



**SAĞLIK HİZMETLERİ MESLEK
YÜKSEKOKULU**

PATOLOJİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ PROGRAMI


PLT113-GENEL HİSTOTEKNOLOJİ-I

Öğretim Görevlisi Dr. Nurhan ÇON

**DOKU TESPİTİ VE TESPİTE
ETKİ EDEN FAKTÖRLER**

PLT113-GENEL HİSTOTEKNOLOJİ-I

Hafta-4



Dokuların Hazırlanması

- Dokuların incelenmesinde kullanılan en yaygın yöntem, histolojik kesitler hazırlayarak ışık mikroskobuyla incelemektir.

- Genellikle dokular, içinden ışığın geçişine olanak tanımayacak kadar kalındır.



- Mikrotom adı verilen aletlerle, dokular ince kesitler halinde dilimlenir ve bir dizi işlemden geçirilerek hazırlanır.



Histoloji Tekniği

Histolojik preparat hazırlama, dokuları mikroskobik incelemeye hazır hâle getirmektir. Doku, fiksasyonla başlayan bir serisi takip eden serisi işlemler sonunda doku preparatları hâline getirilir. Bu işlemler sırayla aşağıda verilmiştir.

- Fiksasyon (tespit)
- Doku takibi
 - *Dehidrasyon (suyunu alma)
 - *Saydamlaştırma (clearing)
 - *Sertleştirme (infiltrasyon)
- Parafin bloklama /parafin (embedding)
- Kesit alma (sectioning)
- Sudan alma
- Rutin boya (staining)
- Kapatma/montaj (mounting)

Doku Tespiti (Fiksasyon)

- Patoloji laboratuvarına gelen biyopsi dokularında hastadan alındıktan sonra çeşitli değişiklikler olur.
- Hücrede sindirim organeli olarak görev alan lizozom enzimleri, hücreye zarar vermesini engelleyen bir zarla çevrilidir. Hücre ölümünde, lizozom zar yapısı bozularak sindirim enzimleri hücre içerisine yayılıp bütün hücrenin sindirilmesine sebep olur. Bu olaya, kendini eritme anlamına gelen otoliz adı verilir.
- Ayrıca doku hücrelerinde bulunabilecek bakteriler de hücrenin parçalanmasına neden olur.
- Bu sayılan değişikliklere, ölüm sonrası bozulmalar (post mortem değişiklikler) adı verilir. Ölüm sonrası bu tür değişiklikler meydana gelmiş hücreler, normal görünümlerini kaybederek incelenmesi imkansız hale gelir.

Dokularda histolojik bir inceleme yapılmasındaki temel amaç; dokunun yapısal öğelerini, canlılık özelliğini taşıdığı evreye hastadan alındığı anki duruma (in vivo) en yakın şekilde koruyup sabitleştirerek dokunun temel yapı taşlarını anlamaktır. Dokuyu ölüm sonrası meydana gelecek değişikliklerden korumak için tespit işlemi yapılır.

TESPİTİN AMACI

- Tespit; protoplazmadaki protein, lipid, karbonhidrat ve diğer maddeleri koagüle veya presipite ederek mikroskopik kesit hazırlanıncaya kadar dokuyu karşılaşılabilecek reaksiyonlara karşı dirençli hale getirir.
- Tespit işlemi; dokuyu hücresel enzimlerin neden olduğu otoliz ve bakteri ya da mantarlarca oluşturan dekompozisyonundan korur, enfeksiyöz ajanları inaktive eder ya da öldürür, dokuyu sertleştirir ve doku komponentlerini stabilize eder.

Doku Tespiti (Fiksasyon)

- Tespitin amacı;
 - Hücrelerin biçimini bozmadan, içeriklerini eritmeden muhafaza etmek,
 - İncelenecek dokunun, görülmek istenen yapısını canlı durumuna en yakın şekilde korumak,
 - Kolaylıkla difüzyona uğrayan maddelerin kaybını önlemek,
 - Doku takibinde büzölmelerini önlemek,
 - Güzel, berrak, temiz bir boyama elde ederek incelemeyi sağlamaktır.

- Tespit için kullanılan ajanlar kimyasal maddelerdir. Bunlar **fiksatif** olarak adlandırılır.

İyi bir fiksatifin dokuda

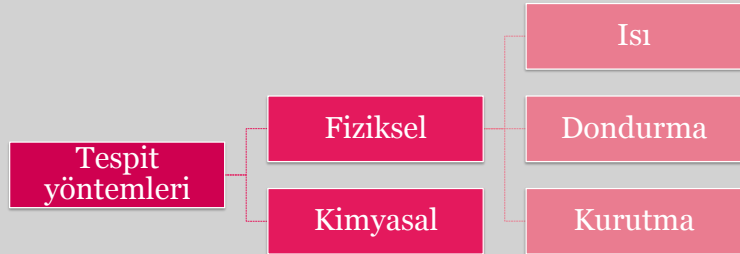
- öldürücü,
- nüfuz edici ve
- sertleştirici nitelik taşıması gerekir.

Histolojik çalışmalarda her basamak bir sonraki basamağı ve finaldeki en son mikroskopik incelemenin kalitesini direkt olarak etkiler. Histolojik çalışmaların tespit ile başlanması bu işlemi daha da önemli hâle getirir. Kullanılacak tespit yönteminin incelenecek dokuya ve boyama yöntemine göre uyumlu seçilmesi gerekir.

Tespit kaliteli bir kesit elde edilebilmesi için çok gerekli bir basamaktır. Bununla birlikte, tespit dokular üzerinde istenmeyen etkileri de söz konusudur. Bunlar arasında, protein yapısındaki değişimler, doku komponentlerinin çözünmesi, dokunun büzülmesi ve nükleik asitlerin degradasyonu gibi etkiler yer alır.

Dokuların tespitinde en önemli reaksiyonlar proteinleri stabilize eden reaksiyonlardır. Fiksatiflerin, proteinler arasında çapraz bağlar oluşturarak jel meydana getirme ve her şeyi canlı durumdaki ilişkileriyle koruma özelliği bulunduğu varsayılmaktadır. Bu bağlamda, çözünabilir proteinlerin yapısal proteinlere sabitlenerek çözünmez hale geldiği bildirilmektedir. Tespitin lipidler üzerindeki etkisi konusunda çok fazla bilgi mevcut olmamakla birlikte, geleneksel tespit ve doku işlemi lipidlerin kaybına yol açtığından frozen kesitler gerekmektedir. Glikojen-mukopolisakkaritler ve tespit konusunda en önemli nokta glikojenin suda eriyen bir madde olması nedeniyle alkol tespitini gerektirmesidir. Müsinler için spesifik tespit modelleri gerekmez.

Doku Tespiti



Fiziksel Yöntemler

- Isı
 - Büyük parçaların tespitinde kullanılır.
 - Proteinler denatüre olur, yağlar erir.
- Dondurma
 - Hızlı tanıda kullanılır.
 - Çözünür maddelerin kaybını, hücresel yapıların yer değiştirmesini, kimyasal değişiklikleri, protein yıkımını en aza indirir.
- Kurutma
 - Kan ve kemik iliği yaymalarında kullanılır.

Kimyasal Yöntemler

- En fazla kullanılan yöntemdir.
- Doku tespitinde kullanılan sıvı haldeki kimyasal madde ya da karışımlara fiksatif veya fiksator adı verilir.
- Tespit teknikleri:
 - İmmersiyon (daldırma)
 - Perfüzyon (basınç uygulama)

İmmersiyon



- Geniş ağızlı ve ağzı iyi kapanan kaplar içerisinde tespitin yapılmasıdır.
- Tespit edilecek organ/doku örneklerinin bütün yüzeylerinin solüsyonla doğrudan temasının olması gerekir.
- Beyin gibi yumuşak dokuların tespitinde, organın kaba asılarak zemine dokunmaması ve her yüzünün tespit solüsyonuna temasının sağlanması gerekir.
- Tespit süresince kapların ara ara çalkalanması ve karıştırılması gerekir.

Perfüzyon



- Deneysel çalışmalarda, anestezi altındaki hayvanın kanının boşaltılarak hangi organdan örnek alınacak ise o organın atardamar sisteminden, vücut ısısında, düşük basınç altında izotonik solüsyon verilip damar sisteminin yıkanmasıdır.
- Daha sonra tespit solüsyonu aynı yolla verilerek organ çıkarılır ve tespit solüsyonuna alınır.

FİKSATİFLERİN GENEL İŞLEVLERİ

- İyi bir histolojik preparat için, “uygun bir fiksatifle yeterli miktarda tespit” en önemli basamaktır.
- Uygunsuz bir fiksatifle ya da yetersiz şekilde tespit edilmiş dokularda en başta kesit ve boya kalitesi olmak üzere çeşitli laboratuvar tekniklerinin kalitesi son derece olumsuz olarak etkilenecektir.
- Fiksatiflerin işlevleri kısaca şöyle özetlenebilir :
 1. Organlar ya da organ kısımlarını doku işlemi sırasında değişikliğe uğramayacak mikroanatomik yapı içerisinde tutmak,
 2. Otoliz ve pütrefaksiyon (çürüme) gibi değişiklikleri önlemek,
 3. Hücredeki yapıtaşlarını çözünmez hale getirmek.

İyi Fiksatifin Özellikleri

Bu nedenle, dokuları tespit etmek ve otoliz ve pütrefaksiyonu önlemek için tespit solüsyonunun;

- Dokuyu büzmemesi, şişirmemesi ve eritmemesi,
- Enzimleri inaktive etmesi,
- Dokudaki mikroorganizmaları öldürmesi,
- Hücre içine çabuk difüze olması,
- Hücre içeriğini erimeyen maddeler biçiminde ve çok iyi çöktürmesi,
- Dehidratan, şeffaflandırıcı, sertleştirici ve boyayıcı ajanlarla karşılaştığında dokunun orijinal şeklini korumasını sağlayacak şekilde doku elemanlarını değişikliğe uğratması beklenir.

İyi Fiksatifin Özellikleri

- Burada hemen belirtmek gerekir ki, her türlü amaca hizmet edebilen tek bir fiksatif bulunmamaktadır.
- Dolayısıyla farklı fiksatiflerin kullanımı konusunda genel bir bilgiye sahip olmak çok önemlidir.
- Tespit solüsyonları genel olarak fiksatif maddeler, su ve tampon çözeltilerinden meydana gelir.
- Ancak, farklı amaçlar doğrultusunda bazen fiksatiflere ek maddeler de konulabilmektedir.

Tespite Etki Eden Faktörler

- Tespit solüsyonunun amaca göre seçimi
- Tespitin solüsyonunun pH'sı
- Tespitin solüsyonunun sıcaklığı
- Fiksatiflerin penetrasyonu
- Fiksatifin osmolalitesi
- Tespit solüsyonunun Miktarı
- Tespitin süresi

Tespit Solüsyonunun Amaca Göre Seçimi

- Örneğin; suda hazırlanmış bir fiksatif dokudaki glikojeni, alkolde hazırlanmış bir fiksatif ise lipitleri eriteceğinden söz konusu maddelerin araştırılmasında kullanılmaz.
- Nükleus ya da kromozomlar incelenecekse asit fiksatifler çok sık kullanılır.
- Aseton, formalin ve glutaraldehit en az denatürasyona neden olduklarından ve enzimleri de iyi koruduklarından enzim etkinliğini araştırmalarında kullanılır.

Tespit Solüsyonunun pH'ı

- Çeşitli fiksatiflerin pH değerleri değişkenlik gösterir. Genel olarak hidrojen iyonu konsantrasyonu uygun bir tampon ile fizyolojik sınırlar içerisinde tutulur. Bunun için çeşitli tampon sistemleri mevcuttur. Tatminkâr bir tespit pH6 ile 8 arasında gerçekleşir.
- Genellikle hücre çekirdek ve sitoplazması birbirine zıt pH değerlerinde iyi sonuç verir.
- pH asit olduğunda; çekirdek sitoplazmaya göre daha iyi korunur.
- pH alkali olduğunda; sitoplazma çekirdeğe göre daha iyi korunur.

Tespitin solüsyonunun sıcaklığı

- Geleneksel olarak cerrahi materyallerin tespiti oda sıcaklığında gerçekleştirilir. Bunun nedeni oda sıcaklığında otolizin daha yavaş geliştiğinin ve difüzyonun ise daha optimal gerçekleştiğinin düşünülmesidir.
- Ancak, çeşitli kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi tespitin de daha yüksek sıcaklıklarda hızlandığı bir gerçektir.
- Buna karşın sıcaklığın arttırılmasının otolizi hızlandırabileceği ve bazı antijenlerin zarar görmesine yol açabileceği unutulmamalıdır.

Fiksatiflerin penetrasyonu

- Tahmin edilebileceği gibi, bu önemli bir konudur. Penetrasyon nispeten yavaş bir işlem olduğundan, tatminkâr bir tespit için küçük boyutlu ya da ince doku örneklerine gereksinim vardır.
- Fiksatiflerin dokulara difüzyonunda, penetrasyon derinliğinin (d), fiksatifte geçen sürenin kare köküyle orantılı olduğu bulunmuştur ($d = K\sqrt{t}$). Burada K sabiti fiksatifin difüzyon yapabilme katsayısı olup her bir fiksatif için farklıdır.
- Yani 1 saat içerisindeki difüzyon katsayısı, fiksatifin dokuya difüzyonunun milimetre cinsinden mesafesidir.
- En sık kullanılan fiksatif olan % 4'lük formalin için dokudaki bu katsayı 0.78, buna karşın etanol için 1,0'dir.
- Fiksatiflerin difüzyon yapma yeteneği oldukça üniform dokularda ölçüldüğünden farklı dokularda bu değerler daha düşük çıkabilir.
- Ayrıca, unutulmamalıdır ki, tespit yalnızca fiksatifin dokuya difüzyonuna bağlı olmayıp, aynı zamanda doku komponentleriyle reaksiyon oranına da bağlıdır.

Tespit Solüsyonunun Osmolalitesi

- Hipertonik solüsyonların hücre büzüşmesine, izotonik solüsyonların hücre şişmesine neden olduğu gösterilmiştir.
- En iyi sonuçların ise hafifce hipertonik solüsyonlarla (400-450 mOsm) elde edildiği bulunmuştur.

Tespit Solüsyonunun Miktarı

- Tespit solüsyonu ile bu solüsyon içerisine konulacak doku örneğinin oranı önemlidir.
- Tespit solüsyonuna fazla örnek konursa solüsyon içindeki kimyasallar yetersiz kalır ve uygun bir tespit oluşmaz.
- Genellikle 1:50 - 1:100 oranı ile iyi sonuçlar alınır.

Tespit Süresi

- Yukarıda sıralanan diğer faktörlerin tümüyle yakından ilişkilidir. Dolayısıyla tespit süresinin saptanmasında, tanımlanan her bir faktörün mutlaka göz önünde tutulması gerekir. Ayrıca, bazı fiksatiflerde sürenin gerekenden fazla uzatılması dokuda sertleşme, büzüşme veya kırılabilirliğe neden olabilir.
- Çeşitli faktörlere bağlıdır:
 - **Örneğin büyüklüğü**
 - **Tespit solüsyonunun difüzyon gücü:** Solüsyonun cinsine ve tespit edilen organ/doku örneğinin yapısal ve fonksiyonel özelliğine bağlıdır.
 - **Ortam ısısı:** Ortam ısısı düşük olduğunda, difüzyon hızı azalacağından tespit de gecikir.
 - **Amaç**
 - **Doku örneğinin yapısı:** Embriyonal dokular ve yumuşak dokular daha kısa sürede tespit edilirken, sert dokular ya da organ kapsülleri daha uzun sürede tespit edilir.

- Bu arada, son olarak tespit işleminin bazı artifaktlara yol açabileceği de akılda tutulmalıdır.
- Hücre içi ve dışı kompartmanlarda oluşabilecek hacim değişiklikleri ve asidik formalinde tespit edilen dokuların kesitlerindeki formalin pigmenti bu artifaktlara örnek olarak verilebilir.



- Sekonder tespit (post fiksasyon): Belli durumlarda dokular ardışık olarak ikinci bir fiksatifle tespit edilebilir. Buna **postfiksasyon** adı verilir.
- Örneğin formalinde tespit edilmiş bir doku civa klorür-formalin solüsyonunda sekonder bir tespiti tabi tutulabilir. Bu sayede kesit ve boya kalitesi yönünden daha iyi sonuçlar elde edilebilir.

Patoloji Laboratuvarına Gelen Materyallerin Kontrol ve Kabulü



- Fiksasyon içinde gelen parçaların fiksasyon miktarları kontrol edilir.
 - Materyallerin konulduğu kapların, tespit solüsyonunun buharlaşmasını ve dökülmesini önleyecek şekilde kapaklı olması gerekir.
 - Materyal kaplarının ağız genişliği parçayı kolaylıkla çıkarılabilecek büyüklükte olmalıdır.
 - Dokunun, materyal kabında sıkışmamış ve yüzer durumda olması gerekir.
 - Eksik fiksatif bulunan kaplara yeterince fiksatif ilave edilir. Fiksasyon miktarı, parça büyüklüğünün 10 ile 20 katı kadar olmalıdır. Parçanın tümü fiksatif içinde kalmalıdır.

Patoloji Laboratuvarına Gelen Materyallerin Kontrol ve Kabülü

- Fiksatif içindeki materyaller oda sıcaklığında bekletilir.
- Tespit sırasında fiksatif zaman zaman çalkalanarak dokunun hareket etmesi sağlanır.
- Tespit süresince kaplar karanlıkta bekletilir.
- Fiksatif yüzeyine çıkmış büyük organ dokularının üzeri gazlı bezle örtülerek fiksatifle temas etmesi sağlanır.

Patoloji Laboratuvarına Gelen Materyallerin Kontrol ve Kabülü

- Özellikle yağlı dokular, tespit solüsyonu üzerinde yüzer durumda ise üzeri gazlı bezle örtülür.
- Büyük materyaller genellikle 24 saat fiksasyon eriyiği içerisinde bekletilir. Endoskopik, iğne biyopsisi, punch vb. küçük parçalar fiksasyonda 3-4 saat bekletilerek çalışmaya alınır.
- Ön tanılara göre bazı örneklerin fiksasyon süresi uzatılır (kist hidatik, tüberküloz...).