

MORFİN SULFAT İLE STİMÜLE EDİLMİŞ SIÇAN NAZAL MAST HÜCRELERİNİN IŞIK MİKROSKOBİK SEVİYEDE HİSTOKİMYASAL METODLARLA İNCELENMESİ

Dr. Aydan CANBİLEN, Dr. Serpil KALKAN, Dr. Hasan CÜCE

S.Ü.T.F. Morfoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, morfin sulfatın sıçan nazal mast hücrelerine etkisi ışık mikroskopik seviyede incelendi.

Kullanılan 20 adet albino dişi ve erkek sıçan Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edildi.

Sıçanlar iki gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki 10 sıçan hiçbir madde verilmeden eterle bayıltıldı ve regio respiratoria nasi'den frontal kesitler alındı. İkinci gruba perkutan yoldan 200 mg/kg morfin sulfat verildi, ve burunları kesildi. Kesilen burunların hepsi oda ısısında üç gün Carnoy fiksatifinde tesbit edildi. Alkol takibi yapılan dokulardan 5 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak toluidin mavisi ve alcian mavisi-safranin O boyaları ile boyanarak incelendi.

Sonuçta, kontrol grubunda granüle mast hücreleri bulunmasına karşın, morfin sulfat verilen grupta granüle hücrelerin bulunmaması morfin sulfatın nazal mast hücreleri üzerinde stimüle edici bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Sıçan, nazal mast hücresi, morfin sulfat, degranulasyon

SUMMARY

Light Microscopic Investigation of Stimulated Nasal Mast Cells of Rat Using Histochemical Methods

In this light microscopic study, the effects of morphine sulfate on nasal mast cells was investigated using alcian blue-safranin O and toluidin blue staining methods.

The investigation was performed on 20 male and female albino rats which were obtained from the Experimental Animal Laboratory of the Faculty of Medicine, Selçuk University.

Rats were divided into two groups of ten rats each. First group was considered as control group. Percutaneous injection of 200 mg/kg morphine sulphate was administered to the second group. Rats were anesthetized by ether and regio respiratoria nasi of rats were frontally excised. Tissues were fixed in Carnoy solution for three days at room temperature, dehydrated with absolute alcohol and embedded in paraffin. Five micrometer sections were cut from the paraffin blocks using rotary microtome and stained with alcian blue-safranin O and toluidin blue solutions.

In conclusion, control group slides demonstrated normal appearing mast cells with dark violet (with toluidin blue) and red and reddish-blue (with alcian blue-safranin O) stained granules. In contrast, the morphine sulphate stimulated specimens exhibited no granules.

Key Words: Rat, nasal mast cells, morphine sulphate, degranulation

GİRİŞ

Mast hücreleri (mastosit- labrosit) gevşek bağ dokusu, bazı organların fibröz kapsülü içinde (karaciğer gibi) deride, timusta, uterusu, lenfoid dokuda, idrar kesesinde, sinoviada, mezenterde, küçük ve büyük kan damarları çevresinde, sindirim ve solunum sistemlerinin submukozal bağ dokusunda ve epitelinde bulunurlar (1, 2, 3, 4, 5).

Mast hücreleri 7-20 mikrometre çapında, yuvarlak veya oval şekilli uzantsız hücrelerdir (1, 2, 3, 6, 7). Çekirdekleri oval, tek loblu, sentrik yerleşmiş ve küçüktür (2, 3, 6). Sitoplazmalarında bazik boyalarla metakromatik boyanan granüller bulunmaktadır. Mast hücreleri spesifik granülleri ile kolayca tanınırlar (8,9). Mast hücre sitoplazmasında bulunan granüller yuvarlak, oval veya köşeli şekillerde ve membranla çevrili, homojen görünümündedir (10).

Mast hücre granüllerinde birçok madde bulunmaktadır. Bunlar salgılanma şekillerine göre primer, sekonder veya yeni oluşmuş ve granül matriks mediatörleri olmak üzere üç grupta incelenir. Primer mediatörler hazır olarak bulunur ve fizyolojik koşullarda hızla salgılanırlar. Histamin, eosinofil kemotaktik faktör (EFC), nötrofil kemotaktik faktör (NFC) ve serotonin (5- hidroksitriptamin) bu tip mediatörlerden bazılarıdır. Sekonder veya yeni oluşmuş mediatörler primer mediatörlerden primer mediatörlerin etkisi ile yeni oluşturulan mediatörlerdendir. Bu tip mediatörlerin bazıları ise şunlardır: anafleksinin yavaş etkileyen maddesi (SRSA), trombosit aktive edici faktör (PAF) ve lökotrien B'dir. Granül matriks mediatörleri ise hazır olarak bulunan ancak granül boşalmadan matriksten ayrılmayan mediatörlerdir. Heparin, tripsin ve anafleksinin inflamatuvar faktörü (IF-A) bu tip mediatörlerdir (7).

Mast hücreleri birçok maddeden etkilenerek degranüle olurlar. Morfin sulfat, Polimiksin B, Stilbamidin (II), 48/80 maddesi (12, 13), kalsiyum, opioidler, sıcak, soğuk, güneş ışığı ve basınç (12) gibi kimyasal ve fiziksel stimulanların mast hücrelerinin degranülasyonunda etkili oldukları bildirilmiştir.

Mast hücre degranülasyonundan sorumlu immunolojik mekanizma iki ağır ve iki hafif zincirli

tipik bir monomerik immunoglobulin olan IgE'dir. İki IgE molekülünün spesifik bir antijenle, mast hücresi yüzeyinde köprülenmesi ile degranülasyon meydana gelir (7).

Sıçan kullanılarak yapılan bu araştırmanın amacı nazal mast hücrelerine morfin sulfatın etkisini ışık mikroskopik seviyede incelemektir.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada, aynı bakım ve beslenme koşullarında yetiştirilen 20 adet albino erkek ve dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlardan 10 tanesi kontrol grubu olarak kullanıldı. Kontrol grubundaki sıçanlar hiçbir madde verilmeden eterle bayıldıktan sonra regio respiratoria nasi'den frontal kesitler alınarak tesbiti için Carnoy fiksatifinde oda sıcaklığında üç gün bekletildi.

Geri kalan on sıçan ise perkutan yoldan 200 mg / kg morfin sulfat verilerek histamin salgılanmasının kanıtı olan sıçanın kuyruğunda dikleşme gözlenene kadar (14) beklendi ve sıçanların burunları kesilerek kontrol grubunda olduğu gibi tesbit için Carnoy fiksatifinde oda sıcaklığında üç gün bekletildi.

Alkol takibi yapılan dokulardan parafin bloklar hazırlanarak bir gece buzdolabında bekletildi. Ertesi gün, bloklardan rotatif mikrotom yardımı ile 5 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak deparafinize edildi ve boyamaya hazır hale getirildi. Preparatlar alsian mavisi-safranin O ve toluidin mavisi boya metodları kullanılarak boyandı. Boyanan kesitler Olympus BH-2 mikroskobu ile incelenerek fotoğrafları çekildi.

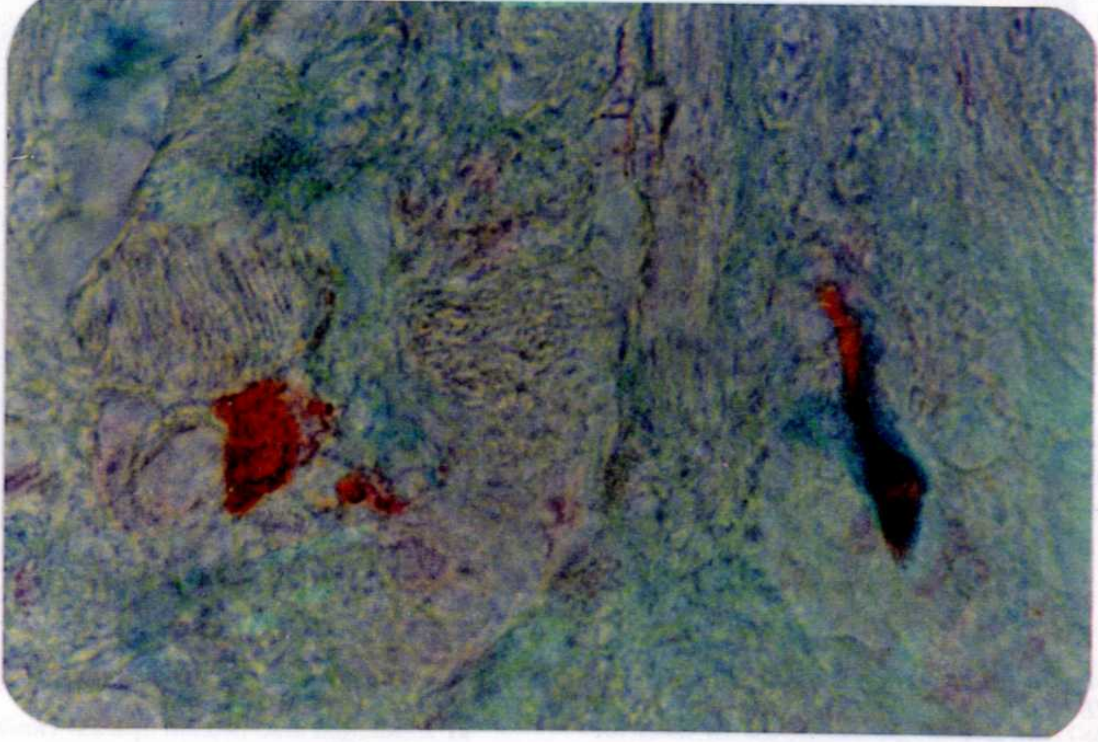
BULGULAR

Kontrol grubu ve morfin sulfat verilen sıçanların nazal dokularındaki mast hücreleri incelendiğinde, kontrol grubunda hem granüle hem de degranüle mast hücrelerinin bulunduğu, ancak degranüle mast hücre sayısının granüle mast hücre sayısından daha az olduğu gözlemlendi. Kontrol grubundaki mast hücrelerinin alsian mavisi-safranin O boyası ile kırmızı ve mavi boyandığı (Resim 1), toluidin mavisi ile ise koyu menekşe -mor renkte boyandığı görüldü (Resim 2).

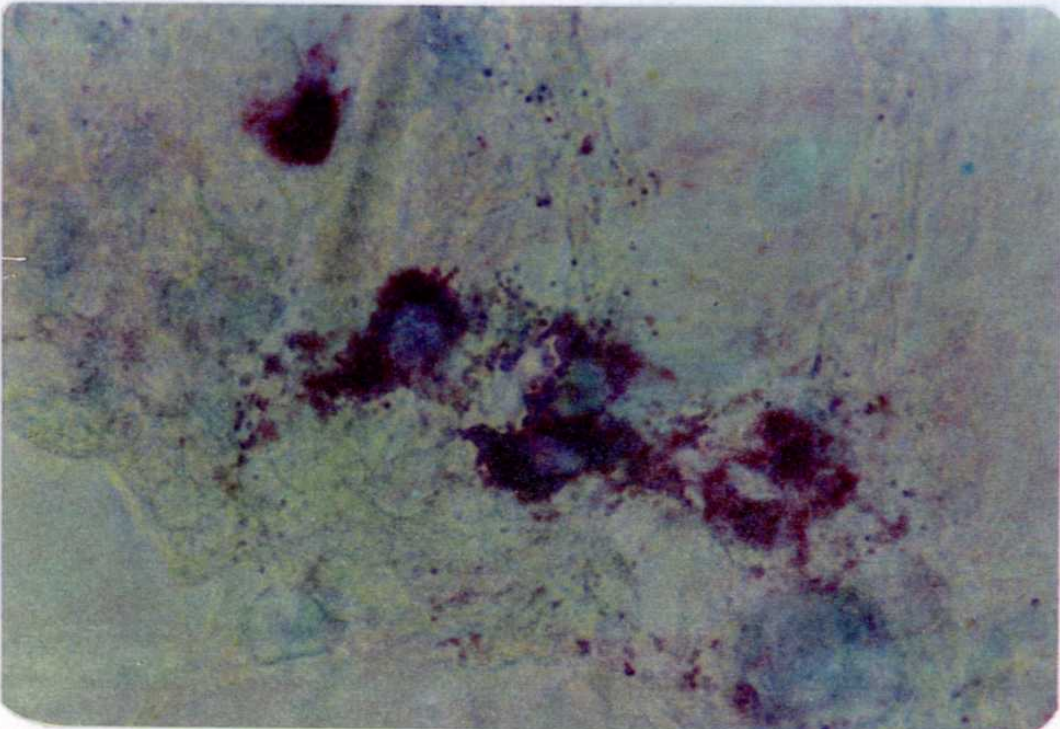
Morfin sulfat verilen gruptaki sıçanların burunlarından alınan kesitler incelendiğinde ise mast

hücrelerinin hepsinin tamamen degranüle olduğu gözlemlendi. Ancak mast hücrelerinin granüllerini kontrol grubundaki gibi tek tek gözlemek mümkün olmadı. Alsiyan mavisi -safranin O boyası ile boyanan

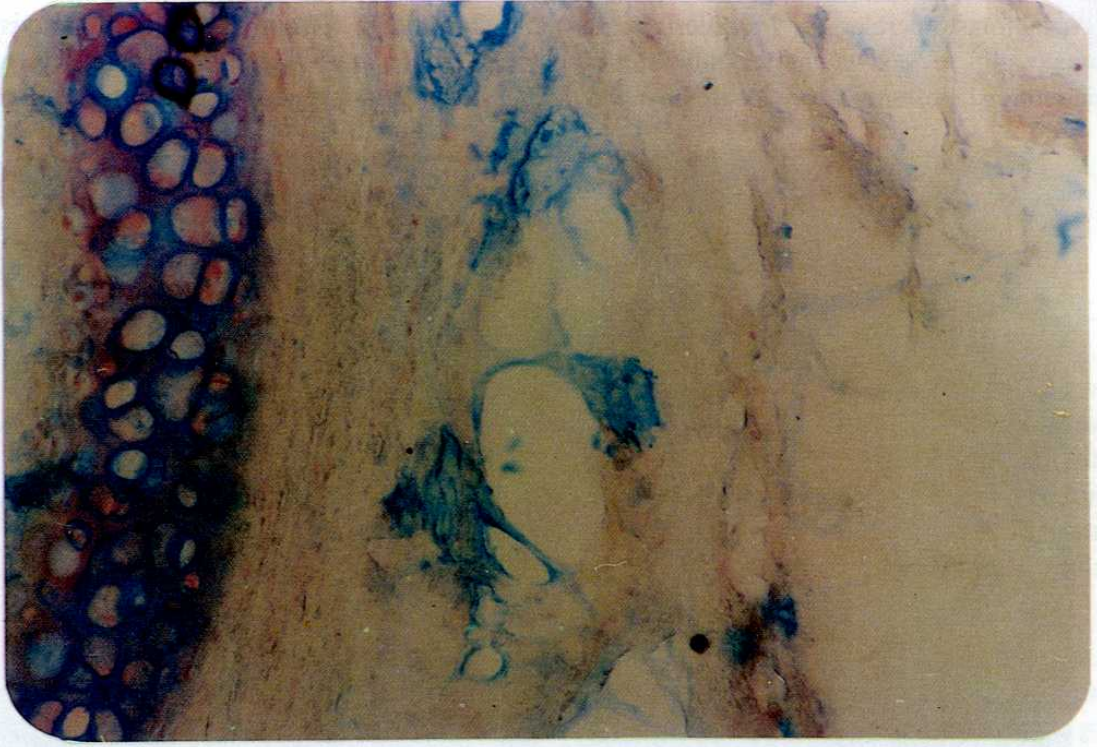
kesitlerde mast hücre kalıntılarının turkuvaz renkte boyandığı (Resim 3), toluidin mavisi ile ise degranüle mast hücrelerinin damarlar ve bezler çevresinde mor boyandığı tesbit edildi (Resim 4).



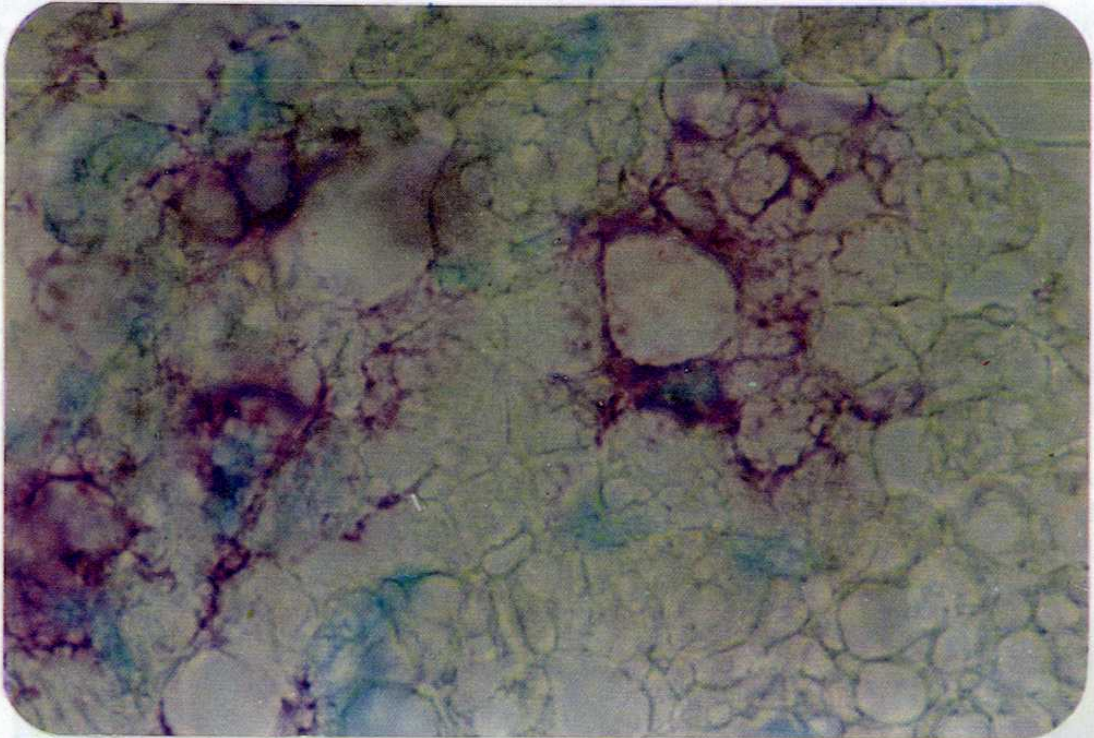
Resim 1. Kontrol grubunda alsiyan mevisi- safranin O boyası ile hem kırmızı hem de kırmızımtarak- mavi boyanan mast hücreleri, MB: x 1000.



Resim 2. Kontrol grubunda granüle ve degranüle mast hücreleri. Toluidin mavisi, MB: x 1000



*Resim 3. Morfin sulfat verilen gruptan alınan kesitte mast hücrelerinin görünümü. Alsiyan mavisi- safranin O
MB: x 200*



Resim 4. Morfin sulfatlı grupta damarlar çevresinde görülen degranüle mast hücreleri. Toluidin mavisi, MB: x 400

TARTIŞMA

Mast hücrelerinde histamin salgılanmasını stimüle eden ve dolayısı ile degranülasyona neden olan bir çok fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanlar mevcuttur.

Shanahan ve arkadaşları (15) mast hücre kültürlerine dyorphan ve antijeni beraber ilave ettiklerinde degranülasyonun 30 saniye içinde tamamlandığını görmüşlerdir.

Benyon ve arkadaşlarının (16) hücre kültürlerinde yaptıkları bir araştırmada morfinin mast hücrelerinden histamin salgılanmasını indüklediğini, histamin salgılanmasının morfin konsantrasyonu ile orantılı olarak arttığını ve salgılanmanın 10-15 saniye gibi kısa bir sürede gerçekleştiğini gözlemişlerdir.

Ebertz ve arkadaşları (14) da morfin sulfat ile oluşturulan histamin salgılanmasının morfin konsantrasyonu ile birlikte arttığını, sıçanların 150-200 mg/kg morfin sulfatı tolere edebildiklerini bildirmişlerdir.

Degranülasyonu stimüle etmek amacıyla morfin sulfatın seçildiği bu çalışmada, morfin sulfatın mast hücre degranülasyonunda diğer araştırmacıların da belirttiği gibi oldukça etkili bur madde olduğu gözlemlendi. Morfin sulfat verilen sıçanların burunlarından hazırlanan preparatların hiçbirinde granüle mast hücrelerine rastlanmadı. Degranüle mast hücrelerinde granülleri tek tek görmek mümkün olmadı. Bunun sebebinin, morfin sulfat verilerek oluşturulan degranülasyonun çok kısa sürede meydana gelmesinin olduğu düşünüldü. Degranüle mast hücrelerinin damarlar ve bezler çevresinde alsian mavisi-safranin O ile turkuvaz, toluidin mavisi ile ise mavi renkte boyandığı tesbit edildi.

Kontrol grubundaki sıçanların burunlarından hazırlanan preparatlarda hem granüle hem de degranüle mast hücrelerinin bulunduğu gözlemlendi. Ayrıca morfin sulfat verilen gruptakinin aksine kontrol grubunda degranüle mast hücrelerinin granülleri tek tek görülmekteydi. Kontrol grubundaki degranüle mast hücrelerinin stres, mekanik travma gibi fiziksel etkilerden kaynaklandığı düşünüldü.

KAYNAKLAR

1. Erkoçak A.Genel histoloji. İstanbul: Okan Dağıtımçılık Yayıncılık Ltd. Şti, 1983 :164.
2. Kalaycı Ş. Histoloji. Bursa : Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1986: 114.
3. Leeson TS. Leeson CD and Papero AA. Text / atlas of histology. Philadelphia: WB Saunders, 1988; 145-6.
4. Miecznic B. Mast cells in the cytology of nasal mucosa: a quantitative assesment and their diagnostic meaning. Ann Allergy 1980;44: 106-11.
5. Ross MH and Reith EJ. Histology: a text and atlas. New York: JB Lippincott Company, 1985: 93.
6. Krüger PG. Morphology of normal and secreting mast cells. Acta Otolaryngol (Stockh) 1984; 414: 118-23.
7. Melman SA. Mast cells and their mediators. Emphasis on their role in type I immediate hypersensitivity in canines. Int J Dermatol 1987;26: 335-44.
8. Cowley E and Hoch-Ligeti C. Association of tissue mast cells and skin tumors. Arch Dermantol 1961;83:146-50.
9. Soylu R. Sıçan mezenter lenf düğümü makrofajlarının değişik koşullarda yapısal niteliklerinin transmsiyon elektron mikroskobu düzeyinde incelenmesi. S. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 1984; (1) : 195-220.
10. Lever WF and Schaumburg-Lever G. Mast Cells. In: Histopathology of the skin. 7.th ed. Philadelphia : JB Lippincott Company, 1990: 62-3.
11. Ellis HV, Johnson AR and Moran NC. Selective release of histamine from rat mast cells by several drugs. J Pharmacol Exp Ther 1970; 175: 627-31.
12. Dvorak AM, Mihm MC and Dvorak HF. Morphology of delayed-type hypersensitivity reactions in man. Laboratory Investigations 1976;34: 179-91.
13. Şeftalioğlu A. 48/80 ile stimüle olmuş sıçan inguinal lenf düğümü mast hücrelerinin histokimyasal ve morfolojik değişiklikleri. Deniz Tıp Bülteni 1966; 12 : 1-20.
14. Ebertz JM, Hermens JM, Mc Millan JC, Uno H, Hirshman V and Hanifin JM. Functional differences between human cutaneous mast cells and basophils: A comparison of morphine-induced histamine release. Agent and Actions 1986;18: 455-62.
15. Shanahan F, Lee TDG, Bienenstock J and Befus AD. The influence of endorphins on peritoneal and mucosal mast cell secretion. J Allergy Clin Immunol 1984;74: 499-504.
16. Benyon RC, Lowman MA and Church MK. Human skin mast cells: their dispersion, purification and secretory characterization. Journal of Immunology 1987;138: 861-7.