

Sıçan Dalağında Makrofaj Alt Gruplarının Farklı Morfolojik Teknikler Kullanılarak İncelenmesi

Investigation of Macrophage Subgroups in Rat Spleen by Using Different Morphological Techniques

Deniz Billur¹

¹ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

Amaç: Dalak sahip olduğu özel morfoloji sayesinde, yaşlı hasarlı eritrositlerin yanı sıra patojenlerin kandan temizlenmesinde önemli rol üstlenir. Dalak makrofajları üzerinde yapılan çalışmalarda dalağın farklı bölgelerinde yerleşen makrofaj alt grupları tanımlanmıştır. Bu çalışmada sıçan dalağında bulunan makrofaj alt gruplarının intravenöz yolla verilen çini mürekkebine ve eritrositlere karşı fagositoz yeteneklerinin, lizozomal enzim aktivitelerinin ve ışık mikroskobu düzeyinde yapısal özelliklerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 18 adet Wistar Albino tipi erişkin erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar üç eşit gruba ayrıldı. Birinci gruba herhangi bir işlem yapılmadı. İkinci ve üçüncü gruptaki hayvanlara kuyruk veninden 1 ml/100 g olacak şekilde çini mürekkebi verildi. Enjeksiyondan 30 dakika sonra ikinci gruptaki sıçanlar, 24 saat sonra üçüncü gruptakilerle birlikte birinci gruptaki sıçanlar sakrifiye edilerek dalakları çıkarıldı. Işık ve elektron mikroskobu için rutin tespit ve takip prosedürü uygulanarak elde edilen parafin ve araldit kesitlere çeşitli boyama teknikleri uygulandı. Lizozomal enzim aktivitelerinin belirlenmesi için enzim histokimya yöntemi kullanıldı.

Bulgular: Sıçan dalağında marjinal bölgede yerleşen makrofajların karbon partiküllerine karşı zayıf fagositoz yeteneği gösterdiği, lizozomal enzim aktivitelerinin zayıf olduğu, morfolojik yönden kırmızı pulpada yerleşen makrofajlardan farklı oldukları belirlendi.

Sonuç: Sıçan dalağının esas fagositoz yapan hücrelerinin kırmızı pulpa makrofajları olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: **Dalak, Marjinal Bölge, Makrofaj, Morfolojik Teknikler**

Aim: As a result of its special morphology, the spleen plays an important role in cleaning of pathogens as well as old damaged erythrocytes from blood. Macrophage subgroups located in different areas of the spleen were identified through the studies performed on spleen macrophages. With this study we aimed to evaluate subgroups in rats spleen's phagocytic and lysosomal enzyme activity for erythrocytes and intravenously administered India ink and macrophage subgroups structural properties assessed at light microscopy level.

Material and Method: In this study, eighteen Wistar Albino adult male rats were used. Rats were divided into three equal groups. No application was made to the first group. India ink with a weight of 1 ml / 100 g were given to the second and third group animals from the tail vein. Thirty minutes after the injections, the animals of Group 2 were sacrificed. The animals of Group 3 were sacrificed twenty-four hours after the application simultaneously with Group 1 and their spleens were removed. Routine fixation and processing procedures applied for light and electron microscopy, and various staining techniques were performed to the paraffin and araldite sections. Enzyme histochemistry technique was used to determine lysosomal enzyme activities.

Results: As a result, macrophages located in the marginal zone showed weak phagocytic activity to the carbon particles, their lysosomal enzyme activities were weak, and the macrophages located in red pulp were morphologically different.

Conclusion: It was concluded that the main phagocytic cells of rat spleen are the red pulp macrophages.

Key Words: **Spleen, Marginal Zone, Macrophages, Morphological Techniques**

Geliş Tarihi : 10.07.2017 • Kabul Tarihi: 13.07.2017

İletişim

Yrd. Doç. Dr. Deniz Billur

E-posta: billur@medicine.ankara.edu.tr

Tel: 0 312 595 82 85

GSM: 0 532 456 86 40

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Sekonder lenfoid organlar arasında yer alan dalak, kan kaynaklı patojenlerin uzaklaştırılmasında hem morfolojik hem de immunolojik filtrasyon fonksiyonu gören özelleşmiş bir yapıya sahiptir. Anatomi olarak hilus bölgesinden organ içine giren A.lienalis dalları etrafında

yerleşir. Fonksiyonel ve morfolojik açıdan birbirinden farklılık gösteren beyaz ve kırmızı pulpadan oluşur (1).

Santral arter olarak adlandırılan a. lienalis dalları lenfoid doku tarafından çevrelenir. T lenfositlerince oluşturulan pe-

riarteriyel lenfatik kılıflar (PALS) ve PALS'ın periferinde yerleşen B lenfositlerince oluşturulan follikül yapıları beyaz pulpayı oluşturur.

Santral arter dallarının bir kısmı incelenerek beyaz pulpadan geçer, T ve B hücre bölgelerini çevreleyen alanda marjinal sinuslerde sonlanır. Burası beyaz pulpayı çevreleyen ve beyaz pulpa ile kırmızı pulpa arasında anatomik bir sınır oluşturan marjinal bölgenin iç sınırını oluşturur (2). Marjinal bölge; arterlerin endotelile devam eden sinus döşeyici hücreler, retikulum hücreleri ve lifleri tarafından oluşturulan ağ yapısına tutunan makrofajlarla birlikte B hücrelerini barındıran, özellikli bir bölgedir. Marjinal sinüslerden kan bu ağ yapısını geçerek serbestçe kırmızı pulpaya süzülürken patojenlere ve hücre artıklarına karşı sürekli incelemeden geçirilir (3).

Kan marjinal bölgeden kırmızı pulpa kordonları arasındaki venöz sinüslere girer. Kırmızı pulpayı oluşturan kordonlar ve venöz sinüsler kan akımının yavaşlamasına ve kanın filtrasyonuna olanak sağlar. Bu durum yıpranmış kan hücrelerinin seçimi ve bunların makrofajlar tarafından ortadan kaldırılmasında önemli bir basamak oluşturur (3).

Marjinal bölge intravenöz olarak verilen materyal ve antijenlerin ilk ulaştığı bölge olması nedeniyle önemlidir (4). İmmün sistem üzerinde yapılan çalışmalarda lenfositlerin immün cevabında önemli roller üstlenen nonlenfoid hücreler belirlenmiş, dalağın değişik bölgelerinde yerleşen, yapı özellikleri ve işlevleri bakımından farklı makrofaj grupları yüzey antijenlerine göre tanımlanmıştır (5).

İmmün cevabın oluşumunda lenfoid hücrelerle makrofajlar arasındaki ilişkinin net bir biçimde ortaya çıkarılması ve antijenlerin temizlenmesinde dalağın işlevlerinin anlaşılması önem taşımaktadır. Sıçanlar üzerinde yapılan bu çalışmada dalağın farklı bölgelerine yerleşen makrofaj alt gruplarının intravenöz yolla verilen çini mürekkebine ve eritrositlere karşı fagositoz kapasiteleri, lizozomal enzim ak-

tiviteleri ve yapı özelliklerinin ışık mikroskobu düzeyinde incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerekli izinler alınarak yürütülmüştür. Materyal olarak Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarlarında yetiştirilen yaklaşık 250-300 gram ağırlığında 10 haftalık 18 adet Wistar türü erişkin albino erkek sıçan kullanılmıştır. Her gruba eşit sayıda sıçan rasgele dağıtılarak birinci gruba herhangi bir işlem uygulanmamıştır. İkinci ve üçüncü gruplara karbon parçacıklarının *in vivo* fagositozunun gözlenmesi amacıyla kuyruk veninden 1 ml/100 g olacak şekilde çini mürekkebi verilmiş, enjeksiyondan 30 dakika sonra ikinci gruptakiler ve 24 saat sonra üçüncü gruptakilerle birlikte birinci gruptaki sıçanlar eter anestezisi altında sakrifiye edilerek dalakları alınmıştır. Örnekler ışık mikroskobu takibi için Carnoy solüsyonu ve pH 7,2 %10'luk nötr formalinde tespit edilip parafin bloklara gömülmüştür. Parafin bloklardan Leitz-1512 tipi mikrotomla 5 µm kalınlığında alınan seri kesitlere B lenfositlerini göstermek için Metil Green Pironin (MGP) boyaması, marjinal sinusleri döşeyen endotel hücresi bazal membranını gözlemek için Periyodik Asit Schiff (PAS) boyası ve parçalanmış eritrositlerden açığa çıkan hemosiderin pigmentinin gözlenmesi için Pearl'un demir boyası uygulanmıştır.

Makrofajlarda bulunan asit fosfataz ve non spesifik esteraz (NSE) enzim aktivitelerinin gösterilmesi amacıyla enzim histokimya tekniği her gruptan alınan frozen kesitler üzerinde uygulanmıştır (6). Substrat olarak pararosanilin içeren çalışma solüsyonu içinde asit fosfataz aktivitesinin gösterilmesi için naphthol-AS-TR-phosphate, NSE aktivitesinin gösterilmesinde ise naphthyl-acetate kullanılmıştır. Yarı ince kesitlerin elde edilmesi için alınan dokular ise fosfat tamponlu %2,5 glutraldehitte tespit edilip hazırlanan

araldit bloklardan elde edilen 1 µm'lik kesitler Toluidin mavisi-Azur II ile boyanmıştır. Işık mikroskobu incelemeleri Zeiss Axioscop fotomikroskobu ile yapılarak fotoğrafları çekilmiştir.

Bulgular

Birinci grupta bulunan ve işlem uygulanmayan sıçanlardan elde edilen MGP ile boyalı kesitlerde dalak parankiminde beyaz pulpa ve kırmızı pulpaya ait yapılar tanımlandı. Beyaz pulpada, sitoplazmaları ribozomdan zengin olan B lenfositlerinin pironinofil özelliği göstermesi nedeniyle bu hücreleri barındıran primer ve sekonder folliküller ayırt edildi. Santral arter çevresinde T lenfositlerini barındıran PALS gözlendi (Şekil 1). Marjinal bölge PALS ile follikül yapılarının çevresinde, kırmızı pulpa ile beyaz pulpa arasında tanımlandı. Bu bölgede makrofajlar ve pironinofil gösteren B lenfositleri gözlendi (Şekil 2).

İntavenöz yolla çini mürekkebi verilen sıçanlardan 30. dakikada alınan dalak örneklerinde karbon partiküllerinin daha az olarak marjinal bölge makrofajlarınca ve daha yoğun olarak kırmızı pulpa makrofajları tarafından fagosite edildikleri görüldü (Şekil 3). Çini mürekkebi enjeksiyonunu takiben 24. saatte hazırlanan doku örneklerinde karbon partiküllerinin büyük kısmı kırmızı pulpa makrofajlarında görüldü. Kırmızı pulpadaki makrofajların özellikle kırmızı pulpa-marjinal bölge sınırında kümeler oluşturdukları izlendi. PAS ile boyalı kesitlerde marjinal bölge iç sınırında marjinal sinus iç duvarının kesintisiz bir bazal membranla çevrili olduğu dikkat çekti (Şekil 4).

Birinci gruba ait yarı ince kesitlerde kırmızı pulpada bulunan makrofajların sitoplazmasında çok sayıda vakuol ve granüllerin bulunduğu, şekillerinin geniş, düzensiz olduğu ve çoğunun eritrositlerle temasta olduğu görüldü (Şekil 5). Buna karşın marjinal bölgede bulunan makrofajların oval ya da yuvarlak şekilde olduğu, kırmızı pulpa makrofajlarından daha küçük çaplı

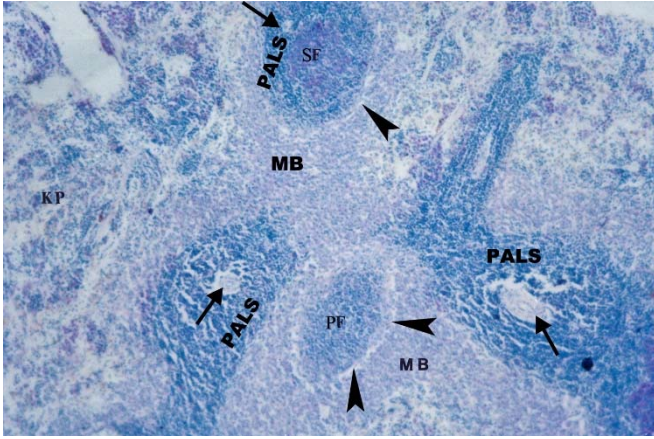
oldukları, çekirdek/sitoplazma oranlarının çekirdek lehinde bulunduğu izlenirken sitoplazmada granül ve vakuollerin küçük ve az sayıda oldukları görüldü. Marjinal sinus iç duvarında endotel hücrelerine komşu yerleşimde makrofajlar izlendi. Bu hücrelerin endotel hücreleri arasından sinus lümenine ulaşan sitoplazmik uzantıları vardı. Hücreler bu özellikleriyle marjinal metalofil makrofajlar olarak değerlendirildi (Şekil 6). Karbon enjeksiyonunu takiben 30. dakikada alınan örneklerden hazırlanan yarı ince kesitlerde marjinal bölgenin dış kısmında makrofajların az sayıda ve küçük

karbon partikülü içermesine karşın (Şekil 7) kırmızı pulpa makrofajlarının çok fazla karbon partikülü fagosite ettiği ve makrofaj kümeleri oluşturduğu görüldü (Şekil 8).

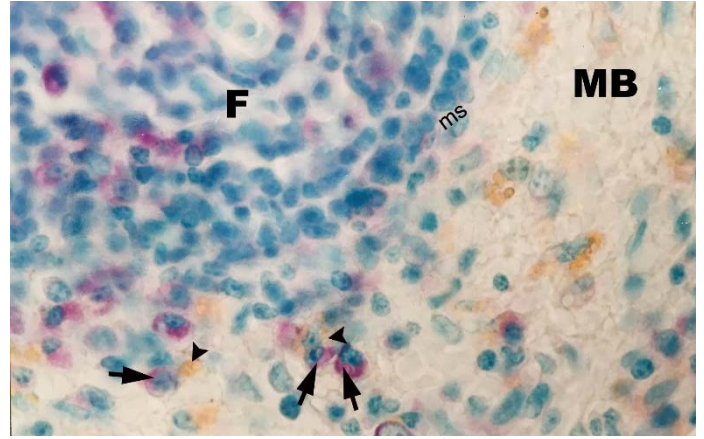
Pearl'ün demir boyasıyla boyanan dalak kesitlerinde hemosiderin inklüzyonlarıyla dolu olan makrofajlar kırmızı pulpa ve marjinal sinus komşuluğunda bulundular (Şekil 9-10). Marjinal bölge makrofajlarında bu yöntemle boyanma gözlenmezken follikül-lerde koyu boyanan hücreler vardı (Şekil 10). Folliküllerin yarı ince kesit-

lerinde apopitotik cisimcikler içeren hücelere rastlandı (Şekil 11).

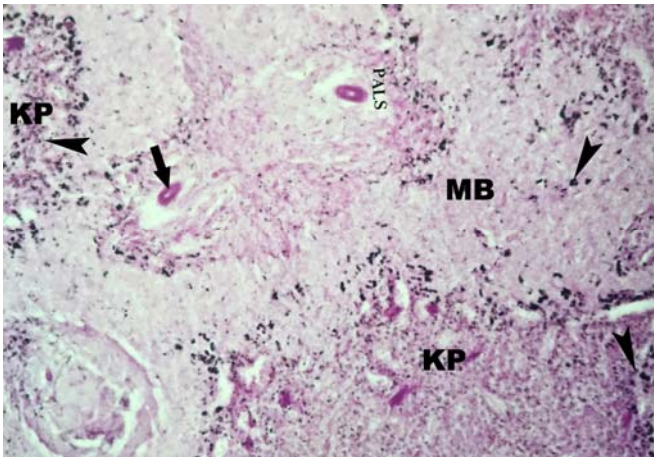
Makrofajların lizozomal enzim aktivite-lerinin belirlenmesi amacıyla asit fosfa-taz ile boyanan kesitlerde kırmızı pulpa makrofajlarının kuvvetli, marjinal metallofillerin ve marjinal bölge makrofaj-larının ise hafif şiddette asit fosfataz aktivitesine sahip oldukları görüldü (Şekil 12). NSE aktivitesi için kırmızı pulpa makrofajlarının pozitif reaksiyon vermesine karşılık marjinal bölge mak-rofajları ve marjinal metallofillerde re-aksiyon görülmedi (Şekil 13).



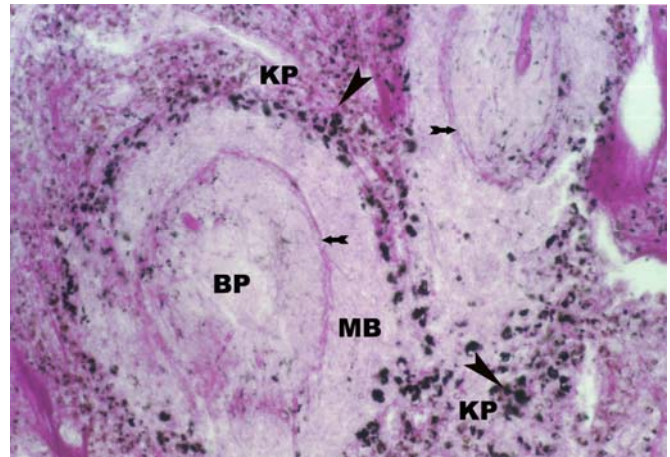
Şekil 1. Birinci gruptaki sıçanların dalak kesitlerinde beyaz pulpa santral arter (ok) çevresinde yerleşen PALS ve primer (PF) - sekonder follikül (SF) yapıları izlenmektedir. Bu yapıları çevreleyen marjinal bölge (MB)'nin kırmızı pulpa (KP) ile beyaz pulpa arasında yerleştiği görülmektedir. Marjinal bölge iç sınırında PALS ve folliküller arasında marjinal sinus (ok başı) yer almaktadır. Boya: MGP, Büyütme x25



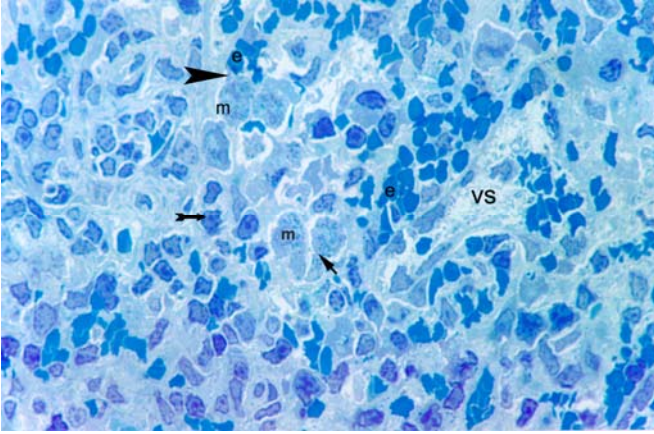
Şekil 2. Birinci gruptaki sıçanların dalak kesitlerinde marjinal bölgede (MB) pironin ile sitoplazmaları pembe boyanan hücrelerin (B lenfositler)(ok) makrofajlarla (ok başı) temas ettiği görülmektedir. Follikül (F), Marjinal Sinüs (ms). Boya: MGP, Büyütme x250.



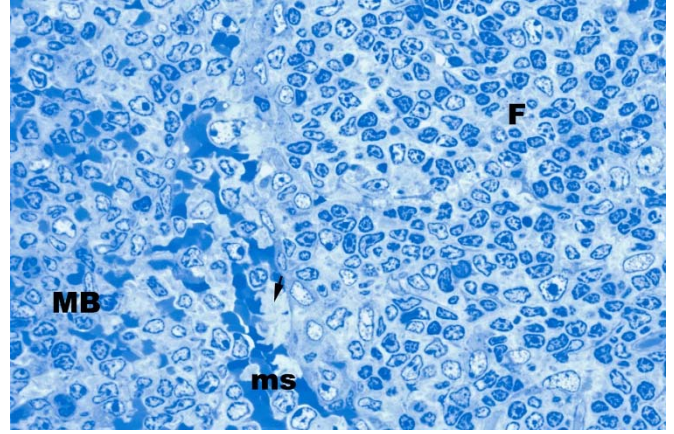
Şekil 3. İkinci gruba ait dalak kesitlerinde karbon enjeksiyonundan 30 dakika sonra marjinal bölge (MB) ve kırmızı pulpada (KP) karbon partiküllerini fagosite eden makrofajlar (ok başı) izlenmektedir. Santal arter (ok). Boya: PAS, Büyütme x25



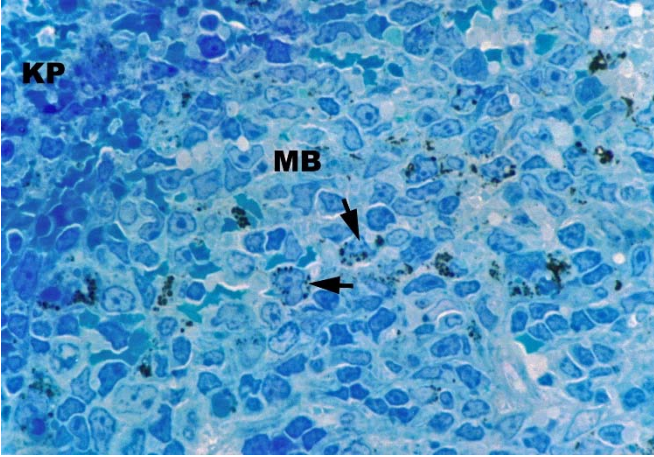
Şekil 4. Üçüncü gruba ait dalak kesitlerinde karbon enjeksiyonundan 24 saat sonra kırmızı pulpada (KP) karbon partiküllerini fagosite eden makrofajlar (ok başı) izlenmektedir. Marjinal sinus iç duvarında izlenen kesintisiz bazal membran (kuyruklu ok) dikkat çekmektedir. Beyaz Pulpa (BP), Marjinal Bölge (MB). Boya: PAS, Büyütme x100.



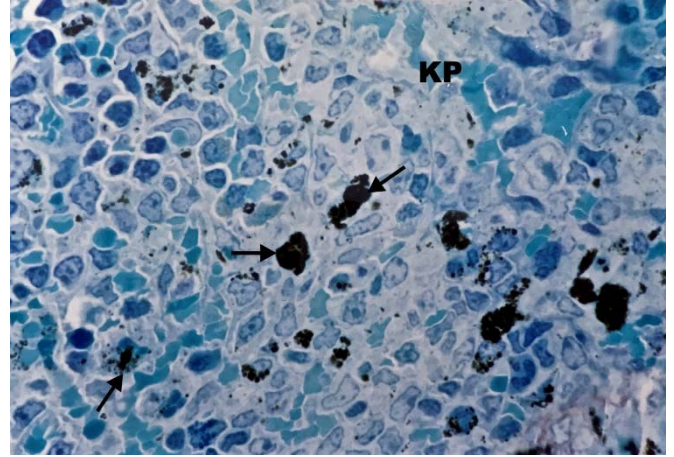
Şekil 5. Birinci gruba ait mikrografta kırmızı pulpa kordonlarında yer alan makrofajlar (m), eritrositler (e), lenfositler (kuyruklu ok) görülmektedir. Makrofajların sitoplazmasında granül ve vakuoller (ok) dikkat çekmektedir. Eritrositlerle temas eden makrofajlar (ok başı) izlenmektedir. Venöz Sinüs (vs). Boya: Toluidin mavisi-Azur II, Büyütme x 250.



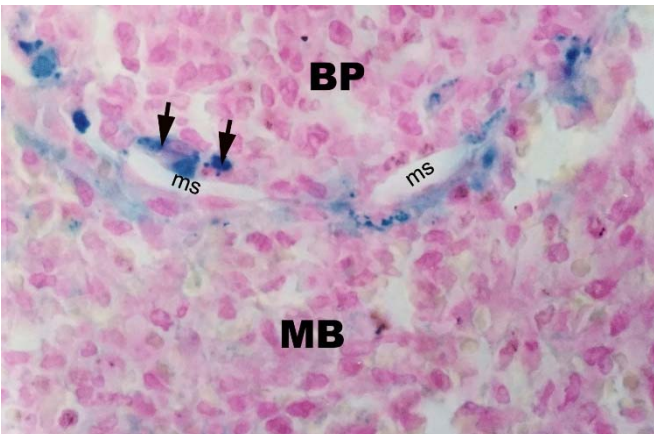
Şekil 6. Birinci gruba ait mikrografta marjinal bölge (MB)'nin iç sınırında yer alan marjinal sinus (ms) duvarında endotel hücreleri arasından lümeneye ulaşan sitoplazma uzantıları (ok) dikkat çekmektedir. Follikül (F). Boya: Toluidin mavisi-Azur II, Büyütme x 250



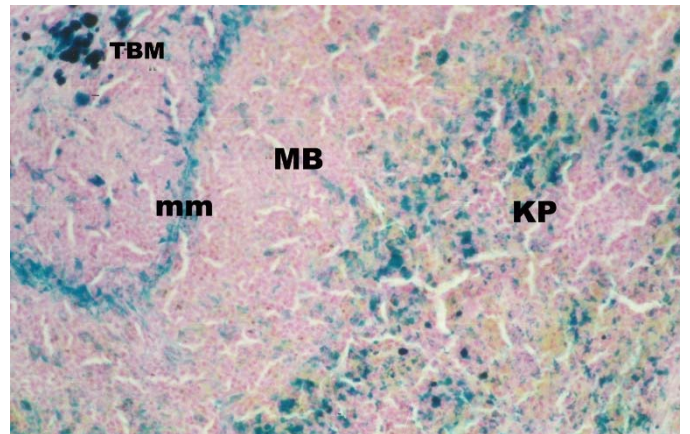
Şekil 7. İkinci gruba ait mikrografta marjinal bölgede (MB) bulunan makrofajların sitoplazmasında küçük ve az sayıda karbon partikülleri (ok) izlenmektedir. Boya: Toluidin mavisi-Azur II, Büyütme x 250.



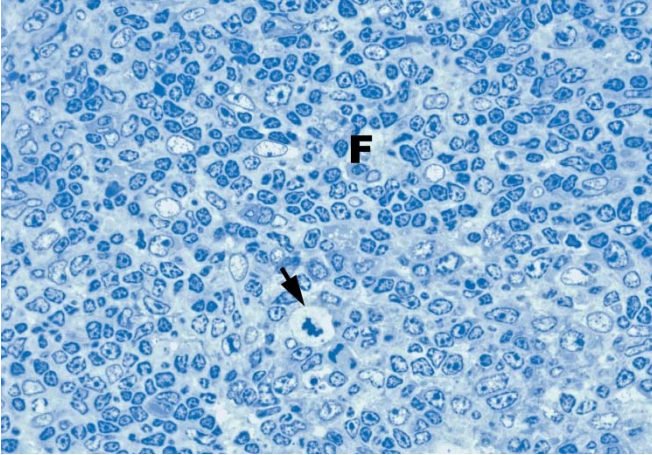
Şekil 8. Üçüncü gruba ait mikrografta kırmızı pulpada (KP) bulunan makrofajların sitoplazmasında fagosite edilmiş büyük ve çok sayıda karbon partikülleri (ok) izlenmektedir. Boya: Toluidin mavisi-Azur II, Büyütme x 250.



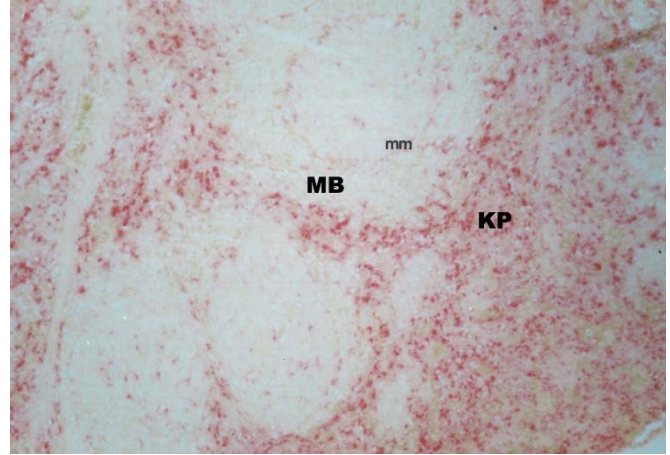
Şekil 9 . Birinci gruba ait mikrografta marjinal sinus iç duvarında yerleşen makrofajların sitoplazmasında hemosiderin inklüzyonları (ok) görülmektedir. Marjinal Sinüs (ms), Beyaz Pulpa (BP), Marjinal Bölge (MB). Boya: Pearl'ün demir boyası, Büyütme x 250.



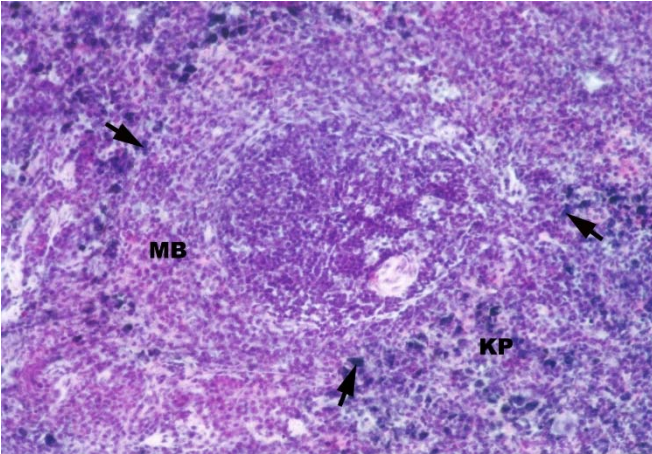
Şekil 10. Birinci gruba ait mikrografta kırmızı pulpada (KP) ve marjinal sinus iç duvarında yerleşen makrofajların sitoplazmasında hemosiderin inklüzyonlarının varlığına bağlı mavi boyanma görülmektedir. Folliküllerin orta bölgelerinde bu yöntemle koyu boyanma gösteren hücreler (TBM) izlenmektedir. Boya: Pearl'ün demir boyası, Büyütme x 50



Şekil 11. Birinci gruba ait mikrografta follikül iç kısmında sitoplazmasında apoptotik cisimler içeren hücre (ok) dikkat çekmektedir. Boya: Toluidin mavisi-Azur II, Büyütme x 250.



Şekil 12. Birinci gruba ait mikrografta asit fosfataz için (+) reaksiyon ile kırmızı renk değişikliği gözlenen makrofajlar görülmektedir. Kırmızı Pulpa (KP), Marjinal Bölge (MB), Marjinal Metallofil Makrofajlar (mm). Boya: Asit fosfataz boyası, Büyütme x 25.



Şekil 13. Birinci gruba ait mikrografta hematoksilin ile zıt boyama uygulanmış kesitte NSE (+) reaksiyon veren kırmızı pulpa makrofajları (ok) görülmektedir. Marjinal Bölge (MB), Kırmızı Pulpa (KP). Boya: NSE boyası, Büyütme x 50.

Tartışma

Beyaz pulpa, marjinal bölge ve kırmızı pulpa olmak üzere dalağın tanımlanan her üç bölümünde de farklı makrofaj alt grupları bulunmakta ve her biri kendi lokalizasyonuna göre farklı fonksiyonlar üstlenmektedir (7).

Marjinal bölgenin retiküler ağ yapısı içinde marjinal bölge makrofajları (MBM) ve gümüş çöktürme teknikleriyle boyanabildikleri için marjinal metallofil makrofajlar (MMM) olarak adlandırılan iki makrofaj alt grubunun yanı sıra B lenfositleri, kandan gelen granülosit ve lenfositlerle birlikte dendritik hücreler de bulunur (7). Marjinal bölgenin özel

anatomisine bağlı olarak yavaşlayan kan akımı sayesinde dolaşımda bulunan bakterilerle bazı virus ve parazitlerin MBM ve MMM'lar tarafından kandan temizlenmesi olanaklı hale gelir (8).

Araştırmalarda marjinal bölge makrofajlarının esas işlevlerinin kapsüllü patojenleri ortadan kaldırmak olduğu bildirilmiştir (9,10). Marjinal bölgede makrofajlar tarafından bu organizmaların tutulması sonucunda B hücrelerinin uyarımı için gereken yüksek antijen konsantrasyonu sağlanır. Bu işlevin eksikliği splenektomili bireylerde kapsüllü mikroorganizmaların neden olduğu fulminan enfeksiyonlara

karşı duyarlılığı açıklayabilir. Yeni doğanlarda marjinal bölge doğumdan sonraki ilk haftalarda gelişmeye başlar. Marjinal bölge makrofajları da bu bölgenin gelişmeye başlaması ile birlikte görülür. Yeni doğanlarda marjinal bölgede B lenfositlerinin bulunmaması da önemlidir. Dolayısıyla yenidoğan döneminde kapsüllü mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonlara karşı cevabın zayıf olması, marjinal bölge makrofajlarının reseptörleri aracılığı ile bunları tanıyarak B lenfositlerine sundukları sonucuna varan çalışmalarını desteklemektedir (11).

MBM'nın yüzeyinde bulunan C-tipi lektin reseptörü (SIGN-R1: C-type lec-

tin SIGN related-1) pnömokoklara ait sakkaritlerin tanınmasında özellikle de *Streptococcus pneumoniae*'nin temizlenmesinde rol alırken kollajen yapılı makrofaj reseptörleri (MARCO: Macrophage receptor with collagenous structure) meningokoklara bağlanır (9-12). Marjinal sinus iç duvarında yerleşen MMM'in yüzeyinde bulunan SIGLE-1(CD-169) ve MOMA-1 reseptörleri aracılığıyla başta *Listeria* olmak üzere çeşitli bakteriler, virüsler ve parazitlerin tanınması sağlanır (9,13). Her iki makrofaj tipi de, tip I interferon (IFN), interlökin (IL)-1 α ve tümör nekrozis faktör (TNF)- α gibi sitokinler üretir, bu yolla da bakteri ve virüslerin yayılımını önlerler (9). Bu çalışmada farklı makrofaj tipleri morfolojik özellikleriyle tanımlanmıştır. Marjinal bölge makrofajlarının oval ya da yuvarlak şekilli, çekirdek/sitoplazma oranlarının çekirdek lehinde olduğu, sitoplazmalarında küçük ve az sayıda vakuol ve granül içerdiği gözlenmiştir.

Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda immün uyarımla dalakta MBM ve MMM'da NSE aktivitesinin yükseldiği, buna bağlı olarak bu hücrelerin immün uyarımı takiben olgunlaşarak işlevlerine kavuşan potansiyel fagositler oldukları ileri sürülmüştür (14). Araştırmalarda marjinal bölgede yerleşen makrofajların orta şiddette asit fosfataz aktivitesi, karbon partikülleri için zayıf fagositoz ve timus bağımsız tip 2 (TI-2) antijeni olan nötral polisakkaritler için kuvvetli pozitif reaksiyon verdikleri belirtilmektedir (15). Bu çalışmada da lizozomal enzim aktiviteleri açısından yapılan boyamalarda MBM'da asit fosfataz için zayıf reaksiyon alınırken NSE enzimi için reaksiyon görülmedi. NSE aktivitesinin gözlenmemesi çalışmada immün uyarıcı uygulanmamasına bağlandı ve bu hücrelerin immün kompetanlara karşı potansiyel fagositoz gösterdikleri yönündeki çalışmalarla uyumlu bulundu.

Çalışmamızda MGP ile boyalı dalak kesitlerinde marjinal bölgede pironinofili gösteren B hücreleriyle makrofajların

komşuluğu gösterilmiştir. Bu bulgular literatürde MBM ile marjinal bölgede bulunan B lenfositlerin birbirleriyle fonksiyonel olarak ilişkilerinin olduğunu gösteren yayınlarla uyum göstermektedir (7). B lenfositleri kompleman reseptörleriyle antijenleri tutar, follikülere göç ederek burada yerleşik folliküller dendritik hücrelerde antijenin depolanmasına yardım eder. Marjinal bölgede B hücrelerinin yokluğunda MBM hızla SIGN-R1 reseptör ifadelmelerini kaybeder ve ligantlara karşı fagositoz yetenekleri bozulur (16).

Araştırmalarda beyaz pulpada santral arterin dalları olan follikül kılcal damarlarının marjinal sinüsleri oluşturduğu, kan hücrelerinin marjinal sinus duvarında marjinal bölge yönünde geçişine olanak veren aralıkların bulunduğu belirtilmiştir. Marjinal sinüsü döşeyen endotel hücreleri sinüsün folliküle bakan iç yüzünde süreklilik göstermekte, buna karşılık marjinal bölgeye bakan dış yüzünde yer yer retikulum hücreleriyle devam etmektedir (17).

Bu çalışmada da marjinal bölge-beyaz pulpa sınırında yer alan marjinal sinüsü döşeyen endotelin beyaz pulpaya bakan iç yüzünde süreklilik gösterdiği ve PAS (+) boyanmanın endotel bazal membranındaki sürekliliğe bağlı olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık marjinal sinüsün marjinal bölgeye bakan dış duvarının yer yer retikulum lifleri ile seyrettiği, bazal membranda süreklilik bulunmadığı gözlenmiştir.

İmmün cevap sırasında MMM'in sinus lümeninden immün kompleksleri ve virus partiküllerini yakalayarak bunları folliküler dendritik hücrelerde depolamak üzere B lenfositlere transfer ettikleri gösterilmiştir (18). Bu çalışmada marjinal sinus iç duvarında yerleşen MMM'in endotel hücrelerinin hemen altında yerleşim göstermesi ve sitoplazmik uzantılarını endotel hücreleri arasından lümenine uzatması bu transferdeki rollerini morfolojik olarak ortaya koyan bir bulgudur. Lizozomal enzim aktivitelerini değerlendirmek için yapılan asit fosfataz boyamasında

orta şiddette reaksiyon gözlenirken, immün uyarıcı bulunmamasına bağlı olarak NSE için boyanma gözlenmemiştir.

MMM'in varlığı folliküler B lenfositlerine bağlıdır ve B lenfositlerince üretilen lenfotoksin- $\alpha\beta$ 'ya gereksinim duyarlar (19). Ayrıca MMM'lar, sinüslerde tutukları antijeni T hücre bölgesinde CD8⁺ dendritik hücrelere transfer ederek T hücre cevabının aktivasyonunda rol alırlar (20).

MBM ve MMM'lar kan akımından apoptotik hücreleri spesifik olarak fagosite eder. Apoptotik hücrelerin makrofajlar tarafından ortadan kaldırılması periferik toleransın sürdürülmesi açısından önemlidir. Bu sürecin bozulması otoimmün hastalıklara yol açar. Bu hücreyle ilişkili antijenlere karşı immün cevabın bastırılmasına neden olur. İntakt marginal sinüslü hayvanlarda hücre ilişkili antijenler CD8⁺ dendritik hücrelerce sunulur. Bu immün toleransı başlatır. Buna karşın her iki makrofaj tipinin ortadan kalkması apoptotik hücrelerin temizlenmesinde bozulmaya, hücre ilişkili antijenlerin CD8⁻ dendritik hücrelerce sunulmalarına ve sonuçta apoptotik hücreler tarafından indüklenen toleransın kaybına yol açar (21). Diğer yandan MBM ve MMM'ların her ikisinin birden kaybı apoptotik hücrelerin kırmızı pulpa makrofajlarınca tutulmasına, beyaz pulpada apoptotik hücrelerin yerleşiminin artmasına, inflamatuvar sitokinlerin üretiminde artışa, otoimmün hastalıkların indüksiyonunda hızlanmaya neden olmaktadır (22). Bu durum marjinal bölgedeki makrofajlar tarafından apoptotik hücrelerin fagositozunun, periferik toleransın sürdürülmesinde ve otoimmün hastalıkların önlenmesindeki önemini göstermektedir (7).

Beyaz pulpanın hem T hücre bölgesi (PALS) hem de B hücre follikülleri farklı makrofaj grupları içerir. Bu hücreler dalak için özgün olmayıp sekonder lenfoid organların tümünde bulunurlar. T hücre bölgesindeki makrofajlar kandan beyaz pulpaya gi-

ren monositlerin soyundan geliyor olabilirler. İşlevleri antijen sunumu veya ölen lenfositlerin ortadan kaldırılmasıyla ilişkilidir (7). B hücre folliküllerinde makrofajlar apopitotik B hücrelerinin temizlenmesinde önemli rol oynarlar. Folliküllerde dendritik hücreler (FDC) immun kompleksleri alıkoyarken folliküler B hücreleri antijenler için FDC'lerin yüzeyinde araştırma yapar. Uygun reseptör şekline sahip olmayan B hücreleri apopitozla ölür ve germinal merkezlerde makrofajlar tarafından temizlenir (23). Germinal merkezde geniş, kondanse apopitotik çekirdekleri içerdiği için boyanabilen cisim makrofajı (Tingible Body Macrophage, TBM) denen hücreler belirir (24). Bu çalışmada da yarı ince kesitlerde apopitotik cisimleri fagosite eden hücreler görüldü. Pearl'un demir boyasıyla boyanan dalak kesitlerinde folliküllerde kuvvetli boyanma gösteren hücrelerin apopitotik cisimleri fagosite eden ve TBM'lar olarak tanımlanan hücreler olduğu düşünüldü. Apopitotik hücrelerin makrofajlar tarafından fagositozu sırasında pro-inflamatuar reaksiyona yol açmaması önemlidir. Apopitotik yolakta defekt oluşturulan farelerle yapılan çalışmalar hem B hücrelerinin nekrozla ölümünün inflamasyona yol açması nedeniyle hem de otoreaktif B hücrelerinin gelişmesine yol açan negatif seleksiyonun kaybolmasına bağlı olarak çok ciddi otoimmun hastalıkların geliştiğini göstermiştir (7).

Kırmızı pulpada arteriyel kan akımı kapalı dolaşımın yanı sıra, retikulum hücreleri ve retikulum liflerinden oluşan

kırmızı pulpa kordonlarında sonlanarak açık bir sistem oluşturur. Kırmızı pulpa kordonlarında çok sayıda makrofaj vardır. Makrofajlar yüzeylerinde F4/80, CD11b, CD68 reseptörleri içerir. Kan, kordonlardan venöz sinüsler içine geçer. Venöz sinüsleri döşeyen endotel hücreleri arasında belirgin interselüler boşluklar vardır. Bu bölgede bazal lamina kesintilidir ve endotel hücrelerinin uzun eksenine dik açıyla seyreden bazal lamina şeritleri bulunur. Bu düzenlenme açık dolaşım ile kordonlar arasında serbest bulunan kırmızı kan hücrelerini bazal lamina şeritlerinin sardığı dar sinüs lümenine doğru iter. Sertleşmiş membrana sahip yaşlanmış eritrositler için böyle bir geçiş zorlayıcıdır. Bu nedenle hücreler kordonlara tutunurlar ve makrofajlarca fagosite edilirler. Eritrosit döngüsü için önemli olan bu süreçte demirin geri kazanımı da kırmızı pulpa makrofajlarının esas görevlerindedir (7).

Çalışmada kırmızı pulpa makrofajlarının geniş, yuvarlak veya düzensiz şekilde olduğu, sitoplazma/çekirdek oranlarının sitoplazma lehinde bulunduğu, çok sayıda vakuol ve granüller içeren aktif hücreler oldukları gözlemlendi. Makrofajların yer yer eritrositlerle temas etmesi, parçalanmış eritrositlerden açığa çıkan hemosiderin pigmentine karşı pozitif boyanması, bu hücrelerin dalakta eritrositlerin fagositozunda rol aldıkları yönünde bir bulgu olarak değerlendirildi. Lizozomal enzim aktivitelere bakıldığında asit fosfataz için kuvvetli, NSE aktivitesi

için zayıf pozitif reaksiyon gösterdikleri görüldü.

Bu çalışmada intravenöz çini mürekkebi enjeksiyonunu takiben 30. dakikada alınan örneklerde karbon partiküllerinin marjinal bölgede ve daha yoğun olarak kırmızı pulpa makrofajlarında bulunduğu, 24. saatte ise karbon partiküllerinin büyük kısmının kırmızı pulpa makrofajlarında, özellikle de kırmızı pulpa marjinal bölge sınırında yoğunlaşarak oluşturduğu gözenmiştir. MBM'nda karbon partiküllerine karşı fagositozun ve lizozomal enzim aktivitesinin zayıf olduğu saptandı. MMM'ın karbon partiküllerini fagosite etmediği gözlemlendi. Pearl'un demir boyasıyla eritrositlerin parçalanma ürünü olan hemosiderinin başlıca kırmızı pulpa makrofajları tarafından fagosite edildiği görüldü. MMM ve TBM'larda da bu yöntemle hemosiderine karşı pozitif sonuç alındı.

Bu çalışma sonucunda MBM ve MMM'ların fagositoz işlevlerinin, karbon partikülleriyle eritrositleri fagositoz yetenekleri, lizozomal enzim aktivite ve yapısal özellikleri dikkate alınarak zayıf olduğuna karar verildi. Sıçan dalağının esas fagositik hücrelerinin kırmızı pulpa makrofajları olduğu belirlendi. Hemosiderin inklüzyonları için yapılan boyamalarda kırmızı pulpa makrofajları kadar kuvvetli reaksiyon gözlenmemekle birlikte MMM ve TBM'lara karşılık gelen lokalizasyonlarda pozitif boyanma görülmesi bu hücrelerin eritrosit metabolizması üzerindeki rolleriyle ilgili farklı çalışmaların planlanması gerektiğini gösterdi.

KAYNAKLAR

1. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:606-616.
2. Schmidt EE1, MacDonald IC, Groom AC. Comparative aspects of splenic microcirculatory pathways in mammals: the region bordering the white pulp. *Scanning Microsc.* 1993;7:613-628.
3. Kraal G. Cells in the marginal zone of the spleen. *Int Rev Cytol.* 1992;132:31-74.
4. van Ewijk W, Nieuwenhuis P. Compartments, domains and migration pathways of lymphoid cells in the splenic pulp. *Experientia.* 1985 15;41:199-208.
5. Humphrey JH, Grennan D. Different macrophage populations distinguished by means of fluorescent polysaccharides. Recognition and properties of marginal-zone macrophages. *Eur J Immunol.* 1981;11:221-228.
6. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, eds. *Laboratory methods in histotechnology* (Armed Forces Institute of Pathology). 1st ed. Washington, D.C. : American Registry of Pathology; 1992:235-240.
7. den Haan JM, Kraal G. Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen. *J Innate Immun.* 2012; 4:437-445.

8. Borges da Silva H, Fonseca R, Pereira RM, et al. Splenic Macrophage Subsets and Their Function during Blood-Borne Infections. *Front Immunol.* 2015 22;6:480.
9. Elomaa O, Kangas M, Sahlberg C, et al. Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. *Cell.* 1995 24;80:603-609.
10. Chao D, MacPherson GG. Analysis of thymus-independent type 2 antigen uptake by marginal zone macrophages in thin slices of viable lymphoid tissue in vitro. *Eur J Immunol.* 1990;20:1451-1455.
11. Lee G. R, Bithell T.C, Foerster J et al., eds. *Wintrobe's Clinical Hematology.* 9th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1992:311-322, 354.
12. Geijtenbeek TB1, Groot PC, Nolte MA, et al. Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens in vivo. *Blood.* 2002 15;100:2908-2916.
13. Kraal G, Janse M. Marginal metallophilic cells of the mouse spleen identified by a monoclonal antibody. *Immunology.* 1986;58:665-669.
14. Van Rooijen N, Kors N, vd Ende M, Dijkstra CD. Depletion and repopulation of macrophages in spleen and liver of rat after intravenous treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate.. *Cell Tissue Res.* 1990;260:215-222.
15. Matsuno K, Fujii H, Kotani M. Splenic marginal-zone macrophages and marginal metallophilic cells in rats and mice. *Cell Tissue Res.* 1986;246:263-269.
16. You Y, Myers RC, Freeberg L, et al. Marginal zone B cells regulate antigen capture by marginal zone macrophages. *J Immunol.* 2011 15;186:2172-2181.
17. Veerman AJ, van Ewijk W. White pulp compartments in the spleen of rats and mice. A light and electron microscopic study of lymphoid and non-lymphoid celltypes in T- and B-areas. *Cell Tissue Res.* 1975;156:417-441.
18. Phan TG, Green JA, Gray EE, et al. Immune complex relay by subcapsular sinus macrophages and noncognate B cells drives antibody affinity maturation. *Nat Immunol.* 2009;10:786-793.
19. Junt T, Moseman EA, Iannacone M, et al. Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature.* 2007 1;450:110-114.
20. Backer R, Schwandt T, Greuter M, et al. Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8+ dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 5;107:216-221.
21. Miyake Y, Asano K, Kaise H, et al. Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell-associated antigens. *J Clin Invest.* 2007;117:2268-2278.
22. McGaha TL, Chen Y, Ravishankar B, et al. Marginal zone macrophages suppress innate and adaptive immunity to apoptotic cells in the spleen. *Blood.* 2011 19;117:5403-5412.
23. King C, Tangye SG, Mackay CR. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:741-766.
24. Bratton DL, Henson PM. Apoptotic cell recognition: will the real phosphatidylserine receptor(s) please stand up? *Curr Biol.* 2008 22; 8:R76-79.