

58752

T.C.

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ - EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA PROGRAMI

6-9 AYLIK İNSAN FETUSU DALAK HÜCRELERİNİN
FLOW CYTOMETRİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

ERSAN ODACI

Tezin Enstitüye Veriliş Tarihi

:

Tezin Sözlü Savunma Tarihi

:

Tez Danışmanı

: Prof Dr. Haluk ARVASI

Jüri üyesi

: Prof.Dr.Yavuz ÖZORAN

Jüri üyesi

: Prof.Dr.Refik SOYLU

Enstitü Müdürü

: Doç. Dr. Murat ERTÜRK

TRABZON-1997

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	
I. GİRİŞ	1-2
II. GENEL BİLGİLER	3-14
II.1. Dalağın yapısal nitelikleri	3-12
II.2. Dalağın fonksiyonları	13-14
III. HÜCRE SIKLUSU	15-17
IV. AKIM SİTOMETRİ	18-22
V. MATERYAL METOD	23-25
VI. BULGULAR	26-40
VI.1. Işık mikroskopik bulgular	26-33
VI.2. Akım sitometrik bulgular	34-40
VII. TARTIŞMA	41-46
VIII. SONUÇLAR	47
IX. ÖZET	48
X. İNGİLİZCE ÖZET	49
XI. KAYNAKLAR	50-53
ÖZGEÇMİŞ	

ÖNSÖZ

“6-9 Aylık İnsan Fetusu Dalak Hücrelerinin Flow Cytometric ve İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Araştırılması”* K.T.Ü. SABE Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak hazırlanmıştır. Çalışmalar literatür ve laboratuvar araştırmaları olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasının konusunu oluşturan dalak üzerinde çok sayıda mikroskopik çalışma yapılmıştır. Ancak flow cytometry (akım sitometri) kullanılarak yapılan çalışmalar az sayıdadır. Özellikle fetal dalak üzerinde akım sitometri ile yapılan çalışmalar yok denecek kadar azdır.

Bu çalışma sırasında ve doktora eğitimimde her türlü kolaylığı gösteren bilimsel katkılarını esirgemeyen tez hocam sayın Prof. Dr. Haluk ARVASI'ye, Prof. Dr. Yavuz ÖZORAN'a, laboratuvar çalışmalarımnda desteğini esirgemeyen Dr. Sevim AYDIN'a, akım sitometrik analizlerde yardımcı olan Bio. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU'na, istatistiksel analizlerde yardımcı olan Dr. Gamze CAN'a ayrıca yardımlarını hiç bir zaman esirgemeyen Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU'na Dr. Mehmet EMİRZEOĞLU'na, Dr. Cengiz SOYLU'ya, Dr. Ayhan SEZEROĞLU'na, desteklerinden dolayı eşim Hatice'ye, sabırlarından dolayı kızım Göksu' ya bu günlere ulaşmamda emeği geçen anneme, babama sevgi, saygı, ve hürmetlerimi arz ederim.

Nisan 1997

Dr. Ersan ODACI

* Bu çalışma K.T.Ü. Araştırma fonu tarafından 96.114.001.3 kod nolu proje ile desteklenmiştir.

I. GİRİŞ

Organizmanın en büyük lenfoid organ ve lenfoid doku topluluğu olan dalak lenfoid organlar içerisinde lenforetiküler grupta gösterilir (3,4,5,13). Dalak çok sayıda fagositik hücre içermesi ve dolaşımdaki kan hücreleriyle yakın teması nedeniyle, dolaşıma girmiş tüm mikroorganizmalara karşı önemli bir savunma bölgesidir. Bununla birlikte lenfositlerin yapıldığı ve farklılaştığı; eritrositlerin yıkımının gerçekleştiği, kanın depolandığı bir organdır (1,3,4,12,13).

Fetal hayatın ikinci yarısında 5. aydan sonra gelişmeye başlayan ve 7. ayda tipik yapısını kazanan fetal dalak 24 - 28 haftalarda hematopoezis için önemlidir ve son fetal yaşama kadar hematopoetik bir merkez olarak fonksiyon görür (7,8,10,13). Kemikler şekillendikten ve boşlukları kemik iliği ile dolduktan sonra kc. de olduğu gibi dalakta da kan hücresi yapımı tamamen durur. Dalak fetal yaşamın son evrelerinden başlayarak postnatal yaşam boyunca diğer lenfoid organlarda da olduğu gibi sadece lenfositleri meydana getirir (7,8,9,10).

Dalak geniş boyutuna ve önemli fonksiyonlarına rağmen çıkarılması vücutta fazla bir yan etki meydana getirmez. Bir bütün olarak çıkarıldığında fonksiyonları kc. ve kemik iliği tarafından yapılır (4,13).

Embriyonal dönemde çok daha fazla önemi olan dalak üzerine bir çok araştırmalar yapılmıştır. Önceleri daha çok ışık mikroskobu düzeyinde yapılan çalışmalar son yıllarda immünohistokimyasal (33,35,54) ve biyokimyasal yöntemlerle (41,42,); elektron mikroskobisi (45) ve akım sitometri ile (34,35,36,37,38,44,) yapılmaya başlanmıştır. Özellikle 18-24. haftalık fetal dalak üzerinde yoğunlaşan çalışmalar fetal hayat ve sonrası için çok önemli ipuçları vermektedir (37,38,39,40). 1665 yılında Robert Hooke'ın şişe mantarı kesitini basit mercekle incelemesi ve optiğin bilime uygulanabileceği müjdesini vermesi ile birlikte gelişen teknoloji sayesinde son on yılda laser ışınları tıp, biyokimya ve

moleküler biyolojide kullanılmaya başlamıştır. Bu sayede bir çok hastalığın tanısı konmuş ve tedavisi mümkün olmuştur. Floresan aktiviteli analiz ve ayırma başka bir ifade ile akım sitometri (FCM) optikte başvurulan yeniliklerden birisidir. FCM teknolojisi ile yapılan çalışmalar hematoloji onkoloji gibi bazı bölümlerde rutin halde kullanılmaya başlanmıştır (5,8,20,24).

İnsan fetusu dalağının gelişimini akım sitometri tekniği ve ışık mikroskobu kullanarak fonksiyonel ve morfolojik bakımdan erişkin dalağı ile karşılaştırmak çalışmanın temel amacıdır. Ayrıca son yıllarda fetal dalak üzerinde yoğunlaşan çalışmalara ve bu konuda yapılacak diğer araştırmalara katkıda bulunmak bu çalışmanın diğer bir amacıdır.



II. GENEL BİLGİLER

II. 1. Dalağın Yapısal Nitelikleri

Lenfatik organlar içerisinde lenforetiküler grup içerisinde gösterilen dalak organizmadaki en büyük lenfoid organ ve lenfoid doku topluluğudur (3,4,5,13). Dalak diğer lenforetiküler organ olan ve lenf dolaşımı yolu üzerinde yer alan lenf düğümlerinden farklı olarak kan dolaşımına bağlı, sinusları kanla dolu ve kanı filtre etmek için özelleşmiş tek organdır (1,5,12,13). Çok sayıda fagositik hücre içermesi dolaşımdaki kan hücreleriyle yakın temas da olması nedeniyle dalak dolaşımına girmiş tüm mikroorganizmalara karşı önemli bir savunma bölgesidir. Dalakta çok sayıda eritrositinde yıkımı gerçekleşir. Diğer lenfoid organlar gibi antijenle uyarılıp aktive olmuş lenfositlerin yapım yeridir. Aktive lenfositler dalağı terk edip direkt olarak kan dolaşımına girerler. Dalak aynı zamanda kanda dolaşan antijenlere karşı çabucak reaksiyon geliştiren bir immünolojik filtre ve antikor yapıcı organdır (1,3,4,5).

Anatomi

Dalak sol hipokondrium bölgesinde derinde sol böbrek, mide, flexura coli sinistra ve diafragma arasında bulunur. Kıvamı yumuşak olduğundan, canlıda dalağın şekli komşu organların durumuna bağlıdır. Mide boş ve kalın barsak dolu olduğu zaman, tabanı ile flexura coli sinistra üzerine oturmuş, üç kenarlı piramide benzer. Mide dolu ve kalın barsak boş ise dalağın şekli bir portakal dilimine benzer (2,12).

Dalağın diafragma ile komşuluk yapan yüzü (facies diaphragmatica) konvektir. Konkav olan yüzünün (facies visceralis) arka kısmı mide ile komşuluk yapar (facies gastrica). Bu yüzün facies renalis'e yakın kısmında uzun ve dar bir çukur görülür. Hilus lienalis adı verilen bu çukurdan dalağın damar ve sinirleri girer ve çıkarlar (2,11,12). Hilus lienalis pankreas kuyruğu ile komşudur. Ön kenar künt, genellikle düz ve ön kenara nispeten daha kalındır (2,12).

Dalak diafragma altında eğik durumda olup, insan sırt üstü yattığı zaman, uzun eksenini 10. kaburganın doğrultusuna uyar. Ayağa kalkınca, dalağın durumu dikeye yaklaşır. Normal dalağın ön kenarı kaburgalar arkusunu aşmaz ve muayenede ele gelmez (2,12).

Dalağın her tarafı peritonla örtülüdür. Lig. gastrolienale aracılığı ile mideye ve lig. phrenicolienale aracılığı ile diafragmaya tutunmuştur. Alt ucu lig. phrenicocolicum üzerine oturmuştur (1,2). Ağırlığı 150-750 gr. arasında olup şahsa ve içerisinde bulunan kan miktarına göre değişir (1,2,3,13).

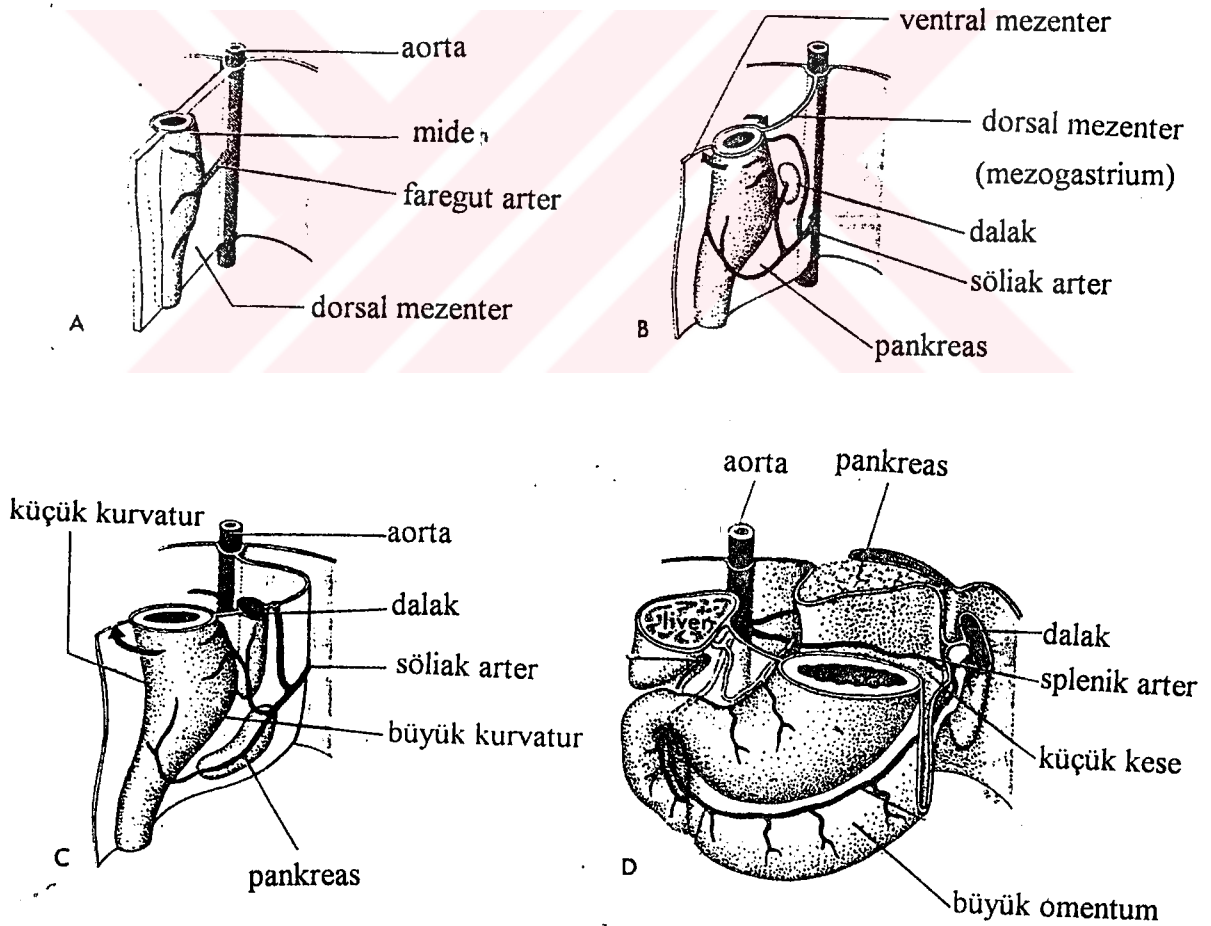
Dalak dıştan çok sayıda elastik lifler bir miktar kollagen ve düz kas lifleri bulunduran bir kapsülle sarılmıştır. Kapsül içeriye doğru ince plak veya huzmeler şeklinde uzantılar verirler. Dalak trabekülleri adı verilen bu uzantılar dalağın içinde bir çok aralıklar meydana getirirler. Trabeküller de kapsül gibi çok sayıda elastik, bir miktar kollagen ve düz kas lifleri bulundururlar. Dalakta kan miktarı arttığında trabeküllerde ve kapsülün yapısında bulunan elastik lifler uzarlar ve dalağın büyümesine imkan verirler. Kollagen liflerde dalağın depo ettiği kanın gereğinde boşaltılmasını ve venler yolu ile genel dolaşıma katılmasını, düz kas liflerinin kasılmasını sağlarlar (2,4,5,13,28).

Trabeküllerin arasında bulunan büyük aralıklar içinde retiküler bağ dokusundan yapılmış çok ince uzantılar birbiri ile birleşerek daha küçük aralıklar meydana getirirler. Bu küçük aralıkların içinde dalağın temel parankiması bulunur. Dalağın parankiması kırmızı ve beyaz pulpa olmak üzere birbirinden yapı ve fonksiyon bakımından farklı iki kısma ayrılır. Kırmızı pulpa dalak sinusoidleri, bunların arasında bulunan ve eritrositleri de barındıran retiküler bağ dokusundan yapılmıştır. Beyaz pulpada ise lenfatik doku bulunur (1,4,5,12,13,28).

Dalak Gelişimi:

Dalak mezoderm germ tabakasının ileri farklılaşmasından meydana gelir (1,6). Lenfatik bir organ olan dalak, midenin dorsal mezogastrium tabakaları arasında lokalize olan mezenşimal hücrelerin birleşmesinden köken alır. Dalak primordiumundaki mezenşimal hücreler kapsülü, bağ doku çerçevesini ve dalağın parankimasını, dalak taslağını örten sölom mezotel ise kapsül üzerindeki periton örtüsünü oluşturmak üzere farklılaşırlar (1,6,7,8,9,10).

Geniş vasküler bir organ olan dalak 4. gebelik haftası sonunda 5. Gebelik haftası sırasında gelişmeye başlar. Ancak erken fetal periyoda kadar karakteristik şeklini alamaz (6,7,8,9,10). Gelişimin 4. haftasında midenin dorsalindeki mezenşimde küçük intersellüler yarıklar belirir. Bu yarıklar hızla birleşerek daha sonra midenin arkasında bursa omentalis olarak bilinen boşluğa oturur. Dorsal mezogastrium dorsal ve lateral yönde genişlemeye devam ederek sol tarafa doğru balonlaşır. Bu genişlemenin mide, dalak ve pankreas üzerinde oldukça önemli etkisi vardır. Dalak primordiumu gelişimin 5. haftasında dorsal mezogastrium yaprakları arasında mezodermal proliferasyon şeklinde belirir. Bursa omentalisin oluşumuyla birlikte dalak ve dorsal orta hat arasında yerleşmiş olan dorsal mezogastriumun bir kısmı sola doğru kayar ve karın arka duvarının peritonu ile birleşir (7,8,9,10), (Şekil 1).



Şekil 1: 4. Haftadan itibaren dalak gelişiminin şematik görünümü (7).

A:30.Gün

B:35.Gün

C:40.Gün

D:48Gün

2.Aydan itibaren dorsal mezogastriumun bu kısmının sol yaprağı ve periton daha sonra yok olur. Her zaman intraperitoneal pozisyonda olan dalak, karın arka duvarına sol böbrek bölgesinde lineorenal ligament, mideye de gastrolinal ligament ile bağlıdır (2,7,8,9) .

Midenin dönmesiyle mezogastriumun sol yüzeyinin sol böbreğin üzerinde peritonla yapışması lineorenal ligamentin (splenorenal lig.) dorsal bağlanması ve ergin splenik arterinin siliak gövdesinin en geniş dalının omental bursaya posterior ve sol böbreğe anterior bir seyir izlenmesini de açıklar (7,9,10) .

Dalak taslağını meydana getiren mezenşim hücreleri kısmen lenfositlere ve kısmen de retiküler hücrelere dönüşür. Küçük dalak arterlerinin (a. sentralis) adventisyalarda lenfositlerin karakteristik şekilde infiltre olması ve bu surette dalak cisimciklerinin (malpighi cisimcikleri) meydana gelmesi fetal hayatın ikinci yarısında 5. aydan sonra başlar, 7. ayda tipik yapısını kazanır (8,10).

Dalak fetus içinde lobüllere ayrılmıştır. Fakat lobüller doğmadan önce normal olarak kaybolur. Erişkin dalağın superior kenarındaki çentikler fetal lobülleri ayıran olukların kalıntılarıdır (7) .

Fetal dalak 24-28. haftalarda hematopoezis için önemli bir bölgedir. Dalakta eritropoezis 28.haftada biter. Bu haftadan sonra kemik iliği eritrositlerin formasyonunun major yeri haline gelmiştir (1,7,8,9). Ancak son fetal yaşama kadar hematopoetik bir merkez olma özelliğini sürdüren dalak, yetişkin hayatında bile kan hücresi formasyonu için potansiyelini devam ettirir (7,13).

Organlar şekillenmeye başlayınca önce kc. de sonra dalakta ve diğer lenfoid organlarda kan hücresi yapımı başlar. Kemikler şekillendikten ve boşlukları kemik iliği ile dolduktan sonra kc. ve dalak da kan hücresi yapımı tamamen durur. Fötal yaşamın son evrelerinden başlayarak postnatal yaşam boyunca lenfoid organlar sadece lenfositleri meydana getirir (15).

Dalağın Histolojik Yapısı:

Dalak yoğun kollagen fibril, çok az sayıda elastik fibril ve az miktarda düz kas içeren sıkı bağ dokusundan yapılmış bir kapsülle sarıdır. Kapsül hilus bölgesinde kalınlaşmıştır. Hilus dışında kapsül çepeçevre periton ile örtülüdür (3,4,5,28). Kapsülden içeri giren bağ dokusu bölmelerine trabekül denir. Trabeküller parankimayı yada dalak pulpasını tam olmayan bölmelere ayırırlar. Trabeküller kompakt bağ dokusudur. Kapsüldekinden daha fazla elastik fibril bulunur. Dalak kapsülü ve trabeküllerinin bağ dokusu içinde az miktarda mevcut olan düz kas hücreleri ve zengin elastik ağları sayesinde kontraktil ve elastik bir organdır. Hacmini geniş hudutlar içinde değiştirebilir (4,5,13,28). Trabeküller içinde arteria ve vena trabekularis ile sınırlar seyredir. Bununla birlikte trabeküllerin bağ dokusu içindeki lenfatik damarları trabeküller içinde devam ederler ve hilusdan organı terk ederler. Dalak pulpasında lenfatik damar bulunmaz (1,3,4,5).

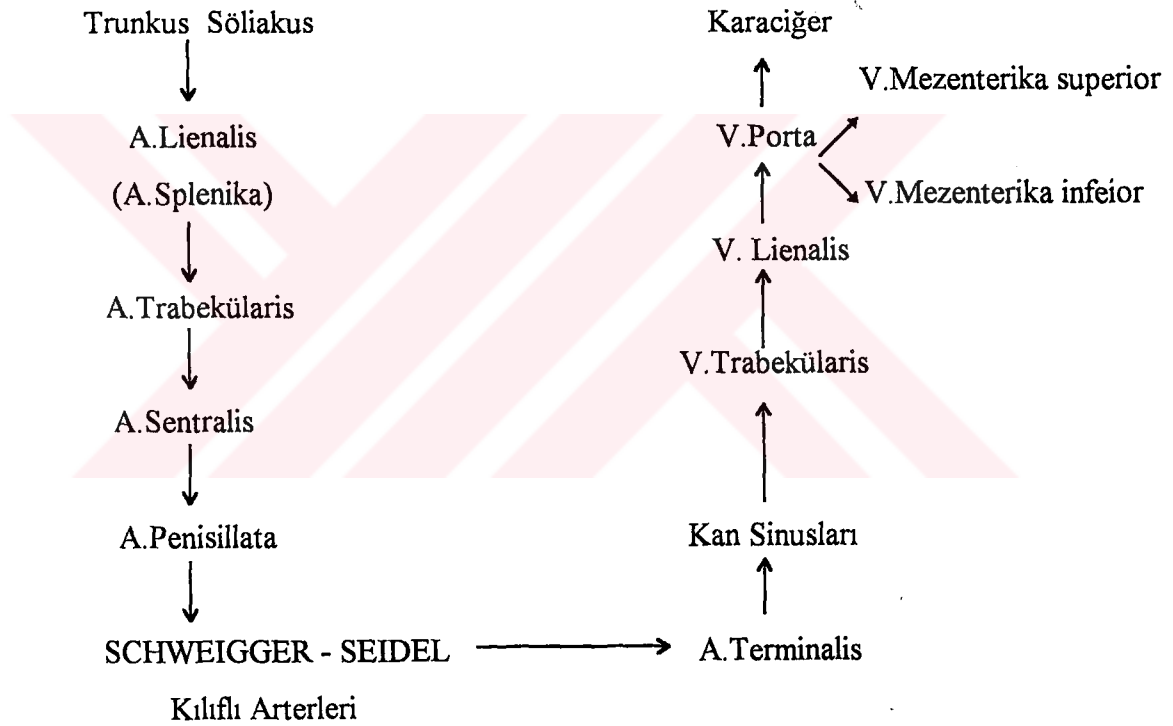
Dalak parankiması esas itibariyle kapsül ve trabeküllerin arasını dolduran retiküler bağ dokusundan oluşan bir çatı içine yerleşmiş lenfoid hücreler, makrofajlar ve antijen hazırlayıcı hücrelerden oluşmuştur. Yani her yöndeki uzun uzantıları aracılığı ile biri diğerine bağlanarak bir hücre ağı yapan, yıldız şeklinde retiküler hücrelerden, bu hücrelerle ilgili sık retiküler lifleri ağından ve bu hücre ve lif ağının aralıklarını dolduran serbest hücrelerden yapılmıştır. Retiküler lifler kapsül ve trabeküllerin altında bunların kollagen lifleriyle devam ederler (1,3,4,5,14,28).

Kesintili trabeküller ile dalak lobüllere ayrılır. Her lobül yaklaşık 1mm. çaptadır. Kan a.sentralis ile lobüle ulaşır. Lobül kanı trabeküller ile seyreden venlerden drene olur. Tam olarak trabekül ile kuşatılmadığından lobül sınırları keskin çizgilerle ayrılamaz (1,3,4,11,28).

Bağ dokusu çatının gözeneklerini dolduran süngerimsi yumuşak dokuya dalak pulpası denir. Dalak pulpası beyaz ve kırmızı pulpa olmak üzere iki kısımda belirtilmiştir. Tespit edilmemiş taze dalağın kesit yüzeyinin makroskopik incelemesinde parankima farklı kısımlar gösterir. Kesit yüzeyinde 0,2-0,7 mm² ye kadar çeşitli büyüklükte beyaz noktalar şeklinde dağılmış bölgeler görülür. Bu bölgeler lenfoid nodüllerdir. Dalağın beyaz pulpasının bir bölümünü oluştururlar. Lenfoid nodüllerin içine yatakladığı parankima ise kırmızı pulpa adını alır. Bu bölge koyu kırmızı renkli kanla dolu bir lenfoid dokudur. Mikroskop altında

kırmızı pulpanın dalak kordonları (Billroth kordonları) denilen, uzun lenfoid doku bölgeleriyle bunların arasına yerleşmiş sinusoidlerden oluştuğu görülür. Sinusoid duvarı, pencereci yassı endotel hücreleriyle döşenmiştir. Böylece sinusoid içindeki kan kırmızı pulpay ile kolayca ilişki kurar (1,3,4,5,12).

Dalaktaki kan dolaşımı trunkus sölialikus'un bir dalı olan splenik arterin (a.lienalis) bağ dokusu bölmelerinden trabeküler arter adı altında dallanması ile başlar. Trabeküler arterler tipik mürküler tip arterlerdir. Beyaz pulpa ve kırmızı pulpa yönünde bir dallanma gösterirler. Dalakta ven olarak devam eden ve hilusdan v.lienalis olarak organı terk eden dolaşımın ara yolları şu şekilde şematize edilebilir (1,2,3,4,5,11,12).



Trabeküler arterler bağ dokusunu terk edip lenfoid parankimaya girdiklerinde damarın çevresi lenfoid dokudan oluşmuş bir kılıfla sarılır. Bu yapıya periarteriyel lenfatik kılıf (PALS) denir. Burada arterler sentral arterler veya beyaz pulpanın damar çevresindeki seyri boyunca yer yer lenfatik nodüller oluşturur. Sentral arter terimi kullanılmasına rağmen follikül içindeki arter çoğunlukla periferik yerleşim gösterir ve lenfatik kılıfı besleyen uç dallar verir. Bu kapillerler kırmızı pulpa içinde de devam eder. A.sentralis ve a.sentralisin dallanması ile oluşan kapillerde kübik epitelle döşelidir (3,4,12), (şekil 2).

Beyaz pulpayı bir kaç kez dallandıktan sonra terk eden ve marginal zona ulaşan a.sentralis dış çapı yaklaşık 24 mm olan fırça görünümündeki a.penisillataları oluşturur. A.penisillatalar birbirini izleyen ve giderek çapı daralan 3 segment gösterilir (5, 12) .

1) Pulpa arteriolu: Kübik endotelle döşeli ve bazal lamina tamdır. Düz seyirli, ince bir yada iki sıra düz kas tabakası ve ince bir adventisyası bulunan en uzun segmenttir (5,12).

2) Kılıflı veya elipsoid arteriol: Duvarlarında kas tabakası bulunmaz. Endotel dışında kuvvetli fagositik aktivitedeki retiküler hücrelerden oluşan bir kılıf bulunur. Bu hücreler konsantrik düzenlenmiştir. Aralarında retiküler fibriller yer alır. Bu kılıfa SCHWEIGGER-SEIDEL kılıfı adı verilir ve arter bu isim ile de anılır. İnsan dalağında bu kılıf gelişmemiştir (5,12) .

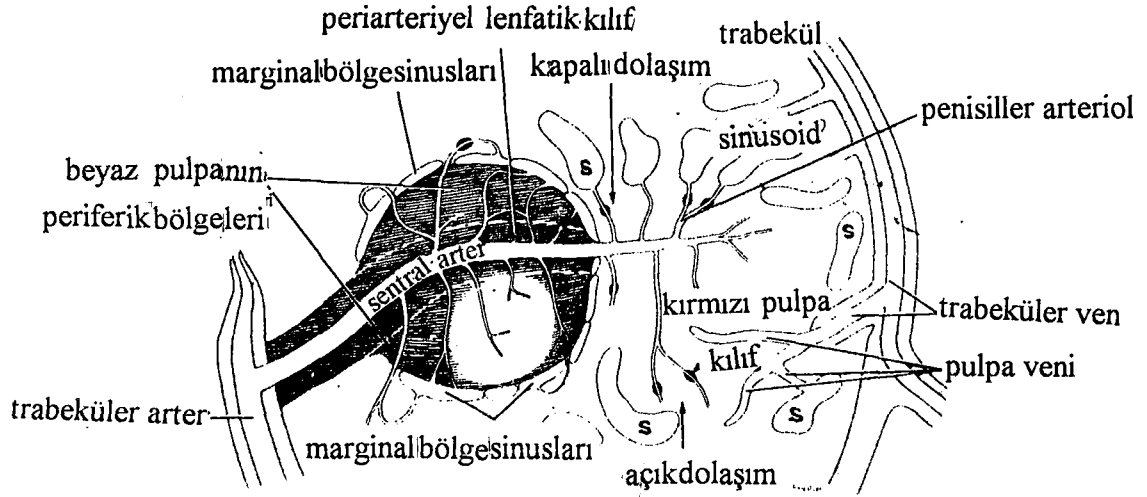
3) Terminal arteriel kapiller: Kılıflı arterioller iki yada daha çok sayıda kapillerlere ayrılır. Son bölümleri konik biçimde genişleme gösterir. Duvarı yalnızca endotelden oluşan bu segment a. terminalis olarak adlandırılır (3,5,12,28).

A.penisillatalardan sonra kan akımının nasıl devam ettiği henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bu konuda iki teori tartışılmaktadır (1,3,5,12-28).

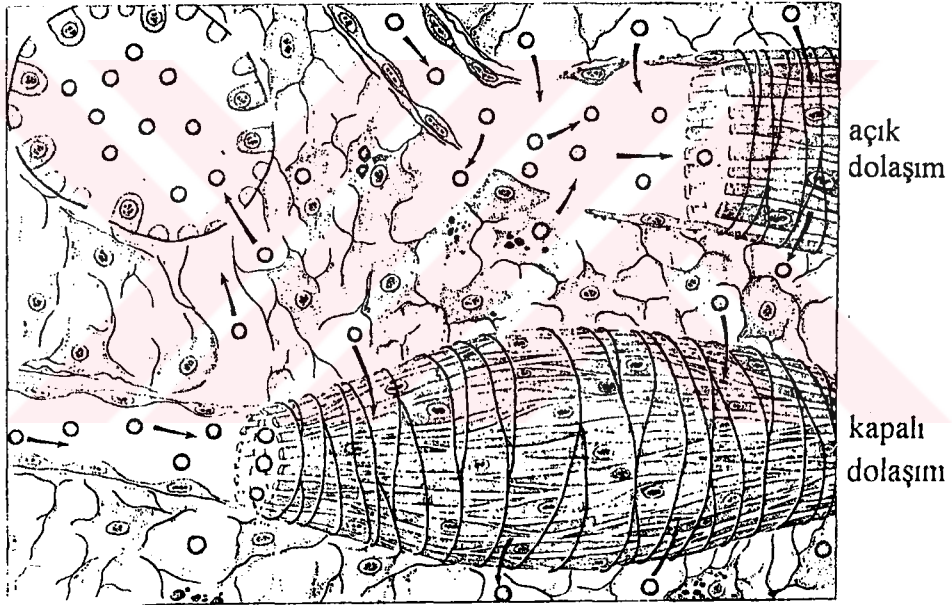
1. Açık veya yavaş dolaşım teorisi:
2. Kapalı veya hızlı dolaşım teorisi:

Açık veya yavaş dolaşım teorisinde arteriel kapillerin direkt olarak kırmızı pulpa içine açıldığı ve kanın derece derece venöz sinusların içine geriye filtre olduğu iddia edilir. Kapalı veya hızlı dolaşım teorisinde ise arteriel kapillerin direkt olarak venöz sinuslar içine açıldığı iddia edilir (5,12,28) (Şekil 2), (Şekil 3).

Bu günkü bilgiler insan dalağında dolaşımın açık dolaşım teorisini destekler yöndedir. Ancak her iki teori içinde dikkate değer kanıtlar vardır. Ayrıca her iki sistem strüktürel ve fonksiyonel olarak dalakta vardır (1,5,12,13).



Şekil 2: Dalak dolaşımı, B ve T lenfositlerinin dağılımı; Açık ve kapalı dolaşım şematize edilmiştir. S: Dalak sinusları (4).



Şekil 3: Dalak kırmızı pulpasının yapısı, sinüsoidler, dalak kordonları, retiküler hücreler ve içlerinde fagosite edilmiş materyal bulunan, makrofajlar görülmektedir. Retiküler lifler kırmızı pulpada ağsı bir düzenlenme göstermekte ve sinüsoidlerin çevresinde ise sinüsoid uzun aksına dik olarak uzanmaktadır. Şekilde, açık ve kapalı dolaşım teorileri de gösterilmektedir (3).

Dalaktaki kan dolaşımı bundan sonra kan sinüsoidlerinden kırmızı pulpa venlerine doğru ilerler. Kırmızı pulpa venleri birbirleriyle birleşerek parankimayı terk edip trabeküllerin bağ dokusu içine girerler ve trabeküler veya interlobüler venleri oluştururlar.

Trabeküler venlerin birleşmesiyle oluşan v.lienalis veya splenik ven hilusdan organı terk eder ve a.lienalisi izleyerek uzanır; v. porta'ya dökülür (1,2,3,4,13,14), (Şekil 2) .

Dalak pulpası veya parankiması iki ayrı tipte oluşur. Beyaz ve kırmızı pulpa. Beyaz pulpa arterleri sarar ve izler. Diğer pulpa kordonları olarak mevcuttur (4,5,12,13,28) .

Beyaz pulpa a.sentralis çevresindeki lenfoid dokudur. Bu doku damarın çevresinde lenfoid folliküllerle, follikül şeklinde biçimlenmemiş damarın seyri boyunca izlenen lenfoid dokudan oluşmuştur. A.sentralisi çevreleyen lenfoid kılıfta (PALS) T lenfositler çoğunluktadır. Ancak lenfoid nodüllerde ve marginal zonda B lenfositlerin sayısı üstünlük sağlar (4,5,28).

Beyaz ve kırmızı pulpa arasında sinusların bol bulunduğu gevşek bir lenfoid doku uzanır. Bu bölgeye marginal zone adı verilir. Burada bol miktarda aktif makrofaj ve az sayıda lenfosit bulunur. Kan kökenli antijenlerin yoğunlaştığı bu bölge dalağın immünolojik aktivitesinde önemli bir role sahiptir. Sentral arterden doğan pulpa arterioller, beyaz pulpadan kırmızı pulpaya açılıp uzaklaştıktan sonra tekrar geriye dönüp marginal bölge sinuslarına ağızlanırlar. Böylece beyaz pulpa damarlarındaki kanın tekrar marjinal bölgeye gelmesi, burada süzülüp temizlenerek, antijenik cevabın başlamasına neden olur (1,4,12,28).

Marjinal bölgede, interdijitasyon yapan dendritik hücreler antijeni immün yetenekli hücrelere (lenfositler) takdim eder. Marjinal bölge sadece antijenlerin ortadan kaldırıldığı bir bölge olmayıp, sirkülasyondaki T ve B lenfositlerin dalak parankimasına girdiği bölgedir. Marjinal bölgeye ulaşan T ve B lenfositler beyaz pulpaya doğru göç ederken dentritik, retiküler hücrelerle karşılaşırırlar. Burada uygun B hücresi, T hücresi ve uygun antijen mevcut ise immün yanıt başlar. Uyarılmış B lenfositler beyaz pulpa lenf folliküllerinin merkezine göç ederek plazma hücrelerini ve bellek B lenfositlerini oluştururlar. Plazma hücreleri kırmızı pulpa kordonlarına geçerler ve venöz sinus içindeki kana antikorlarını salgırlarlar (1,4,12,13).

Periarteriel lenfatik kılıfın artere yakın iç bölgelerinde T lenfositler çoğunlukta olup timusa bağımlı bölgeyi oluştururlar. Kırmızı pulpaya doğru olan periferel beyaz pulpada, lenfatik nodüllerde ve marjinal bölgede B lenfositler çoğunluktadır (4,12,28), (Şekil 2) .

Kırmızı pulpa venöz sinusların arasında birbiriyle devamlılık gösteren dalak kordonları denilen özel türde bir retiküler dokudan oluşur. Dalak kordonlarının kalınlığı sinusoidlerin bölgesel genişliğine göre değişir. Dalak kordonlarında retiküler hücreler ve liflerin yanı sıra serbest makrofajlar, lenfositler ve dolaşan kanın bütün elemanları bulunur (3,4,12,28) .

Lenfositler büyük, orta ve küçük boyutlarda beyaz pulpa içerisinde çok sayıdadır. Fakat kırmızı pulpa içinde daha azdır ve gevşek olarak düzenlenmiştir. Lenfositlerin çeşitli tipleri beyaz pulpa içinde ortaya çıkarlar ve amöboik hareketlerle kırmızı pulpaya yayılırlar. Monositler de oldukça fazladır. Bazıları kan akımı ile getirilmişlerdir. Diğerleri dalağın içinde proliferasyonla ortaya çıkar. Kırmızı pulpa çok sayıda plazma hücresi, granüler lökosit ve eritrositte içerir (4,12,28).

Dalak sinusoidleri uzun eksenleri sinusoidin uzun eksenine paralel olarak uzanmış endotel hücreleriyle döşelidir. Endotel hücreleri arasında makrofajlar yerleşmiştir. Sinus duvarı dıştan çoğunluğu enine seyreden tıpkı bir varilin çevresine sarılmış kalın ipler gibi düzenlenmiş retiküler fibrillerle çevrelenip desteklenmiştir (Şekil 3). Sinusoidi döşeyen hücreler arasında 2-3 mm çapında veya daha dar aralıklar olduğundan ancak şekil değiştirebilen hücresel elemanlar, kırmızı pulpadan sinus lümenine doğru hareket edebilir (4,12,13).

Bir çok memelide ve memeli embriyosunda dalağın kırmızı pulpası megakaryositler, myelositler ve eritroblastları içerirler. Bu myeloid elemanlar yetişkin insanlarda dalakta yoktur. Bazı belirli patolojik durumlarda ortaya çıkarlar ki bu durumda dalak myeloid metaplaziye uğrar (12) .

Doğumdan, erken yetişkinliğe kadar beyaz pulpa dalağın daha büyük hacmini oluşturur. Fakat artan yaşta geriler, splenik nodüllerin sayısı azalır ve kırmızı pulpa artarak önemli hale gelir (12).

II. 2. Dalanın Fonksiyonları :

Dalağın histolojik yapısından da anlaşılacağı üzere organizmada bir çok fonksiyonu vardır. Dalak lenfositlerin yapıldığı ve farklılaştığı, eritrositlerin yıkımının gerçekleştiği, kan dolaşımındaki yabancı maddelere karşı organizmanın korunduğu ve kanın depolandığı bir lenfoid organdır (1,3,4,12,13).

1. Lenfosit Yapımı: Lenfositler beyaz pulpanın lenforetiküler dokusunda gelişir. Beyaz pulpanın kenarından kırmızı pulpa dokusunun gözeneklerine oradan da sinusoid lümenine ulaşarak genel dolaşıma katılırlar. Lenfosit yapımı beyaz pulpa folliküllerinin bol miktarda bulunduğu gençlerde fazladır. Yaş ilerledikçe lenfatik dokunun gerilemesine paralel olarak yavaş yavaş ortadan kalkar (1,4,13) .

2. Eritrositlerin Yıkımı: 120 günlük yaşam süreleri olan eritrositlerin yıkımları çoğunlukla dalakta olmak üzere bir miktarda kemik iliğinde gerçekleşerek dolaşımdan temizlenir. Dalak kordonlarındaki makrofajlar ekstrasellüler aralıkta bulunan parçalanmış eritrosit artıklarını fagosite ederek ortadan kaldırırlar (1,3,4).

3. Organizmanın Savunulması: Dalak lenfoid dokusu T ve B lenfositler, antijen hazırlayıcı hücreler ve makrofajlarla organizmanın savunma sisteminde önemli bir görev üstlenir. Kan yoluyla organizmaya giren antijenlere karşı antikorların yapıldığı yer olan dalak kandaki antijene ilk cevabı verir. Bu antijene karşı plazma hücrelerinin gelişip antikor salmalarıyla sonuçlanan humoral immün yanıtta ilk önce arterler etrafında lenfoid kılıfta lenf follikülleri artar. Sentrum germinativumları çok belirginleşir. Sentrum geminativum içinde lenfositler çoğalır ve plazmosit serisi hücrelere dönüşürler (1,3,4,13). Dalak kanı süzen bir filtre organı olarak görev yapar. Kana karışmış bakteri ve virüs gibi canlı yada yapısı bozulmayan bazı partiküllerin fagosite edilmesinde, dalak makrofajları organizmanın diğer fagositik hücreleri arasında en aktif olanıdır (1,3,4,13).

4. Kan Depolama: Dalak kapsul ve trabeküllerindeki elastik liflerin zenginliği ve pulpasının esas çatısını yapan elemanların ağ şeklinde düzeni dolayısıyla hacmini değiştirebilen elastik bir organdır. Bu sayede kırmızı pulpasının gözeneklerine ve venöz sinuslar içine kan biriktirerek bir depo görevi yapabilir. Organın kan deposu olarak oynadığı rol şiddetli dalak kontraksiyonları gösterebilen at ve köpek gibi hayvanlarda önemlidir. Bu hayvanlarda dalak, kapsül ve trabeküllerinde bol düz kas hücrelerini içerdiği için kuvvetle

kasılır. Bu surette depo ettiği kanı genel dolaşıma iter. İnsan dalağında ise kapsül ve trabeküller içinde düz kas hücrelerinin miktarı az, dalak kontraksiyonu zayıftır. Organın kan deposu rolü de o nisbette az gelişmiştir. Organizmadaki toplam eritrositin ancak % 2-4'ü kadarı depolanır (1,3,13,28) .

Normal dalakta, dolaşımda bulunan kandaki trombosit sayısının 1/3'ü bulunur. Başlıca sinusoidlerde toplanmışlardır ve damar zedelenmesi gibi trombosite ani gereksinim duyulduğu durumlarda hemen kana verilir. (3)

İnsan fetusunda dalak hematopoezis için önemli bir yerdir. Lösemi gibi bazı patolojik durumlarda fetal dönemdeki kan yapıcı fonksiyonuna yeniden başlayan dalak fetal döneme özgü yapılar olan eritrosit ve granülositleri oluşturmaya başlar. Kan yapımının kemik iliği dışındaki bölgelerde gerçekleşmesiyle dalak myeloid metaplaziye uğrar. Splenomegali, anemi, kanda olgunlaşmamış granülositler ve çekirdekli eritrositler görülür (4,13).

Dalak geniş boyutuna ve önemli fonksiyonlarına rağmen çıkarıldığında vücutta çok az bir kayıp etkisine sebep olur. Bir bütün olarak çıkarıldığı zaman onun fonksiyonları kc. ve kemik iliği tarafından üzerine alınır (4,13,28).

III. HÜCRE SIKLUSU

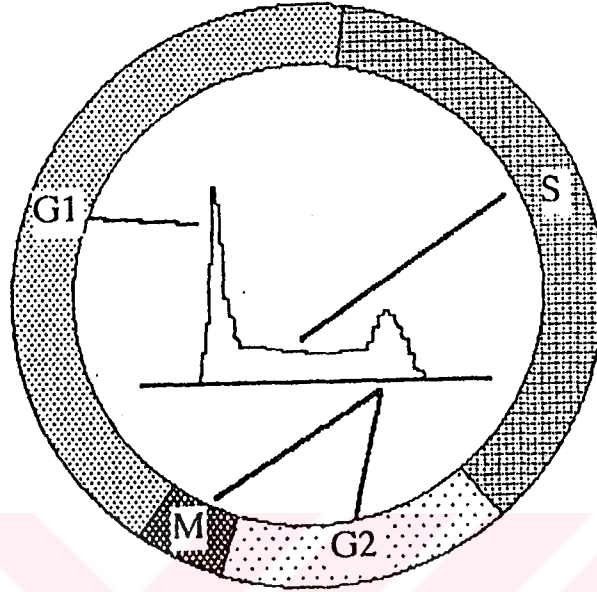
Çok hücreli diploid organizmalarda yaşam tek bir hücre olan ovumun spermiumla birleşerek meydana getirdiği zigot ile başlar (9,10,16,17). Vücut hücrelerinin birbirinden farklı; bölünme farklılıkları ve bölündükten sonra kazandıkları özelliklerden kaynaklanır. İleri derecede diferansiye olmuş sinir ve kas hücreleri dışındaki hemen hemen bütün soma hücreleri bölünme ve çoğalma gücüne sahiptirler. Kemik iliği ve gastrointestinal kanaldaki epitel hücreleri sürekli olarak replike olurlarken hepatositler gibi bazı hücrelerde ancak stimülasyonlarla çoğalmaya girerler (15,17,18,19,20,25) .

Hücre siklusu ister gelişme ister yenilenme amacıyla olsun bir hücrenin mitoz hazırlanması (interfaz) ve mitoz bölünmeyi kapsayan iki interfaz arasındaki devredir (IF+M). Mitoz öncesi dönem hücre bölünmesine hazırlık olaylarının geçtiği dönemdir. Mitoz dönemi ise hücre bölünmesinin gerçekleştiği dönemdir. Yüksek ökaryotlarda hücre siklusunun %90'ını kaplayan interfaz 16-24 saat sürerken mitoz bölünme 1-2 saatte tamamlanır. İnsan vücudunda bulunan 10^{13} - 10^{14} hücrenin tamamı aynı sürede bölünmez. Genel süre 8 saat-100 gündür. Hücre siklusundaki bu durum farklılığı G_1 fazının uzunluğuna bağlı olarak değişim göstermektedir (2,12,17,18,26,27) .

Memeli hücrelerin bölünmesinde kısa mitoz (M Fazı), postmitotik (G_1 Fazı), DNA sentezini içeren (S Fazı), kısa premitotik (G_2 Fazı) ve DNA sentezinin olmadığı istirahat (G_0) evreleri mevcuttur. Premitotik hücreler G_2 fazına girerler ve DNA sentezi bu dönemde durur. G_1 fazı başladığında mitoz tamamlanmış olur. Bu evrelerin özellikleri şu şekilde açıklanabilir (17,18,23).

1. G_1 Fazı : DNA'nın ön sentezleme aşamasıdır. Bu aşamada sabit olarak varolan DNA miktarında RNA ve protein sentez edilir. Bu tür bir sentezlemeye gen miktarlanması (gen dosajı) denir. Bölünmeyen hücreler için G_0/G_1 fazı proliferasyona geçişte spesifik yolları kapsar ve hücreleri DNA sentezine hazırlar. G_0/G_1 fazı istirahat fazı veya presentez fazı olarak bilinir. İnsan vücudundaki farklılaşmamış hücrelerin çoğu bu fazdadır. Bu

hücrelerin DNA içerikleri $2N$ olarak ifade edilen diploid özelliktedir. Bu fazın sonunda DNA sentezi başlar. Süresi yaklaşık 8-10 saat sürer (16,17,23),(şekil 4).



Şekil 4 : Hücre siklusunu ve DNA histogramı ile ilişkisi: G_0 proliferasyon dışı hücreleri tanımlar. G_1 (post mitotik faz): RNA ve protein sentezi var, DNA sentezi yoktur. S (sentez fazı): DNA sentezi başlar, RNA sentezi devam eder ve protein sentezi maksimumdur. G_2 (post sentetik faz): DNA sentezi tamamlanır, RNA ve protein sentezi G_1 kadardır. M (mitoz): Somatik hücre bölünmesi (22).

2. S Fazı : Aktif DNA sentezi ile kromozom duplikasyonu başlar. Hücrelerin DNA içeriği $2N-4N$ arasında artış gösterir. DNA sentezi yaklaşık 7-8 saat sürer. Ayrıca RNA ve protein sentezi de devam eder (16,22,23).

3. G_2 Fazı: DNA sentezinin son aşaması ile mitozun başlangıcına kadar sürecek olan fazdır. DNA içeriği en yüksek düzey olan iki katına (tetraploid $4N$) çıkmıştır. Bu aşamada tekrar bir RNA ve protein sentezi olur. Ayrıca RNA ve protein sentezine ilaveten fosfolipid ve karbonhidratlarda hücre siklusunun G_1-S-G_2 aşamalarında sentezlenmektedir. Bu fazda yaklaşık 3-4 saat sürer (16,17,22,23).

4. M Fazı: Bu fazda ökaryotik hücreler mitozda kromozomlarını ikiye ayırırlar. Önce nükleus sonra hücre ikiye bölünür. Bu fazda yaklaşık bir saat kadar sürer (16,20,22,23).

Mekanizması olarak oldukça karışık olan ökaryotik hücre siklusunun mitoz evresi genellikle profaz, metafaz, anafaz ve telafaz safhalarına bölünerek incelenir. Mitoz evresi oldukça dinamik ve devamlıdır. Mitozun sona yaklaşmış aşamalarından biri olan sitokinazdan sonra diploid bir ata hücreden iki diploid yavru hücre meydana gelir. Mitozda en önemli olay kromozomların ikiye bölünmesi ile birlikte her kromozomun aynı kalıtsal maddeyi taşımasıdır. Bu yarımlardan her biri interfazın sentez safhasında DNA replikasyonu ile oluşan birbirinin ve ona DNA molekülünden birini alarak hazırlanmış olduğundan aynı kromozoma ait iki kromatid kalıtım yükü bakımından birbirine eşittir (4,20,27,32),(Şekil 4).

5. G₀ Fazı: DNA sentezinin bulunmadığı hücre siklusunun bölünmeyen istirahat halinde olduğu dönemdir. Bu dönemin hangi mekanizmalarla meydana geldiği bilinmemektedir (16,17,23).



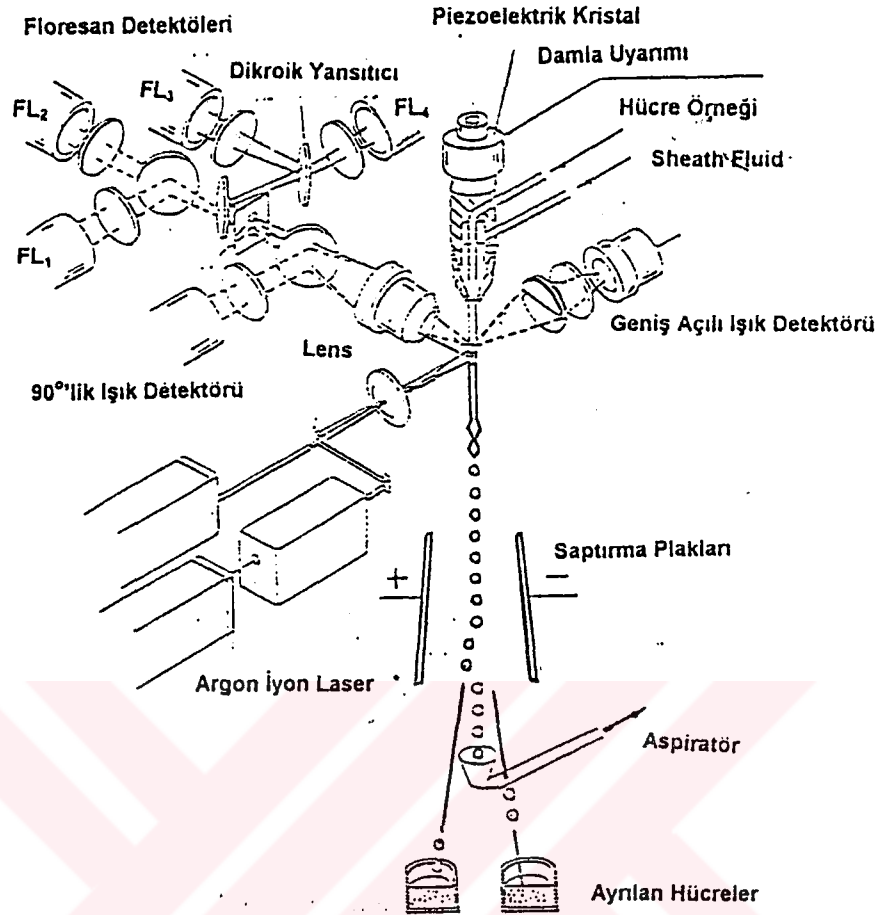
IV. AKIM SİTOMETRİ

Tek hücre düzeyinde hızlı, istatistiksel ve kantitatif tayin sağlayan, hücre ve bileşenlerini analiz etmek için geliştirilmiş bir sistem olan akım sitometri hücrenin fiziksel özelliklerini, yüzey antijenlerini, reseptörlerini, hücre içi bileşenlerini, nükleer DNA-RNA'sını ve diğer hücresel parametrelerinin kantitatif tayinini sağlar. Hedley'in 1983'de dokulardan akım sitometrik DNA analiz metodunu geliştirmesi ve Ethidium Bromide (EB), proidium iodide (PI), Acridine Orange (AO) Chromycine A3 (A3) , Hoechst 33258-33342, Diamidine Phenylindole (DAPI), Mithramycin, gibi floresan boyaların kullanılması yapılan çalışmalara hassasiyet ve kolaylık sağlamış, teşhise yönelik hale getirmiştir (20,24,35,36,38,40,44,47).

Akım sitometri sisteminde boyanmış hücreler hızlı bir şekilde yoğun lazer alanından geçirilirler ve floresan boyalar uyarılır. Boyanın floresan emisyonu hassas fototüp tarafından belirlenir, çoğaltılır, dijitalize edilir ve bilgisayar sistemine aktarılır. Bilgi olarak toplanır ve analiz edilir. Bu şartlar altında her bir hücredeki DNA içeriğinin tam olarak ölçümü yapılır ve istatistiksel olarak bir kaç dakikalık periyotta farklı sayıda hücre ölçümlenebilir (10.000-1.000.000). İki yada üç farklı floresan boya ile multi parametrik analiz yapılarak çeşitli parametrelere göre hücre ayrımı (Cell Sorting) yapılır (20,22,40,43,46,47), (Şekil5).

Hücre siklusu analiz tekniklerinden olan akım sitometri ile S fazı belirlenebildiği gibi G_0/G_1 ve G_2/M fazları da belirlenebilmektedir. Malign hücre içerisindeki DNA'nın akım sitometrik analizinde birbirinden bağımsız üç ayrı parametre bulunmaktadır.

1. Aneuploid hücre popülasyonunun tespiti
2. Aneuploid hücre popülasyonunun seviyesi ve DNA indexi
3. Hücre proliferasyon hızının ölçümüdür (20,40,43).



Şekil 5 : Akım sitometri cihazının şematik görünümü

Buradan elde edilen sonuçlar tanı konulmasında güçlük çekilen hastaların teşhis ve tedavisinde yardımcı olmaktadır (20,43,48).

Akım sitometri sisteminde hücreler ince bir sıvı akımı içinde tek sıra halinde geçmektedir. Bu geçiş esnasında hücrelerin üzerine isabet ettirilen lazer ışını ile hücre yüzeyindeki farklı işaretlerin verdikleri dalga boyları ve farklı renklerdeki floresan boyalarla sağlanan ışık yansımaları çok sayıdaki fotodetektörlerde toplanırlar. Her bir hücreden gelen ışık dağılımları ve uyarımlar elektronik olarak ilgili hücrelerin tanımlanmasında kullanılırlar (18, 23, 48). Hücreler lazer ışın demetinin içinden geçtiği sırada, lazer ışığının bir kısmı dağılır. Işık dağılımının yoğunluğu, hücrelerin büyüklüğü, şekilleri ve iç yapısal özelliklerine göre farklı açılar içerir. Bu önemli özellikler şu şekilde sıralanabilir.

1.Hücre grubunun belirlenmesi: 90° lik dik açı ile gelen ışık dağılımı floresan almış hücrelerin büyüklüğünü tespit eder.

2.Hücre büyüklüğünün önemi: Işık dağılımlarının hepsi hücre büyüklüğü ile etkilenir. Benzer boyuttaki hücreler daha fazla sayıda uyarıma neden olurken, küçük boyutlu hücrelerde ışık dağılım açısı küçüktür.

3.Hücre yapısı: 90° lik açı ile gelen ışık dağılımının miktarı hücrelerin iç yapısına göre tanımlanmasında önemlidir. Aynı büyüklükteki hücreler granülarite dağılımına göre ayrılırlar (18,22,23,48), (Şekil 5).

Akım sitometri'nin en önemli uygulama alanları;

1.Floresan boylarına tutunmuş monoklonal antikoları kullanarak hücrelerin fenotipik analizinin yapılması,

2.Hücrelerin taşıdıkları özelliklere göre ayırt edilmesi (Cell Sorting),

3.DNA analizidir (18,22,23).

Akım sitometrik DNA analizi bir popülasyondaki hücrelerin DNA miktarının dağılımı çalışmasıdır. Bu hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Hücre popülasyonları bölünen ve bölünmeyen fazlardaki hücrelerin karışımından ibarettir. Bu yöntemle taze, dondurulmuş, formalinle tespit edilmiş ve parafinde bloklanmış dokulardan elde edilen hücre süspansiyonları kullanılabilir. DNA içeriğinin akım sitometrik yöntemle analizinde propidium iodide (PI) gibi DNA'ya spesifik floresan boyası ile doğru olarak ölçülebilir (10,11,18,22).

Bu boya hücrelerin DNA'sına bağlanır ve DNA'ya bağlanan boyanın miktarı ise her bir hücredeki total DNA ile orantılıdır. Böylece bir hücre popülasyonunda DNA'da bir kayıp veya ilave (aneuploidi) tespit edilebilir duruma gelir. DNA içeriği anormallikleri tümörlerdeki kromozom anormalliklerini göstermesi yanında kromozom sayısındaki değişiklikleri de yansıtır. Bu teknik ile total DNA miktarından değişiklikler yapmayan translokasyon gibi kromozom anormallikleri saptanamaz (18,22,23,48).

Akım sitometride elde edilen floresan yoğunluğu doğrudan doğruya hücrenin içerdiği DNA miktarına orantılıdır. En az DNA içeren hücreler G_0/G_1 fazında, bunun iki katı G_2/M fazında, S fazındaki hücreler ise ikisinin arasında bir DNA muhtevası gösterir. Siklusun

G_0/G_1 , G_2+M ve S faz uzunlukları bu üç grubun birindeki hücre fraksiyonundan kolayca hesaplanır (11,18,20,27).

DNA analizinde asenkron hücre popülasyonları siklusun G_0/G_1 hücreleri daima büyük fraksiyonda toplanırlar ve $2N$ diploid DNA içeriğine sahiptirler. Diploid DNA içeriği kromozomların sayısı ve büyüklüğü ile ilgili olup her canlı için sabittir. Hücreler G_2 ve M fazına ulaştıklarında DNA içeriği iki katına çıkar. Bunlar G_0/G_1 pikinden ve orijinden uzakta yer alırlar. Siklusun S fazındaki hücreler $2N+N$ arasında DNA içeriğine sahip olup G_0/G_1 ile G_2/M pikleri arasında yer alır. Akım sitometri ile DNA analizinden G_0/G_1 fazındaki hücrelerin DNA içeriği ve hücre siklusu fazlarında kaç hücre olduğu bilgisi sağlanır (18,40,48).

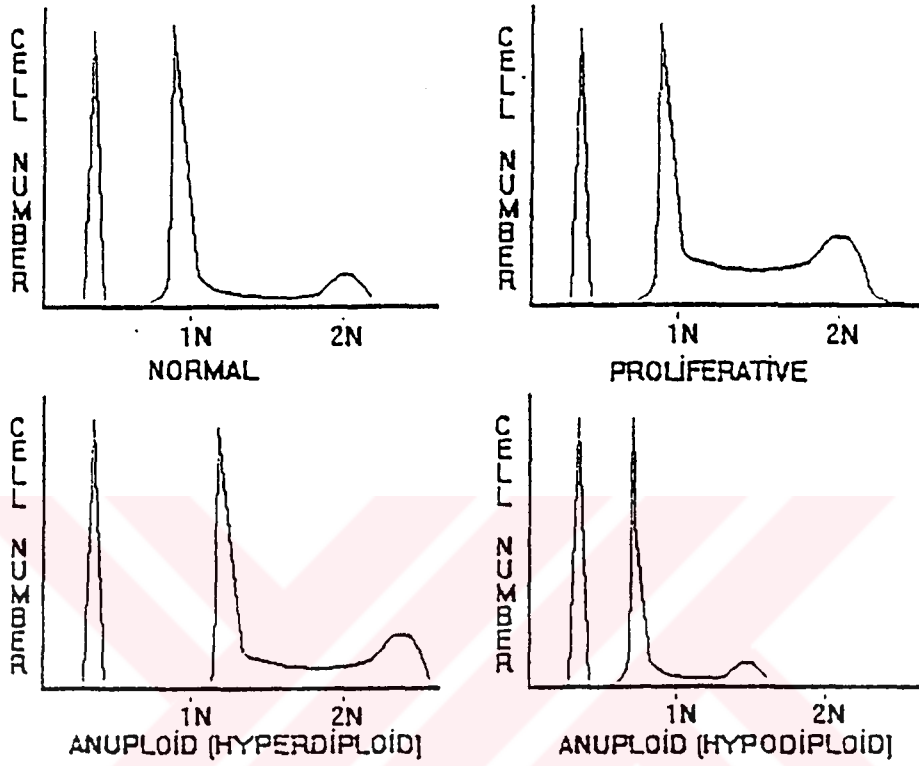
Hücre siklusunda G_0/G_1 fazındaki replike olmayan diploid hücreler aynı DNA içeriğine sahiptirler. Bu DNA içeriği $2N$ diye ifade edilir ve insanlarda 46 kromozomdan oluşur. S fazında DNA sentezi yapılır ve hücresel DNA miktarında artış olur. G_2 ve M fazındaki hücreler $4N$ DNA içeriğine ulaşmış olurlar. Mitozdan sonra orjinal hücrelerin yerine $2N$ DNA içeriğine sahip yeni hücreler alırlar (3,12,28).

DNA histogramlarında y-aksisi hücrelerin (nükleus) sayısını, x-aksis'i ise artmakta olan floresansı (DNA miktarı) temsil eder. Aktif proliferasyon göstermeyen bir hücre popülasyonunun analizinde S faz fraksiyonu (SPF=S phase fraction) ve G_2/M fazları fazlaca saptanmaz. Halbuki normal kemik iliği gibi aktif bir dokunun analizinde daha yüksek SPF ve G_2/M fazında hücreler görülecektir.

DNA histogramlarında DNA içeriğinin dağılımı hücre popülasyonunun yanında pik çevresinde de bir miktar değişkenlik gösterir. Bu değişkenlik cihaz hatalarından, boyama yönteminden veya DNA boyanmasından dolayı hücreden hücreye farklılıklar gösterebilir ve her hücre popülasyonunun G_0/G_1 piki için coefficient of variation (CV) olarak ifade edilir. CV hücre popülasyonunun ortalama pik kanalı numarasının standart sapmaya bölünmesiyle belirlenir. Böylece CV histogramın kalitesini belirler. CV ne kadar küçük ise histogram o kadar güvenilirdir (18,22,23).

Diploid miktarında DNA taşıyan hücre popülasyonunun G_0/G_1 fraksiyonu DNA indeksi (DI) olarak ifade edilir. Normal diploid popülasyonda tanımlanan DNA indeksi 1.0'dır. Malign hücreden çoğunlukla normal diploid DNA içeriğinden sapmalar gösterir ve

histogramda ekstra pikler verir. DNA içeriği artmış ise hiperploid, azalmış ise hipoploid olarak tanımlanır (11,18,23), (Şekil 6).



Şekil 6 : Sık rastlanan DNA histogramlarınının grafiksel anlamları.

V. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Mart 1994 - Nisan 1997 tarihleri arasında KTÜ Tıp Fakültesi SABE Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalında yapılmıştır.

Intrauterin yaşları 21,5 - 36,1 hafta arasında değişen toplam 42 adet fetus çalışmaya dahil edildi (30). Çalışmaya dahil edilen 42 adet fetus 3 gruba ayrıldı. IV. grup herhangi bir dalak patolojisi olmayan 7 adet otopsi materyalinden oluşturuldu.

Çalışma gruplarının oluşturulması:

- I. Grup: 21-25 haftalık fetus
- II. Grup: 26-30 haftalık fetus
- III. Grup: 31-35 haftalık fetus
- IV. Grup: Sağlıklı erişkin grup

Fetuslarda dalağın çıkartılması için dalak lojuna yakın kolay insizyon şekli olarak median laparotomi kesisi tercih edildi. Bu amaçla ksifoid altından pubis hizasına kadar linea alba bütünüyle insize edildi. Mide sağ tarafa çekildi pankreas kuyruğu bulunarak arteria lienalis bağlandı ve kesildi. Lig. pankreatiocolienalis ve lig. gastrolienalis ayrıldı. Dalak serbest olarak pedikülünden bağlanmış halde karın dışına alındı ve pedikülünden kesildi. Dalaklardan alınan parçalar numaralandırılarak % 10'luk tamponlanmış formaldehit solüsyonuna konuldu. Rutin alkol-ksilol doku takip serinden sonra parafin bloklara gömüldü.

Işık Mikroskopik değerlendirme için,

Hazırlanan parafin bloklardan pika marka mikrotom ile 5-7 µ kalınlığında alınan kesitler Hematoksilen Eozin (H&E), Gümüşleme ve Triple boyası ile boyandı. Olympus marka ışık mikroskopunda kesitler incelendi ve resimleri çekildi. Yapılan çalışma ile dalak

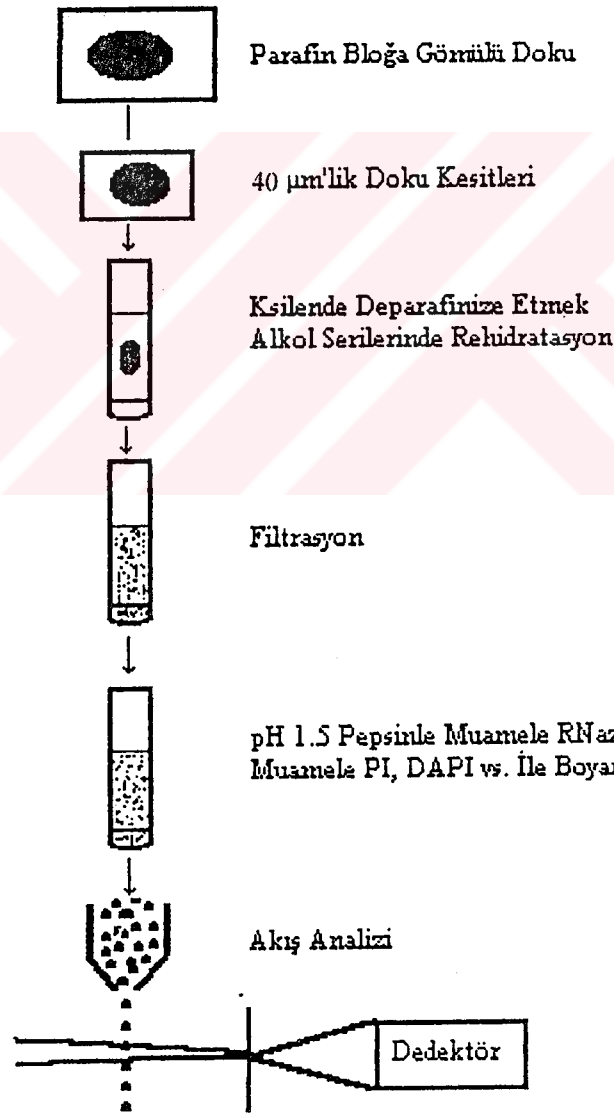
retiküler çatısı, bağ dokusu gelişimi, kollagen liflerin ve retiküler liflerin yoğunluğu, a.sentralis ve a.sentralis etrafında lenfoid folliküllerin oluşumu, dalak kapsülü, trabeküller, beyaz pulpa lenfoid follikül çevresi, kırmızı pulpa sinusoid çevresi ve organ stromasına ait hücresel-yapısal özellikler ışık mikroskopik düzeyde değerlendirildi.

Akım Sitrometrik Analiz için; (Hedley metodu), (11).

Bunun için sırayla şu işlemler yapıldı.

1. Parafin bloğa gömülü dokular işaretlendikten sonra Reichert marka mikrotomla 40 μ kalınlığında 3'er adet kesildi.
2. Tüp içerisine alınan parçalara iki defa 10 ml ksilen konularak 2x10 dakikada parafini giderildi.
3. %100, %90, %75, %50, etanol serilerinden 10'ar dakika geçirilir.
4. Doku örnekleri bir gece veya 6 saat distile suda bekletildi.
5. Ertesi gün örnekler iki defa daha distile suda yıkandı ve saat camına aktarıldı.
6. Bistüri ile ince ince ince doğrandı, enjektöre çekildi ve 16 G iğneden iki defa geçirildi. 10 ml'si konik tüpe alındı.
7. 10 dakika 500 devirde santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
8. PH:1,5 olan % 0,5 pepsin solüsyonundan (100 mg pepsin + 20 ml %0,9 serum fizyolojik) 3 ml eklenerek vortekslendi. 37⁰ C' de 30 dakika inkübe edilirken 5 dakika aralıklarla vortekslendi.
9. 3 ml RPMI 1640 medium (320-1875) solüsyonu ile nötrale edilip 500 devirde 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı.
10. Tekrar 3 ml RPMI solüsyonu eklenerek 47 μ m'lik filtreden geçirildi.
11. 300 μ l solüsyondan alındı DNA prepte (DNA-prep LPR coulter 6604454 < 0,1 % NaN₃ < 0,1 %Propidium Iodide) hazırlandı ve 15 dakika inkübasyondan sonra akım sitometride analiz edildi.

Akım sitometri cihazı (Coulter Epics Elite ESP) DNA kontrol ile standardize edildi. Her bir hücreden sayılarak 488 nm Argon-Iyon lazerde analiz edildi. Hücre akım hızı numunedeki hücre yoğunluğuna göre ayarlandı. Ortalama 25.000 hücre sayılarak bilgisayar sistemine aktarıldı (Şekil 8). Böylece analiz edilmek istenen hücre popülasyonu agregat ve hasarlı hücrelerden büyük ölçüde temizlendi. DNA histogramında G_0/G_1 , S, G_2/M fazındaki hücrelerin oranları, CV değerleri Multicycle bilgisayar programı kullanılarak değerlendirildi. Verilerin istatistiksel analizinde 486 DX 66 bilgisayarda statgraf 5.0 versiyon paket programı kullanıldı. Grupların ikişerli karşılaştırılmasında parametrik varsayımlar yerine getirilmediğinden ve gruplar bağımsız olduğundan non parametrik Mann-Whitney-U testi kullanıldı (25).



Şekil 7 : Parafin bloğa gömülü dokulardan Akım sitometrik DNA analiz yöntemi.

VI. BULGULAR

VI.1. Işık Mikroskopik Bulgular:

Dalağın fetal dönemde gelişimini incelemek için bu çalışmaya 42 adet fetus alındı. Fetusların ayak uzunlukları ölçülerek intrauterin yaşları, dış genital organ muayenesi ile de cinsiyetleri saptandı. Yapılan ölçümler sonucu fetusların 21.5 - 36.1 hafta arasında olduğu tespit edildi. Fetus dalaklarının, normal erişkin dalaklar ile karşılaştırılması amacıyla oluşturulan sağlıklı erişkin grubun yaş ortalaması 39.6 yıl olarak saptandı. Işık mikroskopik çalışmada fetusların haftalara göre dağılımları Tablo I. de gösterilmiştir.

Tablo I : Işık mikroskopik çalışmaya dahil edilen fetusların yaş gruplarına göre dağılımı.

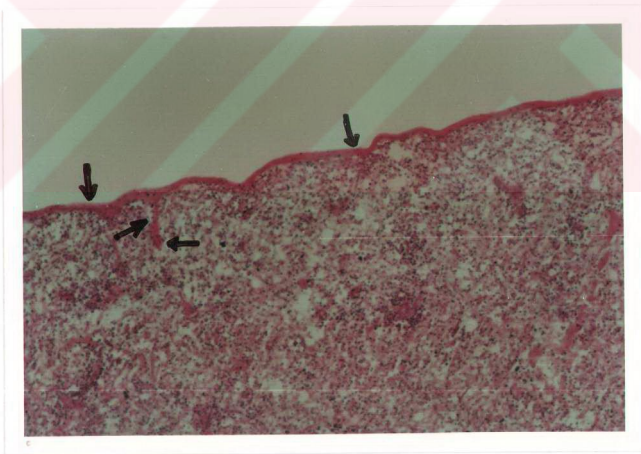
GRUP	HAFTALAR	SAYI	%
I	21-25	15	35.7
II	26-30	13	31.0
III	31-35	14	33.3
TOPLAM		42	100

I.GRUP :

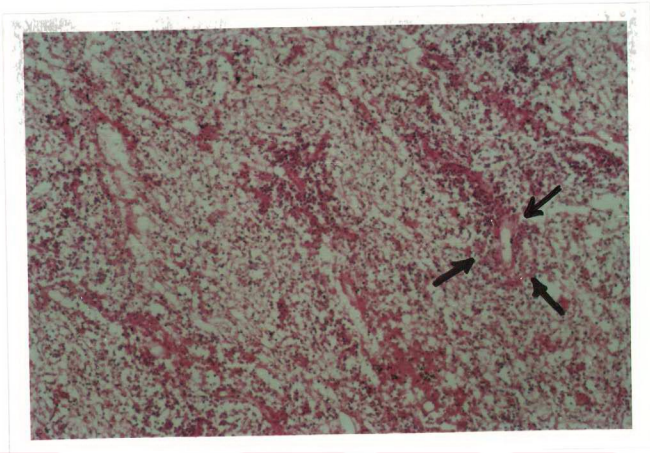
21-25 haftalık insan fetus dalaklarının HE ile boyanmış kesitlerinde kapsül oluşumunun başladığı ve organı ince bir tabaka şeklinde sardığı izlenmektedir. Kapsülden organın derinliklerine uzanan trabeküler yapının giderek incelendiği ve dallandığı görülmekte ancak erişkin yapısına ulaşmadığı dikkati çekmektedir. Kırmızı ve beyaz pulpa ayırımının net olarak yapılamadığı, tabloya kırmızı pulpanın hakim olduğu görüldü (Resim 1).A. sentralisler etrafında yer yer lenfositlere rastlandı ve lenfositlerin oluşturduğu kümeler görüldü. Ancak a. sentralisler etrafında beyaz pulpa oluşumunun tam olarak başlamadığı izlendi (Resim 2).

Retiküler fibrilleri görüntülemek için gümüşleme histokimyasal reaksiyonu ile incelenen kesitlerde retiküler çatının oluşmaya başladığını ancak liflerin yeterli kalınlık oluşturarak ve beyaz pulpa içinde sinusoidal ağ desteği sağlayacak hale gelmediği izlendi .

Bağ dokusu gelişimini incelemek için Triple boyası ile boyanarak incelenen kesitlerde bağ dokusu gelişiminin başladığı izlendi. Ancak kollagen lif görülemedi.



Resim 1: İnce bir tabaka şeklinde dalak kapsülü, kapsülden içeriye uzanan trabeküler yapının (→) oluşumunun başladığı ve kırmızı pulpa yoğunluğu izlenmektedir. (H& E X10)

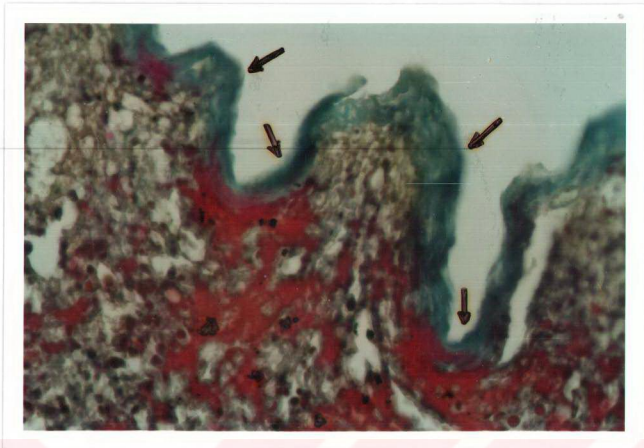


Resim 2: A. sentralistler etrafında lenfoid hücre kümelenmesinin başladığı görülmektedir (H&E X 20).

II.GRUP

26-30 haftalık fetus dalakları alınıp HE ile boyandığında kapsülün organı daha kalın bir şekilde sardığı kapsülden ince bantlar şeklinde uzanan trabeküler yapının organın derinliklerine doğru belirgin bir şekilde ilerlediği, ancak erişkin yapısına bu grupta ulaşmadığı izlendi. Kırmızı ve beyaz pulpa ayırımının giderek belirginleştiği, tabloda kırmızı, pulpa hakimiyeti olmasına rağmen çapları çok büyük olmasa bile beyaz pulpa oluşumunun başladığı görüldü. A.sentralislerin oluşumunun devam ettiği, a.sentralislerin etrafında çok sayıda lenfositler ve bu lenfositlerin oluşturduğu kümelerin artarak çok sayıda lenfoid follikülleri meydana getirdikleri gözlemlendi (Resim 3).

Retiküler fibrilleri görüntülemek için gümüşleme histokimyasal reaksiyonu ile incelenen kesitlerde fibrillerin sayı ve çaplarının artarak daha belirgin hale geldiği, retiküler çatının oluşumunun devam ettiği izlendi.



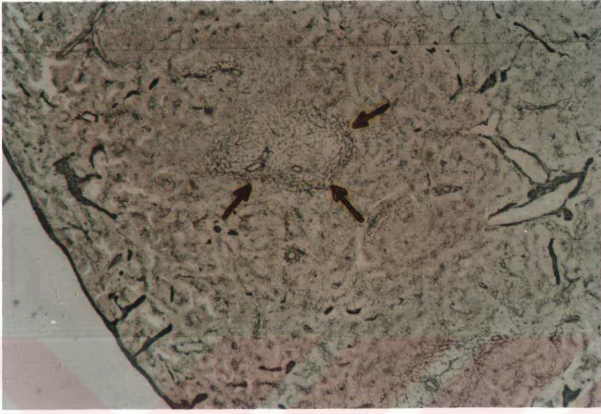
Resim 5: Dalak kapsülünde mavi renkli kollagen liflerin yoğunluğu görülmektedir (Triple X40).

III. GRUP

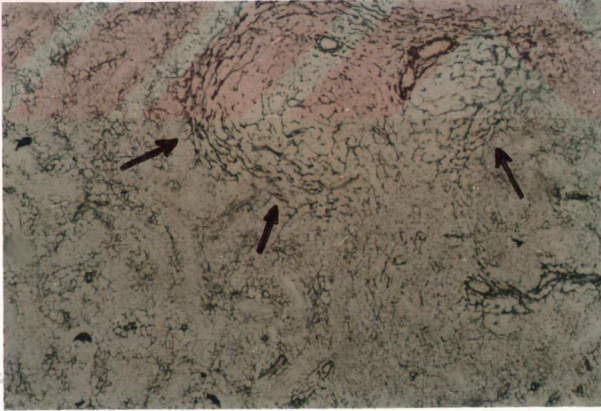
31-35 haftalık fetus dalakları alınıp HE ile boyandığında I. ve II. gruba oranla dalak kapsülünün ve trabeküllerinin gelişmiş olduğu, trabeküllerin kapsülden organın içine doğru ilerlediği ve erişkin yapısına benzer bir görünüm aldığı izlendi. Kırmızı ve beyaz pulpaların şekillendiği tipik yapılarına kavuştukları ve ayrımlarının net olarak yapılabildiği, bununla birlikte yeterli çapa ulaşmadıkları gözlemlendi. A.sentralislerin gelişiminin yeterli seviyeye geldiği a.sentralisler etrafında bol miktarda lenfositlerin kümeleşmesi ile lenfoid folliküllerin oluştuğu tabloda I. ve II. gruplardaki kırmızı pulpa hakimiyetinin bu grupta azaldığı ve beyaz pulpa oluşumunun arttığı izlendi.

Retiküller fibrilleri görüntülemek için gümüşleme histokimyasal reaksiyonu ile incelenen kesitlerde retiküler çatının erişkin yapısına ulaşmasa bile oluştuğu, retiküler fibrillerin sayısı ve çapı olarak arttığı, trabeküllerden ayrılan ince retiküler liflerin lenfoid follikül çevresinde yoğunlaştığı ve bunun kırmızı pulpa sinusoidal kapiler ağı ile birleştiği

izlendi (Resim 6). Ayrıca a.sentralisler etrafında sayı ve yoğunluğu artmış lenfoid folliküllerin oluştuğu izlendi (Resim 7).



Resim 6: Trabeküllerin kapsülden organın içine doğru ilerlediği, trabekülden ayrılan ince retiküler liflerin lenf follikül çevresinde (→) yoğunlaştığı ve bunun kırmızı pulpa sinusoidal kapiller ağ ile birleştikleri görülmekte (Gümüşleme X5).



Resim 7: Resim 6 da ok ile işaretli alanın ileri bir büyütmesi A. sentralisler etrafındaki lenf folliküllerinin (→) yoğunluğu retiküler liflerin sayı ve çap olarak arttığı izlenmektedir (Gümüşleme X10).

VI.2. Akım Sitometrik Bulgular

Işık mikroskopik düzeyde çalışılan 42 adet fetusdan sinir sistemi gelişim özürü olan 9 adet fetus (siklopi, meningoşel, meningomyelosele, ve anensefali gibi) akım sitometrik çalışma dışında bırakıldı. Ayrıca 3 adet fetus ise çalışma tekniklerinde yapılan hatalardan dolayı çalışmaya dahil edilmedi. Akım sitometrik çalışmada kullanılan toplam 30 adet fetus sayılarının haftalara göre dağılımı ve gruplandırılması tabloda gösterilmiştir (Tablo II).

Tablo II: Akım sitometrik çalışmaya dahil edilen fetusların haftalara göre dağılımı ve gruplandırılması.

GRUP	HAFTALAR	SAYI	%
I	21-25	10	33.33
II	26-30	10	33.33
III	31-35	10	33.33
TOPLAM		30	100

IV. Grup olarak erişkin sağlıklı grup toplam yedi dalaktan oluşturulmuş ve kontrol grubu olarak alınmıştır.

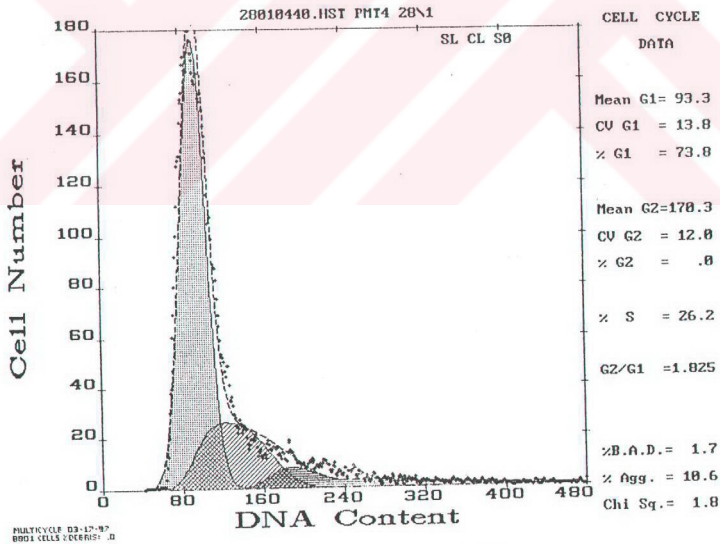
Akım sitometrik analiz ile grupların G_0/G_1 , G_2/M ve S fazları ile bu fazların CV'leri bulunarak ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda gruplar birbirleri ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

I.GRUP :

21-25 hafta arası insan fetusu dalaklarından oluşturulan grubun akım sitometrik analiz sonuçlarının ortalamaları, G_1 : 75.3 ± 12.8 , CVG_1 : 14.5 ± 2.7 , G_2 : 1 ± 0.5 , CVG_2 : 10.7 ± 3.1 , S : 23.7 ± 12.7 olarak belirlenmiştir (Tablo III), (Şekil 8).

Tablo III: I. Grubun Akım Sitometrik Analiz Sonuçları.

No	% G_1	CVG_1	% G_2	CVG_2	% S
1	59.4	17.7	1.6	12.0	39.0
2	91.5	12.5	1.0	3.3	7.5
3	73.2	15.5	0.9	7.6	25.9
4	78.9	12.4	0.8	12.7	20.3
5	89.8	18.3	1.0	12.0	9.2
6	51.8	18.2	0.9	12.9	47.3
7	73.8	13.8	0.0	12.0	26.2
8	88.0	12.8	1.0	13.0	11.0
9	73.0	12.3	1.2	11.7	25.8
10	74.0	11.8	1.7	10.8	24.3
Ort. Ve SD	75.3 ± 12.8	14.5 ± 2.7	1 ± 0.5	10.7 ± 3.1	23.7 ± 12.7

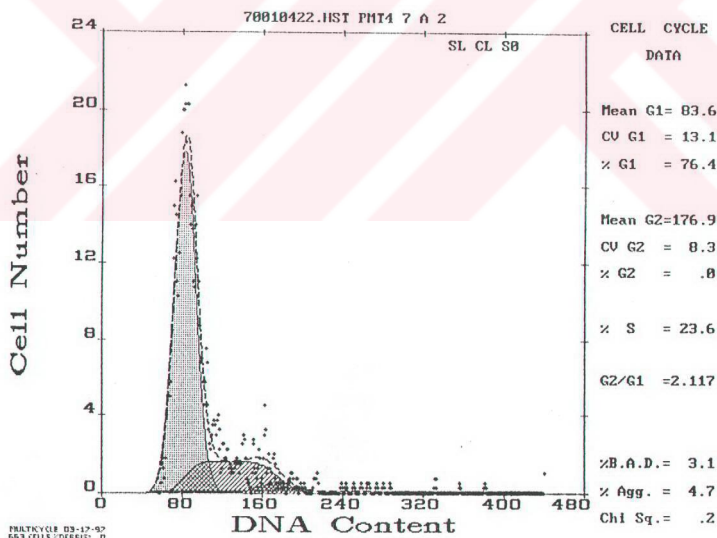
**Şekil 8:** I. Grubun Histogram Örneği

II.GRUP :

26-30 hafta arası insan fetusu dalaklarından oluşturulan grubun akım sitometrik analiz sonuçlarının ortalamaları. G_1 : 73.1 ± 12.2 , CVG_1 : 15.1 ± 2.2 , G_2 : 1.6 ± 1.3 , CVG_2 : 14.1 ± 6.4 S: 25.3 ± 11.7 olarak belirlenmiştir (Tablo IV), (Şekil-9).

Tablo IV : II. Grubun Akım Sitometrik Analiz Sonuçları

No	%G ₁	CVG ₁	%G ₂	CVG ₂	%S
1	49.4	17.4	3.8	22.8	46.8
2	76.4	13.1	0.0	8.3	23.6
3	75.0	15.6	0.7	15.5	24.3
4	97.6	13.6	0.7	4.8	1.7
5	65.3	17.2	0.9	17.2	33.8
6	70.6	16.2	1.2	21.4	28.2
7	74.6	11.4	0.8	18.2	24.6
8	67.5	15.8	1.8	5.7	30.7
9	73.1	17.6	2.7	16.4	24.2
10	81.1	13.2	3.4	10.7	15.5
Ort. Ve SD	73.1 ± 12.2	15.1 ± 2.2	1.6 ± 1.3	14.1 ± 6.4	25.3 ± 11.7



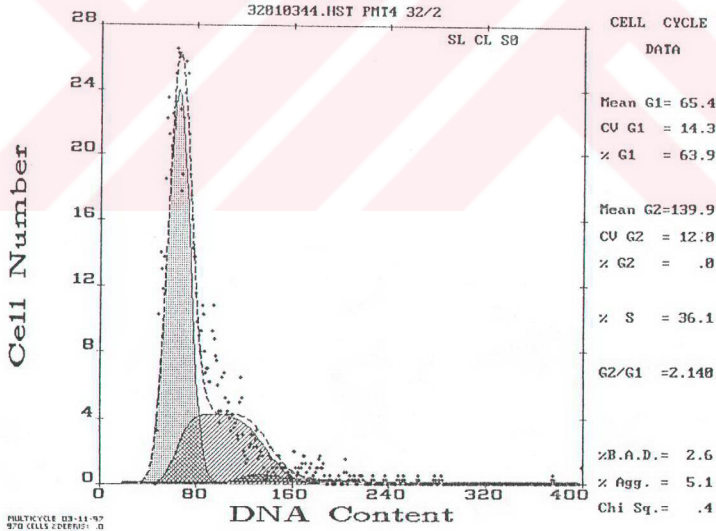
Şekil 9: II. Grubun Histogram Örneği.

III.GRUP :

31-35 hafta arası insan fetusu dalaklarından oluşturulan grubun akım sitometrik analiz sonuçları ortalamaları, G_1 : 66.5 ± 6.6 , CVG_1 : 15.4 ± 2.9 , G_2 : 0.95 ± 0.46 , CVG_2 : 12.9 ± 1.95 , S : 32.6 ± 6.7 olarak belirlenmiştir (Tablo V), (Şekil 10).

Tablo V : III. Grubun Akım Sitometrik Analiz Sonuçları

No	%G ₁	CVG ₁	%G ₂	CVG ₂	%S
1	65.9	16.4	1.2	16.4	32.9
2	63.9	14.3	0.0	12.0	36.1
3	69.2	19.8	0.9	12.9	29.9
4	76.4	14.9	0.8	11.0	22.8
5	66.5	18.9	0.9	12.0	32.6
6	65.1	13.7	1.2	14.3	33.7
7	52.4	13.3	0.6	13.2	47.0
8	62.5	14.3	1.8	11.8	35.7
9	74.3	10.2	0.9	15.3	24.8
10	68.3	17.8	1.2	10.1	30.5
Ort. Ve SD	66.5±6.6	15.4±2.9	0.95±0.46	12.9±1.95	32.6±6.7



Şekil 10: III. Grubun Histogram Örneği

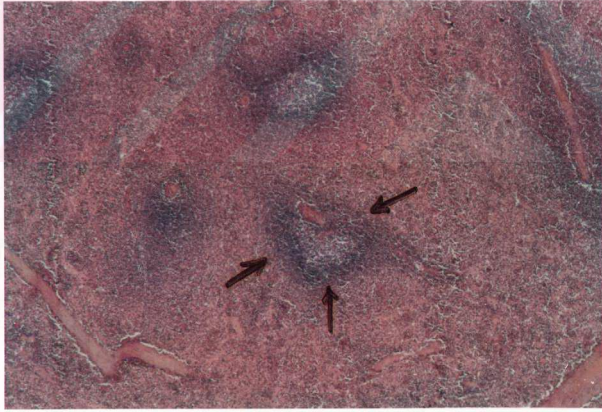
Bağ dokusu gelişimini incelemek için Triple boyası ile boyanan kesitlerde bağ dokusunun gelişimini tamamladığı, kapsül ve trabeküllerdeki kollagen liflerin yoğunluğunun diğer gruplara göre arttığı izlenmiştir.

IV. GRUP

Sağlıklı erişkin grubun HE ile boyanmış kesitlerde dalak kapsülü ve kapsülden ışınal tarzda organın derinliklerine uzanan trabeküllerin organı böldüğü izlendi (Resim 9). Kırmızı ve beyaz pulpa fetus gruplarına göre net olarak ayrırt edildi. A.sentralis ve çevresinde oluşan lenfoid doku ve germinal merkezler belirginleşmiş olarak izlendi (Resim 8).

Gümüşleme histokimyasal reaksiyonu ile incelenen sağlıklı erişkin dalağın retiküler çatısının oluştuğu trabeküllerden ayrılan retiküler liflerin lenf follikülleri çevresinde yoğunlaştıkları, kalınlaştıkları ve sayıca artmış oldukları gözlemlendi.

Bağ dokusunu görüntülemek için Triple boyası ile boyanan sağlıklı erişkin dalağı I. ve II. gruplara göre farklı olarak izlendi. Ancak kapsül ve trabeküllerdeki kollagen liflerin yoğunluğunun III. grup ile benzerlik gösterdiği izlendi.



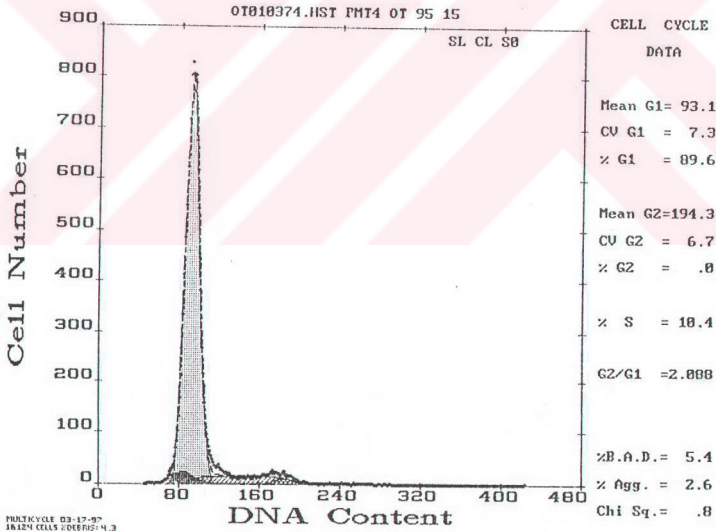
Resim 8: A.sentralis ve etrafındaki lenfoid dokunun oluştuğu erişkin yapı izlenmekte (H&E X5).

IV .GRUP :

Erişkin sağlıklı grubun akım sitometrik analiz sonuçları ortalamaları, G_1 : 90.9 ± 1.9 , CVG_1 : 9.5 ± 1.3 , G_2 : 1.09 ± 0.5 CVG_2 : 8.44 ± 1.43 , S : 7.99 ± 2.31 olarak belirlenmiştir (Tablo VI), (Şekil 11).

Tablo VI: IV. Grup Sağlıklı Erişkinlerin Akım Sitometrik Analiz Sonuçları.

NO	% G_1	CVG_1	% G_2	CVG_2	%S
1	92.7	9.3	1.6	8.2	5.7
2	91.7	10.4	1.0	10.4	7.3
3	92.6	10.5	1.7	8.1	5.7
4	87.6	9.0	0.9	8.3	11.5
5	90.3	11.3	0.9	10.3	8.8
6	89.6	7.3	0.0	6.7	10.4
7	92.0	8.7	1.5	7.1	6.5
Ort. Ve SD	90.9 ± 1.9	9.5 ± 1.3	1.09 ± 0.5	8.44 ± 1.43	7.99 ± 2.31



Şekil 11: IV. Grubun Histogram Örneği

Grupların İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması :

I. ve II. Grup karşılaştırıldığında analiz sonuçlarının tümünde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($P>0.05$), (Tablo VII).

Tablo VII: Akım Sitometrik Analiz Sonuçlarına Göre I. ve II. Grupların İstatistiksel Karşılaştırılması

	I. GRUP	II. GRUP	P
%G ₁	75.3±12.8	73.1±12.2	0.667
CVG ₁	14.5±2.7	15.1±2.2	0.623
%G ₂	1.0±0.5	1.6±1.3	0.761
CVG ₂	10.7±3.1	14.1±6.4	0.241
%S	23.7±12.7	25.3±11.7	0.824

I. ve III. Grup karşılaştırıldığında analiz sonuçlarının tümünde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. ($P>0.05$), (Tablo VIII).

Tablo VIII: Akım Sitometrik Analiz Sonuçlarına Göre I. ve III. Grupların İstatistiksel Karşılaştırılması

	I. GRUP	III. GRUP	P
%G ₁	75.3±12.8	66.5±6.6	0.088
CVG ₁	14.5±2.7	15.4±2.9	0.345
%G ₂	1.0±0.5	0.95±0.46	0.702
CVG ₂	10.7±3.1	12.9±1.95	0.170
%S	23.7±12.7	32.6±6.7	0.076

I. ve IV. Grup karşılaştırıldığında G₁ faz değerinde ($P: 0.00541$), CVG₁ değerinde ($P:0.00076$), CVG₂ değerinde ($P: 0.028$), S faz değerinde ($P: 0.0054$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunurken G₂ faz değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($P>0.05$), (Tablo IX).

Tablo IX: Akım Sitometrik Analiz Sonuçlarına Göre I. ve IV. Grupların İstatistiksel Karşılaştırılması.

	I. GRUP	IV. GRUP	P
%G ₁	75.3±12.8	90.9±1.9	0.00541
CVG ₁	14.5±2.7	9.5±1.3	0.00076
%G ₂	1.0±0.5	1.0±0.5	0.805
CVG ₂	10.7±3.1	8.4±1.4	0.028
%S	23.7±12.7	7.09±2.3	0.0054

II. ve III. grup karşılaştırıldığında analiz sonuçlarının tümünde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($P>0.05$), (Tablo X).

Tablo X: Akım Sitometrik Analiz Sonuçlarına Göre II. ve III. Grupların İstatistiksel Karşılaştırılması

	II. GRUP	III. GRUP	P
%G ₁	73.1±12.2	66.5±6.6	0.081
CVG ₁	15.1±2.2	15.4±2.9	0.677
%G ₂	1.6±1.3	0.95±0.46	0.542
CVG ₂	14.1±6.4	12.9±1.95	0.496
%S	25.3±11.7	32.6±6.7	0.076

II. ve IV. grup karşılaştırıldığında G₁ faz değerinde ($P: 0.00728$), CVG₁ değerinde ($P: 0.00076$) ve S faz değerinde ($P:0.0072$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunurken diğer parametrelerde anlamlı bir fark bulunamadı ($P>0.05$), (Tablo XI).

Tablo XI : Akım Sitometrik Analiz Sonuçlarına Göre II. ve IV. Grupların İstatistiksel Karşılaştırılması

	II. GRUP	IV. GRUP	P
%G ₁	73.1±12.2	90.9±1.9	0.00728
CVG ₁	15.1±2.2	9.5±1.3	0.00076
%G ₂	1.6±1.3	1.0±0.5	0.0845
CVG ₂	14.1±6.4	8.4±1.4	0.079
%S	25.3±11.7	7.09±2.3	0.0072

III. ve IV. grup karşılaştırıldığında G₁ faz değerinde($P: 0.00076$), CVG₁ değerinde ($P: 0.0021$), CVG₂ değerinde ($P: 0.0015$) ve S faz değerinde ($P: 0.00075$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunurken G₂ faz değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($P>0.05$),(Tablo XII).

Tablo XII: Akım Sitometrik Analiz Sonuçlarına Göre III. ve IV. Grupların İstatistiksel Karşılaştırılması.

	III. GRUP	IV. GRUP	P
%G ₁	66.5±6.6	90.9±1.9	0.00076
CVG ₁	15.4±2.9	9.5±1.3	0.0021
%G ₂	0.95±0.46	1.0±0.5	0.0488
CVG ₂	12.9±1.95	8.4±1.4	0.0015
%S	32.6±6.7	7.09±2.3	0.00075

— TARTIŞMA —

Lenfatik organlar içerisinde lenforetiküler grupta gösterilen dalak organizmanın en büyük lenfoid organı ve lenfoid doku topluluğudur (3,4,5,13). Dalak diğer lenforetiküler organ olan ve lenf dolaşımı yolu üzerinde yer alan lenf düğümlerinden farklı olarak kan dolaşımına bağlı, sinusları kanla dolu ve kanı filtre etmek için özelleşmiş tek organdır (1,5,12,13). Çok sayıda fagositik hücre içermesi dolaşımdaki kan hücreleri ile yakın temasta olması nedeniyle dalak dolaşımına girmiş tüm organizmalara karşı önemli bir savunma bölgesidir. Dalakta çok sayıda eritrositinde yıkımı gerçekleşir. Diğer lenfoid organlar gibi antijenle uyarılıp aktive olmuş lenfositlerin yapım yeridir. Aktive lenfositler dalağı terk edip direkt olarak kan dolaşımına girerler. Dalak aynı zamanda kanda dolaşan antijenlere karşı çabucak reaksiyon geliştiren bir immünolojik filtre ve antikor yapıcı organdır (1,3,4,5).

Dalağın bu fonksiyonları, prenatal ve postnatal dönemdeki morfolojik gelişimi ile paralel olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, prenatal ve postnatal dönemlere ait dalağın morfolojik açıdan incelenmesi önem kazanmaktadır.

Kaynaklarda prenatal ve postnatal dönemde dalak yapısı üzerine ışık mikroskopik (33,35,) elektron mikroskopik (45) çalışmalara çok miktarda rastlanmaktadır. Ancak akım sitometrik çalışmalara (34,35,37) daha az rastlanmaktadır.

Bu nedenle dalağın prenatal dönemdeki morfolojik ve fonksiyonel gelişimi ışık mikroskopik düzeyde incelendi. Ayrıca akım sitometri tekniği ile hücre yaşam siklusuna ait değişiklikler belirlenerek çalışma sonuçları, tüm grupların sonuçları ile ayrı ayrı belirtildikten sonra topluca tartışıldı.

Yapılan çalışmada I. gruptaki insan fetus dalaklarının ışık mikroskopik değerlendirilmesinde kapsül oluşumunun başladığı ve organı ince bir tabaka şeklinde sardığı, trabeküler yapının organın derinliklerine doğru uzandığı, kırmızı ve beyaz pulpa ayırımının yapılamadığı tabloya kırmızı pulpanın hakim olduğu izlendi. A.sentralis oluşumunun

başladığı, a.sentralisler etrafında yer yer lenfositlerin oluştuğu ve kümeler oluşturdukları ancak beyaz pulpa oluşumunun tam olarak başlamadığı izlendi. Retiküler çatının oluşmaya başladığı ancak yeterli kalınlığa ulaşmadığı ve beyaz pulpa içinde sinusoidal ağ desteği sağlayacak hale gelmediği izlendi. Bununla birlikte bağ dokusu gelişiminin başladığı izlendi. Ancak kollagen lif izlenemedi.

II. gruba ait fetus dalakları ışık mikroskobu ile incelendiğinde kapsülün organı daha kalın bir şekilde sardığı, kapsülden ince bantlar şeklinde uzanan trabeküler yapısının organın derinliklerine doğru belirgin bir şekilde ilerlediği, kırmızı ve beyaz pulpa ayırımının giderek belirginleştiği, beyaz pulpa ayırımının başladığı görüldü. A.sentralis oluşumunun devam ettiği, etraftan çok sayıda lenfositler ve bu lenfositlerin oluşturduğu kümeleşmelerin artarak çok sayıda lenfoid follikülleri meydana getirdikleri izlendi. Bu grupta dalak kapsülü ve trabeküllerdeki kollagen liflerin yoğunluğunun arttığı da izlendi.

III. gruba ait fetus dalaklarının ışık mikroskobik incelemesinde ise I. ve II. gruba göre dalakların erişkin yapıya oldukça benzerlik gösterdikleri izlendi. Bu grupta dalak kapsülü ve trabeküllerin gelişmiş oldukları, kollagen liflerin yoğun olarak izlendiği, kırmızı ve beyaz pulpaların şekillendiği ve tipik yapılarına kavuştukları ancak yeterli çapa ulaşmadıkları ve beyaz pulpanın daha fazla izlendiği tespit edilmiştir. A.sentralislerin gelişiminin yeterli seviyeye geldiği ve etrafında bol miktarda lenfositlerin kümeleşmesi ile lenfoid folliküllerin oluştuğu izlendi. Retiküler çatının oluştuğu ve retiküler liflerin lenfoid follikül çevresinde yoğunlaştığı tespit edildi.

IV. gruba ait erişkin dalakların ışık mikroskobisi incelendiğinde dalak kapsülü ve kapsülden ışınal tarzda organın derinliklerine uzanan trabeküllerin organı böldüğü, kırmızı ve beyaz pulpanın net olarak ayrıldığı, a.sentralis çevresinde lenfoid doku yoğunluğu ve germinal merkezlerin belirginleşmiş olduğu gözlemlendi.

Kaynak verileri yapısal değerlendirmelerle karşılaştırıldığında, değerlendirmelerin kaynak verileri ile uyumlu oldukları tespit edilmiştir. Kaynaklarda küçük dalak arterlerinin (a.sentralis) adventisyalarda lenfositlerin karakteristik şekilde infiltre olmasının fetal hayatın ikinci yarısında 5. ayda başladığı ve 7. ayda tipik yapısına kavuştuğu bildirilmektedir (8,10,37). Yapılan çalışmamızda lenfositlerin I. grupta a.sentralisler etrafında oluştuğu ve

kümeler oluşturdıkları; II. grupta ise a.sentralisler etrafında lenfoid follükülleri oluşturdıkları tespit edilmiştir.

Erbach ve arkadaşları 18-24 haftalık insan fetus dalağı üzerinde üzerinde yaptıkları bir çalışmada bir çok lenfosit bu haftalarda izole edebildiklerini bildirmektedirler (37). Bu bizim çalışmamızda I. grupta lenfositlerin görülmesini destekleyen bir çalışmadır.

Yine Erbach ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada da fetal dalak lenfoid hücre markırları gebeliğin ortasında izole edilmiştir (38). Bu bilgilerde çalışmalarımızda 21-30. haftalık fetal dalak gruplarında (I. ve II. grup) lenfositler ile ilgili bulgularımızı desteklemektedir.

Kapsülden ayrılan trabeküllerin I. II. III. gruplarda dalağı böldüğü çalışmamızda izlenmiş olup dalağın fetus içinde lobüle olduğu kaynak verileri ile desteklenmiştir (17).

Germinal merkez oluşumu erişkin dalakta görülmüş, gelişim sırasındaki örneklerde görülmemiştir. Bu da bize antijenik yapılara karşı etkileşmenin doğum sonrası dönemde söz konusu olduğunu kuvvetle düşündürmüş ve literatürle de uygun bulunmuştur (1,3,4,13).

Kaynaklarda fetal dalağın 24 - 28. haftada hematopoezis için önemli bir bölge olduğu, dalakta eritopoezisin 28. haftada bittiği (1,7,8,9), ancak son fetal yaşama kadar hematopoetik bir merkez olma özelliği sürdürdüğü (7,13) belirtilmektedir. Yapılan çalışmada I. grupta tabloya kırmızı pulpanın hakim olduğu bu hakimiyetin II. grupta da devam ettiği tespit edilmiştir. Kaynaklarda kırmızı pulpanın koyu kırmızı renkli kanla dolu bir lenfoid doku olduğu (1,3,4,5,12) belirtilmekte olup tespitlerimiz kaynak verileri ile uyumlu görülmüştür.

Çalışmamızda lenfositlerin I. grupta izlenmeye başladığı, yer yer kümeler oluşturdıkları, II. grupta bu kümelerin artarak lenfoid follükülleri oluşturdıkları, III. grupta ise lenfoid follüküllerin yoğunlaşarak tabloya daha fazla hakim olduğu tespit edilmiştir. Kaynaklarda da fetal yaşamın son evrelerinde lenfoid organların sadece lenfositleri meydana getirdikleri (8,10,12,15,37,38) bildirilmiş, bu bilgilerde çalışmamızı bu yönde desteklenmiştir.

Dalak erken fetal periyoda kadar karakteristik şeklini alamaz (6,10).Çalışmamızda fetal dalağın kapsül, trabekül, bağ dokusu, kollagen, beyaz pulpa gelişimi yönündeki

tespitlerimiz bu kaynak verileri ile de uyumlu bulunmuştur. Ayrıca III. grupta dalağın tipik görünümü kazandığı da verilerle desteklenmiştir (7,8,10,12,15). III. grupta (31-35 hafta) kapsül - trabekül - beyaz pulpa lenfoid follikül çevresi - kırmızı pulpa sinüzoid çevresi retiküler ağ sırası ile retiküler çatının erişkindeki organ stromasını oluşturmak için biçimlendiği ve giderek artan oranda kollagen lif kazandığı çalışmamızda gösterilmiştir. Kollagen lifler kapsül ve trabekül dallarında giderek azalan oranda görülmekte, sinusoidal çevrelerde yalnızca retiküler liflerle devam etmektedir. Bu kaynaklarda da belirtilen dalağın kan dolaşımındaki işlevi için uygun bir tespittir (1,3,13,28).

Akım sitometri ile çalışılan dalaklardan elde edilen sonuçlar tartışılmadan önce tekniğin incelenerek tartışılması bu konuda yapılacak çalışmalara ışık tutması açısından uygun görülmüştür.

Hücre örneklerinin hazırlanması akım sitometrik çalışmanın en önemli aşamasıdır. Hücrelerin kohezyon göstermeden tek tek bulunabildikleri bir süspansiyon halinde olmaları gereklidir. Örnekler parafine gömülü, taze ve dondurularak saklanmış dokulardan elde edilmiş olabilir (11,18,23).

Parafinde bloklanmış dokuların akım sitometri ile incelenmesi taze dokulara göre bazı avantajlar sağladığı görülmüştür. Parafinde bloklanmış dokuların önce ışık mikroskopik inceleme şansı olduğundan dokunun en uygun kısmını seçmek mümkün olabilir. Taze dokularda yeterli ve doğru örnekleme yapılıp yapılmadığını kontrol etmek ise çok zordur. Ayrıca parafin blokları dokularda geriye dönük çalışmaların yapılabilmesi, arşivlerdeki bir çok materyalin değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır (20,23,40).

Çalışmamızda da dikkat edildiği gibi parafinde bloklaşmış dokuların çalışılmasında, sonuçların kaliteli ve doğru olması için doku tipi, fizyolojinin çeşidi, fizyolojide bekleme şartları, doku işlenmesi, parafin bloklarında saklama şartları, kesit kalınlığı ve diğer faktörler önemlidir. Arşiv materyali ve diğer solid dokulardan DNA analizi yaparken histogramların kaliteli olabilmesi için doku kesitlerinin kalınlığı da önemli bir faktördür (30 - 50 µm). 30 µm kesitlerde hücre hasarları görülebilmektedir. Çalışmamızda kesit kalınlığı 40 µm olarak alınmıştır (20).

Hücre nükleusları parafin ile tespit edilmiş dokularda daha iyi korunduğundan DNA içeriğinin incelenmesi daha verimli olabilir (22,48). Formalinle fixe edilip parafinde

bloklanmış dokuların taze dokulara göre bazı dezavantajları vardır. Bu dokularda boyanan nükleusların DNA floresansında tahmin edilemeyen ve her hücre için farklılık gösteren önemli azalmalar olabilmektedir. Bu nedenle DNA içerik ölçümlerinde referans noktalarının tespiti için dışarıdan standartlar kullanılmakta bu da sonuçların karşılaştırılmasında sorunlara neden olmaktadır (18,22,23,40).

Parafinize dokularda yapılan deparafinizasyon işlemi incelenecek hücrelerin membranlarının ve stromal elementlerin zarar görmelerine neden olur. Bu yüzden parafinize dokularda genellikle nükleuslar ile ilgili çalışmalar yapılabilmektedir (18,22).

Çalışmamızda akım sitometrik analiz için Hedley metodu kullanılmıştır. Hedley metodu analizi yapılacak hücre süspansiyonlarında 10-30 bin hücre sayımının yeterli görülmektedir (11), Çalışmamızda tüm materyallerden 25 bin hücre sayımı yapılmış buda kaynak verileriyle desteklenmiştir (40).

Çalışmada kullanılan pepsin, kromozomların histon ve nonhiston proteinleri ile DNA arasındaki bağları gevşetip kovalent hale getirerek boyanın DNA ile bağlanmasını sağlar. Enzimatik muamele sonucunda hücrelerin tekrar birbirine yapışması ve agregat oluşması engellenir (11,18).

Floresan boyalarla DNA analizi yapmak ve verim almak, hücrelerin boya ile muamelesi, sıcaklık, pH gibi faktörlerin kontrolü altındadır. Çalışmalarımızda kullanılan PI boyası canlı hücrelere giremediğinden hücrelerin ölü veya canlı olduğunun test edilmesinde de kullanılır. Ayrıca CV'si diğer floresan boyalara göre daha küçük olduğu içinde çok tercih edilmektedir (18,22,23).

Bu literatürler eşliğinde parafin bloklardaki fetus ve erişkin dalak gruplarına akım sitometri tekniği ile DNA analizi uygulandı. G_0/G_1 , G_2/M , S fazları ve CV değerleri gruplar arasında karşılaştırıldı.

Akım sitometrik DNA çalışmamızda diploid yapının dışında aneuploid (hipodiploid, hiperdiploid) yapılar rastlanmamıştır. Çalışma gruplarının az sayıda oluşu bunun nedeni olarak açıklanabilir . Diploid DNA içeriğine sahip hücre popülasyonunun DNA indexi 1 olarak kabul edilmektedir (18). G_0 / G_1 fazındaki hücreler % olarak en yüksek değere burada sahiptirler . Çalışmamızdaki grupları incelediğimiz zaman, DNA indeksinin diploid

özelliğinde olduğu ve G_0/G_1 fraksiyonu tüm gruplarda en yüksek faz değerlerine burada ulaştığı tesbit edilmiştir .

G_0/G_1 faz yüzdesi fetus gruplarında mitotik aktivitenin yüksek oluşundan dolayı düşük bulunur iken , erişkin grupta mitotik aktivitenin azalması ile G_0/G_1 faz yüzdesindeki artış kaynak verileri ile de desteklenmiştir (11,18).

Fetus grupları kendi aralarında G_0/G_1 faz değerleri yönünden karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı tespit edilmiştir ($P>0.05$).Ancak fetus gruplarının her birinin erişkin grup ile karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Bu bize fetal dönemde dalak da mitotik aktivitenin yüksek erişkin dönemde ise düşük olduğunu göstermektedir. Bu bulgularda kaynak verileri ile desteklenmiştir (11,18,22).

G_2/M fazı DNA içeriğinin iki katına çıkıp mitozun gerçekleştiği fazdır (18). Bu fazda elde edilen değerler dolaylı olarak mitotik aktiviteyi göstermektedir. Fetus grupları ve sağlıklı erişkin grup G_2/M faz değerleri yönünde karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır ($P>0.05$).

S faz değeri aktif DNA içeriğinin iki katına çıktığını gösterir ve proliferasyon hızı hakkında bilgi vermektedir (11,18,22). S fazı fetus grupları arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark ifade etmemektedir. Ancak fetus grupları arasında ilerleyen haftalarla birlikte S faz değerinde artış saptanmıştır. Bu artış III. grupta (31-35) en yüksek değerine ulaşmıştır. Bu artışın doğuma yakın haftalarda arttığı kaynak verileri ile de belirtilmiştir (37,38). Fetus dalak gruplarının hepsi ile erişkin grup dalak S faz değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Fetus gruplarında S faz değerlerinin yüksek oluşu fetal dalak da lenfositlerin I. gruptan itibaren II. ve III. grupta giderek artması ile açıklanabilir (37,38).

Sonuç olarak ışık mikroskopik ve akım sitometrik analiz ile fetus gruplarında mitotik aktivitenin hızlı olduğunu, erişkin yaş grubunda ise mitotik aktivitenin azaldığını söyleyebiliriz .Ancak çalışma gruplarının sayısı artırılıp yeni çalışmalar planlanır ise sonuçlar daha iyi yorumlanabilir. Bu nedenle embriyonal, fetal ve postnatal dönemlere ait çok sayıda dalak birlikte değerlendirilip yorumlamanın daha iyi olacağı düşünülmektedir.

VIII. SONUÇLAR

1. Hücre proliferasyon sürecinin intrauterin dönemde giderek arttığı en yüksek değerine 31-35 haftalarda ulaştığı tespit edilmiştir.
2. Fetus dalağının gelişimi sırasında her hangi bir dönemde aneuploid, tetraploid yapıya rastlanmamıştır.
3. Mitotoik aktivitenin fetal dönemde arttığı, erişkin dönemde ise azaldığı tespit edilmiştir.
4. Fetal gelişim sürecinde germinal merkezler belirgin olarak izlenememiştir.
5. Lenfoid folliküllerin 26. haftadan itibaren oluştukları gözlenmiştir.
6. Fetal dalakta 21-30 hafta arasında kırmızı pulpa , 31-35 hafta arsında ise beyaz pulpanın hakim olduğu görülmüştür.
7. Dalağın fetal gelişim sırasında lobüle olduğu izlenmiştir.
8. 31-35 haftalar arsında dalağın erişkin görünümünü kazandığı gözlenmiştir.
9. Hematopoezisin 21-25 haftalarda en yüksek seviyede olduğu dikkati çekmektedir.
10. Dalağın embriyonal, fetal ve postnatal dönemlerde fonksiyonu sırasındaki tartışmalı değişikliklerin anlaşılması için akım sitometrik, elektron mikroskopik ve immünohistokimyasal olarak çalışılması gerekmektedir.

IX. ÖZET

Bu çalışmada insan fetusu dalağının gelişimini ışık mikroskobu ve akım sitometrik analiz ile inceleyerek, morfolojik ve fonksiyonel bakımdan erişkin dalağı ile karşılaştırmak ve yapılacak olan araştırmalara katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

Çalışma Nisan 1995 - Mart 1997 tarihleri arasında K.T.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji - Embriyoloji Anabilim Dalında yapılmıştır. Çalışma grupları intrauterin yaşları 21,5 -36,1 hafta arasında değişen toplam 42 adet fetus ve 7 adet erişkin otopsi materyalinde oluşturuldu.

Kapsül ve trabeküllerdeki bağ dokusu komponentleri, kırmızı-beyaz pulpa gelişimi histokimyasal reaksiyonlarla, dalak hücrelerinin proliferasyon gücü akım sitometrik analizlerle incelendi.

Işık mikroskobik çalışmada, kapsül ve trabeküllerin ayrıntılı yapısı, kırmızı-beyaz pulpa farklılaşması, a.sentralis çevresinde lenfosit birikimi ve lenfoid follüküllerinin sayı ve hacim artışı , a.sentralis oluşumu , kapsül ve trabeküllerde kollagen fibril birikiminin fetal gelişimle paralellik gösterdiği tespit edildi.

Akım sitometrik analizde S faz (DNA sentez fazı) değerleri ileri fetal haftalarda erken fetal haftalara göre kayda değer ölçüde yüksek bulundu. Bu değerlerin yetişkin dalak örneklerinde düşük olduğu görüldü.

X. SUMMARY

The purpose of this study is to investigate the development of fetal spleen by light microscopy and flow cytometric analysis and also compare with adult spleen with respect to morphologic and functional properties.

Study was performed in the department of Histology-Embryology in Medical Faculty of Karadeniz Technical University between April 1995 and March 1997. The study groups include 42 fetus with intrauterin age between 21.5- 36.1 weeks and 7 adult autopsy materials.

Connective tissue components, red-white pulp development by histochemical reactions and proliferation power of spleen cells investigated by flow cytometric analyses.

In microscopic study, the detailed structure of capsul and trabeculs, red-white pulp differantiation lenfosit cumulation around a. centralis, and the development of lymphoid folliculs examined. The number and the volume of lymphoid follicules, capsular and trabecular collagen accumulation were increasing by fetal development.

Flow cytometric analysis revealed "S" phase (DNA synthesis phase) values were significantly higher in late fetal weeks, and these values were lower in adult spleen.

XI. KAYNAKLAR

1. Erkoçak A.: Özel Histoloji. Ankara Üniversitesi . Ankara,1980.
2. Odar İ.V.: Anatomi ders kitabı . Salmanlar Ofset. Ankara ,1984.
3. Paker Ş.:Histoloji. Uludağ Üniversitesi. Bursa ,1990.
4. Jangueri C.L., Carneiro j., Kelley R.O.: Temel Histoloji (Çev.Ed. Y.Aytekin). Barış Kitapevi . İstanbul , 1993.
5. Erbenği T.: Histoloji I. BETA. İstanbul , 1984.
6. Şeftalioğlu A.: Genel insan embriyolojisi . AÜ Basımevi . Ankara , 1991.
7. Keith L., Moore T.V.N. : The developing human clinically oriented embriyoloji. 5.th Edition ,WB Saundurs Company . Philadelphia , 1988.
8. Maskar Ü.: Embriyoloji ders kitabı, İstanbul Üniversitesi. İstanbul,1964.
9. Sadler T.W. : Langman's medical embriyology .6 th edition , Williams and Wilkins. Bultimore , 1990.
10. Petorak İ: Medikal Embriyoloji . BETA . İstanbul ,1986 .
11. Hedley DW: Flow cytometry using parafin-embedded tissue : Five years on. Cytometry, 10 : 229-241 , 1989.
12. Leeson T.S.,Leeson C.R.,Paparo A.A.:Leeson and Leeson 1 st edition,WB Saunders Company 1988 , pp 475-496 .
13. Wheater PR,Burkitt HG, Daniels VG: Fonksiyonel Histology.2 th edition Churchill Livingstone . Edinburg,1987.
14. Erbenği T., Clara M.:Histoloji atlası.3 baskı . İstanbul Üniversitesi . İstanbul,1984

15. Sağlam M. : Genel Histoloji . 3 baskı . Emel matbaacılık . Ankara ,1987.
16. Yenson M: İnsan biyokimyası . 6 baskı . BETA . İstanbul ,1988.
17. Watson J.D., Hopkins N.H. and Roberts J.W.: Moleküler biology of the gene. Fourth ed. Benjamin /Cumming, 1987.
18. Riley R.S.,Mahin E.J. and Ross W.:Clinical application of flow cytometry. First ed. Igaku-Shoin Medical Publishers Inc . New York,1993.
19. Ekmekci A.,Erbaş D.:Kanserin moleküler mekanizması : Onkojenler ve büyüme faktörleri . Ankara ,1991.
20. Uçar F:Maligansi tanısında periferik kan,hücre süspansiyonları ve solid dokularda flow sitometrik DNA ve hücre siklusu analizleri. Doktora tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enst., Trabzon ,1994 (Yayınlanmamış).
21. Givan A.L.: Flow Cytometry: First Principles . Wiley-Liss Inc. New York,1992.
22. Ormerod MG: Flow Cytometry. First ed. BIOS Scientific Publishers Limited. Oxford,1994.
23. Aydın S.:İnsan fetus karaciğerinin ışık mikroskopik ve akım sitometrik incelenmesi. Uzmanlık tezi,KTÜ Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı,Trabzon, 1996 (Yayınlanmamış).
24. Cremer C., Haussmann M., Zuse P., Aten J.A., Barths J., and Buhring H.J.: Flow Cytometry of Chromosomes: Principles and applications in medicine and molecular biology.,82(1): .9-18,1989.
25. Saunders Dawson B.,Trapp R.G.: Basic and clinical bioistatistic. Second ed.,Prentice-Hall İnternational , Connecticut, 1984 , pp.117-118
26. Robertis E.D.P. and Robertis J.R.E.M.F.:Cell and molecular biology. Eight ed. Lea&Febringer. Philadelphia, 1987.
27. Günalp A., Ayter Ş.,Lüleci G.: Tıbbi biyoloji. Meteksan , Ankara 1989.

28. Bloom W. and Fawcett D.W.:A textbook of Histology. 11 th ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia, 1986.
29. Mathews C.K., Van Holde K.E.: Biochemistry. Benjamin/Cummings . California , 1990.
30. Mercer B.M.,Sklar S.,Shariatmadar A.,Gilieson M.S.,D'Alton M.E.:Fetal foot lenght as a predictor of gestational age .Am. J. Obstet. Gynecol., 156 ,p:350-355,1987.
31. Gözükara E.M.: Biyokimya. Repromat Ltd. Ankara, 1990.
32. Menteş N.K., Menteş G.(ed): Harper'in biyokimyaya bakışı. E.Ü. Tıp fak yayınları. İzmir ,1988.
33. .Breel M., Griffionen A. Terhart H., Kraal GG.:An antigen expressed by murine CD8+T cells and activated B cells. Immunobiology. 179 (2-3) : 159-171,1989.
34. .Vikingson A.,Pederson K.,Muller D.:Enumeration of IFN-gamma producing lenfosites by flow cytometry and correlation with quantitative measurement of IFN-gamma . J. Immunol . Methods. 173(2):219-228,1994.
35. .Coventry B.J., Neoh S . H. A. Comparison of the sensitivity of immunoperoxidase staining methods with high-sensitivity fluorecence flow cytometry-antibody quantitation on the cell surface .Histochem -Cytochem. 42(8):1143-1207,1994.
36. Watkins J.R.,Loken M.R.,Knight K.L.:Two B-cell subpopulations identified by F.C..Immunology.56(2):315-320,1985.
37. .Erbach G.T.,Semple J.P.,Osathanondh R.,Kurnick JT.:Phenotypic characteristics of lymphoid populations of middle gestation human fetal liver spleen and thymus. J. Reprod Immunol. 25(1):81-88,1993.
38. .Erbach G.T.,Semple J.P.,MilfordE.,Gougen J., Osathannondh R.,Kunick J.T.: Phenotypic characteristic of lenfosite population isolated from middle gestation human placenta. J. Reprod Immunol. 25(1):1-13,1993.

39. Shimamura M., Ohta S., Suzuki R., Yamazaki K.: Transmission of maternal blood cells to the fetus during pregnancy: Detection in mouse neonatal spleen by immunofluorescence F.C.. Blood. 83(4):926-930, 1994.
40. Hedley Dd.W. Friandler M.L., Taylor I.W.: Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploidy and Its clinical significance. Cytometry. 6(1):327-333, 1985.
41. Schmid I., Uittenbogaart C.H., Giorgi J.V.: Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry. Cytometry. 15(1):12-20, 1994.
42. Ohgama J., Katoh M.: Functional studies on MEL-14+ and MEL-14-T cells in peripheral lymphoid tissue . Immunobiology. 190(3) :225-242 , 1994.
43. Silvestrini R.: Quality control for evaluation of the S-phase fraction by flow cytometry : a multicentric study .The SICCAB group for quality control of cell kinetic determination. Cytometry. 18(1) :11-16 ,1994.
44. Lyons A.B., Parish C.R.: Determination of lenfosite division by F.C.J. Immunol. Methods. 171(1) :131-137 , 1995.
45. Szabo G.J, Toth F, Rethy A: Cell surface antigens reacting with antiretrovirus sera on normal mouse spleen cells: a flow cytometric study. Cytometry. 4 (1):47-53, 1983.
46. Glick B., Lavia M.F., Koger B.: Flow Cytometric analysis of bursal , thymic , and splenic cells from normal and cyclophosphamide-treated embryos. Poult Sci 64(4):723-731, 1994
47. Hirons G.T., Fawcett J.J., Crissman H.a.: TOTO and YOYO: New very bright fluoro chromes for DNA content analyses by F.C.. Cytometry. 15(2):129-140, 1994.
48. Shapiro HM.: Practical flow cytometry. Sec. Ed. Alan R Liss, Inc. New York, 1989.

ÖZGEÇMİŞ

Dr. Ersan ODACI 26.07.1964 yılında Şebinkarahisar'da doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 1984 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesine girdi ve 1991 yılında doktor ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl T.C. Sağlık Bakanlığı Trabzon Göğüs Hastalıkları Hastanesinde göreve başladı.

Doktora eğitimine 1991 yılında KTÜ SABE Histoloji-Embriyoloji Anabilim dalında başladı. İngilizce bilen, evli ve bir çocuk babası olan Dr. Ersan ODACI halen aynı görevini sürdürmektedir.

