Patoloji Bülteni 2001; 18(1): 19-23
Turkish Bulletin of Pathology 2001; 18(1): 19-23

Böbrek iğne biopsilerinde tesbitin glomerül morfolojisi ve histokimyasal boyalara olan etkisi (Morfometrik çalışma)

Effects of type of fixation on glomerular morphology and staining (A morphometric study)

Sait Şen [1], Bülent Celasun [2], Ömer Günhan [2], Aziz Aksu [2], Yusuf Oğuz [3]

[1] *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, İzmir*

[2] *Gülhane Askeri Tıp Akademisi Patoloji Anabilim Dalı, Ankara*

[3] *Gülhane Askeri Tıp Akademisi Nefroloji Bilim Dalı, Ankara*

Böbrek biopsilerinin fiksasyon aşamasında farklı tesbit solusyonları kullanılmaktadır. Bu farklılık histolojik kesitlerde ve rutin histokimyasal boyalarda farklı görünümlere yol açmaktadır. Bu çalışmada, en sık kullanılan formalin ve Bouin fiksatifleri, böbrek biopsisinin farklı korlarına aynı anda uygulanıp, hematoksilen eozin, Masson trikrom, methenamine silver ve periodik asit Schiff boyama yöntemlerinin kalitesi ile glomerül boyutundaki farklılıklar araştırılmıştır .

Morfometrik olarak, Zeiss Vision (KS 400 ver 1.2) görüntü analizi yazılımı kullanılarak 301 glomerül visseral ve parietal yaprakları çizilmiş; her birinin alan, çevre ve çapları ölçülmüştür. Her iki fiksatifte glomerül visseral yaprağından yapılan alan ölçümlerde anlamlı fark yokken (p>0,05), parietal yapraktan yapılan ölçümler formalin ile fikse olan örneklerde anlamlı olarak büyük bulunmuştur (p<0.0001). Rutin histokimyasal boyaların uygulandığı kesitlerde iki fiksatifin birbirine üstünlüğü açıkça ortaya konamamıştır. Hematoksilen eozin kesitlerde ise araştırıcılar objektif bir değerlendirme yapamamış ve alışkın oldukları fiksatifi tercih etmişlerdir.

Sonuç olarak böbrek kesitlerinin değerlendirilmesinde fiksatiflerin glomerül morfolojisini özel biçimde etkileyebileceği ortaya konulmuştur. Bu etkiler, bazı lezyonların tanısında yanılgılara neden olabilecek derecede olduğundan morfolojik değerlendirmede dikkate alınmalıdırlar.

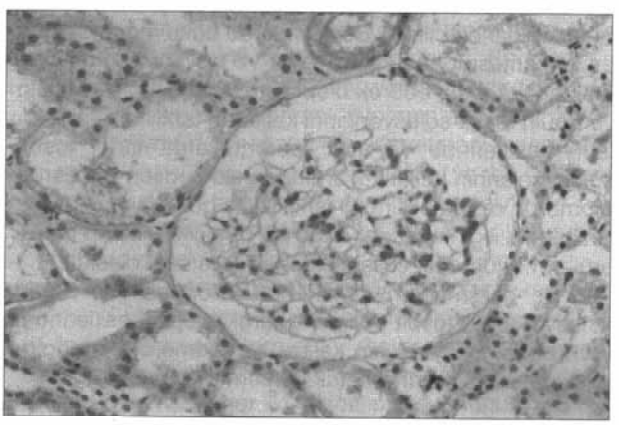
Anahtar Kelimeler: Böbrek biopsisi, morfometri, fiksasyon, glomerül

At the fixation process of kidney biopsies different fixatives are used and this may cause different pictures on histological slides in this study, all consecutive renal needle biopsies were separated into two cores and one core has been fixed in 4% formalin and theother in Bouin' solution. Paraffin sections were prepared and routinely stained. Staining quality of hematoxylin eosin, periodic acid Schiff, methenamine silver and Masson's trichrome stains and glomerular size were evaluated.

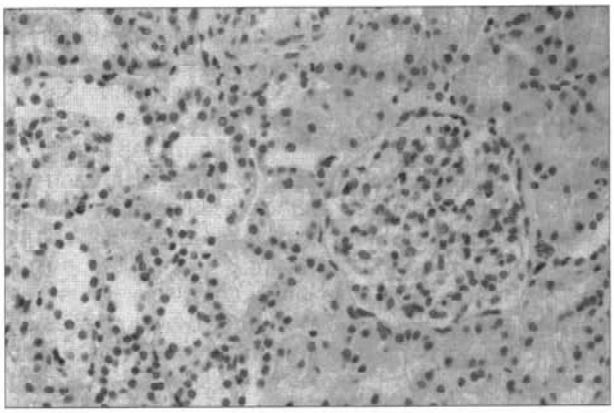
Visceral and parietal membranes of glomeruli were drawn using Zeiss Vision (KS 400 ver 1.2) image analysis software. Area, perimeter, and feret calculations were done by the system. Three-hundred and one glomeruli were evaluated. Perimeters of the parietal membranes were significantly higher in the formalin-fixed group (p<0.0001), but visceral membranes were not (p>0,05). The quality of the special stains were similar between the groups. On hematoxylin eosin sections the observers were apparently aware of the differences and choose the samples fixed with their favored fixative.

As a result, it has been demonstrated that the type of the fixatives used affect the morphology of the glomeruli. Since that influence of the fixative may cause misdiagnosis, it has to be taken into account during diagnosis.

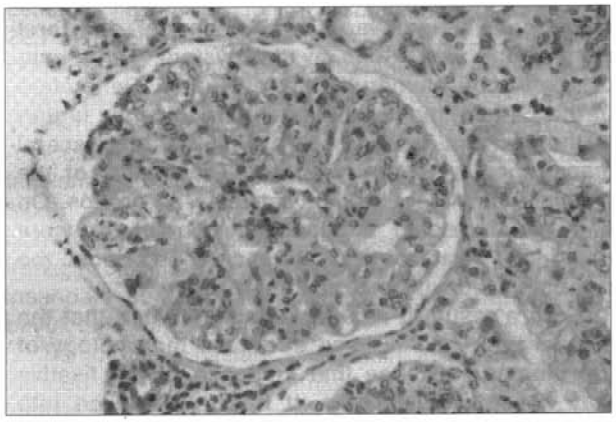
Key Words: Kidney biopsy, morphometry, fixation, glomerulus



Resim 1A: Hematüri nedeniyle araştırılan ve biopsisi normal sınırlarda değerlendirilen olguda glomerüller. Olgu 7, formalin, (HE, x200).



Resim 1B: Hematüri nedeniyle araştırılan ve biopsisi normal sınırlarda değerlendirilen olguda glomerüller. Olgu 7, Bouin (HE, x200).



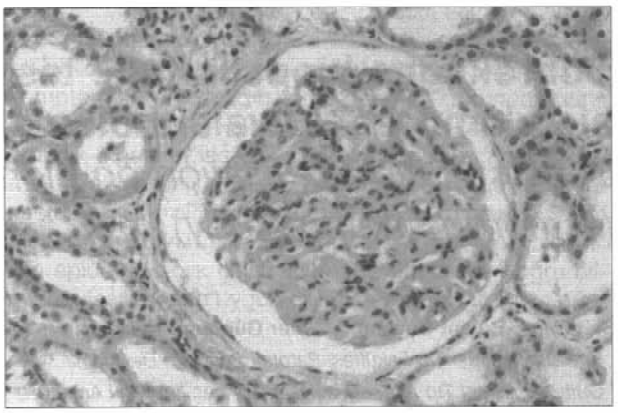
Resim 2B: Nefrotik sendromlu ve MPGN tanısı alan olguda glomerüller. Olgu 3, Bouin (HE, x200).

Böbrek iğne biopsilerinin tesbit ve takip aşamasında farklı solusyonlar ve yöntemlerin önerildiği ve kullanıldığı görülmektedir [1,2]. Tesbite veya takip aşamasına bağlı olarak böbrek biopsi kesitleri arasında bir takım morfolojik farklılıklar olabilir [1-4]. Bu işlemlerde doku morfolojisinin bozulmaması, daha kaliteli kesit ve boyanma amaçlanmaktadır. Ancak, böbrek biopsilerinin tesbitinde formalin ve Bouin tesbit solusyonlarını kullanan farklı laboratuvarların kesitlerinde ve aynı laboratuvarda farklı tesbit solusyonlarının kullanımı ardından elde edilen kesitlerde glomerül morfolojisinde farklılıklar gözlemlemekteyiz. Tesbit farklılığının oluşturduğu bu değişikliklerin glomerüler morfometrik çalışmaları da etkilemesi olasıdır .

Bu çalışmada % 4'lük nötral formalin ve Bouin solusyonunda tesbit edilmiş böbrek biopsi kesitlerinde, rutin böbrek boyalarının kalitesi ve glomerüler morfolojideki farklılıklar morfometrik yöntem ile araştırıldı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ardışık olarak böbrek iğne biopsi materyalleri



Resim 2A: Nefrotik sendromlu ve MPGN tanısı alan olguda glomerüller. Olgu 3, formalin (HE, x200).

immunfluoresan inceleme için parça alındıktan sonra ikiye ayrılarak % 4'lük nötral formalin ve Bouin solusyonlarında tesbit edildi. Dokular rutin takip ardından parafine gömüldü, hazırlanan 3-5 µm kalınlıktaki tüm kesitlere aynı şartlarda hematoksilen eozin (HE), periodik asit Schiff (PAS), Masson trikrom ve Jones methenamine silver boyaları uygulandı. İkisi renal patoloji (SŞ, OG), ikisi de renal patoloji dışında (BC, AA) çalışan dört araştırıcı farklı fiksatif ve boyalara ait tüm kesitleri kör olarak inceledi. Fiksatiflerin farklı boyama metodlarında boyanma kalitesine etkisi için, tüm araştırıcılar her bir boyama metodunda daha nitelikli bulduğu kesiti seçti, kesitler arasında tercih yapamadığında fark yok diye belirtti. Boyama metodları için tüm araştırıcıların fiksatif tercih yüzdesi hesaplandı.

Morfometrik inceleme için HE kesitlerden 5 'ten fazla glomerül içeren biri rastgele seçilip, glomerül görüntüleri Zeiss Axioscope mikroskop, 10x planapochromat objektif, Sony CCD video kamera ve Kontron frame grabber yardımı ile Intel 486 66Hz işlemcili bilgisayar ortamına aktarıldı. Görüntü üzerinde glomerüler yumağın dışı (visseral yaprak) ve parietal yaprakları (Bowman kapsülü) çizilerek Zeiss Vision KS 400 ver. 1.2 görüntü analizi yazılımı ile en büyük/en küçük çaplar, perimetre ve alan otomatik olarak hesaplandı. Her olguda tüm ölçümlerin ortalaması alınarak, formalin ve Bouin solusyonları arasındaki morfometrik farklılıkların istatistiksel anlamı, eşleştirilmiş örnekler için t testi kullanılarak araştırıldı.

BULGULAR

On üç olgunun biopsi örneği yeterli bulunarak çalışmaya alındı. Bu olguların klinik ve patolojik özellikleri tablo 1'de verildi.

Her iki fiksatife ait HE kesitlerde, araştırıcılardan ikisi, olguların 12'sinde formalin tesbitlileri tercih ederken diğer iki araştırıcı tam tersine (10 ve 11 olgu) Bouin tesbitli kesitleri tercih etmişti (Resim 1-3). Diğer boyalarda ise tercihlerde bu kadar belirgin bir farklılık olmadığı

O	Yaş	C	Klinik	P	Patoloji	Öykü, Özellik
1	20	E	Asemptomatik P	4	MMP	4 ay önce akut nefritik sendrom
2	20	E	SLE böbrek tutulumu	1.5	Lupus nefrit WHO IV	Eklem ve kas ağrısı etiolojisi
3	21	E	NS	7	MPGN	Enfeksiyon ardından gelişen ödem
4	22	E	Asemptomatik P+H	0.3	MMP	4 ay önce akut nefrotik sendrom
5	26	E	Asemptomatik P+H	0.5	MMP	hematüri etiolojisi, anti tbc tedavili
6	37	E	NS (Hodgkin lenf.)	10	MLH ile uyumlu	1992 de Hodgkin hastalığı
7	37	E	Asemptomatik P+H	0.5	Normal sınırlarda	hematüri etiolojisi, tbc -
8	24	E	Asemptomatik P	1.5	MMP	Guatr operasyonu rutininde P.
9	22	E	NS	3.7	MPGN	
10	32	E	NS	10	MPGN	1 yıllık ödem öyküsü
11	21	E	Asemptomatik P+H	2	Ig A nefropatisi	Steroid tedavi sonrası takip
12	24	E	Asemptomatik P+H	4	Ig A nefropatisi	klinik araştırma sırasında
13	43	E	NS	12	FSG	1 aydır ödem öyküsü

O, olgu; C, cinsiyet; E, erkek; P, Proteinüri (gm/gün); MMP, minimal mezenjial proliferasyon; NS, nefrotik sendrom; H, hematüri, MLH, minimal lezyon hastalığı; MPGN, membranoproliferatif glomerülonefrit; FSG, fokal segmental glomerüloskleroz, tbc; tüberküloz

Tablo 1: Olgulara ait özellikler

ancak methenamine silver'da Bouin fiksatifli kesitlerin daha çok tercih edildiği dikkati çekti. Tüm araştırıcıların boyama metodlarına göre tercih ettikleri fiksatif yüzdeleri tablo 2'de verildi. Genel olarak 4 araştırıcı da aynı olgunun özel boyalarında farklı fiksatifleri tercih etmişti. Ayrıca araştırıcıların tercih ettikleri fiksatif olgular arasında da değişkenlik göstermekteydi.

Morfometrik olarak 148'i Bouin, 153'ü formalin ile tesbitli toplam 301 glomerül incelenmiştir. Formalin tesbitli glomerüllerin parietal yapraktan yapılan tüm ölçümlerinin anlamlı olarak büyük olduğu saptanmıştır ($p<0.0001$). Visseral yaprağa göre yapılan ölçümlerde ise iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.1$) (Tablo 3).

TARTIŞMA

Böbrek biopsisi değerlendirilen merkezlerde ve kaynaklarda farklı tesbit ve takip aşamaları olduğunu görmekteyiz. Bunlarda daha kaliteli kesit elde etme ve boyanma kalitesini artırma amacı yanısıra bireysel

Fiksatif tercihi	HE	PAS	MT	MS
Formalin	% 50	% 38.46	% 48.08	% 21.15
Bouin	% 42.30	% 32.69	% 42.31	% 65.38
Fark yok	% 7.70	% 28.85	% 9.62	% 13.46
Toplam	% 100	% 100	% 100	% 100

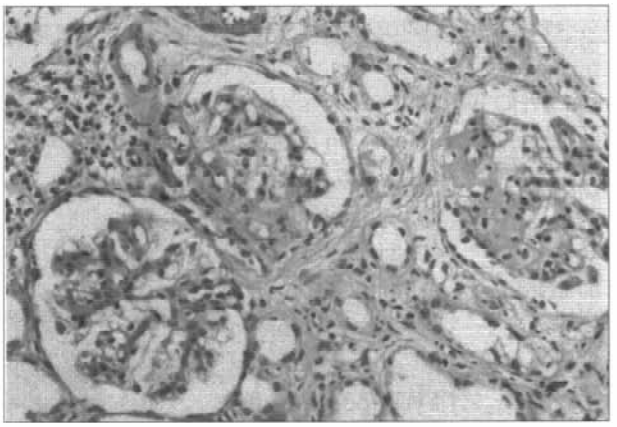
HE; hematoksilen eosin, PAS; periodik asit Schiff, MT; Masson trikom, MS; Jones methenamine silver.

Tablo 2: Araştırıcıların her bir histoşimik inceleme için formalin ve Bouin fiksasyonunu tercih yüzdeleri.

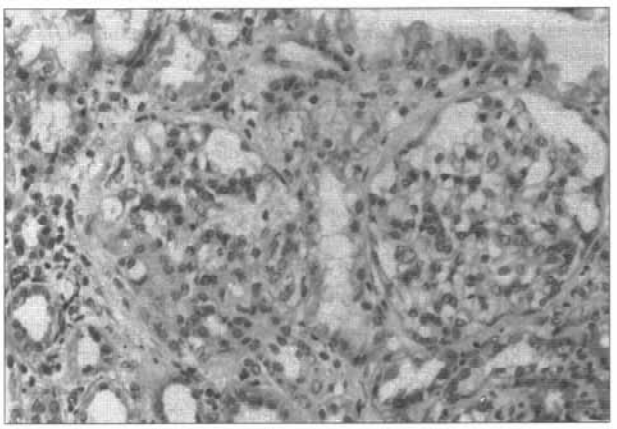
alışkanlıklar veya laboratuvar koşulları gibi bazı faktörler etkili olmaktadır. Bu aşamalarda doku morfolojisinin bozulmaması istenilen bir özelliktir. Böbrek biopsi kesitlerinde, hastanın bireysel özelliklerine [3,5,6,7] ve glomerüler patolojiye [3,4,8-12] ait morfometik farklılıklar dışında tesbit ve takibe bağlı morfometrik farklılıklar beklenmektedir [1-4]. Biz de formalin ve Bouin solusyonlarında tesbit edilmiş böbrek kesitlerinde Bowman mesafesinde ve glomerüler yumakta hücresellikte ve bazal membran yapısında farklılıklar gözlemekteyiz. Bu çalışmada aynı hastaya ait biopsi korlarını % 4'lük nötral formalin ve Bouin fiksatifleri ile eş zamanlı fikse ve takip ederek iki fiksatifin rutin koşullarda boyama kalitesine ve morfometrik ölçümlere olan etkilerini araştırmayı amaçladık.

Dört araştırıcı hematoksilen eozin ve methenamine silver boyalarında Bouin solusyonunun boyanma kalitesini olumlu etkilediği konusunda hem fikirdir. Ancak HE kesitlerde Bouin solusyonu, nükleer detayı daha belirginleştirmekte ve nükleusların normale göre daha büyük görünmesine neden olmaktadır. Bu nedenle hücresel proliferasyon izlenimi verebilmektedir. Ayrıca rutin HE kesitlerde Bouin solusyonuna alışkın olmayanlarda Bowman mesafesini daraltması nedeniyle Bowman kapsülüne olan yapışıklıkları ve bazal membran konturlarını tam göstermemesi nedeniyle de normal veya minimal değişiklikler izlenen glomerülleri değerlendirmede yanılgıya yol açabilir. Erken dönem membranöz glomerülonefritte HE ile Bouin fiksatifinde glomerül bazal membranını değerlendirmek güç olabilir ve immünfluoresan inceleme, methenamine silver gibi özel boyama teknikleri kesin tanı için gereklidir.

Bu çalışmada her iki tesbit solusyonunun kesit ve boyanma kalitesinde birbirine olan üstünlüğü açıkça ortaya konamadı. Sonuçlar her araştırıcının özel boyalarda sürekli aynı fiksatifi seçmediğini ve araştırıcılar arasın-



Resim 3A: Nefrotik sendromlu ve glomerüloskleroz tanısı alan olguda glomerüller. Olgu 13, formalin, (HE, x200).



Resim 3B: Nefrotik sendromlu ve fokal segmental tanısı alan olguda glomerüller. Olgu 13, Bouin, (HE, x200).

da da fiksatif tercihinin değişken olduğunu ortaya koymuştur. Bu değişkenliği yorumlamak güçtür. Hematoksilen eozin kesitlerde ikişer araştırıcınında formalin veya Bouin fiksatifini tercih etmesi bu araştırıcıların fiksatif alışkanlıkları ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca laboratuvar koşullarının değişkenlik göstermesi de özel boya kalitesini fiksatifler kadar etkileyebilir. Genel olarak HE dışında aynı fiksatif, aym araştırıcı tarafından sürekli tercih edilmediği gibi, aynı olgunun farklı boyalarında da aynı fikstatif kesitleri tercih edilmemiştir. Gözlemciler arasında özel boyalarda fiksatif tercihinde uyum oldukça düşük olduğundan kesin bir yorum yapılamamıştır .

Morfometrik çalışma aşamasında formalin tesbitli böbreklerin parietal yapraktan yapılan tüm ölçümlerinin Bouin'e göre anlamlı olarak büyük olması, visseral yaprak ölçümlerinin anlamlı fark göstermemesi, Bowman mesafesindeki büyümenin, glomerül yumağın küçülmesinden çok interstisyumum büzülmesinden kaynaklandığım düşündürmektedir. Bouin solusyonunda glomerüler yumağın Bowman mesafesini doldurması, içindeki glasial asetik asitin, pikrik asitin büzücü etkisini

Ölçüm	Formalin (SS)	Bouin (SS)	p değ
Par. büyük çap	223±32 μm	191±29 μm	0.000
Par. küçük çap	172±27 μm	147±23 μm	0.000
Par. alan	30096±9502μm²	22101±7341μm²	0.000
Par. perimetre	663±99 μm	569±86 μm	0.000
Vis büyük çap	173±29 μm	171±27 μm	0.746
Vis. küçük çap	134±26 μm	132±22 μm	0.521
Vis. alan	18044±6640 μm²	17864±6140 μm²	0.657
Vis. perimetre	555±132 μm	520±87 μm	0.211

SS, Standart sapma; Par, parietal yaprak; Vis. visseral yapraktan yapılan ölçümün ortalaması

Tablo 3: Formalin ve Bouin takibinde glomerüllere ait ölçümlerin ortalama, standart sapma ve istatistiksel anlamları.

tamponlamadaki dengesizliğinden kaynaklanabilir [13]. Bu aynı zamanda yalancı hücresel proliferasyon görünümüne yol açabilir. İçindeki bu maddeler nedeniyle Bouin solusyonu mordant olarak da kullanılmaktadır .

Glomerüler morfometri ile ilgili çalışmalar glomerül boyutunun prognostik önemi ve teknik imkanların artması ile ön plana çıkmıştır. Bu çalışmada % 4 'lük nötral formalin kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda genelde %10'luk nötral formalin kullanıldığı, glomerüler ölçümlerin de yumak [5-11] veya kapsülden [3,4,8-10] yapılmış olduğu görülmektedir. Morfometrik olarak formalinin değişik konsantrasyonları arasında belirgin bir fark yoktur [14]. Bizim ölçümlerimizden çıkan bir diğer sonuca göre tesbit solusyonları farklı olsa da glomerül visseral yaprağından yapılan ölçümlerde anlamlı fark yoktur ve dolaşım bozukluğu sonucunda oluşan glomerüler patolojiler (iskemik glomerüler kollaps) ve Bowman mesafesinde genişlemeye neden olabilen üreter obstrüksiyonu gibi olaylar dışında, glomerül boyutu çalışmalarında visseral yaprak ölçümlerinin kullanılması daha uygun olabilir. Ancak visseral yaprak ölçümlerinin kullanılması daha uygun olabilir. Ancak visseral yaprak ölçümleri glomerül lobüllerinin belirgin hale geldiği lobuler glomerülonefrit gibi özel durumlarda birtakım zorluklar yaratabilir .

Böbrek kesitlerinde seri kesitlerle takip etmediğimiz sürece glomerülün tam boyutunu saptamak güçtür. Bu nedenle farklı yöntemler önerilmektedir [3,4,6,7]. Bu çalışmada rastgele 5'ten fazla glomerül içeren bir kesit seçilmiş ve kesitteki tüm glomerüllerde ölçümler yapılmıştır. Çalışma iki farklı tesbit solusyonunun glomerüler morfolojiye olan etkisini araştırmayı amaçladığından ve iki grupta da aynı yöntem uygulandığından uygulamamızın yeterli olduğunu düşünüyoruz. Glomerül boyutunu saptamaya yönelik çalışmalarda diğer yöntemler uygulanabilir.

Bulgularımız böbrek biopsi kesitlerini değerlendirirken kullanılan tesbit solusyonunun özelliklerinin

gözönüne alınması gerektiğini ve morfometrik ölçümlerde visseral yaprak ölçümlerinin yapılmasının daha uygun olacağını göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Zollinger HU , Mihatsch MJ. Renal Pathology in Biopsy Light, Electron and Immunofluorescent microscopy and clinical aspect. Berlin: Springer V erlag, 1978; 8-9 ve 28-29 .
2. Pirani CL, Croker BP. Handling and processing of renal biopsy and nephrectomy specimens. In: Tisher CC, Brenner BM. editors. Renal pathology with clinical and functional correlations. 2th ed. (vol 2) Philadelphia: JB Lippincott Company, 1994; 1683-1694.
3. Newbold KM, Howie AJ, Girling AJ, Kizaki T, Bryan RL, Carey MP. A simple method for assessment of glomerular size and its use in the study of kidneys in acromegaly and compensatory renal enlargement. J Pathol 1989; 158: 139-146.
4. Newbold KM, Howie AJ, Koram A, Adu D, Michael J: Assessment of glomerular size in renal biopsies including minimal change nephropathy and single kidneys. J Pathol 1990; 160: 255-258.
5. Kasiske BL, Umen AJ. The influence of age, sex, race and body habitus on kidney weight in humans. Arch Pathol Lab Med 1986; 110: 55-60.
6. Abdi R, Slakey D, Kittur D, Racusen LC. Heterogeneity of glomerular size in normal donor kidneys: impact of race. Am J Kidney Dis 1998; 32: 43-46.
7. Abdi R, Slakey D, Kittur D, Burdick J, Racusen L. Baseline glomerular size as a predictor offunction in human renal transplantation. Transplantation 1998; 66: 329-333.
8. Newbold KM, Howie AJ. Determinants of glomerular cross-sectional area. J Pathol 1990; 162: 329-332.
9. Suzuki J, Yoshikawa N, Nakamura H. A quantiative analysis of the glomeruli in focal segmental glomerulosclerosis. Pediatr Neprol 1994; 8: 416-419 .
10. Moore L, Williams R, Staples A. Glomerular dimensions in children under 16 years of age. J Pathol 1993; 171: 145-150.
11. Muda AO, Feriozzi S, Cinotti GA, Faraggiana T. Glomerular hypertrophy and chronic renal failure in focal segmental glomerulosclerosis. Am J Kid Dis 1994; 23: 237-241.
12. Fogo A, Hawkins EP, Berry PL, Glick AD, Chiang ML, MacDonell RC, Ichiklawa I. Glomerular hypertrophy in minimal change predicts subsquent progression to focal glomerular sclerosis. Kidney Int 1990; 38: 115-123
13. Sheean DC, Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. 2. Baskı. Ohio: Batelle Press, 1980; 40-58
14. Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. Formaldehyde fixation. J Histo Cytochem 1985; 33:845-853.