

1EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

*Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 (Hirudinidae,  
Clitellata)'DE İMMÜN SİSTEM HÜCRELERİNİN IŞIK  
VE FLORESAN MİKROSKOBU İLE İNCELENMESİ

**Irmak ATALAYIN**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Hüseyin ARIKAN**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi: 27 .09.2016**

**Bornova-İZMİR**

**2016**



İrmak ATALAYIN tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “*Hirudo medicinalis Linnaeus, 1758 (Hirudinidae, Clitellata)*’de İmmün Sistem Hücrelerinin Işık ve Floresan Mikroskobu ile İncelenmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 27/09/2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**İmza**

**Jüri Başkanı** : Prof.Dr.Hüseyin ARIKAN

**Raportör Üye** : Prof.Dr.Dinçer AYZ

**Üye** : Yrd.Doç.Dr. Murat AFSAR



**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Hirudo medicinalis Linnaeus, 1758* (Hirudinidae, Clitellata)’de İmmün Sistem Hücrelerinin Işık ve Floresan Mikroskobu ile İncelenmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu kez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

27/09/2016

İmzası

Adı Soyadı

Irmak ATALAYIN



## ÖZET

### ***Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 (Hirudinidae, Clitellata)'DE İMMÜN SİSTEM HÜCRELERİNİN IŞIK VE FLORESAN MİKROSKOBU İLE İNCELENMESİ**

ATALAYIN, Irmak

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hüseyin ARIKAN

Eylül 2016, 17 sayfa

Mevcut çalışma, tıbbi sülük, *Hirudo medicinalis*'te immün sistem hücrelerini hem ışık hem de floresan mikroskopuyla saptamak amacıyla yapılmıştır. Bunun için, tıbbi sülüğün kanında bulunan hemosit tiplerinin ölçüm ve hesaplanmasında giemsa boyasıyla boyanmış yayma preparatlardan yararlanılmıştır. Hemosit tipleri morfolojik olarak ışık mikroskopunda incelenip büyüklükleri ölçülmüştür. Tıbbi sülüğün kanında prohemositler, hyalin hemositler (plazmatositler), granüler hemositler (granülositler) ve eleositler (inklüzyonlu hemositler) olmak üzere toplam dört farklı hemosit tipi tespit edilmiştir.

Prohemositlerden kökenlendiği düşünülen diğer hemosit tiplerinin antibakteriyal ve antiparazitik savunma mekanizmaları kapsamında fagositik aktivite, melanizasyon/kapsül oluşturma, pıhtı oluşturma ve yara iyileşmesinde önemli rolleri bulunmaktadır.

**Anahtar Sözcükler:** Tıbbi sülük, *Hirudo medicinalis*, Annelida, İmmün sistem hücreleri, Lateral sinus.



## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE IMMUN SYSTEM CELLS of *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 (Hirudinidae, Clitellata) WITH LIGHT and FLUORESCENCE MICROSCOPY

ATALAYIN, Irmak

M.Sc. In Biology

Supervisor: Prof. Dr. Hüseyin ARIKAN

September 2016, 17 pages

The study was conducted to detect immune system cells of medicinal leech, *Hirudo medicinalis*, with both light and fluorescence microscopy. For this purpose, giemsa dyed preparates were used to calculate measure and hemocytes types in blood of *Hirudo medicinalis*. Hemocytes types were morphologically examined under a light microscope and the size of the cells was measured. There are four different hemocytes types such as prohemocytes, hyaline hemocytes, granular hemocytes and eleocytes were determined in the blood of medicinal leech.

The scope of antibacterial and antiparasitic defense mechanism of other species which are thought to originate from prohemocytes have been an important role on phagocytic activity, melanisation/ formation of capsul and clots, and recovery of wounds.

**Keywords:** The medicinal leech, *Hirudo medicinalis*, Annelida, Immun system cells, Lateral sinus.



## TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde, araştırma aşamasında, yön tayininde ve tamamlanmasında destek olan, daima bilgisini ve sabrını benden esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Hüseyin ARIKAN'a minnettarım. Tezimin başlangıcından bitimine kadar benden yardımlarını esirgemeyen, her zaman yanımda olan değerli bilgilerini paylaşan Sayın Doç. Dr. Yiğit UYANIKGİL'e bana verdiği tüm emekleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tezimin laboratuvar çalışmaları aşamasında yardımcı olan ve imkan sağlayan, çalışma süresince tüm zorlukları aşmamda beni destekleyen Araş. Gör. Sayın Kubilay Doğan KILIÇ'a teşekkürlerimi sunarım. Tezimde kullandığım türün temininde bana yardımcı olan Su Ürünleri Mühendisi Sayın Bahadır UĞURAL'a ve yüksek lisans öğrencisi İlhan Bayram İSMAİL'e, tezimin proje başvurusu sürecinde yardımcı olan Araş. Gör. Esra AKAT'a, fotoğraf çekimi aşamasında bana yardımcı olan yüksek lisans öğrencisi Dirim ŞENDOĞAN'a, 2015 Fen 009 No'lu proje kapsamında maddi destek veren Ege Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim. Son olarak benden hem maddi hem de manevi desteğini esirgemeyen canım aileme, ümitsizliğe düştüğümde beni cesaretlendirdiği için çok teşekkür ederim.



**İÇİNDEKİLER****Sayfa**

ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
TEŞEKKÜR .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xv
1. GİRİŞ .....	1
2. MATERYAL VE METOT .....	4
2.1. Örneklerin temini ve hazırlanması .....	4
2.2. Deneysel prosedür ve hemositlerin boyanması .....	4
2.2.1. Işık mikroskobu yöntemi .....	4
2.2.2. Floresan mikroskobu yöntemi .....	6
2.3. Mikroskobik inceleme .....	6
3. BULGULAR .....	7
3.1. Işık mikroskobu bulguları .....	7
3.1.1. Prohemositler .....	7
3.1.2. Hyalin hemositler (Plazmatositler) .....	8
3.1.3. Granüler hemositler (Granülositler) .....	8
3.1.4. Eleositler .....	9

## İÇİNDEKİLER (Devam)

### Sayfa

3.2. Floresan mikroskobu bulguları .....	10
4. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	11
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	14
ÖZGEÇMİŞ .....	17



**ŞEKİLLER DİZİNİ**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. <i>Hirudo medicinalis</i> 'in A. dorsalden ve B. ventralden görünüşü .....	4
2.2. Kanın lam üzerinde yayılışı .....	5
3.1. <i>H. medicinalis</i> 'te tespit edilen hemositlerden prohemosit.....	7
3.2. <i>H. medicinalis</i> 'te tespit edilen hemositlerden hyalin hemositler.....	8
3.3. <i>H. medicinalis</i> 'te tespit edilen hemositlerden granüler hemositler .....	9
3.4. <i>H. medicinalis</i> 'te tespit edilen hemositlerden eleositler .....	9
3.5. <i>H. medicinalis</i> 'te acridine orange uygulaması ile floresan mikroskopta tespit edilen hemosit tipleri(3.5A, 3.5B, 3.5C, 3.5D).....	10



## GİRİŞ

*Hirudo medicinalis* batı ve güney Avrupa ile Ural Dağları ve kuzeydoğu Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde yayılış göstermektedir (Sawyer, 1986). 1554'de, doğa bilimci Guillaume Rondelet "Natural History of Fishes" adlı eserinde farklı sülük türlerinin ilk tavsiflerini vermiştir. 1735'de, Linnaeus tarafından "*Systema Naturae*" adlı eserinde *Hirudo medicinalis* ve *Hirudo sanguisuga* sınıflandırmalarını verilmiştir. 20. yüzyıl başlarında, Fransa kodedsi tıbbi sülüğün ayrıntılı özelliklerini vermiştir.

650 sülük türünden biri olan *H. medicinalis* terapötik özelliğinden dolayı üzerinde en fazla çalışılan ve en yaygın kullanılan türlerden biridir. Bilimsel ismi de tıbbi önemini yansıtmaktadır. Kan emen organizmalar arasında, sülük kanın pıhtılaşmasını önleyen oldukça gelişmiş bir mekanizmaya sahip ayrıcalıklı bir omurgasızdır. Kan emen annelid sülükler uygarlığın başından beri terapötik amaçlar için kullanılmıştır. Eski Mısır, Hindistan, Yunan ve Arap doktorlar deri hastalıkları, sinir sistemi bozuklukları, ürogenital sistem rahatsızlıkları, enflamasyon ve diş sorunları gibi sistemik hastalıkların tedavisinde sülükleri kullanmışlardır (Abdualkader et al., 2013).

Sülükler annelida phylumu, clitellata sınıfı içerisinde yer alırlar. 3 ordo, 10 familya, 131 cins ve 1000'den fazla türle temsil edilirler. Sülüklerin boyu familyalar arasında varyasyon gösterebilir ve 20 cm'ye kadar ulaşabilir. *Haementaria ghilianii* gibi Amazon sülüklerinde uzunluk yaklaşık 50 cm'dir. Klasik bir sülük vücudu 2 preoral metamerik olmayan segmentler ve 32 somitten oluşmuştur. Bir sülükte genellikle anterior ve posterior vantuzlar vardır. Sülükler deri yoluyla nefes alırlar. Hermafrodit canlılardır. Sülükler beslenme alışkanlıklarına göre, birçok omurgasızın predatörü olan yırtıcı sülükler ve ektoparazit olarak insanlar dahil omurgalıların kanı ile beslenen sülükler olarak 2 gruba ayrılırlar. Isırma çeneleri ve vantuzların yardımı ile kurbanın kanını emebilirler. Sülükler 10-30 dk içerisinde 2-20 ml kan emerler. Sülükler sucul ve nemli karasal bölgelerde dahil çeşitli ortamlarda yaşayabilirler. Bazı türler tatlı suda, haliçlerde, akarsularda, göletlerde, göllerde ve denizlerde yaşarlar.

Birçok triploblastik hayvan sekonder sölom adı verilen bir vücut boşluğuna sahiptir. Sölom boşluğu mezoderm kökenli hücrelerden oluşan mezotelyum ile döşenmiştir. Sölom omurgalılarda peritoneal boşluk, pleural boşluk ve perikardiyal boşluk olarak birçok bölüme ayrılmıştır. Halkalı kurtlarda (Annelidlerde) ise, her segment bir çift bilateral sölomattan oluşmuştur. Sölomat omurgasızlarda kan/damar sistemi çok iyi gelişmiştir.

Omurgalılar için karakterize edilen kan hücrelerinden en azından bazılarının yapısal ve fonksiyonel özellikleri ile serbest hareket eden hücreler tüm çok hücreli hayvanlarda bulunmaktadır. Bir damar sistemi ile birlikte hakiki sölom boşluğu gelişmiş hayvanlarda, bu hücreler yaygın olarak sölomositler ve/veya hemositler olarak belirtilmekte; sölom boşluğu olmayan (asölomatlar veya psödosölomatlar) hayvanlarda ise amebositler, intersisial hücreler ya da neoblastlardan bahsedilmektedir (Hartenstein, 2006)

Üzerinde en fazla çalışılan arthropodlar ve mollusklar gibi çoğu omurgasız hayvanda açık dolaşım sistemi mevcuttur. Bu hayvanlarda, sölomosit adı verilen sölom sıvısı içinde bulunan hücreler kan damarının lümenine göç ederler ve hemosit adı verilen kan damarı lümeninin hücreleri de karşılıklı olarak sölom boşluğuna göç ederler. Omurgasızlar arasında, çoğu omurgasızdan farklı olarak, annelidler (halkalı kurtlar) ise sölom boşluklarının sıvısından ayrı olarak kapalı bir damar sistemine sahiptirler. Hemositler tüm sölomat hayvanların sölom boşluğu ve damar lümeninde bulunurlar. Sölomositler hemositleri oluşturmak için kan damarı lümenine göç ederler ve kan damarı lümenindeki hücreler de sölom içine göç ederler. (Hartenstein, 2006)

Annelidlerde, hücrel immünite (fagositoz, sitotoksosite) ve hümmoral immünite (antimikrobial, hemolitik ve pıhtılaşma özellikleri)'nin değişik şekillerde sölom sıvısına katılması konusunda çok sayıda çalışma mevcuttur (Stein and Cooper, 1981; Cooper, 1996; Adamowicz, 2005). Sölomositlerin aksine, annelid kan hücrelerinin morfolojisi ve immün fonksiyonları henüz tanımlanmamıştır. Annelidler arasında, tıbbi sülük, *Hirudo medicinalis* ventral kan sinusu içinde kapanmış bir sinir şeridinde sahip olarak orijinal bir özellik göstermektedir.

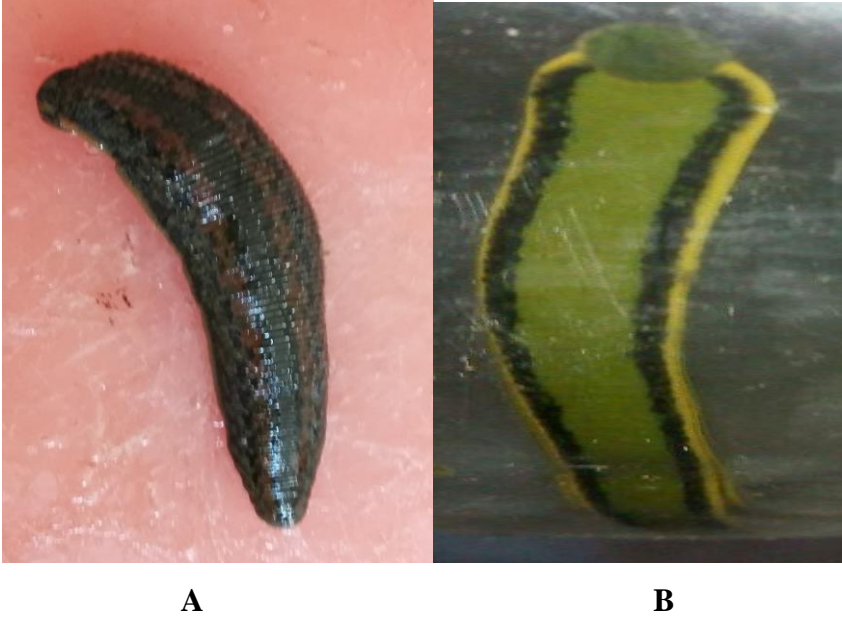
Bu tez çalışmasında, tıbbi sülük, *Hirudo medicinalis*'in kanında bulunan hemosit tiplerinin belirlenerek morfolojilerinin ışık ve floresan mikroskopta incelenmesi amaçlanmıştır.



## 2. MATERYAL ve METOT

### 2.1. Örneklerin Temini ve Hazırlanması

Çalışmada kullanılan *Hirudo medicinalis* örnekleri Kemeraltı (İzmir)'nden sağlanmıştır. Öncelikle örneklerin hem dorsalden hem de ventraldan resimleri çekilmiş ve deneysel prosedüre geçilinceye kadar, laboratuvar ortamında içinde su bulunan cam kavanoz içinde tutulmuşlardır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Çalışmada incelenen *Hirudo medicinalis*'in A. dorsalden ve B. ventralden görünüşü.

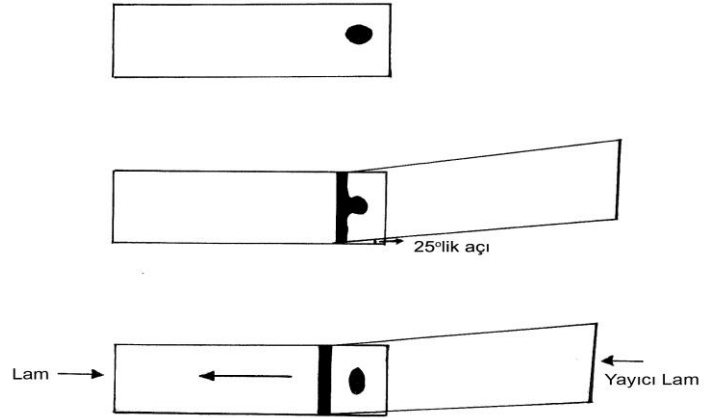
### 2.2. Deneysel Prosedür ve Hemositlerin Boyanması

#### 2.2.1. Işık Mikroskobu Yöntemi

Hemositlerin ölçüm ve incelenmesi için gerekli kan lateral sinusların ya da posteriyör vantuzun küçük bir makas yardımıyla kesilmesi ile elde edilmiştir. Kan heparinli hematokrit kılcal tüplere alınmıştır. Hemositlerin ölçüm ve hesaplanmasında Giemsa solüsyonuyla hazırlanmış yayma preparatlardan yararlanılmıştır.

## Yayma Preparatlar İçin Giemsa Boyaması

**Yayma Preparatın Hazırlanması:** Önceden temizlenmiş lamın bir kenarından 1 cm kadar içeriye bir damla kan damlatılır. Yayıcı olarak ikinci bir temiz lam alınır ve kan damlası ile  $25^\circ$  açı yapacak şekilde ayarlanıp aynı hızda yayıcı lam itilerek yayma gerçekleştirilmiş ve kurumaya bırakılmıştır (Şekil 2.2). İşlemlerin devamı için 4 farklı şale hazırlanır. Sırasıyla 1. şaleye metanol, 2. şaleye distile su, 3. şaleye giemsa çalışma solüsyonu ve 4. şaleye ise akar su konulur. Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra yayılan preparatlar 1. şalede bulunan metanolde 10 dk. tespit edilir. Tespit işleminden sonra 2. şalede bulunan distile suda yaklaşık 5 dk. bekletilir. Yaymalar Giemsa çalışma solüsyonu içeren 3. şalenin içine konur ve 25-35 dk. tutulur. Lamlar şaleden çıkartılır ve 4. şalede bulunan akar su içine 3-4 kez batırılıp çıkartılarak yıkanır. Sonra lamlar şaleye yerleştirilir ve 5-10 dk. boya kalıntıları temizlenene kadar bekletilir. Şaleden çıkartılan lamlar düşey pozisyonda dizilir ve havada kurutulur. Kuruma işlemi bittikten sonra lamlar entellan ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde lamelle kapatılır ve mikroskopta incelenir.



Şekil 2.2. Kanın lam üzerinde yayılışı.

Giemsa (Merck) hazır stok solüsyondan 7.8 cc + 180 cc distile su ile hazırlanan çalışma solüsyonu kullanılmıştır.

### **2.2.2. Floresan Mikroskobu Yöntemi**

Hemositlerin ölçüm ve incelenmesi için gerekli kan lateral sinusların ya da posterior vantuzun küçük bir makas yardımıyla kesilmesi ile elde edilmiştir. Hemolenf sıvısı heparinli hematokrit kılcal tüplere alınmıştır. Hemositlerin ölçüm ve hesaplanmasında Acridine orange solüsyonuyla hazırlanmış yayma preparatlarından yararlanılmıştır.

#### **Yayma Preparatlar İçin Acridine Orange Boyaması**

**Yayma Preparatın Hazırlanması:** Önceden temizlenmiş lamın bir kenarından 1 cm kadar içeriye bir damla kan damlatılır. 1/300 oranında PBS (phosphate buffered saline) ile dilute edilen (seyreltilen) Acridine orange stok solüsyonu preparat yapılacak V(volume) hacmindeki hemolenf damlası üzerine V/V hacminde olacak şekilde uygulanır. Kan damlasının hacmiyle üzerine uygulanan boya hacmi aynı olacak şekilde ayarlanır. Daha sonra alınan Acridine orange solüsyonu kanla pipetaj yapıldıktan sonra yayıcı olarak ikinci bir temiz lam alınır ve hemolenf damlası ve boya karışımı ile 25° açı yapacak şekilde ayarlanıp aynı hızda yayıcı lam itilerek yayma gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hızlı bir şekilde boyaya uygun filtrelerle floresan mikroskobunda incelenir. Ayrıca yapılan bütün işlemler karanlık bir odada ve hemen inceleme yapılmalıdır.

### **2.3. Mikroskobik İnceleme**

Hemositlerin morfolojik özellikleri ışık ve floresan mikroskobunda incelenmiştir. Daha sonra, iyi hazırlanmış preparatlarda MOB-1-15x mikrometrik oküler yardımı ile hemositlerin ölçümleri alınmış ve Axio Scope.A1 mikroskobu altında Zen Lite programı ile fotoğrafları çekilmiştir. Floresan mikroskobuna ait incelemeler ve fotoğraf çekimleri Leica marka DM 3000 model mikroskobu ile yapılmıştır.

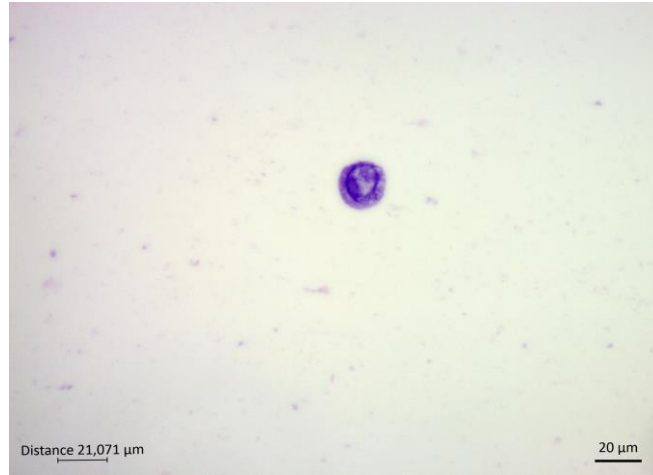
### 3. BULGULAR

#### 3.1. Işık Mikroskobu Bulguları

*H. medicinalis*'te, yapısal olarak prohemositler, hyalin hemositler (plazmatositler veya monositler), granüler hemositler (granülositler) ve eleositler (inklüzyonlu hemositler) şeklinde dört büyük kan hücre tipi tanımlanmıştır.

##### 3.1.1. Prohemositler

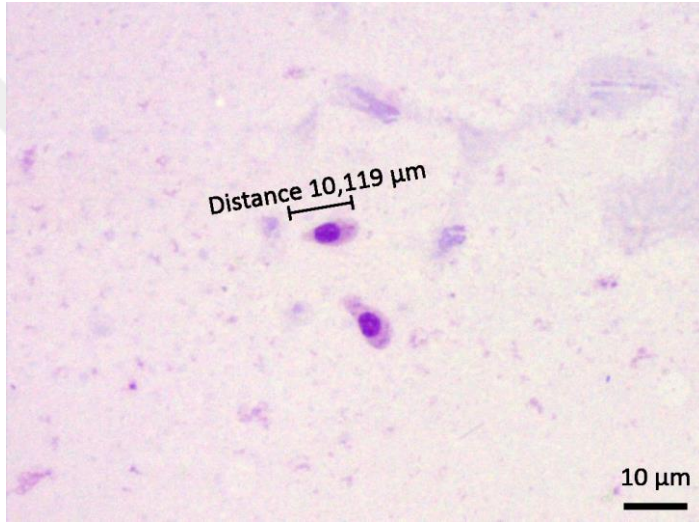
Prohemositler en temel hemosit tipidir. Diğer hücrelerden büyüklük olarak daha küçüktürler ve hücrenin neredeyse tamamını dolduran bir nükleus ile ince bir tabaka şeklinde yer alan bir sitoplazmaya sahiptir. Granülositler ile plazmatositler bu hemosit tipinden köken alırlar. Prohemositler hematopietik dokulardaki hücrelerin çoğunluğunu oluşturan immatür hücrelerdir. Bunlar küçük, nispeten büyük nükleuslu yuvarlak hücreler olup omurgalılarıdaki öncü kan hücrelerine benzerler. Prohemositlerin diğer kan hücre tiplerine farklılaşan immatür kan öncü hücreleri olduklarına inanılmaktadır (Hartenstein, 2006). Prohemositlerde ortalama çap 21.07  $\mu\text{m}$  olarak ölçülmüştür (Şekil 3.1 ve Şekil 3.5A).



Şekil 3.1. *Hirudo medicinalis*'te tespit edilen hemositlerden prohemosit.

### 3.1.2. Hyalin Hemositler (Plazmatositler)

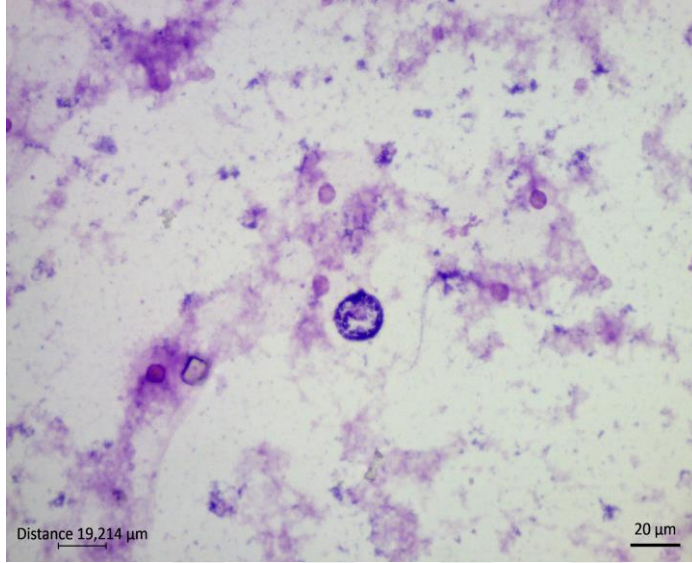
Farklılaşmış kan hücrelerinin en yaygın tipi hyalin (camsı) hemositler ya da plazmatositlerdir. Psödopodiumların mevcudiyeti hyalin hemositlerin önemli karakteristiğidir. Plazmatositler genel olarak patojenlerin sindirilmesinde (doğuştan immün tepki) ve apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılmasında fagositik hücreler (makrofajlar) olarak tanımlanmıştır. Plazmatositler omurgalılarıdaki monositler/makrofajlar ile karşılaştırılabilirler (Hartenstein, 2006). Oval olan hücrelerde uzun çap 10.12  $\mu\text{m}$  olarak ölçülmüştür (Şekil 3.2. ve Şekil 3.5B).



Şekil 3.2. *Hirudo medicinalis*'te tespit edilen hemositlerden hyalin hemositler (plazmatositler).

### 3.1.3. Granüler Hemositler (Granülositler)

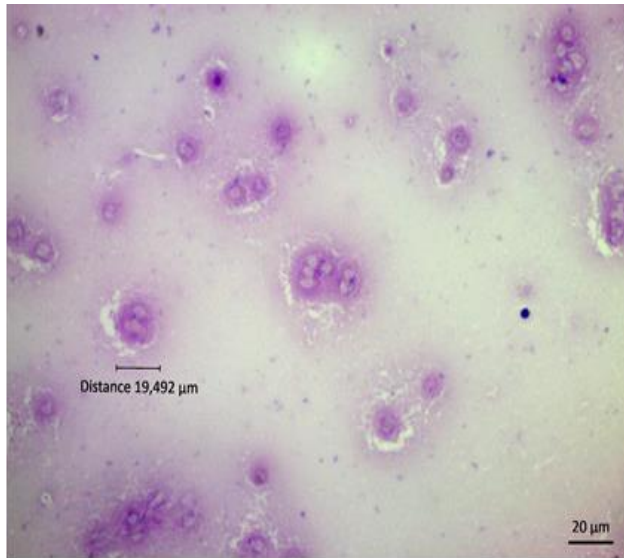
Granüler hemositler (granülositler) enzim içeren lizozomlar, elektronca yoğun granüllerle doldurulmuştur. Omurgalılarıdaki nötrofil, eosinofil ve bazofilik granülositlere benzerdirler. Granülositler yara iyileşmesi, kan pıhtılaşması ve fagositoz dahil immün fonksiyonlar gibi gelişimsel ve metabolik fonksiyonlar ile ilgili hücrelerdir (Hartenstein, 2006). Sferik olan granüler hemositlerde ortalama çap 19.21  $\mu\text{m}$  olarak ölçülmüştür (Şekil 3.3 ve Şekil 3.5C).



**Şekil 3.3.** *H. medicinalis*'te tespit edilen hemositlerden granüler hemosit.

#### 3.1.4. Eleositler

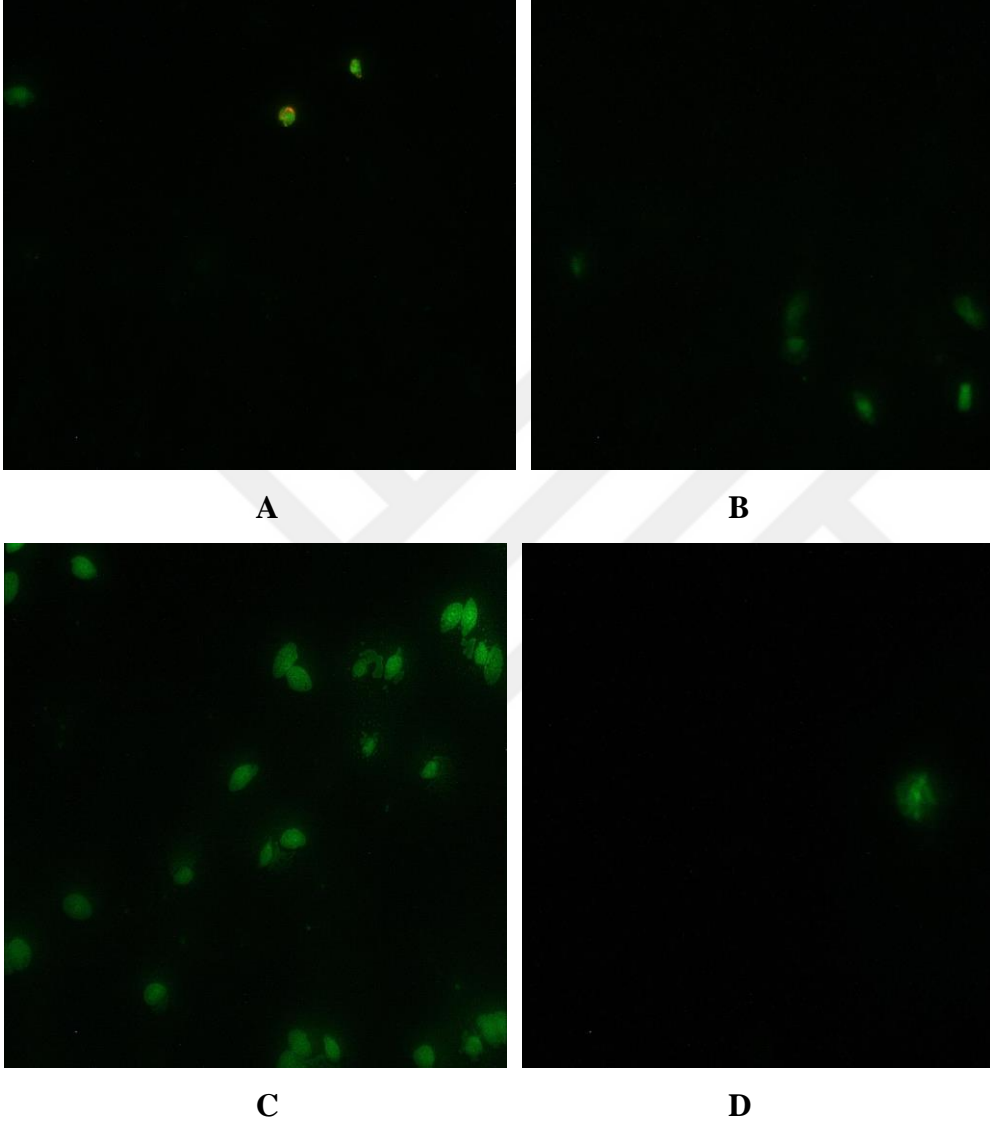
Plazmatositler ve granülositlerden başka, çoğu türde kan/hemolenf/ sölom düzensiz büyüklükte ve şekilde lipid veya kristal içeren bir grup hücre içermektedir. Eleositler, kloragogen hücreler, spherulositler, adipohemositler ve oenositoidler şeklinde farklı isimlerle anılmaktadır. Sitoplazmalarında bol miktarda vakuol tespit edilmiştir. Ortalama çap 19.49 µm olarak ölçülmüştür (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5D).



**Şekil 3.4.** *H. medicinalis*'te tespit edilen hemositlerden eleositler.

### 3.2. Floresan Mikroskobu Bulguları

Acridine orange uygulaması sonucunda floresan mikroskopta elde edilen hemosit tipleri Şekil 3.5 (3.5A, 3.5B, 3.5C, 3.5D)'te verilmiştir.



Şekil 3.5. *H. medicinalis*'te acridine orange uygulaması ile floresan mikroskopta tespit edilen hemosit tipleri. A. Prohemosit, B. Hyalin hemositler, C. Granüler hemositler, D. Eleosit.

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sölomat omurgasızlarda kan/damar sistemi iyi gelişmiştir. Kan damarları sölomatanın mesothelial duvarları arasında açık sinuslar şeklindedir (Gardiner, 1992; Nakao, 1974; Ruppert and Carle, 1983; Smith, 1986). Sölomatanın mesothelial duvarları progenitör kan hücrelerinin kökenlendiği yerlerdir. Hemositler tüm sölomat hayvanların sölom boşluğunda ve damar lümeninde bulunurlar. Sölom hücreleri (sölomositler) hemositleri oluşturmak için kan damarlarının lümenine göç ederler (Hartenstein, 2006).

Hemositlerin bağışıklık sistemi içerisinde multi-fonksiyonel hücreler olarak rol oynadığı bilinmektedir. Fagositöz (Stein and Cooper, 1981; Bilej et al., 1990; Dales and Kalac, 1992; Cooper, 1996; Adamowicz and Wojtaszek, 2001), kapsül meydana getirme mekanizması (Stein and Cooper, 1983; Field et al., 2004), nodülasyon (Valembois et al., 1992 ve hümorale immün tepkiler (Stein and Cooper, 1983; Ville et al., 1995; Jarosz and Glinski, 1997; Cooper et al., 2001) dahil hücresele immün tepki ile ilgili hücrelerdir. Bunun yanında, pıhtı oluşumu ve direk olarak yaraların iyileştirilmesinde oynadıkları önemli roller birçok böcek türü üzerinde yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Ancak sınıflandırılmasında bir kesinlik olduğu söylenemez. Jones (1962) tarafından yapılan bir sınıflandırma birçok araştırmacı tarafından benimsenen bu çalışma, hemositlerin kökeni ve işlevleri hakkında yararlı bir kaynak olarak kullanılmaktadır. Hemositler bu çalışma kapsamında prohemosit, plazmatosit, granülosit, sitosit, sferülosit, adipohemosit, podosit, önositoit ve vermiform hücreler olarak çeşitli sınıflara ayrılmıştır. Çoğu hemosit hücresele bağışıklıkta alacağı işleve göre diğer tipe değişebilmektedir. Gupta (1985) tarafından yapılan bir çalışmada, hemositler 7 farklı tip olarak belirlenmiştir. Prohemositlerin dışında diğer hemosit tipleri plazmatosit, granülosit, sferülosit, adipohemosit, önositoit ve sitositler olarak sınıflandırılmıştır.

Prohemositler, hyalin hemositler ve granüler hemositler annelidlerde dolaşan kan hücrelerinin çoğunluğunu oluştururlar. Sferülositler ya da adipohemositlere benzeyen annelidlerdeki eleositler değişik büyüklükte ve şekillenmiş inklüzyonlu kan hücreleridir. Birçok araştırmacı (Butt and Shields,

1996; Chiang et al., 1988; Essaway et al. 1985; Giulianini et al., 2003; Pelc, 1986) bu hücrelerin fagositik plazmatositlerin farklılaşma yolunda son safhaları gösterdiğini iddia etmektedir.

Yapısal olarak dört büyük kan hücre tipi prohemositler, hyalin hemositler (plazmatositler veya monositler), granüler hemositler (granülositler) ve eleositler (inklüzyonlu hemositler) tanımlanmıştır (Hartenstein, 2006). Prohemositler hematopoietik dokulardaki hücrelerin çoğunluğunu oluşturan immatür hücrelerdir. Bunlar küçük, nispeten büyük nükleuslu yuvarlak hücreler olup omurgalılarıdaki öncü kan hücrelerine benzerler. Prohemositlerin diğer kan hücre tiplerine farklılaşan immatür kan öncü hücreleri olduklarına inanılmaktadır (Wigglesworth, 1965; Jamieson, 1981; Lebestky et al., 2000).

Farklılaşmış kan hücrelerinin en yaygın tipi hyalin (camsı) hemositler ya da plazmatositlerdir. Plazmatositler genel olarak patojenlerin sindirilmesinde (doğuştan immün tepki) ve apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılmasında fagositik hücreler (makrofajlar) olarak tanımlanmıştır. Plazmatositler omurgalılarıdaki monositler/makrofajlar ile karşılaştırılabilirler. Plazmatositler özellikle sitoplazmik uzantılara sahip olmaları ile kolaylıkla ayırt edilmektedir. (Evans et al., 2003).

Granüler hemositler (granülositler) enzim içeren lizozomlar, elektronca yoğun granüllerle doldurulmuştur. Omurgalılarıdaki nötrofil, eosinofil ve bazofilik granülositlere benzerdirler. Granüler hemositler yara iyileşmesi, kan pıhtılaşması, fagositoz, ve patojenlerin kapsülasyonu dahil immün fonksiyonların yanında gelişimsel ve metabolik fonksiyonlar ile ilgili hücrelerdir. Plazmatositler ve granulositlerden başka, çoğu türde kan/hemolenf/ sölom düzensiz büyüklükte ve şekilde lipid veya kristal içeren bir grup hücre içermektedir. Eleositler, kloragogen hücreler, spherulositler, adipohemositler ve oenositoidler şeklinde farklı isimleri bulunmaktadır.

Hemosit tipleri arasında en sık görülen hücrelerin plazmatositler ve granülositler olduğu tespit edilmiştir. *H. medicinalis*'te hemosit tiplerinin farklı oranlarda olduğu belirlenmiştir. Bu durum bu hücrelerin birbirlerine

dönüştürdüklerini ve sayılarının değişiklik göstermesi hücrelerin mitotik aktivite gösterdiklerini de göstermektedir. Bu kan hücreleri diğer omurgasız türlerinde olduğu gibi, fagositoz, kapsül oluşturma, koagülasyon ve yaraların iyileştirilmesi şeklinde immün sistem faaliyetlerinde önemli roller almaktadırlar (Lavine and Strand, 2002).

Adamowicz (2005) tarafından oligoket toprak solucanı türü, *Dendrobaena veneta* sölomositlerinin morfolojisi ve ultrayapısı üzerine yapılan bir çalışmada, sölom sıvısında eleositler (kloragogen hücreler), hyalin amöbositler ve granüler amöbositler şeklinde üç tip hücre ayırt edilerek eleositlerin çok sayıda klorogom içeren sitoplazmaya sahip nispeten büyük hücreler olduğu tespit edilmiştir.

Mevcut çalışmada eleositler hemositler arasında en büyük ve sferik hücreler olarak tespit edilmiştir. Aynı zamanda nukleuslarının sitoplazmaya oranla daha küçük olduğu gözlenmiştir. Literatür bilgisine uygun olarak sitoplazmalarında glikojen ve lipid depoladıkları saptanmıştır.

Omurgalı immünitesinde kan lökositlerine analog olan ve annelidlerin immün sisteminde aktif rol oynayan hemositlerin Hirudinidae familyası içinde yer alan sülüklerde de benzer yapısal özelliklere sahip olduğu ve benzer immünolojik görevler üstlendiği söylenebilir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdualkader, A.M., Ghawi, A.M., Alaama, M., Awang, M.A., ad Merzouk, A.** 2013, Leech therapeutic applications, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(2): 127–137.
- Adamowicz, A., ad Wojtaszek, J.**, 2001, Morphology and phagocytic activity of coelomocytes in *Dendrobaena veneta* (Lumbricidae), *Zoologica Poloniae*, 46(1-4): 91-104.
- Adamowicz, A.**, 2005, Morphology and ultrastructure of the earthworm *Dendrobaena veneta* (Lumbricidae) coelomocytes, *Tissue and Cell*, 37: 125-133.
- Bilej, M., Vetvicka, V., Tuckova, L., Trebichavsky, I., Koukal, M., ad Sima, P.**, 1990, Phagocytosis of synthetic particles in earthworms. Effect of antigenic stimulation and opsonisation. *Folia Biologica*, 36(6): 273-280.
- Butt, T.M., ad Shields, K.S.**, 1996, The structure and behavior of gypsy moth (*Lymantria dispar*) hemocytes, *Journal of Invertebrate Pathology*, 68: 1-14.
- Chiang, A.S., Gupta, A.P., ad Han, S.S.**, 1988, Arthropod immune system I. Comparative light and electron microscopic accounts of immunocytes and other hemocytes of *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae), *Journal of Morphology*, 198: 257-268.
- Cooper, E.L.**, 1996, Earthworm immunity. In: Rincevich, B., Müller, W.E.G. (Eds.), *Invertebrate Immunology*. Springer, Berlin, Heidelberg, 10-45pp.
- Cooper, E.L., Kauschke, E., ad Cosarizza, A.**, 2001, Annelid humoral immunity: Cell lysis in earthworms, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 484: 169-183.
- Dales, R.P., ad Kalac, Y.**, 1992, Phagocytic defence by the earthworm *Eisenia foetida* against certain pathogenic bacteria, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 101A, 487-490.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Essaway, M., Maelville, A., ad Brehelin, M.,** 1985, The hemocytes of *Heliothis armigera*: ultrastructure, functions and evolution in the course larval development, *Journal of Morphology*, 186: 225-64.
- Evans, C.J., Hartenstein, V., ad Banerjee, U.,** 2003, Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis, *Developmental Cell*, 5: 673-690.
- Field, S.G., Kurtz, J., Cooper, E.L., ad Michiels, N.K.,** 2004, Evaluation of an innate immune reaction to parasites in earthworms, *Journal of Invertebrate Pathology*, 86: 45-49.
- Gardiner, S.L.,** 1992, Polychaeta: general organization, integument, musculature, coelom, and vascular system. In *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Vol. 7, F.W Harrison, S.L Gardiner, (ed.), Wiley-Liss, New York, 19-52pp.
- Giulianini, P.G., Bertolo, F., Battistella, S., ad Amirante, G.A.,** 2003, Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in in vivo phagocytosis, *Tissue Cell*, 35: 243-251.
- Gupta, A.P.,** 1985, Cellular elements in hemolymph. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Integument Respiration and Circulation*, G.A Kerkut and L.I. Gilberts (Eds.), Vol.: 3, Pergamon Press, New York, 401-451pp.
- Hartenstein, V.,** 2006, Blood cells and blood cell development in the animal kingdom, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22: 677-712.
- Jamieson, B.G.M.,** 1981, *The Ultrastructure of the Oligochaeta*. Academic Press, London/New York/Toronto/Sydney/San Francisco.
- Jarosz, J., ad Glinski, Z.,** 1997, Earthworm immune response, *Folia Biology*, 45: 9.
- Jones, J.C.,** 1962, Current concepts concerning insect hemocytes, *American Zoologist*, 2: 209-246.
- Lavine, M.D., ad Strand, M.R.,** 2002, Insect hemocytes and their role in immunity, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1295-1309.
- Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V., ad Banerjee, U.,** 2000, Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors, *Science*, 288: 146-149.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nakao, T.**, 1974, An electron microscopic study of the circulatory system in *Nereis japonica*, *Journal of Morphology*, 144: 217–236.
- Pelc, R.**, 1986, The hemocytes and their classification in the larvae and pupae of *Mamestra brassica* L. 1758. (Lepidoptera, Noctuidae). *Canadian Journal of Zoology*, 64: 2503-2508.
- Ruppert, E.E., ad Carle, K.J.**, 1983, Morphology of metazoan circulatory systems, *Zoomorphology*, 103: 193–208.
- Sawyer, R.T.**, 1986, *Leech Biology and Behaviour*. Clarendon Press, Oxford.
- Smith, P.R.**, 1986, Development of the blood vascular system in *Sabellaria cementarium* (Annelida, Polychaeta): an ultrastructural investigation. *Zoomorphology*, 106: 67–74.
- Stein, E., ad Cooper, E.**, 1981, The role of opsonins in phagocytosis by coelomocytes of the earthworms, *Lumbricus terrestris*. *Developmental and Comparative Immunology*, 5: 415-425.
- Stein, E.A., ad Cooper, E.L.**, 1983, Inflammatory responses in annelids, *American Zoology*, 23: 145-156.
- Valembois, P.**, (1992): Scanning electron microscopic study the involvement of coelomic cells in earthworm antibacterial defence. *Cell Tissue Res.* 240, 479-484.
- Ville, P., Roch, P., Cooper, E., Masson, P., ad Narrbonne, J.**, 1995, PVBs increase molecular-related activities (lysozyme, antibacterial, hemolysis, proteases) but inhibit macrophage-related functions (phagocytosis, wound healing) in earthworms, *Journal of Invertebrate Pathology*, 65: 217-224.
- Wigglesworth, V.B.**, 1965, *The Principles of Insect Physiology*, E.P. 6th ed., Dutton & Co., London.

## ÖZGEÇMİŞ

Irmak ATALAYIN, 1990 yılında doğmuştur. İlk ve orta öğretimini İzmir’de tamamlamıştır. 2009 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümüne kayıtlanmıştır. 2013 yılında lisans eğitimini tamamlamıştır. 2014 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Zooloji Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başlamıştır.

