

FAZ KONTRAST MİKROSKOBUNUN İDRARIN MİKROSKOBİK ANALİZİNDEKİ YERİ (Kolay ve Güvenli Bir Metod)

Alp Can*

Cengiz Güven**

Yıllardır, idrar sedimentinde bulunabilecek tüm organik ve inorganik oluşumları, aydınlık saha mikroskopunda incelemek, en çok kullanılan ve en kolay yol olarak kabul edilmiştir. Oysa, boyanmamış olan bu sıvılardaki canlı veya cansız tüm oluşumlar, buldukları ortamın (idrarin sıvı kısmı) ışığı kırma indisine çok yakın bir değere sahip oldukları için, bu yapılar ile buldukları ortamdan geçen ışınların dalga boyları arasındaki faz farkı çok azdır. Bu nedenle, söz konusu elemanlar, ortam içinde çok güç fark edilirler. Bunu gidermek amacıyla, çoğu zaman, gözlemciler, kondansör diyaframını kapatarak veya kondansörü bir miktar aşağı indirerek obje üzerine düşen ışığı azaltıp kontrastı artırmayı amaçlamışlardır. Ancak bu metod ile hyalin silindirler kısmen görülebilir hâle gelmişler ise de, diğer tür silindirleri ve hücreleri birbirinden ayırt etmek güç olmuştur (2).

Bunlara ek olarak, boyama teknikleri ise, hücreler arasındaki yeterli ayırımı yapmak amacıyla çeşitli şekillerde kullanılmaktadırlar. Bu amaçla Papanicolaou, Giemsa, Wright gibi nonspesifik boyaların yanında (4) Sterheimer (12) veya Prescott-Brodie'nin (7) geliştirdikleri özel boyalar da zaman zaman kullanılmışlardır. Bu boyaların çoğu idrar sedimentindeki hücresel yapıları boyamalarına karşın, anorganik yapıların (çeşitli kristaloid yapılar vs.) ayırt edilmesine olanak sağlayamamışlardır (2).

Yukarıdaki teknikler, görüntü oluşturmadaki dezavantajlarının yanında gözlem ve tanı süresinin uzamasına da neden olmaktadır. Aydınlık saha mikroskopisinde boyalı veya boyasız bir inceleme yapmak için bu konuda deneyimli bir gözlemcinin bile en az 10 dakika-

* A.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı Araştırma Görevlisi.

** A.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı Yardımcı Doçenti.

lık zamanını görüntüye oryantasyonu almaktadır. Daha az deneyimli gözlemciler ise belki bu iş için daha az zaman harcamakta fakat gördüklerinin teyid edilmesi için bu konuda daha deneyimli bir gözlemciye gerek duymaktadırlar. Bir doktorun veya laborantın gördüklerine güvenememesindeki başlıca neden, aydınlık saha mikroskobundaki optik sınırlamalardan kaynaklanmaktadır. Hücreler ve silindirler kesin olarak birbirinden ayırt edilemedikleri için, üriner sediment incelemesi, çoğu kez yeterince güven sağlayamamakta ve birçok merkezde sadece zaman kaybına neden olmakta ve daha ileri tanı yöntemlerine başvurulması gerekmektedir (2,11).

1955 yılında Zernike'nin (13) faz kontrast mikroskobunu (FKM) geliştirmesi ile birlikte boyanmamış ve canlı dokularda inceleme yapma imkanı ortaya çıkmış ve bu teknikten yararlanarak birçok doku örneği bu yolla, incelenmeye ve değerlendirilmeye başlanmıştır.

FKM'nun çalışması, farklı kırma indisine sahip iki yapı arasında oluşacak kontrastı artırması prensibine dayanır. Bunu da, farklı iki yapıdan kırılarak geçen ışınların dalga boyları arasında mevcut olan faz farkını iki katına çıkararak gerçekleştirir (10). Böylece, FKM ile, idrar sedimentinde bulunan tüm yapılar, idrar içinde farklı bir kontrastta rahatlıkla görülüp değerlendirilebilmekte ve daha kaliteli fotoğraflar çekilip bulgular belgelenebilmektedir.

Bizim bu çalışmamızdaki amacımız ise, optik sınırlamalardan kaynaklanan bu gözlem zorluğunu FKM tekniği kullanarak belli bir düzeye kadar gidermek ve sonuçların hem daha güvenilir hem de daha kolay ve hızlı yoldan değerlendirilebildiğini göstermektir.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada, normal idrarda bulunabilecek temel yapıları gözlemek amacıyla laboratuvarımız personelinden (mikroskobik olarak bir patoloji saptanmayan 3 erkek ve 1 kadın olmak üzere toplam 4 kişi) alınan idrar örnekleri 5 dakika 1500 devirde santrifüj edilmiş, daha sonra süpernatant dökülerek bir damla sediment lam üzerine alınmış ve lamel kapatılmıştır (2,3,4,11). Başka bir damla sediment ise

yeni bir lam üzerine yayılarak kurutulmuş ve Giemsa bile boyanmıştır (2). Bu boyanın uygulanmasındaki amaç, her üç teknik sonucu (boyasız aydınlık saha, boya aydınlık saha ve boyasız faz kontrast mikroskopisi) oluşan görüntüyü ve işlemler için geçen süreleri karşılaştırmaktır.

Gözlemler ve fotoğraflar Zeiss 62182 aydınlık saha ve faz kontrast araştırma mikroskopunda 100, 125, 160 ve 250 büyütmeselerde yapılmıştır.

SONUÇLAR

a) Silindirler

Özellikle hyalin silindirlerin matriksi Tamm-Horsfall mukoproteininden zengin olduğu için (6) ve bu maddenin de ışığı kırma indisi idrarın kırma indisine çok yakın olduğundan, hyalin silindirler aydınlık saha incelemelerinde şeffaf olmaları nedeniyle yeterince gözlenememiş, çoğu kez gözden kaçmıştır. Bunları aydınlık saha mikroskopunda görülebilir hâle getirmek için kontrastı artırmaya yönelik ayarlar sonucunda, bu kez diğer silindirler birbirinden ayırt edilememiştir. Çeşitli hücre içeren silindirler ise içerdikleri hücrelerin ayırt edilememesi nedeniyle yeterince değerlendirilememişlerdir (Resim 1).



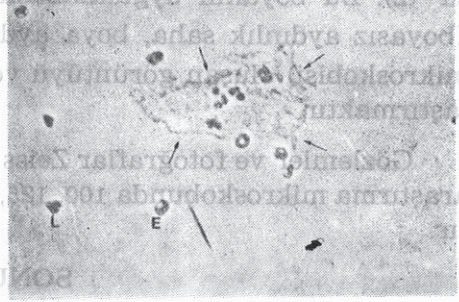
Resim 1 : Aydınlık saha mikroskopunda bir granüler silindir X 100.

FKM görüntülerinde ise, hyalin silindirler, buldukları ortama göre bir hayli farklı kontrast oluşturmuşlardır (Resim 3). Diğer si-

lindirlerin yapılarında bulunan hücelere göre ayırmaları da daha kolay olmuştur (Resim 2).



Resim 2 : Faz kontrast mikroskopunda aynı granüler silindir. Ok : Silindir içindeki hüresel yapıyı göstermekte x 100.

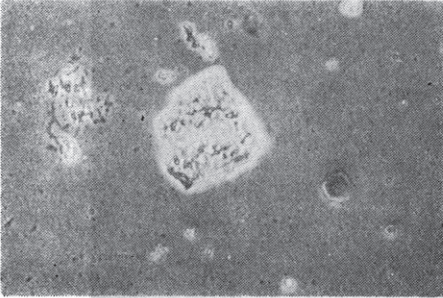


Resim 3 : Oklar : Faz kontrast mikroskopunda bir hyalin kümeyi göstermekte. E : Eritrosit, L : Lökosit. Aynı saha aydınlık saha mikroskopunda incelendiğinde bu küme ayırt edilememekte ve üzerindeki hücelere adeta idrarda serbestmişler gibi değerlendirilmektedir X 160.

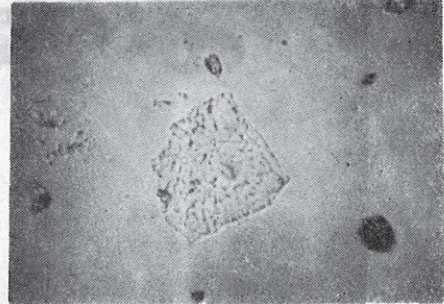
b) Hücreler

Aydınlık saha mikroskopisi çalışmalarında gözlemcinin deneyimiyle de orantılı olarak genellikle lökositlerle eritrositler ve küçük renal epiteliyal hücreleri, eritrositlerle mantarları birbirinden ayırt etmek güç olmuştur. Silindirlerin matriksi kimi zaman görülemediği için silindir üzerine lokalize olmuş olan hücreler veya diğer cisimler idrarda serbest olarak bulunuyorlarmış gibi değerlendirilmişlerdir.

FKM'da ise epiteliyal hücreler tüm detaylarıyla ayırt edilebilmektedirler (Resim 4,5). Çekirdek ve sitoplazmik yapıların net olarak görülebilmesi, bu hücrelerin tiplendirilmesine de yardımcı olmaktadır. Eritrosit ve lökositler de tipik morfolojileri ile hücrelerden ve ortamdan kolaylıkla ayırt edilebilmiştir.



Resim 4 : Faz kontrast mikroskopunda bir epiteliyal hücre. Hücre içi yapıların izlenebildiği dikkati çekiyor X 125.



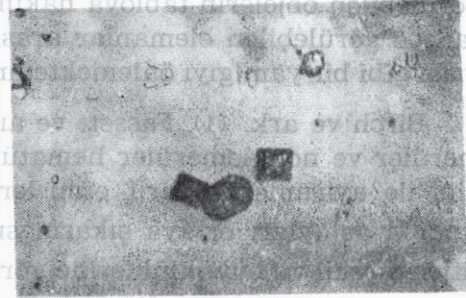
Resim 5 : Aynı hücrenin aydınlık saha mikroskopundaki görüntüsü. Tüm kontrast ayarları yapılmasına rağmen hücre içi yapılar izlenememektedir X 160.

c) Kristaller ve Diğer Oluşumlar

Kristallerin çoğu (triple fosfat, kalsiyum okzalat ve bazı ürik asit kristalleri) hücresel elemanlara oranla daha homojen ve daha yoğun madde içerdikleri için kontrast ayarı yapılmış aydınlık saha mikroskobuyla da yeterince gözlenebilmişlerdir (Resim 6,7).



Resim 6 : Faz kontrast mikroskopunda kristaloid yapılar X 250.



Resim 7 : Aydınlık saha mikroskopunda kristaloid yapılar. Yoğun ve homojen madde içerdikleri için burada da FKM'da olduğu gibi yeterince izlenebilmektedirler X 250.

Bunlardan başka, idrarda bulunması olası spermatozoon, mantar, bakteri, parazit gibi olağan dışı yapıların gözlenmesinde ve fotoğraflarının çekilmesinde FKM'dan son derece verimli bir şekilde yararlanılmıştır.

Boyalı idrar sedimentinin aydınlık saha gözlemleri sonucunda da özellikle hücresel yapıların ayrımları, aldıkları boyaların renk farklarına göre kolaylıkla sağlanabilmektedir. Buna karşın silindirik yapılar ve kristaloid yapılarda bir görüntü farkı sağlanamamış ve tüm bunlar yanında diğer analizlere oranla daha fazla zaman harcanmıştır (Tablo I).

Tablo I : İdrar sedimentinin mikroskopik analizleri için gerekli hazırlık süreleri. Tablodaki sürelere görüntünün bulunması ve kabaca tüm alanın taranması dahil edilmemiştir. Bu işlem, aydınlık saha boyasız gözlemlerde kontrastı artırmak amacıyla yapılan birtakım ayarlardan dolayı diğerlerine oranla uzun sürmektedir.

	Boyalı	Boyasız
Aydınlık Saha	75 dak.	10 dak.
Faz Kontrast	—	10 dak.

TARTIŞMA

Birçok otörün de belirttiği gibi kanımızca FKM transparan objelerin görüntüsünü hiçbir kayıp olmadan sağlaması nedeniyle idrar sedimentinin incelenmesinde kullanılabilecek ideal tekniktir. (2,3,4,11). Bu teknik yardımıyla, silindir ve hücrelerin kesin ayrımları, daha iyi görülebilen objelerin tabloya hakim olarak kabul edilmesi ve böylece sadece görülebilen elemanlar arasında bir sayım ve inceleme yapılması gibi bir yanılığın önlenmektedir.

Birch ve ark. (1), Fassett ve ark. (5) ve Rizzoni ve ark. (8,9) glomerüller ve nonglomerüller hematürinin faz kontrast mikroskopi tekniği ile ayrımlarını tarif etmişlerdir. Bu tekniğin, hücre morfolojisindeki detayları ortaya çıkarması gerçeğinden yola çıkarak eritrositlerin şekil ve büyüklüklerine göre kanamanın yerini % 95 kesinlikle gösterebildiklerini iddia etmişler ve bu iddialarını diğer tanı yöntemleriyle desteklemişlerdir.

de Vooght ve ark. (4) üriner sitoloji tanısında FKM ile aydınlık saha mikroskobisi bulgularını karşılaştırmışlardır. Bu çalışmalarında hücresel elemanlar göz önünde tutulduğu için (çekirdek/sitoplazma oranı, çekirdek polimorfizmi, kromatin içeriği gibi) ayrıntıları gözleyebilme özelliğinden yararlanarak, FKM, tercih edilen yöntem olmuştur. İki yıllık üriner sitoloji çalışmaları sonucunda FKM'nin klâsik boyama tekniklerine (Papanicolaou ve Giemsa) oranla daha güvenilir ve daha hızlı bir yöntem olduğu ortaya çıkmış, bunun sonucunda da FKM özellikle üriner neoplazmların tanısında önem kazanmıştır.

Biz bu çalışmamızda idrarda bulunabilecek temel elemanları her iki mikroskop tekniğini kullanarak karşılaştırmaya çalıştık. Deneyimiz kapsamına patolojik idrarlar (renal parankimal hasar vs.) dahil edilmemiştir. Bu tip idrarların incelemelerinde de görüntü kalitesinde, aydınlık saha çalışmalarına kıyasla artış olacağı kuşkusuzdur.

Kanımızca, sık sık idrar sedimenti analizi yapılan aydınlık saha mikroskopları, fazla zaman ve para kaybına neden olmadan bazı bölümleri değiştirilerek kolaylıkla faz kontrast mikroskobuna dönüştürülebilir ve böylece gerek rutin tanı laboratuvarlarında gerekse doktor muayenehanelerinde kullanılabilir.

ÖZET

Yeterli kontrastın sağlanamaması nedeniyle incelenmesi güç olan idrar sedimentinin daha kolay ve güvenilir olarak incelenebilmesi amacıyla faz kontrast mikroskopisi kullanılmış ve sonuçlar aydınlık saha mikroskopisiyle karşılaştırılmıştır. Sonuçta gerek hüresel yapıların gerekse silindirik yapıların faz kontrast mikroskopu ile daha güvenilir olarak ve kısa zamanda tanımlandığı gözlenmiştir.

SUMMARY

Use Of Phase Contrast Microscopy in Microscopic Urinalysis (A Simple And Reliable Method)

For not having the sufficient contrast of the sedimental elements of microscopic urinalysis, the phase contrast microscopy was used and the results were compared with the bright field microscopy. It was observed that, either cellular structures or casts were identified properly and quickly with the use of phase contrast microscopy.

KAYNAKLAR

1. Birch DF, Fairley GF : Hematuria : Glomerular or nonglomerular? Lancet 2 : 845, 1979.
2. Brody L, Webster MC, Kark RM : Identification of elements of urinary sediment with phase-contrast microscopy. JAMA 206 (8) : 1777, 1968.
3. De Voogt HJ : Rapid urinary cytology by phase contrast microscopy. A preliminary report. Urol Res 1 : 113, 1973.
4. De Voogt HJ, Beyer-Boon ME, Brussee JM : The value of phase contrast microscopy for urinary cytology, reliability and pitfalls. Acta cytologica 19 (6) : 542, 1975.
5. Fassett RG, Horgan BA, Mathew TH : Detection of glomerular bleeding by phase-contrast microscopy. Lancet 1 : 1432, 1982.
6. Mc Queen EG, Sidney MB : Composition of urinary casts. Lancet 1 : 397, 1966.
7. Prescott LF, Brodie DE : A simple differential stain for urinary sediment. Lancet 2 : 940, 1964.
8. Rizzoni G, Braggion F, Zacchello G : Differentiation of glomerular hematuria

from nonglomerular hematuria by phase-contrast microscopy in children (abst).
Int J Pediatr Nephrol 3 : 141, 1982.

9. Rizzoni G, Braggion F, Zacchejo G : Evaluation of glomerular and nonglomerular hematuria by phase-contrast microscopy. J Pediatrics 103 : 370, 1983.
10. Ross KFA : Phase contrast and interference microscopy for cell biologists. New York : St. Martin's Press, Inc. 1967. pp : 27-80.
11. Russo MA, Cockett ATK : Microscopic urinalysis with phase contrast microscopy. J Urol 107 : 843, 1972
12. Sternheimer R, Malbin B : The clinical recognition of pyelonephritis with a new stain for urinary sediments. Amer J Med 11 : 312, 1951.
13. Zernike F : How I discovered phase contrast. Science 121 : 345, 1955.

KAYNAKLAR

1. Dijk DE, Fairly GP : Hematuria : Glomerular or nonglomerular? Lancet 2 : 844, 1978.
2. Brock J, Webster MC, Kirk RM : Identification of elements of urinary sediment with phase-contrast microscopy. JAMA 208 (6) : 1775, 1968.
3. De Voort JM : Rapid urinary cytology by phase contrast microscopy. A preliminary report. Urol Res 1 : 10, 1973.
4. De Voort JM, Bovenbrun ME, Broeze JM : The value of phase contrast microscopy for urinary cytology, including and pitfalls. Acta cytologica 10 (4) : 512, 1975.
5. Frensch HC, Horgan EA, Andrew JM : Detection of glomerular bleeding by phase-contrast microscopy. Lancet 1 : 1432, 1982.
6. McQueen FG, Sidney MH : Composition of urinary casts. Lancet 1 : 307, 1968.
7. Prescott LL, Brodie DE : A simple differential stain for urinary sediment. Lancet 2 : 910, 1967.
8. Rizzoni G, Braggion F, Zacchejo G : Differentiation of glomerular hematuria