

PANKREASIN FARKLI YAPILARININ BELİRLENMESİNDE UYGUN HİSTOLOJİK BOYAMA YÖNTEMLERİNİN KIYASLI İNCELENMESİ

Sacide Gazilerli*

Cengiz Güven**

Pankreas hem endokrin (iç salgı) hemde ekzokrin (dış salgı) yapan bir bezdir. Pankreasın ekzokrin salgısı sindirimde iş gören enzimlerdir. Bu salgı tübuloalveoler bez yapısındaki ekzokrin son kısımlarda yapıp duodenuma akıtılır. Ekzokrin son kısımlar protein tabiatında salgı sentez eden seröz son kısımların yapısını yansıtır. Böylece son kısım hücreleri apikal bölümlerinde salgı içeriğine bağlı asidofili yanında bazal bölümlerinde ergasitoplazma nedeniyle bazofili gösterirler. Bu özellikleri yönünden hücreler uygun boyama yöntemleriyle incelenebilir. Endokrin pankreas veya Langerhans adacıkları ise başlıca insulin ve glukagon salgılayan çeşitli endokrin hücrelerden yapılmıştır. Böylece endokrin pankreasda glukagonun kaynağı A hücreleri, insülinin kaynağı B hücreleri ve arjirofil granüllü hücreler ile granül içermeyen C hücreleri yer alır (2,5,16). Bu hücrelerin saptanabilmesi amacıyla özel histolojik veya histokimyasal yöntemler uygulanır. Bu amaçla Azan yöntemi eskiden beri Langerhans adacık hücrelerinin saptanmasında kullanılır (2,4,5,12,16). Bu yöntemle endokrin pankreasda 3 tür hücre saptanabilir. Ancak endokrin pankreasda salgı içeriği yönünden farklı endokrin hücrelerin belirlenmesinde her hücre için ayrı özel boyama yöntemleri de uygulanır (1,6,7,8,9,10,13,14,15). Bu çalışmada hem Langerhans adacıklarının farklı endokrin hücrelerini birarada gösterebilmek ve hem de ekzokrin bölümler yanında stromanın da yapısını belirlemek amacıyla çeşitli boyama yöntemleri uygulandı ve birbirleriyle kıyaslanarak en elverişli olanının saptanmasına çalışıldı.

MATERYEL VE YÖNTEM

Materyel olarak cinsiyet ayrımı yapılmadan 200 - 250 gr. ağırlığında 7 adet normal ergin kobay kullanıldı. Hayvanlar eter anestezisiyle birkaç dakikada uyutulup açıldı ve pankreası alındı. Alınan parça'lar önce laboratuvarın alışılmış tesbit solüsyonu % 10 formalin ve ayrıca Bouin (Pikrik asit, formalin, asetik asit) ve

*A. Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Kürsüsü Doçenti

**A. Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Kürsüsü Asistanı

Zenker (asetik asit, merkürük klorid, potasyum dikromat, sodyum sülfat) solüsyonlarında 18-24 saat süre ile tesbit edildi. Deneme preparasyonlarında Bouin solüsyonunun uygulanan özel yöntemlerde daha başarılı sonuçlar verdiği görülerek, çalışmada Bouin tesbit solüsyonu kullanıldı. Parafin blokları yapıldı, bu bloklardan alınan 3-5 mikron kalınlığındaki kesitlere aşağıdaki boya yöntemleri uygulandı.

Pankreasın genel yapısını belirlemek amacıyla laboratuvarın alışılmış boyama yöntemi Hematoxylin-Eosin :

Hem parankima hemde stromanın bazı elemanlarını spesifik boyayarak daha ayrıntılı yapısını göstermek amacıyla Azan (azocarmine, orange G, anilin mavisi) yöntemi;

Özellikle Langerhans adacıklarının farklı endokrin hücrelerini gözleyebilmek amacıyla, Aldehyde fuohsin, ayrıca Aldehyde fuchsin ile birlikte toluidin mavisi veya orange G ve Light Green boyaları kullanılan iki ayrı modifiye şekli;

Endokrin pankreasın arjirofil hücrelerini saptayabilmek amacıyla gümüş impenyasyon yöntemleri uygulandı.

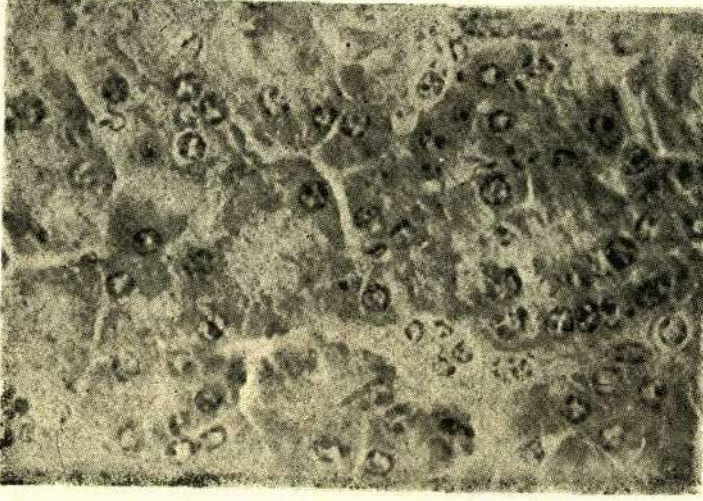
Boyanan preparasyonlar Kanada balsamı ile kapatılıp, Zeiss foto - mikroskopunda gözlenerek mikrofotografları çekildi.

BULGULAR

Laboratuvarın alışılmış boyama yöntemi Hematoxylin - Eosin ile pankreasın yapısı genelde incelenebilmektedir. Bu boyama yöntemi ile stroma ve parankima elemanları ayrılabilenekte, ancak bir asit bir bazik boya içeren bu yöntemle yapının belirlenmesi daha çok hücre tertiplenmesindeki farklılık nedeni ile. Organın gerek stroma gerek parankimasındaki yapı veya içerik farklılığını belirlemek amacıyla çeşitli boya karışımları içeren yöntemler kullanmak gerekmektedir. Bu nedenle çeşitli asit ve bazik boya karışımı olan Azan boyama yöntemi organ-da farklı yapı elemanlarını belirler. Bu yöntemle stromanın bağ dokusu lifleri özellikle kollagen lifer boya karışımındaki anilin mavisi ile mavi renkte izlenebiliyor. Böylece loblar arasındaki genişçe bağ dokusu bölmelerde, boşaltma kanalları ve damarlar çevresinde kollagen lifler belirgin olarak görülebiliyor. Loblar içinde ise son kısımlar ve Langherhans adacıkları çevresinde ancak ince mavi çizgiler şeklinde çok az bağ dokusu lifi seçilebiliyor. Genel olarak bütün hücre nükleusları kromatin içeriğine bağlı olarak ya ince kırmızı granüllü veya kromatini yoğun olan nükleuslarda daha yoğun yapıda kırmızı görülüyor. Bu boyama yöntemi ile parankimanın belirlenen bölümleri ise şöyle :

Egzokrin pankreas asinus hücrelerinin RNA dan zengin bazal sitoplazmaları boya karışımındaki bazik boya anilin mavisi ile mavi renkte izleniyor. Asinitüs hücrelerinin apikal sitoplazma bölümleri hücrelerin fonksiyon durumuna göre ge-

niş veya dar bölümler şeklinde azokarmin ile kırmızı renkte görülüyor. Bazı asinus hücrelerinin apikal bölümleri ise salgılama periyoduna bağlı olarak az boyanıyor veya bazan bir boyanma göstermiyor (Resim 1). Endokrin pankreasın çeşitli hücrelerini belirlemede kullanılan spesifik boya Azan yöntemi ile Langerhans adacıklarında 3 farklı renkte boyanan hücre tipi görülüyor. Bir adacık hücreleri-



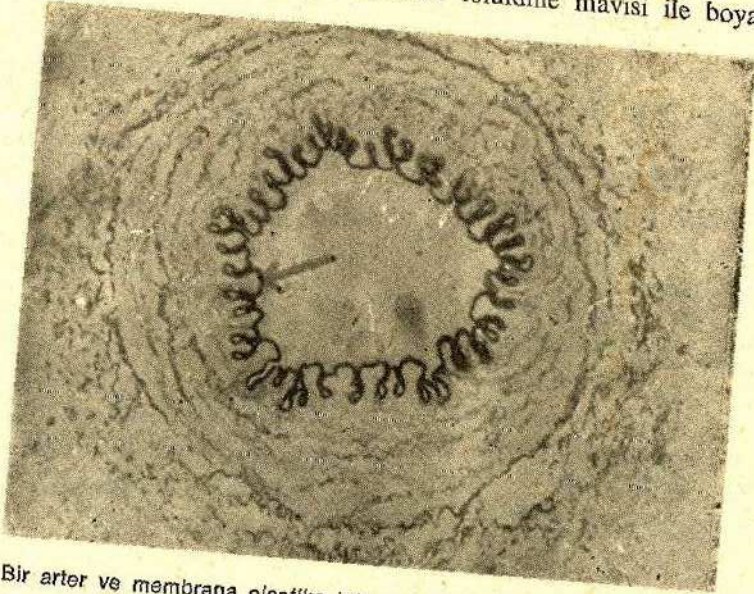
Resim 1 : Pankreasda ekzokrin son kısımlar (asinuslar) ve arada intralobuler boşaltma kanalı (okla işaretli) görülüyor. Azan X 700

nin büyük çoğunluğu (B hücreleri) boya karışımındaki orange G ile sarı portakal rengi boyanan hafif granüller yapıda sitoplazma içeriyor. Bunlar arasında anilin mavisi ile boyanan hafif granüler materyel taşıyan mavi sitoplazmalı daha az hücre (D hücreleri) görülüyor (Resim 2). Bazı Langerhans adacıklarında görülemeyecek kadar az sayıda hücre (A hücreleri) ise Azocarmin ile boyanan sitoplazmik hücre içeriğine bağlı olarak koyu pembe-kırmızı sitoplazmaları ile ayrılabilirler. Son zamanlarda özellikle endokrin pankreasın hücrelerini sitoplazmik içerikleri nedeni ile belirlemekde kullanılan diğer bir boya da aldehide fuchsin'dir. Ancak endokrin pankreasın farklı hücreleri yanında ekzokrin bölümleri ve stroma elemanlarını da belirlemek amacıyla aldehide fuchsin ile birlikte çeşitli asit ve bazik boyalar kullanılır. Biz de bu amaçla preparasyonlarımızda aldehide fuchsin ile birlikte toluidine mavisi veya orange G-light green birleşik boyama yöntemlerini uyguladık. Aldehide fuchsin kullanılan bütün preparasyonlar Langerhans adacıklarının B hücreleri aldehide fuchsin ile boyanarak kırmızı-mor renkte görülüyor. Aynı şekilde stroma elemanlarından bağ dokusunun elastik lifleri de aynı renge boyanıyor. Böylece elastik liflerin yoğunlaşma bölgeleri olan arter du-



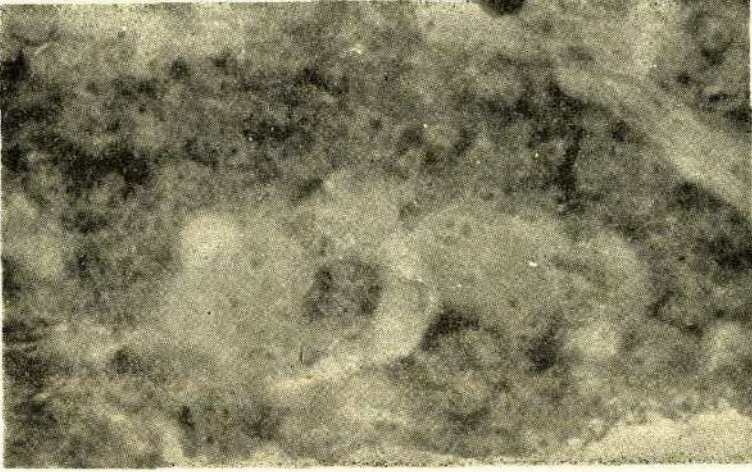
Resim 2 : Langerhans adacığında B ve D (okla işaretli) hücreleri. Azan X 700

varlarının membrana elastika internaları küçük büyültmelerle bile dikkati çekecek kadar belirgin görülüyor (Resim 3). Aldehyde fuchsin ile birlikte bazik boya toluidine mavisi kullanılan yöntemde ise endokrin pankreasın kırmızı - mor sitoplazmalı B hücreleri yanında diğer hücreler toluidine mavisi ile boyanarak açık



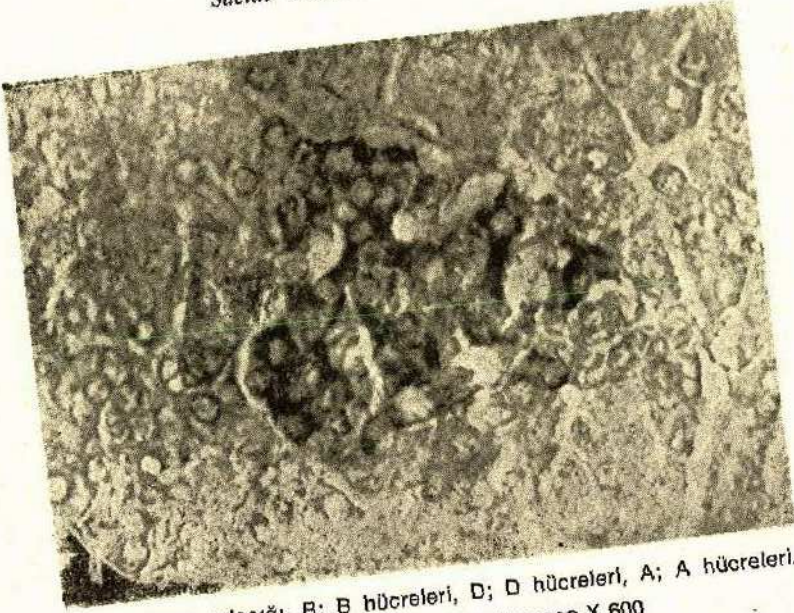
Resim 3 : Bir arter ve membrana elastika internaları (okla işaretli). Aldehyde-fuchsin X 250

mavi renkte izleniyorlar (Resim 4). Bu yöntemle stromanın mastositleri de toluidine mavisi ile spesifik olarak boyanıyor. Boşaltma kanalları ve damarlar çevresindeki interlobular alanlarda bu hücreler bazik boya toluidine mavisi ile metakromatik boyanan granüllü sitoplazmaları ile belirgin olarak ayrılabilir. Ekzok-



Resim 4 : Langerhans adacığı. Koyu renk ve fazla sayıda olanlar B hücreleri, açık renk ve iri görülenler A veya D hücreleri olabilir. Aldehyde-fuchsin ve toluidin mavisi X 800

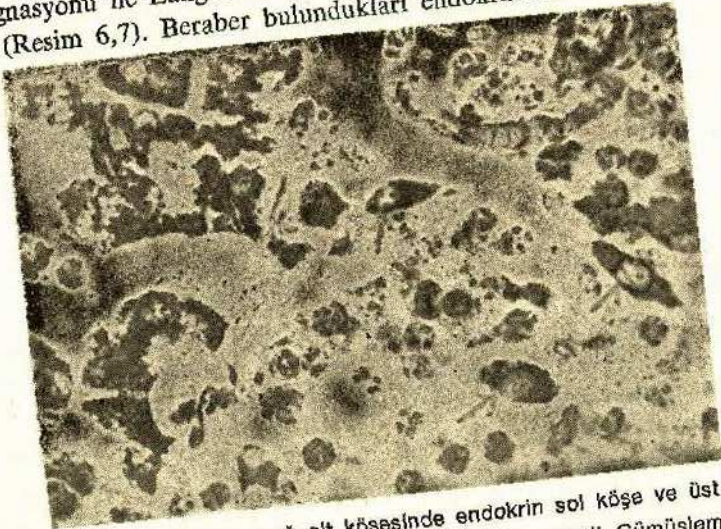
rin pankreasın asinüs hücreleri ise bu yöntemle bazal sitoplazmaları RNA içeriğine bağlı olarak bazik boya toluidine mavisi ile mavi boyanırken apikal bölümleri az veya çok oranda salgı içeriğine bağlı olarak pembe renkte ve hafif granüler yapıda görülüyor. Aldehyde fuchsin ile birlikte orange G-Light Green kullanılan modifiye yöntem ile bağ dokusunun elastik lifleri aldehyde fuchsin ile kırmızı - mor, diğerleri Light Green ile yeşil, bütün hücre nükleusları orange G ile portakal renginde izleniyor. Bu yöntem ile Langerhans adacıklarında fuchsin ile kırmızı - mor boyanan hücreler (B hücreleri) çoğunluğu oluştururken daha az oranla portakal rengi nükleuslu ve Light Green ile yeşil boyanan sitoplazmalarıyla iri poligonal veya üçgenimsi yapıda hücreler belirleniyor. Bunlar D hücre'leri olmalı. Her adacıkta saptanamıyan çok az sayıda hücre ise sarı renkte sitoplazmalı ve çoğunlukla uzunca veya mekik biçimi hücreler şeklinde beliriyor. Bunlar ise A hücreleri olmalı (Resim 5). Bu yöntemle ekzokrin pankreasın asinus hücrelerinin bazal sitoplazmaları morumsu boyanırken apikal sitoplazmaları büyük büyütmelerle belirgin, portakal rengi granüller içeriyor. Aldehyde fuchsin ile toluidine mavisi kullanılan modifiye yöntemde endokrin pankreasta farklı renkte sitoplazmik granül içeren iki hücre türü belirmesine karşın, aldehyde fuchsin yanında orange G ve Light Green kullanılan modifiye yöntemde ise Lan-



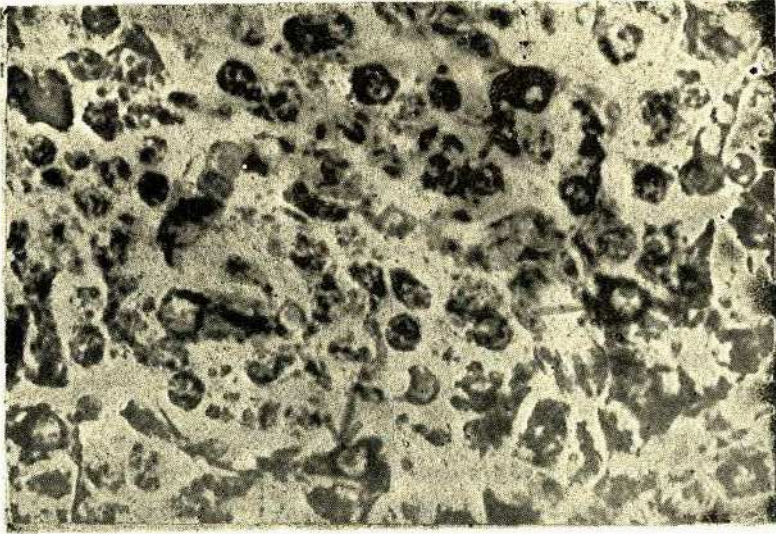
Resim 5 : Langerhans adacığı. B; B hücreleri, D; D hücreleri, A; A hücreleri. Aldehyde-fuchsin, Orange G ve Light green X 600

gerhans adacıklarının farklı renkte granül içerikleriyle 3 tür hücrelerini ayırabilmek olanağı doğuyor.

Endokrin pankreasın arjirofil hücrelerini belirlemek amacıyla kullanılan gümüş impregnasyonu ile Langerhans adacıklarında üçgen veya iğ biçimi hücreler görülüyor. (Resim 6,7). Beraber bulundukları endokrin hücrelerin sitoplazmaları



Resim 6 : Pankreas. Resmin sağ alt köşesinde endokrin sol köşe ve üst kısımlarında ekzokrin bölümler görülüyor. Arjirofil hücreler okla işaretli. Gümüşleme X 800



Resim 7 : Langerhans adacığında arjirofil hücreler (okla işaretli). Gümüşleme X 800

granülsüz görülmesine karşın, bu hücreler koyu siyah boyanan iri sitoplazmik granülleri ile saptanabiliyorlar. Bu yöntemle ekzokrin pankreasın asinus hücreleri ise bazal bölümlerinde siyah renkte görülürken apikal sitoplazmaları spesifik olmayan şekilde sarı renkte izleniyor.

Langerhans adacıklarında her tür boyama yöntemiyle sitoplazması boyanamıyan veya salgı niteliğini belirleyen granül içermeyen hücreler çok seyrek olarak görüldü. Bunlar C hücreleri olmalı.

TARTIŞMA

Bilindiği gibi pankreas, endokrin (içsalgı) ve ekzokrin (dış salgı) salgı yapan iki farklı yapı içermektedir. Salgı içerikleri nedeniyle dış salgı yapan hücreler asit boyalarla gösterilebilirler. Ayrıca bu hücreler ergastoplazma içerikleri nedeniyle bazik boyalarla da ışık mikroskopik düzeyde gözlenebilirler (2,5,16). Pankreasın endokrin kısımlarındaki (Langerhans adacıkları) hücrelerin gösterilmesi ise asit ve bazik boya karışımlarını içeren boya yöntemleri ile sağlanabilir (2,4,5,12,16).

Endokrin hücrelerin içerdikleri salgı granüllerinin korunabilmesi için seçilecek tesbit sıvısının (fikzator) önemi büyüktür. Farklı araştırmacılar tarafından bu amaçla önerilenler Bouin (1,6,9,10,14,15), Halmi (4), Susa (9) veya Zenker (2, 9,13) gibi asit veya ağır metal tuzları içeren tesbit sıvılarıdır. Gabe'a (4) göre potasyum bikromatlı sıvılar her şartta başarılı sonuçlar vermektedir. Bizde laboratuvarın alışılmış tesbit sıvısı formalin yanında Bouin (11) ve Zenker (4) tesbit

sıvılarını denedik. Bouin sıvısının yapılan çeşitli boyama yöntemleri için daha uygun olduğunu gördük. Laboratuvarın alışılmış boyama yöntemi Hematoxilin-Eosin ile pankreasda parankima ve stroma elemanları ayrılabilir. Bu yöntemle ekzokrin son kısımlar arasında, açık renk boyanan ve kapillerler çevresinde kümelenen hücre toplulukları şeklinde endokrin bölümler (Langerhans adacıkları) görülür. Ancak Hematoxilin-Eosin boyası ile endokrin pankreasda bulunan salgı ve buna bağlı olarak içerik yönünden farklı hücreler belirlenemez. Farklı salgı maddeleri oluşturan değişik tipdeki bu hücrelerin ayrılabilmesinde genellikle Azan boyama yöntemi kullanılmaktadır (2,5,16). Bu yöntemle endokrin pankreasda içerdikleri salgı granüllerinin boyanmasına göre 3 tür hücre saptanabilir. Bunlar orange G ile sarıturuncu boyanan B hücreleri Azocarmin ile kırmızı boyanan A hücreleri ve anilin mavisi ile mavi boyanan D hücreleridir.

Endokrin pankreasın farklı salgı hücrelerini belirlemek amacıyla son yıllarda Aldehyde fuchsin boyama yönteminde önerilmektedir (1,6,9,11,13,15,16). Ancak Aldehyde fuchsin Langerhans adacıklarında sadece B hücrelerini özel olarak belirler. Endokrin pankreasda B hücreleri yanında diğer endokrin hücrelerin de saptanabilmesi amacıyla Aldehyde-fuchsin ile toluidin mavisi (9) veya trikrom (1,6,13) boya karışımlarını kullanmak gerekir. Biz de uyguladığımız benzer yöntemlerle aldehyde-fuchsin ve toluidin mavisi ile endokrin pankreasda B hücrelerini mor bunun yanında diğer bütün hücreleri mavi boyanmış olarak izledik. Gözlemlerimize göre Langerhans adacıklarında farklı hücre tiplerini ayırmakta aldehyde-fuchsin ile uygulanan toluidin mavisi B hücreleri dışında farklı hücre belirlemediği için kanımızca bütün endokrin hücrelerin saptanmasında uygun bir yöntem değildir. Gabe (4) asit hidrolizini izleyen toluidin mavisi ile boyamada D hücrelerinin koyu kırmızı geçici bir metakromazi verdiğini belirtmektedir. Ancak bu metakromatik boyanma geçici olduğu için D hücreleri uzun süre gözlenemez ve devamlı preparasyonlarda kanımızca yararlı olamaz.

Aldehyde-fuchsin, orange G ve light green boya karışımıyla hazırlanan preparatlarımızda B hücreleri mor (1,6,9,13,15), D hücreleri yeşil (3,11,15) ve A hücreleri sarı - portakal rengine yeterli kontrastta ayrılabilmekteydi. Kanımızca bu yöntem endokrin pankreasda farklı hücre türlerini ayırmakta toluidin mavisi ve aldehyde-fuchsin yöntemine oranla daha uygundur.

Endokrin pankreasda uygun birleşik boyama yöntemleriyle çeşitli hücreler bir arada belirlenebildiği gibi yalnız tek tür hücre veya salgı materyelini saptayabilmeyi amaçlayan boyama yöntemleri de kullanılır. Aldehyde-fuchsin, insülin salgılayan B hücrelerinin (1,6,9,13,15,16), gümüş tuzları veya arjirofil reaksiyonda A ve D hücrelerinin (7,8,14) özel boyalarıdır. Biz de aldehyde - fuchsin ile B hücrelerini Langerhans adacıklarında belirgin olarak izledik. Ancak gümüş tuzlarıyla belirlenen az sayıdaki arjirofil granüllü hücreler A veya D hücreleri ola-

bilir (6,15). Bazılarına göre ise A ve D hücreleri farklı büyüklükte aynı yapıda iki granül içeriğinden biri veya öbürünün belirlediği hücre şekilleridir. Bu hücreler birbirlerine dönüşebilirler (2,11), veya A hücreleri gümüş tuzlarını redükte eden veya etmeyen granüle sahip iki türde olabilirler (4,6). Biz de ışık mikroskopik düzeyde gümüş tuzlarını redükte eden granül içeren hücreleri saptadık, ancak bu hücreler A veya D hücreleri olabilirler.

Her boyama yönteminde sitoplazması boyanabilen granül içermediği için boyanmayan veya spesifik olmayan şekilde açık renk görülen hücreler C hücreleri olmalı (2,5,16).

Uyguladığımız yöntemlerden endokrin pankreasda B hücreleri aldehide-fuchsin veya A ve D hücreleri gümüş tuzlarıyla özel olarak boyanabilirler. Ancak farklı endokrin hücrelerin bir arada belirlenmesinde aldehide-fuchsin, orange G ve light green yöntemi, eskiden beri kullanılan Azan yöntemi kadar başarılı olabilir. Ayrıca bu yöntemle ekzokrin bölümler veya stromanın bazı yapıları da ayrı renk veya belirgin kontrastta açıkça izlenebilmektedir.

ÖZET

Bu çalışmada pankreasda endokrin ve ekzokrin parankima ile stromanın yapısını belirlemek amacıyla çeşitli histolojik boyama yöntemleri denendi. Laboratuvarın alışılmış yöntemi hematoxylin - eosin ile endokrin pankreasın alışılmış boyama yöntemi azan yanında çeşitli özel boyama yöntemleri uygulandı. Uygulanan bu yöntemlerden aldehide-fuchsin'in B hücrelerini, gümüş tuzlarının ise A veya D hücrelerini özel olarak belirlemesi yanında, aldehide - fuchsin, orange G ve light green boya karışımının endokrin pankreasda farklı renkte üç tür hücre ile ekzokrin bölümlerde ve stromada da farklı yapıları saptamaya uygun bir boyama yöntemi olduğu görüldü.

SUMMARY

The Comparative Study of Useful Staining Procedures for Demonstration of Different Structures of Pancreas

In this study various histological staining methods were examined for the demonstration of endocrine and exocrine parenchymal and stromal structure of pancreas. In addition to the rutin Hematoxylin - Eosin staining procedures of laboratory and habitual Azan staining procedure of endocrine pancreas, various special staining techniques were applied. From these aldehide - fuchsin showed B cells and argentum salts showed A or D cells specially. But aldehide - fuchsin, orange G and light green mixed staining procedures, showed 3 types of cells with distinct colors in endocrine pancreas and demonstrated different structures in exocrine parts and stroma.

KAYNAKLAR

1. Björkman N, Hellerström C, Hellman B, Peterson B : The Cel types in the endocrine pancreas of the human fetus, *Z. Zellforsch* 72 : 425, 1966
2. Bloom W, Fawcett DW : A textbook of histology, 10. ed. 1975, W.B. Saunders Com. Philadelphia, London, Toronto.
3. Drury RAB, Wallington EA, Cameron SR : Carleton's histological technique, 4. ed. 1967, Oxford University Press, NY-Toronto
4. Gabe M . Histological techniques, 1976, Masson Springer Verlag Paris - NY - Barcelona.
5. Ham AW : Histology, 6. ed. 1969, J.B. Lippincott Com. Philadelphia - Toronto.
6. Hellerström C, Asplund K : The two types of A cells in the pancreatic islets of snakes, *Z Zellforsch* 70 : 68, 1966.
7. Hellman B, Hellerstrom C : The islets of Langerhans in ducks and chickens with special reference to the argyrophil reaction, *Z Zellfor* 52 : 278, 1960.
8. Hellman B, Hellerström C : The specificity of the argyrophil reaction in the islets of Langerhans in man, *Acta Endocr* 36 : 22, 1961.
9. Kallman J : Aldehyde-fuchsin followed by toluidine blue O for pancreatic islet cells, *Stain Tech* 46 : 210, 1971.
10. Levene C, Feng P : Critical staining of pancreatic alpha granules with phosphotungstic acid hematoxylin, *Stain Tech* 39 : 39, 1964.
11. Like AA : The ultrastructure of the secretory cells of the islets of Langerhans in man. *Lab Invest* 16 : 937, 1967.
12. Lillie RD : Histopathologic technique and practical histochemistry, 3. ed. 1965, Mc Hraw Hill Com. N Y - Toronto - Sydney - London :
13. Paget GE : Aldehyde - thionin : A stain having similar properties to aldehyde-fuchsin, *Stain Tech* 34 : 223, 1959.
14. Pascual JSF : A new method for easy demonstration of argyrophil cells, *Stain Tech* 51 : 231, 1976.
15. Schweisthal MR, Frost CC, Brinn JE : Stains for A, B, D cells in fetal rat islets, *Stain Tech* 50 : 161, 1975.
16. Wood RL, Kell DE, Copenhaver WM : Bailey's textbook of histology, 17. ed. 1978. Williams and Wilkins Com. Baltimore