

# IŞIK MİKROSKOBA DOKU HAZIRLANMASI

# **İŐIK MİKROSKOBA DOKU HAZIRLANMASI**

Hücreler ile hücrelerin bir araya gelerek oluşturduğu dokular ve dokuların şekillendirdiği organların mikroskop altında incelenebilmesi, alınan organ ya da doku parçalarının incelenecek mikroskop türüne bağlı olarak uygun şekilde hazırlanması ile mümkündür.

# Işık Mikroskopik İncelemeler

## 1- Canlı İncelemeler

Canlı (vital) incelemelerde materyal, kan, lenf, sperma, özel işlemlerle ayrılmış hücreler, ince membranlar ve doku kültürü olabilir. Bu metodla hücreler ya boyanmadan faz kontrast mikroskobu ya da vital boyalar (hücreye zarar vermeden hücre içine alınan boya maddeleri) ile boyanarak incelenebilir.

## 2- Cansız İncelemeler

Cansız incelemeler **tespit edilmiş** ve **boyanmış froti** ya da **ince doku kesitlerinde** yapılır.

# **Froti yapımı**

Froti yapılarak incelenecek dokular (kan, lenf, sperma gibi) bir lam üzerine damlatıldıktan sonra tekniğine uygun şekilde ince bir film halinde lam üzerine yayılır.



Diğer dokular ise hayvan derin anestezi altındayken ya da ölümden hemen sonra küçük parçalar halinde alınır. Alınan bu doku örneklerinden histolojik preparatların hazırlanması işlemleri **histoloji teknikleri** olarak isimlendirilir.

# Işık Mikroskopik Preparatların Hazırlama Aşamaları

- Tespit (Fikzasyon)
- Yıkama
- Suyunu giderme (Dehidrasyon)
- Parlatma ya da Saydamlaştırma
- Emdirme
- Gömme ya da Blokaj
- Kesme
- Boyama
- Kapatma

- Sırayla izlenen bu aşamaların her birinde öngörülen koşullara uyma zorunluluğu vardır. Bunlardan birinde yapılan sapma ya da yanlışlık, sonucu olumsuz yönde etkiler ve uygun bir preparat elde edilemez.



# TESPİT

- Hücre içi ve hücreler arası unsurların yapısını yaşamın durduğu andaki durumlarıyla sabitlemektir.
- Canlıdan alınan materyalin bozulmaksızın saklanması amaçlanır.
- Bütünlüğü bozulan ve organizma dışına çıkartılan dokular, özel koşullar sağlanmadığı takdirde hücrelerde bulunan lizozomlar ve ortamdaki mikroorganizmaların etkisi ile kısa sürede değişime ve yıkıma uğrarlar.
- Canlı organizmaların hücrelerindeki lizozomlarda, sitosolden lizozomlara doğru bir ozmotik yönelme vardır. Bireyde ya da hücrede ölüm sonrasında membran, kontrol gücünü yitirir ve sitosole çıkan lizozomal enzimler otolize neden olur.

- Yıkım olayları şekillenmeden ve hücreleri yaşam sırasındaki durumlarıyla saklayabilmek için doku ya da organ parçaları, en kısa süre içinde uygun tespit solusyonuna alınmalıdır.
- Tespit işlemi ile doku unsurları mümkün olduğunca yapıları bozulmadan canlı haline en yakın durumda korunur ve dokunun sertliği artırılarak kesit alma işlemi kolaylaşır. Ayrıca tespit, mikroorganizmaları öldürür ve bunların dokulara zarar vermesini önler.

# TESPİT

## 1- Fiziksel yöntemler

- Isıtma

Isı tespiti proteinleri tamamen denatüre etmesi ve dokuda istenmeyen görünüm bozukluklarına sebep olması nedeniyle kullanılmamaktadır.

- Kurutma

Kurutma tespiti ise froti yapılan dokularda doku sıvısının oda ısısında evaporasyonla dokudan uzaklaştırılması esasına dayanır. Lam üzerinde ince bir film oluşturacak şekilde hazırlanan frotiler havada kurutulur.

- Dondurma

Dondurma tespiti, donma ile hücredeki faaliyetlerinin durdurulması ve böylece ölüm sonrası hücrelerde fazla bir yıkım oluşmaması esasına dayanır.

## 2- Kimyasal yöntem

Bu amaçla formaldehid, pikrik asit, asetik asit, etil alkol, civa-2-klorür, potasyum bikromat, sodyum sülfat, glutaraldehid, paraformaldehid, ozmik asit gibi kimyasal maddeler kullanılır.

Bu maddelerden her biri farklı hücre kısımlarını iyi tespit edebilmesi nedeniyle çoğu tek başına bütün hücre yapıları için yeterli tespiti sağlayamaz. Bu nedenle bu maddeleri belli oranlarda içeren tespit sıvıları kullanılır.

Pek çok tespit sıvısının bileşimine giren formol'ün %10'luk solusyonu çok yaygın kullanılır.

Histoloji tekniğinde tespit işlemi en kritik ve bu nedenle de en önemli aşamadır.

Başarılı bir tespit işleminden sonra, bunu izleyen aşamalarda aynı özen gösterilmezse iyi sonuca ulaşılamaz.

# **Tespit aşamasında optimal koşullar, çeşitli faktörler dikkate alınarak saptanabilir.**

**1-Tespit sıvısının amaca göre seçimi**

**2-Tespit sıvısının miktarı**

**3-Tespit sıvısının pH'sı**

**4-Tespit süresi**

a-Parçanın büyüklüğü

b-Tespit sıvısının difüzyon gücü

c-Ortamın ısısı

d-Amaç

e-Dokunun cinsi

**1-Tespit sıvısının amaca göre seçimi:** Bütün dokular ve hücreler için ideal olan tek bir tespit sıvısı yoktur. İncelenecek doku yada hücrelerin yapısal karakterleri göz önüne alınarak en iyi şekilde tespit eden tespit solusyonu seçilmelidir. Örneğin sinir doku ve lipidler için formol (formalin) idealdir. Karbonhidrat ve proteinler için ise etil alkol seçilmelidir. Ayrıca çeşitli canlı türleri ve her sınıftan canlıların embriyonal gelişme dönemleri için seçilecek tespit türleri farklıdır. Dokuların vital karakterlerine en uygun bir şekilde birinci derecede ozmik asit, ikinci derecede de formol ile tespit edilebilir. Aynı araştırmada birden fazla doku yada hücre incelenecekse her biri için en ideal olan tespit solusyonlarının kullanılması gerekir.

**2-Tespit sıvısının miktarı:** Tespit sıvısı ile bu sıvı içersine konacak materyalin oranı önemlidir. Bir tespit sıvısına gereğinden fazla parça (materyal) konursa, tespit sıvısı içindeki etkili maddeler yetersiz kalır ve ideal bir tespit olayı gerçekleşmez. Bunun için 1:50 - 1:100 oranı bildirilmektedir. Ancak, kimyasal madde yönünden olanakları sınırlı durumdaki laboratuvarlar için 1:20 – 1:25 oranı ile de uygun sonuç alınabileceği belirtilmektedir. Ozmik asit yukarıda belirtilen oranlara uymaz. %1 – 2’lik ozmik asit eriyiği için 1:5 oranı uygundur; ancak, alınacak parçaların 1-2 mm kalınlık dolayında olmasına özen gösterilmelidir.



**3-Tespit sıvısının pH'sı:** Genellikle çekirdek ve sitoplazma birbirine zıt pH değerlerinde iyi tespit olurlar. Asit pH'da çekirdek, alkali pH'da ise sitoplazma daha iyi korunur. Bazı araştırıcılar kan serumu gibi vücut sıvılarındaki pH değerinde (pH 7,2) ya da pH 6-8 arasındaki nötral pH'ya yakın pH değerlerinde çalışmayı önerirken, diğeri pH 4 dolayında optimal şartların sağlandığını bildirmektedir. Ancak asit pH polarize siyah tortu görünümünde pigment oluşumuna neden olabilir. pH ayarlanmasında en çok kullanılan tampon solusyonları fosfat, bikarbonat, kakodilat ve veronal tampon solusyonlarıdır.

**4-Tespit süresi: Parçanın tespit sıvısı içerisinde bulundurulma süresi aşağıda belirtilen faktörlere bağlıdır:**

**a)Parçanın büyüklüğü:** Uygun büyüklükte alınan parçaların en derin kısımlarında bile otoliz şekillenmeden tespit işleminin tamamlanması gerekir. Çok yumuşak doku parçaları başlangıçta büyükçe bir boyutta tespite atılır; biraz sertleşme olduktan sonra (1-2 saat sonra) uygun büyüklükte kesilir (trim yapılır); böylece dokunun ezilmesi de önlenmiş olur.

**b) Tespit sıvısının difüzyon gücü:** Tespit işleminde kullanılan substansların difüzyon gücü çok çeşitlidir. Ozmik asit ve pikrik asit çok yavaş yayılma gösterirler. Asetik asit, formol, triklorasetik asit ve alkol ise çok seri biçimde derinliğine etki yaparlar. Tespit sıvısının difüzyon gücünü tespit edilecek organın strüktürel ve fonksiyonel özelliği de etkiler; örneğin organ kapsülü gibi bağdokusal membranlar, tespit sıvısının doku içerisine doğru yayılmasını güçleştirir.

**c)Ortamın ısısı:** Düşük ısıda difüzyon gücünün zayıflaması nedeniyle tespit olayı da gecikir.Yüksek ısı ise kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi tespit işlemini de hızlandırır ancak artefakt oluşumuna ve dokularda hasarlara neden olur. Kimi araştırmacılar optimal ısı olarak 0-4°C'yi önerirlerken, kimileri de 37-40°C'de iyi sonuçlar aldıklarını bildirmektedirler. Histokimyasal çoğu çalışmalarda 0-4°C seçilirken, bunun dışında genellikle oda ısısında (20°C) tespit işleminin yapılması yaygındır.

**d)Amaç:** Tespit süresinin belirlenmesinde amaç da önemlidir. Seri teşhis için tespit sıvısında olabildiğince kısa süre bırakma söz konusu iken, kimi dokuları daha uzun süre (merkezi sinir sistemini %10 formolde en az bir hafta) tespitte tutmakla daha iyi sonuç elde edilir.

**e)Dokunun cinsi:** Embriyonal dokular ve yumuşak dokular daha kısa sürede tespit edilirken, sert dokular ya da organ kapsülleri daha uzun süreyi gerektirirler.

Ancak, tespit süresinin aşıldığı kimi durumlarda da dokuların aşırı sertleşmesine bağlı kırılma, ufalanma ve kötü boyanma gibi durumlar ortaya çıkar. Parçaların uzun süre saklanmaları için %10 formol dışındaki tespit sıvıları uygun bir ortam değildir.

# Tespit işleminde başlıca iki teknik uygulanır

- İmmersiyon tekniđi
- Perfüzyon tekniđi

- **İmmersiyon tekniği:** Alınan doku örneklerinin geniş ağızlı ve ağzı iyi kapanan cam kaplar içerisindeki tespit sıvılarında tespit işleminin yapılmasıdır. Tespit edilecek parçaların, bütün yüzeylerinin tespit sıvısıyla doğrudan ilişkisi gerekir. Bunun için de, tespit şişesinin dibine cam yünü, filtre kağıdı ya da pamuk konarak ya da delikli porselen kaplar (Fairchild kabı) kullanarak parçanın her taraftan tespit sıvısı ile temas etmesi sağlanır. Tespit süresince şişenin ara ara çalkalanması ya da karıştırılması da uygun olur.



- **Perfüzyon tekniği:** Derin narkoz altındaki hayvanın göğüs boşluğu açılarak kalbin sağ atriyumunu ensizyonla açılıp kanı boşaltılmaya başlanır. Bu anda hayvana sol ventrikulusdan (arteriyel sistemden) vücut ısısında olmak üzere izotonik solusyon enjekte edilir. Düşük basınç altında verilen izotonik enjeksiyon sıvısı sağ atriyumdan çıkıncaya kadar devam edilir. Kanın boşalmasından sonra sol ventrikulusdan bu kez de yine vücut ısısında tespit sıvısı enjekte edilir. Perfüzyonun tamamlanmasından sonra istenilen doku ya da organ parçaları uygun yöntemle alınır ve perfüzyonda kullanılan tespit sıvısı içerisine atılır. Bundan sonraki işlem, immersiyon tekniğindeki gibidir.



# YIKAMA

- Tespitin türüne göre su ya da değişik yoğunluklardaki alkollerde yapılır. Böylece tespit sıvısının dokulardan uzaklaştırılması sağlanır.
- Akarsuda yapılan yıkamada Fairchild delikli porselen kabından yararlanılır. İnce bir boru yıkama kabının dip tarafına daldırılır ve yüzer durumdaki Fairchild delikli porselen kabı içindeki parçalar dipten yukarıya su akımını sağlanarak yıkanır.
- Yalın formol ve ozmik asit tespitleri ile krom tuzu içeren tespitlerden sonra yıkama aşamasında su kullanılır
- Pikrik asitli tespitlerden sonra %70-80'lik alkol ile yıkama gerçekleştirilir
- Krom içermeyen süblimeli ya da triklorasetik asitli tespitlerden sonra, parçalar yıkama amacıyla %90-96'luk alkole konulurlar.

# SUYUNU GİDERME (DEHİDRASYON)

- Parafin, plastik madde ya da selloidin ile blokaj işlemi yapılacak doku parçalarına, bu maddelerin su ile uyuşmaması nedeniyle yıkamadan sonra uygulanan işlemdir.
- Bu aşama sonunda dokularda hiç su kalmaması amaçlanır.
- Bu amaçla, en yaygın olarak etil alkol kullanılır.
- Etil alkolün dokular üzerindeki büzücü etkisini en aza indirmek için aşamalı olarak su giderme işlemi gerçekleştirilir.
- Dehidrasyon işlemi, düşük dereceli alkollerden başlayarak gittikçe artan dereceli alkollerle (%50, 60, 70, 80, 90, 96 ve Absolu alkol) aşamalı olarak yapılır.
- Yıkama alkolle yapılmışsa dehidrasyona yıkamadaki alkol derecesinden başlanır.
- Dehidrasyon sonunda dokularda hiç su kalmaması gerekir. Dehidrasyon süresi parçanın büyüklüğüne ve cinsine göre değişir; 1-2 saat yeterli olabileceği gibi, bu süre 24 saat kadar da sürebilir.
- Dokular düşük dereceli alkollerde daha uzun zaman bırakılabilirken, yüksek derecelilerde (%96 ve absolu alkol) dokuların sertleşmemesi için optimal süre aşılmamalıdır

# PARLATMA (SAYDAMLASTIRMA)

- Bu işlem dokulardan alkolün giderilmesi işlemidir.
- Bu işlem sırasında dokulardaki suyu gideren alkol ile gömme materyalini çözücü özelliğe sahip olan bir madde yer değiştirir.
- Bu amaçla nispeten ucuz olan xylol yaygın olarak kullanılır. Ancak xylol'un dokuları sertleştirici özelliği vardır. Methylbenzoate bu yönden daha kullanışlıdır.
- Dokulardan alkolü uzaklaştıran bu maddeler aynı zamanda dokuları saydamlaştırır.
- Bu amaçla xylol ya da methylbenzoate kullanılır.
- Parlatmada kullanılan kimyasal maddeler yağları çözücü özelliktedir.
- Bu aşamada dokuda bulunan yağlar eridiğinden, bu dokulardan hazırlanan preparatlarda yağ içeren kısımlar boşluklar olarak gözlenir.

# EMDİRME

- Parlamiento ve saydam duruma gelmiş doku parçalarına parafin, plastik madde ya da celloidin emdirmektir.
- En yaygın olarak kullanılanı parafindir. Parafinin ticarete, erime noktaları değişik ısılara göre ayarlanmış, plastik maddeler eklenerek daha kolay kesit alınabilen ve paraplast olarak isimlendirilen şekli bulunur. Genellikle parafinin 58-60°C'de eriyeni kullanılır.
- Düşük ısıda eriyen parafin kullanıldığında hazırlanan bloklar çok yumuşak olur, çok yüksek ısıda eriyen parafin kullanıldığında ise yüksek ısı dokuya zarar verir.
- Özel parafin etüvlerinde erimiş halde tutulan parafinin dokulara daha kolay ve derinliğine girmesini sağlamak için etüvün havası vakum pompası ile boşaltılır.



# GÖMME ya da BLOKAJ (BLOKLAMA)

- Emdirme materyalini iyice emmiş olan dokular, yine aynı materyal içerisine gömülürler.
- Bu amaçla, emdirme yapılan etüvde erime derecesine getirilen emdirme materyali özel kalıplar içerisine doldurulur.
- Sıvı durumdaki bu maddenin içine, **kesit yüzleri üzerine oturtulmak koşuluyla**, doku parçaları yerleştirilir.
- Dokunun kesit yüzünün hazırlanan bloğun ön yüzüne **düzgün olarak yerleştirilmesi önemlidir.**
- İşlem biter bitmez bloklar, buzdolabında sertleşmeye bırakılır.









**TARİH:**

**SAAT:**

**TESPİT:**

**TESPİT SÜRESİ:**

**YIKAMA SÜRESİ:**

..... **GÜNÜ**

**9-- %70 Alkol**

**10-- %80 Alkol**

**11-- %96 Alkol**

**12-- Absolu Alkol I**

**13-- Absolu Alkol II**

**14-- Absolu Alkol III**

**15-- Methylbenzoate I**

.....**GÜNÜ**

**9-- Methylbenzoate II**

**17-- Methylbenzoate III**

.....**GÜNÜ**

**9 Benzol I**

**930 Benzol II**

**10 Benzol III**

**1030 Benzol Paraplast**

**1045 Paraplast (Vakum)**

**15 Blokaj**