

Rat (*Rattus rattus*) Özofagusundaki Glikokonjugatların Lektin Histokimyası İle Belirlenmesi

Emel DEMİRBAĞ^{1*}

Hatice GÜN¹

Kenan ÇINAR¹

Geliş Tarihi: 26.12.2012
Kabul Tarihi: 10.04.2013

Özet: Bu çalışmada rat (*Rattus rattus*) özofagusunda bulunan glikokonjugatların *Canavalia ensiformis* (Con A), *Datura stramonium* (DSA), *Helix pomatia* (HPA) ve *Maackia amurensis* (MAA) lektinleri ile belirlenmesi amaçlandı. 5 adet erişkin erkek Wistar albino türü ratın özofagusları materyal olarak kullanıldı. Alınan kesitlere *Canavalia ensiformis* (Con A), *Helix pomatia* (HPA), *Maackia amurensis* (MAA) ve *Datura stramonium* (DSA) lektinleri uygulandı. Özofagusta epitel yüzeyi, epiteldeki yassı, poligonal, prizmatik hücreler ile endotel hücreleri değerlendirildi. Özofagus epitelinin yüzeyindeki glikokonjugatların güçlü ve çok güçlü Con A, çok güçlü HPA ve zayıf DSA reaksiyonları gösterdiği belirlendi. Özofagusun belirtilen bölgelerinde MAA spesifitesi gösteren glikokonjugata rastlanmadı. Sonuç olarak; rat özofagusundaki glikokonjugatların siyalik asit içermediği, glikokonjugatların dağılımları ve yoğunluklarının bölgeler arasında farklılık gösterdiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Rat, özofagus, mukus, glikokonjugat, lektin histokimyası.

The Determination of Glycoconjugates in Esophagus of Rat (*Rattus rattus*) by Lectin Histochemistry

Abstract: In this study, it was aimed to determine the glycoconjugates in esophagus of rat (*Rattus rattus*) by *Canavalia ensiformis* (Con A), *Datura stramonium* (DSA), *Helix pomatia* (HPA) and *Maackia amurensis*. The esophaguses of 5 adult Wistar albino rats were used as material. *Canavalia ensiformis* (Con A), *Helix pomatia* (HPA), *Maackia amurensis* (MAA) and *Datura stramonium* (DSA) lectins were applied to sections. It was detected that the glycoconjugates in the epithelial surface of esophagus showed the strong and very strong Con A, very strong HPA and weak DSA reactions. There was no glycoconjugate showed MAA specificity in the mentioned regions. It was detected that the glycoconjugates in the rat esophagus did not contain sialic acid, and the distribution and density of glycoconjugates were differ between regions.

Key Words: Rat, esophagus, mucus, glycoconjugate, lectin histochemistry.

Giriş

Özofagus mide ile yutak arasında omurganın önünde uzanan kısmen sindirilmiş besinlerin laringofarinksten mideye geçmesini sağlayan bir yol olarak görev yapar^{4,6,8,17}.

Organizmanın birçok boşluklu organının yüzeyinde yer alan mukus, yapısında münis glikoproteinleri bulunduran viskoz bir salgıdır¹.

Mukus gastrointestinal kanalda, respiratorik ve ürogenital sistemde yüzeyi kayganlaştırıcı, gerilmeyi en aza indirici ve zararlı maddelere karşı difüzyon bariyeri oluşturmada görevlidir^{6,18}. Mukusun ana yapısını oluşturan münisler bir proteinin bütün özelliklerini ve belirli şartlarda şekerlerin özelliklerini taşıyan kısımlardan oluşan glikoprotein yapısındaki bileşiklerdir^{7,10,11}.

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 32100 Çünür/ISPARTA
edemirbag@gmail.com

Hücrelerde şekerlerin belirlenmesi için enzimler, radyoaktif işaretlemeler, antikorlar ve lektinler kullanılır⁷. Lektinler, hücre yüzeyindeki veya organellerdeki şeker kalıntılarına bağlanıp, agglütine ederek belirlenmesine yardımcı olan bitkisel veya hayvansal kaynaklı protein ya da glikoprotein yapıdaki maddelerdir^{9,11}. Miktar ve fenotipik belirlemeler için lektinler, kompleks yapıdaki oligosakkaritleri özel seçicilikle tanıyıp bağlanması özelliğinden faydalanılır¹³. Bu sayede lektinler, çeşitli kan araştırmalarında, kanserli hücre yüzeyi incelemelerinde ve birçok hücre biyolojisi ile ilgili çalışmalarda yaygın bir yöntem olarak kullanılmaktadır¹⁵.

Bu çalışmada ise rat özofagusundaki glikokonjugatların DSA, Con A, HPA ve MAA lektinleri kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada, Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel Hayvan Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarından (SDÜ-HADYEK: 1201531934323139/125) temin edilen 5 adet erişkin erkek Wistar albino türü ratın özofaguslarının torakal kısmından alınan örnekler materyal olarak kullanıldı. Alınan dokular tespit için Bouin fiksatifinde yaklaşık 16-18 saat süresince tespit edildi ve parafinde bloklandı. Hazırlanan bloklardan 5-6 µm kalınlığında kesitler alınarak lektin histokimya yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde göre kesitler, 10 dakika %0.3'lük hidrojen peroksitte (H₂O₂) bekletildi, daha sonra distile su ile çalkalandı. 0.1M ve pH 7.2'lik PBS (phosphate buffer saline) içeren %1'lik Bovine Serum Albumin (BSA) ile yıkanan kesitler Tablo 1'de dilüsyon oranları belirtilen PBS'de çözülmüş Horseradish Peroksidaz-bağlı (HRP) lektinlerle 30 dakika inkübe edilip PBS ile yıkandı. Ayrıca kesitler lektin içermeyen PBS ile inkübe edilerek negatif kontrol uygulandı. HRP lektinlerle bağlantı içeren bölgelerin tespit edilmesi için kesitler DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)'da kontrollü olarak inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Kesitler PBS ile yıkandıktan sonra alkol ve ksilollerden geçirildi ve entellan ile kapama işlemi yapıldı. Hazırlanan preparatlar Olympus CX 41 tipi ışık mikroskopunda incelendi ve ilgili kısımlardan fotoğraf çekimleri yapıldı.

Tablo 1. Uygulanan lektinlerin izole edildikleri türler ve karbonhidrat spesifite-leri

Table 1. Isolated species and carbohydrate specificities of applied lectins

Lektin Adı	Tür Adı	Karbonhidrat spesifitesi	Dilüsyon oranları
ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	α-D-Man; α-D-Glc	50 µg/L
HPA	<i>Helix pomatia</i>	D-GalNAc,	10 µg /L
MAA	<i>Maackia amurensis</i>	Neu 5Ac2, 3 Gal/ GalNAc	50 µg /L
DSA	<i>Datura stramonium</i>	GlcNAc	10 µg /L

Bulgular

Uygulanan lektin histokimya yöntemi sonucunda rat özofagusundaki glikokonjugatların dağılımı ve reaksiyon dereceleri Tablo 2'de belirtilmiştir.

Tablo 2. Özofagus mukozasındaki glikokonjugatların lektinlere karşı verdiği reaksiyonlar

Table 2. The reactions against to lectins of glycoconjugates in esophageal mucosa

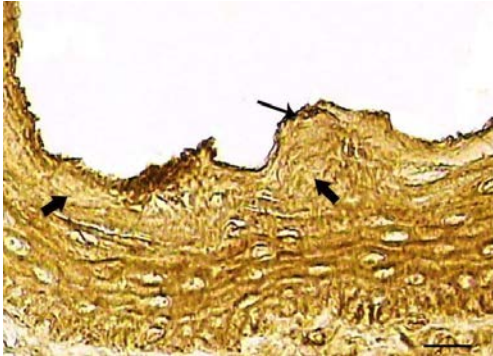
Uygulanan Lektinler Bölgeler	ConA	HPA	MAA	DSA
Epitel yüzeyi	3/4	4	0	1
Yassı hücreler	2/3	3/4	0	0
Poligonal hücreler	3/4	2/3	0	0
Prizmatik hücreler	3/4	4	0	0
Endotel hücreleri	4	1	0	0

Reaksiyon dereceleri, 0: negatif, 1: zayıf, 2: orta, 3: güçlü, 4: çok güçlü.

Özofagus epitelinin yüzeyindeki glikokonjugatların güçlü ve çok güçlü Con A (Resim 1), çok güçlü HPA ve zayıf DSA reaksiyonları gösterdiği belirlendi. Lamina epitelyalinin yassı hücrelerinde orta miktarda ve yoğun Con A pozitif (Resim 1), yoğun ve çok yoğun HPA pozitif glikokonjugat saptandı. Poligonal ve prizmatik hücrelerdeki Con A reaktivitesinin güçlü ve çok güçlü olduğu tespit edildi. Poligonal hücrelerdeki glikokonjugatların orta ve güçlü (Resim 2), prizmatik hücrelerdeki glikokonjugatların ise çok güçlü (Resim 2) HPA reaksiyonu gösterdikleri belirlendi. Bununla birlikte yassı, prizmatik ve poligonal hücrelerde DSA pozitif glikokonjugata rastlanmadı.

Özofagus submukozasında yer alan kan damarlarının endotel hücrelerinde çok güçlü Con A (Resim 3) ve zayıf HPA reaktivitesi belirlenmesine karşın, bu hücrelerdeki glikokonjugatların DSA reaksiyonu göstermedikleri tespit edildi.

Ayrıca özofagusun belirtilen bölgelerinde MAA spesifitesi gösteren glikokonjugata rastlanmadı.



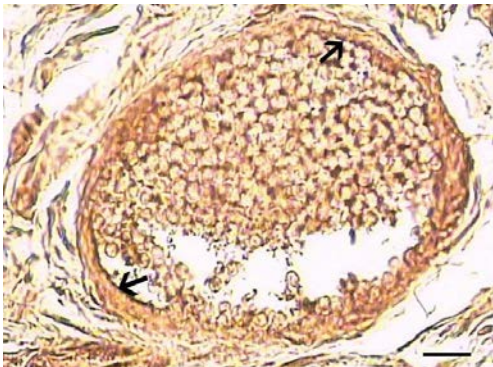
Resim 1. Epitel yüzeyinde (ince ok) çok güçlü, yassı hücrelerde (kalın oklar) orta yoğunlukta reaksiyon. Con A. Bar: 30 μ m.

Figure 1. Very strong reaction in epithelial surface (thin arrow), moderate reaction in squamous cells (thick arrows). Con A. Bar: 30 μ m.



Resim 2. Poligonal hücrede (ince ok) güçlü, prizmatik hücrelerde (kalın oklar) çok güçlü reaksiyon. HPA. Bar: 30 μ m.

Figure 2. Strong reaction in polygonal cell (thin arrow), very strong reaction in columnar cells (thick arrows). Con A. Bar: 30 μ m.



Resim 3. Endotel hücrelerinde (oklar) çok güçlü reaksiyon. Con A. Bar: 30 μ m.

Figure 3. Very strong reaction in endothelial cells (arrows). Con A. Bar: 30 μ m.

Tartışma ve Sonuç

Farklı hayvan türlerinin özofagus glikokonjugatlarının belirlenmesine yönelik çalışmalar^{2,3,5,12,14,16,19} bulunmaktadır.

Bu çalışmada elde edilen bulgularla benzer şekilde Poorkhalkali ve ark.¹² insan, tavşan, domuz, kedi, gelincik ve köpek özofagusunda MAA lektinine karşı reaksiyona rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen bulgulardan farklı olarak tavşan, domuz ve kedi özofaguslarında Con A pozitif glikokonjugata rastlanmadığı belirtilmiştir¹². Aynı araştırmacılar¹² Con A uygulamasında insan, gelincik ve köpek özofagusu yassı hücrelerinde zayıf reaksiyon belirlediklerini bildirirken, bu çalışmada yassı hücrelerde orta ve çok güçlü reaksiyon saptandı. Ayrıca bu çalışmada poligonal ve prizmatik hücrelerde güçlü ve çok güçlü Con A reaktivitesi saptanmasına karşın, köpek özofagusu poligonal ve prizmatik hücrelerindeki reaksiyonun zayıf olduğu bildirilmiştir¹².

Diaz ve ark.³ *Cynoscion guatucupa* özofagus epitelinin yüzeyinde orta yoğunlukta Con A reaksiyonu tespit ettiklerini bildirmelerine karşın, bu çalışmada güçlü ve çok güçlü reaksiyon saptandı.

Bu çalışmada elde edilen bulgulara paralel olarak tavuk özofagusu epitel hücrelerinin yüzeyinde D-GalNAc terminal uçlu glikokonjugat bulunduğu bildirilmiştir⁵. İnsan özofagusunda yassı hücrelerin orta yoğunlukta GlcNAc terminal uçlu glikokonjugat içerdikleri, buna karşın GalNAc terminal uçlu glikokonjugat içermedikleri belirtilmiştir¹⁶. Çınar ve Demirbağ² karga özofagusundaki yassı hücrelerde yoğun miktarda GalNAc, çok az miktarda GlcNAc terminal uçlu glikokonjugat bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise yassı hücrelerin yoğun ve çok yoğun GalNAc terminal uçlu glikokonjugat içerdikleri ancak GlcNAc terminal uçlu glikokonjugata sahip olmadıkları tespit edildi.

Karga özofagusunda poligonal hücrelerin çok az miktarda GalNAc terminal uçlu glikokonjugat içerdiği ancak GlcNAc uçlu glikokonjugat içermediği belirtilmiştir². Bu çalışmada da poligonal hücrelerde GlcNAc uçlu glikokonjugata rastlanmazken, yoğun miktarda GalNAc uçlu glikokonjugat saptandı. İnsan özofagusunda¹⁶ bazal epitelde az miktarda GalNAc ve GlcNAc içeren glikokonjugat bulunduğu bildirilmesine karşın; karga özofagusunda prizmatik hücrelerin bu glikokonjugatları içermediği belirtilmiştir. Bu çalışmada ise prizmatik hücrelerde

yoğun GalNAc uçlu glikokonjugat saptanırken, GlcNAc içeren glikokonjugata rastlanmadı. Ayrıca insan özofagusunda¹⁶ bildirilen bulgulara benzer olarak özofagusta siyalik asitli glikokonjugata rastlanmadı.

Rat özofagusunda β - Galaktosil içeren glikokonjugatlar sadece yassı epitel yüzeyinde bulunurken N- asetil-galaktozamin içeren glikokonjugat ise yassı epitelin hem orta hemde bazal tabakasında bulunduğu belirtilmiştir¹⁹.

Sonuç olarak; rat özofagusundaki glikokonjugatların siyalik asit içermediği, glikokonjugatların dağılımları ve yoğunluklarında bölgeler arasında farklılık olduğu belirlendi. Ayrıca özofagus glikokonjugat içeriğinin hayvan grupları ve türler arasında da değişim gösterdiği sonucuna varıldı.

Kaynaklar

- Berne, R.M., Levy, M.N., 2008. Fizyoloji, 5. Baskı, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara.
- Çınar, K., Demirbağ, E., 2012. Karga (*Corvus corone*) özofagus, proventrikulus ve gizzard mukozalarındaki glikokonjugatların lektin histokimyası ile belirlenmesi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 28, 53-59.
- Diaz, A.O., Garcia, A.M., Goldemberg, A.L., 2008. Glycoconjugates in the mucosa of the digestive tract of *Cynoscion guatucupa*: A histochemical study. *Acta Histochem.*, 110, 76-85.
- Eşrefoğlu, M., 2004. Genel ve Özel Histoloji, 1. Baskı, Pelikan Tıp ve Teknik Kitapçılık Ltd. Şti., Malatya.
- Gheri, G., Gheri, B.S., Sgambati, E., Gulisana, M., 1993. Characterization of the glycoconjugate sugar residues in developing chick esophageal epithelium. *Histol. Histopathol.*, 8, 351-8.
- Guyton, A.C., Hall, J.H., 2006. Text Book of Medical Physiology, 11th Ed., Elsevier, Pennsylvania.
- Karaçalı, S., 2002. Glikobiyoloji güncel moleküler biyoloji. *Türk J. Vet. Anim. Sci.*, 27, 489-495.
- Ovalle, W.K., Nahirney, P.C., 2009. Temel histoloji (Netter), 4. Baskı, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara.
- Öztabak, K.Ö., 2005. Lektinler ve *Viscum album* Agglutinin (VAA)'nın antikarsinojen etkileri. *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 2, 55-59.
- Perez-Vilar, J., Hill, R.L., 2004. Mucin family of glycoproteins. In: Lennarz, W.J., Lane, M.D. (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry*. 2nd Ed., Elsevier Acad. Press, USA.
- Ponchel, G., Irache, J.M., 1998. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 34, 191-219.
- Poorkhalkali, N., Jacobson, I., Helander, H.F., 1999. Lectin histochemistry of the esophagus in several mammalian species. *Anat. Embryol.*, 200, 541-549.
- Rhodes, J.M., Milton, J.D., 1998. *Lectin Methods and Protocols*. 2nd Ed., Humana Pres, New Jersey.
- Scocco, P., Acilci, D., Menghi, G., Ceccarelli, P., 1998. Unusual glycoconjugates in the oesophagus of tilapine polyhybrid. *J. Fish. Biol.*, 53, 39-48.
- Sharon, N., Lis, H., 1982. *The Proteins*. Vol. 5. Neurath, H., Hill, R.L. (Eds.), 3rd Ed., Academic Pres, New York.
- Shimamoto, C., Weinstein, W.M., Boland, C.R., 1987. Glycoconjugate expression in normal, metaplastic and neoplastic human upper gastrointestinal mucosa. *J. Clin. Invest.*, 80, 1670-1678.
- Soydan, N., 1986. *Histoloji Organlar ve Sistemler*, İstanbul Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Yayınları, 64, İstanbul.
- Thornton, D.J., Sheehan, J.K., 2004. From mucins to mucus toward a more coherent understanding of this essential barrier. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 1, 54-61.
- Watanabe, M., Muramatsu, T., Shirane, H., Ugai, K., 1981. Discrete distribution of binding sites for *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) and for peanut agglutinin (PNA) in mouse organ tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 29, 779-790.