

Siyatik Sinir Histolojisinin Işık Mikroskopik Değerlendirilmesi

LIGHT MICROSCOPIC EVALUATION OF SCIATIC NERVE HISTOLOGY

Neşe ÇÖLÇİMEN

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Türkiye

ÖZ

ISPEC 3.Uluslararası Sosyal ve Beşeri Bilimler Kongresinde, VAN /20-22 Aralık 2019 özet sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Amaç: Periferik sinir sistemi, santral sinir sistemi ile içinde yaşadığımız dış dünya arasındaki iletişimimizi sağlayan vücudun tüm bölgelerini birbirine bağlayan sinir sistemi bölümüdür. Periferik sinirler kimyasal, mekanik ve termal nedenlerle hasara uğramaktadır. Bu nedenle periferik sinirlerin histolojik incelenmesi önem arz etmektedir. Bizde siyatik sinirin farklı boyama ve kesit kalınlıklarında ışık mikroskopik olarak histolojik yapısını değerlendirmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: İki adet adult, sağlıklı Wistar albino erkek sıçan alındı. Anestezi altında sol siyatik sinir periferik dokularından disseke edilerek çıkarıldı. %10'luk formaldehitte 72 saat fikse edildikten sonra rutin ışık mikroskopik histolojik takip prosedürleri uygulandı. Dokular parafine gömüldü, akabinde 5µm, 3µm kalınlığında kesitler alındı. Hematoksilen&Eozin, Masson'un üçlü boyası ve %1'lik Toluidin Mavisi boyama yöntemleri uygulandı.

Bulgular: Her üç boyama sonrasında siyatik sinirin genel histolojik yapısı ve bağ dokusu kılıfları normal olarak değerlendirildi. Masson'un üçlü boyamasında siyatik sinirin bağ dokusu kılıflarının diğer boyama metodlarına oranla daha net bir şekilde izlendiği görüldü. Boya tutulumu açısından kesitler değerlendirildiğinde her üç boyama metodunda da 5 µm kesitlerin daha iyi boyandığı görüldü. Histolojik yapının değerlendirilmesinde kesit kalınlığı yönünden fark izlenmedi.

Sonuç: Farklı boyama ve kesit kalınlıklarında siyatik sinirin genel yapısı ve akson yapıları değerlendirildi. Sunulan verilerin periferik sinir çalışmalarında uygulanacak prosedür ve histolojik değerlendirmeye katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Histolojik yapı, Sıçan, Siyatik sinir

Neşe ÇÖLÇİMEN

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Türkiye

E-posta: colcimennese@hotmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-7695-3049>

ABSTRACT

Introduction: Peripheral nervous system is the part of the nervous system that connects all parts of the body that provide communication between the central nervous system and the outside world in which we live. Peripheral nerves are damaged by chemical, mechanical and thermal reasons. Therefore, histological examination of peripheral nerves is important. We aimed to evaluate the histological structure of the sciatic nerve in different staining and section thicknesses by light microscopy.

Methods: Two adult, healthy Wistar albino male rats were taken. The left sciatic nerve was dissected from the peripheral tissues under anesthesia. Routine light microscopic histological follow-up procedures were performed after fixation in 10% formaldehyde for 72 hours. The tissues were embedded in paraffin and then 5µm and 3µm thick sections were taken. Hematoxylin & Eosin, Masson's triple dye and 1% Toluidine Blue staining methods were applied.

Results: After all three stainings, the general histological structure and connective tissue sheaths of the sciatic nerve were evaluated as normal. In Masson's triple staining, it was observed that the connective tissue sheaths of the sciatic nerve were observed more clearly compared to other staining methods. When the sections were evaluated in terms of dye uptake, it was seen that 5 µm sections were stained better in all three staining methods. In the evaluation of histological structure, no difference was observed in terms of section thickness.

Conclusion: The general structure and axon structures of the sciatic nerve were evaluated in different staining and section thicknesses. We believe that the presented data will contribute to the procedure and histological evaluation to be applied in peripheral nerve studies.

Keywords: Histological structure, Rat, Sciatic nerve

Periferik sinir sistemi, santral sinir sistemi ile; içinde yaşadığımız dış dünya arasındaki iletişimimizi sağlayan vücudun tüm bölgelerini birbirine bağlayan sinir sistemi bölümüdür (1). Periferik sinirler kimyasal, mekanik ve termal nedenlerle hasara uğramaktadır. Travmaya maruz kalan hastaların %2,8'inde periferik sinir hasarı olduğu bildirilmektedir. Periferik sinir yaralanmalarının tedavisinde en iyi seçenek kesilmiş periferik sinir uçlarının primer olarak uc uca onarılması, bunun uygulanmadığı, hasarlı sinir uçları arasındaki kaybın büyük olduğu durumlarda otolog duyuşal sinir grefti kullanılarak sinir uçlarının birleştirilmesidir (2). Amaç sinir bütünlüğünü tekrar sağlayarak impuls iletiminin geri dönüşümünü sağlamaktır (1). Ancak tedavi sonrası iyileşme için geçen sürenin uzun olması (1) tam olarak fonksiyonel geri

kazanım ve iyileşmenin olmaması (3) nedeniyle farklı klinik uygulamalar ve stratejiler geliştirmek için araştırmalar günümüzde halen devam etmektedir.

Sıçanda en kalın periferik sinir Nervus İschadicus'tur (4). Periferik sinir çalışmalarında sıçan siyatik siniri en sık kullanılan ve hasar modeli oluşturulan sinirdir (5). Bu yüzden de histolojik incelemesi önem arz etmektedir. Miyelinli periferik sinirlerin morfolojik olarak değerlendirilmesi için doğru ve uygun bir tespit işlemi ön koşuldur. Histolojik incelemelerde periferik dokularından iyi ayrılmış periferik sinirin glutaraldehitte immersiyon fiksasyon uygulamasını takiben kuvvetli bir oksidan osmium tetroksitle (OsO₄) postfiksasyonu genellikle tercih edilmektedir. Sonrasında epoksi resin içine gömülen dokulardan yarı ince kesitler alınarak Toluidin Mavisi ile boyama periferik sinir histolojisinde, miyelinli sinir

liflerinin birçoğunun değerlendirilmesini mümkün kıldığı için altın standart olarak kabul edilmektedir (5). Bu yaygın kullanılan metod dışında periferik sinirlerin histolojik değerlendirilmesinde ışık mikroskopik prosedür ve inceleme de mümkün olmaktadır. Çalışmamızda, siyatik sinirin histolojik yapısının incelenmesinde kullanılacak ışık mikroskopik yöntemleri ortaya koymak için farklı boyama ve kesit kalınlıklarında siyatik sinir yapısını incelemeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

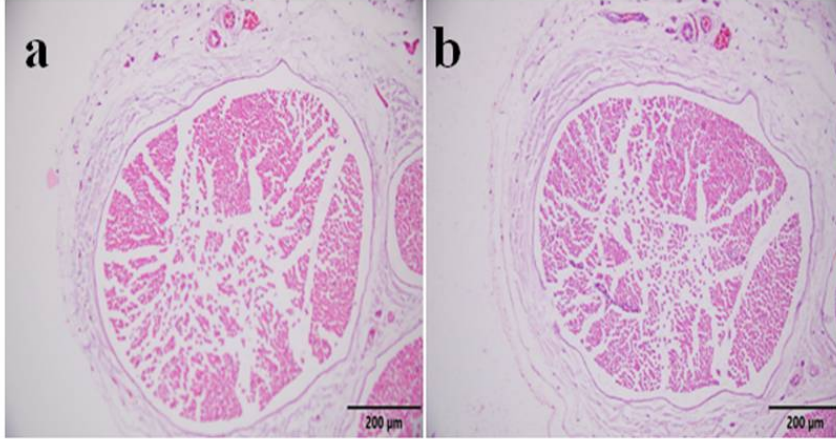
Çalışma için Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan etik onay alındı (31/10/2019, No: 2019/10). İki adet adult (2 aylık), sağlıklı Wistar Albino cinsi erkek sıçan alındı. Anestezi altında (ketamin 50 mg/kg ve xylazine 15 mg/kg, intraperitoneal) sol uyluk tıraş edildi, sol siyatik sinir trunkustan ayrıldıktan sonra uyluk orta kısmında periferik dokularından disseke edilerek çıkarıldı. %10'luk formaldehitte 72 saat fikse edildikten sonra dokular parafine gömüldü, akabinde 5µm ve 3µm

kalınlığında kesitler alındı. Kesitler, 60 °C'de 1 saat etüvde bekletildi. Daha sonra, dokular 10'ar dakika ksilol I-II-III aşamalarından geçirildi. Ksilol aşaması sonrası azalan alkol serilerinde (%100-95-80) 5'şer dakika bekletildi. Alkol serilerinden sonra, kesitler distile suda yıkandı. Ardından kesitler Hematoksilen & Eozin ile boyandı. (6). Aynı aşamalardan geçirilen dokulara boyama aşamasında Masson'un üçlü boyası (Anilin mavili) ve %1' lik Toluidin Mavisi boyama yöntemleri uygulandı. Farklı boyama ve kesit kalınlıklarında siyatik sinirin genel yapısı ve akson yapıları ışık mikroskopunda (Olympus BX53, Tokyo, Japan) değerlendirildi.

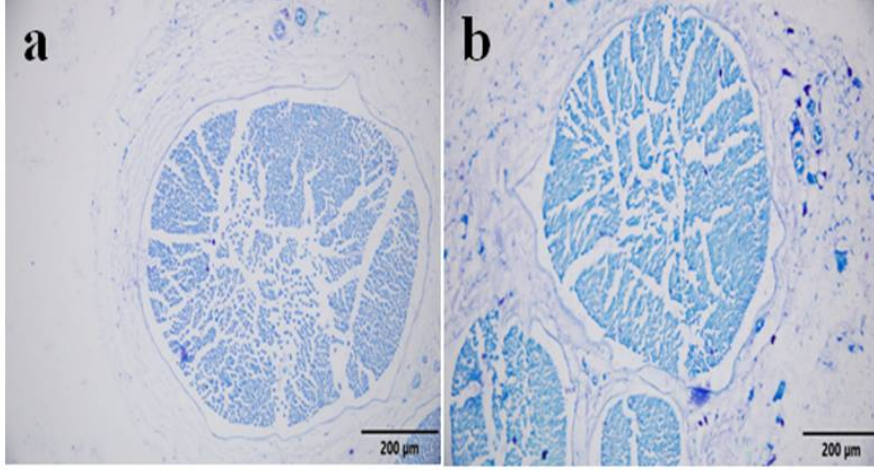
BULGULAR

Hematoksilen & Eozin (Şekil 1) ve %1' lik Toluidin Mavisi boyama (Şekil 2) uygulamaları sonrasında siyatik sinirin genel histolojik yapısı ve bağ dokusu kılıfları (epinörüm, perinörüm, endonörüm) normal olarak değerlendirildi.

Şekil 1. Siyatik sinir 3µm (a),5µm (b)kesit kalınlığı, Hematoksilen & Eozin, Scale bar 200µm



Şekil 2. Siyatik sinir 3µm (a),5µm (b)kesit kalınlığı, %1'lik Toluidin Mavisi, Scale bar 200µm

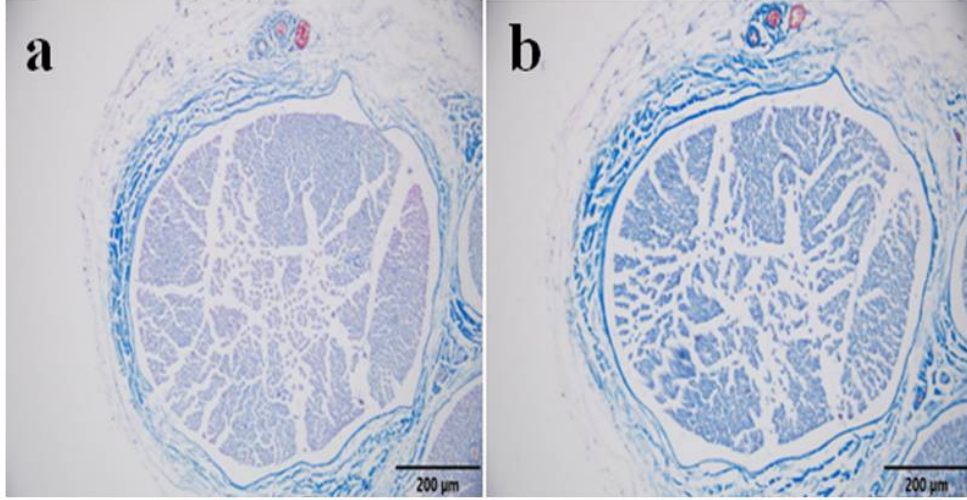


Masson'un üçlü boyamasında (Anilin mavili) siyatik sinirin bağ dokusu kılıflarının (epinörium, perinörium, endonörium) diğer boyama metodlarından farklı olarak içerdiği kollajen mavi renkte boyandı. Böylece dokulardan ayrıldığı ve daha net bir şekilde izlendiği görüldü (Şekil 3).

Boya tutulumu açısından kesitler değerlendirildiğinde her üç boyama metodunda da 5 µm kalınlığında ki kesitlerin daha iyi boyandığı görüldü. Histolojik yapının değerlendirilmesinde kesit kalınlığı yönünden fark izlenmedi.

Şekil 3. Siyatik sinir 3µm (a),5µm (b)kesit kalınlığı, Masson'un üçlü boyası (Anilin mavili),

Scale bar 200µm



TARTIŞMA

İnsan bacağına duyu innervasyonunun tamamına yakını ve motor innervasyonunun önemli kısmını siyatik sinir sağlamaktadır. Ayrıca, lomber ve sakral bölgenin vertebral disk hasarları veya kemik yapıda oluşan deformasyonlara bağlı basılar, siyatik sinir trasesinde ağrıya neden olmakta ve klinikte önemli bir yer tutan sağlık problemlerini oluşturmaktadır. Siyatik sinir hasarı, kolay ulaşılabilirliği ve uygulamaların göreceli olarak daha kolay yapılabilmesinden dolayı yaygın olarak kabul gören bir modeldir. Bu nedenlerden dolayı, periferik sinir hasarı çalışmaları genellikle sıçan siyatik siniri üzerinde geliştirilen modellerle yapılmaktadır (4). Memeli hayvanlar arasında sıçan siyatik siniri, elektron mikroskop düzeyinde dahi insan sinir dokusundan ayırt edilemeyecek hücresel detayları olan, temin edilmesi kolay ve ucuz bir sinir doku kaynağıdır (7). Ayrıca sıçan siyatik siniri, motor fonksiyonun yanı sıra duyu fonksiyonunun da aynı

zamanda değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır (8). Çalışmamızda bu nedenlerle sıçan siyatik sinirini inceledik ve periferik sinir hasarı çalışmalarının tümünde olduğu gibi erkek sıçan (4) kullandık.

Periferik sinir sistemi hasarlarının tedavi stratejilerindeki son gelişmelere rağmen, periferik sinir yaralanması, dünya çapında artan insidansla hala en önemli sağlık sorunlarından biridir (9). Periferik sinir yaralanması sonrası tam olarak iyileşmeyi sağlayacak bir tedavi yöntemi halen mevcut değildir (10). Periferik sinir yaralanmasının iyileşme süreci ve hedeflenen yeniden innervasyon; çeşitli hücreleri, büyüme faktörlerini ve sinyal yollarını içeren çok faktörlü, karmaşık bir süreçtir. Bu sebeplerden dolayı, periferik sinir yaralanmasının kabul edilebilir işlevsellikle uygun şekilde yeniden yapılandırılması ve iyileştirilmesi klinik bir zorluk olmaya devam etmektedir (9).

Bu karmaşık süreçte meydana gelen olayların patofizyolojisini aydınlatarak yeni tedavi yöntemleri geliştirmek için araştırmalar günümüzde halen sürmektedir. Biz de bu bilgi birikimine katkı sağlamak amacıyla siyatik sinir üzerinde farklı kesit kalınlığı ve boyama yöntemleri uygulayarak histolojik yapısını değerlendirdik. Mevcut literatür taramasında siyatik sinirin genel histolojik yapısının değerlendirilmesinde ışık mikroskopik prosedürlerden en sık Hematosilen & Eozin (H&E) boyama yönteminin kullanıldığı belirlendi. H&E boyama metodu histoloji laboratuvar uygulamalarında doku tiplerinde genel amaçlı yaygın kullanılan yöntemdir. Bu yöntemle yapılan boyamada çekirdeğin mavi-siyah renkte, hücre sitoplazması ve bağ dokusu unsurlarından olan kollagen lifler ve kas liflerinin aynı tonlarda boyandığı izlenir. Bu nedenle kas ve bağ doku ayrımının yapılması zor olur (11). Ekstrasellüler matriks elemanlarının değerlendirilmesinde Masson'un üçlü boyamasıyla H&E boyamaya göre daha iyi sonuç alınır. Histolojik değerlendirme, deskriptif bir metod olarak bilinmektedir. Ancak günümüzde dokudaki spesifik alanlardaki hücre çapı, sayısı, hacmi gibi nicel verilerde histolojik olarak ölçülebilmektedir. Bu şekilde çalışmalarda gruplar arasında karşılaştırma yapmak mümkün olmaktadır (12).

Bölümümüz laboratuvarında gerçekleştirdiğimiz sinir sistemi stereolojik (akson sayımı, alan değerlendirilmesi gibi) çalışmalarımızda sıklıkla %1' lik Toluidin Mavisi boyama yöntemiyle elde ettiğimiz görüntüleri kullanmaktayız. Periferik sinir kılıf yapısının (epinörium, perinörium, endonörium) değerlendirileceği çalışmalarda Masson'un üçlü boyama yöntemi daha uygun olmaktadır. Çalışmamızda dokunun histolojik yapısını değerlendirmede kesit kalınlığı açısından 3µm ve 5µm kesitler arasında herhangi bir fark izlenmedi, ancak boya dağılımı ve tutulumu açısından 5µm kesitlerde daha iyi görüntüler elde edildi.

Sonuç olarak çalışmanın, periferik sinir sistemi konusunda yapılacak araştırmalara ışık mikroskopik prosedürlerin uygulanması ve kullanımına dair veriler sunarak, araştırmacılara yol gösterici olacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Sütçü M. Periferik sinir kesisinde farklı onarım zamanlarında melatonin sinir iyileşmesine olan etkisinin incelenmesi. Uzmanlık Tezi, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Konya, 2010.
2. Kardeş Ö, Çivi S, Bulduk EB, Kaya Selçuk F, Süner Hİ, Durdağ E, et al. Effect of gabapentin on primary surgical treatment of experimental sciatic nerve injury in rats. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2018;24:481-487.
3. Öroğlu B. Hiperbarik oksijen tedavisinin periferik sinirlerin gergin tamirine etkisi (Deneysel Çalışma). Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, 2008.
4. Olçum M. Siyatik sinir hasarında kitosan ve kompozitlerinden üretilen tüplerin iyileşmeye etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, İzmir, 2012.
5. Akakın D, Kolbaşı B. Periferik sinir çalışmalarında histolojik incelemeler: morfometrik analiz ve sinir lifi ayırma (teasing) yöntemi. *Review. Türkiye Klinikleri J Neurol – Special Topics.* 2014;7:49-55.
6. Slaoui M, Fiette L. Histopathology Procedures: From Tissue Sampling to Histopathological Evaluation. In: Gautier JC. (eds) *Drug Safety Evaluation. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 691. Humana Press; 2011: 69-82.
7. Mackinnon SE, Hudson AR and Hunter DA. Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plast Reconstr Sur.* 1985;75:384-388.
8. Varejão AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patricio JA, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *Journal of Neuroscience Methods.* 2001;108:1-9.
9. Samadian H, Maleki H, Fathollahi A, Salehi M, Gholizadeh S, Derakhshankhah H, et al. Naturally occurring biological macromolecules-based hydrogels: Potential biomaterials for

- peripheral nerve regeneration. *Int J Biol Macromol.* 2020;154:795-817.
10. Li R, Li D-H, Zhang H-Y, Wang J, Li X-K, Xiao J. Growth factors-based therapeutic strategies and their underlying signaling mechanisms for peripheral nerve regeneration. Review Article. *Acta Pharmacol Sin.* 2020;41:1289-1300.
 11. Şen E, A.Sırmalı Ş. Farklı histolojik boyama yöntemlerinin kıkırdak dokusunda karşılaştırılması. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2020; 46(1): 9-13.
 12. Ayık G. Akut periferik sinir yaralanmalarının rejenerasyonunda epidermal büyüme faktörü'nün etkilerinin tavşan modeli üzerinde histolojik incelenmesi. Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Ankara, 2019.