

KÖPEK DERİSİNDE MAST HÜCRELERİ

Ülker EREN¹

Mast cells in the skin of dog

Summary: *In this study, histological and histochemical properties and density of mast cells were investigated in the skin of dog. For this purpose skin biopsies from nine dogs with no clinical or histological evidence of skin diseases were examined. Biopsies of the dogs were obtained from the lateral abdomen. Each specimen was divided into two pieces which were placed in both neutral buffered formalin (NBF) and isotonic formalin acetic acid fixatives (IFAA). To demonstrate the mast cells, tissue sections were stained with toluidine blue (TB), alcian blue / safranin O (AB/SO) and Berberine sulphate staining methods. The mast cells were observed in subepidermal region, around the blood vessels, sweat glands, sebaceous glands and hair follicles. In IFAA fixed tissue, the mast cells could not be demonstrated sufficiently with AB/SO staining method. The mast cells were stained as AB(+), AB/SO(+) and frequently SO(+) in NBF fixed tissues. The heparin containing mast cells were also demonstrated with Berberine sulphate staining methods in subepidermal region, around the blood vessels, sweat glands, sebaceous glands and hair follicles. With TB staining method, the mast cell density were detected as 27.80 ± 1.68 mast cells /mm² in NBF fixed tissues and 29.09 ± 3.16 mast cells /mm² in IFAA fixed tissues. No statistically significant differences were found between the number of TB (+) mast cells in the NBF and IFAA fixed tissues.*

Key words: *Dog, histochemistry, mast cell, skin.*

Özet: *Bu çalışmada, köpek derisinde mast hücrelerinin histolojik, histokimyasal özellikleri ve dokudaki dağılımları araştırıldı. Bu amaçla herhangi bir deri hastalığı olmayan dokuz adet köpekten alınan deri örnekleri incelendi. Deri örnekleri lateral abdomen'den alındı. Doku örneklerinin bir parçası IFAA, diğer parçası NBF'de tespit edildiler. Mast hücrelerinin demonstrasyonu için kesitler TB, AB/SO boyama metotları ve Berberin sülfat floresan boyama metodu ile boyandılar. Mast hücrelerinin epidermisin altında, kan damarlarının etrafında, kıl foliküllerinde, deri ve yağ bezlerinin etrafında buldukları gözlemlendi. IFAA ile tespit edilmiş kesitlerde mast hücrelerinin AB/SO boyama metodu ile yeterince boyanmadıkları görüldü. NBF ile tespit edilmiş kesitlerde, mast hücrelerinin AB (+), AB/SO (+) ve daha sıklıkla olmak üzere SO (+) boyandıkları tespit edildi. Heparin içeren mast hücreleri kan damarlarının etrafında, kıl foliküllerinde, deri ve yağ bezlerinin etrafında Berberin sülfat ile*

demonstre edildiler. TB ile boyanan kesitlerde mm² 'deki mast hücre sayısı, NBF tespit sıvısı kullanıldığında 27.80± 1.68, IFAA tespit sıvısı kullanıldığında ise 29.09 ± 3.16 olarak tespit edildi. İstatistiksel değerlendirme sonucunda mast hücre sayısındaki farklılığın anlamlı olmadığı görüldü.

Anahtar kelimeler: Deri, histokimya, köpek, mast hücresi.

Giriş

Mast hücreleri, granüllerinde histamin, heparin, kondroitin sülfat, nötral proteazlar ve eozinofil kemotatik faktör içeren, fizyolojik ve patolojik olaylarda rol alan bağ dokusu hücreleridirler (11, 15). Mast hücrelerinin nöropeptidler aracılığı ile uyarılması sonucu derinin kan akımının düzenlenmesine yardımcı olduğu (15), histamin ve heparinin yara iyileşmesi ve doku yenilenmesinde rol aldığı (13, 18) bildirilmektedir. Köpek derisinde atipik mast hücrelerinin antijene karşı erken yanıttan, tipik mast hücrelerinin ise geç faz yanıttan sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (3).

Rodentlerde, mast hücre heterojenitesinin varlığı kabul edilmekte ve bağ dokusu mast hücresi (CTMC) ile mukozal mast hücresi (MMC) olmak üzere iki tip mast hücresi tanımlanmaktadır (8, 9, 19, 31, 35). Mast hücre heterojenitesi rodentler dışında farklı türlerde ve farklı dokularda da örneğin: insanda barsakta (26, 29) ve solunum sisteminde (22, 24, 32), koyunda barsakta (16), kanatlıda akciğerde (25), inekte solunum sistemi (6) ve uterusunda (10) çalışılmıştır.

Köpeklerde ise mast hücre heterojenitesi oldukça sınırlı sayıda deride (2, 3, 33) ve solunum sisteminde (21, 27) araştırılmıştır. Emerson ve Cross(7) normal köpek derisinde mast hücrelerinin stratum papillare'ye göre stratum retikulare'de daha fazla bulunduğunu, özellikle damarların çevresinde olmak üzere kıl foliküllerinin yağ ve ter bezlerinin etrafında yer aldığını bildirmektedirler. Araştırmacılar (7) köpek derisinde mast hücre dağılımının yaş ve cinsiyete bağlı farklılık göstermediğini tespit etmişlerdir. Mast hücre tümörlerinin köpeklerde deride en sık gözlenen malign tümör (14) olması dolayısıyla, köpeklerde mast hücre ça-

lışmaları bu yönde yoğunlaşmıştır (4, 5, 12, 23, 30).

Sunulan çalışmada, normal köpek derisinde bulunan mast hücrelerinin, histolojik-histokimyasal özelliklerinin ve birim alandaki yoğunluklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırmada materyal olarak, 10 ay ve 6 yaş arasında, 5.5-43 kg ağırlığında belirgin bir ırk özelliği göstermeyen ve herhangi bir deri hastalığı olmayan 9 adet (2 dişi ve 7 erkek) köpek kullanıldı. Genel klinik muayenelerden sonra, deri örnekleri lateral abdomen'den 1 cm çapında alındı. Doku örneklerinin bir parçası %10'luk tamponlu nötr formalin (NBF)(24 saat), diğer parçası ise izotonik formalin asetik asit (IFAA, pH 2,9)(97,85 ml distile su, 1,65 ml formalin, 0,5 ml asetik asit, 18 saat IFAA ve 12 saat %70 alkol) solüsyonlarında tesbit edildi (8, 9, 34). Parafin bloklardan 30 µ ara ile 5 µ kalınlığında seri kesit alındı. Mast hücrelerinin demonstrasyonu için, toluidin blue (TB) (% 0.5, pH 0.5), alcian blue (AB)(% 0.5, pH 0.2)/ saf-ranin O (SO)(% 0.25, pH 1) (9, 18) ve Berberin sülfat (% 0.02, pH 4) (1) boya metotları uygulandı. NBF ve IFAA ile tespit edilmiş dokulardan alınan kesitler TB ile boyandıktan sonra, x 400 büyütmede ve okuler kare grid (10x10) (0.00625 mm²) yardımıyla, her kesitte 10 kare alanda sayıldı. Bu şekilde her bloktan 6 kesitte sayım yapıldı. Elde edilen verilerin ortalamaları alındıktan sonra, 1 mm² alandaki mast hücre sayısı belirlendi.

Mast hücre sayımı sonunda, farklı tespit solüsyonunda tutulan doku örneklerinden elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde bağımlı gruplar için t testi uygulandı. Bu amaçla SPSS hazır paket program kullanıldı (28).

Bulgular

I FAA ve NBF solusyonları ile tespit edilen dokularda mast hücreleri, TB ile metakromatik olarak boyandılar. I FAA tespit sıvısı kullanıldığında, genelde dokunun tespitinden kaynaklandığı düşünülen sorunlar yaşandı. Boyanan kesitlerin lam üzerinden kaydıkları veya katlandıkları görüldü. Yine I FAA ile tespit edilen dokular AB/SO ile boyandığında mast hücrelerinin demonstrasyonunda iyi sonuç alınmadığı gözlemlendi. NBF ile tespit edilmiş kesitlerde ise mast hücrelerinin çoğunlukla safranin (+) (Şekil 1 ve 2 s), daha az olarak da alcian blue (+) (Şekil 2a) ve alcian blue / safranin (+) (Şekil 2 ab) boyanan granüller içeren mast hücrelerine rastlandı. TB ve AB/SO boyama metotları ile boyanan kesitler incelendiğinde, mast hücrelerinin dermiste epitelin altında

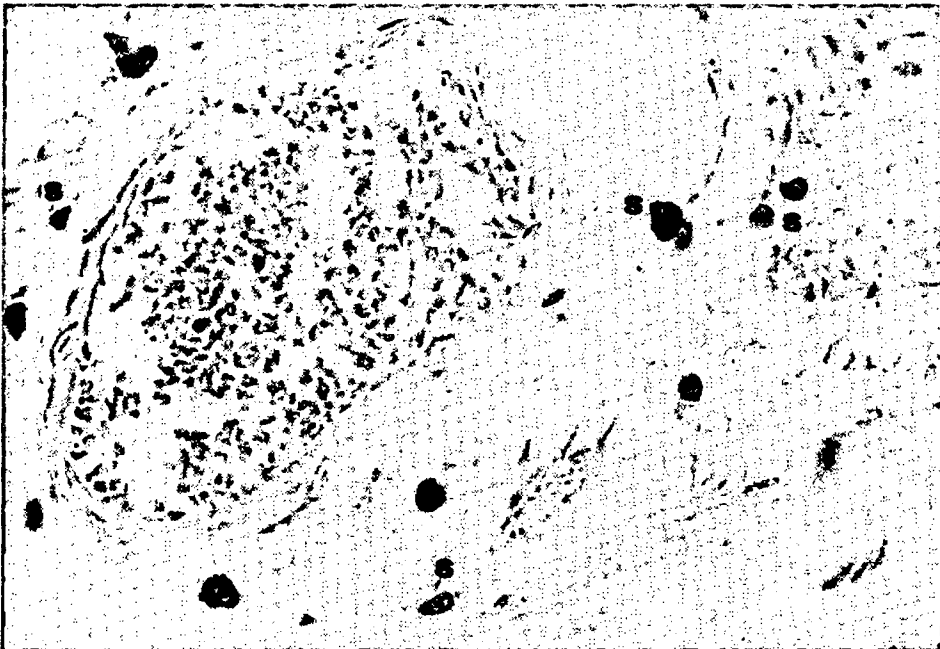
(Şekil 3 oklar), kan damarlarının (Şekil 1, 2), kıl foliküllerinin (Şekil 4 oklar), yağ ve ter bezlerinin çevrelerinde yerleştikleri görüldü.

Berberin sülfat ile boyanan kesitler floresan mikroskopla incelendiğinde mast hücrelerinin sarı fluoresan verdikleri gözlemlendi. Berberin sülfat ve AB/SO ile boyanan bitişik kesitler incelendiğinde, safranin (+) ve heparin içeren mast hücrelerine hem I FAA, hem de NBF ile tespit edilmiş doku kesitlerinde, epidermin hemen altında, kan damarlarının (Şekil 5A ve B oklar) ve kıl foliküllerinin etrafında (Şekil 5A ve B x) rastlandı. Ayrıca, yağ ve ter bezlerinin etrafında da (Şekil 6 oklar) heparin içeren mast hücreleri gözlemlendi.

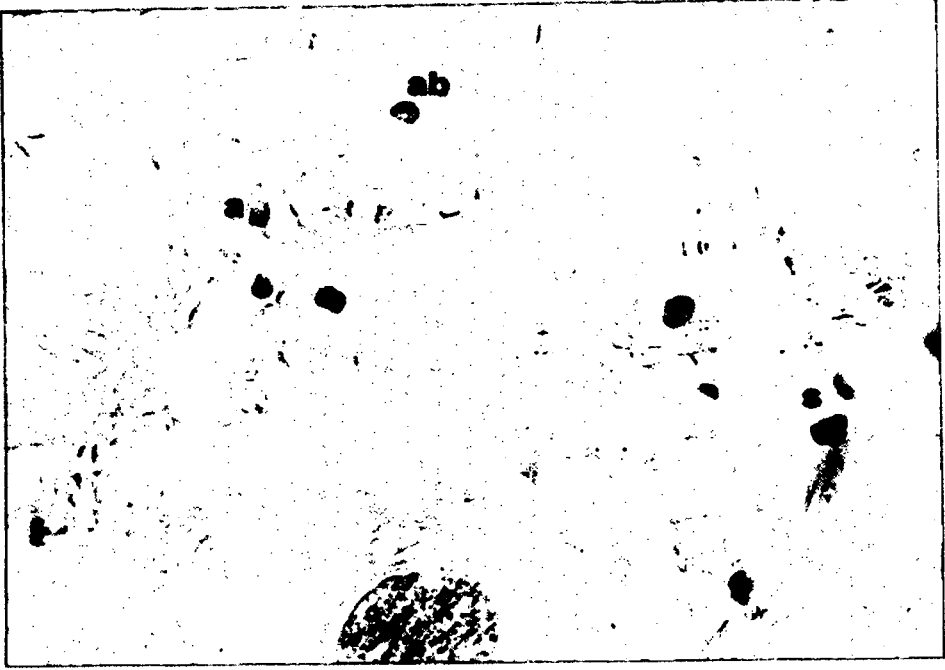
TB ile boyanan kesitlerde mm²'de belirlenen mast hücre sayısı Tablo 1'de verildi.

Tablo 1. I FAA ve NBF ile tespit edilmiş ve TB ile boyanmış kesitlerde mast hücre sayısı.
Table 1. The TB (+) mast cell counts in I FAA and NBF fixed tissues.

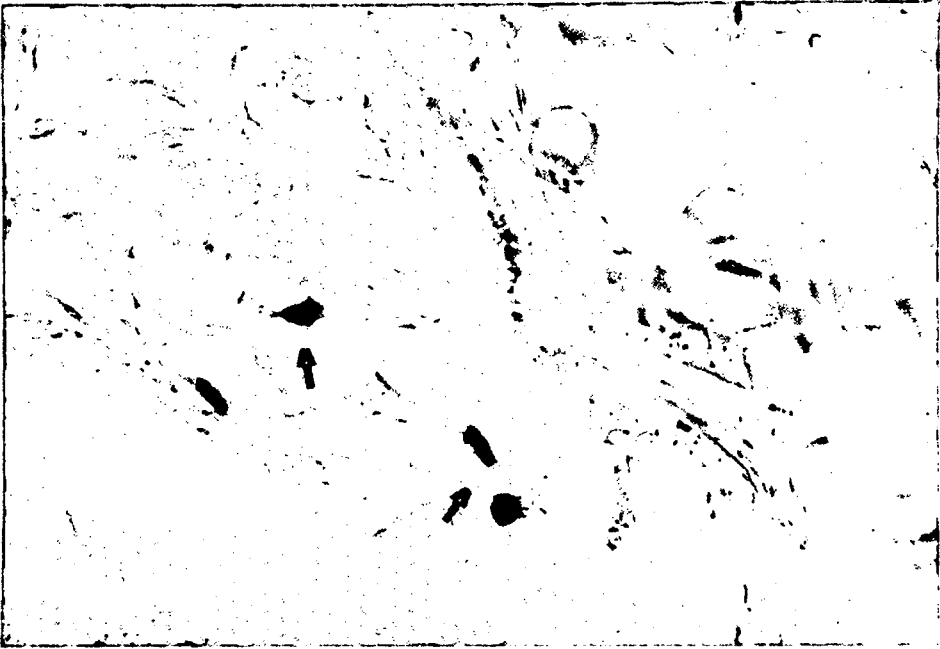
X(mast hücre sayısı/mm ²) ± SEM	I FAA (n=9)	NBF(n=9)
TB boyama	29.09 ± 3.16	27.80 ± 1.68



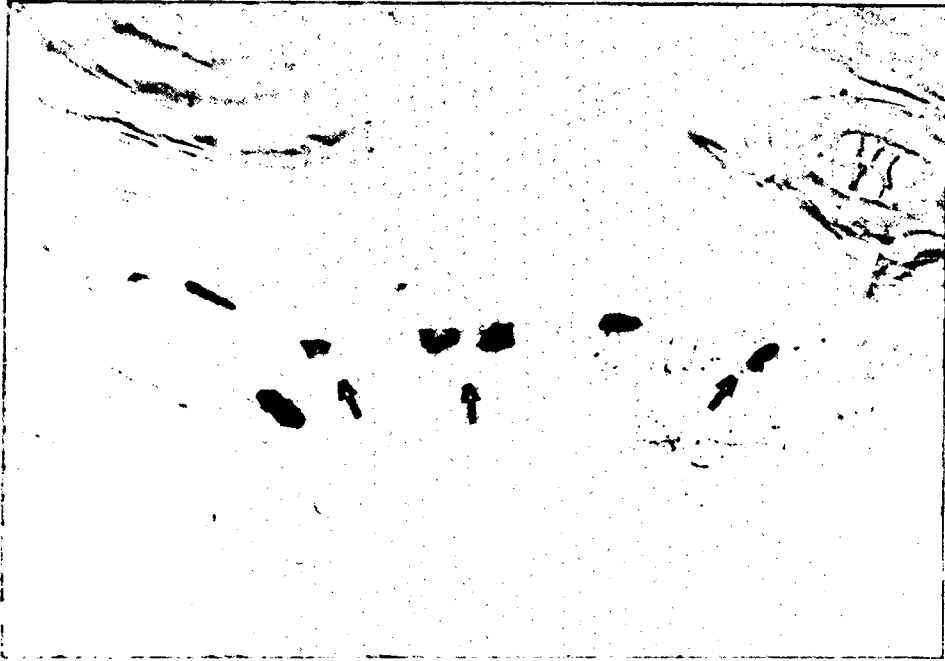
Şekil 1. Köpek derisinde kan damarı etrafında SO (+) mast hücreleri (s). AB/SO. x 500.
Figure 1. SO (+) mast cells (s) around the vessels in the skin of dog. AB/SO. x 500.



Şekil 2. Köpek derisinde AB (+) (a), SO (+)(s) ve AB/SO(+)(ab) mast hücreleri. AB/SO. x 500.
 Figure 2. AB (+) (a), SO (+)(s) and AB/SO(+)(ab) mast cells in the skin of dog. AB/SO. x 500.



Şekil 3. Köpek derisinde subepidermal TB (+) mast hücreleri (oklar). TB. x 500.
 Figure 3. The subepidermal TB (+) mast cells in the skin of dog (arrows). TB. x 500.



Şekil 4. Köpek derisinde kıl folliküllerinin etrafında TB (+) mast hücreleri (oklar). TB. x 500.
Figure 4. TB (+) mast cells around hair follicles in the skin of dog (arrows). TB. x 500.



Şekil 5A. Köpek derisinde kan damarlarının (oklar) ve kıl follikülünün çevresinde (x) Berberin sülfat ile sarı fluoerсан veren mast hücreleri. Berberin sülfat boyama. x 520.
Figure 5A. Berberine-induced fluorescence showing mast cells around the vessels (arrows) and hair follicule (x) in the skin of dog. Berberine sulphat staining. x 520.



Şekil 5B. Köpek derisinde kan damarlarının (oklar) ve kıl follikülünün çevresinde (x) mast hücreleri. AB/SO. x 520.
 Figure 5B. The mast cells around the vessels (arrows) and hair follicule (x) in the skin of dog. AB/SO. x 520.



Şekil 6. Köpek derisinde yağ ve ter bezlerinin çevresinde Berberin sülfat ile sarı fluoresan veren mast hücreleri (oklar). Yağ bezi (y), ter bezi (t). Berberin sülfat boyama. x 480.
 Figure 6. Berberine-induced fluorescence showing mast cells around the sweat and sebaceous glands (arrows) in the skin of dog. Sebaceous gland (y) and sweat gland (t). Berberine sulphat staining. x 480.

İstatistiksel değerlendirme sonucunda, farklı tespit solusyonları kullanılan ve TB ile boyanan kesitlerde belirlenen mast hücre sayısındaki farklılığın anlamlı olmadığı görüldü.

Tartışma ve Sonuç

Wingren ve Enerback (34), formalinin barsakta mast hücre granüllerinin katyonik boya tutmasını geçici olarak engellediğinden, mast hücrelerinin demonstrasyonu için özel fiksatiflere gereksinim olduğuna işaret etmektedirler. Deri mast hücrelerinin boyanmasında da aldehit blokajının oluştuğu rat (1), insan (20) ve köpeklerde (2) bildirilmiştir. Rat derisinde (1) aldehit blokajının subepidermal mast hücrelerinde meydana geldiği tespit edilmiştir. İnsanlarda ise hem TB hem de AB boyamada aldehit blokajının oluştuğu, AB/SO boyamada en fazla AB (+) granüllerin etkilendiği belirlenmiştir (20).

Sunulan çalışmada tespit sıvısı olarak IFAA ve NBF kullanıldı ve araştırmacıların (1, 2, 20) bulgularından farklı olarak IFAA ile tespit edilen kesitlerde belirlenen mast hücre sayısının fazlalığı, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Ayrıca IFAA ile tespit edilen kesitlerin lam üzerinden düşmesinin, köpek derisinde mast hücrelerinin dışında, dokunun genel anlamda yeterince tespit olmamasından kaynaklanabileceği düşünüldü.

Emerson ve Cross'un (7) bulguları ile uyumlu olarak, sunulan çalışmada da köpek derisinde mast hücreleri damarların, kıl folliküllerinin, yağ ve ter bezlerinin çevresinde demonstre edilmiştir. Mast hücrelerinin deride bu bölgelerde bulunmalarının nedeni, savunma mekanizmalarının (3, 33) dışında, damar geçirgenliğini artırarak ya da hücreler arası madenin sıvılık durumunu ayarlayarak epidermise ait hücrelerin ve lokalize oldukları bölgelerde bulunan diğer hücrelerin beslenmesini kolaylaştırmak olabilir.

Rat derisine AB/SO boyama uygulandığında subepidermal mast hücrelerinin

çoğunlukla AB(+), daha aşağılarda olan mast hücrelerinin ise SO (+) boyandığı tespit edilmiştir (1). İnsanlarda deride AB/SO boyama metodu ile mast hücrelerinin çoğunlukla AB (+) ve daha az olmak üzere SO(+) ve AB/SO(+) boyandıkları gözlenmiş, TB boyamaya göre AB/SO boyamada daha fazla mast hücresi tespit edilmiştir (20). Becker ve ark (2) ise köpek derisine AB boyama uygulamışlar ve tespite bağımlı olmadan AB ile boyanan mast hücrelerini "tipik", bazik kurşun asetat tespitinden sonra AB ile boyanan mast hücrelerini ise "atipik" mast hücresi olarak tanımlamışlardır. Araştırmacılar (2) AB boyamadan sonra safranin kullanmamışlardır. Welle ve ark. (33) ise enzim immunohistokimyasal metotlar kullanarak spesifik proteazları araştırmış ve mast hücre granüllerinin heterojen olduğunu ileri sürmüşlerdir. Sunulan çalışmada AB/SO boya metodu uygulandığında, NBF ile tespit edilen kesitlerde mast hücrelerinin AB(+), SO(+) ve AB/SO(+) reaksiyon verdikleri tespit edildi. SO (+) mast hücrelerinin daha sıklıkla gözleendiği dikkati çekti. Rodentlerde safranin O'nun bağ dokusu mast hücresinde heparine bağlandığı bildirilmiştir (9). IFAA ile tespit edilen kesitlerde mast hücreleri, AB/SO boyama metodu ile yeterince demonstre edilemediler. Bunun yanında rat derisinde olduğu gibi (1) köpek derisinde de hem IFAA hem de NBF ile tespit edilen dokularda mast hücrelerinin Berberin sülfat ile fluoresan verdiği tespit edildi. İnek derisinde de (17) mast hücrelerinde heparinin varlığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak köpek derisinde mast hücrelerinin epidermisin altında, damarların, kıl folliküllerinin, ter ve yağ bezlerinin etrafında buldukları, histokimyasal olarak heterojen oldukları tespit edildi. Birim alanda mast hücre sayısı belirlendi. Köpek derisinde aldehit blokajının IFAA tespit sıvısından başka tespit sıvılarıyla da çalışılması gerektiği kanısına varıldı.

Kaynaklar

1. Aldenborg F, Enerback L (1988) *Histochemical heterogeneity of dermal mast cells in athymic and normal rats*. *Histochem J*, **20**, 19-28.
2. Becker AB, Chung KF, McDonald DM, Lazarus SC, Frick OL, Gold WM (1985) *Mast cell heterogeneity in dog skin*. *Anat Record*, **213**, 477-480.
3. Becker AB, Chung KF, McDonald DM, Lazarus SC, Frick OL, Gold WM (1986) *Cutaneous mast cell heterogeneity, response to antigen in atopic dogs*. *J Allergy Clin Immunol*, **78**, 937-942.
4. Bostock DE (1980) *The biological behaviour of mastocytomas and melanomas in the dog*. *Vet Annu*, **20**, 124-128.
5. Caughey GH, Viro NF, Calonico LD, McDonald DM, Lazarus SC, Gold WM (1988) *Chymase and trypsinase in dog mastocytoma cells, asynchronous expression as revealed by enzyme cytochemical staining*. *J Histochem Cytochem*, **36**, 1053-1060.
6. Chen W, Alley MR, Manktelow BW, Slack P (1990) *Mast cells in the bovine lower respiratory tract, morphology, density and distribution*. *Br Vet J*, **146**, 425-436.
7. Emerson JL, Cross RF (1965) *The distribution of mast cells in normal canine skin*. *Am J Vet Res*, **26**, 1379-1382.
8. Enerback L (1966a) *Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effect of fixation*. *Acta Path Microbiol Scand*, **66**, 289-302.
9. Enerback L (1966b) *Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. II. Dy-binding and metachromatic properties*. *Acta Path Microbiol Scand*, **66**, 303-312.
10. Eren Ü, Aşti RN, Kurtdede N, Sandıkçı M, Sur E (1999) *Inek uterusunda mast hücrelerinin histolojik ve histokimyasal özellikleri ve mast hücre heterojenitesi*. *T J Vet Anim Sci*, **23**, Supplement 1, 193-201.
11. Fawcett DW (1994) *A Textbook of Histology*. Chapman and Hall, New York.
12. Garcia G, Brazis P, Majo N, Ferrer L, Mora F, Puigdemont A, De Mora F (1998) *Comparative morphofunctional study of dispersed mature canine cutaneous mast cells and BR cells, a poorly differentiated mast cell line from a dog subcutaneous mastocytoma*. *Vet Immunol Immunopathol*, **62**, 323-337.
13. Gordon JR, Burd PR, Galli SJ (1990) *Mast cells as a source of multifunctional cytokines*. *Immunol Today*, **11**, 458-464.
14. Hazıroğlu R, Milli ÜH (1998) *Veteriner Patoloji*. Tamer Matbaacılık, Ankara
15. Huntley JF (1992) *Mast cells and basophils: A review of their heterogeneity and function*. *J Comp Path*, **107**, 349-372.
16. Huntley JF, Newlands G, Miller HR (1984) *The isolation and characterization of globule leucocytes, their derivation from mucosal mast cells in parasitized sheep*. *Parasite Immunol*, **6**, 371-390.
17. Jenkinson D, Thompson GE, Kenny JDR, Pearson JM (1970) *Histochemical studies on mast cells in cattle skin*. *Histochem J*, **2**, 419-424.
18. Katz HR, Stewens RL, Austen KF (1985) *Heterogeneity of mammalian mast cells differentiated in vivo and in vitro*. *J Allergy Clin Immunol*, **76**, 250-259.
19. Koretjou O (1988) *Relationship between the staining property of mast cell granule with alcian blue-safranin o toluidine blue o, and the content of mast cell protease I in the granule of rat peritoneal mast cell*. *Acta Histochem Cytochem*, **21**, 25-32.
20. Marshall JS, Ford GP, Bell EB (1987) *Formalin sensitivity and differential staining of mast cells in human dermis*. *Br J Dermatol*, **117**, 29-36.
21. Osborne ML, Sommerhoff CP, Nadel JA, McDonald DM (1989) *Histochemical comparison of mast cells obtained from the airways of mongrel dogs and Basenji-greyhound dogs by bronchoalveolar lavage*. *Am Rev Respir Dis*, **140**, 749-755.
22. Pesci A, Foresi A, Bertorelli G, Chetta A, Oliveri D (1993) *Histochemical characteristics and degeneration of mast cells in epithelium and lamina propria of bronchial biopsies from asthmatic and normal subjects*. *Am Rev Respir Dis*, **147**, 684-689.
23. Phillips MJ, Calonico L, Gold WM (1982) *Morphological and pharmacological characterization of dog mastocytoma cells*. *Am Rev Respir Dis*, **125**, 11-63.
24. Pipkorn U, Karlsson G, Enerback L (1988) *Phenotypic expression of proteoglycan in mast cells of the human nasal mucosa*. *Histochem J*, **20**, 519-525.
25. Ribatti D, Contino R, Quondametteo F, Formica V, Tursi A (1992) *Mast cell populations in the chick embryo lung and their response to compound 48/80 and dexamethasone*. *Anat Embryol*, **186**, 241-244.
26. Ruitenbergh EJ, Gustowska L, Elgersma A, Ruitenbergh HM (1982) *Effect of fixation on the light microscopical visualization of mast cells in the mucosa and connective tissue of the human duodenum*. *Int Archs Allergy Appl Immun*, **67**, 233-238.
27. Sommerhoff CP, Osborne ML, Gold WM, Lazarus SCJ (1989) *Functional and morphologic characterization of mast cells recovered by bronchoalveolar lavage from Basenji greyhound and mongrel dogs*. *Allergy Clin Immunol*, **83**, 441-449.
28. SPSS Advanced Statistics™. 7.5. (1977) SPSS Inc. Chicago.
29. Strobel S, Miller HRP, Ferguson A (1981) *Human intestinal mucosal mast cell, evaluation of fixation and staining techniques*. *J Clin Pathol*, **34**, 851-853.
30. Targowski S (1982) *Determination of immune complexes in sera from dogs with various diseases by mastocytoma cell assay*. *J Clin Microbiol*, **15**, 64-68.

31. **Tas J, Brendsen RG** (1977) *Does heparin occur in mucosal mast cells of the rat small intestine?* J Histochem Cytochem, **25**, 1058-1062.
32. **Walls AF, Roberts JA, Godfrey RC, Church MK, Holgate ST** (1990) *Histochemical heterogeneity of human mast cell, disease-related differences in mast cell subsets recovered by bronchoalveolar lavage.* Int Arch Allergy Appl Immunol, **92**, 233-241.
33. **Welle MM, Olivry T, Grimm S, Suter M** (1999) *Mast cell density and subtypes in the skin of dogs with atopic dermatitis.* J Com Pathol, **120**, 187-197.
34. **Wingren U, Enerback L** (1983) *Mucosal mast cells of the rat intestine, a re-evaluation of fixation and staining properties, with special reference to protein blocking and solubility of the granular glycosaminoglycan.* Histochem J, **15**, 571-582.
35. **Woodbury RG, Miller HRP, Huntley JF, Newlands GFJ, Palliser AC, Wakelin D** (1984) *Mucosal mast cells are functionally active during spontaneous expulsion of intestinal nematode infections in rat.* Nature, **312**, 450-452.

Yazışma Adresi:

Doç. Dr. Ülker EREN

Adnan menderes Üniversitesi

Veteriner Fakültesi

Batı Kampüsü Işık / AYDIN