

Dogiel Tip I Sinir Hücrelerinin Sıçan İnce ve Kalın Bağırsağındaki Dağılımı

THE DISPERSION OF DOGIEL TYPE I NEURONS ON RAT ILEUM AND COLON

S. Tuna KARAHAN*, Belgin CAN**, Bizden TAVİL SABUNCUOĞLU**

* Doç.Dr.,Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi AD,

** Uz.Dr.,Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD, ANKARA

Özet

NADPH koenzimi varlığında nitroblue tetrazolium'un, NADPH-diaphorase ile indirgenmesinin gözlemlenmesinden bu yana bu konuda çalışmalar devam etmektedir. Nitrik oksit sentazın bu enzimle hemen aynı dağılımı göstermesi ile çalışmalar histokimyasal ve immunhistokimyasal yöntemlerin birlikte kullanımını ortaya çıkartmıştır.

Biz bu çalışmada sıçan bağırsağından hazırlanan whole-mount preparatlar üzerinde histokimya yöntemi ile plexus myentericus'da NADPH-Diaphorase (+) sinir hücrelerinin özelliklerini incelemeyi ve ileum ile colon'da bu hücrelerin dağılımını belirlemeyi amaçladık.

Boyanma gösteren sinir hücrelerinin, boyanma farklılıkları göstermekle birlikte Dogiel'in tanımladığı birinci tip sinir hücrelerine uyduğunu gördük. Ileum ve colon'da plexus myentericus'daki ganglionların yoğunlukları ile her bir ganglionda geçen NADPH-diaphorase (+) sinir hücrelerini saptadık.

Anahtar Kelimeler: Plexus myentericus, Sıçan, NADPH-Diaphorase, Morfometri

T Klin Tıp Bilimleri 1999, 19:13-17

Summary

It has been previously observed that in the presence of coenzyme NADPH, nitrobluetetrazolium is reduced by NADPH-diaphorase. Because of nitric oxide synthase shows almost the same distribution as this enzyme, the usage of histochemical and immunohistochemical methods come into view.

In this study we aim to examine the properties of NADPH-diaphorase neurons of plexus myentericus on whole-mount preparations of rat intestine and to determine the dispersion of these cells in both ileum and colon by using histochemical methods.

Although there were certain differentiation between the staining of cells, we detected that they looked like the cells that have been described as Dogiel type I neurons. In the plexus myentericus of ileum and colon, we determined the intensity of ganglions and the NADPH-diaphorase (+) neurons per each ganglion.

Key Words: Plexus myentericus, Rat, NADPH-diaphorase, Morphometry

T Klin J Med Sci 1999, 19:13-17

Thomas ve Pearse adlı araştırmacılar, beyinde NADPH koenzimi varlığında, nitroblue tetrazolium'un NADPH-Diaphorase ile indirgenmesini ve bu reaksiyonun gerçekleştiği, açık mavi renk alan hücrelerin varlığını gözlemlədiler (1). Sonraki yıllarda damar endotelinden salgılanan "endothelium derived relaxing factor" (EDRF) adı verilen bir maddenin varlığı gösterildi (2). Bunları izleyen çalışmalar nitrik oksit (NO) denilen maddenin var-

lığını ortaya çıkarttı. Otonom sinir sisteminde kolinerjik ve adrenerjik sistemlerin etkileri ile açıklanamayan bazı yanıtların nonadrenerjik-nonkolinerjik sistem adı verilen bölüm tarafından yapıldığı ve NO'nin bu etkilerin çoğundan sorumlu olmasının yanı sıra, tipik nörotransmitter özelliklerini de taşıdığı belirlendi. Bu noktadan sonra çalışmalar NO'nin etki yolları üzerinde yoğunlaşmaya başladı. Ayrıca farklı araştırmacılar NO etkilerini ve bulunduğu yerleri değişik organ ve organ sistemlerinde incelemiştir (3). NADPH ile boyanan sinir hücreleri NOS ile de boyanma göstermektedir. Bazı dokularda NADPH, NOS'a göre daha fazla sayıda hücreyi boyarken, bağırsaklarda böyle olmadığından, NADPH-Diaphorase güvenli ve daha ucuz bir

Geliş Tarihi: 02.09.1998

Yazışma Adresi: Dr.S. Tuna KARAHAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi AD, Morfoloji Binası
Sihhiye, TR-06100, ANKARA

T Klin J Med Sci 1999, 19

13

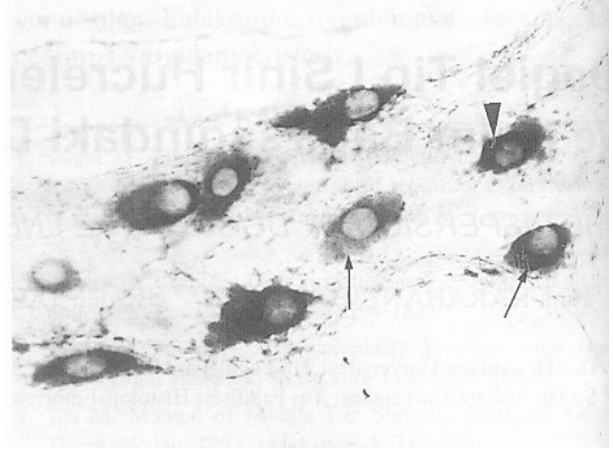
yöntem olarak kullanılabilirliğini korumaktadır (4). Biz bu çalışmada NO'in en fazla etkiye sahip olduğu sistem olan sindirim kanalındaki sinir ağında (gastrointestinal nervous system), NADPH-diaphorase ile boyanan sinir hücrelerini, onların özelliklerini ve ayrıca sinir hücrelerinin yoğunluklarını morfometrik olarak plexus myentericus (Auerbach) üzerinde incelendi.

Materyel ve Metod

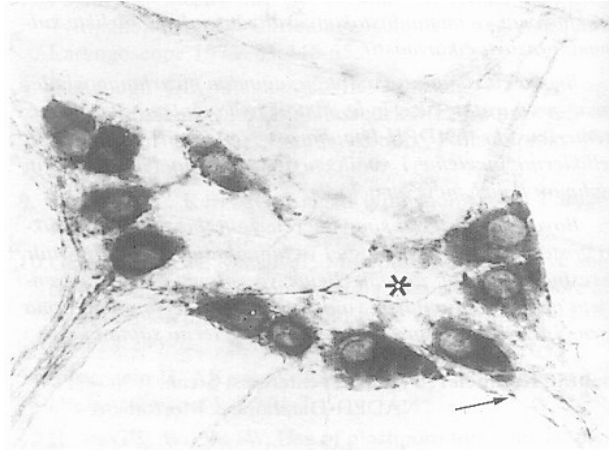
Deney hayvanı olarak 10 adet Wistar cinsi erişkin sıçan kullanıldı. Sıçanların bağırsaklarının boşalması için bir gece aç bırakıldıktan sonra ertesi gün eter anestezisi ile öldürüldü. Orta hat kesisi ile hemen karın açılarak ileum ve colon bölümleri meso'ları kesilerek dışarı alındı. Çıkarılan dokular Krebs solusyonuna konularak temizlendi. %4'lük formaldehit içeren 0.1M'lık PBS solusyonu ile dokular 2.5 saat 4°C'da tesbit edildi. Meso'nun bulunduğu kenardan kesilerek açılan organlar PBS'in 0.01 M'lık solusyonu ile bir kaç kez yıkandı. Yine aynı özellikteki PBS içinde 4°C'de buzdolabında saklandılar. PBS içine, histokimyasal tepkimeye zarar verebileceği düşüncesiyle, hiçbir konserve edici madde konulmadı. Reaksiyonu kolaylaştırmak amacıyla organlar stereomikroskop altında prepare edildi. Bunun için önce mukoza, altındaki tabakalardan kazınarak ayrıldı. Daha sonra tunika muskularis ile tela submukoza ince diseksiyon ile birbirlerinden ayrıldılar. Yapıların inceliği de göz önüne alınarak tunika muskularis daha fazla prepare edilmedi. Elde edilen tam kalınlıktaki preparatlar NADPH-Diaphorase histokimyasal reaksiyonu için 0.25 mg/ml nitroblue tetrazolium (Sigma) ve 1 mg/ml β-NADPH (Sigma) içeren 0.1 M Triton-X-Tris Buffer (Sigma) solusyonunda oda sıcaklığında, iki saat tutuldu. Yeterli boyanma elde edildiğinde reaksiyon Tris Buffer ile durduruldu. Lam üzerine alınan preparatlar gliserinin PBS'deki solusyonu (1:3) ile kapatıldı. Zeiss fotomikroskop yardımı ile ORWOPAN 25 ASA siyah beyaz film kullanılarak görüntülendi.

Bulgular

Ileum ve colon'dan hazırlanan preparatlarda plexus myentericus'a ait ganglionlarda NADPH-Diaphorase ile boyanan sinir hücreleri gözlemlendi. Bu sinir hücreleri daha çok koyu mavi renkte

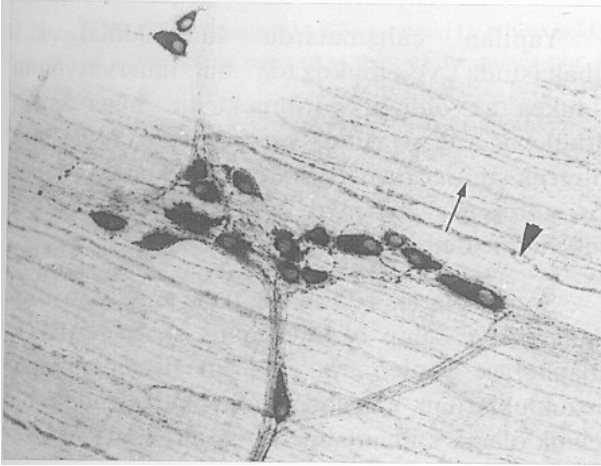


Şekil 1. Colon'da NADPH-diaphorase (+) sinir hücreleri açık ve koyu renkli boyanmaktadır (ok), bu hücrelerden ayırt edilebilenler Dogiel tip I hücrelerine uymaktadır (okbaşı). (x285)



Şekil 2. Ileum'da plexus myentericus'da NADPH-diaphorase – hücrelere ait boşluklar (*) izlenmektedir. Sinirlerin üzerindeki variköz genişlemeler (ok) fonksiyonel sinaps alanlarıdır. (x285)

boyanma özelliği göstermekteydiler. Bunların yanında daha açık renkli boyanan sinir hücreleri de vardı (Şekil 1). Boya almayan sinir hücreleri de yine bu ganglionlarda boşluklar halinde görüldü (Şekil 2). Sinir hücrelerinin tümü iyi seçilememekle birlikte ayırt edilebilenlerin Dogiel'in Tip I olarak tanımladığı sinir hücrelerine uyduğu görüldü. Pleksuslarda yerleşmiş olan sinir hücrelerinin boyut olarak da birbirlerinden farklılıklar gösterdikleri izlendi. Yine plexus myentericus'da ganglionlar arasında uzanan ve üzerlerinde variköz genişlemeler gösteren sinir uzantıları göze çarp-



Şekil 3. Ileum'da plexus myentericus'dan ayrı olarak tunica muscularis'de kas liflerine paralel seyirli, sinir hücre gövdesi içermeyen ve boya almayan hücelere ait boşluklar (okbaşı) barındıran bir sinir ağı (ok) izlenmektedir. (x110)

maktaydı (Şekil 2). Bunlardan ayrı olarak tunica muscularis'de kas liflerine koşut olarak uzanan ve NADPH-Diaphorase ile boyanan sinir hücresi içermeyen sinir demetlerine de rastlandı (Şekil 3). Bu sinir demetleri içinde glia hücrelerine ait olmaları daha olası olan boşluklar belirlendi.

Yaptığımız morfometrik incelemede herbir colon ve ileum'da plexus myentericus'daki 100 adet ganglion içinde NADPH Diaphorase ile boyanan sinir hücreleri sayıldı. Buna göre kolonda ortalama herbir ganglionda 5.9 adet NADPH-Diaphorase ile boyanan sinir hücresi olduğu (max: 21, min: 1), ileumda ise ganglion başına ortalama 4.1 adet (max: 9, min: 1) boyanan sinir hücresi düştüğü görüldü. Birim alan olarak seçilen 1cm² alanda colon'da ortalama 330 (max: 511, min: 197) ganglion gözlenirken aynı birim alanda ileum'da ortalama 471 adet (max: 668, min: 236) ganglion gözlemlendi (Tablo 1).

Tartışma

Dogiel Tip I hücreler hücre gövdesi sınırları düzensiz multipolar hücrelerdir. Bunlar kısa ve kalın belirgin akson ve dendritlere sahiptirler (5, 6). Stach, tip I nöronların plexus myentericus'da bulunduğunu, plexus submucosus'da bulunmadığını bildirmektedir. Ayrıca tip I nöronların büyüklüklerine göre 3 alt gruba ayrıldıklarını ve eksantrik çekirdek içerdiklerini belirtmektedir (6). Tavşan proksimal kolonundan hazırlanan whole mount ve kriyo preparatlarında NADPH ve NOS boyaması yapılmıştır. Buna göre plexus myentericus'da Dogiel'in tip I hücrelerine uyan hücreler görülmüştür. Aynı şekilde plexus submucosus'da da Dogiel Tip I hücreler görülmüştür. Dondurma kesitlerde sirküler kasın submukoza tarafında Henle pleksusu olarak adlandırılan bir pleksus görülmüştür. Ancak hücrelerin farklı büyüklüklerde olduğundan söz edilmemiştir (4). Dogiel Tip I hücreler sindirim kanalındaki sinir ağının büyük bölümünü oluştururlar. Sindirim sisteminin değişik bölümlerinden NO'in salgılandığı bildirilmiştir (7). NO'in hücre içinde hangi organelle ilişkili olabileceği yönündeki çalışmalar, belli bir hücre içi organel veya hücre zarı ile ilişkili olmadığını göstermektedir. Bu ise saklanma ve salınımı konularını karanlıkta bırakmaktadır. Yine bu ince yapısal çalışmalarda NO'in myenterik sinirlerin ve düz kasların fonksiyonları ile ilgili olduğu izlenimini vermektedir (8). Damar duvarında VIP ve NO'in yakın ilişkisi, NO'in damar gevşemesinde VIP-Asetilkolin sistemi ile bağlantısını düşündürmektedir (9). Ancak benzeri bağlantı henüz bağırsaklar için gösterilmemiştir.

Çalışmamızda plexus myentericus'da hem ileum ve hem de colon'dan hazırlanan preparatlarda NADPH-Diaphorase ile hücrelerin farklı yoğunluklarda boyandıklarını gözlemledik. İnsanda da

Tablo 1. Ileum ve colon'dan hazırlanan whole-mount preparatlarda, plexus myentericus'da ganglion başına düşen NADPH-Diaphorase ile boyanma gösteren sinir hücre sayısı ve cm² başına düşen ganglion sayısını gösteren tablo

	ILEUM			COLON		
	ortalama	max	min	ortalama	max	min
NADPH (+) hücre sayısı/ganglion	4.1	9	1	5.9	21	1
Ganglion/cm ²	471	668	236	330	511	197

colon plexus submucosus'una ait hücrelerde farklı yoğunlukta boyanma olduğu bildirilmekte, ancak nedeni belirtilmemektedir (10).

Erişkin bir sıçanın ileum'undaki plexus myentericus'un %27.4±9.6'sını NADPH-Diaphorase (+) nöronların oluşturduğu ve bu ganglionlardaki hücre sayısının 5-20 arasında değiştiği belirtilmektedir. Proksimal kolon'da ise bu değer %7.6±1.1'e ulaşmaktadır. Bu oran hayvan yaşlandıkça NADPH-Diaphorase (+) nöronlar lehine bozulmaktadır (11). Bu oranların verildiği preparasyonların cinsi belirtilmediği için kendi sonuçlarımızla karşılaştıramadık.

Ileum'daki sinir ağının %19'unu NOS (+) sinirler yapar. Sirküler tabakada bu sinirler özellikle boldur. Longitudinal kasta az olarak bulunur. Kobayda yapılan bu çalışmada hücreler farklı büyüklüklerde olmakla birlikte, Dogiel'in tip I tanımlamasına uydukları belirtilmektedir (12). Fonksiyon ile ilgili bir açıklama getirilmemiştir.

Ileum'da sıçanlarda plexus myentericus'un incelenmesi ile cm²'de 2247±372 sinir hücresi ve her bir ganglionda ise 12±4 sinir hücresi düştüğü belirtilmektedir. Nitrerjik sinirlerin sirküler kaslara uzandıkları ifade edilmektedir. Fizyolojik ve farmakolojik özelliklerin türler arasındaki farkını anatomik farklılığa bağlamaktadırlar (13). Ancak, çalışmada whole-mount mu yoksa kriyo preparatlardan mı yararlandığı belirtilmemektedir. Çalışmada sıçanların cinsi belirtilmemekle birlikte aradaki fark cinsler arası farka bağlı olabilir.

Normal sıçanlarda ileum'da plexus myentericus'da ganglion başına 1.54±1.96 (max:10, min: 0), plexus submucosus'da ise 0.26±0.56 (max:3, min: 0) ve colon'da plexus myentericus'da 5.48±4.58 (max:25, min: 0), plexus submucosus'da 0.12±0.32 (max:1, min:0) NADPH (+) hücre izlemiştirlerdir. Ancak bu incelemeler kriyo kesitlerine dayanmaktadır. Ayrıca hücrelerin büyüklük ve boyanma farklılıklarına değinmemektedir (14).

Wistar sıçanlarında özofagusta, NADPH-Diaphorase ile boyanan sinir hücrelerine ait varikoziteler içeren uzantıların submukozaya, muskularis mukozaya ve damarların çevresine uzandığı belirtilmektedir. Benzeri varikoziteler içeren sinirlerin dış anal sfinktere ait kas lifleri arasında da uzandığını ifade edilmektedir (15).

Yapılan çalışmalarda longitudinal kas tabakasında ve mukozada bu innervasyonun oldukça az olduğu görülmektedir. Innervasyon sirküler kas tabakasında ise yoğundur. Myenterik nitrerjik sinirlerin anal yönde uzandıkları veya motor nöron ya da inen ara nöronlar oldukları düşünülmektedir (3).

Sonuç olarak NO'nin bağırsak motilitesi üzerinde etkiye sahip olabileceğini, ayrıca NADPH-Diaphorase yönteminin sindirim sistemi motilite bozukluklarının tanısında kolay kullanılabilir bir teknik olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Thomas E, Pearse AGE. The solitary active cells, histochemical demonstration of damage-resistant nerve cells with a TPN-Diaphorase reaction. *Acta Neuropath* 1964; 3: 238-49.
2. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6.
3. Grozdanovic Z, Brüning G, Baumgarten HG. Nitric oxide-A novel autonomic neurotransmitter. *Acta Anat*, 1994; 150: 16-24.
4. Ward SM, Xue C, Shuttleworth CW, Bredt DS, Synder SH, Sanders KM. NADPH diaphorase and nitric oxide synthase colocalization in enteric neurons of canine proximal colon. *Am J Physiol* 1992; 263: 277-84.
5. Gunn M. Cell types in the myenteric plexus of the cat. *J Comp Neurol* 1959; 111: 83-100.
6. Stach W. Zur neuronalen Organisation des Plexus myentericus (Auerbach) im Schweinehinddarm. I. Typ I-Neurone. *Z mikrosk -anat Forsch* 1980; 94: 833-49.
7. Vincent SR, Hope BT. Neurons that say NO. *Trends Neurosci* 1992; 15: 108-13.
8. Llewellyn-Smith IJ, Song Z-M, Costa M, Bredt DS, Snyder SH. Ultrastructural localization of nitric oxide synthase immunoreactivity in guinea-pig enteric neurons. *Brain Research* 1992; 577: 337-42.
9. Kummer W, Fischer A, Mundel P, Mayer B, Hoba B, Philippin B, Preissler U. Nitric oxide synthase in VIP-containing vasodilator nerve fibres in the Guinea-pig. *Neuroreport* 1992; 3: 653-5.
10. Kramer H-J, Zhang M, Kühnel W. Distribution of NADPH-Diaphorase-positive neurons in the enteric nervous system of the human colon. *Ann Anat* 1994; 176: 137-41.
11. Belai A, Cooper S, Burnstock G. Effect of age on NADPH-diaphorase-containing myenteric neurones of rat ileum and proximal colon. *Cell Tissue Res* 1995; 279: 379-83.

12. Furness JB, Li ZS, Young HM, Förstermann U. Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description. *Cell Tissue Res* 1994; 277: 139-49.
13. Gabriel R, Batori Zs, Wilhelm M. NADPH-diaphorase positive myenteric neurons in the ileum of guinea pig, rat, rabbit and cat. *Neurobiol* 1997; 5: 65-6.
14. Guizar-Sahagun G, Garcia-Lopez P, Espitia AL, Mendez S, Castaneda-Hernandez G, Madrazo I, Franco-Bourland RE. Histochemical evidence of the increased expression of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent diaphorase in neurons of the myenteric plexus after acute spinal cord injury in adult rats. *Neurosci Lett* 1996; 206: 185-8.
15. Neuhuber WL, Wörl J, Berthoud H-R, Conte B. NADPH-diaphorase-positive nerve fibers associated with motor endplates in the rat esophagus: new evidence for co-innervation of striated muscle by enteric neurons. *Cell Tissue Res* 1994; 276: 23-30.