

Tavuk Perifer Kan Monocyt'lerinin Yapısal, Histokimyasal ve Farklılaşma Özellikleri Üzerinde Araştırmalar

Aytekin ÖZER*

ÖZET

Tavuk perifer kan monocyt'leri, pseudopod içeren euchromatik ve özel biçimli çekirdeğe sahip olan hücrelerdir. Sitoplazmalarında granüllü endoplazma retikülumu ve mitokondrion'lar çok sayıda buna karşılık azurofil granüller ise az sayıda bulunur. Bu granüller asit fosfataz pozitif reaksiyon verir.

Stapylococ enfeksiyonuyla hastalanmış tavuğun perifer kanında monocyt'lerden başka bol lysosomal granüllere, mitokondrionlara ve iyi gelişmiş Golgi complex'ine sahip, doku macrophage'larına benzeyen hücreler de bulunur. E. coli ile yapılan deneysel fagositoz çalışmalarında da, tavukların perifer kanında bakterileri fagosite eden heterophyl granulositler yanında, normal monocytler ile, bunlardan diferensiyel olan ve sitoplazmalarında eksositoz vakuolleri ile lysosomal granüller içeren macrophage'lara rastlanır.

SUMMARY

Investigations on the Ultrastructural, Histochemical and Differentiation Properties of Chicken Peripheral Blood Monocytes

In the peripheral blood of normal chicken, monocytes display pseudopods and euchromatic, special shaped nuclei. Their cytoplasm contain granular endoplasmic reticulum and mitochondria abundantly but, azurophyl granules in little amount. Acid phosphatase activity are observed in azurophyl granules. In the peripheral blood of the chickens infected with staphylococci, some cells with abundant spherical, membrane-bounded cytoplasmic granules, mitochondria and well developed Golgi complex are observed. These cells are similar to the tissue macrophages. In order to determine the phagocytic activity of these cells chickens were experimentally infected with E.coli. Phagocytic activity was seen clearly in heterophyl granulocyt only. In macrophages found in the peripheral blood there were some exocytic vacuols containing membranacous residues.

* Doç.Dr.; U.Ü. Vet. Fak. Histoloji-Embriyoloji Bilim Dalı, Bursa/TURKEY.

GİRİŞ

Memeli hayvanların ve kanatlıların perifer kan hücreleri ile çalışan araştırmacılar, çok eski tarihlerden beri yapıya ilişkin bilgi birikimine katkıda bulunmuşlardır.

Araştırmaların boyutları, mikroskobun evrimi ile genişlik kazanmış, histokimyasal çalışmalara girilmek suretiyle de, kan hücrelerinin yapısal özellikleri fonksiyonel özellikleri ile bütünlük kazanmaya başlamıştır.

1950'li yıllarda Elektron Mikroskobunun bilim alanına girmesiyle, kan hücrelerinin ince yapısında bulunan, ışık mikroskobik düzeydeki araştırmalarla yorum yapılamayan, histokimyasal çalışmalarla da desteklenemeyen bazı özellikler aydınlanmaya başlamış, fonksiyonel özelliklerle korrelasyonlar yapabilmek mümkün olmuştur.

Memeli ve Kanatlı hayvanların perifer kanında bulunan Monocyt'lerin ışık ve elektron mikroskobik düzeylerdeki yapısal özellikleri klasik kitaplarda kesinlik kazanmıştır^{3.4.6.7.10.11.12.19.20}. Bu hücrelerin cytoplasmalarında histokimyasal yollarla hidrolitik enzimlerden peroxidase'in varlığı ortaya konularak^{3.4.6.10.11.12.14.19.20.21}, kendilerine ışık mikroskopik düzeyde benzeyen ve teşhiste karıştırılabilen büyük tip Lenfocyt'lerden farklılığı belirtilmiştir.

Monocyt'lerin yapısal özellikleri üzerindeki çalışmalar, onların fonksiyonlarının aydınlatılmasına büyük ölçüde yardımcı olmuş, bu hücrelerin damar dışına çıkabilme gücüne sahip oldukları (diapedesis) ve perifer kan dışında gevşek bağ dokuda ve vücut içi boşluklarda biriken exudatlarda da yaşayabildikleri ortaya konmuştur^{3.6.17.20.21}.

Perifer kan hücrelerinden monocyt'lerin yapısal özellikleri ve fonksiyonlarına ilişkin bilgiler, bu hücrelerin damar içinde iken inaktif oldukları, damar dışına çıkıp da organizmada bir yangı ile karşılaştıklarında ise aktifleşerek macrophage'lara dönüştükleri üzerinde yoğunlaşmaktadır^{3.4.6.7.9.11.12.19.20.21.22}.

Çalışmamızın amacı, yukarıdaki görüşlerin kanatlılar için de geçerli olup olmadığını incelemek; ayrıca, kanatlılarda bakteriyel bir enfeksiyon söz konusu olduğunda, kanda bulunan monocyt'lerin damar dışına çıkmadan macrophage'lara diferensiyeye olup olmayacaklarını saptamaktır.

MATERYAL ve METOD

Çalışmamızda Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı Çifteler harası orijinli beyaz "Babcock" tavuklar kullanıldı.

Monocyt'lerin ince yapılarını gözlemek, bu hücrelerde elektron histoşimi yoluyla enzim araştırması yapmak ve deneysel yolla perifer kana bakteri kültürü verildiğinde kanda macrophage'ların oluşup oluşmadığını incelemek üzere 5'erlik gruplar halinde 15 adet tavuk kullanıldı.

Monocyt'lerin ince yapılarını inceleyebilmek amacıyla hayvanların kalbinden punksiyon yoluyla heparinize 6'şar ml. kan alındı. Anderson¹'un yöntemine göre 1000 devir/dakika santrifugasyon'la elde edilen "buffy coat" — Lökositleri ve trom-

bositleri içeren tabaka — Karnovsky¹³ yöntemine göre glutaraldehid-paraformaldehid tesbit sıvısı ile 60 dakika tesbit edilerek jilet yardımıyla peletlere ayrıldı. Bu peletler bir gece 0,1 M. fosfat tamponunda (Sakkarozlu) bekletildikten sonra, % 1,3'lük Ozmik asitte bir saat süre ile ikinci kez tesbit edildiler. İkinci tesbitten sonra peletler, % 1'lik Uranil asetat solusyonunda bir saat boyandılar. Dehidrasyon ve parlatmayı takiben Araldit M'de bloğa alındılar. Böylece 5 hayvandan 50 adet elektron mikroskobik blok hazırlandı.

Bu bloklardan elde edilen kesitlere Reynolds¹⁸ yöntemine göre kontrast boyaması uygulandı.

Histokimyasal çalışmalar için ayrılan 5 hayvanın perifer kanında yine Anderson¹'un yöntemine göre peletler elde edildi. Bu peletler Barka ve Anderson²'un Sodium betaglycreophosphat ve Novikoff ve arkadaşlarının¹⁶ cytidin-5-Monophosphoric asit (CMP) inkubasyon medyumlarından geçirilerek, 50 adet elektron mikroskobik blok hazırlandı.

Perifer kandaki monocytl'erin, kana experimental yolla bakteri kültürü verildikten sonra macrophage'lara differensiyel olup olmadıklarının incelenmesi için ayrılan 3. grup hayvanlara, 1 ml'sinde yaklaşık 10×10^9 Escherichia Coli bulunan kültür, kalp yoluyla 0,5 ml. olarak verildi. Bu hayvanların kalplerinden 30 ve 60 dakikalık, 6 ve 24 saat'lik aralarla punksiyonla alınan kan örneklerinden, birinci grupta kullanılan yöntemlerle 50 adet elektron mikroskobik blok hazırlandı.

"Coc" infeksiyonu ile hastalandığı tesbit edilen bir tavuğun kalbinden punksiyonla alınan heparinize kandan da 10 adet elektron mikroskobik blok hazırlandı.

Çalışma süresince morfolojik ve histokimyasal incelemeler için hazırlanan toplam 160 bloktan LKB Ultratome III ile alınan ince kesitler Carl Zeiss 9S-2 Elektron mikroskobuyla incelendiler.

BULGULAR

Elektron mikroskobunda monocytl'ler, granül yönünden çok fakir olmaları (Resim 1,2,3), çekirdeklerinin az loptu olup bir kenarından içeriye doğru çöküntü yapmaları (Resim 2) ve çekirdek içinde çok az olan heterochromatinin çekirdeğin perifer kısımlarında toplanması (Resim1,2,3) ile, diğer lökositlerden kolayca ayrılıbildi.

Ayrıca bu hücreler, irilikleri ile de dikkati çekti (Resim 1). Sağlıklı tavukların perifer kan monocytl'lerinin cytoplasmaları, granülden fakir olmalarına karşın, diğer membransel organeller yönünden oldukça zengin bulundu. İncelenen preparatların çoğunda monocytl'erin çok bol miktarda serbest ribozomlara, granüllü endoplazma reticulum'u keseciklerine ve mitochondrion'lara sahip oldukları gözlemlendi (Resim 2,3). Bunların yanında incelenen monocytl'erin çoğunda iyi gelişmiş bol vezikül, vakuol ve kesecikleriyle her hücrede 1-2 adet Golgi complex'i dikkati çekti (Resim 3). Monocytl'erin hemen hepsinde cytoplasmada yaygın şekilde irili ufaklı, çoğunun içleri boş, bazılarının ise içlerinde metabolik artıklar bulunan vakuollere rastlandı (Resim 2).

Azurophyll ya da oxyphyll granüller olarak isimlendirilen homojen içerikli granüller seyrek ve az sayıda bulundu (Resim 3). Bu granüllerin hepsinde asit fosfataz aktivitesi gözlemlendi. Bu aktiviteyi belirleyen kurşun presipitat, granüllerin tamamına

yayılmış olarak görülmedi; bazılarında granülün yarısına yakın kısmında diğer bazı- larında ise granülün tamamını çevrelemiş olarak göze çarptı (Resim 4 oklar). Bu hücrelerin çekirdeklerinde de küçük noktalar halinde oldukça homojen şekilde bir enzim reaksiyonu gözlemlendi (Resim 4 N).

"Coc" infeksiyonunda perifer kan monocyt'lerinin bol pseudopod'lu biçimle- rini kaybederek yuvarlaklaşmaya yüz tuttıkları gözlemlendi (Resim 5,6). Cytoplasma- da, miktarları bollaşan mitochondria, granüllü endoplasma reticulumu ve serbest ri- bosomların yanında en dikkat çekici yapısal değişim, vakuollerin sayı ve hacimlerin- de bir artış (Resim 5 V), az sayıdaki granüllerin ise, bazı vakuollerle birleşerek (Re- sim 6 M) multivesicular body'ler oluşturmalarıyla. Vakuoller içinde değişik şekiller- de membransel artıklar gözlemlendi (Resim 5 oklar). Endoplasma reticulumunda da bir çeşitlenme, granüllü endoplasma reticulumu yanında granülsüzlerin de varlığı göze çarptı (Resim 6 ok.).

Aynı tavukta, büyüklük bakımından monocyt'lere benzeyen, pseudopod'lu, çekirdekleri bir kenarlarından içeriye doğru çökük ve kromatinden oldukça fakir hücreler de göze çarptı (Resim 7). Monocyt'lerde olduğu gibi bu hücrelerde de kromatin, çekirdeğin periferine dağılmış, çekirdekçik belirginleşmiş (Resim 7 n) olarak gözlemlendi. Bu hücrelerin en çok göze çarpan yanları cytoplasmalarının tıka basa granüllerle dolu olmasıydı. Granüller homojendi ve ünit membranla çevrili idi (Resim 8).

Bazı granüllerin vakuollerle birleştikleri ve vakuollerle temas noktalarında ünit membranla çevrilmiş olan sınırlarında bir erime olduğu saptandı (Resim 8 oklar). Cytoplasma'da lizozomlar dışında oldukça fazla sayıda mitochondrion'lara az sayı- da granüllü endoplasma reticulumu keseciklerine, gelişmiş bol vezikülleriyle Golgi complexine (Resim 8) ve içlerinde membransel artıklar bulunan vakuollere rastlandı.

Deneyssel olarak perifer kana kalp yoluyla bakteri kültürü verilen tavuklardan inkubasyonun 30 uncu, 60 ıncı dakikaları ile 6. ve 24 üncü saatlerinde alınan kan ör- neklerinden yapılan preparatlarda her dört evrede de bakterileri fagosite etmiş olan heterophyl granulositlerle (Resim 9 F), pseudopod'lu, cytoplasmaları homojen göri- nüşte granüllerle dolu, irili ufaklı vakuoller ve mitochondrion'lara sahip macrophage'lar görüldü (Resim 10).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Tavuk perifer kan monocyt'leri 15-20 mikron büyüklükte, tüm leucocyt'lerin yaklaşık % 3-9'unu teşkil eden ve onların içinde en iri olan hücrelerdir⁷.

Genellikle klasik kitaplarda^{2.4.6.7.10.11.12.14.19.20}, perifer kan mono- cyt'leri memeli hayvanlarda ve insanlarda; at nalı, fasulya ya da böbrek biçiminde çekirdekleriyle karakterize, çekirdeği 1-3 çekirdekçiğe sahip, cytoplasmalarında az sayıda membransel organelleri olan, bir miktar azurophyl (oxyphil) granüle sahip pseudopod'lu hücreler olarak tanımlanmıştır.

Kanatlı hayvanlar üzerinde ince yapı düzeyindeki çalışmalarda da^{5.8.15} mo- nocyt'ler, perifer kanın en büyük hücreleri olarak gösterilmişler; çoğunun pseudo- pod taşıdığı, çekirdeklerinin yuvarlak, oval, çentikli ya da böbrek biçiminde ve euchromatik yapıda olduğu, cytoplasmalarında az miktarda oxyphil granül, buna

karşılık bol miktarda mitochondrion, granüllü endoplazma reticulumu ve serbest ribozom bulunduğu, çok iyi gelişmiş bir Golgi complex'ine sahip hücreler olarak bildirilmiştir.

Nirmalan¹⁵, bıldırcın perifer kan örnekleriyle yaptığı çalışmasında monocytlerin cytoplasmasında bulunan oxyphil granülleri lisosom olarak kabul etmiştir.

Constantinidies⁶, Erkoçak¹⁰, Sağlam¹⁹, monocyt'lerin cytoplasmalarında az sayıda görülen azurophyl granüllerin proteolitik ve hydrolytic enzimler içerdiklerini belirtmişler, Bloom⁴ bu enzimlerin asit fosfataz ve aryl sulfatase, Ham¹¹ peroxidase, Schalm ve arkadaşları²⁰ ise, asit fosfataz ve peroxidase olduklarını bildirmişlerdir.

Biz, sağlıklı tavuk perifer kanında monocyt'leri literatürde belirtildiği gibi leucocyt'lerin en iri hücreleri olarak gördük. Pseudopodlar, oval biçimdeki hücrede göze çarpan bir belirginlikte idi. Bir kenarından çöküntüye uğramış olan euchromatik çekirdekte heterokromatin kümeleri çekirdek periferine aralıklarla yerleşmiş durumda idi. Cytoplasma, granüllü endoplazma retikülümü kesecikleri, serbest ribozomlar ve mitochondria yönünden oldukça zengin, homojen görünüşteki azurofil granüller yönünden ise fakir idi. Bu azurofil granüllerin asit fosfataz enzimi yönünden pozitif reaksiyon verdiğini gözledik. Çekirdekte gördüğümüz noktalar halinde ve homojen yayılıştaki pozitif reaksiyona diğer araştırmacılar tarafından değinilmemiştir. Her hücrede bir ya da birkaç adet ve iyi gelişmiş Golgi complexi vardı.

Kaynakların araştırılması sırasında herhangi bir enfeksiyonla hastalanmış katanlıların kan hücreleriyle yapılmış bir çalışmaya rastlayamadık. Coc enfeksiyonuna yakalanmış tavuğa ait kan örneklerinde, monocytlerin yukarıda tartışılan yapısal özelliklerinde bazı değişikliklerin oluştuğunu gördük. Hücreler pseudopod'larını kaybederek yuvarlak bir biçim almışlar, cytoplasmalarında bulunan irili ufaklı vakuollerin sayısı artmış ve asit fosfataz pozitif reaksiyon gösteren lisosomal granüllerin bir kısım veziküllerle birleşerek, bir takım yeni oluşumlar — multivesiculer body'ler — oluşturmuştu. Ayrıca cytoplasmalarında çok bol olarak bulunan granüllü endoplazma reticulumu keseciklerinin yanında, granülsüz olanlar da göze çarpmakta idi.

Aynı tavuğun perifer kan preparatlarında rastladığımız, cytoplasmaları homojen yapılı granüllerle ve irili ufaklı vakuollerle dolu macrophage'ların perifer kanda bulunabileceği üzerinde yayın çok azdır. Araştırmacılar genellikle macrophage'ları, gevşek bağ dokularda ve vücut içi boşluklarda biriken exudatlarda monocyt'lerin damar duvarından dışarı çıkarak buralarda differensiye olmalarıyla oluştuklarını belirtmektedirler^{2,4,6,7,9,10,11,12,19,20,21}.

Van Furth²¹, in vitro olarak insan perifer kan monocyt'leriyle yaptığı çalışmasında, monocyt'lerin mononuclear fagosit sistemin hücreleri olduğunu belirtmiş, in vitro fagositoz'un extracellular serum faktörünün sağlanmasıyla mümkün olduğunu bildirmiştir.

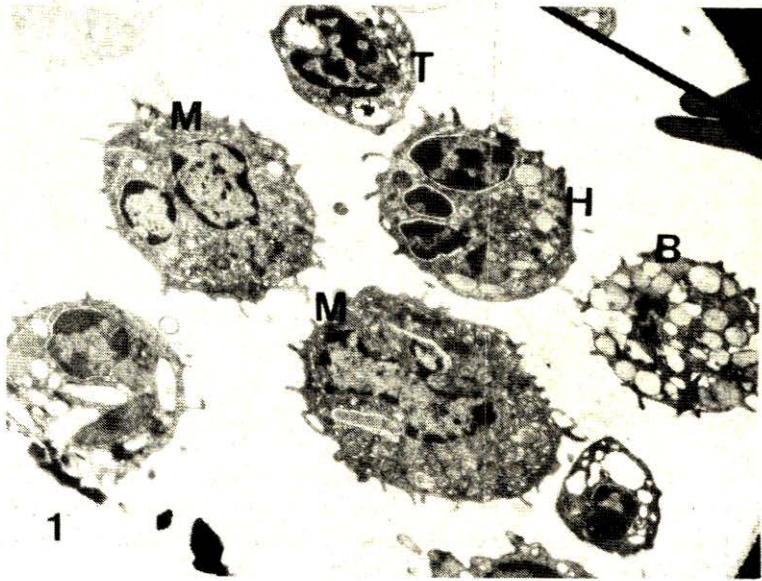
Weiss²², perifer kanda sirküle olan monocyt'lerin, sirkülasyonun durgun olduğu yerlerde (Kulak memesinde, bazı damar sinus'larında ve geçici olarak tıkanmış damarlarda) kolaylıkla macrophage'lara differensiye olabileceklerini bildirmektedir. Bizim bulgularımız da bu durumu doğrular niteliktedir.

Gerçektende bir enfeksiyon sonucu hastalanmış ya da kalpten punctation yoluyla bakteri verilen tavukların perifer kanında, cytoplasmalarında çok sayıda lyso-

somal granül ile, bu granüllerle temas halinde ya da cytoplasmaya yayılmış olarak göze çarpan, içlerinde yer yer membransel artıklar bulunan vakuoller içeren macrophage'lar gözledik.

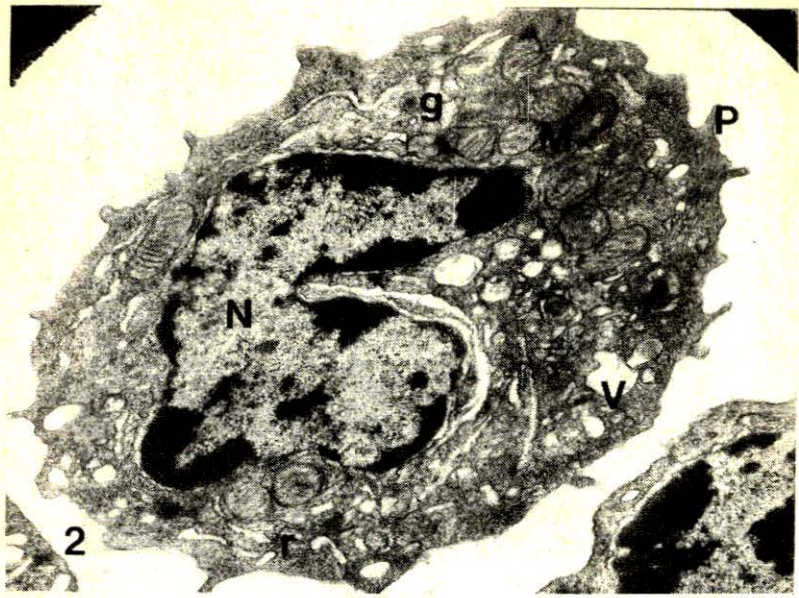
Bu da göstermektedir ki, tavuklarda monositlerden macrophage oluşumu sadece gevşek bağ dokularda, exudatlarda ya da yangılı bölgelerde değil, herhangi bir enfeksiyon sonunda direkt olarak perifer kanda da gerçekleşmektedir.

Ancak bu macrophagelerin dolaşım sisteminde fonksiyon yapıp yapmadıklarına karar verilemedi. Kandaki heterophyl granüositlerde bol miktarda fagosite edilmiş bakteri bulunduğu halde, macrophage'larda bulunmayışı, macrophage'ların acil durumlarda dolaşım sisteminde farklılaştıklarını ancak yine de işlevlerini damar dışı ortamda yaptıklarını akla getirmektedir.



Resim: 1

Perifer kan hücreleri. Monocyt (M), Heterophyl granulocyte (H), Trombocyt (T), Basophyl granulocyte (B). X 5500



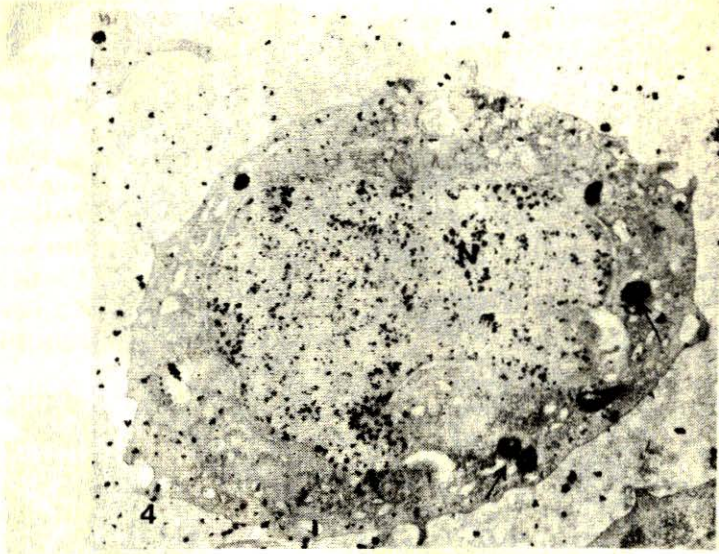
Resim: 2

Monocyt. Çekirdek (N), Pseudop'lar (P), Azurophyl granüller (g), Granüllü endoplazma reticulumu kesecikleri (r), Mitochondrion'lar (M), Vacuoller (V). X 11400

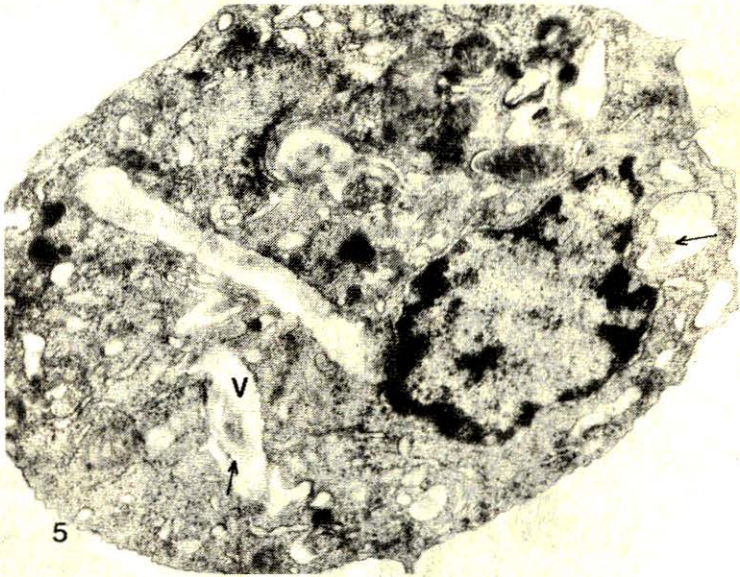


Resim: 3

Monocyt. Çekirdekte heterochromatin (h), Golgi Complex'i (G) X 11400



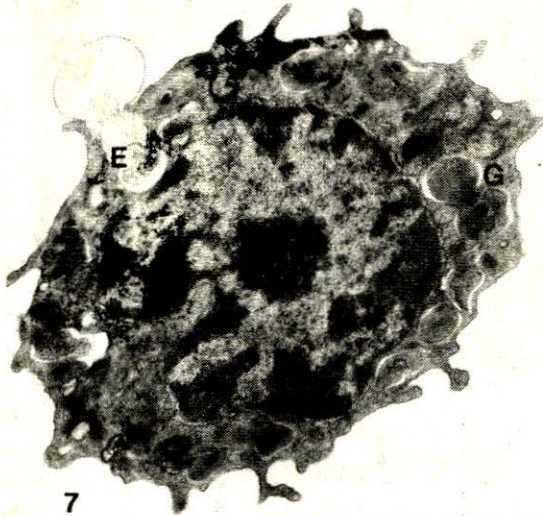
Resim: 4
Monocyt'te asit fosfataz demonstrasyonu. Granüllerde enzim reaksiyonu (oklar), çekirdekte enzim reaksiyonu (N). X 15000



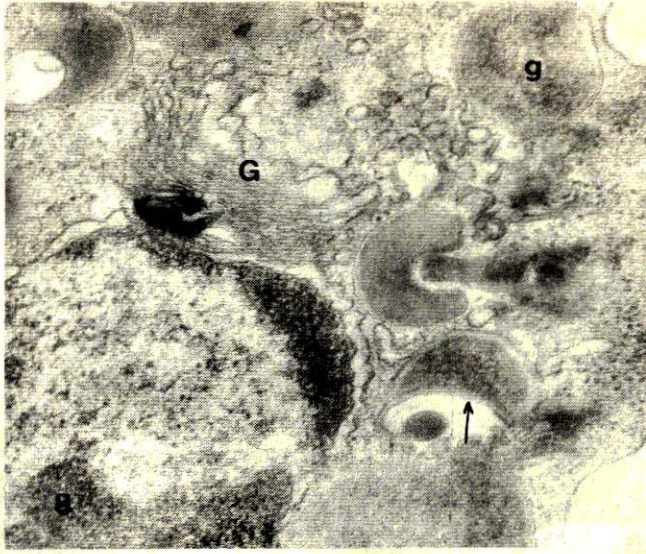
Resim: 5
Enfekte tavuk perifer kan monocyt'i. Vakuoller (V), Vakuollerde membransel artıklar (oklar). X 23750



Resim: 6
Enfekte tavuk perifer kan monocyti. Multivesiculer body'ler (M), Granülsüz endoplasma reticulum'u kesecikleri (oklar). X 22000

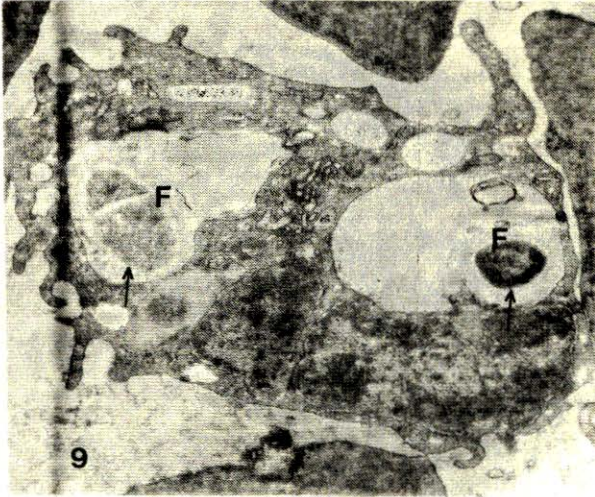


Resim: 7
Enfekte tavuk perifer kan Macrophage'i. Cytoplasmic granüller (G), Çekirdekçik (n), Exocytic vacuol (E). X 19500



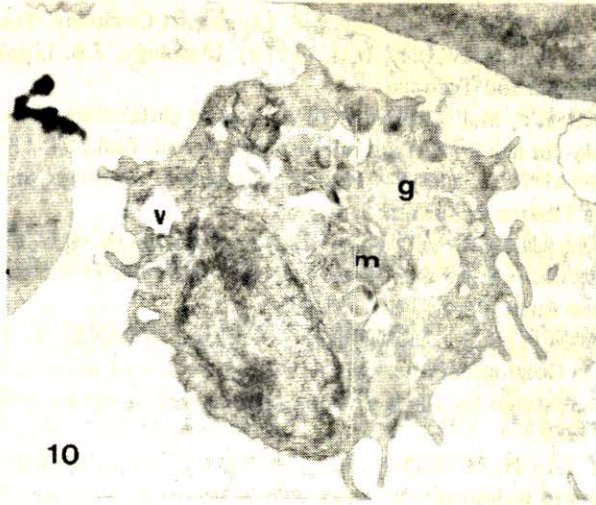
Resim: 8

Perifer kan macrophage'ında membransel organeller. Golgi complex'i (G)
Cytoplasmic granüller (g), Granüllerde membran erimesi (ok.) X 55000



Resim: 9

Bakteri verilmiş tavuk perifer kanında heterophyl granulosit'te fagosi-
toz (F). Fagosite edilmiş bakteriler (oklar). X 19500



Resim: 10

Bakteri verilmiş tavuk perifer kanında Macrophage. Cytoplasmic granüller (g), Vakuoller (V), Mitochondrion'lar (m).

KAYNAKLAR

1. ANDERSON, D.R. (1965): A method of preparing peripheral leucocytes for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, 13: 263-268.
2. BARKA, T., ANDERSON, P.J. (1962): Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.*, 10: 741-53.
3. BEVELANDER, G., RAMALEY, J.A. (1979): *Essentials of Histology*. The C.V. Mosby Company. LONDON.
4. BLOOM, V. and FAWCETT, D.W. (1975): *E Textbook of Histology*. W.B. Saunders Company. Philadelphia.
5. BRADLEY, C.O., (1960): *The structure of fowl*. Oliver and Boyd Ltd. Edinburgh-Great Britain.
6. CONSTANTINIDES, P. (1974): *Functional Electronic Histology*. Elsevier Sci. Pub. Com. New York.
7. DELLMAN, H.D., BROWN, E.M. (1981): *Textbook of Veterinary Histology*. Lea and Febiger. Philadelphia.
8. DHINGRA, L.D., PARRISH, W.B. and WENZKE, W.G. (1969): Electron microscopy of nongranular leucocytes and trombocytes of chickens. *Am.J. Vet. Res.* 30: 1837-42.
9. DOUGLAS, S.D. (1978): *Cells involved in immune responses*. Basic Clinical Immunology. Lange Medical Publications. California.
10. ERKOÇAK, A. (1978): *Genel Histoloji*. A.Ü. Tıp Fakültesi Yayınları, Sayı: 364.

11. HAM, A.W. (1969): Histology. J.B. Lippincott Company. Toronto.
12. HAM, A.W., CORMACK, D.H. (1979): Histology. J.B. Lippincott Company. Philadelphia and Toronto.
13. KARNOSKY, M.J. (1965): A formaldehyd-glutaraldehyd fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*; 27: 137A-138A.
14. LEONHART, H. (1977): Human Histology, Cytology and Microanatomy. George Thiema Publishers Stuttgart.
15. NIRMALAN, G.P., ATWAL, O.S. and CARLSON, H.C. (1972): Ultrastructural studies on the leucocytes and thrombocytes in the circulating blood of Japanese quail. *Poultry Sci.*, 51: 2050-55.
16. NOVIKOFF, P.M., NOVIKOFF, A.B., QUINTANA, N. And HAUW, J.J. (1971): Golgi apparatus, GERL and lysosomes of neurons in rat dorsal root ganglia, studied by thick section and thin section cytochemistry. *J. Cell. Biol.* 50: 859-86.
17. MIGALLY, N, MURTHY, R.C. DOYE, A. and ZAMBERNARD, J. (1982): Changes in pulmonary alveolar in rats exposed to oxides of Zinc and Nickel. *J. Submicrosc. Cytol.* 14(4), 621-626.
18. REYNOLDS, E.S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17: 208-12.
19. SAĞLAM, M. (1977): Genel Histoloji. A.Ü. Veteriner Fakültesi Yayınları, 334.
20. SCHALM, O.W., JAIN, N.C., CARROL, E.J. (1975): Veterinary Hematology. Lea and Febiger, Philadelphia.
21. VAN FURTH, R. et al. (1982): Phagocytosis and intracellular killing by peripheral blood monocytes of patients with monocytic leukemia. *Blood*, Vol. 59 No: 6 (June).
22. WEIS, L., (1972): The cells and tissues of the immune system. Prentice-Hall Inc. Engle Wood Cliffs, New Jersey.