

İnce Yapı İncelemelerinde Beyin ve Medulla Spinalisin Beş Farklı Tespit Solüsyonuyla Korunmasının Karşılaştırılması

Comparison of the Brain and Medulla Spinalis Ultrastructural Evaluation Using Five Different Fixatives

© Ferda Topal Çelikkan, © Esra Erdemli

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Öz

Amaç: Sinir dokularının ince yapı düzeyinde incelenmesi nörobilimsel çalışmalar için gereklidir. Sinir dokusu hipoksi ve iskemiye hassastır. Bu nedenle, bu dokunun tespit ve takip edilmesi sinir dokusunun ince yapı düzeyinde değerlendirilmesi açısından kritiktir. Bulguların deneysel araştırmada kullanılan tespit solüsyonundan mı yoksa deneysel etkenden mi kaynaklandığını ayırt etmek zordur. Bu çalışmada, beş farklı tespit solüsyonunun merkezi sinir sistemi organları olan beyin ve medulla spinalis üzerine etkilerini, hücre ve organellerin ince yapı düzeyinde gösterilmesini ve karşılaştırılmasını amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda beş erkek Wistar albino sıçana (200-250 gr) anestezi uygulandı. Perfüzyon tespiti %4 paraformaldehit (PFA) ile gerçekleştirildi. Çıkarılan beyin ve medulla spinalis parçaları; (I) Trump'ın solüsyonu %4 PFA ve %1 glutaraldehit (GA), (II) %2 PFA ve %2,5 GA (2,5 mM CaCl içinde), (III) %2 PFA ve %2,5 GA, (IV) %2,5 G, (V) Trump'ın çözeltisi %4 PFA ve %1 GA (potasyum ferrosiyanat içeren %1 OsO₄) olmak üzere beş farklı tespit solüsyonuna daldırıldı. Rutin takip işlemlerinden sonra, tüm ince doku kesitleri geçirimli elektron mikroskobu altında incelendi.

Bulgular: Grup 4'te beyin ve medulla spinaliste gözlemlenen hücre çekirdeği, perinükleer boşluk, mitokondri, granüllü endoplazma retikulumu, miyelin tabakası, endotel ve bazal laminasının diğer gruplara göre normal bir yapıda olduğu elektron mikroskobu altında izlendi.

Sonuç: Bu çalışmada, beyin ve medulla spinalisin elektron mikroskobu altında incelenmesi için tespit işleminde kakodilat tamponu ile hazırlanan %2,5 GA çözeltisinin uygun ve etkili olduğunu gösterdik.

Anahtar Kelimeler: Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM), Tespit Solüsyonu, Trump Solüsyonu, Fosfat Tamponu, Kakodilat Tamponu

Abstract

Objectives: Ultrastructural examination of nervous tissues is essential for neuroscientific study. Nervous tissue is sensitive to ischemia and hypoxia. Thus, the fixation and process of this tissue is critical for evaluating ultrastructure of nervous tissue. It is difficult to distinguish whether the findings are due to the fixative used in the experimental research or the experimental agent. In this study, we aimed to investigate the effects of the different five fixatives on the brain and medulla spinalis, which are the central nervous system organs, by evaluating the ultrastructural changes.

Materials and Methods: In this study, five male Wistar Albino rats (200-250 gr) were anesthetized. The perfusion fixation was performed by 4% paraformaldehyde (PFA). The extracted brain and medulla spinalis pieces were immersed into five different fixation solutions as (I) Trump's solution 4% PFA and 1% glutaraldehyde (GA), (II) 2% PFA and 2.5% GA with 2.5 mM CaCl, (III) 2% PFA and 2.5% GA, (IV) 2.5% GA, (V) Trump's solution 4% PFA and 1% GA (1% OsO₄ containing potassium ferrocyanate). After routine processes, all ultrathin tissue sections were investigated under the transmission electron microscopy.

Results: In Group 4, the cell nucleus, perinuclear space, mitochondrion, rough endoplasmic reticulum and myelin sheet, endothelium and basal lamina of nervous tissues of brain and medulla spinalis were evaluated as normal ultrastructure compared to the other groups.

Conclusion: In present study, we showed that 2.5% GA solution prepared with cacodylate buffer was convenient and effective for nerve tissues of electron microscopic routine process.

Key Words: Transmission Electron Microscopy (TEM), Fixatives, Trump's Solution, Phosphate Buffer, Cacodylate Buffer

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Ferda Topal Çelikkan,
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
Tel.: +90 506 479 47 02 E-posta: ftopal@ankara.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0002-8254-0558

Geliş Tarihi/Received: 27.12.2020 Kabul Tarihi/Accepted: 09.02.2021

©Telif Hakkı 2021 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.
Yayınlanan tüm içerik CC BY-NC-ND lisansı altındadır.



Giriş

Dokuların ince yapı düzeyinde araştırmalarında elektron mikroskobu inceleme ve değerlendirilmeleri hala en ideal yöntem olma özelliğini korumaktadır (1). Tespit işlemi, mikroskopik incelemenin ilk ve en kritik basamağıdır (2,3). Elektron mikroskopik inceleme esnasında elde edilecek verilerin doğru ve güvenilir olabilmesi için dokuların doğru solüsyonların iğerisine alınıp uygun sürelerde tespit edilmesi gerekmektedir (4). Uygun olmayan bir şekilde tespit edilmiş dokuların takibi sonucu ortaya çıkan artefaktlarla (hatalı görüntüler) normal yapıları ayırmak mümkün olamamakta, doku incelemeleri sırasında yapılan ölçümler ve testler de yanlış değerlendirmelere neden olabilmektedir (5).

Günümüzde elektron mikroskobunda ince yapı düzeyinde yapılan incelemeler birçok klinikte ayırıcı tanıda oldukça önemli bir yere sahiptir (6). Bu amaçla kullanılacak dokuların, özellikle santral sinir sistemi (SSS) organlarından alınan doku örneklerinin, en kısa zamanda tespit solüsyonuna alınması gerekir (7). Bekletilen dokularda otoliz, hasar ya da mikroorganizma kontaminasyonu geręekleřir. Dokunun tespit edilmeden geçirdiği süreyi en aza indiren perfüzyon yöntemi hücre/dokuları henüz kalp pompalama işlevini sürdürürken tespit solüsyonuyla buluşturan bir yöntemdir ve literatürde tespit solüsyonlarının etkinliğini daha da artırdığı gösterilmiştir (8). Bu nedenle tespit solüsyonunun perfüzyon yöntemiyle uygulanması tercih edilir. Biz de çalışmamızda perfüzyon yönteminin daldırma yöntemine üstünlüğü nedeniyle perfüzyon yöntemini uyguladık.

Kullanılan yetersiz tespit solüsyonları dokunun analiz sonuçlarını değiştirebilir. Doğru şekilde seğilen tespit solüsyonları dokuları da yaşamın durduğu andaki haliyle koruyarak dokunun geçirdiği takip süreçlerini doğrudan etkiler. Glutaraldehit (GA) ve paraformaldehit (PFA), Trump solüsyonu ve Karnovsky'nin solüsyonu farklı laboratuvarlarda elektron mikroskobu incelemelerinde sıklıkla kullanılan tespit solüsyonlarıdır (3,9-11). Özellikle SSS dokularının hassasiyeti ve tespitinin zorluğu göz önüne alındığında; bu farklı tespit solüsyonlarının doku

bütünlüğü ve hücresel yapıların korunması üzerine etkinliklerinin araştırılması ve karşılaştırılması zorunlu hale gelmektedir.

Farklı tespit solüsyonlarının kullanılması sonucunda doku incelemeleri üzerinden verilecek tanı, yapılacak gözlem ve ölçüm sonuçları değişkenlik gösterebilir, verilerimizi ve çıkarımlarımızı etkileyebilir. Bu çalışma; çeşitli tespit sıvılarının etkinliğini ve birbirine olan üstünlüğünü araştırarak, dokunun değişken laboratuvar yöntemlerinden etkilenmesini en aza indirmek ve kullanılan tespit yöntemlerini standardize etmek üzere planlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Deney hayvanları ve deney tasarımı

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylandı (no: 2020-20-162). Hayvanlar Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edildi. Deneyler laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımı kılavuzuna göre geręekleřtirildi. Çalışmamızda Wistar Albino tipi 5 erkek sıçan (10-12 haftalık) kullanıldı. İntramüsküler 100 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin enjekte edilerek anesteziye alındı. Kalbin pompalama gücünden yararlanılarak, sol ventriküle takılan kateterle enjektöre basınç uygulanarak gönderilen heparinli serum fizyolojik, sağ atriumdan atılan kesiyle sıçanın dolaşım sistemini terk edene kadar beklendi. Kesiden gelen heparinli serum fizyolojiğin rengi şefflaşlaştığında, yine sol ventriküle enjektör yardımıyla %4 PFA verildi. Tespit solüsyonunun hayvanın tüm vücuduna dağılması hayvanın burun ucu gibi periferik noktalarının pembeliğini kaybedip beyazlaşması ile anlaşıldı. Verilen tespit sıvısı henüz hayvan yaşarken kılcal damarlar aracılığıyla en periferik bölgelere kadar iletildiğinden dokuların ve hücrelerin hiç vakit kaybetmeden tespitleri başlamış oldu. Dokuların sertleşmesiyle bunun başarıldığı anlaşıldı. Tespitin ardından beyin ve medulla spinalisten 1 mm³lük parçalar çıkarıldı. Her hayvandan alınan dokular, beş farklı solüsyonla 1. tespit yapılarak takip edildi. Deney grupları Tablo 1'de gösterilmiştir. Solüsyonlar taze hazırlandıktan sonra pH değerleri 7,2-7,4 olarak ayarlanıp +4 °C de kullanılabilecek kadar

Tablo 1: Deney grupları

Gruplar	Tespit solüsyonu iğeriği	Tampon solüsyonu	Eklene kimyasal madde
Grup 1 (Trump solüsyonu)	%4 PFA ve %1 GA	Fosfat tamponu (PBS)	-
Grup 2	%2 PFA ve %2,5 GA	2,5 mM CaCl içeren PBS	-
Grup 3	%2 PFA ve %2,5 GA	Fosfat tamponu (PBS)	-
Grup 4	%2,5 GA	Kakodilat tamponu	-
Grup 5 (Trump solüsyonu)	%4 PFA ve %1 GA	Fosfat tamponu (PBS)	%1 OsO ₄ iğerisine potasyum ferrosiyanat eklendi

GA: Glutaraldehit, PFA: Paraformaldehit

muhafaza edildi. Tekrar tespit solüsyonu pH'leri kontrol edilerek işlemler başlatıldı.

Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) doku takibi

İlk üç grup ve beşinci grupta tespit solüsyonu fosfat tampon (PBS) içerisinde hazırlanırken, dördüncü grupta kakodilat tamponu kullanıldı. Tespit işlemi 4 °C de 4 saat süreyle gerçekleştirildi ve birinci tespit işleminden sonra dokular %1 osmiyum tetraoksit içerisinde 4 saat kadar oda ısısında bekletildi. Dereceli alkol solüsyonlarında dokuların suyu uzaklaştırdıktan (dehidratasyon) sonra propilen oksite aktarılıp Araldit 6005'e gömüldü. Yarı ince kesitler 800 nm kalınlığında kesilip Toluidin mavisi-Azur II ile boyandı ve uygun alanlar belirlenerek ince kesitler 60-80 nm olarak ultramikrotomla (Leica Ultracut R) kesildi ve bakır gridlerin üzerine alındı. İnce kesitler uranil asetat ve kurşun sitratla boyandı ve ince doku düzeyinde değerlendirilmek üzere TEM'de incelendi (LEO 906E, Zeiss, Oberkochen, Germany).

Bulgular

Tüm hayvanlarda %4 PFA solüsyonuyla perfüzyonlu tespit işlemi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve 5 hayvanın beyin ve medulla spinalisinden eşit büyüklükte parçalar alınarak 5 farklı tespit solüsyonuna konulmuştur. Ortak takip işlemi sonrası ince yapı incelemelerinin sonuçları TEM'de gözlenerek karşılaştırılmıştır.

Medulla spinalis ve beyinde hücre yapıları (nöron ve glia hücreleri), çekirdek, kromatin dağılımı, çekirdek zarı korunumu, organellerin korunması, miyelin ve damar yapıları incelenirken,

özellikle damar yapılarında endotel hücrelerinin özellikleri ve bazal laminanın görünümü değerlendirildi (Tablo 2,3).

Grup 1: %4 PFA ve %1 GA (fosfat tamponu içerisinde) (Trump solüsyonu)

Medulla spinaliste hücre çekirdeklerinde kromatin dağılımı normal olarak izlendi, çekirdekçik belirgindi. Çekirdek çift zarı devamlılığı izlenirken iç ve dış zarının bazı alanlarda ayrıldığı gözlemlendi. Çekirdek zarının üzerinde bulunan çekirdek porlarının normal yapısı ayrıntılı olarak izlenebilmekteydi. Sitoplazmada mitokondriyon çift zar ve krista yapısı bozulmuş görünümdeydi. Miyelin yapıları ve akson içeriği düzenliydi. Nöropil alanında vakuol yapıları dikkat çekti. Medulla spinaliste yer alan damarların endotel hücreleri ince sitoplazmalarıyla hücre içeriği ve altlarında bulunan bazal laminayla ilişkileri normaldi, herhangi bir ayrılma izlenmedi (Şekil 1).

Beyinde hücre çekirdeklerinin zar bütünlüğünün ve çekirdek kromatin yapısının korunduğu yapısı ve hücre sitoplazmasında şişme (hidrops) dikkat çekti. Hücrelerin içinde organellerde ve nöropilde şişme ve vakuoller izlendi; hücre içi ve hücrelerarası alanda şişme görüldü. Beyinde bulunan kılcal damar endotel hücrelerinin sitoplazmasında şişmiş mitokondriyonlar gözlemlendi (Şekil 2).

Grup 2: %2 PFA ve %2,5 GA, (2,5 mM CaCl içeren fosfat tamponu içerisinde) (Karnovsky'nin fiksatif)

Medulla spinaliste gözlenen hücrelerin kromatin dağılımı ve çekirdek zarlarının normal yapıda olduğu izlendi. Mitokondriyonların içerisinde kristaların kaybolduğu ve endoplazmik retikulum (ER) sarnıçlarının genişlediği dikkat

Tablo 2: Medulla spinalisteki hücrelerin, miyelinin ve kılcal damarların ince yapı düzeyinde inceleme sonuçları

	Kromatin yapısı	Çekirdek çift zarı	Sitoplazmanın yapısı	Mitokondriyon çift zar yapısı ve kristalar	GER ve Golgi kompleksi	Miyelin	Kılcal damar endotel ve BL
Grup 1	Normal	Ayrılma	Normal	Bozulma	Normal	Normal	Normal
Grup 2	Normal	Normal	Normal	Bozulma	Genişlemiş	Ayrılma/parçalanma	Normal
Grup 3	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Ayrılma	Normal
Grup 4	Normal	Genişleme	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Grup 5	Normal	Genişleme	Normal	Şişme	Normal	Ayrılma/şişme	Normal

GER: Granüllü endoplazmik retikulum

Tablo 3: Beyindeki hücrelerin, miyelinin ve kapiller damarların ince yapı düzeyinde inceleme sonuçları

	Kromatin yapısı	Çekirdek çift zarı	Sitoplazmanın yapısı	Mitokondriyon çift zar yapısı ve kristalar	GER ve Golgi kompleksi	Kılcal damar endotel ve BL
Grup 1	Şişme	Normal	Şişme, vakuoller	Şişme	Şişme	Şişme
Grup 2	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Grup 3	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Grup 4	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Grup 5	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

GER: Granüllü endoplazmik retikulum

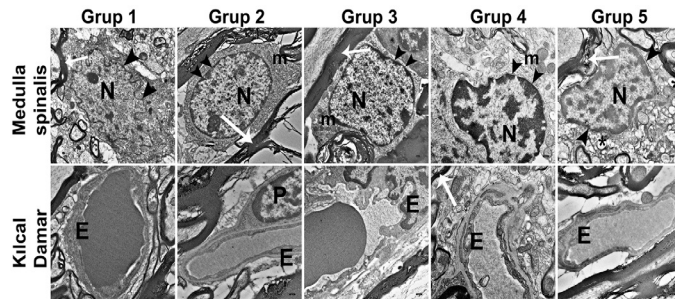
çaktı. Aksonların miyelinden ayrıldığı alanlar mevcuttu. Miyelin yapılar oldukça ayırık ve parçalanmış olarak gözlenirken kılcal damar endotel hücreleri ve perisitlerin normal yapıda olduğu gözlemlendi (Şekil 1).

Beyindeki hücrelerin çekirdek zarı, çekirdekçik ve çekirdek içeriği bütünlüğünü koruduğu çekirdek çift zarının düzenli ve birleşik olduğu gözlemlendi. Mitokondriyon zarı, kristalleri ve granüllü ER sarnıçlarında genişleme yoktu ve zarlarda bütünlüğün bozulmadığı dikkat çekti. Damar yapılarının bütünlüğünü koruduğu, endotel hücrelerinde ve perisitlerde bütünlüğün korunduğu izlendi (Şekil 2).

Grup 3: %2 PFA ve %2,5 GA (fosfat tamponu içerisinde) (Karnovsky'nin fiksatif)

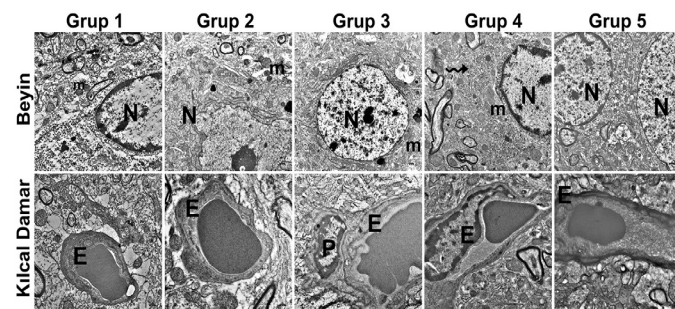
Medulla spinaliste hücrelerin çekirdekindeki ökromatin yapısı düzenli olarak izlendi. Çift tabakalı çekirdek zarı normal yapıdaydı, genişlemeler gözlenmedi. Miyelin yapıları bütünlüğünü korurken, yer yer ayrılmalar görüldü. Kılcal damar endotel hücreleri ve bazal laminaları normal yapıda izlendi. Endotel hücreleri içerisinde pinositik veziküllerin görünür ve sağlam yapıda olması dikkat çekmekteydi (Şekil 1).

Beyinde hücrelerin çekirdeklerinin bütünlüğünün korunduğu, çekirdek çift zarlarının ayrılmadığı izlendi. Mitokondriyon zar



Şekil 1: Medulla spinalisin TEM incelemesi. Hücreler, miyelin ve kapiller yapıların ince yapı görüntüleri.

E: Endotel, M: Mitokondriyon, N: Nükleus, Çekirdek, P: Perisit, Ok başı: Çekirdek zarı, Beyaz ok: Miyelin, Yıldız: Vakuol



Şekil 2: Beyinin TEM incelemesi. Hücre, organel ve kapiller damarların ince yapı incelenmesinin görüntüleri

E: Endotel, M: Mitokondriyon, N: Nükleus/çekirdek, P: Perisit, Dalgali ok: Serbest ribozomlar

ve kristallerinin, ER sarnıçlarının korunduğu dikkat çekti. Kılcal damar endotel hücreleri, perisit ve bazal lamina yapılarının normal olduğu gözlemlendi (Şekil 2).

Grup 4: %2,5 GA (kakodilat tamponu içerisinde)

Medulla spinaliste hücrelerde çekirdek zarının bütünlüğünü korurken hafif düzeyde genişlemeler gözlemlendi. Kromatin yapısının bütünlüğü korunmuştu. Sitoplazmasında bulunan mitokondriyonların zar yapılarının ve kristallerinin yapısı korunmuş olarak izlendi. Miyelin yapılarının korunduğu ve düzenli olduğu izlendi. Kılcal damar endotel hücrelerinin sağlam olduğu, organel ayrıntılarının oldukça net gözlemlendiği dikkat çekti (Şekil 1).

Beyinde hücrelerin çekirdek yapısının ve bütünlüğünün korunduğu, çekirdek çift tabakasının düzenli bir şekilde gözlemlendiği, sitoplazma içeriği ve dağılımının normal olduğu dikkat çekti. Granüllü ER sarnıçları ve mitokondriyon zar yapılarının sağlam kaldığı gözlemlendi. Sitoplazmada organel yapılarının bütünlüğü bozulmamıştı, sitoplazma ya da nöropilde şişme izlenmedi. Kılcal damar endotel hücresinin çekirdek ve sitoplazmasının ve aynı zamanda bazal laminasının normal olduğu gözlemlendi (Şekil 2).

Grup 5: %4 PFA ve %1 GA (fosfat tamponu içerisinde) %1 OsO₄ içerisinde potasyum ferrosiyanat eklendi (Trump solüsyonu)

Medulla spinaliste gözlenen hücrelerin çekirdeklerinde kromatin dağılımı normaldi ancak çekirdeğin çift tabakalı zarında yer yer genişlemeler izlendi. Mitokondriyonlarda şişme vardı. Miyelin yapılarında yer yer şişme ve ayrılma bölgeleri göze çarpmaktaydı. Akson içeriğinin normal olduğu, hücre içinde ve nöropilde boş vakuoller bulunduğu gözlemlendi. Damar endotel hücrelerinin normal morfolojide olduğu ve bazal laminalarının bütünlüklerini koruduğu dikkat çekti (Şekil 1).

Beyinde hücrelerin çekirdek bütünlüğünün korunduğu, çekirdek çift katlı tabakası ve sitoplazmadaki zarlı yapıların bozulmadığı izlendi. Mitokondriyon zar ve krista yapılarının korunduğu dikkat çekti. Hücreler arası bağlantılarının ayrılmadığı, devamlılıklarını koruduğu gözlemlendi. Kılcal damar endotel hücrelerinin ve bazal laminanın bütünlüğünü koruduğu izlendi (Şekil 2).

Tartışma

Geçmişte bakıldığında, son yıllarda tespit solüsyonlarındaki değişiklikler elektron mikroskobu hazırlama yöntemlerinde meydana gelen gelişmenin bir yansımasıdır. Farklı tespit solüsyonları, farklı takip süreciyle birleştirildiğinde, dokuların ince yapılarının korunmasında farklı sonuçlar ortaya çıkarır (12). Sinir sistemi, hücrelerinin oksijensizliğe dayanıksızlığı, bu hücrelerin hızla dejenere olması hatta ölümüne neden

olur. Uygun ve hızla yapılan tespit bu hücrelerin korunmasını sağlayacaktır. Aynı zamanda beyaz cevherinde bulunan miyelin nedeniyle, yağ içeriği diğer organlardan farklıdır ve bu sebeple tespit işlemleri uzun sürmekte ve hızla yapılması gerekmektedir (13). Çalışmamızda SSS organlarından beyin ve medulla spinalisin perfüzyon yöntemiyle tespit edilmesinin ardından beş farklı tespit solüsyonunda tespit gerçekleştirildi ve elektron mikroskobunda ince yapı düzeyinde incelendi.

Tespitin hızla yapılmasının gerekliliğini göstermede; perfüzyon ve daldırma (immersiyon) yönteminin farklılığı Garman (14) tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada sıçanlar üzerinde %10 tamponlu formalin ile perfüzyon ve daldırma yöntemleri uygulanıp hematoksilen eozinle boyanarak ışık mikroskobunda değerlendirilmiştir. Perfüzyon yöntemiyle beyinde normal yapıda nöronlar izlenirken daldırma yönteminde büzülmüş, düzensiz görünümde bazofilik nöronlar (koyu nöronlar) ve nöron çevresinde çekilme sonucu boşluklar izlenmiştir (14). Lamberts ve ark. (15) perfüzyon ve daldırma yöntemiyle GA ve PFA solüsyonuyla, Palay ve ark. (16) ise osmiyum tetraoksit ile beyni tespit ettikten sonra sonuçları TEM'de karşılaştırdıklarında, perfüzyon yöntemiyle hücrelerin çekirdek, zarlı organel, sitoplazma ve hücre zarı düzeyinde daha iyi korunduğu sonucunu elde etmişlerdir. Biz de bu araştırmada, Garman (14), Lamberts ve ark (15) ve Palay ve ark.'nın (16) yaptığı çalışmalar ışığında, perfüzyon yöntemini kullanarak medulla spinalis ve beyinin farklı tespit sıvıları ve tamponlarla korunmasının karşılaştırılmasını çalışmacılara faydalı olacağı düşüncesiyle gözlemledik.

Tespit solüsyonları değerlendirildiğinde; GA, PFA'dan daha büyük bir molekül olduğu için dokuya girişinin yavaş olduğu, bu nedenle PFA'nın dokuya daha hızlı nüfuz ettiği bilinmektedir. Bu çalışmada, GA ile karşılaştırıldığında perfüzyon yönteminde daha hızlı tespit hızına sahip PFA seçilerek perfüzyonun etkisi en etkin seviyede kullanılmıştır (17). Çalışmamızda, perfüzyon yönteminin kullanılmasının bir sonucu olarak; kılcal damar yapılarının incelemelerinde endotel hücrelerinin tüm tespit solüsyonlarında ince yapı düzeyinde çok iyi korunduğu dikkat çekmiştir. Perfüzyon yöntemiyle tespit yapılması sırasında kılcal damar endotel hücrelerinin tespit solüsyonuyla ilk temas eden hücreler olması ve dolayısıyla tüm tespit solüsyonlarında normal yapıda gözlenmesi beklenen bir sonuç olarak değerlendirildi (18).

Tamponların farklılıklarına bakacak olursak; PBS, laboratuvar uygulamalarında yaygın olarak kullanılan, elektron mikroskobu solüsyonlarını seyreltmede tercih edilen bir tampon solüsyonudur (5). PBS tamponlama kapasitesi diğer tamponlara göre daha yüksek olduğu ve toksik olmadığı için öncelikli olarak kullanılmaktadır. Ancak bu çalışmada fizyolojik pH'de (pH=7,2-7,4) hazırlanan kakodilat solüsyonuyla %2,5 GA'nın diğer

tespit solüsyonlarına göre sinir dokusunda hücreleri (nöron ve glia hücreleri), organellerini, damar yapıları (endotel, perisit) ve nöropili koruduğu ortaya konulmuştur. Kakodilat tamponu PBS'ye göre daha pahalı ve daha toksik olmasına rağmen yüksek reaktif gruplara sahip olmaması nedeniyle fosfat tampon gibi hücre elementleriyle reaksiyona girmez (19). Kakodilat tamponu içeriğinde toksik bir madde olan arseniğin olması nedeniyle çeker ocak altında dikkatli bir şekilde hazırlanmasına dikkat edilmelidir. Fosfat tampon içerisinde kalsiyum klorür (CaCl) kullanılması (Grup 2) hücrenin çekirdeğindeki DNA içeriğini sabitleştirir ve sağlamlaştırır (20). Tespit solüsyonunu tamponuna CaCl eklediğimizde çekirdekdeki kromatin içeriğinin korunması nedeniyle çekirdek yapısının iyi korunduğu bizim gözlemlerimizde de ortaya çıkmıştır.

Bu çalışmada Trump solüsyonuyla (Grup 1 ve 5) tespit edilen medulla spinaliste hücrelerin içinde ve hücreler arasında vakuoller tespit edildi, beyinde ise hücrelerde (nöron ve endotel hücrelerinde) şişme gözlemlendi. Trump solüsyonunda GA oranının %1 oranında olması hücre ve hücre dışı yapıların korunmasının yetersiz olabileceğini düşündürdü. TEM ile sinir dokusunun ince yapı düzeyinde incelenmesinde ve hücre analizinde Trump solüsyonunun tercih edilirken bu sonuçların göz önünde bulundurulması önerilmektedir. Grup 1 ve 5 arasında ince yapı düzeyinde incelemelerde bir fark olmaması grup 5'te osmiyum tetraoksit içine konulan potasyum ferrosiyanatın tespit işleminde etkin rolü olmadığını göstermektedir. Wood ve Luft (21) yaptığı çalışmada karaciğer ve pankreasın tespitinde osmiyum tetraoksiti farklı (kollidin, fosfat, arsenat, sodyum bikarbonat, Veronal asetat ve potasyum kromat-dikromat) tampon solüsyonları içinde çözerek doku takibinde kullanmışlardır. Bu dokuların TEM'de incelenerek karşılaştırılmasında, tampon sistemleri arasında belirgin bir fark olmadığı bildirilmiştir (21).

Sonuç

Bu çalışma sonucunda sinir dokularının elektron mikroskopta incelemesi için doku takibinde çok çeşitli tespit ve tampon solüsyonları kullanılırken tek iyi bir tespit solüsyonundan bahsetmek zor gibi görünmektedir. Tespit sonuçları arasında farklar olabileceği göz önünde bulundurulduğunda çalışmamızda kakodilat tamponuyla hazırlanan %2,5 GA solüsyonunun (Grup 4) hem beyin hem de medulla spinaliste hücrelerin (nöron ve glia hücreleri), organellerin, nöropilin ve kılcal damar ince yapısının korunmasında diğer gruplara göre sinir dokusu için elverişli ve etkin olduğunu gösterdik.

Etik

Etik Kurul Onayı: Çalışma Kasım-Aralık 2020 tarihlerinde yürütülmüş ve etik kurul onayı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır (onay no: 2020-20-162).

Hasta Onayı: Bu çalışma için hasta onamına gerek duyulmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulunun içinden ve dışından olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Hayvan Deneyleri: F.T.Ç., E.E., Konsept: F.T.Ç., E.E., Dizayn: E.E., Veri Toplama veya İşleme: F.T.Ç., E.E., Analiz veya Yorumlama: F.T.Ç., E.E., Literatür Arama: F.T.Ç., Yazan: F.T.Ç., E.E.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

Kaynaklar

1. Tizro P, Choi C, Khanlou N. Sample Preparation for Transmission Electron Microscopy. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:417-424.
2. Farias DR, Simioni C, Poltronieri E, et al. Fine-tuning transmission electron microscopy methods to evaluate the cellular architecture of Ulvacean seaweeds (Chlorophyta). *Micron.* 2017;96:48-56.
3. Tanaka KA, Suzuki KG, Shirai YM, et al. Membrane molecules mobile even after chemical fixation. *Nat Methods.* 2010;7:865-866.
4. Richter KN, Revelo NH, Seitz KJ, et al. Glyoxal as an alternative fixative to formaldehyde in immunostaining and super-resolution microscopy. *EMBO J.* 2018;37:139-159.
5. Schiff RI, Gennaro JF. The role of the buffer in the fixation of biological specimens for transmission and scanning electron microscopy. *Scanning.* 1979;2:135-148.
6. Tucker JA. The continuing value of electron microscopy in surgical pathology. *Ultrastruct Pathol.* 2000;24:383-389.
7. Hayat MA. Central Nervous System I, in *Fixation for Electron Microscopy.* Academic Press: New York.; 2012. s. 227-228.
8. McFadden WC, Walsh H, Richter F, et al. Perfusion fixation in brain banking: a systematic review. *Acta Neuropathol Commun.* 2019;7:146.
9. Smith JE, Reese TS. Use of aldehyde fixatives to determine the rate of synaptic transmitter release. *J Exp Biol.* 1980;89:19-29.
10. McDowell EM, Trump BF. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Arch Pathol Lab Med.* 1976;100:405-414.
11. Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron-microscopy. *Journal of Cell Biology.* 1965;27:1-149.
12. Maser MD, Powell TE 3rd, Philpott CW. Relationships among pH, osmolality, and concentration of fixative solutions. *Stain Technol.* 1967;42:175-182.
13. Fix AS, Garman RH. Practical aspects of neuropathology: a technical guide for working with the nervous system. *Toxicol Pathol.* 2000;28:122-131.
14. Garman RH. Artifacts in routinely immersion fixed nervous tissue. *Toxicol Pathol.* 1990;18:149-153.
15. Lamberts R, Goldsmith PC. Fixation, fine structure, and immunostaining for neuropeptides: perfusion versus immersion of the neuroendocrine hypothalamus. *J Histochem Cytochem.* 1986;34:389-398.
16. Palay SL, McGee-Russell SM, Gordon S Jr, et al. Fixation of neural tissues for electron microscopy by perfusion with solutions of osmium tetroxide. *J Cell Biol.* 1962;12:385-410.
17. Kasukurthi R, Brenner MJ, Moore AM, et al. Transcardial perfusion versus immersion fixation for assessment of peripheral nerve regeneration. *J Neurosci Methods.* 2009;184:303-309.
18. Gage GJ, Kipke DR, Shain W. Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp.* 2012;65:3564.
19. Dykstra MJ. *A Manual of Applied Techniques for Biological Electron Microscopy.* 1993: Springer US.
20. Kohll AX, Antkowiak PL, Chen WD, et al. Stabilizing synthetic DNA for long-term data storage with earth alkaline salts. *Chem Commun (Camb).* 2020;56:3613-3616.
21. Wood RL, Luft JH. The influence of buffer systems on fixation with osmium tetroxide. *J Ultrastruct Res.* 1965;12:22-45.