

ELEKTRON MİKROSKOPİDE TESPİT, GÖMME VE BOYAMA PROBLEMLERİ*

M. Sağlam**

1. Tespit ile İlgili Problemler:

Morfolojik anlamda tesbit denince, hücre içi ve hücrelerarası canlı ve cansız unsurların yapılarını, gerçeğe mümkün olduğu kadar yakın bir şekilde sabitleştirmek, stabilize etmek anlaşılır. Ancak tesbit yolu ile dir ki, ince yapıdaki organizasyon, preparasyon ve mikroskopik inceleme sırasında etkisini gösteren kimyasal ve fiziksel etkenlere karşı, -o da bir ölçüde korunabilmektedir.

Tespit işinde kullanılan maddelere tesbit maddeleri denir. Bu maddeler, protein, yağ ya da karbonhidratlardan oluşan unsurların yapılarına giren suyu çıkararak, bu unsurları şekillendiren moleküllerin birbirlerine daha sıkı bir şekilde bağlanmalarını sağlarlar. Burada önemli olan husus, bu bağlanma sırasında hücre içi ve dışı organizasyonun değişikliğe uğramamasıdır. Çok çeşitli tesbit maddeleri bulunmasına rağmen, bunlardan ancak birkaç tanesi ince yapıyı gerçeğe yakın bir şekilde tesbit edebilmektedir.

Tespiti etkeleyen faktörler :

Tespit maddesinin türü : İlk elektron mikroskopik araştırmalarda tesbit için, ışık mikroskopide çok kullanılan formaldehid'den yararlanılmak istenmiş ancak bundan yeterli sonuç alınamamıştır. Bunun peşinden 1950 lerde ozmik asit kullanılmaya başlanmıştır (11,13,16, 23,25,26). Bu madde bugün hâlâ, ya tek başına, ya da aldehid grubu tespitlerinden sonra, ikinci tespit (postfixation) işleminde kullanılmaktadır.

Ozmik asit dokulara yavaş işler (16, 25, 26). Bundan ötürü de, sadece ozmik asitle tespit edilecek doku parçalarının çok ufak olması

* Kendi deney ve tecrübelerimizden de yararlanılarak hazırlanan bu makale, 2-6 Şubat 1976 tarihleri arasında İstanbul'da toplanan IV. Elektron Mikroskopi Simpozyumunda, çağrılı tebliğ olarak sunulmuştur.

** A.Ü. Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Kürsüsü Profesörü.

gerekir. Ozmik asitin en iyi tespit ettiği maddeler, yağlı maddeler (lipid'ler)dir (1, 11, 13, 16, 26). Karbonhidratlar da oldukça iyi tespit edilirler. Proteinlerin çoğunluğunu ise ozmik asit yeterince tespit edemez (1, 2, 4, 13, 16, 26). Ayrıca, bu madde membran permeabilitesini arttırdığından (13), hyaloplazma ve karyoplazmadaki bir kısım proteinler (ribozomlar v.s.), tespit, dehidrasyon ve gömme işlemleri sırasında ekstraksiyona uğrarlar (21). Buna bağlı olarak da, ozmik asitle tespit edilmiş hücrelerin sioplazma ve çekirdekleri, aldehid tespitililere kıyasla daha silik ve daha az kontrastlı olarak görünür (Şek. 1A); mitokondriyumların matriksleri erir (Şek. 1B, m); buna karşılık, membransel şekilli unsurlar, özellikle hücre ve çekirdek zarları (Şek. 1A), lipid damlacıkları ve salgı granülleri (Şek. 1B, s) belirginleşirler. Bunun nedenleri, hücre şekilsiz temel maddesinin bir dereceye kadar erimiş, buna karşılık, membranlarda ve granüllerde bulunan yağlı maddelerin iyi korunmuş olmasıdır.

Ozmik asitin diğer bir dezavantajı da, proteinleri iyi tespit edememesinden ya da parçalamasından ötürü, enzim araştırmalarında ilk tespit için kullanılamayıdır (11, 13). Ozmik asit ayrıca, bitkisel hücreleri de yeterince tespit edememektedir (13, 16).

Ozmik asitin bu yetersizlikleri anlaşılınca, başka tespit maddelerine yönelinmiş ve bu arada, 1960 larda Sabatini ve çalışma arkadaşları (27), glutaraldehid'i tanıtmıştır. Bu madde bugün artık, bitkisel ve hayvansal dokuların tespitinde en popüler ve üniversal olan tesbit maddesi haline gelmiştir. Bunun iki nedeni vardır: Bir defa glutaraldehid, çoğu enzimler de dahil, proteinleri ve karbonhidratları iyi tespit eden bir maddedir (2, 11, 13 16 26). İkincisi, bu tespitten sonra dokular tamponlarda, fazla ekstraksiyona uğramaksızın uzunca bir süre saklanabilmektedir (13, 16).

Saf glutaraldehid yağlı bir maddeden ibarettir. Buna Pentandial veya Dioxopentan adları da verilir. Piyasada % 25, 50 veya 75 lik sulu eriyikleri bulunmaktadır. Ancak, saf olmayan bu eriyikler, ultrastruktur düzeyinde yeterli bir tespit gücüne sahip değildir. Bunlar sanayide, derilere dayanıklılık ve yumuşaklık kazandırmak için kullanılmaktadır.

Elektron mikroskopide kullanılan glutaraldehid'ler, bu ticari aldehid'lerin vakum distilasyonuna tâbi tutulmaları ile elde edilmektedir (3, 9, 13, 16). Monomer halindeki bu saf glutaraldehid eriyiklerinde zamanla bir taraftan glutarik asit, diğer taraftan da polimerler şekillenmektedir. Bayat glutaraldehid'lerin tespit gücünü kaybetmeleri, şekillenen bu maddelere bağlanmaktadır (3, 11, 12).

Glutaraldehyd eskidikçe pH'sında düşme olur. pH'sı 3.5 dan aşağı düşen glutaraldehyd'ler tespit işinde kullanılamamaktadır (12, 13, 16). Eskimeye yüz tutmuş glutaraldehyd'ler en büyük zorluğu enzimlerin demonstrasyonunda çıkarmaktadır. Örneğin, böyle bir glutaraldehyd ile asit fosfataz enzimini saptamak kolay olmamaktadır (7, 9). Ayrıca, sitomembranlar, salgı granülleri ve mitokondriyumlarda yıkım olmakta ve bunlardan çıkan yağlı maddelerden, daha sonraki ozmik asit tespiti sırasında myelin figürleri şekillenmektedir.

Yurdumuzda saf glutaraldehyd sağlamak zordur. Genellikle yeni getirilen glutaraldehyd'lerin bile pH'sı, çoğu kez 3.5'un altında olmaktadır. Bundan ötürü glutaraldehyd'leri, kullanmadan önce aktif kömürle süzmekte, hattâ, ihtiyaca göre, distile etmekte yarar vardır. Biz, bayat ve taze glutaraldehyd'leri, orijinal hallerinde, süzerek ya da distile ederek kullandık ve şu sonuçları aldık: pH'sı 3-3.5 arasında olan glutaraldehyd'ler kullanıldığında, sitoplazmik unsurlar iyi tespit olmamakta, yukarda da belirtildiği gibi, myelin figürler şekillenmekte (Şek. 2A, s), endoplazmik kesecikler şişmekte, mitokondriyumların matriksleri crimektedir. Buna karşılık, çekirdek ve çekirdekcik materyali (Şek. 2B), taze glutaraldehyd'e kıyasla, biraz daha iyi korunmaktadır.

Eski glutaraldehyd'ler aktif karbonla süzöldüğünde, pH da belirgin bir yükselmeye olmaktadır; pH, 5.5-6.5'a kadar çıkmaktadır. Bunların kullanılmasında, sitoplazmik oluşumlar (E.R., mitokondriyumlar, Golgi aparatları, salgı granülleri v.s.) daha iyi korunabilmekte; myelin figürleri azalmakta ya da hiç görölmemekte, fakat çekirdek materyali biraz zayıflamaktadır (Şek. 3).

Bu tür glutaraldehyd'ler damıtıldıklarında, özellikle karyoplazma ve endoplazmik kesecikler içeriğinde bir zayıflama olmaktadır; buna karşılık, salgı granülleri, mitokondriyumlar, membransel oluşumlar ve lizozomlar belirginleşmekte; mikrofilament ve mikrotubuluslar daha iyi görölebilmektedir.

Taze ve pH'sı 3.5'un üzerinde olan glutaraldehyd ile ise, hem sitoplazma ve hem de çekirdek materyali yeterince tespit olmaktadır (Şekil. 4). Bu durumda sadece mitokondriyum matriksinde (m) bir miktar yıkım olmaktadır. Son yıllarda glutaraldehyd, paraformaldehyd ile kombine şekilde kullanılmaya başlanmıştır (15). Glutaraldehyd dokulara, ozmik asitten daha hızlı işleyen bir tespit maddesidir. Fakat paraformaldehyd, glutaraldehyd'den de daha hızlı işlemektedir. Bu durumdan ötürü de, kombine yani dialdehyd tespit solusyonu, sadece glutaraldehyd'e kıyasla ince yapıyı daha iyi korumaktadır. Örneğin mitokondriyum matriksi bu durumda daha iyi belirginleşmekte (Şek. 5); myelin figürleri azalmaktadır.

Glutaraldehid'lerin iki dezavantajı vardır. Bu madde lipidleri yeterince tespit edememektedir (11, 13, 16, 26). Ayrıca, sadece glutaraldehid ile tespit edilmiş dokulardan elde edilen kesitler boyaları yeterince alamazlar. Aldehid tespitinden sonra ozmik asitle postfiksasyon bu nedenle yapılır.

Aldehid grubuna giren ve girmeyen daha birçok tespit maddesi varsa da bunlar ancak belli amaçlarla kullanılmaktadır.

Belli bir tespit solusyonu ile tespitte her zaman ve her hücrede aynı sonucu almak olanaksızdır. Tespit kalitesi bir bloktan ötekine değişebildiği gibi, aynı kesitteki komşu iki hücreden biri diğerinden daha iyi de tespit olmuş olabilir. Bu son durum, tespitle ilgili olabileceği gibi, hücrelerin farklı fonksiyon aşamalarında olmalarından da ileri gelebilir. Örneğin, çok aktif bir metabolizma fazında olan hücreler, ideal bir tespit solusyonu ile tespit edilseler bile, özellikle endoplazmik kesecikler (Şek. 6 A, B), hattâ perinuklear boşluk, şişkin olarak gözüktür. Bu durumu, tespit hatası olarak almamak gerekir. Bu gibi hallerde, aynı doku içindeki diğer hücre türleri, ya da aynı tür hücrenin istirahat halinde olanı incelendiğinde, bunlarda, şişme durumu bulunmadığı görülecektir.

Amaca uygun bir sonuç elde edebilmek için, tespit türünden başka, pH'sını, ozmotik basıncını, iyon içeriğini, ısısını, tespitte kullanılan tampon maddesinin türünü ve tespiti uygulama yolunu da iyi seçmek gereklidir.

Tespitin pH durumu: Morfolojik araştırmalarda genellikle 7.2-7.4 arası bir pH kullanılır (11, 13, 26). Ancak pH değerini 6.5-8 arasında değiştirmenin yapı üzerinde büyük bir farkı olmamaktadır (13). Fakat bazı maddelerin, özellikle enzimlerin spesifik demonstrasyonlarında, pH'nın tam bildirilen değerde olması gereği de vardır. Diğer taraftan, mukopolisakkarit türünde salgı granülleri taşıyan hücreler, örneğin mide yüzey epiteli, normal pH'da tespit edilince, salgı granülleri iyice tespit olamamakta; buna bağlı olarak da, bu gibi dokular kesit alma sırasında zorluk çıkarmakta; hücrelerin bu tür granülleri taşıyan bölgelerinde yırtılmalar meydana gelmektedir. Bu tür dokuları, 8-8.5 arası pH'larda tespit etmenin iyi sonuç verdiği literatürde bildirilmektedir (14). Mide üzerinde yaptığımız bir araştırmada, biz de aynı sonuca varmış bulunmaktayız.

Bazı araştırmacılar, pH'sı 7 olan bir solusyonla tespite başlayıp, tespit işlemi bitinceye kadar pH'yı 8'e çıkarmayı önermektedirler (24). Diğer taraftan, hafif asit (6.0) pH'da ozmik asit tespitinin çekirdek materyalini ve mekik ipliklerini daha iyi tespit ettiği de bildirilmektedir (8).

Tespitin ozmotik basıncı : Tespit solusyonlarının ozmotik basıncı, tesbit edilecek hücrelerin ozmotik basıncı ile aynı ya da ona çok yakın olmalıdır (5, 6, 13, 18). Eğer solusyonun ozmotik basıncı hücrelerinkinden daha düşük olursa (hipotonik solusyon), bu durumda, hücre ve içindeki şekilli unsurlar su alıp şişerler (Şek. 7A, e, p); buna karşılık, dıştaki sulu ortama madde verirler (5, 6, 13, 18). Böyle olmayıp da, tespit işinde yoğun (hipertonik) tespit solusyonları kullanılırsa, bu sefer de hücreler dışarıya fazla su verirler, dolayısıyla da büzülürler. Böyle dokularda hücreler birbirlerinden uzaklaşmış olarak görünürler (Şek. 7B) Ayrıca, hücre içi yoğunluk arttığından, şekilli unsurlar koyu görünürler; çeşitli yapılar arasındaki kontrast farkı azalır.

Fazla su taşıyan dokuların-embryo'ya ve suda yaşayanlara ait dokular-tespitinde biraz hipertonik olan tespit solusyonları tercih edilir (13).

Ozmotik basıncı ayarlamak için genellikle NaCl, sucrose veya glucose gibi maddeler kullanılır. Ozmik asit solusyonları hipotoniktirler; izotoniye sağlamak için bunlara bu maddelerin birinden belli miktarlarda katılmalıdır. Glutaraldehyd ve formaldehyd solusyonları ise, izotoniktirler; çoğu dokular bu gibi bir katkıyı gerektirmez. Eğer bu maddelerden katılıp da solusyon hipertonik hale getirilirse, hücreler su kaybederek büzülürler ve birbirlerinden uzaklaşırlar.

Tespit solusyonundaki iyon içeriği : Ekstrasellüler sıvılarda iyonlar bulunduğundan, tespit solusyonlarında da aynı maddeler bulunmalıdır. Aksi takdirde hücre içi ve dışı materyalde ekstraksiyonlar olur (13). Bunun içindir ki, tespit solusyonlarına bir miktar bivalent katyon (Ca veya Mg) katılır. Böylelikle, tespit ve dehidrasyon sırasında, özellikle membran lipidlerinin ve mitokondriyum matriksinin ekstrakte olması önlenir; myelin figürleşmeleri azalır.

Isının etkisi : İlk tespit olarak ozmik asit kullanılacaksa, tespit buz dolabında (4°C) yapılmalıdır. Bu madde dokulara yavaş işlediğinden, oda ısısında tespit sırasında, doku parçalarının derin kısımları iyi tespit olamaz. Aldehyd grubu tespit maddeleri dokulara hızla işlediğinden, bunlarla tespiti oda ısısında ya da buz dolabında yapmanın belirgin bir farkı olmamaktadır. Ancak enzim demonstrasyonu söz konusu ise, tespiti, sağıkta yapmak gereklidir. Birkısım araştırmacılar (24), aldehydlerle tespite oda ısısında başlayıp, ısıyı 40°C'ye kadar çıkartmanın iyi sonuç verdiğini bildirmektedirler. Ancak, bu çok özen isteyen bir iştir. Yaptığımız deneylerde, ısıyı biraz hızlı yükseltince, mitokondriyumların ve sitomembranların yıkıldığını saptamış bulunmaktayız.

Tampon maddesinin etkisi: Çok çeşitli tampon maddeleri vardır. Bunlardan bugün en yaygın olarak kullanılanlar, fosfat ve kakodilat tamponlarıdır. Bu maddeler hem ozmik asitle hem de aldehyd grubu maddelerle kullanılabilirler. Fosfat tamponları kullanıldığında, tespitin dokularla daha iyi uyduğu ve daha hızlı işlediği bildirilmektedir (13) ve bundan ötürü de, ozmik asitle tespit özellikle bu tampon tavsiye edilmektedir (22, 30). Ancak aldehyd tespitlerinde bugün daha çok kakodilat tamponu kullanılmaktadır.

Bazı enzim demonstrasyon metodları, daha başka tamponlar (Tris, maleat, asetat v. s.) kullanmayı da gerektirmektedir (11, 13, 16).

Tespiti uygulama yolunun etkisi: Bilindiği gibi, tespit işlemi başlıca iki şekilde yapılmaktadır: Immersion ve perfusion yoluyla. Bunlardan immerzion tespiti daha sık olarak kullanılmaktadır. Ancak merkezi sinir sistemini oluşturan dokularla böbrek ve kaslarda, perfüzyon adeta zorunludur. Sinirsel dokularla böbrek dokusu ölümden sonra çok çabuk bozulurlar. Perfüzyon bu bakımdan gereklidir. Kaslar ise, kontraktil olduklarından, tespit edilmeden yerlerinden alınırlarsa kısırlar ve normaldeki görünüşlerini kaybederler (Şek. 8A). Hernekadar, yerlerinden çıkarılan kaslar, normal boylarınca gerilerek immerziyon yoluyla tespit edilebilirse de, bu tür tespit, perfüzyon tespiti (Şek. 8B) kadar iyi sonuç vermemektedir.

Çoğu araştırmacılar (11, 13, 28), perfüzyondan önce dolaşım sistemini fizyolojik bir solusyonla yıkayarak kanı dokulara atmayı uygun görürler. Bu durum, kan hücreleri iri olan canlılarda, örneğin kanatlılarda, daha da önem kazanmaktadır. Eğer kan, damarlardan dokulara atılmamışsa, tespit solusyonları ile pıhtılaşmakta ve bu pıhtı, tespit solusyonlarının dokulara ulaşmasını önlemektedir.

2. Gömme ile ilgili problemler

Gömme işleminde çok değişik maddeler kullanılmaktadır. Bu maddeler 3 grupta toplanmaktadır: 1. Epoxy reçineleri (Epon, Araldit, Maraglas, Durcupan, DER, ERL. v. s.), 2. Poliester reçineleri (Westopal, Rigolac, Selectron v. s.) ve 3. Acrylic reçineler (metacrylate türevleri). Bunların hemen hepsi ile iyi sonuçlar alınabilmektedir. Fakat bugün için en fazla kullanılan gömme maddeleri Epoxy reçineleri (Epon, Araldit, Maraglas) dir (10, 11, 13, 16, 17, 20, 26). Bunlar içinde en çok tercih edileni ise Epondur. Araldit ve Epon'un kesit zemininde ince bir granulariteye yol açtığı gerekçesi ile (13, 26) Maraglası tercih edenler de vardır. Kanımızca, gömme materyali seçi-

minde, yurdumuz koşullarında en çok önem verilecek husus, gömme materyalinin mümkün olduğu kadar dayanıklı olması ve kolay sağlanabilmesidir. Biz bu yönden araştırmalarımızda Araldit'i tercih etmekteyiz.

Gömme ve bloklamada en çok dikkat edilecek husus, gömme materyalinin sertlik derecesini, kullanılacak dokularinkine göre ayarlamaktır. Eğer gömme materyali dokudan daha yumuşaksa, kesitler ondüleli bir hal alırlar; hücrelerdeki yuvarlak şekilli unsurlar ovalleşirler. Eğer gömme materyali daha sertse, bu sefer de kesitlerde parçalanma olur.

Bozulmaya yüz tutan gömme materyali ile yapılan blokların sertlik derecesini ayarlamak zorlaşır ve böyle bloklardan güzel kesit alınamaz.

Gömme materyalleri, tespit edilmiş dokularda ekstraksiyona sebep olurlar (13, 16, 26). Bunun için dokuları bu maddelerde gereken den daha uzun tutmamalıdır. Emdirmeyi soğukta ya da sıcakta yapmanın da ekstraksiyon derecesi üzerine etkisi vardır (19). Eğer emdirme basamağında dokuları uzunca süre bekletmek zorunluğu varsa, bu işlemi buz dolabında yapmalıdır.

3. Boyama Problemleri

Kesitlerin kontrast kazanmasında başlıca etken ozmik asittir (13). Bu madde dokuları hem tespit eder, hem de dokuların boya maddelerine karşı affinitesini arttırır. Bundan ötürüdür ki, aldehyd tespitlerinden sonra ozmik asitle postfikzasyon zorunluğu vardır. Sadece aldehyd tespitli kesitler, ne kadar boyansalar yine de yeterince kontrast kazanamazlar.

En sık kullanılan kontrast maddeleri, uranyl asetat ve kurşun sitrattır (13, 16, 26). Bu maddeler çoğu unsurlara yeterince kontrast kazandırırılar. Ancak belli durumlarda, diğer bazı kontrast maddelerinden de yararlanılmaktadır. Örneğin bağdoku iplikleri fosfo-tungstik asitle daha iyi boyanmaktadır (13, 16).

Boyama, ya tespit sırasında, ya dehidrasyon sırasında veyahut da kesitler üzerinde yapılır (13). Tek bir boya maddesi ile her zaman yeterli kontrast alınamaz. Bunun içindir ki, buğn en çok uranyl asetat ve kurşun sitratla ikili boyama yolu seçilmektedir (13, 16, 26). Kesitler önce uranyl ile, peşinden de kurşunla boyanırlar. Biz araştırmalarımızda, uranyl ile boyamayı, dehidrasyon sırasında bloklara uygulamakta, kesitleri iç, sadece kurşun sitratla boyamaktayız. By-

lelikle boyama süresi kısaldığından, daha temiz kesitler sağlanabilmektedir. Ayrıca, bu aşamada kullanılan uranyl asetat, özellikle lipidleri stabilize etmek suretiyle, dehidrasyon ve gömme sırasındaki ekstraksiyonlarını azaltmaktadır (13, 29). Kesitlerin temizliğini sağlayabilmek için, kurşun sitratta da mümkün olduğu kadar kısa tutmalıdır. Süre uzadıkça, kurşun karbonat şekillenir ve kesitler kirlenir (Şek. 9A). Biz, dehidrasyon sırasında uranyl ile boyanmış ve Araldit'e gömülmüş bloklardan elde edilen kesitleri, sadece kurşun sitratla ve 60-75 saniye süre ile boyamakla iyi sonuçlar almaktayız (Şek. 9B).

Kesitlerin temizliğini etkileyen diğer bir faktör de, kesme ve boyama sırasında kullanılan sudur. Suyun mikroorganizmalardan arınmış olması lazımdır. Bunu sağlamak için özel filtrelerden ya da kalın süzgeç kâğıtlarından yararlanılabilir.

Yeterince kontrast elde edilebilmesi için, kullanılan boya solusyonlarının bayat olmaması gerekir. Böyle boyalar, kesitler ne kadar uzun boyanırsa boyansın, yeterince kontrast veremezler.

Kontrast probleminde gözönünde bulundurulacak diğer bir husus da, mikroskopun kendisi ile ilgilidir. Eğer kontrast diyaframı ışık yolu üzerine getirilmemiş ya da getirilmiş olmasına rağmen kirlenmiş veya bozulmuşsa, bu gibi durumlarda da, normal kontrastlı kesitler, boya almamış gibi görünürler.

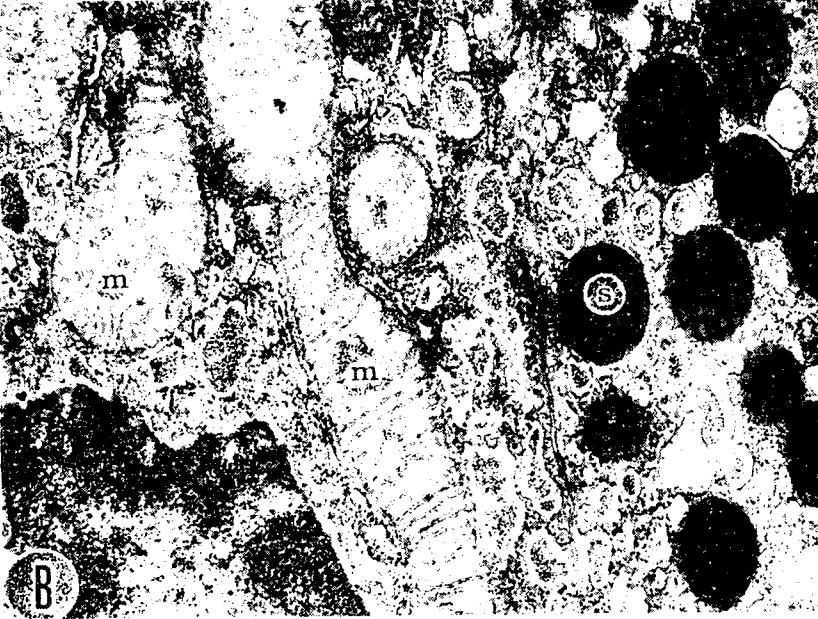
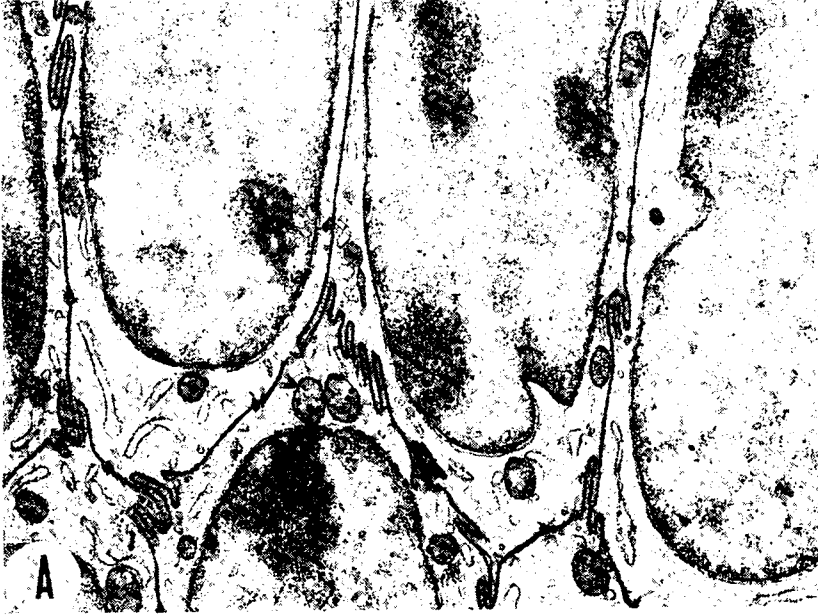
Yararlanılan Kaynaklar

- 1- **Afzelius, B. A.** (1963): *Experiments with simple fixatives*. J. Ultrastruct. Res. 9: 393.
- 2- **Amsterdam, A., Schramm, M.** (1966): *Rapid release of the zymogen granül protein by osmium tetroxide and its retention during fixation by glutaraldehyde*. J. Cell Biol. 29: 199.
- 3- **Anderson, P. J.** (1967): *Purification and quantitation of glutaraldehyde and its effect on several enzyme activities in skeletal muscle*. J. Histochem. Cytochem. 15: 652.
- 4- **Bahr, G. F.** (1955): *Continued studies about the fixation with osmium tetroxide*. Exp. Cell Res. 9.: 277.
- 5- **Bone, Q., Denton, E. J.** (1971): *The osmotic effects of electron microscope fixatives*. J. Cell Biol. 49: 571.
- 6- **Bone, Q., Ryan, K. P.** (1972): *Osmolarity of osmium tetroxide and glutaraldehyde fixatives*. Hist. J. 4: 331.

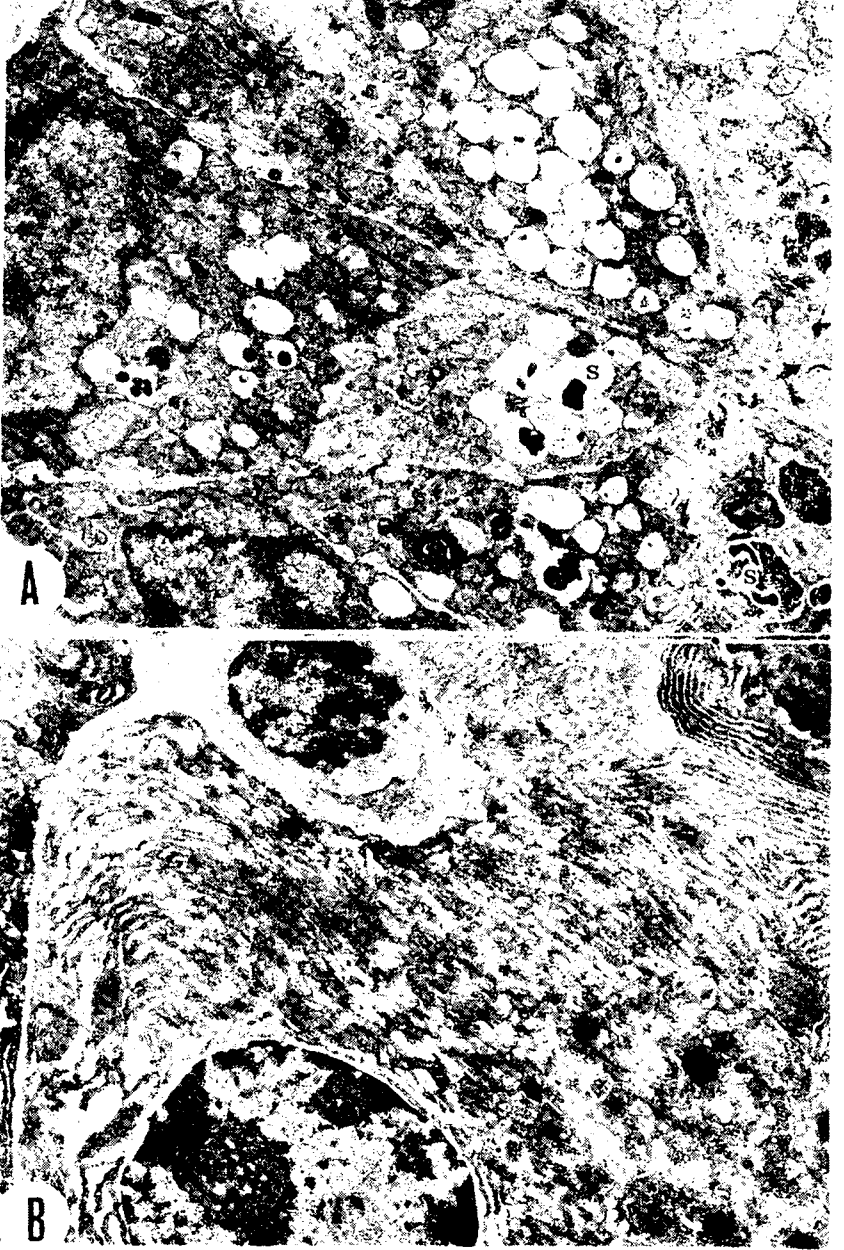
- 7- **Brederoo, P., Daems, W.T., van Duijn, P., van der Ploeg, M.** (1968): *Quantitative investigation on the effect of aldehyde fixations on acid phosphatase activity.* V. Europ. Reg. Conf. EM, Rome, p. 79.
- 8- **Claude, A.** (1962): *Fixation of nuclear structures by unbuffered solutions of osmium tetroxide in slightly acid distilled water.* Proc. 5 th. Int. Congr. Elect. Micr., Philadelphia 2, I-14.
- 9- **Fahimi, H. D., Drochmans, P.** (1968): *Purification of glutaraldehyde. Its significance for preservation of acid phosphatase activity.* J. Histochem. Cytochem. 16: 199.
- 10- **Finck, H.** (1960): *Epoxy resins in electron microscopy.* J. biophys. biochem. Cytol. 7: 27.
- 11- **Geyer, G.** (1973): *Ultrahistochemie.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- 12- **Gillet, R., Gull, K.** (1972): *Glutaraldehyde-its purity and stability.* Histochem. 30: 162.
- 13- **Glauert, A. M.** (1975): *Practical methods in electron microscopy. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens.* North-Holland / American Elsevier.
- 14- **Helander, H. F.** (1962): *Ultrastructure of fundus glands of the mouse gastric mucosa.* J. Ultrastruct. Res., Suppl. 4: 1-123.
- 15- **Karnovsky, M. J.** (1965): *A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy.* J. Cell Biol. 27: 147 A.
- 16- **Kay, D.** (1967): *Techniques for electron microscopy.* Blackwell Scientific Publications, Oxford-Edinburg.
- 17- **Kushida, H.** (1959): *On an epoxy resin embedding method for ultrathin sectioning.* J. Electr. Microsc. 8: 72.
- 18- **Kushida, H.** (1962): *A study of cellular swelling and shrinkage during fixation, dehydration and embedding in various standard media.* J. Electr. Microsc. 11: 135.
- 19- **Kushida, H.** (1965): *A new method for embedding with epoxy resin at room temperature.* J. Elect. Microsc. 14: 275.
- 20- **Luft, J. H.** (1961): *Improvements in epoxy resin embedding methods.* J. biophys. biochem. Cytol. 9: 409.
- 21- **Luft, J. H., Wood, R. L.** (1963): *The extraction of tissue protein during and after fixation with osmium tetroxide in various buffer systems.* J. Cell Biol. 19: 46 A.

- 22- **Milonig, G.** (1961): *Advantages of phosphate buffer for OsO₄ solution in fixation.* J. appl. Phys. 32: 1637.
- 23- **Palade, G. E.** (1952): *A study of fixation for electron microscopy.* J. exp. Med. 95: 285.
- 24- **Peracchia, C., Mittler, B. S.** (1972): *New glutaraldehyde fixation procedures.* J. Ultrastruct. Res. 39: 57.
- 25- **Porter, K. R., Kallman, F.** (1953): *The properties and effect of osmium tetroxide as a tissue fixative with special reference to its use for electron microscopy.* Exp. Cell Res. 4: 127.
- 26- **Reimer, L.** (1967): *Elektronenmikroskopische Untersuchungs-und Präparationsmethoden.* Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- 27- **Sabatini, D.D., Bensch, K., Barnett, R. J.** (1963): *Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular structure and enzymic activity by aldehyde fixation.* J. Cell Biol. 17: 19.
- 28- **Schultz, R. L., Case, N. M.** (1970): *A modified aldehyde perfusion technique for preventing certain artefacts in electron microscopy of central nervous system.* J. Microsc. 92: 69.
- 29- **Silva, M.T., Guerra, F.C., Magalhaes, M.M.** (1968): *The fixative action of uranyl acetate in electron microscopy.* Experientia 24: 1074.
- 30- **Wood, R. L., Luft, J. H.** (1965): *The influence of buffer systems on fixation with osmium tetroxide.* J. Ultrastruct. Res. 12: 22.

Yazı "Dergi Yazı Kurulu"na 4. 3. 1976 günü gelmiştir.



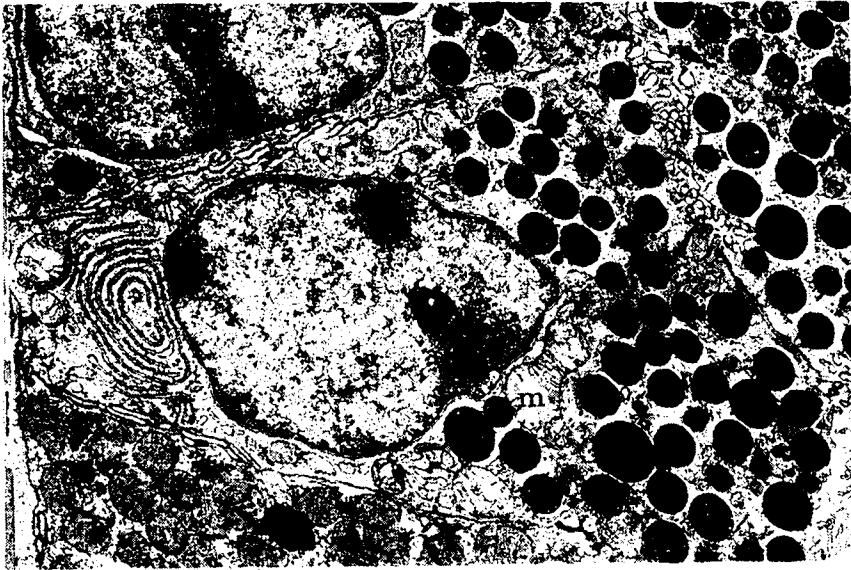
Şkil 1. Ozmik asit tespitinin ince yapı üzerindeki etkisi. A. Mide yüzey epitelinden (buzığı) tangential kesit. Sitoplazma ve karyoplazmada protein tabiatındaki unsurlar iyi korunmamış. Kromatin ve ribozomlar zayıflamış. Buna karşılık, hücre ve çekirdek membranları belirginleşmiş. X. 12600. B. Pankreasda bez epitel hücreleri (kobay). Mitochondriyumların matrisleri (m) erimiş, salgı granülleri (s) ise belirgin. X. 22800.



Şekil 2. Bayat glutaraldehidin etkileri. A. Pylorus bez epitel hücreleri (kuzu). Hayloplazmada ve salgı granüllerinde (s) myelin figürleri (iç içe yerleşmiş siyah lameller) şekillenmiş. X. 10800. B. Pancreas (kobay). Hücrelerin sitoplazmaları iyi korunamamış. Buna karşılık, çekirdek (hetero- ve ökromatin) ve çekirdekçik gayet iyi tespit edilmiş. X. 6820.



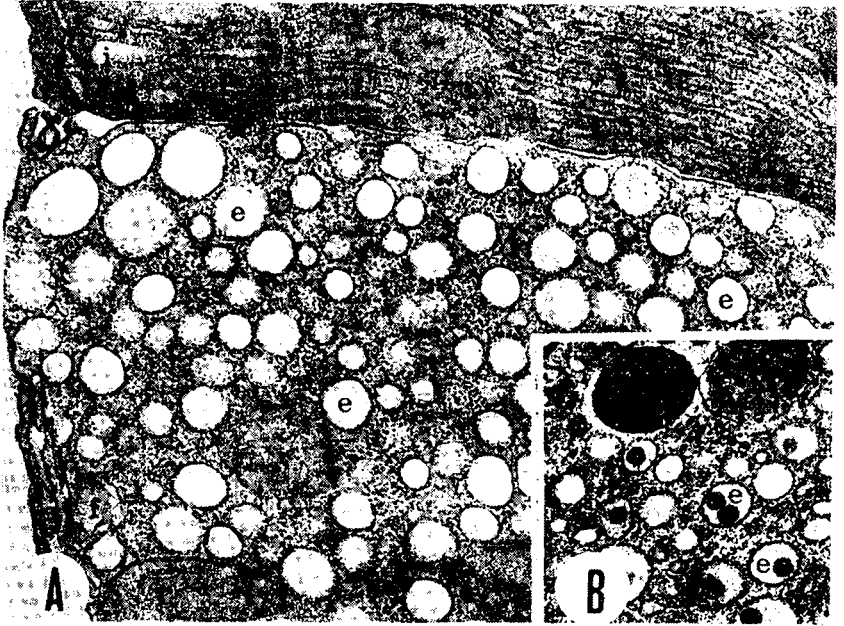
Şekil 3. Aktif karbonla süzölmüş bayat glutaraldehid'in etkisi. Sitoplazmik oluşumlar iyi tespit edilmiş fakat çekirdek materyalinde zayıflama olmuş. Pcreas, kobay. X. 11250.



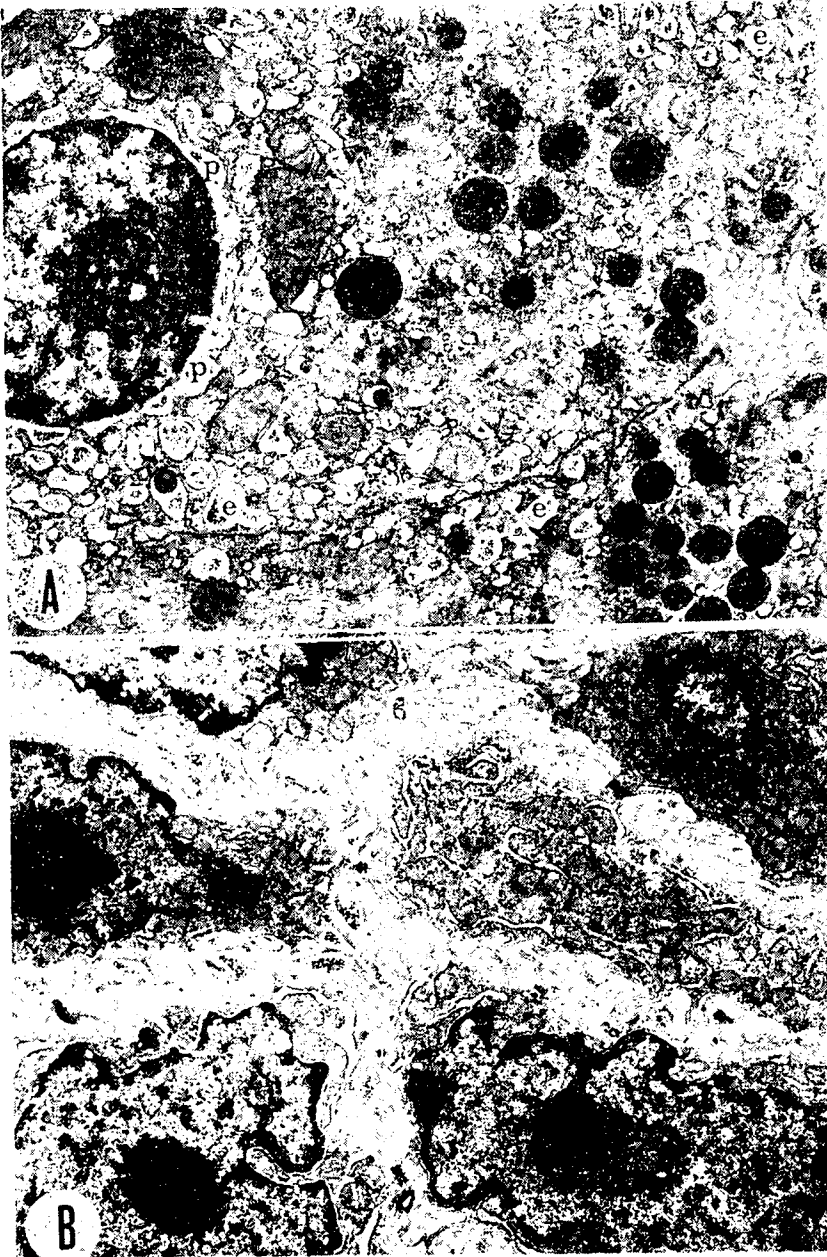
Şekil 4. Taze glutaraldehid'in etkisi. Sitoplazma ve çekirdek içeriği iyi korunmuş; sadece mitokondriyum matrisinde (m) bir miktar yıkım görölmekte. Fundus bez epitel hücresi, buzağı. X. 9200.



Şekil 5. Paraformaldehid-glutaraldehid kombine tespitinin etkisi. Çekirdek materyali ve sitoplazmik oluşumlar güzel tespit edilmiş. Pancreas, kobay. X. 10800.



Şekil 6. Aynı tür hücrelerin farklı fonksiyon periyotlarındaki görünüşleri. A. İstirahat (i) ve fonksiyon (f) evresinde olan iki pancreas epitel hücresi. İstirahatte yassılan endoplazmik kesecikler, fonksiyon sırasında şişip yuvarlaklaşırlar (c). X. 24000. B. Fonksiyon halindeki hücrede, endoplazmik keselerde (c) protein sentezi. Pancreas, kobay. X. 14250.



Şekil 7. Hypotonik ve hipertonic tespit solusyonlarının etkisi. A. Hypotonik solusyonla tespit. Perinuclear boşluk (p) ve endoplazmik keseciklerde (e) şişmeler görlmekte. Pancreas, kobay. X. 11250. B. Hypertonic solusyonla tespit. Hücreler büzülmüş ve birbirlerinden uzaklaşmış. Pylorus yüzey epiteli (cnine), buzağı. X. 11250.



Şekil 8. İmmerziyon (A) ve perfüzyon (B) tespitinin, kastelinin ince yapısına etkisi. İmmerziyon tespiti, bantlaşmanın düzensizleşmesine yol açmakta; H bandı ile, bu band içindeki M bandı kaybolmaktadır. A=X. 13500, B=X.27500.



Şekil 9. Kesit temizliğinin önemi. A. Boyama sırasında kurşun karbonat partikülleri ile kirlenmiş bir preparat. Böyle bir preparatın dar bir alanından bile temiz fotoğraf çekmek olanaksızdır. X. 10500. B. Kirlenmeden boyanmış bir preparat. Fotoğrafa geniş bir alan alınmış olmasına rağmen kir görülmemekte.X.3375.