

Sıçan dilinin karbonik anhidraz enzim aktivitesi

Dr.Birkan YAKAN*, Dr.Mukaddes EŞREFOĞLU*, Dr.Haydar ÖZTAŞ**

Bu çalışmada, sıçan dilinin kriostat kesitlerinde karbonik anhidraz aktivitesini ortaya çıkarmak amacıyla Hansson'un histokimyasal tekniğinin bir modifikasyonu kullanılmış olup, sıçan dilinde bu enzim damarlar içindeki eritrositlerde ve dili döşeyen epitelin keratin katının yüzeye yakın bölümlerinde belirgin ve yoğun olarak gözlenmiştir. Bulgular literatür verileri ile karşılaştırılarak sıçan dilinde karbonik anhidraz enziminin aktivitesi yorumlanmıştır. [Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi 2(2):135-140,1995]
Anahtar Kelimeler : Karbonik anhidraz, sıçan dili

Carbonic anhydrase enzyme activity of rat tongue

A modification of Hansson's histochemical technique was used for demonstration of carbonic anhydrase enzyme activity on kriostat sections of rat tongues. This enzyme was observed clear and dense on the apical part of the keratin layer of epithelium of tongue and on erythrocytes in the vessels. The findings of this study were compared with previous studies and interpreted in light of our results. [Journal of Turgut Özal Medical Center 2(2):135-140,1995]

Key Words : Carbonic anhydrase, rat tongue

Karbonik anhidraz enziminin hücrede metabolizma, madde sentezi, iyon veya madde transportunda kullanıldığı bilinmektedir. Bu enzimin varlığı memeli organizmasında tükrük bezleri, mide mukozası, pankreas, karaciğer, safra kanalları, böbrekler, ter bezleri, gonadlar, beyin, göz, kulak ve deride gösterilmiştir¹⁻¹⁴. Ayrıca, deride keratinazasyona yol açan hücrelerin plazmalemmasında veya intersellüler ortamda bulunabilecekleri saptanmıştır^{4,8}. Weinstock ve Wilgram keratinizasyonun fare dilinde filiform papillalarında daha belirgin ve yoğun olduğunu ve buna bağlı olarak bu papillaların enzim aktivitelerinin yüksek olabileceğini ileri sürmüşlerdir¹⁵. Ayrıca kas dokusunda da bu enzimin tip III türünün sarkolemmaya bağlı olarak bulunduğu gösterilmiştir¹¹.

Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda farklı histolojik yapı ve fonksiyona sahip olan ve belirgin bir keratinizasyon özelliği gösteren filiform papillaları, dilin çizgili kasların ve bunların arasındaki bağ dokusunun karbonik anhidraz enzim aktivitesini incelemek olarak belirlenmiştir.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada cinsiyet ayrımı yapılmaksızın sekiz adet Wistar albino türü sağlıklı erişkin sıçan kullanıldı. Eterle uyutulan hayvanlarda 0.1 M sodyum fosfat tamponu içinde hazırlanan %4'lük glutraldehit solusyonu ile 10 dakika perfüze edilen dillerin papilla filiformis içeren kısımları çıkarıldı. Alınan örneklerden parafin blok elde edilecek olan kısımlar %10'luk formalinle 24-48 saat tesbit edildi¹⁶. Diğer kısımlar ise iki saat süre ile oda sıcaklığında fosfat tamponlu %4'lük glutraldehit solusyonu içinde bırakıldılar. Parafin bloklardan elde edilen 4-5 mikronluk kesitlere rutin boya Hematoksilin-Eosin (Hem.-Eo.) uygulandı. İki saat süre ile oda sıcaklığında fikse edilen parçalardan -20°C'deki bir kriostatda 8-9 mikron kalınlığında sagittal kesitler elde edildi. Kesitler karbonik anhidraz aktivitesini gösterebilmek için total 10 dakika süre ile Hansson vasatında inkübe edildiler². Hansson vasatı 1.75 mM CoSO₄, 11.7 mM KH₂PO₄, 157 mM NaHCO₃ ve 53 mM H₂SO₄'den ibaret bir solusyondur (Hansson, 1967). Bu şekilde inkübe

* : Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı - Erzurum

** : Atatürk Üniversitesi K.K. Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü - Erzurum

(II Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresinde poster olarak tebliğ edilmiştir.)

Yakan ve ark.

Sıçan dilinin karbonik anhidraz enzim aktivitesi

edildiğinde karbonik anhidraz aktivitesi gösteren yerler % 0.5'lik amonyum sülfid içerisinde kısa bir süre inkübasyon devresini izleyerek siyah inkübasyon ürünleri vererek açığa çıktılar. Kriostat kesitleri amonyum sülfid ile işlemiden sonra sırası ile ksilol, dereceli alkoller ve ve distile sudan geçirildikten sonra gliserin-jelatin karışımı bir jelle kapatılıp¹⁷ boyasız preparatlar elde edildi. Preparasyonların Olympus Vanox fotomikroskobu ile mikrofotograflar çekildi.

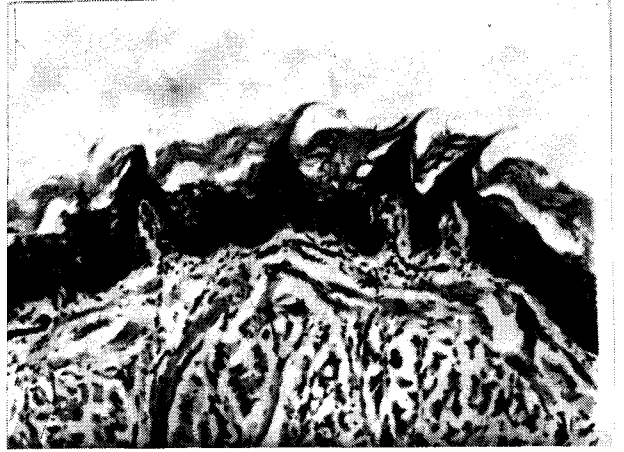
BULGULAR

Memelilerde dilin temel yapısı fonksiyonu gereği çizgili iskelet kaslarından meydana gelir ve çeşitli yönlerde dağılım gösteren kas demetleri aralarında ise damarlar ve sinirleri taşıyan bağ dokusu yer alır. Bu yapılar dıştan ağız boşluğuna doğru çok katlı bir yassı epitel tarafından sınırlanır. Dil yüzeyini kaplayan çok katlı yassı epitel, insanlarda filiform papillalar dışında, keratinizasyon göstermez. Ancak bazı hayvan türlerinde dili döşeyen epitel tümü ile keratin kat içerebilir. Bu çalışmada Hem.-Eo. ile hazırlanan sıçan dili preparatlarında dil ucunun hem dorsal hem de ventral yüzeyinde dili döşeyen çok katlı yassı epitelinde keratinizasyon saptanmış olup incelemeyi amaçladığımız filiform papillalar sıçan dilinde genelde ince bir lamina propria ve epitel uzantılar şeklinde ortaya çıktı. Bu papillaların yüzeyindeki sekonder papillalar ise sadece epitel çıkıntılar şeklinde olup bu papillaların keratin yüzeyinde sivri ve çoğu üçgen şeklinde ince yapılar oluşturduğu görüldü. Filiform papillaların belirgin olarak izlenen bu epitel ve keratinden oluşan sekonder papilla yapıları, dil ucunun daha geniş olduğu diğer papillalarda görülmedi (Resim 1).

Sıçan dilinden Hem.-Eo. boyama yöntemi ile hazırlanmış preparasyonlarda dil bedenini oluşturan çizgili iskelet kası ve bağ dokusu beklenen yapıda gözlemlendi. Böylece kesitlerimizde enine, boyuna, oblik kas demetleri ve aralarında oldukça geniş çaplı damarları, sinirleri taşıyan ve yer yer yağ dokusundan zengin gevşek bağ dokusu izlendi (Resim 2).

Karbonik anhidrazı belirlemek için hazırlanan preparatlarda bu enzim, sıçan dilinde dili döşeyen epitelin keratin katının yüzeye yakın olan bölümlerinde ve damarlar içerisindeki eritrositlerde belirgin ve yoğun olarak görüldü (Resim 3, 4). Ayrıca, enzim reaksiyonu ince siyah çizgiler şeklinde kas lifleri çevresinde ve çok katlı yassı epitelin apikale yakın bölümlerinde hücreler arasında da

belirgin olarak ortaya çıktı (Resim 5, 6). Yüksek büyütmelerde ise filiform papillaların sekonder papillalarında, papilla uzun eksenine paralel, birbiri üzerine konsantrik tertiplenmiş, ince siyah çizgiler şeklinde enzim reaksiyonu saptandı. Bu reaksiyon özellikle filiform papillaların posterior yüzlerinde daha belirgin olarak ortaya çıktı (Resim 7). Papillaların tepesine yakın bölümlerindeki sekonder papillalar arasında ise yoğun, çoğu kere granüler, bazende globuler görünümde bir reaksiyon gözlemlendi (Resim 7).



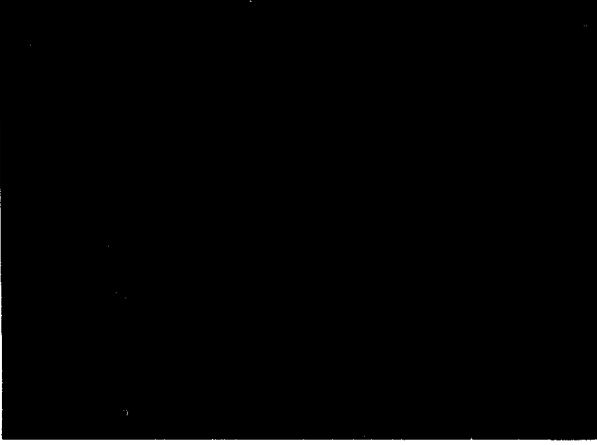
Resim 1. Sıçan dili filiform papillaları, Hematoksilin-Eosin x250.



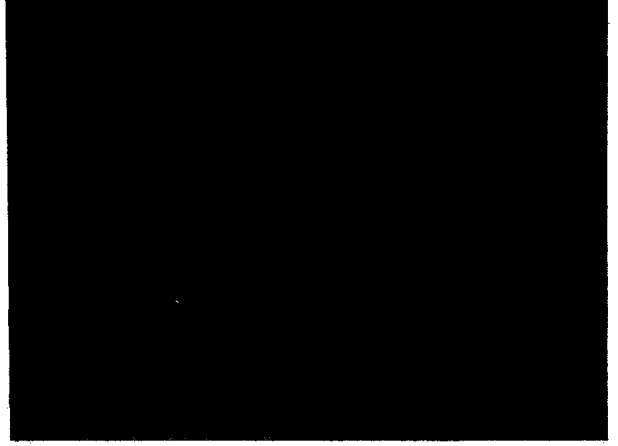
Resim 2. Sıçan dili çizgili kasları ve bağ dokusu, Hematoksilin-Eosin x125.

Yakan ve ark.

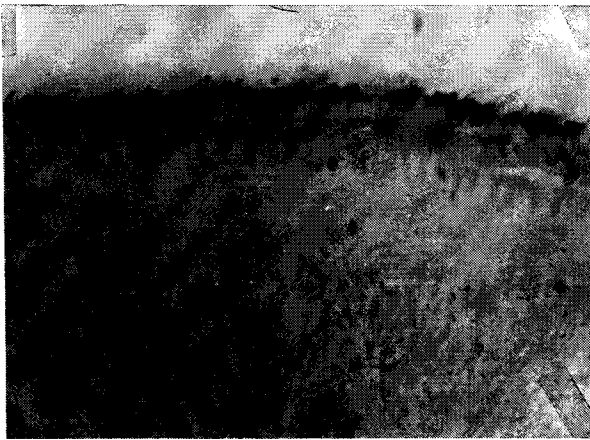
Sıçan dilinin karbonik anhidraz enzim aktivitesi



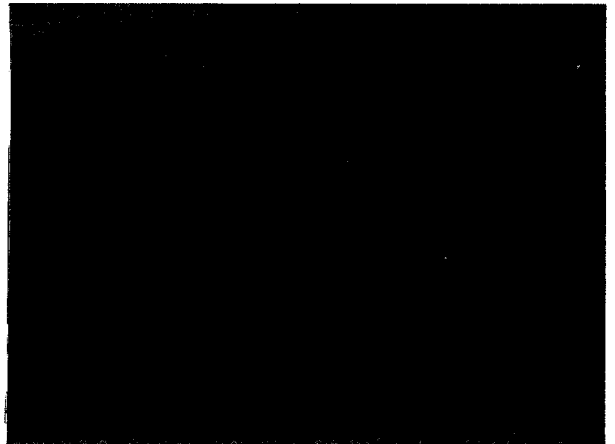
Resim 3. Sıçan dilinde karbonik anhidraz reaksiyonu (damarlar okla işaretli) x 125.



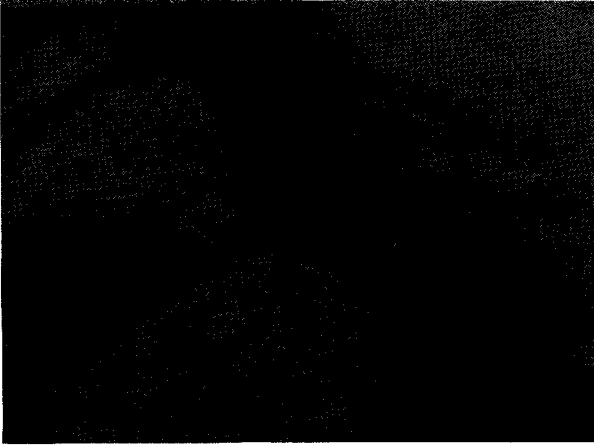
Resim 5. Kas lifleri çevresinde enzim reaksiyonu (okla işaretli) x250.



Resim 4. Filiform papillaların yüzeye yakın bölümlerinde pozitif enzim reaksiyonu, X125.



Resim 6. Epitelin apikale yakın kısımlarında pozitif enzim reaksiyonu, x250.



Resim 7. Sekonder papillaların posterior yüzünde ve interpapiller bölgede pozitif enzim reaksiyonu, x 1000.

TARTIŞMA

Filiform papillalarda yüzeyden uzanan epitel ve keratin katından oluşan ince papillalara genelde sekonder veya tali papilla denir. Bu yapılar insanda filiform papillalarda seyrek olarak görünmesine karşın sıçanda bol ve belirgin olarak gözlenebilir. Ayrıca bu sekonder papillalar nedeni ile filiform papillalarda keratinizasyon katı da oldukça kalın olarak izlenir. Böylece çoğunlukla sekonder papilla ihtiva eden bölgeler, keratin yüzeyinden dışarıya doğru konik çıkıntılar meydana getirirler¹⁸⁻²⁵. Biz de preparasyonlarımızda filiform papillaları yapı ve keratinizasyon yönünden benzer şekilde izledik.

Karbonik anhidraz enzimi iyon transportu veya madde geçişi ve sentezi ile ilgili olduğu kadar hücre metabolizması için de gereklidir. Günümüzde memelilerde bu enzimin çözünebilir özelliğe sahip üç ve membrana bağlı bir olmak üzere, toplam dört izoenzim tipi tesbit edilmiştir¹². Son zamanlarda karbonik anhidraz, eritrositler, tükrük bezleri, mide mukozası, pankreas, karaciğer, safra kanalları, böbrekler, ter bezleri, gonadlar, beyin, göz, kulak ve deride bazı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir¹⁻¹⁴.

Karbonik anhidraz enzimi derinin çok katlı yassı epitelinde keratinizasyona giden hücre katlarında ve hücre kültürlerinde, intersellüler ortamda^{5,9} veya hücre membranına bağlı olarak⁴ gösterilmiştir. Weinstock ve Wilgram keratinizasyonun fare dilinde filiform papillalarda daha belirgin ve yoğun olduğunu, bu papillaların enzimatik aktivitelerinin de daha yüksek olabileceğini öne sürmüşlerdir¹⁵. Nitekim biz de sıçan dilinde keratinizasyonun sekonder papillalar aracılığıyla yüzeyden konik çıkıntılar yapan filiform papillalar hizasında daha bol olduğunu gördük. Sekonder papillaların epiteli ve keratin katında izlediğimiz papillaların uzun eksene paralel konsantrik olarak tertiplenmiş ince çizgiler şeklindeki pozitif reaksiyon, kanımızca keratin lamelleri veya keratinizasyona giden hücrelerin membranlarına bağlı veya intersellüler ortamında olabilir. Nitekim Galar ve Marroquin⁹ ile Carter ve arkadaşları⁴ deride keratinizasyona giden hücrelerde, plazmalemmaya bağlı intersellüler ortamda karbonik anhidraz aktivitesi göstermişlerdir. Ayrıca preparasyonlarımızda filiform papillalar hizasında, özellikle sekonder papillalar arasındaki keratin katında, belirgin ve yoğun bir enzim reaksiyonu vardı. Kanımızca bu reaksiyon filiform papillalarının sekonder papillalar arasında ve keratin kat yüzeyinde biriken materyalden geliyor olabilir. Nitekim koyunda, insanda ve sıçanda tükrükte veya seröz bezlerin salgı granülleri içinde karbonik anhidraz aktivitesi çeşitli araştırmacılarca gösterilmiştir^{7,8,10}.

Sıçan dilinde stroma içinde yer alan damarlardaki eritrositler preparasyonlarımızda kuvvetle karbonik anhidraz reaksiyonu gösterdi. Bugün karbonik anhidrazın eritrositlerde bulunduğu bilinmekte²⁶ ve bu enzimin karbondioksit CO₂ transportunda i gördüğü kabul edilmektedir¹². Preparasyonlarımızda karbonik anhidraz enzim aktivitesini pozitif gösteren diğer bir yapı da iskelet kası lifleriydi. İskelet kasında bu enzimin varlığı çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir^{3,11}. Karbonik anhidrazın Tip III izoenziminin gelişmekte olan iskelet kasında var olduğu ve karbonhidrat metabolizmasında i gördüğü savunulur³. Biz preparasyonlarımızda enzim reaksiyonunu kas liflerinin periferik bölümleri veya çevresinde izledik. Gözlemlerimize göre iskelet kasında izlediğimiz bu reaksiyon sarkolemmada veya sarkolemmanın intersellüler ortama dönük yüzüne bağlı olabilir. Nitekim Wistrand¹² hücre membranına bağlı karbonik anhidraz Tip IV izoenzimini göstermiş ve Lönnerholm¹¹ ise sarkolemmada karbonik anhidraz reaksiyonunu saptamıştır.

KAYNAKLAR

1. Asari M, Sasaki K, Igarashi K, Amasaki T, et al. Distribution of carbonic anhydrase izoenzyme III (CA-III) positive cells in duct segments of the bovine submandibular gland. *Acta Histochem* 1993;94(1):67-72.
2. Brown D, Garcia-Segura LM, Orci L. Carbonic anhydrase is associated with taste buds in rat tongue. *Brain Research* 1984;324:346-8.
3. Cabral AR, Hewet-Emmet D, Welty RJ, Castor CW. Effects of human carbonic anhydrase III (CA-III) on synovial and muscle fibroblast glycosaminoglycan metabolism. *Proc Soc Exp Biol Med* 1987;184(1):24-30.
4. Carter ND, Fryer A, Grant AG, Hume R, et al. Membran specific carbonic anhydrase (CA IV) expression in human tissues. *Biochem Biophys Acta* 1990;1026(1):113-6.
5. Carter MJ. Carbonic anhydrase; izoenzymes, properties, distribution and functional significance. *Biol. Rev* 1972;47:465-507.
6. Dobyant DE, Magill LS, Friedman PA, Hebert SC, et al. Carbonic anhydrase histochemistry in rabbit and mouse kidneys. *The Anat Rec* 1982;204:185-97.
7. Feldstein JB. Purification and characterization of carbonic anhydrase from saliva and red cells of rat. Ph.D. Thesis. University of Florida. Gainesville. Florida 1983.
8. Fernley RT, Wright RD, Coghlan JP. A novel carbonic anhydrase from ovine paratroid gland. *FEBS Lett* 1979;105:299-302.
9. Galar I, Marroquin MC. Cyclic AMP effects on chloride transport and carbonic anhydrase activity in frog skin. *Can J Physiol Pharmacol* 1990;68(9):1269-74.
10. Hennigar RA, Schulte BA, Spicer SS. Immunolocalization of carbonic anhydrase isoenzymes in rat and mouse salivary and extraorbital lacrimal glands. *Anat Rec* 1983;207:605-14.
11. Lönnerholm G. Carbonic anhydrase in rat liver and rabbit skeletal muscle; further evidence for the specificity of the histochemical cobalt-phosphate method of Hansson. *J Histochem Cytochem* 1980;28(5):427-33.
12. Lönnerholm G, Winstrand PJ, Barany E. Carbonic anhydrase isoenzymes in the rat kidney. Effects of chronic acetazolamide treatment. *Acta Physiol Scand* 1986;126:51-60.
13. Noda Y, Dosumi H, Morishama T. Immunohisto-chemical study of carbonic anhydrase in mixed tumours and adenomas of sweat and sebaceous glands. *J Cutan Pathol* 1987;14(5):285-90.
14. Noda Y, Takai Y, Iwai Y, Meenaghan MA, et al. Immunohistochemical study of carbonic anhydrase in mixed tumours from major salivary glands and skin. *Virchows. Arch Pathol Anat Histopathol* 1986;408(5):449-59.
15. Weinstock M, Wilgram GF. Fine structural observation on the formation and enzymatic activity of keratinosomes in mouse tongue filiform papilla. *J Ultrastructure Research* 1970;30:262-74.
16. Bancroft JD, Cook HC. *Manuel of histological techniques*. First ed. Edinburg, London, Melbourne and New York; Churchill Livingstone 1984:18-22.
17. Pearse AGE. *Histochemistry theoretical and applied*. 3th. ed. Baltimore; Williams and Wilkins Comp 1968:578-79.
18. Iwasaki S. Surface structure and keratinization of mucosal epithelium of the domestic cat tongue. *J Mamm Soc Japan* 1990;15(1):1-13.
19. Iwasaki S, and Miyata K. Studies on the lingual dorsal epithelium of the guine pig by scanning electron microscopy. *Okijimas. Folia Anat Jpn* 1985;61(6):423-36.
20. Iwasaki S, Miyata K. Fine structure of the filiform papilla of beagle dogs. *J Morphol* 1989;201:235-42.
21. Iwasaki S, Miyata K. Fine structure of the dorsal epithelium of the mongoose tongue. *J Anat* 1990;172:201-12.
22. Iwasaki S, Miyata K, Kobayashi K. Comparative studies of dorsal surface of the tongue in three mammalian species by scanning electron microscopy. *Acta Anat* 1987;128:140-6.
23. Iwasaki S, Miyata K, Kobayashi K. Scanning electron microscopy of the dorsal lingual surface of the squirrel monkey. *Acta Anat* 1988;132:225-9.
24. Kelly DE, Wood RI, Anders AC, Bailey's. *Textbook of microscopic anatomy*. 18th ed. Baltimore, London; Williams and Wilkins, 1984;509-12.
25. Yakan B, Ersan Y. Erişkin fare ve kedide dil filiform papillalarının histolojik kıyaslı incelenmesi. *Atatürk Üniversitesi Tıp Bülteni* 1992;24(3):589-96.
26. Smith EL, Hill RL, Lehman IR, Lefkowitz RJ, et al. *Principles of Biochemistry*. Mammalian

Yakan ve ark.

Sıçan dilinin karbonik anhidraz enzim aktivitesi

Biochemistry. 7th. ed. Philadelphia, McGraw Hill
Company 1986:123.

Yazışma Adresi : Yrd.Doç.Dr.Birkan YAKAN
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji ABD
25240 ERZURUM
Tlf : 0-442-2331122/2405