



Plastinasyon/Deplastinasyon Uygulanmış Koyun Kalbinde Doku Morfolojisinin Işık Mikroskopik Yönden İncelenmesi

Saime Betül BAYGELDI^{1,a,✉}, Barış Can GÜZEL^{1,b}, Uğur ŞEKER^{2,c} Z. Ender ÖZKAN^{1,d}

¹Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Elâziğ

²Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır

^aORCID: 0000-0002-4403-8663; ^bORCID: 0000-0002-2504-120X; ^cORCID:0000-0002-1693-6378; ^dORCID:0000-0001-5213-958X

Geliş Tarihi/Received
04.04.2020

Kabul Tarihi/Accepted
03.06.2020

Yayın Tarihi/Published
30.06.2020

Öz

Silikon plastinasyonu metodu, dokulardaki sıvının aseton ile yer değiştirmesinden sonra asetonun vakum tankında bir silikon-katalizör karışımı ile değiştirilmesi esasına dayanır. Bu işlem neticesinde dayanıklı gerçek biyolojik örnekler elde edilir. Deplastinasyon, plastinasyonu tersine çeviren bir süreçtir ve histopatolojik çalışmalarda yardımcı olmaktadır. Bu çalışmadaki amacımız koyun kalbine silikon plastinasyonu uygulayarak orjinaline eş ve dayanıklı eğitim materyalleri elde etmek hem de deplastinasyon uygulayarak hem ışık mikroskopunda histolojik olarak inceleme yapabilmektir. Bu amaçla mezbahanededen temin edilen 5 adet koyun kalbi tespit edildikten sonra silikon plastinasyonu işlemine tabi tutuldu. Deplastinasyon aşamaları da uygulanarak mikroskopik olarak incelendi. Sonuç olarak plastine olan koyun kalpleri eldiven gereksiz kullanılabilen ve anatomik situslarını koruyan materyaller halini aldığı gözlemlendi. Plastinasyon uygulanan örneklerde hem ağırlık, hem de boyutlarında küçülmeler gözlemlendi. Deplastinasyon sonucunda ise histolojik kesitlerde kısmi bozulmalar şekillendi.

Anahtar Kelimeler: Deplastinasyon, kalp, ruminant, plastinasyon

Light Microscopic Examination of Tissue Morphology in the Heart of Sheep with Plastination/Deplastination

Abstract

The silicone plastination method is based on replacing the liquids in the tissues with acetone, replacing the acetone with a silicone-catalyst mixture in the vacuum tank. As a result of this process, durable real biological samples are obtained. Deplastination is a process that reverses plastination and helps in histopathological studies. Our aim in this study is to obtain silicon, equivalent, durable, educational materials by applying silicone plastination to the sheep's heart, and to perform histological examination both in light microscopy by applying deplastination. For this purpose, 5 sheep hearts from the slaughterhouse were identified and then subjected to silicone plastination. Deplastination steps were also performed and examined microscopically. As a result, sheep hearts that were plastinated became materials that can be used without gloves and protect their anatomical situs. In plastination samples, both weight and size decrease was observed. As a result of deplastination, partial distortions were formed in histological sections.

Key Words: DePlastination, heart, ruminant, plastination

GİRİŞ

Kalp (cor) dolaşım sisteminin merkezi olan içi boş kassel bir organdır. Şekil bakımından, tabanı yukarıda, tepesi aşağıda olan ve ruminantlarda uç kesimi (apex cordis) çok sivri bir koni şeklindedir. Kalp; göğüs boşluğunda, mediastinum'un iki yaprağı arasında ve pericardiumun içinde bulunur (1). Kalp anatomisi hakkında çok sayıda atlas ve yayınlanmış kitap olmasına rağmen, gerçek kadavraya denk bir örnek bulunamamıştır. Bu amaçla plastinasyon, ilk önce von Hagens (1979) tarafından geliştirilmiş ve bir organ koruma tekniği olarak kullanılmıştır. Plastinasyonun geleneksel koruma tekniklerine göre avantajları kokusuz, dayanıklı, nontoksik olması ve böylece kullanım kolaylığı sağlamasıdır (2). Plastinasyonun prensibi; doku sıvılarının, bazı organik solventlerle (aseton vb.) dokudan uzaklaştırılması ve yerine silikon, polyester veya epoksi türevi bir polimer kimyasalın

aktarılması ve sonrasında da doku içinde sabitlemesi işlemlerine dayanır (3, 4). Gerek radyolojik görüntülemeler ile eşleştirilebilen kesitsel örneklerin gerekse üç boyutlu makroskopik örneklerin plastine edilerek sağlığa zararı olmayan, korunması için özel şartlar ve ortam gerektirmeyen, kullanımı kolay, dayanıklı ve gerçekçi eğitim materyallerine dönüştürülmesi ayrıca tanıtıl ve eğitimsel özellik gösteren bu örneklerin uzun süreli muhafazası sağlanmaktadır. Ravi ve Bhat'a göre (5), silikon plastine dokuların önemli ve potansiyel olarak faydalı özelliklerinden biri mikroskopik yapısının bozulmadan kalmasıdır. Bu, histolojik inceleme için tam potansiyeli korurken, numunenin neredeyse süresiz olarak kolayca saklanabilen bir şekilde muhafaza edilebileceği anlamına gelir. Bazı araştırmacılar ise plastinatlı örneklerin histolojik yapısına erişmek için sodyum metoksit ve metilbenzen, metilen veya dikloroaseton ile deplastinasyon uy-

gulaşmış ve plastinasyonun örnekler üzerinde yapısal değişikliklerinin olduğunu belirtmişlerdir (6).

Bizimde bu çalışmada amacımız koyun kalbine plastinasyon ve deplastinasyon uygulanarak ışık mikroskobundaki farklılıkları belirlemektir. Taze organlardan geleneksel doku tespit işlemleri ve parafin gömme metodu ile uzun yıllar saklanabilen dokulardan histolojik kesitler elde edilebilmektedir. Ancak deplastinasyon metodu ile önceden plastine edilmiş, çalışılmamış örneklerin yıllar sonra dokusunu muhafaza etmiş plastinasyon sayesinde deplastine ederek mikroskobik görüntülerini inceleme fırsatı oluşacaktır. Silikon plastinasyonunun, örneklerin sadece makroskobik olarak değil, mikroskobik olarak da yapısının koruduğu belirlenecektir. Ayrıca yapılan taramalar sonucunda deplastinasyon konusu yeteri kadar incelenmediğinden literatüre deplastinasyon ile alakalı katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından alınan 2018/84 no'lu kararla, deneysel çalışma etik kurallara uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Kalp örneklerinin plastinasyonu

Bu çalışmada oda sıcaklığında silikon plastinasyonu işlemlerinin tamamı Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Plastinasyon Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan 5 adet koyun kalbi Elâziğ ili mezbahanelerinden temin edilmiştir. Gereklî diseksiyon işlemleri tamamlandıktan sonra kalplerin ağırlıkları hassas terazide belirlenmiş ve en boy oranları dijital kumpasla ölçülmüştür. Fiksasyon aşaması +4 °C'de, %10'luk formalin solüsyonu ile tespit edildikten sonra kalpler dehidrasyon aşamasına alındı. Bu aşamada kalplerin içindeki doku sıvıları, -25°C'lik derin dondurucuya konulan izolasyonlu çelik tanklar içinde asetona (%99.5) ile yer değiştirildi. Koyun kalplerine yapılan silikon plastinasyonu işleminin dehidrasyon aşamasında örnekler 3. banyodan sonra asetona konsantrasyonu istenilen değerde sabitlenebildi. Dehidrasyon aşaması toplamda 17 gün sürdü.

Kalplere yağdan arındırma işlemi de uygulandı ve asetonda oda sıcaklığında beklenerek, bu aşama 7 günde tamamlandı. Aseton banyoları tamamlandıktan sonra vakum tankına alınan örnekler oda sıcaklığında S10 silikonu ve S3 katalizör karışımı ile zorlu impregnasyona tabii tutuldu ve 8 gün devam etti. Daha sonra örnekler oda sıcaklığında 1 gün S10/S3 karışımı içerisinde, 1 gün de silikon-katalizör karışımı dışına alındı. Vakum tankından alınan örnekler silikon salınımı için bekletildi. Örneklerden fazla silikonun salınması işlemi 10 gün sürdü. En son aşama olarak S6 kimyasalı ile gaz kütleme ve sertleştirme işlemi gerçekleştirilerek plastinasyon işlemine son verildi. Gaz kütleme ünitesinde sertleştirme aşaması 5 gün de tamamlandı. Sonuç olarak koyun kalbinin plastinasyonu 47 gün de tamamlandı.

Plastine kalp dokularının deplastinasyonu ve doku takibi

Plastine edilmiş ve kuru ortamda ortalama 6 ay bekletilmiş kalp örnekleri deplastinasyon aşamasına alındı. Histolojik

inceleme amacıyla deplastinasyon aşamaları daha önce Ripani ve ark. (7) tarafından belirtilmiştir. Deplastinasyon için total kalp örnekleri %99'luk alkolde (Merck, #107017) 24 saat, metilbenzen (Merck, #108327) içerisinde ise 48 saat süreyle sırayla bekletildi. Metil benzen deplastinasyonunu kontrol etmek amacıyla toplu iğne dokuya kolaylıkla saplanabilecek düzeye gelene kadar dokulardaki yumuşama belirli aralıklarla kontrol edildi. Metilbenzen uygulamasının sonunda kalp dokuları küçültülerek kalbin sağ ventrikülünden alınan doku örnekleri %70'lik alkol içerisine alındı. Daha sonra artan dereceli alkol serilerinden geçirildi ve xylol içerisinde şeffaflaştırılarak sıvı parafine gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan mikrotom yardımıyla alınan 5 µm kalınlığında kesitler Hematoksilen ve Eozin ile boyandı ve Entellan ile kapatıldı. Elde edilen kesitler ışık mikroskobu altında incelenerek mikrograflandı.

Taze kalp dokularının histolojik takibi

Mezbahanedan temin edilen taze koyun kalp örnekleri doğrudan %10'luk nötral tamponlu formalin içerisine alındı. Yaklaşık 8 saat süren ön fiksasyon sonunda kalp örnekleri disseke edildi ve deplastinenin yapıldığı aynı bölgeden alınan küçültülen kalp örnekleri, total fiksasyon için tekrar formalin içerisine aktarıldı. 24 saatlik fiksasyon sonunda dokular çeşme suyu altında yıkandıktan sonra, %70'lik alkolde 24 saat, %80, %90, %96 ve absolut alkol içerisinde 1'er saat bekletilerek dehidre edildi. Ksilol'de şeffaflaştırılan örnekler sıvı parafine gömülerek bloklandı. Elde edilen bloklardan alınan 5 µm kalınlığında kesitler Hematoksilen ve Eozin ile boyandıktan sonra entellan ile kapatılarak ışık mikroskobu altında incelendi. İncelenen örneklerden mikrografları alındı. Hem deplastine hem de taze örneklerden elde edilen bulgular kıyaslandı.

Terminoloji olarak Nomina Anatomica Veterinaria (8) ve Nomina Histologica Veterinaria esas alındı (9).

BULGULAR

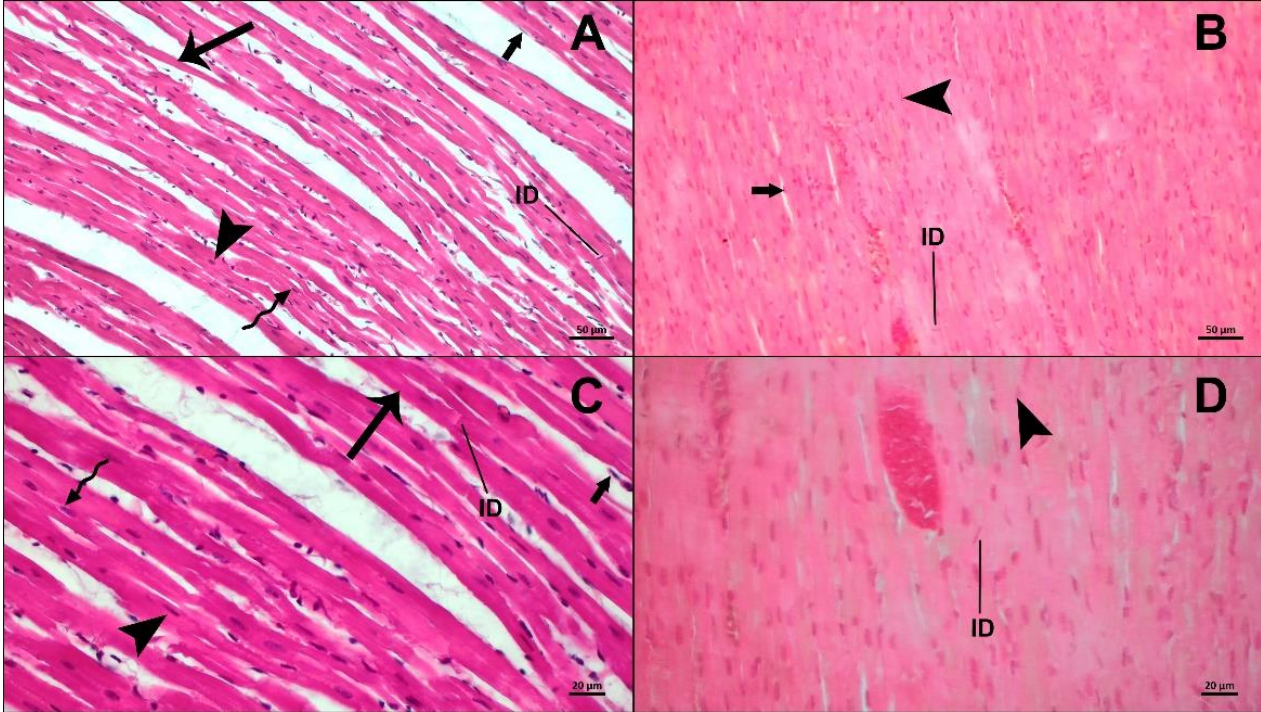
Plastinatlar doğal görünümüne oldukça benzerdi ve önceki morfolojik özelliklerini korumuşlardı (Şekil 1). Koyun kalplerinin silikon plastinasyon öncesine göre; ağırlıkları %60.09 oranında azalmış, boy uzunlukları ortalama %1.96 oranında ve en uzunlukları ortalama %3.82 oranında azalmış olarak belirlendi.



Şekil 1. Plastinasyon işlemi uygulanmış koyun kalbi

Histolojik olarak; taze koyun kalp dokusunun normal morfolojide olduğu gözlemlendi. Bu gruptaki kardiyomiyositlerin düzenli tertiplendiği, hücre çekirdeklerinin hematoksilin ile koyu renkte boyanıp, hücre periferine yakın lokalize olduğu tespit edildi. Kalp kasına özgü interkalar disklerin varlığı ve kas liflerinin dallanmış bir morfolojiye sahip oldu-

ğu görüldü. Taze kalp örneklerinin kardiyomiyositlerinde izotrop/anizotrop bölgelerin varlığı göze çarpmaktaydı, hücre çekirdeklerinin periferinde depolanan glikojenin perinükleer vakuoller şeklinde varlığı tespit edildi. Ayrıca koroner arter ve endokard bağ dokusunda koyu renkli boyanan endotel hücreleri görüldü (Şekil 2).



Şekil 2. Taze (A, C) ve deplastine (B, D) kalp örneklerinin ışık mikroskopik görüntüsü. Kardiyomiyosit çekirdekleri (ok başı), izotrop/anizotrop bantlar (ok), interkalar diskler (ID), perinükleer glikojen vakuolleri (kivrımlı ok), endotel hücreleri (kalın ok). Boyama: H&E, Bar; A-B: 50 µm, C-D: 20 µm.

Deplastine koyun kalp örneğinde ise normal morfolojik yapıların bazıları kolaylıkla ayırt edilebilirken bazı yapısal bölgelerin ayırımında güçlük çekilmiştir. Taze kalp dokusu ile karşılaştırıldığında kardiyomiyosit çekirdeklerinin daha eozinofilik görüntüsü göze çarpmaktaydı, ayrıca interkalar diskler ve izotrop/anizotrop bantlar yer yer güçlükle ayırt edilebilirken dokunun genelinde bantlaşmalar ayırt edilemedi. Deplastine kesitlerde perinükleer glikojen vakuollerinin neredeyse tamamen görünmeyecek kadar küçüldüğü gözlemlendi. Ayrıca, sarkolemma ve dokunun bütün bir şekilde eozinofilik bir görünüme sahip olduğu tespit edildi (Şekil 2).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Plastine organların anatomik yapıları doğala özdeş bir şekilde gözlenebilmekte ve silikon plastinasyonu öncesi morfolojik özelliklerini büyük oranda koruduğu tespit edilmiş, literatürde de aynı şekilde (10) gözlemlenmiştir.

Plastinasyonun bir dezavantajı örneklerin hacminin küçülmesidir. %10 büzüşme kaçınılmazdır (11). Bazı araştırmacılar (12-14), formalin fiksasyonu dokuların rengi ve hacmi üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğu kanaatinde dirler. Fiksasyon silikon plastinasyonu için önemli bir adım olmamasına rağmen, memelilerde (4) ve sürüngenlerde (15), elde edilen sonuçlara göre, fiksasyon işlemi gerçekleştirilen örneklerin, fiksasyon işlemi gerçekleştirilmeyen ör-

neklere kıyasla daha iyi sonuçlar verdiği ortaya konulmuştur. Çalışmamızda plastinasyon sonrası, organın hem ağırlığında hem en-boy uzunluğunda küçülme gerçekleşmiştir.

Daha önceki çalışmalarda (3, 16) dehidrasyon aşamasında örnekler göre değişiklik olmakla beraber iki veya üç kez aseton banyosunun yapılması gerekliliği vurgulanmış, çalışmamızda ise 3. banyo sonunda derişim %95'in üzerine çıkmıştır. İmpregnasyon aşaması Raoff ve ark. (17) 5 günde, Zheng ve ark. (18), ise 18-25 gün arasında tamamlamıştır. Çalışmamızda ise bu aşama 8 gün sürmüştür. Zheng ve ark. (18) göre belirtilen gaz kütleme ve sertleştirme aşaması süresi çalışmamızla benzer olmakla beraber elastik örnekler elde edebilmek adına 5 gün yeterli görülmüştür.

Histolojik olarak, Ripani ve ark.'na (7) göre uygulanan deplastinasyon işleminde kardiyak yapılarda perifer kısımlarının oldukça iyi korunduğu, lif çaplarının küçüldüğü, ipliksi yapıların hasar gördüğü belirtilmiştir. Çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Daha önce yapılmış çalışmalarda deplastine edilmiş dokulardan elde edilen histolojik kesitler hematoksilin ve eozin ile kolaylıkla boyanarak morfolojik yönden incelenmiştir. Hatta bu çalışmalarda plastine doku parçaları deplastine edilmeden dahi morfolojik yönden incelenebilmiştir (19, 20). Boyanma özelliği açısından değerlendirildiğinde, deplastinasyon örneklerini boyamak için biraz daha uzun bir

süreye ihtiyaç duyulmuştur. Çalışmamızda da olduğu gibi deplastinasyonun zorluğunun çözülme süreciyle ilgili önemli adımlar atıldığı kanaatindeyiz. Öte yandan Grondin ve ark., (21) Sodyum metoksit kullanıldığında deplastinasyon sonrası boyama işleminde iyi histopatolojik görüntüler alındığını savunmuşlardır.

Sonuç olarak plastinasyon sayesinde kuru, kokusuz, dayanıklı, özel bakım ve saklama koşulu gerektirmeyen ve eldivensiz kullanımına uygun gerçek biyolojik örnekler elde edilmektedir. Ayrıca plastinasyon hem akademik personelin hem de öğrencilerin toksik maddelere (formaldehit, fenol, alkoller vb.) maruz kalmadan anatomik yapıları incelemelerine olanak sağlamaktadır. Plastinasyon anatomi eğitimi için ideal eğitim materyaline dönüşmektedir (22).

Rutin histolojik uygulamalar günümüzde gerek eğitim ve araştırmada gerek tanı koymada etkin bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Dokunun ön fiksasyonunu takiben küçültülmesi, hazırlanan örneklerden kesit alınmasını kolaylaştırmakta ve mikroskopik incelemeler için avantaj sağlamaktadır. Genellikle takip edilecek dokunun kalınlığının 3 mm'nin altında olması önerilmektedir (23). Ancak doku küçültme aşamasının geri dönüşler veya tekrarların önünde engel oluşturabileceğini düşünmekteyiz. Rutin histolojik doku takibindeki küçültme işleminin aksine plastinasyon yönteminde doku ve organların gross bir şekilde plastine edilerek oda ısısında saklanması bu metodolojinin en büyük avantajlarından. Mevcut halleriyle bu dokular-dan/organlardan kesit alıp mikroskopik incelemeye tabi tutmak oldukça zordur (24). Bu amaçla plastinasyon/deplastinasyon'un geliştirilmesi hem anatomik örneklerin hem de endemik tür ve vakalardan gelen örneklerin uzun süre saklanabilmesine daha sonra histolojik yönden incelenebilmesine olanak sağlayacaktır. Bu nedenle bu tekniğin yaygınlaştırılması ve optimum protokollerin geliştirilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Dursun N. (2008). Cor. (İçinde): Veteriner Anatomi II. Dursun N (editör). Cilt 2. Baskı 12. s. 186-188. Medisan Yayınevi, Ankara, Türkiye
2. Popp AI, Basso AP, Lodovichi MV, Sidorkewicz NS. (2018). Conservation of Body Sections and Organs of the Narrownose Smooth-hound, *Mustelus schmitti* (Pisces, Chondrichthyes), by Silicone Injection at Room Temperature to be Used in Comparative Anatomy learning. *Int J Morphol.* 36(2):413-418.
3. Ekim O. (2018). Evcil Kanatlı Hayvan Örneklerine Uygulanan Farklı Silikon Plastinasyonu Protokollerinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi. *Vet Hekim Der Derg.* 89(1): 74-84.
4. Ekim O, Tunalı Ş, Hazıroğlu RM, Ayvalı M. (2014). Evcil Memeli Hayvanlarda Böbreklerin Soğuk Ortam Tekniği ile Silikon Plastinasyonu. *Vet Hekim Der Derg.* 85(2): 1-11.
5. Ravi SB, Bhat VM. (2011). Plastination: A Novel, Innovative Teaching Adjunct in Oral Pathology. *J Oral Maxillofac Pathol.* 15(2): 133-137.
6. Rabi S. (2018). Deplastination: Making Plastinates Histopathologically Relevant Deepak Vinod Francis. *J Anat Soc India.* 67:77-79.
7. Ripani M, Boccia L, Cervone R, Macciucca DV. (1996). Light Microscopy of Plastinated Tissue, Can Plastinated Organs Be

Considered Viable for Structural Observation. *J Int Soc Plastination.* 11:28-30.

8. International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. (2017). *Nomina Anatomica Veterinaria.* 6th ed, Hanover, Germany.
9. International Committee on Veterinary Histological Nomenclature. (2017). *Nomina Histologica Veterinaria.* 1st ed, Hanover, Germany.
10. De Jong K, Henry RW. (2007). Silicone Plastination of Biological Tissue: Coldtemperature Technique Biodur S10/S15 Technique and Products. *J Int Soc Plastination.* 22: 2-14.
11. Von Hagens G. (1985). *Collection of all Technical Leaflets for Plastination.* 2nd ed, Heidelberg, Germany.
12. Shanthi P, Singh RR, Gibikote S, Rabi S. (2015). Comparison of CT Numbers of Organs Before and After Plastination Using Standard S-10 Technique. *Clinical Anatomy.* 28: 431-435.
13. Brizzi E, Sgambati E, Capaccioli L, Giurovich E, Montigiani L. (1994). A Radiological-Anatomical Comparison Between Formalin-Preserved Organs and "Plastinated" Ones. *Ital Anat Ed Embriologia.* 99: 145-155.
14. Pendovski L, Iliki V, Nikolovski G. (2004). Silicone Plastination of a Malpositioned Long-Term Formalin-Fixed Green Iguana. *J Int Soc Plastination.* 19: 40-42.
15. Ekim O, İnsal B, Bakıcı C, et al. (2014). Yılanlarda Soğuk Ortam Tekniği ile Tüm Vücut Silikon Plastinasyonu. *Dicle Üniv Vet Fak Derg.* 1: 9-22.
16. Pashaei S. (2010). A Brief Review on The History, Methods and Applications of Plastination. *Int J Morphol.* 28: 1075-1079.
17. Raof A, Henry RW, Reed RB. (2010). Silicone Plastination of Biological Tissue: Room Temperature Technique Dow/Corcoran Technique and Products. *J Int Soc Plastination.* 22: 21-25.
18. Zheng WX, Zhou JN, Yu SB, et al. (2013). Effects of Time and Temperature of Curing on Hardness of Organs in Silicone Plastination. *Acta Anat Sin.* 44: 368-371.
19. Francis DV, Rabi S. (2018). Deplastination: Making Plastinates Histo-Pathologically Relevant. *J Anat Soc India.* 67:77-79.
20. Hanno S, Suganthi S, Toshiyuki S, et al. (2008). Light-Weight Plastination. *Ann Anat.* 190:428-431.
21. Grondin G, Grondin GG, Talbot BG. (1994). A Study of Criteria Permitting the Use of Plastinated Specimens for Light and Electron Microscopy. *Biotech Histochem off Publ Biol Stain Comm.* 69 (4): 219-234.
22. Latorre RM, Garcia-Sanz MP, Moreno M, et al. (2007). How Useful is Plastination in Learning Anatomy? *J Vet Med Educ.* 34(2):172-6.
23. Feldman AT, Wolfe D. (2014). Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining. In *Histopathology* (pp. 31-43). Humana Press, New York, NY.
24. Rahul TG, Francis DV, Pandit S, et al. (2020). Deplastination: Preservation of Histological Structures and Its Anticipated Role in the Field of Histopathology. *Clin Anat.* 33(1): 108-112.

✉ Yazışma adresi:

Saime Betül BAYGELDİ
Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı, Elâzığ, TÜRKİYE
E-mail: sbaygeldi@firat.edu.tr