

HİSTOLOJİ TEKNİĞİ

Doç. Dr. Şerife TÜTÜNCÜ

Işık Mikroskopide Kullanılan Histoloji Tekniği

- H¼cre ve h¼crelerin oluşturduğu dokuların yapısal özelliklerinin mikroskop altında incelenebilir hale getirilmesini sağlayan preparat hazırlama yöntemlerine *Histoloji Tekniği* adı verilir.
- Bu tekniğin esası ışığı ge¼iremeyecek kadar kalın olan dokulardan ışığı ge¼irebilecek incelikte kesitler almak ve canlıda renksiz olan doku unsurlarını boyayarak mikroskop altında gör¼lebilir hale getirmektir.

- Histoloji tekniği uygulanan dokular genel olarak cansız incelenir,
- Bazı dokuları ise vital boyalar aracılığı ile canlı olarak incelemek mümkündür.
- Canlı incelenebilecek dokular;
 - * kurbağa yavrusunun kuyruğu, Hamster'in yanak kesesi, kan, lenf sıvısı ve spermatozoondur.

Vital boyalar kimyasal karakterine göre ikiye ayrılır:

- * **Asidik vital boyalar:** Çini mürekkebi, tripan mavisi, lityum karmin
- * **Bazik vital boyalar:** Methylen blue, Toluidin blue, Cresyl viole, Neutral Red

Histoloji Tekniğinde Kullanılan Temel Aşamalar

- Materyalin alınması
- Tespit ve yıkama
- Suyunu giderme (Dehidrasyon)
- Parlatma veya saydamlaştırma
- Emdirme
- Gömme veya bloklama (Blokaj)
- Kesme (Kesit alma) ve lama yapıştırma
- Boyama
- Kapatma

- **Materyalin alınması:** Canlıdan biyopsi ile ya da anestezi altında incelenecek olan dokudan örnekler alınır. Alınan örnekler dokuya göre değişmekle birlikte 1 cm ebatlarında olmalıdır.
- **Tespit (fiksasyon):** Hücre ve hücrelerarası matriksi canlılığın sona erdiği andaki yapısal özellikleri ile korumak için yapılan işlemdir. Diğer bir deyişle mumyalamak veya konserve yapmaktır. Canlıdan uzaklaşan ya da bütünlüğü bozulan dokular özel ortamlara alınmadıkları sürece lizozomal enzimler ve bakteriler tarafından yıkımlanır (otoliz).

Tespit Türleri

- Cansız (ölü) incelemede birinci basamak **tespit (fiksasyon) dir.**

- Tespit ile postmortem değişiklikler, otoliz önlenir. Proteinler, bileşikler ve makromoleküller halinde çöktürülür.

I- Fiziksel tespit: Isı, kurutma ve dondurma yoluyla sağlanan tespittir.

- Özellikle enzim ve lipit çalışmalarında bu yöntemlerden yararlanır.

II-Kimyasal Tespit:

- Tespit ajanı olarak bilinen **kimyasal maddelerle** ya da kimyasal maddelerin bir araya gelmesi ile yapılır.
 - * Daldırma (İmmersiyon) tekniği ve
 - * Perfüzyon tekniği şeklinde uygulanan (Total, parsiyal) kimyasal tespit en fazla kullanılan yöntemdir.

Perfüzyon tespiti: Histolojik incelemeler için en iyi tespit yöntemidir.

■ **Total perfüzyon;** küçük hayvanlarda yapılır amaç, postmortem değişiklikler başlamadan tespit sıvısının narkozdaki hayvanın kalbinin sol ventrikulusuna verilerek uygun basınç ile bütün organ, doku ve hücrelere gitmesini sağlamaktır.

■ **Parsiyal perfüzyon;** büyük hayvanlarda yapılır. Sadece organ tespittir. Organa gelen damardan verilen tespit sıvısının organı dolaşıp, organdan çıkması hedeflenir.

- **Daldırma tespiti:** Organ parçalarına uygulanan yöntemdir. Narkoz halindeki bir canlıdan uygun operasyon yöntemlerine göre alınan organ parçasının, tespit solüsyonuna konmasıdır.
- Yöntemin başarılı olması için organ parçalarının 1x1 cm den büyük olmaması gereklidir.

- Tespit işleminde dokulara sabitleyici ya da proteinler ile çapraz bağlar oluşturucu kimyasallar uygulayarak dokunun canlılıktaki gibi kalması sağlanır.
- Tespit amacı ile kullanılan kimyasal maddelere **fikzatif** denir.
- Tespit amacı ile kullanılan kimyasal maddeler tek olarak kullanılabilir ancak hiçbiri tek başına tüm amaçları karşılayamaz, bu nedenle değişik oranlarda kimyasal maddeler kullanılarak hazırlanan solusyonlar tercih edilir.



Tespit Amacı ile Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Formaldehid,
- Glasiyal asetik asit,
- Etil alkol,
- Merkürü klorür,
- Pikrik asit,
- Potasyum dikromat,
- Aseton,
- Osmiyum tetraoksit,
- Potasyum permanganat,
- Glutaraldehid

Tespit Amacı ile Kullanılan Solusyonlar

- Formol salin,
- Tamponlu nötr formalin,
- Formol alkol,
- Formalin sodyum asetat,
- Formalin amonyum bromide,
- Formol kalsiyum,
- Zenker,
- Helly,
- Bouin,
- Carnoy,
- Susa,
- Orth,
- Newcomer's gibi.

%10 Formol Salin Solusyonu

- %37-40'lık Formalin.....100ml
- Sodyum Klorid.....9.0g
- Çeşme suyu.....900ml

Tamponlu Nötral Formalin Solusyonu

- %37-40'lık Formalin100ml
- Distile Su.....900ml
- Sodyum fosfat monobasik.....4.0g
- Sodyum fosfat dibasik(anhidr).....6.5g

Rutin kullanım için önerilen en kapsamlı tespit solusyonudur.

Formol kalsiyum solusyonu

- Kalsiyum klorid(anhidr)10g
- %37-40'lık Formalin.....100ml
- Distile su.....900ml

Özellikle lipidler ile çalışıldığı zaman iyi sonuç veren bir tespittir.

Bouin Solusyonu

- Suda doymuş pikrik asit solusyonu.....750ml
- %37-40 formol.....250ml
- Asetik asit.....50ml
(kullanılacağı zaman ilave edilir)

Kimyasal tespit aşamasında üzerinde durulması gereken faktörler

- Tespit sıvısının amaca göre seçimi,
- Tespit sıvısının miktarı,
- Tespit sıvısının PH'sı,
- Tespit süresi,
- Doku parçasının büyüklüğü,
- Ortam ısısı,
- Tespit sıvısının difüzyon gücü,

Tespitten sonra su ya da değişen derecelerde alkol ile yıkama yapılarak tespitte ait kalıntıların uzaklaştırılması sağlanır

Suyunu giderme (dehidrasyon):

- Dokuların büyük bir bölümünü su oluşturduğu için %50'den başlayarak %100'e kadar dereceli etil alkoller ile dokunun suyu alınır.
- Etil alkolün dereceli olarak kullanılmasının nedeni dokuları büzücü etkisinden dolayıdır.
- Dehidrasyon için tetrahidrofuran, aseton, dioksane ve isopropil alkolde kullanılabilir.

Parlatma veya saydamlaştırma :

- Dokuları transparan hale getirmek için yapılan işlemdir.
- Aynı zamanda dokudaki alkol giderilir ve emdirmede kullanılan maddeye uyum sağlanması sağlanır.
- Bu amaçla kullanılan maddeler uçucu, yanıcı ve toksiktir.
- Bu amaç için en yaygın kullanılan madde xylol olmakla birlikte benzen, toluen, chloroform, methylbenzoat, sedir yağı da kullanılabilir.



Emdirme:

- Parlamiř ve saydam duruma gelmiş doku parçalarına gömme materyali olarak kullanacağımız parafin veya plastik maddenin emdirilmesidir.
- Ticari olarak satılan parafinlerden 40 °C de eriyen yumuřak, 58- 60°C'de eriyen ise sert parafindir.
- Parafinin dokulara kolay ve derinlemesine iřlemesini sađlamak için vakumlu etüv ortamı tercih edilmelidir.

Gömme veya bloklama (Blokaj):

- Dokunun erimiş parafin ya da plastik madde içine yerleştirilmesidir.
- Her laboratuvar kullandığı mikrotom (kesit alma aleti) ve koşullarına göre teknikler geliştirmiştir.
- Gömülen dokunun çevresinde 3-4 mm'lik parafin ya da plastik madde bulunur.

Kesme (Kesit alma) ve lama yapıştırma:

- Çevresinde gömme materyali ile birlikte bulunan dokudan çelik bıçaklar ya da disposable bıçaklar aracılığı ile 5 - 7µ kalınlığında kesitler alınır.
- Kesitler önce oda sıcaklığında distile suda yüzdürülerek kırıışıklıklar açılır,
- Daha sonra 40-45 °C' de %0,1 oranında jelatin içeren distile suda yüzdürülerek açılmayan diğer kırıışıklıklarda açılarak kesitler lama çekilir.

- Lamlar yatay pozisyonda 37 °C'lik etüvde kurumaya bırakılır.
- Kesitlerin istenen kalitede olması öncelikle deneyime, kullanılan gömme materyaline, mikrotom ve mikrotom bıçaklarına bağlıdır.



MİKROTOMUN PARÇALARI



ÇEVİRME KOLU

MUMA GÖMÜLÜ
ÖRNEĞİN
YERLEŞTİRİLDİĞİ,
AŞAĞI YUKARI
HAREKET EDEN
BÖLME

FENA HALDE
KESKİN JİLET

ELEKTRONİK
KONTROL
KUMANDASI







Boyama ve kapatma

- Dokuları oluşturan hücreler canlıda renksizdir.
- Işık mikroskobu altında inceleyebilmek için boyanması gereklidir.
- Rutin histolojik amaçlı kullanılan boyalar asidik ve bazik bileşikler gibi davranırlar, dokuların iyonize olabilen bölümleri ile bağlanırlar.
- Bazik boyalar ile bağlanan bölümleri bazofilik, asit boyalar ile bağlanan bölümleri asidofilik olarak tanımlanır.
(Toluidin mavisi, metilen mavisi bazik, Orange G, Eosin, Asit Fuksin asidik boyalardır.)

■ Yaygın olarak kullanılan Haematoksilen & Eosin tekniğinde;

* **Haematoksilen** asidik boyalar gibi davranır hücre çekirdeğini ve sitoplazmanın RNA'dan zengin kısımlarını **maviye** boyar,

* **Eosin** ise sitoplazmayı **kırmızıya**, kollagen iplikleri pembeye boyar.

■ Masson'un Trichrome'u, Orcein'in elastik iplik boyası, Gümüş, PAS, Wright ve Giemsa gibi boyalar da rutin histolojik incelemelerde kullanılabilir.

- Kuruyan ve lama iyice yapışmış olan kesitler tek tek veya özel kaplarda çok sayıda boyamaya alınır.
- Kesitler öncelikle gömme materyalinden kurtulması için xylollerden, xylolden kurtulması için de absolu alkol ve dereceli alkollerden geçirilir.
- Boyama yapılır, tekrar dereceli alkollerden geçirilerek sudan arındırılır, xylollerden geçirilerek parlatılır ve boyanın kalıcı olabilmesi için xylol ile uyum sağlayabilen bir kapatıcı madde ve lamel ile kapatılır.



- Kesitlerin düzgün bir yüzeyde kurumaması sağlanır.
- Bundan sonra preparatlar ışık mikroskop altında incelenmeye hazırdır.
- Işık mikroskopide rutin histolojik boyama dışında histokimya, immunhistokimya gibi metodları kullanmak istediğimiz zaman tespit ve onu takiben kullandığımız süreçlerde bazı farklılıklar gerekir.
- Bunun nedeni tespit ve takiben kullandığımız süreç sırasında dokulardaki bazı madde ve enzimlerin inaktive olmasıdır.

- Bu nedenle öncelikle **dondurma tespiti** tercih edilir (-150 -170 °C'de süratle dondurma örneğin sıvı azot gibi), tespiti takiben dondurma mikrotomunda kesitler alınır,
- Distile suya alınan **kesitler amacımız için özel boyalar** ile boyanarak doğrudan uygun bir kapatıcı madde ve lamel ile kapatılır.
- Örneğin dokulardaki yağları boyamak ya da, dokulardaki bazı enzimleri ATPase, alkalın fosfataz ve asit fosfataz gibi incelemek istediğimiz zaman bu yöntemler tercih edilir.



Kryostat (Dondurma Mikrotomu)

Bazı Boyaların Kimyasal Yapıları ve Dokudaki Reaksiyon Renkleri

Boya maddesi	Kimyasal Yapısı	Reaksiyon Rengi
Asit Fuksin	Asidik	Kırmızı
Anilin Blue	Asidik	Mavi
Eosin	Asidik	Kırmızı
Orange G	Asidik	Portakal
Metil Yeşili	Bazik	Yeşil
Metilen Mavisi	Bazik	Mavi
Pironin	Bazik	Kırmızı
Toluidin Mavisi	Bazik	Mavi

- Bazı bazik boyalar reaksiyona girdikleri doku komponentlerini normal renklerinden farklı maviye kırmızı ve mora değişen tonlarda boyarlar.
- Bu absorpsiyon değişikliğine **Metakromazi** denir.
- Metakromazi ionize sülfat ve fosfat gruplarının yüksek konsantrasyonlarına sahip hücre ve dokularda görülür örneğin; kıkırdak, mast ve plazma hücreleri gibi.



TEŞEKKÜRLER