

KRONİK ALKOL TÜKETİMİNİN SIÇAN PANKREAS MAST HÜCRELERİNE ETKİLERİ

The effect of chronic alcohol consumption on pancreas mast cells of rats

Nigar VARDI¹, Ali OTLU², Feral ÖZTÜRK³

Özet

Amaç: Bu çalışmada, kronik alkol tüketiminin sıçan pankreas mast hücreleri üzerine etkisi ışık mikroskopik seviyede incelendi.

Materyal ve Metod: Çalışmada 51 adet Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Deney grubu %7.2 alkol içeren modifiye diyet (MSD) ile kontrol grubu ise alkolsüz MSD ile iki, dört ve altı ay beslendiler. Deney süresinin sonunda, pankreastan alınan örnekler Bouin solüsyonu ile tesbit edildi. Kesitler, Hemotoksilen- Eozin ve Toluidin Blue yöntemleri ile boyandılar.

Bulgular: Alkolik grupta, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, mast hücrelerinde degranülasyon ve hücre sayısında belirgin bir azalma gözlemlendi.

Sonuç: Uzun süre kullanılan alkolün, sıçan pankreaslarında mast hücre mediatörlerinin salınmasına neden olarak, organdaki mast hücre sayısını azalttığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Alkol, Mast Hücresi, Pankreas

Abstract

Purpose: In this study the effect of chronic alcohol consumption on pancreas mast cells of rats was investigated at light microscopic levels.

Material and Methods: The study was performed on male Wistar albino rats. The experimental group was fed with a modified liquid diet (MLD) containing 7.2 % ethanol for 2,4 and 6 months. Control rats were fed on isocaloric MLD with no ethanol. At the end of the experimental feeding period, samples were fixed in Bouin solution. The sections were stained with Hematoxylen-Eosin and Toluidin Blue methods.

Results: This study revealed that the number of mast cells was significantly reduced in the alcoholic group when compared with the control group. Mast cells also showed degranulation in the experimental group.

Conclusion: We conclude that alcohol induced the secretion of mast cell mediators in the pancreas of the alcohol fed rats.

Key Words: Alcohols, Mast Cells, Pancreas

Mast hücreleri, dış çevre ile yakın temas içinde olan sindirim sistemi, solunum sistemi ile deride, lenfoid organlarda, sinirler ve kan damarları çevresinde çok sayıda bulunurlar. Çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarda; mast hücrelerinin granüllerinin içeriğini hücre dışına boşalttıkları bilinmektedir. Bu hücreler; iskemi-reperfüzyon hasarı, endotoksinler, çinko zehirlenmeleri, kolinerjik stimülasyonda, hipertermide, inflamasyon ve hipersensitivite reaksiyonlarında degranüle olarak fonksiyon yaparlar (1,2).

Alkol, pankreas bozuklukları için etiyolojik bir faktör olarak bilinmesine rağmen patogenezi hakkında bilgiler azdır (3). Kronik alkol tüketiminin pankreas mast hücreleri üzerine etkilerinin araştırılması, aynı zamanda alkolik pankreasta oluşan histopatolojik değişimlerin de açıklanmasında ve bu konuda yapılacak ilerki araştırmalar için de yol gösterici olacaktır.

Bu çalışmada, kronik alkol tüketiminin sıçan pankreas mast hücreleri üzerine etkisinin histolojik olarak araştırılması amaçlanmaktadır.

MATERYAL METOD

Çalışmada ağırlıkları 180- 250 g olan Wistar albino

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi MALATYA
Histoloji-Embriyoloji. Öğr.Gör.Dr.¹, Prof.Dr.², Y.Doç.Dr.³.

Geliş tarihi: 7 Kasım 2001

cinsi 51 adet sıçan kullanıldı. Deney hayvanları İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Laboratuvar hayvanları yetiştirme ve deneysel araştırma merkezinden sağlandı. Denekler 22°C oda sıcaklığında 60±%5 nem ayarlanmış odada birbirini görecekle şekilde ayrı kafeslere yerleştirildi.

Hayvanlar bir hafta süre standart sıçan yemiyle, deney süresince de özel hazırlanmış Modifiye sıvı diyet (MSD) ile beslendiler (4). Bu diyetin içeriği 925 ml az yağlı inek sütü, 17 g sükröz ve 5000 İÜ A vitamininden oluşmaktaydı. Alkol grubundaki deneklerin diyetine; MSD'ye ek olarak %7.2 alkol (%95.6) eklendi. Kalori miktarını sabit tutmak için alkol grubuna eklenen kalori değeri kadar şeker diyetten eksiltildi. Deney (n=30) ve kontrol (n=21) grubundaki sıçanlar eşit olarak üçe ayrılıp iki, dört ve altı aylık alkolüz ve alkolü MSD ile beslenme periyotlarına alındı. Hayvanlara diyet özel hazırlanmış kapaklı, bilyalı bir ağızlık içeren şişelerde verildi. Böylece hayvanların günlük tüketimleri kontrol edildi. Günlük alkol alımları ölçülüp; her sıçanın günde kg başına g olarak tükettiği alkol miktarı hesaplandı..

Deneklerden elde edilen kan serumlarının alkol oranları, NAD/NADH+ enzim spektrometre ile (5) saptandı.

Deney süresinin sonunda hayvanlar servikal dislokasyonla öldürülüp, pankreasları alındı. Örnekler, Bouin fiksatifleri ile tesbit edildi. Rutin doku takibinden sonra elde edilen parafin bloklardan, mikrotomda altı mikronluk kesitler alındı. Kesitlere dokunun genel görünümünü izlemek için H&E ve mast hücrelerini araştırmak için de %0.5 Toluidin blue boyama yöntemi uygulandı (6).

Hazırlanan kesitlerde mast hücreleri Olympus BH2 geniş sahali araştırma mikroskopunda X10 büyütmede sayıldı.

İstatistiksel Değerlendirme: Veriler non-parametrik testlerden, Man-Whitney U ve Kruskal Wallis testine göre değerlendirildi.

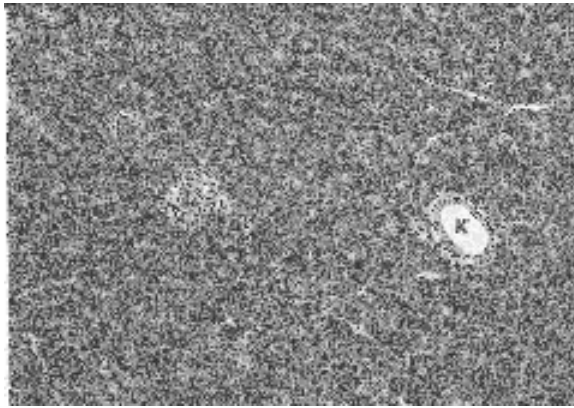
BULGULAR

İki, dört ve altı aylık alkol gruplarının günlük alkol tüketimleri ve serum-alkol seviyeleri Tablo-1'de verilmiştir.

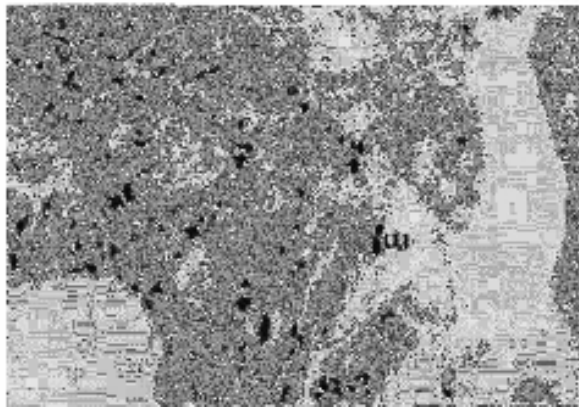
Çalışmamızda genel yapıyı incelemek için H&E boyama yöntemi uygulandı. Ekzokrin bölümde asinuslar, kanallar ve Langerhans adacıkları normal görünümdeydi (Resim 1). Toluidin Blue boyama yöntemi ile mast hücreleri kontrol grubundaki sıçanların pankreaslarında kan damarları, periasiner alan, kanallar etrafındaki ve lobüller arasındaki bağ dokusunda izlendi (Resim 2). Alkolik grupta ise histolojik kesitlerde bu hücrelere nadiren rastlandı (Resim3).

Alkolün mast hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmak için, birim alana (BH2 Olympus mikroskopta X10'da bu alan 1milimetre kare) düşen mast hücreleri sayıldı. Elde edilen veriler tablo 2'de gösterildi. İki aylık alkol ve iki aylık sıvı diyet grubunda mast hücrelerinin sayıları arasındaki fark Mann Whitney U testine göre önemsiz bulundu (Alkol=3.9±0.3, Sıvı diyet=3.2±0.2 p>0.05). Dört aylık alkol ve sıvı diyet ile altı aylık alkol ve sıvı diyet grupları arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede (4 ay alkol=4.0±0.2, 4 ay sıvı diyet=6.2±0.3; 6 ay alkol= 2.7±0.2, 6 ay sıvı diyet=7.1±0.4) ise mast hücre popülasyonunda alkole maruz kalma süresi uzadıkça, kontrollere göre azaldığı görüldü (Tablo 3, Grafik 1). Dört ay süresince alkolle beslenen grupta, bu grubun sıvı diyet kontrolü arasında mast hücre sayısı yönünden fark önemli bulundu (p<0.05). Altı aylık alkolik grupta, altı aylık sıvı diyet grubuyla karşılaştırıldığında alkol grubunda gözlenen mast hücre sayısındaki azalma da, Mann Whitney U testine göre anlamlıydı (p<0.05). İki, 4 ve altı ay alkolle beslenen gruplar arasında birim alana düşen mast hücre sayısı bakımında fark olup olmadığını anlamak için KW istatistik yöntemi uygulandı. Bunun sonucunda, farkın 6 ay alkolle beslenen gruptan kaynaklandığı saptandı (p<0.05, Tablo 2). Diğer bir deyişle, alkol verilme süresi uzadıkça, mast hücre sayısı azaldı. Ayrıca kontrol grubundaki mast hücrelerinin sitoplazmaları granüllerle dolu olarak izlenmesine rağmen (Resim 4), dört ve altı

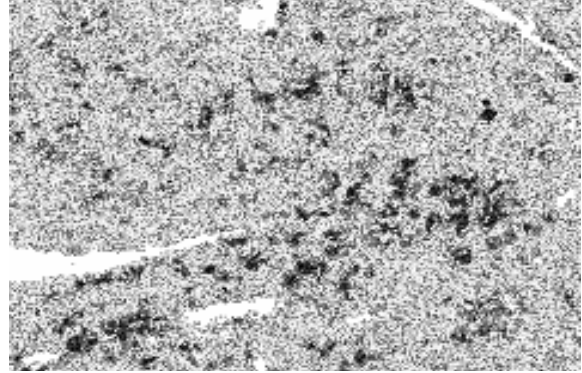
aylık alkol grubundaki mast hücrelerinde alkol tüketimi ile artan degranülasyon izlendi. Alkol gruplarında mast hücre sitoplazmalarındaki granüller azalmış olduğu için, metakromatik boyanma özellikleri de azalmıştı, bu yüzden çekirdekleri de ekzantrik olarak izlenmekteydi (Resim 5).



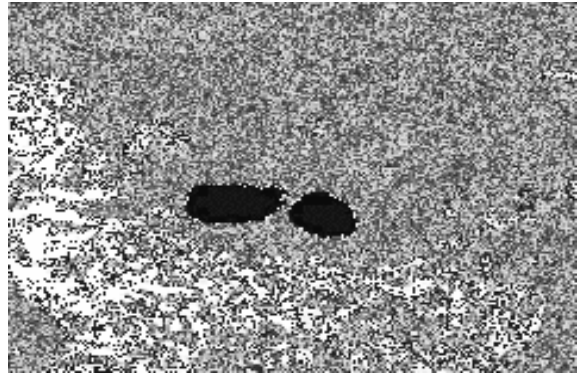
Resim 1. Kontrol grubunda pankreasın genel görünümü. L: Langerhans adacığı. K: Boşaltma kanalı



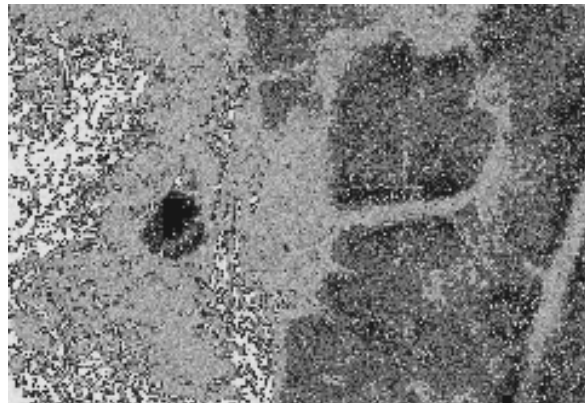
Resim 2. Kontrol grubunda mast hücrelerinin görünümü. Toluidin Blue X20.



Resim 3. Altı aylık alkol grubunda nadir izlenen mast hücresi. Toluidin Blue X20.



Resim 4. Kontrol grubunda granüllerle dolu mast hücreleri. Toluidin Blue X100.



Resim 5. Altı aylık alkol grubunda degranüle mast hücresi. Toluidin Blue X100.

Tablo 1. İki, dört ve altı aylık alkol gruplarının günlük alkol tüketimleri ve serum-alkol seviyeleri

Süre/ay	Alkol tüketimi g/kg/gün Ort±SS	Serum alkol seviyeleri mg/dl Ort±SS
2(n=10)	12.3±0.1	224±32
4(n=10)	13.5±4.2	253±12
6(n=10)	15.2±3.2	278±24

Tablo 2. Alkolle ve sıvı diyetle beslenen grupların mm² deki mast hücre sayıları

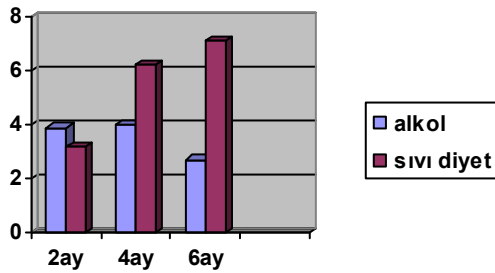
Alkol	Sıvı diyet					
	2 ay n=10	4 ay n=10	6 ay n=10	2 ay n=7	4 ay n=7	6 ay n=7
	4	4	2	3	6	6
	3	5	4	4	5	9
	5	3	3	3	8	7
	2	4	3	2	6	8
	6	5	2	3	7	7
	3	5	2	4	6	6
	3	3	3	4	6	7
	4	4	2			
	5	3	3			
	4	4	3			
<i>minimum</i>	2	3	2	2	5	6
<i>maximum</i>	6	5	4	4	8	9

Tablo 3. Alkol ve sıvı diyetle beslenen grupların mast hücre sayısı verilerinin, Mann Whitney U ve Kruskall Wallis (KW) ile değerlendirilmesi

Gruplar	Medyan mast hücre sayısı		Sıvı diyet		Mann Whitney-U
	Ort.±SH	medyan	Ort.±SH	medyan	
2 ay	3.9±0.3	4	3.2±0.2 ²	3	P>0.05,U=24.500
4 ay	4.0±0.2	4	6.2±0.3	6	P<0.05,U=1.500
6 ay	2.7±0.2 ¹	3	7.1±0.4	7	P<0.05,U=0.000

¹P<0.05,KW=9.696,SD=2
(Alkolle beslenenlerde farkı yaratan 6 aylık gruptur)
²P<0.05, KW=14.866,SD=2
(Sıvı diyetle beslenenlerde farkı yaratan 2 aylık gruptur)

Mm²'ye düşen mast hücre sayısı



Grafik 1. İki, dört ve altı ay alkol ve sıvı diyetle beslenen grupların mm²'deki mast hücre sayılarının dağılımı

TARTIŞMA

Bu çalışma uzun süre dengeli bir diyetle birlikte alınan alkolün sıçan pankreas mast hücreleri üzerindeki, olası histolojik değişikliklerini incelemek amacıyla planlandı.

Deney hayvanlarına alkolün verilmesinde, sıvı-diyet tekniği yaygın olarak kabul görmektedir. Sıvı-diyet tekniği ile günlük olarak alkol alımı ve kan-alkol seviyeleri yükseltilmiş, alkolün neden olduğu

karaciğer hasarı en aza indirilerek, hayatta kalma süresi uzatılıp, kronik alıma olanak sağlanmıştır. Böylece daha önce hayvanlarda oluşturulamayan, ancak alkolik insanlarda görülen bozukluklar deney hayvanlarında da oluşturulabilmiştir. Sıvı- diyet tekniğinin kabul edilebilir olması için günlük alkol tüketimi 12-18 g/kg, kan alkol seviyesinin de 150 mg/dl'den yüksek olması gerekir (7,8). Bizim çalışmamızda, sıçanların günlük alkol tüketimi ve kan alkol seviyeleri Tablo 1'de verilmiştir. Bu değerler uygulanan sıvı- diyet tekniğinin başarıya ulaştığını göstermektedir.

Çalışmamızda; dört ve altı aylık alkollü sıvı- diyet alan sıçanlar, dört ve altı ay alkolsüz sıvı diyet alanlarla karşılaştırıldığında pankreaslarında birim alana düşen mast hücre sayısında azalma belirledik. Mast hücre sayısının azalması, alkolün mast hücrelerinin degranülasyonunu aktive etmesi ve böylece granüllerin azalmasından kaynaklanıyor olabilir. Toluidin Blue boyama yöntemi ile granüller metakromatik olarak boyanırlar. Granüllerin alkole bağlı olarak hücre dışına verilmesinden sonra, sitoplazmada granüller azalır. Mast hücreleri pankreas bağ dokusunda bulunmasına rağmen, granüllerini farkedilemediğinden, diğer bağ dokusu

hücrelerinden ayırt edilemez. Alkolün gastrointestinal sistemdeki mast hücreleri üzerindeki etkilerini inceleyen bazı araştırmacılar da (9,10,11) gastrik mukozada ve intestinal mukozada mast hücrelerinin degranülasyona uğradığını, sayılarının azaldığını tespit etmişlerdir.

Alkol, mast hücre degranülasyonuna farklı mekanizmalarla etki etmektedir. Mast hücre degranülasyonunda etanolün metaboliti olan asetaldehitin rolü olduğu bilinmektedir (12). Etanol oksidasyonu sonucu oluşan asetaldehit, kimyasal olarak son derece toksik, reaktif ve immunojenik bir maddedir (13). Alkoliklerde kandaki asetaldehit seviyesinin yükselmesi mast hücre degranülasyonuna (12,14) ve dolayısıyla mast hücrelerinden kimyasal mediatörlerin salınımına neden olmaktadır. Alkolün, mast hücre degranülasyonunu; kolinerjik stimülasyona neden olarak (15) ya da membran polaritesini, akışkanlığını ve reseptör yapılarını etkileyerek yaptığı açıklanmıştır (16). Son çalışmalar; alkolün serbest radikal oluşumuna neden olduğunu göstermektedir (17). Serbest radikallerin ortamda olması mast hücrelerini stimüle ederek, kimyasal mediatörlerin salınımına yola açar. Diğer yandan serbest radikallerin lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonuna neden olması, membran yapısına zarar vermektedir (18). Membran bütünlüğünün bozulması da mast hücre sitoplazmik granüllerinin hücre dışına çıkmasını kolaylaştırmış olabilir.

Sıvı diyet alan gruplarda zamana bağlı beslenme periyotları sonucunda (2ay, 4ay ve 6ay) beliren mast hücre sayısındaki artışın da (Tablo 2, Grafik 1), yaşlanmaya bağlı olarak bağ dokusunun ve dolayısıyla bağ dokusu elemanlarının artışıyla ilgili olduğunu düşünüyörüz.

Çalışmada; kronik alkol tüketimin süresine bağlı olarak pankreasta bağ dokusu içinde mast hücre sayısında azalma izlendi. Alkolün, pankreas bağ dokusunda mast hücrelerini stimüle ederek, degranülasyonuna neden olduğu sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

1. Canbilen A, Salbacak A, Duman S. Kromolin sodyum ile stabilize edilmiş nasal mast hücrelerinin ışık mikroskopik seviyede incelenmesi. *Samsun Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 1993; 9:226-231
2. Bragnaza JM. Mast cell: pivotal player in lethal acute pancreatitis. *QJM* 2000; 93:469-74.
3. Ponnoppa BC, Marciniak R, Schneider T. Ethanol consumption and susceptibility of the pancreas to cerulein-induced pancreatitis. *Pancreas* 1997; 14:150-157.
4. Uzbay T, Kayaalp O. A modified liquid diet of chronic ethanol administration. *Pharmacological Research* 1995;31: 37-42.
5. Pincus MR, Abraham NZ. Toxicology and Therapeutic Drug Monitoring. In: Bed H, ed. *Clinical Diagnosis and Management Laboratory Methods*. Philadelphia: WB Saunders, 1991, pp 349-384.
6. Bancroft JD, Stevens A, Turner DR. *Theory of Practice of Histological Techniques*. Third edition. Churchill Livingstone 1990, pp 167
7. Lieber CS, De Carli LM. The feeding of ethanol in liquid diets. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 1986; 10: 550-553.
8. Lieber CS, Decarli LM. Animal models of chronic ethanol toxicity. *Methods in Enzymology* 1994; 233: 585-594.
9. Wong P, Ogle CW. Chronic parenterally administered nicotine and stress-or ethanol induced gastric mucosal damage in rats. *Eur J Pharmacol* 1995; 13: 292(29): 157-162.
10. Sathiamoorthy SS, Sathiamoorthy A. Effect of alcohol feeding on gastric mucosal mast cell population and gastric tissue histamine concentration in albino rats. *Ind J Physiol Pharmac* 1985; 29:115-118.
11. Dinda PK, Holitzner CA, Morris PG. Ethanol induced jejunal microvascular and morphological injury in relation to histamine release in rabbits. *Gastroenterology* 1993; 104: 361-368.

12. Koivisto T, Kaihovaaro P, Salaspuro M. Acetaldehyde induced histamine release from purified rat peritoneal mast cells. *Life Science* 1999; 64(3):183-190.
13. Peter TJ, Preedy JR. Metabolic consequences of alcohol ingestion. *Novartis Found Symp* 1998; 216: 19-25.
14. Ruiz CM, Gomes JC. Effect of ethanol, acetaldehyde and acetic acid on histamine secretion in guinea pig lung mast cells. *Alcohol* 2000; 20(2); 133-138.
15. Arizona N, Matsudo S, Hattari T. Anatomical variation in mast cell nerve, associations in the rat small intestine , heart, lung and skin. *Lab Invest* 1990; 62: 626-634.
16. Gonzales A, Crews F. Correlation of ethanol's membrane actions and inhibition of receptor-stimulated histamine release from rat mast cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1986; 239: 111-116.
17. Navasumrit P, Ward TH, Dodd NJ et all. Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented in vivo by antioxydant: effects of acute and chronic ethanol exposure. *Carcinogenesis* 2000; 21:93-99.
18. Mates MJ, Gomez CP, Blanca M. Chemical and biological activity of free radical scavengers in allergic diseases. *Clinica Chimica Acta* 2000; 296: 1-15.