

Maserasyon İle Mikrodiseksiyon Tekniği ve Bunun Önemi (ÖNBİLDİRİ)

Dr. İbrahim Öztekin* / Dr. Aydın Akkaya**

Histolojistler ve patolojistler dokuları mikroskopik olarak incelerken, dokuyu meydana getiren her bir ünitenin tümünü aynı anda görme olanağına sahip değildirler. Örneğin, bir cilt preparasyonunda deri eklemlerinin belirli alanları, bir kas preparasyonunda kas hücrelerinin belirli yerlerinden geçen kesitler, yine bir böbrek preparasyonunda böbreği oluşturan ünitelerin belirli yerlerinden geçen kesitler göz önüne serilir. Bu şekilde hiçbir zaman bir kıl-yağbezi ünitesi, tek bir kas hücresinin başından sonuna tümü veya tek bir nefronun başlangıcından bitimine kadar olan bölümleri görülemez ve patolojik lezyonun tam yeri bazen belirlenemez.

Bu nedenle birçok organa maserasyon tekniği uygulanarak, mikrodiseksiyonla elde edilen ünitelerin incelenmesinde büyük yarar vardır. Bu teknikle ortaya çıkan üç boyutlu görüntüler en ufak bir lezyonun lokalizasyonunu belirlemede kolaylıklar sağlamaktadır. Yine bu yöntemle mikroskopik gözlemler ile makroskopik gözlemler arasındaki boşluğu kapatacak bir köprü kurulmuş olur. Bu yöntemle ayrıca, nicelik ve nitelik yönünden de çalışmalar yapılabilir.

Kaynaklardan edinilen bilgilere göre ilk kez 1862'de Henle, böbreği parçalayarak, değişik aşındırma teknikleriyle nefronun topoğrafisini ve şeklini ortaya koydu. Sonra bunu Peter (1909), Huber (1911), Traut (1923), Stewart (1927), Marshall-Grafflin (1928) gibi araştırmacıların çalışmaları ve diğerleri takip etti. Bu çalışmalara Oliver'in katkıları çok oldu. Oliver normal nefron denemelerinden başka, birçok patolojik durumlarda nefronun yapısını ve tümünü inceleyerek değerlendirdi.^{3,4} Bu çalışmalar günümüze kadar süregelerek, nefronun patolojisindeki ayrıntıları tamamen gün ışığına çıkardı.

* Asist. Dr. G. A. T. A. Patolojik Anatomi Enstitüsü Asistanı Tbp. Kd. Yzb.

** Prof. Dr. G. A. T. A. Patolojik Anatomi Enstitüsü Direktörü Tbp. Kd. Alb.

Mikrodiseksiyona Uygun Materyelin Hazırlanması

Bu yöntem hem nekropsi, hemde biyopsi materyellerine insanlarda ve hayvanlarda uygulanabilir.

Masere edilecek dokular en az bir hafta % 10'luk nötral formalin fiksasyonunda bekletilir. Dört ile beş hafta kadar formalin fiksasyonunda beklemiş dokuların mikrodiseksiyonu daha iyi yapılabilir. Yine yıllarca formalinde kalmış dokularda da uygulanabilir.¹

Maserasyon

İşlemin en güç tarafı budur. Maserasyon optimal düzeye ulaştığını tayin etmek biraz da tecrübeye dayanır. Biz enstitümüzde uzun süre böbreğin maserasyonu ve mikrodiseksiyonu üzerinde çalışmalar yaptık. Sonra bu çalışmalarımızı diğer organlara da yönelttik. Bu nedenle daha çok, tekniğin böbreğe uygulanmasından söz edilecektir. Diğer uygulamaların bundan hiçbir ayrıcalığı yoktur.

Formalinde tesbit olmuş böbreğe frontal bir kesit yapılır. Kesit yüzeyinden korteks, medulla ve papillayı içerecek şekilde 0,2 x 1,2 x 2 cm. boyutlarında kama şeklinde örnekler çıkarılır.¹ Bu örnekler değişik büyüklükte de olabilir. Örnekler kısa bir süre suda yıkanır. Sonra petri kutuları veya ufak cam kavanozlara alınır. Üzeri tamamen örtülünceye kadar, spesifik gravitesi 20°C da 1150-1160 olan konsantre hidroklorik asit dökülür. Ağzı kapatılır. 20-22°C oda ısısında 24 ile 40 saat bekletilir. Bu süre içinde doku kesitleri yumuşar ve ezilebilir bir hale gelir. Maserasyon için konsantre hidroklorik asitten başka konsantre nitrik asit, sülfürik asit, asetik asit, sodyum hidroksit, çeşitli enzimler: papain, pepsin, tripsin, hyaluronidaz ve klostridium welchii toksini denenmiştir.³ Biz uygulamalarımızda asitlerin ve sodyum hidroksit içinden en uygununun konsantre hidroklorik asit olduğunu gördük. Maserasyon işleminde kullanılan bütün bu adı edilen maddeler dokularda doğrudan doğruya ara bağ dokusuna etki ederek, onu eritip, ortadan kaldırmakta ve basal membranla çevrili olan bütün parankimi meydana koymaktadır. Böylece, parankima mikrodiseksiyonla sağlam olarak ayrılabilir. Kısıtlı zaman aşıldığında (24-40 saat), tüm doku tamamen erimekte ve ortadan kalkmaktadır. Bu nedenle ortamın ısı ve zaman maserasyonun istenilen düzeye gelmesinde çok önemli olmaktadır.

Maserasyon daha sıcak bir odada veya etüvde de bekletilmek suretiyle hızlandırılabilir. Fakat bu mikrodiseksiyon sırasında bazı sakıncalar doğurur.^{1,3}

Maserasyonun tamamlandığı, dokunun bir iğne veya tahta çubukla kontroluyla anlaşılır. İğne veya çubuk, dokuyu kolayca ezilmekte-

dir. Bu, asitteki dokunun hafif çalkalanmasıyla da tecrübeli bir göz tarafından anlaşılabilir.

Ayrıca bu dokudan ufak bir parça koparılıp, disseke edilmeye çalışılarak da maserasyonun durumu kontrol edilebilir. Eğer bu ufak parça disseke edilemiyorsa 3-5 saat daha asitte beklemeesi gerekir. Maserasyon süresi genel olarak, örneğin büyüklüğüne ve materyeldeki fibroz doku miktarına bağlıdır.

Maserasyon işlemi tamamlandıktan sonra asit dökülür. Tabakta kalan kesit üç defa distile suyla yıkanır. Yıkamada, distile su tabağa damla damla tabak doluncaya kadar damlatılır. Sonra su dökülür. Dokudan asit ayrılır.¹

Asitli tabaktaki doku bir kepçe ile bozulmamasına dikkat edilerek, içinde distile su bulunan ikinci bir tabağa alınarak da yıkama işlemi yapılabilir.

Son yıkamada suya 1-2 damla 1/10'luk N.hidroklorik asit ilave edilir. Bu nefronun, mikrodiseksiyon sırasında iğnelere veya tabağa yapışmasını önler.⁵

Örnekler artık mikrodiseksiyona hazırdır. Ayrıca buz dolabında 2-4 gün kadar bozulmadan bırakılabilir.¹

Mikrodiseksiyon

Petri kutusunda, binoküler stereoskopik diseksiyon mikroskobu altında 10 ile 45 misli büyütme kullanılarak yapılır. Aydınlatma güneş ışığı veya kuvvetli lambalarla sağlanır. Distile suda 24 saat beklemiş dokuların mikrodiseksiyonu daha elverişlidir.

Dissektör olarak, iğne tutuculara takılmış dikiş iğneleri veya bildiğimiz iki yorgan iğnesi kullanılabilir.

Disseke edilecek kısım asıl ana parçadan ayrılır. Bu ayrılan parça kısım üzerindeki ufak bir kıvrıntı başlama noktası olabilir. Dikkatli hareketlerle diğer tüp yığınlarından tek bir tübüli ayrılır. Bu ayrılma esnasında tübüli veya glomerul kopabilir. O zaman koptuğu yerden devam ederek, tübülünün tamamının çıkarılmasına çalışılır veya yeni bir tübülünün ayrılması işlemi denir.^{1,3,5}

Monte Etme

Bir lâmelin karşılıklı iki kenarına 1 mm.den kalın olmamak üzere vazelin sürülür ve bir kenarda bekletilir. Sonra izole nefronun, üzerine alınacağı lâm 45° açıyla petri kutusuna daldırılır. Nefron iğneyle sürüklenerek kaldırılıp, lamın alt kenarından lam üzerine yukarı doğru kaydırılır. Su yüzeyine çıktıktan sonra da artık lâma yapışmış sayılır.

Lâm sudan çıkarılıp, ters çevrilerek, kenarda duran vazelinli lâmel üzerine kapatılır. Böylece nefron, iki tarafı açık bir bölmeye alınmış olur. Bundan sonra nefronun boyutlarını ölçme, boyama ve mikrofotografi uygulanması işlemlerine geçilebilir.^{1,3}

İzole nefron sudan çıkarıldıktan sonra düz bir lâma değil de godeli bir lâma veya saat camına da alınarak, çukur kısım distile suyla doldurulup, üzeri lâmelle kapatılarak incelemeye alınabilir.

Eğer nefronun uzun süre saklanması gerekiyorsa, o zaman Lam-lamel sınırı arasına Glyceel sürmek gerekir.³

Nefronun boyutları taksimatlı okülerlerle ölçülebilir.

Boyama

Değişik boya yöntemleri uygulanabilir. Sitolojik araştırma için demirli hematoksilen, yağ ve demir boyaları değerlidir. Buna benzer olarak diğer boyalar da kullanılabilir.^{1,5}

Boya solusyonu, içinde nefron bulunan boşluğa üst uçtan damlalıkla konur. Bu boya alt uçtan kurutma veya filtre kağıdı ile emdirilerek çekilir. Yıkama işlemi de aynı yolla yapılır.¹

Ayrıca düz lâm üzerine alınıp, 30-60 saniye kadar havada kurutulan preparatlar klasik Hematoksilen + Eozin boyalarıyla da boyanabilir. Boyama sonucu nukleuslar boyanmamış içi boş veziküller halinde olup sitoplazmalar gayet belirgin görülür.

Nefronların Fotoğrafisi (Mozaik Mikrofotografi)

Buradaki fotoğraflama işlemleri özel laboratuvarlar, çalışma, personel ve teknik isteyen bir konudur.

Mikrofotografi boyanmamış veya boyanmış nefronlara uygulanabilir. Tek bir filmle nefronun bütün ayrıntılarını gösterebilmek mümkün değildir. Bu nedenle bunların bölüm bölüm pek çok (100-200 kadar) fotoğrafları çekilir. Bu bölümler özel haritalar üzerinde işaretlenip birleştirilerek, bir bütün elde edilir. Sonra bu bütünden küçültülerek ayrıca fotoğraflar alınır. Baskı için küçültülmüş fotoğraflar kullanılır. Bunlara mozaik mikrofotografi denir.^{1,2,3,5}

Bununla beraber rutin incelemeler için normal mikrofotografi tekniği, gerek üstten gerek alttan aydınlatma ile uygulanabilir. Faskontrast mikroskopuyla da değerli fotoğraflar elde edilebilir.



Şekil 1 İzole nefronda, glomerul ve proksimal tüp bölümlerine ait yapılar.

Şekil 2 Bir kas hücresinde A ve I bandları ile, I bandları ortasından geçen Z çizgileri

Şekil 3 Kılıf ve bütün tabakalarının belirgin olduğu ve ortasında yuvarlak koyu gölgeli yağ bezinin bulunduğu kıl-yağ bezi ünitesi.

Şekil 4 Meme duktus ve asinilerini içeren yapılar.

Tatbik ve Klinik Açıklama

Maserasyon yöntemi ile hazırlanan boyanmış ve boyanmamış preparasyonlar stereoskopik, faskontrast ve ışık mikroskopuyla bize çok geniş bilgiler verir.

Böbrekleri ilgilendiren; akut renal yetmezlik, polikistik böbrek, bazı nefritler ve diğer hastalıklarda tüplerdeki nekroz, dclinmeler, atrofi ve kısalmalar ile diğer mikroanatomikal lezyonların lokalizasyonlarının saptanmasında büyük yararlar sağlar.^{1,3,5} Bu bilgiler klinik ve biyokimyasal bulgularla karşılaştırılır.

Yine mikrodiseksiyon ile otoradyografi de kullanılarak, tüplerdeki radyoaktif maddelerin, nefronun nerelerine lokalize olduğu ortaya konulabilir.²

Çizgili kas dokusunda atrofi, hipertrofi veya dejeneresansla seyreden bütün kas hastalıklarında, kas hücrelerinin durumu, lezyonun yeri ve özellikle band ve çizgilerin kontrolu yapılabilir. Çizgili kas tümörlerinde, hücrelerde çizgilerin görülmesi tanıya gitmek için diagnostik önem taşırlar.

Kılların, meme duktus ve asinilerinin, yağ bezlerinin, ter bezi, tük-rük bezi salgı ve boşaltım ünitelerinin, ince damarların ve diğer birçok organların ünitelerinin normal yapıları, boyutları ile yapısal değişiklikleri bu yöntemle bir bir ortaya konulabilir.

Metod hemen hemen masrafsız olup, yalnızca 1-2 gün süren bir bekleme ve birkaç saatlik bir çaba ile sonuç verecek, pek çok uygulama alanları bulacak bir metod niteliğindedir.

Özet

Maserasyon ile mikrodiseksiyon tekniği, yüz seneden fazla bir zamandan bu güne kadar çeşitli araştırmacılar tarafından uygulanmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Elektron mikroskopi çalışmalarının yoğun olduğu günümüz koşullarında da özellikle nefronlar üzerindeki uygulamalar bu yöntemin önemini açıkça ortaya koymaktadır.

Biz yaptığımız çalışmalarda böbrek ve bunun dışında kas, kıl, sinir, yağ bezi, ter bezi, tük-rük bezi, meme dustus ve asinileri, küçük damar ve kapillerler ile diğer birçok dokuda, bu dokuları oluşturan ünitelerin normal yapı ve boyutlarını bütünüyle inceleme olanağını bulduk.

Yine bu yöntem, bazı hastalıklarda ünitelerdeki lezyonların lokalizasyonlarının tam yerinin saptanmasında çok değerlidir.

Summary

The technique of microdissection with maceration has been employed with succesful results for a period of over a century up to the present. Even the wide use of electron microscopical studies under present conditions, the application of this technique to nephrons, makes the importance of this method abundantly clear.

In our studies we were able to investigate the complete dimensions and normal structure of the units comprising the kidney, and also muscle, hair, nerve, sebaceous gland, sweat gland, salivary gland, mammary ducts and acini, and small blood vessels and capillaries; together with several other tissues.

This technique is also extremely valuable in the exact localization of lesions of the vrit in certain diseases.

KAYNAKLAR

1. Avunduk M. A., A. F. I. P. Ders Notları, 1971.
2. Darmady E. M., Stranack F.: Autoradiography of the isolated Nephron. Proc. Soc. Exp. Biol. 100: 658-660, 1959.
3. Darmady E. M., Stranack F.: Microdissection of the nephron in disease. British Medical Bulletin. 13: 21-26, 1957.
4. Hamburg J., Richet G., Crosnier J., Funck J. L.-Brentano., Antoine B., Ducrot H., Mery J. P., De Montera H.: Nephrology. W. B. Saunders Company Philadelphia, London, Toronto., Vol. I, 1969, S. 28-44.
5. Oliver J., MacDowell M., and Tracy A.: The pathogenesis of acute renal failure associated with traumatic and toxic injury. Renal ischemia, nephrotoxic damage and the ischemic episode. J. Clin. Invest. 30: 1307-1350, 1951