

T.C
Marmara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Patoloji Ana Bilim Dalı
Histokimya

GLOBAL İSKEMİDE KORTİKAL
NÖRONLARIN FARKLI HİSTOKİMYASAL
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Ecz.GÜLSÜN EKİCİOĞLU

DANIŞMAN

Doç.Dr.AYDIN SAV

İSTANBUL-1992

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İÇİNDEKİLER

Giriş _____	1
Genel Bilgiler _____	2 - 25
Materyel Metod _____	26 - 33
Bulgular _____	34 - 49
Tartışma _____	50 - 51
Sonuç _____	52
Özet _____	53
Summary _____	54
Kaynaklar _____	55 - 61

GİRİŞ

Felç (inme) serebrovasküler hastalıklar içinde insan sağlığı açısından günümüzün en önemli problemlerinden biridir . A.B.D.'de her yıl 500.000 kişi felç geçirmekte ve bunların 200.000'i ölmektedir. Kalp hastalıkları ve kanserden sonra üçüncü ölüm nedeni olarak güncelliğini korumaktadır. A.B.D.'de 35 - 65 yaşları arasında 2,5 milyon insan felçli olarak yaşamını sürdürmekte ve bunların % 15'i iş göremez halde , % 55' i ise ancak yardımla iş görebilmektedir (1,2,4).

Felç iki ana grupta incelenir.

1. İskemik felç

2. Hemorajik felç

Yapılan, çalışmalarda felç geçirenlerde iskemik felcin % 84 (% 53 trombotik, % 31 embolik), hemorajik felcin % 61 (% 10 intraserebral hemoraji ve % 6 intrakraniyal anevrizmanın subaraknoidal kanamayla oluştuğu) oranında olduğunu göstermiştir (3).

Biz çalışmamızda insan yaşamında böyle geniş bir yer tutan hastalığa ışık tutabilmek için, ratlarda global iskemi modelinde perilezyonal alanlarda santral sinir sistemi elemanlarından nöronlardaki reaktif sellüler değişiklikleri konvansiyonel histokimya yöntemlerinden iki boya ile boyayıp, ışık mikroskopunda değerlendirmeyi , bir başka deyişle global iskemiye konvansiyonel histokimya yöntemleri ile göstermeyi amaç edindik.

GENEL BİLGİLER

I -SANTRAL SİNİR SİSTEMİ

Santral sinir sistemi altı bölümden oluşmuştur (5).

a) Cerebrum (beyin):Sağ ve sol hemisferden oluşmuş; 1,5 inçlik bir yarıkla birbirinden ayrılmıştır. Carpus callosum sinir liflerinden oluşmuş ve her iki hemisferi birbirine bağlar . Herbir hemisfer beyaz maddeden ibaret olup, gri madde ile sarıdır (5,70). Gri maddeye ; subsantiya grisea , korteks , beyaz maddeye; subsantiya alba, medulla denir (70). Kortekste genellikle nöronların perikaryonları yerleşmiştir. Kortekste yaklaşık 50 milyar nöron vardır ; en iyi boyama yöntemleriyle bunların % 2 kadarı ortaya çıkarılmıştır (70).

Kortekste sito ve miyeloarkitektürü incelendiğinde altı kattan oluştuğu gözlenir.

Hücreli yapı (sitoarkitektür)

- I. Lamina zonalis (str. molekülare)
- II. Lamina granülaris eksterna
- III. Lamina piramidalis eksterna
- IV. Lamina granülaris interna
- V. Lamina piramidalis interna
(lamina gangliyonaris)
- VI. Lamina multiformis

Fibrilli yapı (miyeloarkitektür)

- I Lamina tangensiyalis
- II Lamina disfibroza
- III Lamina superradyata
- IV Striya Baillarger ekterna
- V Lamina interradyata
(içte striya Baillarger interna)
- VI Lamina infrastriyata

b) Cerebellum (beyincik) : iki hemisferden oluşmuştur. Sulkuslar ile bölünür. Beyinde olduğu gibi beyaz maddeden ibarettir. Gri maddeyle çevrilidir.

c) Midbrain ve pons: Medulla ve spinal corddan bağlıdır. Buradan optik sinir geçer.

d) Medulla: Spinal cord, midbrain ve serebellumu bağlar .

e) Spinal cord : Sinir sisteminin periferik sinirlerini içerir . Spinal cord gri maddeden oluşmuştur. Beyaz madde ile çevrilidir.

f) Meninksler : Santral sinir sistemini çevreler ve korur . Bağı dokusundan oluşmuştur . Üç membrandan oluşur.

- I. Dura mater
- II. Araknoid
- III. Pia mater

Bu membranlar kollajen liflerden, az miktarda elastik liflerden ve endotelial hücrelerden oluşmuştur. Santral sinir sistemi üç tip dokudan oluşmuştur .

Sinir dokusuna ait yapılar: Nöron, akson, dendrit.

Nöroglia : Santral sinir sisteminin özel bağ dokusudur.

Bağ dokusuna ait yapılar : Meninksler .

II-SİNİR DOKUSUNA AİT YAPILAR

NÖRON: Nöronlar 4 - 5 ile 150 mikron büyüklüğündedir (5) . Santral sinir sisteminde piramidal, poligonal, dairevi , oval ve fusiform biçiminde olurlar . Nöronal yapılar iki kategoride toplanırlar .

a) Dendrit b) Akson

Nöronlar genellikle bir akson ve 1-100 dendrite sahiptir. Boyları ve bu yapıların ağaçlanmalarıyla özel bir yapı oluşur (6).

Nöron nukleusu dairesel veya oval yapıdadır. Nukleol veya karyoplasma sitoplazmadan nükleer membranla ayrılmıştır . Bu nükleer membran iki tabakadan oluşmuştur . Perinükleer sisternayı korur. İçteki tabaka düzgünken , dıştaki tabakada kaba endoplazmik retikulumla devam eder, granüler kromatinle düzgün bir şekilde nükleer membranda küme olurlar (6).

Nükleer inklüzyonlar değişik tiplerdedir. Filamentöz , granülofibriler , tübüler ve veziküler yapıdadır. Normal nöronlarda sıklıkla bulunur ve ışık mikroskopuyla da bazen görülebilirler (7) .

Nissl cisimciği ; sitoplazmik bazofilik bir komponenttir. Elektron mikroskobu ile Nissl cisimciklerinin kaba granüllü endoplazmik retikulum yığınlarından oluştuğu gösterilmiştir (6) . Nissl cisimciği; nöronal membran komponentinin bir tamamlayıcısıdır. Organellerle membran molekülleri arasındaki enerji motebolizmasını ve protein eksportunu düzenler (8).

Sitoplazmada en iyi gelişmiş bir organelde golgi kompleksidir . Nukleus etrafında dağınık olarak gözlenir . Agranüler endoplazmik retikulum membranlarının iyi gelişmemesine karşın mikrotübülüsler , mikrofilamanlar ile veziküller akson ve dendritlerde yoğunluk kazanır (6,9) . Golgi cisimciği , agranüler endoplazmik retikulum ve lizozom birbirleriyle ilişkili organellerdir . Golgi cisimciğinin aktivitelerini yoğunlaştırır ve sentezine yardımcı olurlar (10) . Golgi cisimciğinin polari - zasyonu , bütün nöronlarda açıkla görülmese de , materyellerin transportunda önemli bir hizmet gördüğü düşünülmektedir (6).

Perikaryonda pigment yapılarına sıklıkla rastlanır . Sarı - esmer renkte ; lipofuskin karakterliler sekonder lizozom olarak kabul edilir . Yaşlılıkta artar . Bu granüller doymamış yağ asitlerinin polimerizasyonu ve intrasellüler oksidasyonun son ürünleridir . Lipofuskinin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir (6,9) .

Metabolik aktivite sonucunda lipofuskin oluşur. Lizozomda ve sadece mitos esnasında veya hücrenin ölümünde yok olur (11).

Bir diğer görülen pigment de melanindir. Melanın leptomeningeal hücrelerde ve beyin sapının pigmente nükleuslarında bulunur (6).

Mitokondri; oval, yuvarlak ve krista tipli olup akson içinde olanları uzamış şekilleri ile dikkati çekerler (9). Mitokondri, düzenli bir dış membran ve düzensiz iç membrana sahiptir . Bu iki membran strüktür ve fonksiyon olarak farklı yapılardır. İç membranda bir çok hidrogenazlar ve elektron transport mekanizması, dış membranda ise monoaminooksidaz sistemi bulunur (7).

Nöronal sitoskeloton üç elementten oluşmuştur :

- 1) Nörofilaman
- 2) Mikrotübül
- 3) Mikrofilaman

NÖROFİLAMAN : Bu filamanlar 10 nm çapında ve değişik boylardadır . Boyları mikrofilamanlarla mikrotübüller arasındadır . Hayvan hücrelerinde beş çeşit filaman vardır . Bunlardan santral sinir sisteminde iki çeşidine rastlanır.

a) Nörofilaman : Sinir hücrelerinde

b) Glial filaman (GFAP) : Astrositlerde bulunur.

Morfolojik olarak aynı görülse de , farklı proteinlerden oluşur . Nörofilaman santral sinir sisteminde üç polipeptitten izole edilmiştir .

Yaklaşık olarak mol ağırlığı 70 , 150 , ve 200 kilodaltondur (16) . Yapılan çalışmalarda dendrit ve aksonlar perikaryonda nörofilamanlar arasında immunhistokimyasal farklılıklar olduğunu göstermiştir (17) . Nörofilaman aksonal transport ve intrasellüler transport sistemini düzenler. Nöron spesifik (69).

MİKROTÜBÜL: Belirsiz boylarda, 24 nm. çapında 13 globüler subunitden oluşur . Herbiri protofilaman içerir . Nörofilamanla birlikte perikaryonda bulunur. Tübülün , mikrotübülün en önemli komponentidir. α ve β şekilleri vardır (12) . Mikrotübüllerin bir çok fonksiyonu vardır.

Bunlar ; skeletal destek ; aksonal akışı sürdürme, değişik maddelerin ve sitoplazmik veziküllerin transportu , sellüler kontraksiyon ve mitozdaki rolleridir (7) . Golgi cisimciğinin fonksiyonlarının sürdürülmesinde rol oynarlar (15) .

MİKROFİLAMAN : Aktinden oluşur . Globüler protein moleküllerinden oluşur . Mol ağırlığı 42.000 dir. Mikrofilaman aksonal transportta rol oynar . Fonksiyonların stabilizasyonunda etkilidir (14) .

SİNAPSLAR

Sinapslar, elektriksel veya kimyasal nöron dışı, özel fonksiyonel değme bölgeleridir (6,9) . Sinapslar , nöronlar arası uyarı iletisinden sorumludur . Aksonlar sonlanma bölgelerinde myelinlerden kurtulup sinaps

yapısına katılırlar. Bir akson diğer bir nöron yapısına yaklaştığında , genellikle dendrit veya perikaryon ile değme noktalarında butonlar oluşturur . Bunlar elektriksel sinapslardır (9). Hücreden hücreye uyarı iletisi kimyasal mekanizmaile de gerçekleşir. Elektron mikroskopisiyle incelenebilir ütilize çeşitli maddelerle (nörotransmitterler ve nöropeptidler) intersellüler alanda oluşur (6,9) .

Sinapsın yapısında;pre - sinaptik element, sinaptik yarık ve post - sinaptik komponent bulunur.

Serebral korteksin piramidal hücrelerinde ultra-strüktrel çalışmalarda 2 tip sinaps görülmüştür.

Tip I sinaps: Birleşme yeri genellikle geniş, post-sinaptik yoğunluk belirgin,asimetrik sinapsları oluşturur ve geniş sinaptik yarık yoğun plak içerir.

Tip II sinaps: Tip I sinapsın tersine, post-sinaptik yoğunluk az olması ile kolay tanımlanabilir. Yarık dar ve yoğun plak içermez. Her tarafta simetrik konfigürasyon gözlenir (18). Pre-sinaptik element en çok aksonla sonlanır. Aksonal terminalden form alan sinaps bir başka nöronla; akso dendritik sinaps, akso-somatik sinaps , ve akso-aksonal sinaps oluştururlar (6,9).

Sinapsın fonksiyonu ve morfolojisi arasındaki korelasyon, nörotransmitterlerin tipleri temel alınarak yapılmıştır (19). Elektron mikroskopisi ve immun-histokimya çalışmaları kombinasyonuyla santral sinir

sisteminde sinapslar klasifiye edilmişlerdir. Bu çalışmalarda; asetil kolin, noradrenalin, dopamine, 5-hidroksitriptamine, glutamate, γ -aminobutirik asit, glisin ve çeşitli nöropeptidler kullanılmıştır (6).

AKSON:Nöronal bir yapıdır.Genellikle tektir.Akson tepeciğinden köken alır (6,9,20).

Akson tepeciği Nissl cisimciği içermez. Sitoskletal elementler (mikrotübül ve nöroflaman) mevcuttur. Mikrotübüller küçük demetler halinde aksunun primer segmentidir (6).

Aksonun daha çok distalinde çeşitli organeler mevcuttur .Fakat genellikle kaba granüllü endoplazmik retikulum ve poliribosomlar yoktur .

Aksonal transport periferden-perikaryona (anterograd transport) ve tersi (retrograd transport) daha az olmak üzere iki yöndedir (21) . Her iki trasportun mekanizmaları aynıdır . Her ikisi de metabolik enerjiye , aynı iyonlara ve aynı etkili ilaçlara ihtiyaç duyarlar (21) . Aksonal transport sinir hücrelerinin özel fonksiyonları için yaşamsaldır . Protein sentezinde rol oynarlar (6) .

DENDRİT: Santral sinir sisteminde, genellikle çok kısa,multiple ve serbest dallı,hücre gövdesinden köken alan yapılardır (6 ,9 ,20) . Dendritlerde en iyi görülebilen organel golgi cisimciğidir (6) . Dendritik ağaçlanma baz alınarak nöronların 3 şekilde klasifikasyonu kabul edilmiştir (22) .

- I isodendritik nöron
- II Allodendritik nöron
- III idiodendritik nöron

Dendritlerin dallanması göz önüne alınarak daha detaylı bir nöron klasifikasyonu yapılmıştır (23) . Mikroskopik olarak ; dendritler irregüler konturlu, tedricen sivri uçlu, dallı, myelinsizdirler . Nissl cisimciği içerirler (6) .

Sinapslar dendritik gövdeden ya da dendritik spinlerden form alırlar . Dendritik spinler perikaryonda bulunurlar . Hücre gövdesi ve dendritlerin total yüzey alanlarının % 43'ünden sorumludurlar . Tek bir piramidal nöron içinde 4000 spin bulunmaktadır (7) . Spinlerin fonksiyonları bilinmemektedir. Akson terminalleri ile sinapslar yaparlar . Alanın algılanmasında rolleri sınırlıdır . Nöron inputunu uyararak regüle ederler (7) .

MYELİN : Santral sinir sisteminde oligodendrositler aksonun etrafında dilediği benzer uzantıları ile spiral sarılmalar yaparak myelini oluşturur. Periferik sinir sisteminde Schwann hücrelerinden farklı olarak , oligodendrosit aksona hücre gövdesi ile değil uzantıları ile sarılır (6,9,24,25). Bu sinir liflerinde gerek myelin oluşumu , gerekse myelin yapısındaki periyodik çizgilenmelere ait özellikler diğer sinirlerdekine uygunluk gösterir.

Periferik sinirlerden bir farklı özelliği de ; Schwann hücrelerindeki gibi oligodendrositler akson etrafında düzenli olarak ucuca gelmezler . Böylece aksonlarda yer yer çıplak alanlar kalır . Bu kesintiler boğumlar halinde gözlenir . Bu girintiler Ranvier boğumu olarak adlandırılır (6,9,24,25).

İnsanda; embriyoda sinirler ilk oluştuklarında myelinsizdirler. Gebeliğin 14. haftasında myelin oluşması başlar , son üç ayda hızlı myelinleşme görülür . Doğumdan sonra myelinleşme devam eder . Tüm sinirlerde ilk iki yılda tamamlanır (9,26) .

Biyokimyasal olarak myelin protein ve lipidlerden oluşur. Myelin proteinleri yaklaşık % 50 proteolipid proteinler, % 30 temel proteinler, % 20 asidik proteolipid proteinlerdir (27) . Myelin yapısında çeşitli lipidler bulunur .Bunlar kolesterol, fosfatidiletanolamin , fosfatidilserin,fosfatidilkolin, sfingomyelin ve glikolipidlerdir. Galaktoserebrosid ana glikolipid komponentidir (6,20) .

NÖROGLİA

Santral sinir sisteminde nöron dışında kalan, hücreleri birbirine bağlayan hücrelerdir (6,9,25) .

Virchow tarafından glia terimi ilk kullanılmıştır (28) . Daha sonra Cajal (29) glial hücreleri üç kategoriye ayırmış . Astrositlerin iki varyasyonunu (protoplazmik ve fibröz) karşılığı olarak 1 ve 2

olduğunu belirtmiş , 3 . eleman (oligodendrosit ve mikroglial hücre) Rio hortega tarafından refere edilmiştir (30) .

Oligodendrosit; astrositle nöroepitelyal orijinlidir . Mikroglial hücreler mezenkimden orijin alırlar . Nöroglia sadece astrosit , oligodendrosit , ependim hücreleri ve koroid pleksus epitelinden doğan ependimi içerir (6 ,9 ,20) .

ASTROSİT : Nöroglial hücrelerdendir . Yıldız şeklinde , ovoid , yada sferikal , geniş nukleuslu , seyrek kromatin granüllüdürler (24) . Morfolojik olarak en çok varyasyonu en çok yönlü fonksiyonu vardır (6 ,9 ,20 ,24 ,25) .

Protoplazmik ve fibröz astrosit olarak ikiye ayrılırlar (6 ,9 ,20 , 24) . ikisinin arasındaki farklılık;konfigurasyonları ve filaman içerikleridir(6)

Protoplazmik astrosit; dallı bir yapıya sahiptir. Esas olarak beyin ve spinal kordun gri maddesinde bulunur (6,9,24) . Beyindeki bazı patolojik olaylarda zarar gören beyin dokusunun uzaklaştırılmasında veya küçük tamirlerde anahtar rolü oynar (9) . Fibröz astrosit daha az sayıda ve ince , uzun uzantıları vardır . Beyaz maddede yaygındırlar (6,9,20,24,25) . Nöronların kaybı ile oluşan beyin hasarında fibröz astrositler artarak nedbe (scar) veya sklerozis oluştururlar (24) .

Astrositler nöron ile kapiller arasında yer alır. Damar bazal laminasına astrosit son ayakçıkları ile

(perivasküler ayakçıkları) yaslanırlar . Bu sonuçlar kan - beyin bariyerinde , fonksiyon görmesi yanında , diffuzyon bariyeri olaylarında da katkıda bulunurlar (6,9,20) .

OLİGODENDROSİT (Oligodendroglia) : Santral sinir sisteminde beyaz ve gri maddede çok sayıda bulunan glial komponenttir (6,9,20,24,25) .

Astrositten küçüktür (6 - 8 μ m) . Sitoplazması dardır . Nukleus çevresinde mitokondri, bazı serbest ribozomlar , kaba granüllü endoplazmik retikulum profili ve küçük golgi cisimcikleri görülür (24) .

Oligodendrositler,bulundukları lokalizasyona göre üçe ayrılır (6,24) .

I Kan damarları çevresinde , perivasküler .

II Gri maddede , sinir hücrelerine komşu ; perinöral veya satellit hücreler .

III Beyaz maddede;myelinli fibrillerin arasında interfasiküler oligodendrosit.

Son konumda oligodendrositler nöron fibrillerini sararak myelinli form oluştururlar . Aynı fonksiyon periferik sinir sisteminde Schwann hücrelerinde görülür (6,24) .

Oligodendrositler; ultrastrüktürel çalışmalar baz alınarak ,sitoplazmik yoğunluklarına göre üç subgruba ayrılmışlardır (31) .

I hafif II orta III ağır.

Hafif oligodendrositler mitotik evrede çok aktif

olarak görölürler, küçülerek ağır, olgunlaşmış hale gelirler.

iki önemli fonksiyonu vardır .

I Myelin formasyonu .

II Nöronların beslenmesi .

EPENDİMAL HÜCRELER: Ependima ventriküler sisteme yayılmıştır. Epitele benzer bu hücreler kübik veya kolumnar hücresel organizasyonda karakteristik bir kutuplaşma gösterir (6,25) .

Beyaz maddeyle çevrilmiş hücreler düzleşmiştir. Bir kaç siliya sahip olanlar gri maddeyle çevrilidir (6) .

Sitoskletonda intermediyat filaman, mikrofilaman ve mikrotübüllerden oluşur . Intermediate filaman astro-sitte de mevcutken , ependim hücrelerinde de GFAP bulunmaz . Bununla beraber gestasyonun 15-40 hafta arasında insan fetusunda geçici olarak ependimde GFAP bulunur (32) .

Serebrospinal sıvının sirkülasyonuna, ependim hücrelerinin siliyalarını hızlı hareketleriyle yardımcı olurlar. Astrosit gibi destek görevleri vardır. Santral sinir sistemi parenkimi ve ventriküller serebrospinal sıvı arasında ependim bir bariyerdir. Maddelerin transportu için etkili , ideal konumdadır (6) .

MİKROGLİA: Hortega veya Robertson-Hortega hücreleri serebral histiosit, fagosit, rod hücreler ve mesoglia olarak adlandırılır . Normal beyinde bulunur (33) .

Beyaz ve gri maddeye yayılmışlardır. Genellikle kan damarlarının yanında veya nörosatellit olarak bulunurlar (24) .

Mikrogliaların orijinleri hakkında çeşitli hipotezler öne sürülmüştür. Pial, nöroepitelyal, peristik ve monositik kökenli hücreler olduğu söylenmektedir (34).

Mikroglialar zengin lizozomal hidrolitik enzimlere sahiptir . Bu da fagositik aktivitelerini artırır (35). Santral sinir sistemi zedelenmelerinde mikroglialar aktif hale geçerek lezyonun olduğu yere doğru göç ederler, yabancı maddeleri içlerine alırlar ve mitozaya uğrarlar. Değişik şekillerde görünürler (36) .

CHOROİD PLEXUS: Ependimden oluşan bir epitel katman ve pia materin vasküler katmanlarından oluşur (6). Serebrospinal sıvının kontrolünü yapan özel bir salgı epiteli niteliğindedir. Damardan zengin dokuyu örten epitel izoprizmatik ve mikrovillilidir. Yüzeyde yer yer silia grupları taşır (6,9,24) .

Choroid plexus epiteli, sitoplazmasında bulunan karbonik anhidraz II (c) ile immunhistokimyasal olarak tanınabilir (37) . Bu enzimin serebrospinal sıvının yapımında rolü olduğu düşünülmektedir . Nukleus yuvarlak veya oval , sitoplazma içinde genellikle santral konumundadır . Çok sayıda mitokondri hücrenin apikalinde yerleşmiştir . Mitokondri serebro-spinal sıvının yapımı sırasında aktif transport için zorunlu enerjiyi sağlar (6).

Choroid plexus ana görevi serebrospinal sıvının yapımıdır. Serebrospinal sıvının % 10-20'sinin ekstra araknoidalden kaynak aldığı tahmin edilmektedir (38).

Serebrospinal sıvı ; insanda günde yaklaşık 500 - 700 ml yapılır.Bunun sadece 140 ml'si barındırılır. 25 -30 ml'si ventriküllerde ve subaraknoid aralıkta tutulur (39) .

MENİNKSLER (ZARLAR)

Santral sinir sistemini saran , bağ dokusundan oluşmuş membranlar sistemidir.

Üç tabakadan oluşmuştur (6,9,24) .

I Dura mater

II Araknoid

III Pia mater

Araknoid ve pia matere beraberce leptomeninks adı verilir (6,9,24) .

Dura mater (pakimeninks) ; sert, yoğun, elastik olmayan bir membrandır . Beynin etrafını çevirir. İki tabakadan oluşmuştur (6,24) .

I Falx : iki hemisferin arasındadır .

II Tentorium cerebelli : Beynin geri kalan bölümünden posterior fossayı ayırır .

Araknoid çeşitli kalınlıktadır . Değişik hücrelerden köken almıştır . Pia mater araknoidden çok sayıda , çeşitli uzunlukta trabeküllerle ayrılmıştır.

Bu trabeküllerden oluşan aralığa subaraknoid aralık adı verilir (6,24). Trabeküller kollajen ve elastik liflerden oluşmuştur (24). Subaraknoidal aralık serebrospinal sıvıyla doludur (6) . Pia mater araknoidle aynı hücre yapısındadır (6,24). Fakat pia mater araknoidden daha incedir. Damardan zengindir (5).

III - İSKEMİ

Doku ve hücreler besi maddelerini ve oksijeni kandan sağlar. Gerekli ölçüde kanlanmayan doku ve hücrelerde fonksiyon bozuklukları ve morfolojik değişiklikler oluşur.

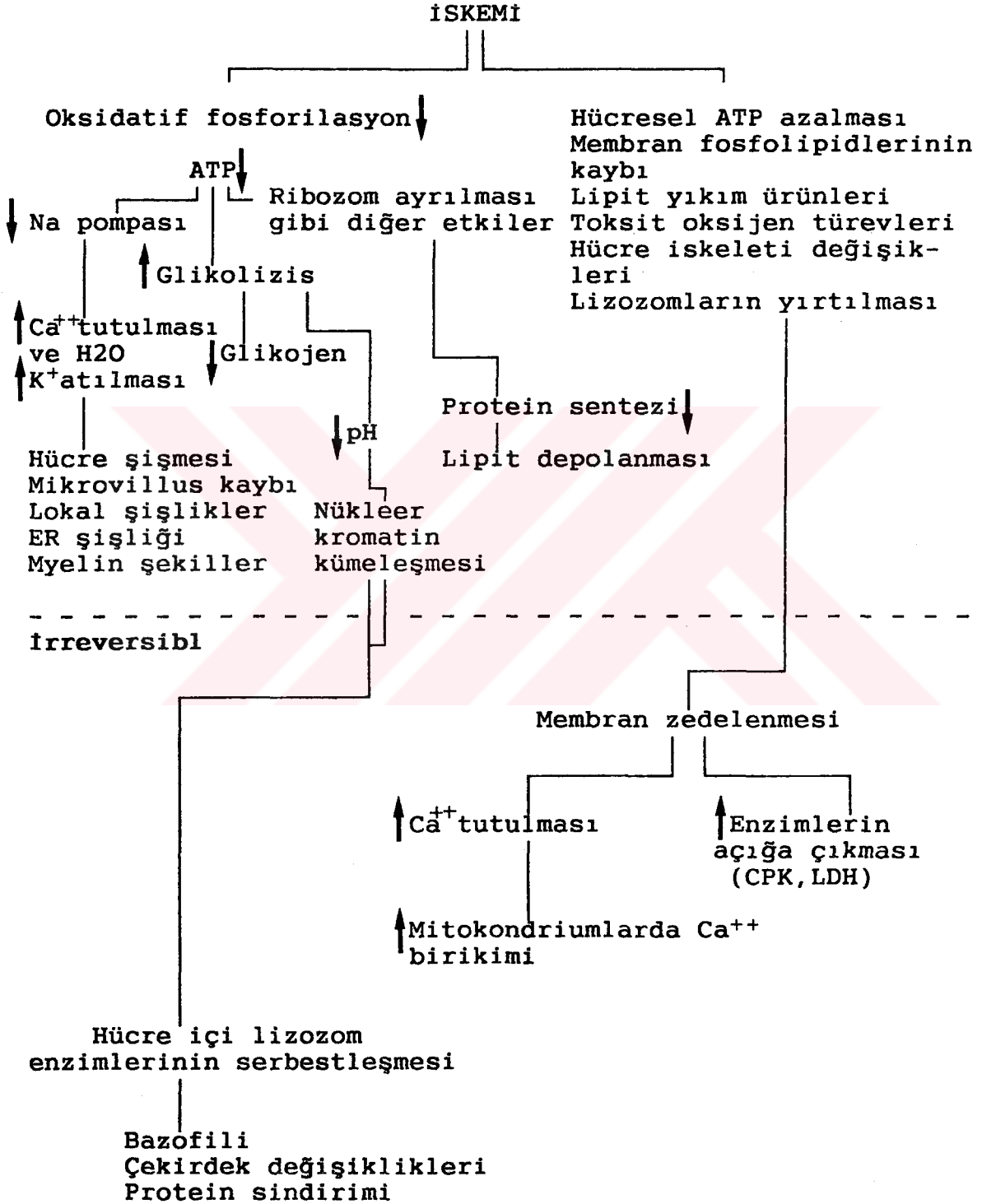
Bir bölgeye az kan gelmesi İSKEMİ (41) oksijensiz kalmasına HİPOKSİ (1) denir . Hipoksi , aerobik oksidatif solunumu etkileyen son derece önemli ve genel bir hücre zedelenmesi ve ölüm nedenidir .

İskemi en sık görünen hipoksi nedenidir. Hücre zedelenmesinde oksijenin ana rolü oynadığı düşünülmektedir. Cowley (43), insanlarda, deney hayvanlarında ve kültür sistemlerinde akut hipoksik zedelenmede yapısal değişiklikler olduğunu bildirmiş ve bu değişiklikler şemalarla gösterilmiştir . (Tablo :1)

Hipokside ilk etkilenen ; mitokondrial oksidatif fosforilasyonla sağlanan, hücrenin aerobik solunumudur. Adenozin trifosfat (ATP) yapılımlı yavaşlar yada durur. Sodyum pompası yetersizliğine sebep olacak şekilde Oubain duyarlı Adenozintrifosfataz (ATPaz) aktivitesinin azalmasına neden olur . İyon tutulumuna izoosmotik su birikimi eşlik ederek akut hücresel şişme ortaya çıkar.

Tablo:1 - İskemik zedelenmede olaylar dizisi (42).

Reversibl



Hücrede ATP azaldığında AMP (Adenozin monofosfat) birikir. Fosfofuruktokinazı uyarır. Bu da anaerobik glikoliz ile glikojenden ATP sentezini artırarak hücreye enerji sağlar .

Glikojen hızla düşer. Glikolizis laktik asit ve fosfat türevlerinin hidrolizi ile inorganik fosfatların birikimine yol açar, hücre içi pH düşer. Kaba endoplazmik retikulumdan ribozomlar ayrılır, polizomların bozulmasıyla monozomlar oluşur .

Hipoksi devam ederse ; membran geçirgenliği azalır. Hücre yüzeyinde lokal şişlikler oluşur. Myelin şekiller ortaya çıkar . Bu evrede mitokondriler normal yada hafifçe şişmiş ya da yoğunlaşmıştır. Endoplazmik retikulum genişlemiş ve tüm hücre belirgin olarak şişmiştir . Oksijen verildiğinde tüm bulgular geri dönebilir . Reversibldır. İskemi devam ettiğinde olay irreversıbl hale gelir. Irreversıbl zedelenme morfolojik olarak ; mitokondrilerin ileri derecede vakualizasyonu , plazma zarlarının aşırı yıkımı, lizozomların şişmesi ve hücre içi yoğun kalsiyum alınması şeklinde görülür . Mitokondri matriksinde şekilsiz yoğunlaşmalar gelişir. Sürekli olarak aşırı geçirgen membranlardan protein , temel koenzimler ve ribonükleik asitler ve hücre içi yüksek enerji fosfatları kaybolur. pH düşmesi lizozom membranlarında zedelenmeye yol açar , enzimler sitoplazmaya geçer.

Asit hidrolazların aktivasyonu ile hücre bileşenlerin enzimatik sindirimi ve buda; ribonükleo-protein ve deoksiribonükleoprotein ve glikojen kaybına neden olur.

Hücre ölümüyle bu süreç içinde hücre bileşenleri yıkılır ve hücre enzimleri hücre dışı aralığa geçerler hücre dışı makromoleküller interstisyel ölü aralıktan hücreye girerler.Ölü hücre myelin şekiller biçiminde büyük fosfolipit kitlelerine dönüşebilir. Bu ya diğer hücrelerde fagosit edilir yada yağ asitlerine parçalanır.(42)Irreversibl hipoksiyi ; Farber (44) ve Smuckler (45)'a göre iki olgu karakterize eder.

- 1- Mitokondirinin işlev bozukluğunun kanlanma ve oksijenlenmeye karşın düzelmeyişi .
- 2- Membran işlevlerinde belirgin bozuklukların gelişimi .

IV-SANTRAL SINIR SİSTEMİNDE İSKEMİ

Santral sinir sisteminde hipoksi nedenleri 3 ana başlıkta incelenir (1) . (Tablo :3) .

- Serebral dolaşımın bozulması .
- Kan dolaşımının bozulması .
- Dokuya toksik ajanların etkisi .

Garcia (49)'a göre insan beyinde iskemik zedelenme 4 şekilde oluşur (Tablo :2) .

- a) Absolute iskemi (Post mortem etkiler) .
- b) Sirkülasyon yetersizliğine sekonder progresiv iskemi,genel olarak bu hastalar hastanede ölürlür.

- c) Ani ve global iskemi , geçicidir bayılma ile zarar verir .
- d) Fokal iskemi , vasküler oklüzyona sekonderdir.

Tablo:2

iskemik zedelenme tipleri ve anatomik karşılığı(47)

A - Irreversible complete iskemi	1 - Somatik ölüm , iskemik hücrel değişiklikler (Bir kaç saatte otolizle oluşan)
B - Incomplete iskemi veya reperfüzyonla oluşan global iskemi.	2 - Beyin ölümü , kardiyak arrest, belirgin hipotansiyon. İntrakranial basınç artımı , kardiyak valvulopati .
C - Regional (Arterial) iskemi. Trombotik, embolik	3 - Beyin enfarksiyonu (iskemik veya hemorajik)
D - Regional (Venöz) iskemi	4 - Beyin enfarksiyonu , hemorajik .
E - Regional (Arteriolar) iskemi.	5 - Beyin enfarksiyonu lakün ve diğer mikro enfarksiyonlar .

Nedenler		Hipoksinin tipi	
I -Serebral dolaşım: Santral sinir sisteminin vasküler hastalığı	A - Genel: Kardiak arrest	Kanla ilgili	Dokudaki O ile ilgili ²
	B - Lokal: Vasküler tıkanma (Trombozis, embolizm)	Yavaşlama	Hipoksi
II - Kan dolaşımı	A - Azalmış O ₂ doygunluğu	İskemi	Hipoksi
	B - 1 -Atmosferik 2 - Solunum asfiksisi Kullanılabilir. hemoglobinin miktarının azalması. 1 - Hemoglobinin miktarı (anemi, hemoraji) 2 - Hemoglobinin kullanı- lılırlığı.	Hipoksemi	Hipoksi
III- Dokuya toksik ajanlar	A - Beyinin solunum enzim sistemlerini zehirle- yenler.		
	B - Dokunun O ₂ kullanımının da yetmezliğe yol açanlar. (Hidrosiyamik asit)		Hipoksidozis

TABLO - 3: Santral sinir sisteminde hipoksi nedenleri (1).

V - SANTRAL SİNİR SİSTEMİNDE İSKEMİK DEĞİŞİKLİKLER

Beynin değişmeyen bir metabolik aktivite düzeyi vardır ve beyin dolaşımını kendi kendine düzenleyen mekanizmalar normal olarak, sistemik kan basıncının geniş sınırlar içinde oynamasına ve beyin içi basınç değişmelerine karşı , beyin perfüzyon basıncının ve kan akımının sürekliliğini sağlar .

Normal insanda beyinde sistolik kan basıncı 50 mm Hg'ya düşene kadar yeterlidir (2,25,47) .

Basıncın bu düzeyin altına düşmesi doku iskemisini uyarır ve bunu izleyen iskemik ansefolopati gelişimini Garcia (46) , bildirmiştir .

Beyinde, iskemiden en kolay etkilenen hücreler nöronlardır. Önce reversibl , sonra irreversibl zedelenmeye uğrarlar (25). Garcia (53) ve Moosy (54)'de çalışmalarında bildirmişlerdir .(Tablo :4) .

Nöronların bazı tipleri, özellikle hippokampusun piramidal hücreleri ve beyinciğin purkinje hücreleri diğerlerinden daha duyarlıdır ve ilk önce bunlar zedelenir (2,25,48) .

Perinöral ve perivasküler alanlarda astrositlerin invaze olması ile geniş vakuoller görülür. Hematoksilen Eosin ile bu alanlarda nukleus uniform bir şekilde mavi , sitoplazma kırmızı renkte görülür (25,48) .

İskemik nöronlarda çok sayıda yapısal değişiklikler görülür.

- Sitoplazmik nükleik asitlerin ve nükleusun solukluğu (gölge noron) .

- Büzülmüş ve yoğunlaşmış perikaryon (Dark nöron).
- Nükleer piknozis ve sitoplazmik eosinofili (Red nöron)
- Nöronal perikaryonda formaldehit pigmentinin çökmesi.
- Nöronal vakualizasyon .
- Perinöronal halo gelişmesi.

Brown (50) ve Garcia (51,52) çalışmalarında iskeminin şiddeti ve süresi ,iskemik alanın reperfüzyon kapasitesi ile belirlenen daha bir çok değişiklikler olabileceğini belirtmişlerdir .

Garcia (55)'a göre ; beyinde global iskemiye sekonder oluşan yapısal değişiklikler :

1 - Makroskobik değişiklikler.

- Diffüz beyin şişmesi ile ağırlığının artması.
- Ventriküller ve sulci daralması .
- Fiksatifin yetersiz penetrasyonu (pembe alanlar).
- Özellikle serebral kortekste gri maddenin koyu renk alması .
- Bazen , beyin parenkimasının yoğunluğunun düşmesi.
- Beyaz maddede corona radiata'nın simetrik oyukları.

2 - Mikroskobik değişiklikler.

- Cerebellar ve cerebral nöronlarda hacim ve boyanma değişiklikleri.
- Nöropillerde vakualizasyon .
- Glial nükleuslarda hiperplazi ve genişleme .
- Soluk eritrositler .
- Polimorf nötrofil lökositlerin göçü ve kenara çekilmesi .
- Özellikle hassasiyetin arttığı alanlarda ; hiperemi

Semptom süresi	Nöronal zedelenme	Hemisferik şişme	Axonda şişme	PMN	Makrofaj	Mikro damarlar	Astro-gliosis
3 saat	++	-	-	-	-	-	-
12 saat	+++	+	-	-	-	+ -	-
18 saat	+++	+++	+ -	-	-	+	-
24 saat	+++	+++	+	+ -	-	+	-
2 gün	++	+++	++	+	-	++	-
3 gün	+	+++	+++	++	+ -	++	-
7 gün	-	++	++++	++	++	++	+ -
16 gün	-	-	++++	-	++	++++	++

TABLO - 4: Serebral infarktüs: Tek damar oklüzyonundan sonra izlenen mikroskobik değişiklikler (53,54) (parafine gömülmüş HE ile boyanmış materyelde).

MATERYAL ve METOD

Çalışmamız ; Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında , ratlar üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmanın devamı olarak yapıldı . Rat beyinlerinde , nöronal hipoksik değişiklikler konvansiyonel histokimya tekniklerinden olan iki yöntem ile karşılaştırıldı .

Çalışmada; cinsiyet ayırımı yapmaksızın ortalama ağırlıkları 146 gr (87-304gr) olan 64 adet Sprague-Dawley rat kullanıldı (56) . Bu ratların kontrol grubu ve 30 dakika ağır hipoksi grubu olan 16 adedi ile çalışıldı .

Test grubunda (B grubu) , hipoksi öncesi 3 dakika süre ile % 100 oksijen solutulan hayvanlara Matsumoto (57), Plummer (58) ve Lunam(59)'ın yaptıkları çalışmalar örnek alınarak %90 N_2O - % 10 O_2 gaz karışımı 30 dakika solutularak ağır hipoksi uygulandı. Kontrol grubuna (A grubu) , sadece oda havası soluyan hayvanlar alındı (56). Süre bitiminde, hayvanlar dekapite edilerek öldürüldüler . Beyinler %10'luk nötral tamponlu formaldehite alındı .

Tüm beyinlerin sağ hemisferleri kullanıldı. Her hayvana 5 mikron kalınlığında kesitler yapıldıktan sonra Hematoxylin - Eosin (HE) ve Luxol Fast Blue -Cresyl Fast Violet (LFB / CV) uygulandı. Bu kesitlerde korteste süperfisyel (A-1,B-1) ve derin

(A-2,B-2) alanda (5'er alan) toplam nöron ve piknotik nöronlar aynı patolog tarafından sayıldı (Resim 1,2).

Gruplarda ; her iki yöntemle alınan sonuçlar "Two - Sample Analysis" (62) ile kendi içlerinde ve test ile kontrol grupları arasında karşılaştırıldı.

Gruplara ait Frequency Histogramlar Statgraf'la (62) , iki yöntemin karşılaştırma grafikleri Harvard Graphics'le elde edildi (63) . Bu işlemler IBM/PS full - compatible , 80286 CPU ve 40 MB harddisk donanımlı bilgisayarda kullanılarak yapıldı. Her iki grup (kontrol ve ağır hipoksi grubunda) beyinlerin tartımları Sartorius hassas terazide alındı. Boyutları ölçüldü (Tablo :5,6) .

Denek	Boyutlar(cmxcn)	Ağırlık (gr)
1	1.2x1.0	0.888
2	1.5x0.9	1.131
3	1x0.9	0.915
4	0.8x0.9	0.735
5	1x0.9	0.876
6	0.9x0.9	0.677
7	0.9x0.8	0.739
8	1x0.9	0.899

TABLO-5: A KONTROL GRUBU (n=8)

Denek	Boyutlar(cmxcn)	Ağırlık (gr)
1	1.5x0.9	0.914
2	2x0.6	0.856
3	2x1	1.053
4	1.7x0.8	0.687
5	1.9x0.9	0.999
6	1.7x0.7	0.794
7	1.6x0.8	0.803
8	2x0.6	0.890

TABLO-6: B TEST GRUBU 30 dakika AĞIR HİPOKSİ (n=8)

Koronal düzlemde frontal polustan itibaren 5-7 mm. düzeylerinde yapılan beyin kesitleri patolojik gözetiminde gerçekleştirildi . Rutin formol-parafin takibinden sonra 5 µm. kalınlıkta koronal düzlemde ikişer adet kesit Reichert kızaklı mikrotomda alındı.

H.E ve LFB / CV boyaları uygulandı. Boya solüsyonlarının tümü laboratuvarımızda hazırlandı. Katı maddelerin tartımlarında ; laboratuvarımızda rutin olarak kullandığımız santigram terazisi , sıvı ölçümlerinde Teknik Cam 100-1000 ml.lik cam mezürler, 1-5-10 ml.lik cam pipetler , solüsyonların hazırlanmasında 100-1000 ml.lik cam balonlar kullanıldı. Alkol seyreltmesinde alkolometre ile çalışıldı .

Preparatların deparafinizasyon işlemi EN- 500 etüvde 65°C da yapıldı .

HEMATOXYLIN-EOSİN METODU (60)

Kullanılan Solusyonlar:

HARRİS HEMATOXYLIN

Hematoxylin crystal (Riedel de Haën:32320)_____5gr.
 Alkol % 100 (Delta Kimya Sanayii ve Ticaret AŞ)____50ml.
 Ammonium aluminium sulfat (Merck:1031)_____100gr.
 Distile su _____1000ml.
 Mercury (II) oxide (red) (Merck:4465)_____2,5gr.

Alkol içinde hematoxylin eritildi. Ammonium aluminium sulfat distile suda , sıcakta eritildi. Ammonium aluminium sulfat distile su karışımı ateş üzerinden alınarak , hematoxylin - alkol solüsyonu ile yavaş yavaş karıştırıldı. Tekrar ateş üzerine alınarak kaynama ısısına hızla erişildi. Ateş üzerinden alınan solüsyona Mercury (II) oxide yavaş yavaş ilave edildi. Koyu mor renk olana dek tekrar kaynatıldı . Ve hızla soğutuldu . Her 100 ml.boya solüsyonu için Asetik asit % 100 (Merck:56) 'den 2 ml. ilave edildi . Solüsyon adi süzgeç kağıdından süzülerek , koyu renkli şişeye alındı .

ASİT ALKOL % 1

Alkol % 70 _____1000 ml.
 HCl % 37 (Merck:314)_____10 ml.

AMONYAKLI SU

Musluk suyu_____1000 ml.

NH₃ % 28 (Merck:5422)_____2 ml.

ALKOLLÜ EOSİN STOK SOLÜSYONU

Eosin Y (Sigma:E-6003)_____1 gr.

Distile su_____20 ml.

Alkol % 96 (Tekel)_____80 ml.

EOSİN ÇALIŞMA SOLÜSYONU

Alkollü eosin stok solüsyonu_____1 kısım

Alkol % 80_____3 kısım

Çalışma solüsyonu kullanmadan önce hemen hazırlandı . Her 100 ml. için 0,5 ml. %100 Asetik asit ilave edildi .

ÇALIŞMA YÖNTEMİ:

Etüvden alınan preparatların Xylol (Merck:8685)'de 15 dakika süre ile deparafinizasyonu tamamlandı. Preparatlar % 96-80-70° alkoller ve su ile hidrate edildi. Harris Hematoxylin de 5 dakika boyandı . Akan

suyla yıkanan preparatlar % 1 Asit alkolle diferansiye edildi . Diferansiyasyon Nikon Alphaphot - 2 -YS 2 mikroskopla kontrol edildi . Akan suyla yıkanan preparatlar amonyaklı su ile morartıldı. Morartma işlemi akan su altında 5 dakika yıkama ile tamamlandı. Eosin çalışma solüsyonu ile preparatlar 1 dakika boyandı . Akan suyla yıkandı . % 70 - 80 - 96° alkol-ler ve aseton (Merck:13) ile dehidrate edildi . Kurutulan preparatlar Xylole alındı. DYO preparat verniği ile lamellenerek mikroskopik incelemeye hazır hale getirildi . Boyama sonucunda ; nükleuslar mavi, sitoplazma pembe kırmızı renk aldılar .

LUXOL FAST BLUE-CRESYL FAST VIOLET (61)

(Kluver-Barrera Method).

Kullanılan Solusyonlar:

% 0,1 LUXOL FAST BLUE

Luxol Fast Blue MBS (Gurr's 21691)_____ 0,1 gr.

Alkol % 96_____ 100 ml.

Boya maddesi , 100 ml. lik balonda, alkolde çözündürüldü. Stabilitayı sağlamak için % 10 Asetik asitten 0,5 ml. ilave edildi .

% 0,1 CRESYL FAST VIOLET

Cresyl Fast Violet (Merck:15947)_____ 0,1 gr.

Distile su_____ 100 ml.

Boya maddesi ,100 ml.lik balon içinde, suda çözün-
dürüldü . Solüsyon kullanılmadan önce % 10 Asetik
asitten 15 damla ilave edildi. Adi süzgeç kağıdından
süzüldü .

% 0,5 LİTYUM KARBONAT

Lityum karbonat (Merck:5671)_____ 0,05 gr.

Distile su_____ 100 ml.

ÇALIŞMA YÖNTEMİ

Etüvden alınan preparatların deparafinizasyonu xylolde 15 dak. süreyle tamamlandı . % 95°lik alkolle çalkalandı . Kesitler , Luxol Fast Blue solüsyonunda 60°C EN-400 etüvde 18 saat bırakıldı. Etüvden alınan boyanmış kesitler % 95°lik alkolle fazla boya gidene dek çalkalandı.Distile suyla yıkandı. Kesitler önce lityum karbonat , sonra % 70° alkolle çalkalanarak diferansiye edildi . Distile suya alındı . Mikroskopik kontrolden sonra diferansiyasyon işlemi tekrarlandı Cresyl Fast Violet solüsyonu 56°C EN 400 etüvde daha önceden ısıtıldı. Isıtılmış solüsyon ile kesitler 6 dakika boyandı.. % 95°lik alkolle boya çıkmayana kadar diferansiye edildi . Absolu alkolle çalkalandı . Kurumaya bırakıldı . Xylole alındı. DY0 preparat verniği ile kapatılarak mikroskobik incelemeye hazır hale getirildi .

Nöronlar : pembe - mor

Myelin : mavi renk verdi.

BULGULAR

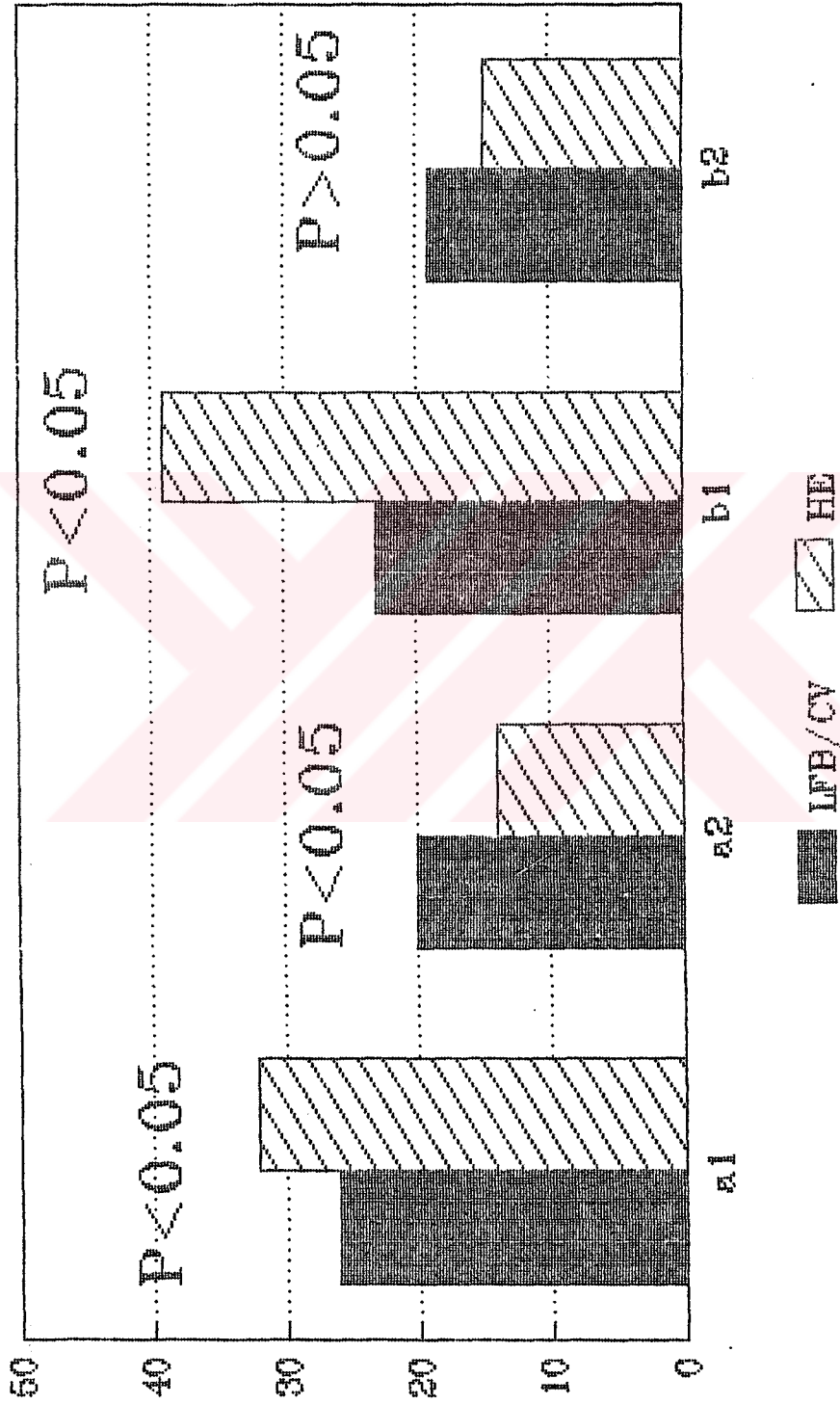
Çalışmamızda ; kontrol grubu ($n=8$) ve 30 dakika ağır hipoksi test grubu ($n=8$) ratlarda kortekste süperfisyel ve derin alanda toplam nöron ve piknotik nöronlar her iki boyama yöntemi ile (H.E ve LFB/CV) ayrı ayrı sayıldı . Sayımlar aynı patolog tarafından, her denekte , her iki katmanda 5'er alan $\times 1000$ immersiyon objektifi ile yapıldı. Piknotik nöronlar Nissl cisimciklerinin net olarak görülmemesi esas alınarak sayıldı (Resim : 17,18).

Kontrol grubu ve test grubunda süperfisyel alanda toplam nöronlar H.E ile daha çok sayılırken ; piknotik nöronlar LFB/CV ile daha çok sayıldı (Resim:3-4). İstatiksel olarak; süperfisyel toplam nöronlarda ,iki yöntemle kontrol grubunda $p=6,90419E-3$ ($p<0,05$), test grubunda $p=2,5033E-7$ ($p<0,05$) H.E lehine anlamlı bir farklılık gözlemlendi (Tablo :7,8,9) . Süperfisyel piknotik nöronlar ; kontrol grubunda $p=4.13867E-3$ ($p<0.05$) LFB / CV lehinde anlamlı bir farklılık gösterirken , test grubunda $p=0.054923$ ($p>0.05$) H.E ve LFB / CV sayımları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi (Tablo :10,10).

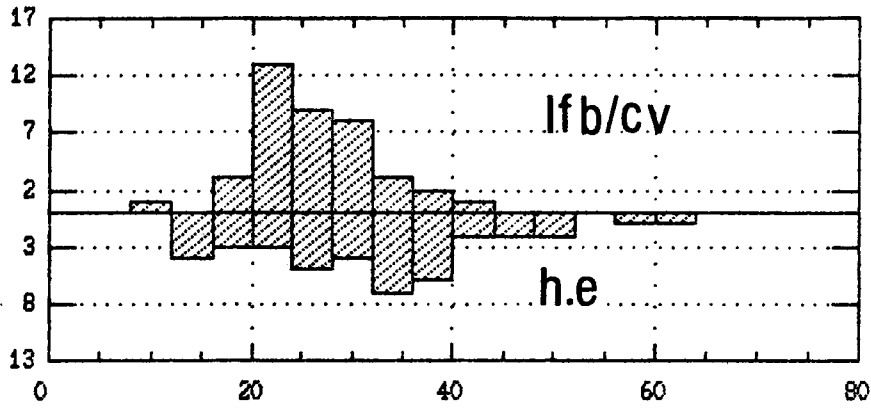
Korteks derin alanda ; iki yöntemle yapılan sayımlarda kontrol grubunda LFB/CV ile toplam nöronlar ve piknotik nöronlar daha fazla sayıldı (Resim:5,6) (Tablo:14). İstatiksel olarak ; sırasıyla $p=4.52E-4$ ($p<0.05$) ve $p=1,04E-5$ ($p<0,05$) bulundu . Anlamlı bir farklılık gözlemlendi (Tablo :12,13) .

Test grubunda ; derin alanda HE ile toplam nöron ve piknotik nöron daha fazla sayıldı .(Tablo:14) (Resim:13,14). Toplam nöronlarda; istatiksel olarak $p=0.819144$ ($p>0.05$) fark izlenmezken , piknotik nöronlarda $p=6,35E-7$ ($p<0.05$) HE lehine anlamlı bir farklılık izlendi. (Tablo:15,16), (Resim:17,18).



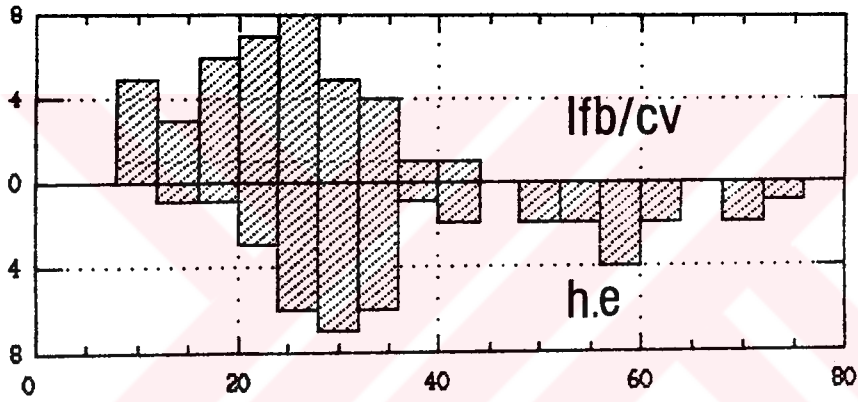


TABLO 7: LFB/CV-HE Süperfisyal Toplam ve Piknotik Nöronlar.



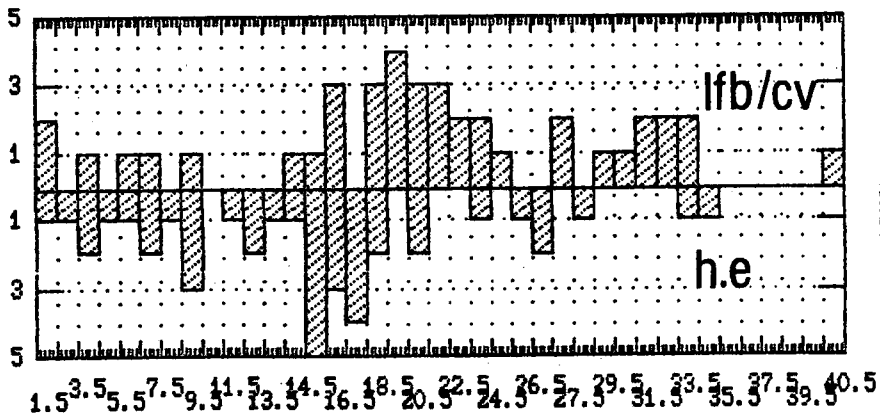
TABLO 8:Süperfisyal toplam nöronlar.

Kontrol grubu LFB/CV-HE



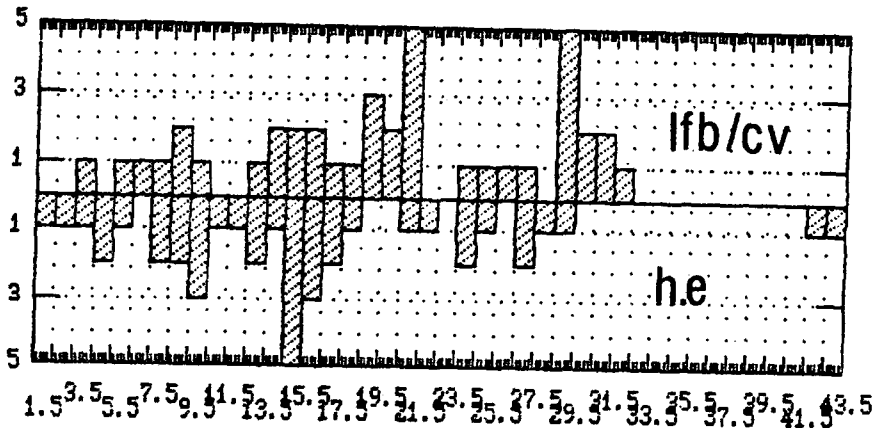
TABLO 9:Süperfisyal toplam nöronlar.

Test grubu LFB/CV-HE



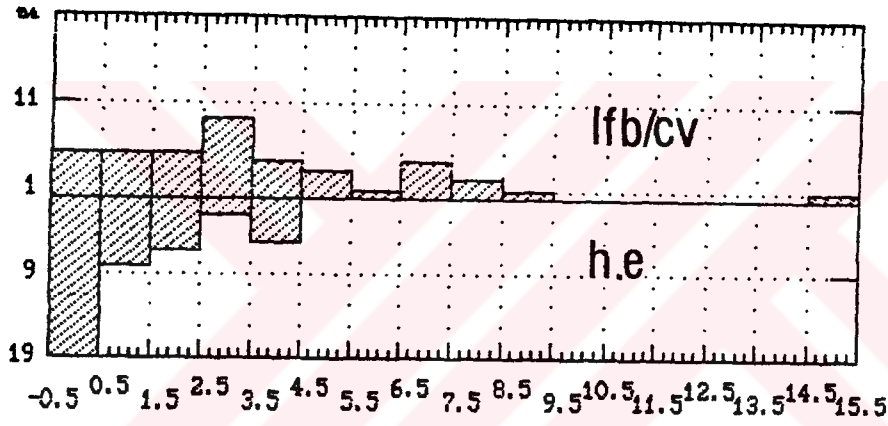
TABLO 10:Süperfisyal piknotik nöronlar

Kontrol grubu LFB/CV-HE



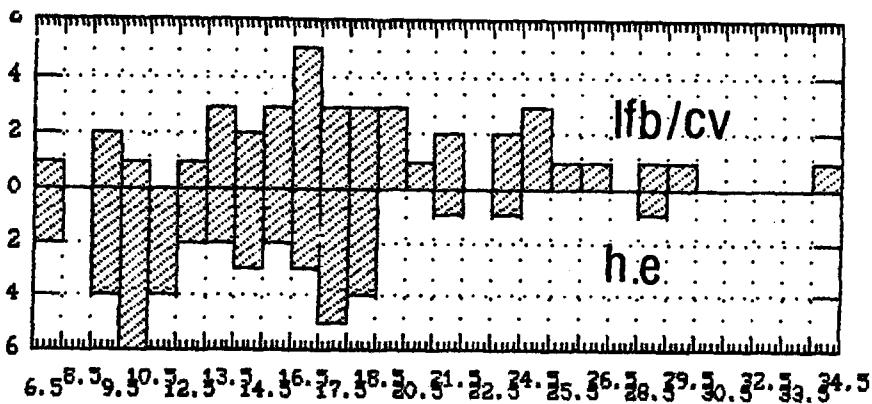
TABLO 11:Süperfisyal piknotik nöronlar

Test grubu LFB/CV-HE



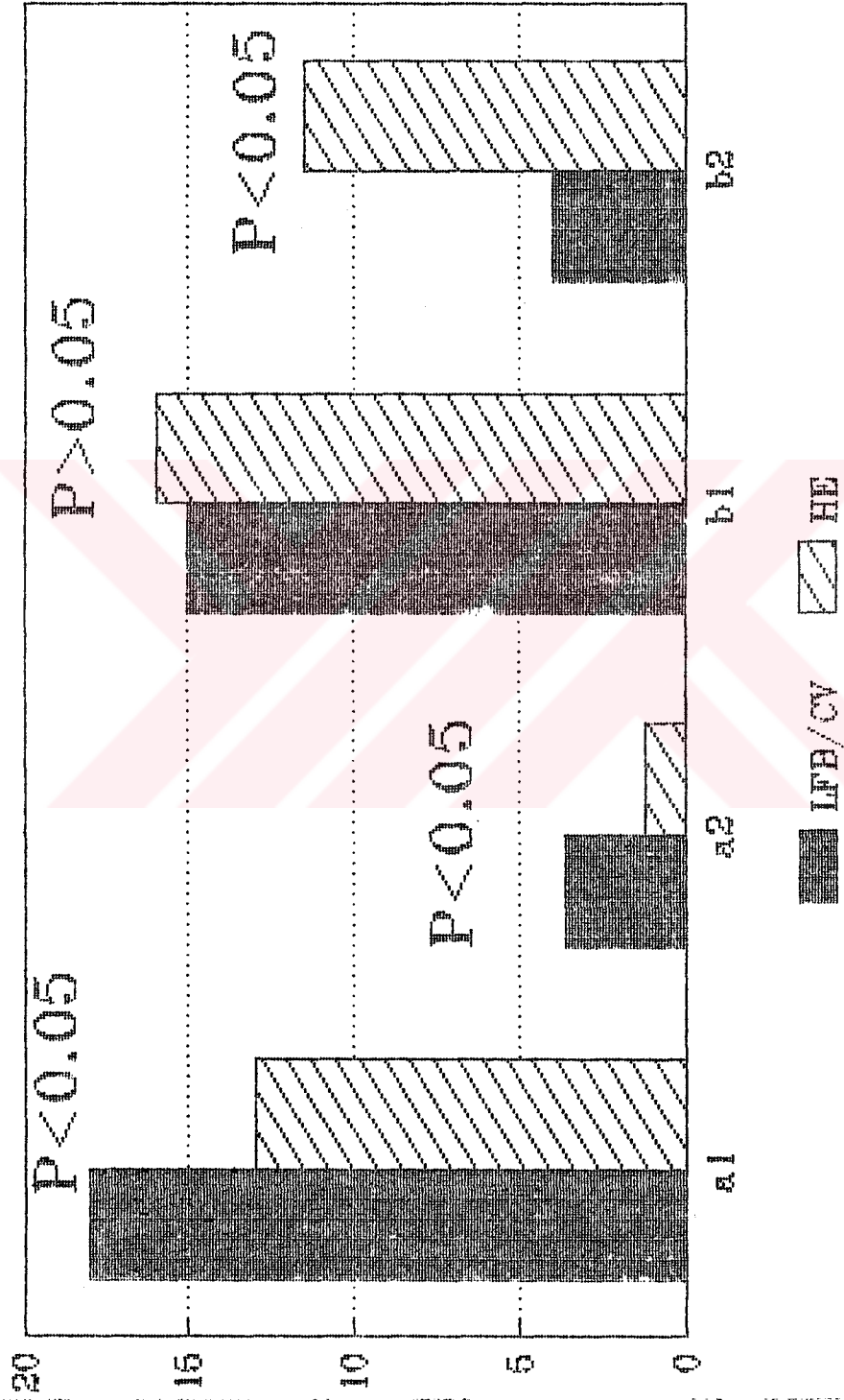
TABLO 12:Derin alan toplam nöronlar

Kontrol grubu LFB/CV-HE

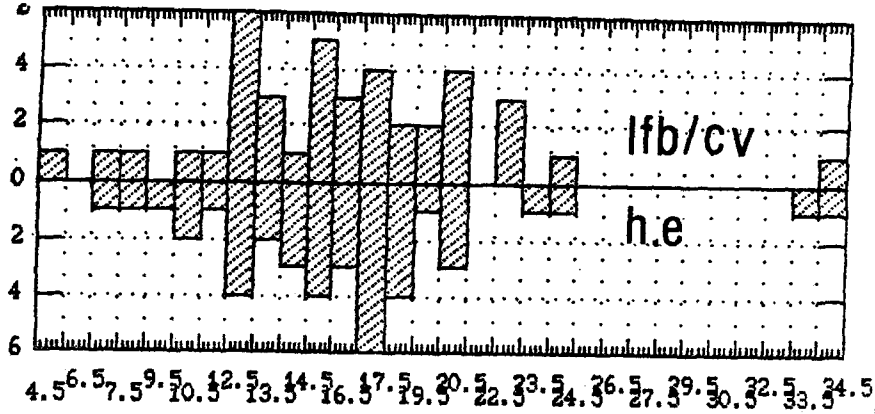


TABLO 13:Derin alan piknotik nöronlar

Kontrol grubu LFB/CV-HE

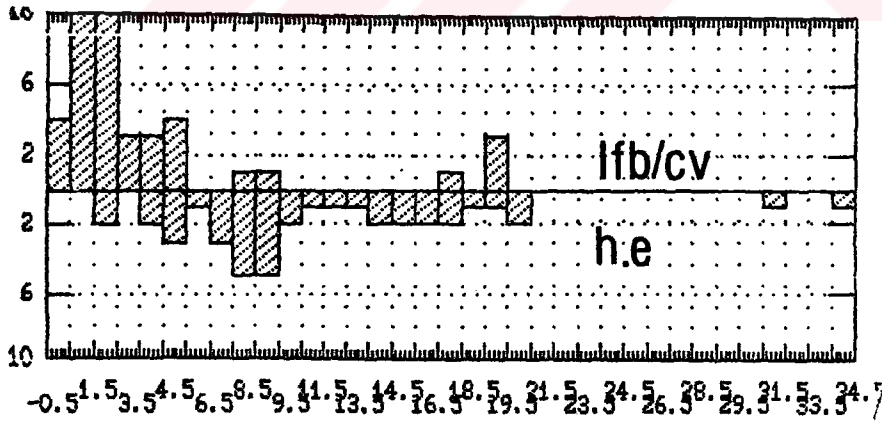


TABLO 14: LFB/CV-HE Korteks Derin Alanda Toplam ve Piknotik Nöronlar



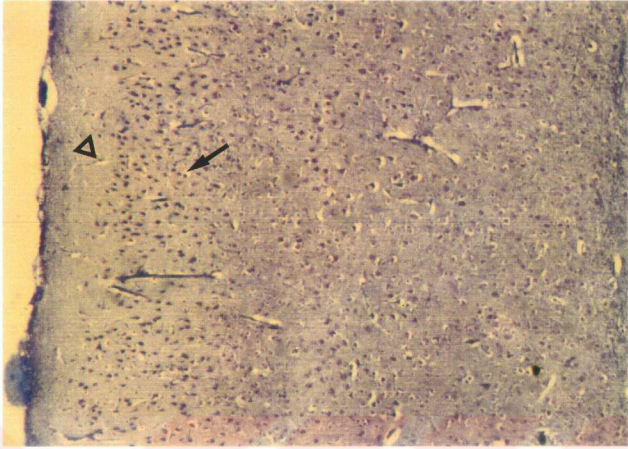
TABLO 15:Derin alan toplam nöronlar

Test grubu LFB/CV-HE

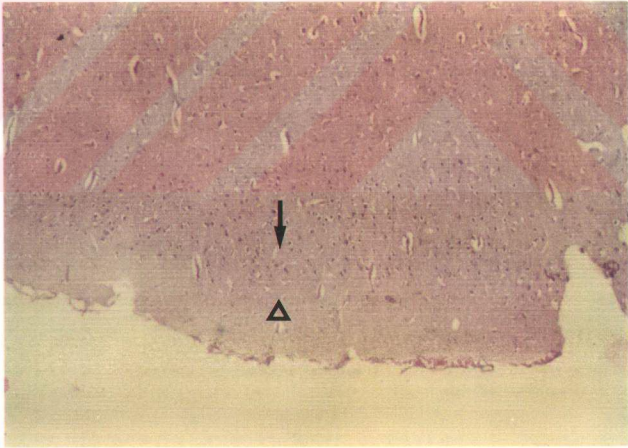


TABLO 16:Derin alan piknotik nöronlar

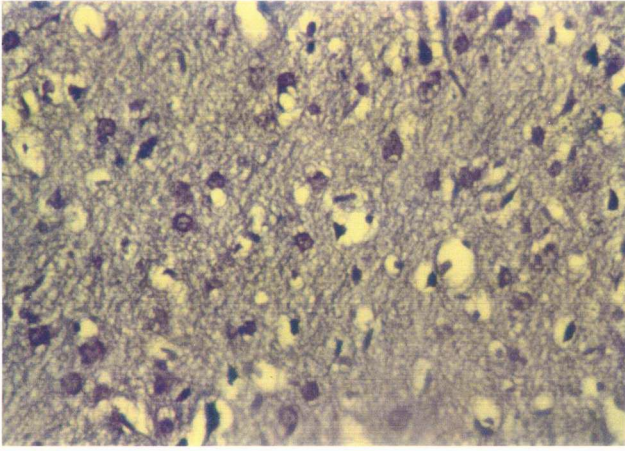
Test grubu LFB/CV-HE



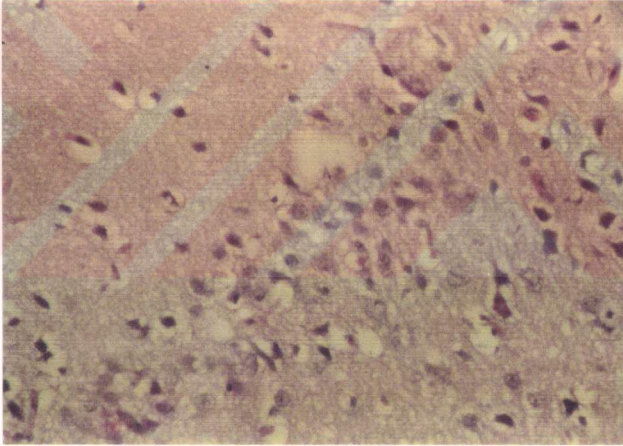
RESİM 1: Rat serebral korteksinde mikroanatomik tabakalar. Açık ok: Süperfisyonel alan, kapalı ok derin alan. (Test grubu, LFB/CVx40)



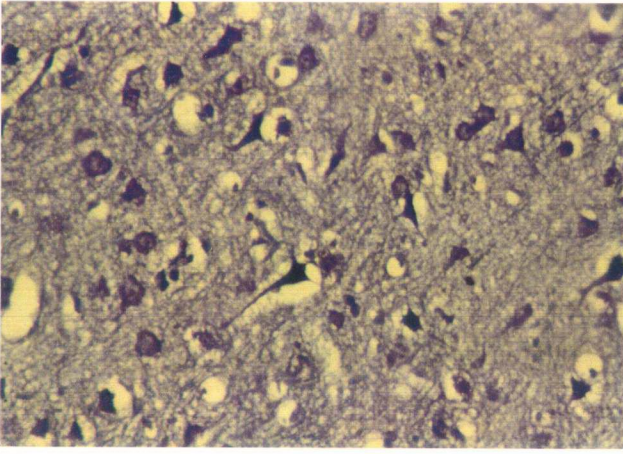
RESİM 2: Rat serebral korteksinde mikroanatomik tabakalar. Açık ok: Süperfisyonel alan, kapalı ok derin alan. (Kontrol grubu HEx40)



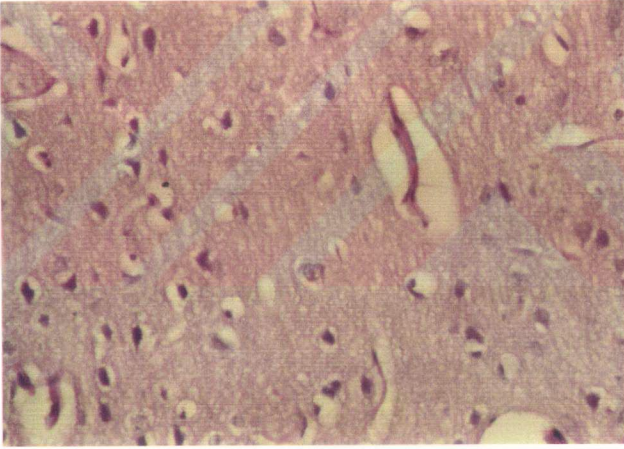
RESİM 3:Süperfisysel canlı ve piknotik nöronlar
Kontrol grubu.(LFB/CV x 200)



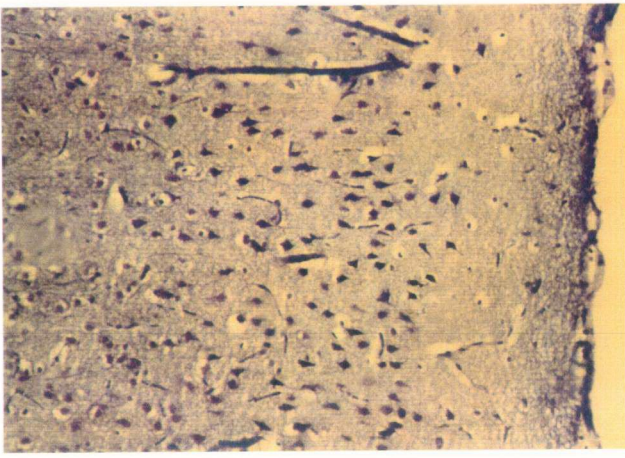
RESİM 4:Süperfisysel canlı ve piknotik nöronlar.
Kontrol grubu.(HE x 200)



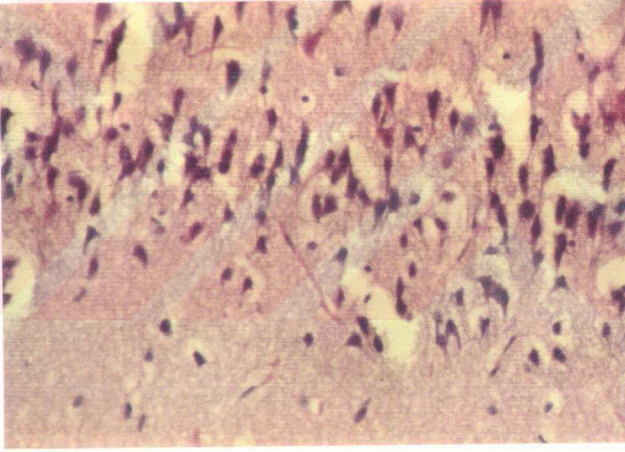
RESİM 5:Derin alanda canlı ve piknotik nöronlar
Kontrol grubu.(LFB/CV x 100)



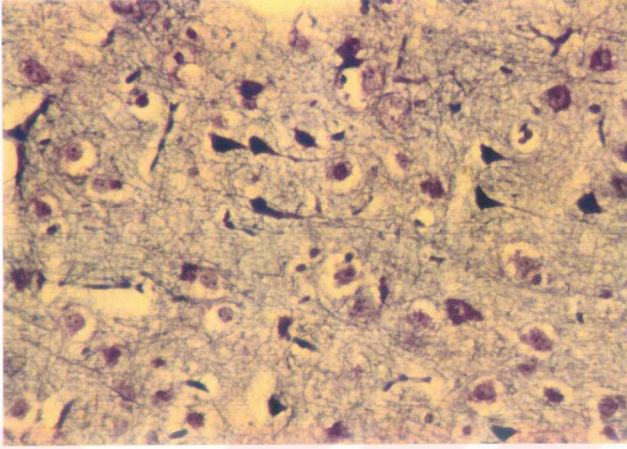
RESİM 6:Derin alanda canlı ve piknotik nöronlar
Kontrol grubu (HE x 100)



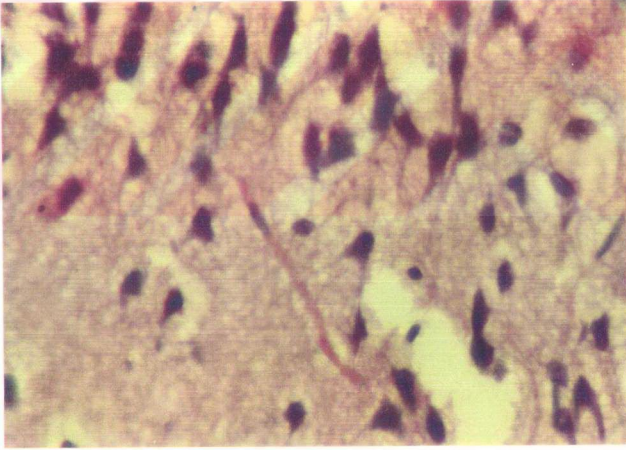
RESİM 7:Süperfisyel alanda piknotik nöronlar
Test grubu.(LFB/CV x 100)



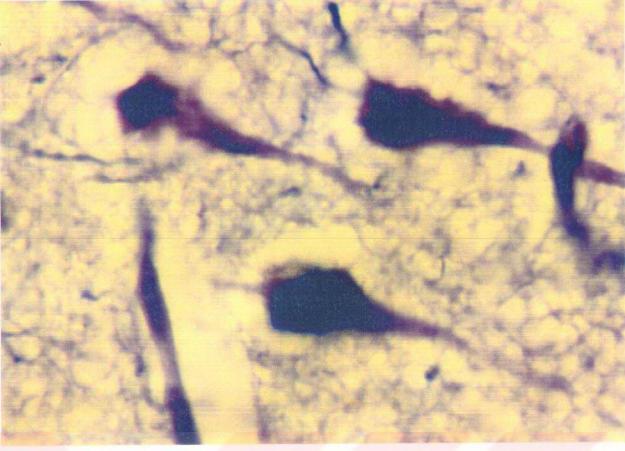
RESİM 8:Süperfisyel alanda piknotik nöronlar
Test grubu.(HE x 200)



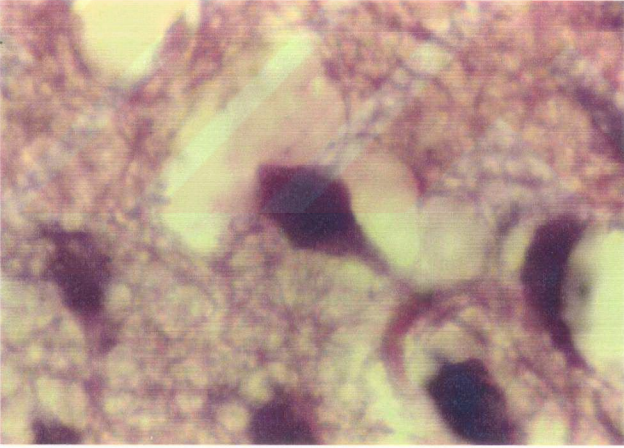
RESİM 9:Süperfisyel alanda canlı ve piknotik nöronlar.Test grubu (LFB/CV x 200)



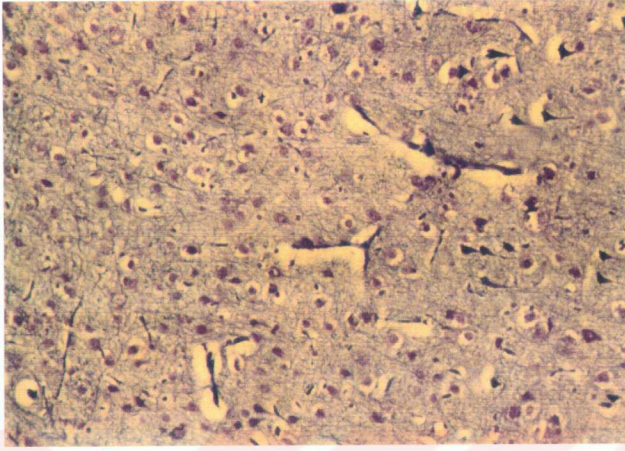
RESİM 10:Süperfisyel alanda canlı ve piknotik nöronlar.Test grubu (HE x 200)



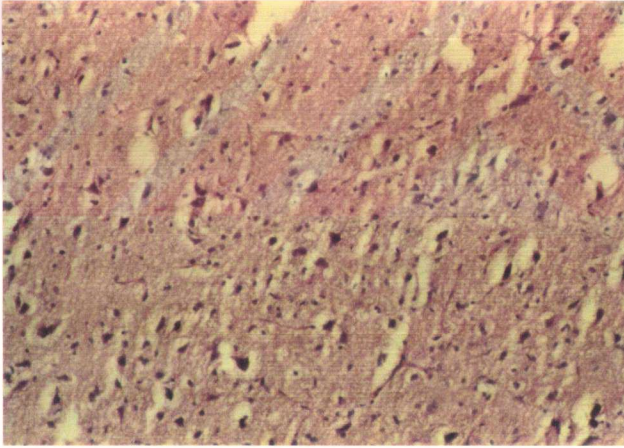
RESİM 11:Süperfisyel alanda piknotik nöronlar
Test grubu (LFB/CV x 1000)



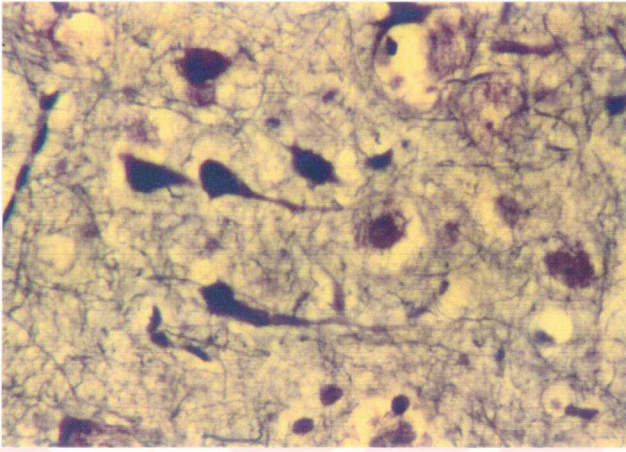
RESİM 12:Süperfisyel alanda piknotik nöronlar
Test grubu (HE x 1000)



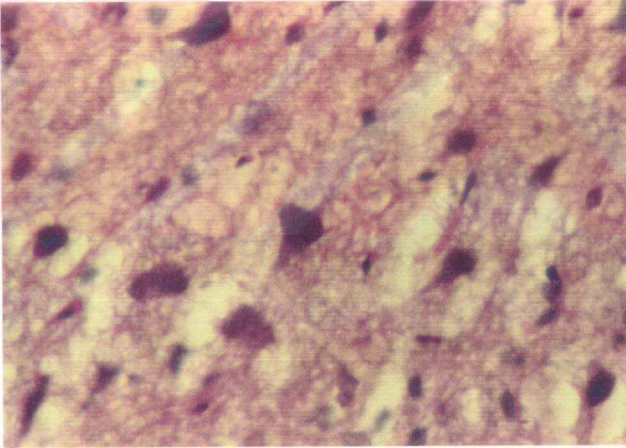
RESİM 13:Derin alanda canlı ve piknotik nöronlar
Test grubu (LFB/CV x 100)



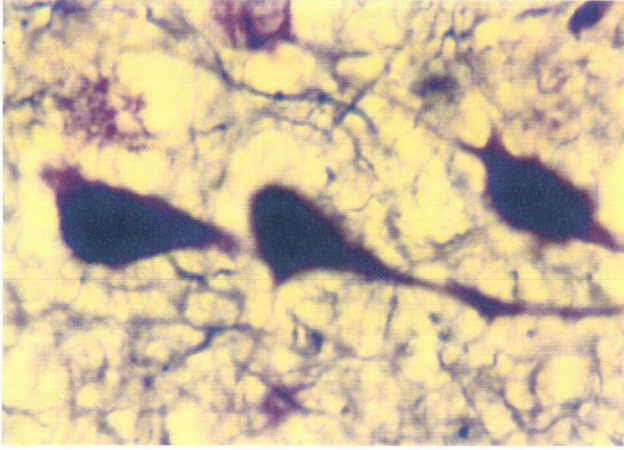
RESİM 14:Derin alanda canlı ve piknotik nöronlar
Test grubu (HE x 100)



RESİM 15:Derin alan canlı ve piknotik nöronlar
Test grubu (LFB/CV x 200)

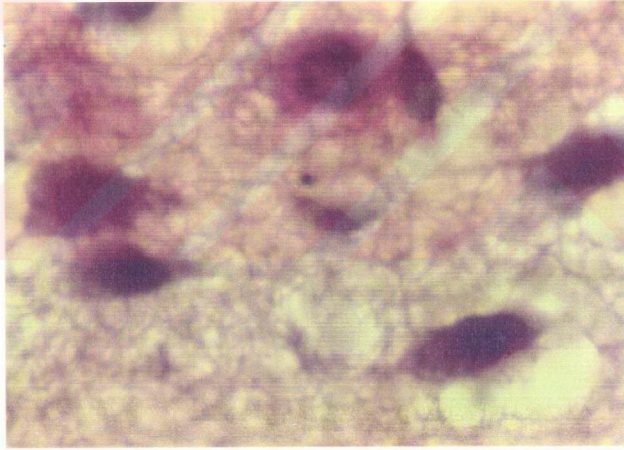


RESİM 16:Derin alan canlı ve piknotik nöronlar.
Test grubu (HE x 200)



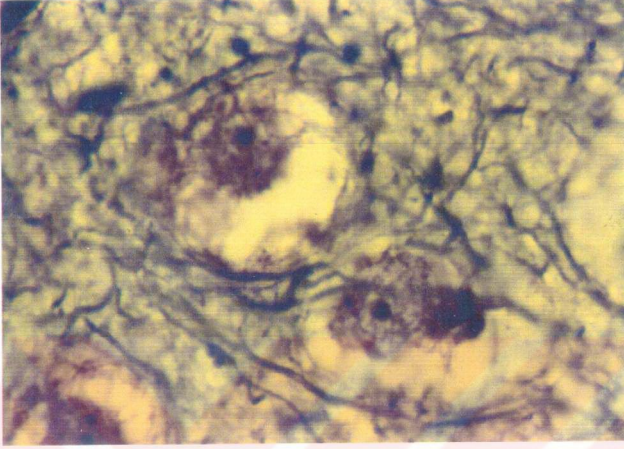
RESİM 17:Derin alan piknotik nöronlar.

Test grubu (LFB/CV x 1000)



RESİM 18:Derin alan piknotik nöronlar

Test grubu (HE x 1000)



RESİM 19:Derin alanda canlı nöron
Test grubu (LFB/CV x 1000)

TARTIŞMA

Çalışmamızda kullandığımız Hematoxylin, 1863 yılından beri histolojik çalışmalarda kullanılan nükleer doğal bir boyadır (64,65) . H.E boyama yöntemi regresif bir yöntemdir . Histoloji ve patoloji laboratuvarlarında , rutin çalışmalarda kullanılan bu boyama yöntemini LFB/CV (Klüver-Barrera) yöntemiyle karşılaştırdık.

Cresyl Fast Violet ; bazik anilin yapıda bir boyadır. Nissl cisimciği bazik anilin boyalarla net olarak boyanmaktadır (66).

Çalıştığımız iki yöntemin karşılaştırılmasında; tarafımızdan bütünlüğü etkileyebilecek tüm faktörleri minimize etmeye çalıştık. Laboratuvarında tarafımızdan uygulanan işlemlerde, 5 mm kesitler patoloğ gözetiminde yapıldı . Alınan beyin kesitleri aynı anda formol-parafin takibine alındı . Her iki yöntem aynı zamanlarda , eşit şartlarda uygulandı . Mikroskopta sayımlar , aynı patoloğ tarafından gerçekleştirildi.

Ratların cinsiyet farklılıkları, yaşları, beyin ağırlıkları, kontrol grubu ve hipoksik grubun çalışma esnasındaki vital bulguları kontrolümüz dışında idi.

İki yöntemin karşılaştırılmasında ; dekapite edilmeden önce % 100 O₂ solutulan kontrol grubunda LFB/CV ile daha çok nöron ve piknotik nöron sayıldı. İstatiksel olarakta HE yöntemiyle aralarında genel olarak anlamlı bir fark bulundu .

Kontrol grubunun, sadece süperfisyel toplam nöronlarında HE ile daha çok ve anlamlı sayım yapıldığını gördük.

Test grubu (30 dakika ağır hipoksi) karşılaştırma sonuçlarının net bir yorumu zorlaştırdığını gördük. Süperfisyel toplam nöronların sayımlarında, kontrol grubunda olduğu gibi HE yönteminin daha üstün olduğunu gördük. Süperfisyel piknotik nöronlarda ise LFB / CV ile HE sayımlarının hemen aynı olduğunu saptadık ($p>0,05$).

Test grubu ; derin toplam nöron ve piknotik nöronların HE ile daha çok sayıldığını gördük.

Kontrol ve test grubunun karşılaştırmasını yaptığımızda kesin bir yargıya varamadık.

Kontrol grubunda gözlemlediğimiz kadarıyla, LFB/CV yönteminin canlı ve piknotik nöronları ayırtetmekte kullanılabilecek, ucuz ve kolay bir yöntem olduğunu düşündük. Ve bu tekniği bölümümüz laboratuvarında rutin histokimya hizmetleri içinde uygulamaktayız.

Test grubunda nöronal zedelenmeyi (piknozis) gösterebilmek için en az 60 dakikalık bir hipoksinin gerçekleştirilmesi (67) ve yöntemlerin bu çalışma üzerinde uygulanmasını, erken serebral iskemik hasarların gösterilmesinde konvansiyonel histokimya teknikleriyle birlikte, immunhistokimyasal olarak tübülin, CK-BB, NSE, NFP 200 (IF-06) ve GFAP (68,69) çalışılmasının da gerekli olduğunu düşündük.

SONUÇ

Çalışmamızda;korteks süperfisyel ve derin alanda, global iskemi sonucunda nöronlarda piknozisi HE ve LFB / CV ile karşılaştırdık .

Kontrol grubunda LFB/CV yöntemiyle canlı ve piknotik nöronlar daha iyi ayırtedilerek HE ile istatiksel olarak anlamlı , farklı sayımlar yapıldı.

30 dakika ağır hipoksi test grubunda,HE ve LFB/CV ile yorum yapılamayacak farklı sonuçlar elde ettik. Bu farklılıkların hipoksi süresinin kısalığı , ratların yaş ve cinsiyet farklılıkları ve hipoksi derecesinin yetersizliğine bağlı olduğunu düşündük .

Kontrol grubuyla elde ettiğimiz sonucun, test grubunda hipoksi süresinin minimum 60 dakikaya uzatılarak , nöronlarda oluşan değişikliklerin kullandığımız iki yöntem ve immunhistokimya yöntemlerini kullanarak yapılacak çalışmalarla incelenmesi gerekliliği ve bu yöndeki çalışmaların kontrol grubuyla vardığımız sonucu destekleyeceği kanısındayız .

ÖZET

Santral sinir sisteminin sitoarkitektonik yapısının iskemik / hipoksik olaylarda farklı derecede etkilendiği bilinmektedir .

Çalışmamızda , normal oda havası soluyan kontrol grubu ile 30 dakika ağır hipoksik gaz karışımı solutulan ratların serebral korteks nöronlarında hipoksik / iskemik değişiklikler iki farklı histokimyasal boya yöntemi ile (HE ve LFB / CV) karşılaştırıldı .

HE ve LFB / CV gibi iki farklı konvansiyonel histokimyasal boyama yöntemi ile topografik olarak rat serebral kortikal nöronlarında farklı düzeydeki (yüzeysel ve derin) nöron zararlarının şiddet ve lokalizasyonun farklı olduğu gözlemlendi . İki yöntem arasında piknotik nöronların tanınmasında LFB / CV yönteminin daha güvenilir , ucuz ve hızlı uygulanabilir bir yöntem olduğu saptandı .

Ancak , kontrol ve test gruplarında saptanan nöronların hipoksiye gösterdiği selektif duyarlılığın saptanmasında uzun süreli , hipoksik ortamda oluşturulmuş ve immunhistokimya destekli bir çalışmanın yapılmasının gerekli olduğu sonucuna varıldı .

SUMMARY

It has long been well known that the cytoarchitectonics of the cerebral cortex interfered in ischemic / hypoxic insults in varying severity.

In this study , two distinct conventional histochemical staining procedures (H+E versus LFB/ CV) have been applied on the slides prepared from cerebral cortical slices for comparison of hypoxic / ischemic injury of neurons of control rats inhaled normal room air with that of test group rats inhaled severe hypoxic gas mixture of 30 minutes .

Finally , it has been concluded that by taking the advantage of applying two distinct histochemical staining techniques successfully demonstrated the hypoxic injury of the rat cerebral cortical neurons which extensively vary both in severity and topographically , i.e., superficial and deep layers.

Conclusively, it could be summarized that LFB / CV stain seems to be substantially a more reliable, cheaper and easy-to-do technique in detecting pyknotic neurons .

However, it should stressed that from the point of evaluation of the selective vulnerability of the neurons in hypoxic / ischemic injury , there should be more appropriate experimental model settings in both control and test groups i.e., the complete setup of longstanding hypoxic injury model which must be accompanied by immunohistochemical techniques .

KAYNAKLAR

1. Okazaki H : Fundamentals of Neuropathology
Morphologic Basis of Neurologic Disorders. 2nd. ed.
New York . Igaku - Shoin , 1989 , pp : 27-30.
2. Weller RO : Nervous System Muscle and Eyes. 3rd.
ed. Edinburgh , Churchill Livingstone, 1990. pp:89-90.
3. Kannel WB , Wolf PA: In: Russell RWR, ed. Vascular
Disease of the Central Nervous System. Edinburgh:
Churchill Livingstone , 1983:1
4. Caplan LR : Stroke, Clinical Symposia 40 (4), 1988.
5. Culling CFA : Handbook of Histopathological and
Histochemical Techniques 3rd. ed, London,
Butterworths, 1974. pp:121-124.
6. Weller RD : Nervous System Muscle and Eyes. 3rd. ed.
Edinburgh , Churchill Livingstone . 1990 pp:3-33.
7. Peters A, Palay SL, Webster HF: The Fine Structure
of the Nervous System: The Neurons and Supporting
Cells. 2nd. ed. Philadelphia; Saunders, 1976.
8. Broadwell RD , Catalda AMJ : Histochem Cytochem
1983, 31:1077.
9. Erbenli T: Histoloji I. 1st. ed. Istanbul,
Beta, 1984, pp:141-179.
10. Novikoff AB: In: Hyden H, ed. The neuron. Amsterdam:
Elsevier, 1967:255.
11. Dolman , CL, Macleod PM: In: Federoff S., Hertz L,
(eds) Advances in Cellular Neurobiology, New York:
Academic Press, 1981; 2:205.

- 12.Kalnins VI, Connolly JA : In : Federoff S, Hertz L, (eds.). Advances in Cellular Neurobiology , New York: Academic Press,1981 2:393.
- 13.Pachter JS, Liem RKH, Shelanski ML : In : Fedoroff S,(eds.). Advances in Cellular Neurobiology. Orlando : Academic Press, 1984,5:113.
- 14.Anderton BH: In: Smith WT, Cavanagh JB (eds.) Recent Advances in Neuropathology. Edinburgh: Churcill Livingstone , 1982,2: 29.
- 15.Thyberg J, Moskalewski S: Exp Cell Res 1985,159: 1.
- 16.Shelanski ML , Liem RKH: J Neurochem.1979,33: 517.
17. Dahl D: Exp Cell Res.1983,149:397.
- 18.Gray EG: J Anat 1959,93:420.
- 19.Gray EG: In: Clegg NJ,(ed.) Neurotransmitter System and Their Disorders. London: Academic Press,1978:1.
- 20.Bancroft JD , Stevens A : Theory and Practice of Histological Techniques . 2nd.ed. Edinburgh. Churcill-Livingstone, 1982, pp.332-336.
- 21.Bisby MA: In: Fedoroff,S.and Hertz,L.(eds.) Advances in Cellular Neurobiology. New York: Academic Press, 1980, 1:69.
- 22.Ramon-Moliner E : In: Bourne,G.H.ed. The Structure and Function of the Nervous Tissue. New York: Academic Press , 1968,1:205.
- 23.Abdel-Maguid TE , Bowsher D : J Anat 1984,138:689.
- 24.Leeson TS , Leeson RC : Histology .4th.ed. Philadelphia, W.B.Saunders, 1981, pp:216-253.

- 25.Ulunoğlu , Ö . (eds) : Patoloji . Ankara , Güneş Kitabevi . 1990, pp:939-942.
- 26.Brody BA , Kinney HC, Kloman AS, Gilles FH : J Neuropath Exp Neurol 1987,46:283.
- 27.Seil FJ : In:Fedoroff,S.,Hertz,L. (eds.) Advances in Cellular Neurobiology . New York : Academic Press 1982,3:235.
- 28.Virchow R: Virchows Arch Pathol Anat 1854,6:135.
- 29.Cajal S, Ramon Y: Histologie du système nerveux de Investigaciones Cientificas.Instituto Ramón Y Cajal 1972.
- 30.Del Rio Hortega P.: In: Penfield W, (eds.). Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System. New York: Hoeber, 1932,2:481.
- 31.Mori S, Leblond CP: J Comp Neurol 1970,139:1.
- 32.Roessman U, Velasco, ME, Sindely SD, Gambetti P: Brain Res 1980,200:13.
- 33.Cammermeyer, J.In:Ehrenpreis,S., Solnitzky, O.C. (eds.) Neurosciences Research. New York: Academic Press, 1970,3:44.
- 34.Ling EA: In: Fedoroff,S., Hertz,L. (eds.) Advances in Cellular Neurobiology. New York: Academic Press, 1981,2:34.
- 35.Lantos PL: Acta Neuropath (Berl) 1974,29:45.
- 36.Weller RO: Nervous System, Muscle, and Eyes. 3rd. ed. Edinburgh, Churchill-Livingstone. 1990.pp:57-59.

37. Weller RO, Steart PV, Moore IE: In: Walker MD, Thomas DGT, (eds). *Biology of Brain Tumour*. Boston: Nijhoff, 1986:115.
38. Mc Comb, J.G.: *J Neurosurg* 1983, 59:369
39. Bargmann W, Oksche A, Fix JD, Haymaker W: In: Haymaker W, Adams RD, (eds). *Histology and Histopathology of the Nervous System*. Springfield: Thomas, 1982:560.
40. Okazaki, H.: *Fundamentals of Neuropathology Morphologic Basis of Neurologic Disorders*. 2nd.ed., New York: Igaku-Shoin, 1989. pp:4.
41. Yenerman M: *Genel Patoloji*. 1st.ed. Istanbul: Çeliker Matbaacılık Sanayii. 1980 pp.463-464.
42. Uluoğlu Ö: *Patoloji*. Ankara: Güneş Kitapevi. 1990 pp:3-9.
43. Cowley RA, Trump BF: *Pathophysiology of Shock, Anoxia and Ischemia*. Baltimore, Williams & Wilkins. Co. 1981.
44. Farber JL: *Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis*. *Lab. Invest* 1982, 47:114.
45. Smuckler EA, James JL: *Irreversible cell injury*. *Pharmacol Rev.* 1984, 36:778.
46. Garcia JH, Conger KA: *Ischaemic brain injuries: Structural and biochemical effects*. In: Grenvik Ak., and Safar P. (eds): *Brain Failure and Resuscitation*. London, Churchill-Livingstone, 1981, pp:35-54.

- 47.Davis RL, Robertson DM: Textbook of Neuropathology,
2nd.ed. Baltimore, Williams & Wilkinson,
1991.p.651.
- 48.Davis RL, Robertson DM.: Textbook of
Neuropathology. 2nd.ed. Baltimore, Williams &
Wilkinson, 1991.pp.59.
- 49.Garcia JH: A concept of stroke In Current Concepts,
Kalamazoo, Michgan Upjohn Company, 1983.
- 50.Brown AW: Structural abnormalities of neurons. J
Clin Pathol 1977;30 (suppl 11):155.
- 51.Garcia JH.Experimental ischemic stroke. A review.
Stroke 1984,15:5.
- 52.Garcia JH et al.: Post ischemic brain edema:
Quantitation and evolution. Neurol,1980,28:147.
- 53.Garcia JH, Kamijyo Y: Cerebral infarction.Evolution
of Histopathological changes after occlusion of a
middle cerebral artery in primates. J Neuropathol
Exp Neurol.1974,33:409.
- 54.Moossy J: Pathology of ischemic cerebrovascular
disease. In: Wilkins RH, Rengachary S. S. eds
Neurosurgery. New York. McGraw-Hill. 1985,vol II,
pp: 1193-1198.
- 55.Garcia JH: Morphology of global cerebral ischemia.
Crit Care Med 1988,16:979.
- 56.Baykan N: Hipoksik sıçanlarda intraperitoneal
uygulanan propofolün karaciğer üzerine etkileri.
1990, pp:12-15. (Marmara Üniv. Tıp Fakültesi,
Anesteziyoloji A.B.D., uzmanlık tezi).

57. Matsumoto M, Roire DK, Van Dyke RA: Hepatic oxygen supply and conception in rats exposed to thiopenthal halothane, enflurane and isoflurane in the presence of hypoxia. *Anesthesiology* 1987,66:337-343.
58. Plummer JL, Hall PM, Jenner MA, Cousins MJ.: Hepatic effects of repeated halothane anesthetics in the hypoxia rat model. *Anesthesiology* 1987,67:355-360.
59. Lunam CA, Cousins MJ, Hall PM.: Guinea pig model of halothane associated hepatotoxicity in the absence of enzyme induction and hypoxia. *Therapeutics* 1985, 232:802-9.
60. Luna LG.: *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3rd.ed. New York. Mc Graw-Hill Book Company 1968.pp:34-39.
61. Kluver H, Barrera EJ: *Neuropath Exp Neurol* 1953, 12: 400-403.
62. Statgraf, Software, v.2.1; Exec *U* Stat, Laurer, 1986.
63. Harvard Graphics, Copyright 1990, Software Publishing Corp. v.2.301.
64. Luna LG. : *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3rd.ed. New York. Mc.Graw-Hill Book Company. 1968.pp:32-33.
65. Sheehan DC, Hrapchak BB. : *Theory and Practice of histotechnology*. 2nd.ed. Ohio, Battelle Press. 1980.pp:139-140.

66. Sheehan DC., Hrapchak BB. : Theory and Practice of histotechnology. 2nd. ed. Ohio. Battelle Press 1980. pp:139-253.
67. Siesjö BK.: Mechanism of ischemic brain damage. Crit Care Med 1988, 16:954.
68. Matsumoto M, Yamamoto K, Homburger HA, Yanagihara T. Early detection of cerebral ischemic damage and repair process in the gerbil by use of an immunohistochemical technique. Mayo Clin Proc 1987, 62:460-472.
69. Ogata N, Yonekawa Y, Taki W, Kannagi R, Nevrahi T, Hamakubo T, Kikuchi H.: Degradation of neurofilament protein in cerebral ischemia. J Neurosurg. 1989, 70:103-107.
70. Tekelioğlu M: Genel Tıp Histolojisi. Ankara. Beta, 1989 pp:192-193.