

8086.

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTUSU

NORMAL VE UV İLE İŞINLANMIŞ *Spalax leucodon*
(RODENTIA: SPALACIDAE)'da MEGAKARYOSİTLERİN IŞIK
MİKROSKOBUyla İNCELENMESİ VE BUNUN LÖKOSİT SAYISI
İLE İLİŞKİSİ

Mehtap YARDIMCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 17.01.1990 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından 85 (Seksenbeş) not takdir edilerek oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

T. Güven

Yard.Doç.Dr. Turan Güven

Orhan Akkol

Doç.Dr. Orhan Akkol

Z. Suludere

Doç.Dr. Zekiye Suludere

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

AK

Ö Z E T

Yüksek Lisans Tezi

NORMAL VE UV İLE İŞINLANMIŞ *Spalax leucodon*
(RODENTIA: SPALACIDAE)'da MEGAKARYOSİTLERİN IŞIK
MİKROSKOBUyla İNCELENMESİ VE BUNUN LÖKOSİT SAYISI
İLE İLİŞKİSİ

Mehtap YARDIMCI

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Yard.Doç.Dr. Turan GÜVEN
1990, Sayfa: 21

Jüri: Yard.Doç.Dr. Turan Güven
Doç.Dr. Orhan Akkol
Doç.Dr. Zekiye Suludere

Ultraviyole ile ışınlanmış ve kontrollerde *Spalax leucodon* (kör fareler)'un kemik iliğindeki megakaryositler ışık mikroskobu ile incelendi ve bunlardaki değişme lökosit sayısındaki değişme ile mukayese edildi. Ultraviyole ile 52, 112 ve 168 saat ışınlandırılan hayvanların lökosit sayısında, ışınlandırılmamış olanlara nazaran bir düşme tespit edildi. Lökosit sayısı düşük olan hayvanların kemik iliğinden yapılan yayma preparatlarda, çok sayıda megakaryositin sitoplazmasında lökosit gözlendi.

ANAHTAR KELİMELEER: *Spalax leucodon* (körfare), ultraviyole radyasyonu, kemik iliği, megakaryosit, lökosit sayısı.

A B S T R A C T

Masters Thesis

A LIGHT MICROSCOPIC STUDY OF THE MEGAKARYOCYTES
IN INTACT AND UV-IRRADIATED *Spalax leucodon*
(RODENTIA: SPALACIDAE) AND THEIR RELATIONSHIPS
WITH THE LEUCOCYTE NUMBER

Mehtap YARDIMCI

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor : Assoc.Prof.Dr. Turan GÜVEN
1990, Page: 21

Jury : Assoc.Prof.Dr. Turan Güven
Assoc.Prof.Dr. Orhan Akkol
Assoc.Prof.Dr. Zekiye Suludere

The megakaryocytes in the bone-marrow of intact and UV-irradiated *Spalax leucodon* (mole rats) were studied by light microscopy and the changes in megakaryocytes and leucocyte number were compared. Leucocyte numbers in animals exposed to ultraviolet light for 52, 112 and 168 hours were found to be less than those of unirradiated controls. In the smear samples prepared from bone-marrow of animals having lower leucocyte numbers, leucocytes have been observed in the cytoplasm of most of the megakaryocytes.

KEY WORDS: *Spalax leucodon* (mole rats), ultraviolet radiation, bone-marrow, megakaryocyte, leucocyte number.

TEŞEKKÜR

Bana bu konuyu yüksek lisans tezi olarak veren ve her safhada yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Yard.Doç.Dr. Turan GÜVEN'e teşekkür ederim. Deney düzeneklerinin kurulmasında emeği geçen ve çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm bölümümüz araştırma görevlilerinden Mustafa YEL'e, tabiattan canlı materyal temininde ve kan numunelerinin elektronik sayıcıda sayımı ile ilgilenen Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Yüksek Lisans öğrencisi, meslekdaşım Selami CANDAN'a da müteşekkirim.



İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE METOD	6
3. GÖZLEMLER VE SONUÇLAR	8
3.1. Işınlanmamış Hayvanlardan Alınan Megakaryositler	8
3.2. Işınlanmış Hayvanlardan Alınan Megakaryositler	8
3.3. Lökosit Sayısı ile Sitoplazmasına Lökosit Almış Megakaryosit Sayısı Arasındaki İlişki	11
3.4. Sonuçlar	13
4. TARTIŞMA	15
5. KAYNAKLAR	19

1. GİRİŞ

Kemik iliği; bazı lenfositler hariç, diğer kan hücrelerinin geliştiği ve farklılaştığı önemli bir doku olmasından dolayı, birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır (Behnke 1968, Behnke 1969, Beriman 1967, Bessis ve Gorius 1962, Brahim ve Osmond 1970, De Bruyn vd. 1970, Ebbe 1976, El Naggat vd. 1980, Epstein vd. 1971, Keller vd. 1983, Macpherson 1972, Osmond ve Nossal 1974, Owen vd. 1977, Paulus ve Mel 1967, Radley ve Scurfield 1979, Radley ve Haller 1983, Reincke vd. 1982, Ryser ve Vassali 1974, Tanum ve Engeset 1983, Tavassoli 1977, Weiss ve Chen 1975, Weiss 1976, Yoffey vd. 1965).

Kaba incelemelerde, görünüş bakımından "sarı" ve "kırmızı" olmak üzere başlıca iki çeşit kemik iliği tanımlanmaktadır.

Sarı kemik iliği, normal şartlarda kan yapımında etkili değildir. Ancak şiddetli kanama ve hipoksiya durumlarında kırmızı kemik iliğine dönüşerek hematojen hale gelmektedir (Junqueira vd. 1986).

Kırmızı kemik iliği kan yapımı bakımından aktif veya hematojendir. Ayrıca, eritrosit yıkımı ve hemoglobin parçalanması ile meydana gelen demirin depolanması bu ilikte gerçekleştirilir. Kırmızılık, ilikteki eritrositlerden ve bunların farklı gelişme fazındaki öncü hücrelerinden dolayıdır (Junqueira vd. 1986). Kırmızı kemik iliği, diğer hemopoietik dokulardaki gibi stroma, hemopoietik iplikler ve sinüzoidal kılcallardan oluşmuştur (Copenhaver vd. 1971, Fawcett 1986, Junqueira vd. 1986). Stromada makrofajlar (retiküler hücreler) ve adventitial hücreler bulunmaktadır. Eritroblastik adacıkların merkezinde görülen makrofajların görevi, eritroblastlara demir nakli yapmak ve olgun eritrositlerin dışarıya atılan çekirdeklerini fagosite etmektir (Fawcett 1986, Junqueira vd. 1986). Yaşlı eritrositlerin yıkımı kemik iliğindeki makrofajların diğer önemli bir görevidir. Adventitial hücreler, sinüslerin endotelyumu altında bulunur. Bunlar fagositik değildir; sitolojik özellikleri fibroblastlara benzer. Kemik iliğindeki hemopoietik iplikler, olgunlaşma geçiren çeşitli kan hücrelerini (hemopoietik hücreler) ihtiva eder.

V. C.

**Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi**

Makrofajlar (retiküler hücreler), hemopoietik hücreler ve yağ hücreleri, memelilerin kemik iliğindeki ince duvarlı bir sinüs sisteminin çevresini doldurmuşlardır (Fawcett 1986). Bu durum, memelilerdeki kan yapımının ekstravasküler olduğunu ve buralarda olgunlaşan kan hücrelerinin sinüs duvarlarından kan dolaşımına geçtiğini göstermektedir (Copenhaver vd.1971, Fawcett 1986,Junqueira vd. 1986). Kan yapımında, kemik iliğinin morfolojik ve fonksiyonel birimleri olan "eritroblastik adalar" sinüslerin uzağında yer aldığı halde, trombopoiesis ile ilgili olan megakaryositler sinuzoidlere yakın bulunurlar.

Kemik iliğinde gerçekleşen trombopoiesis önemli bir olaydır. Bu olayın sonunda meydana gelen trombositler veya plateletler, omurgalılardaki doku yaralanmaları ve başka sebeplerle meydana gelen kanamalarda pıhtılaşmayı sağlayarak kan kaybına engel olan hücresel elemanlardır. Aşağı omurgalılarda trombositler, tromboplast denilen öncü hücrelerin farklılaşması ve birbirini takip eden bölünmelerle gelişen çekirdekli hücrelerdir (Fawcett 1986,Tavassoli 1980). Bunlar tıpkı eritroblastlardan eritrositlerin meydana gelmesine benzeyen bir olayla şekillenirler. Memelilerin çekirdeksiz plateletleri ise, kemik iliğindeki megakaryositler içinde şekillenen demarkasyon membran sistemi (DMS) denilen bir membran sistemi ile sitoplazmadan ayrılan parçalardır (Behnke 1968, 1969, Macpherson 1972, Shaklai ve Tavassoli 1978, Tavassoli 1980). Fawcett (1986) ve Tavassoli (1980), bir megakaryositin 4000-8000 platelet üretebilecek kapasitede olduğunu belirtmektedirler. Yapı ve menşe bakımından farklı olmasına rağmen, memelilerdeki plateletler; amfibi, sürüngen ve kuşların çekirdekli trombositlerine eş bir fonksiyona sahiptir. Ciddi bir pıhtılaşma defekti olan trombositopenia, plateletlerin az üretilmesinden kaynaklanır. Plateletlerin yapı ve fonksiyonlarındaki anormallikler ise, trombositopatia denilen başka bir pıhtılaşma defektine sebep olur. Memelilerdeki plateletlerin organizma hayatı için önemi tartışılmayacak derecede açıkken, bunların kaynağı durumunda olan megakaryositlerin de o derece önemli olması gerekir. Bu yüzden, insan, sıçan ve fare gibi memelilerin kemik iliğindeki megakaryositler ve plateletler ile ilgili çok sayıda çalışmaya rastlanmaktadır (Behnke 1968, 1969, Bentfeld ve Bainton 1975, Bentfeld

ve Bainton 1982, Ebbe 1976, Macpherson 1972, Paulus 1967, Paulus ve Mel 1967, Penington 1979, Radley ve Haller 1983, Shaklai ve Tavassoli 1978, Tavassoli 1980). Çalışmaların büyük bir kısmı, kemik iliği megakaryositlerinin normal yapı ve fonksiyonları ile ilgilidir.

Paulus ve Mel (1967), mekanik ve enzimatik olarak çıkarılan sıçan kemik iliğinde megakaryositlerin canlı kalabilme yeteneklerini incelemişlerdir. Mekanik metodlarla alınan kemik iliği süspansyonlarında, nigrosin ile ölçülen megakaryosit canlılığının oranı % 20.3 \pm 2.7, enzimatik (kollagenaz) metoduyla hazırlanan süspansyonlardaki megakaryosit canlılığının oranı ise % 65 \pm 4.2 olarak tesbit edilmiştir. Morfolojik gözlemlerin aydınlık alan, faz-kontrast ve interferans mikroskoplarıyla yapıldığı bu çalışmada, megakaryosit incelemeleri için hazırlanacak numunelerin hücreye fiziksel zarar vermeyen metodlarla alınması tavsiye edilmiştir.

Paulus (1967), "megakaryosit ve plateletlerde çok yönlü farklılaşma" başlığı ile yayınladığı bir "tarama makale" (review) de, megakaryositleri poliploid bir bez hücresi olarak değerlendirirken, plateletleri de kontraktıl, endositik ve çekirdeği olmayan elemanlar şeklinde mütalâa etmiştir.

Behnke (1968,1969), sıçan kemik iliğindeki megakaryositlerin ince yapısını, demarkasyon membran sistemi (DMS) nin gelişimini ve platelet yüzey örtüsünü incelemiştir. Araştırmacıya göre DMS, megakaryosit plazma membranının bir türevi olup bu sistemde görülen kesintisiz boşluklar, hücrelerarası boşlukların devamıdır. Araştırmacı, rutenyum kırmızısı ve lantanum iyonları ile platelet yüzeylerini boyayarak bunların megakaryositten köken aldığını göstermiştir.

Sıçan kemik iliğindeki stromanın ince yapısını taramalı ve geçirmeli elektron mikroskobu teknikleriyle çalışan Weiss (1976), daha ziyade kemik iliğinin kan yapan mikro çevresi üzerinde durmuştur. Küçük adacıklar halinde kümeleşen eritroblastlar ve megakaryositlerin sinüslerin hemen dışında bulunduğunu gözlemiştir. Bu araştırmacı, retüküler hücrelerin hematopoietik hücreler üzerinde fiziksel bir destek sağladığını açıklamıştır.

Shaklai ve Tavassoli(1978), "dondurup kırma"(freez fracture) tekniğini kullanarak sıçan megakaryositinde demarkasyon membran sisteminin (DMS) kökeni ve gelişimi ile platelet demarkasyon mekanizmasını incelemişlerdir. Bu araştırmacılar, DMS'nin megakaryosit sitoplazması içinde delikli membran plakaları gibi olduğunu göstererek ince yapının ayrıntılarına girmişlerdir.

Tavassoli (1980), megakaryositlerde platelet oluşumu ve serbest bırakılması ile ilgili tarama makalesinde, konuyu "hücre biyolojisi" açısından ele alarak tartışmıştır. Araştırmacı, son yıllarda bu olayı anlamamızı kolaylaştıran yeni bilgiler ortaya konulduğunu ve bazı eski kavramların değiştiğini ifade etmiştir.

Macpherson (1972), sıçan kemik iliği megakaryositlerindeki DMS'nin kökeni ve gelişimi ile ilgili çalışmasında bu sistemin başlangıcının iki çekirdekli megakaryositlerin yüzey membranlarından uzanan psödopodların varlığı ile açıklanabileceğini belirtmiştir. Ayrıca, gelişen membranların granüllü endoplazmik retikulum ile yakın ilişki içinde olduğuna da işaret etmiştir.

Radley ve Haller (1983) ışık ve elektron mikroskop teknikleri ile fare kemik iliğindeki yaşlı megakaryositlerin akibeti üzerinde bir çalışma yapmışlardır. Bu araştırmacılar, bozulan megakaryositlerin çekirdeklerinde ve membranla çevrili çekirdek parçalarında 7 nm çapında paralel filament yığınları tespit etmişlerdir.

Literatür taramalarında, körfarelerin (*Spalax leucodon*) kemik iliği megakaryositleri üzerinde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bilindiği gibi, körfareler bütün hayatlarını yer altında kurdukları kapalı bir sistemde geçirirler. Yaşadıkları toprağın her çeşit mahalli özelliklerine ve bitki varlığına sıkı sıkıya bağlı oldukları halde, doğrudan güneş radyasyonuna maruz kalmazlar. Körfarelerin bu özellikleri, onların radyasyon çalışmalarında uygun bir deney hayvanı olarak değerlendirilmesi bakımından önem taşımaktadır.

Birçok organizmanın dışı açık yapıları üzerinde, ultraviyole gibi kısa dalga boylu radyasyonların etkisi gayet iyi bilinmektedir (Applegate vd. 1985, Epstein vd. 1971, Johnston vd. 1984, Nix

vd. 1964, Nix vd. 1965). Nükleer güç merkezleri başta olmak üzere, nükleer kaza ve denemeler insanoğlunu tehdit eden başlıca sun'î radyasyon kaynaklarıdır. Son 10 yıl içinde yapılan tespitlere göre, kloroflorokarbon (CFC) ve diğer kirleticilere bağlanan ozon oluşumunun engellenmesi, insanoğlunun bundan sonra daha fazla radyasyona maruz kalacağını göstermektedir (Stolarski 1988). Radyasyonun memeliler üzerindeki etkisi sadece dışa açık yapılarda değil, kemik iliği gibi vücudun oldukça iç kısımlarındaki en hayati dokular üzerinde de görülmektedir. X- ışınları ve gamma radyasyonuna tutulan veya maruz kalan memelilerde, kemik iliğinin normal faaliyetini sürdüremediği ve az sayıda hücre ürettiği bilinmektedir (Baum vd. 1970, Guyton 1977, El-Naggar vd. 1980, Rabotti 1964, Stewart vd. 1982, Strand 1978). "Kemik iliği aplasia'sı" denilen bu durum, atomik radyasyonun yoğun olduğu bölgelerde yaşayan insanlarda görülmekte ve birkaç hafta içinde öldürücü olabilmektedir (Guyton 1977). Kemik iliğinde üretilip de kana verilen lökositlerin radyasyon etkisiyle azalan hücre tipleri arasında olduğu gösterilmiştir (Heit vd. 1970, Leong vd. 1964).

Bu çalışmanın amacı, ultraviyole radyasyonuna tutulan körfarelerin kanlarında bir lökosit azalması olup olmadığını ve azalmanın megakaryositlerle ilişkisi bulunup bulunmadığını göstermektedir. Elde edilen bulgulara dayanarak varılan sonuçların diğer memeli türlerine de uygulanabilirliği, çalışmanın önemini arttırmaktadır.

2. MATERYAL VE METOD

Çalışmada kullanılan körfareler (*Spalax leucodon*) Ankara civarından tutulmuş, boyutları 50x30x120 cm. olan, tabanında 20-25 cm. toprak örtü bulunan ve kenarları camlı özel bir kafeste (terrarium) beslenmiştir. Hayvanlara besin olarak patates, havuç, yer elması ve salatalık verilmiştir. Radyasyona tutulmadan önce, hayvanların sırtlarında 12 cm²'lik bir alan jiletle traş edilmiştir.

Kemik iliği numuneleri, 4'ü erkek 4'ü dişi olmak üzere toplam 8 fertten alınmıştır. Bunlardan 6 tanesi (3 ♂, 3 ♀) ultraviyoleye maruz bırakılmış, 2 tanesi de (1 ♂ ve 1 ♀) "kontrol" olarak kullanılmıştır. Hayvanlar ultraviyole kaynağından 36 cm. mesafede tutulmuş, her fert ayrı ayrı 52, 112 ve 168 saat radyasyona maruz bırakılmıştır. Işınlandırma sürekli yapılmamış, her fert için bir saatlik "beslenme aralığı" verilerek günde 8 saat ultraviyole altında tutulmuştur. Bütün ışınlandırmalar gündüz yapılmıştır. Ultraviyole kaynağı olarak, terrariumun üst kapasına yansıtıcısı ile birlikte monte edilen 90 cm. uzunluğunda ve 30 W gücünde "Mazda TG" marka lamba kullanılmıştır. A.Ü. Fen Fakültesi Fizik Bölümünde yapılan spektrofotometrik ölçümlere göre, bu lambanın neşrettiği ultraviyole ışınlarının dalga boyu 254 ± 10 nm olarak tespit edilmiştir. Radyasyon kaynağının hayvana olan uzaklığı, radyasyon neşreden lamba yüzeyi, lambanın gücü ve ışınlandırma süresi aşağıdaki bağıntıda yerine koyulduğu zaman, bir saniyede bir cm²'ye düşen ışık enerjisinin joule olarak değerini hesaplamak mümkündür.

$$I : \frac{P \times t}{S}$$

P : Güç (Watt olarak)

t : Zaman (Saniye olarak)

S : Aydınlanan yüzey

$$S : 2nr \times 90 \text{ cm}$$

r : Işınlanan hayvan ile lamba

arasındaki mesafe olup 36 cm'dir.

Bilinen değerlerden hareket edildiğinde 52 saat ışınlandırma ile bir cm^2 ye 276 joule, 112 saat ışınlandırma ile bir cm^2 ye 594 joule ve 168 saat ışınlandırma ile bir cm^2 ye 891 joule'lük enerji düşmektedir.

Radyasyonda tutma süreleri bittikten sonra, 1 gr. vücut ağırlığına 0,001 mg anestetik madde düşünülerek, hayvanlara intramüsküler olarak 1:1 oranında "Ketalar-Rompun" karışımı enjekte edilmiştir. Enjeksiyonu müteakip 3-5 dakika içinde genel anestezi sağlanmış, lökosit sayımı için kalpten kan numunesi alınmıştır. Antikoagülan olarak her mililitre kana 1.5 mg EDTA ilâve edilmiştir. Lökosit sayımı hem Contraves Digicell 3100-H marka elektronik sayıcıda, hem de klasik metodla yapılmıştır. Kan numunesi alınan hayvanın femuru iki taraflı kesilerek, çelik iğneli enjektörle kemik iliği çıkarılmıştır. Alınan kemik iliği numunesi lâm üzerine yayılarak havada kurutulmuş, mutlak metil alkolde 20 dakika tespit edildikten sonra, boya olarak Sorensen'in fosfat (pH 6,6) tamponu ile hazırlanan Giemsa kullanılmıştır. Yayma Preparatlar Olympus Vanox ışık mikroskopunda incelenerek mikrografları alınmıştır. Megakar-yositlerin çapları, her hücrenin dar ve geniş kısımlarından alınan ölçülerin ortalamasından hesaplanmıştır.

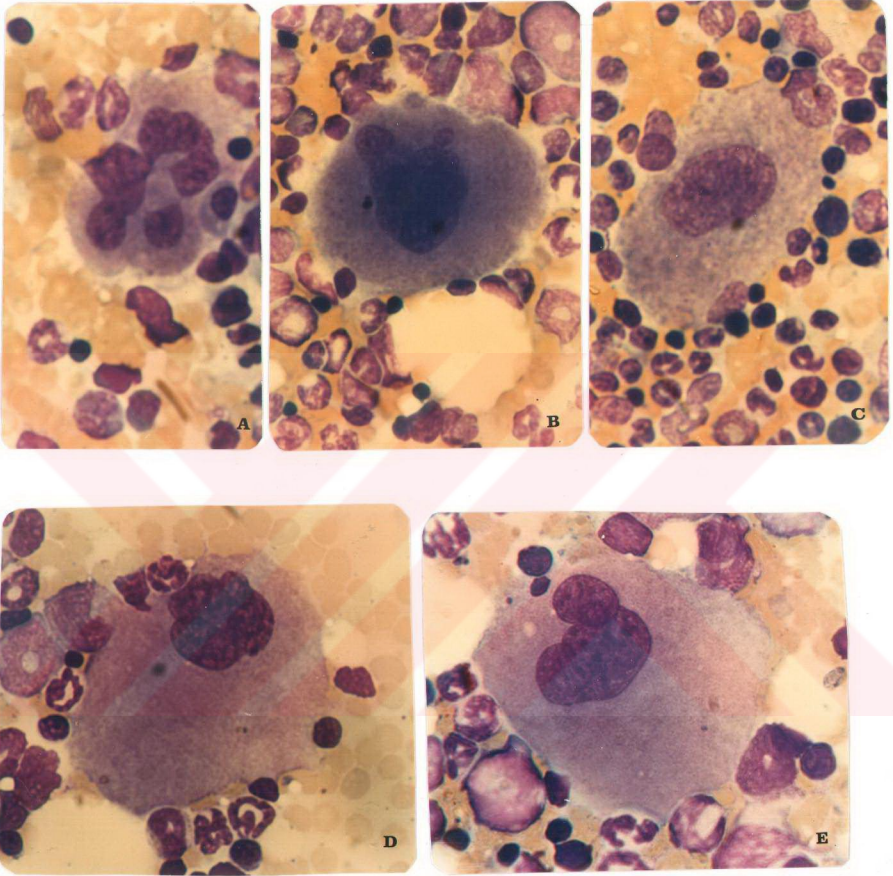
3. GÖZLEMLER VE SONUÇLAR

3.1. Işınlanmamış Hayvanlardan Alınan Megakaryositler

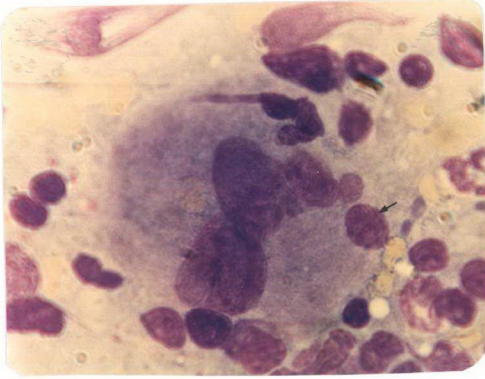
Spalax leucodon'dan alınan kemik iliğinde, kan hücreleri ve bu hücrelerin öncü tipleri net bir şekilde görülmektedir. Eritrositler ve eritrosit öncüleri, lökositler ve lökosit öncüleri arasında megakaryositler tipik şekilleriyle kolayca tanınırlar. Büyüklükleri 50-70 μ arasında değişir. Çekirdekleri büyük, tek loblu, çok loblu ve koyu boyanmıştır (Şekil 3-1 A,B,C,D,E). Çekirdek her zaman hücrenin merkezinde bulunmaz (Şekil 3-1.D,E). Loblar arasında bazen ince bir bağlantı görülür; bazılarında da sanki birçok çekirdiğin yanyana gelerek kaynaşması gibi bir şekil gösterir (Şekil 3-1 D,E). Çekirdekçiği ayırt etmek güçtür. Sitoplazma granüller ve ağısı bir yapıda olup, hücrede büyük yer işgal eder. Çekirdek hariç, diğer organeller belirgin değildir. Sitoplazmada kırmızıya boyanmış küçük granüller farkedilir (Şekil 3-1 C). Işınlandırılmamış kontrol hayvanlarından hazırlanan kemik iliği yaymalarında, bazı megakaryositlerin sitoplazmalarına lökosit aldığı veya almak üzere olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3-1 A,B,C,D,E).

3.2. Işınlanmış Hayvanlardan Alınan Megakaryositler

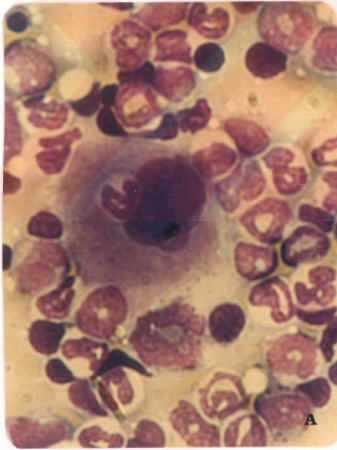
Ultraviyole ile 52, 112 ve 168 saat ışınlandırılan *Spalax leucodon*'un kemik iliğindeki megakaryositler, şekil bakımından önemli farklılıklar göstermez; fakat normal megakaryositlere nazaran sitoplazmalarına lökosit alan megakaryositlerin sayısında bir artma farkedilir. Bazı megakaryositlerde bir, bazılarında da 4-5 tane lökosit bulunabilmektedir. Ayrıca hücre hudutları normal megakaryositlere göre biraz daha belirsizleşmiş, bazılarında da psödopod benzeri uzantı meydana gelmiştir. Dikkati çeken diğer bir husus da çeşitli kan hücreleri ve bunların öncülerinin megakaryosit yüzeyine yapışık bir manzara göstermesidir. Bu durum, özellikle 112 saat ışınlanan hayvanların kemik iliği megakaryositlerinde daha belirgindir (Şekil 3-3). Körfarelerden 52 saat ışınlandırılanların megakaryositlerinde daha ziyade 1-2 lökosit görüldüğü halde (Şekil 3-2), 168 saat ışınlandırılanların megakaryositlerinde en az 3-5 lökosit bulunabilmektedir (Şekil 3-4).



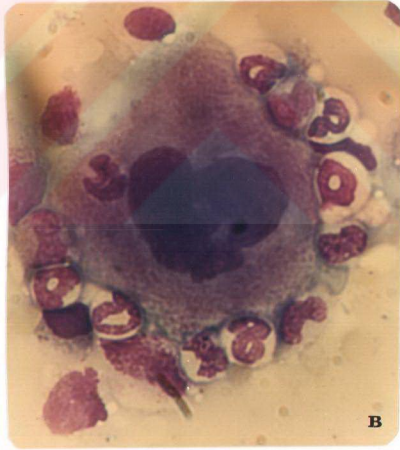
Şekil 3-1. Işınlanmamış *Spalax leucodon*'un kemik iliğinden megakaryositler.
 (A) Çekirdek lobları arasında tıpkı nütrofil lökositteki gibi bağlantılar bulunduran megakaryosit.
 (B) Sitoplazmasına lökosit almış bir megakaryosit.
 (C) Lobsuz çekirdekli megakaryosit.
 (D ve E) Birleşik loblu ve eksantrik çekirdekli megakaryositler. X1000



Şekil 3-2. 52 saat ışılandırılan bir *S. leucodon*'un kemik iliği megakaryositinde lökosit (ok) X1000

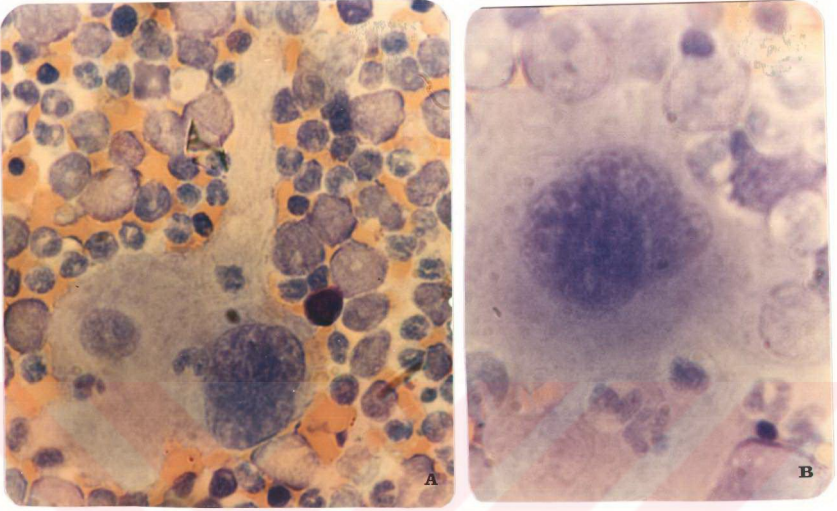


A



B

Şekil 3-3. 112 saat ışılandırılmış *S. leucodon*'dan alınan kemik iliği megakaryositleri.
 (A) Çekirdek yakınına kadar sitoplazmasına lökosit almış megakaryosit.
 (B) Sitoplazmasına lökosit almış ve çok sayıda lökositini yüzeyinde tutan megakaryosit. X1000



Şekil 3-4. 168 saat ışınlandırılmış *S. leucodon*'dan alınmış kemik iliği megakaryositleri.
 (A) Psodopod benzeri uzantı ve sitoplazmada altı lökosit görülmektedir.
 (B) Sitoplazmasına birden fazla lökosit almış başka bir megakaryosit. X1000

3.3. Lökosit Sayısı ile Sitoplazmasına Lökosit Almış Megakaryosit Sayısı Arasındaki İlişki

Işınlandırılmış ve ışınlandırılmamış körfarelerden alınan kemik iliği numuneleri dikkatlice incelendiğinde, sitoplazmasına lökosit almış megakaryosit sayısı ile 1 mm^3 kandaki lökosit sayısının ilişkili olduğu farkedilir.

Kontrol hayvanlarından yapılan kemik iliği preparatlarında toplam 50 megakaryosit sayılmış, bunların %28 (14 tanesi)'inin sitoplazmasında lökosit olduğu gözlenmiştir (Tablo 3-1). Aynı kontrol hayvanlarının kalbinden alınan 1 mm^3 kan numunesinde, elektronik kan sayıcı ile 4100 lökosit sayılmıştır (Tablo 3-2). Bu değerler, hem megakaryositler için hem de lökositler için temel alınmış; azalma ve artmalarda kıstas kabul edilmiştir.

Tablo 3-1. Işınlanmış ve ışınlandırılmamış *S. leucodon* kemik iliği yayma preparatlarında sitoplazmalarına lökosit almış megakaryositlerin sayısı ve yüzdeleri.

	Preparat Sayısı	Sayılan Megakaryosit	İçinde Lökosit Bulunan Megakaryosit Sayısı	Lökosit Bulunduran Megakaryositin Toplam Megakaryosite göre yüzdesi	Normale Göre Yüzde Farkları
Işınlanmamış (Kontrol)	4	50	14	% 28	-
52 saat ışınlandırılmış	4	25	12	% 48	% 20
112 saat ışınlandırılmış	4	47	21	% 45	% 19
168 saat ışınlandırılmış	8	178	86	% 48	% 20

Hayvanların 52 saat ışınlandırılmış olanlarından hazırlanan 4 numuneden 25 megakaryosit sayılmış, bunların % 48 (12 tanesi)'nin sitoplazmasında lökosit olduğu gözlenmiştir (Tablo 3-1). Bu duruma göre, sitoplazmasına lökosit almış megakaryositlerin normalden % 20 oranında daha fazla olduğu görülmektedir. Aynı hayvandan alınan 1 mm³ kan örneğinde, lökosit sayısı 4100'den 3000'e düşmüştür (Tablo 3-2). Düşen miktar 1100 olup, kontrol hayvanlarındaki normal lökosit sayısına göre bu azalma oranı yaklaşık % 27'dir (Tablo 3-2).

Hayvanların 112 saat ışınlandırılmış olanlarından toplam 4 preparat hazırlanmış ve bunlardan 47 megakaryosit sayılmıştır. Megakaryositlerden % 45 (21 tanesi)'nin sitoplazmasında lökosit olduğu görülmüştür (Tablo 3-1). Aynı hayvandan alınan 1 mm³'lük kan numunesinde lökosit sayısı 2450 olarak tespit edilmiştir. Bu lökosit sayısının kontrol hayvanlarındakine göre azalan miktarı 1650 olup, yaklaşık % 40 oranındadır (Tablo 3-2).

Tablo 3-2. Işınlanmış ve ışınlanmamış *S. leucodon*'un 1 mm³ kanındaki lökosit sayıları, bunların normale göre azalma miktarı ve yüzdeleri

	1 mm ³ kandaki Lökosit Sayısı	Normale Göre Azalma Miktarı	Normale Göre Azalma Yüzdesi
Işınlanmamış (Kontrol)	4100	-	-
52 saat ışınlandırılmış	3000	1100	% 27
112 saat ışınlandırılmış	2450	1650	% 40
168 saat ışınlandırılmış	2500	1600	% 39

Körfarelerin 168 saat ışınlandırılmış olanlarından toplam 8 kemik iliği yayması yapılmış ve bu preparatlardan 178 megakaryosit sayılmıştır. Sayılan megakaryositlerden % 48 (86 tanesi)'nin sitoplazmalarında lökosit olduğu görülmüştür. Bu oran, ışınlanmamış kontrol hayvanlarındaki lökositli normal megakaryosit oranından % 20 daha fazladır (Tablo 3-1). Aynı hayvandan alınan 1 mm³ kandaki lökosit sayısının 2500 olduğu tespit edilmiştir. Kontrol hayvanındaki lökosit sayısına göre azalma miktarı 1600 olup, bunun da oranı % 39'dur (Tablo 3-2).

3.4. Sonuçlar

Ultraviyole ile ışınlandırılan körfarelerin 1 mm³ kanındaki lökosit sayısı, ışınlandırılmamış olanların lökosit sayısından daha düşüktür.

Işınlandırılmış körfarelerden hazırlanan kemik iliği yaymasında, sitoplazmasına lökosit almış megakaryosit sayısı, ışınlandı-

rılmamış olanların aynı özelliği taşıyan megakaryositlerinden daha fazladır.

Ultraviyole ile ışınlanan körfarelerde, kemik iliği megakaryositlerinin lökosit tutma özellikleri artmış görünmektedir. Kemik iliğinde rezerv olarak bulunan lökositlerin bir kısmının megakaryositler tarafından tutulduğu gözlenmiştir.

4. T A R T I Ő M A

Çalışmamızda kullandığımız *Spalax leucodon*, hayatını toprak altında açtığı galeri ve yuvalarda geçiren bir hayvandır. Körfarelerin tabiatından tutularak laboratuvar şartlarında 45 gün yaşatılması mümkün olmuştur. Deney hayvanı olarak körfareleri seçişimizin sebebi, bunların ultraviyole gibi güneşten gelen tabii radyasyona direkt olarak maruz kalmamalarıdır. Ultraviyole ışınlarının etkisini, tabii şartlarda bu ışınları alan bir organizmada değil, körfare gibi bir hayvanda denemenin daha sağlıklı sonuç vereceğini düşündük. Şayet toprak üstünde yaşayan bir memeli türünü tercih etseydik, o zaman bu hayvanların kontrolümüz dışında tabiatından aldığı ultraviyole radyasyonunu da ölçmemiz gerekecekti ki, bunun da imkânsızlığı ortadadır. Yerinde bir düşünce olarak, tabiatında yaşayan hiç bir canlının düşük şiddette iyonize radyasyondan izole edilemeyeceği söylenebilir. Gerçekten, "background radyasyon" denilen radyasyon çeşidi, uranyum ve toryum gibi ağır metal atomlarının devamlı bozulmasıyla toprak bünyesinde de meydana gelebilmektedir.

İşınlanmış ve işınlanmamış *Spalax leucodon*'un kemik iliği megakaryositleri arasında bariz bir yapı farkı göze çarpmaktadır. Bu da beklenen bir durumdur; çünkü kemik iliği megakaryositleri radyasyona karşı dayanıklı hücre tipleri arasında sayılmaktadır.

Eğer ince yapı ile ilgili farklar ve değişiklikler varsa, çözme gücünün yetersizliği sebebiyle bunları ışık mikroskobunda görmek imkânsızdır. Ultraviyole radyasyonunun bu hücrelerin yapıları üzerinde etkili olup olmadığını göstermek için, elektron mikroskobik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Spalax leucodon'un kemik iliği megakaryositleri, diğer memelilerin megakaryositlerine benzemektedir. Belirgin bir şekilleri yoktur. Tipik karmaşık loblu çekirdekleri ağırsı-granüler sitoplazmaları ve büyüklükleri ile kolayca tanınırlar. Çekirdeğin karmaşık loblu oluşu, poliploid özelliğinden kaynaklanmaktadır. İşınlanmamış kontrol hayvanlarının kemik iliği megakaryositlerinden çok azının sitoplazmalarında lökosit gözlenmiştir. Bu durum, megakaryositlerin

normalde lökosit alabilecek kadar fagositik olduklarını akla getirmektedir. Aneak 52, 112 ve 168 saat ışınlandırılan körfarelerden hazırlanan kemik iliği yaymalarında, lökositli megakaryosit sayısının normale göre arttığı görülmüştür (Tablo 3-1). Işınlanmış hayvanlarda gözlemlenen diğer bir durum da, kandaki lökosit sayısının düşmesidir. Tablo 3-2'nin verileri ultraviyoleye tutulmuş ve kontrol körfarelerinde 1 mm³ kandaki lökosit miktarını göstermektedir. Tablodan da anlaşıldığı gibi, ışınlanmış hayvanların kanındaki lökosit miktarı kontrol hayvanlarındaki miktardan oldukça düşüktür. Deneylerimizden elde ettiğimiz bu sonuçlar, radyasyonda tutulan memelilerden elde edilen sonuçlarla bağdaşmaktadır. Aşırı ölçüde X-ışınları veya gamma radyasyonuna maruz kalan memelilerde ve nükleer kaza merkezlerine yakın yaşayan insanlarda, kemik iliği aplasia'sı olduğu, 1950'li yıllardan beri bilinen bir husustur. Heit vd. (1970), fareleri 4-5 gün süre ile X-ışınları radyasyonuna maruz bıraktıktan sonra, kemik iliğinin aplastik hale geldiğini ve sonunda kan hücrelerinin sayısının çok düştüğünü gözlemiştirler. Bu araştırmacılar 700 rad'lık doz uygulamasından 6 gün sonra kemik iliğindeki hücrelerde de bozulmalar tespit etmişlerdir. Leong vd. (1964), minimum değerde radyasyona maruz kalan farelerde bile lökosit sayısının düştüğüne işaret etmişlerdir. Yukarıda zikredilen araştırmacılar, lökosit sayısındaki düşüşün, kemik iliği aplasia'sı ile ilgili olduğunda birleşmektedirler. Hattâ, Stewart ve arkadaşları (1982) nın belirttiklerine göre, 375-425 rad'lık doz aralığında, 8 gün ışınlanan farelerin kemik iliği o derece bozulmaktadır ki, transplantasyon bile kurtarıcı olamamaktadır. Işınlanmış körfarelerdeki lökosit sayısının düşmesi, ileri derecede değilse de, böyle bir kemik iliği aplasia'sı ile bağlantılı olabilir. Hangi sebeple oluşursa oluşsun, bütün kemik iliği aplasia'sında temel gösterge daha az hücre üretilmesidir. Vücut radyasyona maruz kaldığı zaman, sayısı düşen ilk hücreler lenfositler, daha sonra da granülositlerdir*. Bu durumda, immün sistemin zarar görmesinden dolayı, şiddetli

* Atomic Radiation: Theory, Biological Hazards, Safety Measures, Treatment of injury. Philadelphia ve Chicago üniversiteleri ile Oak Ridge Nükleer Araştırma Enstitüsünün Ortak Raporu.

bir kemik iliği aplasia'sının öldürücülüğü gayet açıktır (Guyton 1977, Stewart vd. 1982). Işınlanan körfarelerin kanındaki lökosit düşüşü ile içlerine lökosit almış megakaryosit sayısının artışı arasında bir ilişki kurulabilir; fakat bunun mekanizmasını mevcut bilgilere göre yorumlamak zorundayız. Ultraviyole radyasyonu, megakaryositleri bilinmeyen hormonal bir mekanizma ile etkileyerek, onların kemik iliğindeki rezerv lökositleri içlerine alma kapasitesini yükseltebilir. Gerçekten kemik iliği, dış çevredeki küçük değişikliklere oldukça çabuk cevap veren bir dokudur. Meselâ, yüksek rakımlardaki oksijen azalması, insanların kemik iliğindeki eritrosit üretimini hemen uyarır. Radyasyonun da kemik iliğinde buna benzer çabuk bir etki göstermesi gayet tabiidir. Böylece, bir yandan kemik iliğinde yeni lökosit yapılamamasından, bir yandan da rezerv lökositlerin megakaryositler tarafından aşırı alınmasından dolayı, kandaki lökosit sayısının azaldığı düşünülebilir. Aslında, ışınlanmamış kontrol hayvanlarının kemik iliği megakaryositlerinde de lökosit bulunmaktadır; fakat ışınlanmış olanlarda bu durumda olan megakaryositlerin sayısı arttığı gibi, çoğu kez bir megakaryosit içindeki lökosit sayısı da artmaktadır (Bkz.Şek.3-4 A,B). Burada tartışılması gereken ve hatta insanı ciddi bir şekilde endişeye sevkeden diğer bir mesele de ultraviyole ile elde edilen sonuçların "atomik radyasyon"la elde edilenlere benzerlik göstermesidir. Endişe sebebi, yaşadığımız her yerde ultraviyolenin varlığı ve bazen buna uzun süre maruz kalmamızdır. Acaba böyle bir durumda, yaz aylarında uzun süre ultraviyole almak, kemik iliğindeki lökosit üretimini düşürebilir veya megakaryositlerin rezerv lökositleri tutma kapasitesini artırabilir mi? Bilindiği gibi, ultraviyole radyasyonu, elektromagnetik spektrumda X-ışınından daha uzun, görünür ışıktan daha kısa dalga boyludur. Enerjisi yüksek olduğu için canlı organizmada çok kolay kimyasal değişiklikler meydana getirebilir. Meselâ deride steroid moleküllerin D-vitaminine dönüşümü ve DNA çift sarmalını bir arada tutan hidrojen bağlarının koparılması bunlar arasındadır. Dalga boyu 100-1700 Å olan "uzak ultraviyole radyasyonları", iyonizasyon için gerekli enerjiye sahiptirler. Canlı üzerinde daha çok etkili olan da bu ultraviyolelerdir. Bundan daha yüksek dalga boylu ultraviyole radyasyonu, canlılara aneak uzun süre (kronik) uygulandığı zaman zararlı olabilir. Ozon oluşumundaki aksaklığın, yeryüzüne inen ultravi-

yole radyasyonunu yükselteceği ve bunun sonucunda da deri kanseri, kataraktlar ve immün sistem yetersizliği gibi bozuklukların artacağı belirtilmektedir (Stolarski 1988). Gerçekten, ultraviyole radyasyonunun DNA gibi hücrenin genetik bilgisini taşıyan moleküllere de etkili olması, onun yararı yanında zararını da düşünmemiz gerektiğini ihtar ediyor.

Her ne kadar, deneylerimizde dalga boyu $2540 \pm 100 \text{ \AA}$ olan ultraviyole radyasyonu kullanılmışsa da, körfarelerden elde ettiğimiz sonuçlar oldukça anlamlıdır. Problemin kesin olarak aydınlatılması için elektron mikroskobu, biyokimya ve hatta moleküler biyolojik çalışmalara da gerek vardır.

5. K A Y N A K L A R

- APPLEGATE, L.A., STUART, T.D. and LEY, R.D., 1985. Ultraviolet radiation induced histopathological changes in the skin of the marsupial *Monodelphis domestica*. I. The effects of acute and chronic exposures and of photoreactivation treatment. *Brit.J.Dermatol.*, 113: 219-227
- BAUM, S.J., VARON, M.I., and WYANT, D.E., 1970. Radiation induced anemia in rats exposed repeatedly to mixed gamma-neutron radiation. *Radiat.Res.*, 41: 192-199
- BEHNKE, O., 1968. An electron microscope study of the megakaryocyte of the rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat. *J. Ultrastruct. Res.*, 24: 412-433.
- BEHNKE, O., 1969. An electron microscope study of the rat megakaryocyte. II. Some aspects of platelet release and microtubules. *J. Ultrastruct. Res.*, 26: 111-129.
- BENTFELD, M. E. and BAINTON, D.F., 1975. Cytochemical localization of lysosomal enzymes in rat megakaryocytes and platelets. *J.Clin.Invest.*, 56: 1635-1649
- BENTFELD, M.E., BAINTON, D.F., 1982. Identification of primary lysosomes in human megakaryocytes and platelets. *Blood.* 59:472-481.
- BERMAN, I., 1967. The Ultrastructure of erythroblastic islands and reticular cells in mouse bone marrow. *J. Ultrastruct. Res.*, 17: 291-313
- BESSIS, M.C. and BRETON-GORIUS, J., 1962. Iron metabolism in the bone marrow as seen by electron microscopy: A critical review. *Blood.*, 19: 635-663.
- BRAHIM, F. and OSMOND, D.G., 1970. Migration of bone marrow lymphocytes demonstrated by selective bone marrow labeling with thymidine ^3H . *Anat. Rec.*, 168: 139-160.
- COPENHAVER, W.M., BUNGE, R.P., BUNGE, M.B., 1971. Bailey's textbook of histology. Sixteenth edition. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- DE BRUYN, P.P.H, BREEN, P.C. and THOMAS, T.B., 1970. The microcirculation of the bone marrow. *Anat. Rec.*, 168: 55-68.
- EBBE, S., 1976. Biology of megakaryocytes. *Prog.Hemost.Thromb.* 3:211-229.
- EL NAGGAR, A.M., HANNA, I., R.A., CHANANA, A.D., CHARSTEN, A.L. and CRONKITE, E.P., 1980. Bone Marrow changes after localized acute and fractionated X-Irradiation. *Radiat. Res.*, 84: 46-52.

- EPSTEIN,W.L., FUKUYAMA,K. and EPSTEIN,J.H. 1971. Ultraviolet light, DNA repair and skin carcinogenesis in man. *Fed.Proc.*, Vol. 30 No.6. 1766-1771
- FAWCETT,D.W., 1986. A textbook of Histology. Eleventh Edition. W.B. Saunders Company. Philadelphia, London, Toronto, Tokyo.
- GUYTON, A.C., 1977. Fiziyoloji. Beşinci Baskı. (Çeviren: Muammer Bilge) Güven Kitapevi, Ankara.
- HEIT,H., FLIEDNER,T.M., FACHE,I., and SCHNELL,G., 1970. A comparasion of radiation-induced bone marrow degeneration in germ-free and conventional mice. *Radiat. Res.*, 41: 163-182.
- JOHNSTON,K.J, OIKARINER,A.I, LOVUE,N.J, CLARK,J.G. and UITTO,I., 1984. Ultraviolet radiation-induced connective tissue changes in the skin of hairless mice. *J. Invest. Dermatol.*, 82: 587-590
- JUNQUEIRA,L.C., CARNEIRO,J., LUNG,J.A., 1986. Basic Histology. Fifth Edition. Lange Medical Publications, Los Altos, California.
- KELLER,M.G., JOHNSON,G.R. and PHILLIPS, R.A., 1983. Hemopoiesis in spleen and bone marrow cultures. *J.Cell.Physiol.*, 1167: 7-15.
- LEONG,G.F., WISECUP,W.G., GRISHAM,J.W. 1964. Effects of divided doses of X-ray on mortality and haematology of small and large domestic animals. *Ann.N.Y. Acad.Sci.* 114:139-145.
- MACPHERSON,G.G. 1972. Origin and development of the demarcation system in megakaryocytes of rat bone marrow. *J. Ultrastruct. Res.*, 40: 167-177.
- NIX,T.E., NORDQUIST,R.E., SCOTT,J.R. and EVERITT,M.A., 1964. Ultrastructural changes in stratum corneum induced by ultraviolet light. *J. Invest.Dermatol.*, 43: 301-327
- NIX,T.E., NORDQUIST,R.E., SCOTT,J.R. and EVERITT,M.A., 1965. Ultrastructural changes induced by ultraviyiolet light in human epidermis: Basal and spinous layers. *J. Invest. Dermatol.*, 45: 52-64
- OSMOND,D.G. and NOSSAL,G.J.V., 1974. Differentiation of lymphocytes in mouse bone marrow. I. Quantitative radioautographic studies of antiglobulin binding by lymphocytes in the bone marrow and lymphoid tissue. *Cell. Immunol.*, 13: 117-131.
- OWEN,J.J.T. WRIGHT,D.E., HABU,S., RAFF,M.C. and COOPER, M.D., 1977. Studies on the generation of B-lymphocytes in fetal liver and bone marrow. *J. Immunol*, 118: 2067-2072.
- PAULUS,J.M. and MEL, H.C., 1967. Viability studies on megakaryocytes in mechanically and enzymatically suspended rat bone marrow. *Exp. Cell. Res.*, 48: 27-38.

- PAULUS, J.M., 1967. Multiple differentiation in megakaryocytes and platelets. *Blood.*, 29: 407-416.
- PENINGTON, D.G., 1979. The cellular biology of megakaryocytes. *Blood cells.*, 5:5-
- RABOTTI, G., 1964. Bone marrow and spleen patterns in mice irradiated and protected with homologous cells. *Ann.N.Y. Acad.Sci.*, 114:469-479.
- RADLEY, J.M. and SCURFIELD, G., 1979. Effects of 5-Fluorouracil on mouse bone marrow. *Brit. J. Haematol.*, 43: 341-351.
- RADLEY, J.M. and HALLER, C.J. 1983. Fate of senescent megakaryocytes in the bone marrow. *Brit. J. Haematol.*, 53: 277-287.
- REINCKE, U., HANNON, E.C. and HELIMAN, S., 1982. Residual radiation injury exhibited in long term bone marrow cultures. *J. Cell. Physiol.*, 142: 345-352.
- RYSER, J.E. and VASSALLI, P., 1974. Mouse bone marrow lymphocytes and their differentiation. *J. Immunol.* 113: 719-728.
- SHAKLAI, M. and TAVASSOLI, M., 1978. Demarcation membrane system in rat megakaryocyte and the mechanism of platelet formation: A membrane reorganization process. *J. Ultrastruct. Res.*, 62: 270-285.
- STEWART, D.A., LEDNEY, G.D., BAKER, W.H., DAXON, E.G., and SHEEHY, P.A., 1982. Bone marrow transplantation of mice exposed to a modified fission neutron (N/G-30:1) field. *Radiat.Res.*, 92: 268-279.
- STOLARSKI, R.S., 1988. The antarctic ozone hole. *Sci.Amer.*, 258(1): 20-26.
- STRAND, F.L., 1978. *Physiology: A regulatory systems approach.* Mac Millan Publishing Co., Inc. New-York.
- TANUM, G. and ENGESET, A., 1983. Low ploidy megakaryocytes in steady state rat bone marrow. *Blood.*, 62: 87-91.
- TAVASSOLI, M., 1977. Intravascular Phagocytosis in the rabbit bone marrow: A possible fate of normal senescent red cells. *Brit. J. Haematol.*, 36:323-326.
- TAVASSOLI, M., 1980. Megakaryocyte-platelet axis and the process of platelet formation and release. *Blood.*, 55(4): 537-545.
- WEISS, L, CHEN, L.T., 1975. The organization of hematopoietic cords and vascular sinuses in bone marrow. *Blood cells* 1:617
- WEISS, L., 1976. The hematopoietic microenvironment of the bone marrow: An ultrastructural study of the stroma in rats. *Anat. Rec.*, 186: 161-184.
- YOFFEY, J.M, HUDSON, G. and OSMOND, D.G., 1965. The lymphocyte in guinea-pig bone marrow. *J. Anat.*, 99: 841-860.

T. C.

Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi