

ORJİNAL YAZI

Pankreas Dokusunun Değişik Yöntemlerle Fiksasyonu

Nur Pınar ÖZTÜRK, Zeynep KAHVECİ, Özhan EYİGÖR,
Şahin Abdullah SIRMALI

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD. Bursa.

ÖZET

Tüm dokuların ışık mikroskopik incelemesinde fiksasyon temel basamaktır ve sonraki aşamaları etkiler. Değişik fiksasyon yöntemleri olduğu gibi, bu amaç için kullanılan farklı fiksatifler de bulunmaktadır. Bu çalışmada pankreasın gerek endokrin gerekse ekzokrin bölümünün inceleneceği çalışmalarda hangi fiksatifin seçilmesi ile iyi sonuç elde edilebileceğinin araştırılması planlanmıştır.

Bu amaçla iki farklı fiksasyon yöntemi (perfüzyon ve immersiyon), üç farklı fiksatif (nötral formalin, Bouin sıvısı, %4 paraformaldehit+%7.5 pikrik asit) ve değişik fiksasyon süreleri sıçan pankreas dokularında denenmiştir. Her iki yöntemle de fikse edilen dokuların bir kısmına mikrodalga ışınımı uygulanmıştır. Elde edilen kesitler hematoxilen ve eozin ile boyanarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışma sonucunda elde edilen verilerin pankreasın ekzokrin ya da endokrin bölümünün incelenmesi amacı ile yapılacak çalışmalara yön vereceği düşüncesine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Pankreas. Fiksasyon. Mikrodalga fiksasyonu.

Pancreas Tissue Fixation Using Various Methods

SUMMARY

Fixation is the main step in the examination of the tissues by light microscopy and effects the following procedures. There are various fixation methods as well as various fixatives that can be utilized by these methods. The aim of this study is to define which fixative gives the best result in the examination of endocrin or exocrine parts of the pancreas.

For this aim, two different fixation methods (perfusion and immersion), three different fixatives (neutral formaline, Bouin's fluid, 4% paraformaldehyde+7.5% picric acid) and different fixation times are applied onto rat pancreas tissues. Microwave irradiation is applied to some of the tissues which were fixed by either method. The sections examined were stained with heamatoxylin and eosin.

We conclude that the results of the present study will guide the future studies which would be performed to analyze the endocrine or exocrine part of the pancreas.

Key Words: Pancreas. Fixation. Microwave fixation.

Tüm dokuların ışık mikroskopik incelemesinde fiksasyon primer basamaktır ve sonraki aşamalar için temeldir. Değişik fiksasyon yöntemleri ve bu amaç için kullanılan çeşitli fiksatifler vardır. Tüm dokular için ideal tek bir fiksatifin bulunmaması nedeniyle zaman zaman fiksatiflerin kombine kullanılması, birinin eksikliğinin karışımında bulunan bir diğeri ile kompanse edilmesiyle sorun çözülmeye çalışılmıştır. Fiksatif olarak, aldehitler grubundan formaldehit içeren fiksatifler histopatoloji laboratuvarlarında en çok kullanılanlardır¹.

Fiksasyon süresi fiksasyonu etkileyen faktörler içinde önemli bir yer tutar. Doku büyüklüğüne bağlı olarak

değişmekle birlikte 24-48 saatte genellikle dokuların yeterince fikse oldukları kabul edilir. Bu sürenin kısa tutulması yetersiz fiksasyona neden olurken, gerekenden uzun süre tutmak dokuda kırılmalara neden olmaktadır.

Geleneksel olarak ışık mikroskopik incelemelerde immersiyon fiksasyon yöntemi kullanılır ve oda ısısında gerçekleştirilir. Tüm kimyasal reaksiyonlar fiksasyon işlemi de dahil yüksek ısılarda daha hızlı olur. Isı kaynağı olarak klasik yöntemler yanında mikrodalga fırınlarda kullanılmaktadır. Mikrodalga ışınımının doku fiksasyonunda ilk kez kullanımı 1970'li yıllarda başlamıştır². Mikrodalğanın insan dokularında kullanımı ile ilgili çalışmalar ise 1980'li yıllardadır^{3,4,5}. Dokulara göre değişmekle birlikte optimum sıcaklığın yaklaşık 45-55°C olduğu bulunmuştur¹. Mikrodalga metodunun önemi kısa zamanda iyi fiksasyon sağlaması ve kimyasal olmayan bir teknik olmasıdır. Mikrodalgalar elektromanyetik dalgalardır ancak ışık veya radyo dalgaları gibi non-iyonize radyasyondur. Işık dalgaları gibi düz çizgi üzerinde hareket eder. Seyri boyunca kırılır, yansır

Geliş Tarihi: 11.11.2002

Kabul Tarihi: 14.01.2003

Bu çalışma 6. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresinde poster olarak sunulmuştur.

Araş. Gör. Dr.; Nur Pınar ÖZTÜRK
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji ABD
16059, Bursa.

ve polarize olur. Mikrodalganın ışık dalgalarından farkı dalga boyudur. Dalga boyu dalganın frekansı olarak da adlandırılabilir ve birimi Hertz'dir (Hz)⁶. Mikrodalga bir ısı çeşididir, özel bir mikrodalga etkisi yoktur. Diğer konvansiyonel fırınlara üstünlüğü ısı etkisinin kontrol edilebilir olmasıdır. Mikrodalga ışınımı ile elektrik alanın salınımı, su ve proteinlerin polar zincirleri gibi dipolar molekülleri ve iyonları saniyede 2450 milyon kez hızla 180 derece rotasyona zorlar. Kazanılan rotasyonel enerjinin bir kısmı hareket etmeyen moleküller ile çarpışarak rasgele hareketlere dönüştürülür. Böylece indüklenmiş kinetik enerji ani ısınma oluşturur. Oluşan sıcaklık artışı, fiksasyonu etkileyen diğer bir faktör olan penetrasyon hızını artırır. Bu ısıtma türü özellikle doku parçası gibi karıştırmanın mümkün olmadığı durumlarda objenin ısıtılmasında çok etkili bir yoldur. Normal fırın veya etüv kullanıldığında oluşan enerji, solüsyon veya objenin dış tabakası tarafından alınır. Diğer bölümlere ise kondüksiyon (temas) ve konveksiyon (akışkan hareketi) ile iletilir, bu nedenle geri kalan bölümde sıcaklık yükselmesi yavaş olur. Tersine mikrodalga fırınlarında ise sıcaklık homojen olarak yükselir ve bu da fiksatifin diffüzyonunu uyararak için etkilidir^{2,6}.

Mikrodalganın ısı etkisi elektrik alan komponentine bağlıdır, manyetik alan komponenti ile ilişkili değildir. Tam bir ısınma elde etmek için elektrik alan dağılımının üniform olması gerekir. Mikrodalga fırınları içerisinde elektrik alan dağılımının üniform olmaması fırın içerisinde "hot spot"ların ve "cold spot"ların oluşumuna neden olur. Bu nedenle çalışmaya başlamadan önce fırının elektrik alan haritası bilinmelidir⁷.

Diğer bir fiksasyon yöntemi de vasküler perfüzyondur. Bu metotta fiksasyon sistemik dolaşım durur durmaz başlamakta ve bu da dokularda minimal değişikliklere yol açmaktadır. Fiksatifin dokunun tüm kısımlarına hızlı ve üniform bir dağılımı söz konusudur. Dokunun fikse olduktan sonra çıkarılması gerçekleştirildiğinden bu sırada dokunun travmatize olma riski de azalmaktadır. Bu ideale yakın metotta başarılı olabilmek için pH, sıcaklık, fiksasyon süresi, perfüzyonun içeriği ve konsantrasyonunu, perfüzyonun osmotik basıncı, perfüzyonun akım hızı gibi bazı parametrelerin sağlanması çok önemlidir⁸.

Pankreas hem ekzokrin hem de endokrin bölümler içeren, otolitik aktivitesi olan bir doku olduğundan, bu doku ile çalışırken fiksasyonunun ideale yakın olması önemlidir. Pankreas dokusunun incelenmesinde yaygın olarak kullanılan nötral formalinin yanısıra pikrik asit içeren Bouin sıvısı da araştırmacılar tarafından önerilmektedir⁹.

Bu çalışmada pankreasın gerek endokrin gerekse ekzokrin bölümünün inceleneceği mikroskopik çalışmalarda hangi fiksatifin ve fiksasyon metodunun seçilmesi ile iyi sonuçlar elde edilebileceğinin araştırılması ve ideal koşullarda fikse edilen dokular ile hızlı bir şekilde fikse edilmiş mikrodalga ışınımlı dokuların fiksasyon kalitesinin karşılaştırılması planlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden alınan Sprague Dawley cinsi dört adet sıçan kullanılmıştır [Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesi tarafından onaylanmıştır (17.07.2001/2)]. İki farklı fiksasyon yöntemi (perfüzyon ve immersiyon) her biri üç çeşit fiksatifle (nötral formalin, Bouin sıvısı, %4 paraformaldehit+%7.5 pikrik asit) ayrı ayrı denenecek şekilde gruplar oluşturulmuştur (Oluşturulan gruplar Tablo I'de gösterilmektedir). Eter anestezi ile sakrifiye edilen hayvanlar disseksiyon tekniğine uygun şekilde açılıp pankreaslar çıkarılmıştır.

Mikrodalga fiksasyonu yapılan gruplar için; 900 watt çıkış güçlü, mikrodalga salınımı 2450 mHz olan Bosch marka, laboratuvar tipi monitörize mikrodalga fırın kullanıldı. Çalışmaya başlamadan önce neon lambası yöntemiyle hot spotlar saptandı ve örnekler hep aynı noktaya yerleştirildi. Tüm uygulamalarda aynı değerler sabit tutulmak üzere; Set 1:45°C, Set 2:30°C ve Alarm:40°C olmak üzere değerler ayarlandı. İşleme öncesi, işleme sırasında ve sonrasında sıcaklık değerleri kontrol edildi.

Fiksasyonu tamamlanan dokular %50'lik alkole alındı, doku takibi aşamalarından geçirilerek parafin blok haline getirildi. Her bir bloktan 5 mikron kalınlığında kesitler alındı, Hematoksilen ve Eozin ile boyandı. Preparatlar, hücrelerde çekirdek ayrıntısı, asinusun morfolojik yapısı, sentroasiner hücrelerin görülmesi ve Langerhans adacık morfolojisi dikkate alınarak incelendi. Olympus BX50 fotomikroskop kullanılarak fotoğraflandı.

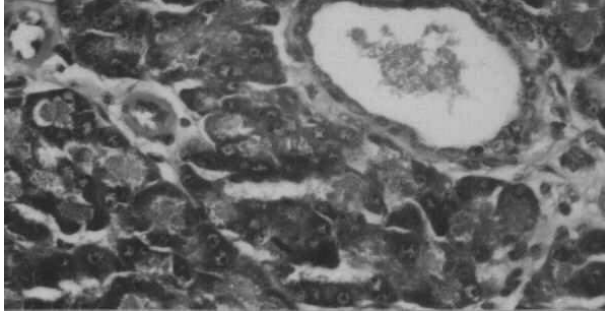
Tablo I- Fiksasyon yöntemine göre oluşturulan deneme grupları.

| PERFÜZYON | İMMERSİYON |
|--|--|
| Perfüzyon sonrasında oda ısısında 1 gece aynı fiksatifte beklemeden sonra doku takibine alınan grup (P1A,B,C) | Doku çıkarıldıktan sonra oda ısısında 24 saat süre ile fiksatifte bekletilen grup (I1A,B,C) |
| Perfüzyon sonrasında hemen doku takibine alınan grup (P2A,B,C) | Doku çıkarıldıktan sonra oda ısısında 48 saat süre ile fiksatifte bekletilen grup (I2A,B,C) |
| Perfüzyon sonrasında 15 dk aynı fiksatifte ıslatma aşaması sonrasında 1 dk MW ışınımı uygulanan grup (P3A,B,C) | Doku çıkarıldıktan sonra oda ısısında 1 hafta süre ile fiksatifte bekletilen grup (I3A,B,C) |
| Perfüzyon sonrasında 15 dk aynı fiksatifte ıslatma aşaması sonrasında 2 dk MW ışınımı uygulanan grup (P4A,B,C) | Doku çıkarıldıktan sonra fiksatifte 15 dk ıslatma aşaması sonrasında 1 dk MW ışınımı uygulanan grup (I4A,B,C) |
| | Doku çıkarıldıktan sonra fiksatifte 15 dk ıslatma aşaması sonrasında 2 dk MW ışınımı uygulanan grup (I5A,B,C) |
| | Doku çıkarıldıktan sonra fiksatifte 15 dk ıslatma aşaması sonrasında 45 sn MW ışınımı uygulanan grup (I6A,B,C) |

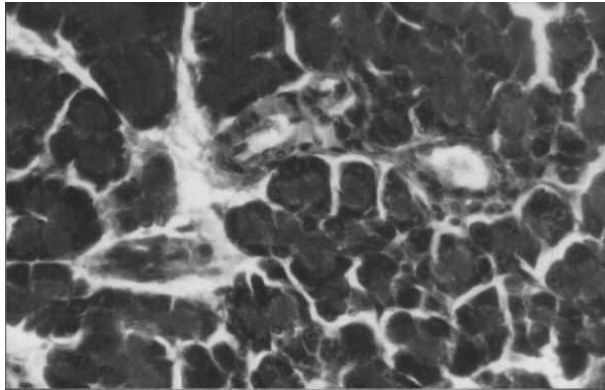
A=Nötral formalin, B=Bouin sıvısı, C=%4 paraformaldehit+%7.5 pikrik asit'i göstermektedir.

Bulgular

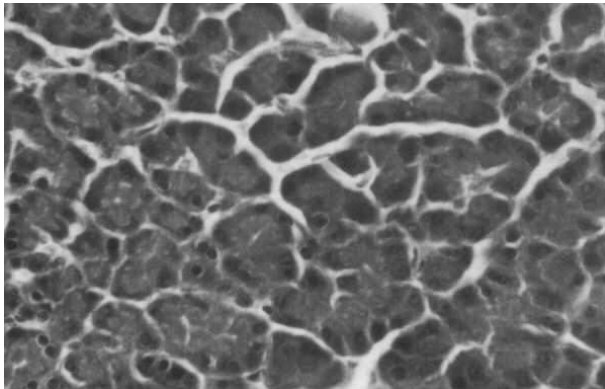
Pankreasın ekzokrin bölümünün incelenmesi için immersiyon yöntemi ile; Bouin sıvısında oda ısısında 24 saat tutulan grup (Grup I1B, Resim 1), 15 dk Bouin sıvısı ile ıslatma aşaması sonrası 45 sn mikrodalga ışınımı uygulanan grup (Grup I6B, Resim 2) ve nötral formalin ile oda ısısında 48 saat tutulan grup (Grup I2A, Resim 3), nötral formalin ile 15 dk ıslatma aşaması sonrası 1 dk mikrodalga ışınımı uygulanan grupta (Grup I4A, Resim 4) kaliteli ışık mikroskopik preparat elde edildiği görülmüştür.



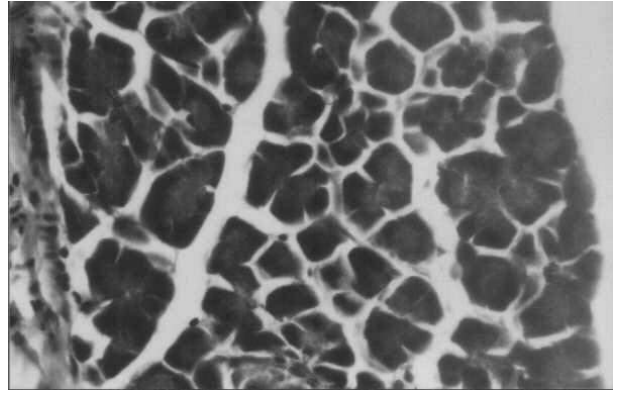
Şekil 1:
Grup I1B (Bouin sıvısında oda ısısında 24 saat tutulan grup), HEX40.



Şekil 2:
Grup I6B (Bouin sıvısı ile 45 sn mikrodalga ışınımı uygulanan grup), HEX40.

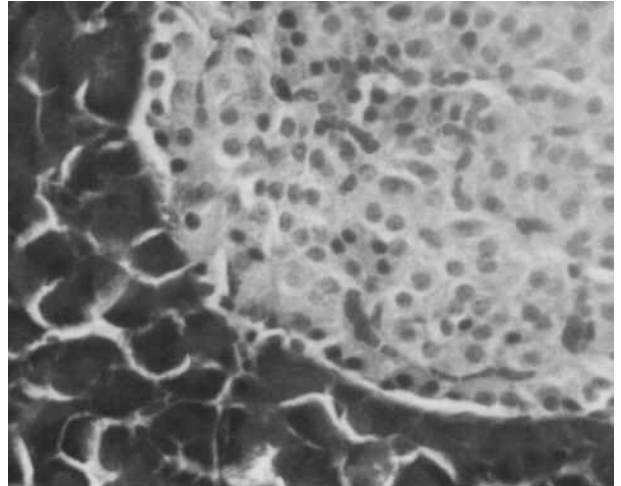


Şekil 3:
Grup I2A (Nötral formalinle oda ısısında 48 saat tutulan grup), HEx40.

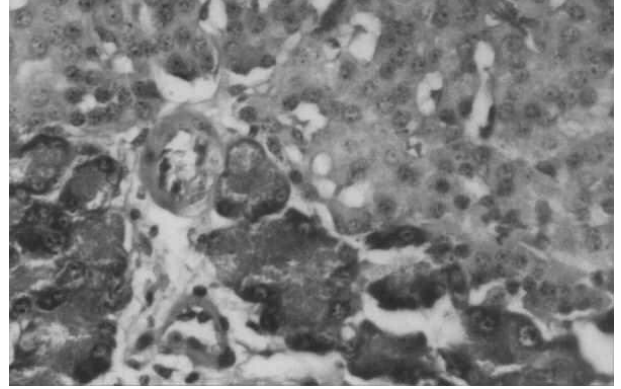


Şekil 4:
Grup I4A (Nötral formalinle 1 dk mikrodalga ışınımı uygulanan grup), HEX40.

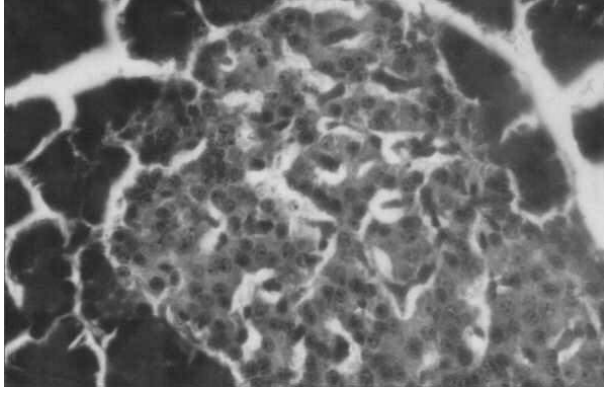
Pankreasın endokrin bölümünün incelenmesi için immersiyon yöntemi ile; Nötral formalinde oda ısısında 48 saat tutulan grup (Grup I2A, Resim 5), Bouin sıvısında oda ısısında 24 saat tutulan grup (Grup I1B, Resim 6) ve Bouin sıvısı ile 15 dk ıslatma aşaması sonrası 45 sn mikrodalga ışınımı uygulanan grup (Grup I6B, Resim 7) ile kaliteli ışık mikroskopik preparat elde edildiği görülmüştür.



Şekil 5:
Grup I2A (Nötral formalinde oda ısısında 48 saat tutulan grup), HEX40.



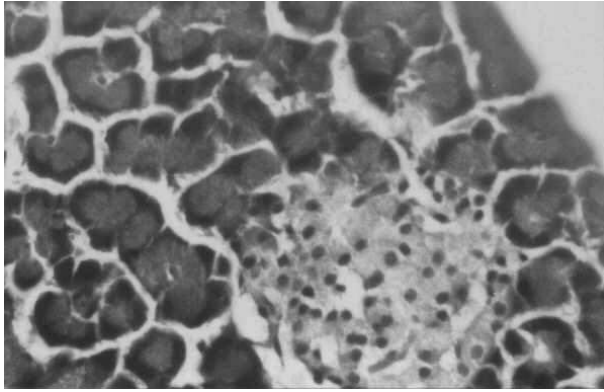
Şekil 6:
Grup I1B (Bouin sıvısında oda ısısında 24 saat tutulan grup), HEX40.



Şekil 7:

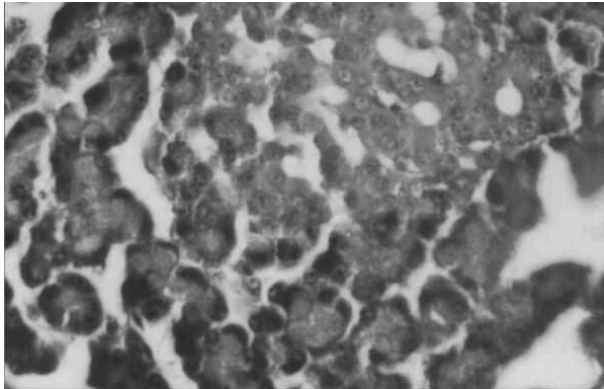
Grup 16B (Bouin sıvısı ile 45 sn mikrodalga ışıını uygulanan grup), HEX40.

%4 paraformaldehit+%7.5 pikrik asit fiksatif ile her iki yöntemle de iyi sonuç elde edilememiştir. Bununla birlikte Langerhans adacık morfolojisi açısından bu fiksatif ile 15 dk ıslatma aşaması sonrası 2 dk mikrodalga ışıını uygulanımı ile elde edilen sonuçlar kalite açısından yeterli olmasa da, değerlendirilebilecek düzeyde bulunmuştur (Grup 15C, Resim 8).



Şekil 8:

Grup 15C (%4 paraformaldehit+%7.5 pikrik asit ile 2 dk mikrodalga ışıını uygulanan grup), HEX40.



Şekil 9:

Grup P4B (Bouin sıvısı ile perfüzyon fiksasyonu sonrasında 2 dk mikrodalga ışıını uygulanan grup), HEX40.

Perfüzyon yöntemi ile elde edilen sonuçlar genel olarak immersiyon yöntemi ile elde edilen sonuçlardan daha kötü bulunmuştur. Bu yöntem ile fikse edilmiş gruplar-

dan en başarılı sonucun Bouin sıvısı kullanımı ile elde edildiği görülmüştür. Bouin sıvısı ile yapılan perfüzyon sonrasında 15 dk aynı fiksatifte ıslatma aşaması sonrası 2 dk mikrodalga ışıını uygulanan grup özellikle pankreasın ekzokrin kısmının incelenmesinde kullanılabilir düzeyde bulunmuştur (Grup P4B, Resim 9).

Tartışma

Pankreas dokusu otolize yatkınlığı nedeni ile postmortem çıkarılması ve fiksatif içine konulması olanaklar ölçüsünde hızlı yapılması gereken dokulardan biridir. Canlı haline en yakın bir şekilde ışık mikroskopik inceleme yapılabilmesi için fiksasyonun ideal olması gerekir. Fiksasyonu etkileyen bazı faktörler vardır. Bunlar fiksatifin pH'sı, osmolaritesi ve konsantrasyonu, ortamın ısısı, fiksatifin dokuya penetrasyonu ve fiksasyon süresidir¹. Bu çalışmada fiksatif pH'sı, osmolaritesi ve konsantrasyonu değiştirilmeksizin fiksasyonu etkileyen diğer faktörler değerlendirilmiştir. Çalışmada fiksasyon sürelerini belirlerken, immersiyon grubunda genellikle önerilen süreler olan 24 saat, 48 saat ve bunlardan daha uzun bir süre olarak da 1 haftayı kullandık. Mikrodalga ışıını uygulanan gruplarda ise ön çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre yeterli olduğu belirlenen 1dk ve 2dk süreyle ışıını uygulandı. Fiksasyon süresinin mikrodalga gruplarında belirgin bir şekilde azaldığı ve kaliteli preparasyon elde edildiği gözlemlendi. Bouin sıvısı ile mikrodalga ışıını verilen grupta ise ön çalışmalar ile belirlenen 45 sn ışıını çalışma gruplarına dahil edildi.

Isı artışının fiksasyonu olumlu etkilediği bilgisi ile çalışmamızda mikrodalga gruplarında iyi sonuçlar alınması birbirini desteklemektedir¹⁰⁻¹³. Kalite açısından bu gruplarla karşılaştırılabilecek düzeyde oda ısısında immersiyonla fiksasyonları yapılmış gruplar da bulunmaktadır. Ancak mikrodalga gruplarındaki zaman kazancı üstünlük olarak değerlendirilmiştir. Isı artışının fiksasyona indirekt bir etkisi ise fiksatifin dokuya penetrasyonunu arttırmasıdır. Mikrodalga ışıını ile sağlanan hızlı fiksasyonda bu etki de rol oynamaktadır. Mikrodalga ışıını ile ilgili daha önce yapılan çalışmalarda doku bütünlüğü ve morfolojisi açısından optimum sıcaklığın 45-55°C bulunmuş olduğu bildirilmektedir¹. Bu çalışmada pankreasın enzimatik aktivitesini de göz önüne alarak sıcaklığın 30-45°C arasında tutulmasına ve ısının daha fazla yükselmesine izin verilmemesi düşünülmüştür.

Mikrodalga ışıını öncesi 15 dakika uygulanan fiksatifte bekleme aşaması, değişik araştırmacılar tarafından özellikle formaldehit içeren fiksatifler kullanıldığında önerilen "ıslatma aşaması"nın gerçekleştirilmesidir^{2,10,12}. Bu aşamanın önemi ise formaldehit ile doku arasında oluşan reaksiyonlar ile açıklanmıştır. Formaldehit ile dokuda bulunan su arasındaki reaksiyon sonucunda metilen glikol oluşmaktadır. Oda ısısında fiksatifin dokuya diffüzyonuna izin verildiği "ıslatma aşaması" sonucunda doku metilen glikol ile tamamen impregne olur. Mikrodalga ışıını bu dönemden sonra başlatılmalıdır. Oluşan ısı artışının sonucu metilen gli-

Pankreas Dokusunun Değişik Yöntemlerle Fiksasyonu

kol monomerize olur ve monomerlerden formaldehit oluşur. Oluşan formaldehit doku proteinlerine bağlanır ve böylece fiksasyon birkaç dakikada tamamlanır. Eğer ıslatma aşaması yapılmaz ise mikrodalga uygulaması sonucu sadece dokunun dışında bu reaksiyonlar oluşur ve dışta bir kabuk oluşarak reaktanın dokunun derinliklerine diffüzyonu önlenmiş olur².

Seçilen fiksatifin cinsi, dokuya uygunluğu yine fiksasyonda önemlidir¹. Bu çalışmada; en yaygın olarak kullanılan fiksatif olduğu için nötral formalin, pankreas dokusunun fiksasyonu için önerilen ve daha sonra yapılabilecek özel boyamalar için de uygun bir fiksatif olduğu için Bouin sıvısı ve laboratuvarımızda perfüzyon fiksasyonunda kullandığımız iki farklı grup fiksatifin bir kombinasyonu olan %4 paraformaldehit+%7.5 pikrik asit fiksatifi seçilmiştir.

Değişik dokularda perfüzyon fiksasyonunun birçok yönü ile immersiyon fiksasyonuna üstünlüğü çeşitli araştırmacılar⁸ tarafından bildirilmesine karşın perfüzyon fiksasyonu yapılan grupta iyi sonuçlar elde edilmemesi uyguladığımız perfüzyon metodunun pankreas için uygun olmadığını düşündürmüştür. Perfüzyon basıncı, cinsi, pH'sı gibi parametrelerin değiştirilip, bu konuda daha fazla veri toplayarak pankreas dokusunun fiksasyonunda perfüzyon fiksasyonunun değerlendirilmesinin daha doğru olacağını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak; pankreas ile yapılacak histopatolojik çalışmalarda yeterli bir fiksasyon sağlayabilmek için;

- Oda ısısında 48 saat nötral formalinde,
- Oda ısısında 24 saat Bouin'in fiksatifinde tutmayı önermekteyiz. Fiksasyonu hızlı bir şekilde tamamlayıp, zaman kazanmak istediğimiz durumlarda ise;
- Bouin'in fiksatifi ile 15 dk ıslatma aşaması sonrası 45 sn mikrodalga ışınımı uygulamasını önermekteyiz.

Tüm dokularda olduğu gibi pankreas dokusunun incelenmesinde de yapılacak boyama yöntemlerinin belirle-

nerek uygun fiksatifin seçimi önem kazanmaktadır. Bu çalışma sonucunda elde edilen verilerin pankreasın ekzokrin ya da endokrin bölümünün incelenmesi amacı ile yapılacak çalışmalara yön vereceği düşüncesine varılmıştır.

Kaynaklar

1. David Hopwood. Fixation and fixatives. In: John D Bancroft, Alan Stevens (eds). Theory and Practice of Histological Techniques. 4th edition. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1996. 20-35.
2. Kok LP, Boon ME. Microwaves for microscopy. Microscopy 1990; 158: 291-322.
3. Hopwood D, Coghill G, Ramsay J, Milne G, Kerr M. Microwave fixation: its potential for routine techniques, histochemistry, immuno-cytochemistry and electron microscopy. Histochem J 1984; 16: 1171-91.
4. Turner CR, Zuczek S, Knudsen DJ, Wheeldon EB. Microwave fixation of the lung. Stain Technol 1990; 65: 95-101.
5. Hopwood D. Cell and tissue fixation 1972-82. Histochem J 1985; 17: 389-442.
6. Kok LP, Boon ME. Physics of microwave technology in histochemistry. Histochem J 1990; 22: 381-8.
7. Login GR, Dvorak AM. The Microwave Tool Book. Boston; Beth Israel Corporation, 1994. 52-71.
8. Hayat MA. Principles and Techniques of Electron Microscopy, 3rd edition. London: The Mac Millan Press Ltd; 1989. 57-67.
9. Ramazan Demir (ed). Histolojik Boyama Teknikleri - Başvuru Kitabı – Birinci Baskı. Ocak 2001. 188-9.
10. Leong ASY, Daymon ME, Miliot J. Microwave irradiation as a form of fixation for light and electron microscopy. J Pathol 1985; 146: 313-22.
11. Boon ME, Gerrits PB, Moorlag HE, Niewenhuis P, Kok LP. Formaldehyde fixation and microwave irradiation. Histochem J 1988; 20: 313-22.
12. Kahveci Z. Değişik Dokuların Fiksasyonunda Mikrodalganın Kullanımı (Doktora Tezi). Bursa: Uludağ Üniversitesi; 1993.
13. Kahveci Z, Çavuşoğlu İ, Sırmalı ŞA. Microwave fixation of whole fetal specimens. Biotechnic & Histochemistry, 1997, 72 (3): 144-147.