

Sığır Jejunum Mukozasındaki Bazı Glikokonjugatların Lektin Histokimyasal Karakterizasyonu

Seçil ZORLU Hatice GÜN Emel DEMİRBAĞ Kenan ÇINAR

Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Isparta, Türkiye

Geliş tarihi: 03.02.2013

Kabul Tarihi: 13.03.2013

ÖZET

Bu çalışmada sığır jejunum mukozasındaki bazı glikokonjugatların lektin histokimyasal karakterizasyonunun Con A (*Canavalia ensiformis*), PNA(*Arachishypogaea*), UEA-I (*Ulexeuropaeus*) ve SBA (*Glycinemax*) lektinleri ile belirlenmesi amaçlandı. Lektin histokimyasal uygulamalar sonucunda villus epitel hücrelerinin yüzeyinde tüm lektinlerle pozitif reaksiyon gözlemlendi. Kadeh hücrelerinde Con A hariç tüm lektinlerle pozitif reaksiyon elde edildi. Villus epitel ve bez epitel hücrelerinde Con A lektini ile pozitif reaksiyon saptandı. Reaksiyon apikal sitoplazmada gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler

Sığır, Lektin histokimyası, Jejunum, Musin, Con A, PNA, UEA-I, SBA

Lectin Histochemical Characterization of some Glycoconjugates in Bovine Jejunum Mucosa

SUMMARY

In this study it was aimed to determination as histochemically of some glycoconjugates in mucosa of bovine's jejunum by Con A (*Canavalia ensiformis*), PNA (*Arachishypogaea*), UEA-1 (*Ulexeuropaeus*), SBA (*Glycinemax*) lectins. As a result of lectin histochemically methods, positive reaction was observed with all lectin in surface of villous epithelium cells. The positive reaction was obtained with the lectins with the lectins except for Con A in the goblet cells. It was detected positive reaction in villous epithelium and glands epithelial cells with Con A lectins. The reaction was observed in apical cytoplasm.

Key Words

Bovine, Lectin histochemistry, Jejunum, Mucin, Con A, PNA, UEA-I, SBA

GİRİŞ

Jejunum, ince bağırsağın duodenumdan sonra gelen ikinci kısmıdır (Tanyolaç 1993, Yörük 2008). Tüm ince bağırsak epitelinde olduğu gibi jejunum da epitel hücreleri arasında ve lamina propriada bulunan bezlerde kadeh hücreleri bulunur. Kadeh hücrelerinden salgılanan alkali özelliikteki mukus salgısı jejunum mukozasını asit mide sıvısının etkilerine karşı korur (Strous ve Dekker 1992; Eşrefoğlu 2004). Mukus su, elektrolitler, glikoproteinlerden oluşan güçlü bir salgıdır. Musinler mukosubtans, proteoglikan ve glikoprotein olarak adlandırılan ve salgılandıkları bölgede fiziksel hasar ve bakteriyel invazyon gibi dış etkenlere karşı koruyan bir bariyer olarak etki eder (Kemper ve Specian 1991, Strous ve Dekker 1992, Bliklager ve Roberts 1997). Çeşitli canlılarda gastrointestinal sistemin değişik kısımlarından salgılanan musinlerin histokimyasal olarak farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir (Filippe ve Fenger 1979; Atuma ve ark. 2002). Lektin histokimyası musin glikoproteinlerin arasındaki farklılıkları belirlemeye yarayan araçlardan biridir (Brooks ve Carter 2001). Lektinler, hücreleri birbirine çapraz bağlayan ve çöktüren glikoprotein veya protein yapısında olan moleküllerdir. Lektinler hücrelerde ve dokularda floresan boyalar veya enzimlerle örneğin peroksidazlarla konjuge edilebilirler (Schaumburg ve ark. 1984). Bu çalışmada sığır jejunum da bulunan musin glikoproteinlerinin lektin histokimyasal yapılarının Con A (*Canavalia ensiformis*), PNA (*Arachis hypogaea*), UEA-I

(*Ulex europaeus*) ve SBA (*Glycine max*) lektinleri ile belirlenmesi amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada Isparta Gülköy Entegre Et Tesisleri'nden 10 adet ergin sağlıklı sığırdan elde edilen jejunum örnekleri materyal olarak kullanıldı. %10'luk formaldehit çözeltisinde 24 saat tespit edilen dokular akarsuda yıkandıktan sonra rutin histolojik doku takibi aşamalarından geçirildi ve parafinde bloklandı. Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında alınan kesitlere lektin histokimya yöntemi uygulandı. Bu yöntemle göre kesitler 10 dakika %0.3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edildi ve daha sonra distile su ile çalkalandı. Ardından kesitler 0.1 M ve pH 7.2'lik PBS içeren %1'lik Bovine Serum Albumine (BSA) ile yıkandı ve PBS içinde çözülmüş Tablo1' de belirtilen Horseradish Peroksidaz-bağlayan (HRP) lektinlerle 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kesitler PBS ile yıkandı. HRP lektinlerle bağlantı içeren bölgelerin tespit edilmesi için kesitler DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)'da 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra alkol ve ksilollerden geçirildi ve entellan ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Olympus CX 41 tipi ışık mikroskobu ile incelendi ve ilgili kısımlardan fotoğraf çekimi yapıldı.

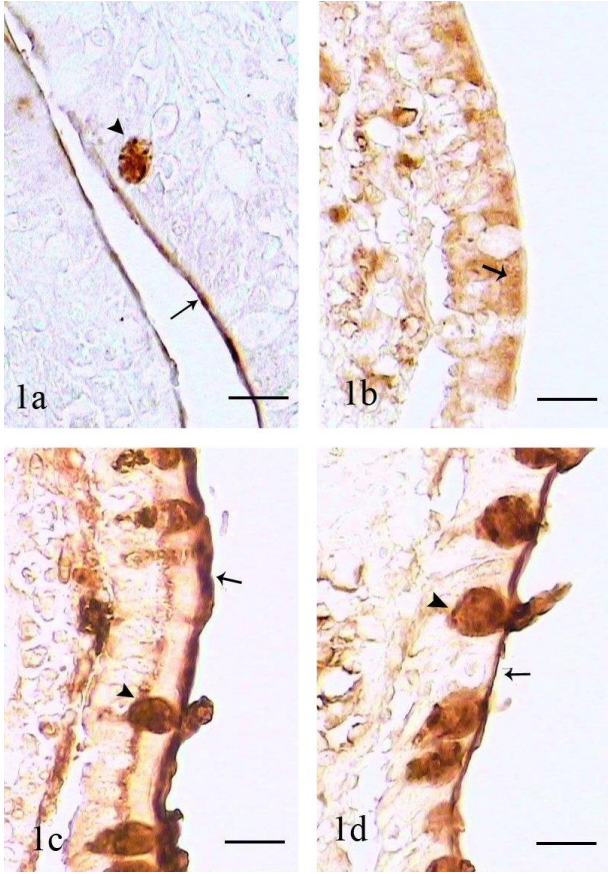
Tablo 1. Kullanılan lektinlerin izole edildiği türler, bağlanma yerleri ve dilüsyon oranları**Table 1.** Isolated species, binding sites and dilution rates of used lectins

Lektin	Tür Adı	Bağlanma Yeri	Dilüsyon oranları
Con A	<i>Canavalia ensiformis</i>	α -D-Man, α -D-Glc	50 μ g/ml
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	β -D-Gal1, β -D- GalNAc	25 μ g/ml
UEA-1	<i>Ulex europaeus</i>	α -Fuc	25 μ g/ml
SBA	<i>Glycine max</i>	α ve β -D-N-Ac-Gal	20 μ g/ml

BULGULAR

PNA

PNA uygulamasında villus epitel hücrelerinin yüzeylerinde güçlü reaksiyon görülürken (Şekil 1a), bez epitel hücrelerinin yüzeylerinde orta veya güçlü (Şekil 2a) PNA reaksiyonu belirlendi.



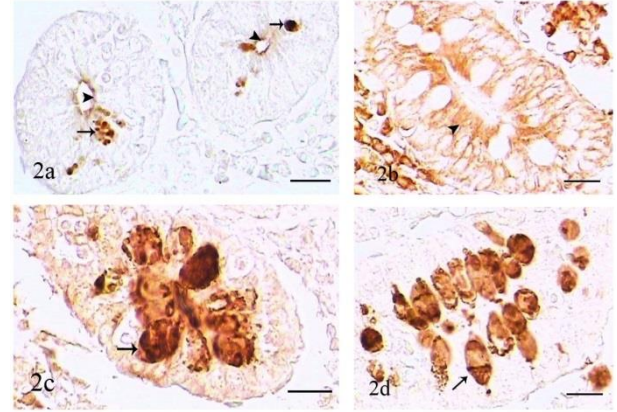
Şekil 1. Jejunum. a) Kadeh hücresinde çok güçlü (ok başı), villus epitel hücresi yüzeyinde (ok) güçlü reaksiyon. PNA. b) Villus epitel hücresi (ok) apikal sitoplazmasında orta dereceli reaksiyon. Con A. c) Kadeh hücresi (ok başı) ve villus epitel hücresi yüzeyinde (ok) çok güçlü reaksiyon. SBA. d) Villus epitel hücresi yüzeyi (ok) ve kadeh hücresinde (ok başı) güçlü reaksiyon. UEA-I. Bar: 80 μ m

Figure 1. Jejunum. a) Very strong reaction in goblet cell (arrow head), strong reaction in surface of villus epithelium (arrow). PNA. b) Apical cytoplasm of villus epithelium (arrow). Con A. c) Very strong reaction in goblet cell (arrow head) and surface of villus epithelium (arrow). SBA. d) Strong reaction in goblet cell (arrow head) and surface of villus epithelium (arrow). UEA-I. Bar: 80 μ m

Villus epiteli (Şekil 1a). Bez epitelindeki (Şekil 2a) çok az sayıda kadeh hücrelerinden çok azında granüler tarzda güçlü PNA reaksiyonuna rastlandı.

Con A

Con A uygulamasında villus epitel hücrelerinin yüzeyinde farklı yoğunluklarda reaksiyon gözlenirken (Şekil 1b), bez epitel hücrelerinin yüzeylerinde orta dereceli Con A reaksiyonu saptandı (Şekil 2b). Villus epitel hücrelerinde orta dereceli Con A reaksiyonu görülürken, bez epitel hücrelerinde zayıf reaksiyon tespit edildi. Reaksiyonun apikal sitoplazmada yerleşim gösterdiği belirlendi. Kadeh hücrelerinde ise Con A'ya karşı reaksiyona rastlanmadı.



Şekil 2. Jejunum. a) Bez epitel hücrelerinin yüzeyinde (ok başı) ve bazı kadeh hücrelerinde (ok) güçlü reaksiyon. PNA. b) Bez epitel hücrelerinin apikal sitoplazmasında orta dereceli reaksiyon (ok başı). Con A. c) Kadeh hücresinde çok güçlü reaksiyon (ok). SBA. d) Kadeh hücresinde güçlü reaksiyon (ok). UEA-I. Bar: 80 μ m

Figure 2. Jejunum. a) strong reaction in surface of gland epithelium (arrow head) and some goblet cells (arrow). PNA. b) Moderate action in apical cytoplasm of gland epithelium. (arrow head). Con A. c) Very strong reaction in goblet cell (arrow). SBA. d) Strong reaction in goblet cell (arrow). UEA-I. Bar: 80 μ m

SBA

Villus epitel hücrelerinin yüzeylerinde (Şekil 1c) çok güçlü reaksiyon görüldü. Villus epitelinde bulunan kadeh hücrelerinin güçlü veya çok güçlü reaksiyon gösterdiği belirlendi (Şekil 1c). Bez epitel hücrelerinin yüzeyi güçlü veya çok güçlü SBA reaksiyonu gösterirken, bez epitelinde bulunan kadeh hücrelerinin bazılarının çok güçlü (Şekil 2c) ve bazılarını ise orta yoğunlukta reaksiyon verdiği saptandı.

UEA-I

Villus epitel hücrelerinin yüzeylerinde çok güçlü UEA-I reaksiyonuna rastlandı (Şekil 1d). Villus epitelinde bulunan kadeh hücrelerinde güçlü (Şekil 1d) ve çok güçlü UEA-I reaksiyonu gözlemlendi. Bez epitel hücrelerinin bazılarının yüzeyinde UEA-I'e karşı reaksiyon gözlenmezken, bazı bez epitel hücrelerinin yüzeylerinde güçlü reaksiyon saptandı. Bezlerde bulunan kadeh hücrelerinin farklı yoğunluklarda UEA-I reaksiyonu gösterdiği belirlendi (Şekil 2d).

Lektin histokimyasal uygulamalar sonucunda kullanılan lektinlerin jejunum bölgesindeki reaksiyon dereceleri Tablo 2.'de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan lektinlerin jejunum bölgesindeki reaksiyon dereceleri**Table 2.** Used lectins of reaction degrees in jejunum region

	PNA	ConA	SBA	UEA-I
Villus epitel hücrelerinin yüzeyi	3	0-3	4	3
Villus epitel hücreleri	0	2 ^a	0	0
Villus epitelindeki kadeh hücreleri	0.4	0	2-4	3-4
Bez epitel hücrelerinin yüzeyi	2-3	2	3-4	0-3
Bez epitel hücreleri	0	0-1 ^a	0	0
Bez epitelinde bulunan kadeh hücreleri	0.3	0	2.4	2-4

0:negatif, 1:zayıf, 2:orta, 3:güçlü, 4: çok güçlü, ^a: apikal sitoplazma.

TARTIŞMA ve SONUÇ

PNA uygulamasında kurbağa (Ferri ve ark. 2001, Sancar-Baş ve ark. 2009) villus epitel hücreleri yüzeyinde reaksiyona rastlanmadığı bildirilirken, tavukta (Boonsoongnern ve ark. 2007) güçlü ve çok güçlü, insanda (Stoward ve ark. 1980) orta ve güçlü, domuzda (Choi ve ark. 2003) orta dereceli reaksiyon gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu çalışmada ise villus epitel hücrelerinin yüzeyinde güçlü PNA reaksiyonu gözlemlendi.

Bu çalışmada kurbağada (Sancar-Baş ve ark. 2009) elde edilen bulgulara benzer biçimde villus epitel hücrelerinde PNA reaksiyona rastlanmadı. Domuzda (Choi ve ark. 2003) orta, insanda (Vecchi ve ark. 1989) ise reaksiyon kuvveti belirtilmeksizin pozitif reaksiyona rastlandığı bildirilmiştir.

Kadeh hücrelerinde kurbağa (Ferri ve ark. 2001, Sancar-Baş ve ark. 2009) ve domuzda (Choi ve ark. 2003) PNA reaksiyonuna rastlanmadığı bildirilirken, nal burunlu yarasada (Scillitani ve ark. 2007) zayıf, insanda (Vecchi ve ark. 1989) reaksiyon kuvveti belirtilmeksizin pozitif, tavukta (Boonsoongnern ve ark. 2007) ise güçlü ve çok güçlü olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ise bazı kadeh hücrelerinde çok güçlü PNA reaksiyonu gözlemlenirken, bazılarında ise reaksiyona rastlanmadı.

Bu çalışmada Con A uygulamasında villus epitel hücreleri yüzeyinde farklı yoğunluklarda reaksiyon saptandı. Tavukta Boonsoongnern ve ark. (2007) bu hücrelerin yüzeyinde güçlü ve orta dereceli reaksiyon görüldüğünü bildirmişlerdir. Kurbağada (Sancar-Baş ve ark. 2009) ise bu hücrelerin yüzeylerinde Con A reaksiyonuna rastlanmadığı bildirilmiştir.

Kurbağada villus epitel hücrelerinde (Sancar-Baş ve ark. 2009) Con A reaksiyonuna rastlanmazken, domuzda (Choi ve ark. 2003) zayıf reaksiyon gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu çalışmada ise bu hücrelerin apikal sitoplazmalarında orta dereceli Con A reaksiyonu saptandı.

Domuzda (Choi ve ark. 2003) kadeh hücrelerinde orta, tavukta (Boonsoongnern ve ark. 2007) zayıf, orta ve güçlü Con A reaksiyonu görüldüğü bildirilmiştir. Bu çalışmada ise kurbağa (Ferri ve ark. 2001, Sancar-Baş ve ark. 2009) ve insanda (Fischer ve ark. 1984) elde edilen bulgulara paralel olarak Con A pozitivitesine rastlanmadı.

Bu çalışmada SBA uygulamasında villus epitel hücrelerinde reaksiyona rastlanmadı. Domuzda (Choi ve ark. 2003) ise bu hücrelerde orta dereceli SBA reaksiyonu görüldüğü bildirilmiştir.

Kurbağa (Ferri ve ark. 2001) ve nal burunlu yarasada (Scillitani ve ark. 2007) goblet hücrelerinde SBA reaksiyonuna rastlanmazken, domuzda (Choi ve ark. 2003) zayıf reaksiyon görüldüğü bildirildi. Bu çalışmada ise

kadeh hücrelerinde orta, güçlü ve çok güçlü SBA pozitivitesi gözlemlendi.

UEA-I uygulamasında kurbağada (Sancar-Baş ve ark. 2009) ve tavukta (Boonsoongnern ve ark. 2007) kadeh hücrelerinde reaksiyona rastlanmadığı, domuzda (Choi ve ark. 2003) ve insanda (Fischer ve ark. 1984, Vecchi ve ark. 1989) zayıf reaksiyon gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu çalışmada ise jejunum kadeh hücrelerinde orta, güçlü ve çok güçlü UEA-I reaksiyonu gözlemlendi.

Sonuç olarak yapılan çalışmada sağlıklı jejunumda epitel hücrelerinde ve hücrelerin yüzeylerinde daha çok α -D-Man, α -D-Glc uçlu glikokonjugatların varlığı gözlemlenirken, kadeh hücrelerinde ve hücrelerin yüzeylerinde β -D-Gal1, β -D-GalNAc, α -Fuc, α ve β -D-N-Ac-Gal uçlu glikokonjugatların varlığı saptandı.

Yapılan çalışmada sağlıklı sığır jejunumundaki müsinin karakteri lektin histokimyasal yöntemlerle belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen verilerin intestinal sistemin histokimyasal araştırmaları, histopatoloji çalışmaları, kanser biyolojisinin araştırılması gibi konularında katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Atuma C, Strugala V, Allen A, Holm L (2002). The adherent gastrointestinal mucous gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280, G922-G929.
- Blikslager AT, Roberts MC (1997). Mechanisms of intestinal mucosal repair. *J Am Vet Med Assoc*, 211, 1437-1441.
- Boonsoongnern P, Saengprapaitip K, Srisai, D, Suprasert D-A (2007). Glycoconjugates characterization in jejunal goblet cell of the chicken by means of lectin histochemistry. *Kasetsart Veterinarians*, 17, 2.
- Brooks SA, Carter TM (2001). N-acetylgalactosamine, N-acetylglucosamine and sialic acid expression in primary breast cancer. *Acta Histochem*, 103, 37-51.
- Choi, BY, Sohn, YS, Choi C, Chae C (2003). Lectin histochemistry for glycoconjugates in the small intestines of piglets naturally infected with *Isoparasus*. *J Med Sci*, 65, 3, 389-392.
- Eşrefoğlu M (2004). Genel ve Özel Histoloji. Pelikan Tıp ve Teknik Kitapçılık, İstanbul.
- Ferri D, Liquori GE, Natale L, Santarelli G, Scillitani G (2001). Mucin histochemistry of the digestive tract of the red-legged frog *Rana aurora*. *Acta Histochemica*, 103, 225-237.
- Filippe MI, Fenger C (1979). Histochemical characteristics of mucins in the small intestine. A comparative study of normal mucosa, benign epithelial tumors and carcinoma. *Histochem J*, 11, 277-287.
- Fischer J, Klein JP, Vierbuchen M, Skutta B, Uhlenbruck G, Fischer R (1984). Characterization of glycoconjugates of human gastrointestinal mucosa by lectins. *Histochem and Cytochem*, 32, 7, 681-689.
- Kemper AC, Specian RD (1991). Rat small intestinal mucins: a quantitative analysis. *Anat Rec*, 11, 277-287.
- Sancar-Baş S, Kaptan E, Sengezer-İnceli M, Sezen A, Us H (2009). Glycoconjugate histochemistry in the fundic stomach and small intestine of the frog (*Rana ridibunda*). *IUFS J Biol*, 68, 2, 93-104.
- Schaumburg-Lever G, Alroy J, Ucci A, Lever WF (1984). Distribution of carbohydrate residues in normal skin. *Arch Dermatol Res*, 276, 216-223.
- Scillitani G, Zizza S, Liquori GE, Ferri, D (2007). Lectin histochemistry of gastrointestinal glycoconjugates in the greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum* (Schreber, 1774). *Acta Histochem*, 109, 347-357.
- Stoward PJ, Spicer SS, Miller RL (1980). Histochemical Reactivity of Peanut Lectin Peroxidase Conjugate. *J Histochem Cytochem*, 28, 9, 979-990.
- Strous GJ, Dekker J (1992). Mucin-type glycoproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 27, 57-92.
- Tanyolaç A (1993). Özel Histoloji. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, Ankara.
- Vecchi T, Franchis D, Tronconi A, Agape D (1989). Evidence of altered structural and secretory glycoconjugates in the jejunal mucosa of patients with gluten sensitive enteropathy and subtotal villous atrophy. *Gut*, 30, 804-810.
- Yörük M (2008). Sindirim Sistemi II: Sindirim Kanalı. Veteriner Özel Histoloji, Özer A (Ed), 161-183, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.