

DOKU TESBİTİ VE TESBİT ÇÖZELTİLERİ

Dr. Yüksel ALVUR*

Dr. Rıfki FİNCİ**

ÖZET

Bu makalede doku tesbitinde çok önemli yeri olan proteinlerin yapısı, genel tepkimeleri, işlevsel gurupları, amfoterik özelliği hakkında kısa bilgi verilmiş, Formalinin ve diğer tesbit çözeltilerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri, genel tepkimeleri ve doku tesbiti sırasında gözönünde bulundurulması gereken zorunluklar da etrafıca tartışılmıştır.

SUMMARY

In this paper, a summarizing knowledge about structure, usual reactions, functional groups and amphoteric peculiarities of proteins which are very important for tissue fixation, has been given. Chemical and physical peculiarities, common reactions of formalin and other fixatives has been discussed. We also discussed what has to be considered during tissue fixation.

Canlı organizmaların temel yapıları olan hücrenin şeklini bozmadan ve hücre elementlerinde kayba meydan vermeden dokunun katılaştırılması ve şeklinin canlı organizmalardakine yakın olarak korunmasına doku tesbiti denir. Tesbitin tam olarak yapılabilmesi için tesbitte önemli işlevi olan proteinlerin ve kullanılacak tesbit çözeltilisinin özelliklerinin iyi bilinmesi gereklidir. Bu nedenle konu iki bölümde incelenmelidir.

- Dokuların tesbiti,
- Tesbit çözeltileri.
- Tesbit :

Tesbitin genel kavramı : Bütün canlı organizmalar inorganik ve organik maddelerden oluşmuştur. İnorganik maddelerin ve organik

* Gülhane As. Tıp Akademisi, Patoloji Enstitüsü Uzmanı

** Gülhane As. Tıp Akademisi, Patoloji Enstitüsü Başasistanı

maddelerden karbonhidrat (CH) ve lipidlerin doku tesbitinde önemli bir yeri yoktur. Lipidler ve CH ların tesbiti için özel tesbit çözeltileri seçilmelidir. Doku tesbitinde en önemli yeri hücrelerin ve dokuların esas çatısını oluşturan proteinler alır. Hücre içindeki kimyasal tepkimeleri yöneten enzimler protein yapısında maddelerdir. Bu proteinler tesbit edildiği vakit hücre ve dokuların şekli canlı organizmadakine yakın olarak korunmuş ve hücre içi enzimleri stabil hale getirilmiş olur. Hücre içi enzimleri stabil hale getirilmeyecek olursa, alınan dokuda otoliz başlar². Dokunun büyüklüğü, enzimatik zenginliği, kandan zengin oluşu ve yüksek ısı otoliz olayını hızlandıran etkenlerdir.^{2,6}

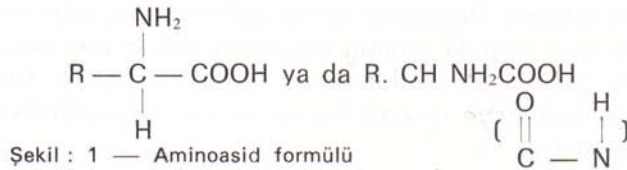
Doku canlı organizmadan alınır alınmaz tesbit çözeltilisine konur ve + 4°C de tesbite bırakılırsa otoliz önlenmiş olur². Alınan dokunun bütün derinliklerine tesbit çözeltilisi hemen işleyemez. Dokunun derin tabakalarında otoliz devam eder. Bu nedenle tesbit çözeltilisine konacak doku mümkün olduğu kadar ince dilimler halinde olmalı ve yukarıdaki sakıncalar gözönünde bulundurulmalıdır. Dokular formalinle tesbit edildiği vakit dezenfektan etkisi nedeniyle dokuların bakterilerle kokuşması ve bozulması da önlenmiş olur.^{1,2,4}

Tesbit işlev varsayımı : Doku tesbiti sırasında dokuların organik maddeleri olan protein, karbonhidrat ve lipidlerinde birçok kimyasal olay meydana gelir. Güncel histolojik ve patolojik inceleme için kullanılan tesbit çözeltileri CH ve lipidleri tesbit etmez, proteinleri ise molekül yapısında fiziko-kimyasal ve kolloidal özelliklerinde değişimler yaparak tesbit eder.²

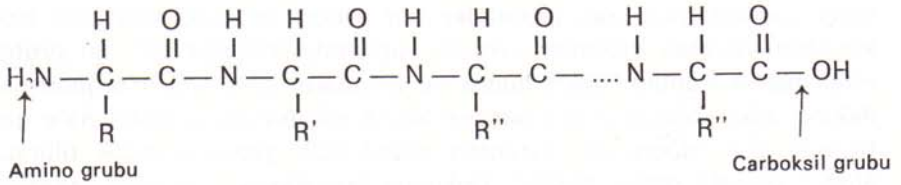
Tesbit sırasında meydana gelen bu değişimleri anlayabilmek için proteinleri ve tesbit çözeltilerini iyi tanımak gerekir.

PROTEİNLER

Belirli oranda ve şekilde karbon (C), Hidrojen (H), Oksijen (O), Azot (N) ve Kükürt (S) elementlerinin birleşmesiyle aminoasitler meydana gelir.^{2,3,5,6} Her aminoasitte ortak yapı —NH₂ ve COOH grubudur. Değişen kısımları ise (R) ile gösterilen kısımlardır (Şekil 1).



Birçok aminoasidin birbirine peptid bağıyla bağlanması sonucu proteinler meydana gelir (Şekil 2).



Şekil : 2 — Fibriler proteinlerin formülü

Bu formülden de anlaşıldığı gibi fibriler proteinlerin birinci ve ikinci yapısında liflerin bir ucunda serbest amino (NH_2) öbür ucunda da karboksil grubu (COOH) vardır. Bu yapısından dolayı proteinler amfoterik özellik gösterirler.^{2,3,6}

Protein molekülünün amfoterik yapısına bağlı özellikleri^{2,3,6} :

a) Asit baz bağlama özelliği :

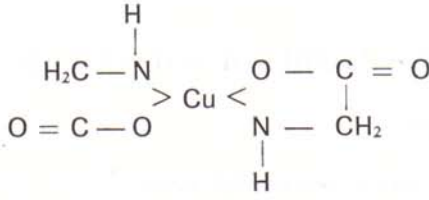
Proteinler taşıdıkları $+\text{NH}_3$ ve COO^- grupları dolayısıyla aminoasitler gibi amfoterik maddelerdir. Yani hem asit hem de bazdırlar. Asit ve alkalilerle tepkimeye girerler ve tuzlar oluşturarak çökerler.

Asit ve alkali durumlar arasında aynı değerde pozitif ve negatif yüke sahip olduklarından ,bu noktada elektrik yükleri sıfırdır ve pH sı da izoelektrik noktadır. Bu noktada aminoasitlerin dissasyonları çok fazla, stabilite ve çökme hızları da çok düşüktür. Bu pH dan asit ve alkali taraflara hafif kaymalar, proteinlerin çökme hızını ve tuz oluşturma eğilimini artırır.

b) İyonlarla erir-erimez tuzlar oluşturma (Çökelme) :

$+\text{H}$ ve OH^- dan başka negatif ve pozitif yüklü her türlü iyonları da bağlayabilirler.

Triklorasetik asit, pikrik asit, tungstik asit gibi protein çöktürücülerin anyonları katyonlaşmış proteinle birleşir, erimez tuzlar oluşturarak proteinleri tesbit ederler. Proteinler anyon halindeyken, ağır metallerin katyonları da aynı şekilde protein çöktürücü olarak etki ederler. Civa (Hg^{++}) vb. Bakır ise tuz oluşturmaz, proteinin COOH , NH_2 ve S-S grupları ile tepkimeye girerek koordinasyon kompleksleri (şelat) oluştururlar (Şekil 3).

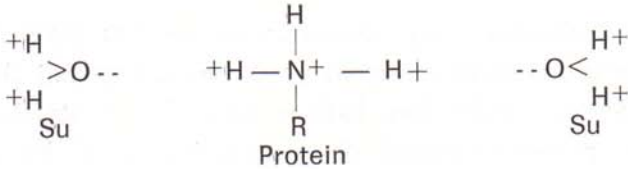


Şekil : 3 — Glikol bakır kompleksi.

c) Su bağlama ve Suyunu verme özelliği :

Protein molekülü izoelektrik noktada pozitif (+NH₂) ve negatif (COO⁻) guruplarına sahiptir². Su molekülü ise dipol karakterdedir²
 $\begin{array}{c} +\text{H} \\ >\text{O}- \\ +\text{H} \end{array}$. Bu yüklerden dolayı proteinle su arasında bir etkileşim

meydana gelir ve protein etrafında bir su kılıfı oluşur (Serbest su). Bu elektriki etkileşim dolayısıyla moleküllerinin büyük ve ağır olmasına rağmen proteinler su içinde çökmezler, asılı veya yüzer gibi dururlar (Hidrofil Kolloid = sol) (Şekil 4).

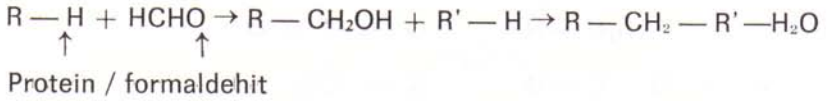


Şekil : 4 — Hidrofil Kolloid

Bu su kılıfından başka bir de proteinin heliks yapısını koruyan iç bağ suyu vardır (Bağlı su).

Alkol ve aseton gibi kuvvetli su çekicilerle proteinlerin suyu çekilirse proteinler çökerler^{1,2,3,5,6} (Hidrofob kolloid). Alkol tipi tesbitte tepkime bu şekilde olur.

d) Formaldehit protein liflerini birbirine metilen bağlarıyla bağlar ve proteinlerin ağlaşmasına (ağ şeklini alması) neden olur.² Bu bağlanma proteinlerin aktif gruplarıyla olduğundan proteinlerin tepkime özellikleri azalır ve çöker (formalin tipi tesbit) (Şekil : 5).



Şekil : Formalin tipi tesbit

Proteinlerin Molekül Yapısı :

Doğada proteinler 2 şekilde bulunurlar;^{2,3,6}

I) Fibriler proteinler,

II) Globüler proteinler.

Fibriler proteinlerin 1. ve 2. yapısı globüler proteinlerinse 1. 2. 3. 4. yapıları vardır.

Birinci yapı (Primer yapı) : Aminoasitlerin birbirine peptid bağlarıyla bağlanması sonucu uzun bir aminoasit zinciri meydana gelir, buna birinci yapı denir. Bu yapı fibriler ve globüler proteinler için aynıdır.

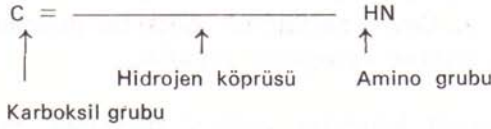
İkinci yapı (Sekonder yapı) : Peptid zinciri helezon (heliks) şeklini alır (fibriler proteinlerin 2. yapısı) ya da helezon şeklini aldıktan sonra kendi üzerine sarılır. Yani katlanır (Globüler proteinlerin 2. yapısı). Fibriler proteinler peptid zincirlerinin boşluktaki konumuna göre 3 kuruluş tipi gösterirler.

a) Alfa keratin tipi kuruluş,

b) Beta keratin tipi kuruluş,

c) Kollagen tipi kuruluş.

a) Alfa keratin tipi kuruluş : Keratin liflerinde peptid zincirleri bir helezon (heliks) oluştururlar (alfa heliks). Bu helezon şeklinin korunması helezonun eksenine paralel olan zincir içi hidrojen köprüleri sayesinde olur. Helezon içindeki hidrojen bağları elektron negatif olan atomların elektronlarını hidrojenle paylaşma eğiliminden doğar. Peptid bağlarındaki -N- ile bir O- ya da iki (-O-), bir hidrojen atomuyla birbirine bağlanır (Şekil 6).



Şekil : 6 — İki ayrı peptid bağının elemanları arasında Hidrojen köprüsü.

Bu hidrojen bağları gevşek bağlardır. Fakat sayılarının çok fazla olması, heliks yapısının korunmasında çok önemli rol oynarlar.

Heliks kuruluşundaki birçok peptid zinciri bir halattaki lifler gibi beraberce burularak bir araya gelirler. Peptid zincirleri arasında yerce uygun olan bölgelerde -NH- ve -CO atom grupları birbirine (H) bağlarıyla bağlanır.

Bu gruptaki proteinler saç ve kılın keratini, (proteinleri) fibrin, fibrinojen, myozindir ve hepsi de elastik fibriler proteinlerdir.⁶

b) Beta keratin tipi kuruluş : Heliks yapısını koruyan iç hidrojen köprüleri kopmuştur. Helezon şekli açılır ve lifin boyu uzar. Komşu peptid zincirleri hidrojen köprüleri ve R grupları da yan bağlarla birbirine bağlanmıştır.

c) Kollajen tipi kuruluş : Üç amino asidden oluşan üç ayrı helezonun birbiri üzerine kıvrılmaları ve hidrojen bağlarıyla birbirine bağlanmaları sonucu bu yapı oluşur. Kollajen bir fibriler proteindir.

Globüler proteinlerde ikinci yapı : Heliks yapısındaki fibriler proteinler kendi üstüne kıvrılır, katlanır, hatta ilmeklenirler. Bu yapının devamını yan bağlar (H- bağı, S-S bağı, serbest -COO ve H₃N⁺ yüklü gruplar arasındaki tuz bağı) gücü sağlar. Hemoglobin, myoglobin, serum albuminleri, ribonukleaz, ovalbumin, insulin, laktoglobulin vb. globüler proteinlerdir.

Globüler proteinlerde 3. yapı : Globüler proteinlerde yan bağlar tepkimeye girerek bağlanır. Bu yapıda protein molekülü sıkı bir yapı alır ve protein molekülünün bağılı suyu çok azalır. Yan bağların (R) birbirine bağlanmasında -COO ve NH₂ arasındaki tuz bağının çok önemli etkisi vardır.

Dördüncü Yapı : Monomer birimlerin polimerleşmesi sonucu dördüncü yapı meydana gelir. Çevre şartlarına göre bu polimerler ayrılır veya monomerler birleşerek agregatlar yaparlar.

Proteinler hakkındaki genel bilgilerin verileri sayesinde doku-
da tesbit işlemi şöyle özetlenebilir : ^{2,3,6}

Fiziksel ve kimyasal etkenlerle, proteinlerin heliks yapısını koryan bağlar koparılır veya gevşetilirse proteinlerin fiziko-kimyasal özelliği değişir ve lifi hal alır.^{2,3,6} Bu olaya denatürasyon denir. Denatürasyonla proteinlerin fiziko-kimyasal özellikleri ve heliks yapısı bozulur, fakat proteinin toplam molekülünde bir kayıp olmaz. Heliks yapısının bozulmasıyla bağlı suyunu kaybedip lifi hale geçen proteinler ikincil olarakta, su kılıfını kaybederek hidrofil halden hidrofob kolloid hale dönerler. Bu durumdaki lifi proteinlerin amino asitlerinin bazı aktif grupları serbest hal alır ve kimyasal tepkimelere daha iyi cevap verirler.

Denatürasyonla oluşan lifi proteinler globüler proteinlerden ayrı özelliklere sahip olurlar. Serbestleşen aktif gruplar birbiriyle tepkimeye girerek protein lifleri uzar ve birçok lif arasında kimyasal bağlanmalar oluşarak lifler ağ şeklini alırlar. Denatürasyon ve ağlaşma ile proteinler sol (kolloid parçacıkları su içinde dağılırsa bu çözeltiye sol denir) halden jel hale dönerler. Sol halden jel hale dönen proteinler karmaşık katı bir durum alır. Böylece tesbit işlemi de bitmiş olur.^{2,6}

Denatürasyon ve ağlaşmaya neden olan kimyasal etkenler proteinle bağlanarak çözeltideki derişiklikleri azalır (formalin tipi tesbit), bu nedenle bu gibi çözeltiler bir kere tesbit için kullanıldığında, ikinci sefer kullanılmamalıdır.²

Alkol-tuz ve asit tipi tesbitte ise, proteinler denatüre olurlar, fakat ağlaşmaya karşı bir tepkime meydana gelir. Alkol, aseton gibi kuvvetli su çekiciler dokunun serbest ve bağlı suyunu çekerler ve dokuyu denatüre ederler. Dokudan çıktıkları su kabın dibinde toplandığından tesbit sırasında bu durumu da gözönünde bulundurmak gerekir.²

Tesbit Çözeltileri² :

1. Saf tesbit çözeltileri

A. Su çekerek tesbit edici çözeltiler :

- a) Alkol
- b) Aseton

B. Tuz oluşturarak tesbit eden çözeltiler :

- a) Süblime
- b) Potasyum bikromat
- c) Uranil asetat
- d) Pikrik asit.

C. Kolloidlerin su çekme gücünü değiştirerek tesbit eden Çözeltiler :

- a) Asetik asid
- b) Triklor asetik asid
- c) Sulfosalisilik asid
- d) Kromik asid.

D. Ağ yaparak tesbit ediciler :

- a) Formalin
- b) Glutaraldehit
- c) O_3O_4

2. Karışım halindeki tesbit çözeltileri

A. Formalinli karışım çözeltileri :

- a) ORTH karışımı
- b) Bouin karışımı
- c) HELLY karışımı
- d) LILLI'nin BLEİNİTRAT - FORMALİN karışımı

e) CAJAL'ın BROM-FORMOL karışımı

f) LISON VOKAER'in glikojen tesbit çözeltisi.

B. Formalinsiz karışım çözeltileri :

a) CARNOY karışımı

b) ZENKER çözeltisi

c) CAJAL Nörofibril çözeltileri.

TESBİT ÇÖZELTİLERİ

1. SAF TESBİT EDİCİLER :

A. a-b) Konsantre alkol-aseton (organik), Amonyüm sülfat (inorganik) :

Bu çözeltilerle kolloidlerin suyu çekilirse proteinlerle su arasındaki elektriki etkileşim bozulacağından proteinler floküle olur ve çökerler. Bu şekil tesbite alkol tipi tesbit denir.

B. Tuz Oluşturarak Tesbit Ediciler :

a) Süblime (HgCl_2) : Proteinle süblime arasında ağır metal tuzları oluşarak dokular tesbit edilir. Bu tuzlar KI çözeltisinde çözünürler. KI ise preparattan sodyumtiyosülfatla ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) temizlenir. Süblimenin % 5-6 lık saf solüsyonları dokuyu fazla katılaştırdığından karışım halindeki solüsyonları (HEIDENHEIN «Sasa», HELLY) özel amaçlı tesbitlerde kullanılır.

b) Potasyum bikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) : Kuvvetli oksidan maddedir. Çözeltideki kromat, proteinlerin hidroksil grupları ile tepkimeye girer. Proteinin bazik grubu (NH_2 -) ve asidofilisi artar. Tesbit işleminden sonra doku iyice yıkanmalıdır.

c) Uranilasetat (CH_3COO) $_2$ $\text{UO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) : Proteinlerin negatif grubu ile uranil iyonunun (UO_2^{++}) pozitif yükü arasında bir etkileşim olur ve doku tesbit edilir. Tesbit çözeltisi olarak tek başına hemen hemen hiç kullanılmaz.



d) Pikrik asit : Sarı renkli iğne şeklinde (Trinitrofenol)

zehirli maddedir. Pikrik asit çözeltilerinde protein proteinpikrat halinde çökerek tesbit olur. Celloidine gömülecek parçalar için önerilmez.

C. Kolloidlerin Su Çekme Gücünü Değiştirerek Tesbit Ediciler :

Koloid kısımların su tutma gücü, izo-elektrik noktada minimumdur. İzo-elektrik noktadan asit ve alkaliye hafif kaymalar bu gücü artırır. Yüksek ve düşük pH da ise bu güç çok azalır. Asit ilavesi ile kolloid çözeltinin pH sı fazlaca asit tarafına kaydırılırsa kolloidin su tutma yeteneği azalır «Gel» hale döner. Bu gruptaki bütün maddeler dokuya çabuk işlerler ve kalsiyum tuzlarını çözerler.

a) Asetik Asit (CH_3COOH) : Nükleoproteinler için iyi çöktürücüdür. Hücre çekirdeği ve kromozomları iyi tesbit eder. Sitoplazma ve mitokondriler için iyi tesbit edici değildir. Kuvvetli su çekici özelliğinden dolayı dokuyu buruşturduğundan saf çözeltileri değil, karışımları tesbit edici olarak kullanılmalıdır.

b) Triklorasetik asit (CCl_3COOH) : Renksiz, kuvvetli su çeken kristaldir. % 5 lik çözeltisi dekalsifikasyon için kullanılır ve sinir dokusunun tesbiti için uygun tesbit edicidir (8-20 saat).

c) Sulfosalisilik asit  : Karışım veya % 5 lik saf çözeltisi ile tesbit yapıldığında bütün boyalarla iyi boyanan kesitler elde edilir. Proteinleri kuantativ olarak çöktürür. Salgılardaki proteinleri bile görünür hale getirir. 6-24 saatte, karanlıkta dokuya optimal sertleşme vererek ve buruşturmadan tesbit eder. Tesbitten sonra dokuyu iyice yıkamak gerekir. Doymuş pikrik asit solüsyonu ile eşit miktarda karışımı Fuelgen nükleus boyası için çok iyi tesbit çözeltisidir.

d) Kromik Asit : Susuz kromtrioksit kristalinin (CrO_3) sudaki % 1 lik çözeltisi kromik asidin (H_2CrO_4) ana çözeltisini verir. Ana çözeltiden hazırlanan % 0.5-0.25 lik tesbit çözeltisi şiddetli oksidan bir maddedir. Küçük dokulara bir günde yeşil bir renk vererek işler.

Doku yeteri kadar sertleştikten sonra bu renk solana kadar yıkamak gerekir. Düşük konsantrasyonları dokuyu masere eder. Bu tesbitten sonra doku ve hücrenin ince yapısı özellikle bazik boyalarla iyi boyanır.

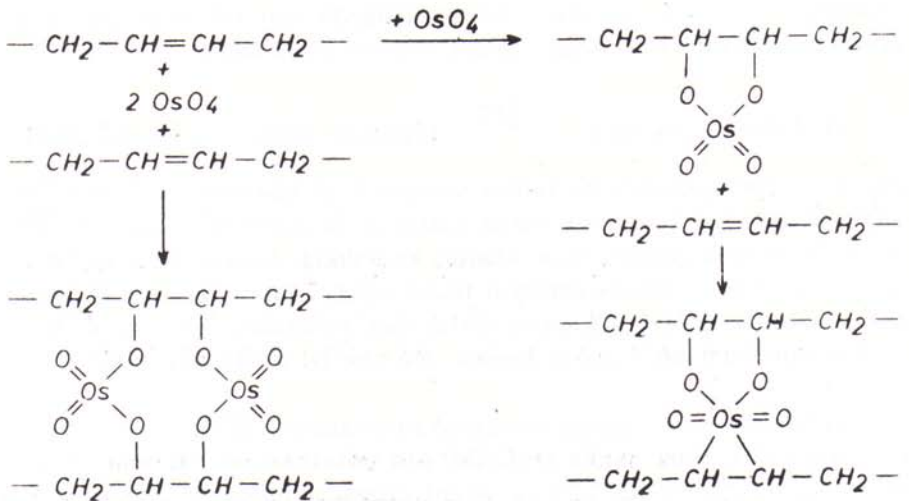
D. Ağlaşma Yapararak Tesbit Ediciler :

a) Formalin : Protein moleküllerini metilen köprüleri ile birbirine bağlayarak dokuyu tesbit eder. Bu konu ileride geniş olarak ele alınacaktır.

b) Glutaraldehit : Taşıdığı aldehid grubundan dolayı formaline benzer şekilde dokuyu tesbit eder. En iyi sonuç % 1 - % 6.5 luk derişiminden alınır. % 1 lik derişiminin osmotik basıncı 100 mosm dur. Canlı doku tesbitinde bu osmotik basıncın 300 mosm; ölü doku tesbitinde de 450 mosm olması gerekmektedir. Osmotik basıncı 400 mosm pH sı 7.3 olan 1000 ml % 1 lik fosfat tamponlu glutaraldehid çözeltisi hazırlamak için, 2.98 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 30.4 g $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve 40 ml % 25 lik glutaraldehit almak gerekir. Küçük dokular 1-6 saatte tesbit edilir.

c) Osmik Asit (OsO_4) : Protein, yağ ve lipidler için iyi tesbit özelliğine sahiptir. Dokuya 1 saatte 0.5 mm işleyebildiğinden tesbit çözeltisi olarak kullanılması çok küçük parçalar için uygun olur.

Osmik asidin çift bağları, bütün lipidlerle peroksid bağları ile bağlanır (Şekil 7).



Şekil 7 : Osmik asidin yağ asitleri ile bağlanması

Yukarıdaki tepkimeden de görüleceği gibi 2 molekül yağ asidi arasında bir veya iki OsO_4 köprü oluşturur. Her iki şekilde de birbirine benzer bir ağlaşma meydana gelir. Polisakkaritlerle de yukarıdaki şekilde ağlaşma yapar. OsO_4 ile tesbit edilen dokular aşırı oksidasyondan dolayı osmik asitle bağlandığı, yani daha önce çift bağ ihtiva ettiği yerden kopar, bu nedenle dokular uzun zaman tesbit süsnyonunda bırakılmamalıdır.

Proteinlerin aktif grupları ile bağlanarak proteinleri ağ şeklinde tesbit ederler.

2. KARIŞIM HALİNDE KULLANILAN TESBİT ÇÖZELTİLERİ :

Tek başına kullanıldığı vakit dokuda aşırı katılaşmaya neden olan veya nükleik asitlerin çözünmesine neden olan, fakat bazı özel işlemler için gerekli olan çözeltilerdir.

A. Formalinli karışımlar :

a) ORTH KARIŞIMI : (1 kısım formalin + 9 kısım MÜLLER çözeltisi) 24-28 saatte iyi sonuçlar verir. Medulla spinalisin tesbiti için önerilir (8-14 gün).

b) BOUIN KARIŞIMI : (15 kısım doymuş pikrik asit, 5 kısım formalin, 1 kısım asetik asit). En iyi netice 2-24 saatte alınır. Embriyonun tesbiti için önerilir.

c) HELLY KARIŞIMI : (100 ml MÜLLER çözeltisi, 5 gr süblime, 5 ml formalin). Tesbit süresi 1-6 saattir. Plazma ve çekirdek çatkısını iyi koruduğundan, kemik iliğı ve sitolojik araştırmalar için iyi tesbit edicidir.

d) LILLI'nin BLEİNİTRAT-FORMALİN ÇÖZELTİSİ : (8 gr Bleinitrat, 80 ml abs. alkol, 10 ml % 4 formalin, 10 ml su). Tesbit süresi 24 saattir. Mast hücreleri ve mukopolisakkaritler için uygun tesbit çözeltisidir.

e) CAJAL BROM-FORMOL KARIŞIMI : (15 ml formalin, 2 gr amonyum bromid, 85 ml su), Glia impregnasyonu için kullanılır. Tesbitten sonra (2-25) gün doku yıkanmalıdır.

f) LISON VOKAER'in GLİKOJEN TESBİT ÇÖZELTİSİ : (% 96 lık alkolde doymuş pikrik asit çözeltisinden 85 ml, 10 ml formalin, 5 ml asetik asit). Küçük parçaları, buzdolabında 5-10 saatte tesbit eder. Glikojen için iyi tesbit edicidir. Tesbitten sonra absölu alkolden geçirilerek gömme işlemi yapılmalıdır. Çünkü glikojen suda erir.

B. Formalinsiz Karışımlar :

a) CARNOY KARIŞIMI : (60 ml absölu alkol, 30 ml kloroform, 10 ml konsantre asetik asit). Dokunun 1 saatte 1 mm derinliğine işler.

b) ZENKER ÇÖZELTİSİ : (100 ml MÜLLER çözeltisi, 5 gr süblime, kullanmadan önce 5 ml konsantre asetik asit) ile tesbit edilen dokulardan Azan ve Goldner boyaları ile, iyi boyanan kesitler elde edilir.

c) CAJAL NEUROFİBRİL ÇÖZELTİSİ : (40 ml pyridin, 30 ml % 96 lık alkol). Bu çözelti ile doku 24 saatte tesbit edilir.

DOKU TESBİTİ SIRASINDA GÖZÖNÜNDE BULUNDURULMASI GEREKLİ HUSUSLAR

a) Tesbit edilecek doku büyük olmamalı ve 0.5 cm.den daha kalın olmamalıdır. Bu şartlara uyulmazsa tesbit solüsyonunun işleyemediği doku derinliklerinde otoliz meydana gelir.

b) Tesbit solüsyonuna konan doku +4°C de tesbite bırakılmalıdır. Her ne kadar düşük ısılar tesbit solüsyonunun dokuya işlerliğini azaltırsa da otolizi önlediklerinden iyi tesbit için bu zorunluğa uymak gerekir.

c) İçi boş organlar tesbit solüsyonu ile doldurulmalıdır. Böylece tesbit solüsyonu dokuya hem iki yüzden işler, hem de boşluğun iç yüzündeki düzgün yüzey şeklini korumuş olur.

d) Dokunun buruşmasına ve katlanmasına meydan verilmemelidir. Kırışma ve katlanma olasılığı olan dokular mantar plakalar üzerinde gerilerek tesbit edilmelidir.

e) Tesbit solüsyonu ile tesbit edilecek doku arasında belirli bir oran olmalıdır. Bu oran her tesbit solüsyonuna özgü olarak değişmektedir. Tesbit sırasında doku proteinine bağlanıp ortamdaki tüketilen çözeltiler (formalin) için bu oran 1/20 den daha az olmamalı ve bir defa tesbit için kullanılan formalin bir daha kullanılmamalıdır.

f) Kaba, önce tesbit solüsyonu sonra parça konmalıdır. Aksi yapılırsa doku kaba yapışır ve bu yapışma yerinden tesbit solüsyonu dokuya işleyemez.

g) Yağdan ve havadan zengin dokular tesbit solüsyonunda yüzdükleri için bir kaset içine alınarak tesbit edilmelidir.

h) Tesbit solüsyonunun dokuya işleyişini hızlandıran işlemlerden kaçınılmalıdır. Yüksek ısı bir yönden tesbit solüsyonunun dokuya işlerliğini artırır. Diğer yönden de dokuda otolizi hızlandırır.

i) Kullanılan tesbit solüsyonunun dokulara işleme hızları bilinmelidir. Bu hız her tesbit solüsyonu için değişiktir. Örneğin;

Alkol 5 mm. kalınlığında bir dokuyu 2-4 saatte tesbit eder.

Aseton " " " " 2 " " "

Süblime " " " " 5 " " "

% 4 lük formalin 4 mm. kalınlığında bir dokuyu +4°C de 5 saatte tesbit eder.

k) Kural olarak özel amaçlar dışında doku 24 saatten daha fazla tesbit edilmemelidir.

l) Tesbit solüsyonu ne hipotonik ne de hipertonic olmalıdır. Kullanılacak tesbit solüsyonunun osmolaritesi canlı dokunun osmolaritesine (300 mosl) veya ölü dokunun (450 mosl) uygun olmalıdır. Bu özellik gözönünde bulundurularak tesbit edilmeyen doku su ile kesinlikle yıkanmamalıdır.

m) Tesbit solüsyonunun pH'sı canlı dokunun pH'sına yakın olmalıdır (6-8). Bu nedenle tamponlanmış formalinle dokuların tesbit edilmesi daha uygundur.

n) Dokunun aşırı derecede sertleşmesine müsaade edilmemelidir. Doku aşırı derecede katılaşacak olursa daha sonraki işlemleri zorlaştırır.

Uzun zaman tesbit solüsyonunda kalan, tesbit solüsyonunun buharlaşması sonucu sertleşen dokulardan tekrar çalışılmak istendiğinde bu doku antiformine konarak yumuşatılabilir.

Antiformin Solüsyonu : 1 gr antiformin 5 ml suya konarak yahutta konsantre solüsyonunun 20 ml si 80 ml suya konarak hazırlanır.

Tamamen kuruyan dokularsa Dimetilsüfoksit (D M SO) içinde yumuşatılarak tekrar çalışır hale getirilebilir.

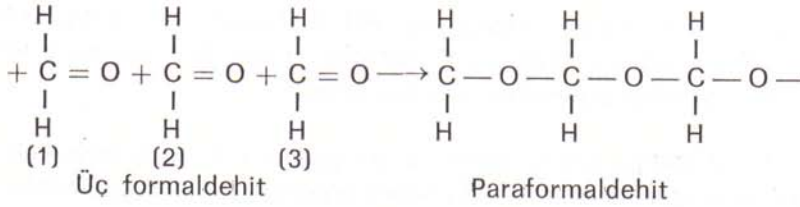


Fiziksel Özellikleri^{2,6} : Kimyasal adı metanal olan bu madde renksiz, keskin kokulu, derişik olduğu zaman yakıcı özellik gösteren, adi sıcaklıkta gaz halinde bulunan, ancak -21°C de sıvılaşabilen bir maddedir. Suda ve alkolde kolay erir. % 40 lık metanal ihtiva eden sudaki eriyiğine formol veya formalin denir (Ticari şekli). Kondansasyon ve polimerize ürünlerinin dezenfektan etkisi vardır.

Doku tesbiti sırasında formaldehitin gösterdiği tepkimeler :

Formaldehit, aldehit yapısından dolayı diğer aldehitlerin genel tepkime özelliklerini gösterir.^{2,6} Aldehitler kolaylıkla oksitlenerek kendilerine uyan asitlere dönüşürler (indirgen özelliği). Doymamışlıkları nedeniyle de katılma tepkimeleri verirler. Bu tepkimelerden doku tesbiti sırasında önemli olanlarını şöyle sıralayabiliriz.

1. Polimerizasyon özelliği : Formalin soğukta bırakılır veya inorganik asitlerle karıştırılırsa formaldehidin oksijenindeki çift bağı açılarak aldehitler birbiriyle bağlanır ve paraformaldehit $[(\text{HCHO})_n]$ halinde kabın dibine çöker² (Şekil 8).



Şekil : 8 — Paraformaldehit

Formaldehidin paraformaldehit haline dönmesi formalinin kullanırlılığını bozmaz, fakat çözeltinin formaldehit derişiminin düşmesine neden olur (Bu özellik gözönüne alınarak formalin soğukta bırakılmamalı ve inorganik asitlerle karşılaştırılmamalıdır). Isıtmakla veya ortama NaOH ilavesi ile paraformaldehit aldehit haline döner.

2. Işık ve ısı etkisiyle formaldehit kendisine uyan formik aside (HCOOH) dönüşür. Bu dönüşümü önlemek için formalin siyah renkli şişelerde ve oda ısısında saklanır. Formalin çözeltisine mermer parçaları (CaCO₃) veya dolomit [Ca Mg (CO₃)₂] ilave edilerek hem formik asidin meydana gelmesi önlenmiş olur, hem de meydana gelen formik asidi H₂O, CO₂ veya kalsiyum formiat'a dönüştürerek ortamdan arındırılır.^{1,2,5}

3. Dokular tesbit edilirken meydana gelen formik asidin önlenmesinde ikinci bir yol ise formalini fosfat veya karbonat tampon ana maddeleri ile tamponlamaktır.

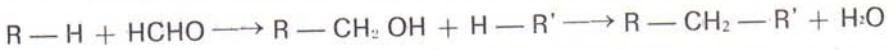
Tamponlu nötral formalin :

% 37 - 40 ticari formalin	100 ml
Distile su	900 ml
Sodyum fosfat monobazik	4 gr
Sodyum fosfat dibazik	6.5 gr

Tamponlanmış formalin çözeltisinde 5 sene süreyle tesbit edilen dokular bile çözeltinin pH sında çok az değişikliğe neden olurlar.² Formaldehit çözeltisini kullanmadan önce pH sı, pH metre ve indikatör kâğıdıyla kontrol edilir. Tesbit sırasında dokuların enzimatik aktiviteleri korunmak istendiğinde dokular tamponlanmış formalinde +4°C de bekletilerek tesbit edilmelidir. Bu şartlara uyularak ya-

pılan tesbitte dokular alkalen ve asit fosfataz, nonspesifik esteraz, lipaz, fosfomidaz aktivitelerini korurlar, fakat dehidrogenaz ve sitokrom oksidaz aktivitelerini kaybederler.²

4. Proteinin amino, imino, nitril, guanil, hidroksil, karboksil, sülfidril aromatik halkaları ile formalin arasında metil köprüleriyle bağlanma sonucu proteinler denatüre olur ve ağ şeklini alarak tesbit olurlar. (Şekil : 9)



Şekil : 9 — Formalin tipi tesbit

Formülden de anlaşılacağı gibi; doku tesbiti sırasında formalin çözeltisinin derişimi azalmaktadır. Bu nedenlerle tesbit edilecek doku ile formalin çözeltisi arasındaki oran en aşağı 1/20 olmalı ve bir kere kullanılan formalin bir daha tesbit için kullanılmamalıdır.

5. Tesbit maddesi olarak seçilecek solüsyon amaca yönelik olmalıdır. Proteinler için iyi bir tesbit solüsyonu olan formalin, CH ve lipidler için uygun tesbit solüsyonu değildir. Proteinleri tesbit ederken glikoproteinleri de tesbit ederler. Formalinde tesbit edilen nükleik asitlerin birçok aktif grubu bloke olur ve iyi boyanmazlar. Glikojen ve ürik asit formalin tesbiti ile tesbit edilemezler. Formalin ve glutaraldehit, tesbit sırasında proteinlerin aynı aktif grubunu tuttuğundan formalinle tesbit edilen dokularda elektron mikroskopik çalışmalar iyi sonuçlar vermez. Eritrositlerden açığa çıkan hemoglobin formalin tarafından indirgenerek koyu kahve renkte geliş güzel dağılmış ışığı çift kıran parçacıklar halinde görülür (Formalin pigmenti). Dokular bu pigmentten, VEROÇAY veya KARDESEWİTSCH solüsyonu ile kesitler deparafinize edildikten sonra temizlenebilir.²

VEROÇAY solüsyonu : 1 kısım % 1 lik KOH + 99 kısım % 80 alkol.

KARDESEWİTSCH solüsyonu : 5-1 kısım % 5 amonyak + 95-99 kısım % 70 lik alkol.

Bu solüsyonlarda 15 dakika — 4 saat arasında tutulduktan sonra 2 kere 5 dakika distile suda yıkanır. % 80 lik alkolde çalkalanır. KAR-

DESEWITSCH solüsyonu bu işlem sırasında malarya pigmentini de soldurur.

6. Formalinin dokuya işlerliği²: % 4 lük formalin (1 kısım % 40 ticari formalin + 9 kısım su) içine konan karaciğerin bütün yüzeyleri 16 saatte 4 mm., 40 saatte 6 mm., derinliğine kadar tesbit olur.

% 10 luğu ile ise (1 kısım % 40 lık ticari formalin + 3 kısım su) aynı dokuyu 16 saatte 6 mm., 40 saatte 15 mm. derinliğine kadar tesbit eder.

5 mm. kalınlığında bir doku % 4 lük formalinle oda ısısında 5 saatte tesbit olur. Derişikliği yüksek formalin çözeltisi dokunun tesbit süresini kısaltır. Fakat dokunun daha çok katılaşmasına ve osmolaritesinin yüksek olması nedeniyle de buruşmasına neden olur. % 3 formalin çözeltisinin osmotik basıncı 1000 mosm dur. Bu osmolarite canlı dokuda (300), ölü dokuda (450) mosm dan daha fazladır.² Bu nedenle dokuda buruşukluklara neden olacağı düşünülürse de, % 6 lık formalin solüsyonları bile, fazla değişiklik yapmadan dokuyu tesbit ederler.

KAYNAKLAR

1. AKER, O.N. : Laboratuvar el kitabı. Örnek Matbaası, Ankara, 1954. s. 5-9.
2. BURCK, H.C. : Histologische Technik. 3. Aufl. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, 1974. s. 6-44.
3. HARPER, H.A., RODWELL, V.W., MAYES, D.A. : Review of physiological Chemistry. 16 th Edition, Lange med. Publications California, 1977. s. 9.
4. LUNA, L.G. : Manual of Histologic Staining Methods. Third edition. McGraw-Hill Book Company, New York 1968. s. 1
5. THOMPSON, S.W. : Selected Histochemical and Histopathological methods. Charles C. Thomas. Publisher, Springfield, 1966. s. 3-21.
6. YENSON, M. : İnsan biyokimyası. Sulhi Garan Mat. 1973. s. 7-22.