

A.Ü. Veteriner Fakültesi Fizyoloji ve Histoloji-Embriyoloji Kürsüleri
Doç. Dr. Fahri Bölükbaşı – Prof. Dr. Osman Hassa

TAVUK ALYUVARLARINDA ÜLTRAVİYOLE İLE OLUŞTURULAN HEMOLİZ ÜZERİNDE İNCELEMELER

Fahri Bölükbaşı* Attila Tanyolaç** Bahri Emre***

Studies on ultraviolet-induced hemolysis of chicken erythrocytes

Summary: *Ultraviolet irradiation caused chicken erythrocytes to hemolyse in an isosmotic solution. All the erythrocytes studied in the same field under phase contrast microscope, appeared to hemolyse completely in approximately 5 hours. Prehemolytic swellings in erythrocytes were observed. In some erythrocytes, nucleus was pushed toward the cell membrane, and some local densities were noticed in the cytoplasm, before hemolysis. According to these characteristics, it is assumed that hemolysis of chicken erythrocytes might be colloid – osmotic in nature.*

(Received on April 7, 1978.)

Özet: *Ültraviyole ışınlaması, izoozmotik bir Ringer eriyiğindeki tavuk alyuvarlarının hemolizine neden oldu. Fazkontrast mikroskopta, aynı görüntü alanında incelenen alyuvarların tümü 5 saat dolayında tamamen hemolize uğradılar. Alyuvarlarda hemoliz öncesi şişmeler gözlemlendi. Hemolizden önce bazı alyuvarlarda nükleus, hücre membranına doğru itilmişti ve sitoplazmada yer yer bazı yoğunlaşmalar dikkati çekti. Bu özelliklere göre, tavuk alyuvarlarında hemolizin, kolloid-ozmotik nitelikte olabileceği düşünülmektedir.*

Giriş

Ültraviyole ışınlamasının canlı organizmalarda pek çok etkiler doğurduğu uzun zamandanberi bilinmektedir. Bu arada, hücre memb-

* Doç. Dr. A.Ü.Veteriner Fakültesi Fizyoloji Kürsüsü. Ankara, Türkiye.

** Doç. Dr. A.Ü.Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Kürsüsü. Ankara, Türkiye.

*** Asistan Vet. Hek. A.Ü.Veteriner Fakültesi Fizyoloji Kürsüsü. Ankara, Türkiye.

ran geçirgenliğinin değiştiği ve özellikle yüksek doz ultraviyole uygulanması halinde, kalıcı nitelikte kromozom farklılaşmalarının meydana geldiği, hücrenin membran sistemleri dahil tüm morfolojik yapılarının etkilendiği bildirimler arasındadır (13, 14).

Hücre membran geçirgenliğinin incelenmesinde, genellikle memeli alyuvarları kullanılmaktadır (3, 4, 9). Potasyumdan zengin sodyumdan fakir olan bu korpüsküllerin membranlarında, iyonlara karşı özel bir davranış bulunmasaydı, tersine bir ortamda yani, potasyumdan fakir sodyumdan zengin olan plazmada dolaşabilmeleri mümkün olamayacak ve içlerindeki iyon dengesi sürdürülemeyecekti (10). Membran özelliği ile alyuvarlar, basit anyonlara geçirgen, fakat katyonlar ile hücre ve plazma proteinlerine geçirgen olmayan ölü hücreler olarak düşünülmektedirler (10). Ultraviyolenin memeli alyuvarlarında, potasyum kaybı ve sodyum kazancı yoluyla su alarak şişmelerine neden olduğuna ve hemoliz oluşturduğuna ilişkin pek çok yayınlar vardır (3, 4, 6, 9, 12, 15). Leu ve arkadaşları (9), hemoliz olayının alyuvar membranı proteinlerinin denatürasyonu ile şekillendiğine ve fotokimyasal bir prosesle başlatılan bu hemolitik mekanizmanın, kolloid ozmotik nitelikte olduğuna değinmektedirler.

Memeli alyuvarlarında ultraviyole ışınlarının hemoliz oluşturma yeteneğini geniş biçimde inceleyen Cook (3), hemoliz olayının alyuvar membranındaki lipoprotein, protein kısmında oluşan hasardan ileri geldiğini ve böylece kolloid-ozmotik nitelikte bir hemoliz şekillendiğini doğrulamaktadır.

Balık, kurbağa, sürüngen ve kanatlıda alyuvar geçirgenliği bakımından geniş farklılıklar bulunmasına karşın (8), hemoliz olayı pek ele alınmamıştır. Eritrositlerin çekirdekli oluşu, aktif bir oksidatif mekanizmanın varlığı (7) ve bunun katyon transport sisteminin sürekliliğine katkısı (10) gözönünde bulundurulduğunda, hemoliz olayının bunlarda da incelenmesinin hayli ilgi çekici olacağı bildirilmektedir (11).

Ultraviyole ışınlarının kurbağa alyuvarında da hemoliz doğurduğu ve bunun kolloid ozmotik bir olay olduğu bildirilmektedir (11). Literatürde ultraviyolenin civcivlerde (5) ve tavuklarda (1), alyuvar sayısı ve hemoglobin miktarını, tavuklarda (2) alyuvar çökme hızı ve hematokrit değeri etkilediği belirtilmekte ise de, hemoliz konusuna değinilmemektedir.

Bu araştırmadan amacımız, ultraviyolenin tavuk eritrositlerine etkisini in vitro inceleyerek, konuya açıklık kazandırmaktır.

Materyal ve Metot

Denemelerimiz 5 adet Golden comet ırkı tavuklarda yürütüldü. İbigin bezelye iriliğinde kesilmesi suretiyle serbestçe akıtılan kan, içinde Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) bulunan bir tüpe alındı (1.5 mg EDTA/1 ml kan). Bundan sonra aşağıdaki prosedür izlendi (11):

EDTA'lı kan, Ringer criyiğinde 5 kez sulandırıldı. 3000 Devirde 10 dakika santrifüje edildi ve supernatant plazma atıldı. Santrifüj tüpünde kalan hücreler, 10 misli Ringer criyiğinde iki kez yıkandı ve sonunda 1:100 oranında olacak şekilde Ringer criyiğine konuldu. Bu suspansiyondan, her iki yüzü optik olarak pürüzsüz olan, ultraviyole ve görünür ışığı geçirebilecek nitelikteki silica lam (Arthur H. Thomas Company, Micro Slide, 1x2 inches, transparent silica, Cat. No. 6686-U20) üzerine 1-2 damla alınarak bir lamelle kapatıldı. Buharlaşmayı önlemek için lamel kenarları vazelinle sıvandı. Aynı tavuklardan hazırlanan kontroller, ultraviyole ışınlarını geçirmeyen cam lamlara aynı biçimde yerleştirildi. Lamlar, 5 cm. uzaklıkta olmak üzere 2 dakika süreyle bir ultraviyole lambası ile ışınlandırıldı (Universal UV-Lampe, Camag 220 v, 50 Hz). 8 Watt'lık ultraviyole lambası ile 254 nm'de yapılan ışınlamada hesaplanan enerji gücü 24.7×10^4 erg. cm^{-2} . sn^{-1} idi.

Bir fazkontrast mikroskobunda her iki örneğe ait preparatlar da, en az 300 alyuvar içeren bir alan seçildi. Bu mikroskop alanı değiştirilmeksizin, her yarım saatta bir olmak üzere 5.5 saat süreyle hemolize uğrayan alyuvarlar sayılarak bunların, aynı alandaki tüm alyuvarlara göre yüzde oranları saptandı.

Sonuçlar

Kontrollarda ve ultraviyole ile ışınlanmış örneklerde toplam alyuvarlardan, belirli sürelerde hemoliz olanlarının yüzdeleri tabloda gösterilmiştir.

Tablodan izleneceği gibi, ışınlanmış alyuvarlarda hemoliz olan alyuvar yüzdesi, kontrollerdakinden çok farklı olmakta ve 5.0 - 5.5 saat sonra bütün alyuvarlar hemolize uğramaktadırlar. Kıyaslama kolaylığı bakımından, kontrol örneklerinden 0.5, 2.5 ve 5.5 saat (Resim 1), UV-ışınılılardan 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5 ve 5.5 saat sonra (Resim 2) çekilmiş fotoğraflar da verilmiştir. Ultraviyole etkisiyle alyuvar hemolizinin, kontrollerdakinden çok daha hızlı seyrettiği görülmektedir. Hemolize uğrayacak alyuvarların şiştikleri, bazılarında

Tablo.- Kontrol ve UV-ışınli alyuvarların belirli sürelerdeki hemoliz yüzdeleri

Geçen süre (saat)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5
Kontrol (%)	0.0	0.0	0.3	2.0	4.3	5.0	5.7	6.3	10.6	16.6	21.6	29.9
UV-ışınli (%)	0.0	7.0	16.9	21.7	24.2	30.6	41.7	58.9	75.2	86.9	96.2	100.0

nukleusun bir yana itildiği, bazılarında da sitoplazmada yer yer koyulaşmalar olduğu dikkati çekmektedir. Bu özellikler, Resim 3'te daha belirgin görülmektedir. Hemoliz oluştuktan sonra ortamda sadece nukleuslar görülmekte ve bazı nukleusların, belli belirsiz bir membranla çevrili hayal hücreler (Ghost cells) içinde yer aldıkları dikkati çekmektedir. Resim 4'te de, ultraviyole etkisiyle sitoplazmada oluşan koyulaşma ya da toplanmalara ilişkin bir elektronmikroğraf verilmiştir.

Tartışma

Ültraviyole ışınlamasının civcivlerde (5) ve tavuklarda (1) alyuvar sayısı ile hemoglobinin miktarında, tavuklarda (2) alyuvar çökme hızı ve hematokrit değerinde bazı değişimler oluşturduğu bilinmektedir. Tavuklar üzerindeki bu araştırmamızda ise, ışınlamanın hemolize de neden olabileceği açıklığa kavuşturulmaktadır. Çekirdekli olan tavuk alyuvarlarındaki *in vitro* çalışmamızda, Maroney'in (11), kurbağa eritrositlerini incelemesindeki yönteminden yararlanılmıştır. Işığın dalga boyu azaldıkça hemolizin artacağı bildirimine (15) uyarak ışınlama, 254 nm'de yapılmış ve hesaplanan enerji verimi 24.7×10^4 erg. cm^{-2} . sn^{-1} olmuştur.

Tablodan ve Resim 2'den anlaşılacağı gibi, ultraviyole ışınlamanın alyuvarlarda hemolizi hızlandırdığı açıktır. Bu görünümüyle bulgularımız, memeli eritrositleri (3, 4, 6, 9, 12, 15) ve nukleuslu olan kurbağa eritrositleri (11) için bildirilenlerle uyum halindedir. Memeli (3, 4, 9, 12) ve kurbağa (11) eritrositlerindeki ultraviyole hemolizinin, bozulan membran geçirgenliği sonucu hücrenin su alarak şişmesi özelliğiyle kolloid ozmotik nitelikte olduğu bildirilmektedir. Maizels'in (10), tavuklarda katyon dağılımının insanlardakine çok benzer olduğu görüşünden hareketle araştırmamızda, alyuvarların ışınlamaya bağlı olarak şişkin bir görünüm kazanmaları, bu bildirimlerin tavuklar için de geçerli olabileceği kanısını uyandırmaktadır.

Hemolize uğrayacak alyuvarlarda şişme sonucu nukleusun bir kenara itilerek ekzantrik bir görünüm kazandığı, sitoplazmada yer yer koyulaşmalar ya da toplanmalar olduğu dikkati çekmektedir. Hemoliz sonucu hemoglobini kaybetmiş çekirdekli hayal hücrelere de rastlanmaktadır. Bu özellikler Resim 3'te daha belirgin olarak görülmektedir. Sitoplazmadaki koyulaşma ve toplanmaların, hemoglobinin bir özelliği olabileceği düşünülmektedir. Nitekim, ultraviyole ışınlamanın tavuk trombositlerinin ince yapısına etkisini incelediğimiz araştırmamızda (16), elektronmikroskopik alyuvar kesitlerinin

bazılarında rastladığımız bu koyulaşmaların (Resim 4), hemoglobin toplanmasından ileri gelebileceğini sanmaktayız.

Araştırmamızda alyuvarların, Ringer eriyiği ile çeşitli işlemlerden geçirilmiş olmasına karşın hemoliz göstermesi, bu olayın başlatılmasında doğrudan alyuvar membranına ait değişmelerin öncülük edebileceği yolundaki bildirimlere (3, 6, 9) güvenilirliği arttırmaktadır.

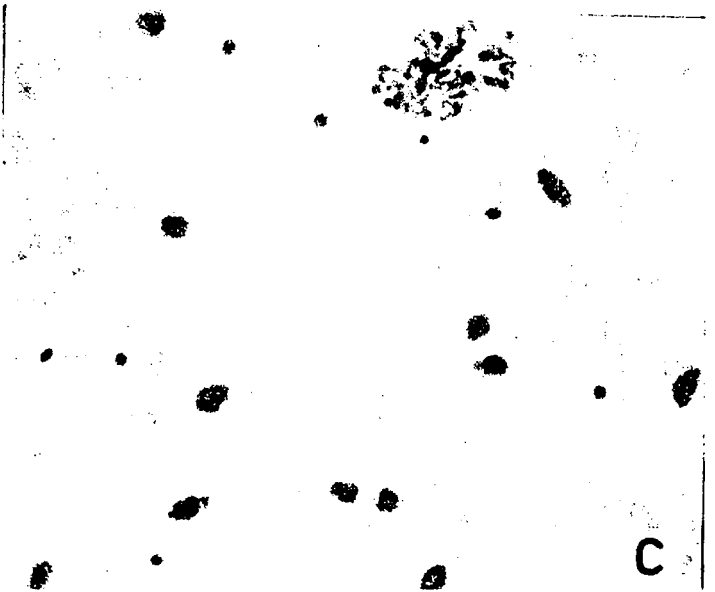
Literatür

- 1- **Bölükbaşı, F.** (1978) : *Ültraviyole ışınlamasının tavuklarda kan şekilli elementleri, hemoglobin miktarı ve alyuvar formülü üzerine etkisi konusunda ayrıntılı çalışmalar.* A.Ü. Vet. Fak. Derg., 25, 163-174.
- 2- **Bölükbaşı, F.** (1978) : *Ültraviyole ışınlamasının tavuklarda alyuvar çökme hızı ve hematokrit değeri üzerine etkisi.* A.Ü. Vet. Fak. Derg., 25, (2), 211-223.
- 3- **Cook, J.S.** (1956): *Some characteristics of hemolysis by ultraviolet light.* J. Cell. and Comp. Physiol., 47, 55-84.
- 4- **Glasser, O.** (1964) : *Medical Physics. Vol. 1,* The Yearbook Publishers, Inc., Chicago.
- 5- **Goranov, N. and Kovachishki, Kh.** (1971) : *Effects of ultraviolet irradiation on farm animals and poultry. II. Broiler chicks.* Veterinar-nomeditsinski Nauki (Sofia), 8 (4), 17-22.
- 6- **Green, J.W.** (1956) : *The separation of cation exchange and glycolysis in human red cells exposed to non-ionizing radiations.* J. Cell. and Comp. Physiol., 47, 125-136.
- 7- **Hunter, A.S. and Hunter, F.R.** (1957) : *A comparative study of erythrocyte metabolism.* Ibid, 49, 479-502.
- 8- **Jacobs, M.H., Glassman, H.N. and Parpart, A.K.** (1950) : *Hemolysis and zoological relationship. Comparative studies with four penetrating nonelectrolytes.* J. Exp. Zool., 113, 277-300.
- 9- **Leu, J., Wildbrandt, W. and Liechti, A.** (1942) : *Untersuchungen über Strahlenhämolysen. 3 Mitteilung: Ultraviolethämolysen.* Strahlentherapie, 71, 487-506.
- 10- **Maizels, M.** (1954) : *Active cation transport in erythrocytes.* Soc. Exp. Biol. Symp., 8, 202-227.
- 11- **Maroney, S.P.** (1960) : *Ultraviolet-induced hemolysis of frog erythrocytes in the presence of various electrolytes.* J. Cell. and Comp. Physiol., 56, 1-5.

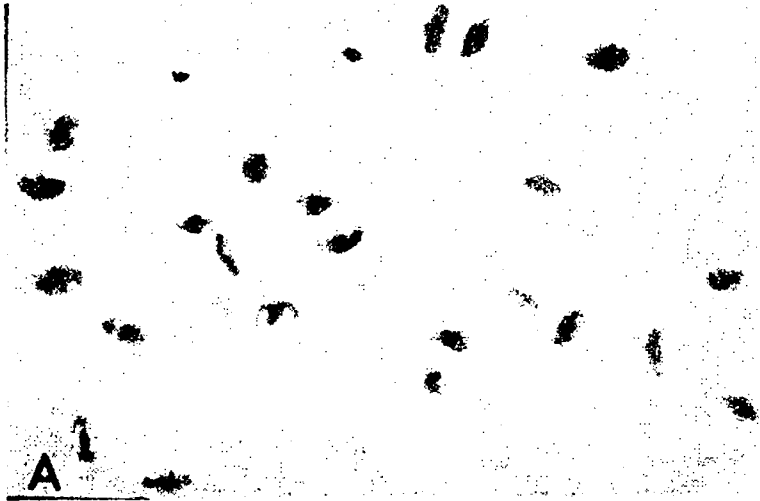
- 12- **Marshall, E. and Tsang, P.** (1963): *Ultraviolet haemolysis in hematologic disorders.* J. A.M.A., 184, 139-141.
- 13- **Montgomery, P. O'B., Bonner, W.A., Hundley, L.L. and Ashworth, C.T.** (1961) : *Biological effects of ultraviolet irradiation in Chaos chaos.* J. Roy. Micr. Soc., 80, 19-24.
- 14- **Montgomery, P.O'B. and Reynolds, C.** (1964) : *Cellular and subcellular responses to ultraviolet radiation.* Lab. Invest., 13, 1243-1253.
- 15- **Sonne, C.** (1929) : *The biological effects of the ultraviolet rays and investigations as to what part of spectrum they lie in.* Arch. Phys. Ther., 10, 239-252.
- 16- **Tanyolaç, A. ve Bölükbaşı, F.** (1978) : *Ültraviyole ışınlamasının tavuk trombositlerinin ince yapısı üzerine etkisi.* A.Ü. Vet. Fak. Derg., 25, (2), 245-260.

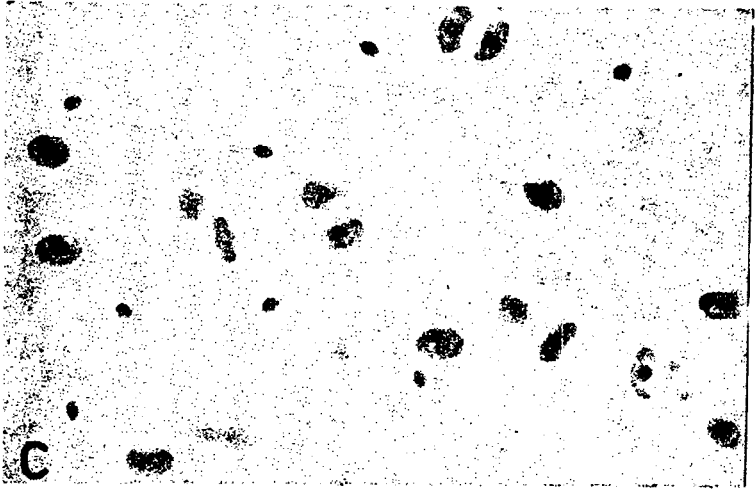
Yazı 7.4.1978 günü alınmıştır.

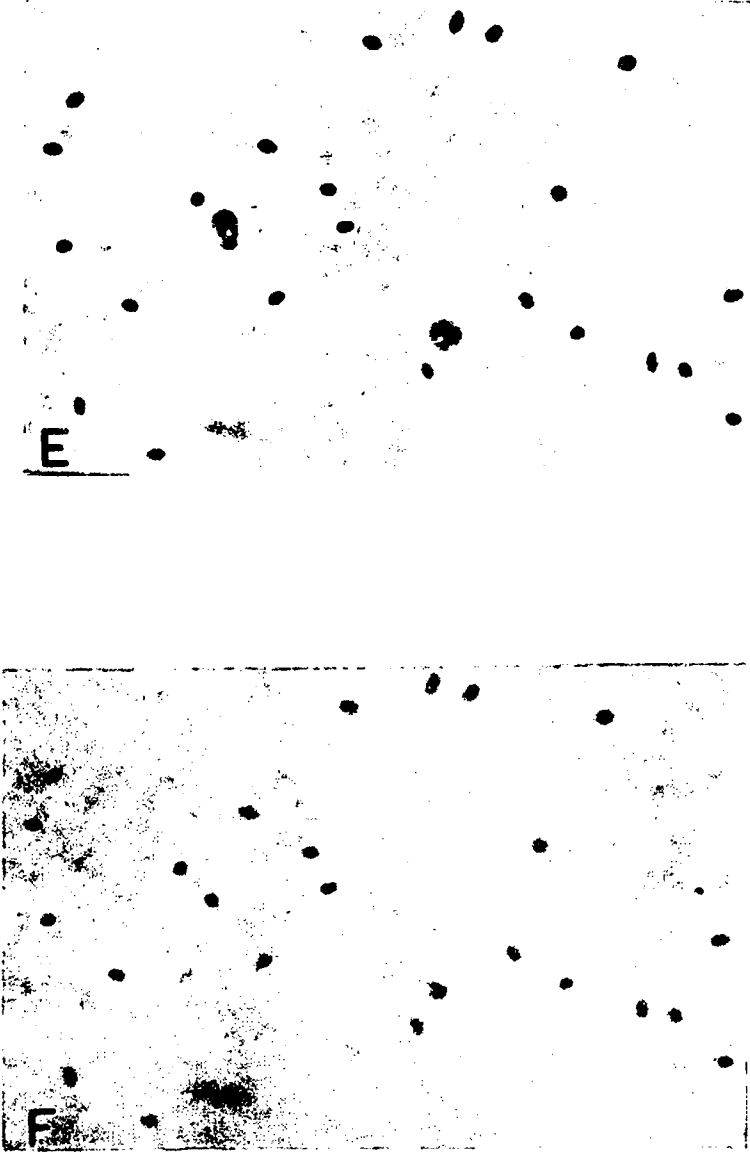




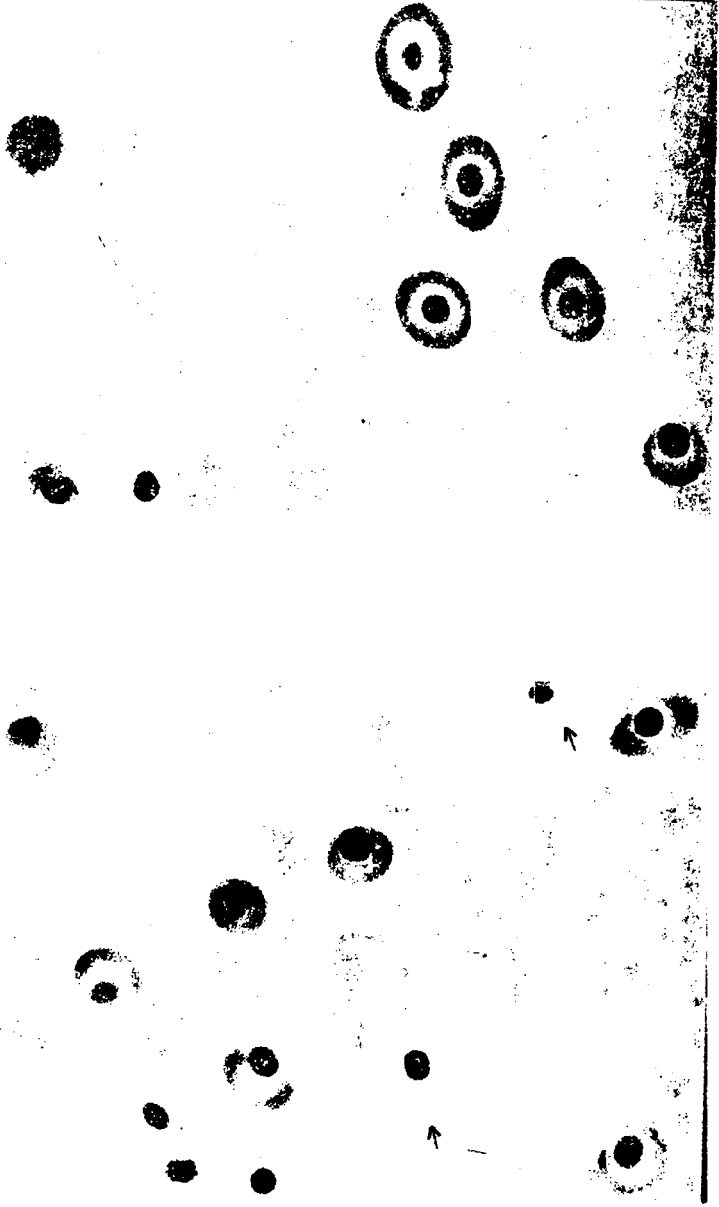
Resim 1. Kontrol örneklerinde A) 0,5 saat, B) 2,5 saat ve C) 5,5 saat sonra şekillenen hemoliz. x 500.







Resim 2. Ültraviyole ile ışınlanmış örneklerde A) 0,5 saat, B) 1,5 saat, C) 2,5 saat, D) 3,5 saat, E) 4,5 saat ve F) 5,5 saat sonra şekillenen hemoliz. x 500.



Resim 3. Ultraviyole ile ışınlama sonucu, hemolize uğrayacak alyuvarlardaki şişmeler, nukleusların kenara itilmeleri ve sitoplazmada yer yer görülen koyulaşmalar, ok'lar) hayal hücreleri. x 1200.



Resim 4. Ultraviyole etkisiyle eritrosit sitoplazmasındaki elektron-dens yığılmalar (büyük bir olasılıkla hemoglobin toplanmaları), x 9900.