Fiksasyon ve histoteknikte mikrodalga uygulanması

Ş. Dilek Öcal*

ÖZET

Fiksasyon, hücre ve dokuların mikroskopik incelenmesinde canlılık olayının bir noktada durdurulmasıdır. Bunun için çok değişik yöntemler ve kimyasal maddeler kullanılabilmektedir. Bunların içinde en yaygın olanı ve bir yüzyıldır öncelikle seçileni formalindir. Her ne kadar değişik amaçlar için farklı fiksatifler kullanılmakta ise de formalin rutin diagnostik araştırmalar için en seçkin olan fiksatiftir. Ayrıca modern laboratuvarlarda kullanılmaya başlanan mikrodalga (Microwave) fırınları, fiksasyon ve arkasından gelen her tür histoteknik uygulamayı hızlandırmakta ve sonuçta varılan kaliteyi yükseltmektedir. Bu yazımızda fiksasyonla ilgili gelen bilgiler ve microwave (MW) fırını kullanarak formalin fiksasyonu yöntemi anlatılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Fiksasyon, Mikrodalga, Histoteknik

SUMMARY

The living state of cells and tissues must usually be stopped for microscopical study by fixation. Several methods and chemical solutions in particular are used for fixation. The most recognized and accepted fixative 10% formalin solution which is 4% of saturated formaldehyde. Formalin has been routinely used for more than one century. There are, however, other fixatives for special purposes. Microwave (MW) Ovens, both household type or specifically designed for laboratory usage, are nowadays indispensable in histoprocessing for modern diagnostic and research microscopy. Using MW-ovens, all kinds of histological procedures can effectively be shortened and the results obtained are superior. We present here the general rules governing fixation procedure and application of MW method for routine formaline fixation for light microscopy.

Key Words: Fixation, Microwave, Histotechnic

FİKSASYON OLAYINA GENEL YANAŞIM

Hücreler ve bunlardan oluşan dokular değişik yöntemlerle incelenebilmektedir. Bunlar arasında en geniş uygulama alanı bulanı mikroskopik incelemedir. Bu yöntem hücre ya da dokular hakkında yapısal bilgiler vermektedir. Mikroskopik olarak incelenecek hücre ve dokuların canlılık özelliklerinin, genel olarak, belli bir noktada bloke edilmesi gerekmektedir. Çünkü ışık mikroskopisi veya diğer tip mikroskopik incelemelerde söz konusu hücre ve dokuların görünür hale getirilmesinde uygulanan hemen bütün metodlar bu esas üzerine kurulmuştur. Hücre ve dokuların anatomik ve sellüler yapılarını bozmaksızın, yaşam süreçlerini sona erdiren bu işlem fiksasyondur.

Ranvier'in (1895), hücrelerin boyanabilmeleri için fiksasyonun kaçınılmaz oluşunu savunmasına karşılık bu, temelde doğru olmayan bir hipotezdir. Canlılığı süren hücre ve dokuları vital boyalarla, fikse etmeden mikroskopta görünür hale getirmek olasıdır. Ancak fikse olmamış hücre ve dokuların saklanabilmeleri ve arşivlenmeleri söz konusu olamayacağından tanısal sitoloji veya histolojide fiksasyon gerekmektedir. Her hangi bir koruyucu işlem ya da fikse edilmeyen hücre ve dokular otoliz sonucu süratle kendilerini tahrip etmektedirler. Otoliz, hücrelerin kendi kendisini eritmesi ve parçalaması demektir. Gerçeğe en yakın yapısal mikroskopik özellikler ise iyi bir fiksasyon ile gerçekleşebilmektedir. Seçilen fiksasyon yöntemi ne olursa olsun, amaç hücrelerin belli morfolojik özelliklerini korumaya almaktır. Ancak bu şekilde bilimsel araştırma ve tanısal incelemelerde güvenilir ve kalıcı, boyanmış preparatlar elde edilebilmektedir.

Fiksasyon için kullanılan yöntem genel olarak şu özellikleri gerçekleştirmelidir:

1- Hücreleri yıkım ve otolize olmaktan kurtarmalıdır (Prezervaif etki).

2- Hücrelerin şekil ve yapısının bozulmamasını sağlamalıdır (Stabilizasyon etkisi).

3- Hücreyi oluşturan yapı taşları ve organellerin kaybına engel olmalıdır.

4- Değişik boyalarla, hücresel kompartmanların boyanmasını hazırlayan reaktif moleküler alanlar yaratabilmelidir.

5- Hücre membranını sıvıların ve boyaların geçişine uygun hale getirmelidir.

* Tıbbi Teknolog, Sevgi Hastanesi Patoloji Laboratuvarı, Ankara

Genellikle hücrelerin fiksasyonu ve prezervasyonu hemen aynı zamanda gerçekleşmektedir. Fiksatiflerin büyük bir kısmı hücrenin submikroskopik ve moleküler yapılarıyla kimsayal bileşikler oluşturmakta ve bu yolla hücre içi enzim aktiviteleri bloke edilmektedir. Fiksasyonu sağlamak üzere kullanılan fiksatiflerin tümü, hücrelerin sitoplazma-nükleus şekillerini ve de boyutlarını değiştirmektedirler. Fiksatifin konsantrasyonu, pH derecesi, ısısı ile kimyasal yapısı bunda rol oynamaktadır. Dondurma (Frozen) yolu ile de hücre ve dokular fikse edilebilir. Bu olayda her hangi bir sıvının fizik veya kimyasal işlemi söz konusu olmadığından, lipid ve proteinik hücresel elemanlar, donma anındaki yer ve şekillerini korurlar. Proteinler hücrenin ana yapı taşlarıdır. Fiksasyon için kullanılan sıvıların pek çoğu bu komponent üzerine etkilidir. Alkol ve aseton, proteinlerin pıhtılaşmasını ve doğal yapılarını kaybetmelerini (koagüle olmalarını) sağladıklarından bunlara Koagülan Fiksatif adı verilir. Isı, dondurma veya havada kurutma gibi fiziksel yöntemler de proteinleri koagüle ederek fiksasyonu sağlamaktadır.

Proteinler uzun ve büyük moleküler yapılardır. Bunlar arasında yeni yan bağların oluşması ve doğal yapılarının korunması aslında ideale daha yakın bir olaydır. Bu yan bağlar sayesinde proteinleri oluşturan peptid zincirlerinin yaptığı bir ağ meydana gelmekte, sekonder ve tersiyer moleküler uzantılar serbest kalmaktadırlar.

Hücreler üzerinde en kuvvetli büzüşme etkisini alkoller göstermektedir. Buna karşılık aldehidli fiksatifler, proteinlerde bir ölçüde şişmeye neden olmaktadırlar. Asetik asit ise hücreleri en çok şişiren bir sıvıdır. Bunun için bazı fiksatiflere belli oranlarda asetik asit karıştırılmaktadır.

Her tip fiksasyon aynı zamanda nukleusun kromatin yapısı üzerinde de etkilidir. DNA moleküllerinin proteinik özellikleri burada en önemli faktördür. Fiksasyon ve takip eden diğer işlemleri sırasında bazı tip moleküllerinin kaybolması söz konusudur. Bu olay, öncelikle hidratasyon ve dehidratasyonda meydana gelmektedir. Glikojen ve lipidlerin sıklıkla hücre dışına atılışı veya kullanılan sıvılarda erimeleri buna örnek olarak verilebilir. Aldehidli fiksatifler (10% Formalin gibi) ve yan bağlar oluşturan diğer solüsyonlar genellikle proteinlein iyi bir şekilde korunmalarını sağlamaktadır. Oluşan ağsı proteinik yapılar suda eriyen proteinleri, gliserol ve lipidleri içlerinde fiziksel olarak hapsederler. Alkollü fiksatifler ve dehidratasyon ise lipidleri hemen tamamen eriterek hücreden çıkarırlar. Bu nedenle örneğin yağ hücrelerinde sitoplazma, gerçekte mevcut olmayan bir boşluk şeklinde görülmektedir.

Proteinlerde fiksasyonla oluşan sekonder ve tersiyer yapılar, taşıdıkları pozitif veya negatif elektriksel yüklerine göre bazik veya asidik boyalara karşı affinite (çekici, bağlayıcı güç) göstermektedir. Bu nedenle fiksatifin pH değeri, proteinin boya alma karakterini ve kullanılacak boyanın pH'sını da ekileyebilmektedir. Havada kurutularak fikse edilen materyalde, proteinlerin sekonder ve tersiyer yapıları bloke edilmiş olduklarından nukleusu ve kromatinin Hematoksilen ile boyanması, alkol veya formaldehidli solüsyonla fikse edilmiş hücrelerle karşılaştırıldığında, hissedilir derecede zayıftır. Havada kurutulmuş smearlerde ve kan yayma preparatlarında, örneğin Romanowski-Giemsa boyamasında, sekonder olarak metanol veya etanol fiksasyonu uygulanarak reaktif proteinik uçları serbestleşmesi sağlanır.

Canlı hücre membranı, boyamada kullanılan kimyasal maddelere karşı hemen hiç geçirgen değildir. Bu, Ranvier'in "Hücreleri boyamak için fikse edilmeleri gerekir" hipotezini koymasının nedenidir. Ancak canlı hücreler de boyanabilir ve mikroskopik olarak incelenebilirler. Örneğin hücre kültürlerinde canlılık olayı devam ederken hücreleri fikse etmeden mikroskopla izlemek olasıdır. Bronş veya gastro-intestinal aspirasyon sıvılarındaki hücreler fikse edilmeden titrek tüyleri yönünden Janus Green gibi vital boyalarla boyanarak incelenebilirler. Bu şekilde, hücrelerin canlılıklarını fiksasyonla bloke etmeden boyamaya 'Vital Boyama' denir. Vital boyalar önce hücre membranındaki lipidlerde erimekte ve ancak bundan sonra hücre içine penetre olabilmektedir. Rutin olarak kullanılan boyalar ise hücre membranında her hangi bir kimyasal değişime uğramaksızın doğruca hücre içine girmektedirler. Buna yardım eden en önemli faktör fiksasyondur, çünkü bu yolla hücre membranı non-permeable olma karakterini yitirmekte ve geçirgen bir yapı şeklini almaktadır.

Fiksatiflerin dokulara işleme hızı (penetrasyon hızı) büyük değişiklikler göstermektedir. Alkol (etanol) düşük bir penetrasyon hızına sahiptir. Bunu artan penetrasyon hızı sırarıyla: Osmik asit (OsO_4), Cıva Klorür ($HgCl_2$), Formaldehid (CH_2O_3) ve asetik asit izlemektedir. Fiksatif ne kadar hızla penetre olursa dokularda otoliz olayı daha az gerçekleşir. Bu nedenle alkolde fikse edilen dokuların kesit yüzünde, fikse olmuş dar bir alan ve bunun gerisinde otolize olmuş geniş bir doku bölgesi izlenir. Dolayısıyla alkol, sitolojik uygulamalar dışında tek başına fiksatif olarak kullanılmaz veya kullanılmamalıdır. Alkol ancak PEG* ile karıştırıldığında histolojide kullanılabilecek özellikler göstermektedir. Sitolojik fiksatif olarak jinekolojik smearlerde, FNAB (IIAB) yaymalarında veya frottilerde alkol, özellikle PEG (PolyEthylene Glycol) eşliğinde spray şeklinde uygulanmaktadır.

Cıva bileşikleri taşıyan fiksatifler kromozomlar, Osmium tetroksit elektronmikroskopisi, formaldehidli fiksatifler ise genel histolojik incelemeler için rutin olarak kullanılmaktadır.

Bir fiksatif sıvısında ana maddenin konsantrasyonu, sıvının ısısı, pH değeri, fizikoşimik karakterleri ve osmolarite; mikroskopta görmek istediğimiz hücre ve dokular üzerinde ileri derecede etkilidirler. Şüphesiz dokuların bu

fiksasyon sıvısı ile olan ilişkileri de fiksasyon olayında ve bundan sonraki evrelerde rol oynamaktadır. Formaldehidli fiksatiflerde doku/sıvı oranı en az 1/10, tercihan 1/50 şeklinde olmalıdır. Ayrıca fikse edilecek doku hacmi ile fiksasyon süresi arasında doğru orantılı bir artım söz konusudur, yani doku büyüklüğü 2 defa arttığında fiksasyon için gerekli süre de 2 kere uzamaktadır. Bu da sıvının belli ısı ve konsantrasyonda göstereceği penetrasyon hızından kaynaklanmaktadır.

Koagülasyon ve denatürasyon yapmayan sıvılar kullanıldığında, örneğin formalin, fiksasyon bir kimyasal olay olarak ortaya çıkmakta ve bunun tamamlanması için belli bir süre gerekmektedir. Bu süre, fiksatifin ısısındaki artışla ters orantılı olarak azalmaktadır, diğer bir deyimle kimyasal reaksiyon hızlanmaktadır; ancak artan ısı hücrelerdeki sitoliz ve otoliz olaylarını da hızlandırmaktadır. Bu nedenle fiksatifin ısısını artırarak fiksasyonu hızlandırmak önerilmemektedir. Rotatuvar hareketlerle sıvı doku ilişkisi daha etkin bir hale getirilirse fiksasyon olayı bir ölçüde hızlanmaktadır. Her ne tip fiksatif sıvı veya fiksasyon metodu seçilirse seçilsin hücre veya dokusal düzeyde artefaktlar olmaktadır. Dolayısıyla ne zaman, hangi nedenlerle, hangi tip fiksatif veya fiksasyon metodunun kullanılması gerektiğini önceden doğru olarak saptamak şarttır. Örneğin yağ dokusu hücreleri incelenmek istendiğinde Alkollü fiksatif ve işlemlerden kaçınmak gerekecektir. Elektron mikroskopik inceleme için öncelikle Glutaraldehid ve sekonder fiksatif olarak Osmik asit kullanılacaktır.

Doku ve hücreleri, yeni ve modern bir histoteknolojik yöntem olan Mikrodalga Metodunu kullanarak fikse etmek ve gerekli bütün ileri aşamaları bu yöntemle tamamlamak olasıdır. Bu yöntem, her ne kadar belli kısıtlamalar getirmekte ise de, buraya kadar anlatılanlardan daha etkili olarak çalışmakta, kimyasal olayları hücre ve doku düzeyinde son derece süratli şekilde gerçekleştirmekte, mikroskopide giderek artan bir ilgiyle çok geniş kullanım alanları bulmaktadır. Hollanda'da, Leiden Sitoloji-Patoloji Laboratuvarında Dr. Mathilde E. Boon,[1] ve Türkiye'de İzmir'de, Melis Patoloji Laboratuvarında Dr. M. Halit Umar,[2] MW yöntemleri başarıyla tanısal ve deneysel olarak uygulamışlar ve yayılmasında öncülük etmişlerdir. MW yöntemlerinin histolojideki uygulama alanları ve şekillerinde son derece hızlı gelişmeler süre gelmektedir.

MW YÖNTEMİYLE FİKSASYON

Her tür kimyasal işlem mikrodalga (MW) enerjisi kullanılarak hızlandırılabilmektedir. Bu, MW'in moleküller üzerinde, onların rotasyon hareketlerini hızlandırması, titreşim ve frekanslarını arttırması, dolaylı olarak internal ısının yükselmesine bağlıdır. Ayrıca oluşan elektromagnetik alanlar son derece kısa da sürse, değişik moleküllerinkendi aralarında süratle bileşikler yapmasına yetmektedir. Bu fiziksel faktörler, dolaylı olarak, değişik osmotik değerlerdeki sıvı ve moleküllerin kendi aralarında kolayca, diffüzyon yoluyla dağılmalarına yardım etmektedir. Diffüzyon hızı, fiksasyonda karşımıza çıkan en önemli bir faktördür. Bu faz tamamlanmadan doku içine dağılmış fiksatif moleküllerinin, orada yeni bileşikler yapması beklenemez.

MW tekniği ile fiksasyonda elektromagnetik enerji dalgalarının sağladığı ilk ve en belirgin fayda, hızlandırılmış *diffüzyon* olayının gerçekleşmesidir. Modern ve ısı kontrolünü bize bırakan, bu iş için özel olarak üretilmiş Laboratuvar MW gereçlerinde elektromagnetik enerji dalgaları aracı sıvı ve maddeler üzerinde, ısı artımına neden olmaktadırlar. Bu özellikle moleküler düzeyde iç ısı (İnternal ısı) artımı olarak ortaya çıkmaktadır. Hücre ve canlı dokular çalışma konumuz olduğunda, bunlarda oluşan moleküler internal ısı, fiziksel ve kimyasal reaksiyonların hızını doğru orantılı olarak arttırmaktadır. Diffüzyon hızının ve buna ek olarak kimyasal reaksiyon hızının çok belirgin şekilde artımı MW tekniğinden beklediğimiz ve elde ettiğimiz faydalardır.

Elektromagnetik enerji dalgalarının her sıvı veya madde üzerine olan etkisi aynı değildir. İşte bu nedenle bazı moleküllerin hiç etkilenmediği, bazılarının ise aşırı boyutlarda etkilendiği bilinmektedir. Örneğin parafin ve lipidler üzerinde MW, histolojik prosedürlerde kullandığımız diğer madelere göre daha az etkilidir. MW enerji dalgaları molekülleri bir anten olarak görmekte ve bunlar üzerindeki atomik elektriksel güçlere yönelik reaksiyonları uyarmaktadır. Metalik her madde, esasta atomları, ideal antenler olduklarından, özellikle MW fırınlarda asla kullanılmamalıdır ve bu konuya özenle dikkat edilmelidir. Çünkü fırın içinde her tarafa dağılan dalgalar bu anten üzerinde toplanmakta ve aşırı bir ısı enerjisi açığa çıkmaktadır. Fırın içinde MW enerji dalgalarının gelişi güzel dağılımını önlemek üzere tavanında veya tabanında dönen tabla veya gereçler bulunmaktadır. Buna karşılık fırın içinde tabla üzerinde işaretli olan odak noktasında maksimal düzeyde ve en homojen şekliyle enerji odaklaşması olmaktadır. Bu, fırının şekli ve magnetron adı verilen MW üreten cihazlardan kaynaklanan fiziksel bir özelliktir. Her cihazda bu odak noktası ufak değişiklikler gösterebilir, fakat bu bizim elde etmek istediğimiz sonucu olumsuz etkilememektedir.

Fırın içinde oluşabilecek fazla ısının emilmesi (absorbe edilmesi) için sıklıkla 100 ml'lik bir su kabı bulundurulmaktadır. Buna *Water Load* adı verilmekte ve bu şekilde enerji fazlası absorbe edilmektedir. Kullanacağımız fiksatifin de yaklaşık bu hacimde olacağını var sayarsak, 200 ml volüm, fiksasyon sırasında oluşabilecek aşırı ısıyı absorbe etmeye yetecektir. Rutin diagnostik fiksasyonda ilk planda ve tercihan 10%'luk formalin solüsyonu kullanılmaktadır. Bu fiksatif solüsyonu 100 ml'lik bir cam şişede yer almalı ve ağzı hafifce kapatılmalıdır. Buharlaşma so-

nucu oluşabilecek gazların çıkması için buna özellikle dikkat etmek gerekmektedir, aksi halde ağzı kapalı şişede artan gaz basıncı patlamalara ve hatta daha önemli olaylara neden olabilir. Baker's Formalin Fiksatif solüsyonu, deneyimlerimize de dayanarak, rutin işlemler için uygun bir sıvıdır.[3]

Baker's Formalin Fiksatif solüsyonu şu şekilde hazırlanır:

Saf Formaldehid (37%)	1 volüm Mutlaka filtre ediniz!
Distile su	9 volüm
$CaCl_2$	1%ağırlık, yani 100 ml sıvı için 1 gram $CaCl_2$

Burada açıklığa kavuşturulması gereken bir terminolojik karışıklık vardır: %4'lük Formaldehid solüsyonu *formalin* olarak bilinen fiksatiftir. Eğer, bunun esasını oluşturan formaldehidin yaklaşık 40% olduğunu kabul edersek 10%'luk *formalin fiksatifi her zaman 4%*'lük bir formaldehid solüsyonudur.

MW İşlem: 100 ml Baker's Formalin solüsyonu
100 ml çeşme suyu taşıyan 2. bir şişe (Water Load)
MW: Power (Enerji) 80%=450 Watt enerji seviyesi
Işınlama süresi: 1 dakika
Bekleme süresi: 1-5 dakika
Tekrar ışınlama süresi: 1 dakika
Bekleme süresi: Dokuların büyüklüğüne bağlı olarak 10-30 dakika.

Mukoza Biopsileri için fiksasyon süresi 20 dakikada tamamlanmaktadır. Kalınlığı 2 mm'yi, yüzeyi 2 cm^3yi aşmayan doku örneklerinde ayrıca 1 kere daha 1 dakikalık bir ışınlama ve ek olarak 20 dakikalık son bir dinlendirme süresi tanınmalıdır. Fiksatifin penetrasyonu MW aracılığıyla son derece hızla olmakta, kimyasal moleküler bağlantılar en çok 1 saat içinde gerçekleşmektedir.

H2500 Microwave Processor gibi her türlü ısı, siklus ve ışınlamada süre kontroluna olanak veren modern laboratuvar cihazlarında olay daha değişik ve emin bir şekilde gerçekleşmektedir. Bu cihazlarda, fiksatifte oluşacak ısı 55°C olarak ve ışınlama süresi saniye veya dakika cinsinden verilmekte ve olayın devamlı kontrolünü cihaz yapmaktadır. Ancak bu tür aparatların parasal değeri diğerlerine göre oldukça yüksektir. Bu ve benzeri MW cihazları pek çok laboratuvarda standart olarak kullanılmakta ve elde edilen sonuçlar tekrarlanabilir özellik taşımaktadır. Buna bilim dilinde *reprodüsibilite* denilmektedir. Bu tip cihazları kullanarak dokuları fikse etme, her tür ileri aşamayı tamamlama, immünohistokimya ve histolojik boyanmaları, elektronmikroskopisi için işleme alma ve gömme, DNA Amplikasyonu (PCR) uygulamaları hızla yayılmaktadır. Bu konularda giderek artan sayıda bilimsel yayınlar çıkmaktadır. Bu da MW tekniğinin artık kesinlikle modern mikroskopi pratiğinde yer alışının bir kanıtını oluşturmaktadır.

Alınacak doku örnekleri ne kadar ince (1-2 mm), az yüzeyli ve dik açılı köşeli olursa elde edilecek sonuçlar daha iyi olmaktadır. Yukarıdaki işlem tablosuna göre bir biopsinin fiksasyon süresi en çok 1 saat içinde tamamlanmış olmaktadır. Daha önce alkolle fikse edilmeye çalışılmış bir dokuyu tekrar formaline alarak fikse etmek, doğrudan formalinle yapılan fiksasyondan beklenen sonuçları vermemektedir. Hastane içerisinde, patoloji laboratuvarına yakın bir müdahale alanında alınan biopsi ve doku örneklerinin, havada kurumasına izin vermeksizin, doğruca laboratuvara yollanması pek çok teknik olumsuzluğu ortadan kaldırabilir ve işlemlerin yanlış olarak başlaması büyük ölçüde önlenebilir. Ayrıca, taze materyalden sitolojik inceleme amacıyla derhal frotti yapmak ve bu yöntemle ön ve ek bilgi kazanmak da olasıdır.[4]

SONUÇ

İyi ve doğru bir fiksasyon yapılmaksızın hücre ve dokuları olması gerektiği şekliyle ileri işleme almak, histolojik olarak takip etmek, yeterli incelikte kesmek ve uygun şekilde boyamak hemen hemen olanaksızdır. Doğru tanı, doğru şekilde işlemiş materyalle gerçekleşeceğine göre fiksasyonun önemini ve mutlak doğru olarak uygulanması gereğini bir kere daha vurgulamakta büyük yarar vardır. MW yöntemi ile fiksasyon kısa sürede ve etkin bir biçimde gerçekleşmektedir. Kişisel deneyimlerimiz ve bütün dünyada giderek yaygınlaşan kullanımı, histoteknikte MW yöntemlerinin uygulanmasının önerilebilir olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

1 Kok and Boon. Microwave Cookbook for Microscopist: Art and Science of Visualization. Third Revised Edition. Coulomb Press Leiden. 1993

2 Umar, M.H., Pabuçcuoğlu, H.U. et al.: Application of Microwave to the Histotechnic. Aegean University Medical Bulletin. 28: 1773-1780. 1989

3 Umar, M.H., Pabuçcuoğlu, H.U., & Öcal, Ş.D.: Modified Microwave Method for Histoprocessing. Turkish Journal of Pathology (İstanbul).

4 Umar, M.H., Çaydere, M., Öcal, Ş.D. and Tarcan, E.: Elastofibroma dorsi. A case report with cytological findings. Turkish J. Dermatopathol. 1: 14-16. 1992