

# Glikojen Tesbitinde Fiksatiflerin Etkisinin Histolojik Olarak İncelenmesi

Mehmet AYDIN \*  
Şermin KALAYCI \*\*

## ÖZET

*Bu çalışmada karaciğer glikojen tesbitinde değişik fiksatiflerin etkileri, fiksasyon süresi ve ortam şartları (sıcaklık farkı, hava ve su) içinde incelenip, birbirleriyle kıyaslanması ve en iyi yöntemin saptanması amaçlandı.*

*Karaciğerden alınan örneklerde deney sonucunda; 24 ve 48 saat oda sıcaklığında (20°C) Orth solüsyonunda veya 24 saat 44°C'de Orth solüsyonu ve tuzlu-formalinde veya 4 ve 8 gün oda sıcaklığında Orth solüsyonu ve tuzlu-formalinde fikse edilen parçalarda glikojenin en iyi şekilde korunduğu gösterildi.*

## SUMMARY

### A Histological Investigation of the Effects of Fixatives on the Fixation of Glycogen

*In this study, the effects of various fixatives on the fixation of liver glycogen in different environmental conditions and of different fixation time was investigated and the results were compared in order to determine the best method.*

*Experimental results showed that the glycogen was stored successfully in Orth's fluid at room temperature (20°C) for 24-48 hours or in Orth's fluid and formal-saline at 44°C for 24 hours or in Orth's fluid and formal-saline for 4-8 days in room temperature.*

\* Uzm. Dr.; Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Bilim Dalı Araştırma Görevlisi.

\*\* Prof. Dr.; Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi.



Günümüzde elektron mikroskobuna kadar ulaşan morfolojik yöntemlerin temeli, oluşumların ince yapılarını fazla bozmadan aslına çok yakın olarak, fikse ettikten sonra incelenmesini sağlamaktır. Fiksasyondan amaç, dokuların morfolojik görünümlerinde ortaya çıkacak dejenerasyonların önüne geçilmesidir <sup>1,2</sup>.

Fiksasyon dokularda önemli etkiler yapar. En önemli etkilerinden biri, dokuların proteinlerini ve diğer yapılarını pıhtılaştırıp, doku takibinde onların kaybını ve dağılmasını önlemektir. Ayrıca, hücre ve doku kısımlarının ışığı farklı kurma indeksleri ile aynılmasına yardım eder. Dikkati çeken bir etkisi de, boyaların tesirini kolaylaştırır <sup>1,3-6</sup>.

Burada kontrol edilmesi gereken önemli hususlar şunlardır:

- Ölümle, dokunun fiksasyonu arasında geçen zaman,
- Fiksatiflerde dokunun tutulma süresi,
- Dokunun oda sıcaklığında havada bırakılması,
- Dokunun fiksasyondan önce suda kalma olasılığı.

Yukarıda maddeler halinde belirtilen nedenler, genel olarak morfoloji enstitülerinde (Histoloji, Anatomi, Patoloji) teknik yetersizlikler nedeniyle karşılaşılan ve dokularda istenilen özelliklerin kaybolmasına yol açabilen durumlardır <sup>1,3</sup>.

Bu çalışma, hayvan karaciğerinde glikojen tesbitinde, değişik fiksatiflerin etkilerinin yanında yukarıda sayılan ortam şartları (zaman, sıcaklık farkı, hava ve su) içinde incelenip, birbirleriyle kıyaslanması ve en iyi yöntemin saptanması amacıyla yapılmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada, "Uludağ Üniversitesi Hayvan Araştırma Merkezi"nden sağlanan, Swiss Albino cinsi 1 adet 1,5 yaşında erkek tavşan kullanıldı.

Deney öncesi tavşan tartıldı (3.050 kg.). Çevresel etkilerden uzak, özel kafesinde bir hafta süre ile beslenmeye alındı. Beslenme için Palet tavşan yemi sürekli verildi. Su kabına şekerli su (% 5'lik) dolduruldu. Deney hayvanının, kontrolde tutulduğu süre içinde, yem ve suyunu normal sınırlar içinde tükettiği görüldü. Deserebre etmeden 6 saat önce, 100 cc. % 10'luk dektron kulak veni (V.auricula externa)'nden perfüze edildi (20 damla/dakika). Tavşan tartılarak (3.170 kg.) deserebre edildi. Karın boşluğu hemen açılarak karaciğeri çıkarıldı. Karaciğerin sağ lobundan alınan 60 adet 5 mm.'lik kübik parçalar zaman kaybetmeden çalışmada kullanılan 10 değişik fiksatifte konarken, daha büyük iki parçadan biri su içine kondu, diğeri de havada bırakıldı. Hava ve suda 30 dakika tutulan parçalardan hazırlanan 10'ar tane 5 mm.'lik parçalarda fiksatiflere kondu. Bu çalışmada;

- 1- % 10'luk formalin solüsyonu,
- 2- Tuzlu formalin solüsyonu,
- 3- Nötral formalin solüsyonu,
- 4- Kalsiyum Asetatlı formalin solüsyonu,
- 5- Formalin-Alkol solüsyonu,
- 6- Absolu alkol solüsyonu,
- 7- Zenker solüsyonu,
- 8- Zenker-formal solüsyonu,



9- Bouin solüsyonu,

10- Orth solüsyonu, fiksatif olarak kullanıldılar.

Yukarıdaki fiksatiflere konan karaciğer parçalarından zaman farkı (fiksasyon süresi) ve ortam şartlarında (sıcaklık farkı, hava ve suda kalma), fiksatiflerin birbirleriyle kıyaslanması amacıyla 8 grup meydana getirildi. Gruplar;

A-Grubu: 24 saat

B-Grubu: 48 saat

C-Grubu: 4 gün

D-Grubu: 8 gün

Hemen fiksatiflere konarak, laboratuvar sıcaklığı (ortalama 20°C)'nda tutuldular.

E-Grubu: 24 saat — 3°C de

F-Grubu: 24 saat — 44°C de

Hemen fiksatiflere kondular.

G-Grubu: 24 saat — 30 dakika suda

H-Grubu: 24 saat — 30 dakika havada

tutulduktan sonra (20°C'de)

fiksatiflere kondular.

— A, B, C ve D gruplarında, fiksasyon süresinin önemi,

— E ve F gruplarında, sıcaklık farklarının fiksasyondaki etkileri,

— G ve H gruplarında, suda tutma ve havada bırakmanın, karaciğer glikojen tesbitindeki etkileri incelendi.

Fiksatiflerin değerlendirilmesinde:

— A, B, C ve D grupları, birbirleriyle kıyaslanarak değerlendirildiler (her grup, diğerlerinin kontrolünü yaptı).

— E, F, G ve H gruplarının değerlendirilmesi, A grubu ile kıyaslandı (A grubu, bunların kontrolünü yaptı).

Farklı sürede ve sıcaklıkta tutulan karaciğer parçalarından, fiksatiflerden çıkarıldıktan sonra hemen dehidratasyon ve şeffaflandırma işlemleri uygulanarak parafin bloklar yapıldı <sup>1.7.</sup>

Laboratuvar çalışmasında homojeniteye dikkat edilerek hazırlanan 80 adet bloktan, kızaklı mikrotomla 6-7 mikron kalınlığında alınan kesitlerden, 720 preparat (her bloktan 9'ar kesit) karaciğer hücresinde glikojenin gösterilmesi amacıyla Periodic-Acid-Schiff (PAS) yöntemiyle boyanarak, kanada balsamı ile kapatıldılar <sup>1.3.7.8.</sup> PAS boyamasında, pozitif boyanmanın gerçekten glikojene ait olup olmadığını Malt diastazı ile kontrol edildi <sup>1.</sup>

Gösterilen glikojen miktarının değerlendirilmesi; Kesitlerdeki glikojen boyanma yoğunluğunun görünümüne göre (0) dan (+++++) olarak derecelendirildi. Glikojenin hiç olmadığı duruma (0) denilirken, en fazla yoğunluğa (+++++) verildi. Diğer durumlar için aradaki kademeler (+), (++) ve (+++) kullanıldı.

## BULGULAR

Boyanmış 720 preparatın incelenmesi sonucunda; karaciğer klasik lobülün merkezindeki V. centralis'ten çevreye doğru ışınal olarak yayılan, dallanan ve anastomozlaşan karaciğer hücrelerinin (hepatositlerin) oluşturduğu kordonlar, sinuzoidler ve lobülün köşelerinde yer alan portal aralıklar genellikle uygun şekilde korunabilmişti. Poligonallı hepatositler de genellikle tek sentrik nükleus bulunuyordu. Hepatositlerin iki nükleuslu olanına da rastlandı.



Hepatositlerin sitoplazmalarında, fiksatifin tümüne göre farklılıklar gösteren, genellikle PAS ile koyu kırmızı boyanmış granüller görüldü.

Zenker solüsyonu ile yapılan tesbitlerde hepatositlerin sitoplazmaları içinde PAS'la koyu kırmızı boyanan granüller görüldü. Granüller sinuzoidler ve V. centralis'in lümeni içinde de tesbit edildi. Glikojen granülleri sitoplazmanın bir bölümünde ve düzensiz bir şekilde üst üste yığılan kümeler oluşturmuştu. V.centralis içindeki eritrositler de glikojen partikülleri ile aynı renkte boyanmıştı.

Tüm gruplardan hazırlanan preparatların incelenmesi sonucu Zenker solüsyonu, glikojen korunması için uygun bir fiksatif olmadığından (0) olarak değerlendirildi.

Çalışmada kullanılan 10 değişik fiksatifin karaciğer glikojen tesbitindeki etkileri tabloda belirtildiği gibi gözlemlendi.

Tablo: 1  
Değişik Fiksatiflerle Tespitten Sonra Tavşan Karaciğerinde Glikojenin, PAS Boyama Yöntemiyle Gösterilmesi

GRUPLAR		A	B	C	D	E	F	G	H
FİKSATİFLER		Grubu	Grubu	Grubu	Grubu	Grubu	Grubu	Grubu	Grubu
1	% 10 luk formalin	++	++	+++	+++	++	+++	+	+
2	Tuzlu formalin	+++	+++	++++	++++	+++	++++	++	++
3	Nötral formalin	+	+	++	++	+	+	+	+
4	Kalsiyum asetatlı formalin	+	++	++	++	+	++	+	+
5	Formalin-alkol	++	+++	+++	+++	++	++	++	++
6	Absolü alkol	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
7	Zenker solüsyonu	0	0	0	0	0	0	0	0
8	Zenker-formal solüsyonu	++	++	++	+++	++	++	+	+
9	Bouin solüsyonu	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
10	Orth solüsyonu	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
Malt Diastaz kontrollü PAS		0	0	0	0	0	0	0	0

## TARTIŞMA

Çalışmada kullanılan değişik doku fiksatifleriyle, karaciğerin üniform ve tam olarak tesbit edildiği gözlenmişti. Ancak glikojenin üniform olarak dağıldığı bilinen tüm preparatların kıyaslanması sonucunda hangi fiksatifin daha iyi olduğu ve fiksasyon zamanı ile diğer faktörlerin (sıcaklık farkı, su ve hava) etkisi ortaya konmaktadır. Buna göre;

*Değişik fiksatiflerin fiksasyon zamanının glikojen üzerine etkisi:*

Tablo 1'den anlaşılacağı gibi basit ve genellikle kullanılan formalin fiksatifleri ve diğerleri ile 24 saate kadar olan fiksasyonda glikojen PAS ile reaksiyon vermekte ise de fiksasyon zamanı uzatıldığında kesitlerdeki glikojen miktarının 4. güne kadar fazlaştığı fakat 8.güne kadar tesbit süresi uzatılan preparatlarda 4. güne kıyasla bir farklılık olmadığı izlendi. Böylece glikojen tesbitinde ideal olarak 4 günlük bir fiksasyon zamanının gerekli olduğunu söyleyebiliriz.



Formalin solüsyonları içerisinde formalin alkol ve özellikle tuzlu formalinde fikse edilen parçalardan hazırlanan kesitlerdeki glikojen diğerlerine kıyasla fazla miktarda bulundu. % 10'luk formalinde fikse edilen parçalarda fiksasyonun 4. gününde (++++) glikojen gösterilebildi. Tuzlu formalin ve formalin-alkol içinde glikojen miktarının 4. günde en fazla olması yukarıda belirttiğimiz hususu vurgulamaktadır. Vallance-Owen % 4'lük formalin kullandığında Best-karmin metoduyla iyi sonuç aldığını yayınlamıştır <sup>4</sup>. Çalışmada hem PAS boyası hem de % 10'luk formalin kullandığımız için bir kıyaslama yapamadık.

Absolü alkol fiksasyonunda fiksasyon süresi uzatıldığı zaman dahi ancak (++++) değerinde glikojen saptandı. Vallance-Owen'de benzeri gözlemi kaydetmiştir <sup>4</sup>. Yine Kugler ve Wilkinson absolü alkolün varolan glikojeni modifiye ederek bunlarda boyanma özelliğini kaybettirdiğini ve yaptığı kantitatif çalışmalarda absolü alkol ile karaciğer glikojeninin ancak % 90'ının korunabildiğini bildirmiştir <sup>5</sup>.

Zenker fiksatifi ile bulgularımız (0) olarak belirtildi. Zenker'in glikojen için uygun bir fiksatif olmadığı, doku glikojenini aktif olarak harapladığı Kugler ve Wilkinson (1964)'un çalışmalarında da vurgulanmıştır <sup>5</sup>.

Bouin fiksatifi ile fiksasyon zamanları arasında saptanan glikojen miktarında farklılık olmadığı görüldü ve glikojen (++++) olarak değerlendirildi. Kugler ve Wilkinson, Bouin solüsyonunun dokuya girme özelliğinin fazla olmaması nedeniyle glikojen tesbitini önermemektedirler <sup>5</sup>. Çalışmamızda iyi sonuç alınmasını çok küçük doku parçaları kullanmamıza bağlayabiliriz.

Değişik fiksatiflerle fiksasyon zamanının glikojen miktarı üzerine etkisini inceleyen Trott (1961)'un bulgularıyla bizim bulgularımız arasında bazı noktalarda ayrıcalık bulunmaktadır <sup>6</sup>. Trott 3 mm.den kalın parçaların glikojen fiksasyonu için uygun olmadığını belirtmekteyse de çalışmamızda 5 mm. kalınlıktaki parçalar halindeki tesbit ettiğimiz dokularda iyi sonuç almış bulunmaktayız. Araştırmacı en iyi fiksatif olarak Asetik alkol-formalin solüsyonunu önermektedir.

Orth solüsyonu 24 saatlik fiksasyon süresinde bile en iyi glikojen koruyucusu olarak (++++) görüldü. Böylece hem fiksasyon süresinin kısa olması hem de glikojenin en iyi korunması açısından Orth solüsyonunun incelediğimiz diğer fiksatiflere kıyasla bariz bir üstünlük gösterdiği çok açıktır. Tarayabildiğimiz kaynaklar arasında Orth solüsyonu ile ilgili bir çalışmaya rastlamadığımızdan bu bulgumuzu kıyaslama olanağı bulamadık.

Fiksatifler için uygun fiksasyon zamanlarının değişkenliği fiksatifin pH ile ilgili olabileceği düşüncesindeyiz. Bu noktanın açıklığa kavuşması için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

#### *Fiksasyon Isısının Glikojen Miktarı Üzerine Etkisi:*

Absolü alkol, Alkol-formalin, Zenker, Zenker-formal, Bouin ve Orth solüsyonlarındaki ısı değişiklikleri, glikojen miktarında bir değişiklik göstermedi. Genellikle kullanılan formalin fiksatiflerinde ise fiksatiflerin ısısının düşülmesi (3°C) herhangi bir değişiklik göstermemesine karşın, ısının yükseltilmesi (44°C) fiksasyonu olumlu yönde etkiledi (Tablo 1).

Bu sonuçlar Vallance-Owen'in bulgularıyla uyuşmamaktadır <sup>4</sup>. Çünkü araştırmacı parçaları 18 ve 48 saat soğuk ortamda tuttuktan sonra normal sıcaklıktaki (18-20°C) fiksatiflere koyarak glikojen kaçışını göstermişti.



*Su ve Havada Tutmanın Glikojen Miktarı Üzerine Etkisi:*

Kugler ve Wilkinson (1964)'a göre glikojen ölümden sonra 90 dakika içinde kaybolmaya başlamaktadır<sup>5</sup>. Bu nedenle fiksasyonda en önemli husus parçanın hemen alınarak tesbit solüsyonuna konulmasıdır. Nitekim çalışmamızda parçaların tesbit solüsyonlarına konmadan önce suda ve havada tutulması, glikojen miktarında az da olsa bir miktar azalmaya neden olduğu görüldü (Tablo 1).

Sonuçlar Vallance-Owen'in bulgularıyla uyum içerisindedir<sup>4</sup>.

Sonuçlara göre PAS boyama yöntemiyle kullanılan fiksatifler arasında en iyi Orth solüsyonu olduğu, bunu tuzlu-formalin ve Bouin solüsyonunun izlediği görülmüştür.

Fiksasyon zamanının oda sıcaklığında (20°C) Orth solüsyonu ve Bouin solüsyonunda 24 saat, tuzlu formalinde ise 4 gün olması, fiksatif sıcaklığının Orth solüsyonu ve Bouin solüsyonunda farklılık göstermediği, ancak tuzlu-formalinde sıcaklığın yükseltilmesiyle (44°C), 24 saatlik fiksasyonun yeterli olduğu görülmüştür.

### KAYNAKLAR

1. DRURY, R.A.B., WALLINGTON, E.A.: Carleton's Histological Technique. 4th ed. New York, Oxford University Press, 1967, p. 33-65.
2. HOPWOOD, D. Fixatives and Fixation, A review. Histochem J, 1: 323-360, 1969.
3. RACE, G.J.: Laboratory Medicine. Hagerstown, Harper and Row Publisher, Vol. 3, Chap. 7 B, 1973, p. 2-10.
4. VALLANCE — OWEN, J.: The histological demonstration of glycogen in necropsy material. J Path and Bact, 9: 325-327, 1948.
5. KUGLER, J.H., WILKINSON, W.J.C.: Quantitative studies with the solutions used for the fixation of glycogen. Acta Anat, 56: 184-195, 1964.
6. TROTT, J.R.: An Evaluation of methods commonly used for the fixation and staining of glycogen. J Histochem Cytochem 9: 703-710, 1961.
7. SMITH, A., BRUTON, J.: A Colour Atlas of Histological Staining Techniques. London, Wolfe Medical Publ. Ltd., 1977, p. 152-153.
8. AKER, O.N.: Laboratuvar El Kitabı. Hususi Boyama Teknikleri. Gülhane As. Tıp Akademisi Patolojik Anatomi Enstitüsü Yayınlarından. No: 1, Ankara, 1954, p. 9-12.

Dr. Mehmet AYDIN  
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji-Embriyoloji Bilim Dalı  
BURSA