

7,12 Dimetil Benzantrazenin Fare İleum Mukozasında Neden Olduğu Histolojik Değişiklikler ve Bu Değişiklikler Üzerine E Vitamini+Selenyum ve Melatoninin Etkileri

Nigar Vardı*, Feral Öztürk*, Çetin Öztürk**, Kadir Batcıoğlu***

* İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji - Embriyoloji AD, Malatya

** İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A D, Malatya

***İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü , Malatya

Amaç: Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) potent karsinojenler olarak bilinmektedirler. Karsinojen etkilerini, serbest radikal oluşturarak gösterirler. 7,12 dimetil benzantrazen (DMBA)'de bir PAH türevidir. Bu çalışmada DMBA'nın fare ileum mukozasında oluşturduğu olası histolojik değişiklikler üzerine, antioksidant özellikleri bilinen Vit E+Se ile melatoninin etkilerini karşılaştırmalı olarak incelemeyi amaçladık.

Materyal Metot: Çalışmamızda Elazığ Hayvan Araştırma Merkezi'nden temin edilen 20 adet dişi fare (mus musculus) kullanıldı. Denekler rastgele seçilerek 5'er fareden oluşan 4 grup oluşturuldu. Birinci grup kontrol grubu, II. Grup DMBA grubu, III. Grup Vit E+Se grubu ve IV. Grup melatonin grubu olarak belirlendi. İlaçlar farelere intraperitoneal yolla verildi. Onbir günlük deney süresinin sonunda farelerden alınan ileum örnekleri rutin doku takibinden sonra parafine gömüldü. Bloklardan alınan 5 mikronluk kesitler H -E, Grimelius, PAS+alcian blue ve aldehyde fuchin- alcian blue ile boyandı.

Bulgular: DMBA grubunda; villuslarda kısalma, villus bağ dokusunda ödem, bez lümenlerinde genişleme gözlemlendi. Bezlerin bazal bölümünde farklı sitoplazma ve nükleus özelliklerine sahip değişik hücreler bulunmaktaydı. Paneth hücre granüllerinde azalma izlendi. Vit E+Se ile melatonin grubunda villuslarda kısalma ve bağ dokuda ödem belirgin değildi. Bez lümenlerinde genişleme ve bez epitel hücrelerindeki çekirdek farklılaşması melatonin grubunda daha seyrek olarak görüldü. Paneth hücreleri eozinofilik granüllerle dolu olarak izlendi.

Sonuç: DMBA'nın barsak mukozası üzerine oluşturduğu hasar üzerine VitE+Se kombinasyonundan daha çok, melatoninin koruyucu etkisi olduğu sonucuna vardık.

Anahtar kelimeler: 7,12-DMBA, Işık mikroskop, İleum, Fare.

The Histological Changes Of Mice Ileum Treated With 7,12- Dimethylbenz(A)Anthracene And The Protective Effects Of Vitamin E+Selenium And Melatonin

Purpose: The purpose of this study was to investigate the histological changes on the ileum of the mouse (mus musculus) of mouse following 7,12-DMBA treatment and the protective effects of Vit E+Se and melatonin on 7,12-DMBA treated mouse ileum.

Material and Methods: Twenty female mice obtained from Elazığ Animal Research Center were used in this study. Animals were divided into four randomized groups. Group I was control , group II was 7,12- DMBA, group III 7,12-DMBA+(Vit E+Se) and group IV DMBA+ melatonin groups . The drugs were applied intraperitoneally. At the end of the eleventh day; samples taken from ileum were embedded in parafin, after from routine tissue preparation technique. Sections were stained with; H -E, Grimelius, PAS-alcian blue and aldehyde fuchsin- alcian blue staining methods. Sections were examined by light microscope.

Results: Shortening of villi; edema within the connective tissue of the villi, dilatation of the lumen of the crypts were observed in DMBA group. Many differentiated cells were detected at the base of the crypts. Paneth cell granules were decreased. Shortening of the villi and edema within the connective tissue were not clear in Vit E+Se group. Dilatation of the lumen of the crypts and nuclear differentiation were rare in melatonin group. Paneth cells were full of granules

Conclusion: We concluded that both Vit E+Se and melatonin have protective effects on 7,12- DMBA treated mice ileal mucosa but melatonin's effect is more effective.

Key words: 7,12-DMBA, Light microscope, Ileum, Mouse.

Kanserlerin %75-80'inin çevresel, %30-40'ının diyetle ilişkili olarak geliştiği bildirilmiştir. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), potent karsinojenlerdir. Metabolik aktivasyon sağlayarak değişik dokularda kanser oluşturabilirler. PAH'lar eksoz dumanları, petrol üretimi sırasında çevreye yayılan yağlar, zift materyalleri, kömür gazları, sigara dumanı, tütsülenmiş yada ızgaralanmış yiyecekler aracılığı ile alınabilirler.^{1,2}

Genotoksik karsinojenler DNA ile kovalent bağ yaparak DNA hasarı oluşturan bir grup maddedir. Bunlardan biri olan 7,12 dimetil benzantrazen (DMBA) bir PAH türevidir. Kimyasal karsinojenler metabolizmaları süresince metabolik ve non-enzimatik olarak serbest radikaller oluştururlar.² Serbest radikaller, DNA bazları ile kovalent bağlanarak fosfodiester omurgasından zincir kırılmasına ve pürin yada pirimidinlerin kaybolmasına yol açabilirler. Bu farklılıkların neoplastik değişikliklerin başlamasında önemli olduğu bilinmektedir.^{2,4} Bu nedenle neoplastik değişiklikleri önlemede serbest radikallerin ortaya çıkmasını engelleyen E vitamini, selenyum, melatonin, retinoid ve β -karoten gibi antioksidant maddelerin kullanılmasının etkili olduğu düşünülmektedir.^{2,5} Nitekim E vitamini ve selenyumun gastrointestinal sistem kanserlerine karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir.^{5,6} E vitamininin ağız boşluğu kanserlerinin tümör hücre gelişimini inhibe ettiği rapor edilmiştir.⁵

Pineal bezden üretilen bir hormon olan melatoninin tümör gelişimi ve yaşlanmanın biyolojik regülasyonunda rolü olabileceğine dair bulgular vardır.⁷ Melatoninin, DMBA'nın neden olduğu serviks ve vagina kanserlerinin inhibe ettiği bildirilmiştir.⁸

Biz de çalışmamızda DMBA'nın fare ileumunun mukozasında oluşturduğu olası histolojik değişiklikleri ve E vitamini+selenyum ve melatoninin bu değişiklikler üzerine etkilerini incelemeyi amaçladık.

MATERYAL ve METOT

Hayvanlar ve deneysel düzenek: Çalışmamızda, Elazığ Hayvan Araştırma Merkezi'nden temin edilen 20 adet dişi fare (mus musculus) kullanıldı. Denekler rastgele seçilerek 5'er fareden oluşan 4 grup oluşturuldu. Bütün hayvanlar, deneyden önce ortama adaptasyonlarının sağlanması amacıyla aynı koşullarda iki hafta süre ile beslendiler. Daha sonra gruplar aşağıdaki şekilde düzenlendi.

Grup I (Kontrol grubu): Bu gruba deney süresince (11 gün boyunca) 25 μ l/gün intra peritoneal (i.p.) mısırozü yağı enjekte edildi.

Grup II (DMBA grubu): Bu gruba deney süresince her gün 25 μ l/gün mısırozü yağı içinde 20 mg/kg/gün DMBA çözülüp i.p. enjekte edildi.

Grup III (Vit E+Selenyum grubu): Bu gruba 5 gün boyunca 48 saatte bir 25 μ l mısırozü yağı içinde 0.09 mg/kg/gün Vit E+ 1.8x10⁻³ mg selenyum i.p. enjekte edildikten sonra yine mısırozü yağı içinde DMBA 20 (mg/kg/gün) + Vit E+selenyum (0.09 mg/kg/gün Vit E+ 1.8x10⁻³Se) mg i.p. enjekte edildi.

Grup IV (Melatonin grubu): Bu gruba 5 gün süreyle 25 μ l mısırozü yağı içinde 4.2 mg/kg/gün melatonin verildikten sonra, yine mısırozü yağı içinde 6 gün 20 mg/kg/gün DMBA+4.2 mg/kg/gün melatonin i.p. olarak enjekte edildi.

Histoloji: Deney süresinin sonunda fareler servikal dislokasyonla öldürülerek ileumları alındı. Örnekler %10'luk formalinle tesbit edildi. Rutin doku takibinden sonra elde edilen parafin bloklardan 5-6 μ m'lik kesitler alındı. Kesitlere genel histolojik yapıyı gözlemek için hematoksilin-eozin (H-E), goblet hücrelerinin sekresyon ürünlerini incelemek için PAS (Periyodik Asit Şift)+ alcian blue ve nöroendokrin hücreleri incelemek için Grimelius gümüşleme metodu uygulandı.⁹ Boyanan kesitler BH-2 Olympus fotomikroskopunda incelenerek fotoğraflandı.

Değerlendirme: Kesitler villuslarda şekil bozukluğu, epitel hasarı, bağ dokusu yoğunluğu, Lieberkühn kriptalarında şekil değişikliği ve dilatasyon derecesi, goblet hücre sayısı, PAS ile boyanma şekli, nükleus ve sitoplazma değişikliği izlenen hücre sayısı, mitoz oranı, Paneth hücrelerinde granül miktarı, vakuolizasyon derecesi açısından değerlendirdi. Bu değişikliklerin derecesi +++ şiddetli, ++ orta, + hafif olarak gösterildi.

İstatistik: Dört grubun nöroendokrin hücre sayısı tüm barsak alanı kesitlerinde sayılarak, aritmetik ortalama \pm standart hata olarak hesaplandı. İstatistiksel incelemede Kruskal-Wallis testi yapıldı. p<0.05 olan değerler anlamlı kabul edildi. Farklılığı yaratan grubu saptamak için, gruplar ikili olarak Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. p<0.01 olan değerler anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

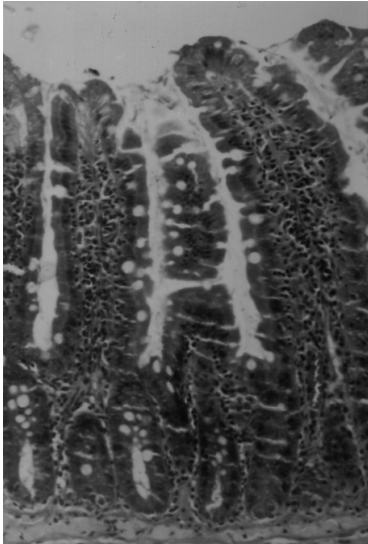
Kontrol grubu: H-E ile boyanmış kontrol grubu kesitlerinde epitel ve lamina proprianın oluşturduğu parmak şeklinde villuslar gözlemlendi. Villusun üzerini örten epitel tek katlı çizgili kenarlı prizmatik epiteldi. Çizgili kenarlı prizmatik hücreler (enterositler) arasında

dağılmış goblet hücreleri bu yöntemle soluk boyandı. Hücreden zengin gevşek bağ dokusu özelliğinde olan lamina propria içinde Lieberkühn kriptaları izlendi. Kriptaların epiteli de enterositleri ve goblet hücrelerini içeren tek katlı prizmatik epiteldi (Resim 1). Kriptaların bazalinde, ökromatik nükleusları bazal sitoplazmada yerleşmiş, apikal sitoplazmalarında çok miktarda pembe-kırmızı renkte granüller içeren pramidal şekilli Paneth hücreleri izlendi. Kriptalarda sık mitoz figürlerine rastlandı (Resim 2). Lamina propria altında lamina muskularis mukoza ve gevşek bağ dokusu özelliğinde submukoza yer almaktaydı. Tunika muskularis içte sirküler dışta longitudinal düz kas liflerinden oluşmaktaydı. İki kas tabakası arasında myenterik ganglionlar gözlemlendi. Tunika muskularis tunika seroza ile çevriliydi.

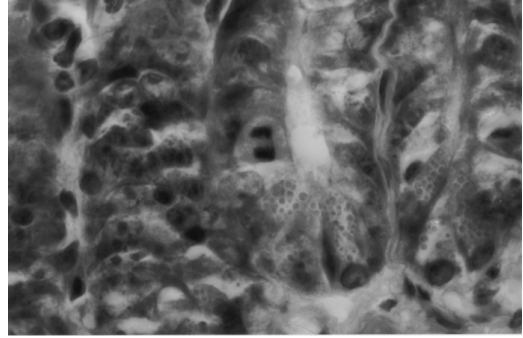
PAS- alcian blue boyama yöntemi ile kontrol kesitlerinde villus epitelindeki goblet hücreleri mor, kriptalarda ise menekşe veya mor renkte izlendiler (Resim 3). Aldehyde fuchsin- alcian blue yöntemi ile de villus yüzeyi ve kriptalarındaki goblet hücre salgısı mavi ve mora boyandı (Resim 4).

Grimelius metodu ile boyanan kesitlerde, yüzey epitelinde ve bez epitelinde bol miktarda arjirofil hücreye rastlandı. Kahverengi- siyah renkte görülen granülleri hücrelerin bazalinde yoğunlaşmıştı (Resim 5).

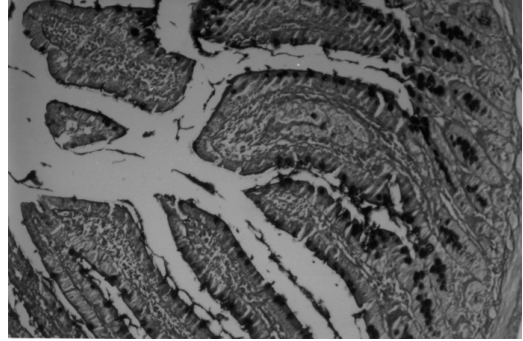
DMBA grubu: H-E boyama metodu ile bu gruptaki farelerin ileumlarının villuslarında belirgin histolojik



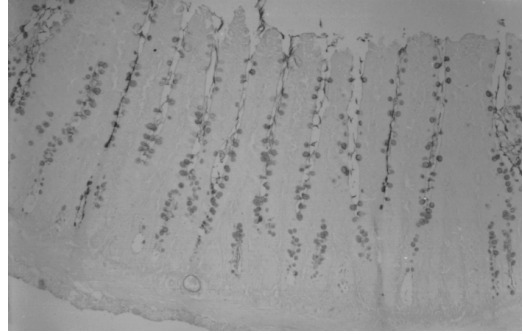
Resim 1. Kontrol grubunda parmak şeklinde gözlenen villusların tek katlı prizmatik epiteli ve goblet hücreleri. H-E X66.



Resim 2. Kontrol grubunda Paneth hücreleri ve mitoz figürleri. H-E X330.

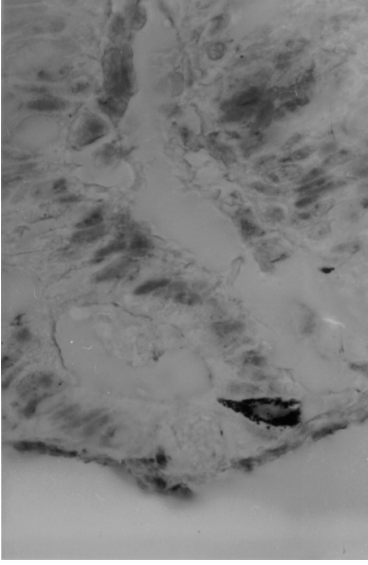


Resim 3. Kontrol grubunda Goblet hücre salgısı. PAS- alcian blue X66.

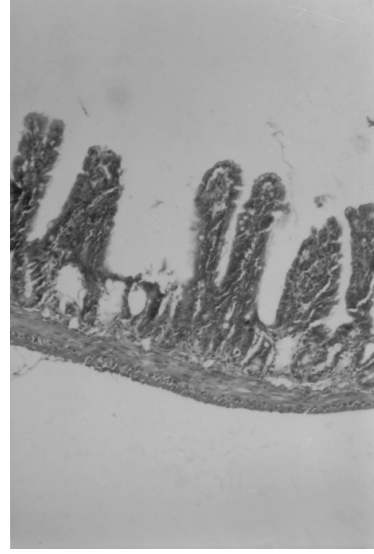


Resim 4. Kontrol grubunda Goblet hücre salgısı. Aldehyde fuchsin- alcian blue X66.

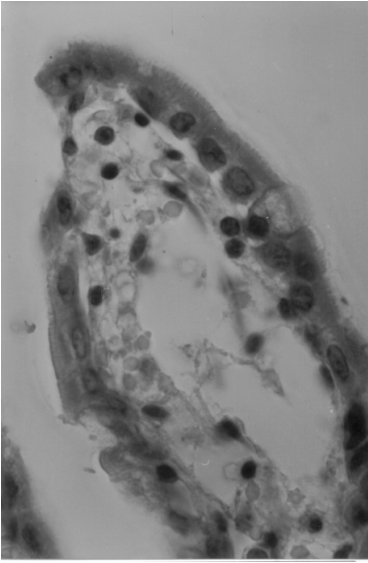
değişiklikler izlendi. Villuslarda yer yer parçalanma ve atrofi bulunmaktaydı. Villuslarda belirgin olarak kılma izlendi (Resim 6). Villus yüzeyini örten prizmatik epitelin (5 fareden 4'ünde) boyunun kısaldığı ve yer yer parçalandığı görüldü (Resim 7). Villusların bağ dokusunda yoğun ödem izlendi. Bağ dokusu içinde damarlarda genişleme görüldü. Bezlerin özellikle bazal bölümlerinin lümenlerinin genişlediği gözlemlendi (Resim 6). Bezlerin bazal bölümlerini



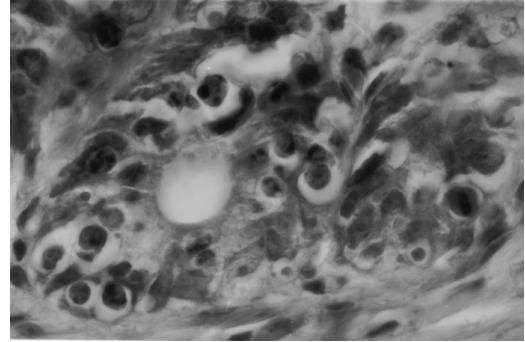
Resim 5. Kontrol grubunda nöroendokrin hücre. Grimelius X330.



Resim 6. DMBA grubunda atrofik villus yapısı, genişlemiş bez lümenleri. H-E X33.



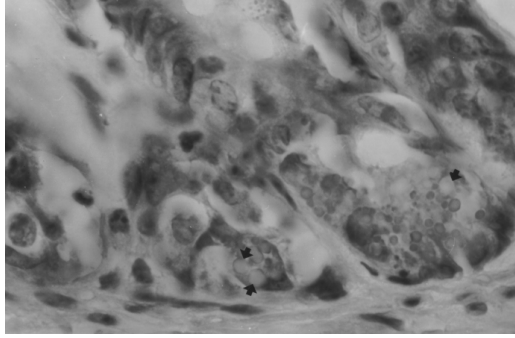
Resim 7. DMBA grubunda yüzey epitelinin boyunun kısalması ve yer yer dökülmesi. H-E X330.



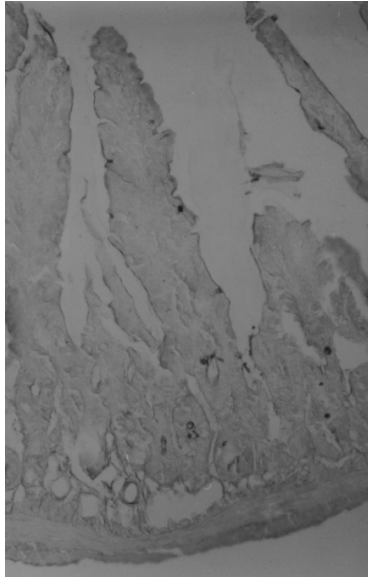
Resim 8. DMBA grubunda; Liberkuhn bezleri içinde farklı nükleus yapılarına sahip hücreler. H-E X330.

döşeyen epitelde normal yapıdaki hücrelerin dışında, farklı nükleus ve sitoplazma özelliklerine sahip değişik hücreler bulunmaktaydı. Genellikle bu hücrelerin nükleus kromatini yoğunlaşmış, çeşitli büyüklükte parçalara ayrılmıştı. Bazı hücrelerde, yoğunlaşarak perifere çekilen kromatin yarım ay şeklinde izlenmekteydi. Nadiren heterokromatik, piknotik nükleuslu hücrelere rastlandı. Bazı hücrelerde ise

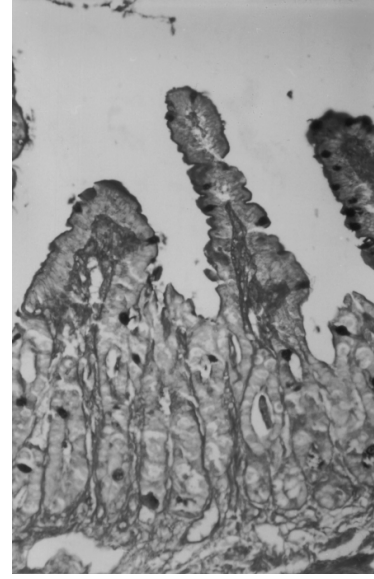
sitoplazma içinde ince bir granülasyon dikkati çekmekteydi. Yer yer, çok miktarda heterokromatik nükleus parçaları içeren büyük çaplı hücrelere de rastlandı. Genellikle bütün bu hücrelerin çevresinde geniş, şeffaf boşluklar bulunmaktaydı (Resim 8). Bezlerin bazalinde yer alan Paneth hücrelerinde de nükleus ve sitoplazma değişiklikleri gözlemlendi. Bazalde yer alan nükleuslarında şekil bozukluğu, çentiklenme izlendi. Kromatin genellikle nükleus periferinde küçük gruplar yapmaktaydı. Bu hücrelerin sitoplazmalarında nispeten az miktarda açık renkte, büyük granüller izlendi. Paneth hücrelerinin sitoplazmalarında yer alan vakuoller de dikkat çekiciydi. Hücreler yuvarlak hücreler haline dönüşmüştü (Resim 9).



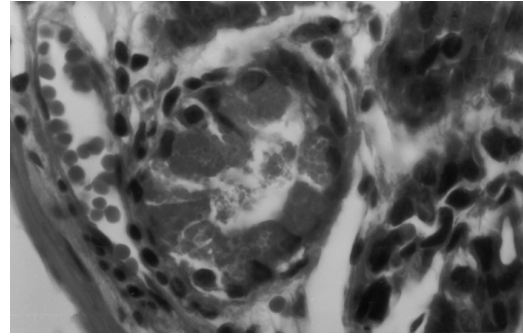
Resim 9. DMBA grubunda; balonlaşmış Paneth hücreleri ve azalmış açık renkli granülleri. Ok. vakuol. H-E X330.



Resim 11. DMBA grubunda salgısı azalan Goblet hücreleri. Aldehyde fuchsin- alcian blue X66.



Resim 10. DMBA grubunda salgısı azalan Goblet hücreleri. PAS- alcian blue X66.



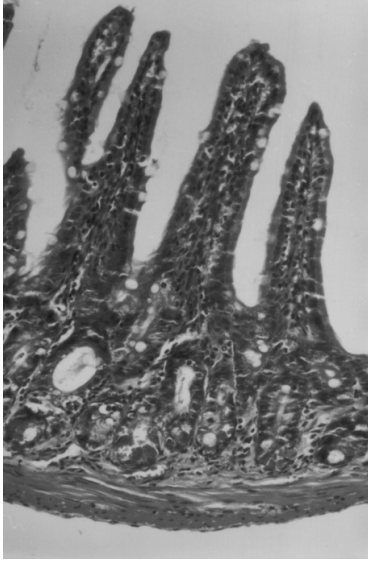
Resim 12. Vitamin grubunda granül sayısı artan Paneth hücreleri. H-E X330.

Lieberkühn kriptalarında az sayıda mitoz figürü görüldü. Tüm barsak alanında sayılan nöroendokrin hücre sayısında kontrollere göre belirgin azalma dikkati çektii $p < 0.05$ (Tablo 1).

PAS- alcian blue boyama metodu ile goblet hücre salgısında kontrollere göre azalma bulundu (Resim 10). Azalma kriptalarda daha belirgindi. Goblet hücrelerinin salgısı, bez lümeninde menekşe renginde gözlemlendi. Aldehyde fuchsin- alcian blue boyama metodu ile de boyanan goblet hücre salgısı azalmıştı. Boyanan salgıda mor renkte izlendi (Resim 11).

Vit E+ Selenyum grubu: DMBA ile birlikte Vit E+Selenyum verilen grupta villus yapısı 5 fareden

3'ünde normaldi. Villuslarda kısalma ve şekil değişikliği izlenmedi. Ancak yer yer parçalanma mevcuttu. Villusun bağ dokusu içinde ödem belirgin olmamasına rağmen, laktealler ile lamina propria ve submukozada yer alan kan damarlarında genişleme dikkati çekmekteydi. Bez epitel hücrelerinin boyunun kısalması, bez lümenlerinin genişlemesi ve çekirdek materyalinin farklılaşması Vit E+ Se grubunda da belirgin olarak izlendi. Ancak nükleus ve sitoplazmasında değişikliği izlenen hücre sayısı bu grupta daha azdı. Paneth hücrelerinin eozinofilik granüllerle dolu olduğu izlendi (Resim 12). Ancak DMBA grubunda tesbit edilen Paneth hücrelerinde sitoplazmik vakuol yapılarına rastlanmadı (Tablo 2). PAS- alcian blue boya metodu ile goblet hücre



Resim 13. Melatonin grubunda sağlam olarak izlenen villus yapıları. H-E X66

salgılarının mor ve kırmızıya boyandığı dikkati çektii. Aldehyde fuchsin- alcian blue boyama metodu ile de salgı mor ve genellikle mavi renkte boyandı. Bu grupta da mitoz figürlerine rastlandı.

Nöroendokrin hücre sayısının azalması bu grupta istatistik anlamda önemliydi ($p < 0.05$, Tablo 1).

Melatonin grubu: DMBA ile birlikte melatonin verilen grupta; 5 fareden 4'ünde villus yapıları normale yakın olarak gözlemlendi. Villuslarda kısalma ve şekil değişikliği izlenmedi. Epitel parçalanması nadirdi. Lamina propria ödem izlenmedi. Lieberkühn kriptalarının lümenleri genişti. DMBA ve VitE+Se grubunda izlenen, nükleus ve sitoplazma değişikliğine uğramış hücrelere seyrek rastlandı. Paneth hücreleri granüllerle dolu olarak izlendi (Resim 13) (Tablo 2).

PAS+ alcian blue ve aldehyde fuchsin –alcian blue boyama metodu ile goblet hücreleri villus yüzeyinde ve Lieberkühn bezlerinde VitE+Se grubuna yakın boyanma özelliği gösterdi (Tablo 2). Grimelius arjirofil metodu ile boyanan nöroendokrin hücre sayısı da kontrol grubuna yakın ($p > 0.05$) bulundu (Tablo 1).

TARTIŞMA

DMBA'nın genotoksik bir karsinojen olduğu bilinmektedir. Bu maddenin tümör oluşturuvcu karsinogenik etkisi moleküler seviyede gösterilmiştir. ^{1, 10} PAH türevleri karsinogenik etkilerini serbest radikal oluşturarak gösterirler. ^{5,11,12} Eşlenmemiş elektronlara sahip atom veya atom grupları içeren serbest radikaller kimyasal bağ oluşumuna hasar verirler. Son derece reaktif olan bu maddeler DNA ve RNA üzerinde zincir reaksiyonlarına neden olurlar. DNA

Tablo 2. Kontrol, DMBA, Vit E+Se ve melatonin grubunda izlenen histolojik değişikliklerin karşılaştırılması.

	Kontrol	DMBA	Vit E+ Se	Melatonin
1. Villus				
Şekil bozukluğu	-	+++	-	-
Villusda kısalma	-	+++	+	+
Villus bağ dokusu ödemi	-	+++	+	-
Epitel hasarı	-	+++	+	-
Bağ doku hücre yoğunluğu	+++	+	++	++
2. Goblet hücreleri				
Villus yüzeyinde azalma	-	+++	+	+
Lieberkühn bezlerde azalma	-	+++	+	-
PAS'la boyanma	++	+	+++	+++
Alcian blue ile boyanma	+++	+	+	+
3. Lieberkühn epiteli				
Nükleus ve sitoplazma değişikliği gösteren hücreler	-	+++	++	+
Mitoz	+++	+	++	+++
4. Paneth hücreleri				
Vakuolizasyon	-	++	-	-
Granülle doluluk oranı	++	+	+++	+++
Balonlaşma	-	+++	+	-
5. Lieberkühn bez lümenleri				
Dilatasyon	-	+++	+++	++
+++ Şiddetli				
++ Orta				
+ Az				
- Yok				

Tablo 1. Nöroendokrin hücrelerin gruplara göre dağılımı.

Gruplar	Nöroendokrin hücreler
I.Grup (Kontrol)	63.00±1.04
II.Grup (DMBA)	20.60±2.2 ^a
III.Grup (Vit E+Se)	25.40±0.81 ^b
IV.Grup (Melatonin)	52.80±5.90

p < 0.005 Kruskal-Wallis, ^ap < 0.001 Mann-Whitney U, ^bp < 0.001 Mann-Whitney U

bazlarına kovalent olarak bağlanırlar, fosfodiester omurgasından zincirin kırılmasına, purin yada pirimidin bazlarının kaybolmasına neden olurlar. Tümör hücrelerinden izole edilen DNA, normal hücrelere transfer edildiğinde normal hücrelerde de neoplastik değişiklikler gözlenmiştir. Bu yüzden DNA'daki değişikliklerin maligniteden sorumlu olabileceği düşünülmektedir.^{2,4} Ayrıca lipid peroksidasyonu yolu ile hücre membranındaki polisatüre lipidlerin yıkımını sağlayıp, hücre membranlarına zarar verebilirler.¹³ Tümör oluşumunda önemli rolleri olduğu düşünülen serbest radikallerin ortaya çıkmalarını engellemek için antioksidant maddelerin kullanılması düşünülmüştür. Çünkü antioksidantlar, serbest radikal oluşumunu önleyerek, kimyasal karsinojenlerin aktivitelerini inhibe edebilir. Antioksidantlar serbest radikallere karşı vücudun primer savunma mekanizmalarıdır. Biz de çalışmamızda, DMBA'nın ileum mukozasında oluşturacağı olası değişiklikleri ve E vitamini ve selenyumun bu değişiklikler üzerine yapacağı etkileri incelemeyi amaçladık. Yapılan çalışmalarda DMBA'nın oluşturduğu hasar üzerine E vitamininin, selenyumun ve melatoninin değişik derecelerde koruyucu etkileri gösterilmiştir.^{6, 8, 14} Ancak DMBA oluşturduğu histolojik değişikliklerin ve bu değişiklikler üzerine E vitamini, selenyum ve melatoninin yaptığı etkilerin kıyaslanarak incelendiği histolojik çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda DMBA verilen farelerin ileumlarında belirgin histolojik değişiklikler gözlemlendi. Villus yüzeyini örten prizmatik epitelin yer yer parçalandığı görüldü. Villusların bağ dokusunda yoğun ödem izlendi. Bezlerin özellikle bazal bölümlerinin lümenlerinin genişlediği gözlemlendi. Bezlerin bazal bölümlerini döşeyen epitelde normal yapıdaki hücrelerin dışında, farklı nükleus ve sitoplazma özelliklerine sahip değişik hücreler bulunmaktaydı. Genellikle bu hücrelerin nükleus kromatini yoğunlaşmış, çeşitli büyüklükte parçalara ayrılmıştı. Bazı hücrelerde, yoğunlaşarak perifer çekilen kromatin yarım şekline izlenmekteydi. Nadiren heterokromatik, piknotik nükleuslu hücrelere

rastlandı. Bazı hücrelerde ise sitoplazma içinde ince bir granülasyon dikkati çekmekteydi. Bu hücreler şeffaf boşluklarla çevrelenmişti. Bu nükleus ve sitoplazma özellikleri ile bu hücrelerin apoptotik hücreler olduğu düşünüldü. Apoptotik hücrelerin morfolojik özellikleri kromatini yoğunlaşması ve kümelenmesi, nükleusun parçalanması, sitoplazmik vakuolizasyon ve hücre büzüşme sidir. Değişime uğrayan hücre daha sonra parçalara ayrılarak apoptotik cisimcikleri oluşturur. Çalışmamızda gördüğümüz, piknotik nükleuslu, kromatini yoğunlaşmış ve kümelenmiş, nükleusu parçalanmış hücrelerin apoptosisin değişik aşamalarını temsil ettiği düşüncesindeyiz. Heterokromatik nükleus kromatinin yarım şekline kümelenmesi apoptosisin sadece dakikalarca süren bir evresidir.¹⁵ Bu nedenle kesitlerde az rastlanan bu evreyi biz de nadiren gördük. Apoptotik cisimcikler dokudan uzaklaştırılmak için makrofajlar veya komşu hücreler tarafından hızla fagosite edilerek ortadan kaldırılır. Biz de kriptalarda, apoptotik hücrelerle birlikte bulunan, çok sayıda heterokromatin kümeleri içeren büyük hücreler izledik. Bu hücrelerin fagosite ettiği apoptotik cisimleri içeren makrofajlar olduğu düşüncesindeyiz. Chang WW¹⁶; bir PAH türevi olan 1,2 dimetilhidrazin verilen sıçanların kolon kriptlerinde buna benzer hücrelerden bahsetmiş ve fagozom olarak nitelendirmiştir.

Normal şartlarda da epitelde apoptosis görülür. Ancak bu hücreler villus tepesinde bulunur. Apoptosisle yok olan hücrelerin yerini almak üzere kriptaların derinlerinde bulunan stem ana hücreler çoğalıp farklılaşarak yukarıya doğru göç eder. ROS'ların ortamda bulunmasının villusun sadece tepesindeki hücrelerde değil, tüm hücrelerde yaygın bir apoptosise yol açtığı gösterilmiştir.¹⁷ Biz de çalışmamızda, apoptosisi yoğun olarak kriptelerin bazalindeki hücrelerde izledik. Peter Latham¹⁸; karsinojen maddelere maruz kalan ratların barsak kriptelerindeki apoptosise seviyesinin arttığını, mitozun ise inhibe olduğunu bildirmiştir. Biz de DMBA verilen farelerin ileumlarında çok miktarda apoptotik hücreye rastladık. Ancak kontrol kesitlerine oranla az

miktarda mitoz figürü gözlemedik. E vitamini+selenyum verilen farelerin ileumlarında apoptotik hücre miktarı DMBA verilen farelerin ileumlarına oranla azdı. Melatonin verilen grupta ise daha az miktarda apoptotik hücre izlendi. Melatoninin apoptotik hücre oluşumunu azaltan, aynı zamanda hücre siklus fazını geciktirerek antitümör etkisi gösteren hormon yapısında bir madde olduğunu göstermiştir.^{7, 8} Melatoninin aynı zamanda antioksidant etkilidir. Bu etkisini glutatyon peroksidaz gibi detoksifikasyon enzimlerini stimüle ederek veya güçlü hidroksil radikallerini yakalayarak gösterir.⁷ Selenyum, hücresel hidrojen peroksidin detoksifikasyonundan sorumlu anahtar enzim olan glutatyon peroksidazın temel bileşenidir. Kanser önleyici etkisini; dokudaki hidrojen peroksidaz ve serbest radikal konsantrasyonunu düşürerek yaptığı rapor edilmiştir. Ayrıca hücre proliferasyonu ve DNA sentezinide inhibe ettiği açıklanmıştır.¹⁹ E vitamini ise hücre membranlarında bulunan yağda eriyen temel bir antioksidanttır. Gastrointestinal kanserlerin gelişiminde etiyolojik bir faktör olarak gösterilen nitrozamin oluşumunu inhibe eder ve immun cevapta önemli bir rol oynar.⁶ Çalışmamızda DMBA'nın neden olduğu apoptotik hücrelerin sayısını azaltmada E vitamini+selenyuma oranla melatoninin daha etkili olduğunu gözlemedik.

DMBA grubunda izlediğimiz histolojik değişikliklerden biri villusların boylarında kısalmaydı. Bu değişiklik VitE+Se ve melatonin grubunda izlenmedi. Villus hücrelerindeki aşırı apoptosisin villusun kısalmasına neden olduğu öne sürülmüştür.¹⁷ Bu yüzden villus atrofisinin sebebi enterosit apoptosisi olarak gösterilmiştir. Nitekim biz de apoptosisin en yoğun olarak izlendiği grup olan DMBA grubunda villuslarda kısalma izledik. E vit+Se ve melatonin grubunda bu değişikliğe rastlanmadı.

DMBA grubunda villuslarda belirgin ödem bulunmaktaydı. E vit+Se grubunda ödem belirgin değildi, melatonin grubunda yoktu. DMBA ve Evit+Se grubunda damarlarda genişleme dikkati çekmekteydi. Epitel altında bağ dokusu içinde oluşan ödem, epitelin bağ dokusundan ayrılmasına yol açar. Biz de DMBA grubunda yoğun ödem nedeni ile epitel ve bağ dokusu arasında şeffaf alanlar izledik. Ayrıca yine aynı sebeple bağ dokusu gevşek bağ dokusu özelliğindedir. Dokuda serbest oksijen radikallerinin artmasının ödeme yol açtığı bildirilmiştir.²⁰ Oksijen radikalleri ile perfüze edilen sıçan ve tavşanlarda kapiller filtrasyonun artması sonucu pulmoner ödem geliştiğini bildirmiştir. ROS'lar aynı zamanda epitelleri arasındaki intersellüler bağlantıların zarar görmesine,

hücre şekil değişikliklerine ve aktin filament organizasyon bozukluklarına yol açtığı gösterilmiştir. Bu yolla intersellüler aralıkları genişletebilir ve hücreleri birbirinden ve bazal membrandan ayırabilirler.²⁰ Bağ dokusu ödemi ve damar genişlemesi birbirleri ile bağlantılı olaylardır. DMBA'nın neden olacağı damar genişlemesi ve ödemi engellemede vit E+Selenyuma oranla melatoninin daha etkili olduğu düşüncesindeyiz.

DMBA grubunda Paneth hücrelerinin granüllerinin azaldığını, sitoplazmada vakuoler yapıların ortaya çıktığını gözlemedik. Vit E- Selenyum veya melatonin verilmiş farelerde ise Paneth hücreleri genellikle pembe-kırmızı renkte granüllerle dolu olarak izlendi. Sitoplazmalarında vakuoler yapılar rastlanmadı. İmmunolojik savunma sisteminde önemli rolleri olan Paneth hücreleri, barsakları etkileyen bir çok hastalığın patogenesisinde rol oynamaktadırlar. Bu hücreler bakteriyel, viral ve diğer patolojik durumlarda granüllerinin içeriğini lümene boşaltarak degranülasyona uğrarlar.^{21, 22} Paneth hücrelerinin ve bazı nöroendokrin hücrelerin tümör nekrosis faktör alfa(TNF) içerdiği tesbit edilmiştir.²³ Anti-tümör etkisi gösterilen sitokinler arasında en güçlü olanı TNF'dir.²⁴ ROS metabolitlerinin ortamda oluşturdukları toksik mediatörler Paneth degranülasyonuna neden olabilir. Paneth hücrelerinde izlediğimiz vakuol ve balonlaşma hücrelerin aktif formda olduğunu göstermektedir. Kript lümenine Paneth granüllerinin içeriğinin aşırı miktarda ekzositozu, sitoplazmada vakuoller oluşturmaktadır. Satoh²²; sekresyon granüllerinin artan miktarlarda üretiminin yoğunluklarında azalma ile sonuçlandığını göstermiştir. Biz de DMBA' grubunda Paneth hücrelerinde az miktarda ve açık renkte granül izledik. Bunun sebebinin hücrede az miktarda granül üretilmesi değil, çok miktarda üretilen granülün lümene boşaltılması olduğu düşüncesindeyiz.

PAS- alcian blue boyama tekniği ile gastrointestinal sistemdeki asit münin maviye, nötral münin kırmızıya ve miks yapıdaki münin ise mor renge boyanır. DMBA grubunda bu boyama tekniği ile goblet hücre salgısının azaldığı ve mavi renkte boyandığı izlendi. Aldehyde fuchsin- alcian blue boyama metodu ile de; sülfatlı müninler koyu mor, zayıf müninler mor, sialomüninler ise mavi renkte boyanırlar.²⁵ DMBA grubunda bu boyama metodu ile boyanan goblet hücre salgısı 5 denekten, 3'ünde mavi renkte olduğu, 2'sinde ise mor ve mavi renkte boyandığı görüldü. Buna göre; PAS- alcian blue yöntemi ile nötral ve miks münin seviyesinde, aldehyde fuchsin- alcian blue yöntemi ile de sülfatlı müninlerde azalma gözlemlendi.

Blandzzi²⁶ sülfidril bileşiklerinin gastrik mukozayı, hemorojik şok ve gastrik mukozal hasara karşı koruduğunu, McGarryt²⁷; 1,2 dimetilhidrazin verilen ratların kolonlarında sülfatlı mürin seviyesinin kontrollere göre düştüğünü bildirmiştir. Gupta²⁸ ise adenomda sülfatlı mürin kaybının belirgin olarak izlendiğini açıklamıştır.

Vit E+ Se ve melatonin grubunda ise PAS- alcian blue metodu ile mor ve kırmızı boyanan mürinlerde artış görüldü. Aldehyde fuchsin- alcian blue metodu ile boyanan mürin, DMBA grubuna benzer olarak genellikle mavi olarak boyandılar. DMBA grubunda mürin sekresyonunda genel bir azalma olurken, Vit E+ Se ve melatonin grubunda nötral ve miks mürinlerde artış, sülfatlı mürinlerde ise azalma gözlemlendi. Son yıllardaki çalışmalar; Mürinin antioksidant aktiviteye sahip olduğu ve reaktif oksijen radikallerinin etkilerinden mukozayı korumak için goblet hücrelerinin mürin salınımını arttırdığını göstermiştir.²⁹ Biz de; Vit E+ Se ve melatonin grubundaki mürinin artmasını mukozanın korunmasına yönelik olduğunu düşünüyoruz. DMBA grubunda ise karsinogenik maddenin hücrelere direkt etkisi sonucu mukus sekresyonunun genel olarak azalması, mukozayı savunmasız duruma getirmiş ve mukozada izlediğimiz ağır hasarların oluşumunu kolaylaştırmış olabilir. Çeşitli patolojik ve deneysel koşullarda gastrointestinal sistemden salgılanan mürinlerin kimyasal yapısı değişmektedir. Barsak epitel hücreleri, hücre farklılaşması ve karsinogenez sırasında farklı tür glikoproteinler salgılamaktadırlar. Bizim çalışmamızda da izlendiği gibi son yıllarda duodenum, jejunum, ileum ve kalın barsağı ilgilendiren premalign ve malign lezyonlarda, mürin histokimyasının değiştiği saptanmıştır. Bu nedenle mürin histokimyasının günümüzde gastrointestinal sistemin premalign ve malign lezyonlarının erken teşhisinde kullanılan kolay ve etkili bir metot olduğu düşünülmektedir.²⁵

Çalışmamızda kriplerde yer alan nöroendokrin hücrelerde DMBA ve VitE+Se grubunda önemli derecede azalma saptadık. Barsaktaki nöroendokrin peptidler gastrointestinal sekresyon, absorpsiyon, motilite, hücre proliferasyonu, lokal immün savunma ve kan akımının düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar. Bu peptidlerin barsak kanserlerinde, özellikle kolon kanserlerinde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir. Nitekim yaşla birlikte peptid düzeyinin azalması, kolorektal kanser gelişimini kolaylaştırmaktadır.³⁰ Çalışmamızda; iki grupta gözlemlediğimiz nöroendokrin hücrelerinin azalması bizce, karsinogen maddenin degranülasyonu

aktive etmesi ve böylece granüllerin büyük ölçüde azalmasında kaynaklanmaktadır. Granüllerinin içeriğini boşaltan bu hücrelerin granülleri belirleyen Grimelius boyama yöntemi ile saptanması mümkün olmadı. Nöroendokrin hücreler kriptalarda yer alsa bile granülleri farkedilemediği için diğer hücrelerden ayırt edilememiş olabilir.

DMBA'nın barsak mukozasında oluşturduğu hasar üzerine Vit E+Se kombinasyonundan daha çok melatoninin koruyucu rolü olduğu sonucuna vardık. .

KAYNAKLAR

1. Granberg L, Brunström B, Brandt I. Cytochrome P45- dependent binding of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) and benzo(a) pyrene in murine heart, lung and liver endothelial cells. Archives of Toxicology 2000; 74(10):593-601.
2. Clemens MR. Free radical in chemical carcinogenesis. Klin Wochenschr 1991; 69: 1123-1134.
3. Izzotti A, Camoirano A, Cartiglia C et al. Patterns of DNA adduct formation in liver mammary epithelial cells of rats treated with 7,12 dimethyl benz(a)anthracene, and selective effects of chemopreventive agents.Cancer Res 1999; 59(17): 4285-90.
4. Cavalieri LE, Rogan EG. The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. Pharmac Ther 1992; 55: 183-199.
5. Sawant SS, Kandarkor SV. Role of Vitamins C and E as chemopreventive agents in the hamster cheek pouch treated with the oral carcinogen-DMBA. Oral Dis 2000; 6:241-7.
6. Knekt P, Aromaa A, Maatele J, et al. Serum vitamin E, Serum Selenium and the risk of gastrointestinal cancer. Int J Cancer 1988; 42: 846-850.
7. Salvia DR, Fiore M, Aglitti T. Inhibitory action of melatonin on H₂O₂ and cyclophosphamide- induced DNA damage. Mutagenesis 1999; 14(1): 107-112.
8. Anisimov VN, Zabezhinski MA, Popovich IG. Inhibitory effect of melatonin on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced carcinogenesis of the uterine cervix and vagina in mice and mutagenesis in vitro. Cancer Lett 2000; 156(2): 199-205.
9. Bancroft JD, Stevens A, Turner DR. Theory of Practice and Histological Techniques. Churchill Livingstone 1990.
10. Boyle SP, Craft JA. The effect of gender, sexual maturation and xenobiotic treatment on the formation of hydroxymethyl metabolites from 7,12 dimethylbenz(a)anthracene in rat liver microsomes. Toxicol Lett 2000;117(1-2): 1-9.
11. Slaga TJ. Inhibition of the induction of cancer by antioxidants. Adv Exp Med Biol 1995; 369:167-74.
12. Slaga TJ. Inhibition of skin tumor initiation, promotion and progression by antioxidants and related compounds. Crit rev Food Sci Nutr 1995; 35(1-2):51-7.
13. Mylonas C, Kauretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. In Vivo 1999; 13(3): 295-309.
14. Labbe MR, Fischer WP, Trick KD. Effect of dietary selenium and tumor status on the retention of Se by tissues and mammary tumors of DMBA-treated rats Biological Trace Elements Research 1989; 20: 179-195.
15. Corran RS, Kumar V, Collins T. Pathologic basis of disease. Chapter 1: Cellular Pathology. Sixth edition. USA: WB Saunders 1999: 18-19.
16. Chang WW. Degenerative behavior of epithelial cells in the colonic crypt of the mouse following administration of colonic carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. Cancer Lett 1981; 13(2): 111-8.
17. Ramachandran A, Madesh M, Balasubramanian K. Apoptosis in the epithelium: It's relevance in normal and pathophysiological condition. Journal of Gastroenterology and Hepatology 2000; 15: 109-120.
18. Latham P, Lund EK, Johnson IT. Dietary n-3 PUFA increases the apoptotic response to 1,2- dimethylhydrazine reduces mitosis and suppresses the induction of carcinogenesis in the rat colon. Carcinogenesis 1999; 20(4): 645-650.
19. Rao AR, Hussain SP, Jannu LN, et al. Modulatory influens of tomosifen, tocopherol, retinly asetat, aminoglutethimidine, ergocryptine and selenium on DMBA-induced initiation of mammary carcinogenesis in rats. Indian Journal of Experimental Biology 1990; 28: 409-416.
20. Lum H, Kenneth AR. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. Am J Physiol Cell Physiol 2001; 280:719-741.
21. Canpolat L, Vardi N. Ranitidin uygulanmasını takiben sıçanların Paneth hücrelerinin histolojik incelenmesi. Turgut Özal Tıp Dergisi 1999; 6(4): 296-300.
22. Satoh Y, Ono K, Moutairou K. Paneth cells of African giant rats. Acta Anatomica 1994; 151: 49-53.
23. Check EA, Check SP, Patchen MI. Ultrastructural localization of tumour necrosis factor-alpha. Histochem J 1994; 26(2): 142-51.
24. Nakamoto T, Inagawa H, Takagi K. A new of antitumor therapy with a high dose of TNF perfusion of unresectable liver tumors Anticancer Res 2000; 20: 4087-96.
25. Eşrefoğlu M, Selimoğlu MA. Wistar Albino farelerde sindirim kanalı musinlerinin histokimyasal özellikleri. T Klin J Gastroenteropatol 2000; 11:25-35.
26. Blandizzi C, Natale G, Gherardi G et al. Acid- indepent gastroprotective effects of lansoprazole in experimental mucosal injury. Dig Dis Sci 1999; 44(10): 2039-50.

Vardı ve ark

27. McGarrity TJ, Via EA, Colony PC. Qualitative and quantitative changes in sialomucins during 1,2-dimethylhydrazine- induced colon carcinogenesis in the rat. J Natl Cancer Inst 1987; 79(6): 1385-82.
28. Gupta SC, Misra V, Singh PA et al. Mucin histochemistry- a simple and effective methods for diagnosing premalignant and early malignant lesion of lower gastrointestinal tract. Indian J Pathol Microbiol 1997; 40(3): 327-33.
29. Baldwin AL, Wilson LM, Valeski JE. Ultrastructural effects of intravascularly injected polyethylene glycol- hemoglobin in intestinal mucosa. AJP- Heart and Circulatory Physiology 1998; 275(2): 615-615.
30. Salyh M, Sandtröm O. How age changes the content of neuroendocrine peptides in the murine gastrointestinal tract. Gerontology 1999; 45: 17-22.

Yazışma Adresi:

Dr. Nigar Vardı
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji- Embriyoloji AD
44069 MALATYA
Tlf: 422 341 0660-1305
Fax: 422 341 0036