

İnsan Fetus Karaciğerinin Işık Mikroskopik ve Akım Sitometrik İncelenmesi

FLOW CYTOMETRIC AND LIGHT MICROSCOPIC INVESTIGATION OF HUMAN FETAL LIVER

Sevim AYDIN*, Yavuz TEKELİOĞLU**, Ersan ODACI*, Ayşe ARVAS***, Haluk ARVAS**

* Uz.Dr., Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD,

** Yrd.Doç.Dr., Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD,

*** Dr., Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD, Öğretim Görevlisi,

**** Prof.Dr., Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD, TRABZON

Özet

Çalışmamızda insan fetusu karaciğeri gelişmesinin klasik ışık mikroskobu ve akım sitometri analizi ile incelenmesi, morfolojik ve fonksiyonel bakımdan erişkin karaciğeri ile karşılaştırılması amaçlandı. 18.4-39.6 haftalık 33 adet fetus, gelişme devresinde haftalara göre gruplara ayrıldı. 18-29 haftalık fetus grubu ışık mikroskopik olarak incelendiğinde; karaciğer hücre kordonlarının henüz oluşmadığı, hepatositlerin düzensiz dizildiği ve hemopoetik aktivitenin fazla olduğu saptandı. Buna bağlı olarak akım sitometrik analizde S faz ve G2/ M faz değerlerinin yüksek olduğu görüldü. 30-39 haftalık fetus grubu ışık mikroskopik olarak incelendiğinde; karaciğer hücre kordonlarının erişkin görünümü kazanmaya başladığı, hemopoetik aktivitenin yok denecek kadar azaldığı ve buna bağlı olarak akım sitometrik analizde S faz ve G2/ M fazlarının 18- 24 haftalık fetus grubuna göre düşük olduğu saptandı. Sonuç olarak; 18-24 haftalık fetus grubunda karaciğer histolojik yapısı erişkin karaciğeri görünümü göstermeksizin, hızlı mitotik aktiviteye sahip iken, 30-39 haftalık fetus grubunda ise erişkin karaciğeri görünümü kazanmaya başladı ve bu devrede mitotik aktivitenin daha az olduğu bulundu.

Anahtar Kelimeler: Fetus, Karaciğer, Işık mikroskobu, Akım sitometri

T Klin Tıp Bilimleri 2000, 20:57-65

Summary

In our study, it was aimed to investigate the development of fetal liver by classic light microscopy and flow cytometry analysis and also compare with adult liver with respect to morphologic and physiological properties. In the fetus, aged between 18 and 29 weeks, it was observed that by light microscopy that the liver cell cords are not formed yet and the irregular hepatocyte design was also observed. S and G2/ M phases values in this group were observed higher than the fetus aged between 30 and 39 weeks by flow cytometric analysis because of the increased hemopoietic activity. In the fetus aged between 30 and 39 week, it was observed that the liver cell cords are becoming to convert the shape of the adult liver cords. Because of the decreased hemopoietic activity, S and G2/ M phases values in this group were observed lower than that of the fetus aged between 18 and 29 week. In conclusion, because of the increased mitotic activity in the fetus aged between 18 and 29 weeks, the histologic structure of the liver is different from the histologic structure of the adult liver. However, the histologic structure of the liver in the fetus aged between 30 and 39 weeks start to convert the histological structure of the liver.

Key Words: Fetus, Liver, Light microscopy, Flow cytometry

T Klin J Med Sci 2000, 20:57-65

İnsanın en büyük ve en karmaşık organlarından biri olan karaciğerin başlıca işlevleri; fetusta ve yeni doğanda kan yapıcı organ olarak görev yap-

Geliş Tarihi: 14.07.1999

Yazışma Adresi: Dr.Sevim AYDIN
KTÜ Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji AD
TRABZON

T Klin J Med Sci 2000, 20

manın yanı sıra, erişkinde; safra yapımı, proteinler, karbonhidratlar ve yağları vücuda yararlı hale getirme, glikojen, vitamin ve demir gibi çeşitli maddeleri depolama, kanı metabolizma artıklarından ve toksik maddelerden temizlemektir (1-3).

Karaciğer; embriyonal üçüncü haftanın ortasında endodermal epitelden gelişmeye başlar (3-5). Çok hızlı gelişen bir organ olma özelliğinden dolayı, ağırlığı 10. haftada tüm vücut ağırlığının

yaklaşık %10'una ulaşır. Karaciğerin bu kadar çabuk büyümesi intrauterin hayatta kan yapıcı organ olmasındandır. İntrauterin hayatın son iki ayına kadar devam eden bu aktivite, doğuma kadar kademeli olarak azalır ve doğumda sadece küçük hemopoetik adacıklar görülür. Erişkin karaciğerinin ağırlığı, total vücut ağırlığının %2-3'ü kadardır (6-11).

Son on yıldan bu yana, lazer ışınlarının kullanılarak yeni metodların geliştirilmesi sonucu birçok hastalığın moleküler düzeyde tanısı ve tedavisi mümkün hale gelmiştir. Floresan aktiviteli analiz ve ayırma yöntemi, başka bir ifade ile akım sitometri (flowcytometry) başvuru alan yeniliklerden birisidir. Akım sitometri ile hücrenin fiziksel özellikleri, yüzey antijenleri, reseptörleri, hücre içi bileşenleri, nükleer DNA-RNA tayinleri ve diğer hücresel parametrelerin kantitatif tayini ve hücre siklusu analizi yapılabilmektedir. Bu teknik ile hücrelerin ilk istirahat (G1), mitoz öncesi (G2) ve aktif proliferasyon (S) dönemleri belirlenebilmektedir (12-13).

Bu çalışmanın amacı; insan fetus karaciğer gelişimini klasik ışık mikroskobu ve akım sitometrik değerlendirme ile morfolojik ve fonksiyonel bakımdan erişkin karaciğeriyle karşılaştırmak ve elde edilecek bulgulardan bu konuda yapılacak ve yapılacak olan araştırmalara katkıda bulunmaktır.

Materyel ve Metod

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalında yapıldı. Ailesi tarafından istenmeyen sahipsiz düşük veya spontan prematür-matür doğumlar sonucu hiçbir patolojisi bulunmayan intrauterin yaşları 18.4 - 39.6 hafta arasında değişen toplam 33 adet insan fetusu dört grupta incelendi (14). I. grupta 18-24 haftalık 10 adet fetus, II. grupta 25-29 haftalık 10 adet fetus, III. grupta 30-34 haftalık 6 adet fetus, IV. grupta 35-39 haftalık 7 adet fetus değerlendirilmeye alındı. V. grup, Patoloji Anabilim dalından alınan ve patolojisi bulunmayan 7 adet sağlıklı erişkin karaciğeri otopsi materyalinden oluşturuldu.

Fetusların sternum alt ucundan geçen sağa ve sola doğru 4'er cm uzanan kesiyile karınları açıldı. Karaciğerin sağ ve sol loblarından 2'şer adet 1x1 cm boyutlarında alınan parçalar numaralandırılarak

%10'luk tamponlanmış formaldehit solüsyonuna konuldu. Rutin alkol - ksilol doku takibi serisinden sonra parafin bloklara gömüldü.

Işık mikroskobu değerlendirmesi için,

Birbirinin aynı olan iki parafin blokta bir tanesinden Pika marka mikrotom ile 5-7 µ kalınlığında kesildi. Hematoksilin-Eozin, Gomori'nin Gümüşleme boyası ve Trikrom Masson boyası yapıldı (15). Yapılan çalışma ile karaciğer kesitlerinde lobülün oluşması, hepatik hücre kordonlarının ve sinüzoid yapıların ortaya çıkışı Nikon marka ışık mikroskobu ile değerlendirildi ve fotoğraflandırıldı.

Akım Sitometrik analiz için; (Hedley metodu) (16).

Parafin bloğa gömülü dokular Pika marka mikrotomla 40-50 µ kalınlığında 3'er adet kesildi. Tüp içerisine alınan parçalara iki defa 10 ml ksilen konularak 2x10 dakikada parafinden giderildi. %100, %100, %75, %50 etanol serilerinden 10'ar dakika geçirildi. Doku örnekleri bir gece veya 6 saat distile suda bekletildi. Ertesi gün örnekler iki defa daha distile suda yıkandı, daha sonra saat camına aktarıldı. Bistüri ile ince ince doğrandı, enjektöre çekildi ve 16G iğneden iki defa geçirildi. 10 ml'si konik tüpe alındı. 10 dakika 500 devirde santrifüj edildi, süpernatant atıldı. pH: 1.5 olan %0.5 pepsin solüsyonundan (100mg pepsin + 20 ml %0.9 serum fizyolojik) 3 ml eklenerek vortekslenildi. 37°C de 30 dakika inkube edilirken 5'er dakika aralıklarla vortekslenildi. 3 ml RPMI 1640 medium (320-1875) solüsyonu ile nötralize edilip 500 devirde 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı ve tekrar 3ml RPMI solüsyonu eklenerek 47 mm lik filtreden geçirildi. 300 ml solüsyondan alındı, DNA Prepte (DNA-Prep LPR Coulter 6604454 < 0.1% NaN3 ve DNA-Prep Stain Coulter 6604451 < 0.1% NaN3, < 0.1% Propidium Iodide) hazırlandı ve 15 dakika inkubasyondan sonra akım sitometrisinde analizi yapıldı.

Akım sitometri cihazı (Coulter Epics Elite ESP), DNA kontrol ile standardize edildikten sonra her tüpteki hücreler sayılarak 488 nm argon iyon lazerde analiz edildi. Hücre akım hızı numunedeki hücre yoğunluğuna göre ayarlandı. Ortalama 25.000 hücre sayılarak bilgisayar sistemine aktarıldı. Böylece analiz edilmek istenen hücre

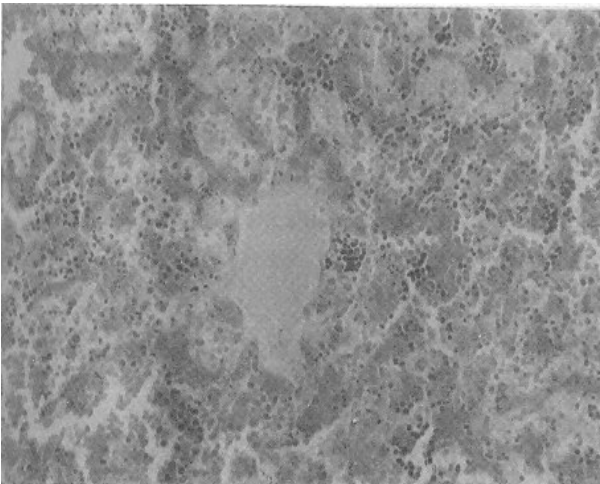
popülasyonu agregat ve hasarlı hücrelerden büyük ölçüde temizlenerek belirlendi. DNA histogramında G0 \ G1, S, G2 \ M fazındaki hücrelerin oranları, CV değerleri Multicycle programı kullanılarak değerlendirildi. Verilerin istatistik analizinde 4.86DX66 bilgisayarda Statgraf 5.0 versiyon istatistik paket programı kullanıldı. Grupların ikişerli karşılaştırılmasında parametrik varsayımlar yerine getirilmediğinden ve gruplar bağımsız olduğundan nonparametrik Mann-Whitney-U testi kullanıldı (17).

Bulgular

Işık Mikroskopik Bulgular

I. grupta karaciğer hücre kordonlarının ve lobül yapılarının tam olarak oluşmadığı izlendi. Vena sentralisler mevcuttu, hepatositler arasında ışınsal düzenlenme gözlenmedi ancak küçük gruplaşmalar vardı. Hepatositler; poligonal görünümlü, sitoplazmaları eozinofilik ve çoğu tek nükleuslu görünümde idi. Sinüzoid yapıları sağlıklı erişkindekine göre çok genişti ve birkaç hemopoietik adacık varlığına bağlı olarak eritropoietik hücre serileri ve megakaryositler dikkati çekmekteydi (Şekil 1).

II. grupta; karaciğerde lobüler yapılanmanın ve hepatositlerde kordonlaşmanın başladığı görüldü. Hepatositlerin görünümleri poligonal, sitoplazmaları eozinofilik ve çoğu tek nükleuslu idi. Sinüzoid yapıları geniş ve düzensizdi. I. gruptakine



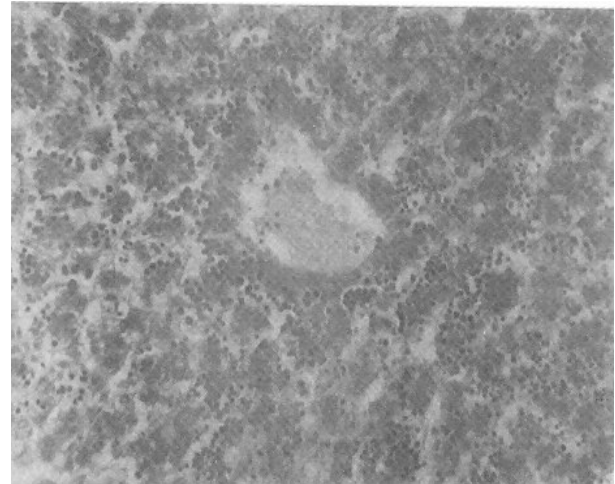
Şekil 1. 18-24 haftalık I.grup fetus karaciğerinde, lopçuğun vena sentralis etrafında ışınsal tarzda dizilim göstermeyen hepatositler, düzensiz yapıda sinüzoid yapıları ve hemopoetik hücreler izlenmektedir Boyası: Hematoksilen-Eosin, Orijinal büyütme 10X.

göre hemopoietik adacık görünüşte daha azdı (Şekil 2).

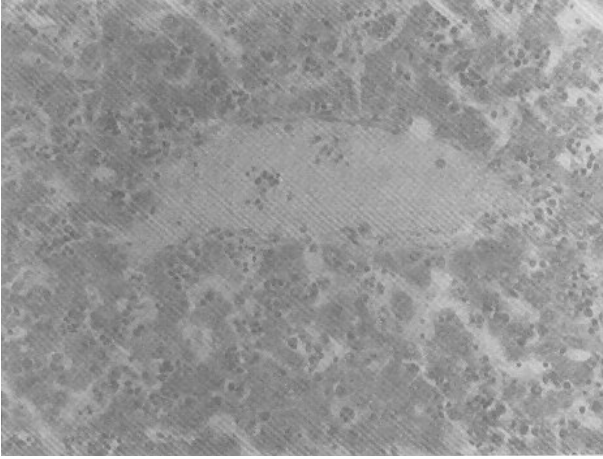
III. grupta; I. ve II. gruba göre karaciğer hücre kordonları ve lobül yapısı daha belirgindi. Vena sentralisler, lobül ortasındaydı ve hepatositler ışınsal tarzda düzenlenmeyi sürdürmekteydiler. Hepatositler; poligonal, çoğunluk tek nükleuslu ve eozinofilik sitoplazmalı idi. Sinüzoid lümenleri daha dar ve daha düzenli idi. Hemopoietik hücre adacıkları daha küçük ve az sayıda görüldü (Şekil 3). Portal aralıkta vena interlobülaris, arteria interlobülaris ve duktus interlobülaris erişkin formuna yaklaşmış olduğu izlendi.

IV. grupta kesin sınırları ayırt edilemeyen lobüllerin ortalarında vena sentralisler izlenmekteydi. Vena sentralise doğru ışınsal tarzda dizilmeye başlayan hepatositler çok net olmasa da plaklar oluşturacak tarzda idi. Hepatositler poligonal görünümde, nükleusları yuvarlak ve düzgün yüzeyle olup sitoplazmaları eozinofilikti. Hücrelerin çoğu tek nükleuslu olmasına rağmen çift nükleuslu olanları da mevcuttu. Sinüzoid yapısı incelendiğinde diğer gruplara göre daha düzenli ve daha dardı. Hemopoietik hücrelerin sayısının daha da azaldığı ve gruplar oluşturmadan tek tek bulunduğu gözlemlendi (Şekil 4).

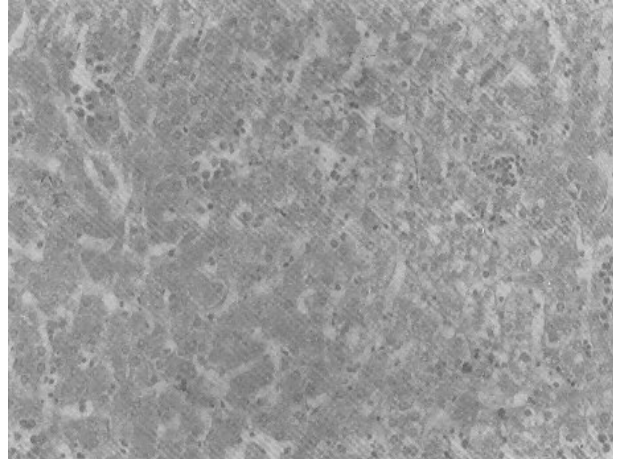
V. grup olan sağlıklı erişkin grubunun H&E boyası ile karaciğer dokusu incelemesinde vena sentralise doğru ışınsal tarzda dizilen poligonal görünümlü hepatositlerin nükleusları büyük yuvar-



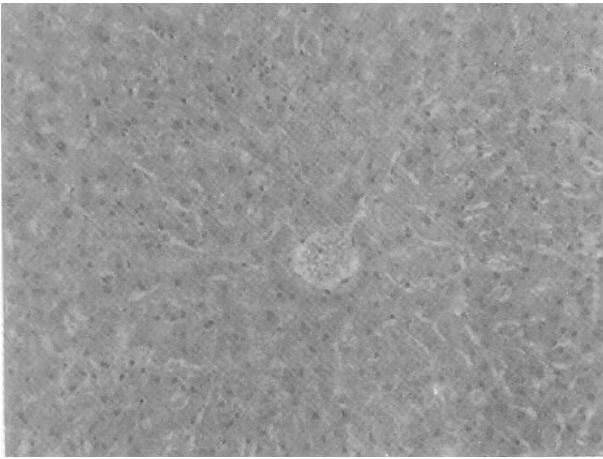
Şekil 2. 25-29 haftalık II. grup fetus karaciğerinde, vena sentralis düzensiz dizilimli hepatositler, sinüzoid yapıları ve hemopoetik hücreler izlenmektedir. Boyası: Hematoksilen-Eosin, Orijinal büyütme 10X.



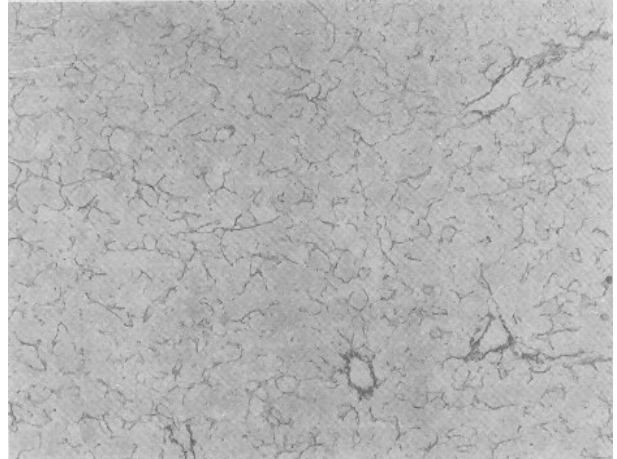
Şekil 3. 30-34 haftalık III. grup fetus karaciğerinde hepatositlerin kordonlar oluşturmaya başladığı ve sinüzoid yapıları ve diğer gruplara oranla daha az hemopoetik hücreler izlenmektedir. Boyası: Hematoksilen-Eosin, Orijinal büyütme 10X.



Şekil 4. 35-39 haftalık IV. grupta fetus karaciğerinde hepatositlerin ışınal tarzda dizilim gösterdiği, sinüzoid yapıların diğer gruplara oranla daha iyi düzenlenmiş olduğu ve hemopoetik hücrelerin sayısının oldukça az olduğu izlenmektedir. Boyası: Hematoksilen-Eosin, Orijinal büyütme 10X.



Şekil 5. V. grup olan otopsi materyalinde vena sentralis etrafında ışınal tarzda düzenli dizilim gösteren poligonal görünümlü hepatositler ve önceki fetus gruplarına oranla daha dar görünümde olan sinüzoid yapıları izlenmektedir. Boyası: Hematoksilen-Eosin, Orijinal büyütme 10X.



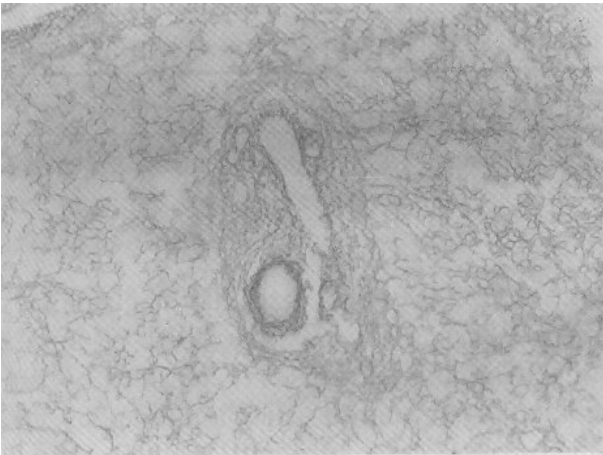
Şekil 6. 18-24 haftalık I. grupta retiküler fibrillerin fetus karaciğeri parankiminde ince ağ yapısında olduğu izlenmektedir. Boyası: Gomori'nin Gümüşlemesi, Orijinal büyütme 10X.

lak ve düzgün yüzeyli olup sitoplazmaları eozinofilik boyanmıştı. Hücrelerin çoğu tek nükleuslu olmasına rağmen çift nükleuslu olanlarına da rastlanmaktaydı. Bu epitelial hücreler birbirleriyle bağlantılı plaklar halinde 1 veya 2 hücre kalınlığında tabakalar oluşturmaktaydı (Şekil 5).

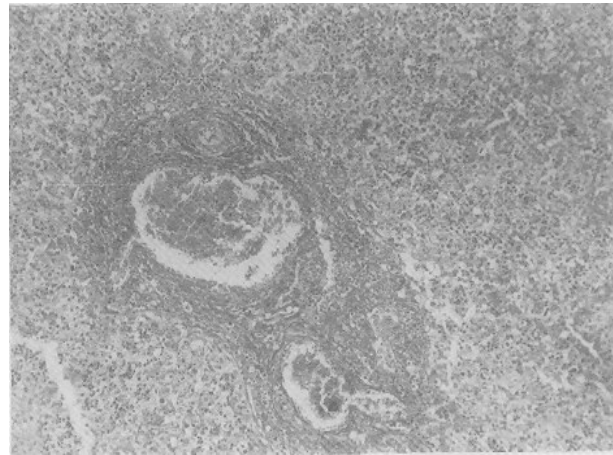
Retiküler fibrilleri görüntülemek için gümüşleme boyası yapılarak incelenen kesitlerde I. grupta portal aralıkta ve karaciğer parankimi içinde bulunan fibriller, daha ince ve az sayıdaydı (Şekil 6). IV. grup-

ta; fetus gelişimi ile paralel olarak karaciğer parankiminde ve portal aralıkta bulunan retiküler fibrillerin sayılarının ve kalınlığının arttığı gözlemlendi (Şekil 7).

Bağ dokusu gelişimini incelemek için Triple boyası ile boyanan kesitlerde I. grupta lobüllerin birleşim yerindeki üçgen biçimli portal aralıkta damarların duvarında bağ dokusu gelişiminin belirgin olduğu gözlemlendi. Oysa IV. grupta bağ dokusu gelişiminin gerek portal aralıkta gerekse vena sentralis civarında daha arttığı tespit edildi (Şekil 8).



Şekil 7. 35-39 haftalık IV. grupta portal aralığında ve parankiminde retiküler fibrillerin daha yoğun ve daha kalın olduğu izlenmektedir. Boyası: Gomori'nin Gümüşlemesi, Orijinal büyütme 10X.



Şekil 8. 35-39 haftalık IV. grupta; fetus karaciğeri portal aralığında damar duvarları kalınlıklarının arttığı izlenmektedir. Boyası: Trikrom Masson, Orijinal büyütme 10X.

Tablo 1. Tüm grupların akım sitometrik analiz sonuçlarının ortalama ve standart sapmaları

	%G1 + SD	%G2 + SD	%S + SD
I. Grup (18-24 hafta)	72.32 ± 6.47	5.86 ± 3.16	21.81 ± 3.94
II. Grup (25-29 hafta)	75.67 ± 6.44	5.70 ± 5.9	19.71± 6.09
III. Grup (30-34 hafta)	71.80 ± 9.08	1.81 ± 1.44	26.03 ± 10.37
IV. Grup (35-39 hafta)	72.15± 6.28	3.77 ± 2.54	24.07 ± 6.20
V. Grup (erişkin grup)	90.3± 0.89	7.51 ± 1.06	2.25± 0.83

Akım Sitometrik Bulgular

Akım sitometrik analiz ile grupların G0 / G1, G2 / M ve S fazları ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Tablo 1). Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda gruplar birbirleri ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Tablo 2). I. grup ile diğer gruplar karşılaştırıldığında; III., IV. gruplar arasında G2 faz değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken ($P<0.001$), V. grup arasında G1 faz değerleri ve S faz değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($P<0.001$). II. grup ile diğer gruplar karşılaştırıldığında; IV. grup arasında G2 faz değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken ($P<0.001$), V. grup arasında G1 faz değerleri ve S faz değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($P<0.001$). III. grup ile diğer gruplar karşılaştırıldığında; IV. grup arasında G2 faz değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunurken ($P<0.01$), V. grup arasında G1 faz

değerleri, G2 faz değerleri ve S faz değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($P<0.01$). IV. ve V. grup karşılaştırıldığında; G1 faz değerleri, G2 faz değerleri ve S faz değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($P<0.01$).

Tartışma

Vücudun en büyük ve en karmaşık organlarından birisi olan karaciğer; safra salgılama, protein, karbonhidrat ve yağları vücuda yararlı hale getirme, glikojen, vitamin ve demir gibi maddeleri depolama, kanı metabolizma artıklarından ve toksik maddelerden temizleme ile fetusta ve yenidoğanda kan yapımı gibi önemli fonksiyonlara sahiptir (1-5). Karaciğerin bu fonksiyonları, prenatal ve postnatal dönemdeki morfolojik gelişimi ile paralel olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, prenatal ve postnatal dönemlere ait karaciğerin morfolojik açıdan incelenmesi önem kazanmaktadır.

Tablo 2. Tüm grupların akım sitometrik analiz sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırması (-) P>0.05, (+) P<0.01, (++) P<0.001

Gruplar	II.	III.	IV.	V.
I. Grup	G ₁ (-) G ₂ (-) S (-)	G ₁ (-) G ₂ (+) S (-)	G ₁ (-) G ₂ (+) S (-)	G ₁ (++) G ₂ (-) S (++)
II. Grup	-----	G ₁ (-) G ₂ (-) S (-)	G ₁ (-) G ₂ (+) S (-)	G ₁ (++) G ₂ S (++)
III. Grup	G ₁ (-) G ₂ (-) S (-)	-----	G ₁ (-) G ₂ (+) S (-)	G ₁ (+) G ₂ (+) S (+)
IV. Grup	G ₁ (-) G ₂ (-) S (-)	G ₁ (-) G ₂ (-) S (-)	-----	G ₁ (+) G ₂ (+) S (+)

Karaciğerin embriyonal ve fetal dönemdeki en önemli fonksiyonu hemopoiezistir. Karaciğer, 6-22 haftalık dönemde aktif olarak hemopoiezis görevinde iken daha sonra bu görevi kemik iliğine bırakır (1,7,9). İnsanda, sıçanda ve farelerde eritropoietik hücre serisi ve megakaryositler en erken görülen hemopoietik hücre popülasyonunu oluştururlar ki bu hücreler daha çok lobüller arasına yerleşmişlerdir. Granülositler ve agranülositler ise daha az görülmektedir ve bu hücreler daha çok portal aralığın bağ dokusu ile kapsülde yer alırlar (4,9,18,19).

Yapılan çalışmada 18-24 haftalık fetustardan oluşan I. grupta; çok sayıda sinüzoidal aralıkta ve hepatositlerin aralarında eritroblast ve megakaryositlerin görülmesi bu bulguları desteklemektedir. 25-29 hafta, 30-34 hafta, 35-39 haftalık fetus gruplarında giderek azalan oranlarda hemopoietik hücre serilerinin görülmesi literatürlerle uyumludur (6,7,11,20,21). Hemopoietik hücre adalarına embriyonel dönem çalışılmadığı için rastlanmamıştır. Fakat, erişkin grubu ile karşılaştırıldığında hemopoietik hücre serileri karaciğerin her bölgesinde izlenmektedir.

İnsan gebeliğinin 5-9. aylarındaki fetus karaciğerinin morfolojik gelişimi ışık mikroskopik düzeyde incelendiğinde hayvan modellerinin gebeliklerinin ikinci yarısı ile uyumlu oldukları

görülmektedir (21-23). Kanai ve arkadaşlarına göre hepatosit miktarı 17 ve 18 günlük fetal farelerde hem periportal, hem de perihepatik zonlarda artmakta, 18 ve 19. gününde ise sadece periportal zonlarda artış göstermektedir. Ayrıca 20. gününde ve erişkin farelerde hepatosit miktarı her iki zonda da önemli ölçüde artmaktadır (22). Fausto ve arkadaşları, hepatositlerin yüksek derecede farklılaşma gösterdiğini ve bölünme yoluyla çoğalma potansiyeline sahip olduklarını, ayrıca erişkin karaciğerinde hepatositlerin bir veya iki hücre kalınlığında ve büyük vasküler alanlar (portal aralık ve vena sentralis) arasında uzanan üç boyutlu plakalar şeklinde düzenlendiğini vurgulamaktadır (21). Peters ve arkadaşları, fare hepatositlerinin gebeliğin ikinci döneminden itibaren olgunlaşmaya başladığını ve 18. günden sonra da tamamen olgun görünüm kazandığını ve poligonol şekil aldığını bildirmektedir (23). Sağlıklı erişkin grubuna ait karaciğerler değerlendirildiğinde de hepatositlerin Fausto ve arkadaşlarının bildirdiği gibi vena sentralis ve portal aralıklar arasında ışınal tarzda düzenlendiği ve genellikle bir, bazen de iki hücre kalınlığında kordonlar oluşturduğu görülmektedir (21). Yaptığımız çalışmada I. gruptaki hepatositlerin dağınık kümeler halinde yerleşim gösterdiği, sinüzoidlerin ise, sağlıklı erişkin gruba göre oldukça geniş ve düzensiz lümen yapısında olduğu izlendi. Işık mikroskopik seviyede sinüzoidlerin

duvar yapısı ve hepatositlerin sinüzoidal yüzeylerine ait oluşumlar tespit edilememiştir. Hepatosit miktarının erişkin gruba oranla daha az olduğu, buna karşılık sinüzoidal alanların fazla yer tuttuğu tesbit edildi. Fetus gelişimi ile birlikte hepatositlerin erişkin hepatositlerine benzer görünüm kazandığı ve hücre sayısının arttığı izlendi.

Karaciğere ait bağ dokusu elemanlarının gelişimi ile ilgili çalışmalara rastlanmamakla birlikte, Ekataksin ve arkadaşlarının domuz karaciğinin morfolojisi üzerine yaptıkları bir çalışmada, kollajen fibrillerin daha çok vena porta ve arteria hepatica'nın dalları çevresinde, retiküler fibrillerin ise sinüzoidlerin etrafında belirgin olarak bulunduğu bildirilmektedir (24). Yaptığımız çalışmada, bağ dokusu elemanlarından kollajen fibrillerin portal aralıkta yoğunlaştığını, retiküler fibrillerin ise sinüzoidlerin çevresinde gelişmeye başladığı ve intrauterin hayatın sonlarına doğru giderek arttığı izlenmiştir.

Tesbitli, parafinde bloklanmış dokuların akım sitometri ile incelenmesi son yıllarda başarılıdır (25). Parafinize dokular, taze dokulara göre bazı avantajlar sağlar. Parafinde bloklanmış dokuların, önce ışık mikroskopunda incelenme şansı olduğundan dokunun en uygun kısmını doğru şekilde seçmek mümkündür. Taze dokularda yeterli oranda ve doğru örnekleme yapıp yapılmadığını kontrol etmek ise çok zordur. Parafin bloklularla geriye dönük çalışmaların yapılabilmesi laboratuvar arşivlerindeki bir çok dokunun değerlendirilmesine olanak verdiğinden, daha kısa sürelerde standart sonuçlara ulaşmak mümkün olmaktadır (13,26,27). Tespitli parafinize dokularda hücre nükleusları daha iyi korunduğundan DNA içeriğinin incelenmesi diğer pekçok parametrenin incelenmesinden daha verimli olabilir (28,29). Diğer yandan formalinle fikse edilip parafinde bloklanmış dokuların, taze dokulara göre bazı dezavantajları da vardır. Bu dokularda boyanan nükleusların DNA floresansında önceden tahmin edilemeyen ve her hücre için farklılık gösteren önemli azalmalar olabilmektedir. Bu yüzden DNA içerik ölçümleri sırasında her seferinde bir referans noktası sağlamak amacıyla dış standartlar kullanılmakta, bu da sonuçların karşılaştırılmasında sorunlara yol açmaktadır (30). Bu sorunlar endojen inflamatuvar hücreler ve stromal hücrelerin diploid değerleri

referans kabul edilerek çözülmeye çalışılır (28). Deparafinizasyon işlemi; incelenen hücrelerin membranlarının ve stromal elementlerinin zarar görmelerine neden olduğundan, parafinize dokularda hemen yalnızca nükleuslarla ilgili çalışmalar yapılabilir (13,28,29).

Akım sitometrik analizi yapılacak hücre süspansiyonlarında yeterli oranda hücre bulunması gereklidir. Hedley metoduna göre 10 000 - 30 000 arası hücre sayımı yeterlidir (26). Çalışmamızda akım sitometrisi ile 25 000 hücre sayılmış olup bu da hücre sayısı açısından literatürle uyumludur. Çalışmamızda kullanılan pepsin, kromozomların histon ve nonhiston proteinleri ile DNA arasındaki bağları gevşetip kovalent hale getirerek DNA ile boyanın kolayca bağlanmasını sağlar. Enzimatik muamele sonucunda hücrelerin tekrar birbirlerine yapışması ve agregat oluşturması engellenir (13,16).

Parankimal hücrelerden hepatositler incelendiğinde; hepatosit nükleusu 1:2:4:8 oranındaki volümleri ile değişik gruplara ayrılır. Bu değişiklikler poliploidiyi ve uygun bir şekilde artmış DNA içeriğini yansıtır. Doğumda hepatositlerin hemen hemen hepsine yakın bir kısmı diploiddir. Oysa 8 yaş civarında hepatositlerin %90'ından daha fazlasının diploid olduğu durumda tetraploid nükleus sayısı da artmaya başlar. Tetraploid hücrelerin 2 diploid nükleuslu hücrelerin mitozundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Hepatositlerdeki poliploidinin önemi henüz bilinmemektedir (5,31).

Mitotik bölünme, embriyonik ve erken postnatal büyümeyi sağlar fakat "genişleyen doku" olarak tanımlanan karaciğer dokusu erişkin karaciğerinde çok düşük mitotik indekse sahiptir. Bu indeks tahminen 10 - 20 000 hücre başına bir mitoz olarak tanımlanmıştır (5). Yaptığımız çalışmada fetal karaciğer dokularının DNA analizleri diploid karakterde olduğu anlaşılmıştır. Diploid DNA muhtevasına sahip hücre popülasyonunun DNA indeksi 1 olarak kabul edilmektedir (13). G0 / G1 fazındaki hücreler en yüksek fraksiyona sahiptirler. Bizim de grupları incelediğimiz zaman G0 / G1 fraksiyonu tüm gruplarda en yüksek değerlerde bulunup, fetus grupları arasında istatistiksel karşılaştırmada anlamlı bir fark bulunamazken, erişkin yaş grubu ile fetus grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Bu so-

nuçta fetus gruplarında mitotik aktiviteden dolayı G0/G1 fraksiyonu düşük iken, erişkin grupta mitotik aktivitenin çok düşük olduğunu göstermektedir.

G2 / M fazı DNA içeriğinin iki katına çıkıp mitozun gerçekleştiği fazdır (24). Bu fazda elde edilen değer dolaylı olarak mitotik aktiviteyi vermektedir. Fetus grupları arasında yapılan karşılaştırmada G2 / M fazının normal diploid hücre popülasyonuna göre değeri daha yüksek bulunmuştur. Gruplar arasında karşılaştırma yaptığımızda G2 / M fazı I. ve II. grupta yani 18-29 hafta arası fetuslarda 30-39 hafta arası fetus grubuna göre daha yüksektir. Bu yüksekliğin nedenini o dönemde hemopoietik aktiviteye sahip kan hücrelerinin sayısının fazlalığı ile açıklayabiliriz. III. ve IV. grup fetusların mitotik aktivitesi kontrol grubuna göre daha yüksek olarak bulunmuştur. Bu yüksekliği de parankim hücrelerinin mitotik aktivitesinin yüksekliğiyle açıklayabiliriz. S faz yüksekliğini ise proliferasyon hızı şeklinde tanımlayabiliriz. Bu faz gruplar arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark ifade etmemektedir. Fakat kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Nedenini ise hem hemopoietik aktivite hem de parankimal hücre proliferasyonu ile açıklayabiliriz. Sonuç olarak fetus ve erişkin karaciğerinin akım sitometrik hücre siklusu bulgularının ışık mikroskopik görünüm ile uyumlu olduğunu söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

1. Junqueri CL, Carneiro J. Basic Histology 1989; 341-54.
2. Bloom W and Fawcett DW. A textbook of histology. Philadelphia: WB Saunders Company, 1986: 679-708.
3. Sadler TW. Langman's Medical Embryology. Baltimore: Williams and Wilkins, 1990: 242-5.
4. Mascween RNN, Antony PP, Scheuer PJ. Pathology of the liver. Churchill Livingstone, 1987: 1- 45.
5. Petorak I. İnsan embriyolojisinin ana hatları. İstanbul: Beta Basım Yayıncılık, 1986: 200-2.
6. Jordan CT, McKearn JP and Lemischka IR. Cellular and developmental properties of fetal hematopoietic stem cells. Cell 1990; 61: 953-63.
7. Kamps WA, Timens W, De Boer GJ, Spanjer HH and Poppema S. In situ study of haemopoiesis in human fetal liver. Scand J Immunol 1989; 30: 399-408.
8. Migliaccio G, Migliaccio AR, Petti S, Mavilio F, Russo G, Lazzaro D, Testa U, Marinucci M and Peschle C. Human embryonic hemopoiesis: Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac ® liver transition. J Clin Invest 1986; 78: 51-60.
9. Bielansko OZ, Kryznowek WJ. Morphometric investigations of the pig developing liver during the prenatal period. Pol Arch Weter 1990; 30: 7-16.
10. Wong GK and Cavey MJ. Development of the liver in the chicken embryo. The Anat Rec 1993; 235: 131-43.
11. Mazzarello V, Deirio AN, Tedde PA. Structural and ultrastructural pattern of the embryonic and early foetal human liver. Boll-Soc-Ital-Biol-Sper 1992; 68(5): 285-91.
12. Riley RS, Mahin EJ and Ross W. Clinical application of flow cytometry. New York: Iqaku Shoin Medical Publishers Inc. 1993.
13. Shapiro HM. Practical flow cytometry. New York: Alan R.Liss Inc. 1989.
14. Mercer BM, Sklar S, Shariatmadar A, Gillieson MS and D'Alton ME. Fetal foot length as a predictor of gestational age. Am J Obstet Gynecol 1987; 156: 350-5.
15. Bancroft JD, Cook HC. Manual of Histological Techniques and their Diagnostic Application. Longman Singapore Publishers Ltd. 1994: 27, 53, 43.
16. Hedley DW. Flow cytometry using paraffin - embedded tissue: Five years on. Cytometry 1989; 10: 229-41.
17. Sümbüloğlu K ve Sümbüloğlu V. Bioistatistik. Ankara: Özdemir Yayıncılık, 1993: 145-8.
18. Naito M, Takahashi K and Nishikawa SI. Development, differentiation and maturation of macrophages in the fetal mouse liver. Jour. I. of Leuk Biol 1990; 48: 27-37.
19. Matsumura G and Sasaki K. The ultrastructure of megakaryopoietic cells of the yolk sac and liver in mouse embryo. The Anat Rec. 1988; 222: 164-9.
20. Sasaki K and Matsumura G. Hemopoietic cells in the liver and spleen of the embryonic and early postnatal mouse. A karyometrical observation. The Anat Rec 1987; 219: 378-83.
21. Fausto N. Hepatocyte differentiation and liver progenitor cells. Cur Opin in Cell Biology. 1990; 2: 1036-42.
22. Kanai K, Kanamura S and Watanabe J. Peri and postnatal development of heterogeneity in the amounts of endoplasmic reticulum in mouse hepatocytes. The Am Jour of Anat 1986; 175: 471-80.
23. Peter SV, Kelly GW and Dembitzer HM. Cytologic changes in fetal and neonatal hepatic cells of the mouse. Ann N Y Acad Sci 1963; 111: 87-103.
24. Ekataksin W and Wake K. Liver units in three dimensions I. organization of argyrophilic connective tissue skeleton in porcine liver with particular reference to the "Compound hepatic lobule". The Am Jour of Anat. 1991; 191: 113-53.
25. Vindelov LL and christensen IJ. A review of techniques and results obtained in one laboratory by an integrated system of methods designed for routine clinical flow cytometric DNA analysis. Cytometry 1990; 11: 753-70.
26. Esteban JM, Sheibani K, Margaret O, Joyce J, Bailey A and Battifora H. Effects of various fixatives and fixation conditions on DNA ploidy analysis. Am J Clin Pathol 1991; 95: 460-6.

27. Hedley DW, Friedlander ML and Taylor IW. Application of DNA Flow Cytometry to Paraffin - Embedded Archival Material for the Study of Aneuploidy and Its Clinical Significance. *Cytometry* 1985; 6: 327-33.
28. Iarsen JK, Munch-Petersen B, Christiansen J and Jorgensen K. Flow cytometric discrimination of mitotic cells: Resolution of M, as well as G₁, S and G₂ phase nuclei with mithramycin, Propidium iodide and ethidium bromide after fixation with formaldehyde. *Cytometry* 1986; 7: 54 -63.
29. Shapiro HM. Flow cytometry of DNA content and other indicators of proliferative activity. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 591-7.
30. Arber DA, Cook PD, Moser LK And Speights VO. Variation in reference for DNA analysis of paraffin - embedded tissue. *J Clin Pathol* 1992; 97: 387-92.
31. Gerlyng P, Stokke T, Huitfeldt HS, Stenersen T, Danielsen HE, Grotmal T and Seglen PO. Analytical methods for the study of liver cell proliferation. *Cytometry* 1992; 13: 404-15.