

İmmün süpressif ratlarda entero endokrin sistem yanıtı

Orhan Özatik

Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum AD., Isparta.

Özet

İnsan vücudunda pek çok savunma mekanizması mevcuttur. Bu savunma mekanizmalarından bir tanesi de mukozal immün sistemdir. İnce barsaklarda bulunan paneth hücreleri ve enteroendokrin hücreler de bu mukozal immün sistemin bir parçasıdır. Bu çalışmada İmmün sistem baskılandığında bu hücrelerin verdiği yanıt araştırılmıştır. Çalışmada 14 adet Wistar Albino sıçan kullanılıp yarısına immün süpresyon uygulandı. Diğer yarısı kontrol grubu olarak kullanıldı. Sıçanlardan elde edilen materyaller histolojik teknikler uygulanıp değerlendirildi. Paneth hücreleri, enteroendokrin hücreler, mast hücreleri granülleri ve sayıları incelendi. İmmün süpresyon uygulanan grupta paneth hücrelerinde ve enteroendokrin hücrelerde kontrol grubuyla aynı özelliklerde morfolojiler tespit edilmesine rağmen, mast hücrelerinde sayıca artış görülmüştür. Ayrıca kript lümeninde bulunan kok ve basiller çok fazla miktarda artmıştır. Bu artış immün sistemin baskılanması sonucu savunma mekanizmasının yeterince çalışmaması sebebiyle olmaktadır. Mast hücrelerindeki artışın savunma mekanizması kompanzasyonu için olduğu düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: immün sistem, mast hücreleri, paneth hücreleri, immün süpresyon.

Abstract

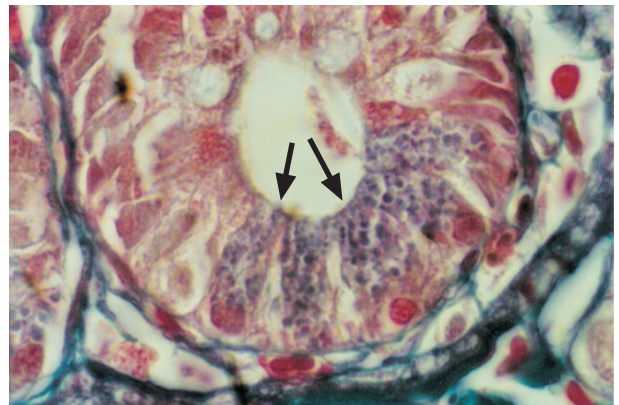
The answer of the entero endocrin system in immun suppressive rats.

Human body has lots of defense mechanisms. One of these mechanisms is the well-known mucosal immune system. Paneth cells exist in the small intestine and enteroendocrine cells are also a part of this mucosal immune system. In this study, we studied the response of these cells when the immune system was suppressed. In the present study, we used 14 wistar Albino rats and applied immune suppression in half of them. The another half of the rats were used as a control group. The materials taken from the rats were evaluated by applying histologic technics. Paneth cells, enteroendocrin cells, granülles of mast cells and their numbers were examined. Although similar morphological characteristics were observed in both the paneth cells and the enteroendocrin cells in the immune suppressed and the control group, an increase in the mast cells were observed. Coke and basillus were found to be existed in the cript lumene and were also in great number. This increasing in the suppression of immune system is the result of deficient defence mechanism. On the other hand, the increase in the mast cells might be the result of a compensatory defence mechanism.

Key words: immune system, mast cell, paneth cell, immune suppression.

Giriş

Vücudumuzda pek çok savunma mekanizması mevcuttur. Bu savunma mekanizmalarından bir tanesi de mukozal immün sistemdir. İnce barsaklarda bulunan paneth hücreleri de bu mukozal immün sistemin bir parçasıdır. Paneth hücreleri (şekil 1) ince barsak kriptaları içinde bulunmaktadır. Son zamanlarda ortaya çıkan hipotez bu hücrelerden salınan antibiyotik peptitlerin mukozal immünitenin komponentlerinden biri olduğu şeklindedir(1,2).



Şekil 1 İnce barsak Paneth hücreleri (Oklar) mason trikrom 500 büyütme

Yazışma Adresi: Dr. Orhan Özatik
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD., Isparta
Tel: 0532 4620784
E-mail: orhanozatik@yahoo.com
Müracaat tarihi: 04.11.2010
Kabul tarihi: 17.02.2011

Enteroendokrin hücreler de mukozal savunma mekanizması içinde görev almaktadır. Ayrıca ince barsak epitelinde bulunan savunma mekanizmasında, savunma sistemi elemanlarının herhangi birinde aksama meydana geldiğinde diğer elemanların kompanzasyon mekanizmasını çalıştırdıkları bilinmektedir (1,2,3). Bu nedenle bu çalışmada ince barsaklarda bulunan diğer mukozal immün sistem komponentleri de incelenmeye çalışılmıştır. Yoğun bakım hastalarında strese bağlı olarak meydana gelen ACTH seviyesinin yükselmesi kortikosteroidlerin artışına sebep olur. Bu kortikosteroid artışına sekonder olarak da immün sistem baskılanması meydana gelebilmektedir. İmmün sistemin baskılanması mukozal lezyonların gelişmesinde risk oluşturur.

Bu çalışmada immün supresyon uygulanan ratlarda ince barsaktaki mukozal immün sistemde meydana gelen değişiklikler tespit edilmeye çalışılmıştır.

Gereç ve Yöntem

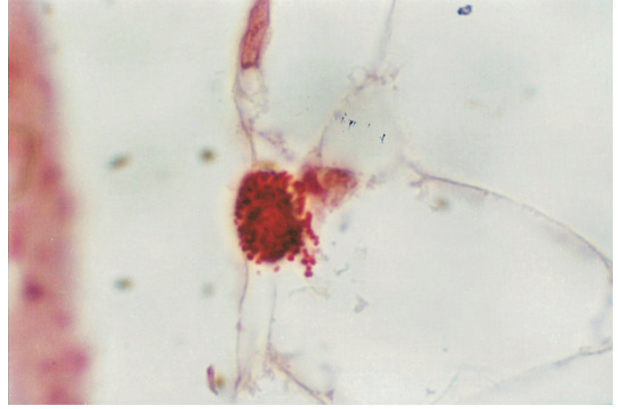
Bu çalışmada 14 adet Wistar Albino sıçan kullanıldı. İmmün yetmezlik meydana getirebilmek amacı ile 7 adet sıçana intra peritoneal siklosporin A uygulandı. 1. grupta bulunan sıçanlara yedi gün süre ile sadece intra peritoneal serum fizyolojik uygulandı ve 7.günün sonunda eter anestezisi ile sakrifiye edildi. Daha sonra dışkı kültürü alındı.

2. grupta bulunan ratlara yedi gün boyunca intra peritoneal olarak 10 mg/kg dozunda siklosporinA verilerek immünsüpresyon sağlandı. Sakrifiye edildikten sonra dışkı kültürü alındı.(4) İşlemin ardından sıçanların ince barsaklarından alınan parçalar histolojik takibe alınıp Hematoksilen Eosin, Gram, May Grünwald Giemsa, Masson Trikrom tekniği ile boyandı.

Paneth hücrelerinin incelenmesinde hücrelerin morfolojik özellikleri göz önünde bulundurularak, içerdikleri granül miktarı baz alındı. Granüllerini salgıladıkları ya da granül sayılarının azaldığı saptanan, düzensiz ve daha kısa boylu paneth hücreleri degranüle olarak değerlendirildi. Sitoplazması tamamen granül ile dolu, düzgün piramidal şekilli ve nükleusları bazal yerleşimli paneth hücreleri ise granüle olarak değerlendirildi.

Enteroendokrin hücrelerin değerlendirilmesinde kontrol grubu ile karşılaştırılarak kriptlerdeki semikantitatif sayıları ve hücrenin granül içeriğine göre normal yada azalmış/artmış olarak belirlendi. Polimorfonükleer lökositler sayıca artmış veya normal olarak değerlendirmeye tabii tutuldu. Mast hücreleri

(şekil 2) ise granüle olmalarına ve kontrol grubuna göre semikantitatif sayılarına göre değerlendirildi. Kript lümeninde bulunan kok ve basiller ise kript lümenindeki yoğunluklarına göre değerlendirildiler.



Şekil 2 Mast hücresi gram boyama 500 büyütme

Bulgular

Kontrol grubu ratların ince barsaklarında yapılan histolojik incelemeler sonunda, paneth hücrelerinin bir kısmının granüllerini lümen boşalttıkları, bir kısmının ise tamamen granül ile dolu oldukları gözlemlendi. Granüle olan hücrelerin toplam paneth hücrelerine oranı yaklaşık olarak %75 dolayındadır. Degranüle olan hücreler ise yaklaşık olarak %25 civarında tespit edildi.

Kontrol grubuna ait ince barsaklarda gözlenen polimorfonükleer hücrelerin çoğunu eosinofil lökositlerin oluşturduğu saptandı. Sadece 4. Kontrol hayvanında +++ olarak tespit edildi ve diğer ratlarda + olarak gözlemlendi (Tablo 1).

ECL (Entero kromaffin benzeri hücre) ve globül lökositler kontrol grubunda bulunan ratların tamamında + olarak gözlemlendi.

Mast hücreleri değerlendirilirken göz önünde bulundurulacak kriterlerden olan granülasyon açısından hiçbir özellik arz etmedi. Ancak ince barsak serozası içinde gözlenen mast hücre sayısı baz alınarak yapılan incelemede + olarak değerlendirildi

Kript lümeninde gözlenen kok ve basiller + olarak tespit edildi

Dışkıdan alınan kültürlerde ise %100 E. Coli üredi. İmmünsüpresyon amacıyla siklosporin A verilen gruptaki ratlardan elde edilen preparatların incelenmesi sonucu, paneth hücrelerinin kontrol grubu ile aynı özellikleri taşıdığı tespit edildi. Kript içinde bulunan paneth hücrelerinde hem granüle hem de degranüle olanları mevcuttu. Polimorfonükleer lökositler az sayıda tespit edildi. Enteroendokrin

hücre incelemesi sonucu hücre sayısı ve granüllerinin çokluğu orta sayıda tespit edildi.

Tablo 1 kontrol grubu bulguları

| Deney grubu | K o n t r o l | | | | | | |
|---------------------|-----------------------------------|----|----|-----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Paneth özelliği | G r a n ü l e / d e g r a n ü l e | | | | | | |
| PMNL özelliği | + | + | + | +++ | + | + | + |
| ECL ve GL özelliği | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Mast hücre özelliği | + | + | + | + | + | + | + |
| Dışkı kültürü | E . c o l i | | | | | | |
| Kok ve basil | + | + | + | + | + | + | + |

+:az ++:orta sayıda +++:çok sayıda

Mast hücreleri ise diğer gruptan farklı olarak ++ olarak gözlemlendi.

Kript içinde bulunan kok ve basil sayısı ise çok sayıda olarak değerlendirildi.

Ratlardan alınan dışkı kültürlerinde %100 E. Coli üredi.

Tablo 2 İntra peritoneal siklosporin A verilen grup bulguları

| Deney grubu | İ m m ü n s ü p r e s y o n | | | | | | |
|---------------------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Paneth özelliği | G r a n ü l e / d e g r a n ü l e | | | | | | |
| PMNL özelliği | + | + | + | + | ++ | + | + |
| ECL ve GL özelliği | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Mast hücre özelliği | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Dışkı kültürü | E . c o l i | | | | | | |
| Kok ve basil | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |

+:düşük düzeyde ++:orta düzeyde +++:yüksek düzeyde

Tartışma

Memeli epitelial hücrelerinden ekspresye edilen pek çok antimikrobiyal peptit, peptit familyasının bir üyesi olup; bunlar fagositlerle nonoksidatif mikrobiyal hücre ölümüne aracılık ederler. Bu peptitler polimorf nükleer lokositlerde azurofilik granüllerde depolanırlar. Bunlar fagolizozomal füzyonu takiben mikroorganizmaların öldürülmesine yardımcı olurlar. Epitelial peptitler aynı zamanda extracellüler kompartmanda da görev alırlar. Kolondaki, solunum yollarındaki ve üriner sistemdeki epitelial hücreler devamlı olarak antibiyotik peptitleri salgırlarlar. İnce barsaklarda mikrobisidal peptitler paneth hücrelerinin sekretuar granüllerinde depolanırlar, exositozla salınırlar. Epitelial antimikrobiyal peptitler nötrofillerin

azurofilik granüllerinde de bulunurlar. Bütün antimikrobiyal peptitler mukozal yüzdeki immünitenin parçasıdır(2,3).

İmmün yetmezlik meydana gelmiş hastalar, dış ortamdan gelecek olan pek çok mikroorganizma karşısında doğal savunma sistemlerini yeterince kullanamamaktadırlar. Bunun sonucunda yeterli tedavi şansını bulamadıklarında ise hastaların kaybı kaçınılmaz olmaktadır. Hatta bu hastalar yoğun bir tedavi almalarına rağmen kaybedilmektedirler. Yoğun bakımda bulunan hastalara mekanik ventilatör uygulamasının yapılması, asit baz dengesinin bozulması ve koagülopatilerin meydana gelmesi mortalite oranının artmasında önemli bir sebeptir. Sepsis tablosu oluşan hastalarda hücre yıkımına bağlı ortaya çıkan maddelerle birlikte laktik asidoz meydana gelmektedir. Daha sonra ortamda bir kısır döngü yaşanmakta ve birbirini tetikleyen mekanizmalarla oluşan laktik asidoz hücre yıkımını artırmaktadır. Artan hücre yıkımıyla beraber ortamın pH sı asite kaymaktadır(5,6,7).

Hipergastrinemi olgularında enteroendokrin hücrelerin artış gösterdiği de bilinen bir gerçektir. Hipergastrinemi pH'nın artışına sekonder olarak gelişen bir durumdur. Artan pH düzeyini kompanze etmek amacıyla ECL hücrelerden histamin salgılanması meydana gelmektedir.

ECL hücreleri gastrine cevap olarak hipertrofi ve hiperplaziye uğrarlar. Stoplazmik granüller, sekretuar veziküller ve mikroveziküller içerirler(8). ECL hücreleri polipeptit hormon salgılayan hücrelerin görünümüne sahiptir(9). Ultrastrüktürel çalışmalarla, içinde pek çok yoğun sekretuar veziküller içeren 8-10 mikrometre çapında sferik hücreler oldukları gösterilmiştir(10). İki ana hücre tipi mevcuttur. 1.si veziküler tip granüllere sahip olan ECL hücreleri, diğeri daha küçük olan üniform elektron dense granülleri olan A-like hücreleridir. Gastrin oksintik ECL hücreleri üzerine tropik etkilidir(9). Sekretuar veziküller (vakuoller) ECL hücre histaminlerinin major depolanma yerleridir(8). Histamin sekretuar veziküllerde depolanır. ECL hücreleri gastrin, somatostatin ve galinin gibi önemli hormonlara cevap olarak gastrik asit sekresyonunun periferik regülasyonunda önemli rol oynarlar(10). Kontrol grubu bulgularımız paneth hücrelerinin granüllerini kript içine vererek mukozal immüniteye katkı sağladığını göstermiştir. Bu daha önce yapılan çalışmalarla da uyumludur (11,12).

İmmün süpresyon uygulanan grupta paneth hücrelerinde ve enteroendokrin hücrelerde kontrol

grubuyla aynı özelliklerde morfolojiler tespit edilmesine rağmen, mast hücrelerinde sayıca artış görülmüştür. Ayrıca kript lümeninde bulunan kok ve basiller çok fazla miktarda artmıştır. Bu artış immün sistemin baskılanması sonucu savunma mekanizmasının yeterince çalışmaması sebebiyle olmaktadır. Mast hücrelerindeki artış savunma mekanizması kompanzasyonu için olmuş olabilir. Enteroendokrin hücreler gastro intestinal sistemin farklı segmentlerine göre değişen miktar ve çeşitlerde hormon benzeri etkiye mediyatörler salgırlar. Bu mediyatörlerden olan Vazoaktif intestinal peptit (VIP); septik, hemorajik ve benzeri şoklarda ilgili şokun neden ve hasarı konusunda önemli rolleri olan mast hücrelerinin degranülasyonunu kontrol etme işlevi ile öne çıkmaktadır. Çalışmada paneth hücreleri ile korele olan enteroendokrin hücre ve salgı bulgularının olası VİP içerikleri nedeniyle mast hücrelerinin degranüle yada granüle formlarına etkisi olabilir (13,14).

Septik şok gram negatif bakterilerin dış membran bileşiminde bulunan lipopolisakkaritlerden oluşan endotoksinin sistemik endotoksemi oluşturması sonucu, çoklu organ yetmezliğine varabilir ve yüksek mortalite riski taşır (15).

Vazoaktif intestinal peptit, septik şok sırasında mast hücrelerinden salınan ve aşırı reaksiyonlarda doku ve/veya organ hücre hasarına neden olabilecek medyatörlere karşı koruyucu etkiye sahiptir. Nitekim septik şoklarda vazoaktif intestinal peptitin plazma seviyelerinin arttığı saptanmıştır. Üstelik periferik iskemi sonucu oluşan serbest oksijen radikallerinden şekillenen sitokinler, oksidanlar ve NO (nitrik oksit) in kaynaklarından olan mast hücrelerinin endotoksik şokta rolleri önemlidir. Vazoaktif intestinal peptit ve naloksan mast hücre degranülasyonunu engelleyerek çeşitli şok modellerinde koruyucu etki yapmaktadır (13,14,16).

Vazoaktif intestinal peptit nöronlar, akciğerler ve bir çok organın yanı sıra ince barsak enteroendokrin hücrelerinden de salınmaktadır (13,14,16). Diğer taraftan mast hücreleri, çeşitli mediyatörler yanı sıra oksidanlar ve nitrik oksit (NO) ile de sepsis tablosunun oluşmasında rol oynarlar.

Hayvanlarda öncelikle paraziter invazyonlara karşı intestinal mukozal bariyerde iş gördüğü saptanan söz konusu hücrelerin, lamina propriya normal eozinofil lökositleri ve mast hücreleri ile birlikte davranmaları ve bu işbirliğinin parazit miktarı ile korele olması; bu hücreler insanlarda bulunmuyor ise toplam mukozal bariyerin insanlarda daha çabuk

yıkılabileceğini de gösterebilir (17,18)

Çok az çalışma ile ortaya konan globüler lökositlerin kökenleri konusundaki verilerin, farklılaşmış hatta ciddi paraziter invazyonlarda intra epiteliyal göç de yapabildikleri gösterilen mast hücreleri olması yönündeki bulgular göz önüne alındığında bu çalışmanın bulguları dikkat çekicidir. Çünkü, gerek mast hücreleri, gerek ECL hücreler, gerekse globüler lökositler ile, nötrofilik ve eozinofilik polimorf lökositlerin her bir grupta farklı etkileşimleri; timus bağımlı olabileceği gösterilen farklı mast hücrelerinin, hayvanlarda kökeni tartışmalı olan, insanlarda ise karşılığı iyi ortaya konmamış olan globüler lökositlerin lokal yada sistemik etkiler ile intestinal mukozal immünite gereksinimlerine göre değişime uğrayan mast hücreleri olabileceğine gösterge olabilir. Yine de globüler lökositlerin endometriyumda insan NK Lenfositlerinin kemirgenlerdeki karşılığı olan Granüler Metriyal Glandular (GMG) hücrelerine benzetilmesi ve intraepitelyal göç edebildiklerini gösteren çalışmalar esas alındığında bu hücrelerin de NK lenfosit olma olasılığının çok yüksek olduğunu göstermektedir (17,19).

Yapılan bu çalışmada uygulanan immün süpresyon paneth hücrelerinin degranülasyonunu ve enteroendokrin hücreleri etkilemediği, ancak mast hücrelerinin sayısında belirgin artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Kaynaklar

1. Neutra M.R. Current Concepts in Mucosal Immunity. V. Role of M cells in Transepithelial Transport of Antigens and Pathogens to The Mucosal Immune System. *Am. J. Physiol.* 274 785-791 (1998).
2. Ouellette A.J. Mucosal Immunity and Inflammation IV. Paneth Cell Antimicrobial Peptides and The Biology of The Mucosal Barrier. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 277(2);257-261 (1999)
3. Tokiyoshi A., Satchell D., Pesendorfer P., Tanabe H., Wilson C.L., Hagen S.J., Ouellette A.J. Activation of Paneth Cell Alfa Defensins in Mouse Small Intestine. *J. Biol. Chem.* Vol:277 no: 7 5219-5228 (2002)
4. Lisik W, Tejpal N, Gong Y, Skelton TS, Ganachari M, Bremer EG, et al. Down regulation of genes involved in T cell polarity and motility during the induction of heart allograft tolerance by allochimeric MHC I. *PLoS One* 2009;4(12):e8020.
5. Desphande G.G., Heidemann S.M., and Sarnaik A.P. Heat Stress is Associated with Decreased Lactic Acidemia in Rat Sepsis. *Crit. Care.* 4(1):45-49 (2000)
6. Irwin R.S., Cerra F.B., and Rippe J.M. *Intensive Care Medicine* Fourth Edition. page 1289-1306 (1999)
7. Pisegna J.R. *Pharmacology of Acid Suppression in*

- The Hospital Setting: Focus on Proton Pump Inhibition. *Crit. Care Med.* 30(6); 356-361 (2002)
8. Chen D., Zhao CM., Andersson K., Sundler F., Hakanson R. Ultrastructure of Enterochromaffinlike Cells in Rat Stomach: Effects of Alpha-fluoromethylhistidine-evoked Histamin Depletion and Hypergastrinemia. *Cell Tissue Res.* 283(3):469-78 (1996).
9. Hakanson R., Larsson L., Liedberg G., Oscarson J., Sundler F., Vang J. Effects of Antrectomy or Portacaval Shunting on The Histamin-storing Endocrine-like Cells in Oxyntic Mucosa of Rat Stomach. A Fluorescence Histochemical, Electron Microscopic and Chemical Study. *The journal of Physiology* 259(3):785-800 (1976)
10. Prinz C., Zanner R., Gerhard M., Mahr S., Neumayer N., Hohne B., Gratzl M. The Mechanism of Histamine Secretion from Gastric Enterochromaffinlike Cells. *Am J Physiol Physiol* 277:845-855 (1999)
11. Canpolat L., Vardı N., Ranitidin Uygulamasını Takiben Sıçanların Paneth Hücrelerinin Histolojik İncelenmesi. *Turgut Özal tıp merkezi dergisi.* 6(4): (1999)
12. Usluer G., Gürer F., Açıkalın E., Erol K. Siprofloksasinin Barsak Florası ve Paneth Hücrelerine Etkileri. *Mikrobiyol. Bült.* 25;21-27 (1991)
13. Tıkız H., Tunçel N., Akin M.Z. and Gürer F. The Effect of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) and Naloxone Combination on Survival Rates in Rats Exposed to Severe Hemorrhage. *Peptides Vol. 13 pp.* 83-89,(1992)
14. Tıkız H., Tunçel N., Gürer F. and Bayçu C. Mast Cell Degranulation in Hemorrhagic Shock in Rats and the Effects of Vasoactive Intestinal Peptide, Aprotinin and H1 and H2 receptör Blockers on Degranulation. *Pharmacology* 43:47-52 (1991)
15. Tunçel N., Töre F.Ç. The Effect of VIP and Inhibition of Nitric Oxide Synthase on Survival rate in Rats Exposed to Endotoxin Shock. *Ann. NY Acad Sci.* 865:586-589,(1998)
16. Akin M.Z., Tunçel N., Gürer F., Kural N., Uslu S. Effect of Vasoactive Intestinal Peptide and Naloxone Combination on Urinary N-Acetyl beta-D-Glucosaminidase Level and Kidney Histology of Rats Exposed to Severe Hemorrhage. *Pharmacology.* 47:194-199 (1993)
17. Friend D.S., Gurish M.F., Austen K.F., Hunt J. and Stewens R.L. Senescent Jejunal Mast Cells and Eosinophills in the Mouse Preferentially Translocate to the Spleen and Draining Lymp Node, Respectively, During the Recovery Phase of Helmint Infection. *The journal of Immunoloji* 165:344-352 (2000)
18. Oliveira T.C.G., Amarante A.F.T. Sequeira J.L. Parasitological Characteristics and Tissue Response in the Abomasum of Sheep Infected with *Haemonchus* spp. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Vol.52 n 5 (2000)
19. Nagatani M., Nakamura A., Yamaguchi Y., Aikawa T., Tamura K. Spontaneous Eosinophilic Granulated Round Cell Tumors in Rats. *Vet. Pathol.* 38:317-324 (2001)