

**JİNEKOLOJİK ÖRNEKLERDE MAKROFAJ-DEMİR
İLİŞKİSİNİN SİTOLOJİK VE SİTOKİMYASAL OLARAK
İNCELENMESİ**

**EXAMINATION OF MACROPHAGE-IRON ASSOCIATION
WITH CYTOLOGICAL AND CYTOCHEMICAL METHODS IN
GYNECOLOGICAL SAMPLES**

AYŞEGÜL YÜCEL POLAT

PROF.DR.ŞAYESTE DEMİREZEN

Tez Danışmanı

**Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak
hazırlanmıştır.**

2014

Ayşegül YÜCEL POLAT 'ın hazırladığı “**Jinekolojik Örneklerde Makrofaj-Demir İlişkisinin Sitolojik ve Sitokimyasal Olarak İncelenmesi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**’ nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. M. Sinan BEKSAÇ
Başkan

Prof. Dr. Şayeste DEMİREZEN
Danışman

Prof.Dr. Güldeniz SELMANOĞLU
Üye

Prof.Dr. Nursel GÜL
Üye

Doç.Dr. Pergin ATİLLA
Üye

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu ,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

28/ 02 /2014

AYŞEGÜL YÜCEL POLAT

Sevgili eşim, annem ve babam'a

ÖZET

JİNEKOLOJİK ÖRNEKLERDE MAKROFAJ-DEMİR İLİŞKİSİNİN SİTOLOJİK VE SİTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ

Ayşegül YÜCEL POLAT

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şayeste DEMİREZEN

Şubat 2014, 62 sayfa

Makrofajlar patojenlerin fagositozu, antijen sunumu, apoptoik hücrelerin sindirilmesi ve doku yenilenmesi gibi bir çok önemli görevlerinin yanı sıra vücuttaki demirin depolanması ve bu depolanan demirin gerektiği zaman dokulara gönderilmesinde de rol oynarlar. Çalışmamızın amacı; şimdiye kadar hiç çalışılmamış olan servikovajinal yaymalarda makrofaj-demir ilişkisinin sitolojik ve sitokimyasal yöntemler kullanılarak incelenmesi ve yaymalarda saptanan enfeksiyonlarla makrofaj sitoplazmasında depolanan demirin ilgisinin belirlenmesidir.

Bu çalışma için 200 hastaya ait servikovajinal yaymalar önce Papanicolaou boyama metoduna göre boyanmış ve bu yaymalarda makrofajların bulunup bulunmadığı ışık mikroskopik olarak saptanmıştır. Makrofajların varlığı saptanan 95 yayma çalışma kapsamına alınmış ve bu yaymalar, makrofajlarda depolanan demiri göstermek amacıyla Prussian Blue boyama metodu ile boyanmıştır. Prussian Blue ile boyanan 95 yaymanın 12 'sinde sitoplazmaları diffüz mavi renk boyanma gösteren demir yüklü makrofajlara rastlanmıştır. Bu 12 yayma çalışma grubu olarak, makrofaj sitoplazmalarında boyanma gözlenmeyen 83 yayma ise kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Çalışma grubunda bulunan 12 yaymadaki makrofajlarda gözlenen diffüz boyanmanın yanı sıra, koyu mavi renkte ve çeşitli büyüklüklerde granüllerin de bulunduğu belirlenmiştir. Her yaymada diffüz boyanan ve diffüz boyanma ile birlikte granüler boyanma gözlenen makrofajlar sayılıp ortalaması alınarak, bu oranın toplam 12 yayma için 10:1 olduğu görülmüştür.

Makrofajlar ile diğler hücreler arasındaki ilişkiler incelendiğinde ise; makrofajların eritrositlerle yakın ilişkide olduğu, bir kısmında eritrosit zarı ile makrofaj zarının kaynaştığı bir kısmında ise bu iki zar arasında çok az bir mesafe olduğu saptanmıştır. Bu yakın ilişkinin yanı sıra makrofajlardan eritrositlere doğru uzanan uzunlu kısıalı pseudopod'ların bulunduğu, bazı ince pseudopodların ise eritrositler arasında kalan dar aralıklara kadar uzandığı görülmüştür. Ayrıca makrofajların sitoplazmalarında fagosite edilmiş apoptotik cisimciklerin, polimorfonükleer lökositlerin ve bazı hücresele artıkların bulunduğu, bazı makrofajların PMNL'lere doğru pseudopod uzattığı saptanmıştır.

Çalışma kapsamına alınan 95 yaymanın 4'ünde *Candida*, 4'ünde ise Bakteriyel vajinozis enfeksiyonlarına rastlanmıştır. Ancak bu enfeksiyonların görüldüğü yaymalardaki makrofajların sitoplazmalarında Prussian Blue metodu ile boyanmaya rastlanmamıştır.

İstatistiksel analizler için Ki kare testi kullanılmıştır. Bu metoda göre makrofajların sitoplazmasında gözlenen boyanma pozitifliği ile aynı yaymada eritrositlerin bulunması arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p < 0.05$). Ayrıca boyanma pozitifliği ile fertil ve menopoz dönem karşılaştırıldığında, fertilitte ile boyanma pozitifliği arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Servikovajinal yayma, makrofaj, demir, Prussian blue

ABSTRACT

EXAMINATION OF MACROPHAGE-IRON ASSOCIATION WITH CYTOLOGICAL AND CYTOCHEMICAL METHODS IN GYNECOLOGICAL SAMPLES

Ayşegül YÜCEL POLAT

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof.Dr. Şayeste DEMİREZEN

February 2014, 62 pages

Macrophages play important roles in phagocytosis of pathogens, antigen processing, clearance of apoptotic cells and tissue renewal, on the other hand they take part in storage of body iron and delivering it to tissues. The purpose of our study is examining the association between macrophage and iron in cervico-vaginal smears by using cytological and cytochemical method and determining the relation between infection in smears and macrophage iron storage.

Firstly cervico-vaginal smears of 200 patients stained with Papanicolaou methods and the presence of macrophages was detected in 95 smears. These 95 smears containing macrophage stained with Prussian Blue method in an attempt to observe macrophage iron storage. Iron laden macrophages which diffuse blue staining was observed in their cytoplasm were seen in 12 of 95 smears. These 12 smears were chosen as study group and other 83 smears were chosen as control group. Granules being various size and staining dark blue color were seen in cytoplasm of iron laden macrophages besides diffuse cytoplasmic staining. Iron laden macrophages were counted in all of the 12 smears. The ratio of diffuse staining to diffuse/granular staining was detected 10:1.

When the relationship between macrophages and other cells was examined, macrophages was found to be in close contact with erythrocytes. It was determined that cell membranes of erythrocytes was fused with cell membrane of some macrophages. Moreover macrophages extending pseudopods which are various size to erythrocytes and PMNLs were observed. Also PMNLs, apoptotic bodies and cellular debris in macrophage cytoplasm were attracted our attention.

Amount 95 smears containing macrophages, 4 *Candida* and 4 Bacterial vaginosis infections were detected. However, there were no staining with Prussian Blue method in the cytoplasm of macrophages that were seen in these smears.

Chi square test was used for statistical analysis. According to these analysis, statistically significant association was found between possitive iron staining of macrophage cytoplasm and the presence of erythrocytes in smears. ($p < 0,05$) In addition statistically significant relation was detected between possitive iron staining of macrophage cytoplasm and fertility, too. ($p < 0,05$)

Key words: Cervico-vaginal smear, macrophage, iron, Prussian Blue

TEŞEKKÜR

Üniversite hayatım süresince ders anlatımına ve verdiği bilgilere hayran kaldığım, yüksek lisans eğitimim boyunca akademik gelişimim yanında birçok hayat dersi de edindiğim, iş bulma sürecinde bana büyük destek veren, tez yazma sürecinde saatlerini ve emeğini benden esirgemeyen değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Şayeste DEMİREZEN'e,

Çalışmamızı yürütmemiz için gerekli olan materyallerin toplanmasını sağlayan ve bu süreçte bize her zaman içtenlikle davranan Sayın Prof. Dr. M. Sinan BEKSAÇ'a,

Kendisi ile aldığım ders sayesinde tanıştığım, yanına her gidişimde yeni bir şey öğrendiğim, o geniş akademik bakış açısına ve hayat görüşüne tekrar tekrar saygı duyduğum sevgili Hocam Prof. Dr. F. Figen KAYMAZ'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca iyi kötü her anımızı paylaştığımız, birlikte çok eğlenceli ve güzel günler geçirdiğimiz, o günlerimizi özlemle andığım canım arkadaşlarım Funda GERÇEKER'e, Merve ÖZCAN'a ve Aydan MUTLU'ya,

Başım her sıkıştığında kendimi yanında bulduğum sevgili Hocam Hanife Güler DÖNMEZ'e ve bütün üniversite hayatım boyunca bana her türlü manevi desteği sağlayan canım Hocam Remma GÜLSOY'a,

Lisans günlerimi hayatımın en güzel dönemi haline getiren, her zaman daha ileriye gitmem için bana destek olan, yüksek lisans eğitimimde tez çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan, yardım eden, sonsuz sabırla her işimi kolaylaştıran, bana olan sevgisinden ve güveninden büyük güç aldığım sevgili eşim Seçkin POLAT'a,

Ve son olarak; beni büyük özveri ve fedakarlıklarla büyüten, hayatımın her döneminde olduğu gibi yüksek lisans eğitimim boyunca da maddi manevi bütün desteklerini benden esirgemeyen, bana verdikleri emekleri hiçbir zaman ödeyemeyeceğim canım annem Hülya YÜCEL ve canım babam Edib YÜCEL'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER VE KISALTMALAR	xii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Makrofajların genel özellikleri	3
2.1.1. Makrofajların kökeni	3
2.1.2. Makrofajların yapısı	5
2.1.3. Makrofajların vücutta bulunduğu yerler	5
2.2. Makrofajların immün sistemdeki görevleri	6
2.2.1. Fagositoz	6
2.2.2. Antijen sunumu	7
2.3. Makrofaj- demir ilişkisi	9
2.3.1. İnsan vücuduna demir alımı ve kullanıldığı yerler	9
2.3.2. Makrofajlardan demir geri dönüşümünde rol oynayan moleküller	10
2.3.2.1. Transferrin	10
2.3.2.2. Transferrin Reseptörü	10
2.3.2.3. Laktoferrin	11
2.3.2.4. Ferritin	11
2.3.2.5. Hemosiderin	12
2.3.2.6. Demir düzenleyici protein 1 ve 2	13
2.3.2.7. NRAMP-1 ve DMT-1/NRAMP-2	14
2.3.2.8. Ferroportin	15
2.3.2.9. Hepsidin	15
2.3.3. Makrofajlara demirin alınma yolları	17
2.3.4. Makrofajlarda demirin depolanması	18
2.3.5. Makrofajlardan demir salınımı	18
2.4. Demir metabolizması hastalıkları	19
2.4.1. Demir eksikliği hastalıkları	19

2.4.2. Demir birikimi hastalıkları	21
3. YÖNTEM VE GEREÇLER	23
3.1. Örneklerin alınması.....	23
3.2. Sitolojik Yöntem	23
3.3. Sitokimyasal yöntem.....	24
4.SONUÇLAR.....	26
4.1.Servikovajinal Örneklerin Sitolojik Yöntemle İncelenmesi.....	26
4.2.Serviko-vajinal Örneklerin Sitokimyasal Yöntemle (Prussian Blue) İncelenmesi ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	41
5. TARTIŞMA	49
6.KAYNAKLAR	55
7.ÖZGEÇMİŞ	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1: Monositlerin damar içinden bağ dokuya geçiş yolları a) Monositin iki endotel hücresi arasından geçerek gerçekleştirdiği "paraselüler diapedez", b) Monositin bir endotel hücresinde açılan pordan geçerek gerçekleştirdiği "transselüler diapedez" (12 numaralı kaynaktan esinlenerek çizilmiştir.)..... 4

Şekil 2. 2: Ferritin proteini ve transferrin reseptörü sentezinin makrofaj sitoplazmasındaki demir miktarına göre IRP biyomolekülleri tarafından düzenlenmesi I) Makrofaj sitoplazması içinde demir eksikliği görülmesi durumunda ferritin proteini ve transferrin reseptörü sentezi II) Makrofaj sitoplazması içindeki demirin fazla miktarda olduğu durumda ferritin proteini ve transferrin reseptörü sentezi..... 14

Şekil 2. 3: Makrofajlardan demir salınımının hepsidin hormonu tarafından düzenlenmesi 16

Şekil 2. 4: Makrofajlarda demir döngüsü 19

Şekil 4. 1: İçinde irili ufaklı vakuoller (ok) içeren, çekirdeği (Ç) böbrek şeklinde olan bir makrofaj görülmektedir. Bu makrofajın etrafında gruplar halinde eritrositler yer almaktadır, Eritrositlerin bazılarının hücre zarının makrofaj zarıyla adeta kaynaştığı (çift ok), bazılarının ise kaynaşmak üzere olduğu (kalın ok) görülmektedir. (Papanicolaou, x1000)..... 28

Şekil 4. 2: Çekirdeğinde küçük bir girinti oluşmuş, sitoplazması köpüklü görünümde olan bir makrofaj zarından etrafında grup halinde dizilim göstermiş eritrositlere doğru uzanan ince bir pseudopod görülmektedir (ok). (Papanicolaou, x1000) 29

Şekil 4. 3: Yanyana dizilim göstermiş yuvarlak çekirdekli, irili ufaklı vakuoller içeren dört makrofaj görülmektedir (M1, M2, M3, M4). M1 ve M2 makrofaj zarları arasında yarısı parçalanmış bir eritrosit görülmektedir (kalın ok). M2 makrofajının hücre zarından bu eritrosite doğru uzanan iki tane pseudopod dikkati çekmektedir (ok). Ayrıca bütün makrofajların sitoplazmalarında dağınık halde bulunan ya da çekirdek zarına bitişik fagositik vakuoller gözlenmektedir. Bu vakuoller içerisinde irili ufaklı eozinofilik özellikteki yapılar dikkati çekmektedir. (Papanicolaou, x1000) 30

Şekil 4. 4: Sitoplazmasında birçok fagositik vakuol içeren makrofajın bir yandan bir eritrosit ile yakın ilişkide olduğu görülürken (ok), bir yandan da sitoplazmasını

kaybetmiş çıplak bir çekirdek ile hücre zarının kaynaştığı görülmektedir (kalın ok). (Papanicolaou, x1000) 31

Şekil 4. 5: Makrofaj sitoplazmasında çok sayıda fagositik vakuol görülmektedir. Bu vakuoller içerisinde piknotik çekirdekli ve daralmış sitoplazmalı PMNL'ler (ok) ve birçok hücre artığı (kalın ok) dikkati çekmektedir . (Papanicolaou, x1000) 32

Şekil 4. 6: M1 makrofajının sitoplazmasında vezikül içinde sindirdiği laktobasiller görülmektedir (ok). Aynı zamanda makrofaj zarından bu zara bitişik gibi görünen zemindeki hücre artıklarına doğru çıkıntılar meydana geldiği gözlenmektedir (kalın ok). M2 makrofajının zarından ise PMNL'lere doğru uzanan kalın pseudopodlar (kıvrık ok) ve bu PMNL'lerin hücre içine alınmak üzere olduğu dikkati çekmektedir. (Papanicolaou, x1000) 33

Şekil 4. 7: Parabazal hücrelerin arasında eozinofilik renkte boyanmış bir çok apoptotik cisimcik içeren, çekirdeği kenara itilmiş bir makrofaj görülmektedir. (Papanicolaou, x1000) 34

Şekil 4. 8: Hücre zarları kaynaşmış bir PMNL ve makrofaj yan yana görülmektedir. Makrofajın zarından eritrositlere doğru uzanmış kısıklı uzunlu çok sayıda pseudopod (P) dikkati çekmiştir. Bazı pseudopodların (ok) bu eritrositlerle yakın ilişki kurduğu ve bu hücrelerin zarlarında içeri doğru bir çöküntü oluşturduğu gözlenmiştir. PMNL zarının da grup halindeki eritrositlerin zarlarıyla adeta birbirine değecek kadar yakınlaştığı görülmektedir. (Papanicolaou, x1000) 35

Şekil 4. 9: Menopoz dönemindeki bir hastaya ait yaymada birçok makrofajın bir araya gelerek oluşturduğu bir "dev makrofaj" görülmektedir. (Papanicolaou, x1000) 36

Şekil 4. 10: Skuamoz epitel hücrelerinin üzerinde *Candida* hifleri görülmektedir. Hifler arasında "septâ" adı verilen boşluklar gözlenmektedir (ok). *Candida* enfeksiyonunun bazı epitel hücrelerinin çekirdeklerinde irileşmeye neden olduğu dikkati çekmektedir (kalın ok). (Papanicolaou, x1000) 37

Şekil 4. 11: Zeminde serbest kokların bulunduğu fertil dönemdeki bir hastaya ait yaymada bazalinde birçok sil (ok) bulunan bir endoservikal hücre dikkati çekmiştir. (Papanicolaou, x1000) 38

Şekil 4. 12: Kontrol grubundaki bir hastaya ait yaymada epitel hücrelerinin sitoplazmasında koilositik atipi (ok) ve bunun yanı sıra çekirdekte irileşme,

hiperkromatizm ve kromatinlerde kabalaşma (kalın ok) dikkati çekmektedir. (Papanicolaou, x1000) 39

Şekil 4. 13: Hiperkromatik ve aşırı irileşmiş, çekirdekçikleri oldukça belirgin çok sayıda çekirdeğe sahip bir hücre görülmektedir. (Papanicolaou, x1000) 40

Şekil 4. 14: Çalışma grubundaki yaymalarda bazı makrofajlar boyanırken bazılarının boyanmadığı dikkati çekmiştir. Skuamoz epitel hücreleri arasında yan yana dizilim göstermiş üç tane makrofajdan ikisinin boyandığı (ok) ve bir tanesinin boyanmadığı (kalın ok) görülmektedir. (Prussian Blue, x1000)..... 44

Şekil 4. 15: Sitoplazmasında diffüz boyanma gözlenen bir makrofaj görülmektedir. Bu makrofajın sitoplazmasında bulunan fagositik vakuollerde boyanma gözlenmezken (kalın ok), fagosite edilmiş bir maddenin kendi renginde olduğu dikkati çekmiştir (ok). (Prussian Blue, x1000) 45

Şekil 4. 16: Sitoplazmasında diffüz mavi renkte boyanmanın yanı sıra çeşitli büyüklüklerde koyu mavi renkli birçok granül (ok) içeren bir makrofaj görülmektedir. (Prussian Blue, x1000) 46

Şekil 4. 17: Sitoplazmasında diffüz boyanma gözlenen bir makrofaj ve çevresindeki eritrositler görülmektedir. Makrofaj hücre zarının ve eritrosit hücre zarlarının birbirlerine yaklaştığı (kalın ok) ve makrofaj zarından eritrosite doğru uzanan pseudopodlar (ok) dikkati çekmektedir. (Prussian Blue, x1000) 47

Şekil 4. 18: Çevresinde bir çok PMNL bulunan boyanmış bir makrofaj (M1) ile sitoplazmasında PMNL içeren bir fagositik vakuol (ok) gözlenen boyanmış bir makrofaj (M2) görülmektedir. (Prussian Blue, x1000)..... 48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1: Makrofajlarda boyanma pozitifliğinin yaymalarda bulunan eritrosit ve PMNL açısından istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	42
Çizelge 4.2: Makrofajlarda boyanma pozitifliğinin hastaların fertilitate ve menopoz durumlarına göre değerlendirilmesi.....	42
Çizelge 4.3: Makrofajlarda boyanma pozitifliğinin yaymalarda gözlenen enfeksiyonlara göre değerlendirilmesi.....	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

µm	Mikrometre
A	Angstrom
gr	Gram
Fe	Demir
mg	Miligram
kD	kiloDalton
α	alfa
γ	gamma
Da	Dalton

Kısaltmalar

PAP	Papanicolaou boyama metodu
MCP1	Monocyte chemoattractant protein-1
ICAM-1	Intercellular adesion molecule -1
ICAM-2	Intercellular adesion molecule -2
GM-CSF	Granulocyte- Macrophage Colony Stimulating Factor
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MHC I	Major histocompatibility complex-I
MHC II	Major histocompatibility complex-II
DMT1	Divalent Metal Transporter 1
IRP1	Iron regulatory protein 1
IRP2	Iron regulatory protein 2
IRE	Iron responsive element
IFN- γ	Interferon-γ
LPS	lipopolisakkarit
TNF-α	Tümör nekroz faktör-α
IL	Interlökin
PMNL	Polimorfonükleer nükleer lökosit
BV	Bakteriyel vajinozis

1.GİRİŞ

Makrofajlar kemik iliğinde üretilen ve kan dolaşımına geçen monositlerin farklılaşmasıyla meydana gelirler. [1] Hücre yüzeylerinde bulunan moleküllerdeki farklılıklar, buldukları farklı dokular ve bu dokulardaki yerleşim yerleri nedeniyle değişik isimlerle adlandırılırlar. [2]

Makrofajlar vücutta birçok dokuda önemli görevler üstlenmişlerdir. Temelde patojen organizmaların fagositozunda ve bu organizmalarda bulunan antijenlerin işlenerek diğer immün sistem hücrelerine sunulmasında görev alan bu hücreler, dokularda bulunan apoptoik hücrelerin hücre içine alınarak parçalanmasında, doku yenilenmesinin sağlanmasında ve diyetle vücuda alınan demirin geri dönüştürülmesinde de önemli rol oynamaktadırlar. [3][4]

Sağlıklı bir insanın vücudunda yaklaşık 3-5 gr demir bulunmaktadır. Vücutta bulunan bu demir eritrositlerdeki hemoglobinin, kaslardaki miyoglobinin, mitokondrilerde bulunan sitokromların ve vücuttaki çeşitli enzimlerin yapısına katılırlar. Sağlıklı insanlarda intestinal sistemden günlük yaklaşık 1 mg demir emilir. Bu miktar ise vücuttaki günlük demir ihtiyacını karşılayamamaktadır. Bu nedenle vücuttaki çeşitli kaynaklardan elde edilen ve intestinal sistemden emilen demirin vücutta geri dönüştürülmesi gerekmektedir. [5]

Makrofajlar ömrünü tamamlamış eritrositlerin fagositozuyla ve hücre yüzeylerindeki çeşitli reseptörlerin “demir – protein” komplekslerini tanımasıyla birlikte demiri hücre içine alırlar. Makrofaj içerisine alınan bu demir-protein kompleksi makrofaj içinde çeşitli işlemler sonucunda birbirinden ayrılır ve demir serbest hale gelir. Sitoplazma içerisindeki serbest demir makrofaj için toksik etki gösterir. Bu nedenle demir makrofaj sitoplazması içindeki ferritin ve hemosiderin moleküllerine tutunarak depo edilir. Dokularda demir ihtiyacı olduğu zaman gelen sinyalle makrofaj uyarılarak sitoplazmasında depo edilmiş olan demir, makrofaj zarındaki ferroportin adı verilen transmembran protein aracılığıyla kan plazmasına verilir ve buradan gerekli dokulara taşınır. Bu yollarla makrofajlar demirin vücuttaki geri dönüşümünde rol oynarlar.

Araştırmamızın amacı; 23 - 81 yaş arası fertil ve menopoz dönemindeki hastalardan alınan serviko-vajinal örneklerde sitolojik ve sitokimyasal yöntemler kullanılarak, ışık mikroskobu altında makrofaj-demir ilişkisini gözlemlemek ve

yaymalarda gözlenen enfeksiyonlarla makrofajlarda depolanan demirin ilgisini saptamaktır. Literatüre bakıldığında; daha önce yapılmış çalışmalarda farklı vücut sıvıları ve dokularda bulunan makrofajlarda demir depolanması araştırılmıştır. Ancak servikovajinal sıvılarla yapılan böyle bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bizim çalışmamız servikovajinal örnekler üzerinde makrofaj-demir ilişkisini inceleyen orijinal bir çalışma olmuştur.

2.GENEL BİLGİLER

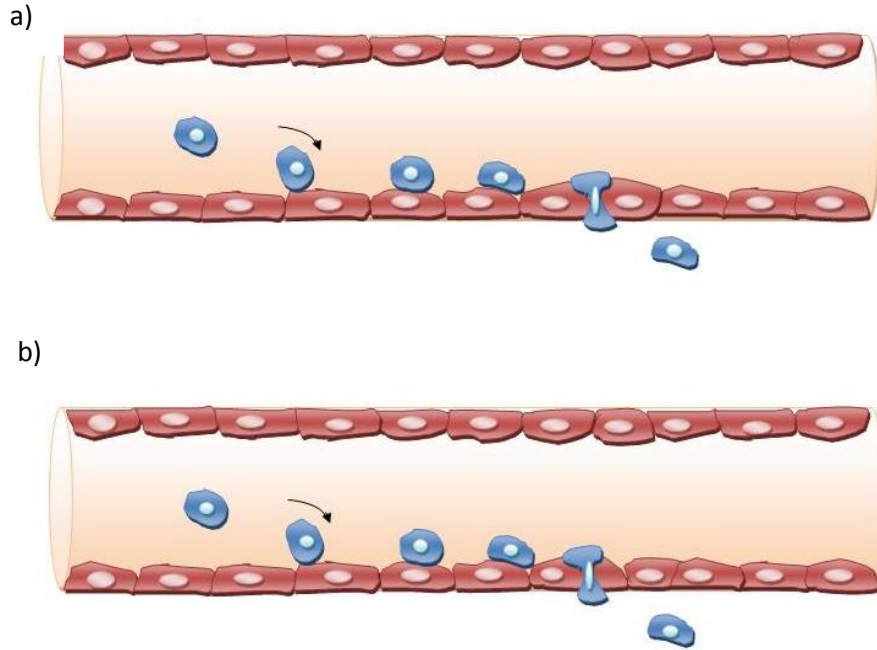
2.1. Makrofajların genel özellikleri

2.1.1. Makrofajların kökeni

İnsanlarda kan lökositlerinin yaklaşık %5'ini "monosit" adı verilen hücreler oluştururlar. Monositler kemik iliğinde üretilirler ve 1-3 gün süren olgunlaşma evresinin ardından damarlara verilerek kan dolaşımına katılırlar. Kan dolaşımına katılan monositler ise damarlardan dokulara göç ederek burada makrofajların öncülleri olarak görev yaparlar. [6]

Monositlerin kan dolaşımından dokuya geçebilmesi için damar duvarının apikal tarafından bazal tarafına geçmesi gerekir. Bu olay ise diapedez yolu ile meydana gelir. Diapedezin ilk aşamasında; monosit ve endotel hücrelerinin yüzeylerinde bulunan ve iki hücre arasında geçici bir bağ kurulmasını sağlayan "selektin" glikoproteinleri, monositlerin "yuvarlanma (rolling)" hareketi yaparak endotel hücrelerine bağlanmasını ve damar duvarı boyunca hareket etmesini sağlar. [7] Monosit ve endotel hücrelerin birbirine teması ile her iki hücreden "Monosit kemoatraktant protein1 (Monocyte chemoattractant protein-1 ya da diğer adıyla CCL2) salgılanmaya başlar. [8] Bu kemokin monositlerin hücre yüzeyindeki "C-C motif reseptörü 2 (C-C motif receptor 2) reseptörlerine bağlanır ve reseptör aracılı endositozla hücre içine alınır. [9] Hücre içine alınan MCP1 kemokini ise monositlerin hücre yüzeyinde bulunan integrin proteinlerinin aktifleşmesine neden olur. [10] Monositlerin hücre yüzeylerinde bulunan bu integrin proteinleri de, endotel hücrelerin apikal yüzlerinde bulunan "Hücreler arası adezyon molekülü (Intercellular adesion molecule -1= ICAM-1)", ICAM-2 ve "Damar hücresi yapışma molekülü-1 (Vascular cell adesion molecule 1)" adı verilen adezyon moleküllerine bağlanır. Bu bağlanma ile birlikte monositler endotel hücreleri üzerinde yatay olarak hareket etmeye başlarlar. Bu aşamadan sonra diapedez iki farklı şekilde gerçekleşebilir. Bunlardan birincisinde yatay olarak hareket eden monositler iki endotel hücresi arasındaki bağlantıların bulunduğu paraselüler bölgeye gelir ve bu bağlantı bölgesinden bazal tarafa geçişini gerçekleştirir. Bu olaya "paraselüler diapedez" adı verilir. Bu yolların ikincisinde ise endotel hücrelerinde monositlerin içinden geçmesini sağlayacak olan transselüler bir por meydana gelir. Monosit ve endotel hücrenin birbirine bağlanmasıyla meydana gelen çeşitli sinyaller sonucunda endotel hücrelerinin yüzeylerinde mikrovillus benzeri yapılar oluşmaya

başlar. Bu yapılar, damar duvarında yatay hareketleri esnasında bu porun açıldığı yere gelen monositleri sarar ve endotel hücrelerinde açılan bu pordan geçmesini sağlar. Bu olaya ise "transselüler diapedez" adı verilir. [11][7][12] (Şekil 2.1)



Şekil 2. 1: Monositlerin damar içinden bağ dokuya geçiş yolları a) Monositin iki endotel hücreleri arasında geçerek gerçekleştiği "paraselüler diapedez", b) Monositin bir endotel hücrelerinde açılan pordan geçerek gerçekleştiği "transselüler diapedez" (12 numaralı kaynaktan esinlenerek çizilmiştir.)

Diapedez yolu ile damar içinden dokuya geçen monositler farklılaşarak makrofajları meydana getirirler. Monositlerin makrofajlara dönüşümünde ise "Granülosit - makrofaj koloni uyarıcı faktör (Granulocyte- Macrophage Colony Stimulating Factor = GM-CSF)" ve "Makrofaj koloni uyarıcı faktör (Macrophage Colony Stimulating Factor = M-CSF)" adı verilen sitokinler görev yapar. Bu sitokinler inflamasyon durumunda ve normal durumlarda makrofajların sayılarının ve çeşitli fonksiyonlarının kontrol edilmesinde rol oynarlar. GM-CSF ve M-CSF sitokinlerinin, monositlerin farklılaşması üzerine birbirlerinden farklı etkileri vardır. Bu nedenle değişik özelliklere sahip iki çeşit makrofaj grubu meydana gelir ve bu makrofajlar farklı sitokin çeşitlerinin üretilmesinde görev yaparlar. [13]

2.1.2. Makrofajların yapısı

Makrofajlar fagositoz yapma özelliğine sahip olan tek çekirdekli hücrelerdir. Bir çok organda yer almaktadırlar ve morfolojileri buldukları dokuya ve aktivitelerine göre farklılık göstermektedir.

Makrofajların çapları 10 µm'den 30 µm'ye kadar değişmektedir. Sitoplazmaları, yüksek orandaki fizyolojik aktivitelerinden dolayı bir çok girinti ve çıkıntı içeren, üç katlı, 80 A kalınlığındaki bir hücre zarıyla çevrilidir. [14] Hücre zarında hücre dışındaki maddelerin makrofaj içerisine alınmasında görev yapan çeşitli büyüklüklerde mikrovilluslar bulunmaktadır. [15] Ayrıca sitoplazma kısmen bazofilik özelliktedir ve birçok vakuol içerir. Sitoplazmanın hücre zarına yakın olan kenar kısımları granüler yapı göstermektedir ve endoplazmik retikulum, mitokondri gibi organeller açısından fakirdir. Bu yapılar daha çok sitoplazmanın merkez kısımlarında bulunmaktadır. Endoplazmik retikulum çekirdek zarının devamında yer almaktadır. Ribozomlar ise çekirdek zarının dış kısmına bağlı haldedir. Çekirdeğin şekli oval ya da girintilidir ve çapının boyutları 6 ile 12 µm arasında değişmektedir.

Çeşitli uyarılar ile makrofajlar aktif hale geçtiğinde yapısında çeşitli değişiklikler meydana gelir. Makrofaj sitoplazmasında bol miktarda serbest ribozom bulunmaya başlar. Mitokondriyonlar normal durumdakinden daha küçük ve daha çok sayıda görülürler. Buna ek olarak normale göre daha fazla miktarda krista içerirler. Aktif makrofajlarda hidrolitik enzimler açısından zengin olan lizozomlar da sitoplazmada yer almaya başlar. [14] Bunlara ek olarak aktif makrofajlarda bakterileri öldürücü etki gösteren bir çok madde bulunur. Bunlar; toksik oksijen ürünleri olan peroksidler, nitrik oksitler, süperoksidler, antimikrobia peptitler olan defensinler, katyonik proteinler ve lizozim ve asit hidrolaz enzimleridir. [16]

2.1.3. Makrofajların vücutta bulunduğu yerler

Makrofajlar vücutta birçok dokuda yer almaktadırlar. Doku makrofajları fagositoz yapma ve hücre içine aldıkları maddeleri parçalama özellikleri sayesinde buldukları dokunun homeostazisinin sağlanmasında, yaşlı ve zarar görmüş hücrelerin temizlenmesinde ve inflamasyondan sonra doku yenilenmesinde ve tamir edilmesinde görev alırlar. [17] Makrofajlar hücre yüzey reseptörlerindeki

farklılıklar, buldukları farklı dokular ve bu dokulardaki yerleşim yerleri nedeniyle birçok değişik isimle tanımlanmaktadır.

Dalak, lenf nodu, kemik iliği ve timus gibi lenfoid organlardaki makrofajlar bu dokuların hangi kısımlarında bulduklarına göre isimlendirilmişlerdir. Örneğin, dalakta yerleşen makrofajlar kırmızı pulpa, marjinal zon, marjinal zon metallofilik ve “tingible body” makrofajları olarak isimlendirilirler. Timusdakiler subkapsüler, korteks, kortiko-medullar ve medullar makrofajlar olarak adlandırılırlar.

Lenfoid dokular dışındaki dokularda yerleşen makrofajlar ise bulunduğu dokuya göre isim almaktadırlar. Karaciğerdeki sinüzoidlerde bulunan makrofajlar “kupfer hücreleri”, akciğerde alveolar hava boşluklarındakiler “alveolar makrofajlar”, alveolar interstitiumlardakiler “interstitial makrofajlar”, deridekiler “dermal makrofajlar”, bağırsaktakiler “lamina propria” ve “serozal makrofajlar” olarak adlandırılmaktadırlar. [2] Bunların yanı sıra merkezi sinir sisteminde bulunan makrofajlara “mikroglia”, kemik iliğinde bulunanlara ise “osteoklast” denilmektedir. [18][19]

Kadın genital sisteminde de makrofajlar önemli rollere sahiptirler. Makrofajlar uterusunda endometriyal stroma ve myometriyal bağ doku içinde bulunurlar. Endometriyumdaki makrofajların (CD68⁺) sayısı menstrual döngü sırasında proliferatif fazdan menstruasyon fazına doğru giderek artar. Bunun yanı sıra anormal uterin kanaması olan kadınların endometriyum dokusunda da makrofajların sayısının normale göre arttığı gözlenmiştir. Bu hücreler doku içinde dağınık halde bulunmalarına rağmen endometriyal bezlerin çevresinde birikmiş halde de yerleşebilirler. Endometriyal makrofajların birçok alt tipi vardır ve bunlar fenotipik olarak farklılıklar göstermektedirler. [20]

2.2. Makrofajların immün sistemdeki görevleri

2.2.1. Fagositoz

Makrofajlar çok etkin bir biçimde fagositoz yapma özelliğine sahip hücrelerdir. Tek bir seferde hücre yüzey alanının %50'si kadar büyüklükteki partikülleri fagosite edebilirler. [21] Bu özellikleriyle antijenlerin, enfeksiyon ajanlarının, yaşlanmış hücrelerin ve apoptozise uğramış hücrelerin makrofaj içine alınıp parçalanmasında, dokuların yenilenmesinde, immün cevabın oluşturulmasında, antijen sunumunda ve inflamasyon olayında görev alırlar. Hücre içine alınacak

moleküller makrofajların hücre zarlarındaki çeşitli reseptörlerin apoptotik ya da yaşlanmış hücrelerde ve patojen organizmalarda bulunan ligandlarını tanıması ile gerçekleşir. Makrofajların hücre zarında bulunan bazı reseptörler mayaların, bakterilerin ve virüslerin fagositozunda görev yaparlar. [22] Bir çok patojene ait moleküllerin tanınmasında makrofaj hücre zarındaki Toll-benzeri reseptör (Toll-like receptor = TLR) proteinleri rol oynar. Mantarların duvarında bulunan zimozan molekülleri TLR2 / TLR6 kompleksi tarafından tanınır. TLR4, gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan lipopolisakkaritleri (LPS) ve TLR2 gram pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunan teikoik asitleri tanır. Virüslerin ve bakterilerin nükleik asitleri de makrofajların zarındaki TLR'lerin ligandlarıdır. TLR3, bazı virüslerin genetik materyali olan çift zincirli RNA'ya, TLR7 ve TLR8 tek zincirli RNA'ya, TLR9 ise bakteriyel DNA'daki metillenmemiş CpG sekanslarına bağlanır. [23] TLR'lerin dışında mayaların hücre duvarındaki mannan molekülleri Mannoze Reseptörleri, β -glukan molekülleri de Dektin-1 reseptörleri tarafından tanınır. [24][25]

Makrofajlar patojen organizmaların yanı sıra apoptotik hücreleri ve tümör hücrelerini de tanıma ve bu hücreleri de fagosite etme özelliğine sahiptirler. Makrofajların hücre zarlarında bulunan CD14 reseptörleri apoptotik hücrelerin tanınmasında rol oynar. [26]

2.2.2. Antijen sunumu

Makrofajlar insan vücuduna giren mikroorganizmaları fagosite ederek hücre içindeki lizozomlarda parçalarlar. Bu organizmalardan elde ettikleri protein yapısındaki antijenleri de T hücrelerine sunarlar. Bu nedenle makrofajlara "Antijen sunucu hücreler" adı verilmektedir. Makrofajların yanı sıra dendritik hücreler ve B hücreleri de antijen sunucu hücreler olarak görev yapmaktadırlar.

Antijen sunumu majör histokompatibilite kompleksi (Major histocompatibility complex = MHC) adı verilen moleküller tarafından gerçekleştirilir. Bu moleküller MHC I ve MHC II olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Bu farklılık MHC moleküllerinin yapısal olarak farklılık göstermesinden kaynaklanmaktadır ve birbirinden farklı genler tarafından kodlanmaktadır. İnsanlarda hücre yüzeyinde yer alan MHC I molekülleri HLA-A, HLA-B ve HLA-C olmak üzere üç farklı gen tarafından kodlanır. MHC II molekülleri ise HLA-DP, HLA-DQ ve HLA-DR adı verilen genler tarafından

kodlanır. [27] Makrofajlarda antijen sunumunu hücre yüzeylerinde yer alan bu kompleman sistemi molekülleri aracılığıyla gerçekleştirirler. Makrofajlarda antijen sunumu için hem MHC I hem de MHC II kompleman sistemleri yer almaktadır. [21]

MHC I ve MHC II molekülleri farklı antijenlerin sunumunda görev yaparlar. Bu antijenler endojen veya ekzojen olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Hücre dışından fagositoz yoluyla makrofaj sitoplazmasına alınan bakteri ya da virüs proteinleri gibi ekzojen antijenler makrofajlar tarafından sentezlenen MHC II molekülleri aracılığıyla T hücrelerine sunulur.

Fagositoz yoluyla makrofaj içine alınan patojenlere ait moleküller, asidik içeriğe sahip veziküller içerisindeki proteazlar tarafından parçalanırlar. MHC II molekülünün alt birimleri makrofajların granüler endoplazmik retikulumlarındaki ribozomlar tarafından üretilir ve burada birleştikten sonra golgi cisimciğine verilirler. Golgi cisimciğinden makrofaj sitoplazmasına gönderilen ve içerisinde MHC II molekülünü bulduran vezikül, antijenleri içerisinde barındıran fagositik vezikülle birleşir. Oluşan bu yeni vezikülün içindeki katalizör peptidler aracılığıyla MHC II – antijen kompleksi oluşur. Bu kompleks makrofaj zarına gönderilir ve burada $CD4^+$ T hücreleri ile bağlantı kurulur. Bu şekilde antijen sunumu gerçekleşmiş olur. [27][28]

Bir patojenle enfekte olan hücrelerdeki endojen antijenler ise MHC I molekülleri tarafından T hücrelerine sunulur. Örneğin; konakçıya ait bir hücre virüs ile enfekte olduğunda, virüse ait proteinler bu hücrenin sitoplazmasında sentezlenmeye başlar. Endojen antijen olan bu viral proteinler hücre sitoplazmasındaki proteazlar tarafından parçalanır. 8-15 amino asit uzunluğundaki peptidler taşıyıcı moleküller aracılığıyla endoplazmik retikuluma taşınırlar. Endoplazmik retikuluma gelen bu antijenler burada sentezlenmiş olan MHC I molekülleriyle birleşirler. Golgi cisimciğinden geçen MHC I – antijen kompleksi hücre zarına taşınır. Böylece antijenler $CD8^+$ T hücrelerine sunulmuş olur. Endojen antijenlerin sunumu da makrofajlar tarafından bu mekanizmayla gerçekleştirilir. [27]

2.3. Makrofaj- demir ilişkisi

2.3.1. İnsan vücuduna demir alımı ve kullanıldığı yerler

Demir atom numarası 26 olan, “Fe” simgesiyle gösterilen, insan vücudunda birçok biyomolekülün yapısına katılan önemli bir iz elementtir. Sağlıklı bir insanın vücudunda yaklaşık 3-5 gr demir bulunmaktadır. Bu miktarın yaklaşık %65’lik kısmını eritrositlerdeki hemoglobin proteinlerinin yapısında bulunan demir oluşturur. Demirin %15-25’i hücrelerdeki ferritin ve hemosiderin molekülleri tarafından depo edilir. Geriye kalan kısım ise kaslardaki miyoglobinde, mitokondrilerdeki sitokromlarda ve çeşitli enzimlerin yapısında yer alır.

Sağlıklı insanlarda intestinal sistemden günlük yaklaşık 1 mg demir Emilimi gerçekleşir. Bu miktar besinlerle alınan demirin %10’luk kısmını oluşturur. [5]Diyetle alınan demir hemoglobinin yapısındaki heme-bağımlı olan ya da heme-bağımlı olmayan demir olarak iki gruba ayrılır. Heme-bağımlı demir intestinal sistemden heme-bağımlı olmayan demire göre daha etkin bir biçimde emilir. Bu iki çeşit demir kaynağı bağırsak hücreleri içine farklı mekanizmalarla alınır. Heme molekülü bağırsaktaki mukozal hücrelere bu hücrelerin mikrovilluslarından endositoz aracılığıyla girer ve demir hücre içindeki heme oksijenaz enzimleri tarafından serbest hale getirilir. Heme-bağımlı olmayan demir ise enterosit adı verilen bağırsak hücrelerine Fe^{+2} formunda bu hücrelerin plazma zarında bulunan “ Divalent Metal Taşıyıcı 1 (Divalent Metal Transporter 1 = DMT1) ” protein aracılığıyla alınır. [29] Demirin bir kısmı enterosit sitoplazması içindeki demiri bağlayan ferritin proteini tarafından depo edilir. Depo edilmeyen demir ise bazolateral membrandaki ferroportin proteini aracılığıyla bağ dokudaki kan damarlarına verilir. Kan plazmasına verilen demir sirküle edilen kan içindeki transferrin proteinine bağlanarak gerekli dokulara taşınır ve bu dokularda kullanılır. [30]

Ancak günlük diyetle alınan demir miktarı kemik iliğinden yeni eritrositlerin sentezi, yapısında demir bulunan biyomoleküllerin üretilmesi, çeşitli enzimlerin ve sitokromların yapımı gibi faaliyetler için yeterli değildir. Bu nedenle farklı işlevlerde kullanılan demirin vücut içinde çeşitli yollarla geri dönüştürülmesi gerekir. Makrofajlar demirin vücutta geri dönüştürülmesinde önemli görevlere sahip hücrelerdir.

2.3.2. Makrofajlardan demir geri dönüşümünde rol oynayan moleküller

2.3.2.1. Transferrin

Kan plazmasında bulunan transferrin molekülü 679 amino asit içeren, yaklaşık 79 kD ağırlığında bir glikoproteindir. [31] Serum transferrininin büyük bir kısmı karaciğerdeki hepatositler tarafından sentezlenir. Ancak karaciğer hücreleri yanı sıra sertoli hücrelerinde, kas hücrelerinde, beyin hücrelerinde ve akciğerlerdeki makrofaj ve lenfositlerde de transferrin üretilmektedir. [32] Bu dokularda üretilmiş olan transferrin proteinleri işlevini yerine getirmek üzere kan damarlarına verilirler.

Transferrin proteini demirin gerekli dokulara taşınmasında görev yapmaktadır. Bu proteinin amino ve karboksil terminal uçlarında iki adet hidrofilik metal bağlayıcı bölgeler bulunur. Bu bölgelerin her birine bir adet Fe^{+3} iyonu bağlanır ve iki adet demir atomu transferrine tutunmuş olur. Demirin transferrine bağlanması ortamın pH'ına bağlıdır. Ortam pH'ının 7.4 olduğu durumlarda demir transferrine en yüksek kapasiteyle bağlanırken, pH: 4.5 ve altında olduğu durumlarda bağlanma gözlenmez. Demirin transferrine bağlanmasıyla serbest halde toksik özellik gösteren Fe^{+3} iyonu, transferrine bağlı olarak zararsız bir formda kan plazmasından demirin gerekli olduğu hücrelere taşınır. [31][16]

2.3.2.2. Transferrin Reseptörü

Transferrin reseptörü makrofaj hücre zarında yer alan ve 90 kD moleküler ağırlıktaki iki homodimerden oluşan transmembran bir glikoproteindir. Hücre dışında kalan bölge C terminal, hücre içinde kalan bölge ise N terminal olarak adlandırılır. Fe^{+3} iyonu taşıyan transferrin proteini transferrin reseptörünün ligandıdır. Bu reseptörün hücre dışındaki C terminal ucu transferrini kendisine bağlamakla görevlidir. Herbir transferrin reseptörüne iki adet transferrin bağlanabilir ve böylece "transferrin – transferrin reseptörü kompleksi" oluşur. Transferrin reseptörünün makrofaj sitoplazmasında bulunan N terminal bölgesi ise çeşitli sinyallerle fosforilasyona uğrayarak, oluşan bu kompleksin hücre içine alınmasında düzenleyici rol oynar. [16][33] Oluşan kompleks endositoz yoluyla içeri alınır. Endozomlar içindeki düşük pH, transferrine bağlı olan demirin bu proteinden ayrılmasını sağlayarak serbest kalmasına neden olur. Transferrin – transferrin reseptörü kompleksi yeniden kullanılmak üzere hücre zarına gönderilirken, endozom içinde serbest kalan demir iyonları da sitoplazmaya verilir.

[34] Sitoplazmaya verilen demir ya metabolik aktiviteler için kullanılır ya da toksik etkisinin ortadan kaldırılması için çeşitli moleküllere bağlanarak depo edilir ve toksik olmayan formda tutulur.

2.3.2.3. Laktoferrin

Laktoferrin 80kDa moleküler ağırlıkta, 703 aminoasit içeren tek bir polipeptit zincirinden oluşan transferrin ailesine ait bir glikoproteindir. Bu protein mukozal epitel hücrelerden salgılanır ve gözyaşı, vajinal sekresyon, semen, gastrointestinal sıvılar, kan plazması ve özellikle anne sütü gibi bir çok vücut sıvısında bulunur. Bunların dışında laktoferrin proteinleri nötrofil granüllerinin içinde bulunmaktadır ve bu granüller içindeki laktoferrin kan plazmasındaki laktoferrinin ana kaynağı olarak görev yapar. Laktoferrin özellikle Fe^{+3} iyonlarına yüksek afiniteyle bağlanırken Al^{+3} , Ga^{+3} , Mn^{+3} , Co^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+3} iyonlarına da daha düşük bir afiniteyle bağlanma özelliğine sahiptir. Vücutta laktoferrin proteinin laktoferrin- α , laktoferrin- β ve laktoferrin- γ olmak üzere üç farklı isoformu bulunur. Bu formlardan sadece laktoferrin- α demire bağlanabilirken, diğer iki form ribonükleaz aktivitesi gösterir. Her laktoferrin proteini iki adet demir bağlayabilme kapasitesine sahiptir. Makrofaj zarındaki reseptörler demir bağlamış olan laktoferrine bağlanır ve reseptör aracılı endositoz yoluyla laktoferrin makrofaj sitoplazmasına alınır. Laktoferrine bağlı olarak içeri alınan demir depolanmak üzere ferritin proteinine aktarılır. [35][36]

2.3.2.4. Ferritin

Ferritin, hayvanlarda ve bitkilerde bulunan hücre içi bir biyomoleküldür. Hücre için zararlı etkilere sahip, reaktif radikallerin oluşmasına neden olan serbest demirin depolanarak etkisiz hale getirilmesinde görev alır. Bir ferritin molekülünde 4500 tane demir atomu depolanabilir. Ferritin hücrede sitoplazmada serbest halde, mitokondriyonlarda, çekirdekte ve lizozomlarda bulunabilir. [37]

Ferritin molekülü yapısal olarak demir atomları ve bunları dıştan saran bir protein kılıftan oluşur. Demir atomlarını saran protein kısmı “apoferritin” olarak adlandırılır. Apoferritin çoğunlukla asidik aminoasitler ve apolar gruplar içerirken, disülfid köprüleri bakımından yoksundur. Bu protein kısmı, yaklaşık 20.000 Da moleküler ağırlığa sahip 24 tane polipeptit zinciri alt biriminden oluşur. [38] İnsanlarda esas olarak H (High) ve L (Low) olmak üzere farklı büyüklüklere sahip iki çeşit alt birim bulunur. Apoferritin üzerinde metal bağlama özelliği gösteren birçok bölge vardır.

Fe^{+2} iyonu bu metal bağlayıcı bölgelere bağlanır. Ancak demirin ferritin tarafından depolanabilmesi için Fe^{+2} 'nin Fe^{+3} haline dönüştürülmesi gerekir. Bu dönüşüm bir oksidasyon tepkimesi ile gerçekleşir. Apoferritin yapısındaki H tipi alt birimler ferrokسيداز özellikleriyle bu oksidasyon işlemini katalizlemekle görevlidir. L tipi alt birimler ise apoferritin proteininde demirin depolandığı merkez kısmının yapısını düzenlemede görev alırlar. Farklı hücrelerdeki ferritin molekülleri bu alt birimlerin içeriği bakımından farklılık gösterebilir. Örneğin, retikuloendotelial sistemdeki makrofajlar ve diğer makrofaj benzeri hücrelerdeki ferritin molekülleri daha fazla demir depolamak amacıyla daha fazla L tipi alt birimler içermektedirler. [37]

Ferritin biyomolekülleri bulunduğu hücrelerin sitoplazması içerisinde küçük dağınık granüller halinde bulunurlar ve hücrelerde demir depolama işleminde esas protein olarak görev yaparlar. [5]

2.3.2.5. Hemosiderin

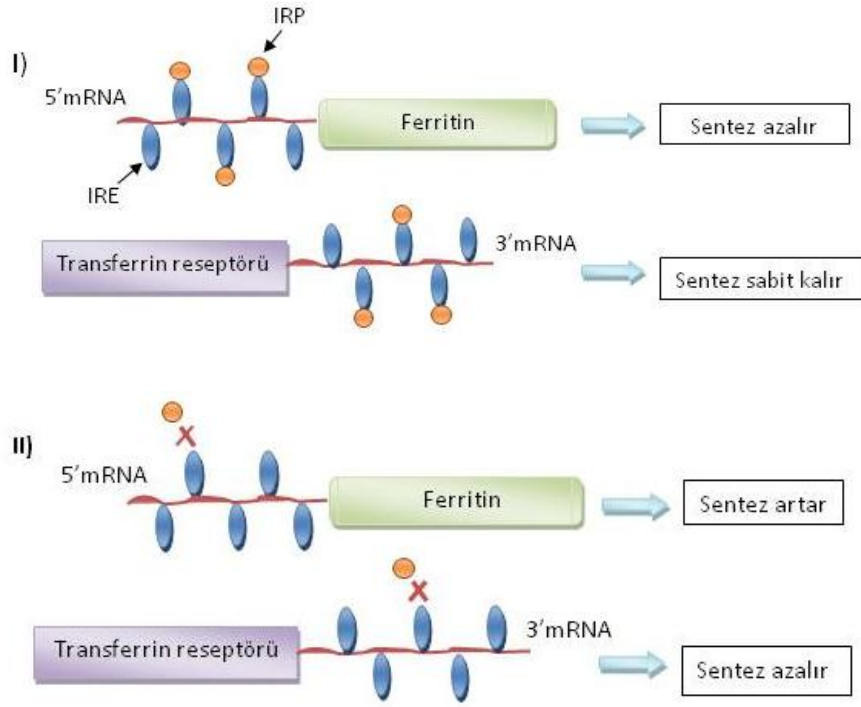
Hücrelerde yıkım olaylarıyla açığa çıkan demir iyonlarının depolanmasında ferritin proteininin yanı sıra hemosiderin molekülleri de görev yapmaktadır. Ferritin hücre içinde fazla bulunduğu durumlarda, ferritin proteinleri lizozomlar tarafından parçalanır. Bu parçalanan ferritin proteinleri de hemosiderin biyomoleküllerini meydana getirir. [39] [40] Ferritin proteini demiri ferrik formda depolarken hemosiderin molekülleri demiri ferrik oksit ya da ferrik hidroksit formlarında depolamaktadır. [41] Ferritine bağlı olarak depolanan demir tekrar kullanılmak üzere uygun formda bulunurken, hemosiderin içinde depolanan demir vücuda geri dönüştürülebilir formda değildir. [38]

Hücrelerde esas olarak ferritin demir depolama görevini yerine getirir. Ancak bazı hastalıkların varlığında hemosiderin ve ferritin moleküllerinin hücrelerdeki seviyelerinde değişiklik gözlenir. Vücutta demirin aşırı olarak bulunmasına neden olan bazı hastalıklarda hücrelerdeki ferritin seviyesi düşer ve daha fazla demir depolama kapasitesine sahip olan hemosiderin baskın form olarak görülür. [5] Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, hemosiderin biyomoleküllerinin sitoplazma içerisinde yoğun, kristal şeklindeki granüller halinde bulunduğu gösterilmiştir. [42]

2.3.2.6. Demir düzenleyici protein 1 ve 2

Demir düzenleyici protein 1 (Iron regulatory protein 1 = IRP2) ve Demir düzenleyici protein 2 (Iron regulatory protein 2 = IRP 2) demir metabolizmasını düzenleyen önemli sitoplazmik proteinlerdir. Bu proteinler hücelere demir alınmasında rol oynayan Transferrin reseptörü ve hücrede demir depolanmasını sağlayan ferritin proteininin sentezinin düzenlenmesinde rol oynarlar.

IRP' ler bu iki proteinin sentezlenmesini zıt yönlerde etkilemektedirler. Hücrede demir seviyesi azaldığında, IRP1 ve IRP2 biyomolekülleri Transferrin reseptörü ve ferritin mRNA'larındaki Demir cevap elementi (Iron responsive element = IRE) adı verilen bölgelere bağlanırlar. Bu bağlanmayla birlikte ferritin sentezi azalırken, transferrin reseptörünün sentezi sabit tutulur. Böylece ferritin seviyesinin azalmasıyla hücre içine alınan demirin depolanması da azaltılmıő olur ve demir gerekli metabolik faaliyetler için kullanılabilir. Bu durumun aksine hücre içindeki demir miktarı arttığında ise IRP1 ve IRP2'nin ferritin ve transferrin reseptörüne ait mRNA'lar  zerindeki IRE bölgelerine bağlanma afiniteleri azalır. Bu Şekilde de ferritin proteininin sentezi artarken, transferrin reseptörünün sentezi azalır. Böylece de hücre sitoplazması içine alınan demir azaltılmıő, sitoplazmada biriken demir ise toksik etki göstermemesi için sentezi artan ferritin proteinleri tarafından depo edilmiş olur. [43][44] (Şekil 2.2)



Şekil 2. 2: Ferritin proteini ve transferrin reseptörü sentezinin makrofaj sitoplazmasındaki demir miktarına göre IRP biyomolekülleri tarafından düzenlenmesi I) Makrofaj sitoplazması içinde demir eksikliği görülmesi durumunda ferritin proteini ve transferrin reseptörü sentezi II) Makrofaj sitoplazması içindeki demirin fazla miktarda olduğu durumda ferritin proteini ve transferrin reseptörü sentezi

2.3.2.7. NRAMP-1 ve DMT-1/NRAMP-2

Nramp (Natural resistance-associated macrophage protein) ailesi çeşitli iyonların transportunda görev alan biyomoleküllerdir. Bu protein ailesi Nramp-1 ve DMT-1(Divalent metal taşıyıcı-1) / NRAMP-2 olmak üzere iki çeşit proteinden meydana gelmektedir. [45]

DMT-1 90-100 kDa moleküler ağırlığında, 12 membran kıvrımı içeren transmembran bir glikoproteindir. İnsan vücudunda Fe^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} gibi +2 yüklü iyonların taşınmasında görev yapar ve hemen hemen her hücre tipinde yer alır. En çok görüldüğü yerler beyin, bağırsak, böbrek, kemik iliği ve retikülositlerdir.

Yaklaşık olarak pH:6 gibi düşük pH seviyelerinde işlevlerini yerine getirirler. [46][47]

DMT-1, intestinal ve retiküloendotelyal sistemde önemli rollere sahiptir. Bu proteinler intestinal sistemdeki enterositlerin apikal membranında bulunurlar. Diyetle vücuda alınan demirin bağırsak hücrelerinin içine taşınmasında görev yaparlar. İkinci olarak bu proteinler makrofajlar içindeki fagozomlarda yer almaktadırlar. Fagozomların zarında yer alan DMT-1 biyomolekülleri, fagozomlar içindeki eritrositlerin parçalanmasıyla elde edilen ya da Transferrin reseptör aracılığı ile içeri alınan demirin makrofaj sitoplazmasına verilmesinde rol oynarlar. [48]

2.3.2.8. Ferroportin

İnsanlarda bulunan ferroportin proteinleri 571 amino asitten oluşmaktadır. Bu proteinler bulunduğu hücrelerin plazma zarında yer alan transmembran özellikteki proteinlerdir. Amino (N) ve karboksil (C) terminal uçları sitoplazma içinde yer alır ve 12 adet transmembran kıvrım içerirler. [49] Plasental hücrelerde, hepatositlerde, karaciğer, dalak ve kemik iliğindeki makrofajlarda ve duodenal enterositlerde yüksek miktarda bulunurlar. [50][51] Ferroportin, bulunduğu hücrenin sitoplazmasındaki demirin, ihtiyaç durumunda sitoplazma içerisinden kan plazmasına verilmesinde görev yapar.

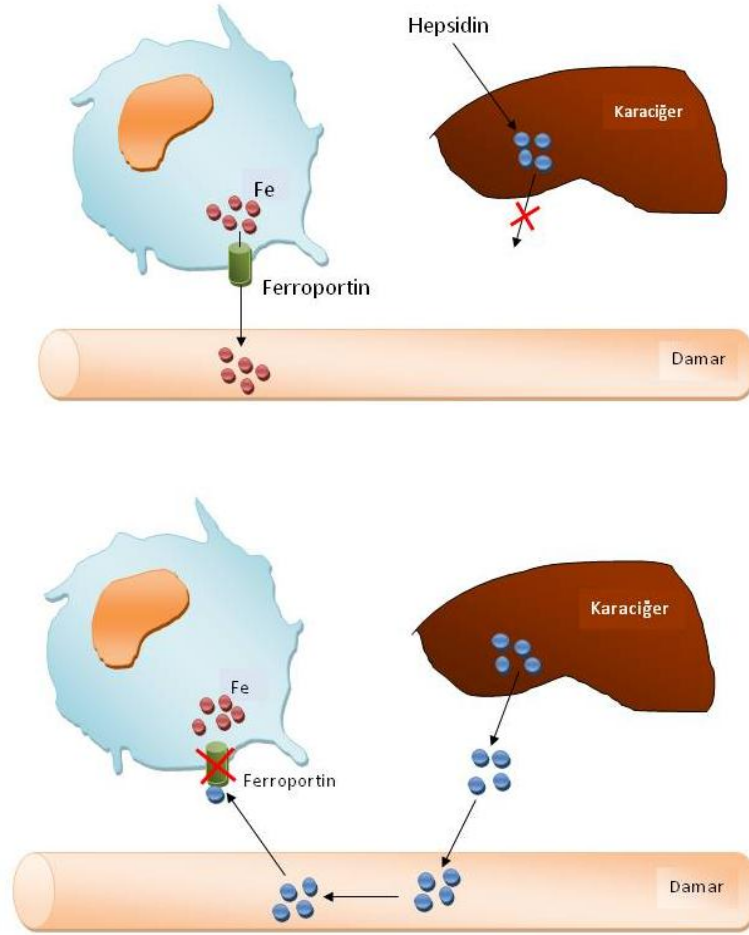
Hücrelerde bulunan ferroportin proteini miktarı karaciğerden salgılanan hepsidin hormonu tarafından düzenlenir. Hepsidin hormonu, ferroportin proteininin transmembran kıvrımlarının üzerinde, hücre zarının dış kısmında bulunan "hepsidin bağlanma bölgesi" ile bağlantı kurarak ferroportin proteininin düzeyinin ayarlanmasını sağlar. [52]

2.3.2.9. Hepsidin

Hepsidin karaciğerde sentezlenen, sistein amino asitleri açısından zengin 25 amino asitten oluşan ve 4 adet disülfid bağı içeren bir hormondur. Bu hormon intestinal sistemden emilen, makrofajlar tarafından geri dönüştürülen ve hepatositlerde depo edilen demirin kan plazmasına verilmesini kontrol ederek demir metabolizmasında çok önemli bir düzenleyici olarak görev yapar. [53]

Hepsidin hormonu hücrelerin zarında yer alan ve demirin hücre dışına taşınmasında rol oynayan ferroportin proteinine bağlanır. Bu bağlanma ile birlikte

ferroportin endositoz yoluyla hücre içine alınarak lizozomlar içinde parçalanır. Sentezlenen hepsidin proteininin miktarı kan plazmasındaki demiri dengede tutacak şekilde ayarlanır. Vücuda intestinal sistemden fazla miktarda demir alınmasının ardından ya da inflamasyon durumunda, kan plazmasındaki hepsidin düzeyi artar. Kan plazmasında hepsidin düzeyinin fazla olduğu bu durumlarda hücrelerde bulunan ferroportin miktarı azalır ve demir bulunduğu hücrelerden kana verilemez. Anemi ve hipoksi durumlarında ise sentezlenen hepsidin düzeyi azalır. Hepsidin düzeyinin azaldığı bu durumlarda da hücrelerdeki ferroportin yıkımı durur ve kan plazmasına salınan demir miktarında artış gözlenir. Bu mekanizmayla kan plazmasında bulunan demir miktarı dengede tutulmuş olur. [54][55] (Şekil 2.3)



Şekil 2. 3: Makrofajlardan demir salınımının hepsidin hormonu tarafından düzenlenmesi

2.3.3. Makrofajlara demirin alınma yolları

Makrofajlar demirin vücut içindeki geri dönüşümünde önemli roller üstlenmişlerdir. Demirin geri dönüştürülebilmesi için öncelikle makrofajların içine alınması gerekir. Demirin makrofajlar içine alınması çeşitli yollarla gerçekleşir.

Makrofajlara demir alımı büyük oranda eritrositlerin fagositozuyla (eritrofagositozis) gerçekleşir. Eritrositlerin ömrü yaklaşık 120 gündür ve yaşlandıkça hücre zarlarındaki biyomoleküllerde çeşitli değişiklikler meydana gelir. Makrofajlar yaşlanmış ve hücre zarlarında değişiklikler meydana gelmiş eritrositleri bu değişiklikler sayesinde tanır ve endositoz mekanizmasıyla sitoplazma içine alırlar. [56] Makrofajlar içindeki fagolizozomlarda hidrolitik enzimler aracılığıyla eritrositler parçalanır ve hemoglobin açığa çıkarılır. Hemoglobin de yine fagolizozom içinde parçalanır ve hem proteini serbest kalır. Hem oksijenaz enzimleri hem proteinini parçalayarak biliverdin, karbon monoksit ve Fe^{+2} bileşenlerine ayırır. [57] Böylece hemoglobin içindeki demir açığa çıkarılmış olur.

Eritrosit yıkımının %10-20' lik kısmı damar içinde meydana gelir ve bunun sonucunda da eritrositlerin içindeki hemoglobin kan plazmasında serbest kalır. Kan plazmasında bulunan haptoglobin proteini bu serbest hemoglobine bağlanarak hemoglobin - haptoglobin kompleksini oluşturur. [58] Karaciğer, kemik iliği, dalak ve lenf nodlarındaki makrofajların zarında bulunan CD163 reseptörleri bu kompleksi tanıyarak reseptör aracılı endositoz yoluyla makrofaj içine alınmasını sağlar. [59][60] Endositozun ardından lizozomlardaki proteolitik enzimler aracılığı ile hemoglobin ve haptoglobin birbirinden ayrılır. Aynı zamanda hemoglobin proteini tek başına da CD163 reseptörüne bağlanabilir. [60] Ancak bu bağlanma hemoglobin-haptoglobin kompleksine göre daha zayıf bir afiniteyle gerçekleşir.

Buna benzer şekilde hemopeksin proteini kan plazmasında serbest halde bulunan hem biyomolekülünü tanır ve böylece hemopeksin-hem kompleksi oluşur. Bu kompleks de karaciğer, dalak ve kemik iliğindeki makrofajların zarında bulunan CD91 reseptörü tarafından tanınarak endositozla içeri alınır. Bu iki yolla makrofaj içine alınan "hemoglobin-haptoglobin" ve "hemopeksin-hem" komplekslerinin parçalanmasıyla hem serbest hale gelir. Daha sonra hem biyomolekülü de hem oksijenaz enzimi tarafından Fe, bilirubin ve karbonmonoksit parçalanır. [61]

Kan plazmasındaki +3 değerlikli (Fe^{+3}) serbest ferrik demir yine kan plazması içinde bulunan transferrin proteinine bağlanır ve “ Fe^{+3} – transferrin kompleksi” oluşur. Bu kompleks endotel hücrelerinden damar dışına çıkarak bağ dokudaki makrofajlara iletilir. Üzerine Fe^{+3} bağlı olan transferrin proteini makrofaj zarındaki Transferrin reseptörüne bağlanır ve reseptör aracılı endositoz yoluyla sitoplazma içine alınır. Endozom içindeki transferrin ve transferrin reseptörü makrofaj zarına geri gönderilir. Demir ise DMT1 proteini aracılığıyla endozom zarından geçirilerek makrofaj sitoplazmasında serbest kalır. [62][63] (Şekil 2.4)

2.3.4. Makrofajlarda demirin depolanması

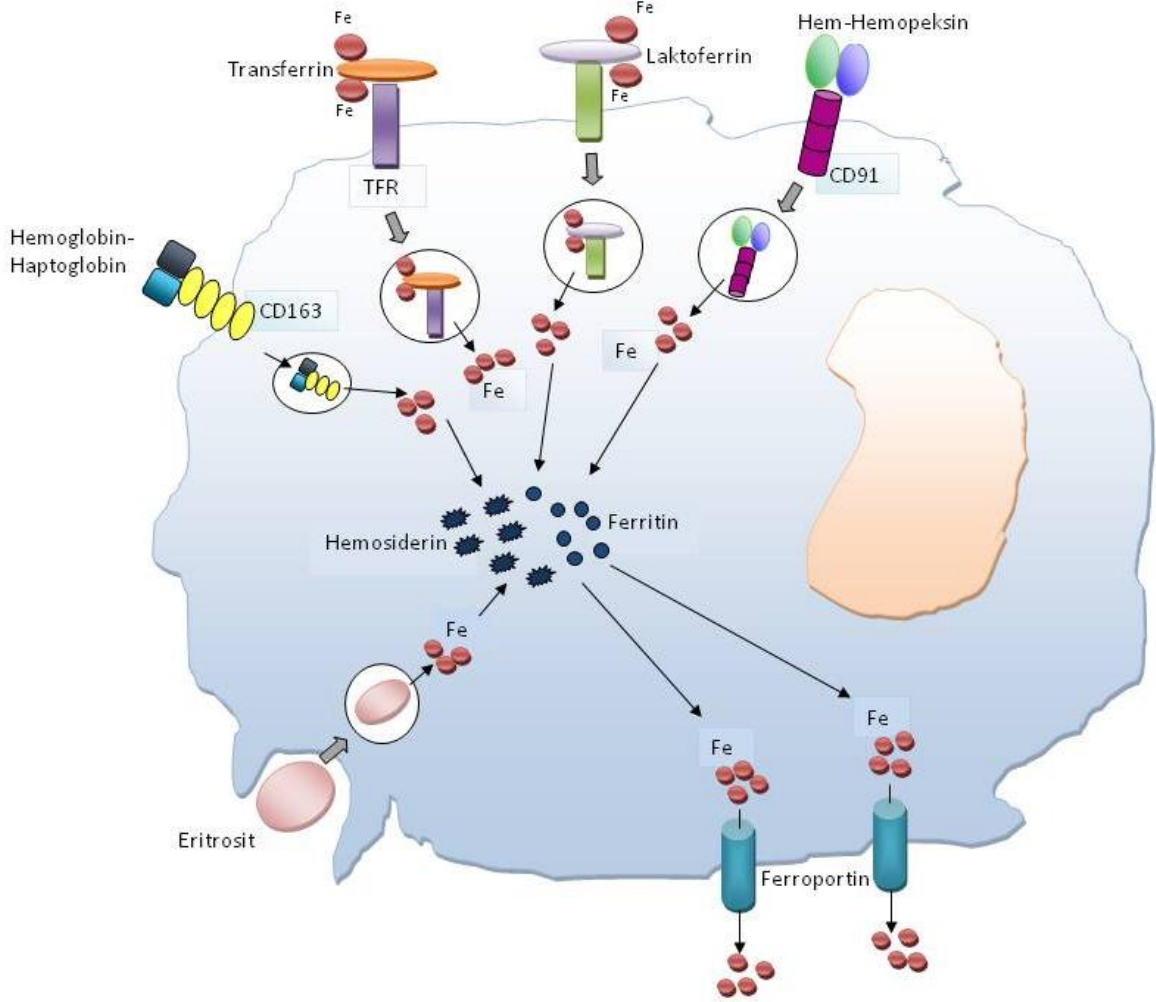
İnsan vücudunda demir depolamakla görevli olan asıl hücreler dalak, karaciğer ve kemik iliğindeki retiküloendotelyal sistem hücreleridir. Ancak yapılan çalışmalarda başka dokulardaki makrofajların da demir depo edebildiği gösterilmiştir. Demir makrofaj içine çeşitli yollarla alındıktan sonra bazı metabolik işlemler sonucunda sitoplazmada serbest hale geçer. Bu serbest haldeki demir hücre için zararlı reaksiyonlara neden olup hücre hasarına yol açacağından dolayı toksik olmayan form haline getirilmesi gerekir. Makrofaj sitoplazmasındaki ferritin molekülü ihtiyaç fazlası olan demirin depolanmasında rol oynar. Ferritin molekülü demire bağlanır ve demir Fe^{+3} formunda depo edilir. [37] Ferritinin yanı sıra hemosiderin molekülü de demir depolama işleminde görev alır. [40] Özellikle demirin makrofaj içinde aşırı bollukta bulunduğu durumlarda, daha çok demir depolama kapasitesine sahip olan hemosiderin demirin depolanmasında rol oynar. (Şekil 2.4)

2.3.5. Makrofajlardan demir salınımı

Makrofaj sitoplazmasında depo edilen demir vücuttaki demir ihtiyacına göre kan plazmasına verilir. Demir makrofajın hücre zarından direkt olarak geçemez ve bu transferrin gerçekleşmesinde makrofaj zarında yerleşmiş olan ferroportin 1 proteini görev yapar. Ferroportin 1 makrofaj sitoplazmasındaki demirin hücre dışına verilmesini sağlar. [64]

Makrofajlardan kan plazmasına verilecek olan demir miktarı ise kan plazmasındaki hepsidin hormonu ile kontrol altında tutulur. Hepsidin proteini, kan plazmasına demir salınımını inhibe edecek şekilde aktivite gösterir. Kan plazmasında demir miktarının artmasıyla birlikte hepsidin hormonunun sentezi de artar. Kandaki seviyesi artan hepsidin hormonu kan plazmasındaki fazla miktarda demir artışını

inhibe eder ve demir kan plazmasında belli bir miktarda tutulur. Kan plazmasındaki demir miktarı azaldığında ise hepsidin hormonunun sentezi de azalarak makrofajlardan kan plazmasına verilecek demir miktarı da artırılır. [53] (Şekil 2.4)



Şekil 2. 4: Makrofajlarda demir döngüsü

2.4. Demir metabolizması hastalıkları

2.4.1. Demir eksikliği hastalıkları

Vücutta demir eksikliği çeşitli nedenlerle meydana gelir. Bunların başında beslenme ile yetersiz demir alımı, çölyak hastalığı, mide ya da bağırsak ameliyatları, by pass operasyonu, genitoüriner, jinekolojik ve gastrointestinal sistemlerden kronik kan kaybı gelmektedir [65].

Demir eksikliğinin belirtileri olarak yorgunluk, solgunluk, egzersiz yaparken zorlanma ve iř yapma performansında dūřuř görülür. Bunların yanı sıra demir eksikliğinin sinir sistemi üzerine direkt olarak da etkisi ortaya çıkabilir. Bu durumda çocuklarda zihinsel anormallikler gelişebilir. Yine ocuk ve erişkinlerde bir çok besinsel olmayan maddelerin yenmesiyle karakterize olan “Pika” hastalığı görülebilir. Hastalarda uzun süreli olarak devam eden demir eksikliklerinde ise bir tırnak hastalığı olan “ kaşık tırnak hastalığı (koilonişi) ” ve özofagusta gelişen anormallikle birlikte yutma davranışında güçlük görülen “Plummer-Vinson sendromu” gözlenebilir. [66]

İnsanlarda gözlenen demir eksikliği anemi olarak adlandırılır ve anemi farklı Őekillerde ortaya çıkabilir. Demir eksikliği anemisi, vücutta demirin genel olarak yetersiz bulunmasıyla karakterizedir. Büyük oranda demirin duodenal sistemden yeterli miktarda emilememesiyle ve vücuttaki kronik ya da kronik olmayan kanamalar nedeniyle gözlenir. [67] Diyetle alınan besin emiliminde bozukluk görülen lyak hastalığı da demir eksikliği anemisine neden olmaktadır. [68]

Diğer bir anemi çeşidi ise kronik inflamasyon anemisidir. Kronik inflamasyon anemisinde demir vcudada yeterli miktarlarda alınır. Ancak demirin retiküloendotelyal sistem hücrelerine alınmasının artmasıyla kan dolaşımındaki demir seviyesi düşer ve retiküloendotelyal hücrelerdeki demir depolanması artar. Kan dolaşımındaki demirin azalmasıyla eritroid nc hücrelerin demire ulaşması kısıtlanır ve bu durumda yeni eritrositlerin sentezi de azalmış olur. [69] İnfiamasyon durumunda salınan sitokinler çeşitli mekanizmalarla kronik inflamasyon anemisine neden olmaktadır. Interferon-γ (IFN- γ) ve patojen organizmalarda bulunan LPS’ler, makrofajlar içine demir alımını sağlayan DMT-1 biyomoleküllerinin ifadesini arttırır. Interlökin-10 (IL-10) da Transferrin reseptör aracılı demir alımını arttırmaktadır. Bunun yanı sıra yine IFN- γ ve LPS makrofajlardan demir salınmasını sağlayan ferroportin proteinlerinin ifadesini azaltırlar.[70] Tümör nekroz faktör-α (TNF-α), IL-1, IL-6, ve IFN- γ makrofajlar içinde demirin depo edilmesinde rol oynayan ferritin proteininin sentezini uyarır. [70][71] Bu sayede demirin makrofaj içine girişi ve depolanması artarken salınımı azalır. Aynı zamanda IL-1 ve TNF-α sitokinleri, eritrosit yapımını uyaran eritropoietin hormonunun sentezinin de azalmasına neden olur. [67] Böylece

intestinal sistemden demir emiliminde bir bozukluk olmamakla birlikte kan plazmasında azalan demir konsantrasyonu aneminin ortaya çıkmasını sağlar.

Anemiye sebep olan nedenler arasında genetik mutasyonlar da bulunmaktadır. Kan plazmasında demirin ilgili dokulara taşınmasını sağlayan transferrin proteinini kodlayan genlerde meydana gelen bir mutasyon sonucu genetik bir hastalık olan "Atransferrinemi" gözlenebilir. Atransferrinemi görülen hastalarda kan plazmasında transferrin eksikliği görülmektedir. [72] Bu nedenle demir diğer dokularla beraber kemik iliğine de ulaşamaz ve yeni eritrositlerin yapımında kullanılacak olan hemoglobin üretilemez. Bu şekilde hastalarda anemi ortaya çıkar. Ancak bu durum literatürde çok nadir olarak kaydedilmiştir.

2.4.2. Demir birikimi hastalıkları

Demir çeşitli bozukluklar nedeniyle vücutta aşırı bir biçimde birikim gösterebilmektedir. Demir birikimiyle ilgili hastalıkların tümüne "hemokromatozis" adı verilmektedir. Hastalarda demirin özellikle karaciğer, kalp ve endokrin dokularında aşırı birikimiyle karaciğerde siroz ve karsinom, kardiyomiyopati ve diyabet gibi hastalıklar gözlenir. [73] Hemokromatozis çeşitli nedenlerden dolayı ortaya çıkabilir.

Demirin vücutta aşırı şekilde biriktiği hastalıkların başında "Herediter hemokromatozis" gelmektedir. Herediter hemokromatozis otozomal resesif genetik bir demir metabolizması hastalığıdır. HFE geninde meydana gelen iki farklı tip mutasyon bu hastalığa neden olmaktadır. HFE geni, normal durumlarda transferrin reseptörünü etkileyerek ligandı olan transferrine bağlanma kapasitesini azaltır. Ancak bu gende meydana gelen mutasyon sonucu transferrin reseptörü transferrine bağlanma kapasitesini azaltamaz ve demirin intestinal hücrelerden aşırı miktarda emilmesine neden olur. [74]

Hemokromatozisin bir diğer nedeni ise hücrelerden demir salınımında görev yapan ferroportin proteini geninde meydana gelen mutasyondur. Bu gende meydana gelen mutasyon farklı fenotiplere sahiptir. Bu fenotiplerden birinde, ferroportin geninde meydana gelen mutasyon sonucu normal olarak aktivite gösteren ve hücre zarında yerleşim gösteren ferroportin proteinleri sentezlenir. Ancak bu proteinler aktivitelerini kısıtlamakla görevli olan hepsidin proteini ile etkileşim kuramazlar. Bunun sonucunda demir bulunduğu hücrelerden kan dolaşımına

sürekli olarak verilir. Kan dolaşımında demiri taşıyan transferrin proteinleri taşıma kapasitesini doldurur ve fazla demir hepatositlerde aşırı bir şekilde birikim gösterir. İkinci olarak mutasyon sonucu sentezlenen ferroportinler asıl yerleşim yeri olan hücre zarı yerine endoplazmik retikulumda yerleşim gösterir. Böylece de intestinal hücreler ve makrofajlardan demir salınımı gerçekleşemez ve hücre içinde aşırı miktarda demir birikimi gerçekleşir. [50]

Hemokromatozisin başka bir çeşidi ise “jüvenil hemokromatozis” hastalığıdır. Otozomal resesif olan bu hastalık genellikle otuz yaşından önce başlar ve etkileri diğer hemokromatozis çeşitlerine göre daha şiddetli gözlenir. Makrofaj ve intestinal hücrelerden demir salınımını kontrol eden hepsidin hormonu geninde ya da bu hormonun sentezini arttıran hemojuvelin biyomolekülünü kodlayan gende meydana gelen mutasyonlar sonucunda hepsidin sentezinde azalma gözlenir.[75] Bu şekilde bu hücrelerden gerçekleşen demir salınımı kontrol altında tutulamaz ve sürekli kan dolaşımındaki transferrine demir aktarımı gerçekleşir.

3. YÖNTEM VE GEREÇLER

Çalışmamızda, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na rutin jinekolojik muayene için gelen gebeliği olmayan 23- 81 yaş arası 200 hasta değerlendirilmiştir. Hastalardan servikovajinal örnekler alınmadan önce; yaş, gebelik ve düşük sayısı, geçirdiği jinekolojik operasyonlar, son adet tarihi, rahim içi araç kullanımı, akıntı, kaşıntı ve diğer jinekolojik şikayetleri ile ilgili bilgiler alınmıştır ve bilgisayara kaydedilmiştir. Hekim tarafından hastalardan alınan örnekler sitolojik inceleme için Papanicolaou (PAP) boyama metoduna göre boyanmıştır. Sitokimyasal inceleme için ise Prussian Blue metodu kullanılmıştır. Tüm değerler istatistiksel analiz için kaydedilmiştir. Çalışmamızın istatistiksel analizleri SPSS (Statistical Package of Social Sciences) paket 15.0 programındaki Ki kare testi kullanılarak yapılmıştır. Anlamlılık sınırı $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

3.1. Örneklerin alınması

Hastalardan sitolojik ve sitokimyasal teknikleri uygulamak için ayrı ayrı örnekler alınmıştır. Sitolojik inceleme için hekim tarafından servikal fırça (cytobrush) yardımıyla ekstoserviks ve endoservikal kanaldan alınan örnekler lamlara tek yönlü olarak yayılmıştır. Her hasta için iki yayma hazırlanmış bunlardan biri sitolojik inceleme için havada kurutulmadan %96'lık etil alkolde, ikincisi ise sitokimyasal inceleme için asetonda tespit edilmiştir.

3.2. Sitolojik Yöntem

Sitolojik inceleme için alınan yaymalar, %96'lık etil alkolde tespit edildikten sonra Sitoloji Laboratuvarında rutin PAP boyama yöntemine göre boyanmış ve binoküler mikroskopta incelenmiştir. İncelemeler sırasında x10, x40 ve x100 objektifler kullanılmıştır. Makrofajlar açısından önemli olduğu belirlenen alanlar işaretlenerek daha sonra fotoğrafları çekilmiştir. Fotoğrafları çekmek üzere "Leica" marka trinoküler floresan ataçmanlı dijital mikroskobun x40 ve x100'lük objektifleri kullanılmıştır.

Papanicolaou serisi

- %80'lik etil alkol
- %70'lik etil alkol
- %50'lik etil alkol

- Distile su
- Hemotoksilen
- Musluk suyu
- %1'lik asitli su
- Distile su
- Doymuş lityum çözeltisi
- Distile su
- %50'lik alkol
- %70'lik alkol
- %80'lik alkol
- Orange G
- %95'lik alkol
- %95'lik alkol
- Eozin asit
- %95'lik alkol
- %95'lik alkol
- Alkol-ksilol
- Ksilol

3.3. Sitokimyasal yöntem

Sitokimyasal inceleme için alınan yaymalar asetonda tespit edilmiştir. Prussian Blue metodunu uygulamak için gerekli solüsyonlar hazırlanmıştır. Kullanılan solüsyonun içeriği aşağıda verilmiştir.

Prussian Blue solüsyonu

- %20' lik HCL çözeltisi
Konsantre HCL.....20 ml
Distile su..... 80 ml
- %10' luk Potasyum ferrosiyaniid çözeltisi
Potassium ferrocyanide..... 10 gr
Distile su.....100 ml

İki solüsyon boyama yapılmadan hemen önce eşit miktarda karıştırılmıştır. Örnekler bu solüsyonda 30 dakika bekletilmiştir. Ardından distile su ile yıkanmış, hematoksilin ile zemin boyama yapılmıştır. Daha sonra preparatlar entellan ile kapatılıp binoküler mikroskopta incelenmiştir. Bu yöntem ile demir HCL tarafından, bağlı olduğu ferritin proteininden ayrılarak serbest hale getirilmiştir. Serbest hale geçen Fe^{+3} , potasyum ferrosiyaniid ile tepkimeye girmiştir. Bunun sonucunda demir yüklü makrofajlar ışık mikroskobu altında diffüz bir şekilde mavi renkte gözlenmiştir. Demir depolamış hemosiderin ise koyu mavi granüller halinde gözlenmiştir. Makrofajlar açısından önemli olduğu belirlenen alanlar işaretlenerek daha sonra fotoğrafları çekilmiştir. Fotoğrafları çekmek için "Leica" marka trinoküler floresan ataçmanlı dijital mikroskobun x100'lük objektifleri kullanılmıştır.

4.SONUÇLAR

Çalışmamızın amacı; servikal örneklerdeki makrofajların demir ile ilişkisini incelemek ve makrofaj sitoplazmasında depolanan demirin enfeksiyonlarla olan ilgisini saptamaktır. İlk aşamada; rutin kontrol amacıyla kliniğe başvuran 23-81 yaş arasındaki 200 hastanın serviko-vajinal örnekleri PAP yöntemi ile boyanıp, sitolojik olarak incelenmiş ve bu yaymalarda makrofaj bulunup bulunmadığı saptanmıştır. Bu incelemeler sonucunda; 200 yaymanın 95'inde (%47,5) makrofaj varlığı saptanmış ve bu hastalar çalışma kapsamına alınmıştır. Makrofaj sitoplazmasındaki demirin varlığını göstermek için ise bu 95 yayma Prussian Blue yöntemi ile sitokimyasal olarak boyanmış ve ışık mikroskopik olarak incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda da, çalışma kapsamındaki 95 yaymanın 12'sinde (%12,6) makrofajların demir içeriği bakımından pozitif olduğu saptanmış ve bu 12 yayma çalışma grubu olarak kabul edilmiştir. Prussian Blue ile makrofajlarda boyanma gözlenmeyen diğer 83 (%87,4) yayma da kontrol grubu olarak alınmıştır. Ayrıca elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

4.1.Servikovajinal Örneklerin Sitolojik Yöntemle İncelenmesi

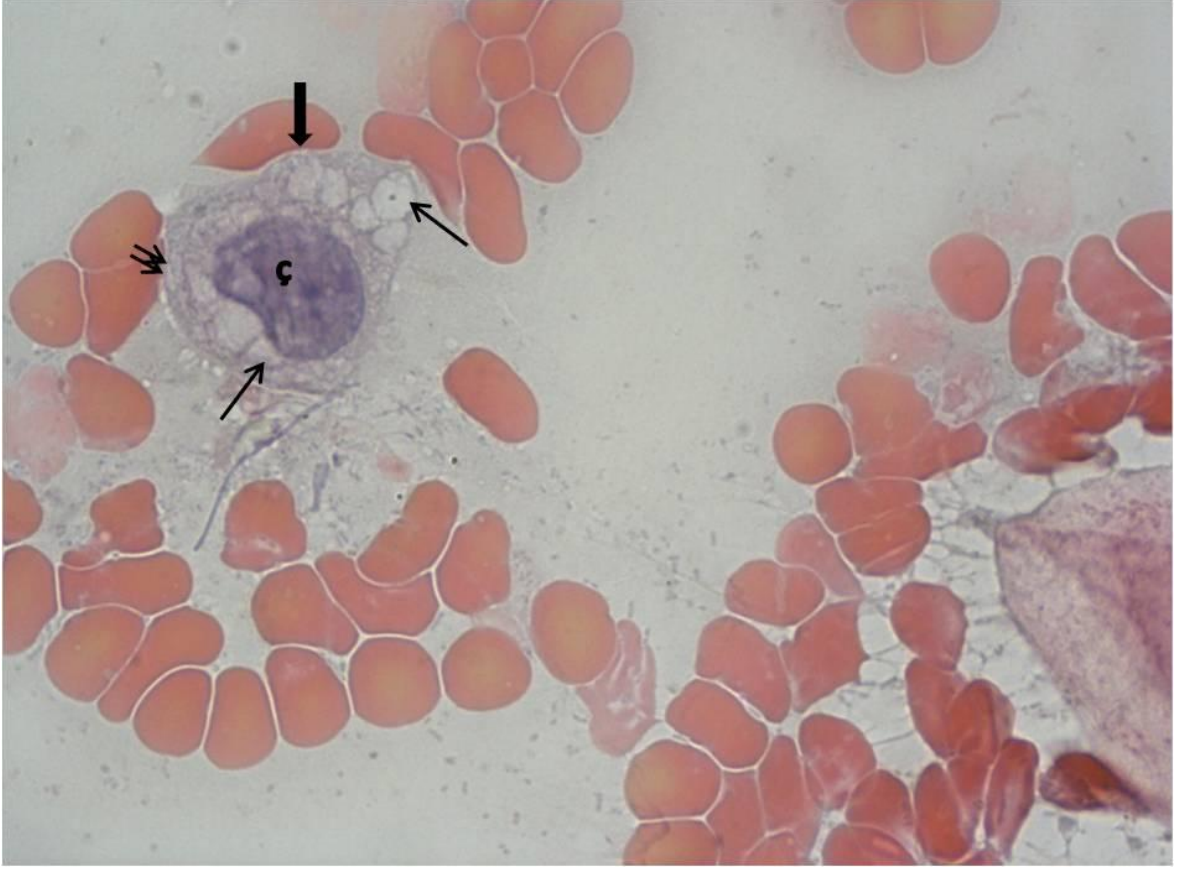
Araştırmamızda sitolojik incelemede rutin PAP boyası ile boyanmış 200 yaymanın 95'inde (%47,5) saptanan makrofajlar incelenmiş ve bu hücrelere ait bulgular kaydedilmiştir. Yaymalarda gözlenen makrofajların hücresel detayına bakıldığında; hemen hemen hepsinin sitoplazmasının büyük ve küçük vakuoller içerdiği ve bu vakuoller nedeniyle sitoplazmanın köpüklü görünümde olduğu belirlenmiştir. (Şekil 4.1, 4.2, 4.3) Bazı makrofajların vakuolleri içerisinde irili ufaklı eozinofilik ya da bazofilik renkte fagosite edilmiş hücresel artıkların bulunduğu görülmüştür. (Şekil 4.1, 4.3, 4.4) Fagosite edilmiş bu yapılar detaylı olarak incelendiğinde bazılarının sitoplazma artığı bazılarının ise bütünüyle fagosite edilmiş bir Polimorfonükleer nükleer lökosit (PMNL) olduğu saptanmıştır. (Şekil 4.5) Bir makrofajın sitoplazmasında da küçük bir vakuol içerisinde iki adet döderlein basilinin fagosite edildiği belirlenmiştir. (Şekil 4.6) Bir diğer ilginç bulgu da makrofajlar içerisinde fagosite edilmiş olan küçük piknotik çekirdek parçaları ve etrafında az bir sitoplazması olan yapıların gözlenmesidir. Bu yapıların çok sayıda olduğu ve tamamen bir makrofajın sitoplazmasını doldurarak çekirdeği iyice kenara ittiği saptanmıştır. (Şekil 4.7) Makrofaj zarına bakıldığında ise dışarı doğru uzanmış olan kısalı uzunlu bir çok pseudopod dikkati çekmiştir. (Şekil 4.8) Makrofaj

çekirdeklerinin ise yuvarlak ya da içeri doğru bir girinti oluşturarak böbrek şeklini aldığı gözlenmiştir (Şekil 4.1, 4.3, 4.4).

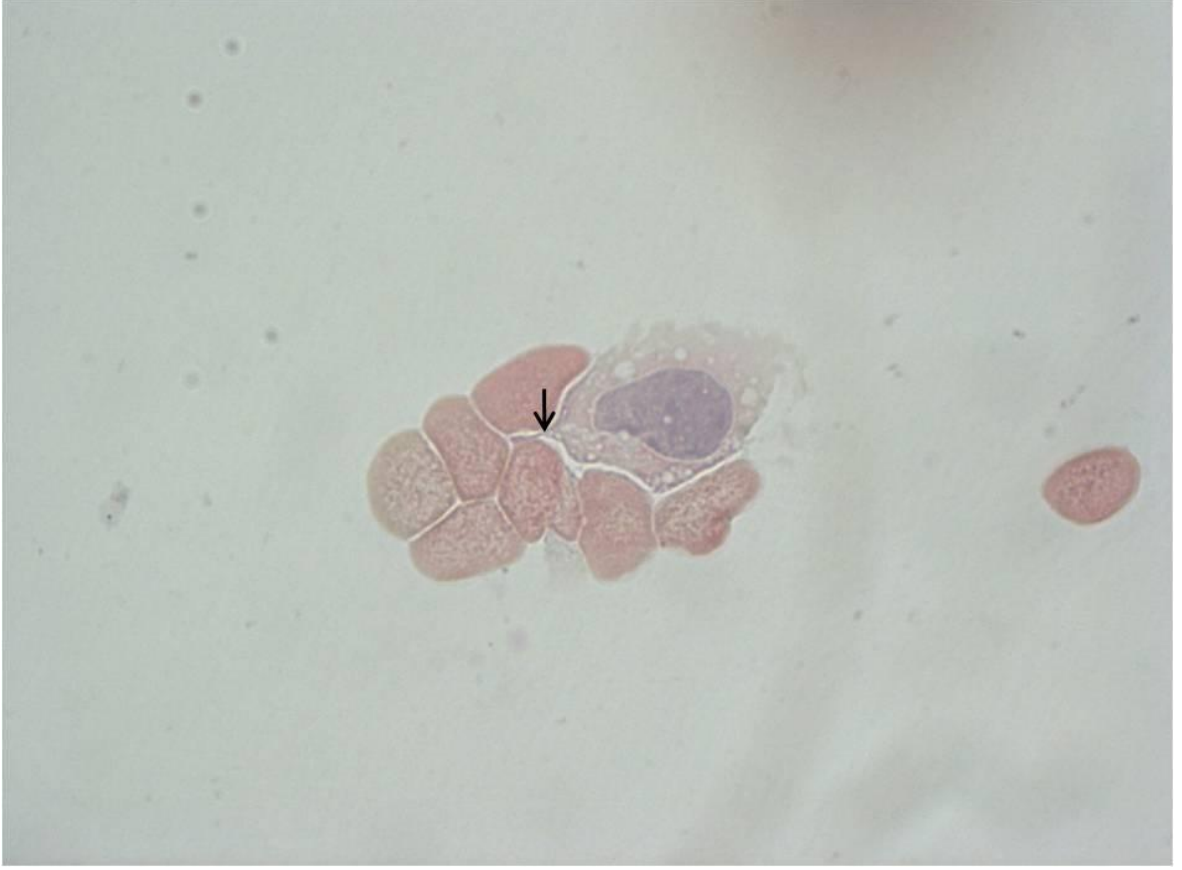
Yaymalarda gözlenen diğer önemli bir bulgu da makrofajların eritrositler ile olan yakın ilişkisidir. Makrofajların etrafında gruplar halinde çok bol eritrositlerin bulunduğu, bazı eritrositlerin zarıyla makrofaj zarının birbirine çok yakın mesafede olduğu, bazı bölgelerde ise bu iki zarın adeta kaynaştığı gözlenmiştir (Şekil 4.1). Hatta şekil 4.2’de görüldüğü gibi makrofaj zarından etrafındaki eritrositlerin arasına doğru uzamış ince bir uzantı dikkati çekmiştir. Şekil 4.8’de de makrofajın zarından eritrositlere doğru uzamış kalın ve kısa pseudopod’ların bulunduğu görülmüştür. Eritrosit zarlarının pseudopod’ların şekline uygun olarak içeri doğru çöküntüler oluşturduğu belirlenmiştir. Bir başka alanda da bir eritrositin yarısının yan yana dizilmiş makrofajlar arasında olduğu, makrofajlardan birinin (M2) bu eritrosit parçasına doğru iki pseudopod uzattığı gözlenmiştir. Ayrıca bu makrofajın çekirdeğine bitişik yuvarlak, eozinofilik renkte fagosite edilmiş bir yapı dikkati çekmiştir (Şekil 4.3). Fagosite edilmiş bu yapıların yanı sıra makrofaj sitoplazmasına alınmak üzere ve makrofaj zarına adeta bitişik gibi görülen sitoplazma parçaları, PMNL’ler (Şekil 4.6) ve çıplak hücre çekirdekleri gözlenmiştir. (Şekil 4.4) Sadece bir yaymada ise çok çekirdekli ve geniş sitoplazması olan bir “dev histiyosit” in varlığı saptanmıştır. (Şekil 4.9)

Makrofajların bulunduğu 95 yaymanın 4’ünde (%4,2) *Candida*’ya ait çok sayıda hif ve blastosporlar gözlenmiştir. Hif ve blastosporların üzerinde yerleştiği bazı hücrelerin çekirdeklerinin irileştiği dikkati çekmiştir (Şekil4.10). Yine 4 (%4,2) yaymada da "Bakteriyel vajinozis (BV)" enfeksiyonuna rastlanmıştır. Ancak hem *Candida* hem de BV enfeksiyonu gözlenen yaymalarda bulunan makrofajların sitoplazmalarında Prussian Blue yöntemiyle boyanma gözlenmemiştir. Başka bir yaymada ise apikal kısmında çok sayıda sillerin bulunduğu endoservikal hücreler görülmüştür (Şekil 4.11).

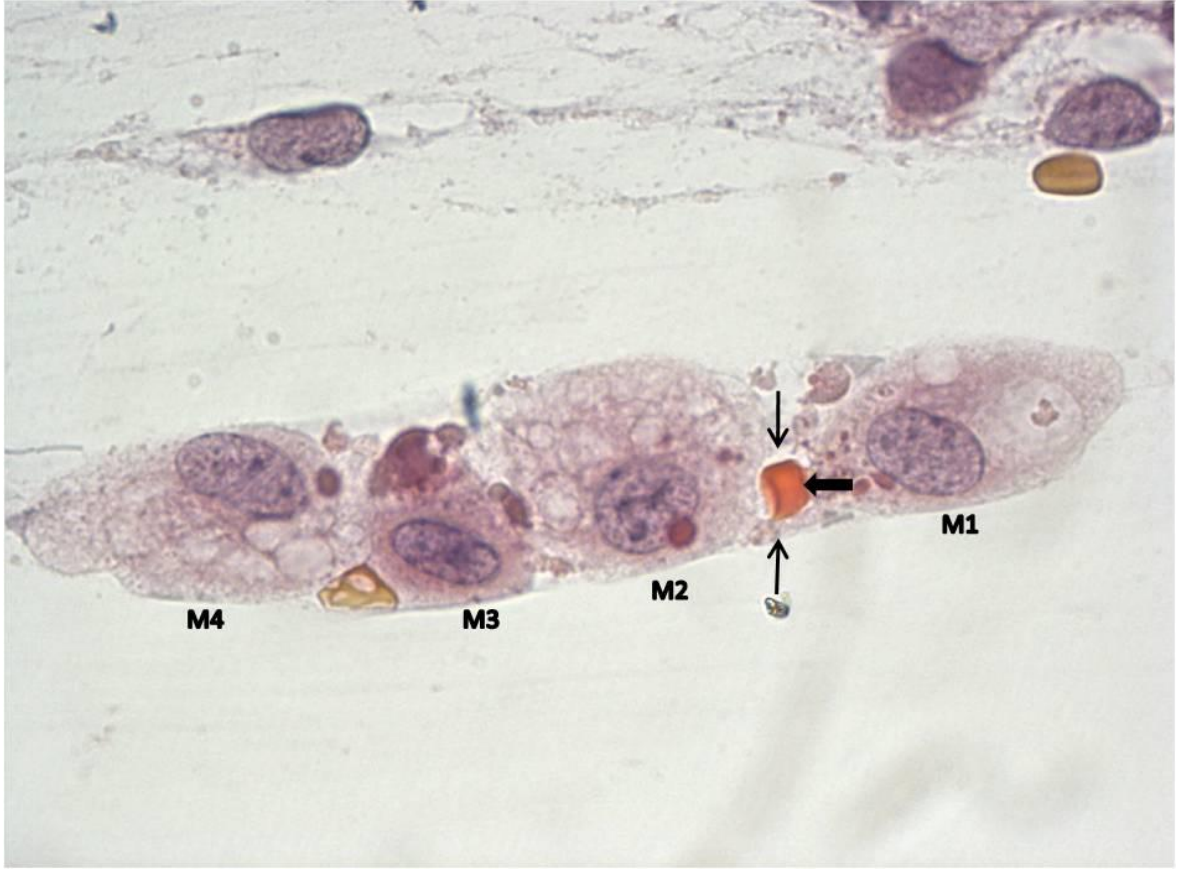
Hücresel atipi açısından olgular incelendiğinde ise; kontrol grubundaki Prussian Blue ile makrofajlarda boyanma gözlenmeyen yaymalarda geniş sitoplazmalı, çekirdeklerinde irileşme ve hiperkromazi gözlenen, sitoplazma ile çekirdek arasında geniş bir sitoplazmik boşluk bulunan hücreler saptanmıştır (Şekil 4.12). Bir diğer hastanın yaymasında ise çekirdeklerde aşırı irileşme ve hiperkromazi, multinükleasyon ve çok büyük çekirdekçikler dikkati çekmiştir (Şekil 4.13).



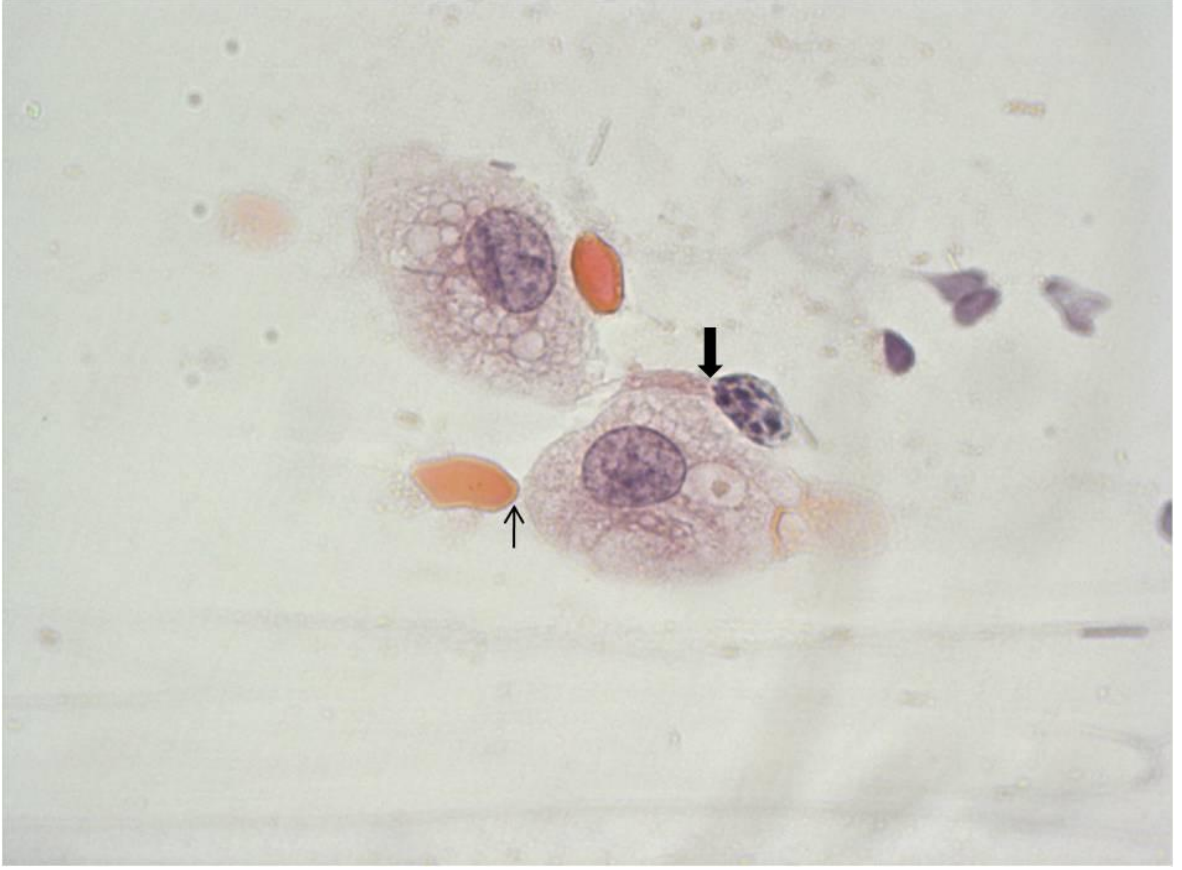
Şekil 4. 1: İçinde irili ufaklı vakuoller (ok) içeren, çekirdeği (Ç) böbrek şeklinde olan bir makrofaj görülmektedir. Bu makrofajın etrafında gruplar halinde eritrositler yer almaktadır, Eritrositlerin bazılarının hücre zarının makrofaj zarıyla adeta kaynaştığı (çift ok), bazılarının ise kaynaşmak üzere olduğu (kalın ok) görülmektedir. (Papanicolaou, x1000)



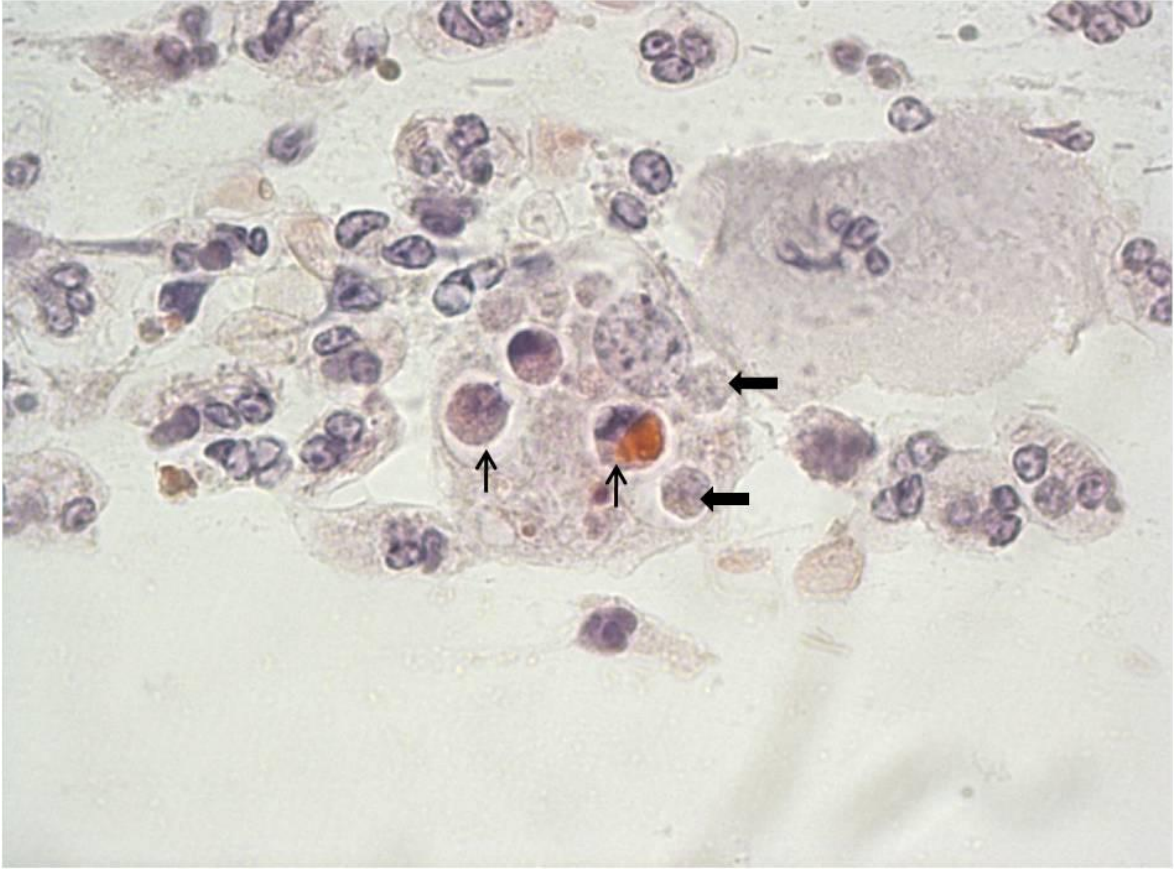
Şekil 4. 2: Çekirdeğinde küçük bir girinti oluşmuş, sitoplazması köpüklü görünümde olan bir makrofaj zarından etrafında grup halinde dizilim göstermiş eritrositlere doğru uzanan ince bir pseudopod görülmektedir (ok). (Papanicolaou, x1000)



Şekil 4. 3: Yanyana dizilim göstermiş yuvarlak çekirdekli, irili ufaklı vakuoller içeren dört makrofaj görülmektedir (M1, M2, M3, M4). M1 ve M2 makrofaj zarları arasında yarısı parçalanmış bir eritrosit görülmektedir (kalın ok). M2 makrofajının hücre zarından bu eritrosite doğru uzanan iki tane pseudopod dikkati çekmektedir (ok). Ayrıca bütün makrofajların sitoplazmalarında dağınık halde bulunan ya da çekirdek zarına bitişik fagositik vakuoller gözlenmektedir. Bu vakuoller içerisinde irili ufaklı eozinofilik özellikteki yapılar dikkati çekmektedir. (Papanicolaou, x1000)



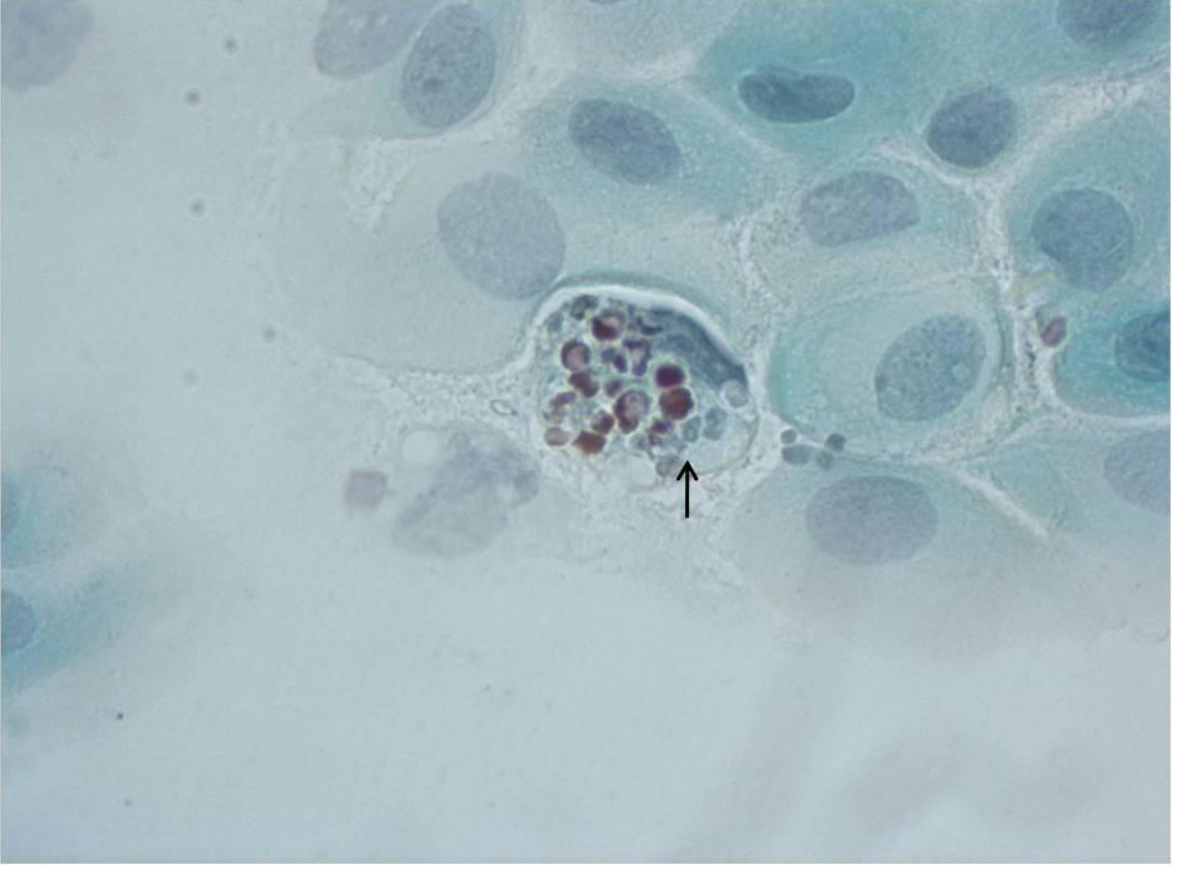
Şekil 4. 4: Sitoplazmasında birçok fagositik vakuol içeren makrofajın bir yandan bir eritrosit ile yakın ilişkide olduğu görülürken (ok), bir yandan da sitoplazmasını kaybetmiş çıplak bir çekirdek ile hücre zarının kaynaştığı görülmektedir (kalın ok). (Papanicolaou, x1000)



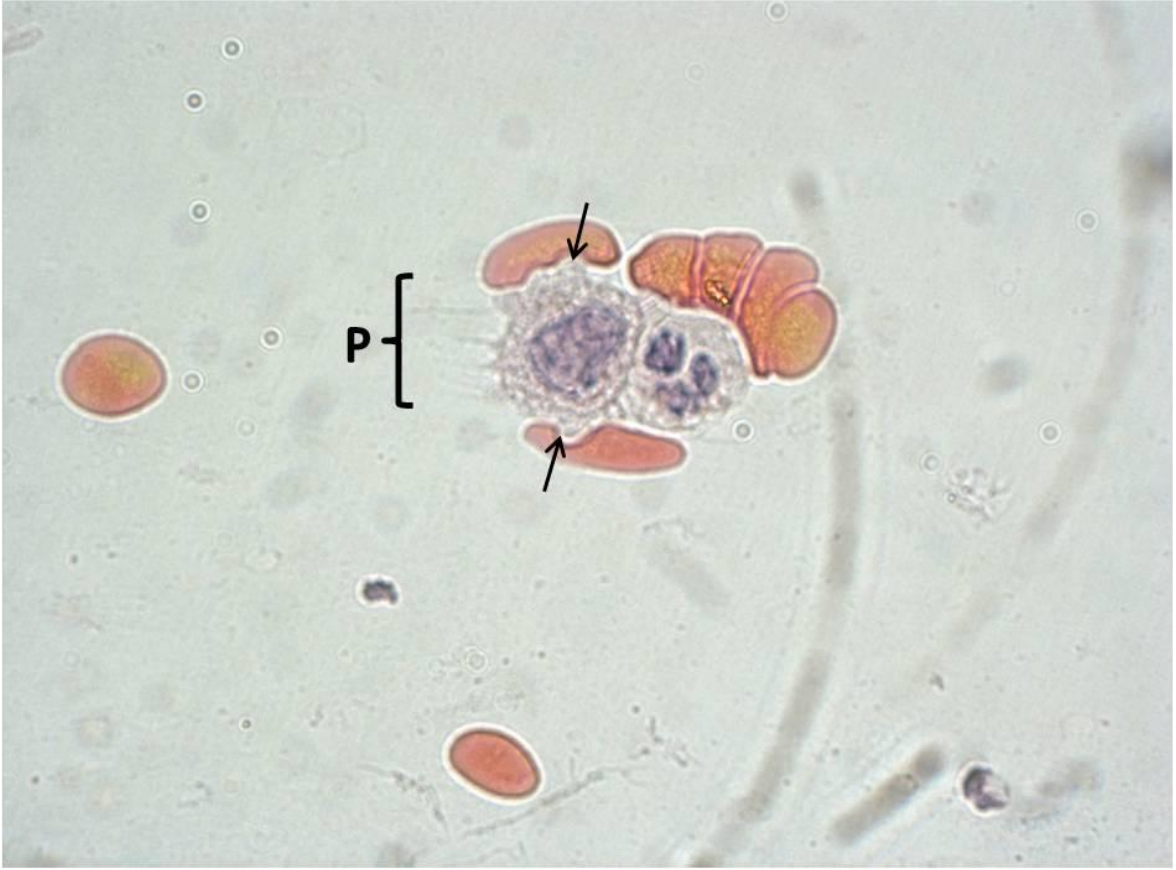
Şekil 4. 5: Makrofaj sitoplazmasında çok sayıda fagositik vakuol görülmektedir. Bu vakuoller içerisinde piknotik çekirdekli ve daralmış sitoplazmalı PMNL'ler (ok) ve birçok hücre artığı (kalın ok) dikkati çekmektedir . (Papanicolaou, x1000)



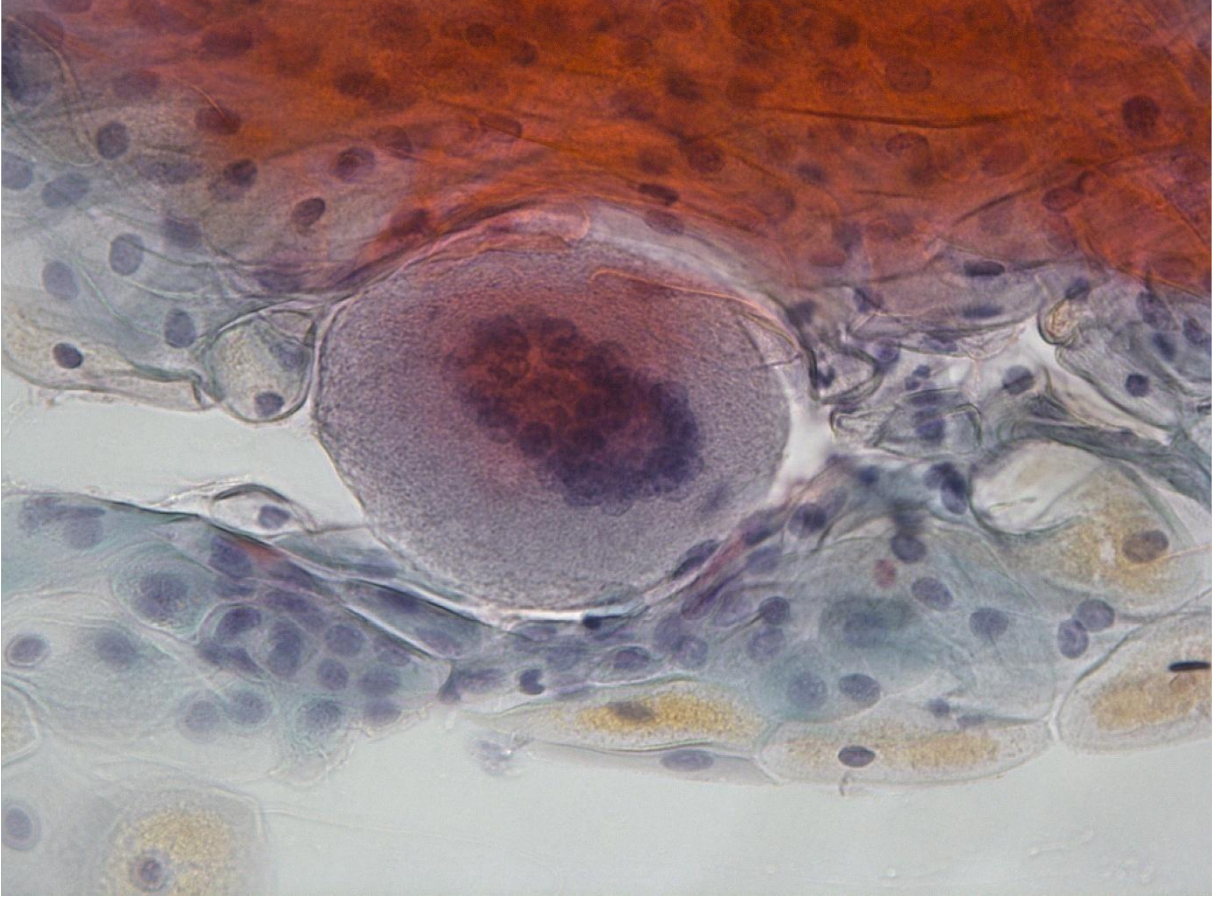
Şekil 4. 6: M1 makrofajının sitoplazmasında vezikül içinde sindirdiği laktobasiller görülmektedir (ok). Aynı zamanda makrofaj zarından bu zara bitişik gibi görünen zemindeki hücre artıklarına doğru çıkıntılar meydana geldiği gözlenmektedir (kalın ok). M2 makrofajının zarından ise PMNL'lere doğru uzanan kalın pseudopodlar (kırık ok) ve bu PMNL'lerin hücre içine alınmak üzere olduğu dikkati çekmektedir. (Papanicolaou, x1000)



Şekil 4. 7: Parabazal hücrelerin arasında eozinofilik renkte boyanmış birçok apoptotik cisimcik içeren, çekirdeği kenara itilmiş bir makrofaj görülmektedir. (Papanicolaou, x1000)



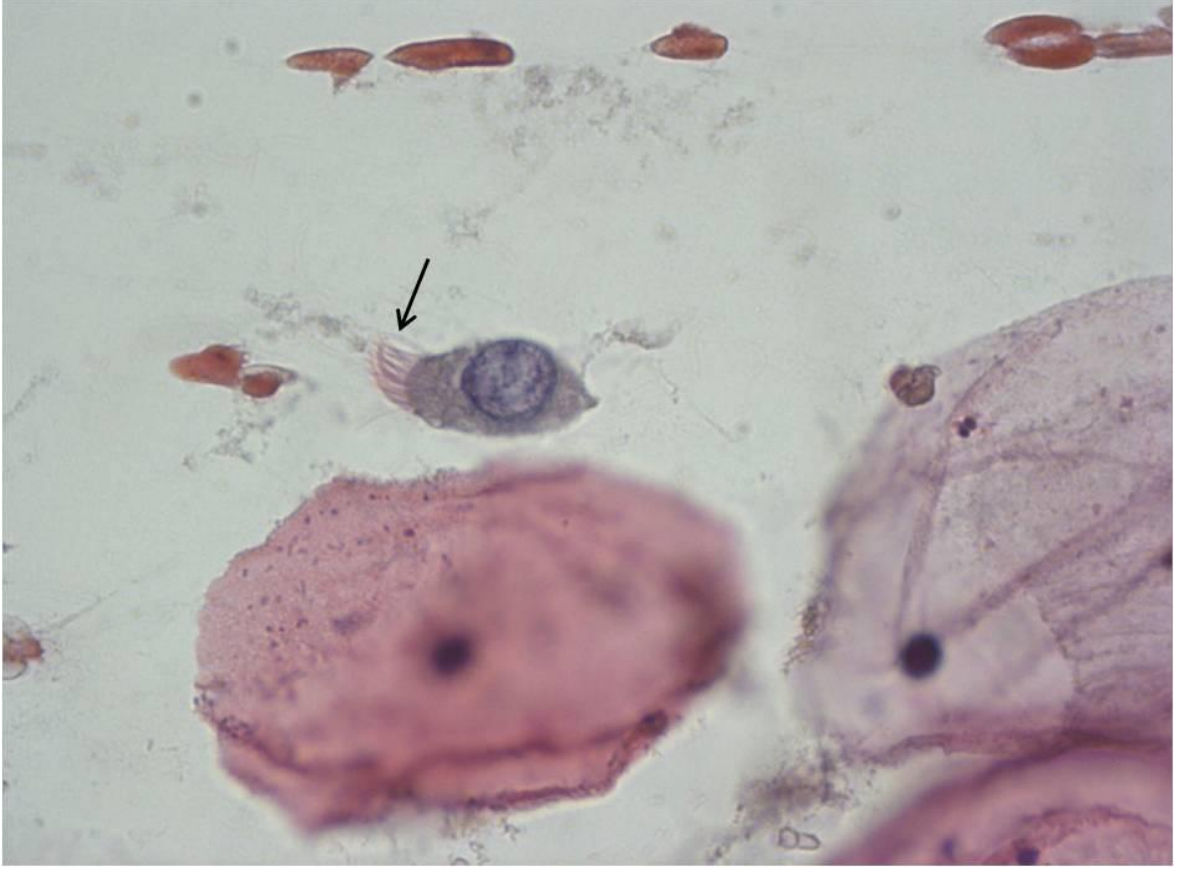
Şekil 4. 8: Hücre zarları kaynaşmış bir PMNL ve makrofaj yan yana görülmektedir. Makrofajın zarından eritrositlere doğru uzanmış kısıklı uzunlu çok sayıda pseudopod (P) dikkati çekmiştir. Bazı pseudopod'ların (ok) bu eritrositlerle yakın ilişki kurduğu ve bu hücrelerin zarlarında içeri doğru bir çöküntü oluşturduğu gözlenmiştir. PMNL zarının da grup halindeki eritrositlerin zarlarıyla adeta birbirine değecek kadar yakınlaştığı görülmektedir. (Papanicolaou, x1000)



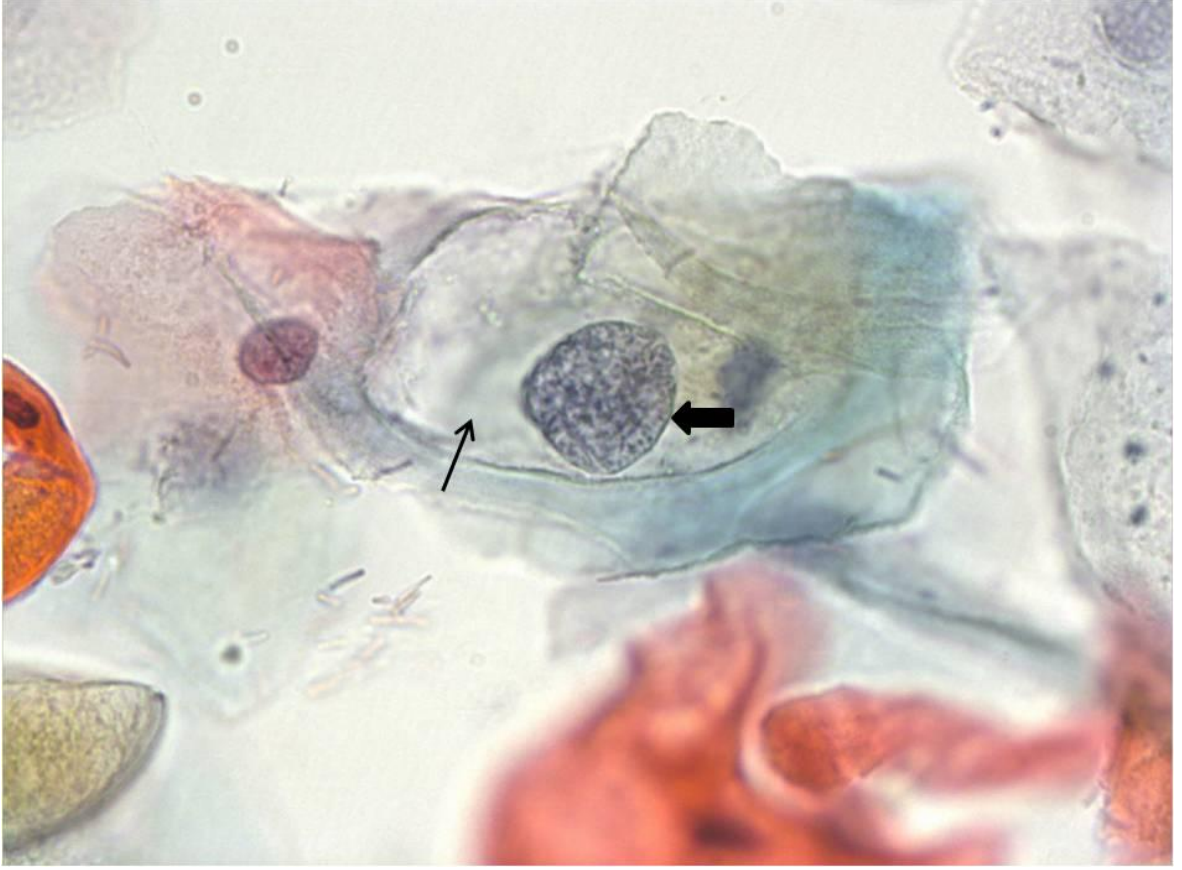
Şekil 4. 9: Menopoz dönemindeki bir hastaya ait yaymada birçok makrofajın bir araya gelerek oluşturduğu bir “dev makrofaj” görülmektedir. (Papanicolaou, x1000)



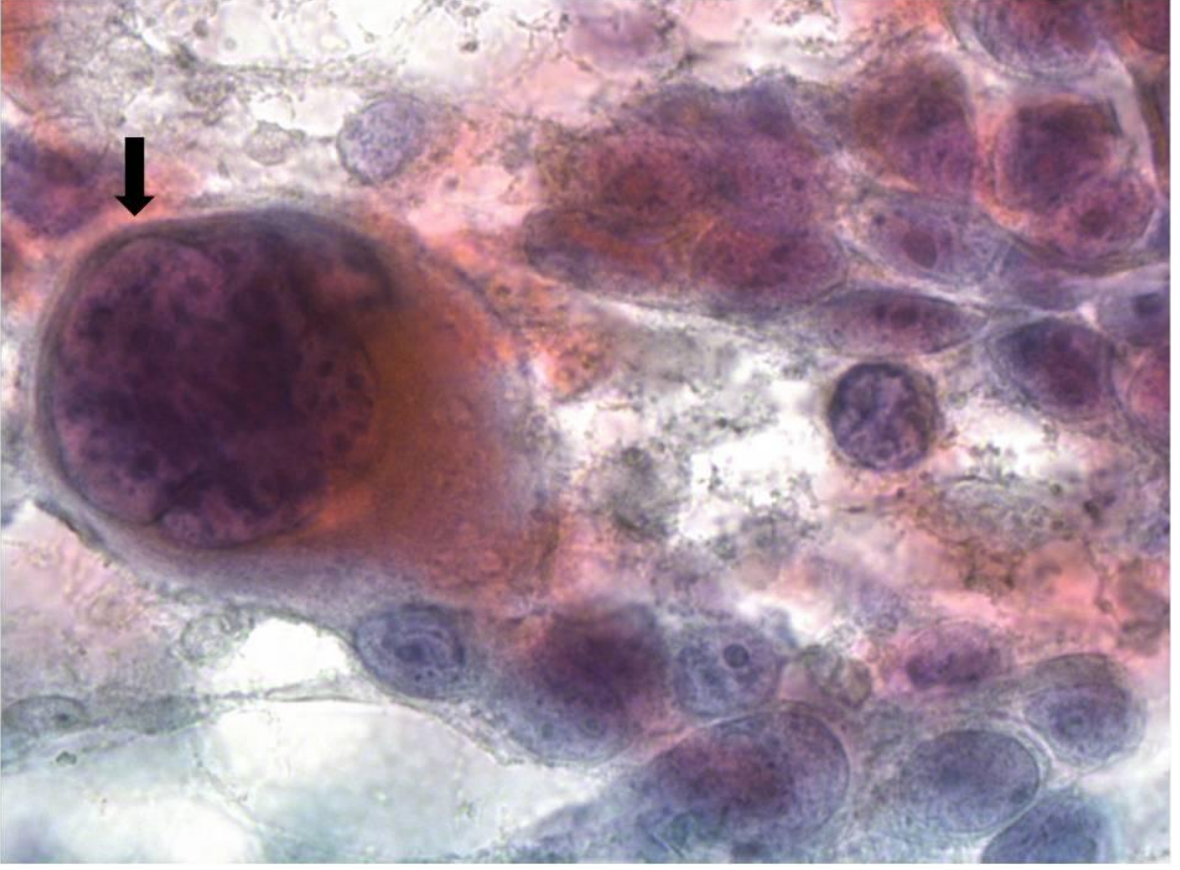
Şekil 4. 10: Skuamoz epitel hücrelerinin üzerinde *Candida* hifleri görülmektedir. Hifler arasında “septum” adı verilen boşluklar gözlenmektedir (ok). *Candida* enfeksiyonunun bazı epitel hücrelerinin çekirdeklerinde irileşmeye neden olduğu dikkati çekmektedir (kalın ok). (Papanicolaou, x1000)



Şekil 4. 11: Zemininde serbest kokların bulunduğu fertil dönemdeki bir hastaya ait yaymada bazalinde birçok sil (ok) bulunan bir endoservikal hücre dikkati çekmiştir. (Papanicolaou, x1000)



Şekil 4. 12: Kontrol grubundaki bir hastaya ait yaymada epitel hücresinin sitoplazmasında koilositik atipi (ok) ve bunun yanı sıra çekirdekte irileşme, hiperkromatizm ve kromatinlerde kabalaşma (kalın ok) dikkati çekmektedir. (Papanicolaou, x1000)



Şekil 4. 13: Hiperkromatik ve aşırı irileşmiş, çekirdekçikleri oldukça belirgin çok sayıda çekirdeğe sahip bir hücre görülmektedir. (Papanicolaou, x1000)

4.2.Serviko-vajinal Örneklerin Sitokimyasal Yöntemle (Prussian Blue) İncelenmesi ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

PAP boyası ile makrofajların varlığı saptanan 95 yaymaya Prussian Blue metodu uygulanmış ve bulgular aşağıdaki gibi kaydedilmiştir. Prussian Blue ile boyanmış bu 95 yaymanın 12'sinde (%12,6) sitoplazmaları mavi renk boyanmış makrofajlar görülmüş ve bu olgular çalışma grubu olarak alınmıştır. Bu 12 yaymada bulunan bazı makrofajların sitoplazmalarının tamamen mavi renkte boyandığı, bazı makrofajların sitoplazmalarında ise hiç boyanma olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.14). Boyanan makrofajların hepsinin sitoplazmasının mavi renkte diffüz bir boyanma gösterdiği (Şekil 4.15), ancak bazı makrofajlarda ise bu diffüz boyanmanın yanı sıra koyu mavi renkte boyanan, çeşitli büyüklüklerdeki granüllerin de olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.16). On iki yaymanın hepsinde diffüz ve diffüz/granüler boyanan makrofajlar sayılmış, sitoplazmasında koyu mavi renkteki granüller bulunan makrofajların, sadece diffüz boyanma görülen makrofajlara oranının 1:10 olduğu saptanmıştır. Bunların yanı sıra boyanma gözlenen makrofajların sitoplazmalarında izlenen fagositik vakuollerde boyanma gözlenmediği, fagosite edilmiş maddelerin ise kendi renklerinde olduğu dikkati çekmiştir. (Şekil 4.15)

Boyanmanın pozitif olduğu 12 yaymanın diğer hücrelerle olan ilişkisi incelendiğinde; bu yaymaların 11'inde (%91,7) eritrositlerle makrofajların yakın ilişkide olduğu gözlenmiştir. Eritrositlerden bazılarının boyanmanın pozitif olduğu makrofajlara ait pseudopod'lar aracılığı ile hücre içine alınmak üzere olduğu, bazı eritrositlerin zarının ise makrofaj zarıyla kaynaştığı gözlenmiştir (Şekil 4.16, 4.17). Boyanma gözlenen makrofajların varlığı ile aynı yaymada eritrositlerin bulunması arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildiğinde boyanma pozitifliği ve eritrositlerin varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p<0.05$).

Bunun yanı sıra çalışma grubuna ait 12 yaymanın 11'inde (%91,7) makrofajlarla birlikte PMNL'lerinde bulunduğu görülmüştür. Boyanmanın pozitif olduğu bir makrofajın etrafında birçok PMNL görülürken, bir başka makrofajın sitoplazmasında ise fagosite edilmiş bir PMNL olduğu görülmüştür (Şekil 4.18).

Prussian Blue ile makrofajlarda boyanma gözlenmeyen kontrol grubundaki yaymalarda, çalışma grubunda görmediğimiz enfeksiyon etkenlerine ve atipik

hücrelere rastlanmıştır. Çalışma grubundaki biyopsi ile endometriyal adenokarsinoma tanısı almış ancak sitolojik incelemesinde atipik bir hücre grubuna rastlamadığımız bir yaymada ise oldukça fazla sayıda boyanma gözlünen makrofajların bulunduğu dikkati çekmiştir.

Çalışma grubundaki 12 hastanın fertil ya da menopoz döneminde olduğuna bakıldığında ise bu hastaların 11'inin (%91,7) fertil dönemde, 1'inin (%8,3) ise menopoz döneminde olduğu saptanmıştır.

Hem çalışma grubu hem de kontrol grubundaki hastalardan elde edilen bulguların istatistiksel değerlendirilmesi ise çizelge 4.1 ve 4.2 de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1: Makrofajlarda boyanma pozitifliğinin yaymalarda bulunan eritrosit ve PMNL açısından istatistiksel olarak değerlendirilmesi

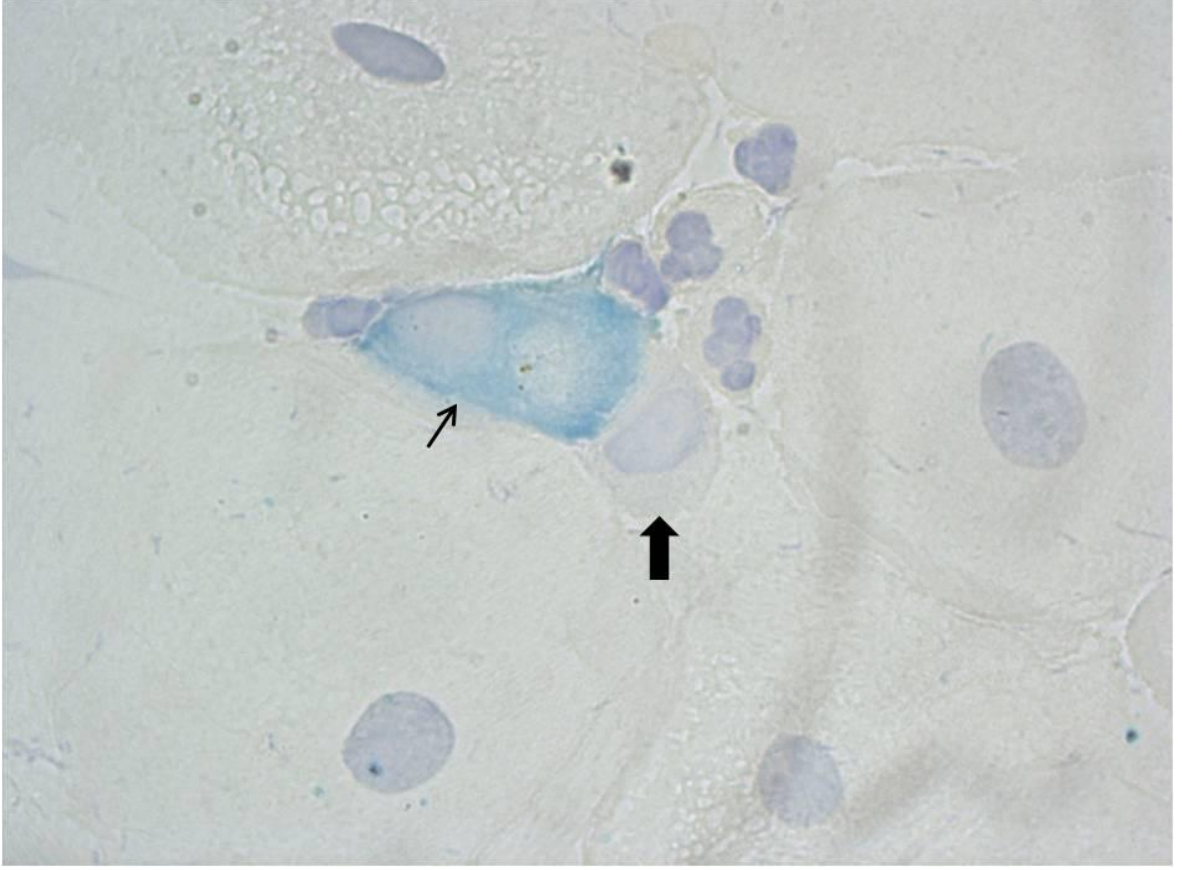
Sitokimyasal Bulgular	Çalışma grubu (n=12)	Kontrol grubu (n=83)	p değeri
Eritrosit			
VAR	11 (%91,7)	42 (%50,6)	*0,006
YOK	1 (%8,3)	41 (%49,4)	
PMNL			
VAR	11 (%91,7)	66 (%79,5)	0,287
YOK	1(%8,3)	17 (%20,5)	

Çizelge 4.2: Makrofajlarda boyanma pozitifliğinin hastaların fertilitate ve menopoz durumlarına göre değerlendirilmesi

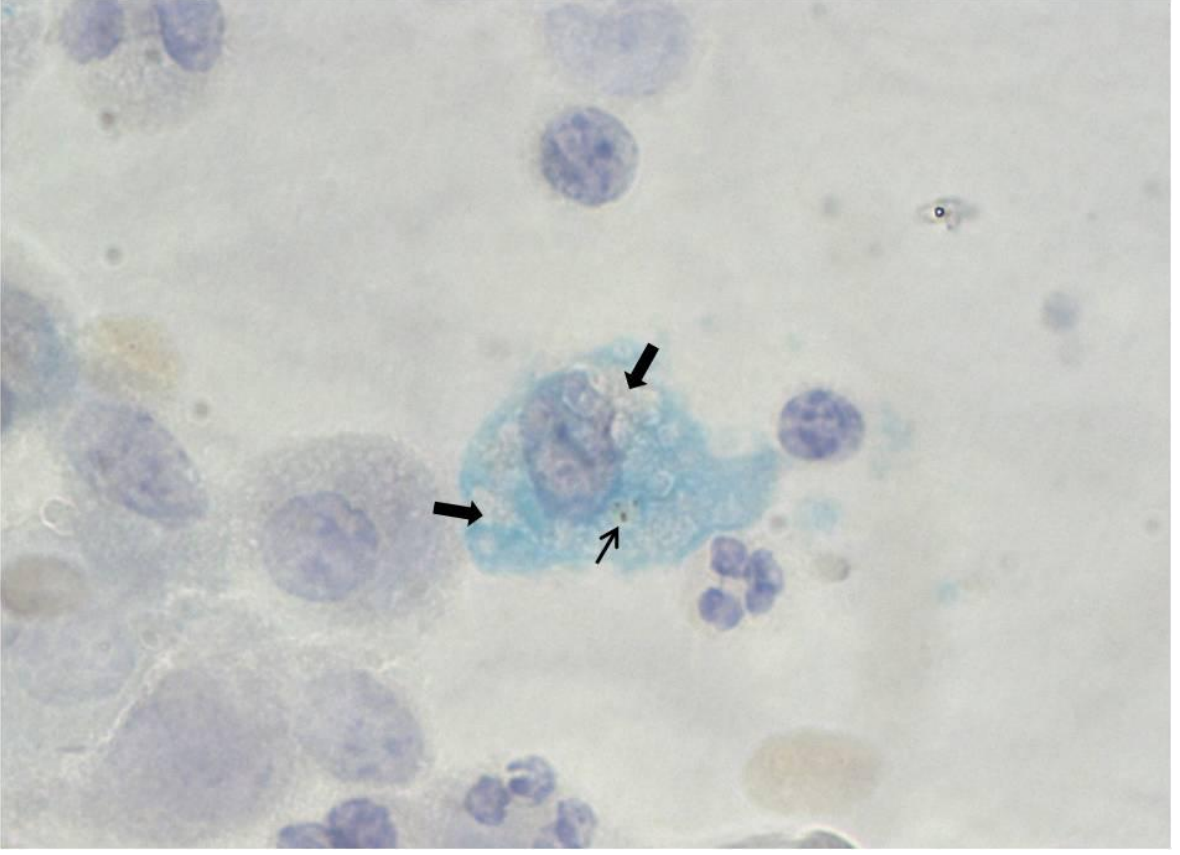
Fertilitate	Çalışma Grubu (n=12)	Kontrol Grubu (n=83)	p değeri
VAR	11 (%91,67)	51 (%61,5)	*0,035
YOK	1 (%8,33)	32 (%38,5)	

Çizelge 4.3: Makrofajlarda boyanma pozitifliğinin yaymalarda gözlenen enfeksiyonlara göre değerlendirilmesi

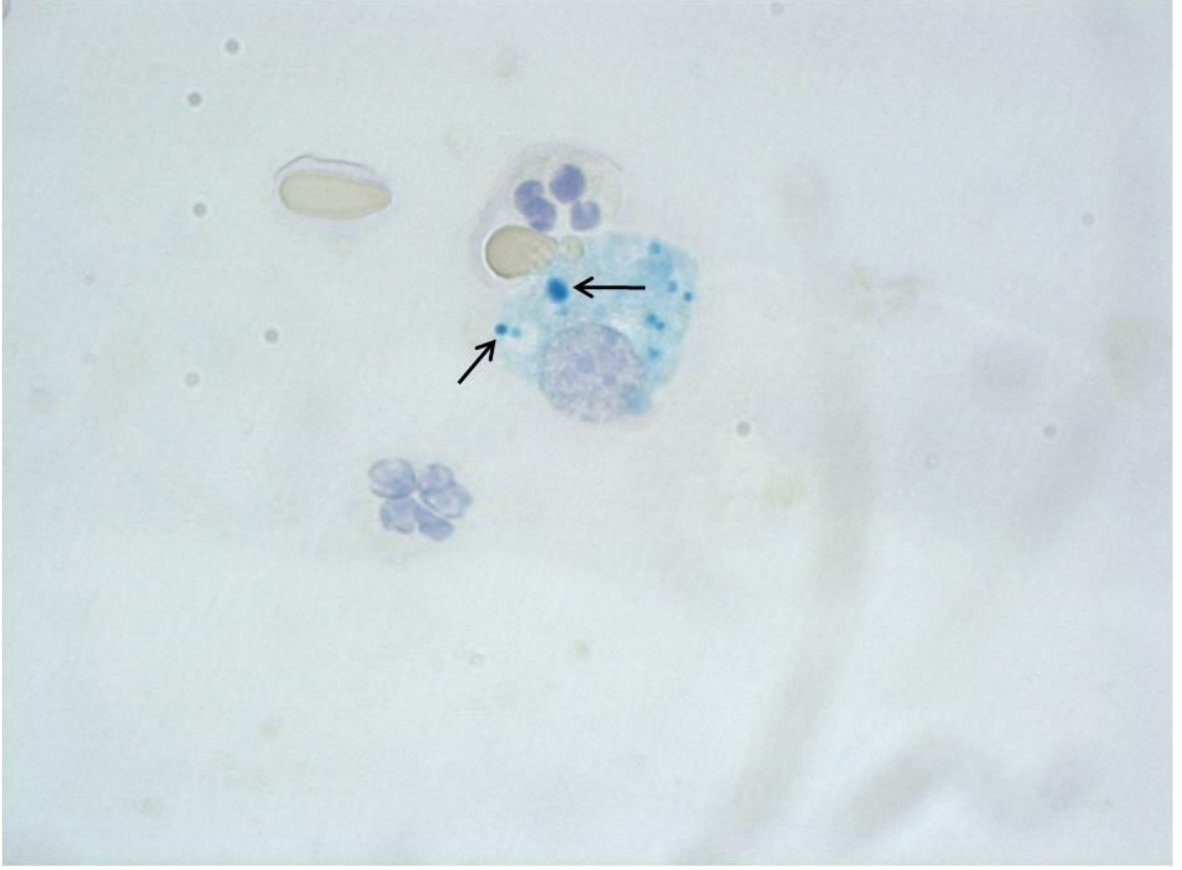
Enfeksiyonlar	Çalışma grubu (n=12)	Kontrol grubu (n=83)
Candida VAR	0	4
YOK	12	79
BV VAR	0	4
YOK	12	79



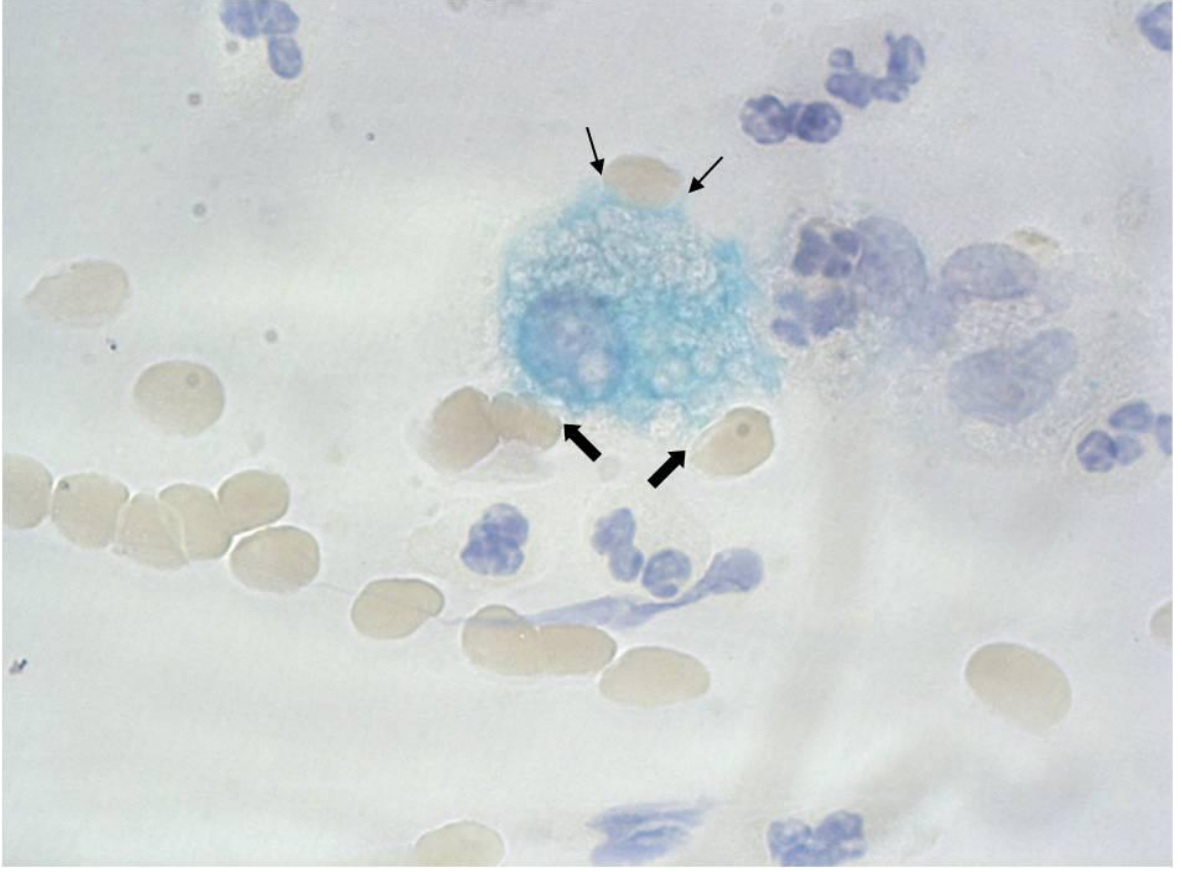
Şekil 4. 14: Çalışma grubundaki yaymalarda bazı makrofajlar boyanırken bazılarının boyanmadığı dikkati çekmiştir. Skuamoz epitel hücreleri arasında yana yana dizilim göstermiş üç tane makrofajdan ikisinin boyandığı (ok) ve bir tanesinin boyanmadığı (kalın ok) görülmektedir. (Prussian Blue, x1000)



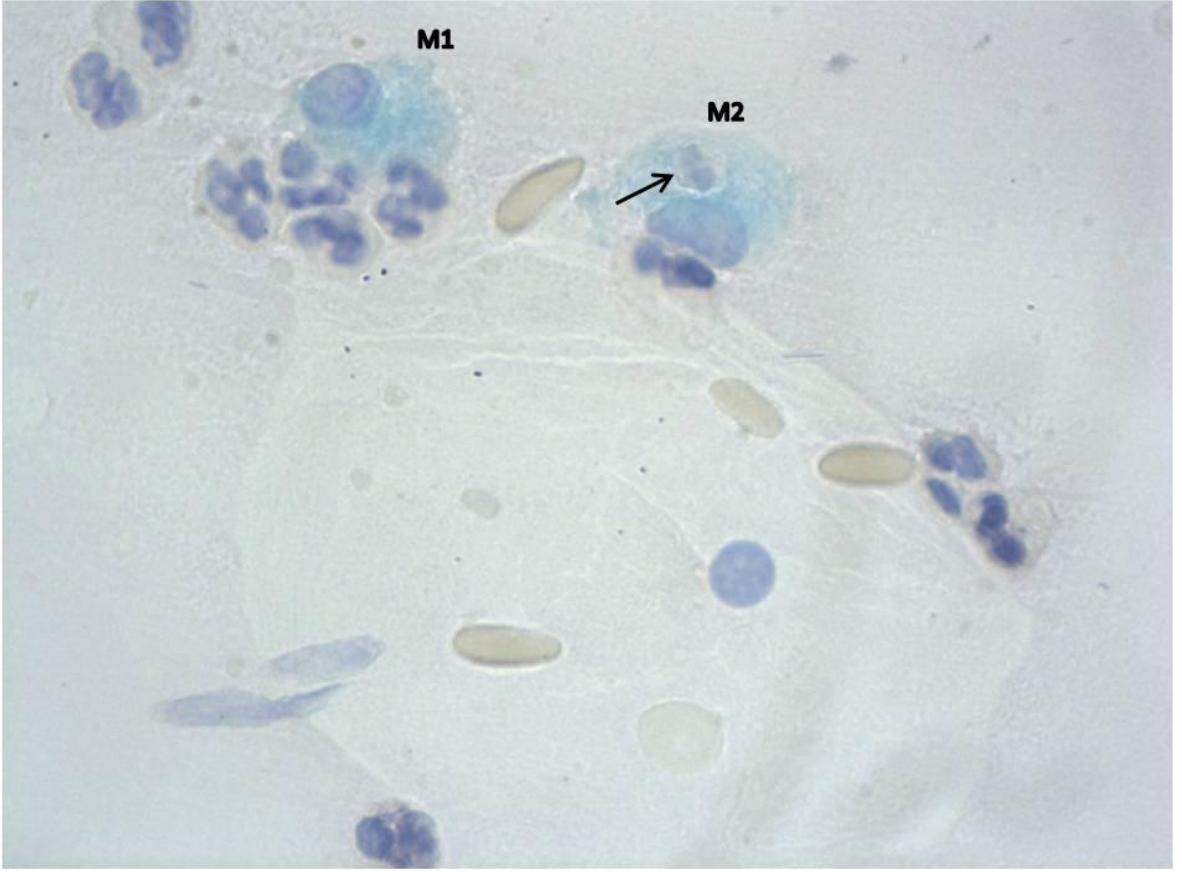
Şekil 4. 15: Sitoplazmasında diffüz boyanma gözlenen bir makrofaj görülmektedir. Bu makrofajın sitoplazmasında bulunan fagositik vakuollerde boyanma gözlenmezken (kalın ok), fagositte edilmiş bir maddenin kendi renginde olduğu dikkati çekmiştir (ok). (Prussian Blue, x1000)



Şekil 4. 16: Sitoplazmasında diffüz mavi renkte boyanmanın yanı sıra çeşitli büyüklüklerde koyu mavi renkli birçok granül (ok) içeren bir makrofaj görülmektedir. (Prussian Blue, x1000)



Şekil 4. 17: Sitoplazmasında diffüz boyanma gözlenen bir makrofaj ve çevresindeki eritrositler görülmektedir. Makrofaj hücre zarının ve eritrosit hücre zarlarının birbirlerine yaklaştığı (kalın ok) ve makrofaj zarından eritrosite doğru uzanan pseudopodlar (ok) dikkati çekmektedir. (Prussian Blue, x1000)



Şekil 4. 18: Çevresinde bir çok PMNL bulunan boyanmış bir makrofaj (M1) ile sitoplazmasında PMNL içeren bir fagositik vakuol (ok) gözlenen boyanmış bir makrofaj (M2) görülmektedir. (Prussian Blue, x1000)

5. TARTIŞMA

Makrofajlar vücuttaki birçok önemli görevinin yanı sıra diyetle vücuda alınan demirin depo edilmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Çalışmamızın amacı doğrultusunda serviko-vajinal yaymalar PAP ve Prussian Blue metodlarına göre boyanmış ve bu örneklerdeki makrofajların demir ile ilişkisi incelenmiştir. Literatür taraması sonucunda bronkoalveolar lavaj örnekleri, vertebra ve beyin gibi dokular üzerinde yapılmış makrofaj-demir ilişkisine ilişkin birçok çalışma bulunduğu ancak jinekolojik yaymalar üzerinde böyle bir araştırmanın yapılmadığı görülmüştür [76][77][78]. Bu nedenle bizim çalışmamız jinekolojik yaymalarda makrofaj-demir ilişkisini ve bu ilişkinin yaymalarda gözlenen enfeksiyonlarla olan ilgisini ilk olarak inceleyen orijinal bir çalışma olmuştur.

Demir makrofajların sitoplazmasında temelde Fe^{+3} formunda “ferritin” proteinine bağlanarak depolanır ve bu protein sitoplazmada çözünebilir özellik gösterir. Demirin sitoplazmada çok fazla miktarda bulunduğu durumlarda ise ferritin proteinleri dejenere olarak sitoplazmada çözünemeyen ve daha çok demir depolama kapasitesine sahip olan “hemosiderin granülleri”ne dönüşür. [5][39][40]. Araştırmamızda; makrofaj sitoplazmasındaki demir varlığının gösterilebilmesi için çalışma kapsamındaki 95 yaymaya Prussian Blue boyama metodu uygulanmıştır. Bu yaymalardan 12’sindeki demir yüklü makrofaj sitoplazmalarında diffüz mavi renkte boyanma olduğu ışık mikroskopik olarak saptanmıştır. Bazı makrofajların sitoplazmasında ise bu diffüz boyanmanın yanı sıra çeşitli büyüklüklerdeki koyu mavi granüllere rastlanılmıştır. Makrofajlarda gözlenen diffüz mavi rengin bu hücrelerin sitoplazmalarında çözünebilir özellikteki demir bağlamış ferritin proteini kaynaklı olduğu, çeşitli büyüklüklerdeki koyu mavi renkli granüllerin ise çözünebilir nitelikte olmayan hemosiderin granülleri olduğu düşünülmüştür. Çalışma grubunda bulunan 12 yaymadaki boyanan makrofajlar sayıldığında; sitoplazmasında hemosiderin granülleri bulunan makrofajların, ferritine bağlı demir nedeniyle sadece diffüz boyanma gözlenen makrofajlara oranının 1:10 olduğu belirlenmiştir. Diffüz boyanmanın granüler boyanmaya göre daha fazla olmasının nedeninin; demirin sitoplazma içinde temelde ferritine bağlı olarak depolanmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Makrofajlar sitoplazmalarında depoladıkları demiri eritrositleri fagosite ederek, demir taşıyan “transferrin”, “laktoferrin” ve “hem” gibi proteinleri reseptör aracılı

endositoz yoluyla hücre içine alarak sağlarlar. Yaşam sürelerini tamamlayan ya da herhangi bir nedenle hücresel hasara uğramış olan eritrositler makrofajlar tarafından fagosite edilir ve parçalanırlar [79]. Bu fagositoz mekanizmasında eritrositlerin zarlarında meydana gelen fizyolojik değişiklikler rol oynar. Yaşlanan ya da hücre hasarına uğramış eritrositlerin zarında bulunan lipidlerin oksidasyona uğraması, sialik asit içeriğinin azalması ve otoantikör birikiminin artması sonucu fizyolojik değişikliklerin meydana geldiği bölgeler makrofaj zarındaki reseptörler için ligand görevi görür [80][81]. Ligad-reseptör ilişkisinin kurulmasıyla da eritrositlerin makrofajlar tarafından hücre içine alınma mekanizması başlamış olur.

Yapılan iki farklı elektron mikroskopik çalışmada da, eritrosit hücre zarı ile makrofaj hücre zarının bazı noktalarda birbiriyle birleştiği, bu birleşme noktalarında makrofajların hücre zarından eritrositlere doğru pseudopod'lar uzatarak eritrositleri tümüyle içine aldığı gösterilmiştir. Ayrıca dışarıda parçalanmış olan eritrositlere ait parçalarında makrofajlar tarafından pseudopod'lar tarafından içeri alındığı bu taramalı elektron mikroskopik çalışmalarda belirtilmiştir [82][83]. Çalışmamızda da makrofaj zarı ile çevresindeki eritrositlerin hücre zarlarının bazı alanlarda kaynaştığı gözlenmiştir (Şekil 4.1). Bunun yanı sıra, sitolojik incelemeler sonucunda makrofajlardan çevresindeki eritrositlere doğru uzamış pseudopodlar da dikkatimizi çekmiştir (Şekil 4.2, 4.3 ve 4.8). Şekil 4.3'de makrofajların arasında kalan yarım bir eritrosite doğru makrofajdan uzanan pseudopodlar görülmüştür. Bu makrofajın sitoplazmasında çekirdeğe bitişik olarak bulunan eozinofilik renkteki yapının ise makrofajlar arasındaki eritrositin diğer yarısına ait bir parça olduğu düşünülmüştür. Şekil 4.8'de de görüldüğü gibi makrofajın yuvarlağımsı-küt uzantılar oluşturduğu ve çevresindeki eritrositlerinde bu yapılarla uyum sağlayarak bazı alanlarda hücre zarının çukurlaştığı görülmüştür (Şekil 4.8). Ayrıca Prussian Blue metoduyla boyanmış, sitoplazmasında demir birikimi görülen bir makrofajın hücre zarından da eritrositlere doğru uzanan pseudopod'lar gözlenmiştir. (Şekil 4.17) Essner ve Montesano ve ark. tarafından yapılan elektron mikroskopik çalışmalarda gözlenen tüm eritrosit-makrofaj ilişkisine dair bulgular çalışmamızda ışık mikroskopik olarak da detaylı olarak gösterilmiştir ve bulgularımız bu yazarların bulgularıyla örtüşmüştür.

Fedorko ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada eritrosit fagositozundan belli bir süre sonra makrofaj sitoplazmasında demir depolama görevi olan ferritin

ve hemosiderin biyomoleküllerinin görülmeye başladığı bildirilmiştir [84]. Araştırmamızda da çalışma grubundaki 12 yaymanın hepsinde eritrositlerle makrofajlar bir arada görülmüştür. Çalışma grubumuz incelendiğinde; makrofajlarda boyanmanın pozitif olduğu 12 hastadan 7'sinin (%58,33) menstruasyon döngüsünün menstrual evresinde ya da bu evreden hemen sonraki foliküler fazda olduğu belirlenmiştir. Bir hastanın ise sürekli devam eden hafif kanaması olduğu bilinmektedir. Çalışmamız için yapılan istatistiksel analizlerde ise makrofajlarda boyanma gözlenmesi ve aynı yaymada eritrosit varlığı arasında anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Bütün bu bulgular servikovajinal yaymalardaki makrofajlarda ferritin ve hemosiderine bağlı olarak depo edilen demirin, öncelikle eritrosit fagositozuyla elde edildiği düşüncesini destekler niteliktedir.

Makrofajlar sitoplazmalarındaki demiri eritrositlerin fagositozu yanı sıra laktoferrin proteinini de hücre içine alarak sağlamaktadır. Laktoferrin mukozal epitel hücreler ve polimorfonükleer lökositler içindeki granüllerden salgılanan demir bağlayıcı bir glikoproteindir. Bu protein hücre dışına salınır salınmaz ortamdaki serbest demir iyonlarına bağlanırlar. Makrofajların hücre zarlarında bulunan reseptörler, demire bağlı olan laktoferrini tanıyarak bu proteinin hücre içine alınmasını sağlarlar. Fe^{+3} formundaki demir makrofaj sitoplazmasında bağlı olduğu laktoferrinden ayrılır ve ferritin proteinine bağlanarak depo edilir [36]. Yapılan çalışmalarda; laktoferrinin vajinal mukusta bulunduğu gösterilmiştir. Bu proteininin vajinal mukus içindeki seviyesine bakıldığında ise en yüksek seviyenin menstruasyondan hemen sonra, en düşük seviyenin ise menstruasyondan hemen önce görüldüğü saptanmıştır [85]. Çalışma grubumuz incelendiğinde ise 11 fertil hastadan 6'sının (%54,5) menstruasyondan hemen sonraki foliküler evrede olduğu saptanmıştır. Bu bulgular sonucunda da boyanan makrofajlardaki demirin vajinal mukustaki laktoferrin molekülünden de kaynaklı olabileceği düşünülmüştür.

Makrofajlarda demir birikiminin fertilité ve menopozy dönemi ile ilişkisine bakıldığında; çalışmamızda yapılan analizlerde fertil dönem ve makrofajlarda demir birikimi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Bu durumun nedeninin, menstruasyon ile birlikte makrofajların etkin bir biçimde eritrositleri fagosite edip yapısındaki demiri açığa çıkararak sitoplazmalarında depo etmesi olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca literatürde; demir

taşıyan bir protein olan laktoferrin'in vajinal mukustaki seviyesinin hormonal olarak kontrol edildiği ifade edilmektedir. Bu proteinin sentezinin östrojen ile uyarıldığı progesteron ile ise baskılandığı belirtilmiştir [86]. Çalışma grubumuzdaki 12 yaymanın 11'inde makrofajlarda pozitif boyanma görülmesinin nedeninin, bu hastaların fertil dönemde olması ve bu nedenle yüksek östrojen seviyesinin laktoferrin sentezini artmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Yapılan bir çalışmada ise; endometriyal adenokarsinoma olgularının yüksek östrojen seviyesi ile bağlantılı olduğu ve bu nedenle laktoferrin sentezinin de arttığı belirtilmiştir. [87] Çalışmamızda da, menopoz dönemindeki sadece 1 hastanın yaymasında demir yüklü makrofajların görülme sebebinin, bu hastada gözlenen endometriyal adenokarsinoma bağlı olarak yüksek östrojen seviyesi nedeniyle laktoferrin sentezinin de arttırmış olabileceği düşünülmüştür.

Araştırmamızda, kontrol grubundaki 83 yaymanın 4'ünde BV, 4'ünde ise *Candida* enfeksiyonu olduğu belirlenmiştir. Almeida ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada *Candida* hiflerinin konakçıya ait ferritin proteinini kendi metabolik faaliyetleri için demir kaynağı olarak kullandığı bildirilmiştir. [88] Knight ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise transferrine bağlı ya da serbest halde bulunan demirin de *Candida* tarafından kullanıldığı ifade edilmiştir [89]. Ayrıca BV enfeksiyonun gözlemlendiği vakalarda en sık rastlanan bakteri olan *Gardnerella vaginalis*'in de demiri kendi metabolik faaliyetleri için kullandığı bilinmektedir. Bu bakterinin salgıladığı "siderofor" proteinlerinin dış ortama verilerek ortamda bulunan ferritin, laktoferrin, transferrin, hem ve hemoglobin gibi proteinlere bağlı olan demiri bu proteinlerden ayırarak demiri serbest hale getirdiği bildirilmiştir. Hücre dışındaki serbest demirin ya da demirin siderofor proteini ile birleşerek oluşturduğu "demir- siderofor kompleksi"nin bu bakterilerin hücre yüzeyindeki reseptörler aracılığıyla hücre içine alındığı belirtilmiştir [90]. Hemalatha ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise BV enfeksiyonu olan ve normal hastalar karşılaştırıldığında, BV enfeksiyonu gözlenen hastalarda demir eksikliği görülme oranının normal vajinal flora sahip kadınlardan daha yüksek olduğu saptanmıştır [91]. Bu bilgiler doğrultusunda BV ve *Candida* enfeksiyonları gözlenen yaymalarda bulunan makrofajların sitoplazmalarında depolanmış demir görülmemesinin sebebinin enfeksiyon etkenlerinin konakçıya ait demiri kendi metabolizmaları için kullanmalarından kaynaklandığı düşünülmüştür.

PAP yöntemiyle boyanmış yaymalarda makrofajların eritrositler dışındaki hücre sel yapılarla olan ilişkisi de incelenmiştir. Makrofajların önemli görevlerinden biri de apoptotik hücrelerin fagosite edilerek dokudan uzaklaştırılmasıdır. Apoptotik hücrelerden salgılanan “fraktalkin” adı verilen bir kemokin, “lizofosfotidilkolin” adı verilen lipidler gibi bazı biyomoleküller makrofajların hücre zarındaki çeşitli reseptörler için ligand görevi yapmaktadırlar. Makrofajlardaki reseptörlerin bu molekülleri tanınmasıyla birlikte apoptotik hücrelere doğru yönelim başlar. Apoptotik hücrelerin zarındaki çeşitli fizyolojik değişiklikler ve biyomoleküller makrofajların bu hücreleri tanınmasını ve fagosite etmesini sağlar. Özellikle apoptotik hücre zarındaki fosfolipid yapısındaki fosfotidilserin biyomoleküllerinin miktarındaki aşırı artış, makrofajların apoptotik hücreleri tanınmasında rol oynar [92]. Brouckaert ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, makrofajlar tarafından sindirilmiş apoptotik cisimcikler elektron mikroskopik olarak gösterilmiştir. Bu cisimciklerin yoğun kromatinli kompakt bir çekirdek ve etrafında az bir sitoplazması olduğu belirtilmiştir. [93] Bunun yanı sıra yapılan diğer çalışmalarda yaşam sürelerini tamamlamış apoptotik ya da hücre sel hasara uğramış PMNL’lerin de makrofajlar tarafından fagosite edildiği gösterilmiştir. [94] [95] Araştırmamız kapsamındaki PAP yöntemi ile boyanmış ve ışık mikroskopik olarak incelenmiş olgularda da, Şekil 4.7’de görüldüğü gibi sitoplazmalarında piknotik çekirdekli ve dar sitoplazmalı birçok apoptotik cisimcik içeren makrofajlara rastlanmıştır. Bunun yanı sıra Şekil 4.5’de sitoplazmasında birçok fagositik vakuol içeren bir makrofajın çekirdeklerinde piknozis görülen ve sitoplazması daralmış bir PMNL’yi de fagosite ettiği görülmektedir. Şekil 4.6’da ise makrofaj zarından etrafındaki PMNL’leri fagosite etmek üzere uzanan kalın pseudopodlar dikkati çekmiştir. Çalışma grubundaki bir yaymada da boyanmanın pozitif olduğu bir makrofaj sitoplazmasında fagosite edilmiş bir PMNL gözlenmiştir. Bizim bu bulgularımız da makrofajlar ve apoptotik hücrelerle yapılan çalışmalar ile uyum göstermektedir.

Çalışmamızdaki kontrol grubunda bulunan bir hastaya ait servikovajinal yaymada da sitoplazmasını kaybetmiş çıplak bir çekirdeğin makrofajın hücre zarıyla olan ilişkisi dikkati çekmektedir. Makrofaj zarının çekirdeği sarmak üzere içeri doğru girinti oluşturduğu ve uç kısımlarında ise küçük çıkıntılar meydana geldiği görülmektedir. (Şekil 4.4) Yapılan elektron mikroskopik bir araştırmada eritroblastların olgunlaşmalarının son aşamasında çekirdeklerini

sitoplazmalarından dışarı verdiği ve dışarı verilen bu çekirdeklerin makrofajlar tarafından fagosite edilip ortamdaki uzaklaştırıldığı gösterilmiştir. [96] Çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak sitoplazmalarını kaybetmiş çıplak çekirdeklerin makrofajlar tarafından fagosite edildiği, bu şekilde de ortamdaki uzaklaştırıldığı belirlenmiştir.

Yapılan sitolojik incelemelerde; kontrol grubundaki iki yaymada atipi gösteren hücrelere de rastlanmıştır. Bu yaymalardan birinde koilositik atipi içeren geniş sitoplazmalı, çekirdek zarında düzensizlikler görülen aynı zamanda çekirdekte irileşme ve hiperkromazi gözlenen hücreler saptanmıştır (Şekil 4.12). Bu hücrelerin Human Papilloma Virus (HPV) etkisiyle olabileceği düşünülmüştür ve bu hastaya “Low grade skuamoz intraepitelyal lezyon (LSIL)” tanısı verilmiştir. Hücresel atipi görülen diğer yaymada ise glandular hücre çekirdeklerinde aşırı irileşme ve hiperkromazi, çok çekirdeklilik (multinükleasyon) ve aşırı irileşmiş çekirdekçikler dikkati çekmiştir (Şekil 4.13). Yaymada görülen bu hücresel değişikliklerin de adenokanser kökenli olduğu düşünülmüştür.

Sonuç olarak çalışmamız kapsamında Prussian Blue yöntemi ile boyanmış yaymalarda mavi renkte makrofajların sitoplazmalarında ferritine bağlı demir nedeniyle diffüz boyanma gözlenirken, bazı makrofajların sitoplazmasında ise çeşitli büyüklüklerdeki hemosiderin granülleri olduğunu düşündüğümüz granüller dikkati çekmiştir. Yapılan analizler sonucunda fertilité ile makrofaj sitoplazmasında boyanma pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Ayrıca, yapılan sitolojik ve sitokimyasal çalışmalarda eritrositler ile makrofajların yaymalarda bir arada görüldüğü ve bu iki hücrenin yakın ilişkide olduğu gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde ise; eritrositlerin yaymalarda bulunması ile makrofajlardaki pozitif boyanma gözlenmesi arasında anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). *Candida* ve BV enfeksiyonları gözlenen yaymalardaki makrofajların hiçbirinin sitoplazmasında ise boyanma görülmemiştir. Bu bulgular sonucunda serviko-vajinal yaymalardaki makrofajların sitoplazmalarında depo edilen demirin öncelikle eritrositlerin fagositozuyla elde edildiği, bunun yanı sıra laktoferrin proteininden de kaynaklı olabileceği ve yaymalarda gözlenen enfeksiyon etkenlerinin de demiri kendi metabolizmaları için kullanmış olabileceği düşünülmüştür.

6.KAYNAKLAR

- [1] S. L. Deshmane, S. Kremlev, S. Amini, and B. E. Sawaya, "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview.," *J. Interferon Cytokine Res.*, vol. 29, no. 6, pp. 313–26, **2009**.
- [2] D. Hashimoto, J. Miller, and M. Merad, "Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo.," *Immunity*, vol. 35, no. 3, pp. 323–35, **2011**.
- [3] M. A. Vega and A. L. Corbí, "Human macrophage activation: Too many functions and phenotypes for a single cell type," *Inmullugia*, vol. 25, no.4, pp. 248–272, **2006**.
- [4] T. Ganz and E. Nemeth, "Hepcidin and disorders of iron metabolism.," *Annu. Rev. Med.*, vol. 62, pp. 347–60, **2011**.
- [5] P. M. Harrison and P. Arasio, "The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation", *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1275, no. 3, pp. 161–203, **1996**.
- [6] B. A. Nichols, D. F. Bainton, and M. G. Farquhar, "Differentiation of monocytes. Origin, nature, and fate of their azurophil granules.," *J. Cell Biol.*, vol. 50, no. 2, pp. 498–515, **1971**.
- [7] M. Kamei and C. V Carman, "New observations on the trafficking and diapedesis of monocytes.," *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 17, no. 1, pp. 43–52, **2010**.
- [8] M. Takahashi, J. Masuyama, U. Ikeda, T. Kasahara, S. Kitagawa, Y Takahashi, K. Shimada and S. Kano, "Induction of monocyte chemoattractant protein-1 synthesis in human monocytes during transendthelial migration in vitro, *Circ Res.*, vol. 76, no. 5, pp. 750–757, **1995**.
- [9] S. Volpe, E. Cameroni, B. Moepps, S. Thelen, T. Apuzzo, and M. Thelen, "CCR2 acts as scavenger for CCL2 during monocyte chemotaxis.," *PLoS One*, vol. 7, no. 5, p. e37208, **2012**.
- [10] U. Maus, S. Henning, H. Wenschuh, K. Mayer, W. Seeger, and J. Lohmeyer, "Role of endothelial MCP-1 in monocyte adhesion to inflamed human endothelium under physiological flow.," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 283, no. 6, pp. H2584–91, **2002**.
- [11] W. A. Muller, "Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes.," *Circ. Res.*, vol. 105, no. 3, pp. 223–30, **2009**.
- [12] C. V Carman, "Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by 'invadosome-like protrusions", *J. Cell Sci.*, vol. 122, no. Pt 17, pp. 3025–35, **2009**.
- [13] A. J. Fleetwood, T. Lawrence, J. A. Hamilton, and A. D. Cook, "Granulocyte-Macrophage Clony Stimulating Factor (CSF) and macrophage Phenotypes Display Differences in Cytokine Profiles and Transcription Factor Activities: Implications for CSF Blockade in Inflammation," *The Journal of Immunology* vol.178, pp. 5245-52, **2007**.

- [14] M.A. Elhelu, "The Role of Macrophages in Immunology," *J Natl Med Assoc.* vol. 75, no. 3, pp. 314-317, **1983**.
- [15] Redel, G. P., *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*, 3.baskı, Springer, **2008**.
- [16] Lin S.S, Macrophage iron recycling, Doktora tezi, McGill University, Montreal, **2009**
- [17] S. Gordon and P. R. Taylor, "Monocyte and macrophage heterogeneity.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, no. 12, pp. 953–64, **2005**.
- [18] A. Minagar, P. Shapshak R. Fujimura, R. Ownby, M. Heyes and C. Eisdorfer, "The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurological disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis", *Journal of the Neurological Sciences*, vol.202, pp. 13-23, **2002**.
- [19] S. L. Teitelbaum, M. M. Tondravi and F. Patrick Ross, "Osteoclast, macrophage, and the molecular mechanisms of bone resorption," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 61, pp. 381–388, **1997**.
- [20] L. A. Salamonsen and L. J. Lathbury, "Endometrial leukocytes and menstruation.," *Human Reproduction. Update*, vol. 6, no. 1, pp. 16–27, **2000**.
- [21] E. S. Trombetta and I. Mellman, "Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 23, pp. 975–1028, **2005**.
- [22] A. Aderem and D. M. Underhill, "Mechanism of phagocytosis in macrophages", *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 17, pp. 593-623.
- [23] A P. West, A. A. Koblansky, and S. Ghosh, "Recognition and signaling by toll-like receptors.," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 22, pp. 409–37, **2006**.
- [24] F. L. van de Veerdonk, R. J. Marijnissen, B. J. Kullberg, H. J. P. M. Koenen, S.-C. Cheng, I. Joosten, W. B. van den Berg, D. L. Williams, J. W. M. van der Meer, L. A. B. Joosten, and M. G. Netea, "The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*.,," *Cell Host & Microbe*, vol. 5, no. 4, pp. 329–40, **2009**.
- [25] G. D. Brown, P. R. Taylor, D. M. Reid, J. A. Willment, D. L. Williams, L. Martinez-Pomares, S. Y. C. Wong, and S. Gordon, "Dectin-1 Is A Major - Glucan Receptor On Macrophages," *J. Exp. Med.*, vol. 196, no. 3, pp. 407–412, **2002**.
- [26] A. Devitt, S. Pierce, C. Oldreive, W. H. Shingler, and C. D. Gregory, "CD14-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages: the role of phosphatidylserine.," *Cell Death and Differentiation*, vol. 10, no. 3, pp. 371–82, 2003.
- [27] R. Coico and G. Sunshine, *Immunology a Short Course*, 6. baskı, Wiley-BlackWell, **2008**.
- [28] DeFranco A. L., Locksley R.M, Robertson M., *Immunity The Immune Response in Infectious and inflammatory Disease*, **2007**.
- [29] E. H. Morgan and P. S. Oates, "Mechanisms and Regulation of Intestinal Iron Absorption," *Blood Cells, Molecules and Disease*, vol. 29, no. 3, pp. 384–399, **2002**.

- [30] J. Emerit, C. Beaumont, and F. Trivin, "Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 55, no. 6, pp. 333–9, **2001**.
- [31] P.T. "Gomme and K.B. McCann, Transferrin: structure,function and potential therapeutic action", *DDT*, vol.10, no. 4, pp 267-73, **2005**.
- [32] F. Mateos, J. H. Brock, and J. L. Pérez-Arellano, "Iron metabolism in the lower respiratory tract.," *Thorax*, vol. 53, no. 7, pp. 594–600, Jul. **1998**.
- [33] D. R. Richardson and P. Ponka, "The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells.," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1331, no. 1, pp. 1–40, **1997**.
- [34] D. M. Sipe and R. F. Murphy, "Binding to cellular receptors results in increased iron release from transferrin at mildly acidic pH.," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, no. 13, pp. 8002–7, **1991**.
- [35] S. A. González-Chávez, S. Arévalo-Gallegos, and Q. Rascón-Cruz, "Lactoferrin: structure, function and applications.," *International Journal. Antimicrobial Agents*, vol. 33, no. 4, pp. 301.e1–8, **2009**.
- [36] L. Adlerova, A. Bartoskova, and M. Faldyna, "Lactoferrin : a review," vol. 53, no. 9, pp. 457–468, **2008**.
- [37] a M. Koorts and M. Viljoen, "Ferritin and ferritin isoforms I: Structure-function relationships, synthesis, degradation and secretion.," *Archives of Physiology and Biochemistry*, vol. 113, no. 1, pp. 30–54, **2007**.
- [38] P. M. Harrison, "The structure and function of ferritine," *Biochemical education*, vol. 14, no. 4, pp. 154–162, **1986**.
- [39] K. J. Hintze and E. C. Theil, "Cellular regulation and molecular interactions of the ferritins.," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 63, no. 5, pp. 591–600, 2006.
- [40] N. D. Chasteen and P. M. Harrison, "Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage.," *Journal of Structural Biology*, vol. 126, no. 3, pp. 182–94, **1999**.
- [41] S. F. Cook, "The Structure and Composition Of Hemosiderin," *The Journal of Biological Chemistry*, vol.82, pp. 595–609, **1929**.
- [42] G. W. Richter, "Electron Microscopy of Hemosiderin : Presence of Ferritin and Occurrence of Crystalline Lattices in Hemosiderin Deposits," *J. Biophysic and Biochem. Cytol.* vol. 4, no. 1, **1958**.
- [43] S. Recalcati, A. Alberghini, A. Campanella, U. Gianelli, E. De Camilli, D. Conte and G. Cairo, "Iron regulatory proteins 1 and 2 in human monocytes, macrophages and duodenum: expression and regulation in hereditary hemochromatosis and iron deficiency", vol.91, pp. 303-10, **2006**.
- [44] T. A Rouault, "The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease," *Nature Chemical Biology*, vol. 2, no. 8, pp. 406–14, **2006**.
- [45] S. Gruenheid, F. Canonne-Hergaux, S. Gauthier, D. J. Hackam, S. Grinstein, and P. Gros, "The iron transport protein NRAMP2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes.," *J. Exp. Med.*, vol. 189, no. 5, pp. 831–41, **1999**.

- [46] N. C. Andrews, "The iron transporter DMT1.," *The International Journal of Biochemistry&Cell Biology*, vol. 31, no. 10, pp. 991–4, **1999**.
- [47] N. Jabado, F. Canonne-Hergaux, S. Gruenheid, V. Picard, and P. Gros, "Iron transporter Nramp2/DMT-1 is associated with the membrane of phagosomes in macrophages and Sertoli cells.," *Blood*, vol. 100, no. 7, pp. 2617–22, **2002**.
- [48] M. Tabuchi, T. Yoshimori, K. Yamaguchi, T. Yoshida, and F. Kishi, "Human NRAMP2/DMT1, which mediates iron transport across endosomal membranes, is localized to late endosomes and lysosomes in HEp-2 cells.," *The Journal Biology Chemistry*, vol. 275, no. 29, pp. 22220–8, **2000**.
- [49] M. C. Bonaccorsi di Patti, N. Maio, and G. Musci, "8 . Iron metabolism : The role of ferroportin and its connection with ferroxidases," *Biochemical Aspects of Human Nutrition*, vol. 661, no. 2, pp. 127–141, **2010**.
- [50] I. De Domenico, D. M. Ward, G. Musci, and J. Kaplan, "Evidence for the multimeric structure of ferroportin.," *Blood*, vol. 109, no. 5, pp. 2205–9, Mar. **2007**.
- [51] C. Delaby, N. Pilard, A. S. Gonçalves, C. Beaumont, and F. Canonne-Hergaux, "Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin.," *Blood*, vol. 106, no. 12, pp. 3979–84, **2005**.
- [52] I. De Domenico, E. Nemeth, J. M. Nelson, J. D. Phillips, R. S. Ajioka, M. S. Kay, J. P. Kushner, T. Ganz, D. M. Ward, and J. Kaplan, "The hepcidin-binding site on ferroportin is evolutionarily conserved.," *Cell Metabolism*, vol. 8, no. 2, pp. 146–56, **2008**.
- [53] T. Ganz, "Molecular control of iron transport.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 18, no. 2, pp. 394–400, **2007**.
- [54] E. E. Johnson, A. Sandgren, B. J. Cherayil, M. Murray, and M. Wessling-Resnick, "Role of ferroportin in macrophage-mediated immunity.," *Infection and Immunity.*, vol. 78, no. 12, pp. 5099–106, **2010**.
- [55] T. Ganz and E. Nemeth, "Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals.," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1763, no. 7, pp. 690–9, **2006**.
- [56] D. Bratosin, J. Mazurier, J.P. Tissier, J. Estaquier, J.J. Huart, J.C. Ameisen, D. Aminoff and J. Montreuil, "Cellular and molecular mechanism of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophage", *Biochimic.*, vol. 80, pp. 173-195, **1998**.
- [57] W. Kong, X. Duan, Z. Shi, and Y. Chang, "Iron metabolism in the mononuclear phagocyte system," *Proress in Natural Science*, vol. 18, no. 10, pp. 1197–1202, **2008**.
- [58] M. Knutson and M. Wessling-Resnick, "Iron metabolism in the reticuloendothelial system," *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 38, no. 1, pp. 61–88, **2003**.
- [59] J. H. Graversen, M. Madsen, and S. K. Moestrup, "CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma.," *The*

International Journal of Biochemistry & Cell Biology, vol. 34, no. 4, pp. 309–14, **2002**.

- [60] D. J. Schaer, C. a Schaer, P. W. Buehler, R. a Boykins, G. Schoedon, A. I. Alayash, and A. Schaffner, "CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin.," *Blood*, vol. 107, no. 1, pp. 373–80, **2006**.
- [61] V. Hvidberg, M. B. Maniecki, C. Jacobsen, P. Højrup, H. J. Møller, and S. K. Moestrup, "Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes.," *Blood*, vol. 106, no. 7, pp. 2572–9, **2005**.
- [62] T. Hirata, P. B. Bitterman, J. F. Mornex, and R. G. Crystal, "Expression of the transferrin receptor gene during the process of mononuclear phagocyte maturation.," *The Journal of Immunology*, vol. 136, no. 4, pp. 1339–45, **1986**.
- [63] M. Tabuchi, T. Yoshimori, K. Yamaguchi, T. Yoshida, and F. Kishi, "Human NRAMP2/DMT1, which mediates iron transport across endosomal membranes, is localized to late endosomes and lysosomes in HEp-2 cells.," *The Journal of Biology Chemistry*, vol. 275, no. 29, pp. 22220–8, **2000**.
- [64] M. D. Knutson, M. Oukka, L. M. Koss, F. Aydemir, and M. Wessling-Resnick, "Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 102, no. 5, pp. 1324–8, **2005**.
- [65] T. D. Johnson-Wimbley and D. Y. Graham, "Diagnosis and management of iron deficiency anemia in the 21st century.," *Therapeutic Advances Gastroenterology*, vol. 4, no. 3, pp. 177–84, **2011**.
- [66] N. C. Andrews, "Disorders of iron metabolism," *The New England Journal of Medicine*, vol. 341, pp. 1986-95, **1999**.
- [67] S. F. Clark, "Iron deficiency anemia.," *Nutrition in Clinical Practice*, vol. 23, no. 2, pp. 128–41, **2008**.
- [68] D. Uçardağ, S. Güliter, Ö. Çeneli, F. Yakaryılmaz, P. Atasoy and O. Çağlayan "Celiac disease prevalence in patients with iron deficiency anemia of obscure origin," *Turk J. Gastroenterol.*, vol. 2009, no. 4, pp. 266–270, **2009**.
- [69] G. Weiss and L. T. Goodnough, "Anemia of chronic disease.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 352, no. 10, pp. 1011–23, **2005**.
- [70] S. Ludwiczek, E. Aigner, I. Theurl, and G. Weiss, "Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells.," *Blood*, vol. 101, no. 10, pp. 4148–54, **2003**.
- [71] F. M. Torti and S.V. Torti, "Regulation of ferritin genes and protein," *Blood*, vol. 99, no. 10, pp. 3505–3516, **2002**.
- [72] E. Beutler, T. Gelbart, P. Lee, R. Trevino, M. A. Fernandez and V. F. Fairbanks, "Molecular characterization of a case of atransferrinemia," *Blood*, vol.96, pp. 4071–4074, **2013**.
- [73] Y. Tüzün and M. Yakut, "Demir Metabolizması ve Herediter Hemokromatozis," *Güncel Gastroenteroloji*, vol.13, no.2, pp. 94–101, **2010**..

- [74] Y. Bayram and C. Türkay, "Hereditär Hemokromatosis Tanı Ve Tedavi," *Güncel Gastroenteroloji*, vol.14, no.2, pp. 3–7, **2010**.
- [75] L. Silvestri, A. Pagani, C. Fazi, G. Gerardi, S. Levi, P. Arosio, and C. Camaschella, "Defective targeting of hemojuvelin to plasma membrane is a common pathogenetic mechanism in juvenile hemochromatosis.," *Blood*, vol. 109, no. 10, pp. 4503–10, **2007**.
- [76] F. Maldonado, J. G. Parambil, E. S. Yi, P. a Decker, and J. H. Ryu, "Haemosiderin-laden macrophages in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse alveolar damage.," *Eur. Respir. J.*, vol. 33, no. 6, pp. 1361–6, **2009**.
- [77] G. Bierry, F. Jehl, N. Boehm , P. Robert , G Prévost , J.L. Dietemann , H. Desal and S. Kremer, "Macrophage Activity in Infected Areas of an Experimental Vertebral Osteomyelitis Model:USPIO- enhanced MR Imaging- Feasibility Study," *Radiology*, vol. 248, no. 1, **2008**.
- [78] I. Nolte, G. H. Vince, M. Maurer, C. Herbold, R. Goldbrunner, L. Solymosi, G. Stoll, and M. Bendszus, "Iron Particles Enhance Visualization of Experimental Gliomas with High- Resolution Sonography," *Am J Neuroradiol.*, vol.26, pp. 1469–1474, **2005**.
- [79] D. Gemsa, C. H. Woo, H. H. Fudenberg, and R. Schmid, "Erythrocyte Catabolism by Macrophages In Vitro The Effect of Hydrocortisone on erythrophagocytosis and on the induction of heme oxygenase," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 52, pp. 812–822, **1973**.
- [80] G. R. Sambrano, S. Parthasarathy, and D. Steinberg, "Recognition of oxidatively damaged erythrocytes by a macrophage receptor with specificity for oxidized low density lipoprotein.," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol. 91, no. 8, pp. 3265–9, **1994**.
- [81] J. A Singer, L. K. Jennings, C. W. Jackson, M. E. Dockter, M. Morrison, and W. S. Walker, "Erythrocyte homeostasis: antibody-mediated recognition of the senescent state by macrophages.," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol. 83, no. 15, pp. 5498–501, **1986**.
- [82] E. Essner, "An electron microscopic study of erythrophagocytosis," *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, vol. 7, no. 2, pp. 329–34, **1960**.
- [83] R. Montesano, A. Mossaz, P. Vassalli, and L. Orci, "Specialization of the macrophage plasma membrane at sites of interaction with opsonized erythrocytes.," *The Journal of Cell Biology*, vol. 96, pp. 1227–33, **1983**.
- [84] M. E. Fedorko, N. L. Cross, and J. G. Hirsch, "Appearance and distribution of ferritin in mouse peritoneal macrophages in vitro after uptake of heterologous erythrocytes.," *The Journal of Cell Biology*, vol. 57, no. 2, pp. 289–305, **1973**.
- [85] M.S. Cohen, B.E. Britigan, M. French and K. Bean, "Preliminary observation on lactoferrin secretion in human vaginal mucus: variation during the menstrual cycle, evidence of hormonal regulation, and implications for infection with *Neisseria gonorrhoeae*", *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol.157, no.5, pp. 1122-5, **1987**.

- [86] C. T. Teng, W. Gladwell, C. Beard, D. Walmer, C. S. Teng, and R. Brenner, "Lactoferrin gene expression is estrogen responsive in human and rhesus monkey endometrium.," *Molecular Human Reproduction*, vol. 8, no. 1, pp. 58–67, **2002**.
- [87] D. K. Walmer, C. J. Padin, M. A. Wrona, A. Mclachlan, D. Gray, D. K. Walmer, C. J. Padin, M. A. Wrona, B. E. Healy, R. C. Bentley, M. Tsao, F. Kohier, and N. Carolina, "Malignant Transformation of the Human Endometrium Is Associated with Overexpression of Lactoferrin Messenger RNA and Protein," *Cancer Research*, vol.55, pp. 1168–1175, **1995**.
- [88] R. S. Almeida, S. Brunke, A. Albrecht, S. Thewes, M. Laue, J. E. Edwards, S. G. Filler, and B. Hube, "The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin.," *PLoS Pathogens*, vol. 4, no. 11, pp. e1000217, **2008**.
- [89] S. A. B. Knight, G. Vilaire, E. Lesuisse and A. Dancis, "Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the Reductive Pathway", *Infect. Immun.*, vol. 73, no. 9, pp. 5482-92, **2005**.
- [90] G. P. Jarosik, C. B. Land, P. Duhon, R. Chandler, and T. Mercer, "Acquisition of iron by *Gardnerella vaginalis*.", *Infection and Immunology*, vol. 66, no. 10, pp. 5041–7, **1998**.
- [91] R. Hemalatha, B. A. Ramalaxmi, G. K. Swetha, M. Rao, S. Charyulu, and D. Kumar, "Nutritional status , bacterial vaginosis and cervical colonization in women living in an urban slum in India," *International Journal Of Nutrition and Metabolism*, vol. 4, no.5, pp. 77–82, **2012**.
- [92] A. Hochreiter-Hufford and K. S. Ravichandran, "Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion.," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 5, no. 1, pp. a008748, **2013**.
- [93] G. Brouckaert, M. Kalai, D. V Krysko, X. Saelens, D. Vercammen, M. Ndlovu, G. Haegeman, K. D. Herde, and P. Vandenabeele, "Phagocytosis of Necrotic Cells by Macrophages Is Phosphatidylserine Dependent and Does Not Induce Inflammatory Cytokine Production," *Molecular Biology of Cell*, vol. 15, pp. 1089–1100, **2004**.
- [94] J.S. Savill, A. H. Wyllie, J. E. Henson, M. J. Walport, P. M. Henson and C. Haslett, "Macrophage Phagocytosis of Aging Neutrophils in Inflammation," *J. Clin. Invest.*, vol.83, no.3. pp. 865–875, **1989**.
- [95] A. J. Meszaros, J. S. Reichner, and J. E. Albina, "Macrophage phagocytosis of wound neutrophils", *J. Leukoc. Biol.*, vol. 65, pp. 35–42, **1999**.
- [96] L. B. Qiu, H. Dickson, M. A. N. Hajibagheri, and P. R. Crocker, "Extruded erythroblast nuclei are bound and phagocytosed by a novel macrophage receptor.," *Blood*, vol. 85, no. 6, pp. 1630–9, **1995**.

7.ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Ayşegül YÜCEL POLAT

Doğum Yeri: Ankara

Medeni Hali: Evli

E- posta: aysegul-yucel@hotmail.com

Adresi: 3.Etap 17366 ada blok: 31 no: 31 Eryaman/Ankara

Eğitim

Lise: 2002-2006, Ankara Anadolu Lisesi

Lisans: 2006-2011, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: 2011-2014

Doktora: --

Yabancı Dil Düzeyi :

İngilizce – Upper Intermediate

İş Deneyimi:

Başkent Hastanesi Patoloji Laboratuvarı, 2013 Ocak-devam ediyor

Deneyim Alanları

Serviko-vajinal yaymaların ışık mikroskopik incelenmesi

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-