

Tissue processing – Doku takibi*

Fulya Çakalağaoğlu

Pathology Laboratory, Vocational School of Health Services, Marmara University and Department of Pathology, Medical Faculty, Marmara University, Istanbul, Turkey

Accepted for publication on 21 December 2004

**Bu çalışma XVII. Ulusal Patoloji Sempozyumu (2–3 Ekim 2004, Gaziantep) Patoloji Teknik Elemanları Uydu Toplantısında sunulmuştur.*

Tissue processing is usually considered to include dehydration, clearing and infiltration. In this paper, embedding is also discussed. The choice of both the fixative and the processing method should be made either before or immediately after removal of tissue at surgery or autopsy. Dehydration means the removal of tissue water. The majority of dehydrating reagents are alcohols. Clearing is another tissue processing step. Clearing agents must be miscible with both dehydrated agent and infiltration medium. Xylene is the most widely used clearing agent. After dehydration and clearing, tissue must be infiltrated with supporting medium in order to obtain thin sections. Paraffin wax is the most popular supporting medium. Tissue embedding is also referred to as tissue blocking. Correct orientation is the most critical step in this step.

Key words: Tissue processing, dehydration, clearing, xylene, embedding

Doku takibi genel olarak, dehidrasyon, şeffaflandırma ve sertleştirmeyi içermektedir. Bu makalede ayrıca doku gömme işlemi de tartışılmıştır. Doku takip metodunun ve fiksatif seçiminin cerrahi spesmenlerin ve otopsi materyallerinin çıkarılmasından hemen önce veya hemen sonra yapılması gerekmektedir. Dehidrasyon doku suyunun uzaklaştırılması anlamına gelmektedir. Dehidrasyon ajanlarının çoğu alkollerden oluşmaktadır. Şeffaflandırma diğer bir doku takip aşamasıdır. Temizleme ajanları dehidrasyon ve sertleştirme ajanları ile uyumlu olmalıdır. Ksilen en sık kullanılan şeffaflandırıcı maddedir. Dehidrasyon ve şeffaflandırmadan sonra dokudaki solüsyonlar tutucu madde ile ince kesit alabilmek için yer değiştirmelidir. Parafin en popüler sertleştirici maddedir. Doku gömme işlemi bloklama olarak da isimlendirilir. Bu aşamada en önemli nokta doğru oryantasyondur.

Anahtar sözcükler: Doku takibi, dehidrasyon, şeffaflandırma, ksilen, gömme.

Giriş

Dokuların mikroskopik incelemeye hazır hale getirilmesi amacı ile yapılan, gömme ile sona eren işlemler dizisine doku takibi denir.¹⁻⁷ Doku takibini etkileyen faktörler dokuya ait olanlar, takip ajanlarına ait olanlar ve takip şekline bağlı olanlar olmak üzere üç ana başlıkta toplanır. Dokuya ait faktörler doku parları, fiksasyon, doku kalınlığı ve

dansitesidir. Takip ajanlarına ait faktörler solüsyonların polaritesi, konsantrasyonu, birbirleri ile uyumu, buharlaşma hızı ve viskoziteleridir. Takip şekline bağlı faktörler ise ısı ve çalkalama biçimidir.^{1,2,5,6}

Doku takibinin aşamaları dehidrasyon, şeffaflandırma ve sertleştirmedir.

Dehidrasyon

Fiksasyonu tamamlanmış dokuların ilk takip aşamasıdır. Dehidrasyon parafin gibi sert maddelere dokuların gömülmesi için gereklidir.¹⁻⁷ İki tip dehidrasyon vardır:

1. Dilüsyonel dehidrasyon: Dokuların artan konsantrasyonda sıvılara transferi ile doku suyunun uzaklaştırılmasıdır.
2. Kimyasal dehidrasyon: Endotermik reaksiyon ile dokulardaki suyun uzaklaştırılmasıdır.

Dehidrasyon ajanları

1. Alkoller:

- a. Etil alkol: En çok kullanılan dehidrasyon maddesidir. Berrak, renksiz, kolay alev alabilen, orta derece toksik ve organik çözeltiler ile karışabilen bir sıvıdır. Hızlı etkili ve hidrofilik (susever) bir ajandır. Dehidrasyon için yükselen konsantrasyonlarda kullanılmalıdır.
- b. Denatüre alkol: Etanol ile aynı özelliklerde ve daha belirgin kokuludur.
- c. Metanol: Özel kokulu, berrak, alev alabilen ve zehirli bir alkoldür. Seyrek olarak tek başına dehidran olarak kullanılmaktadır.
- d. İsopropanol: Parafin gömme doku takibinde etanole en uygun alternatif dehidrasyon ajanıdır. Selloidin doku gömme takibinde kullanılmamalıdır. Dokularda etanol kadar küçülme ve sertleşme yapmamaktadır. Mikro dalga ile doku takibinde de kullanılmaktadır.⁸
- e. Bütanol: Bitki ve hayvan materyallerinin doku takibinde dehidrasyon amacıyla tercih edilmektedir.

2. Glikol-eterler:

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

3. Diğer dehidrasyon ajanları:

- a. Aseton: Renksiz, berrak, alev alabilen ve karakteristik kokulu bir dehidrandır. Hızla dehidrasyon yapmaktadır. Aseton hızla buharlaşarak dokuları sertleştirmektedir. Etanol ve metanole göre çözücü etkisi daha fazla olduğundan özellikle yağlı dokuların takibinde dehidrasyon maddesi olarak kullanılması önerilmektedir.

- b. Tetrahidrofuran: En iyi dehidrasyon ajanıdır. Özellikle yetersiz dehidrasyon olmuş dokularda tekrar doku takibinde kullanılmaktadır.²
- c. 2,2 dimetoksipropan: Kimyasal dehidrasyonda kullanılır.^{2,4}

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, kırılğan, zor kesit alınabilen dokular elde edilmesine yol açar.

Şeffaflandırma (temizleme)

Dealkolizasyon adıyla da anılır. Şeffaflandırıcı ajan olarak dehidrasyon maddesini temizleyebilen, sertleştirici madde ile geçimli olabilen ve dokuya nazik davranabilen maddeler seçilmelidir.

Şeffaflandırma ajanları:

1. Hidrokarbonlar

- a. Ksilen: En sık kullanılan şeffaflandırıcıdır. Alev alabilen tehlikeli bir maddedir. Doku uzun süre ksilende kalırsa sertleşme çok fazla olmaktadır.
- b. Toluen: Ksilene göre daha az sertleştirir, daha yavaş etkilidir.
- c. Benzen: Çok hızlı etkili olmasına karşın toksik ve karsinojen olduğu için kullanılmamaktadır.
- d. Kloroform: Daha yavaş etkilidir. Özellikle tendon, kas ve uterus örnekleri için alternatif bir şeffaflandırıcı olarak bildirilmektedir.

e. Trikloraeten

2. Esterler:

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

3. Terpenler

- a. Sedir ağacı yağı
- b. Limonen: Son yıllarda popüler bir temizleyici ajan olarak kullanılmaktadır. Ksilene göre dokuları daha az sertleştirdiği, parafin ile daha iyi geçimli olduğu bildirilmektedir (1, 2, 5).
- c. 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.

Sertleştirme (infiltrasyon)

Dehidrasyon ve şeffaflandırmadan sonra dokuların mikrotom ile kesilebilmesi için sertleştirilmesi gereklidir. Bu aşamada amaç dokudaki solüsyonların tutucu bir madde ile yer değiştirmesidir. Bu işleme "impregnasyon" (dozurma, doldurma) da denilmektedir. Bunun için kullanılan maddeler:

1. 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. Parafin petrolden elde edilmektedir. Patolojide kullanılması için ticari parafine bazı maddeler ilave edilmiştir. Bunlar balmumu (kristal boyutu yapışmayı artırır), kauçuk (kırılganlığı azaltır, kolay seri kesit sağlar), diğer mumlar (yumuşak kıvam ve daha küçük kristal boyutu sağlar) ve sertlik ve desteği artıran plastiklerdir. Genel olarak parafinin özellikleri erime noktasına göre değişir. Erime noktası arttıkça parafin sertleşmektedir; bu da özellikle küçük dokularda seri kesit alınmasını zorlaştırmakta, sert dokularda ise daha iyi destek olmasına neden olmaktadır. Patolojide rutin işlemlerde parafinin erime noktası 55-58°C'dır. İyi bir infiltrasyon için doku parafinde optimum sürede kalmalıdır. Fazla kalırsa dokuda sertleşme ve büzüşmeler olmaktadır. Parafinin erime derecesi kaliteli bir doku takibi için her gün kontrol edilmelidir. İyi bir infiltrasyon için doku takibinde üç parafin kabı bulunmalı, son parafin kabında şeffaflandırıcı ajan kokusu alınmamalıdır. Bunun için kaplardaki parafin iş yüküne bağlı olarak 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. Parafin takipte uygulanan vakum 400mmHg basıncını geçmemelidir.

2. Alternatif maddeler:^{9,10}

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

3. Diğer maddeler

1. Agar
2. Jelatin
3. Selloidin (kolloidin-parloidin)

Alternatif maddeler içinde selloidin nöropatolojide ve bazı araştırmalarda minimal hücre hasar oluşturması nedeniyle tercih edilmektedir.⁹ Epoksi reçineleri elektronmikroskopik incelemelerde kullanılmaktadır. Akrilik reçinelerin sert dokularda iyi bir ortam oluşturduğu için kullanılabilmesi bildirilmektedir.⁸

Doku takibi işlemi

Patoloji laboratuvarlarında doku takibi üç şekilde yapılmaktadır.^{1,2,4,5}

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

Otomatik doku takibi:

Otomatik cihazlar yardımıyla yapılan taktır. Bu cihazlar çok çeşitli olmakla birlikte genel olarak açık ve kapalı sistem cihazlar olmak üzere ikiye ayrılırlar.

- a. 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.
- b. 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.

Otomatik doku takibinde protokoller laboratuvarlara göre farklılıklar göstermektedir. Açık ve kapalı cihazlar için rutin gecelik doku takibine ilişkin birer protokol örneği Tablo 1’de ve Tablo 2’de sunulmaktadır. Aynı takip edilmesi önerilen küçük dokular için bir protokol örneği de Tablo 3’te görülmektedir.

Manuel doku takibi

Tablo 1. Açık sistem, rutin gecelik doku takip protokolu örneği.²

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 süre	15 saat

Tablo 2. Kapalı sistem, rutin gecelik doku takip protokolu örneği.²

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
Absolu alkol	45 dakika (vakum)
Absolu alkol	1 saat
Ksilen	1 saat
Ksilen	1 saat (vakum)
Parafin	½ saat
Parafin	1 saat
Parafin	1 saat (vakum)
Toplam süre	12,5 saat

Tablo 3. Küçük biyopsiler için doku takip protokolu örneği (kapalı-açık).²

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

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.

Mikrodalga ile doku takibi

Mikrodalga fırınlar histoteknolojide ilk kez Moon ve arkadaşları tarafından 1987 yılında kullanılmıştır.^{1,2} Bu yöntem dokuların tamponlu formalin içinde ışınlanması, bunu izleyerek tek basamak şeklinde etanol ile dehidrasyonu, isopropanol ile temizlenmesi ve parafinizasyon aşamalarını içermektedir.^{1,2,8} Ülkemizde de bu yöntem ilk kez Umar ve Pabuçuoğlu¹¹ tarafından uygulanmıştır (Tablo 4).

Doku takibinde en sık karşılaşılan problemler ve çözümleri

Açık sistem otomatik doku takibinde^{2,4-6}

1. Kaset sepeti yanlışlıkla ilk önce parafin kabına konabilir. Çözüm, sepetin hemen parafinden çıkarılması, parafin sertleştikten sonra (dokular ksilene konmamalıdır!!) dokulardan sıyırıp temiz kasetler kullanılarak takibin yeniden başlatılmasıdır.
2. Takip bittikten sonra dokular tekrar ilk solüsyon kabına –fiksatif– girebilir. Çözüm %95 etanol

Tablo 4. 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
İsopropanol	60 saniye
Ksilen	45 dakika (etüvde sıcak ksilen)
Parafin	60 dakika
Toplam süre	117 dakika

aşamasından sonraki takip prosedürünün uygulanmasıdır.

3. 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 absölu alkol, %20 kısım 0.05 sulu sodyum karbonat solüsyonu ile rehidre edilmelidir. Bu solüsyonda 8-12 saat tutulan dokuların yeniden takibine başlanır.²
4. Kimyasal solüsyonların seviyeleri yetersizliği nedeniyle dokularda kuruma olabilir. Çözüm, yukarıda tanımlanan rehidrasyon solüsyonunun aynı sürede uygulanarak yeniden takibe başlanmasıdır.
5. Takip solüsyonlarının birbirine karışması sonucunda yetersiz dehidrasyon, seffaflama veya infiltrasyon söz konusu ise solüsyonlar yenilenip alkollerden başlayarak tekrar takip yapılır. Bu durumun en baştan önlenmesinin yolu ise takip solüsyonlarının periyodik değişimlerinin yapılmasıdır.

Kapalı sistem otomatik doku takibinde

1. 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.

2. Çinko formalin kullanılıyor ve pH>7 ise cihazın borularında çökelti oluşabilir. Bu durumun çözümü dilue asetik asit solüsyonu (%5-20) ile temizleme yapılması² ve pH ölçümlerine gereken özenin gösterilmesidir.
3. Takip cihazlarının kapağında yoğunlaşan formalin parafin infiltrasyonunu engeleyebilir. Buna önlem olarak makinalara periyodik bakım ve temizlik yapılmalıdır.

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/seffaflama için 30-90 dakika tetrahidrofuranda, 10 dakika ksilende ve her biri 30-45 dakika sürecek şekilde 2-3 parafin istasyonunda tutulup bloklanır.²

Gömme işlemi

Gömme ya da bloklama dokuların infiltrasyon ortamı ile kaplanmasıdır.^{2,4} Bloklamada en kritik nokta dokuya doğru oryantasyondur. Genellikle büyük ve düz parçaların bloklanması pek sorun ile karşılaşılmazken. Sorun çıkaran küçük dokuların gömülmesinde diseksiyon mikroskopunun yardımı olabilir.

Gömme işlemi sırasında parçanın özelliklerine dikkat etmek gereklidir:

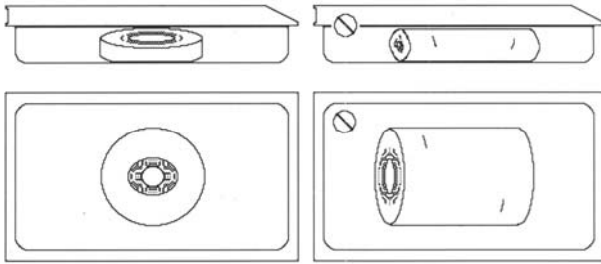
- Kemik gibi sert dokular bloklara diagonal yerleştirilmelidir (Şekil1).
- Deri mutlaka epidermis üstte kalacak şekilde bloklanmalıdır.
- Tüp yapısındaki dokular transvers bloklanmalıdır (Şekil 2).
- Çini mürekkep ile işaretli parçalarda boyalı yüzey yatırılmalıdır.
- Çok sayıda küçük parçayı aynı bloğa yerleştirirken parçalar bloğun uzun eksenine paralel yerleştirilmelidir.
- Dokular bloğun ortasına yerleştirilmelidir.

- Bir bloğa en fazla 4-5 küçük parça yerleştirilmelidir.

Dokular gömüldükten sonra parafin hızlı bir şekilde soğutulmalı ve kristal yapısına dönmesi sağlanmalıdır.



Şekil 1. Kemik dokusunun diogonal bloklanmış şekli.



Şekil 2. Tüp yapısındaki organların, solda doğru, sağda yanlış bloklanması.

Alternatif gömme teknikleri

Sert dokularda yapışmayı sağlamak, parçalı dokuları birarada tutarak doku bütünlüğünü sağlamak amacıyla çift gömme maddesi bir arada kullanılabilir.¹⁰ Bu maddeler arasında en sık birarada kullanılanlar selloidin-parafin ve agar-parafindir.^{1,2,10}

Kaynaklar

1. Bancroft JD. Theory and practice of histological techniques. 3rd ed. London: Churchill Livingstone 1990; 43-67.
2. Carson FL. Histotechnology-Asel-Instructional text. 2nd ed. ASCP Chicago 1997; 25-37.
3. Carson FL, Kingsley WB, Race GJ: Drierite as a dehydrant, indicator and marker for paraffin embedded tissues. Am J Med Tech 1970; 36: 283-5.
4. Culling CFA: Handbook of histopathological and histochemical techniques. London, Butterworths, 1974; 1-27.

5. Prophet ED, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. Laboratory Methods in Histotechnology. Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC. 1994; 23-54.
6. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology 2nd ed. Columbus, Ohio, Battelle Press, 1980; 27-37.
7. Küpeliöğlü AA, Pabuçcuoğlu U. Patoloji ve sitopatoloji laboratuvar teknikleri. DEÜ Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu yayın no: 3, İzmir, 1995.
8. Leong ASY, Sormunen RT. Microwave procedures for electron microscopy and resin embedded sections. Micron 1998; 29: 397-409.
9. Ventura L, Bologna M, Ventura T, et al. Agar specimen orientation technique revisited: A simple and effective method in histopathology. Annals of Diagnostic Pathology 2001; 5 (2): 107-9.
10. Hurley PA, Clarke M, Crook JM et al. Cochleara immunochemistry-a new technique based on gelatin embedding. Journal of Neuroscience methods 2003; 129 (1): 81-6.
11. Umar MH, Pabuçcuoğlu HU, Öcal D. Histoteknikte modifiye mikrodalga metodu. Türk Patoloji Dergisi 1990; 6(2): 67-70.