

Kobay Ureterinde PGP 9.5 ve Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)'e Karşı Antikorlarla Sinir Yapılarının Gösterilmesi

THE DEMONSTRATION OF NERVOUS ELEMENTS IN THE URETERAL WALL OF GUINEA-PIG BY USING THE ANTIBODIES AGAINST PGP 9.5 AND CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE (CGRP)

S. Tuna KARAHAN*

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

Özet

Ureterler pelvis renalis ile mesaneyi birbirine bağlayan kanallardır. İdrarın iletimi peristaltik dalgalar aracılığı ile olur. Bu dalgalar farklı araştırmacılar tarafından farklı mekanizmalarla açıklanmaya çalışılmaktadır. Bunlar arasında ureterde pacemaker görevi yapan bir merkezin varlığı, bağırsaklardakine benzer sinir hücreleri içeren sinir ağı, alt ureter ve mesaneden kalkan impulslar ve son olarak da afferent sinir uçlarından salınan nöromediatörlerin etkileri sayılabilir. Bu çalışmada 5 adet kobay ureterinden hazırlanan whole-mount preparatlarda tüm sinir yapılarını gösteren PGP 9.5'e karşı antikor ve afferent sinir uçlarından salgılanan calcitonin gene-related peptide (CGRP)'e karşı antikor kullanılarak immunhistokimyasal olarak organın duvarındaki sinir yapıları incelendi. PGP 9.5 + immunreaktivite gösteren sinir hücre gövdeleri varken CGRP + immunreaktivite gösterenlere rastlanmadı. CGRP + immunreaktivite gösteren sinirlerin PGP 9.5 + immunreaktivite gösterenlerden daha az miktarda oldukları gözlemlendi. Buna dayanarak ureterdeki peristaltik dalgaların oluşumunda CGRP'den farklı nöromediatörlerin de rol alabileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Kobay, Ureter, İnnervasyon, Immunhistokimya, PGP 9.5, CGRP

T Klin Tıp Bilimleri 1998, 18:384-387

Summary

Ureters are channels, which connect pelvis renalis to the urinary bladder. The urine is transported through the ureter by peristalsis. The occurrence of peristaltic waves is tried to be explained by different mechanisms. The presence of a pacemaker in the ureter, the nerve cell containing plexus which resembles the one in the gut, the impulses which originate from the lower ureter and urinary bladder and the affects of neuro-mediators which are released from the afferent nerve terminals are some of these mechanisms. In this study, whole-mount preparations of five guinea pigs' ureters were used. The immunohistochemical reaction was performed by using the antibodies against PGP 9.5 which is a cytoplasmic protein in the peripheric nerves and against calcitonin gene-related peptide (CGRP) which is released from the afferent nerve terminals and the nerve structures in the ureter were visualised. While PGP 9.5 like immunoreactivity was seen in the nerve cell bodies, no CGRP like immunoreactivity in nerve cells was observed. CGRP like immunoreactivity showing nerves were fewer than the PGP 9.5 like immunoreactivity showing ones. These findings suggest that other neuromediators than CGRP may play a role in the occurrence of peristalsis in the ureter.

Key Words: Guinea-pig, Ureter, Innervation, Immunohistochemistry, PGP 9.5, CGRP

T Klin J Med Sci 1998, 18:384-387

Ureterler böbrek pelvisinden mesaneye kadar idrar iletiminden sorumludurlar. İdrarın iletimini sağlayan peristaltik dalgaların nereden ve nasıl

Geliş Tarihi: 18.09.1998

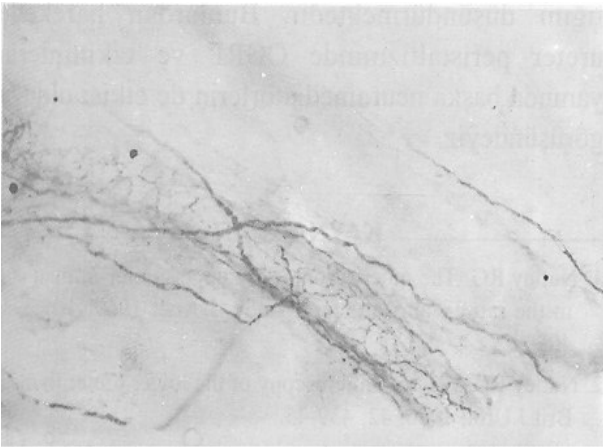
Yazışma Adresi: Dr.S. Tuna Karahan
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi AD,
Morfoloji Binası,
Sıhhiye 06100 ANKARA

kaynaklandığı konusunda fikir birliği henüz oluşmamıştır. Bazı araştırmacılar ureter duvarında sinirlerin urothele yakın yerleşimli olduklarını, bu nedenle de sinirlerin afferent özellik gösterdiklerini belirtmektedirler (1). Yine bazı çalışmalar ureterdeki otonom sinirlerin özellikle alt ureter ve mesane duvarında bulunduğunu ifade ederek idrar iletiminden sorumlu kasılmaların buralardan kaynaklandığını savunmaktadırlar (2). İnsan ureterinde kas hücreleri heterojen olarak dağılmıştır. Fakat

tabaka oluşturmazlar. Hücreler arasında neksuslar bulunur ve bunlar ureteral pacemaker hücreler olarak değerlendirilmektedir (3). Bu neksusların organ duvarında elektriksel sinsitium oluşturdıkları, böylece peristaltik dalgaların ilerledikleri ileri sürülmektedir (4). Bazı araştırmalarda ise renal kaliks ve pelvis'in bazı bölgelerinin ureter aktivitesini idare ettiği üzerinde durulmaktadır (5). Ureter duvarında yerleşmiş sinirlerin karakterleri konusunda da farklı görüşler mevcuttur. Kimi araştırmalar çok az miktarda bulunan sinirlerin yalnızca sensitif özellik gösterdiklerini savunurken, diğerleri organ duvarında yerleşmiş yoğun sinir ağı ile bunun içerisinde yerleşmiş sinir hücrelerinden söz etmektedirler (6-8) Son yıllarda çalışmalar duvarda mevcut sinirlerin özellikleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Afferent sinirler ile ilgili olarak capsaisin verilmiş hayvanların ureterleri incelenmektedir. Bu yöntemle afferent sinirlerin içerdikleri takinininler ve calcitonin gene-related peptide (CGRP) gibi sinirlerde bulunan maddelerin organ üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmaktadır. Bu çalışmada kobay ureter örneklerinde PGP 9.5 ve CGRP + immunreaktivite gösteren sinirler ve sinir hücre gövdeleri görüntülenerek bunların muhtemel fonksiyonlarının mevcut literatür ile birlikte ele alınması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

Bu çalışmada 5 adet kobaydan alınan ureterler fiksasyon için %4 paraformaldehit ve %2 pikrik asit içeren PBS'e konuldu ve 2 saat oda sıcaklığında tutuldu. Whole-mount preparatları hazırlamak için stereomikroskop altında ureter tabakalarına



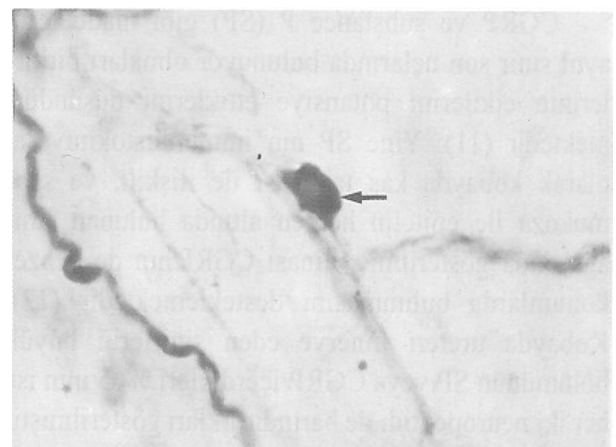
Şekil 1. Ureter duvarında damar çevresinde yerleşmiş PGP 9.5 + immunreaktivite gösteren yoğun sinir ağı, (X 180)

ayrıldı. İmmunhistokimya reaksiyonu için preparatlar önce %10 normal keçi serumu ile (Dakopatts, X 907) 30 dakika muamele edildi. Daha sonra 2 X 24 saat PGP 9.5'e karşı antikorla (Ultraclone Ltd, 1:400 dilusyonda) ve CGRP'ye karşı antikorla (Amersham, 1:400 dilusyonda) reaksiyona tabi tutuldu. Sekonder antiserum olarak keçi-anti-tavşan Ig G (Dakopatts, 1:100 dilusyonda) kullanıldı. Örnekler peroksidaz-antiperoksidaz içeren solusyonda (Dakopatts, 1:100 dilusyonda) 12 saat tutuldu. Kromojen olarak 4-Cl-1-naphtol kullanıldı. Kontrol amacıyla reaksiyondan primer antiserum uzaklaştırıldı. Lam üzerine alınan örnekler gliserin-PBS (3:1) karışımı ile kapatıldı. Siyah beyaz negatif film üzerine görüntüler kaydedildi.

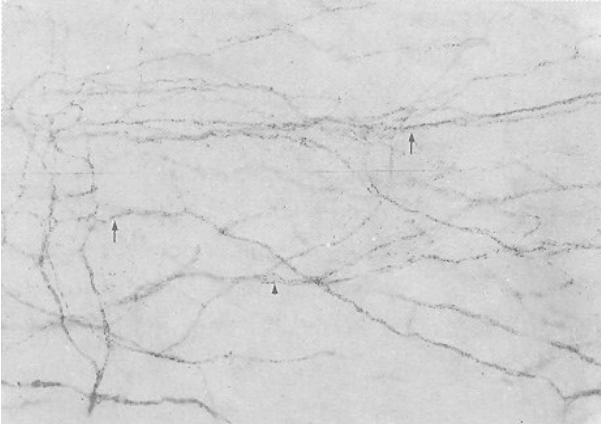
Bulgular

Kobay ureterinden hazırlanan whole-mount preparatlarda organ duvarında damarların çevresinde PGP 9.5 (+) immunreaktivite gösteren yoğun bir sinir ağı gözlemlendi (Şekil 1). Bu sinir ağına sokulan sinirlerde PGP 9.5+immunreaktivite gösteren sinir hücre gövdeleri de izlendi. Organın duvarında sinirlerin yapmış oldukları ağın içerisinde tek tek konumlanmış farklı büyüklüklerde sinir hücre gövdeleri görüldü (Şekil 2). Bunlara ek olarak sinirlerin seyirleri boyunca varikoziteler yaptıkları da tesbit edildi.

Ureter duvarından hazırlanan whole-mount preparatlarda tunica muscularis'in iç yüzünde lamina propria'da yerleşmiş CGRP (+) immunreaktivite gösteren sinir ağı gözlemlendi (Şekil 3). Sinir traseleri boyunca yerleşmiş varikoziteler göze çarpmaktaydı. Sinir demetlerinin arasında CGRP + im-



Şekil 2. Ureter duvarındaki sinir ağında PGP 9.5 (+) immunreaktivite gösteren sinir hücre gövdesi (ok), (X 360)



Şekil 3. Lamina propria'da seyreden sinirlerin oluşturdukları CGRP (+) immunreaktivite gösteren sinir ağı (ok), bu sinirlerin yapmış oldukları varikoziteler (okbaşı) de görülmektedir, (X 180)

munreaktivite gösteren sinir hücre gövdeleri görülmedi.

CGRP+immunreaktivite gösteren sinirlerin PGP 9.5+immunreaktivite gösteren sinirlerden daha az miktarda oldukları tesbit edildi.

Tartışma

CGRP afferent sinirlerin son uçlarından salınan bir mediatördür. Bu maddenin düz kaslar üzerinde gevşetici yöndeki etkileri farklı çalışmalarla incelenmiştir (9). Ortaya çıkan bu yanıtları ureterin normal motilitesinden sorumlu tutan çalışmalar olduğu gibi, organ duvarında olabilecek gerilmeler sonucu oluşan değişiklikleri açıklamaya çalışanlar da vardır (9,10). Ancak bu çalışmalar tam olarak ureter peristaltizminin mekanizmasını henüz açıklayamamaktadırlar.

CGRP ve substance P (SP) gibi maddelerin aynı sinir son uçlarında bulunuyor olmaları birbirlerinin etkilerini potansiye ettiklerini düşündürmektedir (11). Yine SP nin immunhistokimyasal olarak kobayda kas tabakası ile ilişkili, ve submukoza ile epitelin hemen altında bulunan sinir ağlarında gösterilmiş olması CGRP'nin de benzer konumlarda bulunmasını desteklemektedir (12). Kobayda ureteri innerve eden sinirlerin büyük bölümünün SP veya CGRP içerdikleri %65 inin ise her iki neuropeptidi de barındırdıkları gösterilmiştir (13,14). Bu çalışmalar da aynı sinir içindeki maddelerin birbirlerinin fonksiyonlarını etkileyebilecekleri görüşünü desteklemektedir.

İnsanda PGP 9.5 ile düz kas ve damarların çevresinde zengin sinir ağları izlenirken, SP ve CGRP için orta yada az bir innervasyon belirlenmiştir. Bunlar da damar çevresinde, mukozada, çok nadiren de düz kasların arasında görülmüştür. SP ve CGRP (+) innervasyonun toplam innervasyonun ancak %20'sini oluşturduğu belirtilmektedir. Ureterin üst bölümleri alt bölümlere göre çok daha az innervasyona sahiptir. Bu sinirler de alt pelvis'den gelmektedirler. Yine bu bulgularla ureterin alt bölümlerinin mesane doluşu ve boşalışı sırasında tonusu düzenleyici önemli bir fizyolojik role sahip olduğu belirtilmektedir (15).

Sıçan ureterinde CGRP (+) sinirler subepitel-yel ve longitudinal kas tabakası boyunca yerleşmişlerdir. Pelvis renalis ve ureterlerdeki sinirler şişlikler tarzında yapılanmalar içerirler. Eğer ureter bağlanacak olur ise bu sinirlerde önemli derecede azalma olur. Bu da aksonal akımın pelvise doğru olduğunu gösterir (16). Sıçanlarda sinirler kas tabakasının iç yüzünde ve epitele yakın konumda bulunmuştur. Epitele yakın bulunan sinirler kas çevresine göre daha küçük olmakla birlikte sayıca daha fazla izlenmiştir. Sinirlerin bu konumunun sensitif özellikte olmalarını desteklediğini ve bundan dolayı da bu sinirlerin ağrı duyusu taşıyabileceğini ileri sürmektedirler (17).

Çalışmalarda CGRP'nin dağılımı konusunda farklı görüşler vardır. Yine türler arasında da birbirinden farklı tesbitler söz konusudur. Bu çalışmada kobaydan hazırlanan whole-mount preparatlarda PGP 9.5 (+) immunreaktivite gösteren sinirlerin tümünün CGRP (+) immunreaktivite göstermemesi bu mediatörden ayrı diğer mediatörlerin de varlığını düşündürmektedir. Bunlardan hareketle ureter peristaltizminde CGRP ve takininlerin yanında başka neuromediatörlerin de etkisi olduğu görüşündeyiz.

KAYNAKLAR

1. Notley RG. The innervation of the upper ureter in man and in the rat: an ultrastructural study. *J Anat* 1969; 105:393-402.
2. Notley RG. Electron microscopy of the lower ureter in man. *Brit J Urol*, 1970; 42: 439-45.
3. Hanna MK, Jeffs RD, Sturgess JM, Barkin M. Ureteral structure and ultrastructure. Part I. The normal human ureter. *J Urol* 1976; 116: 718-24.

4. Libertino JA, Weiss RM. Ultrastructure of human ureter. *J Urol* 1972; 108: 71-6.
5. Gosling JA, Dixon JS. Morphologic evidence that the renal calyx and pelvis control ureteric activity in the rabbit. *Am J Anat* 1971; 130: 393-408.
6. Gosling JA, Dixon JS. Sensory nerves in the mammalian urinary tract. An evaluation using light and electron microscopy. *J Anat* 1974; 117:133-44.
7. Beatty J, Gabella G. Ureteric ganglia in the guinea pig. *Acta Anat* 1988; 133: 255-9.
8. Karahan ST, Krammer HJ, Kühnel W. Immunohistochemical demonstration of nerves and nerve cells in human and porcine ureters. *Ann Anat* 1993; 175: 259-62.
9. Hua X-Y, Lundberg JM. Dual capsaicin effects on ureteric motility: low dose inhibition mediated by calcitonin gene-related peptide and high dose stimulation by tachykinins? *Acta Physiol Scand* 1986; 128: 453-65.
10. Maggi CA, Meli A. The role of neuropeptides in the regulation of micturation reflex. *J Auton Pharmac* 1986; 6: 133-62.
11. Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neurosci* 1988; 24: 739-68.
12. Sikri KL, Hoyes AD, Barber P, Jagessar H. Substance P-like immunoreactivity in the intramural nerve plexuses of the guinea-pig ureter: a light and electron microscopical study. *J Anat* 1981; 133: 425-42.
13. Semenenko FM, Cervero F. Afferent fibres from the guinea-pig ureter: size and peptide content of the dorsal root ganglion cells of origin. *Neurosci* 1992; 47: 197-201.
14. Wiesenfeld-Hallin Z, Hökfelt T, Lundberg JM, Forssmann WG, Reinecke M, Tschopp FA, Fischer JA. Immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P coexist in sensory neurons to the spinal cord and interact in spinal behavioral responses of the rat. *Neurosci Lett* 1984; 52: 199-204.
15. Edyvane KA, Trussell DC, Jonavicius J, Henwood A, Marshall VR. Presence and regional variation in peptide-containing nerves in the human ureter. *J Auton Nerv Sys* 1992; 39: 127-38.
16. Tamaki M, Iwanaga T, Sato S, Fujita T. Calcitonin gene-related peptide (CGRP)- immunoreactive nerve plexuses in the renal pelvis and ureter of rats. *Cell Tissue Res* 1992; 267: 29-33.
17. Hoyes AD, Bourne R, Martin BGH. Ultrastructure of the submucous nerves of the rat ureter. *J Anat* 1975; 119: 123-32.