

## RUTİN ELEKTRON MİKROSKOP TEKNİKLERİ

Berrin TARAKÇI Aydın GİRGIN

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 08.01.1998:

### Routine Techniques of Electron Microscopy

#### SUMMARY

In order to study biological material with the transmission electron microscope (T.E.M) complex series of techniques and processes is required. These processes are similar to those used in light microscopy, but some modifications are necessary because of differences in image formation. The processes involved are fixation in order to preserve structure, dehydration to remove all traces of water from the specimen and embedding to give mechanical support to the tissue during microtomy.

Almost all the reagents used in processing specimens for electron microscopy are potentially hazardous substances to various degrees. Many chemicals employed for fixation, rinsing, dehydration, embedding and staining are potentially capable of causing harm to workers. They can be absorbed either by skin contact or by inhalation. Therefore, some precautions should be taken before handling.

*Key words: Electron Microscope, Fixation, Dehydration, Embedding*

#### ÖZET

Biyolojik bir materyalin transmisyon elektron mikroskopunda (T.E.M.) incelenebilmesi için bazı kompleks işlemlere gerek vardır. Bu işlemler, ışık mikroskobu için hazırlanacak olan örneklerde kullanılan işlemlere benzer. Bununla birlikte, görüntü oluşturma mekanizmasındaki farklılık sebebi ile bazı değişiklikler de gereklidir. Bu işlemler normal yapının korunması için gerekli olan fikzasyon (tesbit), numunedeki suyu uzaklaştırmak için yapılan dehidrasyon ve mikrotomi boyunca dokuya mekanik destek vermek için yapılan gömme işlemleridir.

Elektron mikroskobu için numune hazırlama sırasında kullanılan kimyasal maddelerin hemen hemen hepsi insan sağlığı için değişen derecelerde zararlıdır. Fikzasyon, yıkama, dehidrasyon, gömme ve boyama esnasında kullanılan kimyasallar çalışanlara zarar verebilecek özelliklere sahiptir. Bu kimyasal maddelerin çoğu ya deriden kontakt yolla, yada solunum yolu ile absorbe edilebilir. Bu nedenle kullanılmaları esnasında bazı önlemlerin alınması gerekir.

*Anahtar Kelimeler: Elektron Mikroskop, Fikzasyon, Dehidrasyon, Gömme.*

#### GİRİŞ

Elektron mikroskopik çalışmalarda kullanılan mikroskop kadar incelenecek olan dokuların tesbiti ve hazırlanışı da çok önemlidir. Yapılması gereken işlemleri şöyle sıralayabiliriz.

1-Kimyasal Fikzasyon (Kimyasal Tespit), 2-Yıkama, 3-Dehidrasyon (Suyunu giderme), 4-Gömme

#### Kimyasal Fikzasyon

Fikzasyonun amacı; hücreyi canlı yapısına en yakın durumda koruyabilmek, bileşiklerindeki kaybı en aza indirmek ve tespit sonrası işlemlere karşı (yıkama, dehidrasyon, bloklama, boyama ve elektron ışınlarına maruz tutma) numunenin korunmasını sağlamaktır.

Elektron mikroskobu için mükemmel özelliklere sahip olan tek bir bileşik olmadığından, kullanılacak fikzatifin seçilmesi, incelenecek olan yapının kimyasal bileşimine ve çalışılacak olan dokunun tipine bağlı olarak belirlenir. En fazla kullanılan fikzatifler aldehidler ve osmiyum tetroksittir. Bu amaçla kullanılan maddeler arasında potasyum permanganat ve değişik metal tuzları da vardır. Doku numunesinin büyüklüğü ve fikzasyon teknikleri gibi bir çok faktör fikzasyon kalitesini etkilemektedir. Fikzatifin konsantrasyonu, ısısı, pH'sı ve fikzasyon süresi de oldukça önemlidir.

### Fikzasyonun kalitesini etkileyen faktörler

**1-Doku numunesinin boyutları:** Tatmin edici bir fikzasyon için istenilen özellikler arasında fikzatifin doku içerisine eşit miktarda dağılması başta gelendir. Fikzatifin eşit miktarda dağılması numunenin boyutlarına ve dokunun özelliğine bağlıdır. Doku numunesinin her bölgesinin eşit miktarda tesbit edilmesi isteniyorsa numunenin boyutları 0.5 mm' yi geçmemelidir.

**2- Fikzatifin pH' sı:** Fikzatifin pH'sı, doku pH'sına oldukça yakın olmalıdır. Eğer fikzatifin pH'sı oldukça yüksek, yada düşük olursa, dokunun ince yapısı radikal olarak değişecek ve doku proteinleri değişikliğe uğrayacaktır. İnsan ve çoğu hayvansal dokuların pH'sı 7.4 tür. Bu nedenle ince yapının en iyi şekilde korunması, fikzatifin pH değerinin 7.4 civarında tutulması ile mümkündür.

**3-Tesbit edici maddenin doku içerisine penetrasyonu:** Düşük molekül ağırlıklı kimyasalların örneğin formaldehidin, doku içerisine penetrasyonu hızlıdır. Bununla beraber moleküler ağırlık ile penetrasyon oranı arasında direk bir ilişki yoktur. Civa-II klorür oldukça yüksek moleküler ağırlığa sahip olmakla beraber dokuya iyi bir şekilde penetre olabilmektedir. Fikzatif olarak çok sık kullanılan formaldehid, glutaraldehid veya osmiyum tetroksit'ten, glutaraldehid ise osmiyum tetroksit'ten daha fazla penetre olabilmektedir.

**4- Sıcaklık:** 0- 4°C olmalıdır.

**5- Tespit süresi:** 1- 4 saat olmalıdır.

**6-Fikzatifin konsantrasyonu:** Genel olarak, düşük konsantrasyonlu fikzatiflerde tespit süresi daha uzundur. Uzun tespit süresi enzimlerin inaktive olmalarına, hücre materyallerinin yapılarının bütünlüklerinin bozulmasına, dokuların büzülmesine yada şişmesine yol açar. Fikzatif konsantrasyonun yüksek olması da benzer etkiler yapar. Genellikle yüksek yoğunluk, embriyonal dokular gibi fazla su

içeren dokularda kullanılır. Uygun konsantrasyonlar fikzatiflerin her birinin ayrı olarak ele alındığı kısımda bahsedilecektir.

### Tamponlar (Buffer'lar)

Bir nümune, tamponlanmamış bir fikzatif ile tesbit edildiğinde, hücredeki tamponlama sistemleri ortamdaki pH'nın korunmasını sağlayamaz. Bir doku numunesi tamponlanmamış fikzatifler ile tesbit edilirse doku pH'sı aside kayar. Neticede dokuda normal olmayan oluşumlar (artefaktlar) şekillenir. Örneğin bir doku tamponlanmamış olan osmiyum tetroksit (OsO<sub>4</sub>) ile tesbit edilirse, dokunun pH'sı 48 saat içerisinde 6.2 den 4.4'e düşer. Asitleşmenin şekillenmesi kısmi olarak şöyle açıklanabilir: protein makromoleküllerinin geri dönüşümsüz olarak düşük molekül ağırlığına sahip proteinlere dönüşümü ve neticede ortamda karboksil iyonlarının artışıdır.

Tampon solüsyonları, zayıf asit ve zayıf bazlarla bunların tuzlarını içerirler. Buffer solüsyonuna küçük miktarlarda güçlü asit veya baz eklendiğinde solüsyon H<sup>+</sup> iyon konsantrasyonunda meydana gelecek olan değişikliklere karşı dayanıklıdır. Bazı nünuneler değişen pH'ya karşı toleranslı olabilirlerse de bu özellik, bu nünuneler içinde optimal bir pH'nın olmadığı anlamına gelmez. Genel olarak sadece farklı doku türleri değil, aynı zamanda farklı hücre tipleri ve organellerin de farklı pH' lara tepkileri değişiktir. Elde edilen araştırma sonuçları bir nünunenin bozulmaya karşı korunmasında, pH'nın ne derece önemli olduğunu göstermiştir. Bir doku örneğinin derin kısımlarının iyi bir şekilde korunamaması, sadece tesbit solüsyonunun dokunun derin kısımlarına yavaş penetre olması sonucu oluşun otoliz neticesi meydana gelmez. Bu olaya uygun olmayan tamponlaştırmanın da neden olduğu sanılmaktadır.

Ortam sıcaklığında tamponun pH'sı üzerine etkisi vardır. Örneğin, soğuk odada hazırlanmış ve pH'sı 8.4 olan Tris tamponun pH'sı oda sıcaklığında 7.8'e, 37°C de ise 7.4'e düşer. Tampon sisteminin etkinliğinin farklı pH seviyelerinde değişime uğraması pH'da meydana gelecek olan değişikliklerin tampon için ne derecede önemli olduğunu gösterir. Örneğin fosfat tamponun pH'sı 7.5 üzerinde ise zayıf tamponlama kapasitesine sahiptir. Bununla beraber triaminometan içeren tamponlar pH 7.5'in altında ise zayıf bir etkiye sahiptirler. Bu sebepten dolayıdırki, bir tamponun pH'sı, her kullanımdan önce mutlaka ölçülmelidir.

Tamponda bulunan spesifik iyon bileşiklerinin nünunenin ince yapısının korunması üzerinde ne

derecede etkili olduğuna dair çok az çalışma yapılmıştır. Fikzasyonun kalitesi üzerine sadece pH değil, aynı zamanda tamponda bulunan iyon tiplerinin de etkisi vardır. Tamponda bulunan iyonların dokudaki bazı kimyasal gruplar ile etkileşime girdiklerinden, fikzasyon kalitesinin de iyonlara bağlı olarak değiştiği sanılmaktadır. Tampondaki spesifik bileşiklerin moleküler yapılarındaki değişiklikler, hücre ve organellerin ince yapılarında değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olurlar. Tampon, fizyolojik olarak aktif iyonlar ( $Ca^{+2}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  ve  $Cl^-$ ) içeriyorsa hücrede kimyasal bazı değişikliklerin meydana gelmesine neden olurlar. Hücre zarının yapısını sabitleştirmek için tesbit solüsyonuna eklenen  $Ca^{+2}$  suda erimeyen fosfat tuzlarının şekillenmesine ve bu tuzların dokuda presipite olmasına sebep olur. Bu çöktürler, çalkalama, postfikzasyon ve dehidrasyon işlemleri esnasında bile uzaklaştırılmamaktadır. Bu tip çöktürler ince kesitlerde, yapının her tarafına dağılmış haldeki elektron yoğun, koyu granüller halinde gözlenir. Tampondaki diğer bazı bileşikler de dokuda suda erimeyen tuzların oluşumuna sebep olur.

Prefikzasyon ve postfikzasyonda kullanılacak olan fikzatiflerin her ikisi de aynı tampon solüsyonu ile hazırlanmalıdır. İki farklı tampondan birinin glutaraldehid ile yapılan prefikzasyonda, diğerinde  $OsO_4$  ile yapılan postfikzasyonda kullanılması, nümuneden alınan ince kesitlerde elektron yoğun granüller halindeki artefaktların şekillenmesine yol açmaktadır. Bunlar genellikle membranlar üzerine oturmuş halde gözlenmektedir. Artefaktlar, kokadilat tamponunun prefikzasyonda, Bilimiloning tamponunun ise postfikzasyonda kullanılması sonucunda da ortaya çıkabilmektedir.

### Tampon Tipleri

**Kakodilat tamponu:** pH 6.4-7.4 arasında etkindir. Bu tampon, fikzatifin pH'sının sabit tutulması yönünden çok etkili değildir. Özellikle hücre membran permeabilitesinde değişikliklere neden olur. Na-kakodilat insan sağlığı için zararlı olan arsenik içerir. Deriden absorbe olduğunda veya inhalasyon yolu ile alındığında deride, karaciğer ve böbrekte yangıya sebep olur. Bu solüsyonun hazırlanması veya tartımı esnasında laboratuvarlarda havalandırma sistemi kullanılmalı ve eller eldivenler ile korunmalıdır.

**Kollidin (Collidine) tamponu:** pH'yı biyolojik sınırlar (6.0-8.0) içerisinde tamponlayabilme kapasitesine sahiptir. Bu tampon toksik olup, güçlü

bir kokuya sahiptir. Rutin elektron mikroskop çalışmaları için genelde tavsiye edilmez.

**Fosfat (Phosphate) tamponu:** Diğer tamponlara kıyasla daha fizyolojiktir. Çünkü canlı sistemde fosfor inorganik fosfat ve fosfat esterleri halinde bulunur. Bu tampon, genelde fikzatif pH'sının sabit tutabilmesi yönünden, diğer tamponlara kıyasla daha etkilidir ve pH'sı farklı sıcaklıklarda daha az değişime uğrar; soğukta ise bir kaç hafta muhafaza edilebilir. Bununla beraber muhafazası süresince, yavaş yavaş kontamine olabilir ve presipitasyon şekillenebilir.

Diğer tamponlar ise HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane-sulphonic acid) tamponu, MOPS (3-N-morpholine-propanesulphonic acid) tamponu, PİPES (piperazine-N-N bis-2-ethanesulphonic acid) tamponu, Tris (tris-hydroxymethyl) tamponu ve Veronal Acetate tamponudur.

### Tamponların Hazırlanışı

#### 1-Cacodylate tamponu (0.2M)

<i>Solüsyon A</i>	
Sodium cacodylate	42.8 gr
Distile su	1000 ml
<i>Solüsyon B</i>	
0.2M HCl	10 ml
Distile su	603 ml

Arzu edilen pH, solüsyon B'den gereken miktarda solüsyon A'ya ekleyip toplam volumü su ekleyerek 200 ml'ye tamamlamakla sağlanabilir.

#### 2-Collidine tamponu

<i>Stok solüsyon</i>	
_Collidine	2.67 ml

Distile su ile solüsyon 1000 ml'ye tamamlanır.

<i>Tampon</i>	
Stok solüsyon	50 ml
1N HCl	9 ml

Distile su ile solüsyon 100 ml'ye tamamlanır.

pH'sı 7.4'e HCL asit ile ayarlanabilir.

#### 3-Hepes tamponu

0.2M N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic asit distile su içerisinde hazırlanır. Solüsyonun pH'sı istenen seviyeye 0.5M NaOH ile getirilir.

**4-Mops tamponu**

0.2M 3-(N-morpholine) propane-sulphanic asit distile su içerisinde hazırlanır. Solüsyonun pH'sı 0.5M NaOH ile istenen seviyeye getirilir.

**5-Phosphate tamponu***Solüsyon A*

Sodium phosphate dibasic -11.876 gr

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

*Solüsyon B*

Potassium phosphate, monobasic 9.08 gr

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

Arzu edilen pH, yeterli miktardaki solüsyon B'yi, solüsyon A'ya eklemek sureti ile sağlanabilir.

**6-Tris tamponu***Solüsyon A*

Tris aminomethane 30.3 gr  
Maleic asit 29 gr

*Solüsyon B*

NaOH 4 gr  
Distile su 96 ml  
Distile su ile 500 ml'ye tamamlanır  
Charcoal 2 gr

Solüsyon karıştırılır, 10 dakika bekletildikten sonra filtre edilir.

Arzu edilen pH, solüsyon B'den gereken miktarın, 40 ml'lik solüsyon A üzerine eklenmesini takiben toplam volümün distile su ile 100 ml'ye tamamlayarak elde edilir.

**7-Veronal acetate tamponu***Stok solüsyon*

Sodium veronal 2.94 gr  
Sodium acetate 1.94 gr  
Sodium chloride 3.4 gr  
Distile su ile solüsyon 100 ml'ye tamamlanır

*Tampon*

Stok solüsyon 5 ml  
Distile su 13 ml  
1M CaCl<sub>2</sub> 0.25 ml  
0.1M HCl 7 ml  
Arzu edilen pH'ya ulaşıncaya kadar HCl ilave edilir.

**Fikzatifler:**

Bir çok çalışma sonucu, glutaraldehid ile yapılan ön fikzasyonu takiben osmiyum tetroksit ile yapılan ikinci fikzasyon neticesinde bir çok doku örneğinde enzim aktivitenin ve normal yapının iyi bir şekilde korunduğunu göstermektedir. Bu çift fikzasyon prokaryotlarda olduğu gibi, bitki ve hayvan dokularının da korunmasında standart prosedür olarak kabul edilmiştir.

**Glutaraldehid:**

Beş karbonlu dialdehid olan basit bir moleküler yapıya sahiptir. Molekül ağırlığı 100.12 dir. Denenen tüm aldehidler içerisinde glutaraldehidin normal olan yapıyı korumada daha etkili olduğu tesbit edilmiştir. Glutaraldehid prokaryotların, eukaryotların, kolayca kırılabilen türlerin, özellikle deniz omurgalarının, embriyo, biyopsi örneklerindeki hücrelerin ve mantarların korunmasında etkilidir. Glutaraldehidin değişme eğiliminde olabilen mikrotubulus, granülsüz ve granüllü endoplazmik retikulum ve pinositik kesecikler gibi hücre içi organellerin korunmasında diğer bilinen fikzatiflere kıyasla daha etkili olduğu tesbit edilmiştir. Doku numuneleri bu fikzatif içerisinde bozulmadan bir kaç saat kalabilir. Günümüzde rutin elektron mikroskop çalışmalarında kullanılabilir olan en etkili ve güvenilir bir fikzatifdir.

Glutaraldehid proteinlerde önemli miktarlarda şekil değişikliklerine yol açmamakla beraber, bu moleküllerde bazı yapısal modifikasyonlara sebep olur. Elde edilen bazı sonuçlar, glutaraldehid ile yapılan fikzasyonlar sonucunda proteinlerin denatüre olmadığını göstermiştir. Bazı çalışmalarda ise proteinlerin şekil ve aktivitelerinin bozulmadan kaldığı gözlenmiştir. Bunun başlıca sebebi, özellikle glutaraldehid için hedef rolü oynayan veya bu maddenin bağlanması için önemli olan aminoasit gruplarının proteinlerin yüzeyinde fazla miktarda bulunmasıdır.

Proteinler ile reaksiyonu: Glutaraldehidin doku proteinleri ile oluşturduğu reaksiyonun teşhisi veya izolasyonu yapılamadığından, bu maddenin proteinler ile reaksiyonunda oluşan kimyasal olaylar hala aydınlatılamamıştır. Oluşan reaksiyonların teşhisindeki güçlüklerin, kısmen glutaraldehidin yapısında fazla miktarda bulunan polimerize formlarının varlığından kaynaklandığı sanılmaktadır.

Glutaraldehidin lizin aminoasit grubu içeren proteinler ile reaksiyona girdiği saptanmıştır.

Glutaraldehid ayrıca tirozin, triptofan, histidin, fenilalanin ve sistin gibi diğer aminoasit grupları ile de reaksiyona girmektedir. Ayrıca aminoasitlerin alfa aminogrupları ile, bazı peptidlerin N-terminal aminogrupları ve sistinlerin sulfil gruplarında bağlandığı gözlenmiştir. Lysine, protein grubunun glutaraldehit ile reaksiyona giren en önemli bileşimidir.

Lipidler ile reaksiyonu: Glutaraldehid ile lipidler arasındaki reaksiyonlar tamamen ortaya konulamamıştır. Bazı çalışmalar glutaraldehidin fosfolipid tabakasında meydana gelen kayıpları önlemediğini göstermektedir. Fosfatidilserin (phosphatidylserine) ve fosfatidiletanolamin (phosphatidylethanolamine) gibi fosfolipidlerin glutaraldehid ile fizyasyon sonucu iyi bir şekilde korunmasının, glutaraldehidin bu lipidlerin içerdiği amino grupları ile bağlanması sayesinde gerçekleştirdiği tesbit edilmiştir.

Glutaraldehid ile fizyasyon sonucunda fare beyinde, böbrek ve dalakta lipidlerin ekstrakte edildiği, fosfatidilserinin ise proteinler ile çapraz reaksiyona girerek dokuda varlığını sürdürdüğü gözlenmiştir. Fosfatidilserinin baki kalmasının başlıca sebebinin bu fosfolipid ile membranlarda bulunan proteinler arasında güçlü bir hidrofobik bağın bulunmasına bağlı olduğu sanılmaktadır.

Bazı fosfolipidler dışında, glutaraldehidin dokulardaki çoğu lipidler ile olan reaksiyonu oldukça zayıftır. Hatta lipidlerin çoğu glutaraldehid ile fizyasyon sonucu dokuda kalsa bile, bunların çoğu dehidrasyon veya gömme işlemi esnasında ekstrakte olur.

Nükleik asitler ile reaksiyonu: Glutaraldehid ile nükleik asitler arasında mümkün olabilen ilişkiler hakkında çok az bilgi vardır. Glutaraldehid ile tesbit edilmiş numuneler TEM'de izlendiğinde, numunedeki bazı nükleik asitlerin iyi korunduğu gözlenmiştir. Glutaraldehid ile muamele edilmiş olan DNA'da deoksiribonükleik asitlerin önemli derecede dirençli oldukları ve bunun da sistidin ve guanidindeki amino gruplarının dialdehid ile reaksiyona girmesinden kaynaklandığı sanılmaktadır. Bununla beraber fizyasyon süresince numunede, glutaraldehidin DNA ve RNA ile girdiği reaksiyon tipleri ise kesin olarak belirlenememiştir.

Karbonhidratlar ile reaksiyonu: Bazı karbonhidratların özellikle glikojenin glutaraldehid ile tesbit edilen dokularda iyi tesbit olduğu gözlenilmiştir. Glutaraldehid ile fizyasyon sonucunda

dokudaki glikojenin %40-65' inin korunduğu bildirilmektedir..

**Sıcaklık:** Bitki ve hayvan dokularının rutin tesbiti için genellikle glutaraldehid ile muameleler 0-4°C' de 2 saatte gerçekleştirilir.

**Konsantrasyon:** Genel olarak glutaraldehidin yüksek konsantrasyonu (%37) dokuda son derecede yüksek oranda büzülmelere neden olurken; düşük konsantrasyonu ise (%0.5) hücre bileşiklerinin ekstraksiyonuna sebep olur. Bitki ve hayvan dokularının tesbiti için genel olarak glutaraldehidin %1.5-4 lük konsantrasyonları tercih edilmektedir.

**pH:** Hayvan dokularının tespitinde genel olarak glutaraldehidin pH'sı 7.0-8.0 arasındaki solüsyonları tercih edilir.

**Osmiyum tetroksit** (Osmium tetroxide; OsO<sub>4</sub>):

Osmiyum tetroksit sadece fizyatif olarak değil, aynı zamanda boya olarak da etki yapar ve iyi bir kontrast sağlar. Bu özelliğinden dolayı diğer fizyatiflere kıyasla kullanım yönünden daha avantajlı sayılır. Osmiyum tetroksit'in postfizyasyonda kullanılması tercih edilmektedir. Bu şekilde doku kalitesinin daha iyi korunduğu tesbit edilmiştir. En önemli özelliği ve avantajı lipidleri korumasıdır. Başlıca dezavantajı ise bir çok doku içerisine yavaş penetre olabilmesi, proteinlerin çoğu ile çapraz reaksiyona girememesi ve karbonhidratları koruyamamasıdır. Sonuçta OsO<sub>4</sub> ile yapılan fizyasyonda fizyasyon olayı tamamlanmadan önce doku yapısı değişebilir. Hatta dokunun boyutları 0.5-1 mm olsa dahi doku tamamen tesbit edilemez. Bu özelliğinden dolayı rutin elektron mikroskobu çalışmaları için OsO<sub>4</sub> prefizyasyonda kullanılamaz. Bununla beraber osmiyumun postfizyasyon sırasında doku içerisine yavaş penetre olması o kadar önemli değildir. Çünkü aldehidlerle gerçekleştirilen prefizyasyon olayı ile dokunun tesbit olayı aşağı yukarı tamamlanmıştır.

**Konsantrasyonu:** Osmiyum tetroksit optimal konsantrasyonda kullanıldığı zaman oldukça etkilidir. Yüksek konsantrasyonu proteinlerin yapılarında parçalanmalara ve neticesinde de protein yapısında kayıplara yol açar. Genel olarak tampon içerisinde hazırlanmış %1-2' lik konsantrasyonu tercih edilmektedir.

**Sıcaklık:** Osmiyum tetroksit ile yapılacak postfizyasyonun 4°C'de yapılması tercih edilmektedir. Çünkü OsO<sub>4</sub> doku içerisine yavaş penetre olur. Meydana gelebilecek otoliz olayım

önlemek için bu sıcaklık tercih edilir. Çünkü soğukta otoliz olayı yavaş gerçekleşir. Yüksek sıcaklıkta yapılan postfiksasyonlarda mitokondriyonlarda büzülme ve sitoplazmada granülleşmelere yol açar. Eğer doku uzun süre OsO<sub>4</sub> de kalacak ise soğuk ısı, oda ısısına tercih edilir.

**Tesbit süresi:** 30 dk ile 2 saat arası tercih edilir.

#### **Tesbit (Fiksasyon) Yöntemleri**

Başlıca 4 çeşit tesbit yöntemi vardır.

1. Vasküler perfüzyon
2. İmmersiyon
3. Organ yüzeyine fikzatif solüsyonun damlatılması
4. Fiksasyonun organ içerisine direkt olarak enjekte edilmesi

Bu metodların her birinin kendine özgü avantajları ve dezavantajları olmasına rağmen vasküler perfüzyon yöntemi tercih edilmektedir. Bu yöntem ile yapılan tespitite doku yapısının daha iyi korunduğu saptanmıştır. Vasküler perfüzyon yöntemi genellikle küçük hayvanlarda (rat, fare, tavşan) uygulanır. İnsanlarda ve büyük hayvanlarda uygulanması mümkün değildir. Bu yöntem ile yapılan fikzasyonda tesbit olayı, kan dolaşımının sona ermesinden hemen sonra başlar. Yani ölümlü tesbit arasındaki zaman oldukça kısadır. Neticede hücre yapısında minimum bir değişme görülür. Bu yöntemin diğer bir avantajı da dokunun tüm bölümlerinin aynı düzeyde ve çok çabuk tesbit edilebilmesidir.

#### **Yıkama**

Nümune tesbit edildikten sonra dehidrasyon öncesi yıkanmalıdır. Fiksasyon ve dehidrasyonda kullanılan maddeler arasında oluşabilecek olan reaksiyonları azaltmak için numunede bulunan fazla fikzatif yıkanıp uzaklaştırılmalıdır. Çift fikzasyon olayında aldehidlerle yapılan prefiksasyonu takiben dokudaki fazla aldehit OsO<sub>4</sub> ile yapılacak olan postfiksasyon öncesi bölgeden uzaklaştırılmalıdır. Eğer fazla miktarda aldehit numunede bırakılırsa, OsO<sub>4</sub> ile reaksiyona girerek OsO<sub>4</sub>'ün çökmesine neden olabilir. Bu durum, tespit edilen nümunenin bozulmasına neden olur. Eğer nümune tamponlu bir fikzatif ile tespit edilir takibinde de su ile yıkanır, bu durum, tespit olmamış bazı hücre materyallerinin parçalanıp dağılmasına ve erimelere sebep olur. Bundan dolayıdır ki yıkama işlemi tespitite kullanılan tampon ile gerçekleştirilmelidir. Bunun diğer bir avantajı da yıkama esnasında dokuda oluşacak ani ve şiddetli değişiklikleri önlemektir.

Çoğu nünuneler için 10-20 dakika süre ile 2-3 kere tampon içerisinde yapılacak olan yıkamalar yeterli olmaktadır. Bununla beraber bazı nünuneler için (sıkı doku v.b) bu süre daha uzun olabilmektedir. Yıkama işlemi gereğinden fazla uzun sürmemelidir. Çünkü glutaraldehidin nünunede oluşturduğu çapraz bağ reaksiyonlarının bir kısmı geriye dönüşümlüdür ve nümunenin uzun süre yıkanması sonucu ince yapı yıkamadan etkilenebilir. Yıkama olayı genel olarak fikzasyon olayının gerçekleştiği sıcaklıkta yapılmalıdır.

#### **Dehidrasyon**

Gömme işleminde suyla karışmayan resin kullanılarak fikzasyon ve yıkama esnasında doku içerisinde kalmış tüm serbest su, infiltrasyon ve gömme işleminden önce, uygun su çeken maddeler kullanmak sureti ile uzaklaştırılmalıdır. Nümune su ile karışabilen resin ile gömülürse, dokudaki suyun uzaklaştırılmasına gerek yoktur. Nümunedeki fazla su, nümunenin su çeken maddenin, konsantrasyonları gittikçe artan serisi ile muamele edilmesi suretiyle uzaklaştırılır. Epoksi resin, etanol ve aseton içerisinde çözünebilir olduğundan, dehidrasyon bu çözücülerden birinin kullanılması ile gerçekleştirilir. Epoksi resin, propilen oksit içerisinde çözünebildiğinden, bu çözücü resin ile infiltrasyon öncesi kullanılmalıdır. Propilen oksit, basit homojen bileşik olup; epoksi'nin su ile karışmasını sağlar.

Propilen oksit, etanol dehidrasyon sıvısı olarak kullanıldığında dehidrasyonun son basamağında kullanılmalıdır. Çünkü çoğu resinler etanol ile tamamen karışmaz. Aseton kullanıldığı zaman, propilen oksidin kullanılmasına gerek yoktur.

Aşağıda iki dehidrasyon prosedürü verilmiştir.

#### *Prosedür I*

1. Etanol (%5, %10, %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80, %90, %100) ...5 dk.
2. %100'lük propilen oksit (2 kere)...5 dk.

#### *Prosedür II*

Aseton (%5, %10, %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80, %90, %100) ...5 dk

#### **İnfiltrasyon**

Uygun gömme materyalinin doku nümunesine tamamen ve homojen biçimde penetrasyonu, arzu edilen kesit işlemi için gereklidir. Bu, infiltrasyon ve gömme ile sağlanır. İnfiltrasyon esas olarak dehidrasyon solüsyonlarının gömme solüsyonu ile aşamalı olarak yer değiştirmesidir. Gömme ince kesit

almayı mümkün kılmalıdır. Çünkü yalnızca bir kaç doku, ilave destek vermeksizin ince kesitler alınacak kadar serttir. Gömme materyali sadece dokuya nüfuz edip destek vermekle kalmaz; ayrıca dokuları bloklara bağlayarak kesit alma sırasında işlemlerin emin bir şekilde yürütülebilmelerini de sağlar. Bununla beraber bazı doku örneklerinde (örneğin, kas dokusu) gömme işlemi olmadan da ince kesitler almak mümkündür.

Yukarıda da bahsedildiği gibi infiltrasyonda dehidrasyon solüsyonunun konsantrasyonu giderek azaltılırken, gömme solüsyonunun konsantrasyonu giderek artırılır. Eğer dehidrasyon solüsyonu gömme solüsyonu ile karışabiliyorsa, dokular doğrudan doğruya gömme ve dehidrasyon solüsyonu karışımına alınabilir. Eğer dehidrasyon solüsyonu gömme solüsyonu ile karışmıyorsa, dehidrasyon solüsyonu yerine gömme solüsyonu ile karışabilen bir ara solüsyonun infiltrasyon öncesi kullanılması gerekir. İnfiltrasyon süresi doku tipine ve kullanılan gömme solüsyonlarına göre tayin edilebilir. Rutin infiltrasyon işlemi aşağıdaki gibidir.

1. %100'lük asetonda son değişim
2. %100'lük aseton ile resin karışımı (3/1)...20 dk
3. %100'lük aseton ile resin karışımı (2/1)...20dk
4. %100'lük aseton ile resin karışımı (1/1)...20dk
5. %100'lük aseton ile resin karışımı (1/2)...20dk
6. %100'lük aseton ile resin karışımı (1/3)...20dk
7. Resin karışımı.....20dk
8. Resin karışımı.....20dk

Polimerizasyon öncesi gerçekleştirilecek olan tüm bu basamaklar oda ısısında sürekli karıştırma ile gerçekleştirilmelidir. Son gömme işlemi polietilen kapsüller veya gömme kalıpları içerisinde yapılmalıdır. Doku ve gömme materyalini içerisinde bulunduran kapsüller veya kalıplar 45°C de 12 saat polimerize edildikten sonra, 60°C de tam polimerize oluncaya kadar bekletilir. Polimerizasyonun tamamlanması için gerekli zaman kullanılan resine bağlıdır.

#### Gömme:

Dokuların çoğu ince kesitler halinde kesilebilecek sertliğe sahip olmadığından, uygun materyaller içerisine gömülerek ince kesitlerin alınması sağlanır. Bundan başka herhangi bir desteğe gerek olmaksızın, küçük boyuttaki dokuların kolayca

tutulması sağlanır. Çok az materyal elektron mikroskobu için gömme materyali olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılacak maddelerde şu özellikler olmalıdır:

a.Yapının iyi bir şekilde korunması, b. Hücre yapısında çok az kayıp, c. Eşit aralarda polimerizasyon, d. Polimerizasyon ve sertleşme esnasında volümde küçük değişiklikler, e. Elektron ışınları altında sıcaklık ayarlayıcı özelliği, f. Uygun yapışkanlık ve yoğunluk, g. Kesim esnasında oluşan ısıya karşı dayanıklılık, h. Doku örneğinin uygun şekilde boyanabilmesi, ı. Diğer gömme materyalleri ile karışmama özelliği,i.Kolayca bulunabilmesi.

Resin, yukarıda sayılan özelliklerin pek çoğuna sahiptir. Uygun resin'in seçilmesi amaca ve nümunenin özelliğine bağlıdır. Gömme işleminde en çok kullanılan materyaller epoksi resin, polyester resin ve akrilik metakrilat'lardır.

#### Epoksi Resinler:

Epon 812: Epon 812 elektron mikroskobu için en fazla kullanılan gömme materyalidir. Kesitler kolayca alınabilmekte ve örnek herhangi bir güçle karşılaşmaksızın kolay bir biçimde boyanabilmektedir. Epon 812'den alınan ince kesitler elektron mikroskobunun kalan ortamındaki güçlü vakum ve sıcaklığı tolere edebilmektedir.

Epon, araldit'e kıyasla doku içerisine daha hızlı nüfuz edebilmektedir. Bunun sebebi Araldit'in daha yüksek vizkoziteye sahip olmasıdır. Asitanhidrat (sertleştirici) ve amine hızlandırıcı ilave edildiğinde düşük sıcaklıkta daha kolay sertleşebilmektedir. En sık kullanılan asitanhidrit dodecynyl succinic anhydride (DDSA) ve nadic methyl anhydride (NMA), amine hızlandırıcı ise 2-4-6-tri (dimetilaminometil) phenol (DMP-30) ve benzil dimetilamin (BDMA)'dır.

#### Formül 1:

Karışım A		Karışım B	
LX-112 (Epon bileşim)	80 gr	LX-112	75gr
DDSA	90gr	NMA	75gr

Karışım A ve B birbirleri ile karıştırılıp, bu karışımın her 10 gr'ına 0.14 gr DMP-30 ilave edilir. Polimerizasyon 45°C de 20 saat, daha sonra 60°C de 24 saat bekletilerek sağlanır.

**Formül 2:**

Epon 812 (veya bileşiği)	26gr
DDSA	22gr
NMA	9gr
enzildimetilamin	%2-3

Araldite: Araldite elektron mikroskobu için gömme materyali olarak kullanıma ilk defa Glauret tarafından sunulmuştur. Temeli gliserol veya aromatik bir epoksi resinin oluşturduğu aralditin, polimerizasyonu sonrası volümünde çok az azalma oluşur. Araldite, yeşile çalan resin olup, dibutilfitalat (dibutyl phthalata) gibi uygun plastikleştiriciler ile değişen sertliklerde hazırlanabilir. Bu resin içerisinde bloklanmış olan doku, en sık olarak kullanılan organik çözücülerden her hangi birisi ile dehidre olabilir. Bununla beraber etanol veya metanol kullanıldığı zaman propilen oksit gibi çözücülerin kullanılması gerekir. Çünkü reaktive olmayan alkolün artıkları kesim kalitesini etkileyebilmektedir.

Araldite resin, uygun miktarlardaki sıvı anhidrat, sertleştirici ve amine hızlandırıcı ile karıştırılabilir ve ısıtmak sureti ile polimerize ettirilir. Bloklar 60°C'de 24 saat veya daha fazla ısıtılır.

**Formül 1:**

Araldit 502	10gr
DDSA	7-8gr
DMP-30	%1-5

**Formül 2:**

Araldit 502	68gr
DDSA	19gr
DMP-30	3gr
TAC	10gr

**Formül 3:**

Araldit CY 212	10gr
DDSA	10gr
BDMA	0.4gr

Blokların son sertliği, sertleştirici veya plastikleştiricinin oranlarını değiştirmek sureti ile ayarlanabilir. Hızlandırıcının oranında yapılacak olan küçük değişiklikler, blokların parlaklığını ve rengini etkiler.

Vinilklorhekzendioksit (vinylchlorhexene dioxide), maraglas ve quetol 651 de epoksi resinlerden olmakla birlikte Epon ve araldite bunların en yaygın olarak kullanılanları ve en kolay bulunanları olduğu için burada bu maddeler ile hazırlanan formülleri verilmiştir.

**Poliester resinler:** En fazla kullanılan poliester resinler vestopal w ve rigolac'tır. Diğer poliester resin gömme materyalleri selectron, rhodester ve beetle'dir. Bunlar nadiren kullanılmaktadır.

**Vestopal w****Formül**

Vestopal W	100 ml
Bezoyl peroxide	1 ml
Cobalt naphthenate	0.5 ml

**Rigolac****Formül**

Rigolac 2004	75 ml
Bez Rigolac 70F	25 ml
Benzoyl peroxide paste	1 gr

**Metakrilatlar (Methacrylates):**

Metakrilatlar renksiz ve şeffaf olup, biyolojik materyallere ince kesitlerin alınması için gerekli olan dayanıklılığı sağlar. Metakrilatlar monomerleri etanol, aseton ve diğer organik çözücüler ile karışabilir ve doku içerisine dehidrasyon olayı tamamlayıncaya kadar nüfuz etmezler. Bu resin daha az vizküz olup, bu özelliğinden dolayı da dehidre olmuş doku içerisine daha kolay nüfuz eder. Metakrilit türü resinler, uygun sürede kendiliklerinden polimerize olurlar. Bu özelliklerinden dolayı depolama veya nakil esnasında polimerizasyonu önlemek amacı ile bu resinlere hydroquinone inhibitörü ilave edilmektedir. Düşük sıcaklık ve karanlık ortam kendiliğinden şekillecek olan polimerizasyonu geciktirir. İnhibitör madde bloğun özelliklerini geri



dönüşümsüz biçimde etkilemediğinden polimerizasyon öncesinde bu maddelerin uzaklaştırmasına gerek yoktur. İnhibitör sadece polimerizasyon üzerine etki etmektedir. Bu durum fazla miktarda katalizör (benzoyl peroxide veya 1,2-dichlorobenzoyl peroxide) ilave etmek sureti ile de önlenir. Eğer gerekli ise inhibitor, distile su ile hazırlanmış %20 lik NaOH solüsyonu içerisinde resinin yıkanması ile uzaklaştırılabilir.

### Dokuların Bloklanması ve İşaretlenmesi

Dokular genellikle blokların kolaylıkla içerisinden uzaklaştırılabilecekleri polietilen veya jelatin kapsüller içinde bloklanır. Bloklar polietilen kapsüllerden, kapsüllerin jilette kesilmesi, jelatin kapsüllerden ise kapsüllerin 70°C de sıcak su banyosu içerisinde eritilmesi ile uzaklaştırılır. Eğer doku blok içinde özel bir şekilde yerleştirilecekse düzgün gömme kalıpları içerisinde bloklanır.

Dokular bloklanmadan önce, şırınga veya pastör pipetleri yardımı ile kapsüller sıcak resin ile doldurulur. Bu basamakta gömme materyali karışımı içerisinde hava kabarcığının kalmamasına dikkat edilmelidir. Doku daha sonra kürdan çubukları ile kapsül içerisine yerleştirilmeli ve dibe doğru batması sağlanmalıdır. Doku örnekleri küçük olduklarından ve kolaylıkla zarar görebilecekleri için forseps kullanılması tavsiye edilmemektedir. Düzgün gömme kalıpları kullanıldığı zaman, kalıplar resin ile tamamen doldurulur ve kürdan çubukları kullanmak sureti ile dokunun transferi ve yönlendirilmesi sağlanır.

Bloklanmış dokuların etiketlenmiş olması gereklidir. Katılmış bloklar ince çelik iğneler ile işaretlenebildiği gibi, bloğu tanıtan kodun kağıt üzerine yazılıp, doku ile birlikte gömülmesiyle de etiketleme yapılabilir. Etiketin kapsül içerisine yerleştirilmesi, kapsülün resin ile doldurulmasından önce yapılmalıdır. Kodlama, mikrografların değerlendirilmesinde hangi dokudan geldiklerinin, hangi deneye ait olduklarının bilinmesi ve ilerde aynı bloktan tekrar kesit alma gerektiğinde o bloğun bulunabilmesi yönünden önemlidir.

### Tehlike ve Önlemler

Elektron mikroskobu için hazırlanacak olan numunelerin geçirildikleri işlemler sırasında kullanılan kimyasal maddelerin hemen hemen hepsi değişen derecelerde zararlıdır. Fiksasyon, yıkama, dehidrasyon, gömme ve boyama esnasında kullanılan kimyasallar çalışanlara zarar verebilecek özelliklere sahiptir. Bu kimyasal maddelerin çoğu ya deriden

yada solunum yolu ile absorbe edilebilir. Bu sebepten dolayı elektronik mikroskobu ile çalışanların laboratuvarlarında iyi bir havalandırma sistemlerinin olması gerekir. Ayrıca birkez kullanılan ve geçirgen olmayan (polietilen) eldivenler ve gözler için de koruyucu gözlükler kullanılmalıdır.

Elektron mikroskobu laboratuvarlarında, tampon olarak en fazla kullanılan, sodyum kokodilat (sodium cacodylate) ağırlığının %30 u kadar arsenik içerir. Arsenik deri ile temas, sindirim ve solunum yolu ile alındığı zaman oldukça tehlikeli bir kimyasal maddedir. Sodyum (-Na) -kokadilat ile uzun süre temas sonunda deride, müköz membranlarda, dalak ve böbreklerde yangı, sinir felçleri, deri, akciğer ve dalakta kanser gelişebilir. Tampon solüsyonu hazırlanırken ve bu kimyasal madde tartılırken havalandırma sistemi kullanılmalı ve gözler gözlükler ile korunmalıdır. Arsenik buharı oluşumunu önlemek için bu kimyasalın asitler ile temasına mani olunmalıdır. Kokadilat tamponu H<sub>2</sub>S ile reaksiyona girdiğinden, her ikisinin aynı solüsyonda kullanılmasından kaçınılmalıdır. Kokadilat solüsyonu kullanıldıktan sonra direk olarak lavobaya dökülmemeli, özel şişeler içerisinde saklanmalıdır. Çünkü solüsyon lavobada bulunabilecek diğer kimyasal maddeler veya temizlik maddeleri ile reaksiyona girerek arsenik gazı oluşturabilir.

Osmiyum tetroksit oda sıcaklığında buharlaşabilir. Buharı, burun, göz ve boğazda yaralanmalara neden olur. Eller veya vücudun diğer bölümleri bu madde ile temas ettirilmemeli, kullanımı esnasında havalandırıcı çalıştırılmalı ve diğer koruyucu önlemler alınmalıdır. Aldehidler de değişen derecelerde zararlıdır. İnhalasyon yolu ile alındıklarında solunum yollarında yangı, deri ile temasları sonucunda ise dermatitis'e neden olurlar. Aldehid döküntüleri Fehling solüsyonu kullanmak sureti ile zararsız hale (renk maviden kırmızıya dönüşür) dönüştürülebilir. Glutaraldehid döküntüleri ise glisin kullanmak sureti ile nötralize edilir.

Tüm epoksi resin bileşikleri zararlıdır. İnhalasyon veya deri yolu ile absorbe edilirler. Başlıca toksik etkileri kalp bozuklukları, kan dolaşımı ve sinir sisteminde bozukluklar ve iştahsızlıktır.

Uranium ve bileşikleri, radyoaktif ve yüksek toksisiteye sahip olan bileşiklerdir. Boyamada kullanılan kurşun ve civa tuzları da oldukça toksiktir. Tannik asit oldukça zehirli, diaminobenzidine kanserojeniktir. Bismut, gümüş nitrat, dimethyl

sulphoksit, krom, potasyum ferrosiyandır ve potasyum permanganat insan sağlığı için oldukça zararlı olan maddelerdir.

Laboratuvarında kullanılan bir çok organik çözücü yanıcı özelliğine sahiptir. Bazı çözücüler ise

hem yanıcı hemde toksik etkiye sahiptir. Aseton, propilen oksit, etanol, ksilen, kloroform, benzen, amil asetat bu özelliklere sahip çözücülerden biridir.

### KAYNAKLAR

1. Barnett RJ, Perney DP and Hagstörn PE. Additional new aldehyde fixatives for histochemistry and electron microscopy. *J Histochem-Cytochem* 1964; 12, 36-41
2. Brooks BR and Klammerth OL. Interaction of DNA with bifunctional aldehydes. *Eur J Biochem* 1968; 5, 178-187
3. Causton BE. Resins: toxicity, hazards and safe handling. *Proc Roy Microsc Soc.* 1981;16, 265-271
4. Cheung DT and Nimni ME. Mechanism of cross-linking of proteins by glutaraldehyde. I. Reaction with model compounds. *Conn Tis. Res* 1982; 10, 187-200
5. Cheung DT and Nimni ME. Mechanism of cross-linking of proteins by glutaraldehyde. I. Reaction with monomeric and polymeric collagen. *Conn Tiss Res* 1982; 10, 201-213
6. Cheung DT, Perelman NK and Nimni ME. Mechanism of cross-linking of proteins by glutaraldehyde. I. Reaction with collagen in tissue. *Conn Tiss Res* 1985; 13, 109-111
7. Coetzee J and van der Merwe Cf Some characteristics of the buffer vehicle in glutaraldehyde-based fixatives. *J Micros.* 1987; 146,143-152.
8. Coetzee J Some characteristics of the buffer vehicle in the glutaraldehyde based fixatives. *J Micros.* 1987; 146, 2:143-155
9. Glauert AM and Philips R The preparation of thin sections. In Kay D (ed) *Techniques for Electron Microscopy*, 2 nd edn. Ch.8 Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1965.
10. Hayat MA. *Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications*, Vol.1. New York and London: Van Nostrand-Reinhold 1970.
11. Hayat MA. *Basic Electron Microscopy Techniques*. New York and London: Van Nostrand-Reinhold 1972.
12. Hayat MA. Specimen Preparation. In Hayat MA (ed) *Electron Microscopy of Enzymes. Principles and Methods*. Vol.1. Ch.1. New York and London: Van Nostrand-Reinhold 1973.
13. Hayat MA. *Fixation for Electron Microscopy*. Academic Press, San Diego and London 1981.
14. Iqbal SJ and Weakley BS The effects of different preparative procedures on the ultrastructure of the hamster ovary. I Effects of various fixative solutions on ovarian oocytes and their granulosa cells. *Histochemistry* 1974; 38, 95-101.
15. Newman SB, Borysko E and Swerdlow M. Ultramicrotomy by a new method. *J of Appl. Physiol.* 1950;12, 67-75.
16. Nunn RE. *Electron microscopy: preparation of biological specimens*. London: Butterworth 1970.
17. Peracchiac and Mittler BS. Fixation by means of glutaraldehyde-hydrogen peroxide reaction products. *J Cell Biol* 1972; 53, 234-241.
18. Roozmond RC. The effect of fixation with formaldehyde and glutaraldehyde on the composition of phospholipid extractable from rat hypophalamus. *J Histochem-Cytochem* 1969; 17, 482-495.
19. Sabatini DD, Bensch K and Barnett RJ. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular structure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J Cell Biol.* 1963; 17, 19-22.
20. Schiff RI and Gennaro JF. The role of the buffer in the fixation of biological specimens for transmission and scanning electron microscopy. *Scanning* 1979; 2, 135-139.