

SIÇAN MEZENTER LENF DÜĞÜMÜ VE MAKROFAJLARININ DEĞİŞİK ŞARTLAR ALTINDA IŞIK MİKROSKOBU SEVİYESİNDE İNCELENMESİ

Refik SOYLU (1)

*Son yıllarda, Makrofajlar hakkında ve özellikle onların bağışıklıkta-
ki (İmmunite) rolleri üzerinde sayısız araştırmalar yapılmış, makale ve
kitaplar yazılmıştır. Özellikle hücresel (Cellular) bağışıklıktaki rolü bü-
yük bir tartışma konusudur.*

*In recent years, there are extensive investigations, written books and
papers on macrophages and especially their roles on immunity. Espe-
cially their role on cellular immunity is a large subject to be discussed.*

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada 30 adet ortalama ağırlığı 200 - 225 gr. olan İsviçre tipi beyaz sıçanlar kullanıldı. Antijen olarak at serumu, yabancı materyal olarak Çin mürekkebi kullanıldı (Tablo 1).

Kontrol gurubu sıçanlar ve deney gurubu sıçanlar aynı şartlar altında gözetim ve bakıma alındılar.

1. Deney gurubundaki sıçanlara Intraperitonal olarak tek enjeksiyonla 1 cc at serumu verildi. 24 saat sonra açılıp mezenter lenf düğümü ışık mikroskobu için hazırlandı. Değişik boya metodları kullanılarak Histokimyasal incelemeler yapıldı.

2. Deney gurubu sıçanlara, birer hafta ara ile iki defa, tek enjeksiyonla 1 er cc. antijen Intraperitonal olarak verildi, son enjeksiyondan 24 saat sonra sıçanların başları kesilerek öldürülüp mezenter lenf düğümü incelendi.

3. Deney gurubu 1 er hafta ara ile 3 defa ve her seferinde 1 er cc. at serumu Intraperitonal verildi ve 24 saat sonra açılıp incelemeye alındı.

4. Deney gurubu sıçanları önce 0,5 cc Çin mürekkebi, 0,5 cc serum fizyolojik ile sulandırılmış olarak bir enjeksiyonla 1 cc Intraperitonal ola-

(1) Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölüm Başkanı Morfoloji (Histoloji-Embriyoloji) Anabilim Dalı Öğretim Üyesi.

rak verildi. Bu enjeksiyondan bir hafta sonra 1 cc at serumu tek enjeksiyonla Intraperitoneal olarak verildi. Son enjeksiyondan 24 saat sonra sıçanlar açılarak mezenter lenf düğümleri Histokimyasal olarak incelenmek üzere hazırlandı.

5. Deney gurubu sıçanlara 0,5 cc Çin mürekkebi ile 0,5 cc serum fizyolojik karıştırılarak Intraperitoneal verildi. Bundan bir hafta sonra 1 cc At serumu bir defada Intraperitoneal verildi. Bu işlemde 24 saat sonra sıçanlar açıldı ve lenf düğümleri ışık mikroskobu seviyesinde Histokimyasal olarak incelenmek üzere hazırlandı.

6. Deney gurubu sıçanlara yarı yarıya Çin mürekkebi serum fizyolojik karışımı 1 er cc ve birer hafta ara ile üç defa Intraperitoneal olarak verildi. Bunlardan sonra yine birer hafta ara ile 3 defa 1 er cc At serumu Intraperitoneal olarak verildi. Bu işlemlerden 24 saat sonra sıçanlar açıldı ve diğer deney hayvanlarındaki gibi işlemler yapıldı.

7. Deney gurubu sıçanlara 6. deneyde yapılan işlem bu defa 6 kere yapıldı. Son işlemde 24 saat sonra sıçanlar açıldı aynı işlemler yapıldı.

8. Deney gurubu sıçanlara yalnız eşit miktarda serum fizyolojik Çin mürekkebi karışımı 6 defa birer hafta ara ile verildi. Aynı işlemlerde incelemeye hazırlandı.

9. Deney gurubu sıçanlara yalnız At serumu birer hafta ara ile 6 defa yine Intraperitoneal olarak verildi ve deney gurublarındaki hazırlıklar yapıldı (Tablo 1).

Sırası Deney	Deney durumu	Deney hayvan sayısı	Işık mikroskobu			
			H.E	PAS	MGP	GÜM
Kontrol	Kontrol					
1. Deney	1xS	3				
2. Deney	2xS	3				
3. Deney	3xS	3				
4. Deney	1xM+1xS	3				
5. Deney	2xM+2xS	3				
6. Deney	3xM+3xS	3				
7. Deney	6xM+6xS	3				
8. Deney	6xM	3				
9. Deney	6xS	3				

Tablo 1 — (S: At serumu, M: Çin mürekkebi, H.E: Hematoksilen-Eozin, P.A.S: Periodic - Acid - Schilf M.G.P: Metyl Green Pyronin, Güm: Gümüşleme).

Sıçanlar herhangi bir anestezi maddenin etkisinden kaçınmak için boyunlarından kesilerek öldürüldü.

Aynı bölgeden elde edilmeye itina gösterilen mezenter lenf düğümleri alındı. Her bir sıçandan elde edilen lenf düğümlerinin bir kısmı %10 Formaldehide - Salin çözeltisinde, diğerleri özel boyamalar için %95 Alkolde tesbit edildiler. Elde edilen Parafin bloklardan 4-6 mikron kalınlığında kesitler alındı. Genel incelemeler için Hematoksilen - Eozin, özel incelemeler için Periodic - Acid - Schiff (PAS) reaksiyonu, Methyl Green Pyronin ve Gümüşleme metodları uygulandı^{8, 12}. Ayrıca elektron mikroskop için hazırlanan bloklardan da kalın kesitler alınıp Metilen mavisi - Azur II ile boyandı. Renkli mikrofotografiler Leitz fotomikroskobu ile DIN 100 ASA kodak filmleri kullanılarak resimler elde edildi. Bu çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Bölümünde yapıldı.

BULGULAR

I - Makroskopik görünüm :

Deney hayvanlarının deneye sokuldukları ilk günlerde sağlık durumlarının bir hayli bozulmuş olduğu gözlemlendi. Hareketleri yavaş ve kolları dikilmiş durumdaydı. Deneyden birkaç gün sonra ise, genel durumları oldukça düzeldi.

Kontrol guruplarında, mezenter lenf düğümleri, piring tanesinden mercimek büyüklüğüne kadar değişen farklar gösterdi. Kirli sarı renkte olup, yağ ve bağ dokusu içinde kolayca bulunabiliyordu.

Kabaca bütün organların durumları gözden geçirilerek herhangi bir patolojik durum olup, olmadığı gözlemlendi. Özellikle parazit yönünden sindirim sistemi kontrol edildi. Herhangi bir parazite rastlanmadı.

Antijen verilmiş guruplarda, antijenin verilmiş birim ve süreleri ile bağımlı olarak Mezenter lenf düğümlerinin belirgin bir şekilde büyüdüğü gözlemlendi. 6 kez at serumu verilmiş mezenter lenf düğümleri çok büyümüşü. Yüzeyinde, içi sıvı dolu veziküller çok belirgindi. Takipler için kesilirken veziküller patladı ve içerdikleri sıvılar aktı. Sağlam doku kısmı oldukça gevşek ve azdı.

Yalnız Çin mürekkebi verilmiş mezenter lenf düğümleri boyanma nedeni ile daha kolay bulundu. Büyüme farkı saptanamadı.

Hem Çin mürekkebi ve hemde antijen verilmiş guruplarda birim ve sürelerine bağımlı olarak mezenter lenf düğümlerinin kontrollere kıyasla giderek daha büyüdüğü saptandı.

Çin mürekkebinin mezenter lenf düğümleri tarafından alınması farklılıklar gösteriyordu. Karın içi, gevşek bağ dokusundan zengin yerlerde siyahlık giderek artıyordu. 3-6 kez Çin mürekkebi verilmiş deney hayvanlarının omentum ve Mezenteriumları siyahlaşmıştı. Karaciğer ve dalak normal renklerine göre daha koyu kırmızı görünüyordu. Pelvis İçi bölgesindeki gevşek bağ dokusunun siyah olduğu gözlemlendi.

II — Işık mikroskop düzeyindeki bulgular :

Kontrol gurubu mezenter lenf düğümlerinin yapısı, lenf düğümünün genel yapısında tariflenen tüm özellikleri gösterdi. H.E. boyamalarında bağ dokusundan yapılı kapsulanın seyrek trabekülalarda devam ettiği gözlemlendi. Kapsula çevresinde yağ hücreleri pek çok yerde görülebiliyordu. Dış ve iç korteks oldukça sıkı tertiplenmiş çoğunluğunu lenfositlerin oluşturduğu hücrelerle dolu idi (Şekil 1).

Gomori'nin gümüşleme yöntemi uygulanmış preparatlarında da retikulum lifleri oldukça sıkı, hücreler aralarına sıkışmış durumda idi (Şekil 2).

Antijen (at serumu) ile bir kez (IXS) uyarılmış lenf düğümleri, belki hayvansal farklılık nedeniyle de çok daha iyi yapısal farklılık gösterdi. Kapsula, marginal sinus, dış korteks H.E., M.G.P. boyaları ve PAS reaksiyonu ile belirgin bir şekilde gözlemlendi. M.G.P. boyası ile plasma hücreleri belirgin bir şekilde lenfositlerden ayırt edildi. Korteks ve medullanın retikulum hücrelerini, sinus endotelleri ve makrofajları ayırmak hemen hemen olanaksızdı. Seyrek olarak soluk büyük sitoplazmalı soluk oval çekirdekli hücreler, bu boya ile zorlukla gözleniyordu.

PAS reaksiyonu ile kapsulanın bağ dokusu, trabekülalar damar çevreleri iyi boyandı.

PAS reaksiyonu ile genel olarak plasma hücrelerinin stoplazmaları boyanmadığı halde çok olgun plasma hücreleri (Russell body) iyi boyandı. PAS reaksiyonu ile retikulum hücreleri makrofajlar, sinus endotelleri stoplazmaları ve uzantıları pembe-kırmızı renkte belirgin bir şekilde boyandılar. Aralarında lenfositler ayırt edilebildi (Şekil 3).

Gomori'nin gümüşleme yöntemi ile retikulum liflerinin daha gevşek tertiplendiği gözlemlendi (Şekil 4).

İki ve üç kez serum verilmiş deney gurupları, makrofajlar için bir değişiklik getirmedi. Genel lenf düğümü, özellikle plasma hücreleri yapı farklılıkları konumuz dışında olduğundan bu gurup resimlenmedi.

5. Deney (2XM+2XS) guruplarında intraperitoneal verilmiş Çin

mürekkebi lenf düğümleri kapsulasına ancak ulaşabilmişti. Plazma hücreleri artmıştı (Şekil 5).

6. Deney (3XM+3XS) grubunda Çin mürekkebinin kapsula ve dış korteks makrofajlarında toplanmağa başladığı gözlemlendi. Bu grupta da tüm boya yöntemleri uygulandı. Makrofajlar bazen tek tek, bazen kümeler halinde, siyah, kahverengi görünümüleri ile kolayca gözlenebildi (Şekil 6).

7. Deney (6XM+6XS) grubunda tüm ışık mikroskobu boyama yöntemleri uygulandı. Çin mürekkebinin almış makrofaj kümeleri kapsuladan medullaya kadar yayılmakta idi. M.G.P. boyamalarında plazma hücrelerinin pironinofilisi belirgindi.

Elektron mikroskop bloklarından elde edilen kalın kesitler metilen mavisi - azur II ile boyandığında, Çin mürekkebinin almış makrofajlar iyi bir şekilde gözlemlendi. E.M. incelemeleri için yapılacak ince kesitlere uyum sağladığı kadar, Kapsula ve dış kortekse dağılmış mast hücreleri içinde iyi bir ayırıcı yöntem oldu. Mast hücresi granülleri mavi boyanmıştı (Şekil 7).

8. Deney (6XM) grubunda sadece altı kez Çin mürekkebi verildi. Kapsuladan medullaya kadar Çin mürekkebi almış makrofajlar tek tek veya kümeler halinde çok belirgindi, ancak M.G.P. boyamalarında pironinofilinin azlığı dikkati çekti (Şekil 8).

9. Deney (6XS) grubunda sadece sıçanlara 6 kez serum verilmişti. Lenf düğümlerinin çok büyüdüğü mikroskopik görünümde belirlenmişti. Histolojik kesitlerde mezenter lenf düğümlerinin en küçük büyütmelele dahi mikroskop alanına sığmayacak kadar büyüdüğü gözlemlendi.

Lenf düğümünün normal yapı düzeni çok bozulmuştu. Sinuslar özellikle çok genişlemişti. M.G.P. boyamalarında yer yer özellikle medulla kordonlarında pironinofilik kümeler dikkati çekiyordu (Şekil 9).

T A R T I Ş M A

Yapılan bu çalışmada, değişik deney koşullarında makrofajların yapısal nitelikleri çeşitli histokimyasal reaksiyonlarda ışık mikroskobu seviyesinde incelendi. Makrofajları tanımada en geçerli metod onun fagositik özelliğine dayanmaktadır. Makrofajlar vücuda giren yabancı maddeleri fagosit'e ederler. Bu hücreler deneysel olarak verilen tripan mavisi Hint - Çin mürekkebi ve lityum karmin gibi boyaları fagosite ettiklerinden ışık mikroskobu düzeyinde ayırt edilmeleri kolaydır. Bunların sabit

ve gezgin olanları olup, Retikuloendotelyal sistemin hücrelerindedir. Hücreyi ilk defa tanımlayan Metchnikoff'dur. Makrofaj terimi bu araştırmacı tarafından kullanılmıştır. Bu hücreye deneysel işlemlere göre ve buldukları yerlere göre değişik isimler verilmiştir. Pyrrhol blue hücreleri, adventisya hücreleri, clasmatosit, rhagiocrine cell, Wandering cell, histiocyte, polyblart, mekalocyte Ana hücre, promonosit, monosit, makrofaj, Alveolar fagositik hücre, retiküler hücre, Kuppler hücreleri, mikrogliya gibi isimler aynı fonksiyonu yapan hücrelerdir^{3, 9, 17}.

Makrofajlar lizozomlardan oldukça zengin. Lizozomlarda bol ve çeşitli sindirici enzimler bulunur. Histokimyasal metodlarla pek çok enzim ayrılabilmiştir. Hidrolazlar grubunda, asit fosfataz, adenozin trifosfataz (A T P), nükleaz, nükleotidaz, asit ribonükleaz, asit dezoksiribonükleaz, esteraz, lipaz, kolin esteraz, alkali fosfataz bulunur. Ayrıca karbonhidraz grubundan, polisakkaridaz, okside redüktaz ve peroksitazlar bulunur. Peptidazlar grubundan, dipeptidaz, tripeptidaz hidraz, glikooksalaz, alfa glukoronidaz, beta glukoronidaz vardır. Proteinazlar; Peptik, triptik, kateptik fosfotilazlardır. Lipazların etrafında zar yoktur. Bunlara aynı zamanda nonspesifik esterazlarda denir. Diğer enzimlerin çevreleri ise bir zarla sarılmıştır. Eğer enzimlerin çevreleri zarla sarılmış olmasalardı makrofajlar kendi kendilerini sindirmiş olacaktı^{11, 16}.

Yabancı maddeler, antijenik maddeler bir özellik göstermeksizin makrofajlar tarafından alınır izoloğ ferritin, heteroloğ ferritin, bakteriel protein flageli makrofajlara pinositoz, mikropinositoz yolu ile veya kesin olmamakla birlikte hücre zarından doğrudan geçtiği yeri sürülür¹⁰.

Farklı iki antijen aynı makrofaj tarafından alınabilir ve bu iki antijen aynı pinositotik vezikülde bulunabilir¹³.

Antijen makrofajlar tarafından alındıktan sonra büyük bir kısmı yıkılır. Fakat bir miktarı ya lizozomlar içinde veya serbest olarak kalır. Bu antijen belirli bir süre immunogenetik olarak görev yapar¹.

Makrofajlar alınan antijenin az bir miktarını hücre yüzeyinde tutar. Bu antijen immun olaylardan sorumludur¹⁵.

Bazı araştırmacılar antijenle karşı karşıya gelen makrofajlardan R N A'nın elde edilebileceğine inanırlar. Bu R N A'nında, lenfoid hücrelerinin özel antikor şekillendirmesine neden olduğu üzerinde dururlar^{2, 5}.

Yapılan pek çok çalışmada makrofajların normal lenforetiküler sistemin olgunlaşmasında önemli bir görev yaptığı gösterilmiştir⁶.

Son yıllarda immünoloji bilimi çok dikkat çekici olmuştur. T ve B

lenfositlerinin rolünün anlaşılması ve plazma hücrelerinin antikor yapımındaki rollerinin kesinlik kazanmasına rağmen fagositoz yapan ve antijenleri alan onlarla ilk karşılaşan makrofajların immünolojideki rolü hala tartışma konusudur^{3, 17}.

Makrofajların antijenleri alışı ve immünolojideki rolü hakkında pek çok çalışma yapılmıştır.

Yapılan çalışmamızda antijen (At serumu) verilmiş sıçan mezenter lenf düğümleri, antijenin veriliş birimi ve süreleri ile orantılı olarak kontrol gruba oranla giderek oldukça büyüdüler, 6 defa antijen verilen grup lenf düğümleri çok büyümüş ve yüzeylerinde içi sıvı dolu veziküller oluşmuştur. İşlemler yapılırken sıvılar boşaldı. Sağlam doku gevşek ve azdı. Yalnız Çin mürekkebi verilmiş grup lenf düğümlerinde büyüme gözlenmedi. Ancak, siyah boyanma nedeni ile daha kolay seçildiler. Hem Çin mürekkebi ve hemde antijen verilmiş gruplarda büyüme kontrol gruba oranla daha büyük ve boyalı idiler.

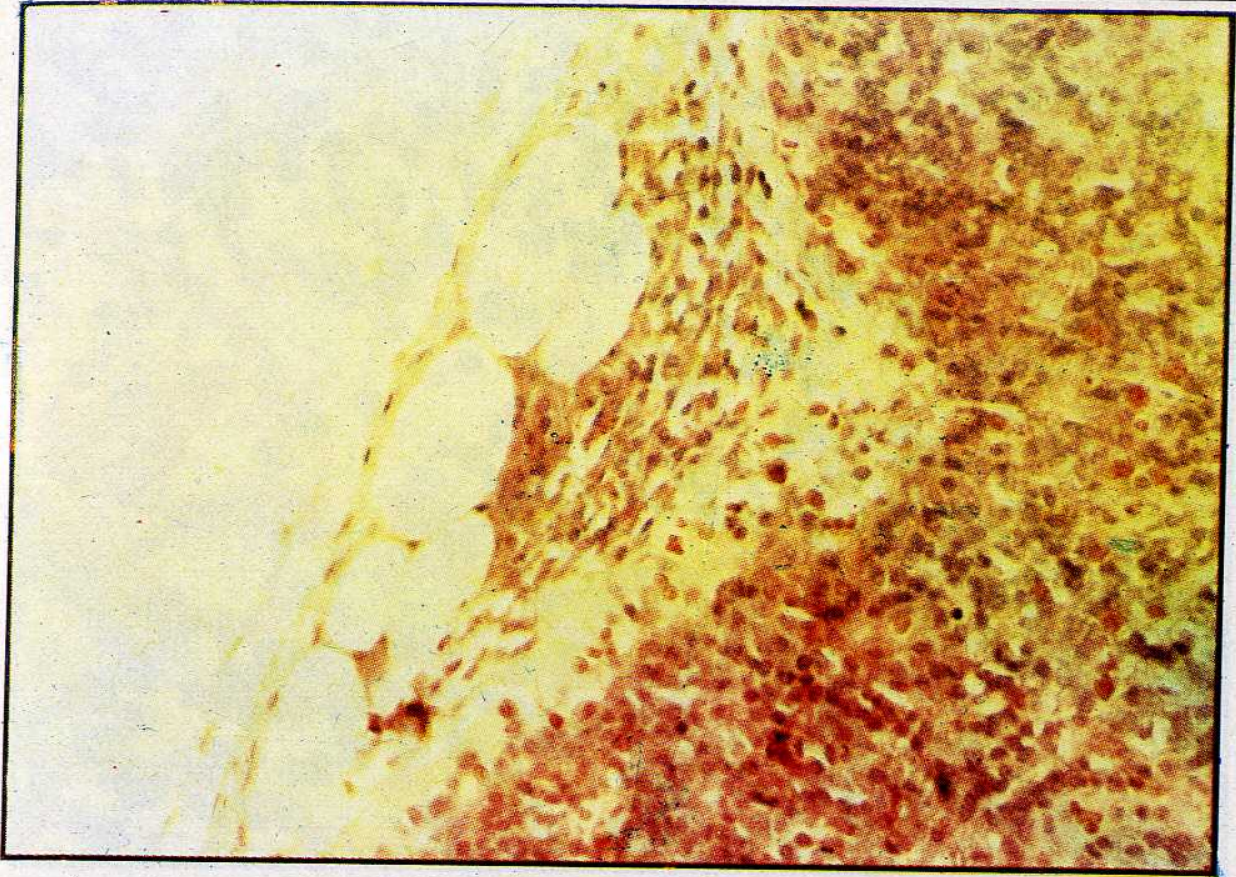
Işık mikroskobu seviyede yapılan çalışmada deney gruplarında blast hücrelerde ve plazma hücrelerinde artışlar gözlemlendi. Yapılan değişik Histokimyasal işlemler neticesinde makrofajların özellikle Morfolojik olarak immun sistemdeki rolü değerlendirildi. Amacımız makrofajların görevlerini deneyler sonucu bloke edildikten sonra olacak değişiklikleri gözlemek içindi. Deneylerin sonunda özellikle pironinofilinin azalması sistemin zincirinin önemli bir halkasıdır.

Makrofajların immun sistemle birlikte çalıştığı açıkça görülüyordu. Deneyler neticesinde makrofajlar büyümüş çok sitoplazmik uzantılar çıkmıştır.

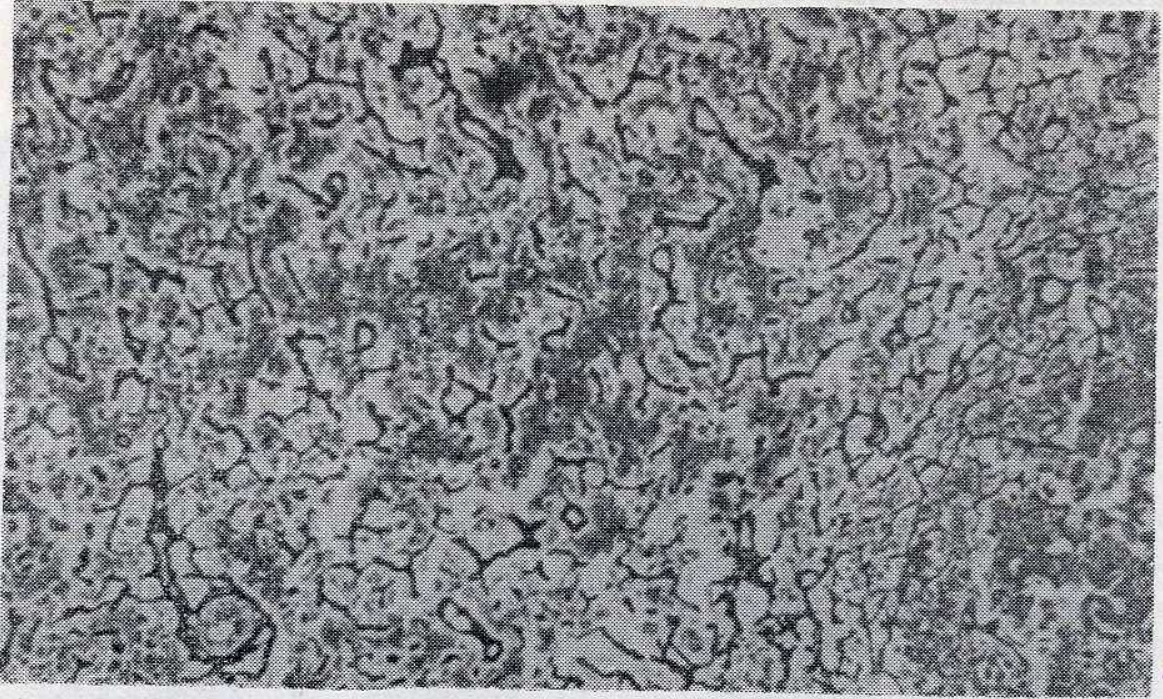
K A Y N A K L A R

- 1 - Askonas, B. A., Auzins, I., Unanue, E.: Role of macrophages in the immune response, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50: 1113, 1968.
- 2 - Bishop, D. C., Pisciotto, A. V., Abramoff, P.: Synthesis of normal and «Immunogenic RNA» in peritoneal macrophage cells. *J. Immunology.*, 99: 751, 1967.
- 3 - Bloom, W., Fawcett, D. W.: The Immune system. In. A Textbook of Histology. W. B. Saunders Comp., X. Baskı S. 427, 1975.
- 4 - Erkoçak, A.: Özel Histoloji Ank. Üniv. Tıp Fak. Yayınları/389. Ank. Üniv. Basımevi, Ankara, III. Baskı, S. 58, 80, 1980.

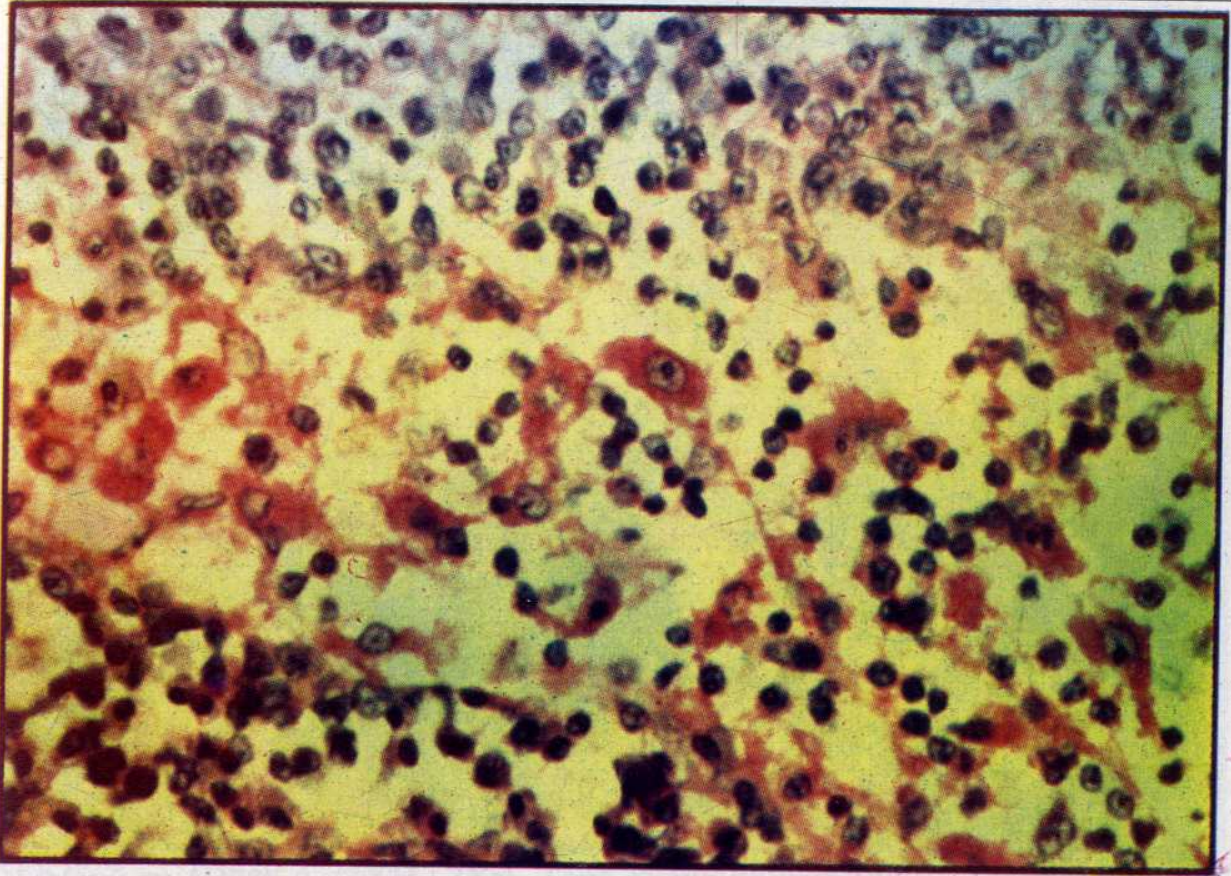
- 5 - Fishman, M., Adler, F. L.: Antibody formation initiated in vitro II. Antibody synthesis in X irradiated of diffusion chambers containing nucleic acid derived from macrophages incubated with antigen, *J. Exp. Med.*, 117: 595, 1963.
- 6 - Fudenberg, H. H., Stites, D. P., Caldwell, J. V., Wells, J. V.: Mononuclear phagocytes (monocyte - macrophages). Basic and clinical immunology. Lange Medical Publication. 1. Baskı. S. 81, 1976.
- 7 - Ham, W. A.: Histology. J. B. Lippincott Com., Philadelphia, Toronto. VI. Baskı. S. 315, 1969.
- 8 - Lillie, R. D.: Histopathologic Technic and Practical Histochemistry. McGraw - Hill Book Comp., III. Baskı, 1965.
- 9 - Metchnikoff, E. (1981): «Lectures on the Comparative Pathology of Inflammation» Publication, New York, 1968.
- 10 - Nossal, G. J. V., Abbot, A., Mitchell, J.: Antigens in immunity. XIV. Electron microscopic radioautographic studies of antigen capture in the lymph node medulla. *J. Exp. Med.*, 127 : 263, 1968 a.
- 11 - Payzın, S.: Fagositozda Sindirim: 1 - Enzimlerin rolü. Bağışıklık Bilimi=Immunoloji ve bağışıklık hastalıkları el kitabı. Ankara Üniversitesi Basımevi, I. Baskı, s. 14, 1974.
- 12 - Preece, A.: Routine hematoxylin and eosin staining procedure. In: A manual for Histologic technicians. Little, Brown and Company Boston., II. Baskı. S. 158, 1975.
- 13 - Rhodes, J. M., Lind, I., Birch, Anderson, A., Rown, H.: The intracellular localization of two antigens after uptake in vivo by peritoneal macrophages from normal mice. *Immunology*, 17 : 445, 1970.
- 14 - Siegmund, J. B., J. B., Ledney, G. D.: Current studies on the proliferation of the mononuclear phagocyte system. In. *Experimental hematology today*. Springer - Verlag New York, S. 65, 1978.
- 15 - Unanue, E. R., Cerottini, J. C.: The immunogenicity of antigen bound to the plasma membrane of macrophages. *J. Exp. Med.*, 131 : 711, 1970.
- 16 - Vernon - Roberts, B.: The macrophage. Cambridge At the University Press. 1972.
- 17 - Weiss, L.: The cell of immune system. Macrophages., Prentice - Hall, Inc., Englewood Clifts, New Jersey. S. 107, 1972.



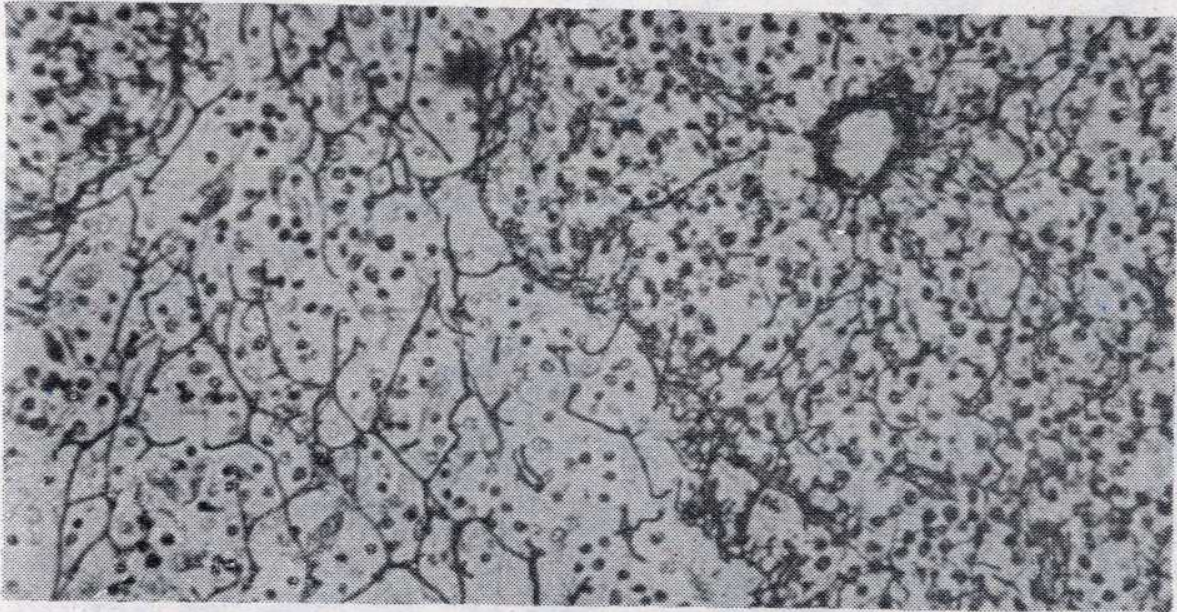
ŞEKİL 1 — Kontrolgrup. Kapsula' Sinus marginalis ve dış korteks gözlenmekte. Kapsulada bir kaç yağ hücresi ayırtedilebilmekte. Boya : H.E. X 40.



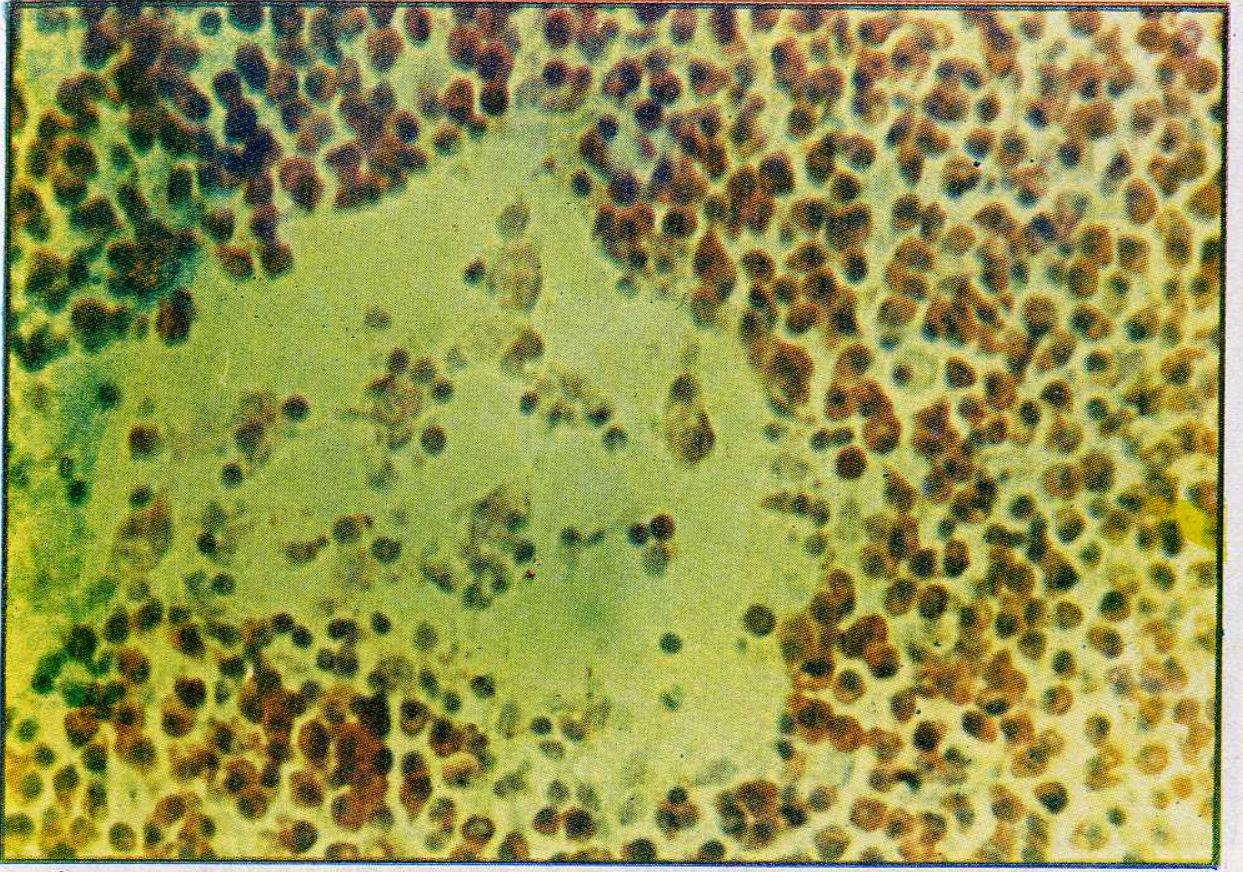
ŞEKİL 2 — Kontrolgrup. Mezenter lenf düğümü korteksinde genel bir görünüm. Retikulum lif ağı ayırtedilebilmekte. Boya : Gomori'nin retikulum boyası. X 40.



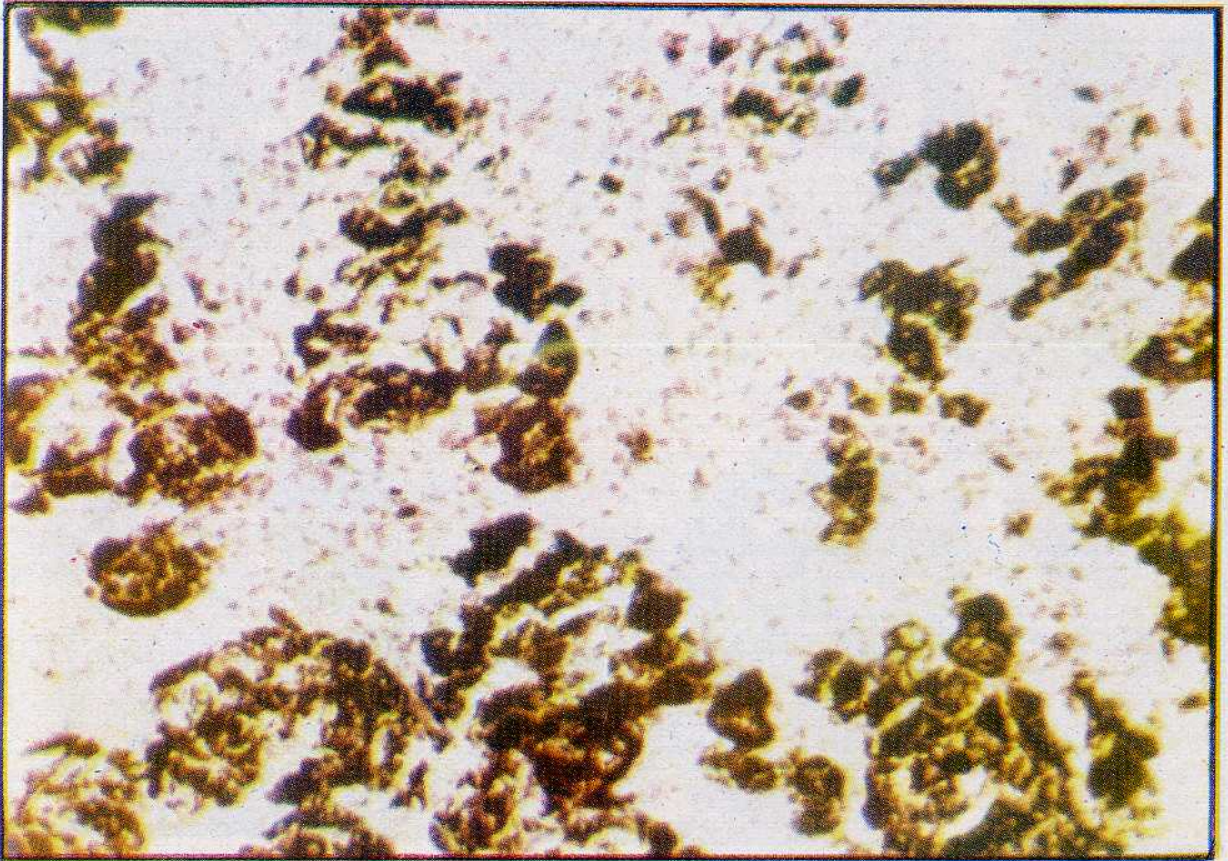
ŞEKİL 3 — Deney 1 (LXS). Şekil 16'nin sinuslar bölgesinden daha büyük büyütmedeki görünüm. Şeklin ortasında soluk, büyük, oval çekirdekli, pembe-kırmızı büyük yıldız şekilli uzantılı stoplazmalı hücreler ayırtedilebilmekte. Tanımlanan bu hücreler retikülüm hücreleri, sinusları döşeyen endotel hücreleri ve makrofajlar olabilir. Aralarında lenfositler ve plasma hücreleri de ayırtedilebilmekte. Boya : PAS. X 40.



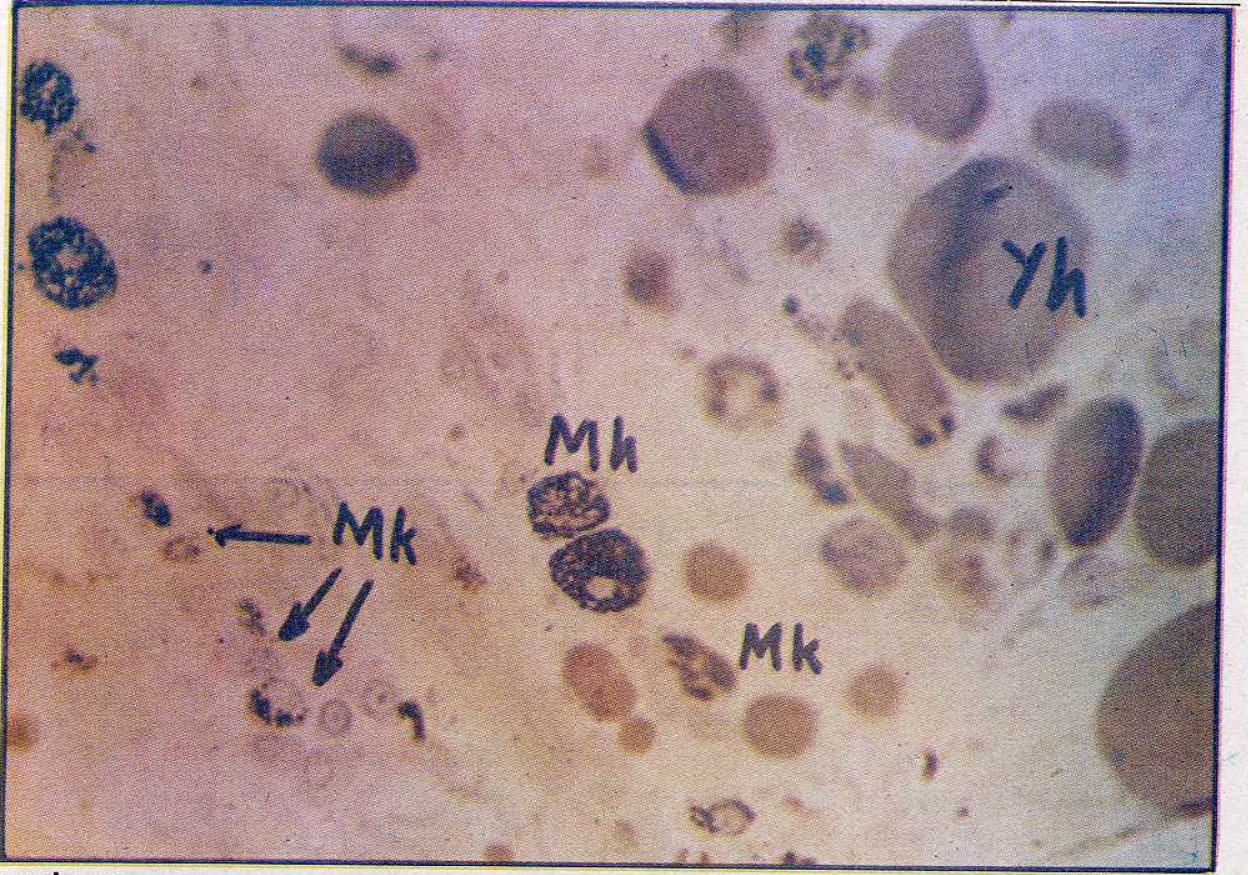
ŞEKİL 4 — Deney 1 (IXS). Medulla bölgesinden bir kesit. Boya : Gomcri'nin retikulum yöntemi. X 40.



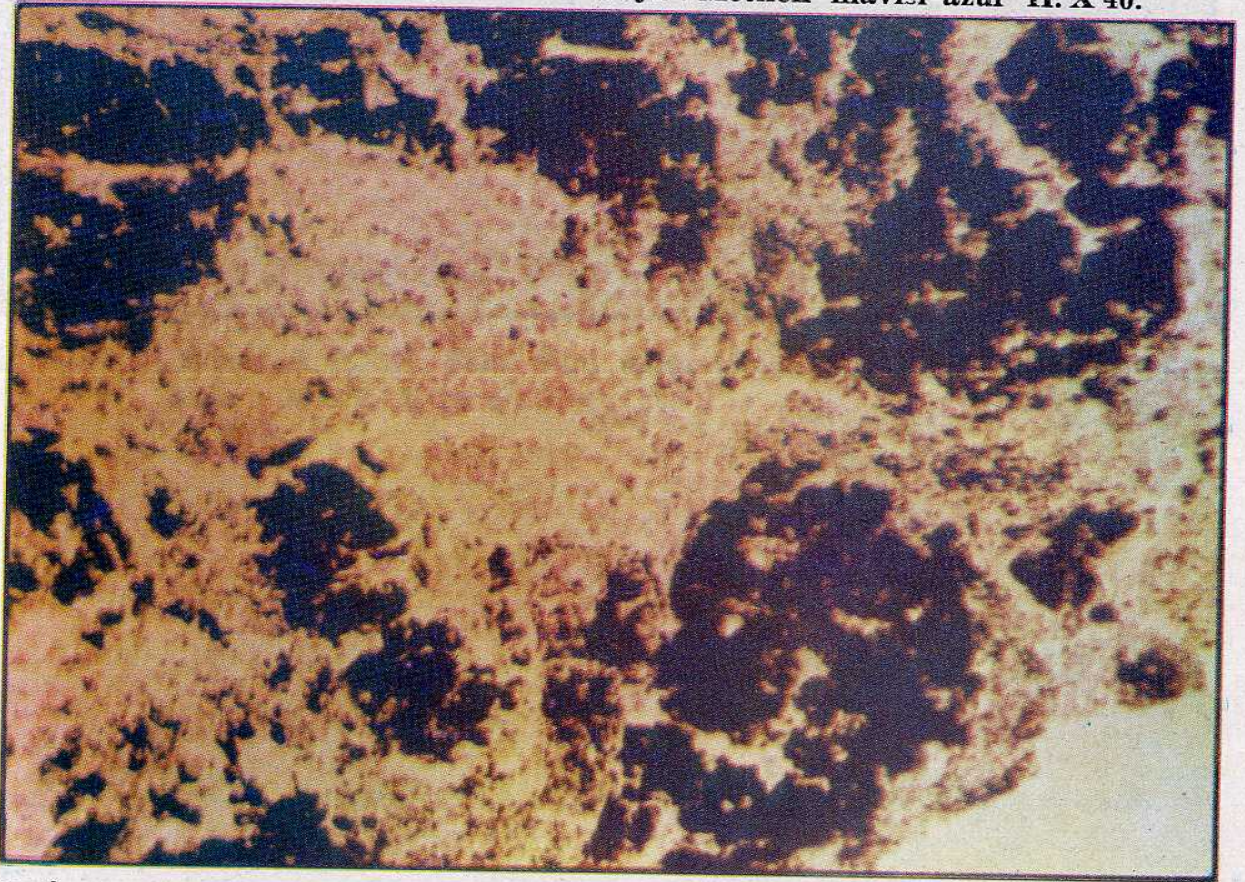
ŞEKİL 5 — Deneş 5 (2XM+2Xs). Lenf düğümünün medullar bölgesi. Prioninofili gösteren bol miktarda plazma hücreleri ve plamaolastlar. Boya : M.G.P. X 40.



ŞEKİL 6 — Deneş 6 (3XM+3XS). Başka bir lenf düğümünden kesit. Çin mürekkebi ile dolu makrofajlar gözlenmekte. Boya : M.G.P. X 40.



ŞEKİL 7 — Dency 7 (6XM+6XS). E.M. Bloklarından kalın kesit. Çin mürekkebi- ni almış makrofajlar kahverengi siyah renkte gözlendiği halde, mast hücreleri granülleri mavi renkte boyanmıştır. Mk, makrofaj; Mh, mast hücresi; Yh, yağ hücresi. Boya : Metilen mavisi-azur II. X 40.



ŞEKİL 8 — Dency 8 (6XM). Çin mürekkebini almış makrofajlar kümesi gözlen- mekte. Pırnofil pozitif hücrelerin son derece azalmış olduğu dik- kati çekmekte. Boya : M.G.P. X 10.



ŞEKİL 9 — Deneş 9 (6XS). Şekil 9'un daha büyük büyütmede bir görünümü.
Boya : M.G.P. X 25.