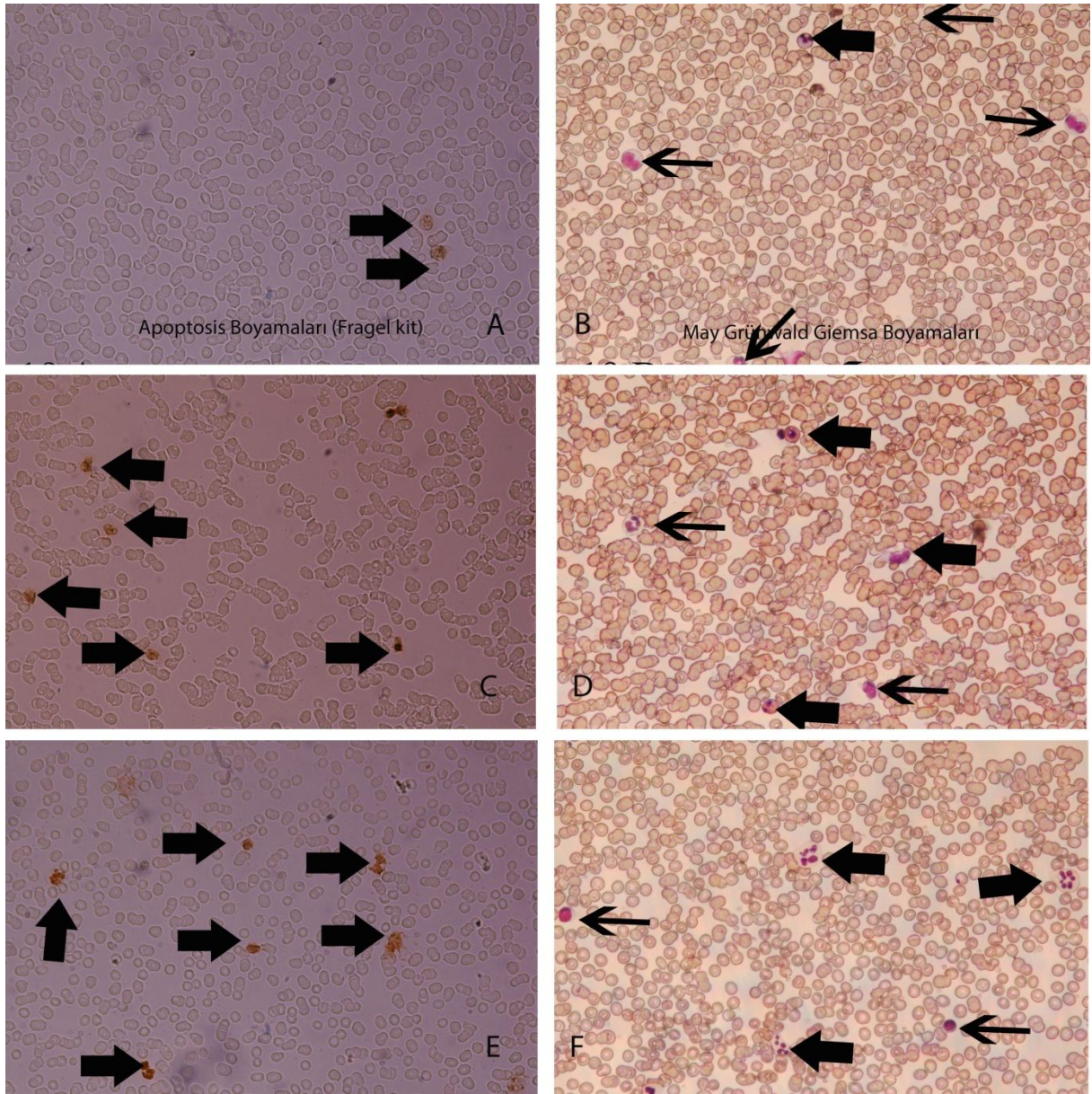
Grup	Denek	Ortalama	Standart	Standart	Minimum	Maksimum
1	12	0,000	0,000	0,000	0	0
2	12	5,833	3,182	0,919	2	12
3	12	4,167	2,249	0,649	1	8
4	12	9,417	4,358	1,258	3	17
5	12	35,750	9,077	2,621	22	53
6	12	17,750	5,956	1,719	8	29
7	12	50,000	10,962	3,165	27	67

**Tablo III:** HSP ölçümü sonucunda ele edilen tanımlayıcı veriler.

Grup	Denek Sayısı (n)	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata	Minimum Değer	Maksimum Değer
1	12	12,893	2,293	0,662	9,22	16,64
2	12	13,024	1,850	0,534	9,82	16,26
3	12	11,849	1,766	0,509	7,86	13,70
4	12	13,468	2,847	0,822	8,83	20,53
5	12	10,824	2,133	0,616	7,78	14,11
6	12	10,619	1,526	0,440	7,88	13,45
7	12	11,648	3,807	1,099	5,94	19,66



**Şekil 1:** IA-B: Grup:1'de periferik yaymanın görünümü (A=Fragel Kit B=May-Grünwald Giemsa). İnce oklar=Morfolojik olarak normal hücreler. x400., IC-D: Grup:2'de periferik yaymanın görünümü (A=Fragel Kit B=May-Grünwald Giemsa). İnce oklar=Morfolojik olarak normal hücreler. Kalın oklar=Apoptotik hücreler. x400, IE-F: Grup:3'de periferik yaymanın görünümü (A=Fragel Kit B=May-Grünwald Giemsa). İnce oklar=Morfolojik olarak normal hücreler. Kalın oklar=Apoptotik hücreler. x400, IG-H: Grup:4'de periferik yaymanın görünümü (A=Fragel Kit B=May-Grünwald Giemsa). Kalın oklar=Apoptotik hücreler. x400.



**Şekil II: A-B:** Grup:5'de periferik yaymanın görünümü (A=Fragel Kit B=May-Grünwald Giemsa). İnce oklar=Morfolojik olarak normal hücreler. Kalın oklar=Apoptotik hücreler. x400, **IC-D:** Grup:6'da periferik yaymanın görünümü (A=Fragel Kit B=May-Grünwald Giemsa). İnce oklar=Morfolojik olarak normal hücreler. Kalın oklar=Apoptotik hücreler. x400, **IIE-F:** Grup:7'de periferik yaymanın görünümü (A=Fragel Kit B=May-Grünwald Giemsa). İnce oklar=Morfolojik olarak normal hücreler. Kalın oklar=Apoptotik hücreler. x400.

### TARTIŞMA

Embriyonik dönemde dokuların şekillenmesi ve organların gelişiminde birçok fizyolojik fonksiyonların aktif hale gelmesinde aracı olan apoptozis, postnatal hayat sürecinde de birçok fizyolojik ve patolojik sürecin kontrolünde çok büyük öneme sahiptir (18). Vücutta faydalı olmayacak her türlü hücrenin elimine

edildiği bir ölüm şekli olan apoptozis, bu sayede vücudu malign hastalıklardan da koruyabilmektedir (2). Birçok intrinsek ve ekstrinsek faktörün etkisi altında ilerleyen ve/veya durdurulan apoptozis süreci radyasyon, yüksek ısı, toksik kimyasallar gibi farklı eksojen stres faktörlerinin etkisi altında aşırı uyarılmaktadır(5).

Bununla birlikte, bu uyarılar bazı durumlarda diğer bir ölüm şekli olan nekrozla da sonlanabilirler (7). Örneğin, yukarıda saydığımız faktörlerin dozu hafif olduğunda apoptozis tetiklenirken, aynı faktörlerin dozunun artırıldığında nekrozun tetiklendiği görülür (8). Bizim yapmış olduğumuz çalışmamızda da yukarıda sayılan stres faktörlerinden biri olan hipertermi ile hiperterminin şiddetine paralel olarak apoptotik hücre ölümünün arttığı sonucuna varılmıştır. Ancak hücrelerde herhangi bir nekroza ait morfolojik bulgu tespit edilememiştir.

Değişik ölüm sinyallerine maruz kalan hücrenin hangi tip ölümü seçeceği, ilgili sinyalin türü, şiddeti ve süresi ile yakından ilgilidir. Nekroza neden olan ölüm sinyallerinin ortamdaki tüm hücreleri etkilemesine karşın apoptozise neden olan sinyallerin belli bir sayıda hücreyi etkilemesi önemlidir. Bunun yanında, nekroz sürecine giren hücrenin geriye dönüşü mümkün olmamakla birlikte; apoptozis sürecine giren bir hücre mitokondriyal transmembran potansiyeli etkilenmedikçe apoptotik uyarının kalkması durumunda normal yapısına geri dönebilir (19- 21). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada 39°C'den 37°C'ye ısı düşürülmesi ile apoptotik hücre ölümünde azalma görülürken, 43°C'den 37°C'ye ısı azaltıldığında apoptotik indekste azalma görülmemiş olup tam aksine artma gözlenmiştir. Buda bize çalışmamızda apoptotik uyarı olarak kullanılan hiperterminin hücreyi apoptozise götürme aşamasında belli basamakta geri dönüşüm olabildiğini göstermektedir. Bu geri dönüşümün bilhassa 39°C'den 37°C'ye ısı düşürülmesi basamağında olmasına karşın 43°C'den 37°C'ye azaltılma durumunda olmaması ve hatta tam aksine hücre ölümünün artması bize yüksek ısı derecelerinde hücrelerin zar yapısının ve bilhassa mitokondriyal zarın yapısının tamir edilemez düzeyde hasarlanmış olduğunu düşündürmektedir.

Stres, organizmanın normal işleyişine aykırı bir durumdur. Genel sıkıntı ve emosyonel düzensizlik vücutta birçok patofizyolojik durumun altında yatan esas etkenlerdir. Vücutta görülen stres şekillerinden biride somatik kaynaklı streslerdir. Bunlara örnek olarak hipertermi, oksidatif hasar, hipoksi, hipoglisemi, ağır metaller, etanol, metabolik zehirlenmeler, protein denaturasyonu verilebilir (17, 22). Stresle hücrelerde koruyucu bir mekanizma olarak ısı şoku proteinleri eksprese edilir. Buna zıt olarak stres ciddi derecede ise apoptozisin tetiklendiği görülür. Bu hasarlanmış hücrelerin organizmadan uzaklaştırılması için iyi bir yöntemdir (23). Bizim çalışmamızda ise uyguladığımız stres faktörünün vücutta HSP

koruma tamponunu aktive edecek kadar yeterli stres oluşturmadığı ortaya konmuştur. Bu durum bize çalışmamızda kullanılan kan örneklerinin ısıtılma sürecinin progressif bir şekilde olması yani çok ısıtma uygulanmaması nedeniyle ve/veya tüm stres faktörünün yani ısının örneklere toplam en fazla 4 saat uygulanması nedeniyle yeterli HSP ekspresyonu oluşturmadığını düşündürmektedir.

Çalışmamızın ana konusunu oluşturan hipertermi kavramı bu stresler içinde oldukça önem arz eden kavramlar içinde yer almaktadır. Çalışmamızda kan dokusunun tercih edilmesi apoptozisin polimorfonükleer lökositlerde kolaylıkla indüklenbilmesi ve çeşitli faktörlerin etkisi altında hücre ölüm mekanizması için elverişli bir model olarak hizmet etmesinden dolayıdır. Bu faktörlerden biri olan hiperterminin kan kültüründe apoptozisi güçlü bir şekilde tetiklediği görülmüştür. Heparinize kan numuneleri alınarak sağlıklı ve hasta bireylerde prednizolon ve hipertermi ile ayrı ayrı uygulamalar yapıldığında uzun süre sıcağa maruz kalan nötrofillerde yaşayabilirliğin azaldığı görülmüştür. Prednizolonla birlikte daha yüksek ısıda nükleer kromatinde azalma gözlenmiştir. Prednizolon ve hipertermi nükleer maddenin lenfositlerde azalmasına neden olmuştur. Kromatin fragmentasyonu görülmüştür. Sağlıklı bireylerde de lenfositlerde ve nötrofillerde değişiklikler benzerdir. Ayrıca hiperterminin (43°C'de, 1 saatte) timositlerde apoptozis oluşturduğu ve bunun protein sentezi ve ATP'den bağımsız farklı bir metabolik yolla gerçekleştiği belirtilmiştir (24). Bizim çalışmamızda da sağlıklı bireylerden alınan kan örneklerinde yüksek ısıda (41°C, 43°C) apoptotik hücre ölümünün olduğu görülmüştür. Tüm organizmalar için fizyolojik değerlerin üzerinde ısıya maruz kalınması durumu olan hipertermi organizma için hayati önem arz eden stres durumudur. Hücreler stresle uyarıldıklarında ya da hasarlandıklarında intrensek apoptotik yol hücrenin kendi yıkımında daha cazip bir seçenek halini alır (25, 26). Sağlıklı bireylerde normalde inaktif olan sistein proteazların yani kaspaz ailesinin uyarımıyla hücrede yıkım başlar. Bu aktivasyonlarda apoptosom oluşumu, başlatıcı kaspaz 9, efektör kaspaz 3, 6 ve 7 önemlidir. Sitokrom C'nin ve Apoptozis Inhibiting Factor (AIF) gibi diğer proapoptotik faktörlerin mitokondriden translokasyonu ve apoptosomun şekillenmesi ile apoptotik süreç devam eder. Hücre stresle uyarıldığında ikinci bir seçenekte apoptotik programın baskılanması durumudur. Bu seçenekte moleküler şaperonlar olarak bilinen HSP'nin ekspresyonudur. Yapılan deneysel bir çalışmada sıcakla indüklenen



apoptotik hücre ölümünün engellenmesini HSP'lerin Bax proteinini baskılayarak ve proapoptotik faktörlerin salınmasını önleyerek gerçekleştirdiği ortaya çıkmıştır (26).

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

Öte yandan çalışmamızın hedeflerinden biri olan apoptotik hücrelerin sayısının artan ve/veya azalan ısı derecelerine bağlı olarak değişiminin incelendiği kısımda elde ettiğimiz verilerde önem arz eder nitelikteydi. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler artan ısı derecelerinin kanda lökositler üzerinde apoptotik ölüm uyarımına neden olduğunu ve apoptotik lökosit sayısının artan ısı derecelerine paralel olarak artış gösterdiğini ortaya koymuştur ki bu literatürde mevcut olan ve yukarıda belirttiğimiz makaleler ile uyumlu verilerdir. Bununla birlikte, burada ısının 37 °C'den 39 °C'ye çıkarıldığı örnekler arasında apoptotik hücre sayısında artışın anlamlı olmaması da çalışmamızda elde ettiğimiz önemli sonuçlardan bir tanesidir. Bu veri bize "hafif hipertermi kan hücrelerinde apoptozisi uyarıcı etki yapmadığı ancak yüksek ısılarda apoptotik yolların aktive olduğunu göstermektedir" ve bu verilerde literatürde mevcut olan ve yukarıda belirtilen birçok çalışmadaki verilerle uyumluluk göstermektedir. Ancak diğer çalışmalardan daha farklı olan ve çalışmamızın özgün yönlerinden biri olan yüksek ısılardan düşük ısıya düşme durumunda apoptotik hücre sayısında görülecek değişimin incelendiği bölümde elde edilen veriler ilginç özellikler taşımaktadır. Elde edilen sonuçlar göstermektedir ki "orta ve yüksek hipertermi durumundaki kan örneklerinin hızla 37 °C'ye soğutulması beklenen aksine

apoptotik hücre ölümünün daha fazla artışına neden olmaktadır. Bununla birlikte, hafif hipertermi uygulanan örneğin soğutulması beklendiği üzere apoptotik hücre sayısının azalmasına neden olmaktadır". Burada da elde edilen verilerin oldukça önemli olduğunu düşünmekteyiz. Elde edilen veriler progresif ateş yükselmesiyle artan apoptotik hücre sayısının hızlı soğutmaya bağlı daha da artmasına neden olduğunu ortaya koyduğu için progresif ateş yükselmesi nedeniyle kliniğe gelen vakaların tedavisi sırasında çok hızlı soğutmanın bazı yan etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir. Çünkü lökositlerde artan apoptotik hücre ölümü immun sistemi baskılayıcı bir etki oluşturabilir ve enfeksiyona sekonder bir katkı sağlayabilir. Ancak burada belirtilmesi gereken önemli bir nokta ileride tartışacağımız üzere lökosit sayısının tüm deneklerden alınan tüm kan örneklerinde değişen ısı derecelerine bağlı olarak anlamlı bir değişim göstermemesidir. Bu nedenle hızlı soğutmayla artan apoptotik lökosit ölümünün immun sistemi baskılayacak düzeyde olmadığını söyleyebiliriz.

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

Çalışmamızın son hedefi olan elde edilen verilerin kadın ve erkek cinsler arasında farklılık gösterip göstermeyeceği konusunun araştırılmasında ise "farklı ısı dereceleri uygulanan gruplarda HSP değerleri, kan bileşenleri ve apoptotik hücre sayısındaki değişimler kadın ve erkek cinsler arasında anlamlı bir farklılık göstermemektedir" sonucuna varıldı. Bununla birlikte burada belirtilmesi gereken önemli bir nokta verilerden görüldüğü üzere kanda eritrosit, Hemoglobin ve hematokrit değerlerinin kadın ve erkek cinsler arasında anlamlı farklılık göstermesiydi. Ancak genel yapısal özellik olarak bilhassa Türk kadınlarında bu değerlerin erkeklere göre daha düşük olması, toplumda bu farklılığın belirgin olması, erkeklerin kendi grupları arasında ve kadınların kendi grupları arasında bu verilerinde anlamlı değişiklik olmaması nedeniyle bu veriler normal olarak kabul edilmiştir.

Elde edilen verilere göre; progresif ısı değişimleri vücut üzerinde tamponlanabilir bir etki ile kontrol altında tutulmaktadır. Ancak ani azalmalar lökositlerin

ölümünü arttırabilmektedir. Bu nedenle klinik olarak yüksek ateşi olan bilhassa çocuklarda ateş düşürme sürecinin hastanın klinik durumu gözönünde bulundurulmak koşuluyla yavaş yapılmasının vücut savunması için daha faydalı olacağını düşünmekteyiz. Ancak elde edilen tüm veriler artan ve/veya azalan ısı değerlerinin oransal anlamda apoptotik indeksi arttırmasına ve/veya azaltmasına karşın kan CBC değerlerinde anlamlı etki yapmayacak düzeyde olduğunu ortaya koymaktadır. Elde ettiğimiz verilerin daha detaylı çalışmalarla ve tekniklerle teyit edilmesinin faydalı olacağını ve bu konuda yapılacak klinik çalışmaların hiperterminin etki/yan etkilerini ortaya koyma açısından önemli faydalar sağlayacağını düşünmekteyiz.

### KAYNAKLAR

1. Erdoğan BB, Uzaslan EK. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde Fas-FasL bağımlı apoptozis. *Akciğer Arsivi* 2003;4(3):165-74.
2. Çalışkan M. Apoptozis: programlanmış hücre ölümleri. *Türk J Zool* 2000;24(Ek Sayı):31-5.
3. Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Trend Gene* 1995;11(3):101-5.
4. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi* 2001;2(1):91-5.
5. Turgut B, Demir T, Çeliker Ü. Oftalmolojide apoptoz. *Fırat Tıp Dergisi* 2006;11(1):1-5.
6. Gougeon ML, Lecoœur H. Evaluation of apoptosis. *J of Imm Methods* 2002;265(1-2):1-2.
7. Aral H. Apoptozis. *Sendrom Tıp Dergisi* 1996;8(6):37-8.
8. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic basis of disease. 7th Edition, Philadelphia: Elsevier Saunders Company, 2005:1-33.
9. Öztürk F. Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2002;9(1):143-8.
10. Kuan NKBS, Passaro EJ. Apoptozis: programmed cell death. *Arch of Surg* 1998;133(7):773-5.
11. Reap EA, Roof K, Maynor K, et al. Radiation and stress-induced apoptozis: A role for Fas/Fas ligand interactions. *Proc of The Nat Academy of Sci* 1997;94(11):5750-5.
12. Wu HJ, Chan WH. Genistein protects methylglyoxal-induced oxidative DNA damage and cell injury in human mononuclear cells. *Toxic In Vitro* 2007;21(3):335-42.
13. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124;1(2):1-6.
14. Johnson SI, McMichael M, White D, et al. Heat stroke in small animal medicine: A clinical practice review. *J of Vet Emer and Crit Care* 2006;16(1):112-9.
15. Poccia F, Pselli P, Vendetti, et al. Heat shock protein expression on the membrane of T cells undergoing apoptozis. *Immunology* 1996;88(1):6-12.
16. Pelham H. Heat shock proteins coming in from the cold. *Nature* 1998;332(6167):766-7.
17. Guzik K, Bzowska M, Dobricki J, et al. Heat-shock monocytes are resistant to Staphylococcus aureus-induced apoptotic DNA fragmentation due to expression of HSP72. *Infectin and Immunity* 1999;67(8):4216-22.
18. Suh Y. Cell signaling in aging and apoptozis. *Mech Ageing Dev* 2002;123(8):881-90.
19. Green DR, Kroemer G. The central executioners of apoptozis caspases or mitochondria. *Trend in Cell Biology* 1998;(8)7:267-71.
20. Majno GJ. Apoptozis, oncosis and necrosis: An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146(1):3-15.
21. Green DR. Apoptotik pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 2000;102(1):1-4.
22. Walsh D, Li Z, Wu Y, et al. Heat shock and the role of the HSPs during neural plate induction in early mammalian CNS and brain development. *Cell and Mol Life Sci* 1997;53(2):198-211.
23. Meinander A, Söderström TS, Kaunisto A. Fever like hyperthermia controls T lymphocyte persistence by inducing degradation of cellular FLIPshorts. *The J of Immun* 2007;178(6):3944-53.
24. Chernykh EI, Yazykov KG, Semke VY. Apoptozis in peripheral blood leukocytes induced by hyperthermia and prednisolone in patients with dysadaptation. *Gen Path and Patholo Physio* 2002;134(6):531-3.
25. Lindquist S. The heat shock response. *Annu Rev Biochem* 1986;55:1151-91.
26. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CPZ, et al. Hsp 70 inhibits heat-induced apoptozis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *The J of Biol Chem* 2005;280(46):38729-39.