

Albino fare (*Mus Musculus Subsp.*)'de trakea, bronş ve bronşiol mukozalarının histokimyasal yapısı

Kenan Çınar, Cansever Yavaş

Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Özet

Bu çalışmada erişkin albino farelerde (*Mus musculus subsp.*) trakea, bronş ve bronşiol (terminal bronşiol ve respiratuar bronşiol) mukozalarının histokimyasal yapısının belirlenmesi amaçlanmıştır. Öldürücü dozda anestezi madde (Aerrane) uygulaması ile öldürülen 10 adet erişkin albino fareye (*Mus musculus subsp.*) ait trakea, bronş ve bronşiol mukozalarının histokimyasal yapısının incelenmesi amacıyla alınan doku örnekleri rutin histolojik işlemlerden geçirildi ve parafinde bloklandı. Bloklardan alınan kesitlere mukus bileşimini belirlemeye yönelik boyama yöntemleri uygulandı. Trakea ve bronş epitelleri ile bez ve goblet hücrelerinde çok az yoğunlukta güçlü sülfatlı glikoproteinlerin bulunduğu saptandı. Öte yandan mukoza bölümlerinde karboksil gruplu (siyalik veya uranik asit) ve/veya sülfat esterli glikoproteinlerin çok yoğun biçimde buldukları belirlendi. Bronşta bulunan sülfatlı glikoproteinler ve okside olabilen visinal diol ve/veya glikojenli glikoproteinlerin ise trakeaya göre daha az yoğunlukta olduğu gözlemlendi. Terminal bronşiol ve respiratuar bronşiol epitellerinde çok az yoğunlukta güçlü sülfatlı ve sülfat esterli glikoprotein içeriğine rastlandı.

Anahtar kelimeler: *Mus musculus subsp.*, Trakea, Bronş, Bronşiol, Mukus Histokimyası.

Abstract

Histochemical structure of trachea, bronchus and bronchulus mucosa in albino mouse (*Mus musculus subsp.*)

The aim of this study was to determine histochemical structure of mucosas of trachea, bronchus and bronchulus (bronchulus verus and bronchulus respiratorius) in adult Albino mouse (*Mus musculus subsp.*). After ten adult Albino mice (*Mus musculus subsp.*) were killed by lethal dose of an anesthetic substance (Aerrane), tissue samples which were taken out to investigate of histochemical structure of trachea, bronchus and bronchulus mucosas were applied routine histological processes and embedded in paraffin. The staining methods were applied to paraffin sections for determination of mucous content. It was detected that strong sulphated glycoproteins were in a low density in the epithelium, glands and goblet cells of trachea and bronchus. The glycoproteins with carboxyl groups (sialic acid or uronic acid) and/ or with sulphate ester were high density in the mucosa sections. It was observed that sulphated glycoproteins and oxidizable vicinal diols and/ or glycogen in the bronchus were less dense than in the trachea's. It was identified that the content of strong sulphated glycoproteins and glycoproteins with sulphate ester were low density in the epithelium of bronchulus verus and respiratorius.

Keywords: *Mus musculus subsp.*, Trachea, Bronchus, Bronchulus, Mucous Histochemistry.

Giriş

Solunum yolu mukusu fiziksel ve kimyasal özellikleri açısından viskoz bir solüsyondur ve farklı hücreler tarafından salgılanır (1). Bu iş için özelleşmiş hücreler goblet hücreleridir ve bu hücreler esas olarak trakea da, az sayıda bronşlardaki epitel hücreleri arasında yerleşim gösterirler (2). Klara hücreleri küçük solunum yollarında çok yoğun olarak bulunan hücre tipi olup, solunum yolu epitelinde goblet hücrelerine

farklılaşma yeteneği gösterirler (3). Ayrıca seröz hücreler de salgılarıyla mukus bileşimine katkıda bulunurlar (4).

Salgılanan mukusun %95'i su, % 2'si musinler (glikoproteinler), %1'i salgı ve serum proteinleri, % 1'i lipidler ve % 1'i organik tuzlardan oluşur (5–6). Solunum yolları mukusunun fonksiyonları; dış etkenlere karşı koruyucu tabaka oluşturmak, solunum yollarında yenilenmeyi sağlamak, vizkoelastikiyeti sayesinde inspire edilmiş hava ile akciğer içine alınmış olan materyalin temizlenmesini sağlamak ve tutularak taşınmasında “biyolojik taşıyıcı kemer” gibi rol

Yazışma Adresi: Kenan Çınar
Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji
Bölümü Tel.:0-246-2112934
Fax: 0-246-2371106
e-mail: kcinar@fef.sdu.edu.tr

oyunaktır (1).

Musinler, protein bir omurgaya O-glikozid bağlarının yüzlerce oligosakkarid zincirlerle bağlanmasıyla oluşan yüksek moleküler glikokonjugat kümeleridir (7). Musinler, mukus örtünün heterojen molekülleri olup, solunum sekresyonunun esas bileşenleridir (7–8). Respiratorik kanal mukus glikoproteinleri yüksek karbohidrat içeriğe sahip moleküllerdir (5). Musinler, sülfat ya da siyalik asitler gibi asidik gruplarının içeriğine bağlı olarak nötral ve asidik gruplar olarak sınıflandırılır (8). Asidik musinler, mukozal olarak bağ dokusu ve epitelden köken alırlar. Bunlar güçlü sülfatlı bağ doku musinleri, güçlü sülfatlı epitelyal musinler, zayıf sülfatlı epitelyal musinler (sulfomusin), sialomusinler ve sülfatlı sialomusinlerdir. Bağımsız heksos grupları ile ilişkili çeşitli heksosaminleri içeren nötral musinler, asidik olmayan reaktif grupları bulundurlar. Bunlar epitelyaldır ve solunum kanalı goblet hücrelerinden salgılanırlar (9).

Bu çalışmada erişkin albino farelerde (*Mus musculus subsp.*) trakea, bronş ve bronşiol (terminal bronşiol ve respiratuar bronşiol) mukozalarının histokimyasal yapısının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada fareler temin edildikten sonra yaklaşık 20–21°C ve %40–60 nisbi nem ortamında 2 gün tutulduktan sonra, öldürücü dozda anestezi madde (Aerrane) uygulaması ile öldürülen, ortalama ağırlıkları 25–35 gr. olan, 10 adet erişkin (yaklaşık 65–70 günlük) albino fareye (*Mus musculus subsp.*) ait trakea, bronş ve bronşiollerin (terminal bronşiol ve respiratuar bronşiol) incelenmesi amacıyla akciğerlerden alınan doku örnekleri materyal olarak kullanıldı. Örnekler %10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat süreyle tespit edildi. Rutin histolojik doku takibinden geçirilen örnekler, parafinde bloklandı. Her hayvanın belirtilen bölgelerinden alınan dokularından, her bölge için 10' ar preparat hazırlandı. 5–6 µm kalınlığında alınmış olan kesitlere tablo 1'de belirtilen boyama teknikleri uygulandı.

Tablo 1. Uygulanan teknik ve mukosubstanslar

Uygulanan teknik	Belirlenen mukosubstans
AB pH 0.5	Güçlü sülfatlı glikoproteinler (10)
AB pH 1.0	O-sülfat esterli glikoproteinler (10)
AB pH 2.5	Karboksil gruplu (Siyalik veya uranik asit) ve/veya sülfat esterli glikoproteinler (10)
AF	Sülfatlı glikoproteinler (11)
PAS	Okside olabilen visinal diol ve/veya glikojenli glikoproteinler (12)
PAS/AB	Nötral ve/veya güçlü asidik glikoproteinler (13)
AF/AB	Güçlü sülfatlı glikoproteinler (14)

Bulgular

Histolojik incelemeler sonucunda, trakeal bezlerin, trakeal kıkırdak halkalar arasında, bronş bezlerinin ise çok az sayıda submukozal bölgede yerleşim gösterdikleri belirlendi. Bronşiollerde ise bezlere rastlanmadı. Yapılan histokimyasal incelemeler sonucunda mukosubstansların bölgesel olarak dağılımı ve yoğunlukları tablo 2'de belirtilmiştir. Bu bulgulara göre, AB (pH 0.5) uygulamasında trakea ve bronş epitelleri ile bez ve goblet hücrelerinde zayıf bir reaksiyon gözlenirken, bronşiollerin belirtilen bölgelerinde reaksiyon gözlenmedi. AB (pH 2.5) uygulamasında trakea ve bronşların epitel, bez ve goblet hücrelerinde güçlü (Şekil 1.a,b), terminal bronşiol ve respiratuar bronşiol epitelinde ise hafif reaksiyon saptandı (Şekil 1.c,d). AF ve PAS uygulamalarına karşı trakea epitel, bez ve goblet hücrelerinde hafif, bronş epitel, bez ve goblet hücrelerinde ise zayıf reaksiyon gözlendi. Terminal bronşiol ve respiratuar bronşiol epitelinde ise hem AF hem de PAS uygulamalarına karşı hiç reaksiyon gözlenmedi. Yapılan AF/AB (pH 2.5) ve PAS/AB (pH 2.5) uygulamalarında ise AB (pH 2.5)'ye karşı reaksiyon gösteren mukosubstansların baskın olduğu, ancak tablo 2'de belirtildiği gibi bölgesel olarak yoğunluk farklılığı gösterdiği belirlendi (Şekil 2.a,b,c,d; 3.a,b,c,d).

Tablo 2. Uygulanan tekniklerde mukosubstansların trakea, bronş ve bronşiollerdeki dağılımı ve yoğunlukları

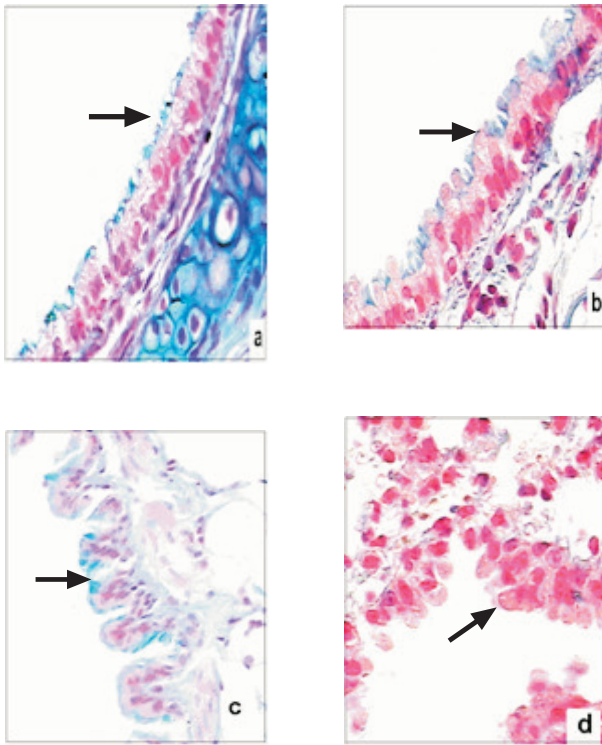
Bölge	Trakea		Bronş		T. bron.		R. bron.	
Teknik	Epit.	Bez	G.H	Epit.	Bez	G.	Epit.	Epit.
AB pH 0.5	+	+	+	+	+	+	-	-
AB pH 1.0	-	-	-	-	-	-	-	-
AB pH 2.5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
AF	++	++	++	+	+	+	-	-
PAS	++	++	++	+	+	+	-	-
PAS/AB pH 2.5	AB*	AB*	AB*	AB*	AB*	AB*	AB*	AB*
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
AF/AB pH 2.5	AB*	AB*	AB*	AB*	AB*	AB*	AB*	AB*
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++

T.bron:Terminal bronşiol, R.bron.:Respiratuar bronşiol, Epit.:Epitel, G.H:Goblet Hücresi, (+):Zayıf reaksiyon, (++)Hafif reaksiyon, (+++):Güçlü reaksiyon, (-):Reaksiyon yok, (*):Baskın

Tartışma ve Sonuç

Farklı hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda trakeal bezlerin mukozal yerleşimlerinde farklılıklar görülmektedir. Sığır trakeasının ventral kısmındaki bezlerin yüzey epitelinin altında üç sıra halinde bulunduğu belirtilirken (15), tavşan trakeasında ise

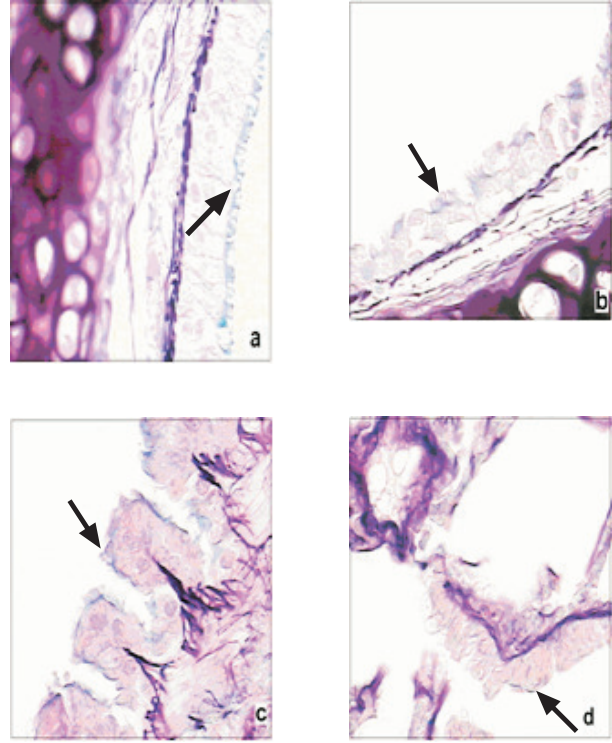
hiç bez bulunmadığı bildirilmektedir (16). Ayrıca, domuz trakeasında bezlerin ventral kısımda ve kıkırdak halkalar arasındaki bölgede yoğunlaştığı (15), kedi trakeasında submukozal bezlerin çok fazla miktarda bulunduğu, geyik trakeasında ise submukozal bezlerin olmadığı belirtilmiştir (17). Bu çalışmada ise domuz, rat, köpek ve kedi trakealarında olduğu gibi trakeal bezlerin kıkırdak halkalar arasında ve çevresinde yerleşim gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada bronş bezlerinin az sayıda bulunması ve submukozal bölgede yerleşim göstermesi literatürle (18) desteklenmektedir.



Şekil 1.a: Trakea; b. Bronş; c. Terminal bronşiol; d. Respiratuar bronşiol epitellerinde mukusun görünümü (oklar). AB (pH 2.5), X700

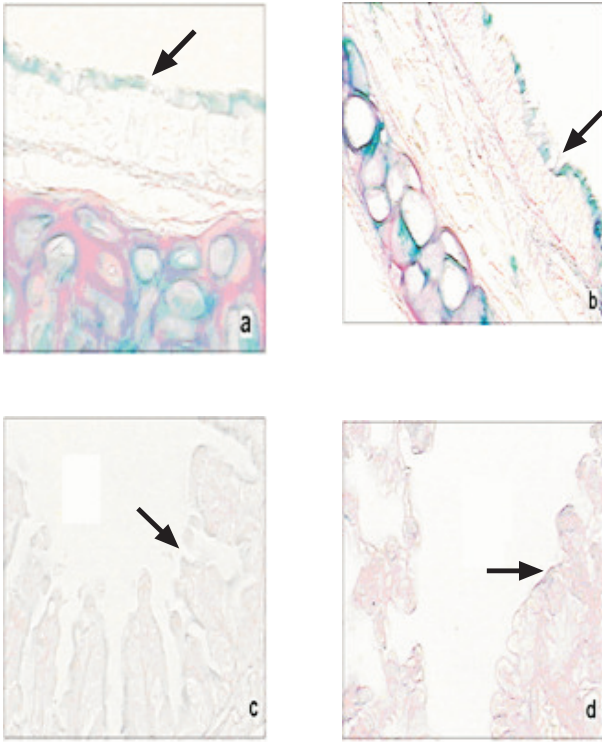
Erkek farelerin solunum yollarında, goblet hücrelerinin solunum yolu boyunca düzensiz olarak dağıldığı (19), kedi trakeasında goblet hücrelerinin bol miktarda bulunduğu ve geyik trakeasında ise bu hücelere rastlanmadığı bildirilmiştir (17). Bu çalışmada ise goblet hücrelerinin trakea epitelinde bol miktarda yerleşim gösterdiği belirlendi. Solunum sistemi dış ortamla sürekli ilişkide olan, çok geniş epitelyal yüzeye sahip bir sistemdir. Solunum yollarının korunması, toksik maddelerden temizlenmesi ve yenilenmenin sağlanması solunum yolları tarafından üretilen özel sekresyonlarla sağlanmaktadır (1). Solunum yollarında bir hasar

oluşması sonucunda solunum yolu epitelinden mukus salınımı çok hızlı bir şekilde artmakta (hipersekrezyon) ve mukusun bileşimi değişmektedir (1). Aynı zamanda mukus yapısı hayvan türleri arasında ve solunum sisteminin farklı bölgelerinde de farklılık göstermektedir (15, 20).



Şekil 2.a: Trakea; b. Bronş; c. Terminal bronşiol; d. Respiratuar bronşiol baskın AB (pH 2.5) özellik (oklar). AF/AB (pH 2.5), X700

Keçi (21), kedi ve geyik (17) trakealarındaki, mukusun önemli bir rezervini oluşturan goblet hücrelerinde sülfat esterli (asidik mukosubstans), deve ise hem asidik hem de nötral türdeki mukosubstansların bulunduğu bildirilmektedir (22). Ayrıca tavşanlarda (23) goblet hücrelerinde bol miktarda sülfat esterli, az miktarda sialik asit içeren ve çok az miktarda da nötral mukosubstans bulunduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada trakeada güçlü asidik ve az miktarda nötral mukosubstansları içeren goblet hücreleri tespit edilmiştir. Plopper ve ark. (24) tavşanların bronş goblet hücrelerinde ise ağırlıklı olarak sülfatlı mukosubstans bulunduğunu bildirmelerine karşın bu çalışmada bronş goblet hücrelerinde karboksil gruplu ve/veya sülfat esterli mukosubstansların baskın olarak bulunduğu saptandı.



Şekil 3.a: Trakea; b. Bronş; c. Terminal bronşiol; d. Respiratuar bronşiol epitellerinde baskın AB (pH 2.5) özellik (oklar). AF/AB (pH 2.5), X700

Dimitrov ve ark. (22)'nin farelere deneysel olarak Ambroxol uygulamasından 30 dakika sonra trakea ve bronş epitel ve bezlerinde AB pH 1.0 uygulanmasına karşı reaksiyon bulunmadığını bildirmektedirler. Bu çalışmada da herhangi bir uygulama yapılmamasına karşın benzer bulgular elde edilmiştir. Ayrıca araştırmacıların (22) bulguları ile uyumlu olarak terminal bronşiol ve respiratuar bronşiol epitellerinde AB pH 1.0 uygulanmasına karşı reaksiyon gözlenmedi.

Araştırmacıların (22) fare trakea ve bronşiol bezlerinde AB pH 2.5 uygulanmasında güçlü, epitellerinde ise zayıf reaksiyon bulunduğunu bildirmelerine karşın bu çalışmada trakea ve bronşiolin belirtilen bölgelerinde AB pH 2.5'e karşı güçlü reaksiyon gözlenmiştir. Yine araştırmacıların (22) bulguları ile uyumlu olarak terminal bronşiol ve respiratuar bronşiolde zayıf asidik mukosubstans ve siyolomusinlere karşı reaksiyon gözlendi. Sherman ve ark. (25)'nin kedilerde yaptıkları çalışmada trakea yüzey epitelinden salgılanan musinin sialik asit içerdiğini, submukozal bezlerden salgılanan musinlerin ise daha çok sulfomusinlerden oluştuğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da Sherman ve ark. (25)'nin bulguları ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Jacob ve Poddar (26) yaban gelinciği trakeasında

submukozal bezlerin nötral musinler açısından baskın olduğunu, az miktarda da sülfö ve sialomusinlerin bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise uygulanan PAS/AB yöntemine göre sülfat esterli glikoproteinlerin (AB pH 2.5) baskın olduğu tespit edilmiştir. Aynı araştırmacıların (26) bronş ve bronşiolde sadece sülfatlı musinlerin bulunduğunu bildirmelerine karşın bu çalışmada karboksil gruplu ve/veya sülfat esterli glikoproteinlerin nötral ve/veya asidik glikoproteinlere göre daha baskın olduğu gözlemlendi.

Plopper ve ark. (24)'nin tavşanların bronş mukus bezlerinde az miktarda okside olabilen visinal diol ve/veya glikojenli glikoproteinlerin bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada Lamb ve Reid (27)'in insan bronş submukozal bezlerinde elde ettikleri bulgularla benzer biçimde mukus hücrelerinin asidik musin ürettiği saptandı.

Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre, trakea ve bronşlarda daha yoğun olmak üzere çalışılan bütün bölgelerde, karboksil gruplu (siyalik veya uranik asit) ve/veya sülfat esterli glikoproteinlerin mukusun büyük bir kısmını oluşturduğu sonucuna varıldı.

Kaynaklar

1. Samet JM., Cheng PW., The role of airway mucus in pulmonary toxicology. *Environmental Health Perspectives* 1994; 102: 89-103.
2. Wheater PR., Burkitt HG., Daniel VG., *Functional Histology*. Churchill Livingstone. New York 1979.
3. Sleigh MA., Blake JR., Liron N., The propulsion of mucus by cilia. 1988; 137 (3): 726-41.
4. Forrest JB., Lee RMKW., *The Bronchial wall: Integrated form and function*. *The Lung: scientific foundations*. Raven Press 1991; New York. . pp. 729-740.
5. Boat TF., Cheng PW., *Biochemistry of airway mucus secretions*. *Fed. Proc.* 1980; 39 (13): 3067-74.
6. Tharnton DJ., Davies JR., Krayanbrink M., Richardson PS., Sheehan JK., Carlstedt I., *Mucus glycoproteins from "normal" human tracheobronchial secretions*. *Biochem J.* 1990; 265: 179-186.
7. Rose MC., *Mucins: Function, and role in pulmonary diseases*. *Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1992; 263: 413-429.
8. Jones R., *Modification of mucus in animal models of disease*. *Proceedings of International Symposium on Mucus in Health and Disease*. Raven Pres. New York 1977; pp. 63-72.
9. Bancroft JD., Steven A., Turner DR., *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone. New York, London, Edinburg, Madrid, Melbourne, San Fransisco Tokyo. 1996; 129 s.

10. Lev R., Spicer SS., Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.* 1964; 12: 309.
11. Gomari G., Gomari's Aldehyde Fuchsin stain. In: *Cellular Pathology Technique* (C.F.A. Culling, R.T. Allison, and W.T. Barr, eds), Butterworths. London 1952; pp.238.
12. McManus JFA., Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.* 1948; 23: 99-108.
13. Mowry RW., Alcian blue techniques for the histochemical study of acidic carbohydrates. *J. Histochem. Cytochem.* 1956; 4: 407-408.
14. Spicer SS., and Mayer DR. Aldehyde Fuchsin/Alcian Blue. In: *Cellular Pathology Technique* (C.F.A. Culling, R.T.Allison, and W.T. Barr, eds). London: Butterworths 1960; pp.233.
15. Choi HK., Finkbeiner WE., Widdicombe JH., A comparative study of mammalian tracheal mucous glands. *Journal of Anatomy* 2000; 197 (3): 361-372.
16. Widdicombe JH., Chen LLK., Sporer H., Choi HK., Pecson I.S., Distribution of tracheal and laryngeal mucous glands in some rodents and the rabbit, *J. Anat.* 2000; 198: 207-221.
17. Jeffery PK., Structure and function of mucus-secreting cells of cat and goose airway epithelium. *Ciba found Symp.* 1978; 54: 5-23.
18. Tanyolaç A., Özel Histoloji, Yorum Basın Yayın Sanayi Ltd. Şti. Ankara. 1999; 213 s.
19. Olesen KL., Cerkez V., Tos M., Quantitative features of goblet cells in the rat tracheobronchial tree. 1987; 164(5): 345-54.
20. Castells MT., Ballesta J., Pastor LM., Madrid JF., Marin JA., Histochemical characterization of glycoconjugates in the epithelium of the extrapulmonary airways of several vertebrates. 1990; 22(1): 24-35.
21. Kahwa CKB., Purton M., Histological and histochemical study of epithelial lining of the respiratory tract in adult goats. 1996; 20 (2): 181-186.
22. Dimitrov D., Dimitrova D., Nikolova G., Savov S., Histochemical investigation of the Glandular and respiratory epithelium in the mice trachea and lung after oral administration of Ambroxol. *Trakia Journal of Sciences.* 2005; 3: 8-10.
23. Vajner L., Konradova V., Uhlik J., Zocova J., Mucin histochemistry of tracheal goblet cells after oral administration of ambroxol. *Acta vet.* 2001; BRNO, 70: 9-13.
24. Plopper CG., George JA. St., Nishio SJ., Etchison JR., Nettesheim P., Carbohydrate cytochemistry of tracheobronchial airway epithelium of the rabbit. *The Histochemical Society.* 1984; 2: 209-18.
25. Sherman JM., Cheng PW., Tandler B., Boat TF., Mucous glycoproteins from cat tracheal goblet cells and mucous glands separated with EDTA. *Am Rev Respir Dis.* 1981; 124: 476-9.
26. Jacob S., Poddar S., Mucous cells of the tracheobronchial tree in the ferret. *Biomedical and Life Sciences.* 2004; 73: 599-605.
27. Lamb D., Reid L., Quantitative distribution of various types of acid glycoprotein in mucous cells of human bronchi. *Biomedical and Life Sciences.* 1972; 4: 91-102.