

METHYL GREEN PYRONIN YÖNTEMİ İLE İNTESTİNAL SİSTEMDE GANGLION HÜCRELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ (*)

Dr. Doğan Ö. (**) • Prof. Dr. Çevikbaş U. (***)

ÖZET: Bu çalışmada tümoral veya iltihabi nedenlerden dolayı rezeksiyon uygulanmış 20 adet barsak materyalinin patolojik özellik göstermeyen cerrahi sınırlarına ait parafin blok kesitleri methyl green pyronin yöntemi ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Methyl green pyronin yönteminin intestinal sisteme ait ganglion hücrelerinin saptanması ve incelenmesinde hematoksilin-eosin yönteminden daha üstün olduğu sonucuna varıldı.

ANAHTAR KELİMELEER: Methyl green pyronin, RNA, ganglion cell, Hirschsprung's disease.

SUMMARY: In this study, paraffin block sections obtained from normal surgical margins of large bowel materials resected from 20 patients by reasons of neoplastic or inflammatory lesions were stained with methyl green pyronin staining method. We conclude that methyl green pyronin staining method is superior to hematoxyline-eosin in the identification and examination of the intestinal ganglion cells.

KEY WORDS: Methyl green pyronin, RNA, ganglion cell, Hirschsprung's disease.

GİRİŞ

Sindirim kanalının nöral innevrasyonunun gelişim şekli

* IX. Ulusal Patoloji Kongresi, Çeşme İzmir 1990'da bildirilmiştir.
** Uz.Dr. Öner Doğan: İst. Tıp Fakültesi Patoloji ABD İstanbul
*** Prof.Dr. Uğur Çevikbaş: İst. Tıp Fakültesi Patoloji ABD İstanbul.

ve Hirschsprung hastalığının etiopatogenezi halen tam olarak açıklanamamıştır (9,12,13). Ancak, bu belirsizliklere karşı pratik uygulama alanında Hirschsprung hastalığının tanısı aganglionik barsak segmentinin saptanmasına dayanır (2,9). Bu amaçla, hastalığın histopatolojik tanısında en yaygın olarak kullanılan yöntem; biopsi materyaline ait hematoksilin eosin ile boyalı kesitlerde ganglion hücresinin

araştırılmasıdır. Ancak bazı durumlarda hematoksilen eosin boyası ile ganglion hücrelerini saptamak oldukça güçtür ve patolog için sorun oluşturur (2,9). Sorunun çözümü amacıyla geliştirilen immun histokimyasal ve enzim histokimyasal yöntemler ise ülkemiz koşulları için genellikle uygulanması güç ve pahalı yöntemlerdir. Bu çalışmada methyl green pyronin yönteminin intestinal sistemde ganglion hücrelerinin saptanmasındaki değeri araştırılmıştır.

MATERYAL METOD

İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D. 1990 yılı biopsi materyali içinde yer alan 20 adet kolon ve rektum rezeksiyon materyali değerlendirildi. Tümör veya iltihabi nedenlere bağlı olarak çıkarılan materyallerin makroskopik olarak lezyon içermeyen cerrahi sınırlarından alınan doku parçaları % 10'luk formaldehid ile tesbit edildi. Rutin takip işlemleri sonucunda elde edilen parafin bloklara ait kesitler hematoksilen eosin ve methyl green pyronin yöntemleri kullanılarak boyandı. Işık mikroskopunda karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Methyl green pyronin yöntemi aşağıda özetlendiği şekilde uygulandı.

Methyl green pyronin boya çözeltisinin hazırlanması:

Methyl green (Merck, kat no: 42585).....	1 gr.
Pyronin Y (Merck, kat no: 45005).....	0.8 gr.
Distile su.....	320 ml
Gliserin.....	80 ml

Gliserin ve distile su iyice karıştırılır. Methyl green ve daha sonra pyronin Y karıştırılarak eklenir. Bir ml fenol katılır. Beş damla % 1'lik asetik asit eklenir. Karışımın pH'ı 4.2 olana kadar 0.2 M tris buffer eklenir. Çözelti 2 saat dinlendirildikten sonra kullanıma hazırdır.

Suya getirilen kesitler havada veya etüvde kurutuldu, boya çözeltisi içinde 25-30 dakika bekletilerek boyandı. Boyanmış preparatlar kurutma kağıdı ile iyice kurutuldu. Kesitler ve lam yüzeyi tamamen kurutuluncaya kadar (yaklaşık 20 dak.) oda sıcaklığında bekletildi, zaman zaman kurutma kağıdı kullanılarak kurutma işlemine yardım edildi. Tamamen kurutulmuş preparatlar sıra ile üç ayrı n-butil alkol (Carlo erb Analyticals Kat No: 414131) içinde pyroninofilik sıvı akmayuncaya kadar batırılıp çıkarılarak diferansiye edildi. Doğrudan ksilol içine alınan preparatlar temizlendikten sonra sentetik kapatma maddesi ile kapatıldı. Kontrol preparatı olarak lenf ganglionu, serebral korteks kullanıldı. Çalışma çözeltisindeki pyronin Y oranına, çözeltinin pH'ına, n-butil alkol differansiasyonundan önce kesitin tamamen kurumuş olmasına, kurutma işlemi ve daha sonraki aşamalarda kesitin su ve nem ile temas etmemesine, differansiasyonun yeterli düzeyde uygulanmasına özen gösterildi.

SONUÇLAR

Küçük büyütmelelerde bile barsak duvarındaki her iki nöral pleksusa ait ganglion hücreleri methyl green pyronin yöntemi ile kolayca saptandı. Auerbach pleksusuna ait ganglion hücreleri, mavi-yeşil renkte boyanmış çevre düz kas ve schwann hücreleri arasında pyroninofilik kırmızı renkli nukleolus ve stoplazması ile hemen fark edildi. H.E yöntemi ile görülmesi oldukça güç olan Henle ve Meissner pleksuslarına ait ganglion hücreleri de benzer özellikleri ile hemen dikkat çekti.

Ganglion hücrelerinin nukleusunun çıkmadığı, sadece stoplazmasının bulunduğu kesitlerde H.E ile ganglion hücre-

resinin varlığını belirlemek oldukça güçtü. Ancak büyük büyütmelelerle yapılan dikkatli incelemelerde güçlüklerle ayırdedilen basofilik boyanmış stoplazmanın görülmesi ganglion hücrelerinin saptanmasını sağladı. Buna karşı methyl green pyronin yönteminde ganglion hücrelerinin stoplazması çevredeki mavi-yeşil zemin üzerinde kuvvetli pyroninofilik kırmızı renkte boyanma özelliği ile küçük büyütmelelerde bile kolayca fark edildi.

H.E. preparatlarında Henle ve Meissner pleksusuna ait ganglion hücreleri ancak büyük büyütmelelerde ve dikkatli incelemeler sonucunda saptanabildi. Buna karşı aynı hücreler methyl green pyronin yöntemi ile çok daha kolay bir şekilde belirlendi. Zaman zaman ganglion hücreleri ile submukozada yer alan ve nisbeten ganglion hücrelerine benzer boyanma özelliği gösteren lenfoid hücrelerden ve mast hücrelerinden ayırım için büyük büyütmeleler kullanıldı. Submukozadaki mast hücreleri içerdekileri asidik mukopolisakkarit granülleri nedeniyle koyu kırmızı-kiremit rengine granüller stoplazmik boyanma gösterdiler. Ganglion hücrelerinden daha küçük oluşları ve stoplazmik boyanma özelliklerinin farlı oluşu nedeniyle kolayca tanınıp ganglion hücrelerinden ayırd edildiler. Pyroninofilik stoplazmaları olan lenfoid hücreler daha küçük boyutlu oluşları ile ganglion hücrelerinden ayırd edildiler.

Protein sentezinin fazla, hücre döngüsünün hızlı olduğu mukoza epitel hücrelerinde pyroninofilik stoplazma özelliği gözlemlendi. Bazı goblet hücreleri de stoplazmik pyroninofili gösterdiler. Ancak tüm bu hücreler lokalizasyon ve şekil özellikleri nedeniyle kolayca tanınıp ganglion hücrelerinden ayırd edildiler.

Schwann hücrelerinde ve aksonik uzantılarında pyroninofilik boyanma görülmedi. Düz kas hücreleri hemen tüm olgularda mavi-yeşil renkte boyanma gösterdi. Belirgin pyroninofili saptanmadı.

Şiddetli fibroblastik proliferasyon ve düz kas hipertrofisi gösteren durumlarda fibroblast ve düz kas hücreleri içerdikleri artmış stoplazmik RNA nedeniyle pyroninofili gösterdilerse de hücrelerin şekilleri, lokalizasyonları, boyutları, daha az yoğun pyroninofili göstermeleri ile ganglion hücrelerinden ayırd edildiler.

Ganglion hücrelerinin en belirgin özelliklerinden biri de belirgin pyroninofilik boyanmış nukleolusların varlığı idi. Ancak kesitin geçtiği düzlemin uygun olmaması nedeniyle zaman zaman bazı ganglion hücrelerinde nukleoluslar izlenemedi.

TARTIŞMA

Hirschsprung hastalığının tanısı aganglionik barsak segmentinin saptanmasına dayanmaktadır (2,9). Bu amaçla biopsi materyalinde H.E yöntemi ile ganglion hücreleri aranması en yaygın kullanılan histopatolojik tanı yöntemidir. Ayrıca nöron spesifik enolaz ve peptiderjik innervasyon ile ilgili histokimyasal yöntemlerle araştırılması; asetil kolin esterase, asetiltiokolik esteraz düzeylerinin enzim histokimyasal olarak araştırılması kullanılan diğer tekniklerdir (2,6,9,12,13).

Ganglion hücreleri nukleolusu belirgin iri veziküler nukleusları, geniş basofilik multipolar, bipolar stoplazmaları ile genellikle kolay tanınan hücrelerdir (9,10).

Ancak ganglion hücrelerinin seyrek olduğu, maturasyonunu tamamlamadığı, biopsi materyalinin müsküler tabakayı içermeyip sadece mukoza ve submukozadan oluştuğu durumlarda Hematoksilen-eosin yöntemi ile ganglion hücrelerini saptamak oldukça güçtür ve patolog için genellikle sorun

oluşturur (2,9).

Ganglion hücrelerinin önemli bir özelliği stoplazmalarında bulunan Nissl granülleridir. Nissl granülleri çok miktarda RNA içeren endoplazmik retikulumdan oluşur (9). Bu nedenle ganglion hücreleri RNA içeriği açısından en zengin hücrelerin başında gelir. RNA'nın büyük ölçüde sentezlendiği yer olan nukleoluslar da ganglion hücrelerinin en çarpıcı özelliklerinden biridir. Çalışmamızda belirtilen bu özelliklerinden yararlanarak ganglion hücrelerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla methyl green pyronin yöntemi uygulandı.

Methyl green pyronin yöntemi nükleik asitlerin özellikle de RNA'nın gösterilmesi için kullanılan histokimyasal yöntemdir (3). İlk olarak Pappenheim tarafından 1898'de tanımlanmıştır (3'den naklen). 1940'da Brachet ile başlayan çalışmalarda nükleik asitlerin boyanma özellikleri incelendi ve Pironin Y'nin RNA'yı, metil greenin DNA'yı boyadığı belirlendi (8'den naklen).

Pironin Y, nükleik asitlerin yoğunlaşmasına, daha sonra kümelenmesine ve çökmesine yol açarak görünür hale gelmesini sağlar. Tek zincirden oluşan poliribonükleotidlere polideoksiribonükleotidlerden daha kuvvetli bağlanır. Daha sabit RNA-pironin Y (RNA-PY) kompleksleri oluşturur. Nükleik asitler içerdikleri baz ve şeker tipine göre değişik pironin Y (PY) konsantrasyonlarında yoğunlaşma (kondensasyon) gösterir. En düşük PY konsantrasyonlarında poliriboadenin (poly-rA) ve poliribourasil (poly-rU) yoğunlaşır. Tek zincirli nükleik asitler, çift zincirli nükleik asitlere göre; riboz içeren nükleik asitler dezoksiriboz içerenlere göre daha düşük PY konsantrasyonlarında yoğunlaşarak görünür hale gelirler. PY konsantrasyonu yükseldikçe özellikle guanin ve sitozinden zengin DNA'nın da yoğunlaşarak boyandığı izlenir. PY konsantrasyonunun $5 \times 10^{-5} M$ veya % 2'den daha yüksek olduğu durumlarda RNA ile birlikte DNA'nın da boyandığı gözlenir (5,8).

Metil green pironin (MGP) yönteminde kromatin yeşil-mavi, nukleolus kırmızı, sitoplazma kırmızı, kıkırdak matriksi, mast hücreleri ve bazen musin kırmızı-portakal renkte boyanır (1,3). Kullanılan PY'nin saflık derecesi boyanın başarısında önemli rol oynar (4). Biolojik Boya Komisyonu, boya sonuçlarının yeterli düzeyde olabilmesi için kullanılan PY'nin en az % 42 oranında aktif madde içermesi gerektiğini bildirmiştir (1). Yapılan çalışmada ticari olarak bulunan PY'lerden bazılarının saflık açısından yeterli düzeyde olmadığı görülmüştür (1,11). Saf PY elde etme ve saflık derecesini belirleme yöntemleri saptanmıştır (1). Bugün için saf PY'nin ticari olarak bulunduğu belirtilmektedir (8).

Belirtilen nedenlerden dolayı MGP yönteminin ışık mikroskopik düzeyde kantitatif RNA-DNA incelemeleri yapmak için yeterince duyarlı bir yöntem olmadığı ileri sürülmüştür (5). Ancak yine de proliferasyon gösteren hücreleri, nonprolifere diferansiye hücrelerden ayırd etmede kullanılabilceği de belirtilmiştir (7).

Çalışmamızda, barsak cidarındaki ganglion hücreleri yüksek düzeydeki RNA içeriklerine bağlı olarak kuvvetli pyroninofilik boyanma özelliği gösterdiler ve böylece diğer hücrelerden kolayca ayırdedildiler. Ganglion hücrelerinin

belirlenmesinde methyl green pyronin yönteminin H.E yönteminden üstün olduğu görüldü. Methyl green pyronin yönteminin barsak cidarındaki ganglion hücrelerinin patolojik durumlarda gösterdikleri değişikliklerin incelenmesinde ve bu arada Hirschsprung hastalığının değerlendirilmesinde yararlı olabileceği düşünüldü. Ayrıca barsaktaki nöral doku gelişiminin ve nöral innervasyon modellerinin incelenmesinde; mast hücreleri ile vaksüler ve nöral yapılar arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde değer taşıyabileceği düşünüldü.

Boya solusyonundaki methyl green/pyronin Y oranı, kullanılan pyronin Y'nin saflık derecesi, solusyonun pH'i, boyama sonrası kurutma işleminin çok iyi yapılması, uygulanan differansiasyon işleminin yeterli olması boyanın başarısında etkili faktörler olarak dikkat çekti.

KAYNAKLAR

1. Andersen AP, Lyon H, Jakobsen P, et al: Nucleic acid staining with methyl green pyronin dyes. *Histochemistry* 84: 279-280, 1986.
2. Ariel I, Vinograd I, Lerner OZ, et al: Rectal mucosal biopsy in agangliosis and allied conditions. *Hum Pathol* 14: 991-995, 1983.
3. Bancroft JD, Stevens A: *Theory and Practice of Histological Techniques* 2. ed. Churchill Livingstone Edinburgh, London, Melbourne, New York, 1982, 151-152.
4. Boon ME, Schleicher A, Wijsman-Grootendorst A, et al: Staining of nucleolus with protein and RNA stains for automatic measurement of nucleolar size in paraffin sections. *Stain Technology* 63: 289-299, 1988.
5. Darzynkiewicz Z, Kapuscinski J, Traganos F. et al: Application of pyronin Y(G) in cytochemistry of nucleic acids. *Cytometry* 8: 138-145, 1987.
6. Hall CL, Lampert PW: Immunohistochemistry as an aid in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *Am.J. Clin. Pathol.* 83: 177-181, 1985.
7. Iseki S, Mori T: Methyl green pyronin stain distinguishes proliferating from differentiated non proliferating cell nuclei after acid denaturation of DNA. *J. Histochem. Cytochem.* 34: 683-687, 1986.
8. Kapuscinski J and Darzynkiewicz Z: Interactions of pyronin Y(G) with nucleic acids. *Cytometry* 8: 129-137, 1987.
9. Lake BD: Hirschsprung's disease and related disorders. In: Whitehead R, ed. *Gastrointestinal and Oesophageal Pathology*. First ed. Churchill Livingstone Edinburgh, London, Melbourne, New York, 1989, 257-276.
10. Levine DS, Haggitt RC: Normal Histology of the colon. *Am. J. Surg. Path.* 13: 966-984, 1989.
11. Lyon H, Andersen AP, Andersen I, et al: Purity of commercial non-certified European samples of pyronin Y. *Histochem J.* 14: 621-630, 1982.
12. Tam PKH: An Immunohistochemical study with neuron-specific enolase and substance P of human enteric innervation. The normal developmental pattern and abnormal deviations in Hirschsprung's disease and pyloric stenosis. *J. Pediatric Surg.* 21: 227-232, 1986.
13. Tam PKH, Lister J: Development profile of neuron-specific enolase in human gut and its implications in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* 90: 1901-1906, 1986.