

İnek Uterusunda Mast Hücrelerinin Histolojik ve Histokimyasal Özellikleri ve Mast Hücre heterojenitesi

Ülker EREN,

A.D.Ü. Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Aydın-TÜRKİYE

Reşat N. AŞTI , Nevin KURTDEDE

A.Ü. Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

Mustafa SANDIKÇI, Emrah SUR

S.Ü. Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Konya-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 24.07.1997

Özet: Bu araştırma, Holştayn ırkı ineklerin uterusunda mast hücrelerinin histolojik ve histokimyasal özellikleri ile dokudaki dağılımlarını belirlemek ve farklı tespit sıvıları kullanarak mast hücre heterojenitesini araştırmak amacıyla gerçekleştirildi. Araştırmada yerel bir kesimhaneden elde edilen, östrüs ve diöstrüs dönemlerinde 10'ar adet olmak üzere 20 adet inek uterusu kullanıldı. Doku örnekleri, % 10'luk nötr tamponlu formalin (NBF) ve izotonik formaldehit asetik asit (IFAA) solüsyonlarında tespit edildi. Mast hücreleri için toluidin blue, alcian blue/safranin O boya metotları uygulandı. Genel olarak IFAA tespit sıvısı kullanıldığında endometriyum, miyometriyum ve perimetriyumda, NBF'de tespit edilenlere göre daha fazla sayıda mast hücrenin bulunduğu ($p < 0.001$) belirlendi. IFAA ile tespit edilen dokularda diöstrüs döneminde, endometriyumda belirlenen mast hücre sayısının miyometriyumda belirlenen mast hücre sayısından daha fazla olduğu ($p < 0.05$) tespit edildi. Miyometriyumda ise NBF'de tespit edilen dokularda, östrüs döneminde diöstrüs dönemine göre daha fazla sayıda mast hücresi belirlendi ($p < 0.05$). İnek uterusunda mast hücrelerinin safranin O (-) oldukları gözlemlendi. Elektron mikroskopik düzeyde yapılan incelemelerle mast hücrelerinde farklı granül tipleri ayırıldı.

Anahtar Sözcükler: Mast hücresi, heterojenite, inek uterusu

The Histological and Histochemical Properties of the Mast Cells and the Mast Cell Heterogeneity in the Cow Uterus

Abstract: The aim of this study was to identify the mast cell heterogeneity of the cow uterus. For this purpose, the histological and histochemical properties and the distribution of the mast cells in cow uterus were investigated. Furthermore, the effects of different fixatives on mast cells were also examined. The study material was obtained from a local slaughterhouse. A total of 20 Holstein cows uteri were used; ten of which were at estrus and the other ten at diestrus phases of sexual cycle. Tissue samples from each cornu uteri were placed in 10 % neutral buffered formalin (NBF) and isotonic formaldehyde - acetic acid (IFAA) fixatives. To determine the mast cells, the tissue sections were stained both with toluidin blue and alcian blue/safranin O methods. In generaly, there were significantly more mast cells in endometrium, myometrium and perimetrium when fixed with isotonic formaldehyde-acetic acid compared with those seen in the same tissues fixed with neutral buffered formalin ($p < 0.001$). In the IFAA fixed tissue, there were more mast cells in endometrium compared with myometrium at the diestrus phases ($P < 0.05$). However, in the NBF-fixed tissues, there were more mast cells in the estrus phases compared with diestrus phases in myometrium ($P < 0.05$). The mast cells in cow uterus were found to be safranin O-negative. Electron microscopic investigations showed that mast cells contained different types of granules.

Key Words: Mast cells, heterogeneity, cow uterus

Giriş

Mast hücreleri IgE ve IgG alt sınıflarını bağlayan membran reseptörlerine sahip olan, aşırı duyarlılık reaksiyonlarında, paraziter hastalıklarda ve neoplazmlara karşı savunmada rol alan hücrelerdir (1,2). Kemikiliği kökenli olan bu hücrelerin farklılaşmalarını perifer dokularda, yerleştikleri mikroçevrenin de etkisiyle tamamladıkları bildirilmektedir (3-7).

Mast hücreleri aşırı duyarlılık ve yangısel reaksiyonlar dışında fizyolojik olaylarda da rol almaktadırlar. Histamin ve heparinin yara iyileşmesi ve doku yenilenmesinde rol aldığı (2,8), yine mast hücrelerinin nöropeptidler aracılığı ile uyarılması sonucu derinin kan akımının düzenlenmesine yardımcı olduğu bildirilmektedir (9). Engelberg (10) mast hücrelerinde heparinin, endotelde lipoprotein lipaz ile etkileşerek trigliseritlerin serbest yağ

asitlerine dönüşümünü kolaylaştırdığını ileri sürmektedir. Mast hücrelerinde degranülasyon, antijenin mast hücre yüzeyindeki IgE ile çapraz bağ kurması sonucu gerçekleşir. Nonimmünojenik olarak, IgE aracılığı olmadan da nöropeptidler, komplement anaflatoksinleri C3a, C5a, fare T hücrelerinde üretilen antijen bağlayan faktör, IL-1, IL-3 ve GM-CSF, şimaz, TNF ve çeşitli hücrelerden salınan histamin bıraktıran faktörlerin, mast hücreleri ve bazofillerde degranülasyona neden olduğu bildirilmiştir (2-9). Mast hücrelerinin IgE'ye bağımlı veya bağımsız olarak salgıladıkları GM-CSF, IL-3, IL-5 ve TNF-(gibi multifonksiyonel sitokinlerle hem kendi fonksiyonlarını hem de buldukları mikroçevredeki diğer hücreleri etkileyebildikleri bildirilmektedir (2-7).

Mast hücrelerinin fenotiplerinin ve yerleştikleri bölgelerin farklı olması, mast hücre heterojenitesi kavramının oluşmasına neden olmuştur (9,11-13). Rodentlerde yapılan araştırmalarda (5,11,12,14,15), mukozaların derin kısımlarında, serozada, deride özellikle kapilar çevrelerinde bulunan bağ dokusu mast hücresi (CTMC) ile mukozaların daha yüzeysel kısımlarında bulunan mukozal mast hücresi (MMC) olmak üzere iki tip mast hücresi tanımlanmıştır. Enerback (11,12) bu tanımlamayı ilk kez rat ince barsağında yapmıştır.

Mukozal mast hücrelerinin granüllerinde kondroitin sülfat ve RMCP-II (Rat Mast Cell Protease - II) bulunduğu, alcian blue (+) reaksiyon verdikleri ve formaldehit tespitinden olumsuz yönde etkilendikleri, bağ dokusu mast hücrelerinin granüllerinde ise farklı olarak heparin ve RMCP-I (Rat Mast Cell Protease -I) bulunduğu ve safranin (+) reaksiyon verdikleri bildirilmektedir (11, 12, 16, 17).

Mast hücre heterojenitesi, mast hücresinin fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolünün daha iyi anlaşılması bakımından, farklı canlılarda ve farklı dokularda çalışılan, araştırmacıların dikkatini çeken bir konudur. İneklerde de mast hücre heterojenitesi akciğer ve deride çalışılmıştır (18, 19). İnek uterusunda mast hücrelerinin özellikleri ile ilgili çalışmalar (20, 21) olmasına rağmen mast hücre heterojenitesini araştıran herhangi bir kaynağa rastlanamamıştır.

Bu çalışmada, inek uterusunda mast hücrelerinin özelliklerinin ışık ve elektron mikroskopik düzeyde incelenmesi, östrüs ve diöstrüs dönemlerinde uterus dokusundaki dağılımlarının belirlenmesi, histokimyasal özelliklerinin ve farklı tespit sıvılarının mast hücrelerinin

boyanma reaksiyonları üzerine etkisinin, dolayısıyla inek uterusunda mast hücre heterojenitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırmada materyal olarak, Konya Belediyesi kesimhanesi'nden toplanan ve Holştayn ırkı ineklere ait olan uteruslar kullanıldı. Makroskopik olarak ovaryumları incelenerek hayvanların östrüs veya diöstrüs dönemlerinde oldukları belirlendi. Her bir dönem için 10'ar adet olmak üzere toplam 20 adet sağlıklı uterus kullanıldı. Alınan materyalin mezbaha materyali olması nedeniyle sadece östrüs veya diöstrüs döneminde olan uteruslar temin edildi. Proöstrüs ve metöstrüs döneminde uteruslara rastlanmadı.

Işık mikroskopik incelemeler için her bir uterusun sağ ve sol kornusundan alınan doku örnekleri, formaldehit konsantrasyonları farklı olan, izotonik formaldehit asetik asit (IFAA, pH2.9) (97.85 ml distile su, 1.65 ml formaldehit, 0.5 ml asetik asit, 12 saat IFAA ve 12 saat %70 alkol) (11) ve %10 nötr tamponlu formalin (NBF) (24 saat) ile tespit edildikten sonra parafinde bloklandı. Herhangi bir patolojik bulgunun olmadığı normal uterusları belirlemek amacıyla NBF ile tespit edilmiş dokulardan alınan kesitler hematoksilin-eozin (HE) ile boyanarak incelendi. Seçilen uteruslara ait hem NBF hem de IFAA ile tespit edilmiş dokulardan hazırlanan her bir bloktan 30µ arayla 5µ kalınlığında, her bir boyama için 10'ar adet olmak üzere seri kesit alındı. Mast hücrelerinin demonstrasyonu için kesitler, aynı hayvana ait NBF ve IFAA ile tespit edilmiş dokulardan alınan birer kesit aynı lam üzerinde olmak üzere, toluidin blue (TB,pH 0.5) ve alcian blue (AB,pH 0.2) / safranin O (SO,pH 1.0) (12) kombine boyama yöntemleri ile boyandılar. TB ile boyanmış kesitlerde endometriyum ve miyometriyumda, 25X10 büyütmede, okuler kare grid (10x10 kare) kullanarak mm²'deki mast hücre sayısı belirlendi (22). Perimetriyumda ise mast hücre yoğunluğu subjektif olarak 0-4 arasında puanlandı (23). Veriler istatistiksel olarak multifaktöriyel varyans analizi metodu ile değerlendirildi. Bu amaçla Minitab® istatistik hazır programı kullanıldı. Grup ortalamaları arasındaki farklılıkların önemi t-Testi ile belirlendi. Değerlerin p<0.05 olanları önemli kabul edildi.

Elektron mikroskopik incelemeler için alınan doku örnekleri Karnovsky (24) yöntemine göre tespit edilerek

Araldit M'de bloklandı. Bu bloklardan alınan yarı ince kesitler toluidin blue/ pyronin boya karışımı ile; ince kesitler ise önce uranil asetat sonra da kurşun sitrat (25) ile boyandı. Hazırlanan ince kesit preparatları Carl Zeiss E M 9S-2 model elektron mikroskopunda incelendi.

Bulgular

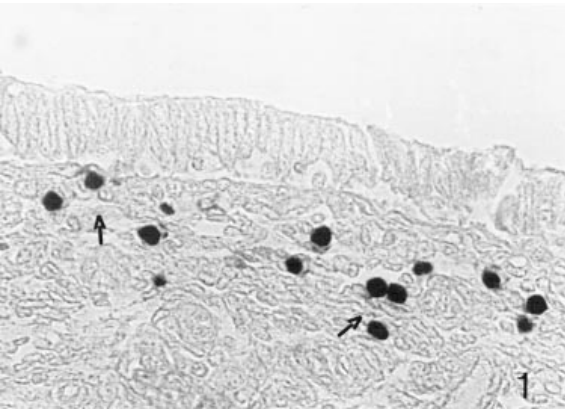
Normal olan uteruslar, NBF ile tespit edilmiş dokulardan alınan kesitlerin hematoksilen-eozin (HE) ile boyanıp incelenmesi sonucunda belirlendi. Bu şekilde ayrılan uteruslara ait olan, IFAA ve NBF ile tespit edilmiş doku kesitlerinin toluidin blue (TB) (PH 0.5) ve TB/pyronin metotları ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenmesi sonucunda, mast hücrelerinin endometriyum, miyometriyum ve perimetriyumda yoğun olarak bulunduğu gözlemlendi. Endometriyumda mast hücrelerinin hem epitel altında (Şekil 1, oklar) hem de bezlerin aralarında oldukça fazla bulunduğu ve şekillerinin de genelde yuvarlağımsı oval olduğu dikkati çekti. Miyometriyumda mast hücreleri farklı büyüklüklerde ve genelde mekik ya da armut şekilliydiler (Şekil 2, oklar). Çoğunluğunun damar çevresinde yerleştikleri görüldü. Perimetriyumda ise farklı şekil ve büyüklüklerde oldukça fazla mast hücrelerinin bulunduğu gözlemlendi (Şekil 3, oklar). IFAA ile tespit edilen dokulara ait kesitlerde, TB ile boyanan mast hücrelerinin görünüşleri NBF ile tespit edilenlerden farklıydı. IFAA ile tespit edilmiş kesitlerde mast hücreleri oldukça yoğun boyanmışlardı (Şekil 1-2, oklar). NBF ile tespit olanlarda ise mast hücrelerinin daha soluk boyandıkları ve granüllerinin ayırdedilebildiği dikkati çekti (Şekil 4,oklar). Işık ve elektron mikroskopik incelemelerde, endometriyum ve özellikle perimetriyumda

(Şekil 5, astriks) mast hücrelerinde degranülasyon gözlemlendi.

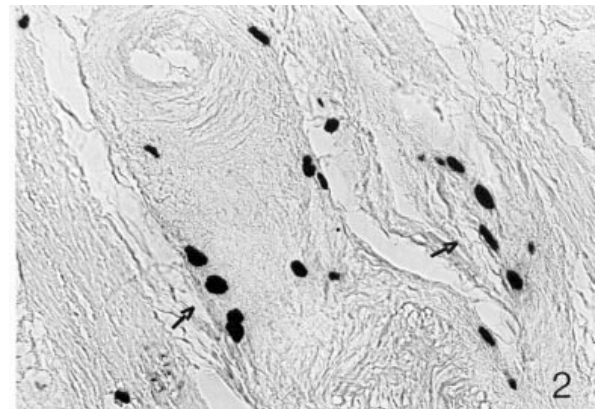
AB/SO boyama metodu uygulandığında mast hücrelerinin SO (-) olduğu görüldü. Boyanmanın kontrolü amacı ile aynı ortamda, inek uterus dokusuna ait kesitlerle birlikte boyanan fare uterus dokusuna ait kesitlerde ise SO (+) hücreler tespit edildi. İnek uterusunda, IFAA ile tespit edilmiş dokularda endometriyum (Şekil 6-7, oklar) ve perimetriyumda AB (+) mast hücreleri gözlemlendi. Miyometriyumda mast hücreleri çok soluk AB (+) boyandılar. NBF ile tespit edilmiş dokularda nadir olarak çok soluk boyanan AB (+) hücrelere rastlandı.

Elektron mikroskopik incelemeler sonucunda mast hücrelerinin şekil ve büyüklüklerinin farklı olduğu, sitoplazmik uzantılara sahip oldukları, çekirdeklerinin yuvarlağımsı oval (Şekil 8) veya loplu (Şekil 9) olduğu görüldü. Sitoplazmalarındaki granüllerin farklı büyüklüklerde ve farklı yoğunluklarda olduğu gözlemlendi. Granüllerin bir kısmı elektron yoğun matriks (Şekil 10, x), bazıları da daha az yoğun ve ince granüler matriks içermekteydi (Şekil 10, oklar) .

Toluidin blue ile boyanmış kesitlerde, mast hücresi dağılımının belirlenebilmesi için elde edilen verilerin aritmetik ortalamaları alındı. Verilere multifaktöriyel varyans analizi metodu uygulandı. Genel olarak IFAA ile tespit edilmiş dokularda daha fazla mast hücresi belirlendi ($P<0.001$). Sağ ve sol kornularda değerler açısından farklılık bulunmadığından endometriyum, miyometriyum ve perimetriyumda elde edilen veriler birleştirildi. Verilerin grup ortalamaları tablo 1 ve 2'de gösterildi. Grup ortalamaları arasındaki farklılığın önemi t-Testi ile belirlendi.



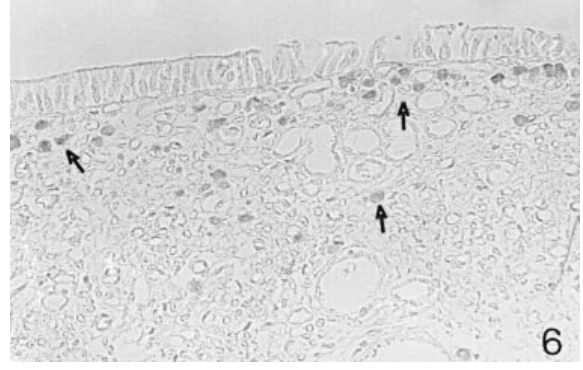
Şekil 1. IFAA ile tespit edilmiş dokuda, endometriyumda, epitel altında mast hücreleri (oklar). TB. x 420.



Şekil 2. IFAA ile tespit edilmiş dokuda miyometriyumda mast hücreleri (oklar).TB. x 220.



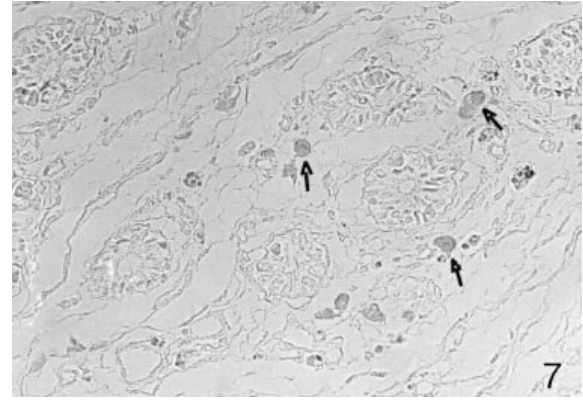
Şekil 3. IFAA ile tespit edilmiş dokuda perimetriumda farklı şekil ve büyüklükte mast hücreleri (oklar). TB. x 260.



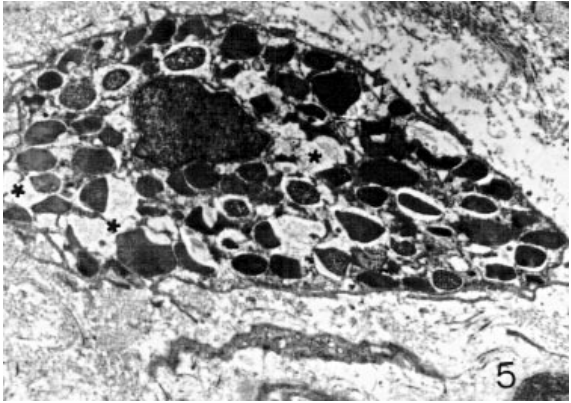
Şekil 6. Endometriyumda epitel altında AB (+) mast hücreleri (oklar). AB/SO. x 240.



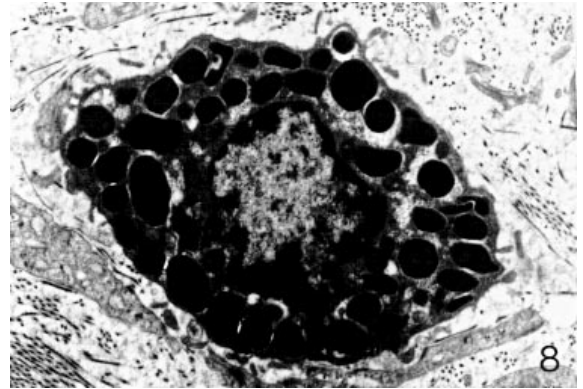
Şekil 4. NBF ile tespit edilmiş dokuda miyometriyumda mast hücreleri (oklar). TB. x 210.



Şekil 7. Endometriyumda bezler arasında AB (+) mast hücreleri (oklar). AB/SO. x 200.



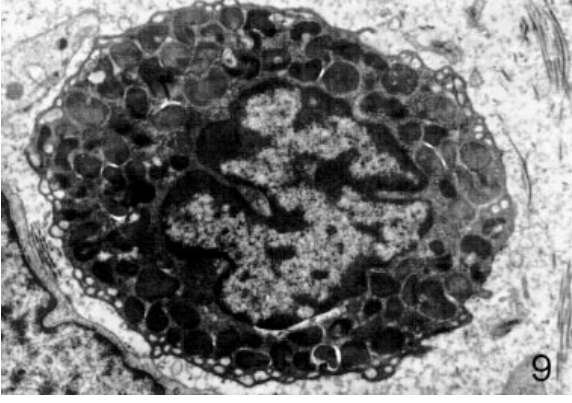
Şekil 5. Perimetriumda bulunan bir mast hücresinde degranülasyon (astriks). x 6310



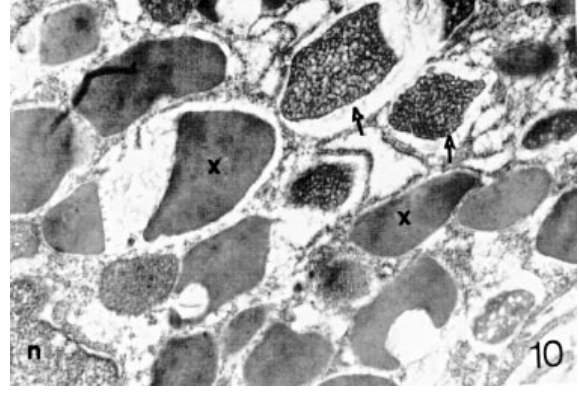
Şekil 8. Endometriyumda bulunan bir mast hücresinin elektron mikroskopik görünümü. x 8550.

Endometriyumda diöstrüs döneminde belirlenen verilerde, tespitler arasındaki farkın ($P < 0.001$) östrüs

dönemindekine göre ($P < 0.01$) daha fazla olduğu görüldü (Şekil 11).



Şekil 9. Farklı yoğunlukta granüllere ve loplu çekirdeğe sahip olan bir mast hücrenin elektron mikroskopik görünümü. x 6300.



Şekil 10. Mast hücreinde elektron yoğun (x) ve ince granüler matriks (oklar) içeren granüller. Çekirdek (n). x 16625.

Miyometriyumda östrüs döneminde tespitler arasındaki fark önemsiz bulunurken, diöstrüs döneminde IFAA ile tespit edilen dokularda daha fazla sayıda mast hücreleri bulundu ($P < 0.01$) (Şekil 12).

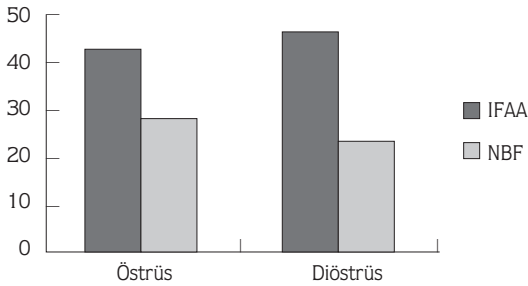
Tespit sıvıları ayrı olarak değerlendirildiğinde; IFAA ile tespit edilen dokularda miyometriyuma göre endometriyumda mast hücre sayısının daha fazla olduğu (Tablo 1), fakat bu durumun diöstrüs döneminde anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). NBF ile tespit edilmiş dokularda ise, miyometriyumda mast hücrelerinin daha fazla olduğu, fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Bununla birlikte NBF ile tespit edilmiş

dokularda miyometriyumda, diöstrüs dönemine göre östrüs döneminde mast hücre sayısının daha fazla olduğu tespit edildi ($P < 0.05$).

Perimetriyumda da mast hücrelerinin oldukça yoğun olduğu gözlemlendi. Mast hücre sayısı oküler kare grid ile (10×10) mm²'de sayılmadığından, mast hücre yoğunluğu subjektif olarak 0-4 arasında puanlandı (Tablo 2). Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, tespitler arasındaki farkın önemli olduğu ($P < 0.001$) (Şekil 13) fakat östrüs ve diöstrüs dönemlerinde belirlenen değerler arasındaki farkın anlamlı olmadığı görüldü.

Tablo 1. Östrüs ve diöstrüs dönemlerinde, inek uterusunda, endometriyum ve miyometriyumda belirlenen mm²'deki mast hücre sayısı

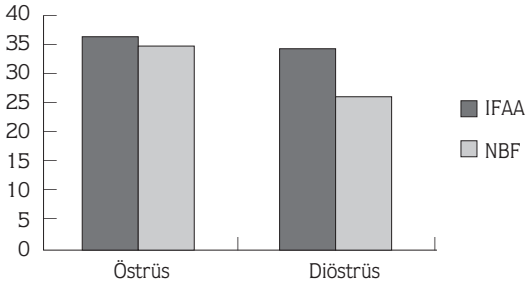
Seksüel siklus	Tespit sıvısı	Endometriyum (Hücre sayısı/mm ² ±(S \bar{x}))	Miyometriyum (Hücre sayısı/mm ² ±(S \bar{x}))
Östrüs	IFAA (n=20)	42.50 ± 2.47	35.86 ± 2.16
	NBF (n=18)	27.40 ± 3.82	34.30 ± 3.31
Diöstrüs	IFAA (n=20)	46.22 ± 2.66	33.15 ± 1.34
	NBF (n=20)	23.00 ± 2.87	25.10 ± 2.22



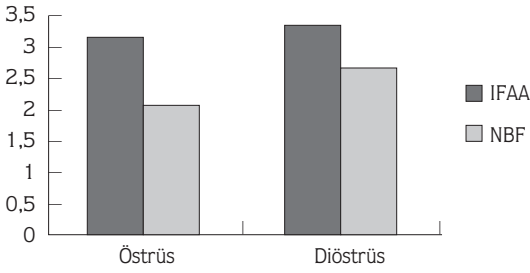
Şekil 11. Östrüs ve diöstrüs dönemlerinde, endometriyumda mm²'de mast hücre sayısı

Tablo 2. Östrüs ve diöstrüs dönemlerinde, inek uterusunda, perimetriyumda belirlenen mast hücre yoğunluğu (0-4 puan).

Seksüel siklus	Tespit sıvısı	Perimetriyum (Hücre yoğunluğu/ Görüntü alanı ± (S \bar{x}))
Östrüs	IFAA (n=20)	3.17 ± 0.15
	NBF (n=18)	2.02 ± 0.21
Diöstrüs	IFAA (n=20)	3.31 ± 0.12
	NBF (n=20)	2.56 ± 0.21



Şekil 12. Östrüs ve diöstrüs dönemlerinde miyometriyumda mm²'de mast hücre sayısı



Şekil 13. Perimetriyumda hücre yoğunluğu

Tartışma ve Sonuç

Rodentlerde, mast hücre heterojenitesinin varlığı kabul edilmekte ve baş dokusu mast hücresi (CTMC) ile mukozal mast hücresi (MMC) olmak üzere iki tip mast hücresi tanımlanmaktadır (5,11,12,15,16,26). Baş dokusu mast hücresinin özellikleri formaldehit tespitine dayanıklı granüller içermesi, granüllerinde heparin bulunması, ratlarda RMCP I içermesi, AB/SO boyama metodunda SO (+) boyanmasıdır. Mukozal mast hücresinin özellikleri ise formaldehit tespitine duyarlı olması, kondroitin sülfat içermesi ve ratlarda RMCP II içermesidir (5,9,11,12,14). Sunulan çalışmada da endometriyum, miyometriyum ve perimetriyumda veriler genel olarak değerlendirildiğinde, % 10 NBF kullanılan kesitlerde toluidin blue boyama ile belirlenen mast hücre sayısının, İFAA kullanılan kesitlere göre belirgin derecede az olduğu ($P < 0.001$) tespit edilmiştir. İnekte, deri ve akciğerde de formaldehit içeren tespit sıvıları kullanıldığında, mast hücre sayısının önemli oranda az olduğu bildirilmiştir (18, 19). Cocchiera ve arkadaşları (27) ise rat uterusunda mast hücrelerinde aldehit blokajının olmadığını ileri sürmektedirler.

Ayrıca, mast hücre heterojenitesi, insanda barsak (28, 29) ile solunum sisteminde (30-32), koyunda barsakta

(33), kanatlıda akciğerde (17), köpekte deride (34) çalışılmış ve formaldehit içeren tespit sıvıları kullanıldığında, dokularda TB ile boyanan mast hücre sayısının daha az olduğu bildirilmiştir. Wingren ve Enerback (35) formalin içeren tespit sıvıları kullanıldığında boya reaksiyonunun engellenmesine, aldehitin protein molekülüne etkisine bağlı olarak oluşan diffüzyon bariyerinin neden olduğunu bildirmektedirler.

Rodentlerde RMCP II içeren mukozal mast hücrelerinin formaldehit tespitine duyarlı oldukları ve boya almadıkları bildirilmiştir (5,11,12,14,16,36). Enerback (37), insanlarda MMC'nin ratlardaki mukozal mast hücrelerinden farklı olarak heparin içerdiğini, fakat yine de boya bağlayan MMC proteoglikanlarında aldehit blokajının oluştuğunu bildirmektedir.

Ratlarda sindirim sisteminde mast hücreleri için AB/SO kombine boya metodu kullanıldığında CTMC'lerin safranin (+), MMC'lerinin ise AB (+) granüller içerdiği bildirilmektedir (11,12). İmmunofloresan yöntemlerle ratlarda ince barsaklarda submukozada (38), immunohistokimyasal yöntemlerle deri, dil, barsak serozası ve akciğer parenşiminde (14) CTMC'nin RMCP I içerdiği tespit edilmiştir. Rat barsağında (39) ve bronş epitelinde (14) bulunan MMC'lerinin ise RMCP II içerdikleri kaydedilmiştir. Rodentlerde safranin O'nun heparine bağlandığı bildirilmektedir (12,40). Bununla birlikte ineklerde akciğer dokusunda çalışan Chen ve arkadaşları (18), AB/SO boyama metodu uygulandığında mast hücrelerinin AB (+) olduğuna dikkati çekmişlerdir. Sunulan çalışmada da AB/SO boyama metodu uygulandığında inek dokusunda mast hücrelerinin SO (-) olduğu gözlenmiştir. SO (+) hücrenin olmaması uterusda baş dokusu mast hücrelerinin olmadığı veya mast hücrelerinin heparin içermediği anlamına gelmemelidir. Chen ve arkadaşlarının da bildirdiği gibi (18), safranin boyası inek dokusunda çalışmıyor olabilir. İFAA ile tespit edilmiş dokularda endometriyum ve perimetriyumdaki mast hücrelerinin AB ile miyometriyumdaki mast hücrelerinden daha koyu boyandıkları, miyometriyumdaki mast hücrelerinin ise çok soluk AB (+) reaksiyon verdikleri gözlemlendi. NBF ile tespit edilmiş dokularda da nadir olarak çok soluk boyanan AB (+) hücrelere rastlandı.

Ratlarda yapılan bir çalışmada (40) başdokusu mast hücrelerinin kondroitin sülfat da içerdikleri bildirilmiştir. Koretou (16) da ratlarda peritoneal mast hücrelerinde çok az miktarda AB (+) granüllerin varlığından

bahsetmektedir. Yapılan çalışmada, inek uterusunda bağ dokusu mast hücreleri olarak kabul edilebilecek hücrelerde, örneğin miyometriyumda damarların çevresinde bulunan hücrelerde, çok soluk da olsa AB (+) granüller gözlenmiştir. Ratlarda peritoneal mast hücrelerinin proteaz I içeriği üzerinde çalışan Koretou (16), toluidin blue O (pH 4), alcian blue-safranin kombine boya metodu ve elektron immunohistokimyasal metotlarla elde ettiği sonuçları karşılaştırarak safranin-pozitif granüllerin fazla miktarda RMCP I içerdiğini, alcian blue-pozitif granüllerin ise çok az miktarda veya hiç RMCP I içermediğini tespit etmiştir. Yine ratlarda solunum sisteminde çalışan Wilkes ve arkadaşları (36) birbirini takip eden kesitlere AB/SO ve immunperoksidaz uyguladıklarında AB (+) hücrelerin RMCP II, AB (+) ve SO (+) granül içeren hücrelerin ise RMCP I bulduklarını bildirmişlerdir.

Mast hücrelerinin yerleştikleri bölgelerin, morfolojik ve histokimyasal özelliklerinin farklı olması fonksiyonel farklılığı da düşündürmektedir. Walls ve arkadaşları (31), normalle karşılaştırıldığında formaldehite duyarlı mast hücresi sayısının bronşiyal karsinom, sarkoidozis, ekstrasik allerjik alveolitis, kriptojenik fibrosing alveolitis ve mikobakteriyel enfeksiyonlarda, özellikle interstisyel akciğer hastalıklarında arttığını bildirmişlerdir. Ratlarda (13,26) ve farelerde (41) sindirim sisteminde nematod enfeksiyonlarının mukozal mast hücrelerinin sayısını arttırdığı tespit edilmiştir.

Rodentlerde yapılan çalışmalarda (42-44) östrüs siklusu boyunca mast hücre sayılarının değiştiği kaydedilmiştir. Gosden ve arkadaşları (45) ise ratlarda uterusda RMCP I konsantrasyonunun RMCP II'den daha fazla olduğunu tespit etmiş ve konsantrasyonlarının östrüs siklusu boyunca değişmediğini bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmada, IFAA ile tespit edilen dokularda, endometriyumda belirlenen değerlerin miyometriyumda belirlenenlerden daha fazla olduğu, fakat sadece diöstrüsde belirlenen farklılığın anlamlı olduğu görüldü ($P<0.05$). Bu sonuç, mast hücrelerinin geç proöstrüs ve erken diöstrüsde maksimum düzeye ulaştığını bildiren araştırmacıların (20) bulguları ile uyumludur. Tibbits ve arkadaşları (21) ise mast hücre sayısının östrüs döneminde en yüksek, metöstrüs ortasında en az sayıda olduğunu ileri sürmektedirler.

Araştırmada, NBF'de tespit edilen dokularda, miyometriyumda endometriyuma göre mast hücre

sayısının daha fazla olduğu belirlendi, fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Ayrıca, NBF kullanılan dokularda miyometriyumda östrüs döneminde diöstrüs dönemine göre daha fazla mast hücresi belirlendi ($P<0.05$).

IFAA'de tespit edilen dokularda, endometriyumda miyometriyuma göre mast hücresinin fazla olması ve diöstrüsde bu fazlalığın anlamlı olmasından, formaldehite duyarlı mast hücrelerinin endometriyumda yoğunlaştığı ve burada etkili olduğu sonucu çıkarılabilir. Ayrıca, NBF'de tespit edilen dokularda, miyometriyumda diöstrüs dönemine göre östrüs döneminde daha fazla mast hücresinin bulunmasından da, formaldehite dirençli mast hücrelerinin miyometriyumda özellikle östrüs döneminde etkili olduğu sonucu çıkarılabilir. Maraspin ve Walter (44) ise östrojen uygulandığında miyometriyumdaki mast hücrelerinin azaldığını bildirmişlerdir.

Yapılan araştırmada perimetriyumda da oldukça fazla mast hücresinin bulunduğu ve tespitler arasındaki farkın önemli olduğu ($P<0.001$) görülmüştür. Perimetriyumda östrüs ve diöstrüs dönemlerinde belirlenen değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

İnekte, akciğer dokusunda bulunan mast hücrelerinde elektron yoğun ve daha az yoğun olup ince granüler matrikse sahip olan granül tipleri bildirilmektedir (18). Sunulan çalışmada da granüllerin farklı büyüklüklerde ve farklı yoğunluklarda olduğu gözlemlendi. Bir kısmı elektron yoğun matriks, bazıları da daha az yoğun ve ince granüler matriks içermekteydi. İnsanlarda belirlenen tomar şeklinde, lamelli veya kafes tipindeki granüller (46,47), ne inek akciğer ve derisinde yapılan çalışmalarda (18,19) ne de yapılan bu çalışmada tespit edilememiştir.

Araştırma sonunda, inek uterusunda, östrüs ve diöstrüs dönemlerinde endometriyum, miyometriyum ve perimetriyumda mast hücresi dağılımı belirlendi. Farklı şekil ve büyüklüklerde olan mast hücrelerinin elektron yoğun matriks, daha az yoğun ve ince granüler matriks içeren granüllerinin olduğu görüldü. Mast hücrelerinin TB (+), AB (+) ve SO (-) reaksiyon verdikleri tespit edildi. Uterus dokusunda mast hücresi dağılımı genel olarak incelendiğinde, IFAA tespit sıvısı kullanılan dokularda, formaldehit içeriği daha yoğun olan NBF kullanılan dokulara göre önemli oranda mast hücre sayısının fazla olduğu görüldü. Farklı oluşturan ve NBF kullanıldığında aldehit blokajı olduğundan dolayı yeterince boya

almayan, başka bir deyişle formaldehite duyarlı, mukozal mast hücresi olarak değerlendirilebileceğimiz hücrelerin endometriyumda yoğunlaştıkları tespit edildi. IFAA kullanıldığında endometriyumda, diöstrüs döneminde östrüs dönemine göre daha fazla mast hücresi belirlendi. NBF kullanılan dokularda, miyometriyumda belirlenen mast hücre sayısının diöstrüs dönemine göre östrüs döneminde daha fazla olduğu dikkati çekti. Perimetriyumda, östrüs ve diöstrüs dönemlerinde belirlenen mast hücresi yoğunluk farkının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.

Sonuç olarak, inek uterusunda, mast hücrelerinin histolojik ve histokimyasal özellikleri belirlendi. Farklı

tespit sıvıları kullanılarak, mast hücrelerinin dokudaki dağılımları tespit edildi ve inek uterusunda mast hücreleri üzerinde, boyanma açısından aldehit blokajı oluştuğuna karar verildi. Elde edilen bulgulara dayanılarak, inek uterusunda bulunan mast hücrelerinde heterojenitenin olduğu kanısına varıldı.

Teşekkür

Bu çalışmada normal olan uterusların belirlenmesindeki yardımlarından dolayı S. Ü. Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Metin M. Kıran'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Arda, M.: İmmunolojik Reaksiyonlarda Fonksiyonları Olan Diğer Hücreler. İmmunoloji. Medisan Yayınevi, 170-172, 1994.
2. Gordon, J. R., Burd, P.R., Galli, S.J.: Mast Cells as a Source of Multifunctional Cytokines. Immunology Today. 1990; 11(12):458-464.
3. Nakano, T. Sonoda, T., Hayashi, C., Yamatodani, A. Kanayama, Y. Yamamura, T., Asai, H., Yonezawa, T. Kitamura, Y., Galli, S.J.: Fate of Bone Marrow-Derived Cultured Mast Cells After Intravenous Transfer into Genetically Mast Cell-Deficient W/W^v Mice. J. Exp. Med. 1985; 162:1025-1043.
4. Kitamura, Y., Kanakura, Y., Sonoda, S., Asai, H., Nakano, T.: Mutual Phenotypic Changes Between Connective Tissue Type and Mucosal Mast Cells. Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 1987; 82: 244-248.
5. Irani, A.M.A., Schwartz, L.B.: Mast Cell Heterogeneity. Clin and Exp. Allergy, 1989; 19: 143-155.
6. Galli, S. J.: New Insights into "The Riddle of the Mast Cells": Microenvironmental Regulation of Mast Cell Development and Phenotypic Heterogeneity. Lab Invest. 1990; 62(1):5-33.
7. Smith, T.J. and Weis, J. H. : Mucosal T Cells and Mast Cells Share Common Adhesion Receptors. Immunology Today, 1996; 17 (2): 60-63.
8. Katz, H.R., Stevens, R.L., Austen, K.F.: Heterogeneity of Mammalian Mast Cells Differentiated in vivo and in vitro. J. Allergy Clin. Immunol. 1985; 76: 250-259.
9. Huntley, J.F.: Mast Cells and Basophils: A Review of Their Heterogeneity and Function. J. Comp. Path. 1992; 107:349-372.
10. Engelberg, H.: Probable Physiologic Functions of Heparin. Federation Proc. 1977;36 (1)70-72.
11. Enerback, L.: Mast Cells in Rat Gastrointestinal Mucosa. I. Effect of Fixation. Acta Path. et Microbiol. Scandinav. 1966;66:289-302.
12. Enerback, L.: Mast Cells in Rat Gastrointestinal Mucosa. II. Dy-Binding and Metachromatic Properties. Acta Path. et Microbiol. Scandinav. 1966; 66: 303-312.
13. Befus, A.D., Pearce, F.L., Gauldie, J. Horsewood, P., Bienenstock, J.: Mucosal Mast Cells. I. Isolation and Functional Characteristics of Rat Intestinal Mast Cells. J. Immunol. 1982; 128, 6:2475-2480.
14. Gibson, S., Miller H.R.P.: Mast Cell Subsets in the Rat Distinguished Immunohistochemically by Their Content of Serine Proteinases. Immunology. 1986; 58: 101-104.
15. Tas, J., Brendsen R.G. Does Heparin Occur in Mucosal Mast Cells of the Rat Small Intestine? J. Histochem. Cytochem. 1977; 25(9):1058-1062.
16. Koretou, O. : Relationship Between the Staining Property of Mast Cell Granule with Alcian Blue-Safranin O and Toluidine Blue O, and the Content of Mast Cell Protease I in the Granule of Rat Peritoneal Mast Cell. Acta Histochem. Cytochem. 1988; 21, 1: 25-32
17. Ribatti D., Contino, R., Quondametteo, F., Formica, V., Tursi, A.: Mast Cell Populations in the Chick Embryo Lung and Their Response to Compound 48/80 and Dexamethasone. Anat. Embryol. 1992; 186: 241-244.
18. Chen, W., Alley, M.R., Manktelow, B.W., Slack, P.: Mast Cells in the Bovine Lower Respiratory Tract: Morphology, Density and Distribution. Br. Vet. J. 1990;146 (5) :425-436
19. Hunt, T. C., Campbell, A.M., Robinson, C., Holgate, S.T.: Structural and Secretory Characteristics of Bovine Lung and Skin Mast Cells: Evidence for the Existence of Heterogeneity. Clin. and Exp. Allergy. 1991; 21: 173-182.
20. Likar, I. N., Likar, L.J.: Acid Mucopolisaccharides and Mast Cells in the Bovine Uterus at Different Stages of the Sexual Cycle. Acta Endocrinol. 1964; 46: 493-506.
21. Tibbits, F.D., Formigli, L., Del Vecchio, R.P., Foote, W.D., Randel, R.D.: A Suggested Role for Mast Cell Heparin in Prostaglandin Synthesis in Bovine Endometrium. Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science. 1989; 40: 337-338.
22. Rüschoff, J.: Methoden der lichtmikroskopischen Morphometrie. In der Romeis Mikroskopische Technik (Denk, H., Künzle, H., Plenk, H., Rüschoff, J. Und Sellner, W. Eds.). Urban und Schwarzenberg. München, Wien, Baltimore, 1989 Pp:327-338.

23. Blalock, T.L., Thaxton J.P. and Garlich, J.D. Humoral Immunity in Chicks Experiencing Marginal Vitamin B-6 Deficiency. *J. Nutr.* 114, 312-322.
24. Karnovsky, M.J. A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy. *J. Cell Biol.* 1965;27:137-148.
25. Venable, J.H. and Coggeshall, R.: A Simplified Lead Citrate Stain for Use in Electron Microscopy. *J. Cell Biol.* 1965; 25:407-408.
26. Woodbury, R.G., Miller, H.R.P., Huntley, J.F., Newlands, G.F.J., Palliser, A.C., Wakelin, D.: Mucosal Mast Cells are Functionally Active During Spontaneous Expulsion of Intestinal Nematode Infections in Rat. *Nature.* 1984; 312 (29): 450-452.
27. Cocchiara, R., Albeggiani, G., Trapani, G.D., Azzolina, A., Lampiassi, N., Cervello, G., Geraci, D.: Dispersal of Rat Uterine Mast Cells and Their Functional Response to an Embryo-Derived Histamine Releasin Factor: A Possible Model for Embryo Implantation. *J. Reprod. Immunol.* 1988; 14: 191-201.
28. Strobel, S., Miller, H.R.P., Ferguson, A. : Human Intestinal Mucosal Mast Cell: Evaluation of Fixation and Staining Techniques. *J. Clin. Pathol.* 1981; 34:851-853.
29. Ruitenberg, E.J., Gustowska, L. Elgersma, A., Ruitenberg, H.M.: Effect of Fixation on the Light Microscopical Visualization of Mast Cells in the Mucosa and Connective Tissue of the Human Duodenum. *Int. Archs Allergy Appl. Immun.* 1982; 67: 233-238.
30. Pipkorn, U., Karlsson, G., Enerback, L.: Phenotypic Expression of Proteoglycan in Mast Cells of the Human Nasal Mucosa. *Histochem. J.* 1988; 20: 519-525
31. Walls, A.F., Roberts, J.A., Godfrey, R.C., Church, M.K., Holgate, S.T. : Histochemical Heterogeneity of Human Mast Cell: Disease-Related Differences in Mast Cell Subsets Recovered by Bronchoalveolar Lavage. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1990; 92:233-241.
32. Pesci, A., Foresi, A., Bertorelli, G., Chetta, A., and Oliveri, D.: Histochemical Characteristics and Degranulation of Mast Cells in Epithelium and Lamina Propria of Bronchial Biopsies from Asthmatic and Normal Subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993; 147:684-689.
33. Huntley, J.F., Newlands, G., Miller, H. R.:The Isolation and Characterization of Globule Leucocytes: Their Derivation from Mucosal Mast Cells in Parasitized Sheep. *Parasite Immunology* 1984;6 (4):371-390.
34. Becker, A.B., Chung, K.F., Mc Donald, D.M., Lazarus, S.C., Frick, O.L. Gold, W.M.: Mast Cell Heterogeneity in Dog Skin. *The Anat. Record.* 1985;213:477-480.
35. Wingren, U., Enerback, L. : Mucosal Mast Cells of the Rat Intestine: A Re-evaluation of Fixation and Staining Properties, With Special Reference To Protein Blocking and Solubility of the Granular Glycosaminoglycan. *Histochem. J.* 1983; 15: 571-582.
36. Wilkes, L.K., McMenamin, C., and Holt, P.G.: Postnatal Maturation of Mast Cell Subpopulations in the Rat Respiratory Tract. *Immunology.* 1992; 75: 535-541.
37. Enerback, L.: Mucosal Mast Cells in the Rat and in Man. *Int. Archs Allergy Appl. Immun.* 1987;82:249-255.
38. Woodbury, R.G., Gruzenski, G. Lagunoff, D.: Immunofluorescent Localization of a Serine Protease in Rat Small Intestine. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 1978; 75:2785-2789.
39. Woodbury, R.G. Miller H.R.P. : Quantitative Analysis of Mucosal Mast Cell Protease in the Intestines of Nippostrongylus-Infected Rats. *Immunology.* 1982; 46:487-495.
40. Tainsh, K. R., Pearce, F.L.: Mast Cell Heterogeneity: Evidence that Mast Cells Isolated from Various Connective Tissue Locations in the Rat Display Markedly Graded Phenotypes. *Int. Arch. Allergy, Immunol.* 1992; 98: 26-34.
41. Guy-Grand D., Dy M., Lufau G.,Vassalli P.: Gut Mucosal Mast Cells. Origin, Traffic, and Differentiation. *J.Exp.Med.* 1984; 160: 12-28.
42. Brandon, J.M., Evans, J.E. : Changes in Uterine Mast Cells During the Estrous Cycle in the Syrian Hamster. *The Am. J. Anat.* 1983; 167: 241-247.
43. Padilla, L., Reinicke, K., Montesino, H., Villena, F., Asencio, H., Cruz, M., Rudolph, M.I.: Histamin Content and Mast Cell Distribution in Mouse Uterus: The Effect of Sexual Hormones, Gestation and Labor. *Cell. and Mol. Biol.* 1990; 36 (1): 93-100.
44. Maraspin, L.E., Walter, J.B.: Effects of Hormones, Pregnancy on the Mast Cell Count in the Rat Uterus. *Life Sci.* 1971; 10: 111-120.
45. Gosden, R. G., Huntley, J.F. Douglas, A., Inglis, L., Miller, H.R.P.: Quantitative and Cytochemical Studies of Mast Cell Proteases in Rat Ovaries and Uteri in Various Reproductive States. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 98: 557-582.
46. Orr, T.S. C.: Fine Structure of the Mast Cell with Special Reference to Human Cells. *Scand. J. Resp. Disease. Suppl.* 1977; 98.1-7.
47. Drudy, L., Sheppard, B.L. and Bonnar, J.: The Ultrastructure of Mast Cells in the Uterus Throughout the Normal Menstrual Cycle and the Post Menopause. *J. Anat.* 1991; 175: 51-63.