

TRANSMİSYON ELEKTRON MİKROSKOBU - 3

1.TESPİT

Bu maddeler **proteinler**, **yağ** ya da **karbonhidratlar**dan oluşan unsurların yapılarına giren **suyu** çıkararak, bu unsurları şekillendiren moleküllerin birbirlerine daha sıkı bir şekilde bağlanmalarını sağlarlar. Burada önemli olan husus, bu bağlanma sırasında hücre içi ve dışı organizasyonun değişikliğe uğramamasıdır.

Alınan dokuların preparasyonunda başarılı olunması için ilk koşul iyi bir tespit solüsyonu seçmiş olmaktır.

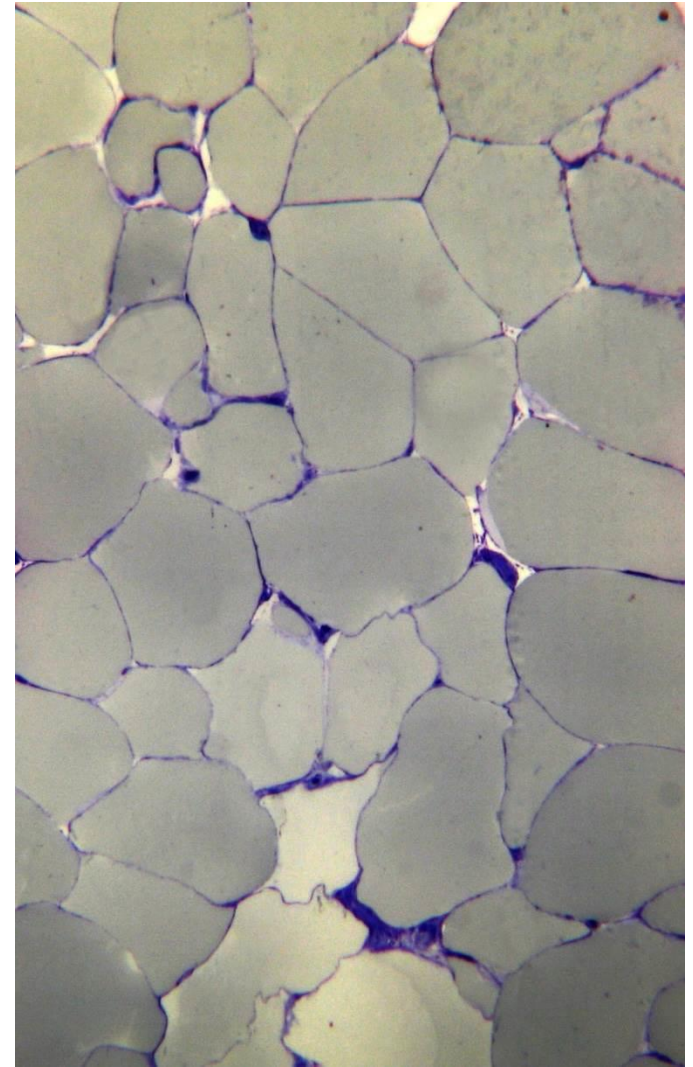
Işık mikroskopta kullanılan tespit solusyonları bu amaca uygun düşmemektedir.

• **Tespiti etkileyen faktörler:**

- Tespit maddesinin türü
- Tespitin pH'sı
- Tespitin ozmotik basıncı
- Tespitin iyon içeriği
- Tespitin ısısı
- Tampon solüsyonunun etkisi
- Tespiti uygulama yolu

- ***Tespit maddesinin türü:*** Elektron mikroskopun kullanılmaya başlandığı ilk yıllarda formaldehidten yararlanılmak istenmiş fakat bundan tatmin edici bir sonuç alınamamıştır. Bu arada daha birçok tespit solüsyonları denenmiş ve sonunda, **ozmik asidin** en iyi tespit edici ajan olduğu kanısına varılmıştır.

Ozmik asit dokulara yavaş işler. Bundan dolayı da, sadece ozmik asitle tespit edilecek doku parçalarının çok küçük olması gerekir. Ozmik asidin en iyi tespit ettiği maddeler, **yağlı (lipid'ler) maddelerdir.** **Karbonhidratlar** da oldukça iyi tespit edilirler. Proteinlerin çoğunluğunu ise ozmik asit iyi tespit edemez.



Çeşitli tespit solüsyonlarının farklı tespit edici özelliklerinden yararlanmak amacıyla bir arada kullanılması yaygın bir uygulamadır. Bu amaçla alınan doku parçalarının **glutaraldehid** ile tespit edilmesinden sonra **ozmik asitte** ikinci kez tespit edilmesi rutin olarak kullanılan bir yöntemdir. Çünkü **glutaraldehid**, çoğu enzimler de dahil, **proteinleri ve karbonhidratları iyi tespit eden bir maddedir**. Ayrıca glutaraldehid tespitinden sonra dokular tampon solüsyonlarında, fazla ekstraksiyona uğramaksızın uzunca bir süre saklanabilmektedir.



- Belli bir tespit solüsyonu ile tespitte her zaman ve her hücrede aynı sonucu almak olanaksızdır. Tespit kalitesi bir bloktan diğerine değişebildiği gibi, aynı kesitteki komşu iki hücreden biri diğerinden daha iyi de tespit olmuş olabilir.



Bu son durum, tespitle ilgili olabileceği gibi, hücrelerin farklı fonksiyon aşamalarında olmalarından da ileri gelebilir. Örneğin çok aktif bir metabolizma fazında olan hücreler, ideal bir tespit solüsyonu ile tespit edilseler bile, özellikle endoplazma retikulumu kesecikleri, hatta perinükleer boşluk, şişkin olarak gözükür. Bu durumu tespit hatası olarak almamak gerekir.

- ***Tespitin pH durumu:***

Morfolojik araştırmalarda genellikle 7.2-7.4 arası bir pH kullanılır.

- ***Tespitin ozmotik basıncı:*** Tespit solüsyonlarının ozmotik basıncı, tespit edilecek hücrelerin ozmotik basıncı ile aynı ya da ona çok yakın olmalıdır. Eğer solüsyonun ozmotik basıncı hücrelerinkinden daha düşük olursa (**hipotonik solüsyon**), bu durumda hücre ve içindeki şekilli unsurlar su alıp şişerler; buna karşılık, dıştaki sulu ortama madde verirler.

Tespit işinde yoğun (**hipertonik**) tespit solüsyonları kullanılırsa, bu sefer de hücreler dışarıya fazla su verirler, dolayısıyla da büzülürler. Böyle dokularda hücreler birbirlerinden uzaklaşmış olarak görünürler.

- Ayrıca hücre içi yoğunluk arttığından, şekilli unsurlar koyu görünürler; çeşitli yapılar arasında kontrast farkı azalır.
- Embriyonel dokular ve suda yaşayan canlılara ait dokularda olduğu gibi bünyesinde fazla su taşıyan dokuların tespitinde biraz hipertonik olan tespit solüsyonları tercih edilir.
- Osmotik basıncı ayarlamak için genellikle **NaCl**, **sukroz** veya **glukoz** gibi maddeler kullanılır.

- ***Tespit solüsyonundaki iyon içeriği:*** Ekstraselüler sıvılarda iyonlar bulunduğundan, tespit solüsyonlarında da aynı maddeler bulunmalıdır. Aksi halde hücre içi ve dışı materyalde ekstraksiyonlar olur. Bu nedenle, tespit solüsyonlarına bir miktar bivalent kation (**Ca** veya **Mg**) katılır. Böylelikle, tespit ve dehidrasyon sırasında, özellikle membran lipidlerinin ve mitokondriyon matriksinin ekstrakte olması önlenir; miyelin figürleşmeleri azalır.

- **Isının etkisi:** İlk tespit olarak **ozmik asit** kullanılacaksa, tespit buzdolabında (**+4 °C**) yapılmalıdır. Bu madde dokulara yavaş işlediğinden, oda ısısında tespit sırasında, doku parçalarının derin kısımları iyi tespit olamaz.
- **Aldehid grubu** tespit maddeleri dokulara hızla işlediğinden, bunlarla tespiti oda ısısında ya da buzdolabında yapmanın belirgin bir farkı olmamaktadır. Ancak enzim demonstrasyonu söz konusu ise, tespiti, soğukta yapmak gerekir.

- ***Tampon maddesinin etkisi:*** Çok çeşitli tampon maddeleri vardır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanlar, **fosfat** ve **kakodilat** tamponlarıdır. Bu maddeler hem ozmik asitle hem de aldehid grubu maddelerle kullanılabilir.

Fosfat tamponları kullanıldığında, tespitin dokularla daha iyi uyduğu ve daha hızlı işlediği bildirilmekte ve bundan ötürü de, **ozmik asitle** tespitte özellikle bu tampon tavsiye edilmektedir. Ancak **aldehid tespitlerinde** daha çok **kakodilat** tamponu kullanılmaktadır.

- ***Tespiti uygulama yolunun etkisi:***

Bilindiđi gibi, tespit işlemi **immersiyon** ve **perfüzyon** olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Bunlardan immersiyon tespiti daha sık olarak kullanılmaktadır. Ancak merkezi sinir sistemini oluşturan dokularla böbrek ve kaslarda, perfüzyon tercih edilmelidir.

Sinir sistemine ait dokularla böbrek dokusu ölümden sonra çok çabuk bozulurlar. Perfüzyon bu bakımdan gereklidir. Kaslar ise, kontraktil olduklarından, tespit edilmeden yerlerinden alınırlarsa kısalırlar ve normaldeki görünüşlerini kaybederler.

Eğer perfüzyonla tespit yöntemi seçilmişse, perfüzyondan önce dolaşım sistemini vücut ısısındaki **fizyolojik bir solüsyonla** yıkayarak kanı boşaltmak gerekir. Bu durum, kan hücreleri iri olan canlılarda, örneğin kanatlılarda, daha da önem kazanmaktadır. Eğer kan, damarlardan atılmamışsa, tespit solüsyonları ile pıhtılaşmakta ve bu pıhtı, tespit solüsyonlarının dokulara ulaşmasını önlemektedir.

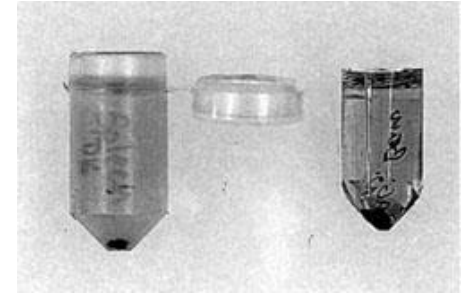
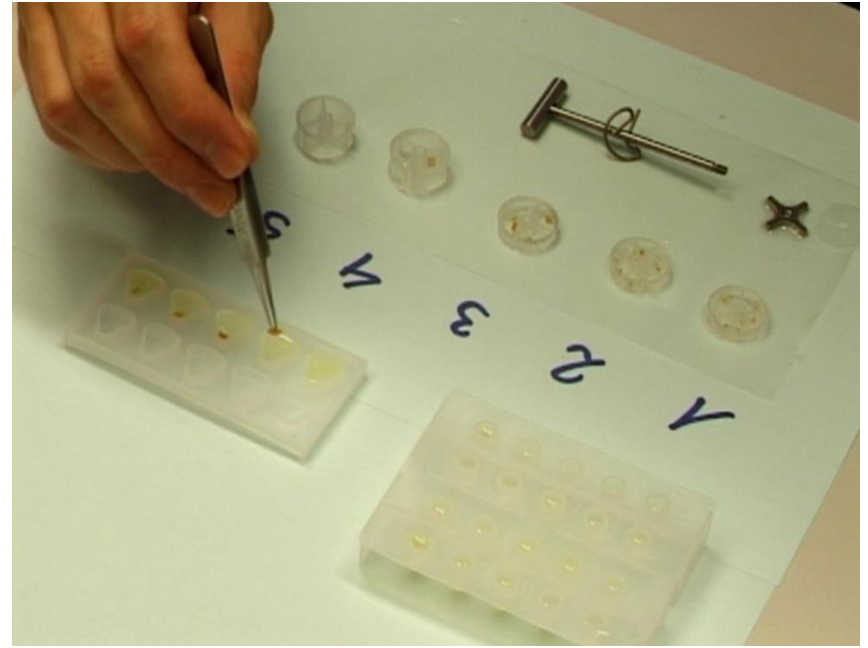
2.GÖMME: Tespit edilen dokuda bundan sonraki iş, tespit solüsyonundan kurtulmaktır. Bu amaçla tampon solüsyonunda (sodyum kakodilat) yıkanır. Yıkama işlemi blokaj ve kesit alma işlemi için çok önemlidir. Bünyesinde tespit solüsyonu kalmış olan doku parçalarına gömme materyali istenildiği derecede nüfuz edemez. Kesitleri de düzgün çıkmaz.

- Tampon solüsyonunda yıkanan numunenin sudan arındırılma işlemi (dehidrasyon) dereceli alkollerle (30°, 50°, 70° alkol) yapılır.
- Etil alkolün büzücü etkisi olduğundan, önce düşük dereceli alkol serilerinden başlanır ve dokular dehidrasyon amacıyla sırasıyla 30°'luk 50°'lik ve 70°'lik alkollerde yarımşar saat bekletilir.

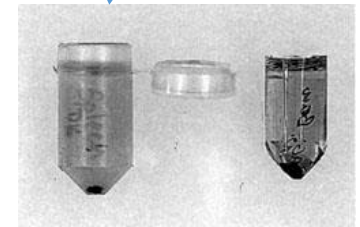
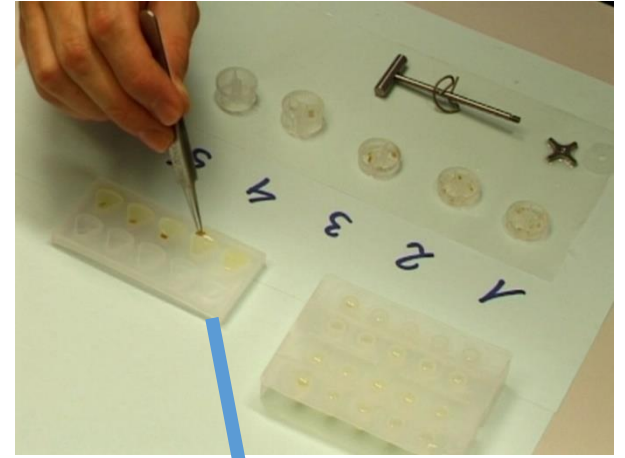
Devamında **uranil asetat** solüsyonunda blok boyaması uygulandıktan sonra tekrar dereceli alkollerde bekletilir ve gömme medyumuna kolayca uyum sağlaması için **propilen oksitten** geçirilerek gömülür. Gömme medyumunu olarak ışık mikroskopta kullanılan parafin, çok ince kesit almak için uygun olmadığından tercih edilmez. Onun yerine Epoksi reçineleri (**Epon, Araldit** vs.) kullanılmaktadır.

Gömme ve bloklamada en çok dikkat edilecek konu, gömme materyalinin sertlik derecesini, kullanılacak dokularınkine göre ayarlamaktır. Eğer gömme materyali dokudan daha yumuşaksa, kesitler ondüleli bir hal alırlar; hücrelerdeki yuvarlak şekilli unsurlar ovalleşirler. Eğer gömme materyali daha sertse, bu sefer de kesitlerde parçalanma olur.

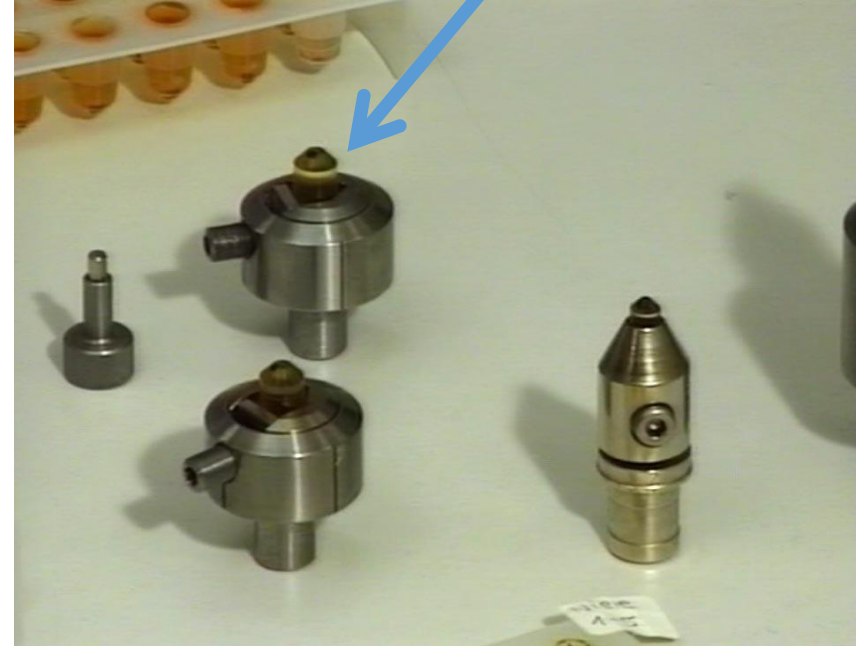
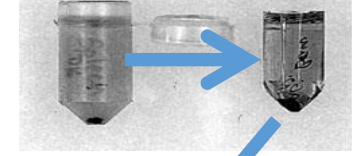
Laboratuvarımızda, ilk hazırlandığında sıvı halde bulunan epoksi reçineleri kullanılmaktadır. Bu amaçla hazırlanan **Araldit** veya **Epon**, jelatinden yapılmış küçük kalıplar veya kapsüller içine dökülür.



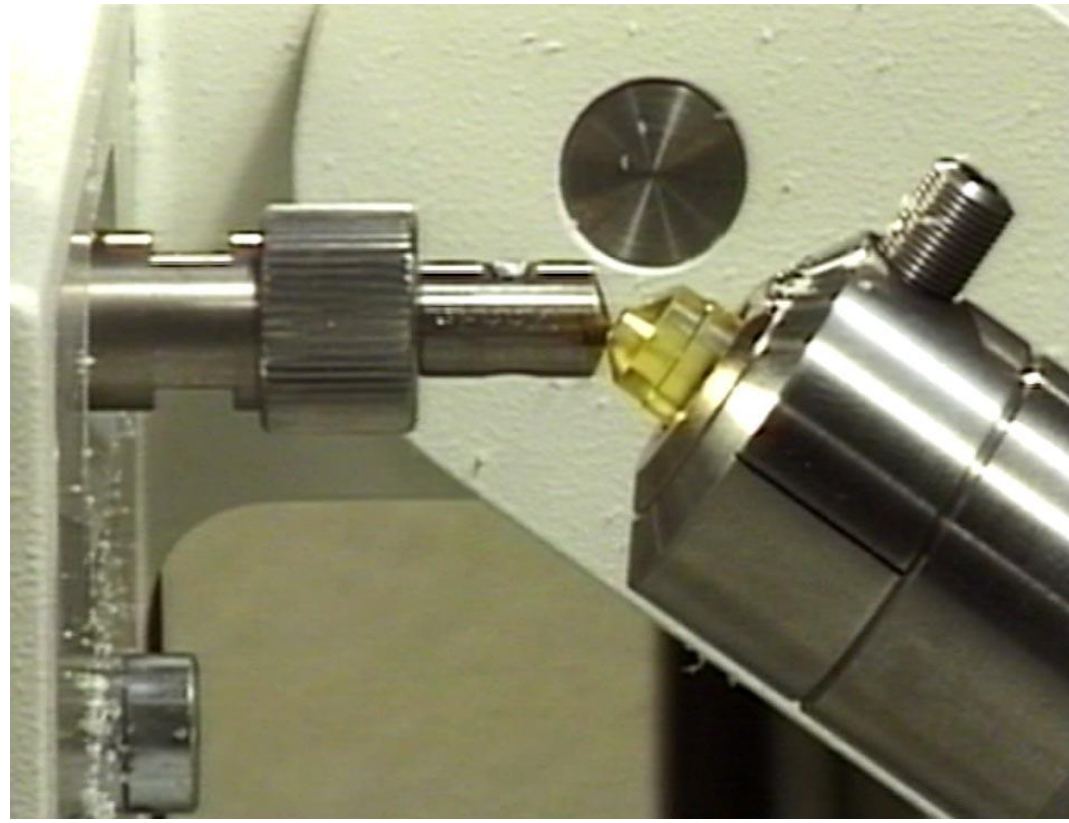
İnce bir öze yardımı ile yaklaşık 1 mm^3 büyüklüğündeki doku örnekleri kapsül veya kalıp içine gömülür. Önce 45°C de, sonra da 60°C 'deki etüvde birer gün bekletilerek **polimerizasyonu** (gömme materyalinin yapısı değişmeksizin molekül ağırlığı daha yüksek bileşik meydana gelmesi) sağlanır. Böylece doku parçasının gömüldüğü plastik materyal iyice sertleşir.



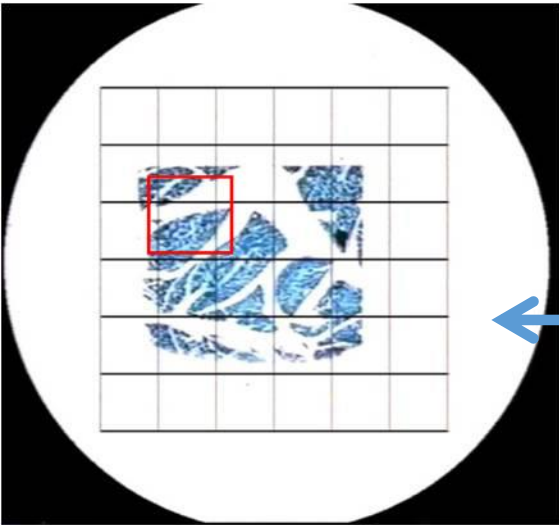
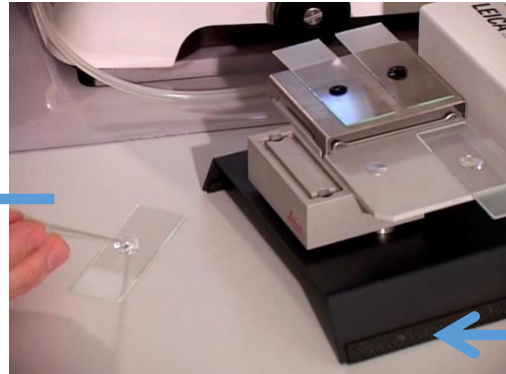
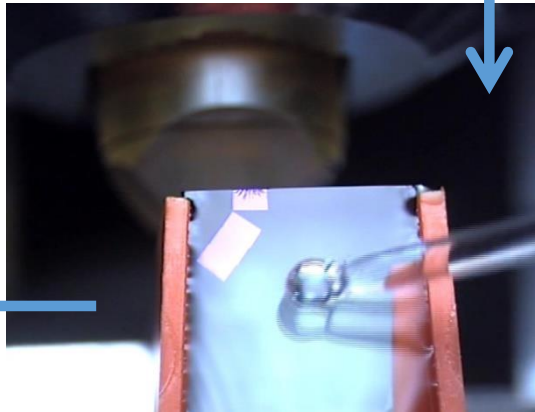
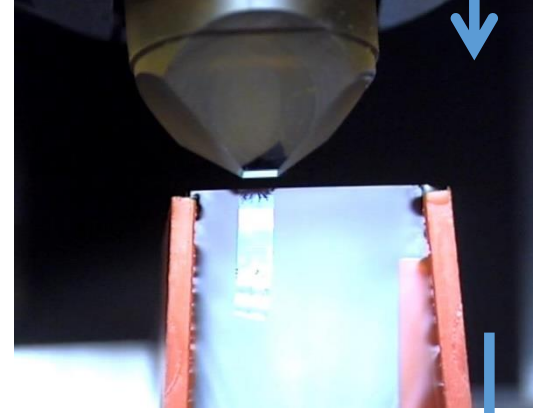
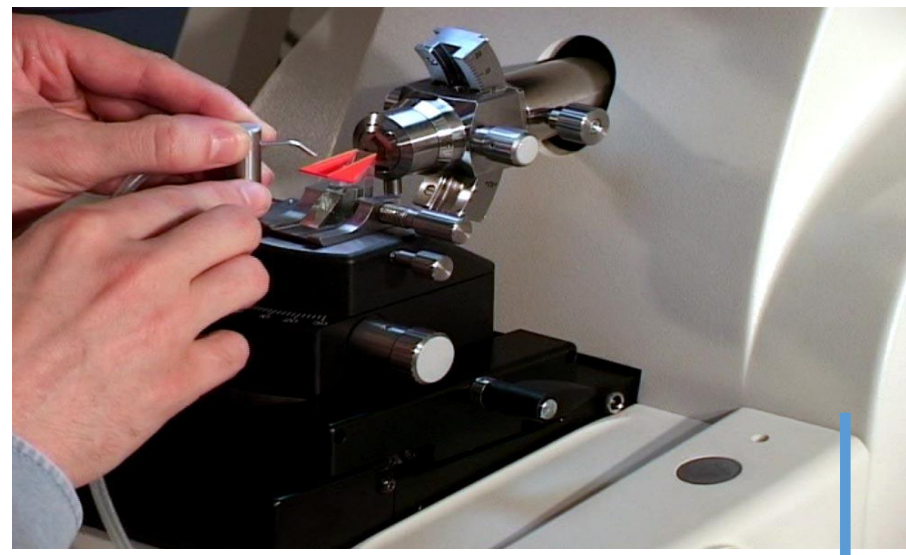
Sertleşmiş bloklar etüvden çıkarıldıktan sonra döküldüğü kalıptan veya üzerinde bulunan jelatin kapsüllerden, sıcak su yardımı ile eritilerek çıkartılır.



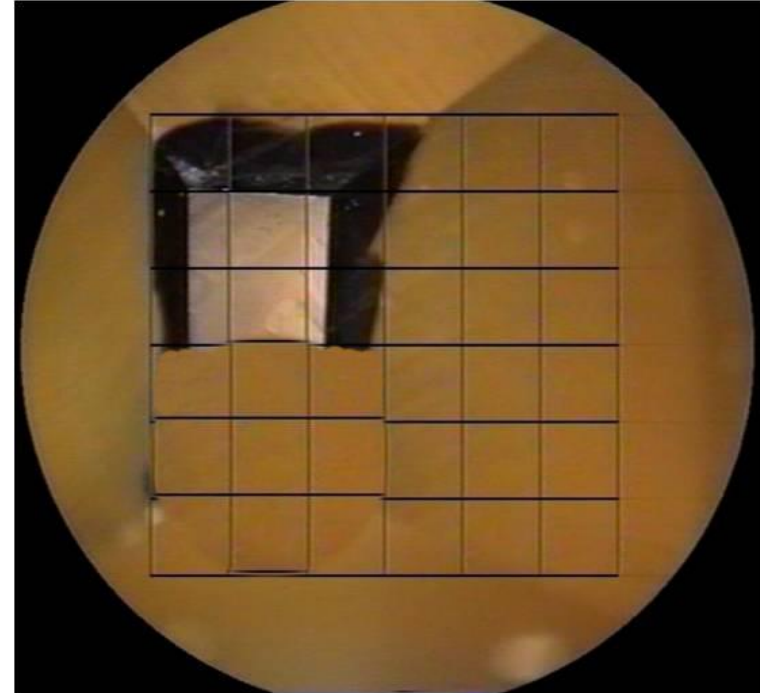
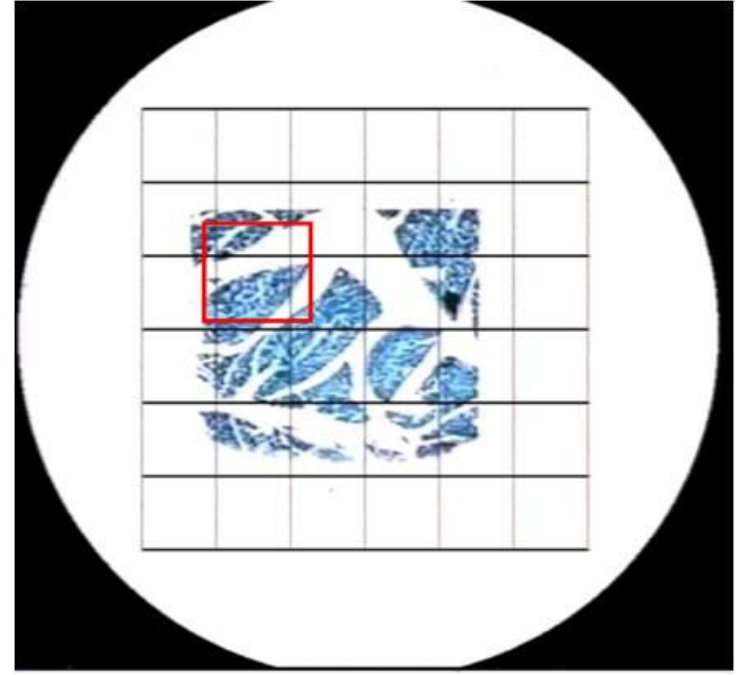
3.KESME: Blok tutucuya yerleştirilen blokların 3n ve yan y3zeyleri doku tamamen ortaya 3ıkarılana kadar **piramitom**da traşlanır.



Tıraşlanmış bloklardan ultra-
mikrotomda 1 mikron (μ)
kalınlığında alınan kesitler
lam üzerine aktarılır ve
Toluidin mavisi ile boyanır.
Kapatıcı medyum aracılığı
ile boyanmış kesitlerin üzeri
lamel ile kapatılır.
İncelenecek bölge
işaretlenir.



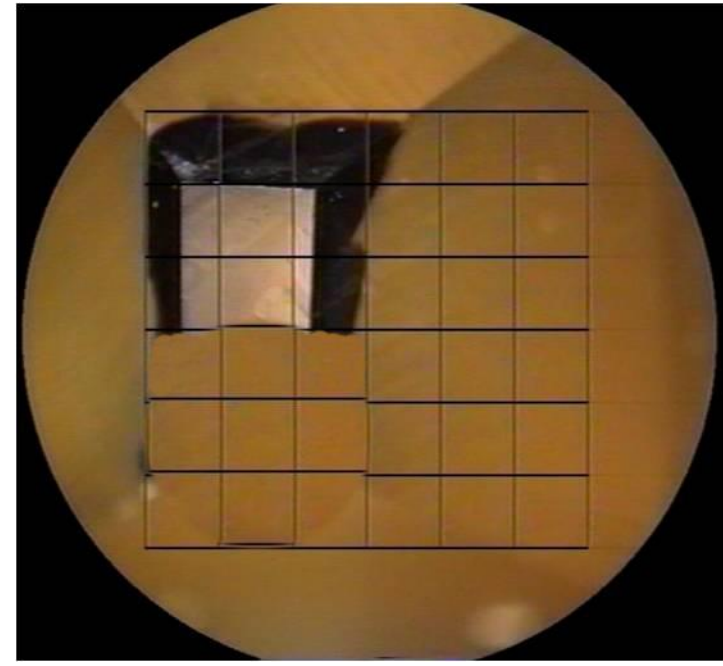
Işık mikroskofta incelenen doku kesiti bu boyutu ile elektron mikroskofta incelemek için yine de çok büyüktür. Bu nedenle daha da küçültülmesi gerekir. Yaklaşık 1 mm^2 büyüklüğündeki kesit yüzeyinin arzu edilen $1/10$ oranındaki bölümü seçilerek işaretlenir.



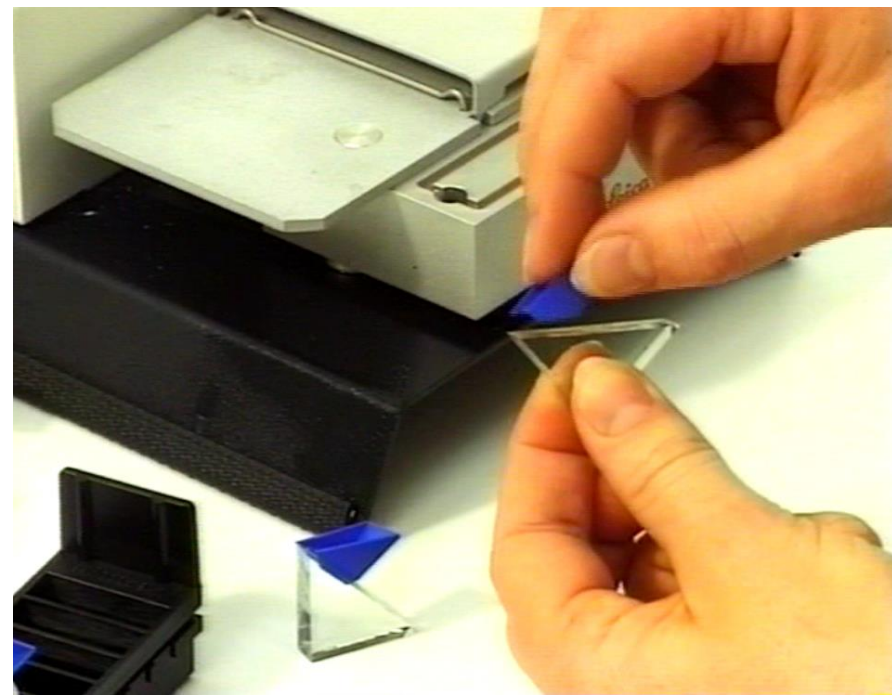
Piramitom yardımı ile dokunun kesitte işaretlenen bölümü dışında kalan diğer kısımları tıraşlanıp atılır.

Blok bu haliyle kesik piramit haline getirilir. Böylelikle kesit yüzeyi daha da küçültülmüş olur.

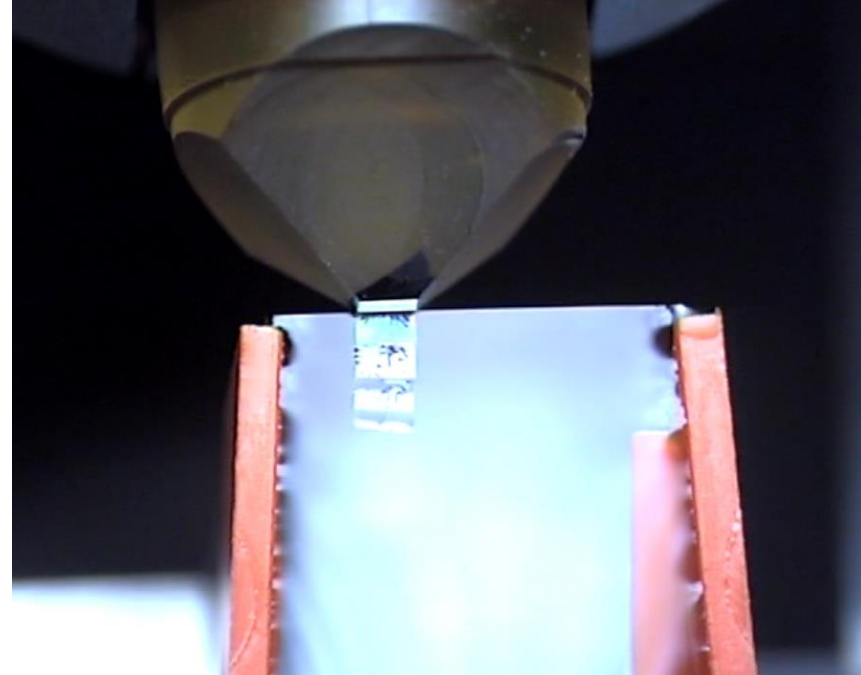
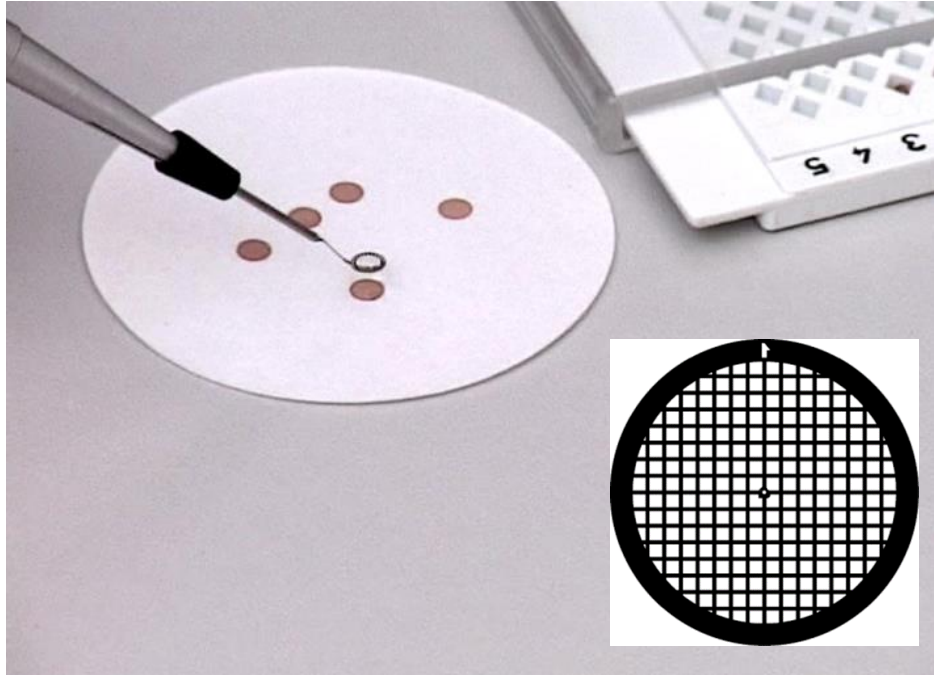
Sonra bu bloklardan ultra-mikrotom yardımı ile 500 angstrom (\AA) kalınlığında şerit halinde kesitler alınır.



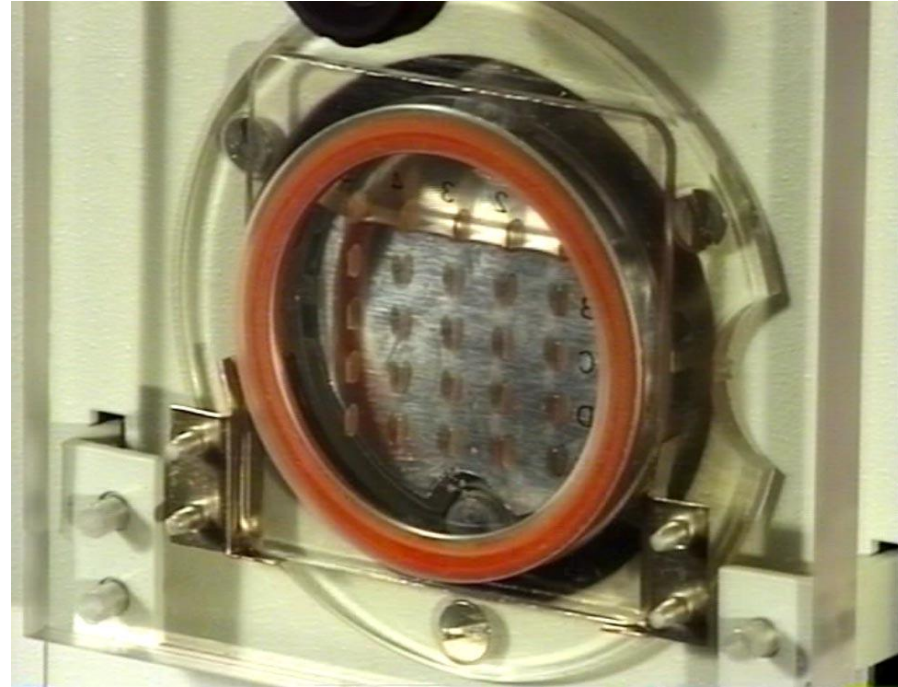
Ultra-mikrotom da kesit almak için camdan yapılmış bıçaklar veya elmas bıçaklardan yararlanır. Üçgen şeklinde hazırlanan cam bıçağın keskin kenarına küçük bir havuzcuk düzeneği hazırlanır.



- Bu havuzcuk bir enjektöre çekilen damıtık su ile doldurulur. Cam bıçağın keskin kenarı ile şerit şeklinde alınan kesitler bu damıtık suda yüzdürülür ve önceden formvarla kaplanmış bakır gridler üzerine aktarılır.



4.BOYAMA: Doku kesitleri ağır metal tuzları içeren boyama solüsyonları ile boyanırlar. Böylelikle kontrastlı bir görüntü sağlanır. **Ozmik asit** tespit edici özelliği yanında boyama amacıyla da kullanılır. Diğer elektron boyaları **Uranil asetat** ve **kurşun sitrat**'tır.



- Gridler üzerine alınan dokular, bu boyalarla boyandıktan sonra elektron mikroskopta incelenirler.
- Doku kesitini ağır metal tuzları, çökelti yapmak suretiyle boyarlar. Kesitin bazı bölümlerinde fazla, bazı bölümlerinde ise daha az çökelti meydana gelir.
- Elektronlar dokudaki ağır metallerle karşılaşınca sahip oldukları kinetik enerjilerinin bir bölümünü kaybederek kesitin diğer tarafına geçerler.
- Bir elektron ne kadar çok ağır metalle karşılaşır o kadar az bir kinetik enerji ile kesitin diğer tarafına geçer.
- Doku kesitini terk eden elektron demetleri, mikroskobun elektromanyetik alanlarından geçerek floresan ekran üzerinde odaklanır.
- Elektronlar mikroskobun floresan ekranına çarpınca görülür hale gelerek ışık saçarlar.
- Sahip oldukları farklı yoğunluktaki kinetik enerjileri nedeniyle ekran üzerinde siyah ve beyazın tonlarında doku kesitine ait görüntüler elde edilir.

KAYNAKLAR

1. Glauert, A. M. (1975): Practical Methods in Electron Microscopy, Fixation Dehydration and Embedding of Biological Specimens, American Elsevier Publishing, New York.
2. Kuo, J. (2007): Electron Microscopy Methods and Protocols, Humana Press, Totowa, New Jersey.
3. Leica Mikrosysteme GmbH Wien (2005) EM Specimen Preparation, www.em-preparation.com.
4. Sađlam, M. (1977): Elektron Mikroskopide Tespit G6mme ve Boyama Problemleri, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
5. Pease, D. (1960): Histological Techniques for Electron Microscopy, Academic Press Inc, USA.