

HİSTOLOJİK YÖNTEMLER-1

DR. ÖĞR. ÜYESİ FERDA TOPAL ÇELİKKAN

08.10.2021

HİSTOLOJİ

Histos; doku, logos; bilimi= **Doku bilimi**

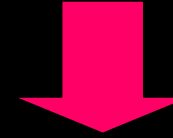
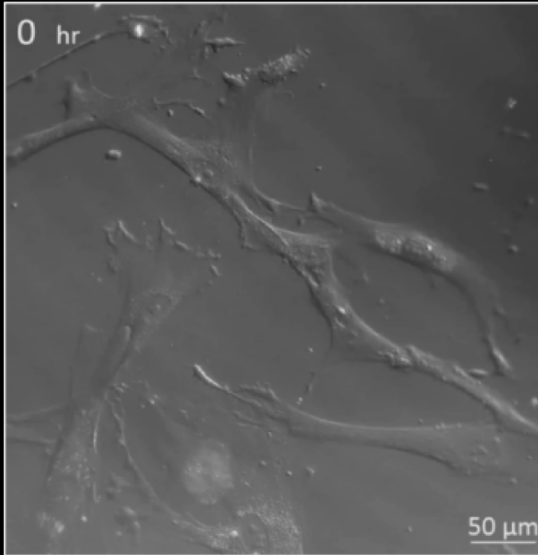
Hücre, doku ve organların mikroskobik yapısını inceleyen bilim dalı olarak da ifade edilir.

Histolojik Teknik

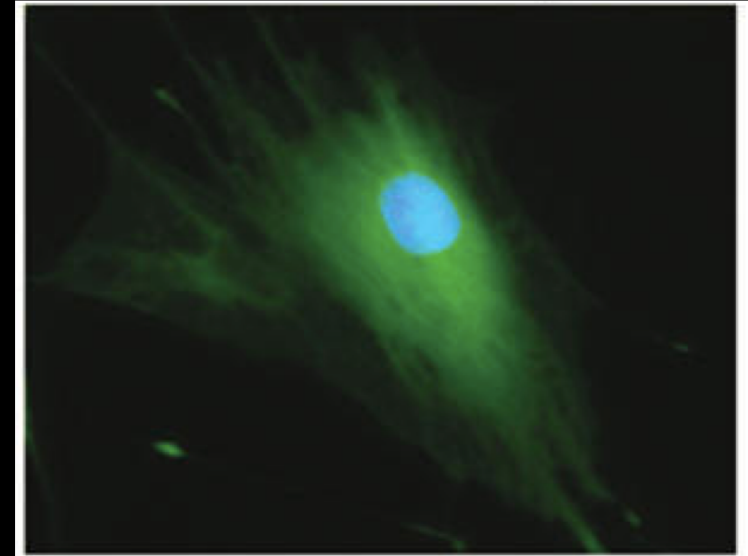
- ✓ Canlılardan alınan doku ve organ parçalarının yapısal özelliklerinin mikroskop altında incelenebilir hale getirilmesini sağlayan preparat hazırlama yöntemlerine *histoloji tekniği* adı verilir.
- ✓ Hücre ve dokuları iki şekilde incelemek mümkündür.



CANLI



CANSIZ



Canlı İnceleme

- ✓ Sıvı ortamda birbirinden ayrı duran hücreler (kan, lenf, sperm, beyin omurilik sıvısı, sinoviyal sıvı vb.)
- ✓ Dokular özel işlemlerle hücrelere ayrılarak izole hale getirilip hücreler incelemeye alınabilir
- ✓ Küçük memelilerin seröz zarları, ör: mezenter gibi ince zarlar

Canlı İnceleme

- ✓ Faz kontrast mikroskobu
- ✓ Hoffman Modülasyon Kontrast Mikroskobu
- ✓ Diferansiyel interferans mikroskop
- ✓ Vital boyalar (az toksik) Ör: Çini mürekkebi, tripan mavisi

Cansız İnceleme

Tespit edilmiş ve boyanmış
hücreler/ince doku kesitleri
üzerinde yapılır

Doku kesitleri/Hücreleri

Mikroskopik İnceleme Yöntemleri

- ✓ Rutin preparat hazırlanması
- ✓ Özel tekniklerin uygulanması
- ✓ Mikroskopik incelemeler

Preparatların Hazırlanmasında Temel Aşamalar

- ✓ Örnek alınması
- ✓ Tespit (fixation)
- ✓ Yıkama (washing)
- ✓ Suyunu giderme (dehydration)
- ✓ Saydamlaştırma (clearing)
- ✓ İnfiltrasyon (infiltration)
- ✓ Gömme (embedding)
- ✓ Kesme (cutting)
- ✓ Boyama (staining)
- ✓ Kapatma (mounting)

Tespit

Hücreleri ve hücrelerarası materyali yaşamın durduğu andaki **yapısal ve kimyasal durumunda** sabitleştirmek ve **otolitik değişiklikleri önlemek** amacıyla yapılan işlemlerdir.

Rutin preparat hazırlanması

Tespitin Amacı

- ✓ Dokuyu korumak,
- ✓ Zar yapısını sabitleştirip otolizi önlemek,
- ✓ Lipoproteinler, glikoproteinler, nükleoproteinler, karbonhidratlar, lipitler vb. maddeleri sabitleştirmek
- ✓ Proteinlerde koagülasyon ve çökme,
- ✓ Dokuda sertleşme ve kesilebilirlik,
- ✓ Boyanmanın kolaylaştırılması.

Tespit Yöntemleri

Kimyasal

Fiziksel

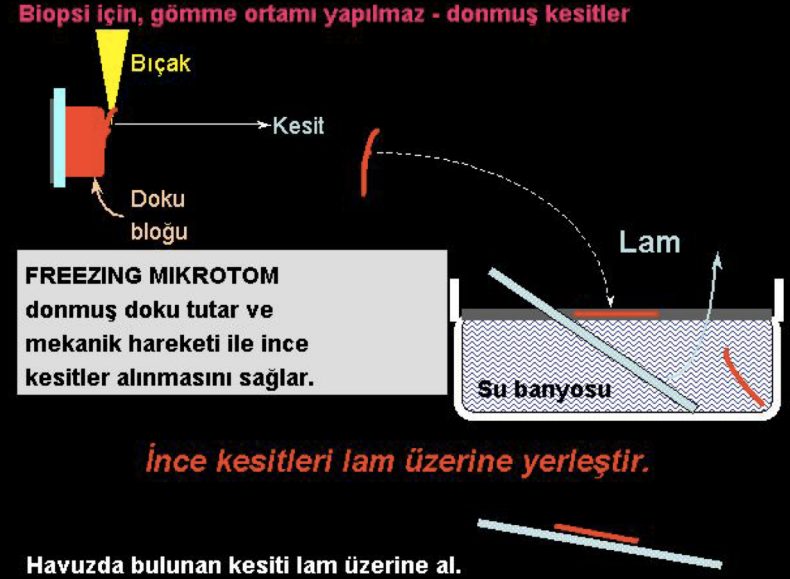
- ✓ Isı
- ✓ Dondurma
- ✓ Kurutma

Isı

- ✓ Proteinler koagüle olur, yağlar erir
- ✓ Büyük parçaların tespitinde kullanılır
- ✓ Mikrodalgayla reaksiyon hızlandırılır; ışıma ile osilasyon (salınım) meydana gelir ve **kinetik enerjinin ısıya dönüşümü sonucunda** ani sıcaklık artışı dokularda koagülatif bir fiksasyon oluşmasını sağlar.

Dondurma (Freezing)

- ✓ Doku kalınlığı 2mm. 'den küçük olmalıdır
- ✓ Buz kristali oluşması kriyoprotektanlarla azaltılır. Ör: gliserol, dimetilsülfoksit, sükroz
- ✓ Sıvı azot (-196 °C), solid karbon dioksit (kuru buz) (-75 °C)



Tespiti Etkileyen Faktörler

- ✓ Tespit sıvısının **amaca göre seçimi**,
- ✓ Tespit sıvısının **miktarı** (en az 20 kat),
- ✓ Tespit sıvısının **pH'sı** (uygun hidrojen iyonu konsantrasyonu),
- ✓ Tespit sıvısının **osmolaritesi**,
- ✓ Tespit **süresi**, **dokunun büyüklüğü**, **ortamın ısısı**, **difüzyon gücü**.

Tespit Teknikleri

- İmmersiyon (daldırma)
 - Perfüzyon

Tespit sıvıları

- ✓ Formaldehit; Proteinlerle **hidroksimetil köprüleri** oluşturur
- ✓ Gluteraldehit
- ✓ Aseton
- ✓ Osmiyum tetroksit
- ✓ Etil Alkol
- ✓ Bouin, Zenker vb.

Yıkama

- ✓ Tespitte kullanılan kimyasalların tortu ve çökeltilerini uzaklaştırmak için yapılır. Tespit türüne göre:
 - ✓ Su
 - ✓ %70-80 Alkol

Suyunu Giderme

- ✓ Dokudaki suyun uzaklaştırılmasını amaçlar.
Düşük dereceden başlayarak yükselen konsantrasyonlarda **etil alkol** kullanılır

% 50>60>70>80>96>100

Saydamlaştırma

- ✓ Dokudaki alkolü çıkarıp gömme materyaliyle yer değiştirebilen bir maddenin dokuya sokulması amaçlanır.
- ✓ Bu maddeler aynı zamanda ışık geçirgenliğini de arttırarak dokuyu şeffaflştırır.
 - ✓ ksilol
 - ✓ kloroform
 - ✓ butanol
 - ✓ metil benzoat
 - ✓ amil asetat
 - ✓ karbon tetraklorür

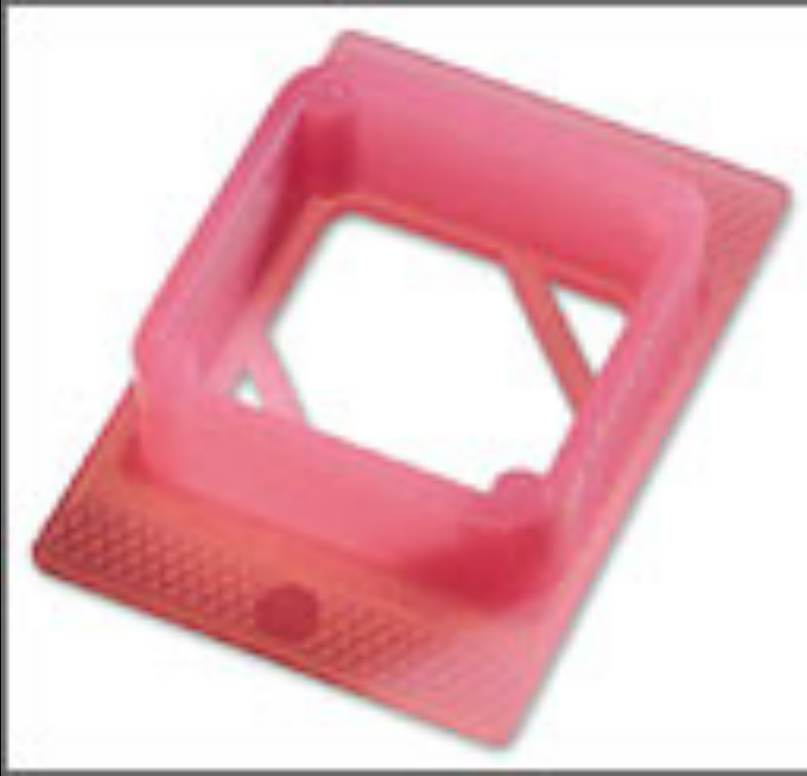
Emdirme



Alkollü giderilmiş doku parçaları gömme materyaline alınır

- ✓ parafin
- ✓ jelatin, agar
- ✓ epon
- ✓ epoksi resin
- ✓ selloidin, plastik maddeler

Gömmе-bloklama



Emdirme materyalini
içine almış parçalar
aynı materyal
içinde uygun
pozisyonda özel
kalıplara gömülür

Kesme

Mikrotom

```
graph TD; Mikrotom --> Sliding; Mikrotom --> Rotary;
```

Sliding

Bıçak hareket eder

Rotary

Blok hareket eder
(büyük bloklarda)

6-20 μm kalınlığında kesitler alınır

Rotary Mikrotom Ve Su Banyosu



Rutin preparat hazırlanması

Kuruduktan sonra parafini uzaklaştır ve kesiti boyayın

Parafini çözü



Hematoxylin ile boyayın - mavi



yıkayın

Eosin ile boyayın - kırmızı



yıkayın

Nukleus - mavi

Sitoplazma -
kırmızı



Rutin preparat hazırlanması



Rutin preparat hazırlanması



Rutin preparat hazırlanması



Rutin preparat hazırlanması

Sert Dokuların Takibi

Dekalsifikasyon

- ✓ Dokuya sertliğini veren kalsiyum tuzlarının dokudan uzaklaştırılmasıdır.
- ✓ Sonuçta sert dokular yumuşayarak histolojik inceleme amacıyla kesilebilir hale gelir.
- ✓ Bu yöntemle dokunun inorganik kısmı uzaklaştırılır, organik kısmı gözlenir.

Dekalsifikasyon Yöntemleri

- ✓ Asitlerle dekalsifikasyon
- ✓ Şelasyon yapan ajanlarla dekalsifikasyon

İyi Bir Dekalsifikasyon Solüsyonunda Aranılan Özellikler

- ✓ Dokudan kalsiyum tuzlarını tamamen uzaklaştırmalıdır.
- ✓ Doku üzerine olumsuz etkileri olmamalıdır.
- ✓ Boyama üzerine olumsuz etkileri olmamalıdır.

Dekalsifikasyon İşleminin Takipteki Yeri

1. Fiksasyon (Tesbit)
2. Yıkama
3. Dekalsifikasyon
4. Yıkama
5. Dehidratasyon (Dokunun Suyunu Alma)
6. Şeffaflandırma
7. Emdirme
8. Gömme
9. Kesit Alma
10. Boyama

Dekalsifikasyon İşlemi

- ✓ Dekalsifikasyon solüsyonu seçilir
- ✓ Dekalsifiye edilecek doku önce tesbit edilir, yıkanır
- ✓ Cam, kapaklı bir kap içerisine doku ve dokunun hacminin en az 20 katı kadar solüsyon konulur.
- ✓ Kullanılan solüsyona da bağlı olmak üzere ortalama 2-3 günde bir solüsyon değiştirilir
- ✓ Değişirme işlemi yapılırken dekalsifikasyon işleminin tamamlanıp tamamlanmadığı kontrol edilir

Dekalsifikasyonun Kontrolü

- ✓ Elle, iki parmak arasında veya pensetle hafifçe sıkıştırarak kıvamının kontrolü
- ✓ İğneyi doku içine sokarak (incelenecek alanın ortasından geçmemeli) kontrol
- ✓ Son dekalsifikasyon solüsyonundan 5 ml alınıp üzerine amonyak solüsyonu damlatılır (sarı bir renk oluşuncaya kadar) nötralize edilir. Üzerine 5ml. amonyum oksalat ilave edilir. 1 saat içerisinde beyaz kalsiyum oksalat çöküntüsü oluşmaması dekalsifikasyonun tamamlandığını gösterir.
- ✓ X ışınlarıyla kontrol

Dekalsifikasyonun Hızını Belirleyen Faktörler

- ✓ Dokunun büyüklüğü
- ✓ Dokunun yoğunluğu
- ✓ Kullanılan solüsyon
- ✓ Ortamın ısısı

Asitlerle Dekalsifikasyon

- ✓ Kuvvetli asitler zayıflatılarak kullanılır. örn: formik asit, nitrik asit, hidroklorik asit vs. (genellikle %5-10'luk solüsyonları kullanılır). Bu yöntemle kalsiyum dokudan ayrılarak çözülmüş kalsiyum iyonları şeklinde solüsyona geçer.
- ✓ Asitlerle dekalsifikasyon **nükleik asitler ve enzimler üzerine zararlı** olabilir. Bu nedenle histokimyasal çalışmalarda yanlış sonuç verebilir. Daha çok histolojik yapının incelenmesinde kullanılırlar.
- ✓ Solüsyonun 1-2 günde bir değiştirilmesi gerekir.

Asitlerle Dekalsifikasyon Yöntemlerine Örnekler

*Formik Asit

-Tamponlu Formik Asit

Formik Asit	%90	250ml
Su		750ml
Sodyum Format		34gr

*Nitrik Asit

-De Castro SIVISI

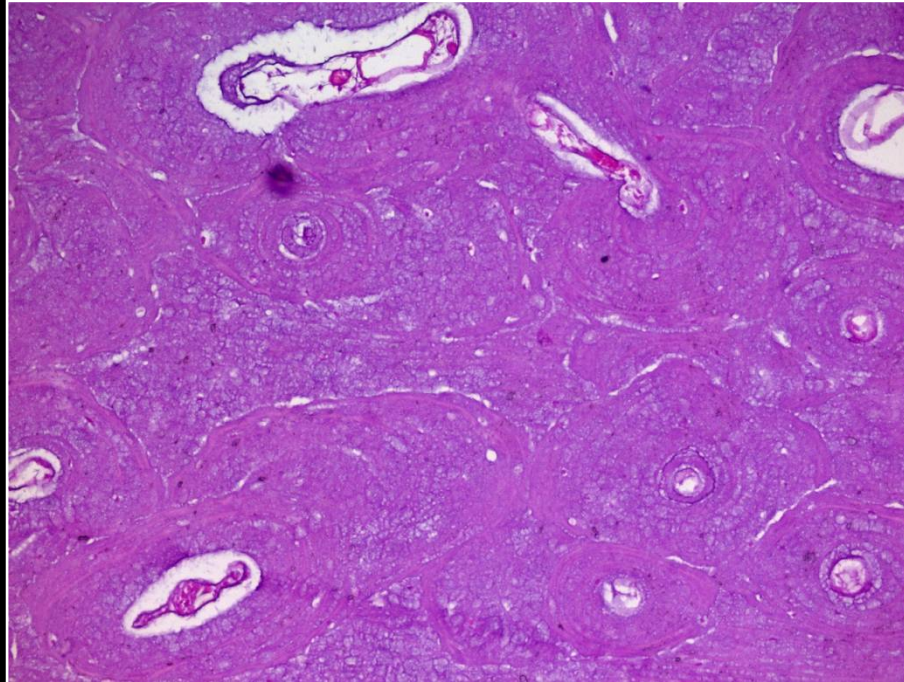
Alkol	%100	300ml
Kloral Hidrat	50gr	
Su		670ml
Nitrik Asit	%70	30ml

Şelasyon Yapan Ajanlarla Dekalsifikasyon

- ✓ Şelasyon yapan ajanlar ya organik bileşiklerdir ya da iyonlardır. Şelasyon yoluyla kalsiyumu uzaklaştırırlar. örn. etilendiamin tetra asetik asit (EDTA)
- ✓ Alkali olarak kullanılırlar. Bu nedenle **nükleik asitler ve enzimler üzerinde zararlı etkileri yoktur**, histokimyasal çalışmalar için uygundur.
- ✓ **EDTA**'nın en önemli dezavantajı asitlerden daha yavaş etkili olmasıdır. Solüsyon 2-3 günde bir değiştirilir.

Sert Dokularını İnceleme Yöntemleri

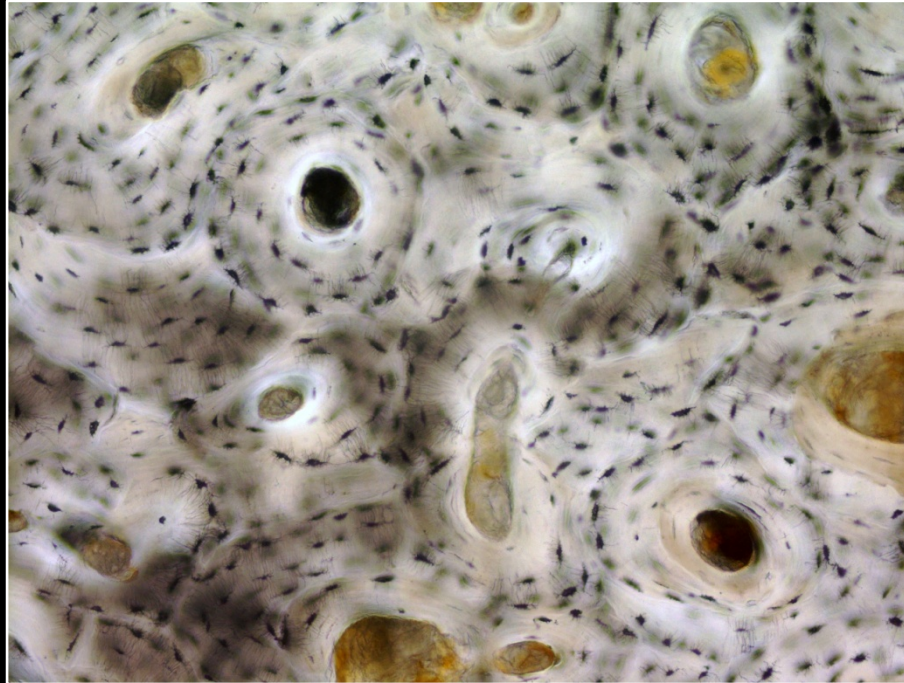
- ✓ Dekalsifikasyon: **inorganik** kısımlar uzaklaştırılır, organik kısımlar incelenir.



Dekalsifiye Kemik

Sert Dokularını İnceleme Yöntemleri

- ✓ Masserasyon: **organik** kısımlar ortadan kaldırılır, inorganik yapı incelenir.



Massere Kemik