

Farklı Fiksasyon İşlemlerinin Karaciğer Boyutu Üzerine Etkisi: Stereolojik Bir Çalışma

B.Zuhal Altunkaynak*, M.Eyüp Altunkaynak*

*Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD. Erzurum

Amaç: Bilindiği gibi mikroskopik takip işlemlerinin ilk aşaması fiksasyondur. Işık mikroskopik takip işlemlerinde formaldehit elektron mikroskopik takip işlemlerinde ise gluteraldehit-osmium tetraoksit ikilisi fiksasyon amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada her iki fiksatif kullanımının karaciğer boyutu üzerindeki etkisinin stereolojik bir teknik olan Cavalieri Prensibi ile değerlendirilmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 5 adet erişkin, dişi Sprague Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Her denekten alınan karaciğerlerin hacimleri suya daldırma metodu (SDM grubu) ile ölçüldükten sonra alınan karaciğer örnekleri ışık mikroskopik inceleme için %10'luk formaldehit ile fiksasyon işlemine tabi tutuldu (grup 1; n= 10 parça karaciğer). Elektron mikroskopik incelemede ön fiksasyon için %3'lük gluteraldehit ve post fiksasyon için % 1'lik fosfat tamponlu osmium tetraoksit kullanıldı (grup 2; n=10 parça karaciğer). Daha sonra tüm bloklardan elde edilen kalın (5 µm) ve yarı ince (1 µm) seri kesitler kameralı bir ışık mikroskobu yardımıyla fotoğraflandı ve bu fotoğraflar üzerinde Cavalieri metodu(CM) ile hacim ölçümü yapıldı. Takiben elde edilen sonuçlar kıyaslandı ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular: Çalışmamızın sonuçlarına göre SDM grubu, grup 1 ve grup 2' ye ait karaciğerlerin ortalama hacimleri sırasıyla 9.178, 9.104 ve 8.522 mm³ olarak hesaplandı. Hem grup 1 ve 2'nin hacim değerleri arasında hem de SDM grubu ile 2. grubun sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktaydı (p< 0,05; Independent Samples T Test).

Sonuç: Literatürde özellikle immünohistokimyasal çalışmalarda gluteraldehit- osmium tetraoksit çifti ve formaldehitle fiksasyonun etkinliğinin kıyaslandığı çalışmalar mevcuttur. Fakat günümüze kadar bu fiksatiflerin karaciğer boyutu üzerine etkisi ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada gluteraldehit-osmium tetraoksit kombinasyonu ve formaldehitin karaciğer boyutu üzerinde farklı etkileri olduğu tarafsız bir yöntem olan stereolojik yaklaşımla gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fiksasyon, Mikroskopi, Stereoloji, Cavalieri Prensibi.

Effects of Different Fixation Processes On Liver Size: A Stereological Study

Objective: As it is well known, the first stage of microscopic processes is fixation. Formaldehyde and pair of gluteraldehyde-osmium tetraoxide are commonly used in light and electron microscopical process respectively. Aim of this study was to evaluate effects of both fixatives on liver size by Cavalieri principle, a stereological technique.

Material and Methods: In the present study, 5 adult, female *Sprague Dawley* rats were utilized. After volumes of removed livers were determined by water immersion method, handled liver samples were fixed in 10% formaldehyde solution for light microscopical examination (group 1; n= 10 liver pieces). In electron microscopical process, it was carried out post-fixation by 1% osmium tetraoxide buffered 0.2 M phosphate after pre-fixation, made by 3% gluteraldehyde buffered with 0.2 M phosphate (group 2; n= 10 liver pieces). Then thick (5 µm), semi-thin (1 µm) sections handled from all blocks were photographed via light microscope with camera attachment and liver volumes were measured with Cavalieri principle on this images. Consequently the results of two groups were compared with each other and it was evaluated statistically.

Results: According to our results, mean liver volumes via water immersion method and liver volumes of two groups were estimated as 9.178, 9.104-8.522 mm³ respectively. Difference between both mean volume values of two groups and between volumetric values by water immersion method and the second group was significant, statistically (p< 0, 05; Independent Samples T Test).

Conclusions: In the literature, some studies are available about comparison of fixation effectiveness between formaldehyde and gluteraldehyde-osmium tetraoxide in specially immunohistochemical studies. But there is not any study concerning effects of these fixatives on liver size till now.

Finally, in this study, different effects of formaldehyde and combination of glutaraldehyde-osmium tetroxide on liver volume were indicated with stereological approachment, an unbiased method.

Key Words: Fixation, Microscopy, Stereology, Cavalieri Principle.

Biyolojik yapıları konu alan bilimsel çalışmalarda niceliksel verilerin elde edilmesi çoğu zaman gerekli bir durumdur. Hacim, hücre sayısı yada ilgili herhangi bir biyolojik objenin boyutu tarafsız stereolojik yöntemlerle kolaylıkla elde edilebilmektedir.¹

Morfometrik çalışmalarda bir organın hacmi, bir organın herhangi bir bölümünün hacmi, iki organ bölümünün birbirine oranı yada bu bölümlerin hacminin tüm yapının hacmine oranı gibi birçok hacim parametresi sıklıkla kullanılmaktadır.²

Böyle bir hacim parametresinin gerek duyulduğu durumlarda Cavalieri prensibi olarak bilinen yöntem en sık kullanılan hacim hesaplama yoludur.³

Morfometrik bir değerlendirmeyi mikroskopik düzeyde yapabilmek için ise incelenmek istenen dokunun fiksasyonu ilk basamaktır. Ayrıca sonraki aşamaların daha verimli olması ve güzel bir histolojik preparat hazırlanabilmesi için fiksasyon işlemi temeldir. Fiksasyon işleminde kullanılacak pek çok tespit maddesi ve tespit yöntemi vardır.⁴ En çok bilinen ve ışık mikroskopik takip işlemlerinde en yaygın kullanılan fiksatif %10 luk formaldehittir. Elektron mikroskobu ile incelenecek preparatların hazırlanmasında ise ultrastrüktürel yapının detaylı incelenebilmesi için çift fiksasyon işlemine gereksinim vardır. Bu işlemde önce tamponlanmış glutaraldehit ilk fiksatif olarak, sonrasında da tamponlanmış osmium tetroksit ikinci fiksatif olarak kullanılır.⁵

Karaciğer gerek vücuttaki en büyük organlardan biri oluşu gerekse 500'ü aşkın endokrin ve egzokrin fonksiyonu ile günümüzde en çok araştırılan konulardan biridir. Karaciğerin ışık mikroskopik değerlendirilmesinde %10 luk formaldehit, elektron mikroskopik olarak incelenmesinde ise glutaraldehit-osmium tetroksit ikilisi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada her iki fiksatifin kullanımının karaciğer hacmi üzerindeki etkisinin stereolojik bir teknik olan Cavalieri Prensibi ile değerlendirilmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

I. Hayvanlar:

Bu çalışmada 5 adet, 150-250 gr ağırlığında, 10 haftalık; erişkin *Sprague Dawley* cinsi sıçan kullanıldı. Tüm hayvanlar steril, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortamda, oda sıcaklığında (22-24⁰ C) tutuldu. Tüm hayvanlara sınırsız yem ve musluk suyu tüketme imkanı sağlandı.

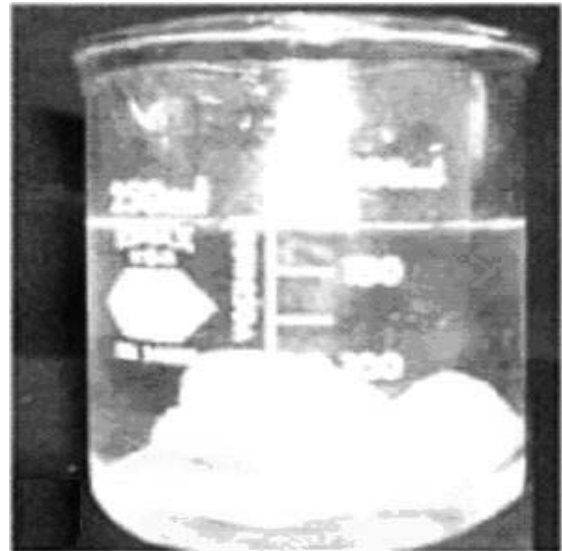
II. Deneysel Prosedür:

İki farklı fiksasyon yönteminin (formaldehit ve glutaraldehit-osmium tetroksit ikilisiyle) ayrı ayrı denenmesi amacıyla sevorane® (Abbott, Ultane; Canada) ile uyutulan hayvanlar sakrifiye edilerek karaciğerleri çıkarıldı. Takiben her denekten alınan karaciğerlerin hacimleri suya daldırma metodu (SDM) ile ölçüldükten sonra sistematik rasgele olarak örneklenen doku parçalarından bir kısmı (n=10 parça karaciğer) %10'luk formaldehit bir kısmı (n=10 parça karaciğer) ise glutaraldehit-osmium tetroksit ikilisi ile fiksasyon işlemine tabi tutuldu.

III. Alınan Karaciğerlerin Stereolojik Metotla Değerlendirilmesi:

Öncelikle sıçanlardan çıkarılan taze karaciğerlerin hacimleri SDM ile taşırdıkları suyun hacmi esas alınarak ölçüldü (**Şekil 1**). Bu yöntemle elde edilen hacim sonuçlarının gerçek hacme en yakın sonuçlar olacağı düşünüldü.

Şekil 1. Karaciğer hacimlerinin suya daldırma metodu (SDM) ile nasıl hesaplandığını görmektedir. Bu metodun uygulanışında, "suya atılan her obje hacmi kadar su taşırır" ilkesinden yola çıkılmaktadır.



Mikroskopik düzeyde hacim ölçümleri ise Cavalieri hacim ölçüm metoduyla (CM) yapıldı. Bu metodun ilk önemli kuralına göre, ilgilenilen objenin hacmini

hatasız olarak hesaplamak için eşit uzaklıkta, paralel ve seri kesitler kullanıldı.⁶

Yapılan bir ön çalışmayla, karaciğerden alınacak kesit kalınlığı marjı belirlendi. Bu işlem yine stereolojinin temel prensiplerinden “hata katsayısı” göz önünde bulundurularak gerçekleştirildi.⁷ Bu aralık belirlendikten sonra yine kurallar dahilinde olan sistematik rasgelelik dikkate alınarak ilgili organdan geçen tüm görüntüler elde edilerek değerlendirildi.

Daha sonra tüm bloklardan elde edilen kalın (5 µm) ve yarı ince (1 µm) seri kesitler Olympus BH2 kameralı ışık mikroskobu yardımıyla fotoğraflandı ve bu fotoğraflar üzerinde CM ile hacim ölçümü yapıldı (Şekil 2, 3). Takiben CM ile elde edilen sonuçlar SDM ile elde edilen sonuçlarla kıyaslandı ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

CM için kullanılan noktalı ölçüm cetvelinin nokta yoğunluğu uygun **HK** (Hata katsayısı= coefficient of error)⁸ a göre belirlenmiş seri ışık mikroskopik görüntü sayısı göz önüne alınarak belirlendi.^{8,9} HK Gundersen and Jensen’in 1987’de geliştirdikleri formüle göre hesaplandı.¹⁰ Kabul edilebilir HK (hata katsayısı) elde edebilmek için yaklaşık 13-15 kesitin yeterli olduğu tespit edilerek çalışma buna göre yapıldı.

Kesitler üzerinde hesaplar yapılırken seri kesit görüntülerindeki ilgili alanlar üzerine noktalı ölçüm cetveli rasgele olarak yerleştirildi ve ilgilenilen objeyi kesen tüm noktalar sabit kurala göre hesaplandı (Şekil 2, 3). Her test noktasının temsil ettiği alan (a cm²) ve her test noktası k cm²’dir (a cm² = k cm x k cm). Bu işlemi takiben monitörün büyütme değeri hesaplanan alan ile çarpıldı (cm²).

$$Volume = t (cm) \times a/p (cm \times cm) \times (\Sigma P) cm^3$$

Volume: karaciğer hacmi

t : kesit kalınlığı

a/p: iki nokta arasındaki alan

ΣP: kesiti kesen toplam

nokta sayısı

V kesit planındaki ilgilenilen objenin (karaciğer) hacmidir, t kesit kalınlığı, a/p noktalar arası alan ve ΣP ise kesitteki karaciğeri kesen toplam nokta sayısını göstermektedir. Her kesitte ayrı ayrı yukarıdaki formül kullanılarak hacim değerleri hesaplandıktan sonra aşağıdaki formülle toplam karaciğer hacmine ulaşıldı.

$$Total Volume = V_1 + V_2 + \dots + V_n$$

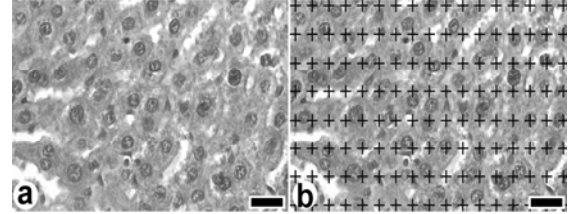
Total Volume: toplam hacim

V₁: 1. kesitin hacmi

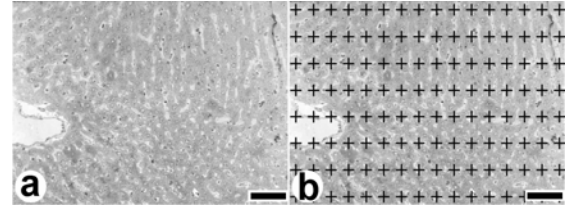
V₂: 2. kesitin hacmi

V_n: n. kesitin hacmi

Şekil 2: Bu şekil Cavalieri Metodunun nasıl uygulandığını göstermektedir. Şekil 2b de görülen “+” simgelerinin temsil ettiği alanlardan yola çıkarak önce kesit alanı daha sonra da bu alanın kesit kalınlığı ile çarpılması sonucu kesit hacmi hesaplanabilmektedir. **a, b;** %10’luk formaldehit ile fikse edilmiş karaciğer kesitleri. **b;** üzerine noktalı ölçüm cetveli rasgele olarak yerleştirilen karaciğer kesiti. **H.E.; Barlar:** 50 µm.



Şekil 3: Şekilde Cavalieri Metodunun yarı ince kesitler üzerine nasıl uygulandığı görülmektedir. **a, b;** Gluteraldehit ve osmium tetraoksit ile fikse edilmiş karaciğer kesitleri. **b;** üzerine noktalı ölçüm cetveli rasgele olarak yerleştirilen karaciğer kesiti. **Toluidine Blue; Barlar:** 100 µm.



IV. İstatistiksel Analiz:

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 13.0 programı ile yapıldı. Grupların karşılaştırmalarında “Independent Samples T Testi” kullanıldı.

V. Histolojik Takip İşlemleri:

Işık mikroskopik çalışma için kullanılan karaciğer örnekleri %10’luk formaldehit (10 ml %40’luk formaldehit, 90 ml su) 48-72 saat, fikse edildi. Daha sonra dokular dereceli alkol serileri ile dehidrate edilip ksilol serilerinde şeffaflandırılarak parafinde bloklandı. Parafin bloklardan mikrotom (Jung. AG. Heidelberg, Germany) ile kesilen 5 mikron’luk seri kesitler cam lamalar üzerine alındı. Bu kesitler genel histolojik yapıyı değerlendirmek amacıyla Hematoksilen- eozin (Harris’in hematoksileni) yöntemi ile boyandı.

Elektron mikroskopik çalışma için kullanılan karaciğerlerin fiksasyonunda ise ön fiksasyon için %3’lük gluteraldehit ve post fiksasyon için % 1’lik fosfat tamponlu osmium tetraoksit kullanıldı. Fikse edilen doku örnekleri daha sonra dereceli aseton ve propilen oksit serilerinden geçirilerek araldite CY 212 içerisinde bloklandı. Nova ultratom ile elde edilen 1 µm kalınlığında yarı ince kesitler toluidine blue ile boyandı. Boyanan tüm kesitler kanada balsamı ile kapatıldıktan sonra ışık mikroskopta (Olympus BH 2;

Japan) fotoğraflandı ve elde edilen aynı alanların seri görüntüleri üzerinde hacim değerlendirmesi yapıldı.

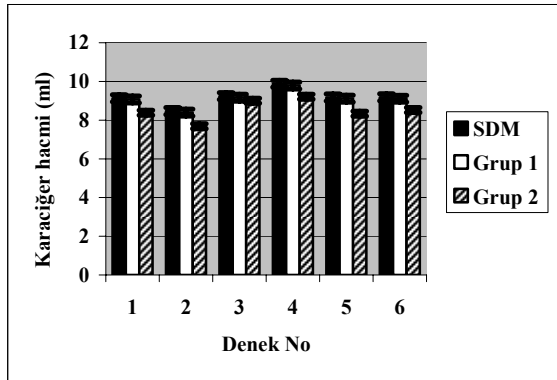
BULGULAR

Stereolojik ölçümlerimiz sonucunda elde edilen bulgular aşağıda özetlenmiştir (Tablo 1; Şekil 4). Grup 1 ve 2'ye ait hacim değerleri birbirleriyle kıyaslandığında aradaki farkın anlamlı olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$). SDM ile elde edilen sonuçlar ve 1. gruba ait hacim sonuçları birbirleriyle kıyaslandığında aradaki fark anlamlı değildi ($p > 0,05$). Fakat bu kıyaslama SDM ile hesaplanan hacim değerleri ve 2. grubun hacim değerleri arasında yapıldığında ortaya çıkan sonuç anlamlıydı ($p < 0,05$).

Tablo 1: Suyu daldırma metodunun (SDM) yanı sıra ışık mikroskopik (grup 1) ve elektron mikroskopik (grup 2) olarak fikse edilen karaciğerler üzerinde Cavalieri metodu (CM) ile elde edilen hacim değerleri.

Denek no	Karaciğer Hacimleri		
	SDM (ml)	CM	
		Grup 1 (ml)	Grup 2 (ml)
1	9,13	9,07	8,38
2	8,47	8,39	7,69
3	9,24	9,16	9
4	9,88	9,79	9,21
5	9,17	9,11	8,33
ortalama	9,178	9,104	8,522

Şekil 4: Suyu daldırma metodu (SDM) ve Cavalieri metodu (CM) ile (grup 1 ve grup 2) elde edilen karaciğer hacmi değerlerinin kıyaslanmasını gösteren şekil.



TARTIŞMA

Histolojik çalışmalarda elde edilen bulguların güvenilir olabilmesi ve iyi bir şekilde gösterilebilmesi için fiksasyonun ideal olması gerekir. Fiksasyonu etkileyen önemli faktörler; fiksatifin pH'sı, osmolaritesi ve konsantrasyonu, ortamın ısısı, parçanın boyutu ve fiksasyon süresidir.^{4, 11} Bu

çalışmada bu etkenler değiştirilmeden farklı fiksatiflerin doku boyutunu nasıl etkileyeceği araştırıldı.

Bu çalışmada uyguladığımız gibi eğer doku karaciğer, dalak gibi etraftan kolayca izole edilebilecek durumdaysa böyle dokuların hacmi SDM ile kolaylıkla hesaplanabilir. Fakat beyin korteksi vb. etrafındaki dokulardan ayrılması mümkün olmayan kompleks yapıların hacmi ölçülmek istendiğinde CM uygulanması gerekmektedir.¹² Bu yöntemle göre alınan seri kesitlerdeki izdüşüm görüntülerinin hacminden yola çıkılarak toplam hacme ulaşılabilir.¹³

Elde edilen bulgulara göre formaldehit ile fikse edilen dokular %0,81 oranında küçülürken aynı oran elektron mikroskopik fiksasyon işlemi sonucunda % 7,15 olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu bağlamda elektron mikroskopik takip işlemlerinde yaygın olarak kullanılan fiksasyon yöntemi olan gluteraldehit-osmium tetraoksit çifti dokuyu formaldehite oranla % 6,34 daha fazla küçültmektedir. Rakamsal olarak bakıldığında bu fark küçük olarak görünmesine karşın sıçan, fare vb. deney hayvanlarının organ boyutlarının ve bu boyutların varyasyonunun çok fazla olmadığı dikkate alındığında bu farkın dikkate değer olduğu açıktır. Bu bulgudan yola çıkılarak farklı histolojik uygulamaların (fiksasyon gibi) dokular üzerine farklı etkileri olabileceği düşünülmeli ve yapılan morfolometrik çalışmalarda dokunun histolojik takibinin de sonucu etkileyebileceği göz önüne alınmalıdır.

Bu çalışma sonucunda elde edilen verilerin karaciğer yada bu organ örnek alınarak diğer organların hacimsel incelenmesi amacı ile yapılacak çalışmalara yön vereceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Sonmez OF, Unal B, Inaloz S, et. al. Therapeutic effects of intracarotid infusion of spermine/nitric oxide complex on cerebral vasospasm. Acta Neurochir (Wien) 2002;144(9):921-8.
2. Gagliardo KM, De Carvalho Balieiro JC, De Souza RR, et. al. Postnatal-related changes in the size and total number of neurons in the caudal mesenteric ganglion of dogs: total number of neurons can be predicted from body weight and ganglion volume. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 2005;286(2):917-29.
3. Sahin B, Emirzeoglu M, Uzun A, et. al. Unbiased estimation of the liver volume by the Cavalieri principle using magnetic resonance images. Eur J Radiol 2003;47(2):164-70.
4. Bancroft JD, Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques; 4th edition. Edinburgh: Churchill Livingstone 1986: 20-35.
5. Hayat MA. Principles and Techniques of Electron Microscopy; 3rd edition. London: The Mac Millan Press Ltd 1989: 57-67.
6. Odaci E, Sahin B, Sonmez OF, et. al. Rapid estimation of the vertebral body volume: a combination of the Cavalieri principle and computed tomography images. Eur J Radiol 2003;48(3):316-26.
7. Nielsen BS, Lund LR, Christensen IJ, et. al. A precise and efficient stereological method for determining murine lung metastasis volumes. Am J Pathol 2001;158(6):1997-2003.
8. Ladekar M, Jensen V, Nielsen B. Stereologic estimation of breast tumor size. Anal Quant Cytol Histol 1996;18(2):151-7.

Farklı Fiksasyon İşlemlerinin Karaciğer Boyutu Üzerine Etkisi: Stereolojik Bir Çalışma

9. Okur A, Kantarci M, Akgun M, et. al. Unbiased estimation of tumor regression rates during chemoradiotherapy for esophageal carcinoma using CT and stereology. Dis Esophagus 2005;18(2):114-9.
10. Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. J Microsc 1987;147 (3):229-63.
11. Hayashi T, Nagayasu T, Kohno S, et. al. Better choice of fixatives provides better histological details of the alveolar-capillary interface. Pathology 2005;37(5):355-9.
12. McNulty V, Cruz-Orive LM, Roberts N, et. al. Estimation of brain compartment volume from MR Cavalieri slices. J Comput Assist Tomogr 2000;24(3):466-77.
13. Sahin B, Aslan H, Unal B, et. al. Brain volumes of lamb, rat and bird do not show hemispheric asymmetry: A stereological study. Image Anal Stereol 2001; 20:9-13.

Yazışma Adresi:

Arş.Gör. B.Zuhal ALTUNKAYNAK
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji AD, Erzurum
E-Posta : berrinzuhul@yahoo.com