

TARTRAZİNİN FARE DERMAL MAST HÜCRELERİNDE DEGRANÜLASYON ETKİSİ**Suna KALENDER¹****ÖZET**

Bu çalışmada enjeksiyon yolu ile verilen tartrazinin (E-102) fare (*Mus musculus domesticus*) dermal mast hücreleri üzerindeki degranülasyon etkisi transmisyon elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Tartrazinin deri altına enjeksiyonundan 1, 6, 12 ve 24 saat sonra dermal mast hücrelerindeki degranülasyon etkisi incelenmiştir. Tartrazin enjeksiyonundan 1 ve 12 saat sonra mast hücrelerinde kısmi degranülasyon meydana geldiği halde, 6 saat sonra oldukça fazla iç degranülasyon gözlenmiştir. Enjeksiyondan 24 saat sonra ise çok belirgin bir degranülasyon tespit edilememiştir.

Anahtar kelimeler: Mast hücresi, degranülasyon, tartrazin

DEGRANULATION EFFECT OF TARTRAZINE ON THE DERMAL MAST CELLS OF MOUSE**SUMMARY**

In this study degranulation effects of intradermally injected tartrazine (E-102) on the dermal mast cells of mouse (*Mus musculus domesticus*) have been studied by transmission electron microscope. Examination of the degranulation have been carried out 1, 6, 12 and 24 hours after the intradermal injection of the tartrazine. Tartrazine has been found to cause a partial degranulation after 1 hour and 12 hours from the injection. However, at the end of the 6 hours period an internal degranulation was predominant. Apperence of the degranulation has virtually dissappeared after 24 hours.

Key words: Mast cell, degranulation, tartrazine

GİRİŞ

Tartrazin günümüzde gıda ve ilaç sanayinde kullanılmakta olan bir katkı maddesidir (1). Tartrazin sarı, toz halde oldukça kompleks kimyasal yapıya sahip azo boyasıdır. Tartrazinin kullanıldığı gıdalar arasında alkolsüz aromalı içecekler, meyve ve sebze şekerlemeleri, hazır jöle karışımları, çorbalar, kuru patates, hububat veya nişasta bazlı çerezler ve cikletler belirtilmektedir (2, 3). Tartrazin 124 ilaç formülasyonunda bulunmakta olup, dünyada yaygın olarak kullanılan dört

boyadan biridir (4, 5). Diğer boyalar ise azo boyalarından sunset yellow, azo olmayan boyalardan ise eritrosin ve indigo carmindir. Kolly ve ark. (6) tartrazinin ilaç formülasyonlarının %4.9'unda bulunduğunu tespit etmişlerdir. Günlük hayatta oldukça yaygın olarak kullanılan azo boyaları ve diğer katkı maddelerin sebep olduğu rahatsızlıklar arasında ürtiker, astım, rhinitis, angioedema, purpura ve nadir olarak da anafilaktik şok, baş ağrısı ve gastrointestinal bozukluklar sayılmaktadır

¹A.Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü. Ankara

Geliş tarihi : 08.03.2000 Kabul ediliş tarihi : 11.04.2000

Yazışma adresi : Dr Suna KALENDER, Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06100 Beşevler / Ankara

(7-9). Katkı maddeleri bu hastalıkların doğrudan sebebi olmasa bile hastalıkları şiddetlendiren bir etken olabilirler. Çok nadir olarak bu hastalıkların temel etkeni durumundadırlar. Azo boyalarının ve diğer katkı maddelerinin sebep olduğu en yaygın deri hastalığı ürtiker ve angioedema'dır (10-17). Astım ve rhinitis ise katkı maddelerinin solunum sisteminde sebep olduğu başlıca aşırı duyarlılık semptomlarıdır (10, 12, 15, 18 - 20). Diğer organlardaki aşırı duyarlılık reaksiyonlarının deri ve solunum sisteminden daha az olduğu tespit edilmiştir (21). Katkı maddeleri sebebi ile meydana gelen reaksiyonlar özellikle allerjik bünyeli ve asetil salisilik asite (ASA) hassasiyeti olan kişilerde daha yaygındır (10, 12, 13, 15-24.)

Katkı maddelerine karşı meydana gelen aşırı duyarlılık reaksiyonlarının populasyon içerisindeki yaygınlığının %0.03-0.15 arasında olduğu belirtilmiştir (8, 11, 21, 25).

Bazı küçük molekül ağırlıklı katkı maddeleri haptin gibi davranarak taşıyıcı molekülere bağlandıktan sonra allerjen şekline dönüşebilmektedir. Özellikle tartrazinin dahil olduğu grup olan azo boyalarının bu şekilde davrandığı tespit edilmiştir (22). Moneret-Vautrin ve ark. (26) deneysel olarak organizmada tartrazine karşı IgE'lerin meydana geldiğini göstermişlerdir. Ayrıca tartrazinin tavşanlarda taşıyıcı proteinlere bağlanmasıyla spesifik IgE üretimine sebep olduğu belirtilmiştir (27). Katkı maddelerine karşı meydana gelen allerjik reaksiyonlarda birincil aracı madde mast hücrelerinden salınan histamindir (28, 29). Histaminin yanı sıra prostaglandinler, leukotrienler, bradikininler ve lökosit inhibitör faktörün de katkı maddelerine karşı meydana gelen reaksiyonlarda payının olabileceğini gösteren çalışmalar vardır (30-34).

Bu çalışmada günlük hayatta yaygın olarak kullanılmakta olan tartrazinin allerjik reaksiyonlarda önemli rol oynayan mast hücreleri üzerindeki degranülasyon etkisinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada kontrol ve dört deney grubuna ait toplam 14 adet ortalama 25 g ağırlığında fare

(*Mus musculus domesticus*) kullanılmıştır.

Kontrol grubu deney hayvanlarının deri altına saf su enjekte edilmiş ve enjeksiyondan 1 ve 6 saat sonra deri numuneleri alınmıştır. Deney hayvanlarına enjekte edilen tartrazinin dozu ülkemizde yetişkin bir insanın günlük gıdalarla alabileceği ortalama miktar hesaplanarak belirlenmiştir (3). Buna göre 10 mg/kg'lık doz tespit edilmiştir. Deney hayvanlarına 10 mg/kg tartrazin enjekte edildikten 1, 6, 12 ve 24 saat sonra derilerinden numuneler alınmıştır. Alınan doku örneklerinin sodyum fosfat tamponunda (pH 7.4) hazırlanmış %3'lük glutaraldehit ile 4°C'de 3 saat ön fiksasyonu yapılmıştır. Numuneler aynı tampon ile yıkandıktan sonra sodyum fosfat tamponunda (pH 7.4) hazırlanmış %1'lik osmiyum tetraoksitte 4°C'de 1.5 saat son fiksasyonu yapılmıştır. Numuneler yine aynı tampon içinde yıkandıktan sonra yükselen alkol serilerinde dehidre edilmiştir. Daha sonra numuneler Araldit-CY212 içinde bloklanmıştır. Hazırlanan bloklardan Reichert Om U3 ultramikrotomla ince kesitler alınarak uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandıktan sonra JEOL JEM CX-II transmisyon elektron mikroskopunda 80 kV'de incelenerek fotoğrafları çekilmiştir.

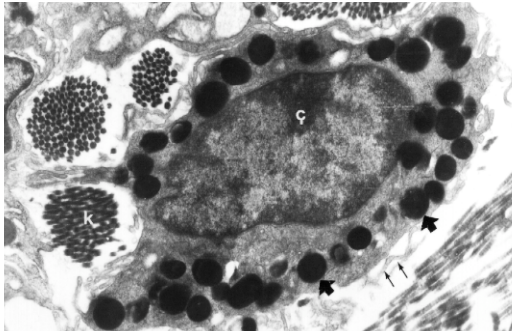
BULGULAR

Kontrol grubu deney hayvanlarının deri numunelerinden alınan kesitlerde mast hücrelerinin ince yapılarında herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Özellikle granüllerin hiç bozulmadan kaldığı ve dolayısıyla degranülasyon göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 1).

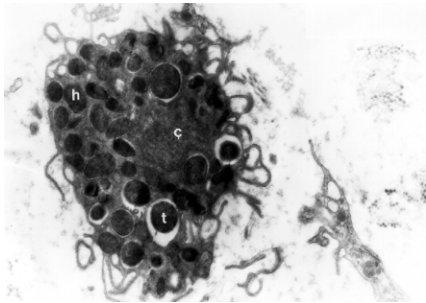
Tartrazin enjeksiyonundan 1 saat sonra kısmi degranülasyon gözlenmiştir. Bazı granüllerin muhtevası kaba tanecikli bir yapıya dönüşme aşamasında kalmıştır. Bir çok granülün etrafında boşluklar oluşmuştur. Bununla beraber granüllerin büyük bir kısmı bütünlüğünü korumakta ve homojen elektron yoğun yapısını muhafaza etmektedir (Şekil 2).

Tartrazin enjeksiyonundan 6 saat sonra dermal mast hücrelerinde oldukça fazla iç degranülasyon gözlenmiştir. Granüllerin hemen hemen hepsi çözülüp kaba tanecikli bir yapı

göstererek etraflarında boşluklar oluşmuştur. Hatta bazı granüllerin muhtevasının diğer granüllerden daha gevşek bir yapıya sahip oldukları gözlenmiştir. Bazı granüllerde kaba taneciklerin ince ipliksi yapılarla retiküler bir görünüm kazandığı tespit edilmiştir. Bu safhada mast hücrelerindeki degranülasyonun tartrazin enjeksiyonundan 1 saat sonra meydana gelen degranülasyondan daha ileri olduğu gözlenmiştir. (Şekil 3).



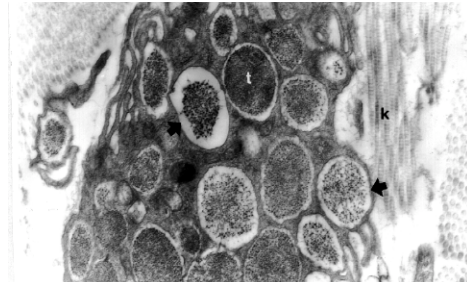
Şekil 1. Beyaz fare'de (*Mus musculus domesticus*) dermal mast hücrelerinin normal ince yapısı. ç:çekirdek, elektron yoğun homojen granüller (kalın oklar), villus benzeri uzantılar (ince oklar), k: kollagen lifler, X12500



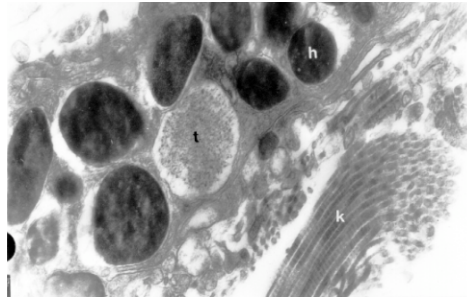
Şekil 2. Tartrazin enjeksiyonundan 1 saat sonra dermal mast hücrelerinde meydana gelen kısmi degranülasyon. h:homojen granüller, t:muhtevası kısmen boşalmış ve etraflarında vakuol oluşmuş kaba tanecikli granüller, ç:çekirdek, X12500

Tartrazin enjeksiyonundan 12 saat sonra dermal mast hücrelerinde daha zayıf bir degranülasyon gözlenmiştir. Bu uygulama sonun-

daki mast hücrelerinde homojen ve olgun granüllerin sayısı, muhtevası boşalmış veya elektron şeffah hale gelmiş granüllerin sayısından daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Muhtevası değişikliğe uğrayan granüller kaba tanecikli bir iç yapı kazanmış ve etrafında boşluklar meydana gelmiştir (Şekil 4). Yine bu safhada bazı mast hücrelerindeki granüllerin bazıları birbirleriyle birleşerek daha büyük granüller meydana getirdikleri de gözlenmiştir.



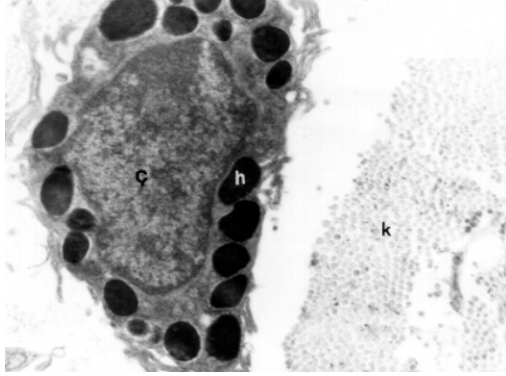
Şekil 3. Tartrazin enjeksiyonundan 6 saat sonra dermal mast hücrelerinde meydana gelen degranülasyon. t:muhtevası kısmen boşalmış ve etraflarında boşluk oluşmuş kaba tanecikli granüller, diğerlerinden daha gevşek bir muhtevaya sahip olan granüller (oklar), k:kollagen lifler, X17500



Şekil 4. Tartrazin enjeksiyonundan 12 saat sonra dermal mast hücrelerinde kısmi degranülasyon. h:homojen granül, t:muhtevası kaba tanecikli bir yapı kazanmış granül, k:kollagen lifler, X22500

Tartrazin enjeksiyonundan 24 saat sonra belirgin bir degranülasyon gözlenmemiştir. Granüllerin neredeyse tamamının, elektron yoğun

yapılarını korudukları tespit edilmiştir (Şekil 5). Bununla beraber bu safhada bazı mast hücrelerindeki bu homojen granüllerin çevresinde halkasal bir boşluk oluştuğu görülmüştür.



Şekil 5. Tartrazin enjeksiyonundan 24 saat sonra dermal mast hücresinin genel görünüşü. h:homojen granül, ç:çekirdek, k:kollagen lifler, X12500

TARTIŞMA

Günümüzde gıdalarda ve ilaçlarda yaygın olarak kullanılan katkı maddelerinin allerjik bünyeli insanlarda ürtiker, astım, rhinitis, angioedema ve anafilaktik şok gibi rahatsızlıklara sebep olduğu, ya da bu rahatsızlıkları arttırdığı ileri sürülmektedir (10, 15, 16, 18, 24). Katkı maddelerinin bağışıklık mekanizmasına etki edip etmediğini belirleyebilmek için, allerjik reaksiyonlarda önemli rol oynayan ve bunu morfolojik değişmelerle gösteren mast hücreleri üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır (35-37).

Mast hücrelerinin en belirgin özelliği çok sayıda sitoplazmik granüllere sahip olmalarıdır. Granüllerin çoğu elektron yoğun ve homojen yapıda iken bazıları tanecikli ve heterojen yapıdadır. Bir çok araştırmacı tarafından granüllerin ince yapısı detaylı bir şekilde incelenmiştir (38-41). Bu çalışmada mast hücrelerinin homojen, elektron yoğun granüllerinde meydana gelen morfolojik değişiklikler dikkate alınarak hücredeki degranülasyon tespit edilmeye çalışılmıştır. Tartrazin enjeksiyonundan sonra mast hücrelerinde meydana gelen degranülasyonlarda,

özellikle granüllerin elektron yoğunluğu tamamen ya da kısmi olarak değişmiş, granüller tanecikli ya da ipliksi bir yapıya dönüşmüş, bazı granüller ise kısmi olarak boşalmış ve bu şekilde etraflarında bir boşluk meydana gelmiş, ya da tamamen boşalarak granül bir hücre içi vakuole dönüşmüştür.

Gıda boyaları ve koruyucuların allerjik reaksiyonlara sebep olduğunu gösteren çalışmalar genellikle klinik, biyokimyasal ve fizyolojik çalışmalardır. Bu çalışmalarda rahatsızlığın ilk başlatıcısı olan mast hücrelerindeki yapısal değişikliklerden ziyade organizmanın genel reaksiyonu ele alınmıştır (10, 13, 22, 42). Bu çalışmada ise diğer yapılan çalışmaların dışında tartrazinin mast hücrelerinde degranülasyona sebep olup olmadığı ortaya konulmuştur. Mast hücrelerinde bulunan diğer sitoplazmik organellerin ince yapısı çok detaylı bir şekilde ortaya konulması amacımız dışında kalmıştır. Zaten sitoplazmanın büyük bir kısmı spesifik granüller ile dolu olmasından dolayı sitoplazmik organellerin örtülmesi sebebi ile bunlara çok nadir olarak rastlanmıştır.

Mast hücreleri çeşitli kimyasal maddeleri sentezleyip granülleri içerisinde depolamaları ve herhangi bir uyararla karşılaştıkları zaman hücreler arası alanlara boşaltmaları sebebiyle birçok araştırmacı tarafından tek hücreli bez olarak kabul edilmektedir. Bu sebeple mast hücrelerinin spesifik granüllerini sitoplazmada paketlenen salgı granülleri olarak ele almak mümkündür. Mast hücreleri degranülasyon esnasında sentezlediği ve özel granüllerde depoladığı maddeleri kritik durumlarda hücre dışına verir. Mast hücrelerinin degranülasyonu esas olarak bir ekzositoz olayıdır (39, 40, 43).

Mast hücrelerindeki degranülasyonu Moriyasu ve Yamura (40) dört tipte tanımlamıştır. Bu çalışmada görülen degranülasyon da Moriyasu ve Yamura'nın (40) tanımlamasına göre dördüncü tip degranülasyona benzemektedir. Buna göre dördüncü tip degranülasyon mast hücrelerinde çok nadir olarak rastlanan bir degranülasyon tipidir. Burada mast hücrelerindeki granüller elektron yoğunluğunu kaybederek, hücrenin genel du-

rumu bal peteği görünümünü kazanır. Moriyasu ve Yamura (40) bu degranülasyon tipini insan ve sıçan derisini 48/80 bileşiği ile muamele ettikten sonra gözlemişlerdir. Mast hücrelerinin bu degranülasyon tipi bez hücrelerinin merokrin salgılama tipine benzemektedir.

Bu çalışmada en fazla degranülasyon tartrazinin deney hayvanlarına enjeksiyonundan 6 saat sonra gözlenmiştir. Bu safhada hücre bal peteği şeklinde görünüm kazanmış olmakla beraber 12 saat sonra çok hafif derecede bir degranülasyon gözlenmiş ve 24 saat sonra ise

mast hücreleri normal görünümüne benzer bir yapı kazanmıştır. Granüllerin bu tip boşalması da bez hücrelerinin merokrin mekanizmasına benzemektedir.

Sonuç olarak klinik, biyokimyasal ve fizyolojik çalışmalara dayanarak allerjik reaksiyonlara yol açtığı ileri sürülen gıdalarda ve ilaçlarda boya maddesi olarak kullanılan tartrazinin allerjik reaksiyonlarda büyük rol oynayan mast hücrelerinin ince yapısında degranülasyona sebep olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- 1.Reynolds JE. Martindale, The extra pharmacopoeia, Thirtieth edition, London: The Pharmaceutical Press, 1993: 701 and 1132-1133.
- 2.Selinger B. Chemistry in the market place. London: John Murray Publishers Ltd., 1980: 312 and 354-360.
- 3.Resmi Gazete. Tarım ve Köyişleri Bakanlığında: Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, Sayı: 23172, 16 Kasım 1997.
- 4.Pollock I, Young E, Stoneham M, Slater N, Wilkinson JD. Warner JO. Survey of colouring and preservatives in drugs. Br Med J 1989; 299: 649-51.
- 5.Weber RW. Food additives and allergy. Ann Allergy 1993; 70: 183-190.
- 6.Kolly M, Pécoud A. Frei PC. Additives contained in drug formulations most frequently prescribed in Switzerland. Ann Allergy 1989;62: 21-25.
- 7.Collins-Williams C. Intolerance to additives. Ann Allerg 1983; 51: 315-316.
- 8.Moneret-Vautrin DA. Food antigens and additives. J Allergy Clin Immunol 1986; 78: 1039-1046.
- 9.Smith JM. Allergic reactions to drug excipients. Practitioner 1987; 231: 579-683.
- 10.Juhlin L, Michaëlsson G, Zetterström O. Urticaria and asthma induced by food and drug additives in patients with aspirin hypersensitivity. J Allergy Clin Immunol 1972;50(2): 92-98.
- 11.Juhlin L. Recurrent urticaria: clinical investigation of 330 patients. Br J Dermatol, 1981; 104; 369-381.
- 12.Settipane GA, Pudupakkam RK. Aspirin intolerance. III. Subtypes familial occurrence and cross-reactivity with tartrazine. J Allergy Clin Immunol 1975; 56(3): 215-221.
- 13.Doeglas HMG. Reactions to aspirin and food additives in patients with chronic urticaria, including the physical urticarias. Br J Dermatol 1975; 93: 135-144.
- 14.Doeglas HMG. Dietary treatment of patients with chronic urticaria and intolerance of aspirin and food additives. Proceedings Verhandlungsberichte Congress 1977: 308-310.
- 15.Ros AM, Juhlin L, Michaëlsson G. A follow-up study of patients with recurrent urticaria and hypersensitivity to aspirin, benzoates and azo dyes. Br J Dermatol 1976; 95: 19-24.
- 16.Settipane GA, Chafee FH, Postman IM, et al. Significance of tartrazin sensitivity in chronic urticaria of unknow etiology. J Allergy Clin Immunol 1976; 57(6): 541-546.
- 17.Gibson A, Clancy R. Management of chronic idiopathic urticaria by the identification and exclusion of dietary factors. Clin Allergy 1980; 10: 699-704.
- 18.Stenius BSM, Lemola M. Hypersensitivity to acetylsalicylic acid (ASA) and tartrazin in patients with asthma. Clin Allergy 1976; 6: 119-129.
- 19.Weber RW, Hoffman M, Raine DA, Nelson HS. Incidence of bronchoconstriction due to aspirin, azo dyes, non-azo dyes and preservatives in a population of perennial asthmatics. J Allergy Clin Immunol 1979; 64(1): 32-37.

- 20.Ortolani C, Pastorello E, Luraghi MT, Della TF, Bellani M, Zanussi C. Diagnosis of intolerance to food additives. *Ann Allergy* 1984; 53: 587-591.
- 21.Hannuksela M, Haahtela T. Hypersensitivity reactions to food additives. *Allergy* 1987; 42: 561-575.
- 22.Chafee FH, Settupane GA. Asthma caused by FD & C approved dyes. *J Allergy* 1967; 40 (2): 65-72.
- 23.Warin RP, Smith RJ. Challenge test battery in chronic urticaria. *Br J Dermatol* 1976; 94: 401-406.
- 24.Farr RS, Spector SL, Wangaard CH. Evaluation of aspirin and tartrazine idiosyncrasy. *J Allergy Clin Immunol* 1979;64 (6): 667-668.
- 25.Wüthrich B. Adverse reactions to food additives. *Ann Allergy* 1993; 71: 379-384.
- 26.Moneret-Vautrin DA, Demange G, Selve C, Grilliat JP, Savinet H. Induction d'une hypersensibilité réaginique à la tartrazine chez le lapin: Immunisation par voie digestive par le conjugué covalent tartrazine-séralbumine humaine. *Ann Immunol (Inst. Pasteur)* 1979; 130C: 419-430.
- 27.Johnson HM, Peeler JT, Smith BG. Tartrazine: Quantitative passive hemagglutination studies on a food-borne allergen of small molecular weight. *Immunochemistry* 1971; 8: 281-287.
- 28.Murdoch RD, Pollock I, Naeem S. Tartrazine induced histamine release in vivo in normal subjects. *J Roy Coll Phys London* 1987; 21(4): 257-261.
- 29.Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular Immunology*, Philadelphia, W.B. Saunders Company 1991: 292-297.
- 30.Neuman I, Elian R, Nahum H, Shaked P, Creter D. The danger of 'yellow dyes' (tartrazine) to allergic subjects. *Clin Allergy* 1978; 8: 65-68.
- 31.Valverde E, Vich JM, Garcia-Calderón JV, Garcia-Calderón PA. In vitro stimulation of lymphocyte in patients with chronic urticaria induced by additives and food. *Clin Allergy* 1980; 10: 691-698.
- 32.Borgeat P. Leukotrienes: A major step in the understanding of immediate hypersensitivity reactions. *J Med Chem* 1981; 24 (2): 121-126.
- 33.Lahti A, Oikarinen A, Viinikka L, Ylikorkala O, Hannuksela M. Prostaglandins in contact urticaria induced by benzoic acid. *Acta Derm. Venerol(Stockh)* 1983; 63: 425-427.
- 34.Warrington RJ, Sauder PJ, Mcphillips S. Cell-mediated immune responses to artificial food additives in chronic urticaria. *Clin Allergy* 1986; 16: 527-533.
- 35.Trautlein JJ, Mann JW. Anaphylactic shock caused by yellow dye (FD and C no: 5, FD and C No: 6) in an enema. *Ann Allergy* 1978; 41: 28-29.
- 36.Kreindler J, Slutsky J, Haddad ZH. The effect of food colors and sodium benzoate on rat peritoneal mast cells. *Ann Allergy* 1980; 44(2): 76-81.
- 37.Supramaniam G, Warner JO. Artificial food additive intolerance in patients with angio-oedema and urticaria. *Lancet* 1986; 18: 907-909.
- 38.Röhlich P, Anderson P, Unvas B. Electron microscope observations on compound 48/80-induced degranulation in rat mast cells. *J Cell Biol* 1971; 51: 465-483.
- 39.Anderson P, Slorach SA, Unvas B. Sequential exocytosis of storage granules during antigen-induced histamine release from sensitized rat mast cells in vitro an electron microscopic study. *Acta Physiol Scand* 1973; 88: 369-372.
- 40.Moriyasu S, Yamura T. Electron microscopic studies of mast cell degranulation. *Acta Derm Venerol Suppl (Stockh)* 1973; 73: 149-156.
- 41.Drake-Lee AB, Price JM, Milford CM, Bickerton RC. Nasal mast cells: a preliminary report on their ultrastructure. *J Laryngol Otol* 1987; 13: 1-17.
- 42.Michaëlsson G, Juhlin L. Urticaria induced by preservatives and dye additives in food and drugs. *Br J Dermatol* 1973; 88: 525-532.
- 43.Lagunoff D. Contributions of electron microscopy to the study of mast cells. *J Invest Dermatol* 1972; 58(5): 296-311.