

Ratlarda Kardiyak Mastositlerinin İstatistiksel Olarak Dağılımı ve Heterojenitesi

Özlem EREKLİ¹ Kenan ÇINAR¹

Geliş Tarihi: 11-11-2015

Kabul Tarihi: 04-12-2015

Özet: Bu çalışmada Wister Albino türü sıçanlarda kardiyak mast hücrelerinin sayısal dağılımı ve altı farklı tespit çözeltilisinin (Bouin, %10 Formalin, Schaudin, Orth, Alkolik Formalin ve Carnoy) bu hücrelerin boyanma özelliklerine olan etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

Mast hücrelerinin demonstrasyonu için Toluidin Blue (TB), Thionin ve Alcian Blue/Safranin O (AB/SO) boya metotları uygulandı. Boyanan kesitlerde, tüm preparatlardaki mast hücrelerinin sayısal yoğunluğu oküler mikrometre yardımıyla belirlendi. Daha sonra elde edilen veriler 1mm²'lik alandaki mast hücre sayısına dönüştürüldü. TB/ Thionin/ AB/SO ile boyanan mast hücre sayılarının atriyum ve ventrikuluslardaki yoğunlukları tespit edildi.

Mast hücreleri Carnoy tespit çözeltisi ile Toluidine Blue'da, Orth tespit çözeltisiyle ise Thionin ve AB/SO'de en fazla sayısal sonucu vermiştir.

Altı fiksatifin de uygulanması sonucunda mast hücre granülleri en belirgin olarak AB/SO boyanması ile gözlemlendi.

Mast hücre şekillerinin, farklı tespit çözeltilerine göre farklılık gösterdiği saptandı. %10 Formalin tespit çözeltisi hariç diğer tespit çözeltileri ile fiske edilmiş doku örnekleri, Toluidine Blue boyası ile boyandıklarında mast hücrelerinin metakromazi gösterdikleri tespit edildi. Carnoy ve Schaudin tespit çözeltilerinin kullanıldığı doku örneklerinde, Thionin ile boyandıklarında metakromazi gösteren mast hücreleri görüldü.

Anahtar Kelime: Rat, mast hücresi, kalp, heterojenite, fiksasyon.

Statistical Distribution and Heterogeneity of the Cardiac Mast Cells in Rats

Abstract: This study was aimed to determine the numerical distribution of cardiac mast cells and the effect of six different fixatives (Bouin, 10% Formalin, Schaudin, Orth, Alcoholic Formalin and Carnoy) on the staining properties of these cells in Albino Wistar rats.

Toluidine Blue (TB), Thionin and Alcian Blue / Safranin O (AB/SO) staining procedures were employed to demonstrate the cardiac mast cells. Numerical density of mast cells was determined through the instrument of the ocular micrometer. Then, the data obtained were converted to the number of mast cells in a 1mm² area. Numerical density of TB/Thionin/AB/SO-stained mast cells was detected in atrium and ventricles.

Mast cells were detected to outnumber in Carnoy-fixed and TB-stained sections and in Orth-fixed and AB/SO, Thionin stained sections.

Mast cell granules were demonstrated more specifically in AB/SO staining as a result of the implementation of six different fixatives.

Shapes of mast cells were found to vary by different fixative solutions. Mast cells were observed to stain metachromatically when sections fixed with other fixative solutions except for 10% Formalin fixative solution were stained with TB. In a similar way, mast cells were shown to stain metachromatically when sections fixed with Carnoy and Schaudin fixative solutions were stained with Thionin.

Key Words: Rat, mast cell, heart, heterogeneity, fixation.

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Doğu Yerleşkesi Çünür/İSPARTA, zlmrkl@gmail.com

Giriş

Mast hücreleri IgE ve IgG alt sınıflarını bağlayan membran reseptörlerine sahip, aşırı duyarlılık reaksiyonlarında, paraziter hastalıklarda ve neoplazmlara karşı savunmada rol alan hücrelerdir^{3,19}. Mast hücresi proteazlarının dokudaki humoral ve hücresele olayların düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Mast hücreleri vazopermeabilite, inflamatuvar hücre cevabı, koagülasyon, doku yıkımı, intersellüler protein ve peptid işlenmesi ve inflamatuvar mediatörlerin hidrolizi gibi önemli görevler üstlenmektedir³³.

Mast hücreleri vücuttaki dokularda kan damarları, sinirler ve dış çevre ile ilişkide olan yüzeylerde yerleşik olarak bulunurlar³³. Mast hücreleri orjinleri, yerleşim yerleri, kullanılan tespit solüsyonuna verilen cevap, taşıdığı glikozaminoglikanlarının türü, intragranüler serin proteinazın türü^{4,8,29} histokimyasal farklılıklar, fonksiyonel kriterler ve hücrelerin morfolojik özellikleri gibi unsurlar göz önüne alındığında, bağ doku mast hücresi ve mukozal mast hücresi olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır^{6,21,22}. Birinci tip, granülleri içinde kanın pıhtılaşmasını engelleyen ve sülfatlanmış bir glikozaminoglikan olan heparin bulduran bağ dokusu mast hücresi, ikinci tip ise granüllerinde heparin yerine kondroitin sülfat bulduran mukozal mast hücresidir. Mast hücre granüllerinde pıhtılaşmaya engelleyen heparinden başka damar geçirgenliğini arttıran histamin, eozinofil ve nötrofillerin kandan bağ dokuya göç etmesini uyaran EFC (Eozinofil kemotaktik faktör) ve NCF (Nötrofil kemotaktik faktör) bulunur¹.

Mast hücreleri birçok dokuda olduğu gibi kalpte de infeksiyonlara ve inflamatuvar uyarılara degranülasyon ile yanıt verir. Miyokardta infarkt alanının iyileşmesinde mast hücreleri, makrofajlar ile birlikte görev yapmaktadır²⁷.

Mast hücre sekresyonunu tetikleyen faktörler; Anafloksinler (C3a ve C5a-hipersensitivite durumunda), bakteriler (E.coli), kimyasallar, ilaçlar (lokal anestezipler, nöromusküler birleşme bölgesi blokerleri), sitokinler, serbest radikaller, toksinler, IgE ve antijen, hormonlar, büyüme faktörleri (SCF-kök hücresi büyüme faktörü), nörotransmitter maddeler (asetilkolin), virüsler (kızamık, grip), fiziksel koşullar (soğuk, egzersiz, basınç), radyasyon olarak sıralanabilir³³.

Mast hücreleri doku homeostazisinde, dokunun yeniden şekillenmesinde ve onarımında etkili hücreler olduğu gözlenmiştir. Kalp

dokusunda bulunmasıyla miyopatik kalplerde hem tanı hem de tedavinin değişmesine neden olmaktadır². Koroner spazma¹⁵ dahil olan mast hücrelerinin ise kardiyomyopati²⁸, aterosklerosis²⁵ ve deneysel miyokard iskemine^{16,17,23} dahil olduğu öne sürülmüştür. İskemik kalp hastalığı olanlarda, aterosklerotik plaklar dâhil kalp dokusunda mast hücrelerinin sayısı ve yoğunluğu artar¹⁰.

Bu çalışmada kullanılan farklı tespit çözeltileriyle sıçan kardiyak mast hücrelerinin atriyum ve ventrikulusta sayısal dağılımı, morfolojik olarak şeklinin belirlenmesi ve tespit çözeltilerinin boyanma üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel Hayvan Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarından temin edilen 5 adet Wistar Albino türü sıçan kalbi materyal olarak kullanıldı. Çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (HADYEK) onayı (karar tarihi: 28.09.2010/karar no: 01) kapsamında gerçekleştirildi.

Alınan kalp dokularının tespiti için Bouin, %10 Formalin, Schaudin, Orth, Alkolik Formalin ve Carnoy olmak üzere altı farklı fiksatif kullanıldı.²⁰

Orth ve %10 Formalin solüsyonlarında 48 saat tespit edildikten sonra 24 saat akar suda yıkanan dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidre edildi ve parafinde bloklandı. Carnoy solüsyonunda 90 dakika, Alkolik Formalin solüsyonunda 4 saat, Schaudin ve Bouin solüsyonlarında 16 saat tespit edilen ve rutin histolojik doku takibi aşamasından geçirilen örnekler parafinde bloklandı.

Dokulardan 5µm kalınlığında alınan kesitlere, mast hücrelerinin belirlenmesi amacıyla Alcian Blue/Safranin⁹, Thionin⁷ ve Toluidine Blue³⁴ boyama yöntemleri uygulananak ilgili alanlardan fotoğraf çekimi yapıldı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda incelendi. Oküler mikrometre yardımıyla preparatların alanları atriyum ve ventrikulus bölgesi olmak üzere iki ayrı alanda hesaplandı ve mast hücre sayımları yapıldı. Daha sonra, preparatların alanları 1mm²'ye düşen mast hücre sayısına dönüştürüldü. Veriler, "Minitab-17" istatistik programına girildi. Preparatlar arasındaki mast hücre sayılarının farklılıkları "One Way Anova" testi ile belirlendi.

Bulgular

% 10 Formalin Fikzasyonu:

Bu fikzasyonun uygulandığı dokulardan alınan kesitlere yapılan AB/SO boyaması sonucunda atriyumda yuvarlak, oval veya armut şeklinde (Şekil-1.a); ventrikulusta oval veya uzun-mekik (Şekil-1.b); epikartta ise yuvarlak (Şekil-1.c) şekilli mast hücreleri gözlemlendi. Thionin boyası ile atriyumda damla şeklinde (Şekil-1.d) veya oval; ventrikulusta granüller dağınık oval, uzun ve düzensiz (Şekil-1.e); epikartta ise oval (Şekil-1.f) mast hücrelerine rastlandı. Toluidine Blue uygulaması sonucunda ise atriyumda oval; ventrikulusta düzensiz ve uzun (Şekil-1.g); epikartta ise mekik şeklinde (Şekil-1.h) ve oval görünümlü mast hücrelerine rastlandı.

Alkolik Formalin Fikzasyonu:

AB/SO ile boyanan atriyum kesitlerinde oval veya düzensiz (Şekil-2.a), yuvarlak; ventrikulusta düzensiz, oval (Şekil-2.b), yuvarlak; epikartta ise uzun yapılı mast hücreleri gözlemlendi. Thionin uygulaması sonucunda atriyumda oval, yuvarlak (Şekil-2.c), düzensiz; ventrikulusta uzun, yuvarlak, granül dağınık ve uzun (Şekil-2.d); epikartta ise yuvarlak veya düzensiz mast hücreleri saptandı. Toluidine Blue boyaması ile atriyumda yuvarlak veya oval (Şekil-2.e); ventrikulusta oval-dağınık granüllü (Şekil-2.f); epikartta ise uzun veya oval mast hücreleri tespit edildi.

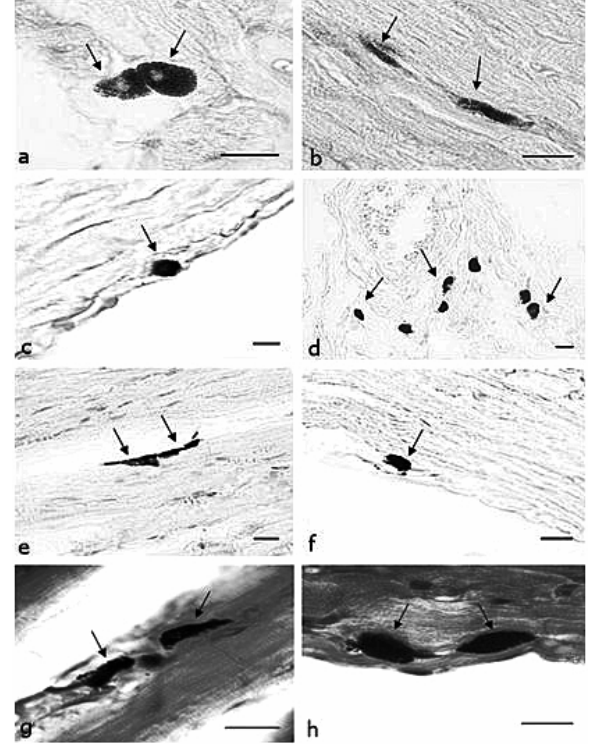
Bouin Fikzasyonu:

Bu fikzasyon ve AB/SO boya uygulaması sonucunda atriyumda oval ve yuvarlak; ventrikulusta oval (Şekil-3.a) ve yuvarlak; epikartta yuvarlak mast hücrelerine rastlandı. Thionin ile boyanan atriyum örneklerinde armut şeklinde ve yuvarlak (Şekil-3.b); ventrikulusta uzun-düzensiz (Şekil-3.c); epikartta oval veya yuvarlak mast hücre tipine rastlandı. Toluidine Blue uygulamasında ise atriyumda granülleri dağınık ya da düzenli-yuvarlak (Şekil-3.d) ve oval; ventrikulusta uzun düzensiz (Şekil-3.e-f.) veya oval biçimli mast hücreleri tespit edildi.

Carnoy Fikzasyonu:

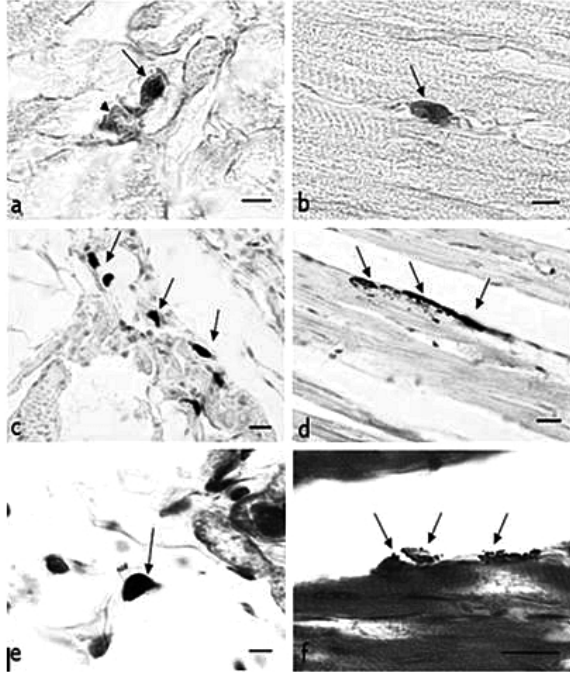
Atriyum kesitlerine AB/SO uygulaması sonucunda oval, granülleri dağınık-oval veya düzensiz (Şekil-4.a); ventrikulusta uzun-düzensiz, oval ve armut (Şekil-4.b); epikartta ise şekillinde mast hücreleri gözlemlendi. Thionin ile boyanan atriyum örneklerinde yuvarlak ve oval (Şekil-4.c); ventrikulusta yuvarlak, düzensiz-dağınık granüllü; epikartta ise oval-granülleri

dağınık mast hücrelerine rastlandı. Toluidine Blue uygulaması atriyumda oval ve yuvarlak; ventrikulusta uzun veya oval (Şekil-4.d), düzensiz; epikartta ise uzun veya düzensiz mast hücreleri saptandı.



Şekil-1.a. Atriyumda safranin (+) mast hücreleri (oklar), Bar: 50µm. **b.** Ventrikulusta AB/SO (+) mast hücreleri (oklar) Bar: 50µm. **c.** Epikartta Safranin (+) mast hücresi (ok) Bar: 50µm. **d.** Atriyumda Thionin (+) mast hücreleri (oklar) Bar: 50µm. **e.** Ventrikulusta Thionin (+) mast hücreleri (oklar) Bar: 50µm. **f.** Epikartta Thionin (+) mast hücresi (ok) Bar: 50µm. **g.** Ventrikulusta T.B (+) mast hücresi(oklar) Bar: 50µm. **h.** Epikartta T.B(+) mast hücreleri (oklar) Bar: 50µm.

Figure-1.a. Safranine (+) staining for mast cells (arrows) in atria, Scale bar: 50µm. **b.** AB/SO (+) staining for mast cells (arrows) in ventricles. Scale bar: 50µm **c.** Safranine (+) staining for mast cells (arrow) in epicardium. Scale bar: 50µm. **d.** Thionin (+) staining for mast cells (arrows) in atria. Scale bar: 50µm. **e.** Thionin (+) staining for mast cells (arrows) in ventricles. Scale bar: 50µm. **f.** Thionin (+) staining for mast cells (arrow) in epicardium. Scale bar: 50µm. **g.** T.B (+) staining for mast cells (arrows) in ventricles. Scale bar: 50µm. **h.** T.B (+) staining for mast cells (arrows) in epicardium. Scale bar: 50µm.

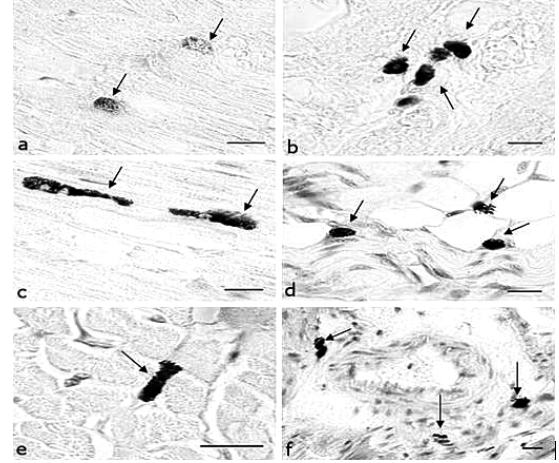


Şekil-2.a. Atriyumda AB (+) (ok başı), AB/SO (+) (ok), Bar:25µm. **b.** Ventrikulusta AB/SO (+) mast hücresi (ok) Bar: 25µm. **c.** Atriyumda Thionin (+) mast hücreleri (oklar), Bar: 50µm. **d.** Ventrikulusta Thionin (+) mast hücreleri (oklar), Bar: 50µm. **e.** Atriyumda T.B (+) mast hücresi (ok), Bar: 50µm. **f.** Ventrikulusta T.B (+) mast hücreleri (oklar), Bar: 50µm.

Figure-2.a. AB (+) staining for mast cells (arrow hit), AB/SO (+) staining for mast cells (arrow) in atria. Scale bar: 25µm. **b.** AB/SO (+) staining for mast cells (arrow) in ventricles. Scale bar: 25µm. **c.** Thionin (+) staining for mast cells (arrows) in atria. Scale bar: 50µm. **d.** Thionin (+) staining for mast cells (arrows) in ventricles. Scale bar: 50µm. **e.** T.B (+) staining for mast cells (arrow) in atria. Scale bar: 50µm. **f.** T.B (+) staining for mast cells (arrows) in ventricles. Scale bar: 50µm.

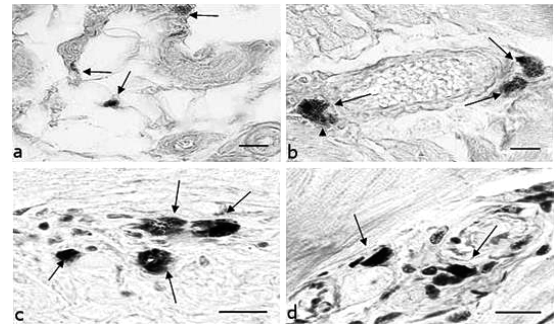
Orth Fiksasyonu:

Bu fiksatif ile fiske edilerek AB/SO boyanan atriyum, ventrikulus ve epikart kesitlerinde düzensiz (Şekil-5.a), armut veya yuvarlak görümlü mast hücreleri tespit edildi. Thionin uygulaması sonucunda atriyumda armut şeklinde veya oval; ventrikulusta granüller dağınık düzensiz-uzun (Şekil-5.b); epikartta granüller dağınık ve uzun-düzensiz (Şekil-5.c) mast hücreleri gözlemlendi. Toluidine Blue boyası ile boyanan doku örneklerinde atriyumda oval; ventrikulusta düzensiz (Şekil-5.d), uzun; epikartta granülleri dağınık ve uzun-düzensiz mast hücrelerine rastlandı.



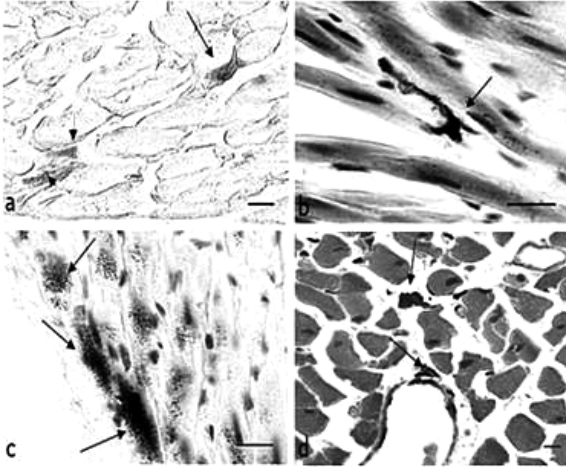
Şekil-3.a. Ventrikulusta AB/SO (+) mast hücreleri (oklar), Bar: 50µm. **b.** Atriyumda Thionin (+) mast hücreleri (oklar), Bar: 50µm. **c.** Ventrikulusta Thionin (+) mast hücreleri (oklar), Bar: 50µm. **d.** Atriyumda T.B (+) mast hücreleri (oklar), Bar: 50µm. **e.** Ventrikulusta T.B (+) mast hücresi (ok), Bar: 50µm. **f.** Ventrikulusta T.B (+) mast hücreleri (oklar), Bar: 50µm.

Figure-3.a. AB/SO (+) staining for mast cells (arrows) in ventricles. Scale bar: 50µm. **b.** Thionin (+) staining for mast cells (arrows) in atria. Scale bar: 50µm. **c.** Thionin (+) staining for mast cells (arrows) in ventricles. Scale bar: 50µm. **d.** T.B (+) staining for mast cells (arrows) in atria. Scale Bar: 50µm. **e.** T.B (+) staining for mast cells (arrow) in ventricles. Scale bar: 50µm. **f.** T.B (+) staining for mast cells (arrows) in ventricles. Scale bar: 50µm.



Şekil-4.a. Atriyumda Safranin (+) mast hücreleri (oklar), Bar: 25µm. **b.** Ventrikulusta Safranin (+) (ok başı), AB/SO (+) (oklar) mast hücreleri, Bar: 50µm. **c.** Atriyumda Thionin (+) mast hücreleri (oklar), Bar: 50µm. **d.** Ventrikulusta T.B (+) mast hücreleri (oklar), Bar: 50µm.

Figure-4.a. Safranin (+) staining for mast cells (arrows) in atria. Scale Bar: 25µm. **b.** Safranin (+) staining for mast cells (arrow hit), AB/SO (+) staining for mast cells (arrows) in ventricles, Scale Bar: 50µm. **c.** Thionin (+) staining for mast cells (arrows) in atria. Scale bar: 50µm. **d.** T.B (+) staining for mast cells (arrows) in ventricles. Scale bar: 50µm.



Şekil-5.a. Ventrikulusta AB (+) mast hücreleri (ok başı), AB/SO (+) mast hücresi (ok), Bar: 25µm. **b.** Ventrikulusta Thionin (+) mast hücresi (ok), Bar: 50µm. **c.** Epikartta Thionin (+) mast hücreleri (oklar), Bar: 50µm. **d.** Ventrikulusta T.B (+) mast hücreleri (oklar), Bar: 50µm.

Figure-5.a. AB (+) staining for mast cells (arrow hit), AB/SO (+) staining for mast cells (arrow) in ventricles. Scale bar: 25µm. **b.** Thionin (+) staining for mast cells (arrow) in ventricles. Scale Bar: 50µm. **c.** Thionin (+) staining for mast cells (arrows) in epicardium. Scale Bar: 50µm. **d.** T.B (+) staining for mast cells (arrows) in ventricles. Scale Bar: 50µm.

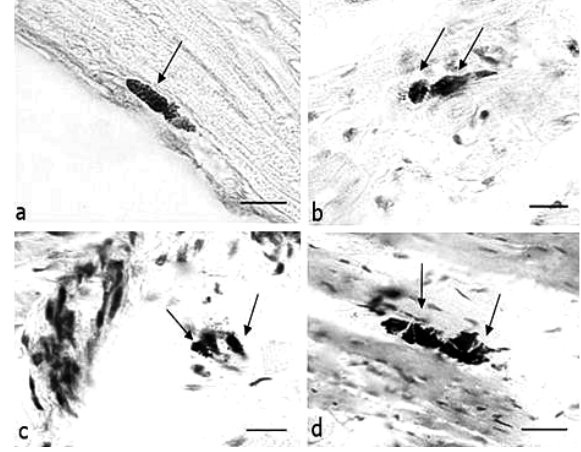
Schaudin Fikzasyonu:

Schaudin fikzasyonu uygulanan atriyum kesitlerine AB/SO boyaması sonucunda yuvarlak ve armut; ventrikulusta yuvarlak veya oval; epikartta ise uzun-oval (Şekil-6.a) mast hücreleri gözlemlendi. Thionin boyası ile atriyumda oval; ventrikulusta oval ve yuvarlak (Şekil-6.b); epikartta ise yuvarlak mast hücreleri saptandı. Toluidine Blue uygulaması sonucunda atriyumda oval şekilli-granülleri dağınık (Şekil-6.c); ventrikulusta yuvarlak, düzensiz (Şekil-6.d); epikartta yuvarlak veya oval mast hücrelerine rastlandı.

Mast hücreleri, damar çevresinde az miktarda görülürken ventrikulus ve epikart bölgesinde daha fazla miktarda dağılım gösterdi. Mast hücrelerinin damardaki dağılımına bakıldığında ise intima ve media bölgelerinde mast hücrelerine rastlanmazken adventisyada az miktarda rastlandı.(Şekil-1.d, Şekil-3.f, Şekil-4.b, Şekil-4.d, Şekil-5.d). Damar çevresinde genellikle oval ve armut şeklinde mast hücrelerine rastlandı.

Mast hücre granüllerinin belirginliğini görebilmek için en iyi boyama yönteminin AB/SO olduğu belirlendi.

Degranüle mast hücreleri sayısının granüle mast hücrelerine oranla daha az olduğu tespit edildi.



Şekil-6.a. Epikartta Safranin (+) mast hücresi (ok), Bar: 50µm. **b.** Ventrikulusta Thionin (+) mast hücreleri (oklar), Bar: 50µm. **c.** Atriyumda T.B (+) mast hücreleri (oklar), Bar: 50µm. **d.** Ventrikulusta T.B (+) mast hücreleri (oklar), Bar: 50µm.

Figure-6.a. Safranin (+) staining for mast cells (arrow) in epicardium. Scale Bar: 50µm. **b.** Thionin (+) staining for mast cells (arrows) in ventricles. Scale Bar: 50µm. **c.** T.B (+) staining for mast cells (arrows) in atria. Scale Bar: 50µm. **d.** T.B (+) staining for mast cells (arrows) in ventricles. Scale Bar: 50µm.

İstatistiksel Bulgular

Kalpte bulunan mast hücrelerinin atriyum ve ventrikulus bölgelerindeki dağılımlarını belirleme amacıyla yapılan hücre sayımlarında ulaşılan ortalama değerlerin farklılık ve sonuçları Tablo 1-5. ve Şekil 1-5.'te belirtildi.

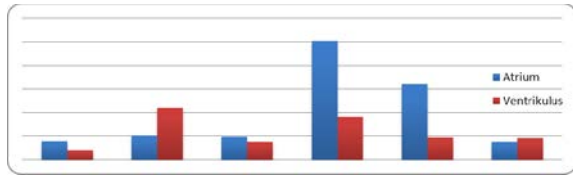
Yapılan boyalamalar sonucunda, Thionin ile boyanmış atriyumdaki mast hücrelerinin sayısal yoğunluğunun en fazla Orth tespit çözeltisiyle, ventrikulus bölgesinde ise %10 Formalin ile fikse edilmiş doku örneklerinde olduğu belirlendi (Tablo-1, Şekil-1).

Toluidine Blue ile boyanmış atriyumda sayıca fazlalık gösteren mast hücrelerinin Carnoy fiksatifi ile, ventrikulusta ise Orth fiksatifi ile tespit edilmiş kesitlerde olduğu belirlendi (Tablo-2, Şekil-2).

Tablo-1. Thionin boyası ile boyanan ortalama mast hücre sayıları. a, b, ab: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark vardır ($p<0,05$).

Table-1. Average number of mast cells stained with Thionine. a, b, ab: Different letters in the same column show to be a statistically significant difference between group means ($p<0,05$).

THIONİN	Atriyum	Ventrikulus
Bouin	15,5 ^b ±19,7	8,19 ^b ±5,31
%10 Formalin	20,57 ^b ±6,73	43,92 ^a ±2,93
Schaudin	19,21 ^b ±3,95	15,16 ^b ±1,89
Orth	100,9 ^a ±44,7	36,19 ^a ±5,31
Alkolik Formalin	64,0 ^{ab} ±32,1	19,13 ^b ±5,77
Carnoy	15,21 ^b ±5,94	18,20 ^b ±2,77



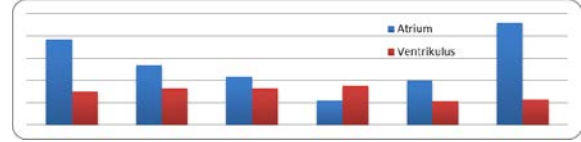
Şekil-1. Thionin boyası ile boyanan örneklerin ortalama mast hücre sayılarının dağılımları.

Figure-1. Mean distribution of mast cell numbers in sections stained with dye Thionine.

Tablo-2. Toluidine Blue boyası ile boyanan ortalama mast hücre sayıları. a: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark vardır ($p<0,05$).

Table-2. Average number of mast cells stained with Toluidine Blue. a: Different letters in the same column show to be a statistically significant difference between group means ($p<0,05$).

T.B	Atriyum	Ventrikulus
Bouin	38,5 ^a ±34,7	14,917 ^a ±1,233
%10 Formalin	26,96 ^a ±6,14	16,647 ^a ±1,322
Schaudin	21,8233 ^a ±0,0950	16,64 ^a ±4,64
Orth	10,953 ^a ±0,705	17,63 ^a ±4,03
Alkolik Formalin	21,25 ^a ±0,00	11,58 ^a ±0,00
Carnoy	45,98 ^a ±10,01	11,303 ^a ±1,359



Şekil-2. Toluidine Blue boyası ile boyanan örneklerin ortalama mast hücre sayılarının dağılımları.

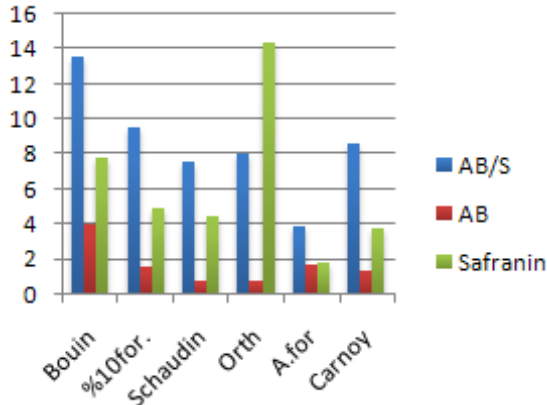
Figure-2. Mean distribution of mast cell numbers in sections stained with dye Toluidine Blue.

AB/S kombine boyası ile boyanmış kesitlerde atriyum bölgesinde kombine boyanan mast hücrelerinin sayıca en fazla Bouin fiksatifinin kullanıldığı, ventrikulus bölgesinde ise Orth fiksatifinin kullanıldığı örneklerde olduğu gözlemlendi (Tablo-3, Şekil-3-4). AB ile boyanan, atriyumda bulunan mast hücrelerinin sayısal fazlalığı en fazla Bouin fiksatifinin kullanıldığı, ventrikulus bölgesinde ise Carnoy fiksatifinin kullanıldığı doku örneklerinde olduğu belirlendi (Tablo-4, Şekil-3-4). Safranin ile boyanan atriyum ve ventrikulus bölgelerinde ise sayısal yoğunluk en fazla Orth ile fikse edilmiş örneklerde görüldü (Tablo-5, Şekil-3-4).

Tablo-3. AB/SO boyası ile boyanan ortalama AB/SO(+) mast hücre sayıları. a: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark vardır ($p<0,05$).

Table-3. Average number of mast cells stained with AB/SO. a: Different letters in the same column show to be a statistically significant difference between group means ($p<0,05$).

AB/SO	Atriyum	Ventrikulus
Bouin	13,53 ^a ±15,12	8,23 ^a ±3,73
%10 Formalin	9,570 ^a ±0,509	3,880 ^a ±0,979
Schaudin	7,520 ^a ±0,860	1,943 ^a ±0,255
Orth	7,98 ^a ±5,90	9,43 ^a ±5,90
Alkolik Formalin	3,8933 ^a ±0,1050	4,963 ^a ±1,445
Carnoy	8,58 ^a ±4,13	6,873 ^a ±0,950



Şekil-3. Atriyumda AB/SO boyası ile boyanan örneklerin ortalama mast hücre sayılarının dağılımları.

Figure-3. Mean distribution of mast cell numbers in sections stained with dye AB/SO in atria.

Tablo-4. AB/SO boyası ile boyanan ortalama AB (+) mast hücre sayıları. a, b, ab: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark vardır ($p<0,05$).

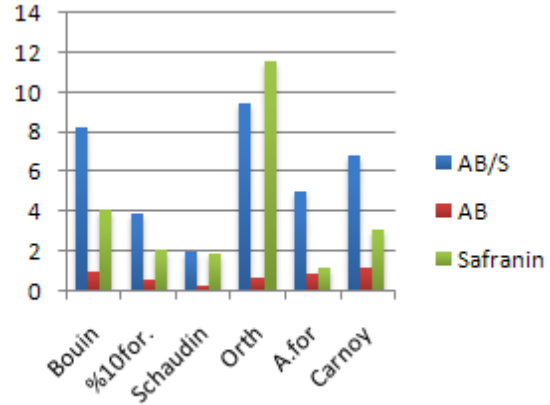
Table-4. Average number of mast cells stained with AB. a, b, ab: Different letters in the same column show to be a statistically significant difference between group means ($p<0,05$).

AB	Atriyum	Ventrikulus
Bouin	4,01 ^a ±4,64	0,997 ^{ab} ±0,227
%10 Formalin	1,527 ^a ±0,900	0,577 ^{ab} ±0,238
Schaudin	0,7600 ^a ±0,1114	0,25333 ^b ±0,00577
Orth	0,783 ^a ±0,595	0,663 ^{ab} ±0,435
Alkolik Formalin	1,653 ^a ±0,625	0,913 ^{ab} ±0,255
Carnoy	1,367 ^a ±0,574	1,203 ^a ±0,528

Tablo-5. AB/SO kombine boyası ile boyanan ortalama Safranin (+) mast hücre sayıları. a, b, ab: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark vardır ($p<0,05$).

Table-5. Average number of mast cells stained with Safranin. a, b, ab: Different letters in the same column show to be a statistically significant difference between group means ($p<0,05$).

Safranin	Atriyum	Ventrikulus
Bouin	7,82 ^a ±6,71	4,063 ^{ab} ±1,689
%10 Formalin	4,86 ^a ±2,48	2,123 ^b ±0,867
Schaudin	4,453 ^a ±0,375	1,910 ^b ±0,370
Orth	14,34 ^a ±9,96	11,56 ^a ±7,24
Alkolik Formalin	1,823 ^a ±0,455	1,220 ^b ±0,840
Carnoy	3,763 ^a ±1,486	3,090 ^b ±0,440



Şekil-4. Ventrikulusta AB/SO boyası ile boyanan örneklerin ortalama mast hücre sayılarının dağılımları.

Figure-4. Mean distribution of mast cell numbers in sections stained with dye AB/SO in ventricles.

Tartışma ve Sonuç

Koçak Harem ve Kurtdeğede²⁴, %10 Formalin ile fiske edilen tavuk alt solunum yollarına ait doku örneklerinde Toluidine Blue boyama ile metakromatik olarak boyanan mast hücrelerine rastlamadıklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmada da benzer bulgu elde edildi. Aynı araştırmacılar²⁴ %10 Formalin ile fiske edilmiş doku örneklerinde mastositlerin Alcian Blue-Safranin ile reaksiyon vermediklerini belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise Alcian Blue-Safranin kombine uygulamasında; Alcian Blue, Safranin ve AB/Safranin ile kombine boyanmış olmak üzere üç farklı mastosit tespit edildi. Bu çalışmadaki bulgulara benzer biçimde Canbilen⁵ sıçan nasal mukozasında Alcian Blue/Safranin boyama metoduyla boyanan kesitlerdeki mast hücre granüllerinin kırmızı, mavi ve bazı hücre granüllerinin ise hem kırmızı hem mavi (kombine) boyandığını belirtmiştir.

Bu çalışmadaki bulguları destekler nitelikte Ertuğrul¹³ tavuk böbreğinde ve Uslu ve Yörük³² hindi sindirim sisteminde mast hücrelerinin buldukları yere göre farklı büyüklüklerde, yuvarlak, oval veya mekik şeklinde gözlendiğini belirtmişlerdir.

Demirbağ vd.¹¹ rat ince bağırsağındaki mast hücre granüllerinin tespiti için Carnoy fiksatifinin uygun olmadığını belirtirlerken bu çalışmada Carnoy fiksatifini ile mast hücre granüllerinin tespit edildiği saptandı.

Ertuğrul¹³ tavuk böbreğinde %10 Formalin ve izotonik formaldehit asetik asit (IFAA);

Özen vd.²⁶ domuz oviduktunda %10 Formalin ve IFAA; Koçak Harem ve Kurtdede²⁴ tavuk alt solunum yollarında IFAA; Demirbağ vd.¹¹ rat ince bağırsağında % 10 Formalin, Carnoy ve IFAA; Uslu ve Yörük³¹ hindi sindirim sisteminde %10 Formalin, Carnoy ve Basic Lead Acetate (BLA); Eren¹² köpek derisinde %10 tamponlu nötral formalin (NBF) ve IFAA fiksatifleri uygulamaları ve Toluidine Blue boyaması sonucunda bu çalışmadaki bulgu ile benzer tarzda mast hücrelerinde metakromazi tespit ettiklerini belirtmişlerdir.

Yine bu çalışmada elde edilen bulgularla benzer biçimde Uslu ve Yörük³¹ hindi sindirim sistemi, Eren¹² köpek derisi, Uslu ve Yörük³² ördek ve kazın alt solunum yolları, Saruhan³⁰ kuzu derisi, Ertuğrul¹³ tavuk böbreği, Özen²⁶ domuz oviduktu, Canbilen⁵ sıçan nasal mukoza ve Facoetti¹⁴ ratların kardiyak dokularında mast hücrelerinin kapılların çevresinde ve damar yakınlarında lokalize oldukları bildirilmiştir.

Facoetti vd.¹⁴, kardiyak mastositlerinin yuvarlak yapıya sahip olup, kan damarları yakınında bulduklarını belirtmişlerdir. Frangogiannis vd.¹⁸ de kardiyak mastositlerinin genellikle adventisyal bölgede ve damar boyunca dağılım gösterdiklerini belirtmişlerdir. Bu çalışmada kan damarları yakınında yerleşim gösterdikleri belirlenen mastositlerin çoğunlukla oval ve armut şeklinde oldukları ve adventisyal bölgede az sayıda görüldükleri tespit edildi.

Bu çalışmada elde edilen bulgulara benzer olarak Facoetti vd.¹⁴; degranülasyon sürecinde olan kardiyak mast hücre granüllerinin dağınık olarak bulduklarını belirtmişlerdir. Ayrıca bu araştırmacılar¹⁴ degranüle olmuş ve degranüle olmamış mast hücreleri olmak üzere morfolojik açıdan iki tip mast hücresi teşhis etmişlerdir. Canbilen⁵ sıçan nasal mukoza degranüle mast hücreleri sayısının granüle mast hücrelerine oranla, daha az olduğunu tespit etmiştir.

Frangogiannis vd.¹⁸ kardiyak mastositlerine Toluidine Blue uyguladıklarında, Carnoy fiksatifinin kullanıldığı örneklerle göre Formalin fiksatifinin kullanıldığı örneklerde daha az mast hücresine rastladıklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmada da benzer bulgular elde edildi.

Yapılan bu çalışma sonunda, Carnoy tespit çözeltisi ile tespit edilen kalp dokularındaki mast hücrelerinin Toluidine blue, Orth tespit çözeltisi ile tespit edilen kalp dokularındaki mast hücrelerinin ise Thionin ve AB/SO boyama yöntemi ile daha iyi boyandığı gözlenmiştir.

Mast hücre granül şekillerinin belirginliğini görebilmek için ise en iyi boyama yönteminin AB/SO olduğu belirlendi.

Bu sonuçlara bağlı olarak; rat kardiyak mastositlerinin boyanması, sayısal yoğunluğu ve morfolojik olarak şekillerinin teşhisinde kullanılan tespit çözeltisinin büyük bir önemi bulunacağı kanısına varıldı.

Kaynaklar

1. Akay, T., 2008. Genel Histoloji. Palme Yayıncılık, Ankara.
2. Akgül, A., 2008. Kardiyak mast hücreleri. *Türkiye Klinikleri Journal Cardiovascular Sciences.*, 20, 63-64
3. Arda, M., 1994. İmmunolojik Reaksiyonlarda Fonksiyonları olan diğer hücreler. İmmunoloji. Medisan Yayınevi, Ankara.
4. Atkins, F.M., Friedmen, M.M., Subra Rao, P.V., Metcalfe, D.D., 1985. Interaction between mast cells, fibroblast and connective tissue components. *International Archives of Allergy and applied Immunology.*, 77, 96-102.
5. Canbilen, A., 1992. Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 56, Konya.
6. Canpolat, L., 1997. Mast hücreleri. *Fırat Tıp Dergisi.*, 1(4), 267-274.
7. Cook, H.C., 1961. A modified thionin technique form ast cells in tissue section. *The Journal of Medical Laboratory Technology.*, 18, 188-192.
8. Crowle, P.K., Reed, N.D., 1984. Bone marrow origin of mucosal mast cells. *International Archives of Allergy Applied Immunology.*, 73, 242-247.
9. Csaba, G., 1990. Alcian Blue-Safranin method for mast cells. In: Bancroft, J.D., Stevens, A. (eds.), *Theory and Practice of Histological Techniques.* Livingstone, New York, pp.639
10. Çolakoğlu, B., 2014. Kardiyovasküler hastalıklar ve anafilaksi. *Türkiye Klinikleri Journal Immunology Allergy-Special Topics.*, 7(1), 44-52
11. Demirbağ, E., Çınar, K., Kutlar, M.H., Eroğlu, G., Sarı, S.M., 2012. Ratların (*Rattus rattus*) ince bağırsaklarında mast hücre dağılımı ve heterojenitesi. *SDÜ Fen Dergisi.*, 7(2), 92-99
12. Eren, Ü., 2000. Köpek derisinde mast hücreleri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.*, 47, 167-175
13. Ertuğrul, T., 2012. Tavuk böbreğinde mast hücrelerinin dağılımı ve heterojenitesi. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi.*, 83(2), 9-16
14. Facoetti, A., Fallarini, S., Miserere, S., Bertolotti, A., Ferrero, I., Tozzi, R., Gatti, C., Palladini, G., Perlini, S., Nano, R., 2006. Histochemical study of cardiac mast cells degranulation and collagen deposition: interaction with the cathecolaminer-

- gic system in the rat. *European Journal of Histochemistry.*, 50(2), 133-140
15. Forman, M.B., Oates, J.A., Robertson, R.M., Roberts, L.J., Virmani, R., 1985. Increased adventitial mast cells in a patient with coronary cpasm. *New England Journal of Medicine.*, 313, 1138-1141
 16. Frangogiannis, N.G., Lindsey M.L., Michael, L.H., Youker, K.A., Bressler, R.B., Mendoza, L.H., Spengler, R.N., Smith, C.W., Entman, M.L., 1998. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF- alpha initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation.*, 98, 699-710
 17. Frangogiannis, N.G., Perrard, J.L., Mendoza, L.H., Burns, A.L., Lindsey M.L., Ballantyne, C.M., Michael, L.H., Smith, C.W., Entman, M.L., 1998. Stem cell factor induction is associated with mast cell accumulation following myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation.*, 98, 687-698
 18. Frangogiannis, N.G., Burns, A.R., Michael L.H., Entman, M.L., 1999. Histochemical and morphological characteristics of canine cardiac mast cells. *The Histochemical Journal.*, 31, 221-229
 19. Gordon, J.R., Burd, P.R., Galli, S.J., 1990. Mast Cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunology Today.*, 11(12), 458-464
 20. Hopwood, D., 1996. Fixation and fixatives. In: Bancroft, J.D., Stevens, A. (Eds), *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill-Livingstone, Edinburgh, pp. 20-35.
 21. Hunt, C., Campell, A.M., Robinson, C., Holgate, T., 1991. Structural and secretory characteristics of bovine lung and skin mast cells: evidence for the existence of heterogeneity. *Clinical and Experimental Allergy.*, 21, 173- 182.
 22. Irani, A.A., Schwartz, L.B., 1989. Mast cell heterogeneity, *Clinical and Experimental Allergy.*, 19, 143-155.
 23. Ito, B.R., Engler, R.L., Del Balzo, U., 1993. Role of cardiac mast cells in complement C5a-induced myocardial ischemia. *American Journal of Physiology.*, 264, H1346-H1354
 24. Koçak Harem, M., Kurtdede, N., 2004. Tavuk (*Gallus domesticus*) alt solunum yollarındaki mast hücreleri üzerinde histolojik araştırmalar. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.*, 1(1), 21-26
 25. Kovanen, P.T., 1995. Role of mast cells in atherosclerosis. *Chemical Immunology.*, 62, 132-170
 26. Özen, A., Bayraktaroğlu, A.G., Ertuğrul, T., Özcan, Z., Ceylan, A., Özen, D., 2014. Domuz oviduktunda mast hücreleri üzerinde ışık ve elektron mikroskopik çalışmalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.*, 61, 9-14
 27. Pakiş, I., Akyıldız, E.Ü., Turan, A., Karayel, F., Ersoy, G., Kır, Z., 2008. Miyokard infarktüsünde mast hücrelerinin rolü: otopsi çalışması. *Adli Tıp Bülteni.*, 13(1), 9-12
 28. Patella, V., Marino, I., Lamparter, B., Arbustini, E., Adt, M., Marone, G., 1995. Human heart mast cells. Isolation, purification, ultrastructure, and immunologic characterization. *The Journal of Immunology.*, 154, 2855-2865
 29. Pearce, F.L., 1986. On the heterogeneity of mast cells. *Pharmacology.*, 32, 61-71.
 30. Saruhan, B., Akbalık M.E., Sağsöz, H., Ketani M.A., 2011. Farklı beslenme uygulanmış ıvesi ırkı kuzu derilerinde mast hücrelerinin histokimyasal ve kantitatif incelenmesi. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.*, 2(4), 58-64
 31. Uslu, S., Yörük, M., 2008. Hindilerde sindirim sisteminde mast hücrelerinin dağılımı ve heterojenitesi üzerine morfolojik ve histometrik araştırmalar. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.*, 2008(2), 47-51
 32. Uslu, S., Yörük, M., 2013. Yerli ördek (*Anas platyrhynchos*) ve kaz'ın (*Anser anser*) alt solunum yolları ve akciğerlerinde bulunan mast hücrelerinin dağılımı ve heterojenitesi üzerine morfolojik ve histometrik araştırmalar. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.*, 19(3), 475-482
 33. Welle, M., 1997. Development, Significance and Heterogeneity of Mast Cells with Particular Regard to the Mast Cell Specific Proteases Chymase and Tryptase. *Journal of Leukocyte Biology.*, 61, 233-245.
 34. Wolman, M., 1971. Standart Blue. *Laboratory Investigation.*, 25, 104-110.

