

Araştırma Makalesi

İNCE BAĞIRSAK YÜZEY ALANI HESAPLANMASINDA İKİ HİSTOLOJİK METODUN KARŞILAŞTIRILMASI

H.Hakan BOZKURT*, Abit AKTAŞ, M. Başak ULKAY, Suzan DAĞLIOĞLU

Geliş Tarihi : 15.12.2007
Kabul Tarihi : 28.06.2007

Comparison of Two Histological Methods for Estimating Surface Area of Small Bowel

Abstract : A geometric model and an unbiased estimation using vertical section for villous surface estimation were compared.

Small bowels of 10 domestic fowls were dissected and 8cm of bowel segments from mercel's diverticulum towards distal direction were subjected to estimation.

In geometric model transversal sections of bowel and a test lattice consist of vertical and horizontal test lines were used. For unbiased estimation; bowel was opened along its length, laid flat on a substratum and sectioned vertical to the substratum. Then a cycloid test lattice was used.

It was found that the estimated total surface due to villi was significantly different between the two methods.

Key Words: intestine, stereology, vertical sectioning.

Özet: Bu çalışmada ince bağırsağın villus yüzey alanı hesaplanmasında stereolojik dikey kesit alma yöntemi ile geometrik modelleme yöntemi karşılaştırıldı. Çalışmada 10 adet Broyler cinsi tavuğun ince bağırsağının Mercel divertikulumundan itibaren distal yönde alınan 8 cm lik parçası kullanıldı. Geometrik model için, enine alınan bağırsak kesitleri ile enine ve boyuna çizgilerden oluşan (kare) grid kullanıldı. Dikey kesit için bağırsak parçaları boyuna açıldı. Enine ve boyuna çizgilerden oluşan grid zemin üzerine yerleştirilerek trimlendi ve kesitleri alındı. Kesitler sikloid sonda yardımı ile değerlendirildi.

Çalışma sonucunda iki yöntem ile elde edilen bağırsak yüzey alanı sonuçları arasında istatistiksel olarak önemli fark olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: bağırsak, stereoloji, dikey kesit.

Giriş

İnce bağırsak mukozası yüzey alanının kantitatif morfolojisi, yem katkı maddelerinin ve stress faktörlerinin etkisinin araştırılmasında önemli bir kriter olarak kullanılmaktadır (2, 5, 10). Çeşitli uygulamaların bağırsaklara etkisini ortaya koymak için bir çok histolojik kriter kullanılmıştır. Villus intestinalis ve mikrovillus tarafından artırılan toplam yüzey alanı bu kriter içinde en doğru sonucu verecek olanıdır. Toplam yüzey alanı farklı türlerde, farklı deneysel koşullarda ve farklı stereolojik metotlarla çalışılmıştır (3, 6, 9).

Bu çalışmanın amacı; ince bağırsak villus yüzey alanı hesaplanmasında stereolojik bir yöntem olan dikey kesit alma yöntemi ile daha kolay uygulanabilir bir yöntem olan geometrik modellemeyi karşılaştırarak, geometrik modelleme yönteminin geçerliliğini saptamaktır.

Materyal ve Metot

Araştırmada 10 adet Broyler cinsi tavuktan alınan ince bağırsak örneği kullanıldı. Örnekler Mercel divertikulumundan itibaren distal yönde 8cm olarak çıkarıldı. Parçalar stereolojik bıçakla sistematik rastgele olarak 8 parçaya bölündü ve %10 formol salin ile tesbit edildi. Sistematik rastgele seçilen parçalardan dört tanesi dikey kesit yöntemi için kalan dördü ise geometrik model yöntemi için kullanıldı (1, 8).

Geometrik model için, ince bağırsaklardan enine kesit ile alınan doku örneklerinden parafin kesitler hazırlandı. HE ile boyanan kesitlerin bilgisayar görüntüleri üzerine bir cm^2 'lik bölümlerden oluşan şeffaf grid yerleştirildi. Grid çizgileri ile villus intestinalis ve submukozanın (primer mukoza) kesişimleri sayılarak (Şekil 1) toplam yüzey alanı aşağıdaki formüle göre hesaplandı (8).

Sa: Sb.Sm

$Sb=(4/\pi).Iv/Ib$

$Sm=L.Cm$

$Cm=(4/\pi).z.Ib$

Sa: Toplam yüzey alanı

Sb: Villus büyütme oranı

Sm: Villusuz mukozal alan

Cm: Bağırsak dairesel alanın çevresi

Iv: Grid ile villusların toplam kesişme sayısı,

Ib: Grid ile submukozanın toplam kesişme sayısı

L: Bağırsak uzunluğu (8 cm)

Z: Grid çizgileri arasındaki mesafe

Stereolojik dikey kesit için bağırsak parçaları boyuna açıldı. Bir cm^2 'lik bölümlerden oluşan grid zemin üzerine yerleştirildi ve grid çizgileri rehber alınarak

* İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. e-mail:bozkurt@istanbul.edu.tr.

örnekler alındı (Şekil 2). Alınan örneklerden parafin kesitler hazırlandı ve Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyandı. İncelemelerde bağırsak görüntüleri bilgisayar ekranına alınarak üzerlerine test çizgileri taşıyan sikloid sonda yerleştirildi. Test çizgileri ile villusların kesişim noktaları ve villuslar üzerine düşen grid noktaları sayıldı (Şekil 3). Elde edilen bu veriler kullanılarak aşağıda verilen formül ile yüzey yoğunluğu hesaplandı (1). Geometrik model için alınan enine kesitler yardımı ile Cavalieri metodu ile toplam hacim bulundu (4). Bu iki veri ile aşağıdaki formüller kullanılarak toplam yüzey hesaplandı (1).

$$2 \cdot \sum_{i=1}^n (l/p) \cdot \sum_{i=1}^n$$

Sa: Sv. V

Sa: Toplam yüzey alanı

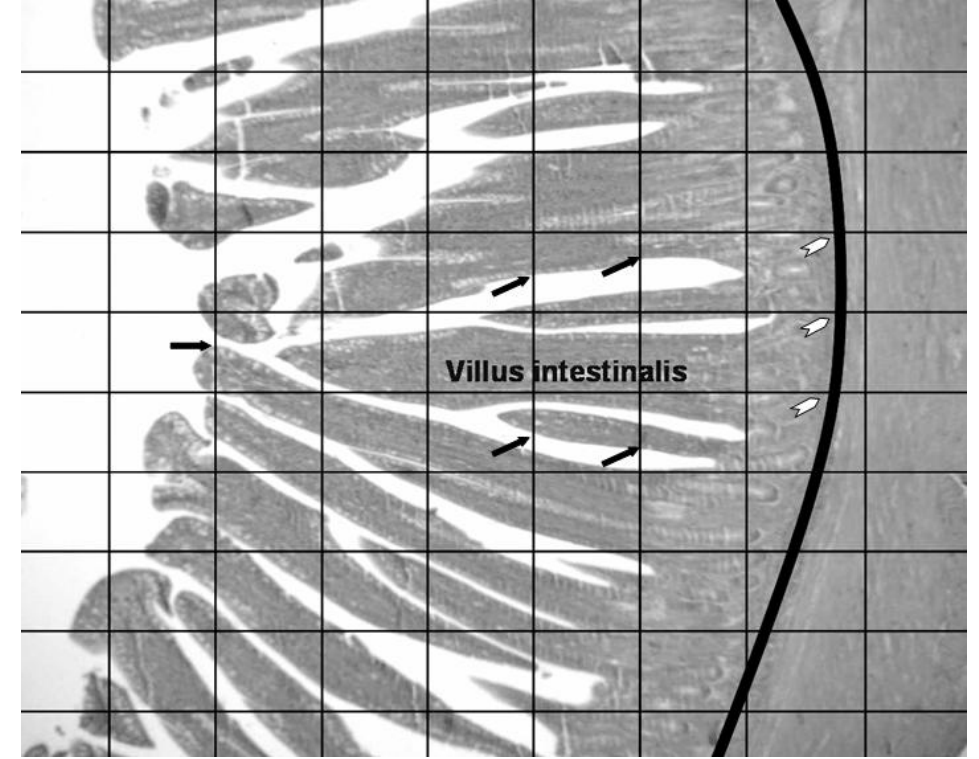
Sv: Yüzey yoğunluğu

l/p: sikloid uzunluğu,

Ii: Toplam villus ile sikloid kesişim sayısı,

Pi: Toplam villusların üzerine düşen nokta sayısı.

V: 8 cm lik bağırsak bölümünün toplam hacmi

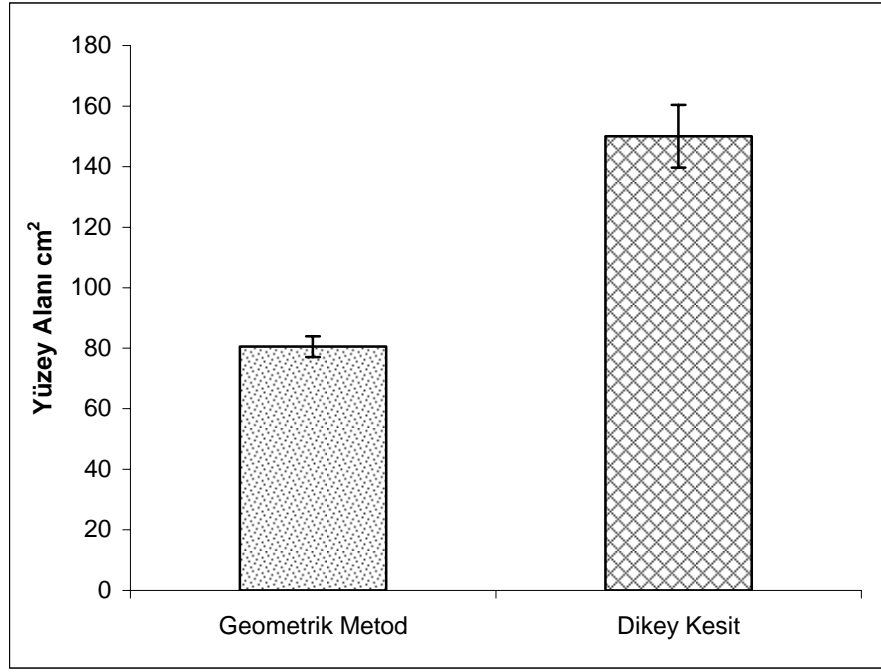


Şekil 1: Geometrik model için enine bağırsak kesit görüntüleri üzerine yerleştirilen grid. Grid çizgileri ile villus intestinalislerin ve submukozanın kesişme noktaları sayıldı. Oklar; villus intestinalislerin, ok başları; submukozanın kesişme noktalarını örnek göstermektedir. 10X.

Figure 1: The grid was placed on the images of the cross sections of the bowl. The intersections between the lines of the grid, the villous surface and the submucosa (primary mucosa) were counted. Arrows; examples of intersections with villus intestinalis, arrow heads; examples of intersection with primary mucosa. 10X.

Bulgular

Villuslardan kaynaklanan toplam yüzey alanı dikey kesit yöntemiyle $150,03 \pm 10,35\text{cm}^2$, geometrik model yöntemiyle $80,52 \pm 3,43\text{cm}^2$ bulundu. Sonuçlar arasındaki farkın istatistiksel olarak $P < 0,05$ düzeyinde önemli olduğu görüldü (Grafik 1).



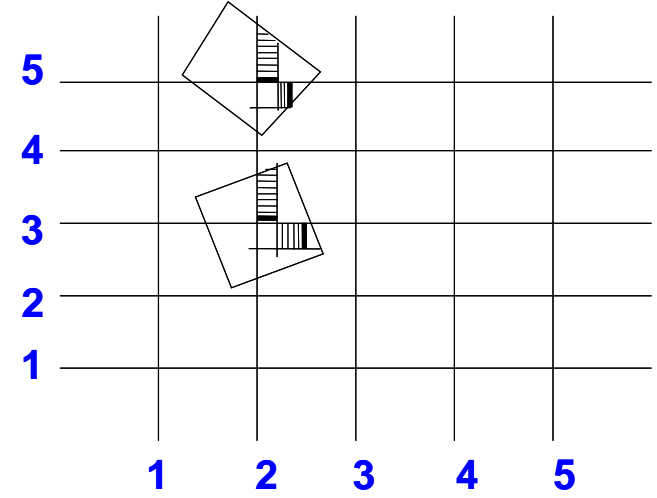
Grafik 1: Geometrik model ile dikey kesit metodu sonuçları. Gruplar arasındaki fark $P < 0,05$ seviyesinde önemli.

Graphic 1: The results of geometric model and vertical section method. Means among the groups are significantly different ($p < 0,05$).

Tartışma

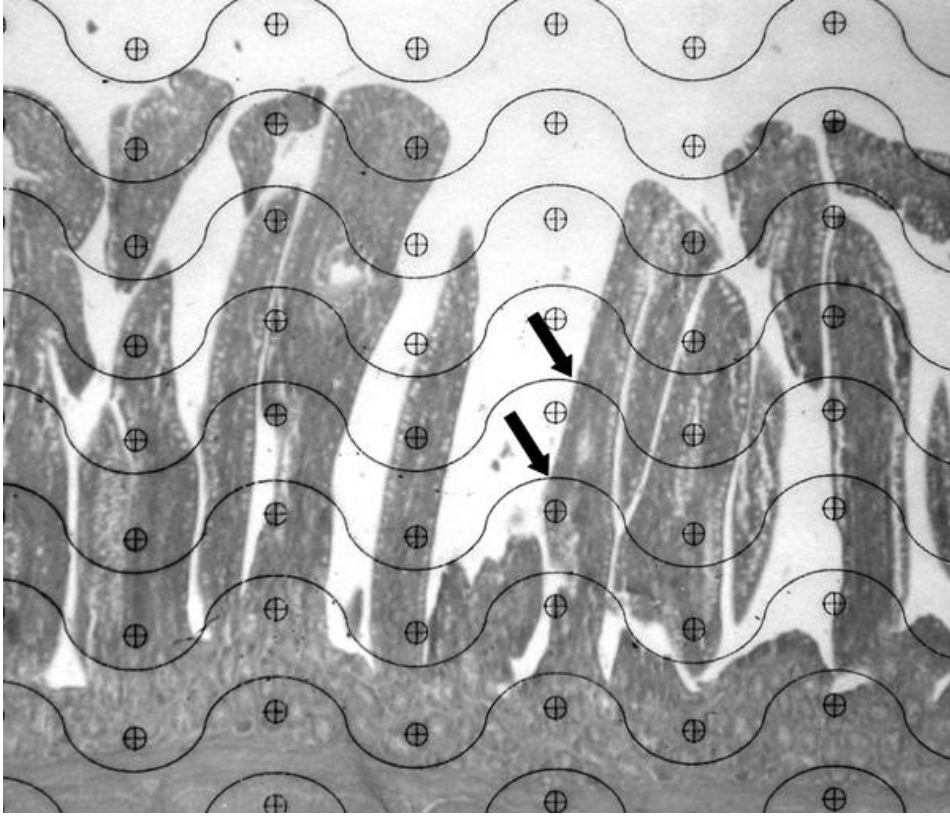
Geometrik model kolay uygulanabilir bir yöntem olduğu için deneysel çalışmalarda kullanılmıştır (8, 9). Stereolojik dikey kesit yöntemi ise uygulaması daha uzun zaman alan bir yöntemdir. Ancak yüzey alanının hesaplanmasında en güvenilir yöntem olarak tanımlanmıştır (1, 7). Mayhew (7) geometrik model ile yarı stereolojik bir dikey kesit yöntemini karşılaştırmıştır. Elde ettiği sonuçlar ışığında her iki yöntemin benzer sonuç verdiğini bildirerek, daha kolay olan geometrik yöntemin kullanılmasını önermiştir. Bu çalışmada bağırsak yüzey alanı hesaplanmasında, aynı organ örneği üzerinde, geometrik model yöntemi ve en güvenilir yöntem olduğu belirtilen stereolojik dikey kesit yöntemi karşılaştırılmıştır. İki yöntemin sonuçlarının farklı olduğunu ve bu farkın istatistiksel önem gösterdiğini saptadık. Mayhew (7) de yayınında bu çalışma kullandığımız tam stereolojik dikey kesit yönteminin daha güvenilir olduğunu

belirtmiştir. Bu sonuçlar ışığında, kullandığımız dikey kesit yönteminin, özellikle morfometrik çalışmalarda tercih edilmesini önermekteyiz.



Şekil 2: Dikey kesit örnekleme için kullanılan grid. Açılmış bağırsak parçaları grid üzerine rastgele atıldı. Grid çizgileri kullanılarak bir birine dik açı yapacak şekilde iki adet örnek kesilerek alındı (çizgili kısım). Kalın çizgisiyle gösterilen kenarlarına paralel olarak örneklerin parafin kesitleri alındı (8).

Figure 2: The grid was used for vertical sectioning. Opened pieces of bowel, spun and placed on a numbered square grid, long blocks taken in the two directions of grid lattice and sectioned vertical to the lattice (8).



Şekil 3: Dikey kesitlerin üzerine yerleştirilen sikloid grid. Grid çizgileri ile villus intestinalislerin kesişme noktaları (oklar) ve villus intestinalislerin üzerine düşen noktalar sayıldı. 20X.

Şekil 3: The sikloid grid was placed on the images of the vertical sections of the bowl. The intersections between the lines of the grid (arrows) and grid points on the villous were counted. 20X.

İki yöntem ile edilen veriler student-t testi ile karşılaştırıldı.

Kaynaklar

1. **Baddeley, A.J., Gundersen, H.J.G. and Cruz-Orive, L.M.:** Estimation of surface area from vertical sections. *J. Micros.*, 1986; 142: 259-276.
2. **Elbrnød, V.S., Dantzer, V., Mayhew, T.M. and Skadhauge, E.:** Correlation of structure and function in the chicken lower intestine (coprodeum): A review. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1997; 118A: 243-246.
3. **Ginneken, C.V., Meir, F.V., SYS, S. and Weyns, A.:** Stereologic characteristics of pig small intestine during normal development. *Digestive Disease and Sciences.*, 2002; 47: 868-878.
4. **Howard, C.V., Reed M.G.:** Estimating of reference volume using the Cavalieri method. In: *Unbiased Stereology*. Eds. Howard, C.V., Reed M.G., Oxford, Bios Scientific Publishers., 1998; 55-65.
5. **Jin, L., Reynolds, L.P., Redmer, D.A., Caton J.S., Crenshaw, J.D.:** Effects of dietary fiber on intestinal growth, cell proliferation and morphology in growing pigs. *J. Anim. Sci.*, 1994; 72: 2270-2278.
6. **Makanya, A.N., Maina, J.N., Mayhew, T.M., Tschanz, S.A. and Burri, P.H.:** A stereological comparison of villous and microvillous surfaces in small intestines of frugivorous and entomophagous bats: species, inter-individual and craniocaudal differences. *J. Exp. Bio.*, 1997; 200: 2415-2423.
7. **Mayhew, T.M.:** Geometric model for estimating villous surface area in rat small bowel is justified by unbiased estimates obtained using vertical sections. *J. Anat.*, 1988; 161: 187-193.
8. **Mayhew, T.M.:** Striated brush border of intestinal absorptive epithelial cells: stereological studies on microvillus morphology in different adaptive states. *J. Elect. Micros. Tech.*, 1990; 16: 45-55.
9. **Mayhew, T.M. and Carlos, F.L.:** Mechanisms of adaptation in rat small intestine: regional differences in quantitative morphology during normal growth and experimental hypertrophy. *J. Anat.*, 1989; 164:189-200.
10. **Mayhew, T.M., Elbrnød, V.S., Dantzer, V. and Skadhauge, E.:** Quantitative analysis of factors contributing to expansion of microvillous surface area in the coprodaeum of hens transferred to a low-NaCl diet. *J. Anat.*, 1992; 181:73-77.