

# Farklı tespit solusyonlarıyla perfüzyon ve immersiyon tespit yöntemlerinin değişik dokularda ışık mikroskopik düzeyde karşılaştırılması

Sibel Köktürk, Süreyya Ceylan, Melda Yardımoğlu, Hakkı Dalçık, Süheyla Gonca  
Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı değişik tespit solusyonlarıyla perfüzyon ve immersiyon tespit yöntemlerini kullanarak farklı dokularda oluşan histolojik farklılıkları değerlendirmektir. **Yöntem:** Wistar cinsi dişi sıçanlar perfüzyon ve immersiyon tespit yöntemleri kullanılarak tespit edildi. Sıçanların beyin, karaciğer, böbrek ve ovaryum gibi çeşitli organlarından doku örnekleri alındı. Tespit sırasında 0.1 M fosfat tamponlu % 10 formalin, 0.1 M kakodilat tamponlu % 4 paraformaldehit ve 0.1 M kakodilat tamponlu % 2.5 gluteraldehit (CaCl<sub>2</sub> ve MgCl<sub>2</sub>'lü) olmak üzere değişik tespit solusyonları kullanıldı. Perfüzyon ve immersiyon tespit yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları değerlendirildi. Doku kesitleri tespit artefaktları, tespit gradienti ve doku komponentlerinde oluşan değişiklikler bakımından incelendi. **Bulgular:** Mikroskopik incelemeler sonucunda perfüzyonun doku morfolojisini daha iyi koruduğu görüldü. Tespit solusyonlarıyla yaptığımız karşılaştırmada da 0.1 M kakodilat tamponlu % 4 paraformaldehit perfüzyonuyla iyi sonuçlar elde edildi. **Sonuç:** Perfüzyon yöntemiyle tespit solusyonu hücrelere vasküler sistem aracılığıyla hızlı bir şekilde ulaştığından dokuda istenmeyen tespit artefaktları ortadan kaldırıldı.

Anahtar kelimeler: Tespit, immersiyon, perfüzyon, tespit solusyonu, ışık mikroskobu.

## Comparison of histological differences in different tissues using perfusion and immersion fixation procedures with different fixatives at light microscopy

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the histological differences in different tissues by using perfusion and immersion fixation procedures with different fixatives. **Methods:** Wistar rats were fixed by perfusion and immersion fixation procedures. Tissue samples were obtained from the brain, liver, kidney and ovaries of rats. 10% formalin in 0.1 M phosphate buffer, 4% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (with CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub>) were used as fixatives. Advantages and disadvantages of perfusion and immersion fixation methods were evaluated. The sections were evaluated according to the artefacts of fixation, gradient of fixation and variations of tissue components. **Results:** Results of microscopical studies revealed that tissue morphology was better preserved by perfusion method. Better results was obtained with 4% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer. **Conclusion:** Fixatives move rapidly to the cells through vascular system with perfusion method, artefacts of fixation were successfully removed.

Key words: Fixation, immersion, perfusion, fixatives, light microscopy.

Genel Tıp Derg 1999;(4):135-9.

Yazışma adresi: Yrd.Doç.Dr.Sibel Köktürk, Kocaeli Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli

Dokular mikroskopik incelemeye alınıncaya kadar çeşitli aşamalardan geçer. Bu aşamalardan ilki tespittir. Tespitin kalitesi, dokunun canlı durumdakine (in vivo) en yakın şekilde tutulması

açısından önemlidir. Bu nedenle günümüzde tespitle ilgili histoteknik alanda yapılan çalışmalar devam etmektedir. Araştırmalarda kullanılan yöntemin pratikliği kritik bir unsur olarak görülmektedir. Herhangi bir ek iş veya zorluk işleminden vazgeçirebilir. Fakat tıbbi etik, profesyonel sorumluluk ve işlemin yararı da göz önünde tutulmalıdır. Katı dokuların tespitinde immersiyon ve perfüzyon olmak üzere başlıca iki yöntem kullanılmaktadır (1). Perfüzyon yönteminde kullandığımız teçhizat (serum şişesi, infüzyon seti, kanül) ucuz, basit ve portatiftir. Operasyon veya postmortem odasında çok çabuk kurulabilir.

Bu çalışmanın amacı, değişik doku tespit solusyonlarıyla, değişik dokularda vasküler perfüzyon ve immersiyonla tespit yöntemi arasındaki histolojik farklılıkları açığa çıkarmaktır. Bu amaçla, tespit yöntemleri ve tespit solusyonları nedeniyle oluşan hücre farklılıklarını değerlendirmeyi planladık.

## Yöntem

Çalışmada deney hayvanı olarak 30 adet dişi Wistar cinsi sıçan (250-300 g) kullanıldı. Sıçanlar perfüzyon ve immersiyon tespit yöntemlerinin uygulanacağı iki gruba ayrıldı. Her iki gruba sırasıyla 0.1 M fosfat tamponlu (pH: 7.4) % 10 formalin, 0.1 M kakodilat tamponlu (pH: 7.4) % 2.5 gluteralehit (0.5 mM CaCl<sub>2</sub> ve 0.25 mM MgCl<sub>2</sub> ile) ve 0.1 M kakodilat tamponlu (pH: 7.4) % 4 paraformaldehit tespit solusyonlarıyla tespit yapıldı.

Perfüzyon yönteminde sıçanlar önce Ketalar (65 mg/kg)'ın intraperitoneal enjeksiyonuyla derin anestezi altına alındı. Toraks duvarı processus xiphoideus'dan başlanıp, costaların iki yanından, parasternal çizgi hizasından kesilerek açıldı ve cranial yönde kaldırılıp, sabitlendi. Diyafram ve pericardium kesildi. 5000 ünite sodyum heparin, 1 ml % 0.9'luk serum fizyolojik içinde eritilerek sol ventrikülden dolaşıma verildi. Sonra sağ atriya ensizyon yapılarak kanın dışarı akışı sağlandı. Kalp kontraksiyona devam ederken kanül ile apeks tarafından sol ventrikül içine girildi.

Kanül vasıtasıyla kan vücuttan tamamen uzaklaşmaya kadar sol ventriküle % 0.9'luk serum fizyolojik solusyonu (yaklaşık 100 ml) verildi. Perfüzyonun başlamasından yaklaşık 5-10 dk sonra

sıçanın tüm kanı dışarı akıtıldı ve organlar soluklaştı. Ardından aynı şekilde tespit solusyonu ventrikülden dolaşıma verildi. Şişeler deney hayvanından yaklaşık 1-1.5 m yüksekte tutuldu. Kalp kontraksiyonu durduğunda sıvıların vücuda verilmesinde bu yükseklikten yararlandı. Sıçana 15 dk içinde yaklaşık 200 ml tespit solusyonu (oluşturulan basınçla dakikada 6 ml'lik bir akım elde edildi) verildi. Perfüzyona bütün vücut sertleşinceye ve özellikle organlar (karaciğer, akciğer v.s.) beyazlaşmaya kadar devam edildi.

Vasküler perfüzyonla tespit işlemini takiben çeşitli organlardan (beyin, böbrek, ovaryum) biyopsi alındı. Alınan dokular aynı tespit solusyonunda 24-48 saat bekletildi. Dokular 0.1 M fosfat tamponlu (pH: 7.4), % 10 formalin'de oda ısısında (25 °C); 0.1 M fosfat tamponlu (pH: 7.4) veya 0.1 M kakodilat tamponlu (pH: 7.4) % 2.5 gluteralehit'de (CaCl<sub>2</sub> ve MgCl<sub>2</sub> ile) +4 °C'de buzdolabında; 0.1 M kakodilat tamponlu (pH: 7.4) paraformaldehit'de +4 °C'de buzdolabında saklandı.

İmmersiyonla tespit yönteminde sıçanlar Ketalar (65 mg/kg)'ın intraperitoneal enjeksiyonuyla anestezi altında sakrifiye edildi. Alınan doku örneklerine aynı tampon ve tespit solusyonlarıyla 24-48 saat tespit uygulandı.

Daha sonra her iki tespit grubunun örnekleri rutin ışık mikroskobu takibi uygulanarak parafine gömüldü. Parafin bloklardan 5 µ'luk kesitler alınarak H&E ile boyandı. Daha sonra Olympus marka fotoğraf ataçmanlı mikroskoplara fotoğrafları çekildi.

## Bulgular

Makroskobik olarak organların dış yüzeyi ve kesik yüzeyi incelendi. İmmersiyonla organların damarları kan ile dolu olduğu için koyu kırmızı ve yer yer daha koyu veya açık olmak üzere heterojen bir renk dağılımı mevcuttu. Perfüzyonla organlarda damarlar kandan arındırılmış olduğundan açık ve homojen bir renk dağılımı mevcuttu. İmmersiyon yöntemiyle tespit için deney hayvanının vücutundan organların alınması ve küçük parçalara ayrılması, yumuşaklığı nedeniyle zordu. Özellikle beyin diseksiyonu sırasında mekanik hasar olasılığı vardı. Perfüzyon yöntemiyle tespit edilen deney hayvanının bütün vücutu sertleştiği için, diseksiyonu sırasında mekanik hasara karşı dayanıklıydı. Ayrıca, tespit sonrası küçük parçalara ayrılması da kolaydı.

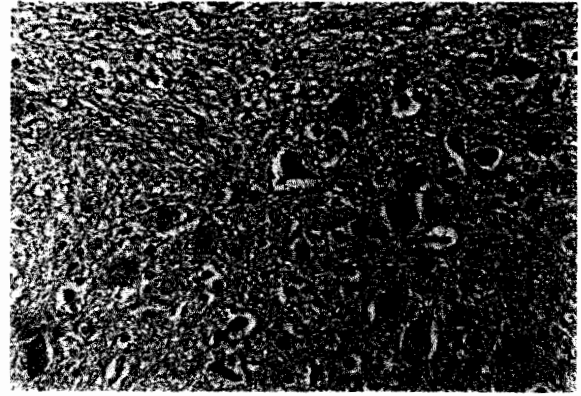
Işık mikroskopuyla genel olarak 0.1 M fosfat tamponlu % 10 formalin, 0.1 M kakodilat tamponlu % 4 PFA ve 0.1 M kakodilat tamponlu % 25 GA (CaCl<sub>2</sub> ve MgCl<sub>2</sub> ile) ile iki farklı tespit yöntemiyle gözlenen ortak bulgular aşağıdaki gibidir (Tablo 1).

*Tablo 1. Farklı tespit solusyonları ve tespit yöntemleriyle saptanan bulgular.*

Solusyon	İmmersiyon Yöntemi	Perfüzyon Yöntemi
% 4 PFA	Hücresel düzeyde büzüşme artefaktı	En iyi korunmuş hücre morfolojisi
	Heterojen ve net olmayan görüntü	Homojen ve temiz görüntü
% 2.5 GA	Hücresel düzeyde büzüşme artefaktı	İyi korunmuş hücre morfolojisi
	Heterojen ve net olmayan görüntü	Homojen ve temiz görüntü
	Parçalanma ve dökülme artefaktı	
% 10 Formalin	Doku genelinde büzüşme artefaktı	İyi korunmuş hücre morfolojisi
	Heterojen ve net olmayan görüntü	Homojen ve temiz görüntü
	Parçalanma ve dökülme artefaktı	

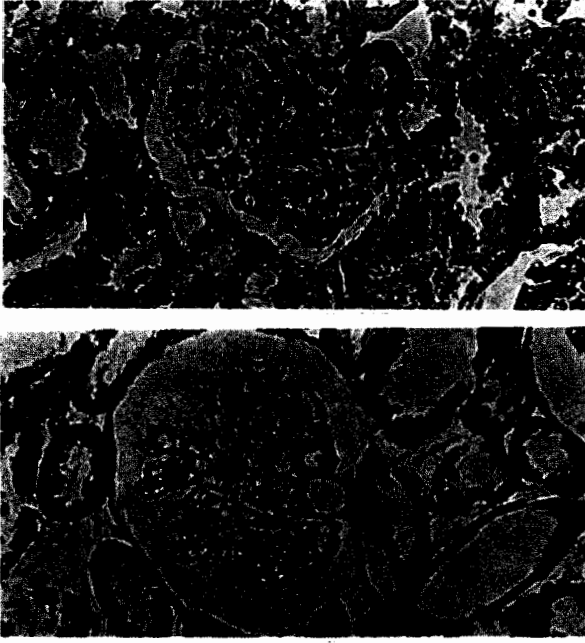
İmmersiyon yöntemi kullanılarak tespit edilen beyin dokusunda normal yapı özelliklerinin yeterince korunmadığı belirlendi. Formalin tespit solusyonuyla doku genelinde büzüşme artefaktı gözlemlendi. Beyin korteksinde piramidal hücrelerin ve nörogliaların çevresinde vakuolizasyon vardı. Hücrelerin sitoplazmalarının tam korunmadığı gözlemlendi (Şekil 1 a).

0.1 M kakodilat tamponlu % 2.5 GA (CaCl<sub>2</sub> ve MgCl<sub>2</sub> ile) ve % 4 PFA ile immersiyon tespitinde ise; beyinde hücre düzeyinde bir büzüşme artefaktı vardı. Doku genelindeki büzüşme formalin fiksatifine göre daha azdı. Genel açıdan piramidal hücrelerin dentritik uzantıları belirgin değildi. Nörogliaların nükleusları daralmış ve piknotik hale gelmişti. Perfüzyon yöntemiyle tespit edilen beyin dokusu homojen bir görünüm gösteriyordu. Nöronlar ve nöroglia hücreleri iyi korunmuştu. Perfüzyonda hücrelerin dentritik uzantıları kolaylıkla seçilebilmekteydi (Şekil 1 b).



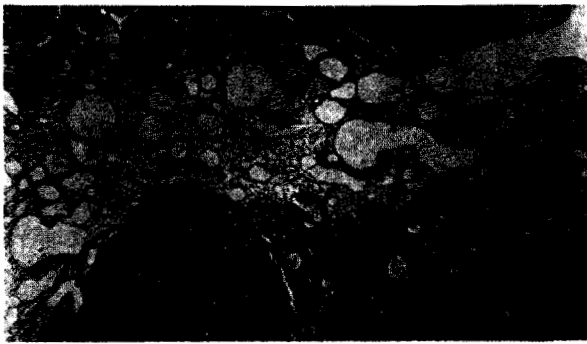
*Şekil 1. Paraformaldehit immersiyon (a) ve perfüzyonu (b) ile tespit edilmiş beyin dokusu görülmektedir.*

İmmersiyonla tespit edilen böbrek dokusunda glomerul kapillerleri kan hücreleriyle doluydu. Bu nedenle kapiller endotelinin ayırt edilmesi zordu. Bowman kapsül aralığı dardı. Bu nedenle yer yer glomerul sınırı ve Bowman kapsülünün parietal tabakası zor ayırt edilmekteydi. Proksimal ve distal kıvrıntılı tubuluslar ise kolayca ayırt edilemedi. Ayrıca, GA ile immersiyon yönteminde böbrekte tubuluslarda ve Bowman kapsülünde parçalanmalar vardı. Perfüzyonla tespit edilen böbrek dokusunda glomerul kapillerleri, kan hücrelerinden arıtıldığı için, sınırları ayrılabilen daha düzgün bir görünüm gösterdi. Glomerul ile parietal tabaka arasındaki kapsül boşluğu geniştir. Böylece, parietal tabakanın tek katlı yassı epitel hücreleri kolayca ayırt edildi. Proksimal ve distal kıvrıntılı tubuluslar kolaylıkla ayırt edilebilecek şekildeydi (Şekil 2).



Şekil 2. Paraformaldehit immersiyon (a) ve perfüzyonu (b) ile tespit edilmiş böbrek dokusu görülmektedir. Perfüzyonla tespititte Glomerul ve Bowmann kapsülünün yapısal komponentleri daha belirgin görülmektedir.

İmmersiyonla tespit edilen ovaryum dokusunda germinal epitelde yer yer dökülmeler ve folikül epitellerinde parçalanmalar görüldü. Medulladaki kan damarlarının lümenleri eritrositlerle doluydu. Bu nedenle medulla stroması karmaşık bir görünümdeydi. Perfüzyonla tespit edilen ovaryum dokusunda germinal epitel ve folikül epitellerinin bütünlüğü korunmuştu. Medulladaki kan damarları eritrositlerden yoksundu. Bu nedenle, korteks ve medulla stroması birbirinden kolaylıkla ayrılabilirdi (Şekil 3).



Şekil 3. Formalin perfüzyonu ile tespit edilmiş ovaryum dokusu görülmektedir. Korteks ve medulla stroması birbirinden kolayca ayrılmaktadır.

## Tartışma ve sonuç

Dalton ve ark tarafından 1950 yılında ortaya çıkarılan ve 1962'de Palay ve ark tarafından geliştirilen vasküler perfüzyon tespiti elektron mikroskobu için hazırlık aşaması olarak biliniyordu (2,3). Özellikle primer fiksatif olarak bifonksiyonel aldehitlerin kullanmasından sonra, vasküleritenin yoğun olduğu dokuların tespiti için kullanılan bir yöntem oldu (2).

Çeşitli araştırmalarda (4-8) immersiyon tespit yöntemiyle değişik PT hücre tipleri görülürken, perfüzyon tespit yöntemiyle hücreler aynı morfolojide gözlenmiştir.

Roberts ve ark (9) toksisite ve yeni farmakolojik ajanların değerlendirilmesi için uygun doku örneklerinin elde edilmesini sağlayan tespit yöntemlerini araştırdıklarında perfüzyon tespit yöntemiyle karaciğer ve akciğerdeki patolojik değişiklikleri belirgin şekilde gözlemişlerdir.

Epstein ve Rohent (10) maymun gözünde normal ve artan intraoküler basınçta, katyonize ferritin perfüzyonu sonrası Schlemm kanalı ve komşu alanların endotel yüzeyinin morfolojik görünüşünü incelemişlerdir. Ciuera ve Gil (11) perfüzyon yöntemiyle fikse edilen tavşan akciğerinin üç zonundaki kapillerlerin morfometrisini incelemişlerdir. Perfüzyon tespit yöntemiyle, kapiller lümeninin ve diğer kanalların kollabe olma durumunun ortadan kalkmasıyla, sıvı akışının rotası izlenmiştir (10-12).

Roberts ve ark (9) perfüzyon yöntemini, özellikle mekanik hasara karşı hassas, yumuşak dokularda oldukça kullanışlı bulmuşlardır. Çalışmamızda perfüze edilen sıçanların tüm organ ve dokuları kesilebilir sertlikteydi. Özellikle beyin diseksiyonu sırasında hasar olasılığı ortadan kalktı.

Yetersiz tespit edilen dokuda daralma ve yarıлма artefaktları artmaktadır. İmmersiyon yönteminde tespit solusyonlarının bu avantaj ve dezavantajları önemli rol oynamaktadır. Perfüzyon yönteminde tespit solusyonunun yavaş penetrasyon dezavantajı ortadan kaldırılmaktadır. Böylece geçen zaman ve alınan mesafe azaltılmaktadır. GA'in düşük penetrasyon oranı ve FA'in düşük tespit oranı telafi edilmektedir (1,7).

Çalışmamızda farklı tampon kombinasyonları, konsantrasyon ve sıcaklıklarda değişik aldehitler

kullandık. İmmersiyon tespit yönteminde 0.1 M fosfat tamponlu % 10 formalin, 0.1 M kakodilat tamponlu % 4 paraformaldehit ve 0.1 M kakodilat tamponlu % 2.5 gluteraldehit (CaCl<sub>2</sub> ve MgCl<sub>2</sub>'lü) olmak üzere değişik tespit solusyonlarıyla dokularda değişik oranlarda büzüşme artefaktı görüldü. Formalinle doku genelinde bir büzüşme artefaktı görüldü. Hücresel düzeydeki büzüşme diğer tespit solusyonlarına göre daha azdı. PFA ve GA ile hücresel düzeyde bir büzüşme görüldü. Perfüzyonla tespit edilen dokularda bu artefaktların büyük oranda ortadan kalktığı gözlemlendi. En iyi perfüzyon 0.1 M kakodilat tamponlu % 4 paraformaldehit ile gözlemlendi. Bunun yanında perfüzyon yöntemiyle tespit edilen dokuda hücre morfolojisi daha iyi korundu. Mikroskopik görüntü daha temiz ve belirgindi. Böylece sonuçlar gösterdi ki, tespit artefaktları immersiyon tespitiyle ortaya çıkar ve aldehitler, tampon kombinasyonları, konsantrasyon ve sıcaklık artefakt oluşumunu teşvik eden önemli faktörlerdir.

### Kaynaklar

1. Hopwood D. Fixation and fixatives. In: Bancroft JD, Stevens A, editor. Theory and practice of histological techniques. 4th ed. Hong Kong: 1996. p.23-46.
2. Thorball N, Tranum-Jensen J. Vascular reactions to perfusion fixation. J Microscopy 1983;129:123-39.
3. Rostgaard J, Qvortrup K. Electron microscopic demonstration of filamentous molecular sieve plugs in capillary fenestrate. Microvascular Res 1996;53:1-13.
4. Larsson HO, Lorentzon R, Boquist L. Structure of parathyroid glands, as revealed by different methods of fixation. Cell Tissue Res 1984;235:51-8.
5. Wild P, Manser EM. Ultrastructural morphometry of parathyroid cells in rats of different ages. Cells Tissues Res 1985;240:585-91.
6. Wild P, Schraner EM, Augsburg H, Berlinger R, Pfister R. Ultrastructural alteration in mammalian parathyroid glands induced by fixation. Acta Anat 1986;126:87-96.
7. Wild P, Kellner SJ, Schraner EM. Parathyroid cell variants may be provoked during immersion fixation. Histochemistry 1987;87:263-71.
8. Kanter M, Dalçık H, Köksal V, Öztaş M, Özcan O. Parathyroid cell variants may be induced by different fixatives I: A light microscopic study. Gazi Med J 1996;7:61-65.
9. Roberts JC, Mccrossan MV, Jones HB. The case for perfusion fixation of large tissue samples for ultrastructural pathology. Ultrastructural Pathol 1990;14:177-91.
10. Epstein DL, Rohent JW. Morphology of trabecular meshwork and inner-wall endothelium after cationized ferritin perfusion in the monkey eye. Invest Ophthalmolog Y Visual Sci 1991;32:160-71.
11. Ciuera D, Gil J. Morphometry of capillaries in three zones of rabbit lungs fixed by vascular perfusion. Anatomical Record 1996;244:182-92.
12. Adickes ED, Folkerth RD, Sims KL. Use of perfusion fixation for improved neuropathologic examination. Arch Pathol Lab Med 1997;121:1199-206.