

Doku Takibi, Karşılaşılabilecek Sorunlar ve Çözümleri



Histoloji Tekniği



- Tespit ve yıkama
- Doku takibi
 - Dehidrasyon (suyunu giderme)
 - Şeffaflaştırma
 - Sertleştirme
- Bloklama/gömme
- Kesit alma ve lama yapıştırma
- Boyama
- Kapatma

Doku Takibi



- Dokuların mikroskopik incelemeye hazır hale getirilmesi amacı ile yapılan, gömme ile sona eren işlemler dizisine **doku takibi** denir.
- Fikse olmuş dokunun bloklamaya hazır hale getirilmesidir.
- Dokunun mikrotomda ince kesitler yapılacak sertliğe getirilmesi gerekir.
- Bu sertlik genellikle parafin infiltre edilerek sağlanır.
- Parafin suda erimediği için öncesinde bazı işlemler gerekir.
- Tespitten sonra su yada değişen derecelerde alkol ile yıkama yapılarak tespitte ait kalıntıların uzaklaştırılması sağlanır.

Doku Takibi



Doku takibini etkileyen faktörler:

- 1. Dokuya ait olanlar,
- 2. Takip ajanlarına ait olanlar ve
- 3. Takip şekline bağlı olanlar olmak üzere üç ana başlıkta toplanır.

Dokuya ait faktörler

- doku porları,
- fiksasyon,
- doku kalınlığı ve
- dansitesidir.

Takip şekline bağlı faktörler ise

- ısı ve
- çalkalama biçimidir.

Takip ajanlarına ait faktörler

- solüsyonların polaritesi,
- konsantrasyonu,
- birbirleri ile uyumu,
- buharlaşma hızı ve
- viskoziteleridir.

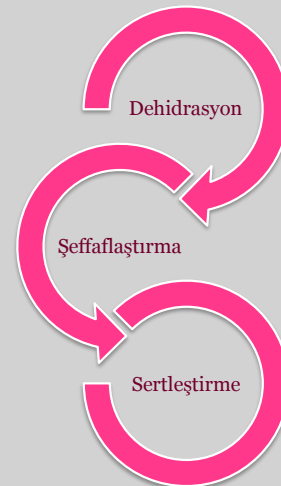
Doku Takibi

Doku takibinin aşamaları:

Dehidrasyon,

Şeffaflandırma ve

Sertleştirme.



Dehidrasyon



- Fiksasyonu tamamlanmış dokuların ilk takip aşamasıdır.
- Dokuda var olan su ve tespit solüsyonundan kurtarılması, arındırılmasına dehidrasyon denir.
- İki tip dehidrasyon vardır:
 1. Dilüsyonel dehidrasyon yöntemiyle dokuların artan konsantrasyonda alkollere transferi ile doku suları uzaklaştırılır.
 2. Kimyasal dehidrasyon: Endotermik reaksiyon ile dokulardaki suyun uzaklaştırılmasıdır.

Dehidrasyon



- Dehidrasyonda kullanılan maddeler:
 - **ALKOLLER**
 - **Etil alkol:**
 - ✦ En çok kullanılan maddedir.
 - ✦ Berrak, renksiz, kolay alev alabilen, orta derece toksik ve organik çözeltiler ile karışabilen bir sıvıdır.
 - ✦ Hızlı etkili ve hidrofilik bir ajandır.
 - ✦ Yükselen (%70, %95, %100) alkol konsantrasyonlarının kullanılması, doku suyunun yavaş yavaş alınarak doku büzülmesini önleyip dokuya sertlik kazandırır.
 - **Metanol:**
 - ✦ Özel kokulu, berrak, alev alabilen ve zehirli bir alkoldür.
 - ✦ Seyrek olarak tek başına dehidran olarak kullanılmaktadır.

Dehidrasyon



o **İsopropanol:**

- ✦ Parafin gömme doku takibinde etanole en uygun alternatif dehidrasyon ajanıdır.
- ✦ Selloidin doku gömme takibinde kullanılmamalıdır.
- ✦ Dokularda etanol kadar küçülme ve sertleşme yapmamaktadır.
- ✦ Mikrodalga ile doku takibinde de kullanılmaktadır.

Bütanol: Bitki ve hayvan materyallerinin doku takibinde dehidrasyon amacıyla tercih edilmektedir.

Dehidrasyon



GLİKOL ETERLER:

- a. Etoksi etanol
- b. Dioksan
- c. Polietilen glikol (PEG)

Dehidrasyon



DİĞER DEHİDASYON AJANLARI

- **Aseton:**
- Renksiz, berrak, alev alabilen ve karakteristik kokulu bir dehidrandır.
- Hızla dehidrasyon yapmakta ve buharlaşarak dokuları sertleştirmektedir.
- Özellikle yağlı dokuların takibinde dehidrasyon maddesi olarak kullanılması önerilmektedir.
- **Tetrahidrofuran:**
- En iyi dehidrasyon ajanıdır.
- Özellikle yetersiz dehidrasyon olmuş dokularda tekrar doku takibinde kullanılmaktadır.
- **2,2 dimetoksipropan:** Kimyasal dehidrasyonda kullanılır.

Dehidrasyon



Dehidrasyon ajanı seçerken ;

- ekonomik olmasına,
- doku takibinin diğer solüsyonları ile uyumlu olmasına ve
- dokuyu ne kadar küçülttüğüne dikkat edilmelidir.

Dehidrasyon yetersiz ise şeffaflandırma ve infiltrasyon aşamaları da kötü olacağından ortası yumuşak, çamur gibi dokular elde edileceği gibi, aşırı dehidrasyon ise çok sert, kırılgan, zor kesit alınabilen dokular elde edilmesine yol açar.

Şeffaflaştırma



- Dealkolizasyon olarak da bilinir.
- Şeffaflandırıcı ajan olarak;
 - ✦ dehidrasyon maddesini temizleyebilen,
 - ✦ sertleştirici madde ile geçimli olabilen,
 - ✦ dokuya nazik davranabilen maddeler seçilmelidir.
- Şeffaflaştırıcı madde, dokudaki alkolle yer değiştirir. Böylece alkol ve sudan yoksun hale gelen doku, parafinin nüfuz etmesine elverişli hâle gelir.

Şeffaflaştırma



- Şeffaflaştırmada kullanılan maddeler:
- **1. HİDROKARBONLAR**
 - **Ksilen:**
 - ✦ En sık kullanılan şeffaflandırıcıdır.
 - ✦ Alev alabilen tehlikeli bir maddedir.
 - ✦ Doku uzun süre ksilende kalırsa sertleşme çok fazla olur.
 - **Toluen:**
 - ✦ Ksilene göre daha az sertleştirir, daha yavaş etkilidir.
 - **Benzen:**
 - ✦ Çok hızlı etkili olmasına karşın toksik ve karsinogen olduğu için kullanılmamaktadır.
- Kloroform:**
 - ✦ Daha yavaş etkilidir.
 - ✦ Özellikle tendon, kas ve uterus örnekleri için alternatif bir şeffaflandırıcı olarak bildirilmektedir.
- Trikloraeten**

Şeffaflaştırma

2. ESTERLER

1. N-Bütül asetat
2. Metil benzoat ve metil salisilat

3. TERPENLER

○ Limonen:

- ✦ Son yıllarda popüler bir temizleyici ajan olarak kullanılmaktadır.
- ✦ Ksilene göre dokuları daha az sertleştirir ve parafınle daha uyumludur.

○ Sedir ağacı yağı

○ Terpinol

Aşırı dealkolizasyon doku proteinlerinin denatürasyonuna yol açar ve bunun sonucunda mikrotomda zor kesit alınır. Yetersiz dealkolizasyon ise boyanma kusurlarına ve bundan kaynaklanan yanlış morfolojik değerlendirmelere yol açar.

Şeffaflaştırma ajanında aranan özellikler:

- Alkolü temizlemeli
- Erimiş gömme maddesi ile geçimli
- Dokuya nazik
- Güvenilir
- Ekonomik olmalı
- Isı, basınç ve vakuma dayanıklı
- Nontoksik olmalı

Sertleştirme (İnfiltrasyon)

- Dokuların mikrotomla kesilebilmesi için gerekli bir aşamadır.
- Bu aşamada amaç dokudaki solüsyonların tutucu bir madde ile yer değiştirmesidir.
- İnfiltrasyon veya impregnasyon da denir. Doyurma, doldurma anlamına gelir.

Sertleştirme

- Sertleştirme için kullanılan maddeler:

- **Parafin:**

- ✦ En yaygın kullanılan sertleştirici maddedir.
- ✦ Kolay kullanılabilir olması, dokuya az zarar vermesi, kısa sürede bloklanabilmesi ve dokuya özel işlemlerin yapılmasına olanak sağlaması nedeniyle tercih edilmektedir.
- ✦ Petrolden elde edilir. Patolojide kullanılabilmesi için bazı maddeler ilave edilir.
 - Balmumu: Kristal boyutu yapışmayı artırır.
 - Kauçuk: Kırılganlığı azaltır, kolay ve seri kesit sağlar.
 - Diğer mumlar: Yumuşak kıvam sağlar.
 - Plastikler: Sertlik ve desteği artırır.

- Parafin:

- ✦ Patolojide rutin işlemlerde erime noktası 55-58°C'dir.
- ✦ İyi bir infiltrasyon için:
 - Doku parafinde optimum sürede kalmalıdır. Fazla kalırsa sertleşme ve büzüşmeler olur.
 - Parafinin erime derecesi her gün kontrol edilmelidir.
 - Doku takibinde üç parafin kabı bulunmalı, son parafin kabında şeffaflandırıcı ajan kokusu alınmamalıdır. Bunun için kaplardaki parafin sık sık değiştirilmelidir.
 - Takip süresini kısalttığı için parafin ile infiltrasyon genellikle vakum ile yapılmaktadır. Ancak küçük dokularda vakum ve ısı dokulara zarar verebildiğinden küçük ve büyük dokular ayrı ayrı takip edilmelidir.
 - Vakum 400 mmHg basıncını geçmemelidir.

Sertleştirme

- Alternatif sertleştirici maddeler:

- **A. Mumlar**

1. Suda çözünen mumlar
2. Ester yapısında mumlar
3. Poliester yapısında mumlar (Polietilen glikol-PEG)
4. Mikrokristalli mumlar

- **B. Reçine yapısında mumlar:**

1. Akrilik reçineler
2. Epoksi reçineler
3. Üre-formaldehit



- Agar
- Jelatin
- Selloidin





- Alternatif maddeler içinde selloidin nöropatolojide ve bazı araştırmalarda minimal hücrel hasar oluşturmaları nedeniyle tercih edilmektedir.
- Epoksi reçineleri elektronmikroskopik incelemelerde kullanılmaktadır.
- Akrilik reçinelerin sert dokularda iyi bir ortam oluşturduğu için kullanılabileceği bildirilmektedir.

Doku Takibi İşlemi



- Patoloji laboratuvarlarında doku takibi üç şekilde yapılmaktadır.

1. Otomatik doku takibi
2. Manuel doku takibi
3. Mikrodalga ile doku takibi



Otomatik Doku Takibi

- Genel olarak açık ve kapalı sistem cihazlar olmak üzere ikiye ayrılırlar.

- **Açık sistem cihaz ile otomatik doku takibi:**

- ✦ Sepet içindeki dokuların kimyasal solüsyon kaplarına otomatik transferi ile yapılır.
- ✦ Bu cihazlarda genellikle 9-10 kimyasal solüsyon kabı ile 2-3 parafin kabı bulunmaktadır.
- ✦ Marka ve modellerine kaset kapasiteleri 30-110 arasında değişmektedir.
- ✦ Bu takip sisteminde çalkalama hareketi dikey veya daireseldir.



- Açık Sistem Doku Takibi
- ☐ Kimyasal solüsyonlar sabit, sepet içindeki dokuların transferi
- ☐ 9-10 kimyasal solüsyon kabı, 2-3 parafin kabı
- ☐ 30-110 kaset kapasite
- ☐ Çalkalama hareketi dikey veya dairesel
- Açık sistem- rutin gecelik doku takip örneği
- Alkolik formalin 3 saat
- Alkolik formalin 1 saat
- Alkolik formalin 1 saat
- Alkol %95 1 saat
- Alkol %95 1 saat
- Absolu alkol 1.5 saat
- Absolu alkol 1.5 saat
- Ksilen 1 saat
- Ksilen 1 saat
- Parafin 1/2 saat
- Parafin 1.5 saat
- Parafin 1 saat
- Toplam:15 saat

Otomatik Doku Takibi

○ **Kapalı sistem cihaz ile otomatik doku takibi:**

- ✦ Dokular sabit kalıp, kimyasal sıvılar transfer olur.
- ✦ Burada 10-12 solüsyon kabı, 3-4 parafin kabı bulunmaktadır.
- ✦ Çalkalama hareketi gel-git şeklindedir.



• **Kapalı sistem, rutin takip örneği**

- Formalin, %10 2 saat(35°C, vakum).
- Alkolik formalin 1.5 saat
- Alkolik formalin 1 saat
- Alkol %95 1 saat(vakum)
- Alkol %95 45 dakika
- Absolü alkol 45 dakika(vakum)
- Absolü alkol 1 saat
- Ksilen 1 saat
- Ksilen 1 saat(vakum)
- Parafin 1/2 saat
- Parafin 1 saat
- Parafin 1saat(vakum)
- Toplam:13.5 saat



Küçük biyopsiler için doku takip protokolü örneği (kapalı-açık)

- Alkol, %70 15 dakika
- Alkol, %95 15 dakika
- Alkol, %95 15 dakika
- Absolu alkol 15 dakika
- Absolu alkol 15 dakika
- Ksilen 15 dakika
- Ksilen 15 dakika
- Parafin 15 dakika
- Parafin 15 dakika
- Parafin 15 dakika

Toplam süre 2,5 saat



Mikrodalga ile doku takibi

- Mikrodalga fırınlar histoteknolojide ilk kez Moon ve arkadaşları tarafından 1987 yılında kullanılmıştır.
- Bu yöntem dokuların tamponlu formalin içinde ısıtılması, bunu izleyerek tek basamak şeklinde etanol ile dehidrasyonu, isopropanol ile temizlenmesi ve parafinizasyon aşamalarını içermektedir.
- Ülkemizde de bu yöntem ilk kez Umar ve Pabuçcuoğlu¹¹ tarafından uygulanmıştır.

Mikrodalga doku takip örneği (Umar– Pabuçcuoğlu)

- Tamponlu formalin 5 dakika (%100 güçle)
- Alkol, %70 90 saniye
- Alkol, %80 90 saniye
- Alkol, %90 90 saniye
- Absolu alkol 90 saniye
- İsoopropanol 60 saniye
- Ksilen 45 dakika (etüvde sıcak ksilen)
- Parafin 60 dakika

Toplam süre 117 dakika

Mikrodalga ile Doku Takibi

- Bu yöntem dokuların,
 - tamponlu formalin içinde ısıtılması,
 - tek basamak şeklinde etanol ile dehidrasyonu,
 - isopropanol ile temizlenmesi,
 - parafinizasyon aşamalarını içermektedir.



- Büyük dokular için optimal zamanı ayarlama olanağı tanıdığı, küçük dokuların takip süresini kısalttığı ve daha ekonomik olduğu için tercih edilebilir.
- Ayrıca, takip makinesinin bozuk ya da elektriğin kesik olduğu zamanlarda da bu yöntem kullanılır.
- El ile doku takibi dokunun en az zarar gördüğü takip yöntemidir.
- İnfiltrasyonun yeterli olması için kimyasal solüsyonların hacmen dokunun en az 50 katı olması gereklidir.

Manuel Doku Takibi



- Doku, bir önceki işlemde yapısına diffüze olan kimyasalı bir sonraki basamaktaki solüsyon kabına taşır.
- Bu nedenle doku takibinde kullanılan solüsyonlar en az iki kapta hazırlanır.
- Basamaklardaki son kimyasalların küçük miktarda bile bulaşı olmayacak şekilde temiz olması gerekir.

Manuel Doku Takibi



- Takibi yapılacak dokunun türüne ve büyüklüğüne göre;
 - Basamaklarda kullanılacak kimyasal hacmine,
 - Kaç adet solüsyon basamağı oluşturacağına,
 - Basamaklarda kimyasallara uygulanacak ısı derecesine,
 - Basamaklarda bekleme süresine,
 - Doku takip süresine karar verilir.

Manuel Doku Takibi



- Kimyasal solüsyonlar hazırlanır.
 - Dehidrasyon işlemi için %70'lik, %90'lık ve %100'lük alkol hazırlanır.
 - Şeffaflandırma işlemi için ksilen hazırlanır. En az iki ksilen kabında planlanır, doku büyüklüğüne göre bu sayı daha fazla olmalıdır.
 - Sertleştirme işlemi için kararlaştırılan miktar kadar katı parafin uygun bir kaba konarak etüvde erimesi için bırakılır.

Manuel Doku Takibi



- Doku kasetleri, uygun bir sepete konur.
- Programlanan süreye uyarak dokular solüsyonlarda sırayla bekletilir.
- Doku sepeti, son parafinde bekletme süresi bitiminde parafinler iyice süzdürüldükten sonra çıkarılır ve doku takibi sonlandırılır.
- Son parafin solüsyonunda ksilen kokusunun alınmaması gerekir. Ksilen kokusu varsa dokular taze parafin kabında bir süre daha bekletilir.

Doku Takibinde En Sık Karşılaşılan Problemler



Açık sistem otomatik doku takibinde

- Kaset sepeti yanlışlıkla ilk önce parafin kabına konabilir.
 - Çözüm, sepetin hemen parafinden çıkarılması, parafin sertleştikten sonra dokulardan sıyrıp temiz kasetler kullanılarak takibin yeniden başlatılmasıdır.
- Takip bittikten sonra dokular tekrar ilk solüsyon kabına (fiksatif) girebilir.
 - Çözüm %95 etanol aşamasından sonraki takip prosedürünün uygulanmasıdır.

Doku Takibinde En Sık Karşılaşılan Problemler



- Makinada kasetler herhangi bir nedenle havada kalabilir.
 - Kasetlerin havada kaldığı süre kısa ise makinenin kaldığı yerden takibe devam edilir.
 - Bu süre uzunsa ve özellikle de parafin öncesi ise dokular %50 kısım su, %30 kısım absolü alkol, %20 kısım 0.05 sulu sodyum karbonat solüsyonu ile rehidre edilmelidir. Bu solüsyonda 8-12 saat tutulan dokuların yeniden takibine başlanır.
- Kimyasal solüsyonların seviyeleri yetersizliği nedeniyle dokularda kuruma olabilir.
 - Çözüm, yukarıda tanımlanan rehidrasyon solüsyonunun aynı sürede uygulanarak yeniden takibe başlanmasıdır.

Doku Takibinde En Sık Karşılaşılan Problemler



- Takip solüsyonlarının birbirine karışması sonucunda yetersiz dehidrasyon, şeffaflama veya infiltrasyon söz konusu olabilir.
 - Solüsyonlar yenilenip alkollerden başlayarak tekrar takip yapılır. Bu durumun en baştan önlenmesinin yolu ise takip solüsyonlarının periyodik değişimlerinin yapılmasıdır.

Doku Takibinde En Sık Karşılaşılan Problemler



Kapalı sistem otomatik doku takibinde

- Dehidrasyon %70'den daha konsantre alkol ile başlarsa, formalin solüsyonunda kullanılan tamponlama tuzları presipite olarak filtreleri tıkayabilir.
 - Bu durumun tek önlemi, tamponlu formalin kullanılıyor ise dehidrasyonun %70 alkol ile başlamasıdır.

Doku Takibinde En Sık Karşılaşılan Problemler



- Çinko formalin kullanılıyor ve $\text{pH} > 7$ ise cihazın borularında çökelti oluşabilir.
 - Bu durumun çözümü dilüe asetik asit solüsyonu (%5-20) ile temizleme yapılması ve pH ölçümlerine gereken özenin gösterilmesidir.
- Takip cihazlarının kapağında yoğunlaşan formalin parafin infiltrasyonunu engeleyebilir.
 - Buna önlem olarak makinalara periyodik bakım ve temizlik yapılmalıdır.

Doku Takibini Etkileyen Faktörler



- Doku, doku takip sıvılarına daldırıldığında doku sıvısı ve çevresindeki sıvı arasında karşılıklı yer değişimleri olur ve bunu birçok faktör etkiler.
 - Ajitasyon: Takip sıvılarının karıştırılması veya dokuların sıvı içinde dikey ve yatay hareketler yaptırılmasıdır.
 - ✦ Çok düşük ajitasyon hızı etkisizken yüksek ajitasyon uygulaması yumuşak ve gevşek dokularda harabiyete yol açabilir.
 - Isı: Isı penetrasyon hızını artırırken, soğuk azaltır.

Doku Takibini Etkileyen Faktörler



- Viskozite: Kullanılan sıvıların viskozitesi, dokulara penetre olma hızını etkiler, molekül büyüdükçe viskozitesi artar ve penetrasyon hızı azalır.
- Vakum: Azaltılmış vakum, erimiş parafinle dokuların impregnasyonunda çok kullanılmaktadır. Dokudaki hava kabarcıkları bu yolla uzaklaştırılır.
- Süre: Takip süresi laboratuvar çalışanlarının deneyimlerinin yanında takibi yapılan doku özellikleri ve takibi etkileyen faktörlerin bulunuşlarına göre belirlenir. Bunlar:
 - ✦ Doku tipi
 - ✦ Büyüklük ve kesit kalınlığı



- Takip işlemlerinde görünür bir sorun olmamasına karşın bazen yine de iyi sonuç alınamayabilir.
- Bu çerçevede en sık görülen durum dokuların ortalarının yumuşak çevresinin ise sert olması ve iyi kesit almaya olanak tanımamasıdır.
- Büyük olasılıkla kalın parça örneklenmesinden kaynaklanan bu olumsuzluğu gidermek için dokular yeniden kasetlere yerleştirilip, ksilende 20-30 dakika parafini uzaklaştırmak için tutulur. Daha sonra birbirini izleyecek şekilde dehidrasyon/şeffaflama için 30-90 dakika tetrahidrofuranda, 10 dakika ksilende ve her biri 30-45 dakika sürecektir. Bu şekilde 2-3 parafin istasyonunda tutulup bloklanır.