

Kronik Alkol Maruziyetinin Dalak Üzerindeki Etkilerinin Stereolojik ve İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Araştırılması

Investigation of The Effects of Chronic Alcohol Exposure on The Spleen By Stereological and Immunohistochemical Methods

Neşe Çölçimen*¹

¹ Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D. Van, Türkiye

Atf: Çölçimen N. (2023). Kronik alkol maruziyetinin dalak üzerindeki etkilerinin stereolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle araştırılması. *Van Sağlık Bilimleri Dergisi*, 16(3), 244-248.

ABSTRACT

Objective: Alcohol is a toxic agent and its consumption is increasing day by day. It has harmful effects on all tissues and organs, and in our study, we aimed to examine its effects on the spleen by stereological and immunohistochemical methods.

Material and Method: Thirteen Wistar albino male rats were recruited for the study. They were randomly divided into 2 groups as Control (6) and Ethanol (7). The ethanol group was given 6.4% (v/v) ethanol orally for 18 days. No application was made to the control group. At the end of the experiment, spleen tissue was removed from the animals under anesthesia. Tissue preparation steps were applied for routine light microscopic histological follow-up procedure and immunohistochemical staining, embedded in parafin. Then 5 µm thick sections were taken for each 40th section, the first of which was random, with an average of 10 sections. Sections taken were stained with Hematoxylin & Eosin. The modified method of the Cavalieri principle was used for stereological measurement. Total tissue volume ratios were measured with the dotted area ruler given in the Shtereom 1.5 version package program. Collagen Type IV and Fibronectin immunohistochemical staining were applied to tissue sections. Immunohistochemical and stereological evaluations were performed. The results were compared statistically.

Results: In stereological measurements, it was determined that spleen total volume and red pulp volume increased in the ethanol group compared to the control group and were statistically significant (p<0.05). It was determined that the white pulp volume was decreased in the ethanol group compared to the control group, but it was not statistically significant (p>0.05). In the immunohistochemical evaluation of Collagen Type IV and Fibronectin, it was determined that the uptake was significantly reduced in the ethanol group when compared to the control group in the capsular and trabeculae areas.

Conclusion: With the stereological and immunohistochemical findings of our study, the negative effects of alcohol on the spleen, which is at the junction of the immune and hematopoietic systems, were revealed.

Keywords: Alcohol, Spleen, Immunohistochemistry, Rat, Stereology

ÖZET

Giriş: Alkol toksik bir ajan olup, gün geçtikçe tüketimi artmaktadır. Tüm doku ve organlar üzerinde zararlı etkileri mevcut olan alkolün, çalışmamızda dalak üzerinde oluşturduğu etkileri stereolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle incelemeyi amaçladık.

Materyal ve Metot: Çalışma için 13 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan alındı. Rastgele Kontrol (6) ve Etanol (7) olarak 2 gruba ayrıldı. Etanol grubuna 18 gün boyunca oral yolla % 6,4 (v/v) dozunda etanol verildi. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmadı. Deney sonunda hayvanların anestezi altında dalak dokusu çıkarıldı. Rutin ışık mikroskopik histolojik takip prosedürü ve immünohistokimyasal boyama için doku hazırlık aşamaları uygulandı, parafine gömüldü. Akabinde 5 µm kalınlığında ilki rastgele olmak üzere her 40. kesit alınarak, ortalama 10 kesit alındı. Alınan kesitler Hematoksilen & Eozinle boyandı. Stereolojik ölçümde Cavalieri prensibinin modifiye metodu kullanıldı. Shtereom 1.5 versiyon paket programında verilen noktalı alan cetveliyle total doku hacim oranları ölçüldü. Doku kesitlerine Kollajen Tip IV ve Fibronektin immünohistokimyasal boyama uygulandı. İmmünohistokimyasal ve stereolojik değerlendirmeler yapıldı. Sonuçlar istatistiki olarak karşılaştırıldı.

Bulgular: Stereolojik ölçümlerde dalak total hacmi ve kırmızı pulpa hacminin etanol grubunda kontrol grubuna göre artmış olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi (p<0.05). Beyaz pulpa hacminin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında etanol grubunda azalmış olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi (p>0.05). Kollajen Tip IV ve Fibronektin'in immünohistokimyasal değerlendirilmesinde kapsül ve trabeküller alanlarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında etanol grubunda tutulumunun ciddi oranda azalmış olduğu tespit edildi.

Sonuç: Çalışmamızın stereolojik ve immünohistokimyasal bulgularıyla alkolün immün ve hematopoetik sistemin kavşak noktasında yer alan dalak üzerindeki olumsuz etkileri ortaya konuldu.

Anahtar kelimeler: Alkol, Dalak, İmmünohistokimya, Sıçan, Stereoloji

* Sorumlu yazar: Neşe Çölçimen. E-mail: colcimennese@hotmail.com.

ORCID: Neşe Çölçimen: 0000-0002-7695-3049

Geliş: 31.07.2023, Kabul: 04.10.2023 ve Basım:30.12.2023



GİRİŞ

Etanol insan ve hayvanlar için toksiktir ve kalp, iskelet kasları, beyin, karaciğer, pankreas, gastrointestinal, endokrin, immün ve hematolojik sistemler üzerinde önemli negatif etkileri bulunmaktadır (Aldahmash ve El-Nagar, 2013). Alkol tüketimi, küresel anlamda önemli bir sağlık sorununu ve halk sağlığı açısından da bir önceliği temsil etmektedir. Yılda üç milyon ölüm, alkole bağlanmakta; zararlı alkol kullanımı, ölüm ve sakatlık için önde gelen küresel risk faktörü olarak yedinci sırada yer almaktadır (Barbería-Latasa ve ark., 2022). Dalak hem immün sistem hem de hematopoetik sistem organı olduğundan yoğun şekilde hücresel etkileşimler içerir ve toksik ajanlar dalağı etkiler (Keskin ve ark., 2012). Kronik alkol tüketiminin spesifik belirtilerinden biri de immün sistem organlarında özellikle dalakta değişikliklere yol açmasıdır (Saidmumadovich ve Sharipovna, 2021). Alkol kullanımı ve alkolizm immün yetmezlik ile ilişkili olup buda alkol kullanımında bazı tümörlere ve enfeksiyonlara karşı artan duyarlılığı açıklar. Etanolün; timus, dalak, periferik kan ve lenf nodlarındaki lenfoid hücrelerin azalmasını indüklediği çalışmalarda gösterilmiştir (Budeč ve ark., 2000).

Stereoloji gerçekte üç boyutlu yapıların iki boyutlu kesitlerinden elde edilen veriler kullanılarak bu yapılar hakkında bilgi edinmeye yarayan bilim dalıdır (Akalan ve Çevik Demirkan, 2013). Günümüzde stereoloji "three dimension studies" olarak isimlendirilmektedir. Bu metodun organların farklı alt birimlerinin hacmini belirlemek için kullanılan metoduna Cavalieri prensibi denir (Vojdani ve ark., 2010). Stereoloji bilimsel değeri yüksek, sonuçları güvenilir, matematiksel olarak doğruluğu kanıtlanmış ve herkes tarafından kabul gören bir yöntemdir (İkinci Keleş, 2019). Çalışmamızda kronik alkol tüketiminin dalak üzerindeki etkilerini stereolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirmeyi amaçladık.

MATERYAL VE METOT

Çalışmamıza Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul (2023/05-08) onayı ile başlandı. On üç adet, ortalama 190-220 gr ağırlığında, erişkin 2 aylık, Wistar albino erkek sıçan alındı. Sıçanlar rastgele olarak Kontrol (n:6) ve Etanol (n: 7) adet olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Etanol grubuna % 6.4'lük (v/v) etanol musluk suyuna karıştırıldı ve oral yolla almaları sağlandı. Kontrol grubuna musluk suyu verildi. Sıçanlar özel metal kafesler içinde oda sıcaklığında ve stabil çevre koşullarında (21°C ± 2°C ve 12 saat karanlık- 12 saat ışık periyodu) barındırıldı. Sıçanlar standart uniform pelet yemle *ad libitum* beslendiler. 18 gün uygulamalara devam edildi. Deney sonunda intramüsküler 10 mg/kg ksilazin (Xylazyne, Bayer, İstanbul, Türkiye) ve 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer, Warner

Lambert, İstanbul, Türkiye) uygulanarak genel anestezi altında üst abdomen bölgesi açıldı. Dalak dokusu periferik dokularından disseke edilerek çıkarıldı. Dalak, 72 saat %10 tamponlu formaldehit içinde fikse edildi. Rutin ışık mikroskopik histolojik takip prosedürü ve immünohistokimyasal boyama için doku hazırlık aşamaları uygulandı, parafine gömüldü.

Stereolojik analizler

Fikse edilen ve parafin blok haline getirilen dokulardan mikrotom ile 5 µm kalınlığında ilk kesit rastgele diğerleri her 40. kesit olacak şekilde ortalama 10 kesit alındı. Akabinde rutin ışık mikroskopik işlem prosedürleri gerçekleştirildi. Kesitler Hematoksilin & Eozin ile boyandı ve entellan ile kapatıldı. Daha sonra ışık mikroskopu altında görüntüledi ve fotoğrafları çekildi (AxioVision 3,1 Zeiss axioplan 2 imaging Germany, Göttingen). Stereolojik ölçümde Cavalieri prensibinin modifiye metodu kullanıldı (Gundersen ve Jensen, 1987). Shetereom 1.5 versiyon paket programında verilen noktalı alan ölçüm cetveli ile toplam dalak hacmi, beyaz pulpa ve kırmızı pulpa hacmi ölçüldü (Gundersen ve ark., 1988; Howard ve Reed, 1998). Stereolojik çalışmalarda her grup için hata katsayısı (CE) ve değişim katsayısı (CV) değerleri hesaplanır (Gundersen ve Jensen, 1987). Çalışmamızda da CE ve CV değerleri hesaplandı ve kabul edilebilir aralıktaydı.

İmmünohistokimyasal analizler

İmmünohistokimyasal analizler için mikrotomla 5 µm kalınlığında polilizinli lamlara alınan doku kesitleri deparafinize ve dehidrate edildi. Dalak dokusuna immünohistokimyasal prosedürler uygulandı. Kesitler, Fibronektin (Santa Cruz, sc8422, 1:200) ve Kollajen Tip IV (Abcam, ab236640, 1:1000) primer antikorlarıyla streptavidin-peroksidaz metodu ile manuel yöntemle boyandı. Sonrasında ışık mikroskopu (Olympus BX53, Japonya) altında incelendi, olympus Cellsens Yazılımı kullanılarak analiz edildi ve fotoğraflandı. İmmünohistokimyasal değerlendirme; gruplardaki her hayvan için rastgele örnekleme seçimiyle ortalama 10-15 alan değerlendirildi. Rastgele seçilen doku alanlarındaki kahverengi renginin yoğunluk indeksine göre skorlandı. Dalak dokusunda rastgele seçilen alanların kahverengi renginin yoğunluk indeksleri; (-) negatif, (+) zayıf pozitif, (++) orta derecede pozitif reaksiyon, (+++) güçlü pozitif olarak değerlendirildi (Parlak Ak ve ark., 2021).

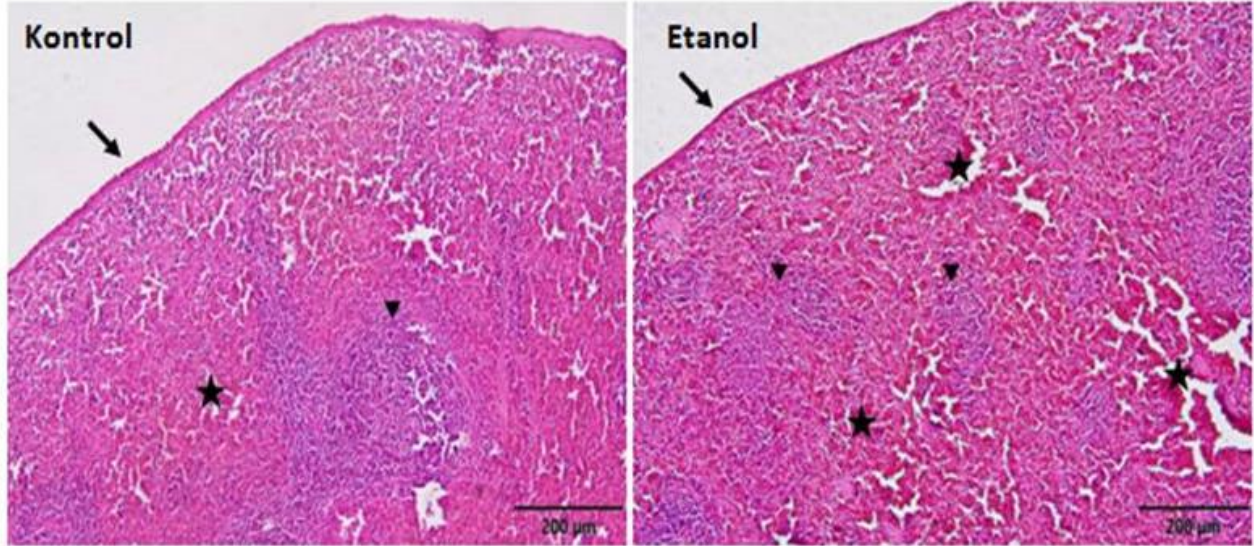
İstatistiksel analiz

Tanımlayıcı istatistikler; median, ortalama, minimum, maksimum, standart sapma ve IQR olarak verildi. Kontrol ve Etanol gruplarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Çalışmanın istatistiksel hesaplamalarında SPSS (ver:21) istatistik programı kullanıldı ve istatistiksel anlamlılık değeri %5 olarak kabul edildi.

BULGULAR

Dalağın histolojik yapısı incelendiğinde kontrol grubunda kapsül, trabeküller, beyaz ve kırmızı pulpa yapılarının normal histolojik görünümde olduğu izlendi. Etanol grubunda kapsül yapısında değişiklikler olduğu, konnektif dokunun azaldığı ve

kapsül yapısının incelmış olduğu izlendi. Kırmızı pulpa alanlarının konjesyone ve duvar yapısının yer yer bozulmuş olduğu damarlar içerdiği ve kontrol grubuna göre genişlemiş olduğu, beyaz pulpa alanlarında organizasyonun bozulmuş olduğu ve azalmış olduğu izlendi (Şekil 1).



Şekil 1. Dalak histolojik yapısı, kapsül (siyah ok), beyaz pulpa (ok başı), kırmızı pulpa ve konjesyone damarlar (yıldız) (Hematoxilen & Eozin, Scale bar: 200 µm)

Stereolojik ölçümlerde dalak total hacminin ve kırmızı pulpa hacminin etanol grubunda kontrol grubuna göre artmış olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Tablo 1).

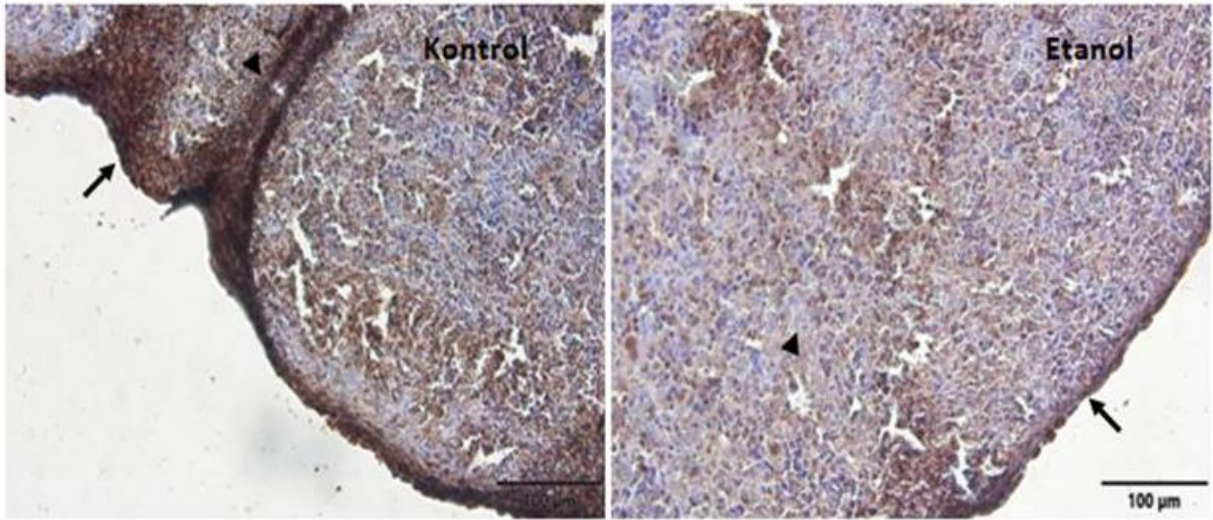
Beyaz pulpa hacminin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında etanol grubunda azalmış olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p > 0.05$) (Tablo 1).

Tablo 1. Tanımlayıcı istatistikler ve grupların karşılaştırmalı sonuçları

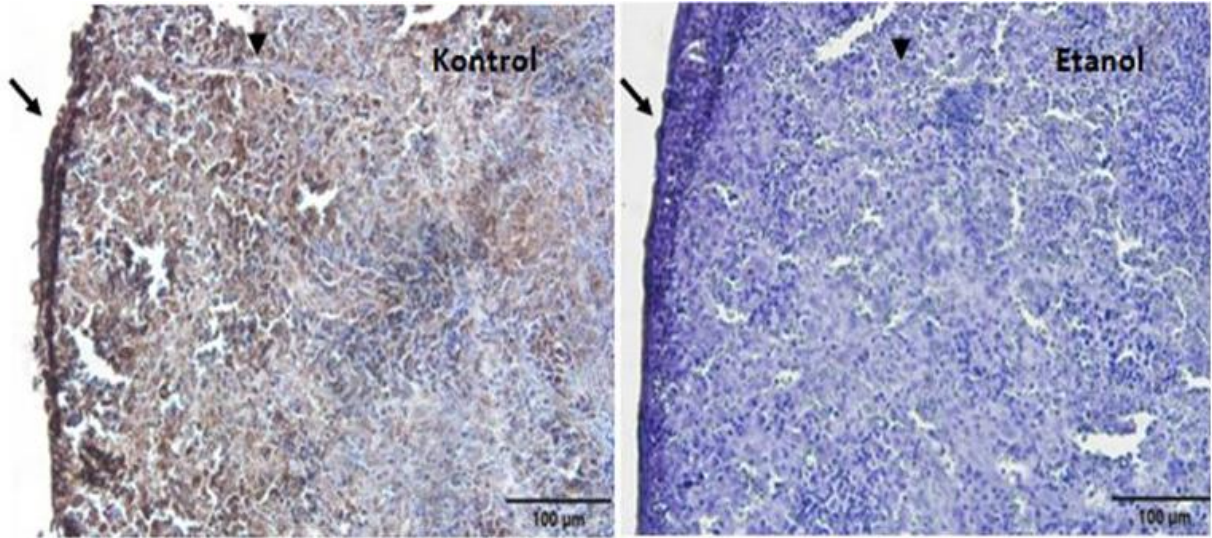
		Median	Ortalama	St. Sapma	Minimum	Maksimum	IQR	p
Dalak Total Hacim (mm ³)	Kontrol	213180000	220360000	56249359,11	162000000	299000000	116450000	0,043
	Etanol	315600000	310200000,00	76586474,00	221600000	402200000	156300000	
Beyaz Pulpa Hacim (mm ³)	Kontrol	110320000	121840000	35326907,59	88800000	170400000	70500000	0,460
	Etanol	95200000	105866666,67	36715046,87	68400000	160000000	66700000	
Kırmızı Pulpa Hacim (mm ³)	Kontrol	100160000	98520000	28672662,94	63800000	140000000	54600000	0,001
	Etanol	211600000	204333333,33	46179591,45	141600000	264800000	87200000	

Dalağın immünohistokimyasal değerlendirilmesinde; Kollajen Tip IV ve Fibronektin'le yapılan immünohistokimyasal boyamada her iki markırında

tutulununun kapsül ve trabeküller alanlarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında etanol grubunda ciddi oranda azalmış olduğu tespit edildi (Şekil 2, 3).



Şekil 2. Kollajen Tip IV immunohistokimyasal boyaması kapsül (siyah ok), trabekül (ok başı) (Scale bar: 100 µm)



Şekil 3. Fibronektin immunohistokimyasal boyaması kapsül (siyah ok), trabekül (ok başı) (Scale bar: 100 µm)

TARTIŞMA

Dalak büyük bir lenfoid organ olup beyaz pulpa ve kırmızı pulpa olarak bilinen iki ana kompartmandan meydana gelmiştir. Beyaz pulpa lenfoid foliküllerden oluşur (Aldahmash ve El-Nagar, 2013). Beyaz pulpa arterlerinin çevresindeki alanda T-lenfositler bulunur. Bu alandaki lenfosit kümelerinde ise B-lenfositler mevcuttur (Keskin ve ark., 2012). Dalaktaki immün sistem aktivitesindeki artış, beyaz pulpa çapının boyutlarında görülebilir (Tasminatun ve ark. 2017). B lenfositler, kemik iliğinden köken alan ve dalakta olgunlaşan lenfositlerdir (Pasala ve ark., 2015). Yapılan çalışmalar, kronik etanol kullanımının hem T hem de B lenfositlerinin işlevlerini bozduğunu açıkça göstermiştir. Kronik alkol tüketimi, dolaşımdaki T ve B lenfositlerde kayıpla birlikte lenfopeniye neden olur. Ayrıca kronik alkol tüketimi B lenfositlerin gelişimi ve olgunlaşmasına da müdahale eder (Pasala ve ark., 2015). Literatürle uyumlu olarak yapmış olduğumuz çalışmada etanol

grubunda beyaz pulpa alanının azaldığı ve yapısındaki organizasyonun bozulmuş olduğu tespit edildi.

Dalağın kapsül ve trabekül yapısı düz kaslardan oluşur ve fizyolojik aktivite artışı durumunda kan mobilizasyonunda rol oynar (Tasminatun ve ark. 2017). Saidmumadovich ve Sharipovna (2021), alkolün organların yapısının morfolojik özelliklerini önemli ölçüde değiştirdiğini, periferik immün sistem organı olan dalağın da yapı ve fonksiyonlarında değişiklikler oluşturduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yapılan çalışmalarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında alkolik dalaklarda kapsülün önemli ölçüde incelendiğini ifade etmişlerdir. Bu literatürle uyumlu olarak çalışmamızda uyguladığımız immunohistokimyasal boyamalarda dalağın kapsül ve trabeküllerinin konnektif dokusunu oluşturan Kollajen Tip IV ve Fibronektin yoğunluğunun etanol grubunda azalmış olduğunu, kapsül yapısının incelendiğini tespit ettik.

Budeč ve arkadaşları yapmış oldukları (2000) çalışmalarında akut etanol verilen sıçanlarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında dalağın ortalama follikül çapının ve follikül hacim yoğunluğunun azaldığını tespit etmişlerdir. Bu bulguların da akut etanol verilmesinin B hücre kaybının bir göstergesi olduğunu bildirmişlerdir. Aldahmash ve El-Nagar (2013) yapmış oldukları çalışmalarında, düşük doz etanolün dalak üzerinde zararlı etkilere neden olduğunu kırmızı pulpanın genişlediğini ve makrofaj sayısının arttığını, doz artırıldığında beyaz pulpanın azaldığını ve bozulduğunu ancak kırmızı pulpadaki genişlemenin ve konjesyonun arttığını bunun da splenomegaliyle sonuçlandığını tespit etmişlerdir. Biz de çalışmamızda literatürle uyumlu olarak stereolojik analizlerde dalağın beyaz pulpa hacminin etanol verilen sıçanlarda kontrol grubuna göre azaldığını, kırmızı pulpa hacminin ve konjesyone damarların arttığını ve kontrol grubuna göre etanol grubunda dalak total hacminin arttığını, splenomegali oluştuğunu tespit ettik.

Sonuç olarak, alkol vücuttaki tüm dokular gibi dalak üzerinde de olumsuz etkiler oluşturmaktadır ve çalışmamızda sunduğumuz bulguların alkol tüketiminde oluşan immün yetmezliğin altta yatan mekanizmalarını açıklamaya yardım edeceği kanısındayız.

Teşekkür

Yazar, istatistiksel analiz aşamasındaki desteklerinden dolayı Dr. Siddık Keskin'e teşekkür eder.

Çıkar Çatışması

Yazar çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Akalan MA, Çevik Demirkan A. (2013). Stereoloji ve veteriner hekimlikte kullanım alanları. Derleme. *Yüzcüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24(2), 95-100.
- Aldahmash BA, El-Nagar DM. (2013). Histological study on the hazardous effects of ethanol on liver and spleen in Swiss albino mice. *HealthMED*, 7(8), 2445-2451.
- Barbería-Latasa M, Gea A, Martínez-González MA. (2022). Alcohol, drinking pattern, and chronic disease. Review. *Nutrients*, 14(9), 1954.

- Budeč M, Miličević Z, Koko V. (2000). Stereological study of rat spleen following acute ethanol treatment. *Indian Journal of Experimental Biology*, 00, 462-466.
- Gundersen HJ, Jensen EB. (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy*, 147 (3), 229-263.
- Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. (1988). Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 96, 379-394.
- Howard CV, Reed MG. (1988). Unbiased stereology, three-dimensional measurements in microscopy. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 39-68.
- İkinci Keleş A. (2019). Sağlık alanında kullanılan kantitatif yöntem, stereoloji. Derleme. *Dicle Tıp Dergisi*, 46(3), 615-621.
- Keskin N, Mammadov R, İli P. (2012). Crataegus aronia var. dentata Browicz ekstraktının dalak üzerindeki etkilerinin araştırılması: histokimyasal çalışma. *Pamukkale Tıp Dergisi*, 5(2), 68-74.
- Parlak Ak T, Yaman M, Tatlı Seven P, Gül B, İflazoğlu Mutlu S, Sur Arslan A, ve ark. (2021). Ratlarda karbon tetraklorür kaynaklı testis hasarı üzerine krisinin etkileri: biyokimyasal, histopatolojik ve immunohistokimyasal değerlendirme. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 16(3), 320-329.
- Pasala S, Barr T, Messaoudi I. (2015). Impact of alcohol abuse on the adaptive immune system. Review. *Alcohol Research*, 37(2), 185-197.
- Saidmumadovich IA, Sharipovna DK. (2021). Spleen morphology and pancreas of rats and its changes under alcoholic intoxication. *World Bulletin of Public Health (WBPH)*, 3, 45-48.
- Tasminatun S, Pravitasari R, Makiyah SNN. (2017). Potential ethanol of *Carica papaya L.* extract as immunomodulatory through histology observation at mice balb/c spleen. *Berkala Kedokteran*, 13(2), 205-210.
- Vojdani Z, Dehghani F, Seyedi F, Noorafshan A, Baha-al-din Bagi F. (2010). Quantitative study of the effects of morphine on the mouse spleen and inguinal lymph node. *Archives of Iranian Medicine*, 13 (4), 294-300.