

SOĞUK STRESTE KOBAY SÜRRENALİNDE GÖRÜLEN DEĞİŞİKLİKLERİN HİSTO-ENZİMOLOJİK YÖNTEMLE İNCELENMESİ.

Dr. İrfan ERDEMLİ (x)

ÖZET: 30 adet kobay -4°C de 24-48 saat bırakılarak soğuk stresin sürrenalde yaptığı değişiklikleri, değişik boya metodları ve enzim tayinleri yapılarak incelendi. 4 kobaydan kontrol olarak yararlanıldı. Hematoksilen-Eosin ve Toluidin Blue boyaları ile medullada koyu boyanan hücreler Norepinefrin, açık boyanan hücreler epinefrin olarak gözlemlendi.

Alkalen fosfataz, kortekste en fazla glomerulosada olmak üzere bütün tabakalarda pozitif reaksiyon verdi Soğuk stres ile reaksiyon şiddeti değişmedi.

Asit ve alkalen fosfataz kontrol ve soğuk stresli hayvan sürrenal medullasında olumsuz sonuç verdi. ATP medullada norepinefrin hücrelerinde pozitif olup soğuk streste reaksiyon şiddeti azalmaktaydı.

GİRİŞ: Birçok araştırmacı laboratuvar hayvanlarının sürrenal medullasında iki tip hücrenin bulunduğu tanımlamışlardır. Bunların değişik hücre gruplarında yerleşik olduğu düşünülmüş fakat histokimyasal yöntemler gelişinceye kadar kesin ayırımları yapılamamıştır. Bilindiği gibi biyokimyasal yöntemlerle hücresel lokalizasyonlar konusunda bir bilgi elde edilememektedir.

Bu konuda yapılan yoğun çalışmalarla, çeşitli araştırmacılar farklı ayırım özellikleri ileri sürmüşlerdir; Erankö, Holtzman, Dominitz 4 asit fosfataz ak.vitesinde farklılık üzerinde durmuşlar, Wood ve Coutland morfolojik özellikleri üzerinde, Yates-Duncan elektro mikroskopide granüller çapta, sitoplazmik matrikste elektron dansitesinde farklılık olduğunu bildirmişlerdir. Çok basit olarak Coupland4 Toluidin blue ve Hematoksilen-Eosin boyamalarında bazı medulla hücrelerinin açık bazılarının koyu bazofil boyanışı, bu hücrelerde çekirdek özellikleri farklı olduğuna dikkati çekmiştir.

Wood 11 katekolamin depo granüllerinden yada hücreden salgılanmasında fosfat parçalayan enzimin norepinefrin demostrasyonunda kullanılabileceği hipo-

(x) Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji bilim dalı öğretim üyesi. Doç. Dr.

tezini⁴ yönteminin ışığı altında ileri sürmüştür. Soğuk stresin norojenik uyarı ile sürrenal medulladaki kromoffin hücrelerinden katekolaminlerin serbestleştirdiği ve bu katekolaminlerden sadece norepinefrinin boşaldığı farmakolojik deneyler sonucu bilinmektedir.

Krumaffin hücrelerindeki bazofilinin, ATP ve katekolamin beraberce koromaffin granüllerde oluşturduğu asidik proteine (kromogranin) bağlanmıştır. 1 Eğer bu bilgi doğru ise bizim Wood yöntemi ile yaptığımız, soğuk strese bırakılan hayvanların medullasında, çalışmamızda norepinefrin hücrelerinin boşalmasında sadece kromogranin kaybı olmayacak, stiplazmada relatif olarak bazofilinin azalması ortaya çıkacaktır.

Çalışmanın Amaçları: Kobaylarda sürrenal medullası morfoloji ve enzim yapısını belirlemek soğuk strese oluşan değişiklikleri saptamak ve enzimatik yöntemlerin rutin olarak kullanılır duruma getirilmesini sağlamaktır.

MATERYAL METOD: Çalışmada 4-6 aylık 30 adet, ağırlıkları 300-540 gr. arasında değişen erkek ve dişi kobay kullanıldı. Bu koybaylardan 2 erkek, 2 dişi olmak üzere 4 tanesi kontrol grup olarak ayrıldı. Gerek kontrol gerekse denemeye alınan hayvanlar aynı koşullar altında beslendi.

Soğuk stres için 4°C ye ayarlanan buzdolabına deneye alınan hayvanlar 24-48 saat dörder, dörder kalmak üzere yeterli yiyecek ve su ile birlikte konuldu. Isı artışı olmaması için deneme süresince dolabın kapısı hiç açılmadı. Dolayısı ile hayvanların hal ve hareketlerini izlemek olasılığında bulunmadı.

Süre sonunda hayvanlar buz dolabından tek tek çıkarılarak hiçbir anestezi vermeden kafalarına bir demir çubukla vurularak şoka sokuldu. Kalb atışları durmadan açıldı. Sağ ve sol sürrenal bezler alınarak uygulanacak olan ayrı ayrı metodlar için bir kısmı taze hazırlanmış soğuk aretonda 24 saat kalmak üzere tesbite alındı. Bir kısmı ile ATP aktivasyonunu göstermek üzere -30°C derecede donduruldu. Bu işlem 3-4 dakikalık bir süre içinde yapıldı. Parafin blok için parçalar iki defa herbirinde 0,5 -1 saat tutularak bezen'de şeffaflandırıldı. 56°C de 2-3 saat (vakum ativi ulmadığı için) parafin infiltrasyonu yapıldı. Daha sonra parafin bloka alındı.

Çalışmada histokimyasal yöntemlere titizlikle dikkat edildi.

Kesitlere 5 ayrı histokimyasal reakson uygulandı.

Çalışmada uygulanan reaksiyonlar;

- 1- Hematoksilen-Eosin (aker)²
- 2- Toluidin Blue (Aker)²
- 3- Alkalen fosfataz: Kobalt sülfid metodu (Gomeriden modifiye 1950)⁵
- 4- Asit fosfataz: Kurşun nitrat metodu (Gomori)⁶
- 5- ATP ase için: Kurşun nitrat metodu²²

A- Morfolojik Bulgular: Normal şartlar altında beslenmeye tabi tutulan koyalarda her hangi bir morfolojik ve fiyolojik değişiklikler görülmedi. Soğuk strese konulan hayvanları dışarıdan izlemek olanağı olmadı. Disseksiyon yapmak üzere dolaptan alınan koyalar adeta küçülmüş vaziyette ve ayaklarını karınlarına çekerek duruyorlardı.

B- Makroskopik Bulgular: Hayvanlar normal olarak açıldı.    organlarda herhangi bir değişik bulguya rastanılmadı.

C- Mikroskopik Bulgular: 1- Kontrol Gurubu; Hematoksilen-Eosin preparatları: Normal şartlarda beslenen koyaların s rrenalleri tesbit ve takip edildikten sonra Hematoksilen Eosin ile boyanmış ve aşağıdaki bulgular kaydedilmiştir.

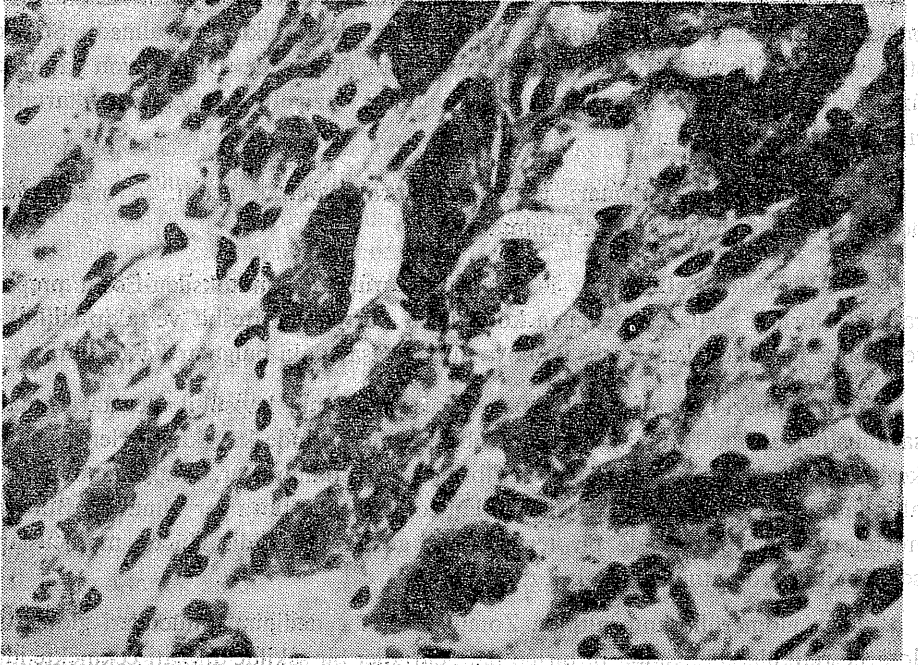
Sürrenal bezi dıştan fibröz bir bağ dokusu ile yapılı kapsül ile her tarafından sarılmıştır. Kaps la fibrozayı oluşturan bağ dokusu içinde kan kapillerlerine, sinir kesitlerne ve bağ dokusunun hücre ve fibrillerine rastlanılmıştır. Kapsulanın hemen altında korteksin birinci tali tabakası olan zona glomer losa yer almakta. Burada hücreler glomerul şekilde bir tertiplenme göstermekte idi. Hücre mukleusları sentrik olup kromatinden oldukça zengin idiler.

Zona glomer llosanın altında Zona fasikülata dediğimiz hücreleri glomeruloza ile retik leris arasında birbirine paralel radier bir şekilde dikkati çekmekte idi. Hücreler poligonal şekilli olup zona glomerulozayı oluşturan hücrelere nazaran daha büyük çapta idi. Hücrelerin lipoidten zengin oluşu ve lipoidlerin rutin hematoksilen-eosin boyalarında ksilolden geçerken erimesi ile hücrelerin vakuoler bir görünümde oldukları izlendi. Retik lata ile glomeruloza hududunda mitotik attivitenin daha fazla olduğu dikkatimizi çekti. Zona retikularis, hücrelerin retikulum yapacak şekilde karmaşık tertiplenmesi ile oluşan bir tabaka olarak seçildi. Medulla ile retikularisi oluşturan hücre kordonlarının medulla içerisine yer yer sokulduğu görüldü. Bu hücre kordonlarının arasında düzensiz şekilli sinusoidal tip kan kapilleri oldukça fazla idi.

Surrenal Medullası: Medullada yer alan hücreler düzensiz şekilli, belirli bir hücre tertiplenmesi göstermiyen kümeler halinde idiler. Hücre dizisi ve kan kapillerlerinin arasında kortekse nazaran çok daha fazla bağ dokusu hücre ve fibrillerine rastlanmakta idi.

Medulla da gruplar yapmış veya tek tek bulunan sempatik ganglion hücrelerine hemen her preparatta rastanıldı. Hücreler büyük çapları oval görünümleri ile hemen dikkati çekmekte idi. Hafif eksentrik lokalizasyonlu nukleusları kromatinden son derece fakir olmakla adeta bir vakuolu anımsatmakta idi. Bir iki veya   adet nukleolus, nukleusun içerisinde koyu lekeler halinde dikkati çekiyordu. (Resim)

Toluidin Blue boyası ile Surrenal Korteks ve Medullasının Tetkiki: Toluidin blue ile incelenen sürrenal korteksinde hematoksilen-Eosin boyamalarından farklı bir



Resim 1- Sürrenal medullasında yer alan sempatik ganglion hücreleri. Hematoksilen-Eosin (büyütme 400 x).

bulguya rastlanılmadı. Medullayı incelediğimizde Toluidin blue ile sitoplazması açık mavi ve nisbeten koyu boyanmış hücreler ayırt edildi. Her iki tip hücrede sekretuar hücrelerin bilinen özelliklerini göstermekte idiler.

Normal Kobay Surrenallerinde Asit Fosfataz ve Alkalen Fosfataz Aktivitesi:

Kobay surrenal korteksi asit fosfataz ve ve alkalen fosfataz aktiviteasyonu bakımından pozitif sonuç verdiği izlendi. Zona glomerulosa hücreleri gerek asit fosfataz gerek alkalen fosfataz aktivitesi bakımından diğer zona hücrelerine nazaran daha çok aktivasyon gösteriyordu. Resim 2:

Medullanın incelenmesinde; medulla parankimasını oluşturan gerek epinefrin gerekse norepinefrin hücrelerinin asit fosfataz ve alkalen fosfataz aktivitesi vermedikleri tesbit edildi.

Normal kobaylarda Surrenal medullasının ATP ase aktivitesi Yönünden incelenmesi: Frozen kesitlerinde medulladaki norepinefrin ve epinefrin hücrelerinin sitoplazmalarında granüler partiküller izlenmiştir. Partiküllerin nukleus ile apikal kutup arasında daha kesif olduğu dikkatimizi çekti. Koyu renkli bu partiküllerin arasını, homogen görünümlü koyu gri ATP ase aktivite sahaları tarafından doldurulmakta idi. (Resim: 3)



Resim 2- Sürrenal korteksinse zona glomerulosa tabakasının diğer tabakalara nazaran asit fosfataz aktivitesinin daha kuvvetli olduğu dikkati çekmektedir (büyütme 200 x).

Soğuk strese bırakılmış kobay sürrenallerinin asit fosfataz ve alkalen fosfataz yönünden incelenmesi :

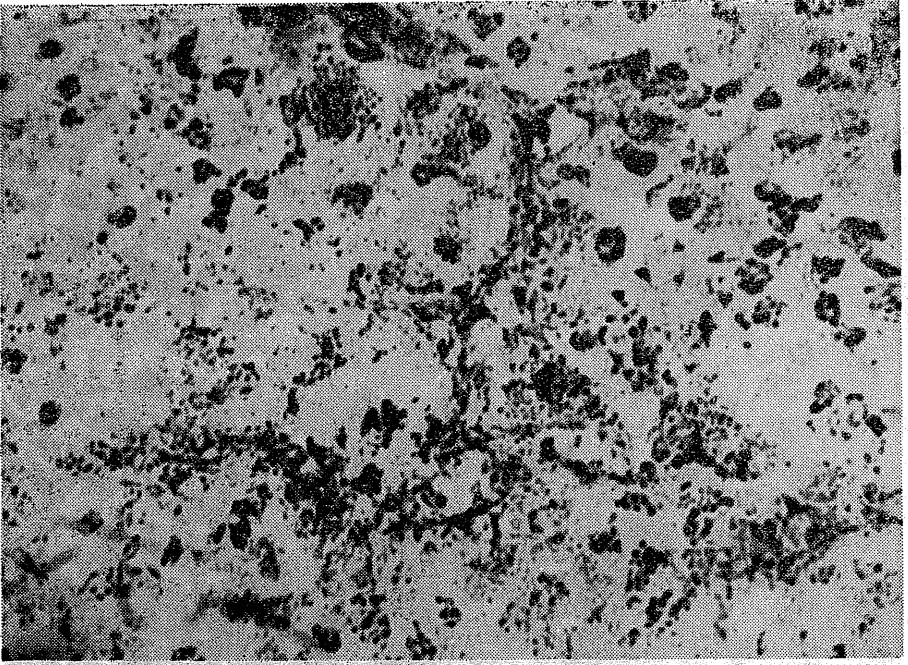
Asit fosfataz ve alkalen fosfataz aktivitesi bakımından kobay surrenallerinin kortekslerinin incelenmesinde soğuk stres sonucu herhangi bir değişik bulgu saptanmadı.

Medullada yine asit fosfataz ve alkalen fosfataz aktivitesi negatif sonuç verdi.

Soğuk Stres Altında Bırakılmış Kobay sürrenal Medullasının ATP Ase Aktivitesi Yönünden İncelenmesi:

Soğuk stres tesiri ile norepinefrin hücrelerinin salgı maddelerini boşalttıkları dolayısı ile ATP reaksiyonunu son derece zayıf verdikleri izlenebildi. Epinefrin hücrelerinde ise soğuk stres sonucu her hangi bir değişikliğin bulunmadığı özellikle dikkati çekti. Resim: 2.

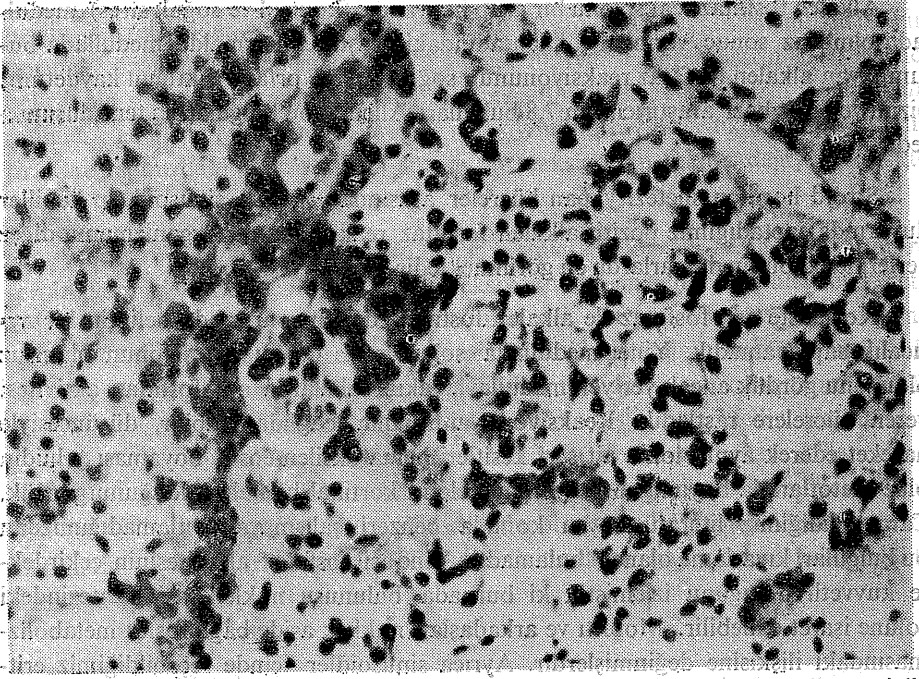
Soğuk stres süresi artırıldıkta yani kobay 48 saat soğuk strese tabi tutulduğunda norepinefrin hücrelerin daha fazla boşalmış olduğu görüldü. Resim.: 5.



Resim 3- ATP aktivitesi bakımında incelenen normal kobay sürrenal medullası. ATP ase aktivitesi koyu renkli partiküler halinde dikkati çekmektedir (Büyütme 200 x).



Resim 4- Soğuk stres altında tutulan kobay sürrenal medullası sit fosfataz aktivitesi bakımından negatif sonuç vermekte olup hücre stippplazmaları son derece sonuk boyanmaktadır. (Büyütme 400 x).



Resim 5- 48 saat soğuk stres altında tutulan kobay sürrenalisi. Resim dondurma mikrotomi ile alınan kesitten hazırlanmış preparattan elde edilmiştir. Açık renkli norepinefrin, yeşil renkli epinefrin hücreleri dikkati çekmektedir (Büyütme 200 x)

TARTIŞMA: Bilindiği gibi hücre metabolizmasındaki değişiklikler hiç kuşkusuz enzim aktivitesinde değişikliği yol açar. Hücrenin değişen metabolizması ile ilgili enzimlerde ya artış ya da azalma görülür. Bu tür çalışmalarda histo-enzimolojik yöntemler çok değerlidir.

İnsanda steroid hormonlar plasentada trofoblast hücrelerinde, testiste Leydig hücrelerinde, ovariumda graaf follikül hücrelerinde ve surrenal korteksinde sentez edilmektedir. Bu organlarda yapılan bütün alkalin fosfataz reaksiyonu pozitif netice verdiği gibi, hormon sentezi stimüle eden trofik hormonun varlığında, alkalin fosfataz aktivitesinin arttığı, heparizektomi sonrası Leydig ve surrenal hücrelerinde alkalin fosfataz aktivitesinin çabucak kaybolması, ACTH verilmesi ile aktivitenin tekrar çoğalması, alkalin fosfataz reaksiyonu ile steroid hormon sentezi arasındaki ilişkiye işaret etmektedir. 7,8

Alkalin fosfataz reaksiyonunun şiddeti kontrol grubu ve soğuk strese bırakılan hayvanlar arasında belirgin bir farklılık göstermediğinden, soğuk stres ile steroid hormon sentezinin değişmediğini söylemek hatalı bir sonuç olmayacaktır kanısındayız.

Alkalen fosfataz reaksiyonu bir grup hayvanda (kontrol ve soğuk stres) medullada olumsuz sonuç vermiştir. Allen adındaki araştırmacı normalde medullada bulunmayan alkalen fosfataz reaksiyonunun soğuk strese ortaya çıktığını kaydetmiş, bizim ve diğer bazı araştırmacıların 7,8 bulguları Allen'in bu bulgularına ters düşmektedir.

Stroid hormon snetezi yapan hücreler arasında yer alan sinusoid tip kapiller duvarında saptadığımız pozitif alkalen fosfataz reaksiyonunu, organizmanın diğer yerlerindeki bütün damarlarda da görülmektedir 7,8

Kortekste asit fosfataz ile alkalen fosfataz dağılımı arasında belirgin bir ayrıcalık saptayamadık. Yine medullada soğuk stres de bu reaksiyonun olumsuz olduğunu gördük ancak yer yer medullaya yakın sahalarda asit fosfataz aktivitesi veren hücelere rastladık. Reaksiyon yanlışlığına bağlıda olabilir, düşüncesiyle hareket ederek aynı blok'a ait seri kesitleri hematoksilen-eosin boyaması toluidin blue metotlarıyla boyadığımızda bu hücrelerin kortikal hücreler olduğunu gördük. Tarayabildiğimiz literatürde bu konuda benzeri çalışmaya rastlamadığımızdan bu bulguları kıyaslama olanağı bulamadık. Yine asit fosfataz aktivitesinin çekirdekte kuvvetli olduğunu izlemiştik ki buruada bulunuşu nukleik asit sentezindeki rolüne işaret edilebilir. Moretti ve arkadaşları nukleik aside bağlı fosfat metabolizmasındaki ilişkisine değinmişlerdir. Ayrıca sinusoidler içinde seçebildiğimiz eritrositlerde pozitif asit fosfataz reaksiyonu vermekteydi. Bulgumuzda literatür bilgisine uymaktadır.

Anestezi metodunun surrenal medullada hücre organellerinin yapısını değiştirdiği Al-Lami¹ ve arkadaşları tarafından ileri sürülmüştür. Bu araştırmacılar eter, nembutal anestezisi ve başa darbe vurularak bayılma yollarını denemişler, üç yöntemde de diseksiyonun 5 dakikadan fazla zaman almamasına dikkati çekmişlerdir.

Bizim çalışmamızda hiçbir anestezi madde uygulanmaksızın hızla başa darbe vurularak bayılma yöntemi kullanılmıştır.

Hematoksilen-Eosin metodu ile boyamada medullar hücrelerin özellikle korteks hududunda asinüs veya troid folliküllerini anımsatan yapılar teşkil edecek şekilde tertiplendiğini çalışmamızda tespit ettik. AL-Lami de ışık mikroskopi seviyesindeki çalışmasında surrenal medullanın folliküler lümenlerini troid bezinin lümenlerine benzetmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında stresli hayvanlarda bu lümenlerin daraldığını dikkatimiz çekti. Bu husus AL-Lami'nin bulgularına uygunluk göstermektedir.

Bell³ dikromat metodu ile Suriye kobayları, sıçanlar, tavşanlar kediler ve insanlar üzerinde yaptığı çalışmada ATP ase, nomanin oksidas ve asetil kolin as-teraz aktivitelerini araştırmıştır. Bütün gruplarda epinefrin ve norepinefrin hücrelerinin karakteristik yapıda olduğu belirlenmiştir. Sinir lifleri boyunca norepi-

nefrin hücrelerinde ATP ase aktivitesinin yaygın olduğu gösterilmiştir. Bizim normal kobaylardaki çalışmamızda ATP ase aktivitesi norepinefrin hücrelerinde belirli bir şekilde bulunmuştur. Soğuk stres altında ise norepinefrin hücrelerinin muhtemelen boşalım sebebi ile ATP ase reaksiyonunu zayıf verdikleri tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki soğuk stresin süresi bu reaksiyonun şeklini değiştirmemektedir.

Wood ve Benzamin 11 gelişkin erkek sıçanlara kilogram başına 50-10 mg reserpin vermişler. Sonuçta reserpin enjeksiyonunun surrenal medullasında katekolamin boşaltılmasını artırdığını saptamışlardır. Bu araştırmacılara göre surrenal medullasından serbestleştirilen katekolaminler sinir sisteminin kontrolü altındadır ve serbestleşme ATP ase aktivitesi ile yakından ilgilidir. Bizim çalışmamızda ATP ase aktivitesinin norepinefrin bulguları ile kontras teşkil etmektedir. Halbuki norepinefrin hücrelerinde boşalmayı açıkça tespit ettiğimize göre katekolamin boşalınının ATP ase aktivitesine bağlı olmayıp, yalnızca otonomik sinirsel kontrol ile olduğunu düşünebiliriz. Keza Wood¹⁰ denervasyon ile yaptığı deneylerde katekolamin serbestleştirilmesinin ATP ase aktivitesinden bağımsız olarak gerçekleştiğini göstermiştir.

KAYNAKLAR:

- 1-AL-Lami, F., and Farman, N: Ultrastructural and Histochemical study of the adrenal medulla in normal and cold stressed Syrian Hamsters. Anat. Rec: 181,113,127. 1975.
- 2-Aker,O.N. Gridley, N.F: Laboratuvar el kitabı Hususi boyama teknikleri. I. Baskı, Örnek matbaası, Ankara-1954.
- 3- Bell, H.L.: Comparative histochemistry of mammalian adreromedullary tissue. Anat. Rec. 131:485-486. 1965.
- 4- Costa, J.L.: Histological, histochemical and cytological observations on the adrenal gland of the wild white for ted mouse. Peromyscus Lencopus. Anat. Rec. 162, 275-288, 1968.
- 5- Davenport, H.A: Histological technics Ed. 4 West Washington Square, Philadepphia, London, Toronto. W.B. Saunders Company, 1969.
- 6- D ry, R.A.B.: Carletons histologecal techniaue-ed 4, Oxfard University Press New York Toronto 1967.
- 7- Kalaycı, Ş.: İnsan göbek kordonunda innevasyon. Ata. Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Bülteni. Cilt: 5 Sayı: 17, 1972.
- 8- Kalaycı, Ş.: Kobaylarda dietin karaciğerdeki bazı enzimlere etkisi. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Bülteni Cilt: 5. Sayı: 16 1972.

9- Pearse, A.G.E.: Histochemistry the oretical and Applied, Ed. 3, Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1968.

10- Wood, J.G.: Elektron microscopic lokalization of 5 hydroxytryptamina (5HT) Kep. Biol. Med. 23: 828-837, 1965.

11- Wood, J.G.P. Benzamin and A. Bogey,: Denervation and or reserpine, induct changes in adrenomedullary catecholamines and nucleotidases. Z. Zellfarzchb, 11, 529-549, 1970.

INVESTIGATION OF ALTERATIONS OBSERVED IN GUINEA-PIG SURRENAL AT COLD STRESS BY HISTO-ENZYMOLOGIC METHOD?

SUMMARY :

30 Guinea-pig was kept at -4°C for 24-48 hours and alterations caused by cold stress was investigated by different dye methods and enzyme determination.

4 guinea-pig was used as contral.

Those cells dyied deark in medulla with hematosylen-Eosin and Toluidin blue dyes were observed as norepinephrine and those dyied light were observed as epinephrine.

Alkolme phosphatase, intortex, gave positive reaction in all layers, mostly in glomerulose. Reaction severtty did not change with cold stress.

Acid anz alkaline phosphatases gave nefative result in control and celd stressed animals surrenal medulla.

ATP as posizioem norepinephrine cells in medulla and recaction serveryty was decreasing with cold stress.