

İskemi-Reperfüzyon Uygulanan Sıçan Jejunum Goblet Hücrelerinin Morfolojik ve Sayısal Değişimi

The Morphological and Numeral Changes of Goblet Cells in the Jejunum of Ischemia-Reperfusion Applied Rats

Meral DAĞ,^a
Dr. Meltem KURUŞ,^a
Dr. Gökhan SÖĞÜTLÜ,^b
Dr. Mukaddes EŞREFOĞLU,^a
Dr. Feral ÖZTÜRK,^a
Saim YOLOĞLU,^c
Dr. Ali OTLU^a

^aHistoloji-Embriyoloji AD,
^bGenel Cerrahi AD, ^cBiyostatistik AD,
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Malatya

Geliş Tarihi/Received: 19.11.2008
Kabul Tarihi/Accepted: 14.02.2009

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Meltem KURUŞ
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji-Embriyoloji AD,
Malatya,
TÜRKİYE/TURKEY
histomelita@yahoo.com

ÖZET Amaç: Bu çalışmada deneysel iskemi ve reperfüzyon hasarı oluşturularak jejunumda bulunan goblet hücrelerinin geçirdiği sayısal ve morfolojik değişimlerin incelenmesi amaçlandı. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışmada Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlar rastgele sekiz adet denekten oluşan dört gruba ayrıldı, gruplar; kontrol, açma-kapama (sham), iskemi (15 dk) ve iskemi ve reperfüzyon (İ/R, 15 dk İ/15 dk R) grupları olarak düzenlendi. Deneyin sonunda denekler sakrifiye edilerek jejunum dokuları çıkarıldı. Morfolojik değerlendirme için gerekli işlemler uygulandı. **Bulgular:** İskemi grubunda, villusların yarıklandıktan subttotal atrofiye kadar giden morfolojik değişiklik gösterdiği, villus boylarının kısaldığı saptandı. Villus goblet hücrelerinin hem sayılarının azaldığı, hem de boyutlarının küçüldüğü tespit edilirken, kript goblet hücre sayısının kontrol grubuyla benzer olduğu, boyutlarının ise küçüldüğü gözlemlendi. İ/R grubunda; iskemi grubunda gözlenen hasara ait bulgular azalırken, villus boyu kısalmasının devam ettiği tespit edildi. Bu grupta villus goblet hücre sayısı normalden, kript goblet hücre sayısının azaldığı, villus ve kriptlerdeki goblet hücre boyutlarının ise küçüldüğü saptandı. **Sonuç:** İskemide, villus goblet hücrelerinin lümenine dökülme nedeniyle azaldığı ve kalan goblet hücrelerinin kript bazallerinden maturasyonlarını tamamlamadan geldiği için küçük görüldüğü, İ/R sürecinde ise kriptlerden villuslara gelen goblet hücreleri nedeniyle villus goblet hücre sayısının normale döndüğü, kript goblet hücre sayısının azaldığı, yine goblet hücrelerinin maturasyonlarını tamamlamadıkları için küçük görüldüğü sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Reperfüzyon hasarı; iskemi; goblet hücresi; jejunum

ABSTRACT Objective: In this study, we aimed to investigate the numeric and morphological changes of goblet cells after experimental ischemia and reperfusion damage. **Material and Methods:** In our study, male Sprague Dawley rats were randomly divided into four groups being eight rats in each group. Groups were: control, sham, ischemia (15 minutes) and ischemia-reperfusion groups (I/R, 15 min. I/15 min.R). After the experiment, all rats were sacrificed and their jejunums were taken out. All the necessary procedures were carried out for morphological evaluation. **Results:** In the ischemia group, villi morphological changes from splitting up to atrophy, and were shorter; goblet cells were found to show reduction both in number and size. On the other hand, it was found that goblet cells in the crypts showed no change in number but in size. Findings in the I/R group were milder than the ischemia group, but the sizes of villi were found smaller in this group. While the number of goblet cells in the villi was normal, it was decreased in the crypts and the sizes of goblets both in the villi and in the crypts were reduced. **Conclusion:** We thought that during the ischemia, the number of goblets were decreased since they fall into the lumen. The rest were small because they came from the basis of the crypts; during the I/R procedure, the number of cells turned to normal because of the arrival of the goblets from the crypts to the villi. However, in this way the number in them in the crypts decreased and they looked small due to incomplete maturation.

Key Words: Reperfusion injury; ischemia; goblet cells; jejunum

Ince barsaklarda emilim yapan hücreler arasında bulunan goblet hücreleri salgı granülleriyle doludur ve salgıladıkları mukus sayesinde lümenal içerikle epitel yüzey arasında bir koruyucu bir tabaka oluştururlar.¹⁻⁴ Miler ve ark. 1981'de parazitik,⁴ Cohen ve ark. 1983'de bakteriyel enfeksiyonların,⁵ Roomi ve ark. 1984'de toksinlerin,⁶ ve son olarak da Mantle ve ark. 1989 da doğal barsak florasının⁷ goblet hücrelerinden mukus salınımını uyardığını bulmuşlardır.

İnce barsaklara gelen kan akımının çeşitli nedenlerle yetersiz hale gelmesi veya durması nedeniyle oluşan akut veya kronik barsak iskemisi önemli bir klinik problemdir ve tüm yaş grubunda görülme riski vardır.⁸⁻¹⁰ İskemi, mukozada dökülmeye, bariyer disfonksiyonuna ve bakteriyel translokasyona neden olur. Bu durumda endotel hücrelerinin şişmesiyle kapiller tıkanıklık gelişir ve sonuçta bağırsak kan akımı azalır.⁸ Doku kanlanmasının yeniden başlaması olan reperfüzyon ise, paradoksal bir şekilde ilave doku hasarına yol açan hücrel ve biyokimyasal olayları başlatır.^{8,11,12}

Bugüne kadar ince barsaklardaki goblet hücrelerinin bakteriyel, virutik ve parazitik enfeksiyonlardaki görevi açık olarak ortaya konmuş olmasına rağmen, iskemi/reperfüzyon (İ/R) gibi ince barsak kan akımının kısmi ya da tamamen bozulduğu durumlardaki rolü tam olarak anlaşılamamıştır.¹³ Bazı araştırmacılar, goblet hücrelerinin ince bağırsakların yüzeyel İ/R hasarında, onarım sürecinin tamamında görev aldığını ifade ederken,¹⁴ bazı araştırmacılar intestinal İ/R'da ilk saatlerde goblet hücrelerinin arttığını, bu durumun da hem iskemi hem de reperfüzyon hasarında mukozayı tamir etmek amaçlı olduğunu rapor etmişlerdir.^{8,15}

Literatürde ince bağırsak goblet hücre boyutlarını ortaya koyan bir çalışma yoktur. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda goblet hücrelerinin tamir mekanizmalarındaki rolü araştırılmış, ancak bu rolün morfolojik ve sayısal yansıması incelenmemiştir. Bu yüzden yaptığımız çalışmada hem normal şartlarda, hem de iskemi ve reperfüzyon olduğunda, sıçan jejunumundaki goblet hücrelerinin sayısal ve morfolojik olarak ışık mikroskopik düzeyde incelenmesi amaçlandı. Bu bilgilerden yola çıkarak iskemi ve reperfüzyon hasarında goblet hücrelerin-

de gerek morfolojik gerekse sayısal değişiklikler olacağı ve bu değişikliklerin goblet hücrelerinin mukozaya tamirinde görev aldığı bir göstergesi sayılabileceği düşünüldü.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma laboratuvarından temin edilen, ağırlıkları yaklaşık olarak 344-365 gram arasında değişen, 32 adet sağlıklı erişkin Sprague Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 21 gün süresince havalandırması olan, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık gün ışığı ritmindeki odada, özel kafesler içinde standart pellet yem ile beslendiler ve çeşme suyu aldılar. Hayvan hakları 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' prensipleri doğrultusunda korundu ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulundan onay alındı (etik kurul no: 2006/001). 21. günün sonunda denekler rastgele olarak sekizer hayvandan oluşan dört gruba ayrıldı. Gruplar; 1.Grup: Kontrol grubu; 2.Grup: Açma-kapama (sham) grubu; 3.Grup: İskemi grubu; 4.Grup: İskemi/reperfüzyon grubu olarak düzenlendi.

CERRAHİ YÖNTEM

1. Grup: Kontrol grubu; Bu gruba herhangi bir işlem yapılmadı.

2. Grup: Açma-kapama (Sham grubu); Bu gruptaki deneklerin abdomenlerine orta hat kesisi yapıldı. Peritonlarına %0.9'luk NaCl (SF) verilerek bağırsaklarının kuruması engellendi. On beşinci dk'nın sonunda deney sonlandırıldı (İskemi ve reperfüzyon oluştururken kesiye bağlı herhangi histopatolojik değişiklik olup olmadığını gözlemek amacıyla oluşturulmuştur).

3. Grup: İskemi grubu; Bu gruptaki deneklerin abdomenlerine orta hat kesisi yapıldı. Superior mesenterik arter (SMA) ve SMA'nın kollateralleri olan sağ kolik ve jejunal arterler proksimallerinden 15 dk boyunca klemplenerek iskemi oluşturuldu. Bu sürenin bitiminde deney sonlandırıldı.

4. Grup: İskemi/reperfüzyon grubu; Bu grupta deneklere önce orta hatta abdominal kesi yapıldı ve SMA'leri bulundu. SMA, sağ kolik ve jejunal arterler proksimalinden klemplenerek 15 dk iskemi

uygulandı. Ardından klempeler açılarak 15 dk boyunca bekledi ve deney sonlandırıldı.

HİSTOLOJİK YÖNTEM

Deneyin sonunda servikal dislokasyon tekniği uygulanarak denekler öldürüldü. Açılan abdominal insizyonla jejunumlar çıkarıldı. Elde edilen jejunumlar duodenuma yakın baş ve ileuma yakın son kısımları çıkarılarak nötral tamponlanmış formaldehit fiksatifinde tespit edildi. Alınan bu parçanın orta kısmından kesilen 1 cm'lik doku kesiti takip işlemlerinden geçirildi. Parafin bloklar hazırlanıp 4-5 mikron kalınlığında üç seri kesit alındı. Seri kesitlerin birincisine dokunun genel histolojik yapısı hakkında bilgi edinilebilmesi için Mayers'in hematoksilen-eozin boyaması (H&E) uygulanırken, ikinci seri kesit goblet hücrelerinin rahat sayılabilmesi için alsian mavisi (AB) boyama metoduyla boyandı. Üçüncü seri kesite goblet hücrelerinin salgı içeriği farkının ayırt edilebilmesi için alsian mavisi/periodyk asid-shif (AB/PAS) boyaması uygulandı. Seri kesitler bu şekilde devam etti.

Elde edilen preparatlarda, her grup için 100 adet villus boyu ölçüldü ve her gruptaki ortalama villus boyu yüksekliği hesaplandı. Diğer taraftan her denek başına 25 adet villus ve 25 adet kripte ki goblet hücreleri sayıldı. Ardından gruplara göre bir villusdaki ve bir kriptteki goblet hücresi sayısı hesaplandı. Her denekte villuslarda ve kripte lerde bulunan 100 adet goblet hücresinin eni ve boyu ayrı ayrı hesaplandı. Tüm bu incelemeler Leica DFC 280 ışık mikroskobu ve Leica Q Win Plus analiz sistemi kullanılarak gerçekleştirildi.

İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Çalışmamızda elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS for Windows Version 13.0 is-

tatistiksel yazılım paket programı kullanılarak yapıldı. Veriler ortanca, (min-max) olarak sunuldu. Ölçülebilir verilerin Shapiro Wilk normallik testi ile normal dağılım göstermediği saptandı ($P < 0.05$). Bu nedenle grupların genel karşılaştırmalarında parametrik olmayan testlerden Kruskal Wallis varyans analizi kullanıldı. İkili karşılaştırmalarda ise Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Villus yüksekliği, villus goblet hücre sayısı, kripte goblet hücre sayısı, villus goblet hücre eni ve boyu, kripte goblet hücre eni ve boyunun gruplara göre dağılımı tablo (Tablo 1) ve grafik şeklinde (Şekil 1, 2, 3) sunulmuştur.

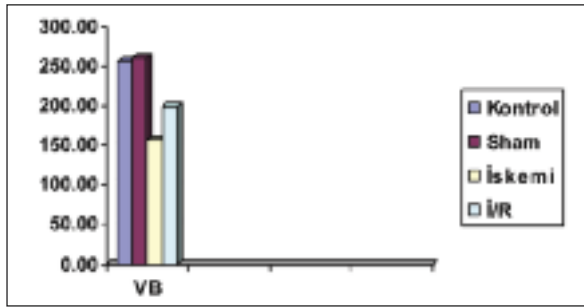
1.Grup: Kontrol grubu; Jejunum preparatları incelendiğinde normal histolojiyle uyumlu olarak; bağırsak villus boylarının hemen hemen aynı seviyede olduğu [villus boyu ortancası 255.31 ve min – max değeri (248.12-420.45) μm], epitelin kesintiye uğramadığı, epitelde yerleşim gösteren ve mukus salgılayan goblet hücrelerinin kadeh şeklinde olduğu tespit edildi. Bu grupta bir villusda bulunan goblet hücresi sayısı 34.5 (25-39) iken, goblet hücresinin eni 12.71 (9.31-18.22) μm , boyu 15.50 (11.11-23.22) μm idi. Lamina propriyada bulunan kripte lerin tek katlı epitel ile döşeli olduğu ve burada da goblet hücrelerinin bulunduğunu gözlemlendi. Kontrol grubunda bir kriptte bulunan goblet hücresi sayısı 7.1 (6-10), goblet hücresinin eni 6.90 (3.39-11.18) μm , boyu 6.95 (2.98-11.13) μm idi.

Goblet hücresi mukus içeriğini ayırt etmek amacıyla uyguladığımız AB/PAS boyamasıyla yapılan incelemede; hem kripte lerde, hem de villus-

TABLO 1: Villus yüksekliği, villus GH sayısı, kripte GH sayısı, villus GH eni ve boyu, kripte GH eni ve boyunun gruplara göre karşılaştırılması.

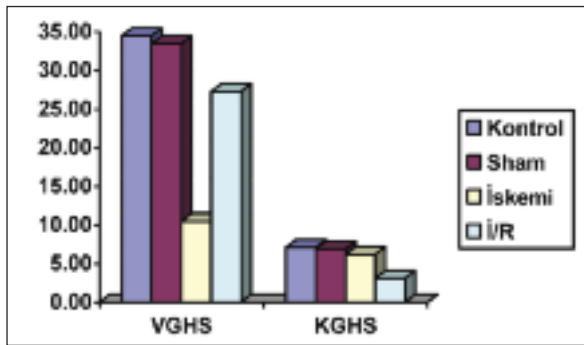
Gruplar	Villus Yüksekliği (μm)	Villus GH Sayısı	Kripte GH Sayısı	Villus GH Eni (μm)	Villus GH Boyu (μm)	Kripte GH Eni (μm)	Kripte GH Boyu (μm)
Kontrol	255.31 (248.12-420.45)	34.5 (25-39)	7.1 (6-10)	12.71 (9.31-18.22)	15.50 (11.11-23.22)	6.90 (3.39-11.18)	6.95 (2.98-11.13)
Sham	260.14 (240.19-417.43)	33.5 (24-38)	6.9 (7-11)	12.70 (9.01-14.50)	15.80 (11.44-23.99)	6.87 (3.41-10.63)	6.98 (2.97-11.11)
İskemi	157.62 ^{ab} (60.41-415.46)	10.5 ^{ab} (4-18)	6.2 (4-10)	11.45 ^{ab} (6.38-16.44)	14.94 ^{ab} (10.95-21.53)	5.90 ^{ab} (0.94-9.04)	5.92 ^{ab} (0.96-9.01)
İ/R	198.61 ^{abc} (97.14-414-19)	27.3 ^c (23-38)	3.1 ^{abc} (1-5)	11.22 ^{ab} (7.11-16.22)	14.27 ^{ab} (9.41-18.71)	5.41 ^{ab} (0.71-9.7)	5.42 ^{ab} (0.85-9.02)

GH: Goblet Hücre, a; $P < 0.05$ Kontrol grubunun diğer gruplarla farkı, b; $P < 0.05$ (Açma-Kapama) Sham grubunun diğer gruplarla farkı, c; $P < 0.05$ İskemi grubunun diğer gruplarla farkı



ŞEKİL 1: Villus boyunun gruplara göre dağılımı.

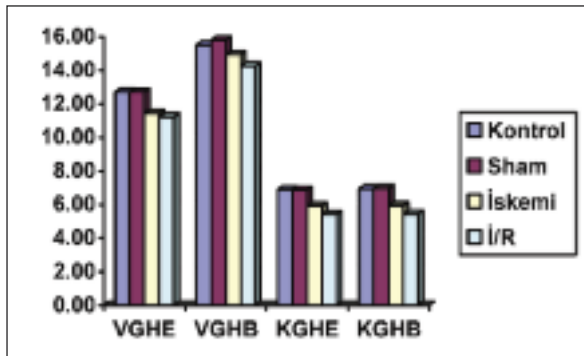
VB: Villus boyu.



ŞEKİL 2: Villus ve kript goblet hücre sayısının gruplara göre dağılımı.

VGHS: Villus goblet hücre sayısı.

KGHS: Kript goblet hücre sayısı.



ŞEKİL 3: Villus ve kript goblet hücre eni ve boyu gruplara göre dağılımı.

VGHE: Villus goblet hücre eni.

VGHB: Villus goblet hücre boyu.

KGHE: Kript goblet hücre eni.

KGHB: Kript goblet hücre boyu.

larda bulunan goblet hücresi mukus içeriğinin aynı yapıda olduğu ve tüm goblet hücrelerinin mor renkte boyandığı gözlemlendi.

2.Grup:Sham grubu; bu gruba ait jejunum dokularının kontrol grubuyla benzer histolojik özellik gösterdiği; villus boylarının aynı seviyede [villus bo-

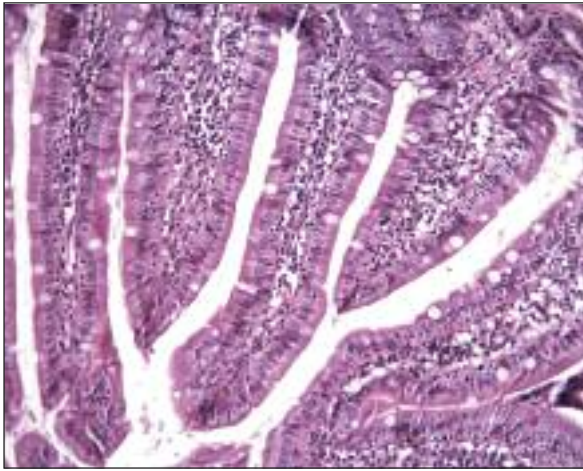
yu 260.14, (240.19-417.43) μm], bir villusda bulunan goblet hücresi sayısının 33.5 (24-38), bu goblet hücrelerinin eninin 12.70 (9.01-14.50) μm , boyunun ise 15.80 (11.44-23.99) μm olduğu saptandı. Yine sham grubunda bir kripte bulunan goblet hücrelerinin sayısı 6.9 (7-11), bu goblet hücrelerinin eni 6.87 (3.41-10.63) μm , boyu 6.98 (2.97-11.11) μm idi. Tüm incelediğimiz parametreler açısından sham grubuyla kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi ($p > 0.05$).

Hem villuslarda, hem de kriplerde bulunan goblet hücrelerinin mukus içeriğinin aynı olduğu, AB/PAS boyamasıyla yapılan incelemede tüm goblet hücrelerinin mor renk boyanması sonucu saptandı (Resim1 A,B,C,D).

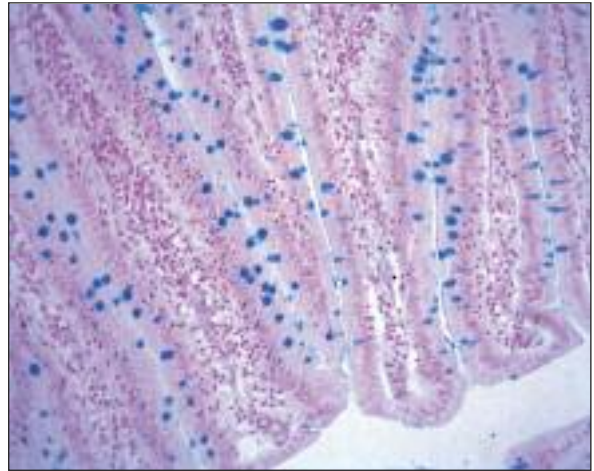
3. Grup: İskemi grubunda yapılan incelemede bazı alanlarda villusların alışılagelmiş parmak şekli yerine yarıklanmalarının olduğu, villus boylarının birbirlerinden çok farklı, kısa, yer yer nekroze veya subtotal atrofiye gitmiş olduğu tespit edildi. Villusların boyu 157.62 (60.41-415.46) μm , bir villusda bulunan goblet hücresi sayısı 10.5 (4-18), bunların eni 11.45 (6.38-16.44) μm , boyu 14.94 (10.95-21.53) μm idi. Bazı villuslarda lamina propriaya hücre infiltrasyonu ve lamina propriaya ait lakteallerde genişleme olduğu gözlemlendi. Diğer taraftan yine iskemi grubunda kript morfolojik yapısının kontrol ve sham grubuyla aynı olduğu tespit edildi. Bir kripte bulunan goblet hücresi sayısı 6.2 (4-10), bu goblet hücrelerinin eni 5.90 (0.94-9.04) μm , boyu 5.92 (0.96-9.01) μm idi. Kontrol grubuyla iskemi grubu; villus boyu, villusdaki goblet hücre sayısı ve bu hücrelerin eni ve boyu ve kriplerdeki goblet hücrelerinin eni ve boyu açısından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcutken (sırasıyla $p = 0.0001$, $p = 0.004$, $p = 0.0001$, $p = 0.0001$, $p = 0.002$, $p = 0.0001$), aynı gruplar arasında kript goblet hücre sayısı açısından istatistiksel fark saptanmadı ($p > 0.05$).

AB/PAS boyamasıyla yapılan incelemede hem villuslarda, hem de kriplerde bulunan goblet hücrelerinin mor renkte olduğu tespit edildi (Resim 2 A,B,C,D).

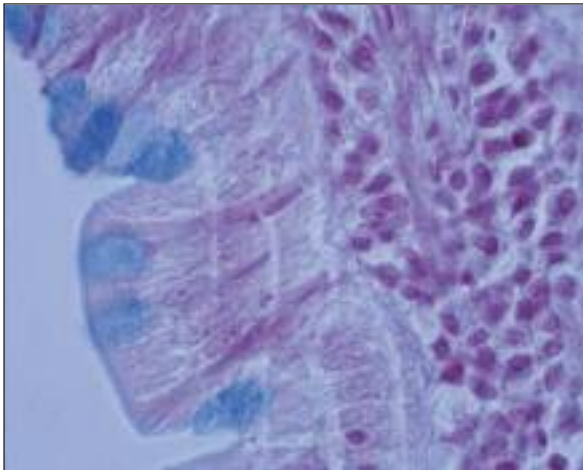
4.Grup: İskemi/reperfüzyon grubu; villus boylarının birbirinden farklı olması, kısalması, subto-



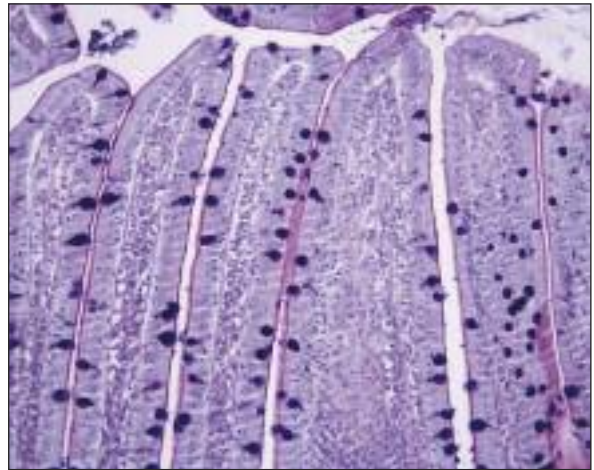
A: Aynı boyda villuslar, seffaf yapı sergileyen goblet hücreleri, çizgili kenarlı epitel yapısı. H&E x20.



B: Villus epitelinde yer alan mavi boyalı goblet hücreleri. Alsiyan mavisix20.



C: Villus epitelde yer alan mavi boyalı goblet hücreleri. Alsiyan mavisix100.

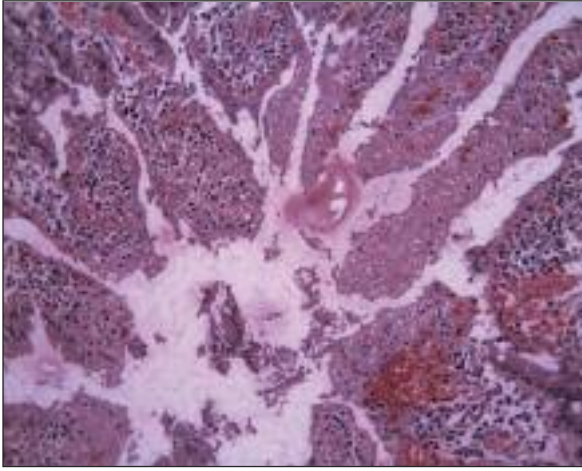


D: Aynı boyda villuslar, çizgili kenar görünümü, epitelde yer alan mor boyalı goblet hücreleri. AB/PAS x20.

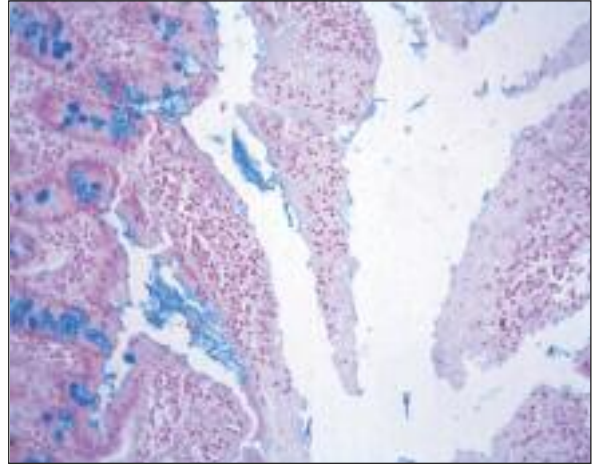
RESİM 1: Sham grubundaki deneklerin jejunum görüntüleri.

tal villus atrofisi, epitel devamlılığının bozulması, epitel hücrelerinin birbirinden ayrılması ve lüme-ne dökülmesi, lamina propriaya hücre infiltrasyonu ve lamina propriaya ait lakteallerde genişleme gibi iskemi grubunda gördüğümüz hasar bulguları İ/R grubunda da söz konusuydu ancak iskemi grubundaki kadar yoğun değildi. Bu grupta bir villusun boyu 198.61 (97.14-414-19) μm iken, bir villusda bulunan goblet hücresi sayısı 27.3 (23-38) idi. Bu goblet hücrelerinin eni 11.22 (7.11-16.22) μm , boyu 14.27 (9.41-18.71) μm idi. Bu gruptaki kripterler iskemi grubundaki gibi kontrol grubundan morfolojik olarak farklı değildi. Bir kripte bulunan goblet hücresi sayısı 3.1 (1-5), bu goblet hücrelerinin eni 5.41 (0.71-9.7) μm , boyu 5.42 (0.85-9.02) μm

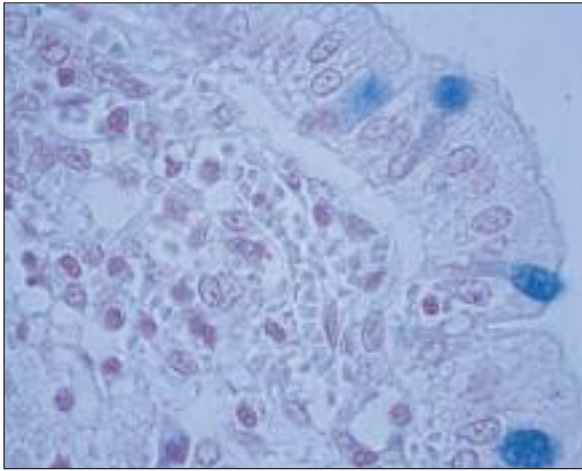
idi. Kontrol grubuyla İ/R grubu; villus boyu, villus goblet hücrelerinin eni, boyu ve kripte goblet hücre sayısı, buradaki goblet hücrelerinin eni ve boyu açısından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcutken (hepsinde $p=0.0001$), aynı gruplar arasında villus goblet hücre sayısı açısından istatistiksel fark saptanmadı ($p>0.05$). İ/R grubunu villus boyu, villus goblet hücre sayısı, kripte goblet hücre sayısı açısından iskemi grubu ile istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda aralarında anlamlı fark mevcutken, (sırasıyla $p=0.0001$, $p=0.002$, $p=0.0001$), aynı gruplar arasında villus goblet hücrelerinin eni, boyu, kripte goblet hücrelerinin eni ve boyu parametreleri açısından anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).



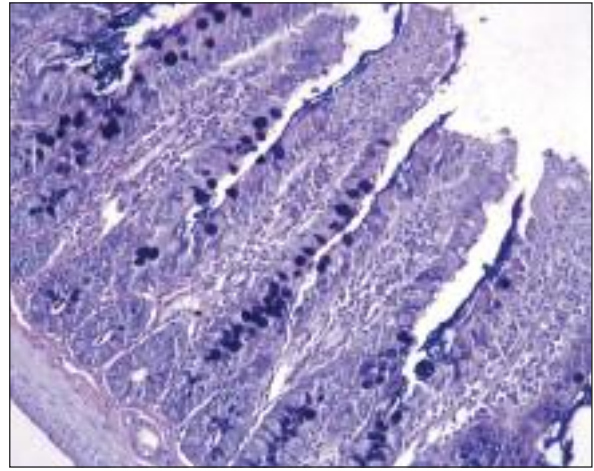
A: Normal villus yapısının bozulması ve villus tepelerinde epitel dökülmesi. H&EX20.



B: Villus yapısının bozulması, villus tepelerinde epitel dökülmesi, kriptlerde mavi boyalı goblet hücreleri ve lümende mavi boyanan mukus. Alsiyan mavisiX20.



C: Mavi boyalı goblet hücreleri ve mavi boyanan mukus. Alsiyan mavisiX100.



D: Epitel devamlılığının kaybı, villuslarda azalmış koyu mor boyalı goblet hücreleri. AB/PASX20.

RESİM 2: İskemi grubundaki sıçanların jejunum görüntüleri.

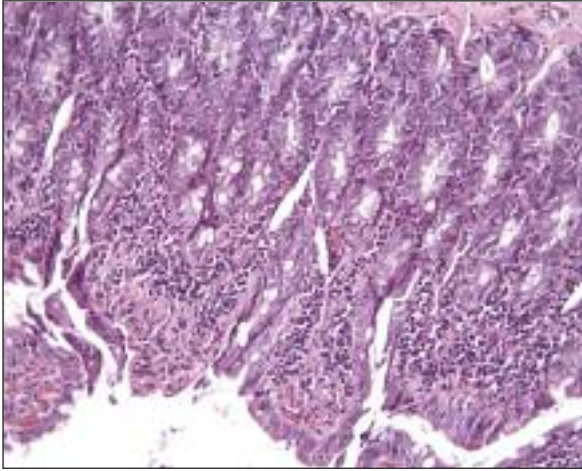
AB/PAS boyamasıyla yapılan incelemede hem villuslarda, hem kriptlerde bulunan goblet hücrelerinin salgı içeriğinin aynı olduğu ve mor renkte boyandıği tespit edildi (Resim 3 A,B,C,D).

TARTIŞMA

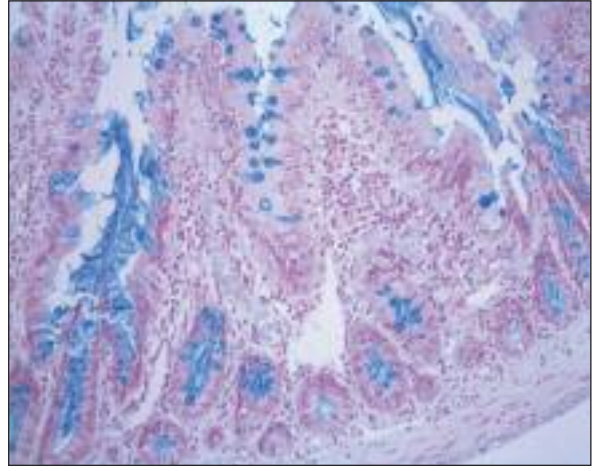
Bu çalışmada deneysel iskemi ve reperfüzyon hasarı oluşturularak jejunumda bulunan goblet hücrelerinin geçirdiği sayısal ve morfolojik değişimlerin incelenmesi amaçlandı. İskemi grubunda; villusların yarıklanmadan subtotal atrofiye kadar giden morfolojik değişiklik gösterdiği, villus boylarının kısaldığı saptandı. Villus goblet hücrelerinin hem sayılarının azaldığı, hem de boyutlarının küçüldü-

ğü tespit edilirken, kript goblet hücre sayısının kontrol grubuyla benzer olduğu, boyutlarının ise küçüldüğü gözlemlendi. İ/R grubunda; iskemi grubunda gözlenen hasara ait bulgular azalırken, villus boyu kısalmasının devam ettiği tespit edildi. Bu grupta villus goblet hücre sayısı normalden, kriptlerde goblet hücre sayısının azaldığı, villus ve kriptlerdeki goblet hücre boyutlarının ise küçüldüğü saptandı.

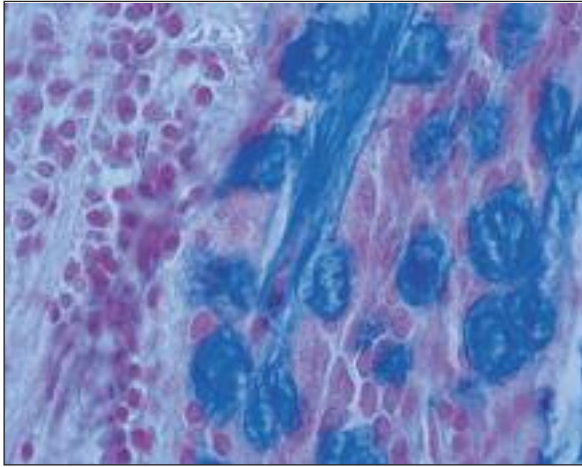
Goblet hücreleri ince bağırsak kripta ve villuslarında bulunan, üretip salgıladıkları mukus sayesinde ince bağırsak mukozasının korunmasında rol alan hücrelerdir.^{1-3,16} Bu hücrelerin ilk olarak kriptlerde oluştuğu ve ardından olgunlaşarak villuslara



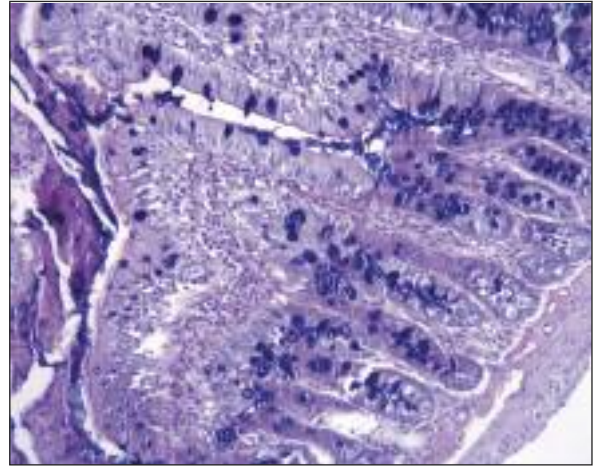
A: İskemi grubuna göre azalmış harabiyet H&EX20.



B: Villus tepelerinde artmaya başlamış mavi renk goblet hücreleri ve lümeninde artmış mukus. Alsiyan mavisiX20.



C: Mavi boyalı goblet hücreleri ve mavi boyanan mukus. Alsiyan mavisiX100



D: Villus tepelerinde ve kript bazallerinde koyu mor boyalı goblet hücreleri, lümede dökülmüş epitel artıkları ve mor mukus. AB/PASX20

RESİM 3: I/R grubundaki sıçanlardan alınan jejunum dokusu

göç ettiği kabul edilir.^{1,16-18} Bugüne kadar yapılan çalışmalarda; ince bağırsak goblet hücre sayısının ve hacminin diyet, mikrobiyal flora, villus boyu ve çevresel faktörlerle son derece bağlantılı olduğu ortaya konmuştur.^{4,16-22}

Bazı araştırmacılar goblet hücrelerinin kriptalardan viluslara göç ederken musinin kimyasal içeriğinin değiştiğini göstermişlerdir.^{13,18} Ancak bu çalışmada musinin kimyasal içeriğini ayırt etmek amaçlı yapılan AB/PAS boyamasında, tüm gruplarda hem kript, hem de villus goblet hücrelerinin mor renkte boyandığı görüldü. Bu bulgularla, standart yemle beslenen erişkin sıçan goblet hücreleri-

nin musin içeriğinin bulunduğu yere göre değişmediğini düşünüldü.

Araştırmacılar gastrointestinal mukoza hasarlarını iki tipe ayırmışlardır; geniş doku nekrozunu içeren derin hasarlar ile, mukozanın üst kısımlarının etkilendiği yüzeysel hasarlar. Normal şartlar altında yüzeysel hasarlar hızlıca tamir edilir, mukoza eski halini alır.²³⁻²⁵ Yapılan çalışmalarla bağırsak kan akımında azalmanın bağırsak iskemisiyle sonuçlandığı¹⁰ ve süresine bağlı olarak yüzeysel veya derin hasarın ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Akut ve kronik bağırsak iskemisi her yaş grubunda görülme riski olan önemli bir klinik problemdir.^{8,10}

Kan akımının azalması mukozada dökülme, bariyer fonksiyon bozukluğu ve bakterilerin üremesine neden olurken endotel hücrelerinin şişmesiyle kapiller tıkanıklık gelişmektedir.²⁶ Bazı çalışmalar sonucunda 15 dk'lık iskemiden sonraki sıfırıncı dakikada destrüksiyonun henüz başlamadığı, ancak normalde parmak şeklinde olan villus şeklinin yarıkları tespit edilmiştir.²⁷

Sıçanda mezenterik kollateral sirkülasyon insandakinin analogu¹⁰ olduğu için bu çalışmada denek olarak sıçan kullanmıştır. Mekanizması ne olursa olsun intestinal iske mi olayın süresiyle direkt ilişkili olarak doku hasarıyla sonuçlanır. Bu çalışmada 15 dk iske mi uygulanan grupta genelde villus yapısında yarıklanmalar olduğu, villus boylarının kısaldığı, hatta villuslarda yer yer subtotal atrofi geliştiği saptanmış, villus tepelerinde iske miye bağlı epitel dökülmesi tüm deney grubunda yoğun bir şekilde gözlenirken, bazı villuslarda lamina propriada hücre infiltrasyonu da izlenmiştir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar; kan akımı sağlandığında, yaranın yeniden kanlanmasıyla birlikte paradoksal olarak, ilave doku hasarına yol açan olayların başladığını,^{8,11,12} iskemilerde hasarın sadece hipoksik periodta değil, yeniden kanlanma sırasında da geliştiğini kanıtlamıştır.^{11,14} Bazı araştırmacılara göre doku hipoksisi hem mukozal lezyonun patogeneğinde, hem de reperfüzyon nedeniyle bozulmuş bağırsak fonksiyonunda anahtar rol oynamaktadır.¹¹ Diğer taraftan bazı çalışmalarla 15 dk'nın altındaki iske mi sürelerinde mukozal hasar ve reperfüzyona bağlı belirleyici lezyon olmadığı rapor edilirken, 30 dk iske mi ve ardından 15 dk reperfüzyondan sonra kan akımının kontrol grubuyla istatistiksel olarak farkı olmadığı kanıtlanmıştır.²⁸⁻³⁰ Tüm bu araştırmalarla da iskemiden sonra kan akımının geri gelmesinin ve hasarın iske minin süresiyle direkt ilişkili olduğu gösterilmiştir.¹⁰

Çalışmamızda kısa süreli iske mi uyguladığımız için iske mi/reperfüzyon grubunda bulduğumuz histopatolojik değişikliklerin literatürde yer alan başka çalışmalarda saptananlara göre daha yüzeysel olduğunu düşünmekteyiz. Bu çalışmada daha önce bahsedilen reperfüzyona bağlı paradoksal ilave doku hasarı bulgularına rastlamadığı gibi, iske mi gru-

bunda saptanan harabiyetin azaldığı, ancak tamamen düzelmediği tespit edilmiştir. Villus boyları ölçüldüğünde hem iske mi, hem de İ/R grubunda villus boylarının kısaldığı, ancak kontrol grubuyla iske mi grubu ve kontrol grubuyla İ/R grubu ve iske mi grubuyla İ/R grubu bu parametre açısından istatistiksel olarak karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Bu verilerle iskemide oluşan hasarın reperfüzyonla birlikte düzelmeye başladığı düşünülmüştür.

Goblet hücrelerinin inflamasyon benzeri olaylara karşı son derece hassas olduğu ve serbest oksijen radikalleri, inflamatuvar mediatörler gibi hasara bağlı oluşan maddelere karşı musinlerini salgıladıkları gösterilmiştir.^{1,2,13,14,31} Yine ince bağırsaklardaki goblet hücrelerinin enfeksiyonlardaki görevi açık olarak ortaya konmuş olmasına rağmen, İ/R gibi ince bağırsak kan akımının kısmi ya da tamamen bozulduğu durumlarda ki rolü tam olarak anlaşılammıştır.^{3,13} Ancak Chang ve ark. ince bağırsaklarda yüzeysel İ/R hasarı oluşturmuşlar, ardından hızlı mukozal onarımda villus tepelerinde goblet hücre birikimi olduğunu saptamışlar ve sonuç olarak artan goblet hücrelerinin musin üretimini ve sekresyonunu arttırarak intestinal hasarda rol oynadığını ifade etmişlerdir.¹⁴ Bazı araştırmacılar da yaptıkları çalışmalarla İ/R dan 2-3 gün sonra goblet hücre sayısında artma saptamışlar, bu veriyi de goblet hücrelerinin tamirde rol oynadığı şeklinde yorumlamışlardır.^{5,12,32} Diğer taraftan yapılan çalışmalar goblet hücrelerinin villus tepelerinde proliferasyonla çoğalmak yerine, kript bazallerinden villuslara geldiğini kanıtlamıştır.^{27,33}

On beş dk iske mi uyguladığımız 3. grupta; epitel devamlılığının bozulması, villusların harabiyete gitmesi gibi nedenlerle hücrelerinin lümene döküldüğü ve/veya dejenere olduğu bunların sonucunda da villus goblet hücrelerinin azaldığı, kontrol grubuyla sayı açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Aynı grupta kriptler iskemiden morfolojik olarak etkilenmiş görünmemektedir, kontrol grubuyla goblet hücre sayısı açısından karşılaştırıldığında da aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. On beş dk iskemiyi takiben 15 dk reperfüzyon uyguladığımız

4. grupta ise villuslardaki goblet hücre sayısının kontrol grubuna benzediği saptanmış, kriptlerde, kontrol grubu goblet hücrelerine göre sayının azaldığı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Diğer taraftan iskemi grubuyla İ/R grubunu hem villus, hem kript goblet hücre sayısı açısından istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda aralarında yine anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Tüm bu veriler ışığında İ/R grubundaki goblet hücrelerinin kript bazallerinden villus yüzeyine tamirde rol almak amacıyla yoğun bir şekilde geldiği, o yüzden villuslarda kontrol grubuna benzer sayıda goblet hücresi bulunurken, kriptlerde sayılarının azaldığı tahmin edilmiştir. Bu hücrelerin iskemi grubundaki goblet hücrelerinden sayıca fazla olmalarının nedeninin; hem kanlanmayla beraber artan oksidatif stres ve nötrofillerin uyarıcı etkisi, hem de geçen 30 dk'lık (15 dk İ/15 dk R) süre boyunca daha fazla hücre yapılıması olduğu düşünülmüştür.

İskemi grubunda villuslarda azalan goblet hücreleri; hem en, hem de boy açısından kontrol grubuyla karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). İ/R grubunda da goblet hücrelerinin iskemi grubundaki gibi eninin ve boyunun küçüldüğü, kontrol grubuyla yapılan karşılaştırmalarında istatistiksel olarak aralarında anlamlı fark olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Her iki grupta da villus goblet hücrelerinin boyutlarının küçülmüş olmasının nedeninin; ya goblet hücrelerinin maturasyonlarını daha tam tamamlamadan kript bazallerinden villuslara göç etmesi, ya da salgılarını boşaltması olduğu düşünülmüştür. Eğer villus goblet hücreleri hasardan dolayı salgılarını boşaltmış goblet hücreleri olsaydı, bu sefer kontrol grubu kript goblet hücre büyüklüğü ile iskemi yada İ/R grubundaki kript goblet hücre büyüklüğünün benzer olması beklenirdi. Diğer taraftan iskemi ve İ/R grubu kript goblet hücrelerinin salgılarını boşaltmış hücreler olduğu düşünülebilir. Ancak bu durumda da kript-

lerde goblet hücrelerini salgılarını boşaltmaya iten bir morfolojik değişikliğin olması gerekmektedir. Bu durum İ/R hasarı nedeniyle kriptlerden maturasyonunu tamamlamamış goblet hücrelerinin villuslara gitmesi, organizmanın bu işleyişe yetiştirebilmek ve hasar onarımına destek verme amaçlı sürekli goblet hücresi üretmesi, bu yüzden de kriptlerde normalden daha küçük goblet hücrelerinin bulunması olarak yorumlandı.

Geyra ve ark. yaptıkları çalışmalarla normal şartlarda goblet hücrelerin kriptlerden villuslara göçünün yaklaşık 2-3 gün aldığını göstermişlerdir.³⁴ Ancak bu çalışmada 2-3 güne göre oldukça kısa olan İ/R sürecinde, goblet hücrelerinin olay yerine gelmesinin hasar iyileşiminde rolleri olduğu konusunda bir ipucu olarak değerlendirilebilir.

SONUÇ

Bu çalışmada 15 dk'lık iskemi süresinden sonra villus goblet hücre sayısının azaldığı, boyutlarının küçüldüğü ancak musin içeriğinde değişiklik olmadığı, iskemi ardından uygulanan 15 dk'lık reperfüzyon süresince villus goblet hücrelerinin normal sayılarına ulaştığı, boyutlarının küçük kalmaya devam ettiği ve musin içeriğinin yine değişmediği tespit edildi. Sayısı ve boyutları değişen goblet hücrelerinin jejunal hasar ve iyileşmedeki katkısının ne olduğu henüz açık olarak ortaya konamamıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda reperfüzyon sürecinde histolojik ve biyokimyasal olarak paradoksal bir hasar olduğu gösterilse de, çalışmamızda elde edilen verilerin aynı yönde olmaması bir taraftan bu süreçte geçerli bazı mekanizmaların daha tam olarak netleşmediğinin bir göstergesi olarak karşımıza çıkarken, diğer taraftan ortaya konan parametrelerin kısıtlılığı da mekanizmaları açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Tüm bu verilerin sonucunda; hem mekanizmalar, hem de bu mekanizmalarda goblet hücre işlevlerinin daha iyi gösterebilmesi amacıyla ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Gersemann M, Becker S, Kübler I, Koslowski M, Wang G, Herrlinger KR, et al. Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differentiation* 2009;77(1):84-94.
2. Strugala V, Dettmar PW, Pearson JP. Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int J Clin Pract* 2008;62(5):762-9.
3. Linh BK, Hayashi T, Horii Y. Eimeria vermiformis infection reduces goblet cells by multiplication in the crypt cells of the small intestine of C57BL/6 mice. *Parasitol Res* 2009;104(4):789-94.
4. Miller HR, Huntley JF, Wallace GR. Immune exclusion and mucus trapping during the rapid expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* from primed rats. *Immunology* 1981;44(2):419-29.
5. Cohen PS, Rossoll R, Cabelli VJ, Yang SL, Laux DC. Relationship between the mouse colonizing ability of a human fecal *Escherichia coli* strain and its ability to bind a specific mouse colonic mucous gel protein. *Infect Immun* 1983;40(1):62-9.
6. Roomi N, Laburthe M, Fleming N, Crowther R, Forstner J. Cholera-induced mucin secretion from rat intestine: lack of effect of cAMP, cycloheximide, VIP, and colchicine. *Am J Physiol* 1984;247(2 Pt 1):G140-8.
7. Mantle M, Basaraba L, Peacock SC, Gall DG. Binding of *Yersinia enterocolitica* to rabbit intestinal brush border membranes, mucus, and mucin. *Infect Immun* 1989;57(11):3292-9.
8. Lindeström LM, Ekblad E. Structural and neuronal changes in rat ileum after ischemia with reperfusion. *Dig Dis Sci* 2004;49(7-8):1212-22.
9. Rahman A, Üstündağ B, Özercan İH, Burma O, Çekirdekçi A, Özveren MF, et al. [The effect of flavonoids on reduction of reperfusion injury after global cerebral ischemia]. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi* 1999;7(6):430-4.
10. Savaş C, Aras T, Cakmak M, Bilgehan A, Ataoglu O, Türközkan N, et al. Pentoxifylline inhibits overflow and reduces intestinal reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 1997;32(6):905-10.
11. Günel E, Çağlayan F, Çağlayan O, Dilsiz A, Duman S, Aktan M. Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. *J Pediatr Surg* 1998;33(10):1536-9.
12. Chan KL, Zhang XH, Fung PC, Guo WH, Tam PK. Role of nitric oxide in intestinal ischaemia-reperfusion injury studied using electron paramagnetic resonance. *Br J Surg* 1999;86(11):1427-32.
13. Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr* 2001;73(6):1131S-41S.
14. Chang JX, Chen S, Ma LP, Jiang LY, Chen JW, Chang RM, et al. Functional and morphological changes of the gut barrier during the restitution process after hemorrhagic shock. *World J Gastroenterol* 2005;11(35):5485-91.
15. Miner TJ, Tavaf-Motamen H, Stojadinovic A, Shea-Donohue T. Ischemia-reperfusion protects the rat small intestine against subsequent injury. *J Surg Res* 1999;82(1):1-10.
16. Brown DC, Maxwell CV, Erf GF, Davis ME, Singh S, Johnson ZB. The influence of different management systems and age on intestinal morphology, immune cell numbers and mucin production from goblet cells in post-weaning pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;111(3-4):187-98.
17. Çetin-Sorkun H, Özdamar S. [Development of small intestines and large intestines in rats and distribution of gastrin cells]. *Türkiye Klinikleri J Med. Sci* 2005;25(1):10-9.
18. Zecchini V, Domaschew R, Winton D, Jones P. Notch signaling regulates the differentiation of post-mitotic intestinal epithelial cells. *Genes Dev* 2005;19(14):1686-91.
19. Tang M, Laarveld B, Van Kessel AG, Hamilton DL, Estrada A, Patience JF. Effect of segregated early weaning on postweaning small intestinal development in pigs. *J Anim Sci* 1999;77(12):3191-200.
20. Filipe MI, Fenger C. Histochemical characteristics of mucins in the small intestine. A comparative study of normal mucosa, benign epithelial tumours and carcinoma. *Histochem J* 1979;11(3):277-87.
21. Podolsky DK, Isselbacher KJ. Glycoprotein composition of colonic mucosa. Specific alterations in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1984;87(5):991-8.
22. Yunus M, Horii Y, Makimura S, Smith AL. Murine goblet cell hypoplasia during *Eimeria praecox* infection is ameliorated by clindamycin treatment. *J Vet Med Sci* 2005;67(3):311-5.
23. Silen W, Ito S. Mechanisms for rapid re-epithelialization of the gastric mucosal surface. *Annu Rev Physiol* 1985;47:217-29.
24. Lacy ER. Rapid epithelial restitution in the stomach: an updated perspective. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1995;210(1):6-8.
25. Masuda K, Ikeda H, Kasai K, Fukuzawa Y, Nishimaki H, Takeo T, et al. Diversity of restitution after deoxycholic acid-induced small intestinal mucosal injury in the rat. *Dig Dis Sci* 2003;48(10):2108-15.
26. Takada K, Yamashita K, Sakurai-Yamashita Y, Shigematsu K, Hamada Y, Hioki K, et al. Participation of nitric oxide in the mucosal injury of rat intestine induced by ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;287(1):403-7.
27. Ikeda H, Yang CL, Tong J, Nishimaki H, Masuda K, Takeo T, et al. Rat small intestinal goblet cell kinetics in the process of restitution of surface epithelium subjected to ischemia-reperfusion injury. *Dig Dis Sci* 2002;47(3):590-601.
28. Park PO, Haglund U, Bulkeley GB, Fält K. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery* 1990;107(5):574-80.
29. Wagner R, Gabbert H, Höhn P. The mechanism of epithelial shedding after ischemic damage to the small intestinal mucosa. A light and electron microscopic investigation. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1979;30(1):25-31.
30. DiResta GR, Corbally MT, Sigurdson ER, Haumschild D, Ridge R, Brennan MF. Infrared laser Doppler flowmeter in the determination of small bowel perfusion after ischemic injury: comparison with the clearance of locally generated hydrogen and fluorescein angiography. *J Pediatr Surg* 1994;29(10):1352-5.
31. Edgerton C, Crispin JC, Moratz CM, Bettelli E, Oukka M, Simovic M, et al. IL-17 producing CD4+ T cells mediate accelerated ischemia/reperfusion-induced injury in autoimmunity-prone mice. *Clin Immunol* 2009;130(3):313-21.
32. Ikeda H, Suzuki Y, Suzuki M, Koike M, Tamura J, Tong J, et al. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. *Gut* 1998;42(4):530-7.
33. Itoh H, Yagi M, Fushida S, Tani T, Hashimoto T, Shimizu K, Miwa K. Activation of immediate early gene, c-fos, and c-jun in the rat small intestine after ischemia/reperfusion. *Transplantation* 2000;69(4):598-604.
34. Geyra A, Uni Z, Sklan D. The effect of fasting at different ages on growth and tissue dynamics in the small intestine of the young chick. *Br J Nutr* 2001;86(1):53-61.