

Koyunlarda Prenatal Dönemde Duodenum'un Histolojik Gelişimi ve Histokimyasal Yapısı Üzerine Işık Mikroskopik Çalışmalar

Kenan ÇINAR, Fuat BİLGİN, Abdullah DİLER

Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Histoloji Laboratuvarı, Eğirdir, Isparta-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 28.05.1996

Özet: Bu çalışma Akkaraman ırkı koyun fötuslarında duodenumun histolojik yapısı ve duodenal mukusun histokimyasal karakterinin intrauterin gelişim süresince incelenmesi amacıyla yapıldı.

Çalışmada materyal olarak 40 adet Akkaraman ırkı fötusa ait duodenum kullanıldı.

Villüslerin bulunmadığı erken gelişim dönemlerinde, çok katlı yapı gösteren Lamina epiteliyalis'in yoğun biçimde nötr mukus maddesi ve glikojen içerdiği belirlendi. Sonraki gelişim dönemlerinde ise tek katlı prizmatik şekle dönüşen Lamina epiteliyalis'teki goblet hücrelerinin nötr ve asidik mukus maddeleri içerdiği tespit edildi. İlk kez iki aylık fötuslarda saptanan müköz karakterli bezlerin de goblet hücreleriyle benzer histokimyasal özelliklere sahip oldukları belirlendi.

Çok katlı görünümdeki epitelin tek katlı prizmatik epitel şekline dönüşümü esnasında ise sekonder lumen oluşumuna rastlanmadı.

Anahtar Sözcükler: Koyun, Prenatal dönem, Duodenum, Histoloji, Histokimya.

Light Microscopic Studies on the Histological Development and Histochemical Structure of the Duodenum on the Prenatal Stage on the Sheeps

Abstract: This study was carried out with the aim to investigate of histological structure of duodenum and histochemical character of duodenal mucous on Akkaraman sheep foetus by during intrauterin development.

In the study, the number 40 duodenum belonging to the Akkaraman sheep foetus was used as a material.

More concentrate neutral mucosubstans and glycogen containing of Lamina epithelialis was determined that it is multilayer structure showing on early development stages not to be found of villi. The later development stages, neutral and asidic mucosubstans containing of goblet cells on Lamina epithelialis was detected that it is convertible to monolayer prizmatic form. For the first time also mucous glands establishing on the two monthly foetus has been determined which it was showed histochemical features similar with goblet cells.

The seconder lumen forming was not seen that it is from multilayer appearance epithel to monolayer prizmatic epithel by during convertible.

Key Words: Sheep, Prenatal stage, Duodenum, Histology, Histochemistry.

Giriş

İçermiş olduğu farklı fonksiyonel özellikteki hücreleriyle sindirim olaylarında önemli bir role sahip olan duodenumun prenatal dönemdeki histolojik gelişimi ile ilgili çalışmalarda (1-3) duodenal yapıların ortaya çıkma zamanlarının kısa ve uzun gebelik dönemine sahip türlere göre değişiklik gösterse de benzer bir sırayı takip ettiği bildirilmektedir. Gelişmedeki bu benzer sıralanmanın dışında, kısa gebelik dönemine sahip türlerde ise gebeliğin belli bir döneminde lumen kapanması şeklinde farklılığın bulunabileceği belirtilmektedir (4-6).

Fötal gelişim esnasında intestinal uzunluğun fötusun uzunluğu,yaşı ve ağırlığı ile önemli ölçüde ilişkili olduğu

(1), aynı zamanda intestinal çap,duvar kalınlığı,villüs yüksekliği ve kript derinliklerinin de, histogenesis'te önemli kriterleri oluşturduğu ileri sürülmektedir (2,7) Öte yandan, fötal dönemdeki duodenal histogenesis'in postnatal dönemde de devam ettiği vurgulanmaktadır (3). Duodenal mukusun fötal gelişim dönemlerinde gösterdiği karakterleri belirlemeye yönelik çalışmalarda başlıca mukus kaynaklarını Brunner bezleri (8,9) ve goblet hücrelerinin (9,10) oluşturduğu bildirilmiştir. Bunların dışında baş dokusunun intersellüler alanlarının (8,10) ve bezlere ait kanal hücrelerinin de (9) diğer kaynakları oluşturabilecekleri öne sürülmektedir. Goblet hücreleri ve Brunner bezlerine ait salgıların nötr ve asidik mukus

maddelerinin karışımı şeklinde olduğu belirtilirken (2,3), goblet hücrelerinin salgısının asidik karakter bakımından baskın olduğundan da söz edilmektedir (9). Öte yandan intersellüler alanların asidik (8,10) ve kanal hücrelerinin de nötral (9) mukus maddesine sahip oldukları bildirilmektedir. Mukus bileşimine katılıp fötusun metabolik olaylarında besin maddesi olarak kullanılabilceği bildirilen glikojenin (11) ise aynı zamanda glikokaliks yapısına da katıldığı ve epitelin şekillenmesinde rolü olabileceği ileri sürülmektedir (12,13).

Bu araştırmada, Akkaraman ırkı koyun fötuslarında duodenumun gebeliğin belirli dönemlerinde gösterebileceği muhtemel histolojik ve histokimyasal farklılıklar ile duodenal mukus kaynaklarının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada Konya Konet Kesimhanesinden temin edilen 40 adet Akkaraman ırkı koyun fötusu materyal olarak kullanıldı. Tahmini yaşları CR (Crown-Rump:Baş-Sağrı) uzunlukları esas alınarak Friser (14) ve Sorensen'e (15) göre saptanan fötuslar 8 gruba ayrıldı (Tablo1). Fötusların pilorusa yakın bölgelerinden alınan duodenum örnekleri %10'luk formaldehitte 24 saat tespit edildi.Rutin histolojik doku takibinden geçirilen örnekler parafinde bloklandı. Parafin bloklardan alınan 5-6 mikron kalınlığındaki kesitlere genel histolojik incelemeler için Crossman tarafından modifiye edilen Mallory'nin üçlü boyama (Triple) yöntemi (16),asidik mukus maddesinin belirlenmesi için Alcian blue (AB) pH 2,5 (17), nötral mukus maddesi için Periodic Acid Schiff (PAS) reaksiyonu (18),her iki mukus maddesinin birlikte belirlenmesi için PAS/AB pH 2,5 (17) ve glikojenin saptanması için de Best Carmine (19) boya metotları uygulandı.

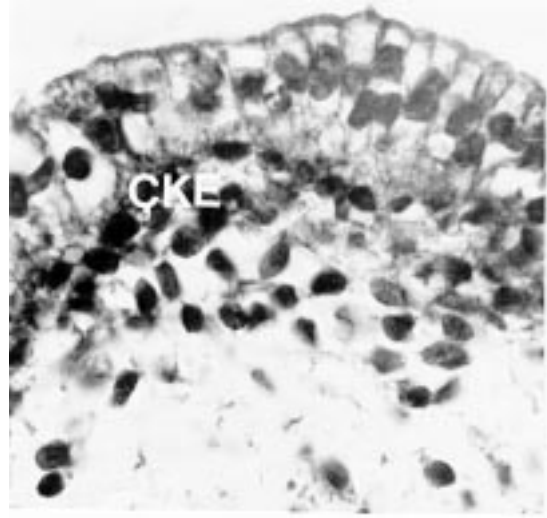
Tablo 1. Baş-sağrı uzunluklarına göre fötusların tahmini yaşları

CR uzunluğu (cm)	Tahmini yaş	
	Gün	Ay
2.5	31	1.0
5.5	44	1.5
11.0	58	2.0
18.5	73	2.5
23.0	88	3.0
35.0	110	3.5
38.0	123	4.0
42.0	134	4.5

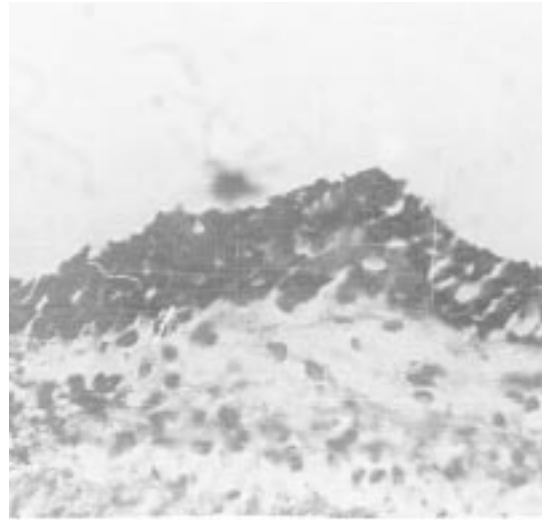
Bulgular

Gelişmenin ilk ayında villus öncülerine çok az sayıda küçük çıkıntılar şeklinde rastlanırken Lamina epiteliyalis'in çok katlı görünümde olduğu saptandı (Şekil 1). Lamina epiteliyalis'in lumenle ilişkili hücrelerinin yüzeyinde ince bir tabaka halinde AB (+) mukus maddesi gözlenirken diğer hücrelerde yoğun PAS (+) mukus maddesi (Şekil 2) ve glikojen bulunduğu belirlendi.

Villusların önceki döneme göre gelişmiş olduğu 1,5 aylık fötuslarda duodenal epitelin de tek katlı prizmatik şekle dönüştüğü gözlemlendi. Epitele ait hücrelerin

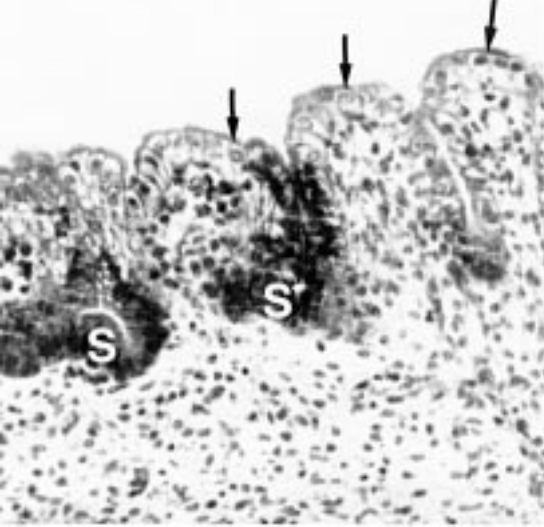


Şekil 1. 1 aylık fötüs. Lamina epiteliyalis'in çok katlı görünümü (ÇKE). Triple., x 1190.

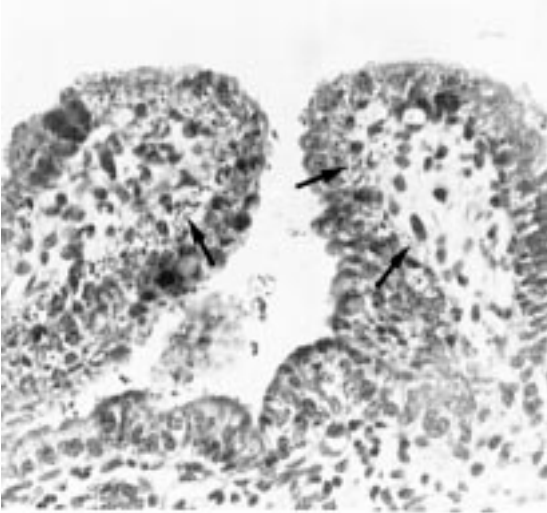


Şekil 2. 1 aylık fötüs. Epitelde yoğun PAS (+) özellik. PAS., x 51

çekirdeklerinin ise apikal yerleşimli oldukları, kriptlerden bağ dokusuna doğru invaginasyonlar şeklinde oluşmaya başladıkları belirlenen bezlerin seröz karakter gösterdikleri saptandı (Şekil 3). Bu dönemde villusların uç kısımlarındaki hücrelerin apikallerinde kuvvetli, lateral ve kript'lerindeki hücrelerde zayıf AB ve PAS (+) özellik gözlemlendi. Yoğun glikojen özelliğinin ise bu dönemde de sürdüğü belirlendi (Şekil 4). İlk kez bu dönemde saptanan goblet hücrelerinde de AB reaksiyon baskın olmak üzere PAS (+) özellik de saptandı.

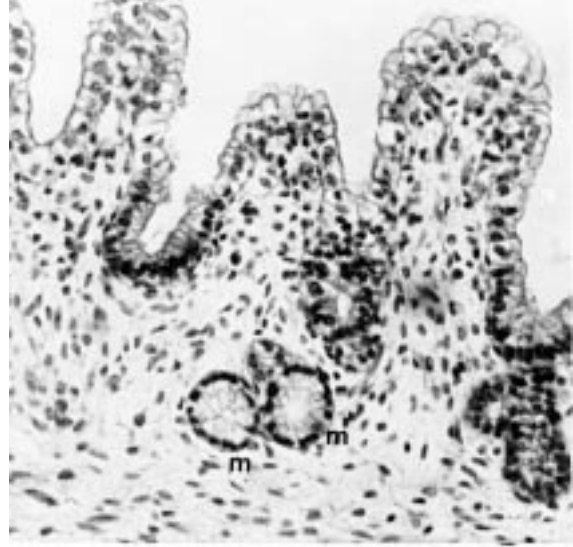


Şekil 3. 1.5 aylık fötüs. Tek katlı prizmatik epitel hücrelerinde apikal yerleşimli nükleuslar (oklar) ve şekillenmekte olan seröz bezler (S). Triple., x 420.



Şekil 4. 1.5 aylık fötüs. Epitelde yoğun glikojen (oklar). Best carmine., x 480.

Artan sayıda ve gelişmiş villusların gözlemlendiği 2 aylık dönemde barsak duvar kalınlığının artışının yanısıra goblet hücrelerinde de artış kaydedildi. Lamina epitelialis'te benzer histokimyasal özelliklerin sürdüğü ve ilk kez gözlenen müköz bezlerin de (Şekil 5) zayıf AB ve PAS (+) karakter gösterdikleri saptandı.



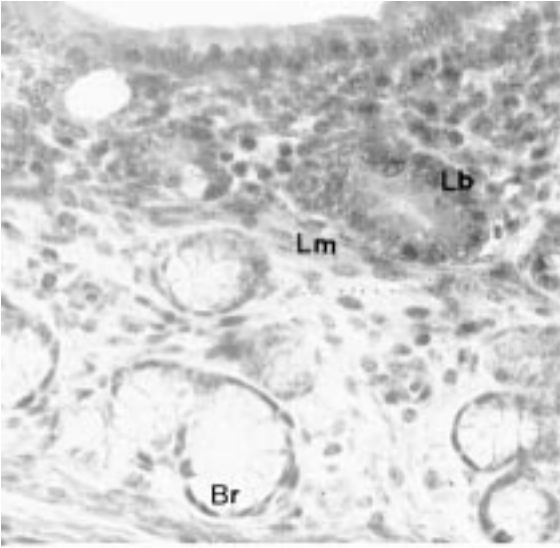
Şekil 5. 2 aylık fötüs. Müköz bezlerin görünümü (m). Triple., x 400.

Gelişmenin 2,5 aylık döneminde müköz bezlerde artış saptandı. Müköz bezler ve epitel hücrelerinin bu dönemde PAS/AB ile daha kuvvetli reaksiyon gösterdikleri ve AB (+) özelliğinin baskın olduğu belirlendi.

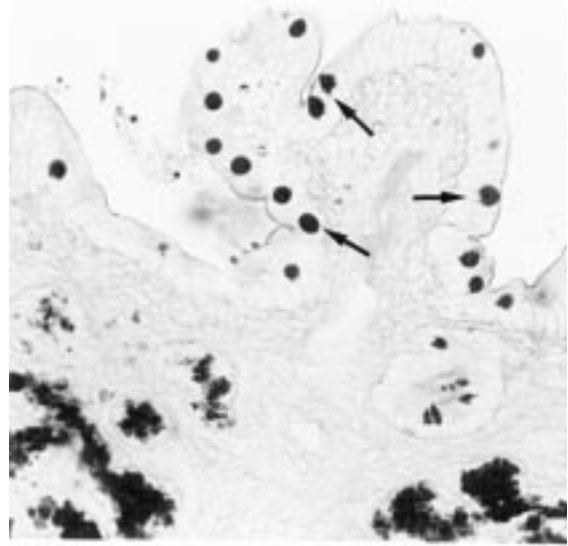
Lamina muskularis'in şekillenmesi ile karakterize olan 3 aylık dönemde villus sayısında ve uzunluklarında azalma, seröz bez (Lieberkühn) sayısında artış tespit edildi (Şekil 6). Müköz bez (Brunner) ve kript epitel hücrelerinde kuvvetli AB (+) ve zayıf PAS (+) özellik gözlemlendi. Pilorusa yakın duodenal bölgede sayılarında artış kaydedilen goblet hücrelerinde ise PAS (+) karakterin baskın olduğu belirlendi (Şekil 7).

Duodenal duvar kalınlığının belirgin biçimde arttığı 3,5 aylık dönemde Brunner bez sayısında da artış saptandı. Önceki dönemle benzer histokimyasal özelliklerin gözlemlendiği Brunner bezlerinin dip kısımlarında ise daha kuvvetli PAS (+) özellik belirlendi (Şekil 8).

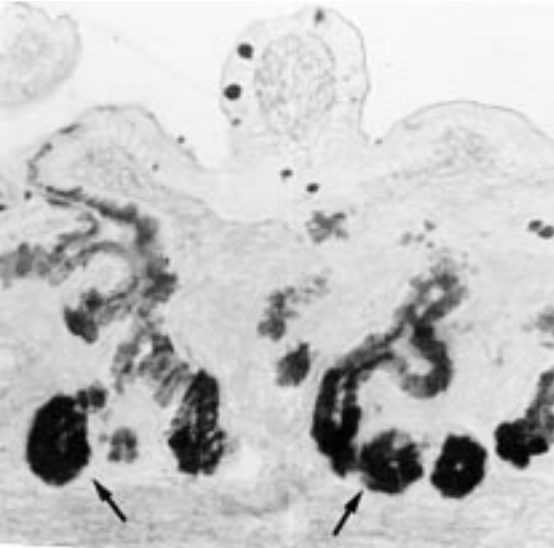
Gelişmenin 4. ayında histolojik yönden Brunner bezlerinin gruplar oluşturmasının dışında farklılık saptanmadı (Şekil 9). Histokimyasal olarak ise sadece



Şekil 6. 3 aylık fötüs. Lamina muscularis (Lm), Lieberkühn (Lb) ve Brunner bezleri (Br). Triple., x 440.



Şekil 7. 3 aylık fötüs. Goblet hücrelerinde baskın PAS (+) özellik (oklar). PAS/AB., x 410.



Şekil 8. 3.5 aylık fötüs. Brunner bezlerinin dip kısımlarında kuvvetli PAS (+) özellik (oklar). PAS., x 420.



Şekil 9. 4 aylık fötüs. Gruplar oluşturan Brunner bezleri (G). Triple., x 170.

goblet hücrelerinin AB ve PAS (+) özellikleri önceki dönemlere göre daha kuvvetli olarak gösterdikleri tespit edildi

Çalışılan son dönemde Lieberkühn bezleri ve villuslarda azalma, Brunner bezlerinde ve goblet hücrelerinde ise artış kaydedildi. Brunner bezlerindeki ve

goblet hücrelerindeki AB ve PAS (+) özelliğin de önceki dönemlere göre artış gösterdiği ve AB reaksiyon bakımından baskın oldukları belirlendi (Şekil 10).

Morfolojik ve histolojik gözlemler gelişmenin hiçbir döneminde sekonder lumen oluşumunun gerçekleşmediğini gösterdi.



Şekil 10. 4.5 aylık fötüs. Goblet hücrelerinde baskın AB (+) özellik (oklar). PAS/AB., x 600.

Tartışma ve Sonuç

Duodenum'un prenatal dönemdeki histolojik gelişimi ile ilgili çalışmalarda Mathan ve ark. (5) ve Nakamuro ve Komura (6) kısa gebelik süresine sahip olan sığanlarda yaptıkları çalışmalarda erken fetal dönemde 2-3 hücre katından oluşan Lamina epiteliyalis'in ileri fetal dönemlerde çok katlı duruma geçerek lumeni tamamen kapattığını ve daha sonra vakuoler biçimde erime ile sekonder lumenin oluştuğunu ileri sürmektedirler. Bu çalışmadan elde edilen bulgular ise, uzun gebelik süresine sahip insan (8,20), deve (10) ve koyunda (3,21) olduğu gibi Lamina epiteliyalis'in erken dönemlerde çok katlı, ileri dönemlerde ise tek katlı görünümde olduğunu göstermektedir. Sekonder lumen oluşumuna rastlanmaması ise araştırmacıların (3,22) bulgularını desteklemektedir.

İnsanda gebeliğin ilk üç aylık döneminin sonuna doğru (8,20), koyunda ise 31-34. günlerde (21) ve 50. günde (3) şekillenmeye başladığı bildirilen villuslara, bu çalışmada gebeliğin 30. gününde rastlandı. Karadağ ve ark. (21)'nin bulgularıyla uyumlu olarak gebeliğin 45. gününden itibaren villusların gelişmiş oldukları ve villusları örten tek katlı prizmatik epitel hücrelerine ait nukleusların, insan (20) ve deve (10) fötüslerindeki benzer biçimde apikal konumlu oldukları belirlendi.

Koyunlarda (22) gebeliğin 35. gününden itibaren gözlenmeye başladığı belirtilen intestinal bezler, bu

çalışmada, ilk kez 45 günlük fötüslerde saptandı. Araştırmacıların (9,20,22) bulgularıyla uyumlu olarak bezlerin, villuslar arası epitelin bağ dokusuna invaginasyonu şeklinde oluştuğları belirlendi. Brunner bezlerinin, koyunlarda Karadağ ve ark. (21) tarafından ilk kez 70-74 günlük fötüslerde tespit edildiğinin bildirilmesine karşın, yapılan çalışmada bu bezlere 2 aylık dönemde rastlandı. Gebeliğin ileri dönemlerinde Brunner bezlerinin gruplar oluşturması ve sayılarında artış saptanması ise, Osman ve Berg'in (9) bulgularını destekledi.

Gastrointestinal sistemin histokimyasal yapısı üzerine yapılan çalışmalarda asidik karakter gösterdiği bildirilen gastrik salgının başta Brunner bezleri olmak üzere, bazı özelleşmiş mukus ve goblet hücrelerinin salgıları ile nötralize edilip (12,23) aynı zamanda bu salgı ile epitel yüzeyinde koruyucu bir örtünün oluştuğu belirtilmiştir (12,24,25). Osman ve Berg (9) tarafından buffalo fötüslerinde yapılan çalışmada, gebeliğin ileri dönemlerinde Brunner bezlerinin nötral ve asidik mukus maddesi içerdiği bildirilmiştir. Aynı şekilde, bu çalışmada da Brunner bezlerinin (müköz bezlerin), her iki mukus maddesinin karışımı şeklinde salgılama yaptıkları belirlendi. Garbarsch'in (8) asidik mukus maddesinin en karakteristik görünümünün villusların ortaya çıktığı dönem olduğunu bildirmesine karşın, bu çalışmada, villus öncesi dönemlerde de asidik mukusa rastlandı.

Mukus örtünün yapısına katılan goblet hücre salgılarının da Brunner bezlerinin salgıları ile yaklaşık aynı histokimyasal özelliklere sahip olduğu bazı çalışmalarda bildirilmiştir (12,25). Osman ve Berg (9) buffalo fötüslerinin erken dönemlerinde goblet hücre salgısının baskın şekilde AB (+) özellik gösterdiğini, Trahair ve Robinson (3) ise 50 günlük fötüslerde bu hücrelerin kuvvetli biçimde PAS (+) reaksiyon gösterdiklerini bildirmektedirler. Bu çalışmada ise goblet hücrelerinin hem AB hem de PAS (+) mukus maddelerini içerdikleri belirlendi. Goblet hücre sayısının, gebeliğin ileri dönemlerinde artışı araştırmacıların (3) bulgularını destekledi.

İnsan (20) buffalo (9) ve koyun (2)'larda gebeliğin erken dönemlerinde çok katlı epitelde yoğun olarak bulunduğu ve insanda (11) ileri dönemlerde azaldığı bildirilen glikojen, bu çalışmada da erken dönemlerde yoğun ve ilerleyen dönemlerde zayıf olarak gözlendi. Erken gebelik dönemlerinde çok katlı epitelde PAS (+) özelliğın saptanması da araştırmacıların (10,20) bulgularını destekledi.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular, duodenum histogenezisinin uzun gebelik süresine sahip türlerle benzer olduğunu, kısa gebelik süresine sahip olan türlerden ise sekonder lumen oluşumunun gerçekleşmemesiyle ayrıldığını gösterdi. Erken gebelik

dönemlerinde glikojenin besin maddesi olabileceği kanısına varıldı. Duodenal salgının başlıca kaynaklarını ise Brunner bezleri ve goblet hücrelerinin oluşturduğu belirlendi.

Kaynaklar

1. Trahair,J.F.,Studies on the Development of the Small Intestine of the sheep. *Anatomy* 375:463,1985.
2. Trahair,J.F., Avila,C.G., Robinson,P.M.,Growth of the Fetal Sheep Small Intestine. *Anatomy* 50:201-216,1986.
3. Trahair,J.F., Robinson,P.,The Development of the Ovine Small Intestine. *The Anat.Rec.*,214:294-303,1986.
4. Cheng, H., Origin, Differentiation and Renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. II. Mucous cells. *Am. J. Anat.*, 141: 481-502,1974.
5. Mathan,M., Moxey,P.C., Trier,J.S.,Morphogenesis of Fetal Rat Duodenal Villi. *Am.J.Anat.*,146:73-92,1976.
6. Nakamura,K.,Komuro,T.,A Three-dimensional Study of the Embryonic Development and Postnatal Maturation of Rat Duodenal Villi.*J.Electron Microsc.*, 32:338-347,1983.
7. Avila,C.G., Harding,R., The Development of the Gastrointestinal System in Fetal Sheep in the Absence of Ingested Fluid. *J.of Pediatric Gastroenterology and Nutr.* 12: 96-104, 1991.
8. Garbarsch,C.,Histochemical Studies on the Early Development of the Human Small Intestine.*Acta Anat.*,72:357-375,1969.
9. Osman,A.H.K., Berg,R., Histological and Histochemical Studies on the Development of Brunner's Glands in the Egyptian Water Buffalo Fetus. *Z.Mikrosk.Anat.Forsch. Leipzig*,98(4):631-636,1984.
10. Osman,A.H.K.,Dougbag,A.S.A.M.,Berg,R., Studies on the Small and Large Intestines of the Camel (*Camelus dromedarius*) I.Histogenesis of the Small Intestinal Mucosa. *Z.Mikrosk. Anat., Forsch., Leipzig*, 97(6):993-999,1983.
11. Lev,R., Weisberg,H., Human Foetal Epithelial Glycogen:A Histochemical and Electron Microscopic Study. *J.Anat.*105:337-349,1969.
12. Martin,B.F., Serous Cells in Brunner's Glands of the Rabbit. *Nature*,174:1195-1196,1954.
13. Subbuswamy,S.G., Patterns of Mucin Secretion in Human Intestinal Mucosa. *J.Anat.*,108:291-293,1971.
14. Friser,A.F., Animal Reproduction. Tabulated Data. Williams and Wilkins Co.,Baltimore,USA,1971.
15. Sorensen,A.M.Jr., Animal Reproduction. Principles and Practises,Mc Graw Hill Book Company,Newyork,1979.
16. Crossman,O., A Modification of Mallory's Connective Tissue Stain With a Discussion of the Principles Involved. *Anat.Rec.*,69:31-38,1937.
17. Luna,L.G., Methods for Carbohydrates and Mucoproteins. In"Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology",3rd Ed.,Mc Graw Hill Book Company,Newyork,1968.
18. Mc Manus,J.F.A., Histologic Demonstration of Mucin After Periodic Acid. *Nature*,158-202,1946.
19. Best,F., Über Karmin Ferbung des Glycogens und der Kerne. *Z.Wiss.Mikr.*,23:319-322,1906.
20. Moxey,P.C., Trier,J.S., Specialized Cell Types in the Human Fetal Small Intestine. *Anat.Rec.*,191:269-286,1978.
21. Karadağ, H., Özmen, E., Yılmaz, S., Dinç, G., Teke, B.E., Koyun Fötüsünde İnce Barsakların Morfogenezisi., *F.Ü. Sağlık Bil. Derg.*, 8(2): 7-12, 1994.
22. Bryden, M.M., Evans, H. E., Binns, W., Embriology of the Sheep. II. The Alimentary Tract and Associated Glands. *J. Morph.*, 138: 187-206,1972.
23. Sheahan,D.G.,Jervis,H.R., Comparative Histochemistry of Gastrointestinal Mucosubstans. *Am.J.Anat.*,146:103-132,1976.
24. Cochrane,W., Davies,D.V., Palfrey,A.J., Stockwell, R. A., The Histochemistry and Electronmicroscopy of Brunner's Glands in the Guinea -Pig. *J.Anat.*,98:1-10,1964.
25. Schrage,J., The Composition and Structural Features of Salivary and Gastric Mucous. *Gut.*,12:417,1971.