

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DEĞİŞİK DOKU TESPİT SOLÜSYONLARIYLA PERFÜZYON VE
İMMERSİYON DOKU TESPİT YÖNTEMLERİNİN
KARŞILAŞTIRMALI OLARAK DEĞİŞİK DOKULARDAKİ
ETKİLERİNİN IŞIK MİKROSKOBU DÜZEYİNDE İNCELENMESİ

Araş. Gör. Bio. Sibel KÖKTÜRK

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin Histoloji ve Embriyoloji
Programı İçin Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (MASTER) TEZİ
olarak hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Süreyya CEYLAN

79808

Kocaeli Üniversitesi Araştırma Fonu, Proje No: 1997/39

KOCAELİ
1998

TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan Doç. Dr. Süreyya CEYLAN



Üye Prof. Dr. Nadir PAKSOY



Üye Doç. Dr. Hakkı DALÇIK



ONAY

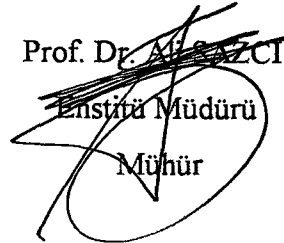
Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

23..10/1998

Prof. Dr. ALPAZCI

Enstitü Müdürü

Mühür



ÖZET

Değişik Doku Tespit Solüsyonlarıyla Perfüzyon ve İmmersiyon Doku Tespit Yöntemlerinin Karşılaştırmalı Olarak Değişik Dokulardaki Etkilerinin Işık Mikroskobu Düzeyinde İncelenmesi

Bu çalışmanın amacı; değişik tespit solüsyonlarıyla perfüzyon ve immersiyon tespit yöntemlerini kullanarak farklı dokularda oluşan histolojik farklılıkları değerlendirmektir. Wistar cinsi dişi sıçanlar, perfüzyon ve immersiyon tespit yöntemleri kullanılarak tespit edildi. Sıçanların beyin, karaciğer, böbrek ve ovaryum gibi çeşitli organlarından doku örnekleri alındı. Tespit sırasında 0,1 M fosfat tamponlu % 10 formalin, 0,1 M kakodilat tamponlu % 4 paraformaldehit ve 0,1 M kakodilat tamponlu % 2,5 glüteraldehit (CaCl₂ ve MgCl₂'lü) olmak üzere değişik tespit solüsyonları kullanıldı. Perfüzyon ve immersiyon tespit yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları değerlendirildi. Doku kesitleri; tespit artefaktları, tespit gradienti ve doku komponentlerinde oluşan değişiklikler bakımından incelendi.

Mikroskobik incelemeler sonucunda, perfüzyonun, doku morfolojisini daha iyi koruduğu görüldü. Tespit solüsyonlarıyla yaptığımız karşılaştırmada da 0,1 M kakodilat tamponlu % 4 paraformaldehit perfüzyonuyla iyi sonuçlar elde edildi. Perfüzyon yöntemiyle, tespit solüsyonu hücrelere vasküler sistem aracılığıyla hızlı bir şekilde ulaştığından, dokuda istenmeyen tespit artefaktları ortadan kaldırıldı.

Anahtar kelimeler: Tespit, Perfüzyon, İmmersiyon.

ABSTRACT

Comparative Examination of Perfusion and Immersion Tissue Fixation Methods with Different Tissue Fixatives on The Light Microscope

The aim of this study is to evaluate the histological differences on different tissues using perfusion and immersion fixation procedures with different fixatives. Wistar rats were fixed using perfusion and immersion fixation procedures. Tissue samples were removed from the brain, liver, kidney and ovaries of rats. 10 % formalin in 0.1 M phosphate buffer, 4 % paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer and 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (with CaCl₂ and MgCl₂) were used as fixatives. Advantages and disadvantages of perfusion and immersion fixation methods were evaluated. The sections were evaluated according to the artefacts of fixation, gradient of fixation and variations of tissue components.

Results of microscopical studies revealed that tissue morphology was better preserved by perfusion method. Better results was obtained with 4 % paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer. Because, fixatives move rapidly to the cells through vascular system with perfusion method, artefacts of fixation was successfully removed.

Key Words: Fixation, perfusion and immersion.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimiimde büyük emeği geçen ve tez çalışmamda yardımlarını gördüğüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım hocam Sn. Doç. Dr. Süreyya CEYLAN'a, Sn. Doç. Dr. Hakkı DALÇIK'a, Sn. Yrd. Doç. Dr. Melda YARDIMOĞLU'na ve aileme tez çalışmalarım süresince gösterdikleri anlayıştan ötürü içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	4
2.1. Tespit	4
2.2. Tespitin Amaçları	5
2.3. Tespitteki Kimyasal Mekanizma	5
2.4. Tespiti Etkileyen Faktörler	6
2.5. Aldehitler	10
2.5.1 Gluteraldehit	11
2.5.2. Formaldehit	11
2.5.3. Paraformaldehit	12
2.6. Tespit Yöntemleri	12
2.6.1. İmmersiyonla Tespit	13
2.6.2. Damlatma	13
2.6.3. Enjeksiyon	14
2.6.4. Perfüzyon	14
2.6.4.1. Perfüzyonun Tarihi	16
2.6.4.2. Perfüzyonun Avantajı	16
2.6.4.3. Perfüzyonun Dezavantajı	17
2.6.5. Yeni Geliştirilen Tespit Yöntemleri	18
2.7. Organların Normal Histolojik Yapısı	18
2.7.1. Beyin	18
2.7.2. Böbrek	19
2.7.3. Karaciğer	21
2.7.4. Ovaryum	22
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	24
4. BULGULAR	28
4.1. İmmersiyon ve Perfüzyon Tespit Yöntemlerinin Karşılaştırılması	28
4.1.1. Makroskobik Bulgular	28
4.1.2. Işık Mikroskobik Bulgular	28
4.1.2.1. Formalin Tespit Solusyonuyla Elde Edilen Bulgular	28
4.1.2.2. Paraformaldehit Tespit Solusyonuyla Elde Edilen Bulgular	30
4.1.2.3. Gluteraldehit Tespit Solusyonuyla Elde Edilen Bulgular	31
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR DİZİNİ	44
ÖZGEÇMİŞ	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

FA	: Formaldehit
GA	: Gluteraldehit
PFA	: Paraformaldehit
PT	: Paratiroid
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
Ca ⁺²	: Kalsiyum iyonu
Mg ⁺²	: Mağnezyum iyonu
H&E	: Hematoksilen ve Eozin



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Perfüzyonda kullanılan serum fizyolojik ve tespit solusyonlarının bulunduğu şişe pozisyonları görülmektedir.....27

Şekil 3.2. Perfüzyonla tespit edilmiş bir sıçanda vücudun ve kuyruğun katılaştığı hali görülmektedir.....27

Şekil 3.3. Perfüzyonla tespit edilmiş sıçanın (a), tespit öncesi (b) organlarının durumunu gösteren bir fotoğraf.....27

Şekil 4.1. Formalin tespit solusyonu kullanılarak immersiyon ve perfüzyon ile tespit edilen dokular görülmektedir. Sırasıyla, beyin dokusu a ve b'de; karaciğer dokusu c ve d'de; böbrek dokusu e ve f'de; ovaryum dokusu g ve h'de görülmektedir görülmektedir (H&E; a, b x400;c, d x100;e ,f x400;g, h x100).....32-33

Şekil 4.2. Paraformaldehit tespit solusyonu kullanılarak immersiyon ve perfüzyon ile tespit edilen dokular görülmektedir. Sırasıyla, beyin dokusu a ve b'de; karaciğer dokusu c ve d'de; böbrek dokusu e ve f'de; ovaryum dokusu g ve h'de görülmektedir görülmektedir (H&E; a, b x400;c, d x100;e ,f x400;g, h x100).....34-35

Şekil 4.3. Glutaraldehit tespit solusyonu kullanılarak immersiyon ve perfüzyon ile tespit edilen dokular görülmektedir. Sırasıyla, beyin dokusu a ve b'de; karaciğer dokusu c ve d'de; böbrek dokusu e ve f'de; ovaryum dokusu g ve h'de görülmektedir görülmektedir (H&E; a, b x400;c, d x100;e ,f x400;g, h x100).....36-37

1. GİRİŞ

Histopatolojik çalışmalarda, çoğunlukla dokular mikroskopik incelemeden önce tespit edilirler. Preparatların incelemeye hazırlanması ve teşhis için temel basamaklardan biri tespittir (Hopwood, 1996). Tespit, dokunun bir kimyasalla veya kimyasal karışımıyla (tespit solusyonu) muamele edilerek, hücre metabolizmasının durdurulması ve sonradan yapılacak incelemeler için doku yapısının korunmasıdır (Ross et al. 1995). Katı dokuların tespitinde, immersiyon ve perfüzyon olmak üzere başlıca iki yöntem kullanılmaktadır (Dalçık ve ark. 1995). İmmersiyon tespit yöntemi, dokunun vücuttan alındıktan sonra, tespit solusyonu içerisinde belli bir süre bekletilerek, tespit edilmesidir. Perfüzyon tespit yöntemi, tespit sıvısıyla, vasküler sistem aracılığıyla tüm organın veya tüm vücudun, hızlı bir biçimde tespit edilmesidir (Maunsbach, 1966; Fox et al. 1985; Rostgaard et al. 1993). Tespit işlemiyle, doku yapıları ve kimyasal içeriği canlıdakine en yakın durumda tutulmaya çalışılır (Hopwood, 1996; Dalçık ve ark. 1995). Halen çeşitli araştırmalarda, en uygun tespit yöntemi ve uygun tespit solusyonu üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (Bioulac-Sage et al. 1984; Masson-Pevet et al. 1993; Duelli and Kuschinsky, 1993; Persson and Gatzinsky, 1993; Kanter ve ark. 1996a; Adickes et al. 1997).

Dalton ve ark. tarafından 1950 yılında ortaya çıkarılan ve 1962'de Palay ve ark. tarafından geliştirilen vasküler perfüzyon tespiti, Elektron Mikroskobu için hazırlık aşaması olarak biliniyordu (Thorbal and Trandum-Jensen, 1983; Rostgaard et al. 1993; Dalçık ve ark. 1995). Özellikle, primer fiksatif olarak bifonksiyonel aldehitlerin tanınmasından sonra, vasküleritenin yoğun olduğu dokuların tespiti için, kullanılan bir yöntem oldu (Thorbal and Trandum-Jensen, 1983). Hayat, 1970 yılında akciğer, karaciğer ve böbrek gibi organlar için perfüzyon yöntemini uygulamış ve tespitte vasküler perfüzyonun önemini açıklamıştır (Dalçık ve ark. 1995).

Perfüzyon yöntemi, immersiyon yöntemiyle karşılaştırıldığında farklı bulguların gözlemlendiği birçok çalışma vardır. Bu çalışmalarda, perfüzyon yönteminin, cerrahi biyopsi, ultrastrüktürel analiz ve postmortem açıdan uygun olup olmadığının

araştırılmasının yanısıra, birçok yeni ultrastrüktürel unsur tartışmaya açılmıştır (Roberts et al. 1990; Rostgaard et al. 1993).

Paratiroid (PT) hücrelerinin değişik morfolojileri 1960'ların sonuna doğru, geçirdikleri siklus değişikliklerine bağlanmıştı (Wild et al. 1986; Dalçık ve ark. 1996). Stöchel ve Porte, 1966 yılında; Isono ve ark. (Moreira and Gonçalves, 1985) ve Setoguti, 1977 yılında (Wild et al. 1986; 1987); yine Setoguti ve ark. 1981 yılında (Moreira and Gonçalves, 1985) yaptıkları çalışmalarda çeşitli deney hayvanlarının PT bezlerindeki morfolojik değişikliklerin, uygunsuz tespit sonucu olabileceğini belirtmişlerdir.

Larsson ve ark. 1984'de, çöl farelerinin PT bezlerini perfüzyon tespit yöntemiyle incelemişlerdir (Larsson et al. 1984; Wild and Manser, 1985; Wild et al. 1986; 1987; Kanter et al. 1996). Wild ve Manser 1985 yılında, sıçanların PT bezleri üzerinde perfüzyon tespit yöntemini uygulamışlardır (Wild and Manser, 1985; Wild et al. 1986; 1987; Kanter et al. 1996). Wild ve ark. 1986 yılında, fare ve kedilerin PT bezlerini perfüzyon ve immersiyon yöntemiyle tespit ederek, karşılaştırmışlardır (Wild et al. 1987). Kanter ve ark. 1996 yılında, farklı aldehit kombinasyonlarıyla yaptıkları çalışmada, PT hücre tiplerini, immersiyon ve perfüzyon tespit yöntemiyle, incelemişlerdir (Kanter et al. 1996). Bu çalışmalarda; immersiyon tespit yöntemiyle, PT hücre tipleri görülürken; perfüzyon tespit yöntemiyle, PT hücreleri aynı morfolojide gözlenmiştir (Wild and Manser, 1985; Wild et al. 1986; 1987; Kanter et al. 1996).

Bohman, geliştirilen tespit yöntemlerinin ardından sıçan böbrek medullasının ultrastrüktürünü araştırmıştır. Osvaldo ve Latta, böbrek medullasının ince yapısı hakkında yeterli bilgi olmamasının ana nedenlerinden biri olarak, bu dokunun tespitinde, büyük zorluklarla karşılaşılmasını göstermişlerdir. Çalışmalar bu dokunun ultrastrüktürü ve fonksiyonu arasındaki ilişkinin öneminden kaynaklanmaktadır (Bohman, 1974). Tespitte veya fonksiyonel koşullar sebebiyle oluşan, hücresel farklılıklar değerlendirilerek, normal değişikliklerin yanlış yorumlanma olasılığının azaltılması için en iyi tespit yöntemi araştırılmaktadır (Moreira and Gonçalves, 1985).

Roberts ve ark. fare, sıçan ve köpek olmak üzere çeşitli deney hayvanları üzerinde ilaç denemesi yapmışlardır. Toksikite ve yeni farmakolojik ajanların

değerlendirilmesi için uygun doku örneklerinin elde edilmesini sağlayan tespit yöntemlerini araştırmışlardır. Bu nedenle perfüzyon ve immersiyon tespit yöntemiyle bu hayvanlardan alınan karaciğer ve akciğer dokularını incelemişlerdir. Perfüzyon tespit yöntemiyle organlardaki patolojik değişiklikleri belirgin olarak gözlemişlerdir (Roberts et al.1990).

Dalçık ve ark. perfüzyon ve immersiyon tespit yöntemiyle beyin, hipofiz, karaciğer ve böbrek dokularını incelemişlerdir. Perfüzyon yöntemi ve immersiyonla tespit yöntemleri arasındaki histolojik farklılıkları araştırmışlardır. Perfüzyonla tespit edilen dokularda, iyi korunmuş hücre morfolojisi ve temiz bir görüntü gözlemişlerdir (Dalçık ve ark. 1995).

Çeşitli araştırmacılar perfüzyon yöntemini değişik tespit solusyonlarıyla, çeşitli organlarda çalışmışlardır. Rostgaard ve ark. fluorokarbon içeren gluteraldehit (GA) kökenli tespit solusyonu kullanmışlardır. Testis, iç kulak, iskelet kası, kapiller ve böbrek gibi organları incelemişlerdir (Rostgaard et al. 1993). Epstein ve Rohent, maymun gözünde normal ve artan intraoküler basınçta, katyonize ferritin perfüzyonu sonrası, Schlemm kanalı ve komşu alanların endotel yüzeyinin morfolojik görünüşünü incelemişlerdir (Epstein and Rohent, 1991). Ciuera ve Gil, perfüzyon yöntemiyle fikse edilen tavşan akciğerinin üç zonundaki, kapillerlerin morfometrisini incelemişlerdir (Ciuera and Gil, 1996). Bu araştırmacılar elde ettikleri sonuçları, daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırmışlardır. Perfüzyon tespit yöntemiyle, kapiller lümeninin ve diğer kanalların kollabe olma durumunun ortadan kalkmasıyla, sıvı akışının rotası izlenmiştir (Epstein and Rohent, 1991; Ciuera and Gil, 1996)

Bu çalışmanın amacı, değişik doku tespit solusyonlarıyla, değişik dokularda vasküler perfüzyon ve immersiyonla tespit yöntemi arasındaki, histolojik farklılıkları açığa çıkarmaktır. Bu amaçla, tespit yöntemleri ve tespit solusyonları nedeniyle oluşan, hücre farklılıklarını değerlendirmeyi planladık. Bu çalışmada, ilk olarak, aynı tespit solusyonu kullanarak immersiyonla tespit edilen dokularla, perfüzyonla tespit edilen dokuların histolojisini karşılaştırdık. İkinci olarak da dokuların histolojisinde değişik tespit solusyonlarının etkisini araştırdık ve değerlendirdik.

2. GENEL BİLGİ VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

2.1. Tespit

Dokuların ışık mikroskopik incelenebilmesi için çeşitli işlemlerden geçmesi gerekir (Kahveci ve ark. 1996). Dokuların enzimlerce (otolizis) veya bakterilerce yıkımını önlemek ve fizyolojik yapıyı korumak için, organ parçaları usulüne uygun olarak deney hayvanının vücudundan alınmasını takiben mümkün olan en kısa süre içinde, hemen kimyasal işlem uygulanmalıdır. Bu işleme tespit (fixation) denmektedir. Genelde tespit, çapraz bağlar oluşturan ajanlarla dokuların korunması veya bu maddeler kullanılarak perfüze edilmesinden oluşur (Junqueira et al. 1992). Tespit, bir kimyasalla veya kimyasalların karışımıyla, hücre metabolizmasının durdurulması ve sonradan yapılacak incelemeler için doku yapısının korunmasıdır (Ross et al. 1995).

Tespit solusyonları, XIX. yüzyılın ikinci yarısından itibaren sistematik olarak araştırılmaya başlandı. Birbirinden farkı çok az olan birçok tespit solusyonu üretildi ve bu alanda karışıklık yaşanmaya başladı. Baker, 1960 yılında bu karışıklığa düzen getirdi. Karışımları ilk bulan kişinin adıyla anmayı gelenekleştirdi. Baker; koagülant tespit solusyonları ve nonkoagülant tespit solusyonları olmak üzere iki gruptan oluşan bir sınıflandırma yaptı.

En son sınıflandırma ise;

1-Aldehitler

Formaldehit (FA), glutaraldehit (GA), akrolein, glioksal

2-Oksitleyici ajanlar

Osmium tetroksit, potasyum permanganat, potasyum dikromat

3-Protein-denatüre eden ajanlar

Asetik asit, metil alkol, etil alkol

4-Diğer çapraz-bağlanan ajanlar

Karbodiimid'ler

5-Fiziksel

Sıcaklık, Mikrodalga

6-Diğerleri

Merkürük klorid, pikrik asit, aldehit içermeyen fiksatiflerdir (Hopwood, 1996).

2.2. Tespitin Amaçları

Doku canlılığını yitirir yitirmez, hücrelerde olumsuz değişiklikler başlar. Bakteriler tarafından, hücre yıkımı gerçekleşir ve hücreler içerdikleri enzimler nedeniyle otolizis ile, yıkılmaya başlarlar (Humason, 1979). Otolizis süreci, su kaybı nedeniyle oluşan osmotik basınç heterojenitesinden kaynaklanan, hücre içi ve dışı arasında enzimlerin ve suyun transportuyla oluşan, anaerobik bozulmadan ibarettir (Kimura and Abe, 1994). Tespit bakteriyel saldırı ve otolizis olayı önlenir (Ross et al. 1995). Tespit solusyonları, koruyucu, otolitik değişiklikleri ve bakteriyel gelişmeyi önleyici olarak hareket eder (Leeson et al. 1985).

Dokunun şekil ve hacminin korunmasıdır (Humason, 1979; Ross et al. 1995). Dokunun tespit işleminden sonra, geçireceği işlemlerde (alkol ve sıcak parafin gibi sıvılardan geçirildiğinde) bozulmadan ve daralmadan kalabilmesi için gereklidir (Humason, 1979).

Materyalin temiz bir boyamaya izin vermesini sağlamaktır (Humason, 1979; Ross et al. 1995).

2.3. Tespitteki Kimyasal Mekanizma

Proteinlerle tespit solusyonunun ilişkisi: Proteinlerle tespit solusyonu birbiriyle çapraz bağ yaparak *invivo* ilişkilerin korunduğu bir jel yapı oluştururlar. Tespit solusyonları çözünebilir proteinleri çözünemeyen proteinlere dönüştürür ve böylece çeşitli işlemlere izin veren mekanik bir güç kazanırlar.

Nükleik asitlerle tespit solusyonunun ilişkisi: Dokuların tespiti sırasında Deoksiribonükleik asit (DNA) ve Ribonükleik asit (RNA)'da fizikokimyasal değişiklikler oluşur. Nükleik asitlerin tespitinde hem dokuların histopatolojik görünümü hem de kantitatif sitofotometrik ölçümü önemlidir. Nükleik asit tespitinde etanol ve metanol yaygın olarak kullanılır. Bu fiksatiflerle DNA'nın büyük bir kısmı çöker.

Lipidlerle tespit solusyonunun ilişkisi: Lipidler, Proteinlere göre biyokimyasal olarak daha zor analiz edilir. Klasik histopatolojik inceleme teknikleri ile lipidlerin büyük bir kısmı dokudan ayrılır. Lipidleri gösterirken *cryostat* veya *frozen section* kullanılmalıdır. Fosfolipidler amino grubu taşıdıkları için Fosfotidil etanol amin olarak tespit edilir. FA doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girer, çift bağla bağlanır ve 1:3 glikol ile 1:3 dioksan oluşur. Civaklorür özellikle kompleks yapılı doymamış lipidlerle reaksiyona girer. Civaklorür, plazmalojen asetal fosfatidler olarak bilinen lipidlerle de reaksiyona girer.

Karbonhidratlarla tespit solusyonunun ilişkisi: Karbonhidratlar için; ultrastrüktürel açıdan tannik asid ve cetyl pyridinium kullanışlı bulunmaktadır. Sıvı solusyonda (% 60-80), glikojen kaybı yüksek olabilir. Glikojen tespiti için alkol içeren tespit solusyonları, tavsiye edilmektedir. Glikozaminoglikanlar gibi birçok su içeren muközmadde işlem sırasında yıkılır.

2.4. Tespiti Etkileyen Faktörler

Hidrojen iyon konsantrasyonu ve tamponlar: İyi bir tespit için pH 6-8 arasında olmalıdır. Bunun dışındaki pH değerleri zarar vericidir. Agonal faz sırasında anoksiye bağlı olarak hücre içi pH düşer (Hopwood, 1996). Doku yapısının korunması, aşırı pH'larda (2 ve 11) bozular, pH 6 ve 8 çok az değişikliğe sebep olur (Schultz and Karlsson, 1965).

Tespit pH'ı, amaca göre de değişebilir. Örneğin, gastrik mukoza için optimum korunma pH:5.5'de sağlanır. Benzer olarak, katekolaminler için kromaffin

reaksiyonunda, adrenalin ve noradrenalin depo granüllerinin en iyi korunması, pH'ı 6.5 olan formalinde sağlanır. Tersiyer ve quaternar yapılı proteinlerin çoğu, oldukça dar bir pH aralığında (6-8) sabit kalır. Asetik asit ilavesiyle protein yapısı bozulur, sonuçta presipitasyon olur. Tespitte yaygın olarak kullanılan, fosfat, s-kolloidin, veronal asetat, bikarbonat, tris ve kakodilat tamponlarıdır.

Tampon seçerken, tamponla fiksatifin reaksiyona girmemesine ve tamponun fiksatifin gücünü azaltmamasına dikkat edilmelidir. Örneğin barbitüratlar ve tris, aldehitler ile reaksiyona girer. Eğer histokimyasal bir çalışma yapılacaksa tamponların, enzimleri inhibe etmemesine dikkat edilir. Örneğin, Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimini, fosfat inhibe eder.

Sıcaklık: Cerrahi parçalar oda ısısında, elektron mikroskobu ve histokimyasal incelemeler için kullanılacak materyal "0" ile +4 °C'de fikse edilmelidir. Tespitin düşük ısılarda hücre elemanlarına daha iyi nüfuz edebileceğine dair kanıtlar vardır. 60°C'ye ısıtılmış formalin, çok acil biopsi materyalinin tespiti için kullanılır. Fakat, doku hasarı riski artar (Hopwood, 1996). Tespit, oda sıcaklığında veya büyük örneklerde +4 °C'de uygulanabilir. Tespit sıvısına yerleştirilen doku, buz kristalleri şeklini bozacağı için dondurulmamalıdır. Örn. % 10 formalin solusyonunun donma noktası -3 °C'dir (Rosai, 1996).

Penetrasyon: İyi bir tespit elde etmek için doku parçaları küçük ve ince olmalıdır. Fiksatifin penetrasyonu, reaksiyonun geri dönebilirliğine ve doku komponentleri ile reaksiyona girebilme oranına da bağlıdır. Örneğin GA ve acrolein hızlı, glioksal ve α -hidroksiadipaldehyd yavaş reaksiyon verir.

Osmolarite: Çalışmalarda tampon ilave edilirken, solusyonun osmotik basıncına dikkat edilmelidir. Yüksek hipertonic solusyonlar, hücre daralmasına sebep olur. İotonik solusyonlar da, hipotonik solusyonlar gibi hafif bir şişme ve kötü bir tespitle sonuçlanır. Elektron mikroskobisinde düşük hipertonic solusyon kullanımıyla iyi sonuçlar alınır (400-450 mOsm; isotonik solusyon 340 mOsm). Tespit solusyonlarına yapılan çeşitli ilaveler, ekstrasellüler alan büyüklüğünü etkileyebilir. Bohman ve Maunsbach (1970) dekstran veya polivinyl pyrrolidone olmadan perfüzyonla tespit edilen ekzokrin pankreasın, geniş ekstrasellüler alanlara sahip olduğunu göstermiş. Bu maddeler tespit solusyonuna eklendiğinde ise ekstrasellüler

alan azalması, gözlenmiştir. Tespit solusyonuna sodyum klorid eklenerek tespit edilen pankreas, büyük daralma artefaktları göstermiştir (Hopwood, 1996). Genelde sıkı dokular, osmolaritedeki değişikliklerden az yoğun dokulardan, daha az etkilenirler (Robinson and Gray, 1996).

Fiksatif konsantrasyonu: Fiksatiflerin kullandıkları konsantrasyonlarda, etkinlik, çözünürlük ve maliyetleri göz önünde tutulur. Tampon varlığı fiksatifin etkin konsantrasyonunda düşmeye yol açar. Çünkü aldehitlerin polimerizasyon yapmasını kolaylaştırır. Dokuların boyanması da kullanılan tespit solusyonunun konsantrasyonuna bağlı olarak değişir (Hopwood, 1996).

Tespit süresi: Kullanılan çoğu tespit sıvısının tespit hızı, yaklaşık 1 mm/saat'dir. Bu nedenle çoğu materyal için saatler süren tespit süresi gerektirir (Rosai, 1996). Fakat, FA'in uzayan tespit süresinin dokuda, daralmaya ve hasara yol açtığı bilinmektedir. Aldehitlerle uzun tespit süresi, enzimlerin aktivitesini inhibe eder. Oksidatif fiksatiflerle tespit süresinin uzaması, dokuları parçalar. Bu duruma, peptid kaybı ve proteinlerin oksidatif parçalanmasının yol açtığı düşünülmektedir.

Tespit solusyonuna eklenen maddeler: Tespit solusyonları genelde tespit ajanı, tampon ve sudan oluşur. Bazı tespit solusyonları, bazı fonksiyonları yerine getirmek için planlanan çeşitli maddeler taşır. Bazı tuzların denatüre edici etkileri olmakla beraber amonyum sülfat, potasyum dihidrojen fosfat gibi tuzlar, proteinleri kuvvetlice stabilize eder (Hopwood, 1996). Lillie (1954) formalinin nötralitesini koruyan, fosfat tamponu gibi etki yapan, kalsiyum asetat'ı kullanmıştır. Baker (1944), kalsiyum (Ca^{+2}) ve kadmiyum iyonlarının eklenmesiyle, fosfolipidlerin proteinler veya musinlerle ortaklaşa bir kompleks oluşturması sayesinde, korunduğunu göstermiştir. Wolman ve Weiner (1965), Ca^{+2} iyonlarının, lipidlerin çözünürlüğünü azalttığını; sodyum gibi monovalent katyonların yüksek konsantrasyonlarının ise arttırdığını göstermişlerdir (High and Lake, 1996). Palay ve ark. (1962) ve Slauterback (1963) tespit solusyonuna Ca^{+2} ve magnezyum (Mg^{+2}) gibi divalent katyonların eklenmesini tavsiye etmiştir. Ca^{+2} iyonlarının eklenmesinin, şişmeyi önlediği belirtilmiştir (Robinson and Gray, 1996). Kalsiyum klorid ve FA'in her ikisi de ortama salınan ve dokuda kalan fosfolipidleri etkiler (Roosmond, 1969).

Hacim Değişiklikleri: Tespitte hacim değişiklikleri yaygındır ve çeşitli faktörlere bağlıdır. Bu faktörler solunumun durması, membran geçirgenlik değişiklikleri, membranlar arası iyon transportudur. Bazı hücreler arası maddeler (kollagen gibi) tespit edilince şişer. Dehidratasyon ve gömme işlemleri de hacimde oldukça fazla değişiklikler yapar. FA ile tespit edilip, parafin bloğa gömülen dokularda % 33 oranında çekilme olur. Çekirdek, dondurulmuş kesitlerde, klasik takibe göre daha büyüktür. İdeal ortam başarılamadığı için bu değişiklikler göz önüne alınmaz.

Agonal Değişiklikler: İdeal olarak, incelenecek doku hemen canlı ortamından alınıp, tespit solusyonuna konulmalıdır. Birinci durumda, organ vücuttan cerrahi olarak alınır. Doku tespit solusyonuna bırakılmadan önce anoksik dönem başlar. İkinci durumda, organ tespit solusyonuna atıldıktan sonra, yeterli konsantrasyonlarının organa infiltre olmasına kadar sürer. Anoksi, elektron mikroskobik incelemede, 10 dk içinde önemli değişmeye neden olabilir (Hopwood, 1996). Bazı dokulardaki solunumun oranı, kan akışı engellendikten sonra 1 dk'dan daha az sürede, şiddetli hipoksi oluşumu için yeterlidir (Johnson, 1987). Bloğun ortasındaki hücrelerde ikinci durum agonal değişiklikler, periferden daha geç olur. Agonal değişiklikler, oda ısısında soğuğa göre daha hızlı gerçekleşir.

Çok düşük konsantrasyonlarda, hücreler bazı fiksatifleri metabolize edebilir (Örn. aldehit dehidrogenazla, FA). Bu nedenle düşük konsantrasyonlu fiksatifler, agonal aralığın uzamasına neden olabilir.

Tespit Artefaktları: Tespit, artefaktları önlemek için yapılır. Fakat tespitin kendisi de artefakt doğurur. Birinci durum, tespit edilemeyen materyalin difüzyonu ile ilgilidir. Organellerin yerlerinden farklı yerlerde lokalizasyonu, yanlış sonuçlara neden olur. Örn. [⁵⁹Fe] ile işaretlenmiş hemoglobin, GA penetrasyonu sırasında sabitlenmeyen materyal olan [⁵⁹Fe]-hemoglobin, bloğun periferinde çıkmıştır. Bu olay, büyük moleküllerin tespit sürecinde yayılma kabiliyetini gösterir. Aynı zamanda küçük doku parçalarının gerekliliğinin altını çizer. İkinci durum, materyale tespit solusyonunun etki etmesinden sonraki adımdır. Küçük moleküllerle, yani inorganik maddeler ve enzim kofaktörleri ile ilgilidir. Örn. Biyolojik aminler, adrenal medullada, nöronlarda ve plateletlerde membrana bağlı granüller olarak depolanır. Tespit, bunları membrana bağlayan proteini bozar. Bu protein, chromogranin'dir. biyolojik aminler, bir

şekilde membrana tutulamazlarsa dokudan kaybolurlar.Üçüncü durum, dokuya dışardan gelen materyalin tespitidir. Bu artefakt, amino asit, şeker, timidin ve üridin'in [³H] ile işaretlendiği, otoradyografi tekniğinde görülebilir. Dördüncü durum, tespitle dokuda kimyasal değişikliklerin ortaya çıkabilmesidir. Örn. GA, dokuya orjinalde olmayan karbonil grupları ekler. Bu durum schiff reaksiyonunu pozitifleştirir.

2.5. Aldehitler

Reaksiyon Mekanizması: Aldehitlerle proteinler arasında çapraz bağ oluşur. Özellikle bazik amino asitlerden lizin (lysine) ile reaksiyon oluşur. GA ile %40-60 lizin rezidüsü reaksiyona girer. FA metil gruplarının, metilen bağlarıyla kondansasyon yapar. Diğer aldehitlerde schiff bazlarında olduğu gibi bir bağlantı mevcuttur. Bu labil olup sekonder bir kondansasyon ile stabil hale geçer. Alifatik aldehitlerle proteinler arasındaki stabilizasyon etkisi amino-amid veya guanidil molekülleri arasında intra ve inter bağlantılarla olur. Aldehitler, nükleoprotein ve bazı karbonhidratları da stabilize ederler, fakat lipidleri ve fosfolipidleri fikse edemezler (Robinson and Gray, 1996).

Aldehitlerle Tespite Etkili Faktörler: Aldehitler ile proteinler arasındaki reaksiyon pH'a bağlıdır. Yüksek pH'da (bazik) reaksiyon daha hızlıdır. FA ile reaksiyon, ilk 24 saatin üstünde, suyla geri dönüşlüdür. GA ile, reaksiyon hızlı ve geri dönüşsüzdür.

Aldehitlerin Dokuya etkileri: Bazik amino asitler ile reaksiyona girdiği için isoelektrik noktada değişim olur. İsoelektrik noktaya etki GA ile daha belirgindir. Antijenik maddelere etkide, GA çabuk etki ettiği için immün aktivite ve enzimler kaybolur. İmmün çalışmalarda FA ve α hidroksiadipaldehit kullanılır. Bunlar daha az antijen kaybı yaparlar. Enzim aktivitesini korumada, kloralhidrat ve sakkaroz ilavesi etkili olur. Çapraz bağlar protein vizkositesini değiştirir. Dolayısıyla, mekanik dayanıklılığı da değiştirir. Aynı çapraz bağlar polimerizasyon yapar ve moleküler ağırlık artar (Hopwood, 1996). Aldehitlerle, sitoplazmik matriksin daralması minimumdur.

2.5.1. Glutaraldehit

GA, tespit için en yaygın kullanılan, molekül ağırlığı FA'in üç misli olan bir dialdehittir (Fox et al. 1985). GA, çapraz bağlanma ile tespiti sağlamaktadır (Junqueira et al. 1993). İnce yapının korunması bakımından diğer aldehitlere göre üstün olduğuna inanılır. GA, Sabatini ve ark. tarafından tanıtıldı. Genelde kakodilat tamponlu % 4'lük solusyonu tavsiye edilir. Yıllardır, çeşitli konsantrasyonlarda ve çeşitli tamponlarla kullanılmaktadır. Tamponun seçimi araştırmanın tipine ve kişinin tercihinine bağlıdır. Rutin olarak, % 2.5-4 oranındaki konsantrasyonlarda kullanılır.

Arsenik içeren kakodilat tamponu, bakteriyel gelişimi önler. Kakodilat tamponu fosfat tamponundan daha uygundur. Fakat birçok araştırmacı, fosfat tamponunu güvenliği açısından tercih eder. Bununla beraber, bazı dokularda fosfat tamponları artefaktlara neden olabilir. TRIS-HCl gibi veronal asetat tamponları ve amin içeren tamponlar aldehit fiksatiflerle kullanılmaz. Bu tamponlar, aldehitlerle reaksiyona girerler ve tamponlama kapasitesi ortadan kalkar.

GA stok solusyonlarının temizliği önemlidir % 25 ve yukarı konsantrasyonlarda olduğunda, oto-oksidasyona maruz kalır. Bu reaksiyon ürünü glutarik asit tespit kalitesini etkiler. Stok solusyonlar, glutarik asiti dağıtmak için kullanmadan önce iyice çalkalanır. Stok solusyonlar baryum kloridle çalkalanarak bir dereceye kadar temizlenebilir. Oluşan baryum glutamat çökeltisi, santrifüjle aldehit solusyonundan ayrılabilir (Robinson and Gray, 1996).

Ayrıca; son yıllarda oksijenin, organik materyal GA ile tespit edildiğinde tüketildiğine değinilmektedir (Rostgaard et al., 1993; Rostgaard and Qvortrup, 1997). Doku primer aminleri için oksidatif kimya GA'in eklenmesiyle artar (Johnson, 1987).

2.5.2 Formaldehit

İlk olarak, Ferdinand Blum, FA'in antiseptik özelliğini test etti. Bu araştırmanın tesadüfi bir bulgusu, FA'in tespit edici özelliğidir. FA'in, alkolle tespit olan dokulardan

farklı olarak, dokuların yalnız marjinalinde daralma ve bozulma oluşturduğu gözlenmiştir. Blum, böylece histopatoloji teknolojisinin gelişmesindeki büyük bir problemi çözdü. Sulu FA, eldesi kolay ve ucuz bir fiksatifdir, çeşitli koşullar altında çalışılır, kararlıdır ve hemen hemen her dokuyla kullanılabilir. FA'in en büyük yararlarından biri, geniş bir konsantrasyon aralığında etkin olmasıdır. Konsantrasyondaki 2 ila 3 kat değişiklikler aynı tespit özelliklerine sahiptir. % 10 veya % 20 formalin ile tespit aynı sonucu verir (Adickes, 1997). FA koagülasyon yapmaz. Böylece tespit olan dokular, koagüle olmuş materyal yığınları içermez. Hücresel yapı hakkında da yanlış yorum yapılması olasılığı ortadan kalkar (Fox et al. 1985). FA ve GA'in doku proteinlerindeki amin grupları (NH₂) ile reaksiyona girdiği bilinmektedir (Junqueira et al. 1993). FA tespitinin özel bir karakteristiği, hücre membranlarının vezikülasyonudur. Veziküller, hücre protoplazmasının bir kısmını içerir. Vezikülasyon için mekanizma, metilen glikol'ün bulunması nedeniyle olabilir (Fox et al. 1985). Ayrıntılı yapının korunma kalitesi, doku yapıları arasında oluşan çapraz bağların miktarıyla sınırlıdır. Enzim aktivitesinin korunması, oluşan çapraz bağların miktarı ve hızıyla ters orantılıdır.

2.5.3. Paraformaldehit

Robertson ve ark. (1963), methanolsüz FA yani paraformaldehit (PFA) ile enzim aktivitesi kaybı olmadan, korunmanın sağlandığını bulmuşlardır. Bu aldehit kökenli tespit ajanı, elektronsitokimyasında ve elektronimmünositokimyasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Robinson and Gray, 1996).

2.6. Tespit Yöntemleri

Doku tespitinin 4 temel şekli vardır:

1) İmmersiyon

- 2) Damlatma
- 3) Enjeksiyon
- 4) Perfüzyon
- 5) Yeni geliştirilen tespit yöntemleri (Rostgaard et al., 1993)

2.6.1. İmmersiyonla tespit:

Ultrastrüktürel araştırmalar için doku örnekleri genelde, aldehitli bir tespit sıvısında, immersiyon tespitiyle incelenir (Roberts et al. 1990). Doku, çapraz bağlar yapan veya proteinleri çökelten ve yıkılmayı önleyen koruyucu bir solusyon (fixative) içine batırılır (Stevens and Lowe, 1993). İmmersiyonun sözlük anlamı dalma, batma, daldırmadır. Sözlük anlamının da ifade ettiği gibi, doku tespit sıvısı içinde belli bir süre bekletilerek, tespit edilir. İmmersiyonla tespit işleminin başlıca avantajı kolaylığıdır. Hücrelerin tespiti ve vücuttan dokunun alınması arasındaki süre, en önemli dezavantajdır. Dokular ölümden sonra mümkün olan en kısa sürede fiksatiye konmalıdır (Humason, 1979). Ultrastrüktürel post-mortem değişiklikler oluşur. Örneğin, mitokondrianın şişmesi, glikojen tüketimi, düz kas hücrelerinin aşırı kontraksiyonu ve karanlık ve aydınlık artefakt hücrelerin gelişimi. Ek olarak, fiksatifin dokunun daha derin kısımlarına doğru, daha yavaş penetrasyonu sonucu, hücrelerin yeterli korunamamasından dolayı, artefakt gradienti oluşur (Rostgaard et al. 1993).

2.6.2. Damlatma

Damlatma yönteminin başlıca avantajı, tespit sıvısı hücrelere ulaşıncaya kadar, normal kan akışının, sürmesidir. Sonuçta hücreler, hipoksiden zarar görmez ve normal metabolizmaları devam eder. Tespit solusyonu, biyopsinin yüzeyini kaplar. Yüzeysel verilen tespit solusyonu, dokunun dış yüzeyinde çok ince bir bölüme kadar penetre olabilir. Dezavantajı, dokunun ince bir yüzey tabakası veya çok küçük bir kısmının,

tespit edilebilmesidir. Bu nedenle doku tespiti, daha sonra immesiyonla devam ettirilmelidir (Rostgaard et al. 1993).

2.6.3. Enjeksiyon

Post mortem materyale, birçok olumsuz faktör etki eder. Dokuda hastalık sürecinden farklı değişiklikler olur. Vücut, morg veya buzdolabına nakledilene kadar oda ısısında kalır. Bu sürecin uzunluğu artefaktları arttırır. Bu artefaktları azaltmak için karaciğer ve böbrek gibi solid organlarda iğne biyopsisi tekniği geliştirilmiştir (Hopwood, 1996). Doku parçası, tespit solusyonu içeren hipodermik bir şırınga yardımıyla, biyopsinin üst bölgesine batırılarak tespit edilir. Enjeksiyon sonrası hemen enjeksiyon alanına yakın dokunun küçük bir kısmı alınır ve aynı fiksatifte tespite devam edilir (Humason, 1979).

2.6.4. Perfüzyon

Birçok organ, bu yöntemle uygun şekilde tespit edilmektedir. Çünkü, perfüzyon sıvısı hücrelere kadar taşınabilmektedir. Perfüzyon için özel teçizat, aortaya uygun bir kanül ve perfüzyon şişesini kanüle bağlayan lastik boruları içerir. Kullanılan kanül istenilen hızlı akışa izin vermesi için mümkün olduğu kadar geniş olmalıdır. Eğer yalnız baş kısmı tespit ediliyorsa, thorasik arter kapatılmalıdır. Eğer beyin ve spinal kord tespit ediliyorsa, intestinal damarlar kapatılmalıdır. Perfüzyon şişesi dolu olduğunda, hava kabarcıklarından kurtarmak için, lastik boru ve kanülden sıvı akışına izin verilir. Çünkü; hava kabarcığı, perfüzyonu engelleyecektir. Artefaktlara neden olacağından kan basıncını aşan basınca izin verilmemelidir. Eğer karaciğer perfüze ediliyorsa, özellikle penetrasyonu yavaş olan GA ile perfüzyon, portal ven ile yapılmalıdır (Humason, 1979). Yumuşaklığı nedeniyle beynin, parçalara

ayrılmadan önce tespit edilmesi gereklidir. Bu nedenle beynin, basiller ve cerebral arterler sayesinde perfüzyonu tercih edilir (Daws, 1996).

Son zamanlarda, otopsinin santral sinir sistemi kısmında, tespiti hızlandırmak ve zamandan tasarruf için perfüzyon yöntemi kullanılmaktadır. Organ perfüzyonu, kalp ve akciğer için pratiktir. Fakat, geçmiş yıllarda otopside beyin perfüzyonuyla ilgili referans mevcut değildir. Buna rağmen, geçmişte FA ile beyin perfüzyonu sık sık uygulanmıştır. Lillie (1954) histolojik teknikler kitabında perfüzyonun öneminden bahsetmektedir. Nekroskopide beyin perfüzyonu 1960'larda, Mayo Clinic ve Washington University-Barnes Hospital gibi birçok kuruluşta uygulanıyordu. Ayrıca deney hayvanlarının FA-kökenli beyin perfüzyonu, 1960 ve 1970'lerde rutin olarak uygulanıyordu (Adickes, 1997).

Son yıllarda, perfüzyonun etkilerinin değerlendirildiği ve immersiyonla karşılaştırıldığı değişik çalışmalar mevcuttur. Örn. Garman, yetersiz tespit edildiğinde santral sinir sisteminde görülen artefakt tiplerini incelemiştir (Garman, 1990). Carrasco ve ark. dalak kordonlarının ultrastruktürünü perfüzyon ve immersiyon tespit yöntemleriyle ışık ve elektron mikroskopik düzeyde incelemiştir (Carrasco et al. 1995). Kakoi ve ark. formalin ve GA ile immersiyon ve perfüzyon tespit yöntemlerini kullanarak sıçan submandibular bezini tespit etmişlerdir. Mukoz hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikleri incelemiştir (Kakoi et al. 1996). Sıçan beyinlerini % 10 nötral formalin perfüzyon ve immersiyonunu kullanarak tespit etmiştir. Vassy ve ark. sıçan karaciğerinde albumin ve transferrin lokalizasyonuna tespit işleminin etkisini; ışık ve elektron mikroskopik seviyede indirekt immünperoksidaz tekniği kullanarak araştırmışlardır. Aynı konsantrasyondaki tespit solusyonuyla perfüzyon ve immersiyon tespit yöntemiyle elde edilen işaretlenmeleri karşılaştırmışlardır (Vassy et al. 1997). Yu ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada da, immersiyon ve perfüzyon yöntemleri incelenmiştir. Glomerül kapiller duvarında, farklı perfüzyon basınçlarının oluşturduğu ultrastrüktürel değişiklikleri araştırmışlardır (Yu et al., 1997).

2.6.4.1. Perfüzyonun tarihi

Elektron mikroskobu için bir hazırlık metodu olarak osmium tetroksit ile kullanılan vasküler perfüzyon tespiti, Dalton ve ark. tarafından 1950 yılında ortaya çıkarıldı ve Palay ve ark. tarafından 1962 yılında geliştirildi. Elektron mikroskobu için primer bir fiksatif olarak GA'nin kullanımından sonra (Sabatini et al. 1963); Schultz ve Karlsson, tarafından bulunan GA perfüzyon tespiti, damarlı dokuların tespiti için seçilen yöntem oldu (Schultz and Karlsson, 1965). Hayat, 1981 yılında vasküler perfüzyon tespiti için cihaz ve teknikler konusunda çalışmalar yapmıştır (Rostgaard et al. 1993).

2.6.4.2. Perfüzyonun avantajı

Perfüzyon tespit yöntemi, teşhis için geçen süreyi kısaltır. Otopsinin santral sinir sistemi kısmında, tespiti hızlandırmak ve zamandan tasarruf için perfüzyon yöntemi kullanılmaktadır (Adickes, 1997). Plasentanın perfüzyon ile tespiti, numunenin hızlı makroskobik ve histolojik incelenmesine izin verir (Jaunioux et al., 1991)

Tespitin vasküler sistem yoluyla tüm organlara ve dokulara ulaşması, böylece tüm hücre ve dokuların eşit şekilde incelenmesidir (Maunsbach, 1965; Rostgaard et al. 1993). Dokunun yalnızca çok küçük hacimleri, elektron mikroskobuyla çalışılabilir, bu nedenle incelenen kısmın dokunun diğer kısımlarıyla eşit şekilde tespit edilmiş olması, çok önemlidir. Rostgaard ve ark. perfüzyon yönteminin tespit gradienti ve agonal (anoksik) değişiklikler gösteren hücreleri (örn. parçalanmış mitokondria, endoplazmik retikulum vezikülasyonu, şişmiş hücreler ve parçalanmış hücre membranları) içermediğini belirtmişlerdir. Ayrıca, bu yeni tekniğin birçok yeni ultrastrüktürel unsurun (örn. testis, iç kulak, iskelet kası, böbrek ve kapillerler) incelenmesine imkan tanıdığı belirtilmektedir (Rostgaard et al. 1993).

Perfüzyon tekniği, materyalin kollabe olmasını önleyerek canlı haline yakın morfolojik durumunu alması bakımından önemlidir. Örn. kalpde boşalan kanın yerini tespit sıvısı alır (Daws, 1996). Yine gözde, değişik perfüzyon basınçlarıyla organın yapısı incelenmiştir. Rosenquist ve ark., normal insan kadavra gözünde değişik perfüzyon basınçları kullanarak, damarların çapını incelemişlerdir (Rosenquist et al. 1989). Hulzen ve Johnson, maymun gözünde perfüzyon ve immersiyonla tespit edilen juxtakanalikular doku ve schlemm kanalını incelemişlerdir. Böylece gözün, fizyolojik sıvı akış yolları hakkında bilgi edinilmiştir (Hulzen and Johnson, 1996). İnsan plasentalarında perfüzyon yöntemi, kullanılan basınca bağlı olarak dolaşım sistemini belirginleştirir. Böylece insan plasentası için, dolaşımın sisteminin yapısı incelenmiştir (Kertshanska et al., 1997).

Perfüzyon, otopside santral sinir sistemine uygulandığında dokunun parçalara ayrılması ve kesilmesi için yeterli sertliktedir. Otopsi işleminde, beyinin hızlı fiksasyonu ile postmortemi önlemesi sonucu detaylı çalışılmasına izin verir (Adickes, 1997).

Perfüzyon, mekanik bozukluklara duyarlı, ince, yumuşak dokuların (örn. akciğer) korunmasında oldukça kullanışlı bulunmaktadır. Toksikite ve yeni farmasötik ajanların değerlendirilmesi sırasında, optimum olarak fikse olan hayvan dokularının hazırlanması için uygun görülmektedir (Roberts et al. 1990).

Perfüzyon yöntemiyle tespit edilen hayvan bir doku bankası gibi hizmet eder, tüm vücuttan iyi fikse olmuş doku materyali sağlanabilir. Vücudun tüm organlarından ve bir seferde dokuların çalışılmasına izin verir (Rostgaard et al. 1993).

2.6.4.3. Perfüzyonun Dezavantajı

Perfüzyon tespiti için olabilecek çeşitli sakıncalar vardır. İlk olarak ekstra iş veya daha ağır bir işlemin sorumluluğunu yüklenmek vardır (Adickes, 1997). Dikkat, deneyim ve nispeten özel donanım gerektiren bir tekniktir (Rostgaard et al. 1993).

Diğer bir sakınca, hemorrhage gibi, kitle lezyonlarında (mass lesion) yararının olamayabilmesidir. Fakat, hemorrhage'in yıkanması veya temizlenmesinden sonra, perfüze edilebilir.

Perfüzyonla tespit yöntemi, hayvan ve insanlardan alınan cerrahi biyopsiler için avantajlı olarak kullanılabilir. Fakat; tümör gibi bazı patolojik doku alanlarının, sınırlı vaskülarizasyon sonucu perfüze olmadan kalabileceği unutulmamalıdır (Roberts et al. 1990).

2.6.5. Yeni Geliştirilen Tespit Yöntemleri

Artefaktları önlemek ve dokuların en iyi şekilde korunması için yeni geliştirilen çeşitli histolojik işlemler denenmektedir. Örn. Bioulac-Sage ve ark. karaciğer biyopsilerini iki fikri modifiye ederek kullandıkları Pasteur pipeti adındaki teknik bir alet kullanarak tespit etmişlerdir (Bioulac-Sage et al. 1984). Loberg ve Torvik, lezyonlu sıçan beyinlerini mikrodalga ışınlarla in situ fikse etmişlerdir. Bu yöntemi; artefakt değişiklikleri ve gerçekten çeşitli patolojik koşullar nedeniyle oluşan dejeneratif nöronları ayırt etmek için kullanmışlardır (Loberg and Torvic, 1993).

İncelenen konunun özel bir tespit tekniği gerektirip gerektirmediği, kullanıldığında beraberinde getirdiği etkilerin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur. Örn. Castagnaro ve ark. domuz kalbinde ölümden sonra 24 saatin üzerinde atrial spesifik granüllerdeki otolitik değişiklikleri incelemiştir. Oluşan otolitik değişikliklerin derecesine bağlı olarak perfüzyon benzeri özel bir tespit metodu gerektirip gerektirmediğini incelemiştir (Castagnaro et al. 1992).

2.7. Organların Normal Histolojik Yapısı

2.7.1. Beyin

Yapısal olarak sinir dokusu 2 hücre tipi içerir: Uzun sinir lifleri içeren sinir hücreleri (*nöronlar*) ve nöronları koruyan, destekleyen, nöral aktiviteye katılan, nöral beslenme ve santral sinir sisteminin savunmasını sağlayan glial hücreler ya da *nöroglia*.

Beyin ve spinal kord gri madde ve beyaz maddelerden oluşur. Gri madde, sinir hücre gövdeleri ve nöroglia (protoplazmik astrositler, oligodendrositler ve mikroglia hücreleri) hücrelerini kapsayan komplike bir ağ halinde izlenir. Beyaz madde ise sinir hücre gövdesi içermez; nöronal uzantılar ve nöroglialardan (oligodendrositler, fibröz astrositler ve mikroglia hücreleri) oluşur. Beyaz madde, nöronal uzantıların çoğunu bir kılıf gibi çevreleyen miyelinden dolayı, beyaz görülür (Junqueira et al.1993).

Astrositler, birçok uzantıları olan en büyük nöroglialardır. Açık boyanan oval veya yuvarlak bir nukleusları vardır. Astrositlerin iki tipi vardır. *Fibröz astrositler*, beyaz maddede bulunurlar ve bol miktarda asidik protein yapısındaki glial fibrilleri içeren, uzun hücre uzantılarına sahiptirler. *Protoplazmik astrositler* ise, beyin gri maddesinde bulunurlar ve az miktarda glial fibriller içeren uzantıları vardır. *Oligodendrositler*, gri ve beyaz maddede bulunurlar. Santral sinir sisteminde myelin yapımından sorumludurlar. Rutin histolojik tekniklerle yalnızca, oldukça yoğun boyanan yuvarlak nukleusları görülebilir. *Ependimal hücreler*, beyinde (ventriküller) ve spinal kord'un sentral kanalındaki boşlukları döşer. Serebrospinal sıvının hareketine yardım eden hareketli silyalar taşırlar. *Mikroglia hücreleri*, santral sinir sistemine ait fagositik hücrelerdir. Hematoksilin ve Eozin (H&E) preparatlarında yalnızca, oldukça yoğun bir kromatin içeren .nukleusu görülür (Stewens and Lowe, 1993).

2.7.2. Böbrek

Böbrek dışta *korteks*, içte *medulla* olmak üzere iki bölüme ayrılabilir. Medulla 10-20 adet konik veya piramidal şekilli yapılardan oluşur. Bunlar *medullar piramitler* adını alır. Herbir medullar piramidin tabanında kortekse uzanan birbirine paralel tubulus demetleri, *medullar ışınlar* çıkar. Her medullar ışın böbreğin fonksiyon gören birimleri olan birkaç nefron grubu ile birlikte, bir ya da daha çok sayıda toplayıcı kanaldan oluşur. Kortikal doku aynı zamanda *bertini sütunları* olarak bilinen yapıları oluşturacak şekilde medullar piramitlerin arasında da bulunmaktadır.

Her böbrek 1-4 milyon *nefron* içerir. Her nefron böbrek cisimciği, proksimal kıvrımlı tubulus, henle kangalının ince ve kalın uzantıları ve distal kıvrımlı tubulus'dan

oluşmaktadır. Embriyolojik kökeni nefrondan farklı olan toplayıcı tubuluslar ve kanallar nefronlarda üretilen idrarı toplayarak böbrek pelvisine iletirler. Nefron ve içine boşaldığı toplayıcı kanal böbreğin işlevsel birimi olarak kabul edilen *ürinifer tubulusu* oluşturur.

Her böbrek cisimciğinin çapı yaklaşık 200 µm'dur ve kapiller bir yumak olan glomerülden oluşmuştur. Bu yumak iki tabakalı epitelyal bir kapsülle sarılıdır. Bu yapı *bowman kapsülü* olarak adlandırılır. Kapsülün iç tabakası (visseral tabaka) glomerülün kapillerlerini örter. Dış tabaka böbrek cisimciğinin en dıştaki sınırını oluşturur ve bowman kapsülünün parietal tabakası olarak adlandırılır. Bowman kapsülünün iki tabakası arasında kapiller duvarından ve visseral tabakadan süzülen sıvının toplandığı idrar boşluğu bulunmaktadır. Her böbrek cisimciğinde, afferent arteriollerin girdiği ve efferent arteriollerin çıktığı bir damar kutbu, proksimal kıvrıntılı tubulusların başladığı noktada ise bir idrar kutbu bulunmaktadır. Afferent arteriol böbrek cisimciğine girdikten sonra genellikle herbiri kapillerlere dönüşen ve glomerülü oluşturan 2 ile 5 primer dala ayrılır.

Proksimal kıvrımlı tubuluslar tek katlı kübik ya da tek katlı silindirik epitelle örtülüdür. Epitel hücreleri çok sayıda mitokondri içeriği nedeniyle asidofilik sitoplazmaya sahiptir. Hücrenin apikalinde fırçamsı kenar oluşturan çok sayıda mikrovillus bulunur. Proksimal tubulusların lümeni geniştir. Hücrelerin apikal sitoplazmalarında mikrovillusların tabanları arasında çok sayıda kanal bulunur. Bu kanallar, makromoleküllerin epitel hücresi tarafından emilmesine yardımcı olurlar. Bazal hücre yüzünde çok yoğun membran katlantıları ve komşu hücreler arası kenetlenmeler vardır. Lateral membran kenetlenmeleri çok sıkı olduğundan ışık mikroskopunda hücreler arası sınır belli değildir.

Henle kangalı proksimal tubulusu yapıca çok benzer. Bir kalın inen kol, ince bir inen kısım, çıkan bir ince kısım ve yapıca distal kıvrımlı tubuluslara benzeyen kalın bir çıkan koldan oluşan -U- şeklinde bir yapıdır.

Henle kangalının çıkan kolu kortekse girdiğinde histolojik yapısını korur. Ancak, bükülerek nefronun son kısmı olan distal kıvrımlı tubulusları oluşturur. Bu tubulus tek katlı kübik epitelle örtülüdür. Distal tubuluslar kortekste izledikleri yol boyunca kendi nefronlarına ait böbrek cisimciğinin damar kutbuna değerkler. Bu

juxtaglomerüler bölgede distal tubulus hücreleri silindirik hale gelirken, çekirdekleri bir araya toplanır ve hücreler daha koyu renkte boyanırlar. Bu distal tubulus segmentine *makula densa* denir.

Distal kıvrımlı tubuluslardan geçen idrar, birbirlerine bağlanarak daha büyük, düz toplayıcı kanalları oluşturan toplayıcı tubuluslara boşalır. Küçük toplayıcı tubuluslar kübik epitelle döşelidir. Medullanın derinlerine doğru hücrelerin boyları uzar, toplayıcı kanal çapı da giderek artar. Toplayıcı kanallar ve tubuluslar soluk boyanan hücrelerden oluşur. Sitoplazmaları az sayıda organel içerir. Bazal yüzde invaginasyon içermezler. Yan yüzlerde hücrelerarası sınırları bellidir.

Böbrek cisimciğinin hemen bitişiğinde afferent arteriolün tunika mediasında modifiye düz kas hücreleri bulunmaktadır. Bu hücelere *Juxtaglomerüler hücreler* denir. Bu hücrelerin çekirdekleri elips biçimindedir ve sitoplazmaları PAS(+) granüller içerir (Fawcett, 1997).

2.7.3. Karaciğer

Karaciğer, hilumda kalınlaşan *glisson kapsülü* olarak adlandırılan bağ dokusundan yapılmış bir kapsül tabakasıyla sarıdır. Diğer bezler gibi karaciğer de, bu kapsülün trabekülaları ile tam olarak loblara ayrılmamıştır. Vena sentralis'in etrafında radial şekilde düzenlenmiş olan parankim hücrelerinin üstüste plaklar yapmasıyla hegzogonal bir yapı oluşur. Bu yapı *klasik karaciğer lobülü* olarak adlandırılır. Bu hegzogonal yapının köşelerinde portal venin, hepatik arterin bir dalının ve küçük bir safra kanalının fibroblastlar ve kollagen liflerle kuşatılmasıyla üçgen alanlar oluşur. Köşelerdeki bu üçgen alanlara *portal aralık* denir. Portal aralığın içerdiği hepatik arterin dalı, portal venin dalı ve safra kanalikülüne ise *portal triad* denir. *Portal lobüller*, safrayı portal triad'a akıtan karaciğer parçasını oluşturur. Portal lobüllerin merkezi, portal triad'dadır ve vena sentralis'lere bağlanan alanla sınırlıdır. Safra, karaciğer hücre plakları içindeki safra kanaliküllerine salgılanır. Safranın akım yönü portal triad'daki safra kanalına doğrudur. Herbir lobülün periferinde triadın küçük

arterinin ve venülünün yan dalları hepatik sinüzoidlerle birleşir. Hepatik sinüzoidler radyal dizilimli karaciğer hücre plakları arasındaki alanı işgal ederler. Kan akımı portal triadlardan sinüzoidler yoluyla klasik lobülün merkezindeki, vena sentralis'e doğrudur. Karaciğerin fonksiyonel lobüllerinden biri de karaciğer parankimasının bir üniti olarak kabul edilen *hepatik asinus*'dur. Parankimin merkezinde portal venin terminal dallarına ek olarak, bir arteriol dal ve safra kanalı vardır. Hepatik asinus'da dağıtıcı venlere yakınlığına göre hücreler zonlara ayrılır (Fawcett, 1997).

Karaciğer hücreleri, üç yüzeyli polihedral hücrelerdir. Sitoplazmalarında mitokondri boldur ve gelişigüzel heryere dağılmıştır. Bu mitokondrial komponentin geniş dağılımı hepatosit sitoplazmasına H&E ile boyanan parafin kesitlerde eozinofilik granüler bir görünüm verir (Stewens and Lowe, 1993).

Sinüzoidler fenestralı endotel hücrelerinin devamlı olmayan, kesintili bazal membranı ile kaplıdır. Bu endotel tabakası hepatik hücre plaklarından dar bir perisinüzoidal aralıkla ayrılmıştır. Bu boşluk *disse aralığı* olarak adlandırılır. Bu boşluktaki retiküler lif ağı karaciğer hücre plaklarını destekler. Kan plazması rahatlıkla disse aralığına geçer ve direkt olarak karaciğer hücrelerinin yüzeyi ile temas eder. Fagositik hücre topluluğu olan kupffer hücreleri de endotel hücrelerinin lümenine yapışmış olarak sinüzoidal aralıkta bulunmaktadır. Bunlar tipik makrofajlardır. Diğer mononükleer fagositik sistemin hücreleri gibi kemik iliği kök hücrelerinden gelişirler. Disse aralığında az miktarda yağ depolayan hücreler (Ito hücresi, yıldız hücre) bulunur ki bu hücreler lipid damlaları içerir (Fawcett, 1997).

2.7.4. Ovaryum

Ovaryum, yaklaşık 3 cm uzunluk, 1.5 cm genişlik ve 1 cm kalınlığında, biraz yassılaştırmış ovoid bir organdır. Mesovarium denen periton katlantısıyla, uterusun geniş bir ligamentinden destek alır. Organ tek katlı kübik germinal epitelle örtülüdür. Epitelin altında soluk boyanan bağ dokusu *tunica albuginea* bulunur. Ovaryumda, dışta korteks ve içte medulla olmak üzere iki bölge ayırt edilir. Ovaryum korteksi,

çeşitli gelişim evrelerindeki , ovaryum folliküllerini içerir. Medulla; kollagen fibriller, fibroblastlar, düz kas hücreleri ve korteks'e dallar veren arter ve venlerden oluşan bağ dokusudur.

Çeşitli gelişim evrelerinde bulunan çok sayıda follikül, korteks stroması içinde gömülmüştür. Sayıları en fazla olanlar, tunica albuginea'nın hemen altında bulunan *primordial follikül*'lerdir. Primordial follikül, tek katlı yassı follikül hücreleriyle örtülü olan bir primer oosit'ten oluşur. Primordial folliküldeki oosit 25µm çapında büyük küresel bir hücredir. Daha büyük olan *unilaminar primer follikül*'deki oosit, tek katlı kübik follikül hücreleriyle örtülüdür. *Multilaminar primer follikül*'deki oosit ise, çok katlı follikül epiteli (*granulosa tabakası*) ile örtülüdür. Follikül etrafında damardan zengin *theca interna* yer alırken, *theca externa* henüz farklılaşmamıştır. *Sekonder follikül*'ler (veziküler follikül) granulosa hücreleri arasında çeşitli büyüklükte boşluklar olan daha iri folliküllerdir. Korteksin daha derin kısımlarında bulunurlar. Follikül çapı yaklaşık 200 µm'ye ulaştığında follikül sıvısıyla (liquor folliculi) dolu boşluklar birleşerek yarımay biçiminde tek bir boşluk oluşturur. Oositi kuşatan granulosa hücrelerinin antruma doğru yaptıkları kalınlaşmaya, *cumulus oophorus* denir. *Tersiyer follikül* (graaf follikül), ovaryum yüzeyine doğru kabartı yapan saydam bir vezikül biçiminde görülür. Follikül sıvısının artışı sonucu, granulosa hücre tabakası incelmıştır. Granulosa hücrelerinin en içteki prizmatik hücreleri, *corona radiata* adını alır. Corona radiata ile oosit arasında glikoprotein yapısındaki *zona pellucida* yer alır. Oosit, granulosa hücrelerinin oluşturduğu bir uzantıyla follikül duvarına bağlanmıştır.

Ovulasyon öncesi, olgunlaşan follikül ovaryum yüzeyinde çıkıntı (stigma) yapar. Germinal epitel bu alanda devam edemez, stroma ince bir hal alır. Bu bölgeden follikül yırtılarak, ovum periton boşluğuna atılır. Geriye kalan granulosa hücreleri ile theca internanın hücreleri *corpus luteum* denen geçici bir endokrin bezi yaparlar. Ovulasyondan sonra granulosa hücreleri bölünmemelerine rağmen ölçülerinde büyük bir artış olur. Corpus luteum parankimasının büyük bir kısmını oluşturarak *granulosa lutein hücreleri* adını alırlar. Theca internanın hücreleri de *theca lutein* hücrelerini vererek corpus luteum'un oluşumunu sağlarlar. Menstruasyon veya gebelik corpus luteum'unun hücreleri otolizle dejenerasyona uğrar ve onların hücresel kalıntıları da makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Bu alan fibröz-sikatrix bir doku olan *corpus albicans*'ı oluşturur (Fawcett, 1997).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmada deney hayvanı olarak 30 adet dişi Wistar cinsi sıçan (250-300 g) kullanıldı. Sıçanlar vasküler perfüzyon ve immersiyon tespit yöntemlerinin uygulanacağı iki gruba ayrıldı. Her iki gruba da sırasıyla :

0,1 M fosfat tamponlu (pH : 7,4)

a) % 10 formalin

0,1 M kakodilat tamponlu (pH : 7,4)

a) % 2.5 gluteraldehit (0.5 mM CaCl₂ ve 0.25 mM MgCl₂ ile)

b) % 4 paraformaldehit, tespit solusyonlarıyla tespit yapıldı.

Vasküler perfüzyon yönteminde, sıçanlar önce Ketalar (65 mg/kg)'ın intraperitoneal enjeksiyonuyla derin anestezi altına alındı. Hayvanın derisi, processus xiphoideus hizasından kesildi. Thorax duvarı, processus xiphoideus'dan başlanıp, costa'ların iki yanından, parasternal çizgi hizasından kesilerek açıldı. Kalbe giriş sağlamak için , thorax duvarı, processus xiphoideus'dan pense tutularak cranial yönde kaldırılıp, sabitlendi. Diyafram ve Pericardium kesildi. Beşbin ünite sodyum heparin, 1 ml % 0.9'luk serum fizyolojik içinde eritilerek sol ventrikülden dolaşıma verildi. Sonra sağ atriyum, makas ile bir kesi yapılarak, kanın dışarı akışı sağlandı. Kalp kontraksiyona devam ederken, kanül ile (enjeksiyon valfli I.V kanül & PTFE katheter) apeks tarafından sol ventrikül içine girildi. Perfüzyon, kanül yerleştirildikten 1-3 sn sonra başlatıldı. Cerrahi işlemler hızla birbirini takip ederek uygulandı.

Kanül vasıtasıyla, kan vücuttan tamamen uzaklaşmaya kadar, yani sağ atriumdan akan sıvı renksiz oluncaya kadar, sol ventriküle % 0.9'luk serum fizyolojik solusyonu (yaklaşık 100 ml) verildi. Perfüzyonun başlamasından yaklaşık 5-10 dk sonra, sıçanın tüm kanı dışarı akıtıldı ve organlar soluklaştı. Ardından aynı şekilde, tespit solusyonu, ventrikülden dolaşıma verildi. Tespit solusyonları, kullanımdan önce süzülerek kısmi trombozis oluşumu engellendi. Perfüzyonda kullanılan serum fizyolojik ve tespit solusyonlarının bulunduğu şişe pozisyonları **şekil 3.1**'de görülmektedir. Şişeler deney hayvanından yaklaşık 1-1,5 m arasında bir yükseklikte tutuldu. Kalp kontraksiyonu durduğunda, sıvıların vücuda verilmesinde bu

yükseklikten yararlanıldı. Sıçana, 15 dk içinde yaklaşık 200 ml tespit solusyonu (oluşturulan basınçla, dakikada 6 ml 'lik bir akım elde edildi) verildi. Perfüzyon solusyonu, şeffaf polietilen tüpler (dış çapı : 5,0 mm, iç çapı : 4,2 mm, 30 bar) ve bağlantılardan geçirilerek, kanüle verildi. Sistem, hava kabarcığı oluşmaması için denetlendi ve kalbe kanülün sokulmasından önce, tespit solusyonunun sistemin ucuna kadar dolduğu, denetlendi. Perfüzyonun başında birkaç seyirme meydana geldi, fakat convulsion, gözlenmedi. Hayvan, tespit sıvısının bütün vücuda yayılmasıyla, tamamen katılaştı (Şekil. 3.2). Perfüzyona, bütün vücut sertleşinceye ve özellikle organlar (karaciğer, akciğer v.s.) beyazlaşınca kadar devam edildi (Şekil 3.3). Bir sıçanın perfüzyonu yaklaşık 25 dk sürdü.

Vasküler perfüzyonla tespit işlemini takiben, çeşitli organlardan (beyin, karaciğer, böbrek, ovaryum) biyopsiler alındı. Biyopsiler fiksasyon için 1-2 mm'lik parçalara (3-4 dk içinde) ayrıldı. Deney hayvanından alınan dokular aynı tespit solusyonunda 24-48 saat bekletildi. Dokular, 0.1 M fosfat tamponlu (pH : 7.4), % 10 formalin'de oda ısısında (25 °C); 0.1 M fosfat tamponlu (pH : 7.4) veya 0,1 M kakodilat tamponlu (pH : 7.4) % 2.5 gluteraldehit'de (CaCl₂ ve MgCl₂ ile) +4 °C'de buzdolabında ; 0.1 M kakodilat tamponlu (pH : 7.4) paraformaldehit'de +4 °C'de buzdolabında saklandı.

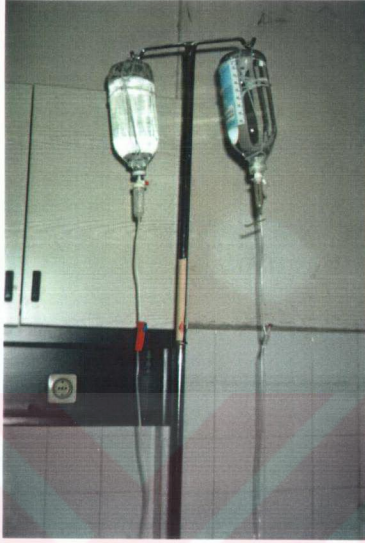
Daha sonra, rutin ışık mikroskobu takibi uygulandı. Parçalar, % 50, % 70, % 80, % 90 ve absolu alkolde dehidrate edildi. Ksilolde şeffaflandırılıp, parafin banyosundan geçirildikten sonra parafin bloklara döküldü. *Leica* marka mikrotomda 5 mikron kalınlığında, kesitler alındı. Alınan kesitler H&E ile boyandı. Daha sonra, *Olympus* marka fotoğraf ataçmanlı mikroskop ile incelenerek, fotoğrafları çekildi.

İmmersiyonla tespit yönteminde, ilk önce sıçanlar Ketalar (65 mg/kg)'ın intraperitoneal enjeksiyonuyla, anestezi altında sakrifiye edildi. Deney hayvanından alınan doku örneklerine saydığımız tampon ve tespit solusyonlarıyla, vasküler perfüzyon yönteminde olduğu gibi 24-48 saat postfiksasyon uygulandı. Ardından yine vasküler perfüzyon yönteminde olduğu gibi rutin ışık mikroskobu takip yöntemi uygulandı. İmmersiyon yönteminde, deney hayvanından dokuların alınması aşaması, vasküler perfüzyon yöntemiyle tamamen aynı şekildeydi. Parafin bloklardan 5 mikron

kalınlığında seri kesitler alındıktan sonra H&E ile boyanıp, mikroskopik incelemeye alındı.



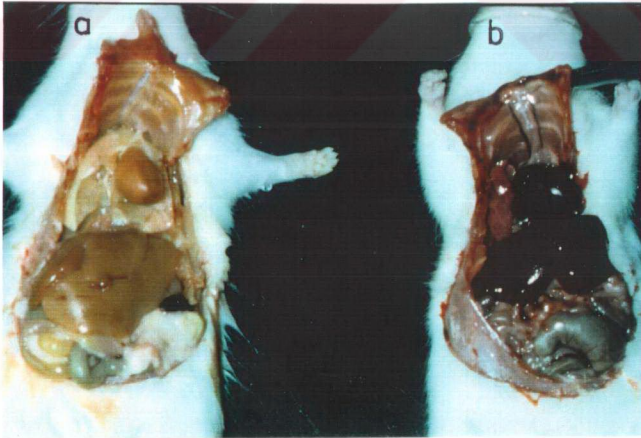
* Bu çalışmada Kocaeli Üniversitesi Araştırma Fonu'ndan (proje no: 1997/39) destek alınmıştır. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.B.D Laboratuvar'ından yararlanılmıştır. Çalışma, altyapısının hazırlanması ve kaynaklarının teminiyle birlikte 1997 yılından başlayıp, Haziran 1998'de sonuçlandırılmıştır.



Şekil 3.1. Perfüzyonda kullanılan serum fizyolojik ve tespit solüsyonlarının bulunduğu şişe pozisyonları görülmektedir.



Şekil 3.2. Perfüzyonla tespit edilmiş bir sıçanda vücudun ve kuyruğun kattlaşmış hali görülmektedir.



Şekil 3.3. Perfüzyonla tespit edilmiş sıçanın (a) tespit öncesi (b) organlarının durumunu gösteren bir fotoğraf. Organlarda görülen renk değişikliği dikkati çekmektedir.

4. BULGULAR

4.1. İmmersiyon ve Perfüzyon Tespit Yöntemlerinin Karşılaştırılması

4.1.1. Makroskobik Bulgular

Çıplak gözle, organların dış yüzeyi veya kesik yüzeyi incelendi. İmmersiyon yöntemiyle tespit edilen organların damarları kan ile dolu olduğu için koyu kırmızı renkte görülmekteydi. Yer yer daha koyu veya açık olmak üzere homojen olmayan bir renk dağılımı mevcuttu. Perfüzyon yöntemiyle tespit edilen organlarda damarlar kandan arındırılmış olduğundan, koyu sarı renkte görülmekteydi. Organın tümü homojen bir renk dağılımına sahipti.

İmmersiyon yöntemiyle tespit için deney hayvanının vücudundan organların alınması, oldukça zordu. Özellikle beynin diseksiyonu sırasında, mekanik hasar olasılığı vardı. Tespit için organların küçük parçalara ayrılması, yumuşaklığı nedeniyle zordu. Perfüzyon yöntemiyle tespit edilen deney hayvanının bütün vücudu tamamiyle katılaştı. Organlar tespitle sertleştiği için, diseksiyonu sırasında mekanik hasara karşı dayanıklıydı. Ayrıca, postfiksasyon için küçük parçalara ayrılması da kolaydı.

4.1.2. Işık Mikroskobik Bulgular

İmmersiyon ve perfüzyon yöntemiyle değişik doku tespit solusyonları ile tespit edilen hayvanların doku kesitleri H&E boyandıktan sonra, ışık mikroskobunda incelendi.

4.1.2.1. Formalin Tespit Solusyonuyla Elde Edilen Bulgular

İmmersiyon yöntemi kullanılarak 0.1 M fosfat tamponlu % 10 Formalin ile tespit edilen beyin dokusunda normal yapı özelliklerinin yeterince korunamadığı

belirlendi. Doku genelinde bir bzme artefaktı gözlendi. Beyin korteksinde piramidal hücrelerin ve nrogliaların çevresinde bir vakuolizasyon (boşluk) vardı. Hücrelerin sitoplazmalarının tam korunamadığı gözlendi. Piramidal hücrelerin dentritik uzantıları belirgin değildi. Nrogliaların nukleusları daralmış ve piknotik hale gelmişti. İmmersiyon tespit yöntemiyle tespit edilen beyin dokusu, Şekil 4.1.a'da görülmektedir.

Perfüzyon yöntemiyle tespit edilen beyin dokusu homojen bir görünüm gösteriyordu. Nöronlar ve nöroglia hücreleri iyi korunmutu. Piramidal hücrelerin tipik büyük nukleusu ve belirgin nukleolusu görülmekteydi. Perfüzyonda hücrelerin dentritik uzantıları kolaylıkla seilebilmekteydi. Nrogliaların nukleusu ve nukleolusu da kolaylıkla ayırt edilebilmekteydi. Perfüzyon yöntemiyle tespit edilen beyin dokusu Şekil 4.1.b'de görülmektedir.

İmmersiyonla tespit edilen karaciğer dokusunda, genellikle lümenleri eritrositler ile dolu olan sinusoidlerin sınırları belirgin değildi. Bu nedenle; hepatosit plaklarının periferden merkeze doğru yönelen ıınsal dizilimi net olarak seilemiyordu. Bazı yerlerde (kesitin periferinde) parankima iyi korunurken, bazı yerlerde iyi korunamadığından (kesitin merkezinde) heterojen bir yapı görüldü. İmmersiyonla tespit edilen karaciğer dokusu Şekil 4.1.c'de görülmektedir.

Perfüzyon yöntemiyle tespit edilen karaciğer dokusunda, sinusoid lümeni eritrositlerden yoksundu. Bu sayede; karaciğer hepatosit kordonlarının yaptığı dallanma ve ağızlaşmalar kolaylıkla izlenebilmekteydi. Eritrositlerden yoksun vena sentralis'in lümeni ilk bakışta parankim dokusundan rahatlıkla ayırt edilebiliyordu. Vena sentralis'e aılan sinusoidler kolayca görülebiliyordu. Perfüzyon yöntemiyle tespit edilen karaciğer dokusu Şekil4.1.d'de görülmektedir.

İmmersiyon yöntemiyle tespit edilen böbrek dokusunda, glomerul kapillerleri, kan hücreleriyle doluydu. Bu nedenle kapiller endotelinin ayırt edilmesi zordu. Bowman kapsül aralığı dardı. Bu nedenle; yer yer glomerul sınırı ve bowman kapsülünün parietal tabakası zor ayırt edilmekteydi. Proksimal ve distal kıvrıntılı tubuluslar ise kolayca ayırt edilemedi. İmmersiyon yöntemiyle tespit edilen böbrek dokusu Şekil 4.1.e'de görülmektedir.

Perfüzyon yöntemiyle tespit edilen böbrek dokusunda, glomerul ve bowman kapsülünün yapısal komponentleri kolaylıkla ayırt ediliyordu. Glomerul kapillerleri,

kan hücrelerinden artıldığı için, sınırları ayrılabilen daha düzgün bir görünüm gösterdi. Glomerul ile pariyetal tabaka arasındaki kapsül boşluğu genişti. Böylece; pariyetal tabakanın tek katlı yassı epitel hücreleri kolayca ayırt edildi. Proksimal ve distal kıvrıntılı tubuluslar kolaylıkla ayırt edilebilecek şekildeydi. Perfüzyon yöntemiyle tespit edilen böbrek dokusu **şekil 4.1.f**'de görülmektedir.

İmmersiyon yöntemiyle tespit edilen ovaryum dokusunda germinal epitelde yer yer dökülmeler ve folikül epitellerinde parçalanmalar görüldü. Medulladaki kan damarlarının lümenleri eritrositlerle doluydu. Bu nedenle medulla stroması karmaşık bir görünümdeydi. İmmersiyon yöntemiyle tespit edilen ovaryum dokusu **şekil 4.1.g**'de görülmektedir.

Perfüzyon yöntemiyle tespit edilen ovaryum dokusunda germinal epitel ve folikül epitellerinin bütünlüğü korunmuştu. Medulladaki kan damarları, eritrositlerden yoksundu. Bu nedenle; korteks ve medulla stroması birbirinden kolaylıkla ayrılabilirdi. Perfüzyon yöntemiyle tespit edilen ovaryum dokusu **şekil 4.1.h**'de görülmektedir.

4.1.2.2. Paraformaldehit Tespit Solusyonuyla Elde Edilen Bulgular

İmmersiyon yöntemi kullanılarak 0,1 M kakodilat tamponlu % 4 PFA ile tespit edilen dokuda, büzüşme artefaktı vardı. Beyinde, nöronlarda büzüşme ve belirgin bir ekstrasellüler vakuolizasyon vardı. Beyin damarlarında büzüşme ve perikapiller vakuolizasyon gözlemlendi (**Şek.4.2.a**). Aynı tespit solusyonuyla perfüzyon tespit yöntemi, genel olarak görülen artefaktları ortadan kaldırdı. Doku morfolojisi oldukça iyi korunmuştu. Beyinde hücre sitoplazmalarının da oldukça iyi korunduğu gözlemlendi (**Şek.4.2.b**).

İmmersiyon yöntemiyle karaciğer dokusunda, karaciğer hücre kordonları kolayca ayırt edilemedi. Vena centralis'in lümeni eritrositlerle doluydu. Sinuzoidler belirgin değildi (**Şek.4.2.c**). Perfüzyon yönteminde, karaciğerde, sinuzoidler belirgindi (**Şek.4.2.d**).

İmmersiyon yönteminde böbrekte, bowman kapsül aralığı dardı. Glomerul kapillerleri, eritrositlerle doluydu. Proksimal ve distal kıvrıntılı tubuluslar iyi korunamamıştı ve belirgin olarak ayırt edilemiyordu (Şek.4.2.e). Perfüzyon yönteminde böbrekte bowman kapsül aralığı, proksimal ve distal kıvrıntılı tubuluslar kolayca ayırt edilebiliyordu (Şek.4.2.f).

İmmersiyon yönteminde ovaryumda da doku genelinde artefaktlar vardı (Şek.4.2.g). Perfüzyon yönteminde ovaryumda korteks ve medulla ayırt edilebiliyordu. Medulladaki damarlar eritrositlerden yoksundu ve temiz bir görünüm hakimdi (Şek.4.2.h).

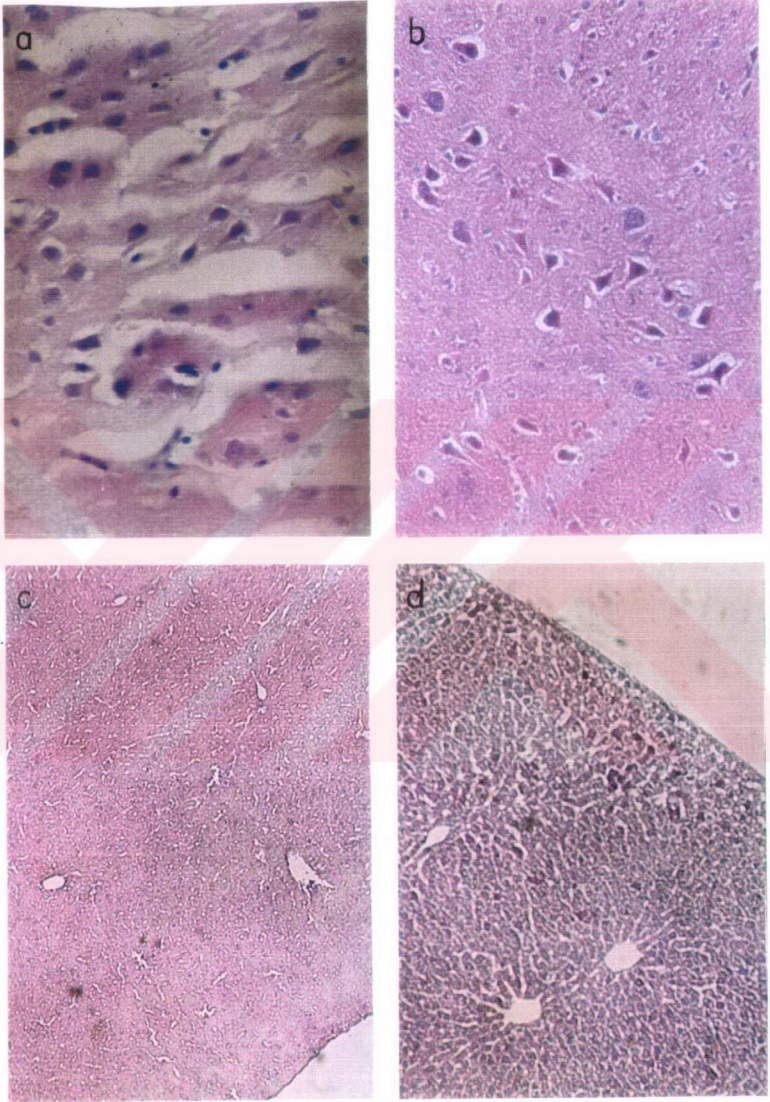
4.1.2.3. Gluteraldehit Tespit Solusyonuyla Elde Edilen Bulgular

0,1 M kakodilat tamponlu % 2,5 GA (CaCl₂ ve MgCl₂ ile) ile immersiyon tespitinde; beyinde hücre düzeyinde bir büzüşme artefaktı vardı. Doku genelindeki büzüşme formalin fiksatifine göre daha azdı. Hücrelerde ekstrasellüler vakuolizasyon gözlemlendi (Şek.4.3.a). Perfüzyon yöntemiyle beyinde hücrelerin sitoplazması iyi korunmuştu (Şek.4.3.b).

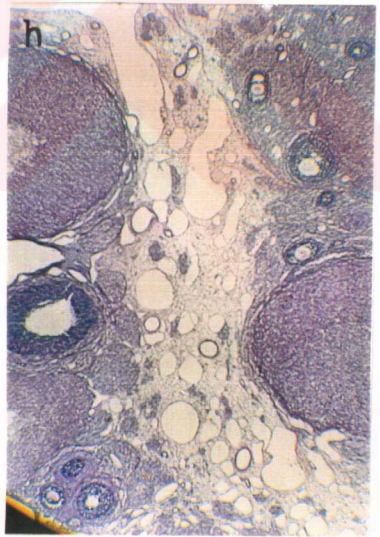
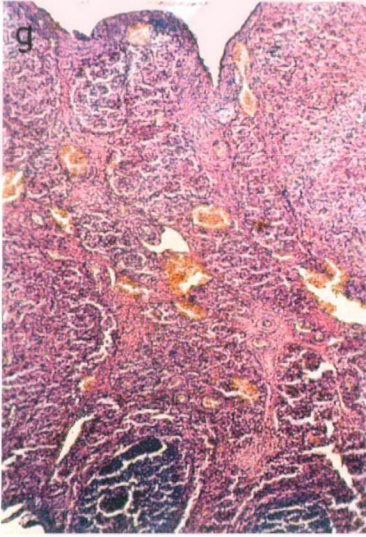
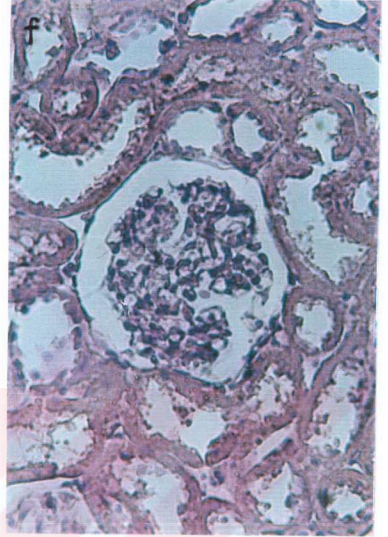
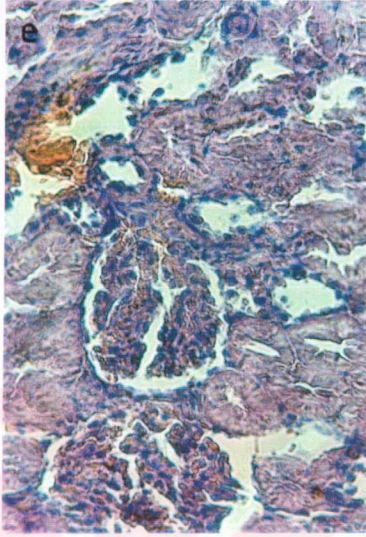
İmmersiyon yönteminde, karaciğerde vena sentralis ve sinusoidlerin lümeni eritrositlerle doluydu. Bu nedenle bu yapılar belirgin değildi (Şek.4.3.c). Perfüzyon yöntemiyle karaciğerde sinusoidler ve vena sentralis belirgindi (Şek.4.3.d).

İmmersiyon yöntemiyle böbrekte tubuluslarda ve bowman kapsülünde parçalanmalar vardı (Şek.4.3.e). Perfüzyon yöntemiyle böbrek dokusunda proksimal ve distal kıvrıntılı tubuluslar birbirinden kolayca ayırt edilebilecek şekildeydi. Glomerul ve bowman kapsülü yapısı ışık mikroskobu sınırları içinde, ayrıntılarıyla belirgin bir şekilde gözlemlendi (Şek.4.3.f).

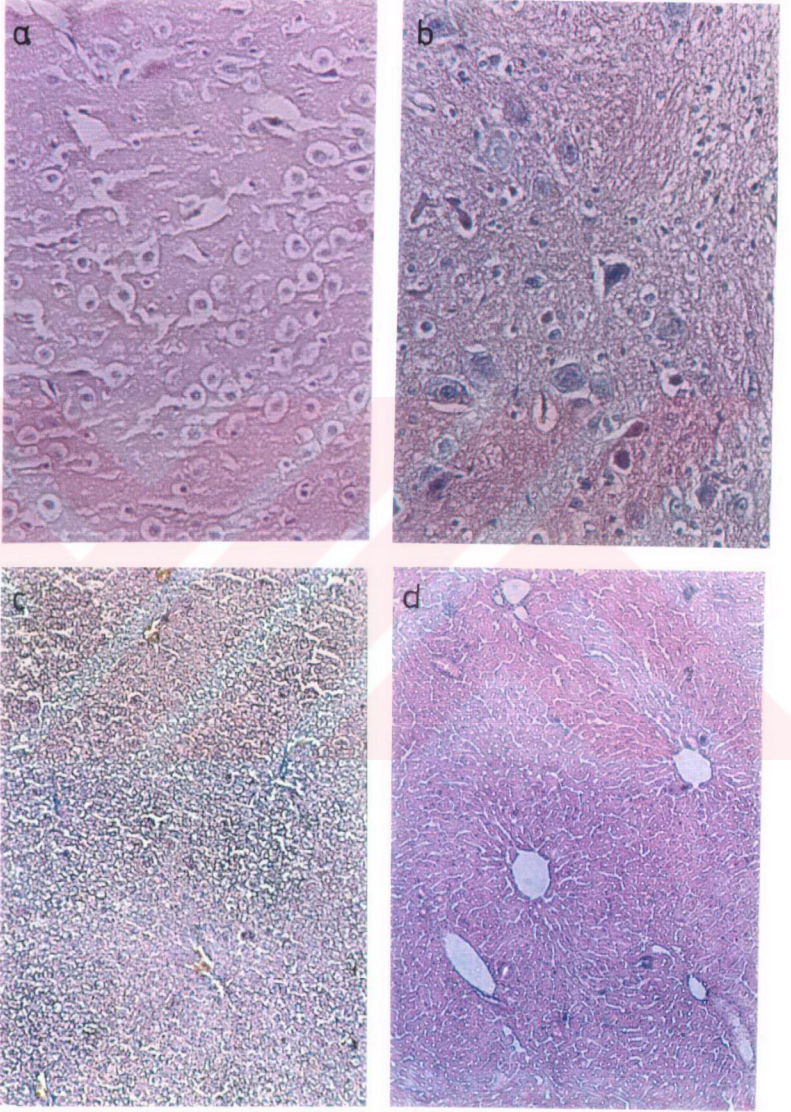
İmmersiyon yöntemiyle ovaryumda yine medulladaki kan damarları eritrositlerle dolu olduğu için temiz bir görüntü elde edilemedi (Şek.4.3.g). Perfüzyon yöntemiyle ovaryumda korteks ve medulla kolayca ayırt edildi (Şek.4.3.h).



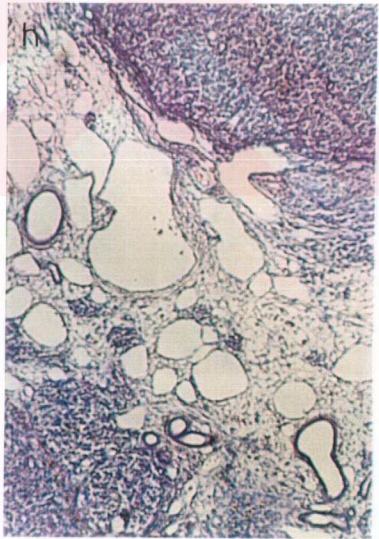
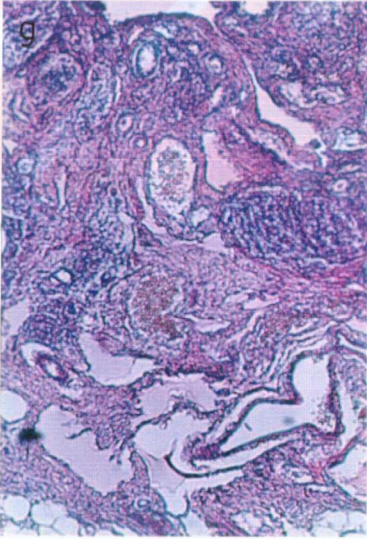
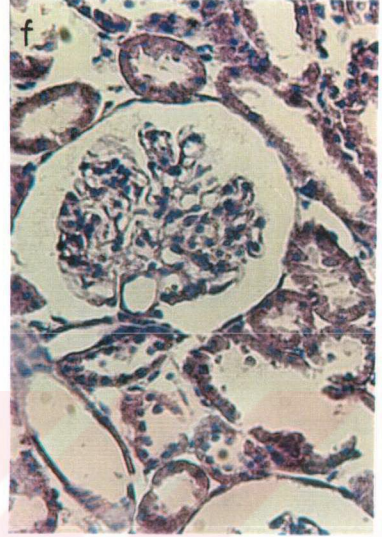
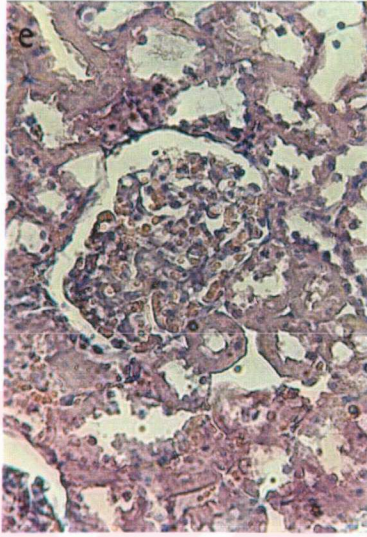
Şekil 4.1.Formalin tespit solusyonu kullanılarak immersiyon ve perfüzyon ile tespit edilen dokular görülmektedir. Sırasıyla, beyin dokusu a ve b'de; karaciğer dokusu c ve d'de görülmektedir (H&E; a, b \times 400; c, d \times 100)



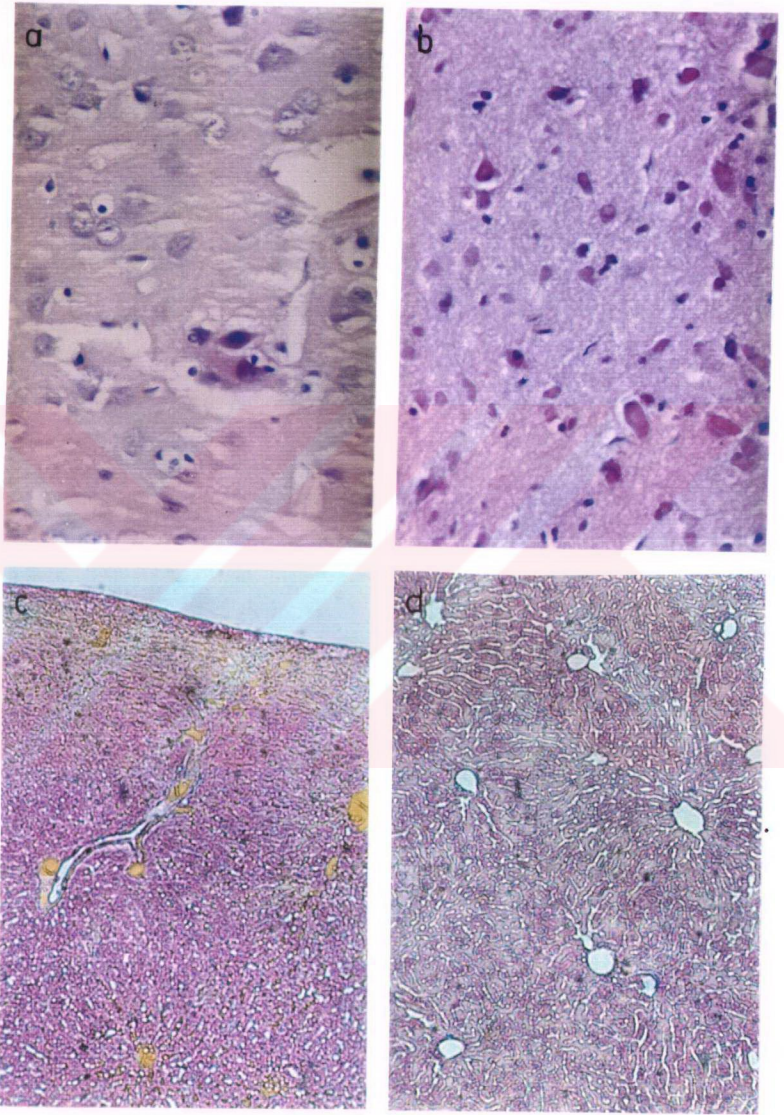
Sekil 4.1. (devam) Formalin tespit solusyonu kullanarak immersiyon ve perfuzyon ile tespit edilen dokular görülmektedir. Sırasıyla, böbrek dokusu e ve f'de, ovarium dokusu g ve h'de görülmektedir (H&E; e, f x 400; g, h x 100).



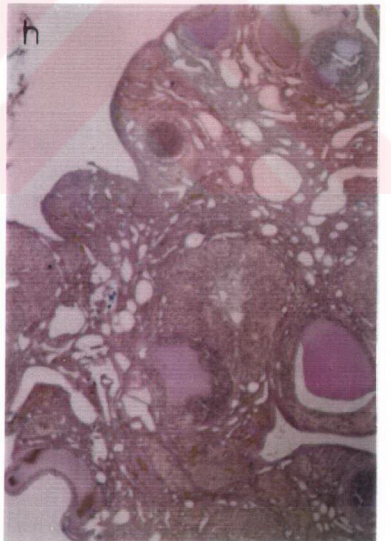
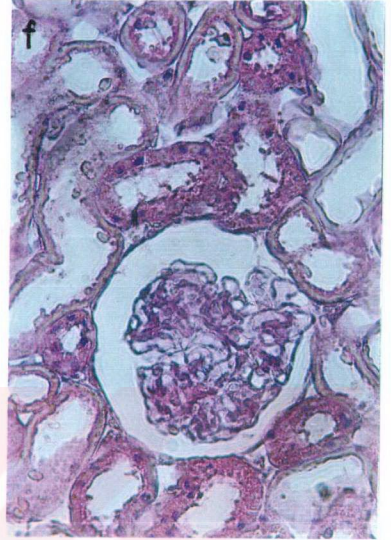
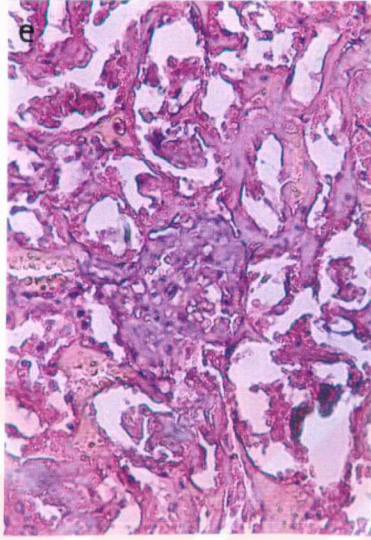
Sekil 4.2. Paraformaldehit tespit solusyonu kullanimilari ile immersiyon ve perfuzyon ile tespit edilen dokular gorulmektedir. SiraSıyla, beyin dokusu a ve b'de; karaciger dokusu c ve d'de gorulmektedir (H&E; a, b x 400; c, d x 100).



Şekil 4.2.(devam) Paraformaldehit tespit solusyonu kullanılarak immersiyon ve perfüzyon ile tespit edilen dokular görülmektedir. Sırasıyla, bobrek dokusu e ve f'de, ovaryum dokusu g ve h'de görülmektedir (H&E, e, f x 400; g, h x 100).



Şekil 4.3. Gluteraldehit tespit solusyonu kullanılarak immersiyon ve perfüzyon ile tespit edilen dokular görülmektedir. Sırasıyla, beyin dokusu a ve b'de; karaciğer dokusu c ve d'de görülmektedir (H&E; a, b x 400; c, d x 100).



Şekil 4.3.(devam) Gluteraldehit tespit solusyonu kullanılarak immersiyon ve perfüzyon ile tespit edilen dokular görülmektedir. Sırasıyla, böbrek dokusu e ve f'de; ovaryum dokusu g ve h'de görülmektedir (H&E, e, f x 400; g, h x 100).

5. TARTIŞMA

Günümüzde histoteknik aşamalarda, birçok yenilik ve gelişmeler olmaktadır. Dokular mikroskopik incelemeye alınıncaya kadar çeşitli aşamalardan geçer. Bu aşamalardan ilki tespittir. Tespitin kalitesi, dokunun canlı durumdakine (in vivo) en yakın şekilde tutulması açısından önemlidir. Bu nedenle günümüzde tespitle ilgili histoteknik alanda yapılan çalışmalar devam etmektedir.

Araştırmalarda kullanılan yöntemin pratikliği, kritik bir unsur olarak görülmektedir. Herhangi bir ek iş veya zorluk işlemin kullanılmasını vazgeçirebilir. Fakat tıbbi etik, profesyonel sorumluluk ve işlemin yararı da göz önünde tutulmalıdır (Adickes et al. 1997). Perfüzyon yönteminde kullandığımız teçizat (serum şişesi, infüzyon seti, kanül) ucuz, basit ve portatiftir. Operasyon veya postmortem odasında çok çabuk kurulabilir.

Artefakt oluşmaması için, bir tespit zaman faktörünün çok önemli olduğu belirtilmiştir. İmmersiyonla tespitte görülen artefaktların, perfüzyon ile yapılan tespitte gözlenmediği ortaya konmuştur (Dalçık ve ark. 1995). Adickes ve ark.'nın yaptığı çalışmada, otopsinin santral sinir sisteminin tespitinde, immersiyonla tespit 5 günü aşarken, perfüzyon yöntemi tüm nöropatolojik incelemelere 3-4 içinde imkan tanımıştır. Otopsi işlemi sırasında beynin hızlı fiksasyonu, postmortem değişiklikleri önleyerek beynin detaylı incelenmesine imkan tanır (Adickes et al. 1997).

Dokunun sertliği, dokunun parçalara ayrılması ve minimum artefakt oluşumu için bir avantajdır. Roberts ve ark. perfüzyon yöntemini, fareden köpeğe çeşitli büyüklükteki hayvanlara uygulamışlardır. Özellikle mekanik hasara karşı hassas, yumuşak dokularda oldukça kullanışlı bulmuşlardır (Roberts et al. 1990). Çalışmamızda perfüze edilen sıçanların tüm organ ve dokuları kesilebilir sertlikteydi. Özellikle; beyin diseksiyonunda kullanılan aletle ve kafatasından tespit solusyonuna konulmasında palpation işlemi sırasında hasar görülmedi.

Maunsbach makalesinde, perfüzyon tespit yöntemiyle, tespit solusyonunun tüm hücrelerle hızlı bir şekilde temas edebildiğini ve tüm dokuda homojen bir tespit sağlandığını belirtmektedir (Maunsbach, 1965).

Thorball ve Tranum-Jensen perfüzyon tespit yönteminin üstünlüklerinden biri olarak, fiksatifin kimyasal aktivitesiyle dokunun hızlı bir şekilde karşı karşıya kalmasını göstermiştir. Böylece; araştırmacılar immersiyon tespit yönteminde karşılaşılan diffüzyon gradientine bağlı geciken metabolik problemlerin minimuma indirildiğini ileri sürmüşlerdir (Thorball and Tranum-Jensen, 1983). Bizim gözlemlerimiz de bu doğrultudadır.

Larsson ve ark. yaptıkları çalışmada, yalnız immersiyonla tespit edilen çöl farelerinin PT bezlerinde boyanma affinitesi veya sitoplazmik elektron yoğunluğu farklı esas hücre alt sınıfları ve ayrıca atrofik hücreler saptamışlardır. Yavaş fiksasyonla oluşan, farklı boyanma affiniteleri ve esas hücre tipleri perfüzyon tespit yönteminde saptanmamıştır. Perfüzyonla tespit edilen bezlerden alınan kesitlerde uniform bir görünüm gözlenmiştir (Larsson et al. 1984). Biz de perfüzyonla tespit edilen beyin, karaciğer, böbrek ve ovaryum kesitlerinde uniform bir fiksasyon belirledik.

Roberts ve ark.'nın yaptığı çalışmada perfüzyonla doku tespiti, baştanbaşa aynıydı. Perfüzyon immersiyonla karşılaştırıldığı zaman, dokuda perfüzyon yönteminde farklı sitoplazmik boyanma gözlenmemiştir. Karaciğerde periportal zondan lobulün sentraline doğru boyanma şiddetinde fark ve sinusoidal daralma gözlenmiştir (Roberts et al. 1990). Bizim karaciğerdeki bulgularımız Roberts ve ark.'nın bulgularıyla benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda perfüzyon yöntemini uyguladığımız sıçanların dokularında homojenlik vardı. Tüm dokuların periferinde ve merkezinde eşit mikroskopik görüntü elde edildi. İmmersiyon yöntemiyle tespit edilen sıçanların dokuları heterojen bir görünüm içeriyordu.

İmmersiyon yöntemiyle tespit edilen beyinde, korteksin üst kısmında yer alan hücrelerde ekstrasellüler vakuolizasyon daha derindeki hücrelerde daha genişti. Yüzeydeki hücreler oldukça daralmış, nukleusları piknotik hale gelmişti.

Periferde yer alan karaciğer lobüllerinde sinuzoidal aralık santralde yer alanlardan daha genişti. Ayrıca her lobulün periferinden sentraline doğru boyanma şiddetinde fark ve sinusoidal daralma gözlemlendi.

İmmersiyon yöntemiyle tespit edilen ovaryumda korteksde yer yer iyi korunmuş alanlar varken, kötü korunmuş alanlar da mevcuttu. Dokuda parçalanmalar ve dökülmelerin olduğu bu kötü alanlar, fiksasyon artefaktı olarak değerlendirildi.

Perfüzyon yönteminde; salin veya diğer isotonik solusyonlarla pre-perfüzyon, damarları temizler ve fiksasyonu kolaylaştırır (Adickeset al. 1997). İmmersiyon tespitinde karşılaşılan bir problem, vasküler kollaps tarafından neden olunan şekil bozukluğudur (Thorball and Trandum-Jensen, 1983).

Perfüzyon yönteminde kan, tespit solusyonuyla hiçbir önemli karışımı olmadan, vasküler sistemin dışına atıldı. Perfüzyon tespiti sonrası, damarlar açık, kansızdı ve kapiller embolizm asla saptanmadı. Bu nedenle; mikroskobik görüntü net ve temizdi. İmmersiyonla tespit edilen dokuda damar şekli değişmiş, lümenleri yer yer kollabe olmuştu. Lümenleri kan hücreleriyle doluydu.

Perfüzyon metodu, tespit solusyonunun tüm hücrelerle hızlı bir şekilde temas etmesini sağlar ve tüm dokuda homojen bir tespit sağlanır (Maunsbach, 1966). Bazı dokularda solunumun oranı, kan akışı engellendikten sonra 1 dk'dan daha az zamanda, hipoksi oluşumu için yeterlidir. Tespit işlemlerinde, minimum hipoksi avantaj sağlar. GA tespiti kan akışı kesildikten sonra minimal gecikmeyle başarılı olmalıdır. Karaciğer ve kas gibi metabolizması hızlı dokular için oksijen alımı GA ile aniden azalır.

İmmersiyon tespitiyle hazırlanan dokuda hipoksi ve asidite, solusyonun tespit edilecek bölgeden uzaklığı nedeniyle artar. Aynı şekilde; asit üreten çevredeki fazla asitin nötralizasyonu bu uzaklık artışıyla çok zor olmaktadır (Johnson, 1987). Bu nedenle ; tespit işlemi kan akışı kesildikten sonra minimal gecikmeyle başarılı olmalıdır. Perfüzyonla tespit solusyonu vasküler sistem aracılığıyla hücrelere kadar ulaşmaktadır. Böylece; tespit solusyonu 20-25 dk içinde hemen hemen tüm hücrelere kadar ulaştırılabilmektedir. Halbuki; immersiyonla tespit solusyonunun tüm hücrelere ulaşması saatler ve hatta günleri bulmaktadır. Yetersiz tespit edilen dokuda, daralma ve yarıma artefaktları artmaktadır.

Ca^{+2} ve Mg^{+2} 'un eritrositlerin şişmesini (Morel et al. 1971) ve hemoglobinin ekstraksiyonunu önlediği (Tooze, 1964) hücre membranına bağlı fosfolipidleri (Hayat, 1981; Roozemand, 1969) ve proteinleri koruduğu (Tooze, 1964; Trump and Ericsson,

1965) bilinmektedir (Maunsbach, 1966; Wild et al. 1987). Bu nedenle GA tespit solusyonuna CaCl_2 ve MgCl_2 ilavesi yapıldı. Daha önceki çalışmalarda CaCl_2 ve MgCl_2 ilavesi olmadan yaptığımız tespit işlemlerinden daha iyi sonuçlar alındı.

GA, proteinlerle çapraz bağlar kuran mükemmel bir fiksatifdir. Lipidlerle de reaksiyona girebilir. Hızla reaksiyona girer fakat, penetrasyonu yavaştır (Wild et al., 1987; Hopwood, 1996). Doku primer aminleri için, oksidatif kimya, GA'ın eklenmesiyle artar. Oksijen tüketimi ve asidifikasyonu, çapraz bağlanma olayından daha hızlı sürede meydana gelir. Hipoksi ve asidifikasyonun morfolojik etkileri genel hipoksi özellikleridir (Johnson, 1987).

Diğer yandan FA, tespit için 24 saate ihtiyaç duyar. Fakat hızla penetre olması avantaj sağlar (Fox et al., 1985; Wild et al., 1987). FA ile karşılaşılan önemli bir sorun da, tespitte oluşan daralma ve biyopsinin uç kısmında yer alan hücrelerle birkaç milimetre uzaklıktaki hücrelerden, farklı görünüş ve morfolojik özelliklere sahip olmasıdır (Fox et al., 1985).

İmmersiyon tespit yönteminde, tespit solusyonlarının bu avantaj ve dezavantajları önemli bir rol oynamaktadır. Perfüzyonla tespit yönteminde ise; tespit solusyonunun yavaş penetrasyon dezavantajı, ortadan kaldırılmaktadır. Çünkü; fiksatif kolayca hücrelere ulaşmaktadır. Böylece; geçen zaman ve alınan mesafe azaltılmaktadır. GA'ın düşük penetrasyon oranı ve FA'ın düşük tespit oranı, telafi edilmektedir.

Çalışmamızda farklı tampon kombinasyonları, konsantrasyon ve sıcaklıklarda değişik aldehitler kullandık. İmmersiyon tespit yönteminde 0,1 M fosfat tamponlu % 10 formalin, 0,1 M kakodilat tamponlu % 4 paraformaldehit ve 0,1 M kakodilat tamponlu % 2,5 glüteraldehit (CaCl_2 ve MgCl_2 'lü) olmak üzere değişik tespit solusyonlarıyla dokularda değişik oranlarda büzüşme artefaktı görüldü. Formalinle doku genelinde bir büzüşme artefaktı görüldü. Hücresel düzeydeki büzüşme diğer tespit solusyonlarına göre daha azdı. PFA ve GA ile hücresel düzeyde bir büzüşme görüldü. Perfüzyonla tespit edilen dokularda bu artefaktların büyük oranda ortadan kalktığı gözlemlendi. En iyi perfüzyon 0,1 M kakodilat tamponlu % 4 paraformaldehit ile gözlemlendi. Bunun yanında perfüzyon yöntemiyle tespit edilen dokuda hücre morfolojisi daha iyi korundu. Mikroskobik görüntü daha temiz ve belirgindi.

Böylece sonuçlar gösterdi ki; tespit artefaktları, immersiyon tespitiyle ortaya çıkar ve aldehitler, tampon kombinasyonları, konsantrasyon ve sıcaklık; artefakt oluşumunu teşvik eden önemli faktörlerdir.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Dokuların ışık mikroskopik incelenmesi için çeşitli işlemlerden geçmesi gerekir. Bu sürecin ilk basamağı tespittir. Artefakt oluşmaması için, tespit zaman faktörü önemlidir. Kaliteli bir tespit için izlenen yöntem önemlidir. Dokuların yapısını ve içeriğini, canlıda olduğu gibi muhafaza edebilmek için, perfüzyon ve immersiyonla tespit yöntemlerini değişik tespit solusyonlarıyla karşılaştırıp, en uygun tespit yöntemini ve tespit solusyonunu araştırdık. Çalışmamızda, perfüzyon yöntemi kullanılan tüm tespit solusyonlarıyla ve tüm dokularda iyi sonuçlar verdi. Perfüzyon yönteminde tespit artefaktları ortadan kaldırıldı ve hücre morfolojilerinin daha iyi korunduğu dikkat çekti. PFA tespit solusyonuyla yapılan perfüzyon, oldukça iyi sonuçlar verdi.

Bilimsel çalışmalarda, sonucun mikroskopik değerlendirilmesi sırasında, yanlış sonuçlara varılmaması için, dokuda tespit yönteminden kaynaklanabilecek artefaktlar ortadan kaldırılmalıdır. Tespit yönteminin, morfolojik ve histolojik incelemede en doğru sonuca ulaşılmasında katkısı önemlidir. Tespit yöntemi ve tespit solusyonlarının, deneyin sonucuna olan etkisi en aza indirilmeli ve böylece, yanıltıcı değerlendirmelerden kaçınılmalıdır.

Çalışmada, değişik tespit solusyonları ve tespit yöntemlerinin karşılaştırılması yapılarak ışık mikroskopuyla çalışmak isteyen araştırmacılar için öneriler getirildi. Özellikle; beyin ve karaciğer gibi yumuşak ve hassas organlar, mekanik hasara ve anoksiye karşı oldukça duyarlı olduklarından bu gibi dokular için perfüzyon tespit yöntemi tercih edilmelidir.

Ayrıca; Türkiye'de yayınlanan histolojik çalışmalara ait yaptığımız bir tarama, immersiyon yönteminin daha çok tercih edildiğini göstermektedir. Fakat; yurtdışı dergilere gönderilen bir makalenin yayınlanmamasında, perfüzyon yönteminin kullanılmaması neden olarak gösterilebilmektedir. Sonuç olarak; perfüzyon yönteminin kullanılmasıyla, daha kaliteli bir tespit elde edilebilir. Bu nedenle; perfüzyon tespit yönteminin yaygınlaştırılması için; bu konuya gerekli duyarlılığın gösterilmesini öneriyoruz.

KAYNAKLAR

- ADICKES E.D., FOLKERTH R.D., SIMS K.L., (1997). Use of perfusion fixation for improved neuropathologic examination. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 121: 1199-1206.
- BIOULAC-SAGE P., LAMOULIATTE H., SARIC J., BALABAUD C., (1984). P'erfusion-fixation des biopsies hépatiques à l'aiguille: technique. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 8: 656-659.
- BOHMAN S.O., (1974). The ultrastructure of the rat renal medulla as observed after improved fixation methods. *J. Ultrastructure Research.* 47: 329-360.
- CARRASCO L., BAUISTA MJ., GOMEZ J., VILLAMANDOS J.C., (1995). Description of a new population of fixed macrophages in the splenic cords of pigs. *J. Anat.* 187: 395-402.
- CASTAGNARO M., BENATTI A., GUARDA F., (1992). Ultrastructural observation on autolytic changes of atrial specific granules in pig heart. *Res. Vet. Sci.* 52: 120-122.
- CIUERA D. and GIL J., (1996). Morphometry of capillaries in three zones of rabbit lungs fixed by vascular perfusion. *The Anatomical Record.* 244: 182-192.
- DALÇIK H., IRMAK M.K., ÖZTAŞ E., ÖZCAN O., KIBRISLI E., (1995). Doku tespitinde vasküler perfüzyon. *Yeni Tıp Dergisi.* 12: 277-281.
- DUELLİ R. and KURSCHINSKY W., (1993). Changes in brain capillary diameter during hypocapnia and hypercapnia. *J. of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 13: 1025-1028.
- EPSTEIN D.L and ROHENT J.W., (1991). Morphology of trabecular meshwork and inner-wall endothelium after cationized ferritin perfusion in the monkey eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 32: 160-171.
- FOX C.H., JOHNSON F.B., WHITING J., ROLLER P.P., (1985). Formaldehtde fixation. *The J. of Histochemistry and Cytochemistry.* 33: 845-853.
- GARMAN RH., (1990). Artifacts in routinely immersion fixed nervous tissue. *Toxicol. Pathol.* 18: 149-153.
- HULZEN R.D.T and JOHNSON D.H., (1996). Effect of fixation pressure on juxtacanalicular tissue and schlemm's canal. *Invest. Ophthalmol.* 37: 114-124.
- HUMASON G.L., (1979). Animal tissues techniques, Ed: A.C. Barlett. San Francisco: The Maple-Vail Book Manufacturing Group. Fourth Ed. p.:26-28.
- JENSH R.P., FAWCETT D.W., (1997). Concise Histology. Chapman&Hall. New York. p.:212-216, 242-248, 270-274.
- JUNQUEIRA L.C., CARNEIRO J., KELLEY R.O., (1993). Çalışma metodları. Çeviren: R. DEMİR. Temel Histoloji. syf: 2, 196.

- JOHNSON A.J., (1987). Glutaraldehyde fixation chemistry: oxygen-consuming reactions. *European Journal of Cell Biology*. 45: 160-169.
- JAUNIAUX E., GONZALO MOSCOSO J., VANESSE. M., CAMPBELL S., DRIVER M. (1991). Perfusion fixation for placental morphologic investigation. *Hum. Pathol*. 22: 442-449.
- KAHVECİ Z., MİNBAY Z., ÇAVUŞOĞLU İ., NOYAN S., SIRMALI Ş., (1996). mikrodalga ışınımının mast hücre granüllerinin fiksasyonu ve thionin metodu ile boyanmasında kullanımı. 3. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi Özet Kitabı. Osmangazi Ün. Histoloji ve Embriyoloji A.B.D., Eskişehir, syf: 66.
- KAKOI H., ANNIKO M., ERWALL C., PETTERSON C.A.V., JANSSON B., (1996). Morphological changes in rat submandibular gland mucous cells during fixation with 10% formalin. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol*. 253: 214-221.
- KANTER M., DALÇIK H., KÖKSAL V., ÖZTAŞ M., ÖZCAN O., (1996) Parathyroid cell variants may be induced by different fixatives 1.a light microscopic study. *Van Gazi Medical journal*. 7: 61-65.
- KERTSCHANSKA S., KOSANKE G., KAUFMANN P., (1997). Pressure dependence of so-called transtrophoblastic channels during fetal perfusion of human placental villi. *Microscopy Research and Technique*. 38: 52-62.
- KIMURA M., ABE M., (1994). Histology of postmortem changes in rat liver to ascertain hour of death. *Int. J. Reach*. 3: 139-150.
- LARSSON H.O., LORENTZON R., BOQUIST L., (1984). Structure of parathyroid glands, as revealed by different methods of fixation. *Cell Tissue Res*. 235: 51-58.
- LEESON C.R., LEESON T.S., PAPARO A.A., (1985). Textbook of Histology. Preparation of dead tissue. Fifth Ed. W.B. Saunders Company.p.:7-8.
- LØBERG E.M. and TORVİK A., (1993). Distinction between artefactually shrunken and truly degenerated 'dark' neurons by in situ fixation with microwave irradiation. *Neuropathology and Neurobiology*. 19: 359-363.
- MAUNSBACH A.B., (1966). The influence of different fixatives and fixation methods on the ultrastructure of rat kidney proximal tubule cells. *J. Ultrastructure Research* .14: 283-309.
- MASSON-PÉVET M., GEORGE D., GAUER F., PÉVET P., (1993). Demonstration of melatonin-binding sites in cyclohexylamine-formaldehyde-fixed brain tissues. *Cell Tissue Res*. 274: 207-209.
- MOREIRA J.E. and GONÇALVES R.P., (1985). Ultrastructural changings of the rat parathyroid gland under various fixation methods. *Anat. Anz*. 158: 413-423.
- PERSSON H.G., GATZINSKY K.P., (1993). Distribution of retrogradely transported fluorescent latex microspheres in rat lumbosacral ventral root axons following

peripheral crush injury: alight and electron microcopic study. *Brain Research*. 630: 115-124.

ROBERTS J.C., McCROSSAN M.V., JONES H.B., (1990). The case for perfusion fixation of large tissue samples for ultrastructural pathology. *Ultrastructural Pathology*. 14:177-191.

ROOZEMOND R.C., (1969). The effect of calcium chloride and formaldehyde on the release and composition of phospholipids from cryostat of rat hypothalamus. *The Journal of Histochemistry*. 17: 273-279.

ROSAI J., (1996).Gross techniques in surgical pathology. *Surgical Pathology*. Ed: Joiner P., Mosby-Year Book. Seventh Ed. New York. p.:15-16.

ROSENQUIST R., EPSTEIN D., MELAMED M., JOHNSON M., GRANT W.M., (1989). Outflow resistance of enucleated human eyes at two different perfusion pressure and different extents of trabeculotomy. *Current Eye Research*. 8:1233-1240.

ROSS M.H., ROMRELL L.J., KAYE G.I., (1995). Histology-a text and atlas. Williams &Wilkins. Third Ed. Ed: Patricia A.C. p.: 1,2.

ROSTGAARD J., QVORTRUP K., POULSEN S.S., (1993). Improvements in the technique of vascular perfusion-fixation employing a fluorocarbon-containing perfusate and a peristaltic pump controlled by pressure feedback.. *Journal of Microscopy*. 172: 137-151.

ROSTGAARD J. and QVORTRUP K., (1996). Electron microscopic demonstration of filamentous molecular sieve plugs in capillary fenestrae. *Microvascular Research*. 53: 1-13.

SCHULTZ R.L. and KARLSSON U., (1965). Fixation of central nervous for electron microscopy by aldehyde perfusion. *J. Ultrastructure Research*. 12: 187-206.

STEVENS A. and LOWE J., (1993). Histology. Ed: Wheater P.R., Mosby-Year Book Europe Ltd. England. p.: 5.; 213-216.

THEORY and PRACTICE of HISTOLOGICAL TECHNIQUES, (1996). **HOPWOOD D.:** Fixation and fixatives. p.:23-46. **HIGH O.B.B. and LAKE B.:** Lipids.p.:213-240. **ROBINSON G. and GRAY T.:** Electron microscopy 2: pratical procedures.p.:585-626. **DAWS J.J.:** Museum and other demonsration.p.: 699-720. Ed: J.D. Bancroft and A. Stevens.Fouth Ed. Hong Kong.

THORBALL N. and TRANUM-JENSEN J.,(1983). Vascular reactions to perfusion fixation. *Journal Microscopy*. 129: 123,139.

VASSY J., KRAEMER M., CHAPMAN M., (1997). The influence of the fixation procedure on the localization of albumin in the liver of adult rat. *Ultrastruct. Pathol*. 14: 177-191.

WILD P. and MANSER E.M., (1985). Ultrastructural morphometry of parathyroid cells in rats of different ages. *Cells Tissues Res.* 240: 585-591.

WILD P., SCHRANER E.M., AUGSBURGER H., BERLINGER R., PFISTER R., (1986). Ultrastructural alteration in mammalian parathyroid glands induced by fixation. *Acta Anat.* 126: 87-96.

WILD P., KELLNER S.J., SCHRANER E.M., (1987). Parathyroid cell variants may be provoked during immersion fixation. *Histochemistry.* 87:263-271.

YU Y., LENG C.G., KATO Y., OHNO S., (1997). Ultrastructural study of glomerular capillary loop at different perfusion pressures as revealed by quick- freezing, freeze-substitution and conventional fixation methods. *Nephron.* 76: 452-459.



ÖZGEÇMİŞ:

1972'de Gölcük'de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Gölcük'de tamamladı. 1989 yılında girdiği Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 1993 yılında Biyolog olarak mezun oldu. 1994 yılının Ekim ayından bu yana Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı'nda Araştırma Görevlisi olarak Yüksek Lisans öğrenimine devam etmektedir.



**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**