

OKLU KİRPİLERİN (HYSTRIX CRISTATA) BULBUS OLFAKTORYUSUNDA SOMATOSTATİN İMMUNOREAKTİVİTESİ

Mine YAMAN¹ Ali BAYRAKDAR² Ömer ATALAR²

¹Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Elazığ – TÜRKİYE

²Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Elazığ – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 25.01.2004 Kabul Tarihi: 09.03.2005

ÖZET

Bu çalışmada, oklu kirpinin bulbus olfaktoryusu immunohistokimyasal olarak incelendi. Bu amaçla, 2 adet ergin oklu kirpinin bulbus olfaktoryusu kullanıldı. Dokular rutin doku takibi işlemlerine alındı ve immunohistokimyasal incelemeler için peroksidaz anti-peroksidaz (PAP) tekniği kullanıldı. Yapılan immunohistokimyasal değerlendirmeler sonucunda somatostatin immunoreaktif (IR) hücreler, bulbus olfaktoryusun periglomeruler bölgesinde, eksternal pleksiform ve granüler hücre katmanlarında tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Endokrin hücre, immunohistokimya, bulbus olfaktoryus, oklu kirpi.

ABSTRACT

Somatostatin Immunoreactivity of Olfactory Bulb in the Porcupines (*Hystrix cristata*)

In this study immunohistochemical examination of the olfactory bulb in the porcupines was conducted. For this purpose, two adult porcupine olfactory bulbs were used. The tissue was applied on routine immunohistochemistry procedure and immunohistochemical staining was carried out by using the peroxidase-antiperoxidase (PAP) method. In immunohistochemical examination, somatostatin immunoreactive (IR) cells were located in periglomeruler region, external pleksiform layer and granular cell layer of the olfactory bulb.

Key Words: Endocrine cells, Immunohistochemistry, Olfactory bulb, *Hystrix cristata*

GİRİŞ

Yabani ve gececi bir kemirici olan oklu kirpi, Rodentia takımının Hystricidia familyasındandır (1).

Bulbus olfaktoryus, yardımcı ve asıl bulbus olfaktoryus olmak üzere iki kısma ayrılır. Her iki kısım da olfaktor sinir katmanı, glomerular katman ile eksternal pleksiform, mitral hücre, internal pleksiform ve granüler hücre katmanlarından oluşmaktadır (2-5).

Bulbus olfaktoryus farklı sinir gruplarının tabakasal dizilimiyle karakterize olan ve koku ile ilgili uyarıların beyine iletilerek değerlendirildikten sonra, tekrar olfaktor membranlara ulaşmasında aracılık yapan bir organdır (3, 6). Bu sinir grupları içerisinde varolan neuropeptidlerin bulbus olfaktoryusun koku alma fonksiyonu ile ilgili olduğu düşünülerek yapılan çalışmada organın farklı katmanlarında somatostatin-14'ün varlığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Bulbus olfaktoryusun ışık ve immunohisto-kimyasal yapısı ile ilgili araştırmalar evcil memeliler (4, 7-10) ve laboratuvar hayvanları (2,5,11-18) üzerine yoğunlaşmıştır. Immunohisto-kimyasal olarak somatostatin immunoreaktivitesi ise rat, kobay, hamster ve insan gibi bazı memelilerin bulbus olfaktoryusunda ayırtedilebilmiştir (6, 19-23).

Ancak yapılan literatür taramalarında oklu kirpinin bulbus olfaktoryusu ile ilgili ışık ve immunohistokimyasal hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada oklu kirpinin bulbus olfaktoryusunda somatostatin-14'ün varlığı immunohistokimyasal yöntemlerle tespit edilerek bu konudaki bilgi birikimine katkı sağlanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma materyalini 2 adet ergin oklu kirpi oluşturdu. Diethyl ether ile genel anestezi altında hayvanların asıl bulbus olfaktoryusları alındı. Alınan doku örnekleri, fosfat tamponu (phosphate buffer saline-PBS) ile hazırlanan % 10'luk formaldehit (pH 7,2) solüsyonunda 24 saat süreyle tespit edildi. Immunohistokimyasal incelemeler için dokular rutin doku takibi işlemlerine alındı. Hazırlanan parafin bloklardan alınan 7 µm kalınlığındaki kesitler immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak boyandı.

Immunohistokimyasal incelemeler için peroksidaz anti-peroksidaz (PAP) tekniği kullanıldı. Endojen peroksidaz aktivitesini azaltmak için kesitler metanolla hazırlanmış %0.08 hidrojen peroksidaz

(H₂O₂) solüsyonunda 5 dakika bekletildi (24). Bunu takiben spesifik olmayan boyamaları engellemek için kesitler 1:10 oranında 0.1 M'lık PBS (pH 7.2) ile sulandırılmış normal keçi serumunda bekletildi.

Peroksidaz anti-Peroksidaz (PAP) Tekniği: Kesitler; içerisinde %2.5 sığır serum albumini ve %0.25 sodyum azid içeren PBS ile 1:50 oranında seyreltilmiş tavşan poliklonal antiserumu (rabbit anti-somatostatin-14; Chemicon, AB1976, Canada) ile 4°C'de 16-20 saat süreyle inkübe edildi. Kesitler daha sonra PBS ile 1:50 oranında sulandırılmış keçi anti-rabbit IgG (Dako, Z0421, Denmark) ile ve bunu takiben tavşan-peroksidaz anti-peroksidaz (PAP) (Zymed Lab., 61.2003, San Francisco) ile oda ısısında 1'er saat süreyle inkübe edildi. Her inkübasyon öncesi kesitler 30 dakika süreyle PBS solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra kesitler glukoz-oksidadz diamin benzidin nikel (GDN) substratına (25) daldırılıp su ile yıkandı ve eozin ile boyanıp ışık mikroskopunda incelendi.

İmmunohistokimyasal reaksiyonun spesifik kontrolü Sternberger (1979) tarafından bildirilen metod ile yapıldı (26).

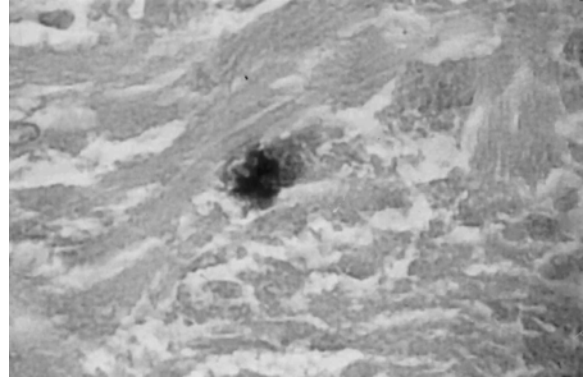
BULGULAR

Histolojik incelemelerde bulbus olfaktoryusun dıştan içe doğru; olfaktor sinir katmanı, glomeruler katman, eksternal pleksiform katman, mitral hücre katmanı, internal pleksiform katman ve granüler hücre katmanlarından meydana geldiği gözlemlendi.

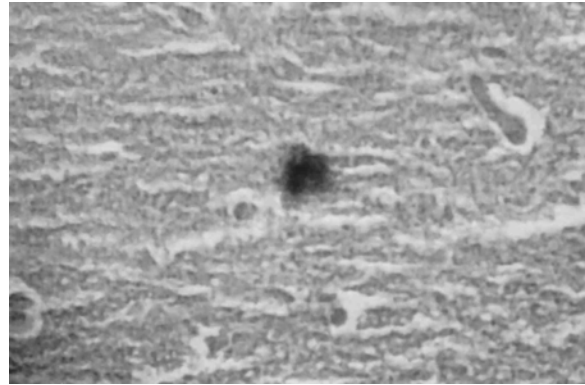
Somatostatin-IR hücreler; bulbus olfaktoryusun olfaktor sinir katmanının glomeruler tabakaya yakın olan periglomeruler bölgesinde az sayıda ayırt edilebildi. Bu immunoreaktif hücrelerin yuvarlak ya da ovalimsi uzun yapıda olduğu saptandı (Şekil 1).

Bulbus olfaktoryusun glomeruler katmanında somatostatin-IR hücelere rastlanmazken, eksternal pleksiform katmanda yuvarlak yapıda olan immunoreaktif hücelere az sayıda rastlandı (Şekil 2).

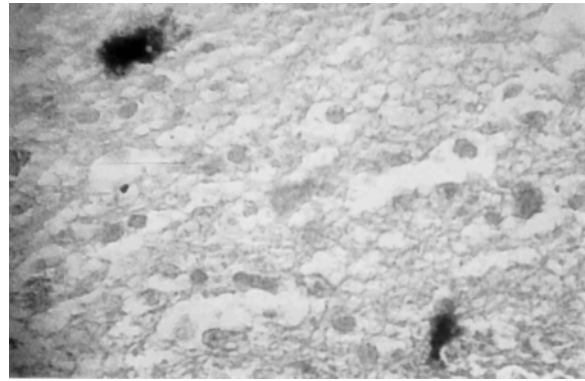
Somatostatin-IR hücreler; bulbus olfaktoryusun mitral hücre katmanı ve internal pleksiform katmanında ayırt edilemedi. Bu immunoreaktif hücelere; bulbusun granüler hücre katmanının yüzeysel ve derin kısımlarında periglomeruler bölge ve eksternal pleksiform katmana oranla daha fazla sayıda rastlandı. Granüler hücre katmanının yüzeysel kısımlarındaki hücreler genellikle yuvarlak yapıdayken, derin kısımlarındaki hücreler, ovalimsi uzun yapıdaydı (Şekil 3-4).



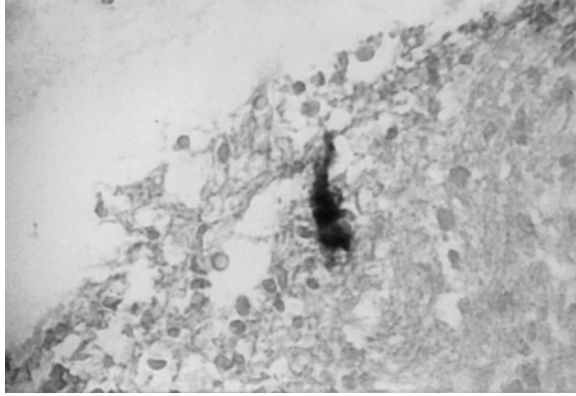
Şekil 1. Oklu kirpi bulbus olfaktoryusunun periglomeruler bölgesinde somatostatin immunoreaktivitesi. Orijinal büyültme x 200.



Şekil 2. Oklu kirpi bulbus olfaktoryusunun eksternal pleksiform katmanında somatostatin immunoreaktivitesi. Orijinal büyültme x 200.



Şekil 3. Oklu kirpi bulbus olfaktoryusunun granüler hücre katmanının yüzeysel kısmında somatostatin immunoreaktivitesi. Orijinal büyültme x 200.



Şekil 4. Oklu kirpi bulbus olfaktoryusunun granüler hücre katmanının derin kısmında somatostatin immunoreaktivitesi. Orijinal büyütme x 200.

TARTIŞMA

Düz ve siklik formları olan somatostatin ilk olarak koyunların hipotalamusunda izole edilmiş olup, 14 tane amino asit içermektedir (27). Somatostatin-IR hücreler rat, kobay, hamster ve insan gibi bazı memelilerin bulbus olfaktoryusunda ayırtedilebilmiştir (6, 19-23). Yapılan bu çalışmada ise oklu kirpinin bulbus olfaktoryusunda somatostatin-IR hücreler saptanmıştır.

Takami (21), somatostatin-28-IR hücreleri ratların asıl bulbus olfaktoryusunun periglomeruler bölgesinde ve granüler hücre katmanının derin kısımlarındaki kısa aksonlu hücrelerde gözlemlemiştir. Hwang (23), yine ratlarda postnatal dönemin 24. ayında somatostatin immunoreaktivitesini asıl bulbus olfaktoryusun glomeruler, eksternal pleksiform ve granüler hücre katmanlarında tespit etmiştir. Oklu kirpilerde

belirlenen immunoreaktif hücreler; periglomeruler bölgede, eksternal pleksiform ve granüler hücre katmanlarında bulunması itibariyle bahsedilen literatürlerle uyum içerisindedir.

Kobaylar üzerine yapılan bir çalışmada, bulbus olfaktoryusun eksternal pleksiform katmanındaki immunoreaktif hücrelerin az sayıda ve yuvarlak gövdeli, granüler hücre katmanının derin kısımlarında ise yüzeysel kısımlarına oranla daha büyük, ovalimsi ve çok sayıda olduğu saptanmıştır (6). Hamsterlerde ise immunohistokimyasal bir çalışmada sadece granüler hücre katmanının derin kısımlarındaki kısa aksonlu hücrelerde somatostatin-IR belirlenebilmiştir (19). Bu çalışmada bulbus olfaktoryus katmanlarında tespit edilen immunoreaktif hücrelerin dağılımı ve farklı şekil ve büyüklükte oluşu, yapılan çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Smith (22) insanlar üzerinde yaptığı bir çalışmada bulbus olfaktoryusun anterior olfaktor nükleuslarında ve granüler hücre katmanının derin kısımlarında immunoreaktiviteyi tespit ederken, Ohm (20) yine insanlarda bulbusun aynı katmanları ve buna ilaveten çok az sayıda glomeruler katman ile granüler katmanın yüzeysel kısımlarında bu sinir hücrelerine rastlamıştır. Oklu kirpilerde ise bu çalışmalara paralel olarak granüler hücre katmanının derin ve yüzeysel kısımlarında somatostatin-IR hücreler gözlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile oklu kirpilerin bulbus olfaktoryusu immunohistokimyasal olarak ilk defa incelenmiş ve somatostatine immunoreaktivite gösteren sinir hücreleri ve bulunduğu katmanlar ortaya konmuştur. Çalışmanın oklu kirpi bulbus olfaktoryusu üzerine yapılacak araştırmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Demirsoy A. Rodentia. Yaşamın Temel Kuralları. Meteksan Anonim Şirketi, Ankara. 1992; 695-629.
2. Price JL, Powell TPS. An experimental study of the origin and the course of the centrifugal fibres to the olfactory bulb in the rat. J Anat 1970; 107: 215-337.
3. Raisman G. An experimental study of the projection of the amygdala to the accessory olfactory bulb and its relationship to the concept of a dual olfactory system. Exp Brain Res 1972; 14: 395-408.
4. Dennis BJ, Kerr DIB. Origins of olfactory bulb centrifugal fibres in the cat. Brain Res 1976; 110: 593-600.
5. Zheng LM, Caldani M, Jourdan F. Immunocytochemical identification of luteinizing hormone-releasing hormone-positif fibres and temrin-
- als in the olfactory system of the rat. Neurosci 1988; 24: 567-578.
6. Matsutani S, Senba E, Tohyama M. Distribution of neuropeptide like immunoreactivities in the guinea pig olfactory bulb. J Comp Neurol 1989; 280: 577-586.
7. Scalia FA. Review of recent experimental studies on the distribution of the olfactory tarcts in mammals. Brain Behav Evol 1968; 1: 101-123.
8. Brunjes PC, Frazier LL. Maturation and plasticity in the olfactory system of vertebrates. Brain Res Rev 1986; 11: 1-45.
9. Kanter M, Karaöz E, Köksal V, Irmak MK. Alman kurt köpeği ve morkaraman koyun ırklarında bulbus olfaktoryusun histomorfolojisi üzerinde

- karşılaştırmalı bir araştırma. Veteriner Bilimleri Dergisi 1996; 12: 125-131.
10. Meisami E, Bhatnagar KP. Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microsc Res Tech* 1998; 43: 476-499.
 11. Heimer L. Synaptic distribution of centripetal and centrifugal nerve fibres in the olfactory system of the rat: An experimental anatomical study. *J Anat* 1968; 103: 413-432.
 12. Barber PC, Raisman G. An autoradiographic investigation of the projection of the vomeronasal organ to the accessory olfactory bulb in the mouse. *Brain Res* 1974; 81: 21-30.
 13. Barber PC, Field PM. Autoradiographic demonstration of afferent connection of the accessory olfactory bulb in the mouse. *Brain Res* 1975; 85: 201-303.
 14. Winans SS, Powers JB. Olfactory and vomeronasal differentiation of male hamsters: Histological and behavioral analyses. *Brain Res* 1977; 126: 325-344.
 15. Mori K, Imamura K, Fujita SC, Obata K. Projections of two subclasses of vomeronasal nerve fibers to the accessory olfactory bulb in the rabbit. *Neurosci* 1987; 20: 259-278.
 16. Katuka S, Oda S, Goth Y, Kishi K. Calbindin-D28k and calretinin immunoreactive neurons in the olfactory bulb of the musk shrew, *Suncus murinus*. *Dev Brain Res* 2001; 129: 11-25.
 17. Crespo C, Blasco-Ibanez JM, Marques-Mari AI, Alanso JR, Brinon JG, Martinez-Guijarra FJ. Vasoactive intestinal polypeptide-containing elements in the olfactory bulb of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *J Chem Neuroanat* 2002; 24: 49-63.
 18. Jia C, Halpern M. Calbindin-D28k immunoreactive neurons in vomeronasal organ and their projections to the accessory olfactory bulb in the rat. *Brain Res* 2003; 977: 261-269.
 19. Davis BJ, Burd GD, Macrides F. Localization of methionine-enkephalin, substance P, and somatostatin immunoreactivities in the main olfactory bulb of the hamster. *Comp Neurol* 1982; 204: 377-383.
 20. Ohm TG, Braak E, Probst A. Somatostatin-14-like immunoreactive neurons and fibres in the human olfactory bulb. *Anat Embryol (Berl)* 1988; 179: 165-171.
 21. Takami S, El-Hawary MH, Graziader PPC. Somatostatin-28-like immunoreactivity in the rat olfactory bulb. *Brain Res* 1990; 526: 333-337.
 22. Smith RL, Baker HB, Greer CA. Immunohistochemical analyses of the human olfactory bulb. *J Comp Neurol* 1993; 333: 519-530.
 23. Hwang IK, Lee JC, Park SK, et al. Age-related change of somatostatin-immunoreactive neurons in the main olfactory bulb of the rat. *Anat Histol Embryol* 2004; 33: 59-63.
 24. Sternberger LA. *Immunocytochemistry*. 3rd ed, New York: John Wiley, 1986.
 25. Shu S, Ju G, Fan L. The glucose oxidase -DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett* 1988; 85: 169-171.
 26. Sternberger LA. The unlabelled antibody peroxidase-antiperoxidase (PAP) method. In: Sternberger L.A., Ed. *Immunocytochemistry*. New York: John Wiley, Sons 1979: 104-169.
 27. Brazeau P, Vale W, Burgurs R. et al. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 1973; 179: 77-79.