

## Orijinal Araştırma

**Doku ve Hücre Bütünlüğünün Korunması Açısından Üç Farklı Dekalsifikasyon Yönteminin Karşılaştırması****Comparison of Three Different Decalcification Methods in Terms of Preservation of Tissue and Cell Integrity****Semir Gül, Mehmet Gül, Birgül Yiğitcan, Salih Yahya Aksanyar**

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye

**Özet**

Kemik dekalsifikasyonu, kemik dokusunun histolojik incelenmesi için en önemli adımlardan biridir. Geleneksel yöntemlerde, dekalsifikasyon işlemi için farklı zayıf asitler uygulanır. Bu asitler doku içindeki hücresel yapıların organizasyonunu olumsuz etkilediğinden doku bütünlüğünü korumak için yeni yöntemler uygulanmaktadır. Bu çalışmada, kemik dekalsifikasyonunda yaygın olarak kullanılan %5 formik asit, asit içerikli RDO çözeltisi ve elektroliz dekalsifikatör sistemi (EDS) olmak üzere üç farklı kemik dekalsifikasyon yöntemini karşılaştırmayı amaçladık. Bulgularımız formik asit ile dekalsifikasyon sonucu doku ve hücre düzeyinde histomorfolojik ve immünohistokimyasal mikroskopik veri kaybının daha fazla olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, RDO ve EDS yöntemleri ile dekalsifiye edilen kemik kesitlerinde, HE ve trikrom boyamalarda ve immünreaktivite açısından histomorfolojik ve immünohistokimyasal verilerin daha kaliteli olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, kemik dekalsifikasyonunda uzun süreli asit inkübasyonunun doku bütünlüğünü, hücre içi yapıları ve antijenik molekülleri bozarak görüntü kalitesini düşürdüğünü göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Dekalsifikasyon, Kemik, Mikroskopi, İmmünohistokimya.**Abstract**

Bone decalcification is one of the most important steps for histological examination of bone tissue. In conventional methods, different weak acids are applied for decalcification. As these acids adversely affect the organization of cellular structures within the tissue, new methods are applied to preserve tissue integrity. In this study, we aimed to compare three different bone decalcification methods, 5% formic acid, acid-containing RDO solution and electrolysis decalcifier system (EDS), which are widely used in bone decalcification. Our findings showed that decalcification with formic acid resulted in more loss of histomorphological and immunohistochemical microscopic data at the tissue and cell level. However, histomorphologic and immunohistochemical data were found to be better in RDO and EDS groups. These results demonstrate that long-term acid incubation during bone decalcification degrades tissue integrity, intracellular structures, and degrades antigenic molecules.

**Keywords:** Decalcification, Bone, Microscopy, Immunohistochemistry.**Giriş**

Kemik ve kemik içeren numunelerin histolojik olarak çalışılması zordur. Sert doku (kemik) ile yumuşak dokunun (kemik iliği, yağ veya neoplastik doku) birbirine giriftliği nedeniyle kemik iliği biyopsisi numunelerinden, kemik tümörü numunelerinden histopatolojik kesitler hazırlanması sürecinde bazı sorunlar ortaya çıkmaktadır (1). Kemik dekalsifikasyonu, klinik patoloji, veteriner patoloji ve histoloji araştırma laboratuvarlarında kemik dokudaki kalsiyum iyonlarının uzaklaştırılması ve böylece kemiğin patolojik inceleme için kolay kesilebilir sertliğe getirilmesi sürecidir (2). Zaman alıcı bir süreç olması nedeniyle, özellikle klinik uygulamalarda doğru teşhis için yapısal ve hücresel bozulma olmaksızın kısa sürede kemik dokusunun dekalsifikasyonu çok önemlidir. Dekalsifikasyon için formik asit ve hidroklorik asit veya EDTA gibi farklı asitler kullanılmaktadır (1, 3, 4).

Yıllar boyunca dekalsifikasyon yöntemlerinde

güçlü mineral asitler, zayıf organik asitler, iyon değiştirici reçineler ve elektrolitik cihazlar kullanılmıştır. Bu yöntemlerin birçoğu günümüzde ilk tanımlandığı haliyle uygulanmaktadır (2, 5). Son yıllarda, araştırmacılar dekalsifikasyon işlemi için özel hazırlanmış dekalsifikatör çözeltileri veya elektrolitik dekalsifikasyon sistemleri kullanmaktadırlar (2, 5). Uygulanan her bir metot histomorfolojik ve immünohistokimyasal incelemeler açısından farklı kalitede sonuçlar sağlamaktadır. Yaptığımız bu çalışmada, sıçan femur dokusuna ait kesitlerde histomorfolojik ve immünohistokimyasal mikroskopik görüntü kalitesi, doku ve hücresel bütünlüğün korunması açısından üç farklı dekalsifikasyon yöntemi, (%10 formik asit (FA), asit bazlı ajan RDO (RDO) (EMS, ABD) ve Sakura TDE dekalsifikasyon solüsyonu (ref 1428) içeren Elektroliz Dekalsifikatör Sistemi (EDS) (SAKURA TDE™ 30, Hollanda) karşılaştırılmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmada başka bir çalışmanın kontrol grubunda yer alan 6 adet, sağlıklı, erkek Wistar Albino sıçana (200-220 g) ait femur kemikleri kullanıldı. Ketamin/xylazine anestezi altında dekapite edilmiş ve esas çalışmanın doku örnekleri alındıktan sonra çıkarılan femur kemiklerinden üç farklı dekalsifikasyon yöntemi için transvers düzlemde ayrı ayrı 5 mm kalınlıkta parçalar alındı. Kemik dokuları oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde 36 saat süreyle %10'luk formaldehit içinde tespit edildi. Fiksasyondan sonra, formik asit dekalsifikasyonu için kemik parçalar haftalık yenilenen 250 ml, %5'lik formik asit solüsyonuna konularak 6 hafta boyunca formik asitte bekletildi. RDO dekalsifikasyonu için kemik parçalar 250 ml RDO solüsyonunda 5 saat süre ile bekletildi. EDS dekalsifikasyonu için kemik parçaları 250 ml Sakura TDE dekalsifikasyon solüsyonu (ref 1428) içeren elektroliz dekalsifikatör sistemi ile 3 saat süreyle dekalsifikasyona tabi tutuldu.

Dekalsifikasyon işlemleri tamamlandıktan sonra, kemik dokuları etanol ile dehidratasyon, ksilen ile şeffaflandırma ve 62°C'de erimiş parafin infiltrasyonu basamaklarını içeren rutin histolojik doku takip işleminden geçirildi. Daha sonra kemik parçaları parafin bloklara gömüldü ve parafin bloklardan mikrotom ile 6 µm kalınlığında kesitler alındı. Elde edilen kesitler için Hematoksilin-Eozin (HE) ve Gomori trikrom boyamaları uygulandı.

İmmunohistokimyasal analiz kalitesini değerlendirmek için osteopontin (OPN, LFMb-14) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) ve

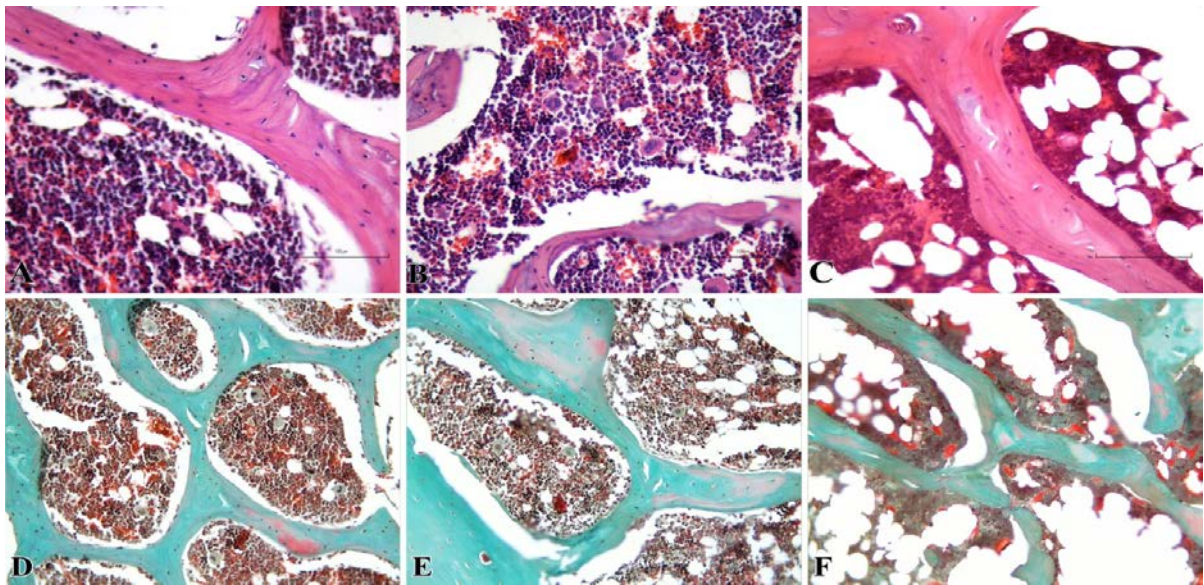
osteokalsin (OC, FL-100) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) antikorları uygulandı. Kesitler Leica DFC 280 ışık mikroskobu ve Leica QWin Plus görüntü analiz sistemi (Leica Micros Imaging Solutions Ltd. Cambridge, UK) kullanılarak incelendi. İmmunohistokimyasal uygulama yapılan kesitlerde immumreaktivite pozitifliği H skoru belirlendi (6).

## Bulgular

### Histokimyasal Analiz

RDO ve EDS gruplarında, kemik dokusu hücreleri, periosteum, endosteum ve bağ dokusu boyanma özellikleri normal histolojik görünümdeydi. Her iki grupta da, kemik iliği hematopoietik hücreleri iyi kontrastlı ve normal heterokromatik özellikte gözlemlendi (Şekil 1A, B). RDO grubunda, EDS grubu ile karşılaştırıldığında kemik iliği hücrelerinde yer yer heterokromatik boyanma artışı izlendi (Şekil 1A). Formik asit grubunda, kemik iliği hücrelerinde nükleer kromatoliz görüntüsü yaygındı. Kesitlerdeki hücrelerin boyanma kontrastı RDO ve EDS gruplarına göre zayıftı. Formik asit grubunda kemik hücresel alanlarında büzüşme etkisi belirgindi. Tüm kesit alanlarında özellikle hematopoietik doku alanlarında zayıf kontrast görüntüsü dikkati çekti (Şekil 1C).

Trikrom boyaması sonucunda, kemiklerin bağ doku komponentlerinin RDO ve EDS gruplarında en iyi şekilde boyanmış olduğu saptandı. Bununla birlikte, nükleer boyanma ve lakünalar RDO grubunda EDS grubuna göre daha belirgindi (Şekil 1D, E). Formik asit grubunda, lakünalar ve osteositler tam olarak belirgin değildi (Şekil 1F).

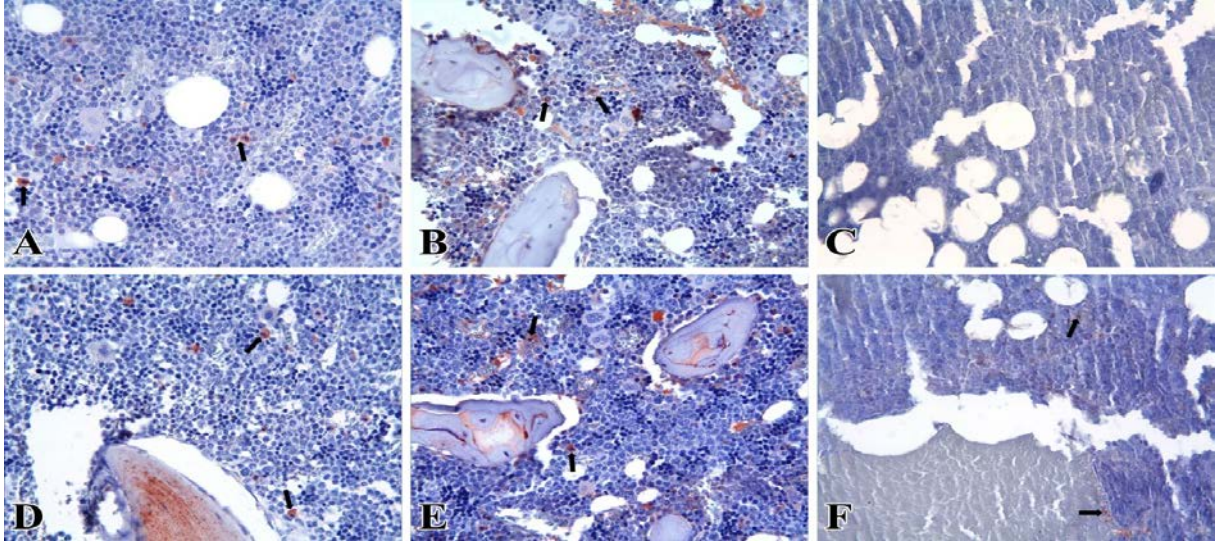


Şekil 1. HE ve Gomori's trikrom boyanması. A) RDO grubu, HE, x40. B) EDS grubu, HE, x40. C) FA grubu, HE, x40. D) RDO grubu, Trk, x20. E) EDS grubu, Trk, x20. F) FA grubu, Trk, x20.

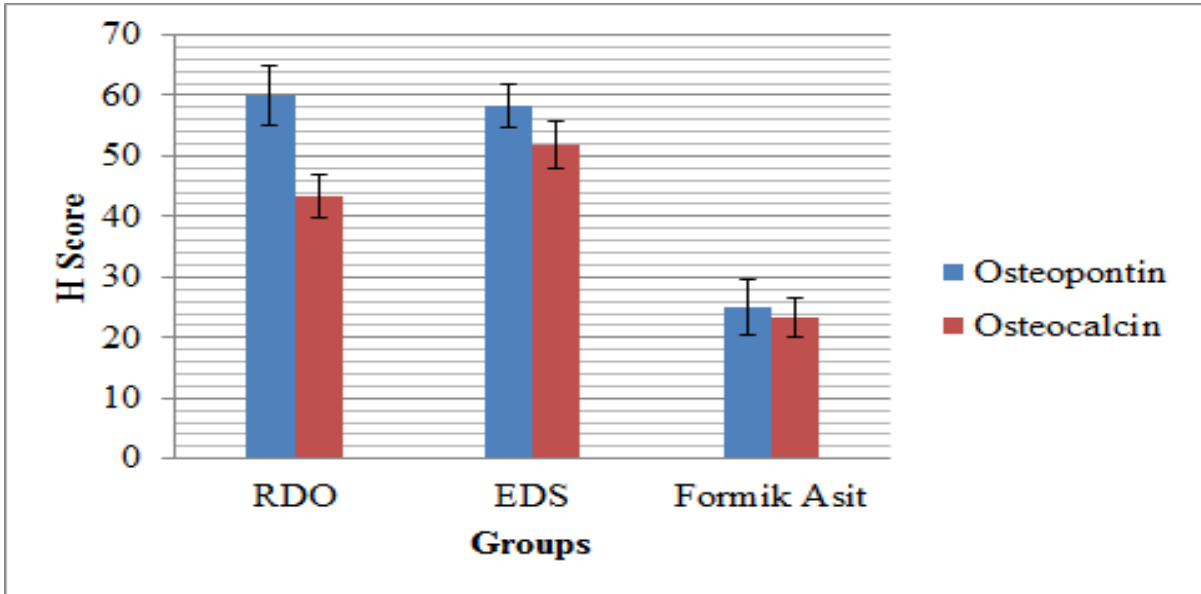
### İmmünohistokimyasal Analiz

RDO ve EDS gruplarında OPN ve OCN için immünreaktivite pozitifliği benzer şekilde belirgin olarak izlenirken (Şekil 2A, B, D,E), formik asit grubunda her iki antikor için de immünreaktivite oldukça zayıf düzeyde izlendi. (Şekil 2C, F). RDO ve EDS gruplarının H skorları OPN için sırasıyla 60.0

$\pm 4,8$  ve  $58,3 \pm 3,7$  olmak üzere birbirine benzerdi ve formik asit grubundan ( $25,0 \pm 4,6$ ) anlamlı derecede yüksekti ( $p<0,05$ ). Benzer şekilde RDO ve EDS grubunun OCN için H skoru birbirine yakın (sırasıyla  $43,3 \pm 3,6$  ve  $51,7 \pm 3,9$ ) ve formik asit grubundan ( $23,3 \pm 3,3$ ) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ( $p<0,05$ ) (Şekil 3).



Şekil 2. OPN ve OCN için immünohistokimyasal boyanma. A) RDO grubu, OPN, x40. B) EDS grubu, OPN, x40. C) FA, OPN, x40. D) RDO grubu, OCN, x40. E) EDS grubu, OCN, x40. F) FA grubu, OCN, x40. Oklar: immünpozitif hücreler.



Şekil 3. Gruplar arasında OPN ve OCN'nin immünreaktivitesinin H skor analizi. OPN: RDO için  $60,0 \pm 4,8$ ; EDS için  $58,3 \pm 3,7$ ; Formik asit için  $25,0 \pm 4,6$ . OCN: RDN için  $43,3 \pm 3,6$ ; EDS için  $51,7 \pm 3,9$ ; Formik asit için  $23,3 \pm 3,3$  ( $p<0,05$ ).

### Tartışma

Kemik dekalsifikasyonu, sert dokuyu yumuşatmak için kemikten inorganik bileşenlerin çıkarılması amacıyla uygulanır (2). Bu uygulama, dekalsifikasyon için kullanılan asitlerin hücresel yapıların bozulmasına neden olması nedeniyle hücresel bütünlüğün korunması

açısından çok önemli bir adımdır. Doku örneklerini tespit etme ve dekalsifikasyon işlemi sırasında doku içerisinde enzimlerin, antijenlerin, hücresel ultrastrüktürlerin ve hücrelerin proteoglikan içeriğinin korunması için doku parçalarını mümkün olduğunca küçük tutmak gerekir, ancak bu her zaman mümkün değildir (2).

Bu nedenle, son yıllarda birçok farklı dekalsifikasyon yöntemi uygulanmaktadır. Bu çalışmamızda, formaldehit ile tespit edilmiş kemik örneklerini, yaygın olarak kullanılan formik asit, asit-içerikli dekalsifikasyon çözeltisi ve elektroliz yöntemleri ile dekalsifiye ederek, histomorfometrik ve immünohistokimyasal verilerin kalitesi açısından karşılaştırdık.

Literatürde kemik dokuda dekalsifikasyon yöntemlerinin karşılaştırılması amacıyla yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Ippolito ve ark. dekalsifikasyon için nötr ve tamponsuz EDTA, formik asit, nitrik asit, sülfosalisilik asit ve özel HCl çözeltisi kullanarak kıkırdak dokusunu dekalsifiye edip, alcian mavisi ile boyamışlardır (7). Bu grup, çalışmalarında daha hızlı dekalsifikasyon için ve minimum proteoglikanın kaybı için %5 formik asit uygulamasını tercih etmişlerdir (2, 7). Benzer şekilde, %5'lik formik asit çözeltisi, Decalcifier II (Surgipath Europe Ltd. Peterborough, İngiltere) ve Boidec-R (Bio-Optica Milano, İtalya) çözeltilerini karşılaştırdığımız bir önceki çalışmamızda, formik asit uygulamasının kemik dokusunun doğal histolojik yapısını diğer gruplara göre en iyi koruduğunu ve beklenen boyanma özelliklerini belirgin şekilde sağladığını tespit ettik. Diğer iki uygulamanın ise formik asite kıyasla hücre ve doku özelliklerini daha az koruyabildikleri ve boyama özellikleri açısından birbirlerine benzer oldukları görüldü (8).

Formik asit uygulaması uzun zaman aldığından, hem deneysel çalışmalar için hem de klinik araştırmalar için dezavantajlı olmaktadır. Bu nedenle bu çalışmamızda kısa sürede dekalsifikasyon sağlayan yöntemlerle formik asit uygulamasını karşılaştırdık. Mevcut çalışmada, dekalsifikasyon için formik asit inkübasyonunun, uzun süre asit maruziyetinden dolayı RDO ve EDS yöntemine göre mikroskopik görüntülerde veri kaybı ve kalite düşüklüğüne neden olduğunu tespit ettik. RDO ve EDS yöntemleri kullanılarak dekalsifiye edilen kemik kesitlerinin mikroskopik incelemesinde doku ve hücre düzeyinde sitolojik ve histolojik yapıların daha iyi korunduğu ve mikroskopik görüntü kalitesinin daha iyi olduğu belirlendi. Athanasou ve ark. tarafından yapılan çalışmada uzun süre asit maruziyetinin immünreaktiviteyi engellediği belirtilmiştir (9). Çalışmamızda da immünohistokimyasal olarak uygulanan OPN ve

OCN antikorları için formik asit grubunda çok düşük immünreaktivite izlenirken RDO ve EDS gruplarında aynı antikorlar için immünreaktivite pozitifliğinin formik asit grubuna göre belirgin şekilde yüksek olduğu görüldü. Bu durum RDO ve EDS ile dekalsifikasyonun doku ve hücrelerdeki antijenik yapıların korunmasında formik asit ile dekalsifikasyon yöntemindekinden daha etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca RDO ve EDS yöntemleri ile dekalsifikasyonu formik asit ile dekalasifikasyona göre çok daha kısa sürede yapılabilmesi özellikle histopatolojik tanı hızı açısından RDO ve EDS yöntemlerini daha kullanışlı hale getirmektedir.

### **Sonuç**

Kemik dokusunun kısa sürede işlenebilir hale getirilmesi ve bu süreçte gerek klinik tanı için gerekse de deneysel araştırmalar için önemli olan hücre zarı, sitoplazma, hücre iskeleti, nükleus gibi hücre yapısının ve enzim, protein, DNA gibi hücre içi moleküllerin korunması klinisyenler ve araştırmacılar için önemini korumaktadır. Yaptığımız çalışmanın sonuçlarına göre, RDO ve EDS uygulamasının hem bahsedilen yapı ve molekülleri daha iyi korumaları hem de önemli derecede zaman kazandırması nedeniyle bu iki yöntem uzun süreli formik asit uygulamasına tercih edilebilir.

### **Kaynaklar**

1. Janneke CA, Pieter-Jaap K, Kees JV, Herman D. Effect of Bone Decalcification Procedures on DNA In Situ Hybridization and Comparative Genomic Hybridization: EDTA Is Highly Preferable to a Routinely Used Acid Decalcifier. *J Histochem Cytochem* 1999; 47(5): 703-09.
2. Gayle C, Diane S. Decalcification of Bone: Literature Review and Practical Study of Various Decalcifying Agents. Methods, and Their Effects on Bone Histology. *J Histotech* 1998; 21(1): 49-58.
3. Arber JM, Weiss LM, Chang KL, Battifora H, Arber DA. The effect of decalcification on in situ hybridization. *Mod Pathol* 1997; 10: 1009-14.
4. Kabasawa Y, Ejiri S, Matsuki Y, Hara K, Ozawa H. Immünoreactive localization of transforming growth factor beta type II receptor-positive cells in rat tibiae. *Bone* 1998; 22: 93-8.
5. Lillie RD, Fuller HM. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry I*; 4th ed. NY: McCraw-Hill Book Company 1960; 787-807.
6. Ishibashi H, Suzuki T et al. Sex steroid hormone receptors in human thymoma. *J Clin Endocrinol*

Metab 2003; 88(5): 2309-17.

7. Ippolito E, LaVelle S, Pedrini V. The effect of various decalcifying agents on cartilage proteoglycans. Stairz Techriol 1981; 56: 367-73.
8. Gül M, Bayat N, Gül S, Hüz M, Yıldız A, Otlu A. A Comparison of Three Different Agents of Decalcification for a Histological Examination of Bone Tissues. J Turgut Ozal Med Cent 2014; 21(4): 274-9.
9. Athanasou NA, Quinn J, Heryet A, Woods CG, Gee Mc J. Effect of decalcification agents on

immünoreactivity of cellular antigens. J Clin Pathol 1987; 40: 874-78.

**Sorumlu Yazar:**

**Semir GÜL**

İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, MALATYA

TÜRKİYE

E mail: semir.gul@inonu.edu.tr

0506 681 01 23