

A.Ü. Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Kürsüsü
Prof. Dr. Zihni Erençin

DOKU LİPİDLERİNİN PARAFİN KESİTLERİNDE GÜMÜŞLEME YOLUYLA DEMONSTRASYONU

Mahmut Sağlam*

Summary

A new Silver Impregnation Method that detects the Tissue Lipids in Paraffin Sections

A new silver impregnation method that demonstrates the tissue lipids in paraffin sections was developed. One percent of ammoniacal silver nitrate solution that also contained 100 mg of Na_2CO_3 per 100 ml of the solution was used. Before impregnating them the sections were divided into three groups (i.e. untreated, pyridine extracted and diastase pretreated). These were compared to the others stained by Best's Carmine, P.A.S., and Baure-Feulgen for glycogen.

Bouin's and Gendre's solutions were the best fixatives for this new technique.

Özet

Bu çalışmada, doku lipidlerinin parafin kesitlerinde demonstrasyonunu sağlayan bir gümüş impregnasyon metodu geliştirildi. Bu amaçla, amonyaklı gümüş nitrat solusyonundan yararlanıldı. Kesin bir sonuca varabilmek için, normal yolla gümüşlenen kesitler, Pyridine ekstraksiyonuna ve Diastase testine tabi tutulduktan sonra gümüşlenenlerle ve ayrıca, glikojen için Best Carmin, P.A.S. ve Bauer-Feulgen'le boyananlarla karşılaştırıldı.

Bouin ve Gendre solusyonlarının, gümüşlenecek materyal için en iyi tespit solusyonları oldukları sonucuna varıldı.

Giriş

Doku lipidlerinin incelenmesinde genellikle Sudan grubu boya- larla boyanan dondurma kesitleri kullanılır. Bu boya metodlarının bazı sakıncaları vardır. Bir defa, dondurma kesitleri alındıktan sonra, arta kalan parçaların uzun zaman saklanması olanaksızdır. Halbuki çoğu araştırmalar, kati bir sonuca varabilmek için, aynı materyali

* A.Ü. Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Kürsüsü Doçenti, Ankara, Türkiye

defalarca kullanmayı gerektirir. Bu da ancak, parafinle blok yapılarak bozulmayacak hale getirilmiş meteryal kullanılmakla mümkün olur. Sudan boyalarının bir sakıncası da, bunların lipidlerle birlikte nötür yağları ve yağ asitlerini de boyamalarıdır.

Diğer taraftan, Sudan grubu boyalarla boyanmış preparatlarından tam net ve kontrastlı fotoğraflar çekmek her zaman kolay olmamaktadır.

CIACCIO (3), Mc MANUS (10) ve ELFTMAN (5,6) lipidleri parafin kesitlerinde demonstre etmeyi başarmışlardır. Ancak bu araştırmacılar, boya olarak Sudan grubu boyaları kullanmışlardır.

Çeşitli zamanlarda, retikulin ipliklerini HUMASON - LUSHBAUGH (7) metoduna göre parafin kesitlerde gümüşlerken, bazı durumlarda karaciğer ve böbrek epitellerinde siyah renkli granüllerle karşılaşıldı. Şekil ve lokalizasyon bakımından lipid tabiatında olmaları gerektiği kanısına varılan bu granüllerin etrafı bir şekilde incelenmesine karar verildi ve neticede, lipid demonstrasyonuna yarayan aşağıdaki gümüşleme metodu geliştirildi.

Materyal ve Metod

Araştırmada kedi ve kobaydan alınan karaciğer, böbrek, ince barsak ve kas materyali kullanıldı. Parçalar %10 formol, formol-alkol, formol-kalsiyum (BAKER, 1), Elftman (5,6), Bouin ve Gendre solusyonlarında tespit edildi; alkol serilerinden sonra 3 defa (toplam 48 saat) methylbenzoate-celloidin'de parlatıldı; benzoller ve benzol-parafinden geçirilerek parafin emdirildi ve parafinde bloka alındı. 7 Mikronluk kesitler aşağıdaki şekilde boyandı:

- 1) Xylol'ler, absolu alkoller ve 95'lik alkolden geçirilen kesitler, 95'lik alkol+Pyridine (aa)'da 15 dakika tutuldu,
- 2) 80 ve 70'lik alkoller üzerinden distile suya indirildi,
- 3) 37°C'ye kadar ısıtılmış distile suda 5 dakika tutuldu,
- 4) yine 37°C'ye kadar ısıtılmış, amonyaklı gümüş nitrat eriyiğinde (etüvde) 60 dakika bırakıldı,
- 5) 100 ml'sine 1 damla amonyak katılmış distile suda (oda ısısında) kısaca çalkalandı,
- 6) tamponlu formolde 5 dakika süre ile redükte edildi (bu kademedeki kesitler hafif şekilde siyahlaşırlar. Mikroskopta bakıldığında, açık kahverengine boyanmış sitoplazmada siyah granüller görünür.),

- 7) akarsuda 5 dakika yıkandı,
- 8) 100 ml'sine 5 ml sirke asidi katılmış %0,5'lik altın klorürde, sitoplazmanın rengi açılıncaya kadar (tahminen 10-15 dakika) dekolore edildi,
- 9) akarsuda 5 dakika yıkandı,
- 10) %5'lik Sodium thyosulphate'da 5 dakika tespit edildi,
- 11) akarsuda 5 dakika yıkandı,
- 12) Kernechtrot'la 10-15 dakika çekirdekler için boyandı,
- 13) distile suda çalkalandı,
- 14) 95'lik alkollerden başlamak suretiyle alkollerden ve Xylol'lerden geçirildi,
- 15) Kanada balzamu ya da sentetik medyumlarla kapatıldı.

Sonuç: Lipid granülleri siyah, çekirdekler pembe.

Amonyaklı gümüş nitrat eriyiğinin hazırlanması: 100 ml'lik bir Erlenmeyer'e 10 ml distile su konur ve bunda 1 g gümüş nitrat eritilir. Erlenmeyer devamlı çalkalanırken eriyik üzerine damla damla amonyak akıtılır. Karışım önce kahverengi bir renk alır; amonyak damlatılmaya devam edilirse, renk açılmaya başlar ve sonunda eriyik tamamen berraklaşır. 2-3 Damla amonyak daha katıldıktan sonra eriyik distile su ile 100 ml'ye tamamlanır ve buna 100 mg kuru sodyum karbonat katılır.

Tamponlu formol hazırlanması: 95 ml distile suya 5 ml formol katılır ve karışımında 25 mg kuru sodyum karbonat eritilir.

Not: Amonyaklı gümüş nitrat ve tamponlu formol solusyonları her defasında taze hazırlanmalıdır.

Bazı gümüşlemeler, tespit edilmiş materyalin BAKER (1)'in lipidler için geliştirdiği Pyridine ekstraksiyon testine tabi tutulmasından sonra yapıldı. Bir kısım kesitler ise, Diastase testi ile glikojen eritildikten sonra gümüşlendi. Diğer bir kısım kesitler de, glikojen demonstrasyonu için, Best Carmine, P.A.S. ve Bauer-Feulgen metodları ile boyandı. Bu gibi durumlarda, alınan seri kesitlerden biri gümüşle, bunu izleyen kesit ise, adı geçen glikojen boyalarından biri ile boyandı.

Gümüşleme ile beliren granüllerin hangi grup yağlardan olduklarını anlamak için, Nilblau sulphate ve Sudanschwarz B (Romeis, paragraf 1069) ve Elftman (Romeis, paragraf 1084) boyamalarından yararlanıldı.

Sonuçlar

Kullanılan tespit solusyonlarından bir kısmı lipid dmonstrasyonuna uygun düşmemektedir. Bunlardan %10'luk formol, lipidleri iyi tespit etmemektedir. Formol-alkol tespitinden sonra, lipidlerle birlikte glikojen de hafif bir şekilde boyanmaktadır. Lipid demonstrasyonlarında çok kullanılan formol-kalsiyum tespiti ise, lipid ile birlikte çekirdeklerin de gümüşü tutmalarına yol açmaktadır. Elftman tespitinden sonra lipid granülleri iyi boyanmakta fakat sitoplazma koyu bir renk almaktadır. Bouin ve Gendre solusyonları ise mükemmel sonuçlar vermektedir.

Boyamada kullanılan kapların temizliğine dikkat edildiği sürece metod kaprissiz olarak çalışmaktadır.

Bu gümüşleme metodu ile lipid granülleri yuvarlak şekilli ve irili ufaklı olarak belirlemektedir. En iri granüllerin çapı 1,5 mikronu geçmemektedir. İri granüllerden bir kısmı, ortaları boş halkalar halinde gözükmektedir.

Karaciğer lopçuklarında granüller homojen bir yayılma göstermektedir. Lopçukların hem periferleri ve hem de V. centralis'e yakın iç kısımlar aynı miktarda granül taşımaktadır (Şekil 1). Granüllerin çoğunluğuna, Remark kordonlarının, safra yarıklarına yakın iç kısımlarında rastlanmaktadır (Şekil 3); ancak, epitel hücrelerinin perifer kısımları da granülden yoksun değildir.

Lipid granüllerinin böbrekteki lokalizasyonu özelliklere sahiptir. Bunların büyük bir çoğunluğuna böbreğin korteksinde rastlanmaktadır. Bunun da hemen hemen tamamını Pars convoluta proximalis'ler taşımaktadır (Şekil 4a). Pars convoluta distalis'lerde (b) ise, lipide çoğu hallerde hiç rastlanmamaktadır. Bulunduğu hallerde ise miktarı, Pars convoluta proximalis'lerdekinden çok daha az olmaktadır. Her iki tür kanalcıkta da granüllerin çoğunluğu, epitel hücrelerinin apikal yarımalarında toplanmaktadır. Barsak epitel hücrelerinde de durum aynıdır. Bu hücrelerin de apikal yarımaları, özellikle Microvillus'ların altındaki dar bir bölge granülden zengin bulunmaktadır. Buna karşılık iskelet kastellerinde granüller homojen bir yayılma göstermektedir.

Pyridine ekstraksiyonundan sonra gümüşleme negatif, Diastase testinden sonra ise pozitif sonuçlar vermektedir.

Tartışma

BAKER (1)'in bildirdiğine göre, sıcak Pyridine ekstraksiyonu, dokulardaki lipidlerin tamamen erimelerine sebep olmaktadır. Ger-

çekten de bu işlemden sonra gümüşlenen preparatlar her defasında negatif sonuçlar verdi. Buna karşılık Diastase testi ile glikojeni eritilen kesitler ise, normal yolla gümüşlenenlerde olduğu gibi, pozitif bir reaksiyon gösterdi. Bu sonuçlar ve yukarıda adı geçen yağ boyaları ile yapılan karşılaştırmalar göz önüne alınarak, geliştirdiğimiz gümüşleme metodu ile boyanan granüllerin lipid tabiatında oldukları kanısına varıldı. MITCHELL-WISLOCKI (11) ve PRITCHARD (12) gümüşleme yoluyla dokulardaki glikojeni demonstre etmişlerdir. Araştırmacılar da bu amaçla amonyaklı gümüş nitrattan yararlanmışlardır. Bu durum, demonstre ettiğimiz granüllerin glikojen partikülleri olabileceğini akla getirebilir. Fakat granüllerin diastazda erimemeleri, buna karşılık piridin ekstraksiyonuna dayanıksız olmaları; ayrıca miktarca glikojenden daha az bulunmaları, bu ihtimali ortadan kaldırmaktadır.

Çalışma sırasında, adı geçen granüllerin glikojen tabiatında olmadığını doğrulayan diğer bir hususla daha karşılaşıldı: Araştırmada kullanılan kobaylardan bir tanesinin karaciğerinde glikojen özel bir lokalizasyon gösteriyordu. Diğerlerinden farklı olarak bu hayvanın karaciğerinde glikojene, lopçukların sadece iç kısımlarında, V. centralis dolaylarında rastlanıyordu (Şekil 2); perifer kısımları ise hiç glikojen taşıymıyordu. P.A.S., Best carmine ve Bauer-Feulgen metodları daima bu durumu teyit ediyordu. Bunun üzerine, adı geçen matelyalden yapılan seri kesitlerden biri Bauer-Feulgen metoduyla glikojen için boyandı (Şekil 2), bunu izleyen diğeri ise, lipid için gümüşlendi (Şekil 1). Gümüşlenen kesitlerde boyanan granüller, lopçukların her tarafında eşit bir yayılma gösterdi; buna karşılık diğer kesitlerde glikojene sadece lopçukların iç kısımlarında rastlandı. Bu durum da, gümüşleme ile beliren granüllerin glikojen olmadığını göstermektedir.

MITCHELL-WISLOCKI (11) ve PRITCHARD (12), gümüşleme ile glikojen demonstrasyonu sırasında kesitleri Potassium permanganate ya da chromic acid gibi oksidan maddelerle oksitlemişlerdir. Kendi metodumuzla yaptığımız gümüşlemelerde, periyodik ve kromik asitle oksidasyondan sonra, lipid granülleri ile birlikte, glikojen partiküllerinin de az çok belirmediğini gördük. Bu demektir ki, oksidasyondan sonra gümüşlemede glikojen ve lipid maddeleri birlikte boyanmaktadır. Bu sakıncadan ötürü metodumuz oksitleme kademesini kapsamamaktadır. LUDWIG (9), MITCHELL-WISLOCKI (11) ve PRITCHARD (12) metodlarının spesifitesi üzerinde durmuş ve bu metodların glikojen için spesifik olmadıklarını, diğer hücre unsurlarının da gümüşü tuttıklarını bildirmiş, fakat bu unsur-

ların neler olduklarını belirtmemiştir. Araştırmacıya göre, diyastaz testinden sonra, adı geçen metodlara göre gümüşlenen preparatlarda granüller azalmayıp tersine artmaktadır. Bu da, bu metodlarla boyanan unsurların sadece glikojen partikülleri olmadıklarını göstermektedir. Gerçekten de MITCHELL-WISLOCKI'nin çalışmasındaki 1 nolu resmin gösterdiği granüller, bizim fotoğraflarımızdaki lipid granüllerine çok benzemektedir.

Lipid gümüşlemesinde Pyridine'in oynadığı rol şöyle yorumlanabilir: LIPP (8)'e göre, gümüşlemelerde renk husulü, şekilli unsurların gümüş partiküllerini yüzeylerinde tutmalarına bağlıdır. Yüzeylerinde Por'lar taşıyan unsurlar gümüşü daha kolaylıkla tutarlar. Pyridine'in bir yağ solventi olduğu bilinmektedir. Muhtemeldir ki bu madde, tespit edilmiş dokularda kısa sürede (15 dakika) yağ granüllerinin yüzeylerini çok hafif şekilde eriterek pürüzlendirmekte, bu da granüllerin gümüşü tutmalarını kolaylaştırmaktadır.

Geliştirdiğimiz metodun en iyi sonuçları Bouin ve Gendre tespit solusyonlarından sonra vermesinin nedenine gelince: BRESLAUGABE (2, s. 5), SPANNHOF (16, s. 18) ve ROMEIS (15, s. 270) gibi araştırmacılar kitaplarında, pikrik asit taşıyan solusyonların (Bouin, Gendre vs.), glikojen için ideal tespit solusyonları olduklarını bildirmektedirler. Bu bakımdan da, demonstre ettiğimiz materyalin glikojen olabileceği akla gelebilir. Ancak CONTI et al. (4) ve RICCI (13, 14)'nin çalışmalarından da anlaşılacağı gibi, pikrik asit taşıyan tespit solusyonları sadece glikojeni değil, yağları ve proteinleri de ideal bir şekilde tespit etmektedirler. Nitekim adı geçen araştırmacılar, lipid eriten anzimlerden çok zengin olan Pancreas'da lipidleri en iyi bir şekilde Bouin solusyonu ile tespit edebildiklerini bildirmektedir. Araştırmacıların bulgularına göre, iyi bir lipid tespit solusyonu olarak bilinen BAKER (1)'in formol-kalsiyum solusyonu bile, adı geçen dokuda Bouin kadar iyi sonuç vermemektedir. RICCI (14) bunun sebebini, Bouin'de bulunan asit pikrik'in anti-lipaz etkisine bağlamaktadır. Araştırmacıya göre asit pikrik, sitoplazmadaki proteinleri denatüre ederek, bunların yağ damlaları etrafında, yağ anzimlerinden etkilenmeyen bir kabuk meydana getirmelerine yol açmakta, bu da yağların prezervasyonunu sağlamaktadır. Bizim görüşümüz de bu merkezdedir. Esasen asit pikriğin kuvvetli bir protein tespit maddesi olduğu bilinen bir husustur.

Periyodik asitle oksitlenmeyi de kapsayan HUMASON-LUSHBAUGH (7) metodu, lipid granüllerini ender durumlarda ve seyrek bir şekilde meydana çıkarmaktadır. Bu metodla ayrıca mukopolisakkaridler ve açık bir tonda da olsa, glikojen de boyanmaktadır.

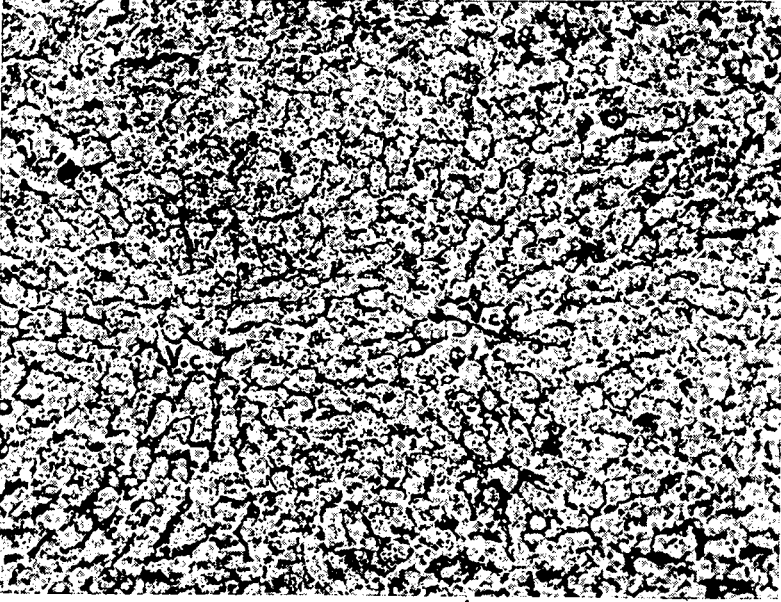
Geliştirdiğimiz metod ise, sadece lipid granüllerini demonstre etmektedir. Metodun tek sakıncası, hemen bütün gümüşleme metodlarında olduğu gibi, retikulin ipliklerini de boyamasındadır. Bu bakımdan metod, bağdokuların ve düz kastellerinin lipid yönünden incelenmelerine pek uygun düşmemektedir.

Literatür

- 1 - **Baker, J.R.** (1946): *The histochemical recognition of lipine.* Quart. J. micr. Sci., 87:441-470.
- 2 - **Breslau, A.M., Gabe, M.** (1962): *Handbuch der Histochemie.* Band II/1. Polysaccharidae. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1962.
- 3 - **Ciaccio, C.** (1909): *Über das Vorkommen von Lecithin in den zellulären Entzündungsprodukten und über besondere lipid-bildende Zellen (Lecithinzellen).* Zentralbl. allg. Path. path. Anat., 20:385-390.
- 4 - **Conti, C., Ricci, P.D., Cavallini, L.** (1955): *Le sostanze lipidiche sudanofile nei diversi stadi del ciclo seminfero del ratto.* Folia Endocrin., 7:171.
- 5 - **Elftman, H.** (1954): *Controlled chromation.* J.Histochem. Cytochem., 2:1-8.
- 6 - **Elftman, H.** (1957): *Phospholipid fixation by dichromate-sublimate.* Stain Technol., 32:29-31.
- 7 - **Humason, G.L., Lushbaugh, C.C.** (1960): *Selective demonstration of elastin, reticulum and collagen by silver, orcein and anilin blue.* Stain Technol., 35:209-214.
- 8 - **Lipp, W.** (1952): *Die Spezifität histologischer Silberimprägnationen.* Z. wiss. Mik., 61:38-43.
- 9 - **Ludwig, K.S.** (1953): *Zur Frage der Spezifität des histologischen Glykogenachweis durch Silbermethoden.* Z. wiss. Mik., 61:321-328.
- 10 - **Mc Manus, F.A.** (1946): *The demonstration of certain fatty substances in paraffin sections.* J.Path. Bact., 58:93-95.
- 11 - **Mitchell, A.J., Wislocki, G.** (1944): *Selective staining of glycogen by ammonical silver nitrate: A new method.* Anat. Rec., 90:261-266.
- 12 - **Pritchard, J.J.** (1949): *A new histochemical method for glycogen.* J. Anat. (Lond.), 83:30-31.

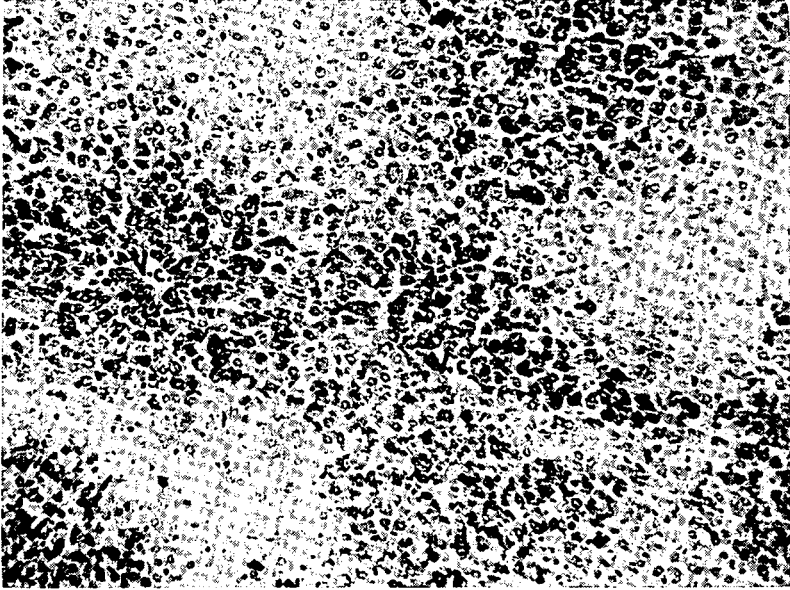
- 13 - **Ricci, P.D.** (1956): *Correlazioni spleno-endocrine. Quadro istologico e disposizione dei lipidi del testicolo del ratto in accrescimento, dopo trattamento con estratti splenici.* Folia Endocrin., 9:409.
- 14 - **Ricci, P.D.** (1957): *L'avantage de la fixation au liquide de Bouin pour la demonstration et l'étude des lipides pancréatiques.* Rev. belg. Path., 26:212-219.
- 15 - **Romeis, B.** (1968): *Mikroskopische Technik.* 16. Auflage, R. Oldenbourg Verlag, München-Wien, 1968.
- 16 - **Spannhof, L.** (1964): *Einführung in die Praxis der Histochemie.* Veb Gustav Fischer Verlag, Jena, 1964.

Yazı, "Dergi Yazı Kuruluna" 3.7.1970 günü gelmiştir.



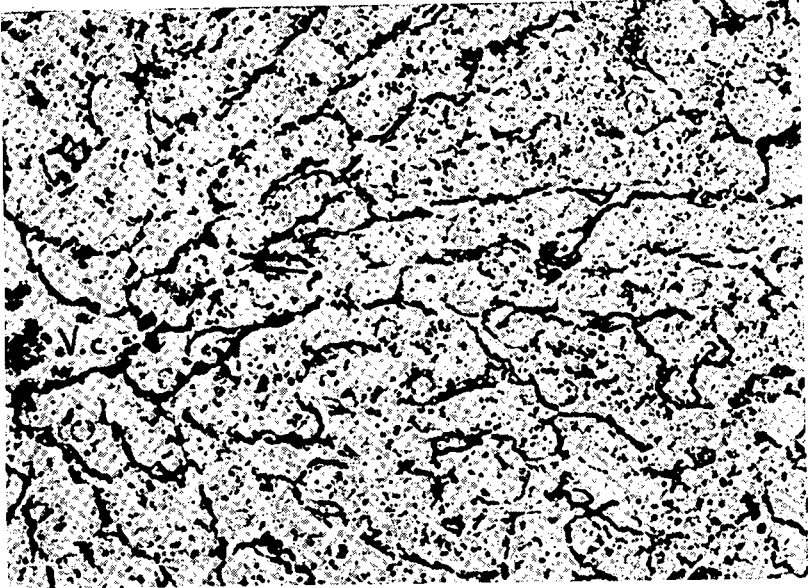
Şekil: 1. Gümüşleme ile beliren lipid granüllerinin karaciğer lopçukları içinde homojen şekilde yayılışı, V.c.=Vena centralis. Kobay, 150X.

Fig. 1. The lipid granules demonstrated by silver nitrate show an evenly distribution in the hepatic lobules, V.c.=central vein. Guinea pig, 150 X.



Şekil: 2. Şekil 1'deki izleyen kesit; Bauer-Feulgen ile glikojen için boyanmış. Glikojene sadece lopçukların iç kısımlarında, V. centralisler (V.c.) etrafında rastlanmakta. 150 X.

Fig. 2. The next section as in fig. 1, stained for glycogen by Bauer-Feulgen. Glycogen is located only at the innermost parts of the lobules, namely around the central veins (V.c.). 150 X.



Şekil 3. Fazla büyütülmüş karaciğer lopçuğundan bir kısım; gümüşlemeden sonra lipid granüllerinin yerleşme durumunu göstermekte, V.c.=Vena centralis. Kobay, 450 X.

Fig. 3. Part of an hepatic lobule in high magnification, showing the distribution of lipid granules after silver impregnation. V.c.=central vein. Guinea-pig,450 X.



Şekil 4. Böbrek korteksinde lipid granüllerinin yerleşme durumu. Pars convoluta proximalis'ler (a) lipid granüllerinden zengin; Pars convoluta distalis'ler (b) ise granül taşıyor. Kedi, gümüşleme, 350 X.

Fig. 4. The localisation of lipid granules at the renal cortex. The proximal convoluted tubules (a) contain much lipid granules. The distal convoluted tubules (b) are devoid of such granules. Cat, silver impregnation, 350 X.