

92

**BENZEN ve HİDROKİNONUN
MEGAKARYOSİTOPOEZ ve TROMBOSİTOPOEZE
ETKİLERİ**

Yasemin (ERGÜN) AYDIN

**Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği Uyarınca
Fizyoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak Hazırlanmıştır.**

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ruhi UYAR

Şubat - 1989

Ö Z E T

Benzen ideal bir eritici olması nedeniyle sanayide çok fazla kullanılmaktadır. Yaklaşık yüzyıldır hemopoietik sistem üzerindeki toksik etkileri bilinen benzen ve metabolitlerinin, megakaryositopoez ve trombositler üzerine olan etkilerinin incelenmesi sınırlı kaldığından bu çalışma yapılmıştır. Belirli süreler içinde 50 ve 100 mg/kg hidrokinon ile 100 mg/kg benzen uyguladığımız farelerin trombosit değerlerinde % 50 megakaryosit değerlerinde % 70 e varan azalmalar görülmüştür. Eritrosit sayılarında çeşitli dalgalanmalara rağmen % 60 'a varan düşüşler saptanmıştır. Benzen ve metabolitlerinin, mitotik aktivitesi olan öncü hücreler üzerinde toksik etki gösterdikleri, bu etkilerinde metabolitlerin DNA ve RNA'ya kovalent olarak bağlanması sonucu oluştuğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Megakaryosit ve trombosit sayılarındaki bu azalmalar bize, benzen ve hidrokinonun mitotik aktiviteye sahip öncü megakaryositik hücrelerde DNA ve RNA sentezi inhibisyonuna yol açarak megakaryositopoezi yada gelişmiş megakaryositik hücrelere etki ederek trombositopoezi baskıladığını düşündürmektedir.

S U M M A R Y

Since it is an ideal solvent, benzene is widely used in industry. Eventhough the toxic effect of benzene on hemopoietic cells is known for over a hundred year, the studies investigating the similar effects on megakaryocytopoiesis or thrombocytopoiesis are very limited in number. Therefore, the effects of benzene (100 mg/kg body weight) and hydroquinone (50 or 100 mg/kg) injections were investigated on mice for nine days. There was seen a reduction of about 50 % and 70 % in the numbers of platelets and megakaryocytes, respectively. In aggrement with previous studies, there were fluctuations and decrease of about 60 % in the number of erythrocytes. It has been shown that benzene and its metabolites exert their cytotoxic effects by covalent binding to DNA and RNA of hemapoietic progenitor cells with a mitotic activity. The reduction in the numbers of megakaryocytes and platelets in this study suggest that benzene and hydroquinone may have the similar effects on megakaryocytopoiesis and/or thrombocytopoiesis by inhibiting the synthesis of DNA and RNA in the megakaryocyte progenitors and/or mature megakaryocytes.

T E Ş E K K Ü R

Bu araştırmanın gerçekleşmesi için gerekli maddelerin ve gereçlerin sağlanmasında, deneyler ve yazım sırasındaki değerli katkıları ile çalışmamda rehberlik edip, yakın ilgisini gördüğüm değerli hocam Yrd.Doç.Dr. Ruhi UYAR'a, çalışmalarım sırasında ilgisi, sabrı ve hoşgörüsü ile büyük destek sağlayan değerli hocam Doç.Dr. Neşe TUNÇEL'e ve sayın hocam Doç.Dr. Ziya KAYGISIZ'a içten teşekkürlerimi sunarım.

İstatistiksel değerlendirmelerin yapılmasında büyük yardımlarını gördüğüm Arş.Gör. Setenay DİNÇER'e ve büyük bir özenle şekillerimin çizimini gerçekleştiren Arş.Gör. Mustafa ŞENGÜL'e teşekkürler ederim.

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
SUMMARY.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
Benzenin Yapısı ve Özellikleri	3
Benzenin Metabolizması	4
Kronik Benzen Zehirlenmesi	7
Deneysel Çalışmalar.....	9
Megakaryositler	10
Trombositler	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
4. BULGULAR	17
5. TARTIŞMA	27
6. SONUÇ	31
KAYNAKLAR DİZİNİ	32
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. Benzenin metabolizması	6
2. 50 ve 100mg/kg hidrokinon uygulanan gruplar ile kontrol grubunun günlere göre trombosit değerleri dağılımı.....	18
3. Kontrol ve hidrokinon uygulanan deney gruplarında günlere göre megakaryosit değerleri dağılımı	20
4. 100 mg/kg benzen uygulanan deney ve kontrol grubunun günlere göre trombosit değerleri dağılımı.....	22
5. Kontrol ve 100 mg/kg benzen uygulanan grubun günlere göre megakaryosit dağılımı.....	24
6. 100 mg/kg hidrokinon uygulanan gruplarda günlere göre eritrosit değerleri dağılımı.....	26
7. 100 mg/kg benzen uygulanan gruplarda günlere göre eritrosit değerleri dağılımı.....	26

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1. 50 ve 100 mg/kg hidrokinon verilen deney grupları ile kontrol grubunun ortalama trombosit değerleri	17
2. 50 ve 100 mg/kg hidrokinon uygulanan deney grupları ile kontrol grubunun ortalama megakaryosit değerleri.....	19
3. 100 mg/kg benzen verilen deney grubu ve zeytin-yağı verilen kontrol grubunun ortalama trombosit değerleri.....	21
4. 100 mg/kg benzen verilen deney grubu ve kontrol grubu ortalama megakaryosit değerleri.....	23
5. 100 mg/kg hidrokinon ve benzen uygulanan gruplar ile kontrol grubu ortalama eritrosit degerleri..	25

KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ILO	International Labour Office
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
CFU-M	Colony Forming Unit-Megakaryocyte
SACHE	Small Acetylcholinesterase Positive
Meg-CSF	Megakaryocyte Colony Stimulating Factor
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
CFU-S	Colony Forming Unit-Spleen

1. G İ R İ Ő

Benzen, taşkömürü ve petrolden üretilen C_6H_6 bileŐiminde bir aromatik hidrokarbondur. İdeal bir çözücü olması nedeniyle sanayinin çeşitli kollarında kullanılmaktadır (ILO , 1968 ; Aksoy, 1980).

Benzen çok uçucu olduğundan bulunduğu ortamın havasına hemen yayılarak solunum yolu ile kana karışmaktadır. Alınan benzenin bir kısmı solunumla geri verilirken, geriye kalanı dokularda, özellikle kemik iliğinde depo edilir (Aksoy,1980 ; Smart and Zannoni, 1984 ; Cronkite, 1987).

Benzen organizmada, karaciğerde oksidasyonla fenol bileŐiklerine çevrilir. Bu bileŐikler glukuronik ve sülfirik asitlerle bağlanarak alkali tuzları Şeklinde idrarla atılırlar (ILO, 1968 ; Aksoy 1980).

Kronik olarak benzene maruz kalmaz çok çeşitli hematolojik hastalıkları yol açabilmektedir. Bu nedenle benzen hemotoksik bir ajandır ve kemik iliğinde hematopoietik sistemi etkileyerek aplastik anemiye yol açmaktadır. Aplastik anemi, lökopeni, anemi, trombositopeni ile karakterize olan ciddi bir hastalıktır (1,2,14,23,29,43). Bu etkisine DNA ve RNA sentezi inhibisyonu yaparak, stem hücrelerinin ve buna bağlı olarak diğer nc hücrelerin sayısını azaltarak yol açar (9,10,13,20,29,31,34,35,36,37).

Ayrıca benzenin bugün artık lösemiye neden olduğu bilinmektedir. Ülkemizde Aksoy ve arkadaşlarının yaptıkları bir epidemiyolojik çalışma ile benzenin lösemiye neden olduğunu ilk kez kanıtlamışlardır (3,4,5,13).

Günümüzde insan sağlığı üzerine olan bu etkilerinden dolayı benzenle çok fazla çalışma yapılmıştır. Özellikle benzene maruz kalan insanlarda ve deney hayvanlarında erit-

rosit ve granülosit seriler üzerine olan etkiler incelenmiştir. Biz ise çalışmamızda megakaryositler ve trombositler üzerine olan etkisini araştırdık.

Megakaryositler kemik iliğinde bulunan trombosit yapımından sorumlu hücrelerdir. Bu hücreler büyüklükleri ve çekirdek yapıları (ploidi) ile diğer kemik iliği hücrelerinden kolayca ayırdedilebilmektedirler.

Önemli kan hastalıklarının nedeni olabilen trombositlerin yapımından sorumlu olan megakaryositlere benzenin etkisinin fazla incelenmemiş olması bizim ilgimizi bu konuya çekti. Böylece çalışmamızda benzen ve benzen metaboliti olan hidrokinon'un megakaryositler ve trombositler üzerine etkilerini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

Benzenin yapısı ve özellikleri

Benzen veya diğer bir adıyla benzol renksiz, sudan hafif, kendisine özel keskin kokulu ve kolay parlayabilen bir aromatik hidrokarbondur. Bileşimi C_6H_6 olup moleküler ağırlığı 78.1 dir (Aksoy, 1980 ; ILO, 1968). Düşük kaynama noktası ve yüksek buharlaşma basıncı normal atmosferik basınçta hemen uçmasına neden olur. Önce taş kömürünün distilasyonundan sonrada petrolden kimyasal yolla elde edilmiştir. Alkol, kloroform, eter, aseton, glasiyel asetik asit, karbon disulfid ve karbon-tetraklorid gibi organik çözücülerde çok kolay çözülür. Özellikle kauçuk, lastik, reçine yağlı maddeler, ilaçlar, boyalar ve bazı plastikleri çok iyi eritir (Aksoy, 1980 ; Rithidech et al., 1987). Sayısız kimyasal maddenin başlangıç maddesi olması açısından da özellikle önem taşır (4,18,28). Benzenden elde olunan bu kimyasal maddelerin en önemlileri şunlardır:

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

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

Siklohekson: Tekstil ürünlerinde ve plastik üretiminde esas maddedir.

Maleik anhidrid: Doymamış bir dibazik asittir ve plastik maddeler ile besinlere eklenen maddelerin elde edilme-

sinde kullanılır. Maleik hidrazid de tarımda kullanılan kimyasal maddelerin yapımında rol oynar.

Nitrobenzen ve metadinitrobenzen: Bu maddenin önemi, anilin'in başlangıç elemanı olmasındandır. Anilin, lastik ve lastik ürünleri ile boya ve ilaç endüstrisinde kullanılır.

Alkil benzen(Dodesilbenzen): Bunların % 90'ı deterjanların üretimi için kullanılır. Bu maddeler uzun süre değişmeden kalabildiklerinden suların faunasının değişmesine neden olabilirler. Bu maddeler ayrıca insektisit (DTT), ilaç ve patlayıcı yapımında kullanılır.

Diğer çözücülerle karıştırılmış olarakta kullanılmaktadır. Hatta petrolden üretim biçimine göre bir çok ülkede benzinin içinde % 5'e kadar varan oranda benzen vardır. Ayrıca benzen çeşitli boyalara inceltici olarak karıştırılmakta, thinner ismi altında çeşitli işyerlerinde ve evlerde temizleyici olarak kullanılmaktadır (Aksoy, 1980 ; ILO, 1968). Kullanıldığı iş yerlerine örnek verecek olursak: Ayakkabı ve deri ürünleri yapım yerleri, ilaç sanayii, basımevleri, boyahaneler, kağıt endüstrisi, mobilyacı, otomobil ve benzeri onarım yerleri, boya, vernik sanayii, kuru temizleyiciler, yapay deri, yer muşambası, yapıştırıcı sanayii, hormon laboratuvarları, ayna sanayii v.s. gibi. Benzen büyük olasılıkla dünyada kullanımı en yaygın olan kimyasal maddedir (Aksoy, 1980 ; Grilli et al., 1987). Bunun sonucu olarak mesleki nedenlerle ve çevre kirliliği nedeni ile toplumun hemen her kesiminin benzenden etkilenmesi büyük ölçüde söz konusudur.

Benzenin metabolizması

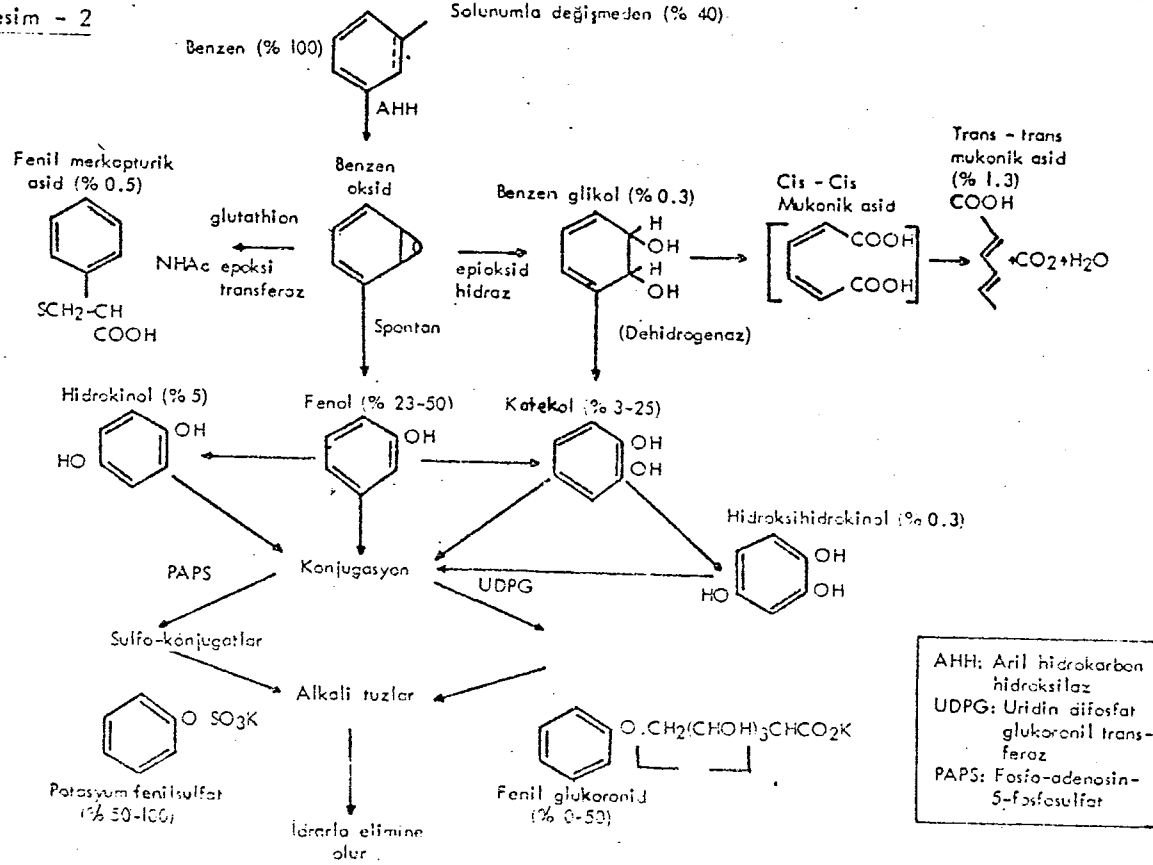
Çok uçucu olmasından dolayı benzenden etkilenme en çok solunum yolu ile gerçekleşmektedir. Bunun dışında bir miktar cild yolu ile emilebilmesi olanaklıdır. Fakat benzen zehirlenmeleri ve bunlara bağlı olarak ortaya çıkan aplastik anemi ve lösemi gibi vakalarda esas olarak benzenin solunum

yoluyla bedene girdiği bildirilmektedir (1-11,18,19,26,28, 29,36,37,45-48). Alınan benzenin yaklaşık % 40'ı tekrar değişmemiş olarak solunum yolu ile geri verilirken geriye kalan ortalama % 60'ı kana karışır ve lipoproteinlerle dokulara kadar iletilir (Aksoy, 1980 ; Cronkite, 1987). Benzen yağlarda eridiği için dokularda özellikle kemik iliğinde depo edilir (Aksoy, 1980 ; Smart and Zannoni, 1984). Benzen dokularda bulunan yağ miktarına göre depo edilir ve yağlı dokulardan atılımı gecikir. Bu nedenle kemik iliğinde kandan 20 kez çok benzen toplanır (Aksoy, 1980).

Benzen metabolizması üzerine ilk kez 1896 da başlayan ve süren çalışmalar, benzenin organizmada başlıca karaciğerde oksidasyonla metabolitlerine çevrildiğini göstermiştir (Aksoy, 1980 ; ILO, 1968). Oksidasyonun ilk adımında benzen Arilhidrokarbon hidroksilaz (AHH) enzimi ile benzen epoksid'e dönüştürülür. Benzen epoksid'in büyük bir kısmı kendiliğinden fenol'e dönüşürken küçük bir kısmı epoksid hidraz enzimi aracılığı ile benzen glikol'e çevrilir ve benzen glikol de dehidrogenazlar ile katekol'u oluşturur (4, 18,29). Oluşan fenol'un çoğu karaciğerde glukuronik asit ve sülfatlarla birleşerek fenil glukuronid ve fenil sülfat olarak bedenden atılır. Ayrıca fenol'un ufak bir bölümü daha ileri oksidasyonla hidrokinona çevrilir, buda konjuge olarak elimine olur (4,18,29,13,36). Katekol'de diğerleri gibi konjugasyona uğrayarak dışarı atılırken küçük bir kısmında oksidasyonla hidroksihidrokinol'e dönüşür (4,13,18). Yan biryol olarak benzen glikol'ün oksidasyonu ile az değerinde trans-trans mukonik asid oluşur. İkinci bir yan yolda benzen epoksid'in asetillenmiş sistein ile birleşip çökerek fenilmerkapturik asid meydana getirmesidir. Mukonik asid ve fenilmerkapturik asid minor metabolitler olup asıl önemli olan fenol bileşikleridir. Fakat sistein gibi büyüme için temel bir aminoasidin metabolize edilmesiyle dolaylı yoldan bir zehirlenmeye sebep olunur (Aksoy, 1980 ; ILO, 1968).

Yapılan çalışmalar, benzenin metabolitlerine dönüştürülmesi için mitokondrilerdeki mikrosomal sitokrom P-450

Resim - 2



şekil 1. Benzenin metabolizması (Aksoy, 1980 den alınmıştır).

enzim sisteminin gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Bu enzim sisteminin en fazla karaciğer ve kemik iliği hücrelerindeki mitokondrilerin iç zarında bulunduğu dolayısıyla benzenin metabolitlerine bu iki organda dönüşebileceği açıklanmıştır (Kalf et al., 1982). Ayrıca mitokondrilerinde sitokrom P-450 enzim sistemi bulunmayan kalp ve beyin dokusunda benzenin toksik etki göstermediği bildirilmiştir (Kalf et al., 1982).

Kronik benzen zehirlenmesi

19. ncu yüzyılın sonlarında, benzenin lastik ve kauçucu eriten bir çözücü olarak kullanılmaya başlanmasından bir süre sonra çeşitli iş kollarında aplastik anemi vakaları görülmüştür. 1888 de bisiklet lastiklerinin bulunması ve bu endüstride benzenli yapıştırıcıların kullanımı ile vakalar artmıştır. Aksoy'un bildirdiği üzere Santesson 1897 de 4 kadın işçide ölümle sonuçlanan aplastik anemi tanısı koymuş ve yayınlamıştır (Aksoy, 1980). 1910 da Amerika'da bir araştırmacı konserve sanayiinde çalışan üç kadın işçide aplastik anemi saptamış ve bunun sonucu olarak lökopeninin çok bariz olduğunu bildirmiştir (Aksoy, 1980). İngiltere'de benzene bağlı aplastik anemi vakalarının çok sık görülmesi üzerine 1918 de benzenin homoloğu olan ksilen kullanılmaya başlamış ve başarı elde edilmiştir. Fakat aynı yıllarda Amerika'da benzenin sanayide çok kullanılmaya başlamasıyla yarısı ölümle sonuçlanan aplastik anemi vakaları saptanmıştır. Bunun üzerine açılan kampanya ile işyerlerinde benzen yerine toluen ve petrol naftası kullanılması sağlanmıştır. Fakat 1953 de fotogravürün bulunması ve bu iş kolunda benzenin mürekkeplere % 10-15 oranında karıştırılarak kullanılması yeniden Avrupa ve Amerika'da benzen zehirlenmesi vakalarının artmasına sebep olmuştur (Aksoy, 1980).

Diğer yandan 19.ncu yüzyılın sonunda ilk kez benzene bağlı lösemi vakası bildirilmiştir (4,5,28). Bunu 1928 de bildirilen akut limfoblastik lösemi izlemiştir (Aksoy, 1980;

Aksoy, 1985a). Bundan sonra benzene bağlı sayısız lösemi vakası bildirilmiştir. Birçok araştırmacı benzeni lösemi nedeni olarak ileri sürmüş ve kabul etmiştir (Aksoy et al., 1974 ; Vigliani and Saita, 1964).

Benzenin lösemi yaptığına dair tek tek vakalar halinde birçok yayının olmasına rağmen, benzenin lösemi yaptığı 1974 de Aksoy tarafından İstanbul'da ayakkabıcılar arasında gerçekleştirilen bir epidomiyolojik çalışma ile ilk kez kanıtlanmıştır (3,4,5,13,28). Aksoy'un bulgularına göre benzene bağlı lösemiler ile diğer lösemiler arasında tip bakımından önemli ayrılıklar vardır. Benzene maruz kalanlarda akut lösemiler % 90'ın üzerinde iken diğer grupta % 5.7 dir. Ayrıca prelösemi ve akut eritrolösemi benzene bağlı lösemilerde oldukça yüksektir (3,5,10,48).

Çin'de Aksoy'un çalışmasına benzer şekilde 528729 işçi üzerinde yapılan epidomiyolojik çalışmada, benzenin neden olduğu aplastik aneminin genel populasyondan 6 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Yin et al., 1987a)

Bugün artık uluslararası bilim çevrelerince kanser yaptığı kabul edilen benzenin bütün dünyada işyerlerindeki üst sınırı 10 ppm dir. 1978 yılında U.S. Occupational Safety and Health Administration (OSHA) iş yerlerindeki benzen konsantrasyonunun 10 ppm den 1 ppm'e düşürülmesini kararlaştırmıştır. Fakat bu karar Amerikan Anayasa mahkemesi tarafından kabul edilmemiştir (Infante, 1987 ; Rinsky et al., 1987). 1 ppm'in risk oluşturduğunu göstermek amacıyla, Rinsky ve arkadaşları benzene maruz kaldıkları bilinen lastik işçileri üzerinde ölüm oranı hesaplamaları yapmışlardır. Ele alınan grup bugüne kadar risk hesaplamalarında kullanılan en büyük gruptur. Bu çalışmanın sonucu olarak:

1) Benzen ve lösemi arasında çok güçlü bir doz-cevap ilişkisi bulunmuştur.

2) Bu ilişki 40 yıllık çalışma boyunca 1 ppm'in altında da etkili olduğunu göstermektedir.

3) Üzerinde çalışılan popülasyonda multiple myeloma nedeniyle çok fazla ölümler olduğu görülmüştür (Rinsky et al., 1987). Yine 10 ppm benzene 40 yıl maruz kalma sonucu 100000 işçide ortalama 88 işçinin lösemi nedeni ile öleceği hesaplanmıştır (Infante, 1987).

Deneysel Çalışmalar

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarla kronik benzen zehirlenmelerine bağlı olarak birçok aplastik anemi, lösemi, trombositopeni lökopeni, limfositopeni gibi olgular (1,2,14,23, 29,43) bildirildikten sonra hayvansal deneylere ağırlık verilmiştir. Bu deneysel çalışmalarda benzenin kemik iliğindeki pluripotent stem hücrelerini çarpıcı bir şekilde azalttığı (Cronkite et al.,1982; Cronkite et al., 1984), olgunlaşmakta olan öncü kan hücreleri üzerinde açık bir toksik etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur (Gaido and Wierda,1984 Wierda and Irons 1982). Grilli' nin bildirdiği üzere kemirgenlerde benzenin karsinojen olabileceği ilk kez Maltoni ve Scarnato'nun 1979'daki çalışmaları ile gösterilmiştir (Grilli et al ., 1987). Uzun süre benzene maruz kalan kemirgenlerde özellikle hematolojik olmayan neoplazmalar görülmüştür ki bunlar genellikle ağızboşluğu karsinomu, karaciğer karsinomu, meme karsinomu, limfo-retiküler neoplazi şeklindedir (9,10,24,32,33).

Yaklaşık yüz yıldır hemopoietik sistem üzerinde toksik etkiye neden olduğu bilinen benzen toksisitesinin kendisindenmi yoksa metabolitlerinden mi ileri geldiği, metabolitlerinin oluşması için gerekli bazı enzimlerin özellikle kemik iliğinde bulunup bulunmadığı gibi sorular sık sık sorulmuştur. Bu nedenle özellikle benzen metabolitleri üzerinde çalışmalar yoğunlaşmış (9-14,17,19,20,23,24,27,29,37, 39,43) ve metabolitlerin benzenden çok daha toksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (20,27,29,31,33-37,43). Hatta, in vitro çalışmalarda benzenin yüksek konsantrasyonlarda bile DNA sentezi üzerinde hiçbir inhibitör etkide bulunmadığı sadece metabolitlerinin DNA ve protein sentezini inhibe

ettiği saptanmıştır (Pellack-Walker and Blumer, 1986). Bundan sonraki aşamada hangi metabolitlerin daha toksik olduğu ve hangi basamaklarda toksisiteye neden olduğu araştırılmıştır. Benzen metabolitlerinin, olgunlaşmış ve mitotik aktivite göstermeyen hücrelere etki etmeyip sadece mitotik aktivitesi olan genç hücreler üzerinde toksik etki gösterdikleri, bu etkilerinin metabolitlerin DNA ve RNA'ya kovalent olarak bağlanması sonucu olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (11,14,20,29,31-37-39,43). Hidrokinonun, moleküler oksijen ile oksitlenerek kinon radikallerini yani p-benzokinon'u oluşturabildiği bilinmektedir (Pellack-Walker and Blumer, 1986). Hidrokinon ve p-benzokinon'un kemik iliği hücrelerinde mRNA sentezini önemli ölçüde inhibe edip, katekol'un çok daha az etki göstermesi ve fenol'un hiçbir etkide bulunmaması (Post et al., 1984) dikkatleri bu iki metabolit üzerine toplamıştır.

Hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalarda benzenden oluşan metabolitlerin ve bunların oranlarının tüm memelilerde aynı olduğu görülmüştür. Henüz türlere özgü farklılıklar saptanamamıştır. Dolayısıyla diğer memelilerde oluşan benzen metabolitlerinin ve bunların etki mekanizmalarının insanlar içinde geçerli olduğu düşünülmektedir (Grilli et al., 1987).

Megakaryositler

Kemik iliğinde oluşan ve kan pulcuğu yapımından sorumlu olan megakaryositlerin en büyük özellikleri; sitogenez geçirmemeleri, kromozom kopyalarının fazla olması (poliploidi) ve boyutlarının çok büyük olmasıdır. Bunlar karmaşık bir dizi olaylar sonucunda multipotent stem hücrelerinden meydana gelmektedirler (Wintrobe, 1976).

Stem hücrelerinden sonra, megakaryositik hücreleri oluşturmak üzere yönlendirilmiş bir hücre topluluğunun olduğu varsayılmaktadır. Bunlar Colony Forming Unit-Megakaryocyte (CFU-M) diye adlandırılan, mitotik olarak

aktif, plojidileri 2N olarak kabul edilen hücrelerdir. Heterojen bir topluluk olan bu hücreler kimyasal ve morfolojik olarak tanınmamaktadırlar (Mazur, 1987 ; Uyar, 1988 b). CFU-M den sonra gelen ve small acetylcholinesterase positive (SACH⁺) hücreler diye adlandırılan diğer bir hücre topluluğunun sitokimyasal ve immünolojik özelliklerinden dolayı megakaryositik hücreler serisinden oldukları bilinmekte, fakat morfolojik olarak tanınmamaktadırlar. Kan pulcuğu sayısındaki artma veya azalmalara karşılık verebilen SACH⁺ hücreler, uyarıldıklarında morfolojik olarak tanınabilen megakaryositik hücrelere dönüşmektedirler (Mazur, 1987).

Morfolojik olarak tanınabilen megakaryositik hücreler dört grupta toplanmaktadırlar ve bunların hepsi kan pulcukları oluşturabilecek düzeyde gelişmişlerdir.

I. Megakaryoblast : 12-25 mikron büyüklüğünde ve çekirdekleri stoplazmaya oranla biraz büyük olan hücrelerdir. RNA sentezinin fazla olmasından dolayı koyu bazofilik yapıdadırlar. Ploidileri en az 5.2N olup mitotik aktiviteleri vardır, fakat sitogenez geçirmezler.

II. Promegakaryosit: Ortalama 15-30 mikron büyüklüğünde ve demarkasyon zar sistemi biraz daha gelişmiş olan hücrelerdir. Çekirdekleri "U" şeklinde ve sitoplazmaya oranı yaklaşık 1/1 kadardır. DNA sentezi durmuş deneye kadar az olup plojidileri 8-32 N dolayındadır.

III. Megakaryosit: Boyutları 40-160 mikrona kadar çikabilen bu hücrelerin çekirdeklerinin stoplazmaya olan oranı en az 1:2 kadar olup demarkasyon zar sistemi çok gelişmiştir. Nadirde olsa plojidileri 64 N kadar olabilir, fakat DNA ve RNA sentezi tamamen durmuş gibidir.

IV. Metamegakaryosit: Megakaryositlere oranla boyutları küçük ve çekirdekleri fazla parçalı olmayan hücrelerdir. Stoplazmaları daha da eosinofilik olan bu hücreler depo megakaryositleri olarak kabul edilirler (Gewirtz, 1986).

Stem hücrelerinden, tanınabilen megakaryositler ve kan pulcuklarına kadar olan süreç düzenli olarak kontrol edilmektedir. Bu süreci düzenleyen faktörlerden hepsi bilinmemekle birlikte bir kısmı açıklığa kavuşturulmuştur. Bu faktörlerden en az ikisinin humoral regülatör olduğu ileri sürülmektedir. Megakaryositopoez'in mitotik evresine yani progenitor (öncü) hücrelerine etki eden humoral regülatöre megakaryocyte colony stimulating factor (Meg-CSF) adı verilmiştir. Progenitor hücrelerin proliferatif aktivitelerinin, Meg-CSF'ye cevap olarak arttığı görülmüştür (Mazur, 1987 ; Uyar 88 a).

İkinci humoral faktör megakaryositopoez'in non-mitotik evresine yani morfolojik olarak tanınabilen hücreler üzerine etkilidir. Bu da trombopoetin denilen bir glikoproteindir. Trombopoetinın progenitor hücreleride etkilediğine dair bir takım veriler ileri sürülmekle birlikte asıl etkisinin tanınabilen hücreler üzerine olduğu sanılmaktadır. Morfolojik olarak tanınabilen hücreler artmış trombopoetin miktarına cevap olarak, kan pulcuğu yapımını arttırmaktadırlar. Kan pulcuğu yapımındaki artma trombopoetin yapımını inhibe, azalma ise stimüle edebilmektedir. Yani kan pulcuğu yapımı negatif feed back ile regüle edilmektedir (Mazur, 1987 ; Uyar, 1988 a).

Birtakım hücreyel regülatörlerden de söz edilmektedir. Bunlar doğal öldürücü hücreler, T-limfositleri, monosit-makrofajlar olabilirler. Bunların etkileri tam olarak bilinmemekle birlikte, dolaylı olarak diğer regülatör maddelerin aracılığı ile veya direkt olarak megakaryosit progenitorleri üzerine olabileceği ileri sürülmektedir (Mazur, 1987; Uyar, 1988 a).

Trombositler

Megakaryositlerin sitoplazmasının parçalanması sonucu oluşan trombositler 2-4 mikron boyutunda hücre parçacıklarındır. Ömürleri 8-10 gün olup bu süre sonunda başlıca da-

lak ve karaciğerde yıkıma uğrarlar. Periferlerinde aktin ve myozinden oluşmuş ve trombositlerin şekil değiştirmesini sağlayan bir mikrotübülüs halkası içerirler. Trombositlerde glikojen, lizozomlar, mitokondriler ve 2 tip granül bulunur. Bu granüllerden birincisi, ADP, ATP ve serotonin içeren yoğun granüller diğeri ise bazı pıhtılaşma faktörleri, birtakım proteinleri ve yaranın iyileşmesini sağlayan fibroblastları stimüle edebilen PDGF içeren granüllerdir (Ganong, 1985). Ekstrasellüler sıvı ile bağlantılı karmaşık bir kanal sistemine sahiptirler. İnsan kanındaki ortalama miktarları $300000 / \text{mm}^3$ olup, hemostasiste en önde gelen savunma elemanlarıdır. Damarda yaralanma ve zedelenmenin olduğu yerde birikerek bir tıkaç oluştururlar. Daha sonra kanallar yardımıyla granül içeriklerini boşaltarak bu tıkaçı sağlamlaştırırlar. Damar yırtıklarını kapamak yanında normal damar bütünlüğünü sürdürmekte de rol oynadıkları sınımlanmaktadır (Wintrobe, 1976). Bu nedenden, metabolitlerin megakaryositopoez ve/ya trombositopoeze etkisinin hangi basamakta ve ne şekilde olduğunu ortaya çıkarma amacını güden daha detaylı araştırmaların yapılması gerektiği kanısındayız.

3. G E R E Ç V E Y Ö N T E M

Deney hayvanları ve kimyasal maddeler

Herbir hayvan grubunda en az 3-4 fare olmak üzere, 14-16 haftalık erkek veya dişi Swiss albino fareler kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Merck firmasından sağlanmıştır.

Benzen ve hidrokinon uygulaması

Benzen zeytinyağında dilüe edildikten sonra 9 gün boyunca günlük dozlar şeklinde subkutan olarak farelere enjekte edildi. Benzen dozu günlük 100 mg/kg olacak şekilde ayarlandı ve kontrol grubuna sadece zeytinyağı verildi.

Hidrokinon fizyolojik serumda çözülerek, günlük 50 ve 100 mg/kg olmak üzere 2 ayrı doz şeklinde uygulandı. 50 mg/kg'lık doz ise 35 gün boyunca uygulandı. Kontrol gruplarına sadece fizyolojik serum verildi.

Kan alımı ve kemik iliği örneklerinin hazırlanması

Farelere son enjeksiyondan 24 saat sonra, önce heparin verildi ve eter koklatılarak uyumaları sağlandı, daha sonra kuyrukları kesilerek trombosit ve eritrosit sayımı için kan alındı. Trombositler % 1 lik Amonyum oksalat, eritrositler ise % 0,9 luk NaCl çözeltisi ile sulandırılarak bilinen klasik yöntemlerle thoma lamı kullanılarak mikroskopta sayıldı.

Servikal dislokasyon ile öldürülen hayvanın bir femuru iyice temizlenerek kemik ortaya çıkarıldı. Kemik iki ucundan kesilerek bir pens ile tutuldu ve bir enjektör yardımı ile kemiğin açık uçlarından birinden fizyolojik serum baskıyla fışkırtılıp kemik iliğinin tüp içine geçmesi sağlandı. Kemik içindeki iliğin tamamı çıkana kadar yıkama işlemine devam edildi. Daha sonra bu karışım enjektör ile bir-

kaç kez çekilip boşaltılarak kemik iliği hücrelerinin dereceli tüpte homojen olarak dağılması sağlandı. Kemik iliği içeren tüpler dengelendikten sonra 2000 RPM de 3 dakika santrifüje edildi ve süpernatant pastör pipeti ile alındı. Dereceli tüpde 0,7 ml fizyolojik serum ile hücreleri içeren bu karışım tekrar pastör pipeti ile homojen olarak dağıtıldı. Daha önceden temizlenmiş iki lam üzerine farenin bir femurundan çıkan bütün hücreler bir lam üzerinde iki yuvarlak olacak şekilde konuldu ve yayıldı. Bu lamlar etüvde 50°C de kurutulularak fikse edildi ve hazırlanan kemik iliği preparatları, özgül megakaryosit boyası ile boyandı.

Boyanın hazırlanması ve preparatların boyanması

Karnovsky ve Roots'un tiyokolin metodundan yararlanılarak, boya aşağıdaki maddeler sırası ile boya kabına konularak karıştırılarak hazırlandı.

- a. 60 mg asetiltiyokolin esteraz
- b. 45 ml fosfat tampon çözeltisi pH : 6

0,1 M	NaH ₂ PO ₄
0,1 M	Na ₂ HPO ₄
- c. 3 ml sodyum sitrat (0,1 M)
- d. 6 ml bakır sülfat (30 mM)
- e. 6 ml potasyum heksasiyanoferrat (III)(5mM)
- f. 6 ml distile su

Boyanın içine daha önceden hazırlanmış kemik iliğini taşıyan lamlar yerleştirilerek preparatların 4-5 saat boyada kalması sağlandı. Süre bitiminde boyadan çıkarılıp fosfat tampon çözeltisi ile yıkanan preparatlar, 10 dakika % 100 lük daha sonra 30 saniye % 50 lik metanole konularak ikinci kez fikse edildi. Alkolden çıkarılan preparatlar tekrar fosfat tamponu ile yıkandı ve hematoksinin boyası içinde 1 dk tutuldu. Boyanan preparatlar distile su ile yıkandı, üzerlerine 1 damla % 2'lik amonyak damlatılarak mavileşmeleri sağlandı. Kurutulularak üzerlerine lamel kapatıldı.

Hazırlanan preparatlardaki megakaryositler mikroskopla 40 X 10 büyütme ile sayıldı. Sayım yapılırken lam üzerindeki yuvarlağın bir kenarından başlanarak önce yukarıdan aşağıya doğru sayıldı. Sonra sayılan alan sağdan sola doğru kaydırıldı ve aşağıdan yukarıya doğru sayıma devam edildi. Böyle devam edilerek bütün yuvarlak alanların tamamı sayılmış oldu.

4. B U L G U L A R

Günde 50 ve 100 mg/kg hidrokinon uygulanan deney grupları ve fizyolojik serum verilen kontrol grubunun ortalama trombosit değerleri Çizelge 1 de gösterilmiştir.

Çizelge 1. 50 ve 100 mg/kg hidrokinon verilen deney grupları ile kontrol grubunun ortalama trombosit değerleri (mm^3).

Trombosit Sayısı			
Gün	Kontrol (S.F)	50 mg/kg Hidrokinon	100 mg/kg Hidrokinon
1	316666 ± 16579	331333 ± 18624	310000 ± 6164
2	-	323500 ± 31800	309000 ± 816
3	316666 ± 4921	306000 ± 68194	255333 ± 44499
4	-	251000 ± 59447	245666 ± 33359
5	-	241000 ± 15121	232000 ± 33339
6	319000 ± 4546		237666 ± 40036
7	-		230000 ± 56856
8	-		-
9	317333 ± 7039		250333 ± 16819
15	-		98000 ± 8286
30	-		163000 ± 12027
35	-		166333 ± 15195

Çizelge 2, 50 ve 100 mg/kg hidrokinon uygulanan deney grupları ile kontrol grubunun ortalama megakaryosit değerlerini göstermektedir. 50 ve 100 mg/kg hidrokinon uygulanan deney gruplarının ortalama megakaryosit değerleri en keskin 2. günde olmak üzere kontrol grubuna göre

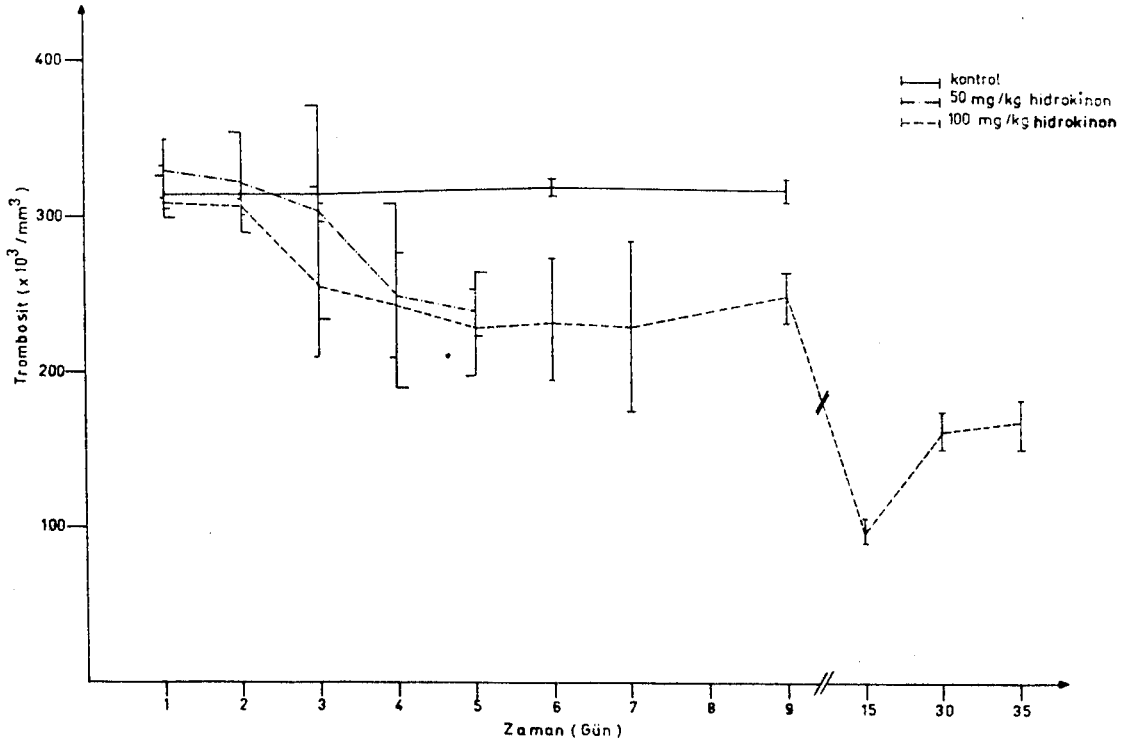
Çizelge 2. 50 ve 100 mg/kg hidrokinon uygulanan deney grupları ile kontrol grubunun ortalama megakaryosit değerleri (1 femur).

Megakaryosit Sayısı			
Gün	Kontrol (S.F)	50 mg/kg hidrokinon	100 mg/kg hidrokinon
1	6898 ± 136.55	6913 ± 80.96	6760 ± 109.55
2	-	4983 ± 842.9	5023 ± 1587.22
3	7109 ± 20.83	4864 ± 568.13	4059 ± 164.54
4	-	4701 ± 143.7	3576 ± 151.55
5	-	3607 ± 272.7	3059 ± 67.01
6	7035 ± 89.84		2471 ± 108.75
7	-		2482 ± 44.88
8	-		-
9	7005 ± 153.66		1999 ± 81.69

çok belirgin biçimde azalmıştır ($p < 0.001$). 50 mg/kg dozda bu azalma 1.güne kıyasla 5. günde % 50 ye ulaşırken, 100 mg/kg dozda yine 1. güne kıyasla 9. günde % 70 e varmıştır (Şekil 3).

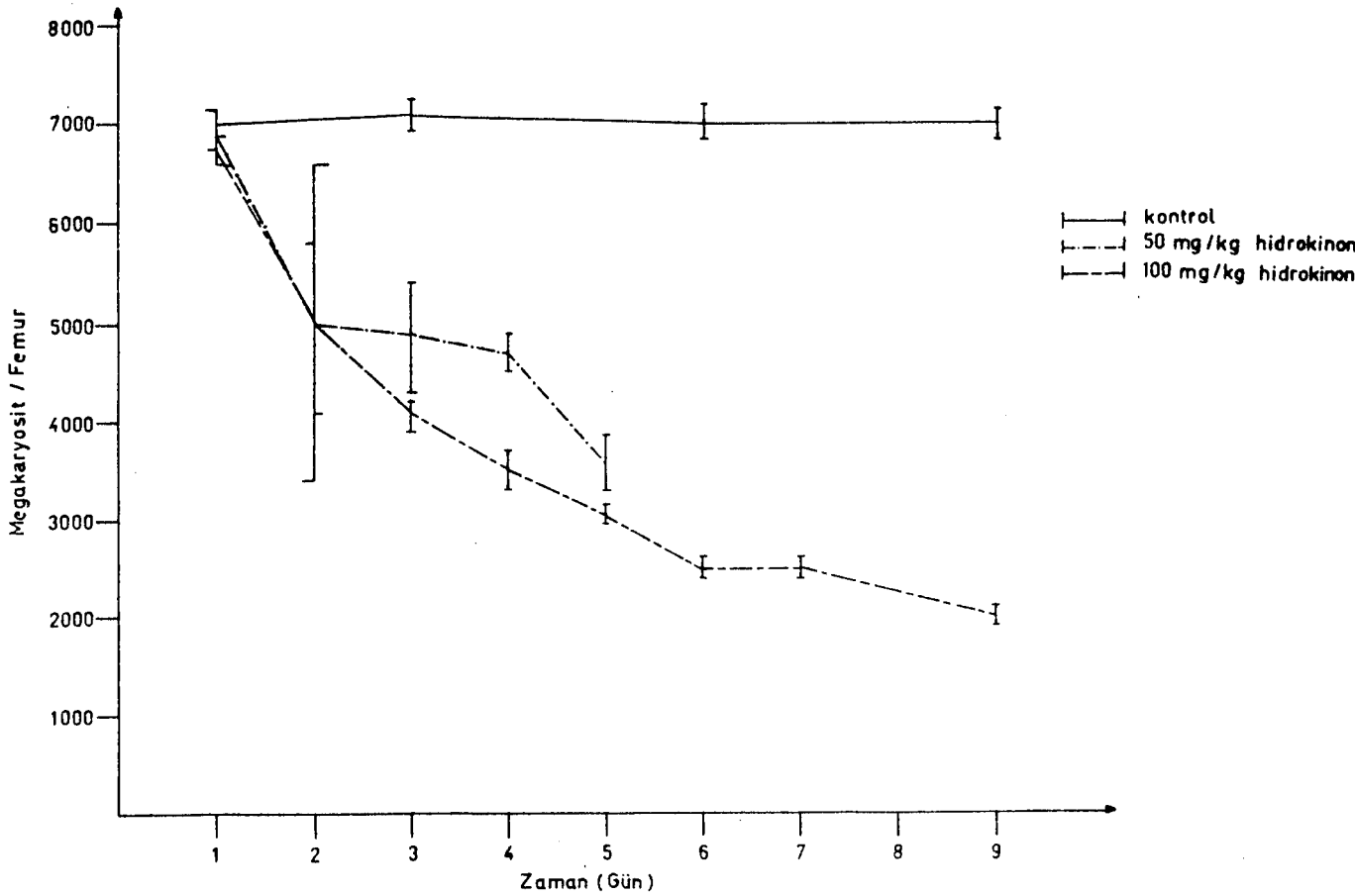
50 ve 100 mg/kg hidrokinon uygulanan deney gruplarının ortalama trombosit değerleri kendi aralarında karşı-

50 mg/kg hidrokinon uygulanan hayvanların ortalama trombosit değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ilk üç günde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$) fakat 4 ve 5. günlerde deney grubu değerlerinde çok belirgin bir azalma vardır ve bu azalma 1. güne kıyasla 5. günde % 27'ye ulaşmaktadır ($p < 0.001$). Çizelge 1 de görüldüğü gibi günde 100 mg/kg hidrokinon uygulanan grubun ortalama trombosit değerleri 1 ve 2. günlerde, kontrol değerlerinden farklı olmasına rağmen bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$). Üçüncü günden sonra deney grubunun değerlerinde, kontrol grubu değerlerine göre çarpıcı bir azalma görülmektedir ($p < 0.001$). Trombositler enjeksiyonun 35. gününde birinci güne kıyasla % 47 azalmışlardır. 50 ve 100 mg/kg hidrokinon dozlarında trombosit sayılarının kontrollere göre azalması Şekil 2 de görülmektedir.



Şekil 2. 50 ve 100 mg/kg hidrokinon uygulanan gruplar ile kontrol grubunun günlere göre trombosit değerleri dağılımı.

laştırıldığında 5. güne kadar anlamlı bir farklılık görülmemektedir ($p > 0.05$), megakaryosit değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında ise 100 mg/kg dozda 50 mg/kg kıyasla 3. günden sonra anlamlı bir azalma ($p < 0.001$) vardır.

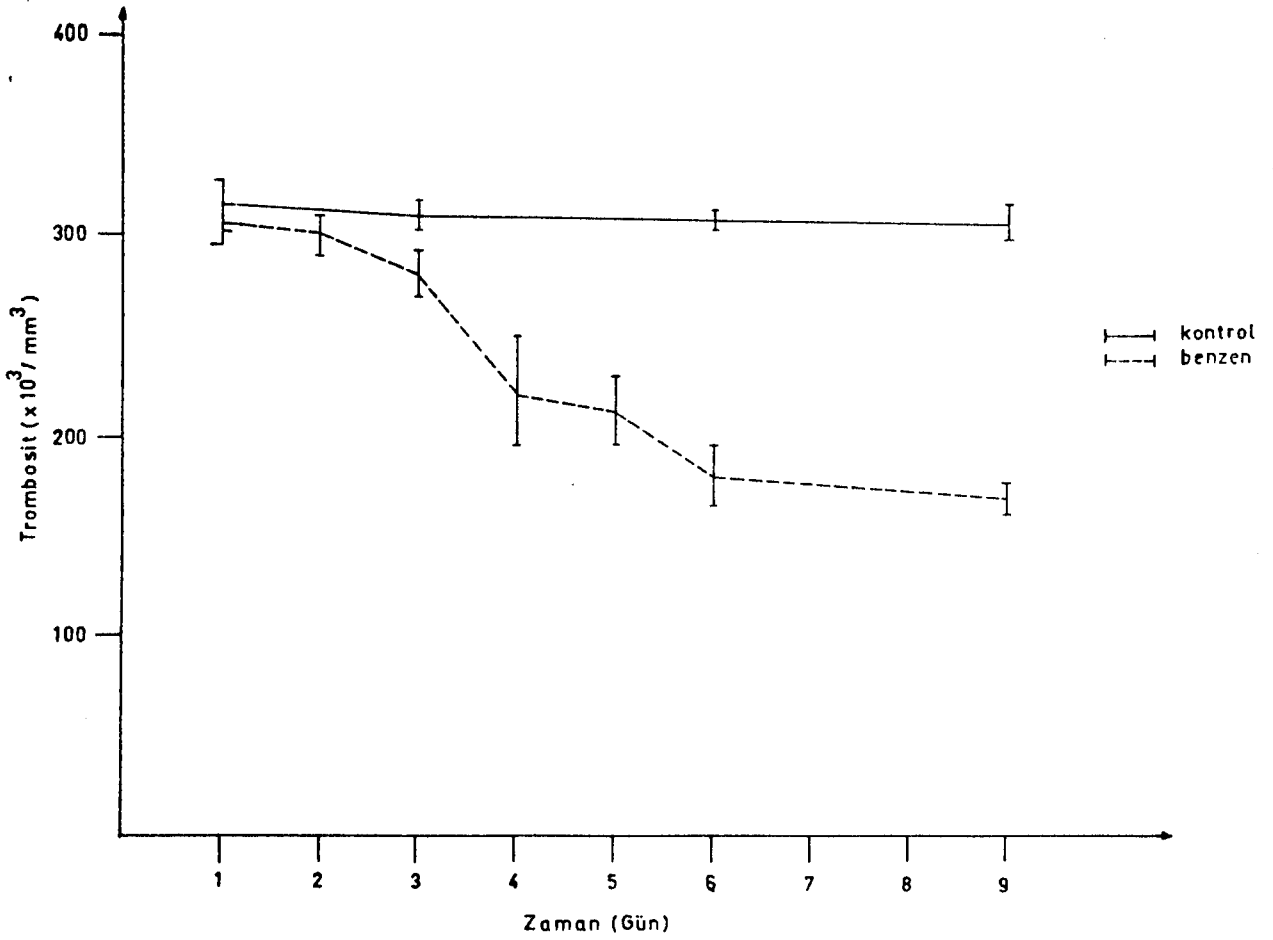


Şekil 3. Kontrol ve hidrokinon uygulanan deney gruplarında günlere göre megakaryosit değerleri dağılımı.

Çizelge 3. 100 mg/kg benzen verilen deney grubu ve zeytinyağı verilen kontrol grubu ortalama trombosit değerleri (mm^3).

Trombosit Sayısı				
Gün	100 mg/kg zeytinyağı		100 mg/kg benzen	
1	316333	\pm 11556	306666	\pm 10624
2	-		302000	\pm 9027
3	313000	\pm 4966	281500	\pm 11842
4	-		226500	\pm 24212
5	-		214000	\pm 17958
6	309000	\pm 4966	181000	\pm 13285
7	-		-	
8	-		-	
9	308000	\pm 7133	172666	\pm 7930

Çizelge 3 de görüldüğü gibi günde 100 mg/kg benzen uygulanan deney grubu ortalama trombosit değerleri ilk iki günde kontrol grubundan anlamlı bir farklılık göstermediği halde 3. günden sonra oldukça anlamlı bir azalma dikkati çekmektedir ($p < 0.001$). Trombosit değerleri 1. güne göre 9. günde % 44 azalmıştır (Şekil 4).



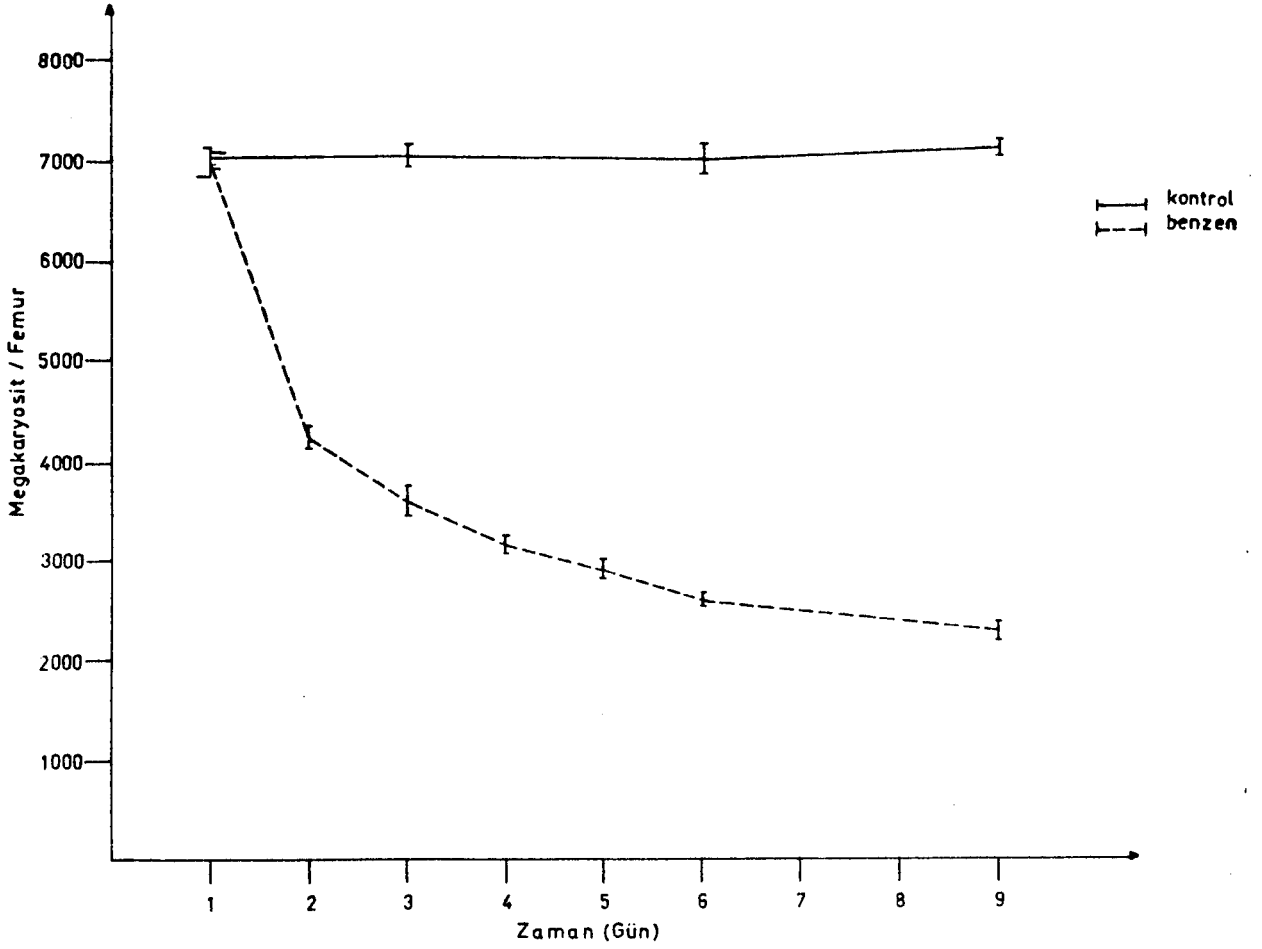
Şekil 4. 100 mg/kg benzen uygulanan deney ve kontrol grubunun günlere göre trombosit değerleri dağılımı.

Çizelge 4 de görüldüğü gibi 100 mg/kg benzen verilen deney grubu megakaryosit değerleri 1. günde kontrol değerlerinden anlamlı bir farklılık göstermez iken ($p > 0.05$) 2. günden sonraki değerlerde anlamlı bir azalma görülmektedir ($p < 0.001$). 1. güne kıyasla 9. günde bu azalma % 68 dir (Şekil 5).

Çizelge 4. 100 mg/kg benzen verilen deney grubu ve kontrol grubu ortalama megakaryosit değerleri (1 femur)

Megakaryosit Sayısı			
Gün	100 mg/kg Zeytinyağı		100 mg/kg Benzen
1	7079	± 93.65	6995 ± 141.75
2	-		4298 ± 70.63
3	7055	± 94.43	3608 ± 113.55
4	-		3151 ± 106.32
5	-		2901 ± 125.52
6	7028	± 103.38	2617 ± 24.6
7	-		-
8	-		-
9	7049	± 40.46	2254 ± 125.02

100 mg/kg benzen ile 100 mg/kg hidrokinon uygulanan deney gruplarının ortalama trombosit değerleri arasında 6. güne kadar anlamlı bir farklılık bulunamaz iken ($p > 0.05$) 9. günde benzen grubu değerlerinde çok belirgin bir azalma ($p < 0.001$) görülmektedir. Megakaryosit değerlerinde ise benzen uygulanan grupta, hidrokinon grubuna göre 3. günden başlayan bir azalma vardır ($p < 0.001$).



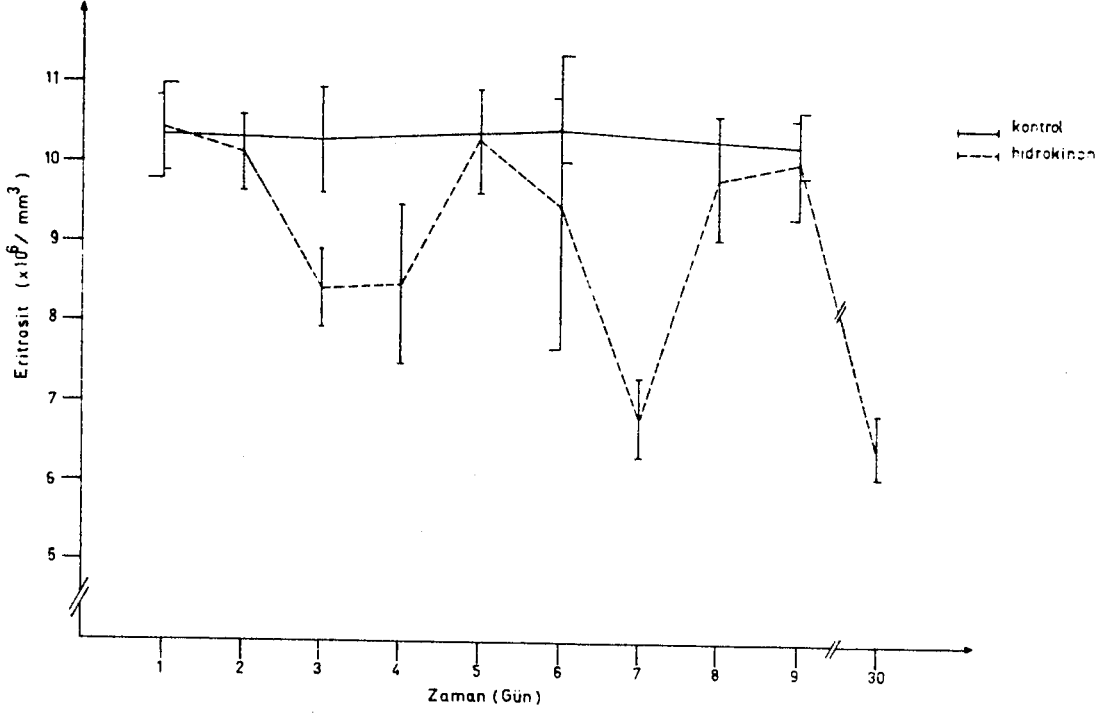
Şekil 5. 100 mg/kg benzen uygulanan grubun günlere göre megakaryosit dağılımı.

Çizelge 5 de 100 mg/kg hidrokinon ve benzen uygulanan deney gruplarının ortalama eritrosit değerleri yer almaktadır.

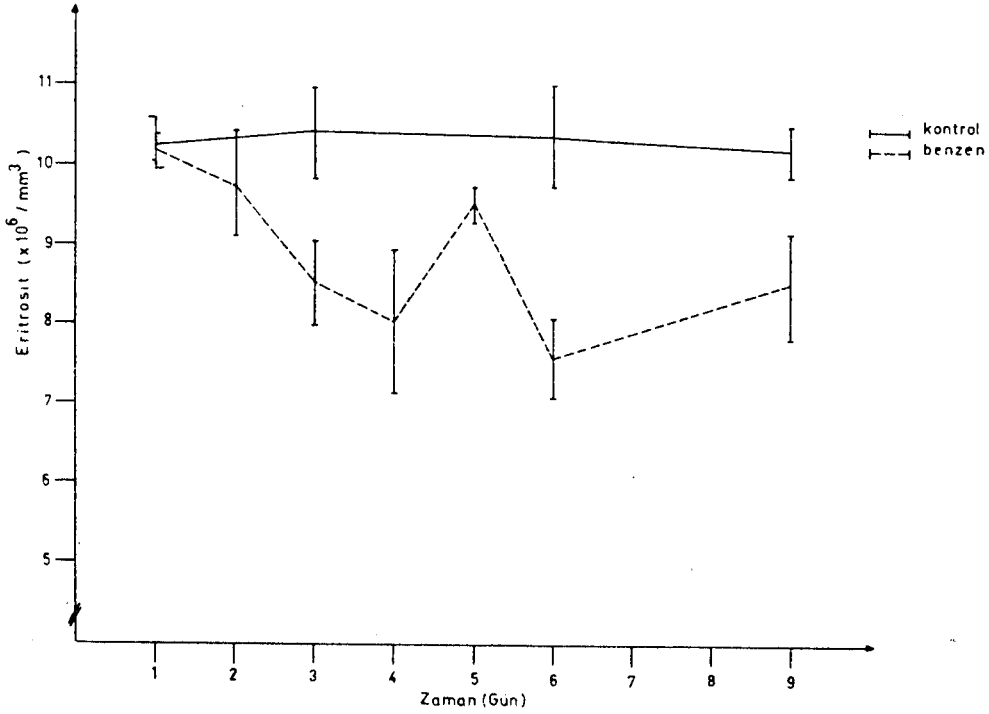
Çizelge 5. 100 mg/kg hidrokinon ve benzen uygulanan gruplar ile kontrol grubu ortalama eritrosit değerleri ($\times 10^4 /\text{mm}^3$).

ERİTROSİT SAYISI				
Gün	Kontrol(S.F)	100 mg/kg Hidrokinon	Kontrol(Z.yaşı)	100 mg/kg Benzen
1	1038 ± 460724	1043 ± 593969	1028 ± 329962	1022 ± 170953
2	-	1014 ± 495670	-	979 ± 680900
3	1030 ± 671763	849 ± 903671	1046 ± 579369	854 ± 515242
4	-	853 ± 997775	-	807 ± 897841
5	-	1033 ± 659966	-	953 ± 209925
6	1047 ± 376150	956 ± 1844511	1040 ± 649860	759 ± 508084
7	-	685 ± 495602	-	-
8	-	987 ± 774611	-	-
9	1026 ± 336386	1004 ± 655031	1024 ± 328509	854 ± 696971
30	-	652 - 383869	-	-

100 mg/kg hidrokinon uygulanan hayvanların ortalama eritrosit değerleri 1,2,5,6,8,9. günlerde kontrol grubu değerlerinden bir farklılık göstermez iken ($p > 0.05$) 3 ($p < 0.001$), 4 ($p < 0.05$), 7,30. ($p < 0.001$) günlerde istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma görülmektedir. Hidrokinon grubu eritrosit değerlerindeki yükselme ve azalma şeklindeki bu dalgalanma benzen grubunda da vardır. Benzen uygulanan grubun eritrosit değerleri 1,2 ve 5. günlerde kontrollerden anlamlı bir farklılık göstermezken, 3 ($p < 0.001$), 4 ($p < 0.05$), 6 ve 9. ($p < 0.001$) günlerde anlamlı bir azalma göstermektedir (Şekil 6) (Şekil 7).



Şekil 6. 100 mg/kg hidrokinon uygulanan gruplarda günlere göre eritrosit değerleri dağılımı.



Şekil 7. 100 mg/kg benzen uygulanan gruplarda günlere göre eritrosit değerleri dağılımı.

5. T A R T I Ő M A

Kronik olarak benzenden etkilenmenin birçok hematolojik hastalıklara yol açtığı yzyıldır bilinmektedir. Yıllardır yapılan epidemiyolojik ve deneysel çalışmalarla kronik benzen zehirlenmesinin aplastik anemi, lösemi, lökopeni, limfositopeni gibi hematolojik bozukluklara yolaçtığı ortaya konulmuştur. Cronkite ve arkadaşlarının (1982) farelerle yaptıkları bir çalışmada benzen uygulanmasının 11. gününde eritrosit sayısında kontrolun % 54'ne varan çok anlamlı düşmeler görülmüş, daha sonraki günlerde ise yükselme ve azalma şeklinde dalgalanmalar olmuştur. Aynı şekilde lökositlerde 4. günde çok düşük bir değere inerek sonraki günlerde çok büyük dalgalanmalar göstermiştir. Cronkite'in (1987) makalesinde bildirdiği üzere Snyder ve arkadaşlarının 100 ve 300 ppm benzen verdikleri farelerde anemi ve limfositopeni gelişmiştir. Latta ve Davies'in (1941) alışmalarında da benzen enjeksiyonunun ilk günlerinde lökosit sayılarında keskin düşmelere yol açtığı daha sonraki günlerde ise yükselme ve düşme şeklinde dalgalanmalar olduğu grlmştir. Eritrositler ise benzenin toksik etkilerine daha fazla direnç göstermişlerdir. Yüksek dozlarda çok yavaş bir ilerleme ile şiddetli bir hemolitik anemi gelişmiştir.

Bizim alışmamızda da eritrositler diğer araştırmacıların bulgularına benzer şekilde benzen ve hidrokinon dozlarında belirli günlerde azalmalar gösterirken bazı günlerde yükselerek dalgalanmalar yapmıştır. Eritrosit değerlerimiz diğer araştırmacıların çalışmalarıyla gösterdiği paralellik, çalışmamızın odak noktası olan trombosit ve megakaryosit değerlerinde doğru sonuçlar elde ettiğimiz konusunda bir kanıt olabilir. Eritrosit değerlerinde görülen bu dalgalanma tam olarak açıklanamamakla birlikte, eritrosit yapım ve yıkım oranlarındaki değişmeler ile farelerin hidrasyon derecelerindeki farklılığın neden olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca kemik iliğinin kısmi kompensasyon

yeteneğinin de bu dalgalanmaya yol açabileceği sanılmaktadır (Cronkite et al., 1982 ; Latta and Davies , 1941).

Elimizdeki literatürlerde benzen ve metabolitleri ile yapılan deneysel çalışmalarda trombosit değerlerine ilişkin kantitatif bir bilgiye rastlanılmamıştır. Sadece insanlar üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda diğer bütün kan hücreleri azalmasıyla birlikte trombositopeni de görüldüğü bildirilmektedir (1,2,14,23,29,43). Çalışmamızda hidrokinnon ve benzen uygulanan grupların trombosit değerleri ilerleyen günlere paralel olarak birinci gün değerlerine kıyasla % 50 ye varan azalmalar göstermiştir.

Literatürde benzen veya metabolitlerinin megakaryositler üzerindeki etkisinin kantitatif olarak araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yalnız bir histopatolojik çalışma 1941 yılında benzenin sıçan kemik iliği megakaryositlerine etkisinden söz etmiştir (Latta and Davies, 1941). 3cc benzen + zeytinyağı/kg verilen sıçanın 21. gündeki kemik iliğinden alınan kesitte, ".....and megakaryocytes were also markedly reduced" şeklindeki yarım bir cümle olarak saptanmıştır. Yine bu çalışmada 4cc benzen + zeytinyağı/kg verilen bir başka sıçandan 45 gün sonunda alınan kemik iliği kesitinde "Megakaryocytes were absent" şeklindeki tek bir kısa cümle ile söz edilmektedir. Söz konusu bu çalışmada megakaryositler ve kan pulcukları malesef kantitatif olarak verilmemiştir. Megakaryositlerin kemik iliğindeki dağılımları toplam çekirdekli hücrelerin yaklaşık % 0.01-0.3 ü kadardır. Normal dağılımları son derece az olan bu hücrelere kemik iliğinden alınan her kesitte rastlanması çok zordur. Hele benzen etkisi ile sayılarının azalacağı varsayılırsa kesitlerde megakaryositlere rastlamak daha da olanaksız gibi gelmektedir.

Yapılan çalışmalar hemopoietik hücrelerdeki fenotipik değişimlerin, nedeni ne olursa olsun hemapoezin devamını sağlayan pluripotent stem hücrelerindeki genotipik değişimler sonucu ortaya çıktığı görüşünü kuvvetlendirmektedir. Cronkite'in (1982) çalışmasında da benzen verilen hayvanların top-

lam kemik iliği hücreleri 5. günde kontrolün % 33 üne kadar düşmüş, yine tibia ve femur CFU-S miktarında 5. günde kontrolün % 23 ü değerinde bir düşme görülmüştür. Genellikle DNA sentezi yapan CFU-S lerde bir azalma olmuştur. Cronkite'ın 1985 ve 1986 yıllarında yaptığı çalışmalar 100 ppm benzenin stem hücrelerinin sayısını önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuştur. Wierda ve Irons (1982) farelere 3 gün boyunca 100 mg/kg hidrokinon uygulanması sonucunda kemik iliği hücrelerinin sayısını ve kemik iliğindeki B limfosit öncü hücrelerinin olgunlaşmasını engellediğini görmüşlerdir. Bu çalışmalar benzen metabolitlerinin stem hücresi harabiyetine neden olarak hücre yenilenmesinde azalmaya yol açtığını göstermektedir. Bizim çalışmamızda da hidrokinon ve benzen uygulanmış farelerin kemik iliklerindeki megakaryosit sayılarında kontrollere kıyasla % 50-70 arasında azalmalar görülmüştür. Bu bulgular diğer araştırmacıların gözledikleri kemik iliği toplam hücre sayısındaki azalmalarla paralellik göstermektedir. Megakaryosit değerlerindeki bu azalmaların, benzen ve hidrokinon'un mitotik aktiviteye sahip progenitor megakaryositler üzerine olan etkilerinden ileri geleceği düşünülmektedir.

Benzenin toksik etkilerinin biyoaktivasyonu sonucu ortaya çıkan metabolitlerinden ileri geldiği yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (20, 34, 35, 37) . Karaciğer ve kemik iliğindeki mikrosomal sitokrom P-450 enzim sistemi ile oluşan bu metabolitler DNA ve RNA'ya kovalent olarak bağlanmaktadır. DNA'nın adenin ve guanin bazlarına bu metabolitlerin bağlanması sonucunda adduct denilen yapılar oluştuğu deneysel olarak ilk kez 1987 yılında Snyder ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Bu bağlanma nedeniyle DNA ve RNA bunlara bağlı olarak da transkripsiyon ve protein sentezi baskılanmaktadır (Pellack-Walker and Blumer , 1986 ; Post et al ., 1984). Schwartz ve arkadaşları (1985) çalışmalarında hidrokinon ve p-benzokinon'un tavşan kemik iliği mitokondrileri ile inkübe edildiklerinde, mitokondrial DNA sentezini inhibe ettiklerini göstermişler-

dir. Aynı çalışmada kinon metabolitleri mitokondrial DNA polimeraz aktivitesini inhibe etmiştir. Bir başka araştırmada Kalf ve arkadaşları (1982) ratların mitokondrilerinde, benzen verilmesi sonucunda 3 RNA tipinin sentezinin baskılandığını görmüşler. Yine Post ve arkadaşları (1984) p-benzokinon ve hidrokinonun mikromolar konsantrasyonlarda kemik iliği hücrelerinin mRNA sentezini baskıladıklarını bildirmişlerdir.

Bu çalışmalar göstermektedir ki benzen metabolitleri doğrudan DNA ve RNA'lara etki ederek transkripsiyon ve translasyonu engellemektedir. Çalışmamız moleküler düzeyde olmamasına rağmen, metabolitlerin bu tür etkisinin megakaryositopoezde de benzeri şekilde olabileceği varsayılabilir. Metabolitler özellikle gelişmekte ve çoğalmakta olan progenitör megakaryositik hücreleri etkileyerek çoğalmalarını bunun yanında gelişmiş megakaryositik hücrelerden pulcuk yapımı olayını da engelliyor olabilirler.

6. S O N U Ç

Çalışmamızda hidrokinon ve benzen verilen farelerde eritrosit, trombosit ve megakaryosit değerleri incelenmiş ve şu sonuçlar elde edilmiştir.

1. 100 mg/kg dozunda hidrokinon ve benzen verilen hayvanların eritrositleri belirli günlerde anlamlı azalmalar ve bazı günlerde ise tekrar kontrol değerlerine doğru yükselme şeklinde dalgalanmalar göstermişlerdir. Hidrokinon verilmesinde 1. güne kıyasla 7 ve 30. günlerde azalma % 40'a, benzen verilmesinde ise 9. günde % 21'e ulaşmıştır.

2. 100 mg/kg benzen ve hidrokinon verilen farelerin trombosit ve megakaryosit değerleri birbirleri ile karşılaştırıldığında, trombosit değerlerinde 6.güne kadar bir farklılık bulunamazken, 9. günde 100 mg/kg benzen verilen hayvanların trombosit değerlerinde hidrokinon grubuna göre anlamlı bir azalma görülmüştür. Megakaryosit değerlerinde de benzer şekilde, 100 mg/kg benzen verilmesi durumunda, hidrokinon grubuna göre 3. günden itibaren daha fazla azalma vardır.

3. 100 mg/kg benzen verilen hayvanların trombosit ve megakaryosit değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma göstermiştir.

4. 50 ve 100 mg/kg hidrokinon verilen farelerin trombosit değerlerinde kontrollere kıyasla % 30-50 arasında, megakaryosit değerlerinde ise % 50-70'e varan azalmalar görülmüştür. Ayrıca hidrokinon'un iki dozu arasında yapılan karşılaştırmada trombosit değerlerinde anlamlı bir farklılık bulunamazken, megakaryosit değerlerinde 100 mg/kg'lık dozda 50 mg/kg doza göre 3.günden itibaren anlamlı derecede azalma görülmüştür.

K A Y N A K L A R D İ Z İ N İ

1. Aksoy, M., Erdem, S., Akgün, T., Okur, Ö. and Dinçol, K: Osmotic fragility in three patients with aplastic anemia due to chronic benzene poisoning. *Blut.*, 13(2): 85-90, 1966.
2. Aksoy, M., Dinçol, K., Erdem, Ş., Akgün, T. and Dinçol, G.: Details of blood changes in 32 patients with pancytopenia associated with long-term exposure to benzene. *Brit. J. Ind. Med.*, 29: 56-64, 1972.
3. Aksoy, M., Erdem, S., Erdoğan, G. and Dinçol, G.: Acute leukaemia in two generations following chronic exposure to benzene. *Human Heredity.*, 24: 70-74, 1974.
4. Aksoy, M.: Benzen (Benzol): Sağlığa etkileri ve önleme yolları. Tübitak Yay., No. 482, Ankara, 1980.
5. Aksoy, M.: Benzene maruz kalma ve çeşitli malignitelerin gelişmesindeki rolü. *Doğa*, 9(3): 249-256, 1985a.
6. Aksoy, M.: Benzene as a leukemogenic and carciogenic agent. *Am. J. Ind. Med.*, 8(1): 9-20, 1985b.
7. Aksoy, M.: Chronic lymphoid leukaemia and hairy cell leukaemia due to chronic exposure to benzene: report of three cases. *Brit. J. Haemat.*, 66: 209-211, 1987a.
8. Aksoy, M., Özeriş, S., Sabuncu, H., İnancı, Y. and Yanardağ, R.: Exposure to benzene in Turkey between 1983 and 1985 : a haematological study on 231 workers. *Brit. J. Ind. Med.*, 44: 785-787, 1987b.

K A Y N A K L A R D İ Z İ N İ (Devam ediyor)

9. Cronkite, E.P., Inoue, T., Carston, A.L., Miller, M.E., Bullis, J.E. and Drew, R.T.: Effects of benzene inhalation on murine pluripotent stem cells. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9:411-421, 1982.
10. Cronkite, E.P., Bullis, J.E., Inoue, T. and Drew, R.T.: Benzene inhalation produces leukemia in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 75:358-361, 1984.
11. Cronkite, E.P., Drew, R.T., Inoue, T. and Bullis, J.E.: Benzene hematotoxicity and leukemogenesis. *Am. J. Ind. Med.*, 7(5-6): 447-456, 1985.
12. Cronkite, E.P.: Benzene hematotoxicity and leukemogenesis. *Blood Cells*, 12(1): 129-137, 1986.
13. Cronkite, E.P.: Chemical leukemogenesis: Benzene as a model. *Semin. Hematol.*, 24(1): 2-11, 1987.
14. Gaido, K. and Wierda, D.: In vitro effects of benzene metabolites on mouse bone marrow stromal cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 76: 45-55, 1984.
15. Ganong, W.F.: Review of medical physiology. Lange Medical, California, pp.422-429, 1985.
16. Gewirtz, A.M.: Human megakaryocytopoiesis. *Semin. Hematol.*, 23: 27-42, 1986.
17. Grilli, S., Werner, K.L. and Parodi, S.: Possible implications from results of animal studies in human risk estimations for benzene: nonlinear dose-response relationship due to saturation of metabolism. *J. Cancer*

K A Y N A K L A R D İ Z İ N İ (devam ediyor)

- Res. Clin. Oncol., 113: 349-358, 1987.
18. ILO: Benzene; uses, toxic effects, substitutes. Geneva, 1968.
 19. Infante, P.F.: Benzene toxicity: Studying a subject to death. Am. J. Ind. Med., 11: 599-606, 1987.
 20. Kalf, G.F., Rushmore, T. and Snyder, R.: Benzene inhibits RNA synthesis in mitochondria from liver and bone marrow. Chem-Biol. Interactions, 42: 353-370, 1982.
 21. Karnovsky, M.J. and Roots, L.A.: A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterase. J. Histochem. Cytochem., 12: 219-221, 1964.
 22. Latta, J.S. and Davies, L.T.: Effects on the blood and hemopoietic organs of the albino rat of repeated administration of benzene. Arch. Pathol., 31: 55-67, 1941.
 23. Levine, E.G. and Bloom-Field, C.D.: Secondary myelodysplastic syndromes and leukemias. Clin. Hematol., 15(4): 1037-1080, 1986.
 24. Maltoni, C., Conti, B. and Cotti, G.: Benzene: a multipotential carcinogen. Results of long-term bioassays performed at the Bologna Institute of Oncology. Am. J. Ind. Med., 4(5): 589-630, 1983.
 25. Mazur, E.M.: Megakaryocytopoiesis and platelet production. A review. Exp. Hematol., 15: 340-350, 1987.

K A Y N A K L A R D İ Z İ N İ (devam ediyor)

26. Mehlman, M.A.: Benzene: Evaluation of control measures not competitive with basic research requirements. *Am. J. Ind. Med.*, 11(5): 604, 1987.
27. Nakajima, T., Okino, T. and Sato, A.: Kinetic studies on benzene metabolism in rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, 36(17): 2799-2804, 1987.
28. Özeriş, S., Aksoy, M., Sabuncu, H., İnanıcı, Y. and Yanardağ, R.: İstanbul'da ve Kocaeli'nde işyerlerinde kullanılan çeşitli materyalde benzen miktarının tayini ve çalışanlarda incelenmesi. *Doğa Tıp ve Ecz. D.*, 11(1): 50-57, 1987.
29. Pellack-Walker, P. and Blumer, J.L.: DNA damage in L5178YS cells following exposure to benzene metabolites. *Mol. Pharmacol.*, 30: 42-47, 1986.
30. Pendergrass, T.W: Epidemology of acute lymphoplastic leukemia. *Semin. Oncol.*, 12(2): 80-91, 1985.
31. Post, G.B., Snyder, R. and Kalf, G.F.: Inhibition of mRNA synthesis in rabbit bone marrow nuclei in vitro by quinone metabolites of benzene. *Chem-Biol. Interactions*, 50: 203-211, 1984.
32. Rinsky, R.A., Smith, A.B., Hornung, R., Filloon, T.G., Young, R.J., Okun, A.H., and Landrigan, P.J.: Benzene and leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 316(17): 1044-1050, 1987.
33. Rithidech, K., Au, W.W., Ramanujam, V.M.S., Whorton, E.B. and Legator, M.S.: Induction of chromosome aberrations

K A Y N A K L A R D İ Z İ N İ (devam ediyor)

- in lymphocytes of mice after subchronic exposure to benzene. *Mutation Res.*, 188: 135-140, 1987.
34. Rushmore, T., Snyder, R. and Kalf, G.: Covalent binding of benzene and its metabolites to DNA in rabbit bone marrow mitochondria in vitro. *Chem-Biol. Interactions*, 49: 133-154, 1984.
35. Schwartz, C.S., Snyder, R., and Kalf, G.F.: The inhibition of mitochondrial DNA replication in vitro by the metabolites of benzene, hydroquinone and p-benzoquinone. *Chem-Biol. Interactions*, 53: 327-350, 1985.
36. Smart, R.C. and Zannoni, V.G.: DT-diaphorase and peroxidase influence the covalent binding of the metabolites of phenol, the major metabolite of benzene. *Mol. Pharmacol.*, 26: 105-111, 1986.
37. Snyder, R., Jowa, L., Witz, G., Kalf, G. and Rushmore, T.: Formation of reactive metabolites from benzene. *Arch. Toxicol.*, 60: 61-64, 1987.
38. Steinberg, B.: Bone marrow regeneration in experimental benzene intoxications. *J. Hematol.*, 4(5): 550-556, 1949.
39. Tunek, A., Högstedt, B. and Olofsson, T.: Mechanism of benzene toxicity. *Chem-Biol. Interactions*, 39: 129-138, 1982.
40. Uyar, R.: Regulation of megakaryocytopoiesis. *Doğa Tıp ve Ecz. D.*, 12(1): 63-76, 1988a.
41. Uyar, R: Megakaryocyte ontogeny. *Doğa Tıp ve Ecz. D.*, 12(1): 77-90, 1988b.

K A Y N A K L A R D İ Z İ N İ (devam ediyor)

42. Vigliani, E.C. and Saita, G.: Benzene and leukemia. N. Engl. J. Med., 271(17): 872-876, 1964.
43. Wierda, D. and Irons, R.D.: Hydroquinone and catechol reduce the frequency of progenitor B lymphocytes in mouse spleen and bone marrow. Immunopharmacology, 4: 41-54, 1982.
44. Wintrobe, M.M.: Clinical hematology. Lea and Febiger, Philadelphia, pp.372-380, 1976.
45. Wong, O.: An industry wide mortality study of chemical workers occupationally exposed to benzene. I. General results. Brit. J. Ind. Med., 44: 365-381, 1987a.
46. Wong, O.: An industry wide mortality study of chemical workers occupationally exposed to benzene. II. Dose-response analysis. Brit. J. Ind. Med., 44: 382-395, 1987b.
47. Yin, S-N., Bi, Q., Liu, Y., Tian, F., Du, C. and Jin, C.: Occupational exposure to benzene in China. Brit. J. Ind. Med., 44: 192-195, 1987a.
48. Yin, S-N., Li, G.L., Tain, F.D., Fu, Z.I., Jin, C., Chen, Y.J., Luo, S.J., Ye, P.Z., Zhang, J.Z. and Wang, G.C.: Leukaemia in benzene workers: a retrospective cohort study. Brit. J. Ind. Med., 44: 124-128, 1987b.