

Kurt-Özcan solüsyonunun çizgili kas dokusu morfolojisi koruyuculuğunun test edilmesi: 6. ayda kontrol

Yasemin Gülcan KURT (*), Bülent KURT (**), Ömer ÖZCAN (***)

ÖZET

Kas biyopsisi örnekleri alındıktan sonra derhal sıvı azota daldırılarak dondurulmalı ve inceleme aşamasına kadar -80°C'de saklanmalıdır. Bu zorunluluk kas biyopsisinin transferinin önünde büyük bir engeldir. Bu nedenle de, ülkemizde, nöromusküler hastalığı olanlar, çizgili kas biyopsisi yaptırabilmek için perifer illerden kas laboratuvarı bulunan illere seyahat etmek zorunda kalmaktadır. Hastaların kas biyopsisi yaptırmak için seyahat etmeleri yerine; buldukları yerde biyopsi yaptırıp, dokunun transferinin sağlanması için tarafımızca Kurt-Özcan adıyla bir solüsyon geliştirilmiştir. Kurt-Özcan solüsyonu, tanısal amaçlı alınan çizgili kas dokusunun morfolojik özelliklerini +4°C'de 18 saat koruyabilmektedir. Bu çalışma, üretiminin üzerinden 6 ay geçmiş olan Kurt-Özcan solüsyonunun, çizgili kas dokusu üzerine halen koruyuculuğu bulunup bulunmadığını test etmek için yapılmıştır. Bir adet sağlıklı Sprague-Dawley rat kurbanı edilmiş ve alınan kas dokuları Kurt-Özcan solüsyonu içerisinde bekletilmiş ve sıvı azotla ani dondurulan kas dokuları ile morfolojik olarak kıyaslanmıştır. Morfolojik değerlendirmede Hematoksilen-Eozin ve modifiye Gomori Trikrom histokimyasal boyamaları kullanılmıştır. Değerlendirme semikantitatif olarak, ödem, organizasyon ve artifisiel değişiklikler skorlanarak yapılmıştır. Kurt-Özcan solüsyonunda 3, 6 ve 18 saat bekletilen grupların ortalama skoru sırasıyla 0.50, 0.66 ve 0.82 olarak belirlenmiştir ve kontrol grubu skoru (0) ile aralarında istatistiksel olarak önemli fark olmadığı tespit edilmiştir. 6 ay +4°C'de beklemiş Kurt-Özcan solüsyonu 18 saate kadar kas dokusunun morfolojik özelliklerini koruma özelliğinin devam ettiği anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Koruyucu solüsyon, morfoloji, çizgili kas dokusu

SUMMARY

Testing of the protectiveness of Kurt-Ozcan Solution on the morphology of the skeletal muscle tissue: control at 6 months

Muscle biopsy samples must be frozen in liquid nitrogen immediately after taken from patient. This requirement is a major obstacle to the transfer of muscle biopsies. Therefore, patients with neuromuscular disease often have to travel to centers with on-site muscle pathology laboratories for muscle biopsy. We developed a preservative solution named Kurt-Ozcan solution to transfer the patients' biopsy material. We have shown that it protects the morphological features of muscle tissue for 18 hours at +4°C. This study was done to test whether the protective effect of it on muscle tissue continues 6 months after it produced. One Sprague-Dawley rat was sacrificed; striated muscle tissue samples were collected and kept in Kurt-Ozcan Solution. Groups were compared morphologically with samples frozen in liquid nitrogen. Modified Gomori-Trichrome and Hematoxylin-eosine stains were used for morphological evaluation. Evaluation was conducted semi-quantitatively by scoring edema, organization and artificial changes. The mean scores of the groups kept in Kurt-Ozcan solution for 3, 6, and 18 hours were 0.50, 0.66 and 0.82 respectively and there were no differences with the control group scores. Kurt-Ozcan solution kept at +4°C for 6 months is seen to continue to preserve the morphological characteristics of muscle tissue up to 18 hours.

Key Words: preservative solution, morphology, skeletal muscle tissue

Giriş

Çizgili kas biyopsileri nöromusküler hastalıkların tanısında önemli bir araçtır. Ülkemizde çizgili kas biyopsilerinin değerlendirilebildiği kas laboratuvarı sayısı oldukça kısıtlıdır. Çizgili kas biyopsileri, patoloji laboratuvarına gönderilen her hangi bir doku gibi değerlendirilmeyip, özel bazı histokimyasal boyamaların yapılmasına ihtiyaç duyar. Rutin incelemeye gönderilen dokular %10'luk tamponlu formaldehit içinde gönderilir (1) ancak çizgili kas dokusu formaldehit içine konmadan gönderilmek zorundadır. Kas laboratuvarına fikse edilmeden (formaldehit içine konmadan) gönderilen çizgili kas dokusu soğutulmuş izopentan içinde sıvı azota daldırılır ve 10 dakika kadar bekletilir (2). Ardından histokimyasal boyamalar ve patolojik değerlendirme yapılana kadar doku -80°C'de bekletilmek zorundadır. Bu işlem çizgili kas dokusunun tanısal özelliklerinin kaybolmamasına neden olur (3). Ancak bu zorunluluk bazı aşılması zor sorunlara yol açmaktadır. Örneğin, bu işleme tabi tutulmuş çizgili kas dokusu transfer edilmek istenirse sıvı azot kullanılmak zorundadır. Sıvı azotun hali hazırda her yerde kolaylıkla bulunamaması (özellikle perifer illerde), transfer sırasında azotun uçup dokunun bozulma ihtimali olması gibi nedenler, bu dokuların transferini güçleştirmekte bazen imkânsız hale getirmektedir. Bu nedenlerle, ülkemizde, nöromusküler hastalığı olanlar, çizgili kas biyopsisi yaptırabilmek için perifer illerden kas laboratuvarı bulunan illere seyahat etmek zorunda kalmaktadır. Bu hastaların çoğunlukla hareket etme güçlüğü yaşayan ve bazılarının tekerlekli sandalyeye bağımlı olduğu da bilinmektedir.

Nöromusküler hastalığı olanların bu problemlerine (kas biyopsisi yaptırmak için kendilerinin seyahat etmesi yerine; buldukları yerde kas biyopsisi yaptırıp, kas dokusunun transferinin sağlanması) çözüm olabilmek için, geçtiğimiz 1.5 yıl içinde, tarafımızca bir solüsyon geliştirilmiştir. Solüsyon Kurt-Özcan solüsyonu olarak isimlendirilmiştir. Kurt-Özcan solüsyonu, tanısal amaçlı alınan çizgili kas doku biyopsilerinin morfolojik özelliklerini +4°C'de 18 saat koruyabilmektedir. Bu süre, ülkemizde her hangi bir ilden, merkezi izi ulaşmak için yeterli bir süredir. Bu çalışma, üretiminin üzerinden 6 ay geçmiş olan Kurt-Özcan solüsyonunun, çizgili kas dokusu üzerine halen koruyuculuğu bulunup bulunmadığını test etmek için icra edilmiştir.

Materyal Metot

Bu çalışmanın etik kurul onayı, GATA Hayvan deneyleri Etik Kurulundan alınmıştır. Çizgili kas dokusu kaynağı için 1 adet sağlıklı Sprague Dawley rat kurbanı edilmiştir. Bu rattan alınan kas dokusu örnekleri aşağıdaki gibi 4 gruba ayrılmıştır.

- 1.grup: Sıvı azot ile dondurularak -80°C derin dondurucuda bekletilen grup (kontrol grubu)(n=6).
- 2.grup: Kurt-Özcan solüsyonu içine konulup ve 3 saat +4°C'de bekletilen grup (n=6).

*Yasemin GÜLCAN KURT, GATA, Tıbbi Biyokimya AD.

**Bülent KURT, GATA, Tıbbi Patoloji AD.

***Ömer ÖZCAN, GATA Haydarpasa Eğitim Hastanesi, Biyokimya Servisi

Ayrı basım isteği: Yasemin Gülcan KURT GATA,
Tıbbi Biyokimya AD.
06010, Etlik, ANKARA
Email: ygkurt@gata.edu.tr

Makalenin Geliş Tarihi: 21.04.2014 • Kabul Tarihi: 18.05.2014 • Çevrim İçi Basım Tarihi: 25.10.2015

3.grup: Kurt-Özcan solüsyonu içine konulup ve 6 saat +4°C'de bekletilen grup (n=6).

4.grup: Kurt-Özcan solüsyonu içine konulup ve 18 saat +4°C'de bekletilen grup (n=6).

Kas örnekleri yukarıda belirtilen sürelerce bekletildikten sonra sızı azot ile dondurulmuş ve histokimyasal/enzim histokimyasal boyamalar yapılarına kadar -80°C derin dondurucuda bekletilmiştir.

Kurt-Özcan solüsyonunu MgSO₄ (5 mmol/L), raffinöz pentahidrat (30 mmol/L), laktobiyonat (100 mmol/L), KOH (25 mmol/L), KH₂PO₄ (25 mmol/L), adenozin (5 mmol/L), glutatyon (3 mmol/L), ve allopürinol (1 mmol/L) kullanılarak hazırlanmıştır. PH 7.4 olarak ayarlanmıştır. Tüm kimyasallar Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından temin edilmiştir.

Morfolojik değerlendirme

Bütün kas biyopsisi örneğinden 8 mikrometre kalınlığında kesitler alınmış ve modifiye gomori trikrom (mGT) ve hematoksilen eozin (HE) ile boyanmıştır (her iki yöntemin detayları

aşağıda verilmiştir (Tablo I ve Tablo II). Morfolojik değerlendirme semikantitatif olarak yapılmıştır. Semikantitatif olarak yapılan değerlendirmede:

1-Kas fasiküllerinin organizasyonu: kontrol grubu ile karşılaştırılarak, normal:0, hafif organizasyon bozukluğu: 1, orta derecede organizasyon bozukluğu: 2 ve belirgin organizasyon bozukluğu: 3 olarak skorlanmıştır.

2-Ödem: normal: 0, hafif: 1, orta derecede: 2 ve belirgin: 3 olarak skorlanmıştır.

3-Artifisiyel değişiklikler: normal:0, hafif artifisiyel değişiklikler: 1, orta derecede artifisiyel değişiklikler: 2 ve belirgin artifisiyel değişiklikler: 3 olarak skorlanmıştır.

Böylece olgunun skoru ne kadar 0'a yakınsa normale yakın; ne kadar 9'a yakınsa anormale yakın olduğu değerlendirilmiştir. Gruplardan elde edilen skorlar istatistikî yöntemlerle karşılaştırılmıştır.

Tablo I. Modifiye gomori trikrom boyama yöntemi

Kullanılacak solüsyonlar

1-Gomori Trichrome Sol.: 0,6 gr Chromotrope 2R
0,3 gr Fast green FCF
0,8 gr Phosphatungstic asit
1 ml Glacial asetik asit
100 ml distile su
Solüsyon hazırlandıktan sonra Ph'ı 1 N NaOH ile 3,4'e getirilir.

2-% 2 Glacial Acetic Acide 2 ml glacial asetik asit
98 ml distile su

3-Harris Hematoxyline Kullanıma hazır halde satın alınmaktadır.

ÇALIŞMA YÖNTEMİ:

5 dk harris hematoxyline de bekletilir.
5 dk akarsuda yıkanır.
10 dk gomori trichrome sol.de bekletilir.
% 2'lik glacial acetic acide sol.de 15- 20 sn bekletilir.
Distile su ile yıkanır.
%80 alkolden 2 defa geçirilir.
%95 alkolden 2 defa geçirilir.
Ksilenden 2 defa geçirilir.
Entellan ile kapatılır.
NOT: Doku kesildikten sonra MGT için ayrılan lamalar aynı gün içerisinde boyanmalıdır.
Gomori trichrome +4 derecede saklanır.
SONUÇ: Yeşil boyalı kas lifleri, içinde kırmızı noktalar halinde mitokondriler.

Tablo II. HE boyanma yöntemi

Kullanılacak solüsyonlar

1-Harris Hematoxyline: Kullanıma hazır satın alınmaktadır.

2-Eosin: Kullanıma hazır satın alınmaktadır.

ÇALIŞMA YÖNTEMİ:

%95'lik alkolde 3 dk. bekletilir.
Suda yıkanır.
Harris HE'de 3 dk bekletilir.
Suda yıkanır.
Eosinde 15-20 sn bekletilir.
Suda yıkanır.
%95'lik alkolde 2 kez geçirilir.
Xyleneden 2 kez geçirilir.
Entellan ile kapatılır.
SONUÇ: Kas lifleri pembe/kırmızı, çekirdekler mavi boyanır

İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel analizler SPSS for Windows V. 17.0 ile yapılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalarda ki-kare testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ bulunan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular

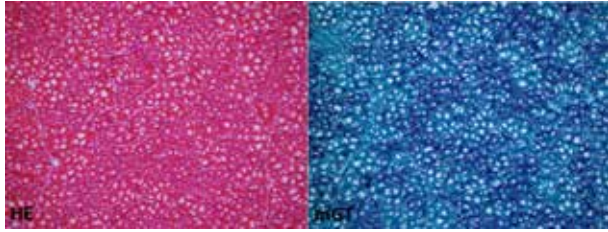
Tablo III'de de özetlendiği gibi 1. grup (rutin olarak kullanılan sıvı azotla dondurulup -80°C 'de saklanan grup (altın standart yöntem)) 3, 6 ve 18. saatlerde, çizgili kas dokusunun morfolojik özelliklerini koruduğu görülmüştür (Resim 1). Bu beklenen bir bulgudur çünkü zaten güncel pratikte de kas patolojisi labo-

ratuvarında kullanılan yöntemdir.

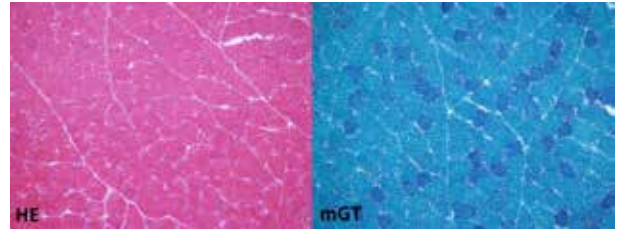
Kurt-Özcan solüsyonunda beklenen örneklerde genel olarak iyi sonuçlar elde edilmiştir. 2. grubun ortalama skoru 0.5, 3. grubun ortalama skoru 0.66 ve 4. grubun ortalama skoru 0.82 olarak belirlenmiştir (Tablo III ve Resim 2). Her ne kadar Kurt-Özcan solüsyonunda bekleme süresi arttıkça, semikantitatif yöntemle elde edilen skor artsa da, her 3 grubun kontrol grubu ile karşılaştırılmasında, morfolojik bulguların kontrol grubundan farksız olduğu görülmüştür. Yani, her 3 grup için solüsyonda beklmeleri ile oluşan değişiklikler istatistiksel olarak anlamsızdır.

Tablo III. mGT ve HE boyamalarda elde edilen ortalama skorlar

Saatler	1. grup skorlar			2. grup skorlar			2.grup ortalama skor	3. grup skorlar			3. grup ortalama skor	4. grup skorlar			4. grup ortalama skor									
	3	6	18	3			3	6			6	18			18									
Organizasyon	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0.33	0	0	0	1	1	0	0.33	0	1	0	0	1	0	0.33
Ödem	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.16	0	1	0	1	0	0	0.33	1	0	0	1	0	0	0.33
Artifisiyel değişiklikler	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0	1	0	0	0	0	0.16
Toplam ortalama Skor	0	0	0							0.5							0.66							0.82
P değeri										>0.05							>0.05							>0.05



Resim 1: Kontrol grubu 18. saat mGT (x200) ve HE (x200) boyama



Resim 2: Kurt-Özcan solüsyonu grubu 18. saat mGT (x200) ve HE (x200) boyama.

Tartışma

Kas biyopsisi nöromusküler hastalıklar için önemli bir tanı aracıdır. Bu gereksinim, nöromusküler hastalığa sahip kişilere, kas biyopsisi yaptırmak için perifer illerden, İstanbul, Ankara, İzmir veya Adana gibi büyük illere seyahat etme zorunluluğu doğurmaktadır. Bu kişiler çoğunlukla zaten hareket etme güçlüğü çeken kişilerdir. Bu nedenle zaman zaman kas biyopsisi yaptırılmadığından, hastaların tanısız kaldığı da olmaktadır. Ayrıca bu sorun, perifer illerdeki nörologların tecrübe edinemesi, tüm hastalarını merkez illere sevk etmesi gibi bir sonuçlar da doğurmaktadır. Ülkemiz ve dünya genelinin önemli bir sorunu olan hastadan alınan kas biyopsilerinin acilen sıvı azot ile dondurulması ve çok düşük ısılarda transferi zorunluluğuna çözüm aranması önemli bir gereksinimdir. Bu amaçla, tarafımızca, ülkemizdeki herhangi bir ilden merkez bir ile transfer edilene kadar kas dokusunun morfolojik, histokimyasal, biyokimyasal ve moleküler özelliklerini koruyabilen bir solüsyon geliştirilmiş ve Kurt-Özcan solüsyonu olarak isimlendirilmiştir. Bu çalışmada, 6 ay önce üretilmiş Kurt-Özcan solüsyonunun çizgili kas dokusu morfolojisini koruyup korumadığı araştırılmış ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, 18 saate kadar koruyuculuğun devam ettiği gösterilmiştir.

Çizgili kas doku biyopsileri, patoloji laboratuvarlarının rutin

yükü içinde küçük bir yer tutmaktadır. Bu nedenle, patoloji laboratuvarları çizgili kas dokusunu değerlendirebilecek özelleşmeyi genellikle gerçekleştirememektedir. Çünkü bu biyopsi örneklerinin değerlendirilebilmesi, hem fiziki şartların geliştirilmesi, hem teknisyen yetiştirilmesi hem de patoloğun bu konu ile ilgili eğitim almasını gerektirmektedir. Örneğin, morfolojik değerlendirme için alınan çizgili kas dokusu, patoloji laboratuvarına rutin inceleme için gönderilen diğer örneklerin aksine formaldehit içine konmayıp soğutulmuş izopentan içinde sıvı azota daldırılıp 10 dakika kadar sıvı azot içinde bekletilmektedir (4). Sıvı azot ile dondurulan kas dokusu -80°C derin dondurucuya kaldırılmakta ve böyle saklanmaktadır. Bu işlemin yapılmaması durumunda konjenital miyopatiler, mitokondriyal miyopatiler veya depo hastalıkları gibi sık görülen kas hastalıklarına tanı koymak olanaksızlaşmaktadır. Bütün bu işlemler, rutinlerinin küçük bir bölümünü oluşturmalarına rağmen, kas laboratuvarı çalışanları için önemli sorunlardır. Bu nedenlerle kas laboratuvarları, ülkemizde sadece Ankara, İstanbul, Adana ve İzmir'de mevcuttur.

Nöromusküler hastalık nedeni ile alınan kas dokusu örnekleri, moleküler, biyokimyasal veya patolojik inceleme için alınabilir. Srinivasan ve ark. 2002 yılında yaptıkları bir derlemede doku fiksatiflerinin nükleik asitler üzerine etkisini değerlendir-

mişlerdir (5). Bu çalışmada taze doku saklamanın uygun yolunun, doku hastadan çıkarılır çıkarılmaz sıvı azot ile dondurmak ve -20°C veya -80°C'de saklamak olduğu belirtilmektedir. Çizgili kas dokusu da, kas laboratuvarlarında benzer muameleye tabii tutulmaktadır. Kurt-Özcan solüsyonunun dizayn edildiği önceki çalışmamızda, +4°C'de Kurt-Özcan solüsyonunun beta-aktin geni mRNA'sını 6 saat koruduğu gösterilmiştir (henüz yayınlanmamış bilgi). Srinivasan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada farklı fiksatiflerde, farklı sürelerde tutulan dokuların nükleik asitlerinin farklı şekilde etkilenebileceği vurgulanmıştır.

Kamikawa ve ark. 2004 yılında yaptıkları çalışmalarında farklı doku koruyucu solüsyonların düz kas dokusu üzerine koruyuculuklarını test etmişlerdir (6). Bu çalışmada, "Cell Banker 2" (NZK Biochemicals, Fukushima, Japan), "Cellvation" (Celox Laboratories, MN, USA), "Cryoprotective" (Bio Whittaker, MD, USA), "SFM101" (Nissui Pharmaceuticals, Tokyo, Japan), "OPTe-MEM" (Invitrogen Corporation, NY, USA) ve "Dulbecco's Ca2+- and Mg2+-free phosphate buffer" solüsyonu (Nissui Pharmaceuticals, Tokyo, Japan) kullanılmıştır. Bazılarının içine 5-20% dimethylsulphoxide (DMSO) eklenmiştir. Beş saat süre ile kas dokusunun fonksiyone olup olmadığı değerlendirilmiş ve SMF101 solüsyonunun daha koruyucu olduğu görülmüştür.

Literatürde koruyucu solüsyonların çizgili kas doku biyopsilerini koruyuculuğuna dair yayınlar sınırlıdır. Var olanlar ise çoğunlukla transplantasyon için yapılan doku nakline ait bilgilerdir (7,8). van der Heijden ve arkadaşlarının çalışmasında (9) soğukta farklı koruyucu solüsyon içinde bekletilen kas dokusunun fonksiyonallığı değerlendirilmiştir. Kas dokusu örnekleri, 2, 4 ve 8 saat 100C'de, "University of Wisconsin (UW)", "Euro-Collins (EC)", "HTK-Bretschneider (HTK)", reversed St. Thomas' Hospital (ST2)" ve "Krebs-Henseleit (KH)" solüsyonlarında bekletilmiştir. Kas örneklerinin fonksiyonallığı elektrik stimülasyonu ile değerlendirilmiştir. Ardından da morfolojik analiz yapılmıştır. Sonuç olarak, UW ve HTK solüsyonunun en koruyucu solüsyonlar olduğu sonucuna varılmıştır.

Kurt-Özcan solüsyonu, kendi ülkemize ait, daha ucuz bir koruyucu solüsyon geliştirilmesi amacı ile üretilmiştir ve 18 saate kadar +4°C'de kas dokusunun morfolojisini koruduğu tarafımızca gösterilmiştir. Bu çalışmada, 6 ay +4°C'de beklemiş Kurt-Özcan solüsyonunun koruyuculuğunun devam edip etmediği değerlendirilmiş ve 18 saate kadar kas dokusunun morfolojik özelliklerini koruduğu tespit edilmiştir.

Kaynaklar:

- 1- Masir N, Ghoddoosi M, Mansor S, et al. RCL2, a potential formalin substitute for tissue fixation in routine pathological specimens. *Histopathology*. 2012;60(5):804-15.
- 2- Dubowitz V, Sewry CA, Fitzsimons RB in Dubowitz V. and Tindall B (ed). *Muscle Biopsy*. second edition, Suffolk, The Lavenham Press 1985: 3-18
- 3- Engel GA. and Franzini-Armstrong C. in Andrew G. Engel ve Clara Franzini-Armstrong (ed), *Myology*. Philadelphia, USA. Mc Graw Hill, 2004: 681-690
- 4- Swash M. and Schwartz M.S. in Swash M. and Schwartz M.S (ed) *Biopsy Pathology of Muscle*. London, U.K., Chapman and Hall. 1984: 14-18.
- 5- Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol*. 2002;161(6):1961-71.
- 6- Kamikawa Y, Shibukawa A, Uchida K, Sasaki K, Sunagawa M, Ohno Y., Preservative solution for freeze-storage of surgically excised human colon to enable study of smooth muscle function in vitro. *J Smooth Muscle Res*. 2004;40(4-5):177-82.
- 7- Norden MA, Rao VK and Southard JH. Improved preservation of rat hindlimbs with the University of Wisconsin solution and butanedione monoxime. *Plast Reconstr Surg*. 1997;100(4):957-65.
- 8- Hallock GG. Getting the most from the soleus muscle. *Ann Plast Surg*. 1996;36(2):139-46
- 9- van der Heijden EP, Kroese AB, Werker PM, et al. Function of rat skeletal muscles after storage at 10 degrees C in various preservation solutions. *Clin Sci (Lond)*. 1998;94(3):271-8.