



# DOKU TESPİTİ

Dr.Yasemin Sezgin



- Patoloji laboratuvarlarında çok sayıda tanısal teknik kullanılmakta ve çoğunluğu laboratuvar teknikerlerince gerçekleştirilmektedir.
- Ancak, laboratuvar yöntemlerinin beklenen kaliteli sonuçları verebilmesi için dikkat edilmelidir



## FIKSASYON NEDİR?

- Histoteknolojinin ilk basamađı
- Patolojik inceleme amacıyla alınan doku parçasının alınışından incelenmesine kadar geçen süre içinde bozulmasını (otoliz) önlemek ve canlı organizmadaki haline en yakın şekliyle kalmasını sağlamak amacıyla yapılan kimyasal koruma işlemidir.



# FIKSASYON

- Dokular insan vücudundan ayrıldıkları anda canlıdırlar ve taşıdıkları hastalığın (varsa) morfolojik bulgularını sergilerler.
- Tespit, dokuların o andaki görünümünün ısı, nem ve enzimlerin etkisiyle değişmesini, bozulmasını önlemek amacıyla yapılır



Tespit edilmeyen dokulardaki hücreler , bir süre sonra bakterilerin ve içerdikleri sindirici enzimlerin etkisiyle otolize uğrar, morfolojik özelliklerini yitirir ve tanısal amaçlı incelemelerde kullanılamayacak duruma gelirler..



## TESPİTİN AMACI

- **Tespitin amacı** protoplazmadaki protein, lipid, karbonhidrat ve diğer maddeleri koagüle veya presipite ederek mikroskopik kesit hazırlanıncaya kadar karşılaşacakları reaktif ataklara karşı dirençli kılmaktır.



- Tespit işlemi, dokuyu;
  - I. Hücresel enzimlerin neden olduğu otolizden ,
  - II. İnfeksiyöz ajanları inaktive ederek ya da öldürerek bakteri ya da mantarlarca oluşturulan dekompozisyondan korur.
  - III. Dokuyu sertleştirir ve doku componentlerini stabilize eder.



## TESPITIN İSTENMEYEN ETKİLERİ

- Bununla birlikte, tespitin dokular üzerinde istenmeyen etkileri de söz konusudur.
- Bunlar ;
  - I. Protein yapısındaki değişimler,
  - II. Doku komponentlerinin çözünmesi,
  - III. Dokunun büzüşmesi
  - IV. Nükleik asitlerin degradasyonu .





## TESPITIN PROTEINLER ÜZERİNDE ETKİSİ

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, çözünebilir proteinlerin yapısal proteinlere sabitlenerek çözünmez hale geldiği bildirilmektedir.



## TESPITIN LİPİTLER ÜZERİNDE ETKİSİ

- Tespitin lipitler üzerindeki etkisi konusunda çok fazla bilgimiz yok,
- Geleneksel tespit ve doku takip işlemlerinin lipitlerin kaybına yol açtığı bilinmektedir
- Lipitlerin değerlendirilmesi gerekiyorsa frozen kesitler tercih edilmelidir.



## TESPITIN KARBOHIDRATLAR ÜZERİNDE ETKİSİ

- Glikojen-mukopolisakkaritler glikojenin suda eriyen bir madde olması nedeniyle alkol tespitini gerektirir
- Müsinler için ise spesifik tespit modelleri gerekmez.



# TESPITI ETKİLEYEN FAKTÖRLER

1. Hidrojen iyonu konsantrasyonu ve tamponlar
2. Sıcaklık
3. Fiksatiflerin penetrasyonu
4. Fiksatifin osmolaritesi
5. Fiksatifin konsantrasyonu
6. Tespitin süresi



## 1-HİDROJEN İYONU KONSANTRASYONU VE TAMPONLAR.

- 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 pH 6 ile 8 arasında gerçekleşir.



## 2. SICAKLIK.

- 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 tespit de daha yüksek sıcaklıklarda hızlandığı bir gerçektir.
- Buna karşın sıcaklığın arttırılmasının otolizi hızlandırabileceği ve bazı antijenlerin zarar görmesine yol açabileceği unutulmamalıdır.



### 3. FIKSATIFLERİN PENETRASYONU

- Fiksasyon için önemli bir noktadır.
- Penetrasyon nispeten yavaş bir işlemdir, tatminkâr bir tespit için küçük boyutlu ya da ince doku örneklerine gereksinim vardır.
- $d = K\sqrt{t}$
- d: fiksatifin penetrasyon derinliği
- t: Fiksatifte kalma süresi
- K: Fiksatifin difüzyon katsayısı



- Fiksatiflerin dokulara difüzyonunda, penetrasyon derinliğinin ( $d$ ), fiksatifte geçen sürenin kare köküyle orantılı olduğu bulunmuştur
- 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 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 componentleriyle reaksiyon oranına da bağlıdır.

#### 4. FIKSATIFIN OSMOLARİTESİ.

- Hipertonik solüsyonların hücre büzüşmesine, izotonik fiksatiflerin hücre şişmesine neden olduğu ve en iyi sonuçların hafifçe hipertonik solüsyonlarla (400-450 mOsm) elde edildiği bulunmuştur.



## 5. FIKSATIFIN KONSANTRASYONU

- Fiksatiflerin farklı konsantrasyonlarının histomorfoloji üzerindeki etkileri konusunda deneysel çalışmalar yürütülmüştür.
- Aynı zamanda dokuların boyanmasının da kullanılan fiksatif konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterdiği saptanmıştır.



## 6. TESPİTİN SÜRESİ.

- 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 kırılmalık artımına neden olabilir.
- Tespit süresi ile ilgili spesifik bilgilere çeşitli fiksatif başlıkları altında değinilecektir.



- Bu arada, son olarak tespit işleminin bazı artefaktlara yol açabileceği de akılda tutulmalıdır.
- Hücre içi ve dışı komponentlerde oluşabilecek hacim değişiklikleri ve asidik formalinde tespit edilen dokuların kesitlerindeki formalin pigmenti bu artefaktlara 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 tespite tabi tutulabilir.
- Bu sayede kesit ve boya kalitesi yönünden daha iyi sonuçlar elde edilebilir.



- **FİKSATİFLERİN GENEL İŞLEVLERİ**
- Yukarıda da vurgulandığı gibi, iyi 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.7



# FIKSATIFLERİN İŞLEVLERİ KISACA ŞÖYLE ÖZETLENEBİLİR :

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.





**BU NEDENLE, DOKULARI TESPİT ETMEK VE OTOLİZ VE PÜTRİFAKSİYONU ÖNLEMELİK İÇİN TESPİT SOLÜSYONUNUN;**

- a. Dokuyu büzmemesi, şişirmemesi ve eritmemesi,**
- b. Enzimleri inaktive etmesi,**
- c. Dokudaki mikroorganizmaları öldürmesi,**
- d. Dehidratan, şeffaflandırıcı, sertleştirici ve boyayıcı ajanlarla karşılaştığında dokunun orijinal şeklini korumasını sağlayacak şekilde doku elemanlarını değişikliğe uğratması beklenir.**



- Burada önemle belirtmek gerekir ki, her türlü amaca hizmet edebilen tek bir fiksatif bulunmamaktadır.
- Dolayısıyla farklı fiksatiflerin kullanımını 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.



# FİKSATİF TÜRLEİ

## 1. Aldehidler :

Formaldehid, glutaraldehit v.b.

## 2. Oksitleyici ajanlar:

Osmium tetroksid, potasyum permanganat, potasyum dikromat

## 3. Protein denatürasyonu yapanlar :

Metil alkol, etil alkol, asetik asit

## 4. Fiziksel:

Isı, mikrodalga

## 5. Diğerleri:

Civa klorür, pikrik asit, v.b.



○ Standart fiksatif % 10'luk formalindir.

- %80'lik etil alkol,
- Bouin solüsyonu,
- Zenker solüsyonu,
- B5 solüsyonu,
- Carnoy solüsyonu ve
- Glutaraldehit

gibi başka tespit sıvıları da yeri geldikçe kullanılabilir



- Sitolojik örneklerin havada kurutulmaları veya ısıtılmaları da tespit yöntemleri arasındadır
- Bu tür tespit yöntemlerine daha çok hematolojik ve mikrobiyolojik boyalar kullanılacaksa başvurulur
- Uygun formalin solüsyonunda bekletilen dokular aylar-yıllar sonra bile histopatolojik olarak rahatlıkla değerlendirilebilir



- Bilindiđi gibi çoğu patoloji laboratuvarında kullanılan standart fiksatif % 10'luk formalindir.
- Formalin formaldehidin sudaki % 40'lik çözeltisidir.
- Dolayısı ile % 10'luk formalin dendiğinde aslında %4 formaldehid anlaşılmalıdır.
- Formalin her türlü materyalin rutin fiksasyonu için kullanılabilir.
- Ucuz olup, doku bozulmaksızın uzun süre saklanabilir.
- Formalinde tespit edilen dokulara birçok özel boya ve immünohistokimya uygulanabilir.

- Buna karşın, tespit proteinlerin çapraz bağlanması ile gerçekleştiğinden antijeniter zamanla azalır.
- Bu dezavantaj antijeni açığa çıkarma yöntemleri ile bir noktaya kadar tersine çevrilebilir.
- Formalinin çapraz bağlar oluşturması yavaş bir süreçtir ve tamamlanması için 24-48 saat kadar süreye gereksinim vardır.
- Formalin ürik asit kristallerinin erimesine yol açar.



- Fiksasyonun 24 saatten fazla sürmesi durumunda meme dokusundaki kalsifikasyonlar da çözünebilir.
- Formalin, ışık mikroskopik olarak incelenecek dokuların tespitinde yaygın olarak kullanılmakla birlikte elektron mikroskopik inceleme için doku tespitine uygun değildir.





- Cerrahi materyalden elde edilen doku örneklerinin optimal tespiti için 24 saat kadar (ya da en azından bir gece) formalinde kalması önerilmektedir
- Küçük doku örnekleri için 24 saatlik bir süre pratik değildir.
- Bu tür biyopsilerde fiksatif penetrasyonu hızlı olduğundan bunlar patoloji laboratuvarına ulaştıkları gün histoteknik işleme alınabilirler.



○ *İğne biyopsileri ve endoskopik biyopsi örnekleri için*

➤ minimum 5-6 saat

○ *Daha büyük doku örnekleri için*

➤ 12 saatten fazla fiksasyon önerilmektedir.

Dokunun yeterli düzeyde tespit olduğundan kesin olarak emin olmak için

○ *Biyopsilerde*

➤ 6-18 saat ve

○ *Cerrahi materyallerde*

➤ 12-36 saat tespitin gerektiği belirtilmiştir

# TESPIT İÇİN DIKKAT EDİLMESİ GEREKEN EN ÖNEMLİ KONU

- Dokunun kalınlığı
- Fiksatifin hacmi
- Tespitin süresidir

Bu faktörlere dikkat edilmemesi dokunun yetersiz ya da aşırı tespitine yol açabilir.



○ *Sonuç olarak, rutin histopatolojik uygulamalarda tespit aşaması için genel prensipler şöylece özetlenebilir:*

1. Kullanılan fiksatif doku hacminin en az 10-15 katı hacimde olmalıdır.
2. İyi bir tespit için doku kalınlığının 2-3 mm'yi geçmemesi gerekir.
3. Çoğu fiksatifte dokunun 24 saat kalması gerekir. Ancak bu durumun istisnaları mevcuttur.
4. Genel olarak fiksasyonun oda ısısında yapılması daha uygundur.
5. Isı protein koagülasyonuna yardımcı olmakla birlikte, otolizi de hızlandıracağından bu konuda dikkatli olunması gerekir.



