

DERLEME

İkili İskelet Boyamaları

Fatma Bahar SUNAY

Balıkesir Üniversitesi Balıkesir Sağlık Yüksekokulu, Balıkesir.

ÖZET

İkili iskelet boyaması, sonuçlarının güvenilir olması nedeniyle; deneysel teratolojik çalışmalarda en sık kullanılan yöntemdir ve bu nedenle de teratoloji çalışan araştırmacılar tarafından iyi bilinmesi son derece önemlidir. Bu derlemenin amacı; iskelet boyamasında, ilk uygulanmaya başlandığı tarihlerden günümüze kadar gerçekleşen başlıca gelişmeleri özetleyerek araştırmacılara kaynak oluşturmaktır. İskelet boyamalarında ilk önemli gelişme kemiğin alizarin red S ile boyanmasıdır. Ardından, termdeki deney hayvanı fetuslarının iskeletinin önemli bir bölümünün kıkırdaktan oluşması nedeniyle, sadece kemiğin boyanmasının yeterli olmayacağı düşünülerek kıkırdak bölümleri boyayacak uygun ajanlar aranmaya başlanmıştır. Bu amaçla, methylen blue, toludin blue, methyl green ve rezorsin fuksin denenmiş, ancak tatmin edici sonuçların alındığı boya alcian blue olmuştur. Bu iki boyanın beraber kullanıldığı ikili iskelet boyaması yöntemlerinin yaygınlaşmasının ardından da; boyama kalitesini arttırmayı, işlemin süresini kısaltmayı, erişkin deney hayvanlarında kullanılacak metotlar tanımlamayı, boyama işlemini daha basit ve daha pratik hale getirmeyi, iskelet boyamalarını farklı amaçlara sahip diğer teknikler ile bir arada kullanmayı ve farklı türlerin fetuslarında kullanılacak metotlar geliştirmeyi amaçlayan çalışmalar yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Teratoloji. İskelet boyaması.

Double Skeletal Staining

ABSTRACT

Because of its trustable results, double skeletal staining is the most widely used method in experimental teratological studies and should be known very well by the researchers who work teratology. This review aims to form a source for the teratology researchers by summarizing the developments about the skeletal staining from the first day to today. The first important development of skeletal staining has been the staining of bone with alizarin red S. After that, because the skeleton of the foetuses of laboratory animals at term contains a considerable amount of cartilage, it has been realized that staining of the bone alone is insufficient and search for a dye, which will stain the cartilage properly, has been started. For this aim, methylen blue, toludin blue, methyl green and rezorsin fuksin has been tested, but the satisfactory result were obtained with alcian blue. After the publication of double skeletal staining methods in which these two dyes were used; studies which aim to increase the quality of the staining, to decrease the duration of the staining, to simplify the staining method, to use the skeletal staining with other methods and to describe methods which can be used in different species has been done.

Key Words: Teratology. Skeletal staining.

İskeleti oluşturan kemik ve kıkırdakların farklı boya ile farklı renklerde ya da aynı rengin farklı tonlarında boyanması işlemine ikili iskelet boyaması denir. Literatür incelendiğinde, ikili iskelet boyamalarının kullanılmış olduğu çalışmalar iki grupta toplanabilir. Bunlardan ilki teratolojik çalışmalardır¹⁻⁹. Bu çalışmalarda; çeşitli kimyasal maddelerin veya fiziksel etkenlerin iskelet sistemi üzerindeki teratojenik etkileri araştırılır. Bu amaçla, gebe deney hayvanları, fetuslarının iskelet gelişimi döneminde etkisi araştırılan kimyasal maddeye ya da fiziksel etkene maruz bırakılır ve fetuslar terme ulaştığında iskelet sistemleri boyanarak herhangi bir malformasyonun gelişip gelişmediği incelenir. İkinci gruptaki çalışmalar ise

gelişimsel çalışmalardır. Bu çalışmalarda, ya abortus sonucu elde edilen insan embriyo ve fetuslarına ikili iskelet boyaması yapılır ve farklı kemiklerdeki kemik ve kıkırdak alanların fetus yaşı, diğer kemiklerdeki kemikleşme, vb. ile ilişkisi incelenir¹⁰⁻¹³, ya da teratolojik çalışmalarda genellikle tercih edilen deney hayvanlarının fetuslarına, gelişimlerinin farklı evrelerinde ikili iskelet boyaması yapılarak, iskelet sisteminin gelişimi incelenir^{14,15}. Ancak, ikili iskelet boyamalarının rutin olarak kullanıldığı alan, tüm farmakolojik, endüstriyel ve çevresel kimyasal madde adaylarının onay almadan önce geçtikleri, olası teratojenik etkilerinin araştırıldığı aşamadır.

İlk İskelet Boyaması Çalışmaları

Hill ve Zdan¹⁶'a göre bir bütün olarak kemiği ilk boyayan ve bu sayede kemiğin anatomisi ve gelişimi hakkındaki ilk bilgileri oluşturan araştırmacı Belchier (1735-1736)'dır. Belchier, İngiliz Adalarında yetişen, halk arasında "madder plant" ismiyle bilinen ve

Geliş Tarihi: 11.08.2005

Kabul Tarihi: 23.09.2005

Dr. Fatma Bahar SUNAY
Balıkesir Üniversitesi
Balıkesir Sağlık Yüksekokulu,
Balıkesir

"Rubia" ailesinden "Rubia perigrina" olduğu düşünölen bitkinin köklerini toz haline getirip hayvanların yemlerine karıştırdığında, hayvanların kemiklerinin kırmızıya boyandığını saptamıştır. Belchier'in tanımladığı bu metot, daha sonra kemik büyümesi ile ilgili çalışmaları olan John Hunter (1830) ve mandiböler alveolar kemiğin büyümesi üzerine çalışan James C. Brash (1926) gibi diğer araştırmacılar tarafından da kullanılmıştır.

Yine aynı araştırmacıya göre¹⁶ kemiğin boyanması alanındaki en önemli gelişme, 1868 yılında Graebe ve Liebermann'ın parlak kömür katranından alizarini elde etmesi olmuştur. Alizarin molekölü kısa sürede mikroskobik ve makroskobik olarak kalsiyumun gösterilmesinde kullanılan indikatörlerin çekirdeği haline gelmiştir. Bunun üzerine alizarinin kemik boyaması için kullanıldığı çok sayıda çalışma yapılmış ve yayınlanmıştır. Bunlardan en kabul gören ve en güvenilir sonuçların alındığı ilk metot, Dawson¹⁷ tarafından 1926'da yayınlanmıştır.

Dawson'un metodunu daha önce yayınlanmış olan ve alizarini kullanarak kemiği boyayan metotlardan farklı kılan, bir başka deyişle başarılı olmasını sağlayan; kullanılan boya solüsyonundaki alizarinin konsantrasyonu olmuştur. Daha önce yayınlanmış olan çalışmalarda örnekler, % 95'lik etanolde hazırlanan oldukça yüksek konsantrasyonlu bir alizarin red-S solüsyonunda boyanmıştır. Boya konsantrasyonunun yüksek olduğu bu solüsyon iskelet yapısındaki kemiklerin yanında yumuşak dokularda da boyanmaya neden olmuştur. Bu nedenle, boyama aşamasının ardından, yumuşak dokudaki boyayı uzaklaştırmak amacıyla soldurma işleminin yapılması gerekmiştir. Soldurma; ya asit alkol solüsyonunun kullanılması ile (% 95'lik etanolde %0.5'lik sülfürik asit solüsyonu gibi), ya da deneğin, yumuşak dokulardaki boya uzaklaşana kadar güçlü güneş ışığında bekletilmesi ile yapılmıştır ve her iki prosedürün de bazı dezavantajları görölmüştür. Asit alkolün kullanıldığı teknik, küçük kalsifikasyon alanlarının dekalsifiye olmasına neden olabildiği için güvenilir bulunmamıştır. Güneş ışığında bekletme ise, özellikle iklimin uygun olmadığı durumlarda oldukça uzun zaman almıştır ve soldurma işleminin haftalarca hatta aylarca sürmesine neden olmuştur.

Dawson'un metodunda ise, boyama solüsyonu son derece dilüedir (1:10.000 alizarin:%1 KOH) ve bu nedenle kemiğin boyanması progressif olarak gerçekleşmektedir. Yani kemik ilerleyici şekilde selektif olarak boyanmakta ve yumuşak dokularda boyanma olmadığı için soldurma işlemine gerek duyulmamaktadır. Bu nedenle, hem asitte soldurma işleminin neden olabileceği dekalsifikasyon, hem de güneş ışığında soldurma işleminin neden olacağı zaman kaybı engellenmektedir.

Dawson'un tanımladığı ve albino sıçanlarda başarılı sonuçlar aldığı bu metodun ardından Lipman¹⁸,

Dawson'un metodunda önerdiği %1'lik KOH yerine aynı ajanın %2'lik konsantrasyonunu kullanarak yeni bir metot tanımlamıştır ve metodunun sıçan, domuz, insan, sığır, kedi ve tavuk embriyolarında başarılı sonuçlar verdiğini bildirmiştir.

Her ne kadar günümüzde bile teratolojik etkilerin değerlendirilmesinde sadece kemiği incelemekle yetinen araştırmacılar varsa da¹⁹⁻²², henüz iskeletin kemik kısmının boyanmasında kullanılacak güvenilir bir metodun araştırılmasına devam edilirken, termdeki deney hayvanı fetuslarının iskeletinin önemli bir bölümünün kıkırdaktan oluşması nedeniyle, sadece kemiğin boyanması ile elde edilecek sonuçların güvenilir olmayacağı ve kıkırdakta oluşan anomalilerin gözden kaçacağı fark edilmiştir²³⁻²⁵. Bunun üzerine kıkırdağı boyayacak boyalar ve metotlar denenmeye başlanmıştır.

Love ve Vickers'a göre²⁴, ilk kez 1902 senesinde Wijhe, asit alkoldeki methylen blue solüsyonunu kullanarak iskeletin kıkırdak kısımlarını boyamıştır. Yine aynı araştırmacılar Lundvall'in, Wijhe'nin metodunda, diğer aşamalarda herhangi bir değişiklik yapmaksızın, methylen blue yerine toluidin blue (1904) ve methyl green (1912) kullanarak iki yeni metot tanımladığını ve bunun ardından da Lee ve Mayer'in balık iskeletindeki kıkırdak kısımları rezorsin fuksin ile başarılı olarak boyadıklarını bildirmişlerdir.

Dawson'un kemik boyanması metodunun yayınlanmasından sonra, kıkırdak boyaması ile kemik boyamasının beraber yapıldığı çalışmalar planlanmaya başlanmıştır. Williams²⁶, %10'luk formalinde fikse ettiği örneklerin iskeletinin kıkırdak kısmını toluidin blue ile boyamıştır. Kemik kısmın boyanmasında ise alizarin red-S'i kullanmıştır. Williams'ın ardından Burdi, formalin-aseton-alkol karışımında fikse ettiği fare²⁷ ve tavuk²⁸ embriyolarının iskeletlerini alizarin red-S ve toluidin blue ile diferansiyel olarak boyamıştır. Burdi'nin metodu yaklaşık 8-12 günde tamamlanmaktadır ve Williams'ın metodundan daha kısa bir metottur.

Ancak, kıkırdağı boyama amacı ile yukarıda adı geçen boyaları kullanan diğer araştırmacılar, toluidin blue ya da metilen blue ile gerçekleştirilen boyamanın zamanla azaldığını ve kısa sürede solduğunu gözlemişlerdir^{23,24,29-31}. Ojeda ve ark.²³ 1970 yılında yayınladıkları çalışmalarında, Lundvall'in tekniğini kullanarak kıkırdak boyamasını asidifiye alkolik toluidin blue ile yaptıklarında, hem işlemin uzun süre aldığı hem de boyanın zamanla solduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar, aynı makalelerinde tavuk embriyolarını boyamak için kullandıkları ve boyanmada zamanla azalma gözlemedikleri alcian blue metodunu yayınlamışlardır. Her ne kadar alcian blue'nun kıkırdak boyamasında kullanılmasını öneren bu ilk çalışmadan sonra da, insan embriyolarında³² ve sıçan embriyolarında²⁴ alcian blue'nun

İkili İskelet Boyamaları

kullanımından önce önerilen methyl green ve methylen blue gibi boyalar yeniden denendiyse de kabul görmemiş ve böylece ikili iskelet boyamasında bugün de en sık kullanılan iki ajan olan alizarin red-S ve alcian blue araştırmacılar tarafından kabul gören boyalar olmuştur.

Gerek Dawson'un¹⁷ gerekse Ojega ve ark.²³'ün metotları sadece kemiği ya da sadece kıkırdağı boyayan metotlardır. Bu iki ajanın beraber kullanıldığı ilk ikili iskelet boyaması metodunu ise 1971 yılında Simons ve Van Horn yayınlamışlardır. Çeşitli yazarlar^{31,33-35} Simons ve Van Horn'un metodunun iki aşamalı bir metot olduğundan bahsetmektedir. Yani önce bir komponenti boyanan örnek masere edilir ve ardından ikinci komponenti için boyanır. Wassersug'a³⁰ göre Simons ve Van Horn, Ojeda ve ark.'nın yayınladığı metodu standart bir alizarin red-S ile kemik boyaması metoduyla birleştirerek tavuk embriyolarını başarıyla boyamışlardır.

İkili iskelet boyamasını günümüzde sıkça tercih edilen haline getiren son önemli gelişme, Inouye'un²⁹ 1976'da tek aşamalı bir boyama metodu tanımlaması olmuştur. Bu metotla; iskeletin hem kemik hem de kıkırdak kısımları, aynı anda, içerisinde hem alcian blue'nun hem de alizarin red-S'in bulunduğu boya solüsyonu ile boyanmıştır. Her ne kadar bu metotta boyama işlemi maserasyon ve saydamlaştırmadan önce yapıldığı için, optimal boyanmanın değerlendirilmesinin güç olduğunu belirten araştırmacılar olmuşsa da^{34,36} Inouye'ün önerdiği metot, daha kısa sürmesi ve daha pratik olması nedeni ile diğer araştırmacılar tarafından da kullanılmıştır^{33,35,37-39}.

İkili İskelet Boyaması Denemelerinin Amaçları

Her ne kadar Inouye'un çalışması kemik ve kıkırdak aynı anda farklı ajanlar ile farklı renklerde boyanmasında başarılı olmuşsa da, bilimin temelinde yatan daha iyiyi arama çabasından dolayı, ikili iskelet boyaması metoduna yönelik çok sayıda yeni çalışmaların yapılmasına devam edilmiştir ve şüphesiz bundan sonra da devam edilecektir. İlk günlerinden başlayarak günümüze ulaşan çizgisinde iskelet boyama metotlarına yönelik çalışmalar incelendiğinde, tüm çalışmaların amaçlarının birkaç ana başlık altında toplanabileceği görülür.

a) Boyanmanın kalitesini arttırmak:

İskelet boyamalarında boyanmanın kalitesini arttırmak için ilk denenen iskeletin kemik ve kıkırdak kısımlarını boyayacak uygun ajanları aramak olmuştur. Daha önce de anlatıldığı gibi, kıkırdağı boyamak amacıyla farklı ajanlar denenmiş^{23,24,26-31,36,37} ve boyanma kalitesi, boyanmanın hızı ve işlemin sonraki aşamalarında ya da zamanla solmaması gibi faktörler göz önüne alındığında alcian blue'nun en uygun ajan

olduğu görülmüştür. Bunun sonucunda da, ikili iskelet boyamalarında kıkırdak kısımların boyanmasında en sık kullanılan boya alcian blue olmuştur^{29-31,33-41}. Ancak, Yamada⁴² kemik kısımlarının Alizarin red S ile boyanmasından sonra en az on yıl beklemiş olan materyallerin kıkırdak kısımlarını boyamak amacıyla, içlerinde alcian blue'nun da bulunduğu 21 farklı boya denelediği çalışmada en iyi boyanmayı kıkırdağı mavi-menekşe renginde boyayan bromophenol blue ile elde ettiğini bildirmiş ve ardından bu metodu detaylı bir biçimde yayınlamıştır⁴³.

İdeal kıkırdak boyasının aranması sırasında çok sayıda farklı boyalar denenmesine rağmen, kemiğin boyanmasında alizarin red-S'e alternatif olarak gündeme getirilen tek ajan mureksittir. Mureksit (amonyum purpurat) de tıpkı alizarin red-S gibi bir kalsiyum şelatörüdür. Bu boyanın kemiğin gross boyanmasında kullanımını öneren ilk araştırmacılar Hill ve Zdan¹⁶'dır. Bu araştırmacılar etanolde fikse ettikleri yenidoğan sıçanları mureksit ile boyadıklarında iki başarılı metot elde etmişlerdir. Bunlardan ilkinde 1 ml %2' lik KOH içinde 0.05 g mureksit bulunan bir boya solüsyonu kullanılır. 6 saat süren boyama işlemi sonunda kemikler kahverengimsi sarı renkte boyanır. Diğer metotta ise 200 ml %95'lik etanolde 0.1 g mureksit bulunan bir boyama solüsyonu kullanılır ve boyama işlemi bir gece sürer. Kemikler ise kırmızı renkte boyanır. Araştırmacılar, etkisinin son derece hızlı olması ve kalsiyum ile 1:1 oranında şelasyon yapması nedeniyle fazla miktarlarda boya solüsyonunda bırakıldığında bile aşırı boyanmaya neden olmamasından dolayı kemiğin boyanmasında mureksitin alizarine rakip olduğunu bildirmişlerdir. Hill ve Zdan'dan sonra az sayıda da olsa mureksiti ikili iskelet boyamalarında kemiğin boyanmasında tercih eden araştırmacılar olmuştur^{35,39}.

Boyanma kalitesini arttırmak için yapılan çalışmaların bir kısmı da en uygun fiksatifi bulmayı amaçlamıştır. Dawson¹⁷ %95'lik etanolde yapılan 48-72 saatlik fiksasyonun iyi sonuçlar verdiğini, ancak sürenin uzamasının maserasyon aşamasını zorlaştırdığını bildirmiştir. Lipman¹⁸ fiksasyonda hem etanolü hem de ilk kez Ignalzi tarafından 1929 yılında kullanımını önerilen %10'luk formalini denemiş ve etanol ile fikse edilen örneklerin daha hızlı masere olması ve saydamlaşmanın çok daha yeterli olması nedeniyle fiksasyonda bu ajanın kullanılmasını önermiştir. %10'luk formalinin Lipman tarafından bir dezavantaj olarak görülen maserasyonu geciktirici etkisini Williams²⁶ maserasyonun çok daha kontrollü gerçekleştirilmesini sağlayan bir avantaj olarak değerlendirmiştir ve bu işlem sırasında iskeletin tamamen dağılmasını engellemek için %10'luk formalinin kullanılmasını önermiştir. Aynı araştırmacı bu fiksatif ile yeterli fiksasyonun sağlanabilmesi için fiksasyon süresinin en az bir hafta olması gerektiğini bildirmiştir. Burdi^{27,28} etanolün daha hızlı maserasyon ve daha

kaliteli saydamlaşma sağlaması özelliğini formalinin maserasyonu daha kontrollü bir şekilde gerçekleştirmesi ile birleştirmek amacıyla fiksasyonda bu iki ajanın beraber kullanılmasını önermiştir. Bu çalışmalarında yenidoğan fare ve sıçanların fiksasyonunda formalin: asetik asit: %70'lik etanolü 1:1:8 oranında karıştırarak bir fiksatif hazırlamıştır ve bu fiksatif kullanıldığında 40 dakikalık bir fiksasyonun yeterli olduğunu gözlemlemiştir. Bu üç fiksatif dışında Ojeda²³ ve McCann³² fiksasyonda Bouin solüsyonu kullanmışlardır ancak bu fiksatif diğer çalışmacılar tarafından kabul görmemiştir. Günümüze kadar yayınlanmış olan tüm metoda yönelik çalışmalar incelendiğinde etanolün^{16,29,35,37,39,41,44}, %10'luk formalinin^{24,30,31,40,45-50} ve formalin: asetik asit: etanolün^{34,36,51} en sık tercih edilen fiksatifler olduğu görülmektedir.

İskelet boyamalarının daha ilk yıllarında, iyi boyanmış örnekler elde edebilmek için maserasyon ve saydamlaştırma işlemlerinin ne kadar önemli olduğu anlaşılmış, bu basamaklarda farklı ajanlar ya da aynı ajanın farklı konsantrasyonlarının denenmesine başlanmıştır. Sedra⁴⁵'nin %2'lik NaOH kullandığı metodu dışında, maserasyonda kullanılan tek ajan KOH olmuştur. Bugüne kadar yayınlanmış olan metotlar incelendiğinde KOH konsantrasyonunun %0.5 ile %10 arasında değiştiği görülmektedir. Kullanılacak konsantrasyonu belirlerken dikkate alınması gereken ilk faktör masere edilecek örneğin büyüklüğüdür. Denek büyüdükçe kullanılacak KOH'in konsantrasyonu arttırılmalıdır. Burdi ve Flecker²⁸ tavuk embriyolarını kullandığı çalışmasında 7-10 günlük embriyolar için %0.5'lik, 11-16 günlük embriyolar için %1'lik ve 17-21 günlük embriyolar için %3'lük KOH kullanımının uygun olduğunu bildirmiştir. Yine akvaryum balıklarında çalışan Park ve Kim⁴⁰ %0.5'lik KOH kullanmışlardır. Önemli bir diğer faktör de işlemin ne kadar hızlı olmasının istendiğidir. %5-10'luk konsantrasyonlar genellikle fiksasyon aşaması yapılmadan taze örneklerin direk masere edildiği hızlı prosedürlerde tercih edilmiştir⁵². Ancak, maserasyonu hızlandırmak için KOH konsantrasyonunun arttırılmasının her zaman iskeletin dağılması ile sonuçlanması olası olduğu unutulmamalıdır. Yani zaman çok önemliyse bu yüksek konsantrasyonlar kullanılabilir, fakat tamamen güvenilir değildir. Jensh ve Brent⁵⁰ %10'un üzerindeki konsantrasyonlarında KOH'in kısmen ya da tamamen disartikülasyona neden olduğunu bildirmişlerdir. Şimdiye kadar yayınlanmış olan metotlar incelendiğinde KOH'in en çok %1'lik^{17,27,29,37,38,50,53} veya %2'lik^{18,26,33,38,44,54} konsantrasyonlarda kullanıldığı görülmektedir.

Saydamlaştırma aşamasında ilk yıllardan itibaren en çok tercih edilen ajan gliserin olmuştur. Williams'a göre²⁶ gliserini ilk kez 1897 senesinde Schultze kullanmıştır. Bugüne kadar yayınlanmış olan boyama metotlarının çoğunda fiksasyon ve maserasyonun ardından boyanan örnekler gliserinin artan konsantrasyonlarında saydamlaştırılır ve ardından da mantar

üremesinin engellenmesi amacıyla birkaç parça timol kristali eklenmiş olan saf gliserinde depolanır^{16-18,25,29,30,34-36,38-45,52}. Gliserin ile saydamlaştırılan örneklerin kolay manipüle edilebildiğini bildirmekle beraber yumuşak dokuların saydamlaştırılmasının yeterli olmadığını düşünen bazı çalışmacılar bu ajanın yerine metil salisilat'ın^{26,32,51}, gliserin-etil alkol karışımının^{27,28,37}, gliserin-etil alkol-benzil alkol karışımının^{50,53,54}, ksilenin²⁴, metil salisilat-benzil benzoat karışımının²³ kullanımını önermişlerdir. Gliserinin en önemli alternatifi olan enzimatik saydamlaştırmayı ilk deneyen araştırmacı ise Taylor^{46,47}'dir. Taylor küçük vertebralıların kemiklerini alizarin red-S ile boyamadan önce yumuşak dokuların saydamlaştırılmasında tripsini kullanmıştır. Bu metot, özellikle gliserin ile iyi sonuçların alınmadığı uzun süre koruyucu sıvılarda saklanmış olan örneklerin saydamlaştırılmasında son derece başarılı olmuştur. Enzimatik saydamlaştırma ile, uygun şekilde fikse edilip korunmuş olan bağ dokusunun sindirimi önemsiz derecededir. Kas dokusu ise ortamdan tamamen uzaklaştırılır. Bu sayede alkali maserasyon sırasında kas dokusunda oluşan ozmotik etkiler sonucunda gelişen aşırı şişmelerden, yırtılmalarından ve bağ dokusunda oluşan şekil bozukluklarından kaçınılmış olur. Taylor'dan sonra Dingerkus ve Uhler³¹ bu metodu alcian blue ile boyanmış örneklerle uygulamışlar ve ardından örnekleri kemik boyaması yapmışlardır. Gosztonyi⁴⁸ ise enzime dayalı çamaşırhane deterjanlarının kullanımı ile işlemin daha ekonomik hale getirilebileceğini bildirmiştir. Kelly ve Bryden³⁶ bu metodu kullanan diğer çalışmacılardır.

Boyama kalitesini arttırmaya yönelik olarak denenlerden biri de; vücut pigmentlerini ağartmak için maserasyon sıvısına hidrojen peroksitin eklenmesi olmuştur^{40,52}.

b) İşlemin süresini kısaltmak:

Herhangi bir farmakolojik, endüstriyel yada çevresel kimyasal madde adayının teratolojik etkiye sahip olup olmadığı araştırılırken, uygun istatistiksel incelenin yapılabilmesi için, çok sayıda denegin kullanılması zorunludur. Bu da ikili iskelet boyamalarında bulunması şart olan güvenilirlik, kalıcılık ve tekrarlanabilirlik özelliklerine, önemli bir başka özelliğin, işlemin kısa sürede tamamlanmasının eklenmesi neden olur.

En iyi sonucu yakalarken harcanan zamanı minimuma indirme amacını taşıyan çalışmalarda fiksasyon aşamasının atlanması ve maserasyonu hızlandırmak için artmış KOH konsantrasyonlarının kullanılması denenmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır. True⁵² hem fiksasyon aşamasını atlayarak hem de artmış konsantrasyonda KOH (%5-10) kullanarak işlemini hızlandırmayı başarmıştır. Jensh ve Brent⁵⁰, değişik KOH konsantrasyonlarını, maserasyon sürelerini ve asetonda bekleme sürelerini denedikleri çalışmalarının sonucunda iki farklı metot önermişlerdir. Bunlardan ilki 9 günde tamamlanan hızlı metottur. Araştır-

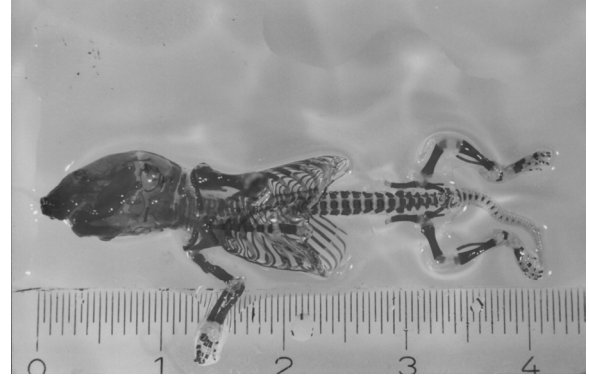
İkili İskelet Boyamaları

macılar bu prosedür ile boyanan preparatların iyi saydamlaşmadığını, ancak zamanın son derece önemli olduğu ve detaysız incelemelerin amaçlandığı çalışmalarda kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Önerdikleri ikinci metot ise detaylı incelemenin amaçlandığı çalışmalar için uygundur ve 14 günde tamamlanmaktadır. Selby⁵⁴, erişkin farelerde yaptığı çalışmasında hızlı ve kaliteli bir kemik boyaması metodu geliştirebilmek için; örneklerin fikse edilmediği, maserasyon aşamasında KOH'in farklı konsantrasyonlarından yararlanılan, daha iyi ve hızlı saydamlaştırma için gliserin, benzil alkol, etanol ve su karışımının kullanıldığı metotlar denemiştir ve çalışmalarının sonucunda iki farklı prosedür önermiştir. Bunlardan ilki kısa olan 3 günlük kemik boyaması metodudur. Araştırmacı bu metodun tek dezavantajının elde edilen örneklerin daha kırılabilir olması olduğunu bildirmiştir ve bu nedenle de zamanın uygun olması durumunda 11-14 gün süren ikinci prosedürün tercih edilmesini önermiştir. Hem kemiğin hem de kıkırdakın boyandığı ilk hızlı boyama metodu ise Kimmel ve Trammell³³ tarafından 1981'de yayımlanmıştır. Kimmel ve Trammell de fikse edilmemiş fetuslar kullanmışlar ve boyama işlemini 39 saatte tamamlamışlardır.

İskelet boyaması metotlarının sürelerini kısaltmayı amaçlayan diğer bir grup çalışmada ise, ısının kimyasal reaksiyonları artırıcı özelliğinden yararlanılmıştır. Hood ve Neill⁴⁴ 1948 yılında yayınladıkları çalışmalarında fare, tavuk ve at embriyolarının alizarin red-S ile boyanmış preparatlarını hazırlarken, boyama aşamasından sonraki maserasyon ve saydamlaştırma işlemini 70 °F'deki inkübatörde gerçekleştirmişlerdir. Bu sayede True⁵²'nin metodunda oda ısısında 9 gün süren bu aşamayı 4 günde tamamlayabilmişlerdir. Benzer bir çalışma 1950'de Sedra⁴⁵ tarafından yayımlanmıştır. Sedra metodunda hem boyama öncesindeki maserasyon aşamasını hem de boyama aşamasını 38°C'de etüvde gerçekleştirmiştir. Ancak, oda ısısında Dawson¹⁷'un metodunda yaklaşık 24-72 saat, Hood ve Neill⁴⁴'in metodunda ise 72 saat süren maserasyon aşamasında kısalma sağlayamamıştır. Büyük olasılıkla bunun sebebi; önceki çalışmalarda kullanılan fiksatifin etanol olması ve buna karşılık Sedra'nın kullandığı fiksatifin maserasyon işlemini geciktirici etkiye sahip olduğu bilinen %10'luk formalin olmasıdır. Buna rağmen Sedra, çalışmasında boyama aşamasını kısaltmada başarılı olmuştur ve Lipman¹⁸'in metodunda oda ısısında 24 saat süren Alizarin red-S ile kemiğin boyanması aşamasını 12 saatte tamamlayabilmiştir. İkili iskelet boyamasında ısıdan yararlanarak işlem süresini kısaltan ilk çalışmacı Inouye²⁹'dur. Inouye ikili iskelet boyaması işlemini 37°C'de etüvde 2-3 günde tamamlamıştır.

Fetal iskelet preparasyonlarında ısı kaynağı olarak mikrodalga ışınımının kullanılmasının sürede önemli azalmalar sağlayabileceğine dikkat çeken ilk araştırmacılar Petrere ve Schardein'dir⁵⁵. Bu araştırmacılar,

fetusların fiksasyonu için mikrodalga ışınımını kullanmışlardır. %10'luk tamponlu nötral formalin içindeki tavşan fetuslarını 2-2,5 dakika, sıçan fetuslarını ise 2,5-3 dakika mikrodalga fırında fikse ettikten sonra, bir gece örnekleri formalin içinde bırakmışlardır. Bu şekilde yapılan fiksasyonun son derece tatmin edici sonuçlar oluşturduğunu bildirmişlerdir ve mikrodalga ışınımı ile fikse edilen fetuslara iskelet boyanması yapılabileceğini önermişlerdir, ancak kendileri bu yönde bir çalışmada bulunmamışlardır. Petrere'den 20 yıl sonra Kahveci ve ark.⁵⁶ da sıçan fetuslarının fiksasyonunda mikrodalga ışınımından yararlanmışlardır. Fiksatif olarak yine %10'luk nötral formalini kullanan çalışmacılar mikrodalga ışınımı öncesinde örnekleri 15 dakika oda ısısında fiksatif içinde bekletmişlerdir. Daha sonra fırını maksimum güçte bir dakika çalıştırarak ısıyı 50 °C'ye çıkartmışlardır. Ardından ısıyı sabit tutabilmek için fırını %10 güçte çalıştırmışlar ve total irradiasyon süresi 2,5 dakikaya ulaştığında işleme son vermişlerdir. Bu şekilde fetusların konvansiyonel yöntemle aynı kalitede ve çok daha kısa sürede fikse edilebildiğini bildirmişlerdir. Sunay ve ark.⁵⁷ ise Inouye'un metodunun diğer aşamalarında değişiklik yapmaksızın, boyama aşamasını etüv yerine mikrodalga fırında gerçekleştirdikleri çalışmalarında, boyama süresini 2-3 günden 8 saate indirmişlerdir (Şekil:1).



Şekil 1:
Inouye'un metodu ile mikrodalga fırında boyanmış yeni doğan fare.

c) Erişkin deney hayvanlarında kullanılabilecek metotlar tanımlamak:

Erişkin deney hayvanlarında da kullanılabilecek metotların geliştirilmesinin gerekli olduğuna dikkati çeken ilk çalışmacı Selby⁵⁴'dir. Dominant mutasyonların fare iskeletinde oluşturduğu malformasyonları inceleyen çalışmacı gelişimini tamamlamış erişkin hayvanlara iskelet boyaması yapması gerektiğinde literatürde var olan metotların fetal ve neonatal hayvanlara yönelik olduğunu ve erişkinlerde kullanılmaları gerektiğinde bu metotlarda ne gibi değişikliklerin yapılması gerektiğine dair yeterli bilginin olmadığını görmüştür. Bunun üzerine geliştirdiği ve erişkin farelerde kullanılan hızlı metodunu 1987 yılında yayınlamıştır. Yine Tarpley³⁹'e göre transgenik ve

knock out fare teknolojisinin kullanılmaya başlanması ile diferansiyel iskelet boyamasının kullanımı gelecekte olarak kullanıldığı alan olan toksikoloji çalışmalarının dışına çıkmıştır. Çalışmacı, fetal dönemlerinde fenotipik bir anomaliye sahip olmayan transgenic ve knock out farelerde, erişkin yaşta tekrar incelendiklerinde, önemli fenotipik farklılıkların tespit edilmesinin bu sonucu doğruladığı belirtmektedir.

d) Boyama işlemini daha basit ve daha pratik hale getirmek:

İkili iskelet boyamalarını hem daha basit ve pratik hale getirmek hem de aynı anda çok sayıda fetusu boyamak için otomatik doku takibi cihazlarının kullanılması denenmiştir. Rousseaux³⁴ metodunun kırkırdak boyaması ile maserasyon ve kemik boyaması aşamalarını doku takibi cihazında gerçekleştirmiştir. Çalışmacıya göre tanımladığı bu metodun avantajları görsel olarak son derece tatmin edici çok sayıda örneği hızla elde etmesidir. Rousseaux'un metodu kısmen otomatize edilmiş bir metottur, boyama işleminin bütün aşamaları cihazda gerçekleşmemektedir. Miller ve Tarpley³⁵ Rousseaux'un önerdiği bu metottan yola çıkarak fiksasyon aşaması dışında tüm işlemlerin doku takibi cihazında yapılabildiği bir prosedür yayınlamışlardır. Trueman ve ark.³⁸ ise tavşan fetuslarında kullanılabilecek benzer bir metot tanımlamışlardır.

Kırkırdak boyası olarak alcian blue'nun kullanıldığı ikili iskelet boyaması prosedürlerinde derinin soyulması, yağ dokusunun uzaklaştırılması ve evisserasyon işlemleri büyük bir titizlikle yapılmalıdır. Çünkü bu dokular alcian blue'nun penetrasyonunu engelleyerek kırkırdak boyanın almaşına neden olurlar^{36,41}. Son derece zahmetli olan bu işlem, aynı zamanda, iskeletin parmaklar gibi küçük kısımlarının kaybedilmesi riskini de taşımaktadır. Boardman ve ark.⁵⁸ derisi soyulmadan alizarin red-S ile kemik boyaması yapılmış sıçan fetuslarını %3'lük asetik asit solüsyonunda 7 gün bekletildiğinde boyanın kemik yapılardan ayrılıp kırkırdakları pembe renkte boyadığını bildirmiştir. Kimmel ve Trammell³³ ise deneğin derisinin soyulmasından önce, 30 saniye süre ile 70 °C'deki su banyosunda bekletilmesinin yada buzdolabında, %4'lük tuzlu suda, bir gece bekletilmesinin işlemleri kolaylaştırdığını bildirmişlerdir.

e) İskelet boyamalarını farklı amaçlara sahip diğer teknikler ile bir arada kullanmak:

Chappard ve ark.⁴⁹ abortus sonucu elde ettikleri ve Alizarin red S ile boyadıkları insan fetuslarını maserasyon ve saydamlaştırma aşamalarının ardından polietilen kalıplar içinde polyester monomerlerine gömmüşlerdir. Böylece boyanmış materyalin uzun yıllar boyunca zarar görmeden saklanması mümkün olduğunu bildirmişlerdir.

Carlson ve ark.⁵¹ ise, tavuk embriyolarını kullandıkları çalışmalarında iskelet boyamasını Feulgen boyaması ile birleştirmişlerdir. 10–12 günlük tavuk embriyolarının kanatlarına, fikse edildikten sonra, blok halinde Feulgen boyaması ardından da iskelet boyaması yapılmıştır. Bu aşamada makroskopik olarak incelenen ve fotoğraflanan örnekler daha sonra Paraplasta gömülmüş, kesitleri alınmış ve zıt boyama yapıldıktan sonra mikroskopta incelenebilmiştir.

Dudzinski ve Neff⁵⁹; fare embriyolarının dolaşım sistemi içerisine lateks enjekte ettikten sonra, ikili iskelet boyaması yapmışlardır.

Bunların dışında; fare²⁹, sıçan^{18,37}, tavşan³⁸, balık⁴⁰, tavuk^{18,28}, domuz, kedi, sığır¹⁸ at⁴⁴ ve insan^{18,32} gibi farklı türlerin fetuslarında kullanılabilecek metotlar geliştirilmiştir. Yine bazı araştırmacılar metotta yer alan ve toksik olan maddeler yerine daha az toksik olan maddelerin kullanıldığı metotlar geliştirmişlerdir. Bu amaçla; Webb ve Byrd⁴¹ ikili iskelet boyamalarında boya solüsyonunun hazırlanmasında, korozif bir ajan olan glasiyal asetik asit yerine potasyum hidrojen fitalat kullanmışlar ve oldukça iyi sonuç almışlardır.

Her ne kadar son yıllarda yayınlanan bazı çalışmalarda tanımlanan radyolojik teknik⁶² ve dijital radyografi tekniği⁶³ iskelet boyamalarına alternatif olarak önerilmekteyse de; rutin teratoloji çalışmalarında kemik boyaması, bilimsel araştırmalar da ise ikili iskelet boyaması hala en sık kullanılan tekniklerdir.

Kaynaklar

1. Lee M, Leichter J. Skeletal development in fetuses of rats consuming alcohol during gestation. *Growth*. 1983; 47: 254–62.
2. Alles AJ, Sulik KK. Retinoic acid induced limb reduction defects: Perturbation of zones of programmed cell death as a pathogenetic mechanism. *Teratology* 1989; 40: 163–71.
3. Bannigan JG, Cottell DC, Morris A. Study of mechanism of BUDR-induced cleft palate in the mouse. *Teratology* 1990; 42: 79–89.
4. Tanigawa K, Kawaguchi M, Tanaka O, Kato Y. Long-term effect of maternal insulin-induced hypoglycemia during organogenesis. *Diabetes* 1991; 40: 1115–21.
5. Ehlers K, Sturge H, Merker H-J, Nau H. The valproic acid metabolite E-2-n-Propyl-2-Pentenoic Acid does not induce spina bifida in the mouse. *Dev Pharmacol Ther* 1992; 19: 196–204.
6. Savontaus M, Metsaranta M, Vuorio E. Retarded skeletal development in transgenic mice with a Type II collagen mutation. *Am J Pathol* 1996; 149: 2169–82.
7. Migliaccio S, Newbold RR, Bullock BC, Jefferson WJ, Sutton FG, McLachlan JA, Korach KS. Alterations of maternal levels during gestation affect the skeleton of female offspring. *Endocrinology* 1996; 137: 2118–25.
8. Savontaus M, Metsaranta M, Vuorio E. Mutation in type II collagen gene disturbs spinal development and gene expression patterns in transgenic Del1 mice. *Lab Invest* 1997; 77: 591–600.

İkili İskelet Boyamaları

- Maddox BK, Garofalo S, Smith C, Keene DR, Horton WA. Skeletal development in transgenic mice expressing a mutation at Gly574Ser of Type II collagen. *Dev Dynam* 1997; 208: 170–7.
- Bareggi R, Grill V, Sandrucci MA, Baldini G, De Pol A, Forabosco A, Narducci P. Developmental pathways of vertebral centra and neural arches in human embryos and fetuses. *Anat. Embryol* 1993; 187: 139–44.
- Bareggi R, Grill V, Narducci P, Forabosco A. A quantitative study on the spatial and temporal ossification patterns of vertebral centra and neural arches and their relationship to the fetal age. *Ann. Anat* 1994; 176: 311–7.
- Bareggi R, Grill V, Zweyer M, Sandrucci MA, Narducci P, Forabosco A. The growth of long bones in human embryological and fetal upper limbs and its relationship to other developmental patterns. *Anat. Embryol.* 1994; 189: 19–24.
- Tomo S, Ogita M, Tomo I. Development of mandibular cartilages in the rat. *Anat. Rec.* 1997; 249: 233–9.
- Danielson M, Kihlstrom I. Calcification of the rabbit fetal skeleton. *Growth.* 1986; 50: 378–84.
- Menegola E, Broccia ML, Giavini E. Atlas of rat fetal skeleton double stained for bone and cartilage. *Teratology* 2001; 64: 125–33.
- Hill MF, Zdan R. Staining of developing skeleton with murexide. *Acta anat.* 1973; 84: 509–15.
- Dawson AB. A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with Alizarin red–S. *Stain Technol.* 1926; 1: 123–4.
- Lipman H. Staining the skeleton of cleared embryos with alizarin red–S. *Stain Technol.* 1935; 10: 61–3.
- Mitala JJ, Boardman JP, Carrano RA, Iuliucci JD. Novel accessory skull bone in fetal rats after exposure to Aspirin. *Teratology.* 1984; 30: 95–8.
- Virtanen P, Lassila V. Alizarin red–S stained bone and cartilage in calcium deficiency provoked by experimental liver injury in rats. *Acta Anat.* 1986; 125: 6–9.
- Curle DC, Ray M, Persaud TVN. In vivo evaluation of teratogenesis and cytogenetic changes following methylmercuric chloride treatment. *Anat. Rec.* 1987; 219: 286–95.
- Cassella JP, Pereira R, Khillan DJ, Prockop DJ, Garrington N, Ali SY. An ultrastructural microanalytical and spectroscopic study of bone from a transgenic mouse with a COL1A1 α 1 mutation. *Bone.* 1994; 15: 611–9.
- Ojeda JL, Barbosa E, Bosque PG. Selective skeletal staining in whole chicken embryos; A rapid alcian blue technique. *Stain Technol.* 1970; 45: 137–9.
- Love AM, Vickers TH. Durable staining of cartilage in foetal rat skeleton by methylene blue. *Stain Technol.* 1972; 47: 7–11.
- Kimmel CA, Laborde JB, Trammell CT. Evaluation of cartilage and bone formation in fetal skeletons following prenatal insult reveals abnormalities not apparent in alizarin stained specimens. *Teratology.* 25: 54A–55A.
- Williams TW. Alizarin red–S and toluidine blue for differentiating adult or embryonic bone and cartilage. *Stain Technol.* 1941; 16: 23–5.
- Burdi A. Toluidine blue Alizarin red–S staining of cartilage and bone in whole–mount skeletons in vitro. *Stain Technol.* 1965; 40: 45–8.
- Burdi AR, Flecker K. Differential staining of cartilage and bone in the intact chick embryonic skeleton in Vitro. *Stain Technol.* 1968; 43: 47–8.
- Inouye M. Differential staining of cartilage and bone in fetal mouse skeleton by Alcian blue and Alizarin red S. *Cong. Anom.* 1976; 16: 171–3.
- Wassersug RJ. A procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formalin fixed vertebrates. *Stain Technol.* 1976; 51: 131–4.
- Dingerkus G, Uhler LD. Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Stain Technol.* 1977; 52: 229–32.
- Mc Cann JA. Methyl green as a cartilage stain; human embryos. *Stain Technol.* 1971; 46: 263–5.
- Kimmel CA, Trammell C. A rapid procedure for routine double staining of cartilage and bone in fetal and adult animals. *Stain Technol.* 1981; 56: 271–3.
- Rousseaux CG. Automated differential staining for cartilage and bone in whole mount preparations of vertebrates. *Stain Technol.* 1985; 60: 295–7.
- Miller DM, Tarpley J. An automated double staining procedure for bone and cartilage. *Biotech Histochem.* 1996; 71: 79–83.
- Kelly WL, Bryden MM. A modified stain for cartilage and bone in whole mount preparations of mammalian fetuses and small vertebrates. *Stain Technol.* 1983; 58: 131–4.
- Whitaker J, Dix KM. Double staining technique for rat foetus skeletons in teratological studies. *Lab Anim.* 1979; 13: 309–10.
- Trueman D, Jackson SW, Trueman B. An automated technique for double staining rat and rabbit fetal skeletal specimens to differentiate bone and cartilage. *Biotech Histochem.* 1999; 74: 98–104.
- Tarpley JE. Adult rodent double skeleton stain. *Biotech Histochem.* 1998; 74: 116–8.
- Park E–H, Kim DS. A procedure for staining cartilage and bone of whole vertebrate larvae while rendering all other tissues transparent. *Stain Technol.* 1984; 59: 269–72.
- Webb GN, Byrd RA. Simultaneous differential staining of cartilage and bone in rodent fetuses: an Alcian blue and Alizarin red S procedure without glacial acetic acid. *Biotech Histochem.* 1994; 69: 181–5.
- Yamada T. Selective staining methods for cartilage of rat fetal specimens previously treated with Alizarin red S. *Teratology.* 1991; 43: 615–9.
- Yamada T, Kurihara A, Nishiyama T, Uchida H. Application of the bromophenol blue staining method to rat fetal cartilage previously stained with Alizarin red S. *Exp Anim.* 1993; 42: 457–61.
- Hood RC, Neill WM. A modification of alizarin red–S technic for demonstrating bone formation. *Stain Technol.* 1948; 23: 209–18.
- Sedra S. Decreasing the time required for making an alizarin skeleton preparation. *Stain Technol.* 1950; 25: 223–4.
- Taylor WR. An enzyme method of clearing and staining small vertebrates. *Proc. U. S. Nat. Mus.* 1967; 122: 1–17.
- Taylor WR. Outline of a method of clearing tissues with pancreatic enzymes and staining bones of small vertebrates. *Turttox News.* 1967; 45: 308–9.
- Gosztonyi AE. The use of enzyme–based laundry “ presoaks ” for clearing small vertebrates for alizarin red staining of bony tissues. *Stain Technol.* 1984; 59: 305–7.
- Chappard D, Alexandre C, Palle S, Riffat G. Permanent preservation of whole alizarin red S skeletons by clearing and embedding in polyester resins. *Stain Technol.* 1985; 61: 145–9.
- Jensh RP, Brent RL. Rapid schedules for KOH clearing and alizarin red S staining of fetal rat bone. *Stain Technol.* 1966; 41: 179–83.
- Carlson BM, Simandl BK, Stocker KM, Connelly TG, Fallon JF. A method for combined gross skeletal staining and feulgen

- staining of embryonic chick tissues. *Stain Technol.* 1986; 61: 27–31.
52. True RM. Staining of embryonic and small mammalian skeletal systems. *Stain Technol.* 1947; 22: 107–8.
53. Crary DD. Modified benzyl alcohol clearing of alizarin stained specimens without loss of flexibility. *Stain Technol.* 1962; 37: 124–5.
54. Selby PB. A rapid method for preparing high quality alizarin stained skeletons of adult mice. *Stain Technol.* 1987; 62: 143–6.
55. Petreter JA, Schardein JL. Microwave fixation of fetal specimens. *Stain Technol.* 1977; 52: 113–4.
56. Kahveci Z, Çavuşoğlu İ, Sırmalı ŞA. Microwave fixation of whole fetal specimens. *Biotech Histochem.* 1997; 72: 144–7.
57. Sunay FB. İkili iskelet boyamalarında mikrodalga ışınımının kullanılması (Uzmanlık Tezi). Bursa: Uludağ Üniversitesi; 2000.
58. Boardman JP, Mitala JJ, Carrano RA, Iulucci JD: Cartilage-staining technique for the examination of unskinned fetal rat specimens previously processed with Alizarin red S. *Teratology.* 1984; 30: 383–4.
59. Dudzinski KM, Neff NA. A technique for the combination of clearing, staining, and injecting small mammals. *Stain Technol.* 1990; 65: 113–8.
60. Dingerkus G. The use of various alcohols for alcian blue *in toto* staining of cartilage. *Stain Technol.* 1981; 56: 128–9.
61. Peltzer MA, Schardein JL: A convenient method for processing fetuses for skeletal staining. *Stain Technol.* 1966; 41: 1420–1.
62. Burdan F, Rozylo-Kalinowska I, Katarzyna Rozylo T, Chahoud I: A new rapid procedure for routine teratological use in bone ossification assessment: a supplement for staining methods. *Teratology.* 2002; 66: 315–25.
63. Rozylo-Kalinowska I, Michalska A, Burdan F: Optimization of analysis of skeletal ossification of laboratory animals by means of digital radiography software options. *Ann Univ Mariae Curie Skłodowska.* 2003; 58:95-100.