

# Histoloji Nedir ?

- ▶ **Histoloji hücre, doku ve organ bilimi olduğuna göre, bunların yapılarının yanı sıra işlevlerini de ele alır.**
- ▶ **Bu yüzden, histoloji sadece yapıyı tanımlamakla kalmaz, aynı zamanda biyokimya, moleküler biyoloji ve fizyoloji arasında bağlantılar kurar ve hastalık ile ilgili patogeneizde önemli rol oynar.**

# Histolojik İnceleme Nasıl Yapılır ?

- ▶ Alınan biyolojik materyaller, belli aşamalardan geçirilir. Bunları, şu şekilde sıralayabiliriz:
  - ▶ **(1) Tespit (Fiksasyon)**
  - ▶ **(2) Yıkama**
  - ▶ **(3) Suyunu giderme (Dehidrasyon)**
  - ▶ **(4) Parlatma veya Şeffaflaştırma**
  - ▶ **(5) Emdirme**
  - ▶ **(6) Gömme veya blokaj (Blokama)**
  - ▶ **(7) Kesme**
  - ▶ **(8) Boyama**
  - ▶ **(9) Kapatma**
- ▶ Sırasıyla izlenen bu aşamaların her birinde, öngörülen şartlara uyma zorunluluğu vardır. Bunlardan birinde yapılan bir hata, sonucu olumsuz yönde etkiler ve uygun bir preparat elde edilemez.

# Tespit İşlemi

- ▶ **Diğer anlamı → Sabitleme (Fiksasyon)**
- ▶ **Hücre veya dokuların, gerçeğe en yakın şekliyle korunması**
- ▶ **Eğer bu sağlanmazsa → Bozunma olur.**

# Tespit İşlemi

► Sabitleyiciler (Fiksatorler):

**Fiziki** : Isı, kurutma ve dondurma

**Kimyasal** : Formaldehit, osmik asit, pikrik asit, asetik asit, alkol, civa klorür, v.s

**Dokuların boyanmasında güzel sonuçlar almak için tespit çok önemlidir.**



[www.biyolojigunlugu.com](http://www.biyolojigunlugu.com)

**İyi tespit olmuř**

**İyi tespit olmamış**



[www.biyolojigunlugu.com](http://www.biyolojigunlugu.com)

# BLOK KESME

- Emdirme maddesinin içine gömülerek homojen biçimde sertleşmiş olan blok kütlesi (doku ve emdirme maddesi), **MİKROTOM** adı verilen özel bir aletle kesilir





Taze dokunun alınması

Çıkarılmış doku parçası

Doku örneğinin uygun büyüklükte parçalara ayrılması

Tespit **%10 Formol, Bouin gibi**

Düşükten yüksek derecelilere doğru alkollerden geçirelerek doku suyunun alınması

**dehidrasyon**

**Xyloller ile Parlatma**

Gömme (örnek; parafine ya da paraplasta)

Gömmenin tamamlanması; içinde doku bulunan parafin bloğu

Bloklama- blokaj

Boyanmış doku kesiti, yapıştırma materyaliyle Lamel altına tesbit edilmiş, mikroskop altı gözleme hazır

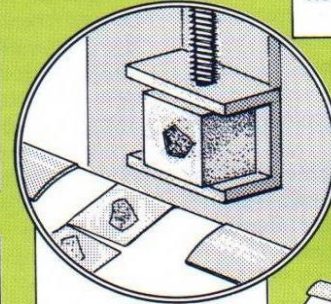
Düşükten yüksek derecelilere alkollerden geçirilerek tekrar doku suyunun alınması

Lâm üzerine yapıştırılan kesitlerin boyanması

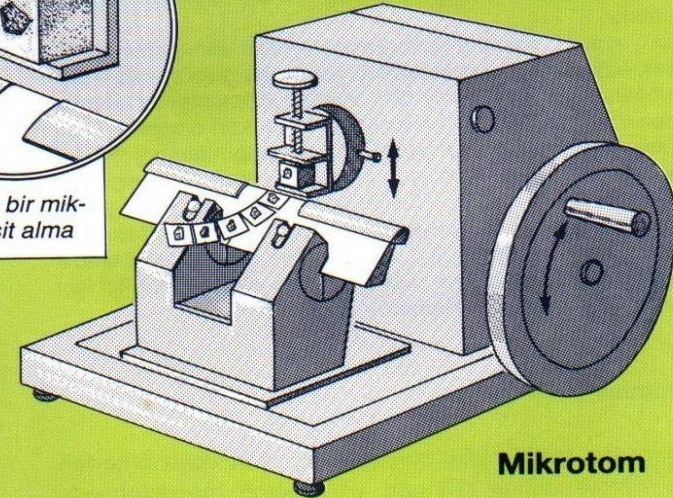
Yüksekten düşük derecelilere doğru alkollerden geçirilerek doku suyunun geri verilmesi

Doku parafininin ksilolle uzaklaştırılması

Lâm üzerine yayılıp kurutulmuş doku kesitleri



Çelik bıçaklı bir mikrotomda kesit alma



**Mikrotom**



# **HİSTOLOJİ BİLİM DALINDA DOKULARI KESMEK İÇİN KULLANILAN ALETLER**

## **1- MİKROTOM**

**(ışık mikroskopik incelemeler için)**

a).KIZAKLI MİKROTOM

b).ROTARY MİKROTOM

## **2- ULTRAMİKROTOM**

**(elektronmikroskopik incelemeler için)**

## **3- KRİYOSTAT (dondurma mikrotomu)**

**(ışık mikroskopik incelemeler için)**

Blokladığımız doku ve organ parçalarında düzgün ince kesitler almak için kullandığımız aletlere **mikrotom** denir.

Işık mikroskop incelemeleri için kullandığımız mikrotomlar mikron düzeylerinde ince kesitler alabilirlerken elektron mikroskop araştırmalarında kullanılan **ultramikrotomlar** angström inceliklerinde kesitler sağlarlar. Işık mikroskobu için kesitler almakta kullandığımız **mikrotomlarda çelik bıçaklar kullanılırken**, EM için kesitler aldığımız **ultramikrotomlarda cam ya da daha iyisi elmas bıçaklar** kullanılır.

Işık mikroskop çalışmalarında genellikle 6-10 mikronluk kesitler kullanılır.

# MİKROTOM

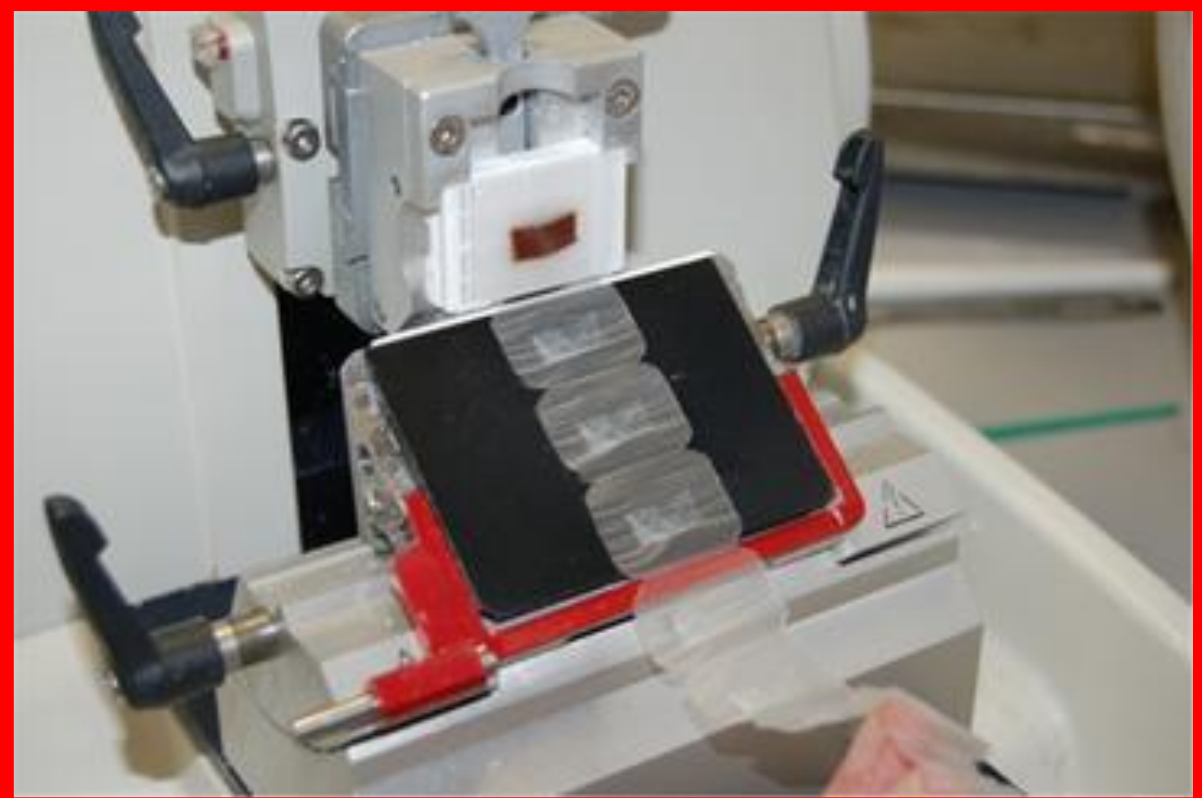
(ışık mikroskopik incelemeler için)

a).KIZAKLI MİKROTOM

b).ROTARY MİKROTOM

Mikrotomların bıçakların hareketli olduğu kızaklı mikrotom denilen tipleri ya da bıçaklarının sabit, kesilecek blokların hareketli olduğu rotari mikrotom tipleri vardır.







**Xylol** gibi bazı solventler doku içindeki lipidler gibi bazı maddeleri eritebilirler.

Bu istenmeyen etkinin önüne geçmek için **cryostat** adı verilen dondurma mikrotomları kullanılır.

Dokular bu yöntemle düşük ısıda aniden dondurularak **takip işlemlerinden geçirilmeden ve bloklanmadan kesit alınabilir hale gelir.**

► Işıık mikroskopide rutin histolojik boyama dışında histokimya, immunohistokimya 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. Ya da xylol gibi bazı solventler doku içindeki lipidler gibi bazı maddeleri eritebilirler. Bu istenmeyen etkinin önüne geçmek için **cryostat** adı verilen dondurma mikrotomları kullanılır.





- Bu nedenle öncelikle dondurma tespiti tercih edilir
- (-150 -170 °C'de süratle dondurma örneğın sıvı azot gibi), tespiti takiben takip işlemlerinden geçirilmeden ve bloklanmadan kesit alınabilir hale gelir.



- Dondurma mikrotomunda kesitler alınır (Soğuk alan içerisinde yerleştirilmiş bir çeşit rotary mikrotom yapısındadır). **Distile suya alınan kesitler** amacımız için özel boyalar ile boyanarak doğrudan uygun bir kapatıcı madde ve lamel ile kapatılır.
- Yani dokulardaki **yağları boyamak** ya da, dokulardaki **bazı enzimleri** ATPase, alkalin fosfataz ve asit fosfataz gibi incelemek istediğimiz zaman bu yöntemler tercih edilir. **Acil cerrahi biopsilerde de** kullanılır.



# KESİT ALMA ÇEŞİTLERİ

Mikrotomla bloklardan alınan kesitler, ışık geçirgenliğine sahip, saydam bir hücre katmanı kalınlığında olmalıdır. Doku kesitinin kalınlığı 5-6 $\mu$  arasında olmalıdır.

**1- Seri kesit alma:** Birbirini takip eden kesitlerin kayba uğratılmaksızın tamamını lama alma işlemidir. Birden fazla lama seri kesit yapılacaksa lamlar numaralandırılır.

**2- Atlamalı veya basamaklı kesit alma:** Doku büyük ise belirli aralıklarla kesitlerin lama alınmasıdır.

<b>İşlem Basamakları</b>	<b>Öneriler</b>
<b>1- Lama blok numarası yazınız.</b>	* Blok numaralarını kurşun kalemle yazınız.
<b>2- Doku su banyosu cihazını hazırlayınız.</b>	* Doku su banyosu sıcaklığını ayarlayınız. * Kullandığınız parafinin erime derecesine göre su banyosu sıcaklığını ayarlayınız.
<b>3- Rotary mikrotomu kesite hazırlayınız.</b>	* Mikrotom temizliğini kontrol ediniz.
<b>4- Parafin blokları buzdolabından çıkarınız.</b>	* Bloklar, istenen sertliğe gelmeden kesite başlamayınız. * Buz kalıbı/kuru buz tepsi içinde kesim hızını göz önünde bulundurarak bir miktar bloğu kesim alanına getiriniz.
<b>5- Disposable mikrotom bıçağını bıçak tutucuya monte ediniz.</b>	* Bıçağı monte ederken mikrotom kesit kolu kilidini kapalı konuma getiriniz. * Bıçak sıkma koluyla bıçağı sıkıştırınız. * Bıçak açi ayarını yapınız.
<b>6- Blok tıraşlaması yapınız.</b>	* Mikrotom —kaba besleme kolunu çevirerek bloğu bıçağa yaklaştırınız. * Tıraşlamayı yüksek mikronda yapınız. * Doku tıraşlamasını dokunun tüm yapıları kesitte gözükecek şekilde yapınız.
<b>7- Dokudan 5-6 µ kalınlığında kesitler alınız.</b>	* Tıraşlaması biten bloktan ince kesit almak için mikron ayarını ayarlayınız. * Bıçaktaki blok tıraşlama kalıntılarını temizleyiniz. * Uygun uzunlukta kesit şeridi elde ediniz. * Kesitte meydana gelen kesit hatalarını gideriniz.
<b>8- Kesit şeridini sıcak su banyosuna atınız.</b>	* Kesit şeridini su banyosuna atmadan önce su yüzeyinde doku kesit kalıntıları olmadığından emin olun, varsa temizleyiniz. * Kesit şeridinde oluşan kırışiklıkları fırçayla açınız.

# BOYAMA

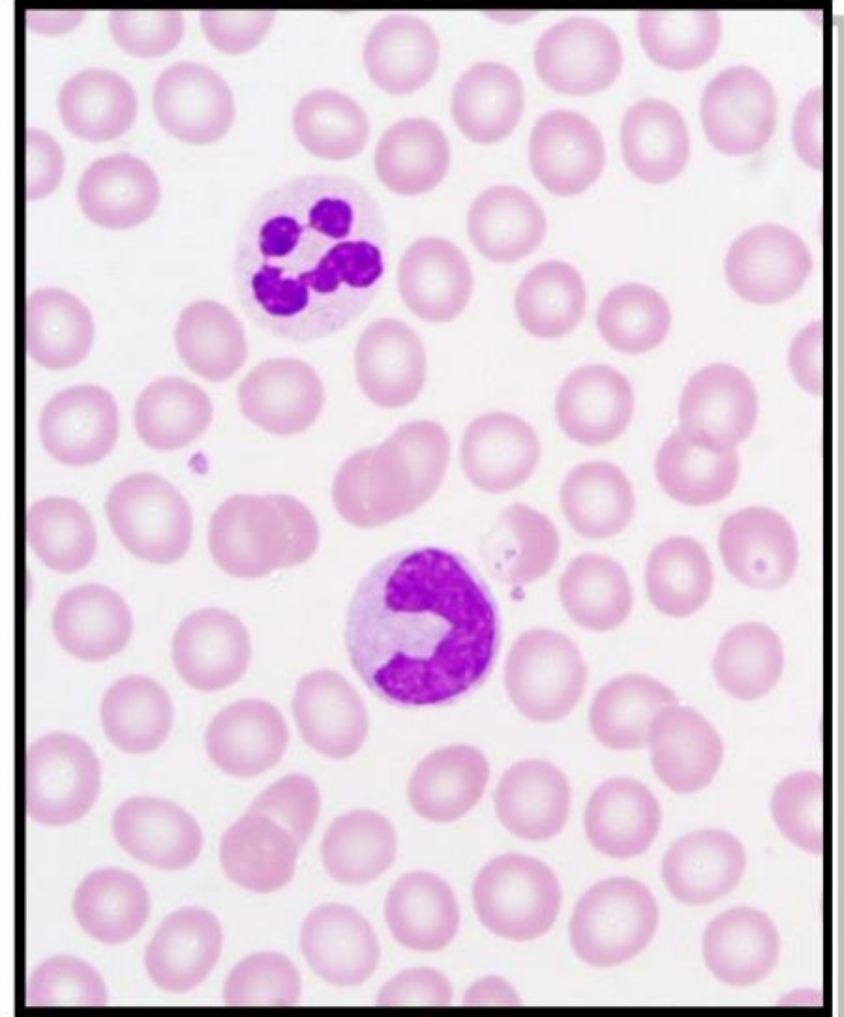
- ▶ **BOYAMA** : Dokuları oluşturan hücreler **canlıda renksizdir**. Işık mikroskop altında inceleyebilmek için **boyanması** gereklidir.
- ▶ Boyalar genellikle suda hazırlanır. Alkolde hazırlanmış olsalar bile bunların da bileşiminde su vardır.
- ▶ Dondurma mikrotomu ya da kriyostat ile elde edilen kesitler direkt olarak boya eriyiğine konabilirler.
- ▶ Özellikle parafin kesitleri, kurumuş şekilleriyle boyanamazlar. Bunların öncelikle suyla uyuşabilir duruma gelmeleri gerekir. Bunun için de önce parafin giderilir. Parafinli kesitler, peşpeşe 2-3 kez tekrarlanan Xylol kapları içerisinde 5'er dakika bırakılarak parafinden arındırılır.

# Boyanma Özellikleri

- **Asidofili:** Bazik yapıdaki bir doku yapısının asit bir boya ile boyanması özelliğine asidofili denir. Eozin bir asit boyadır; sitoplazmayı pembe-kırmızıya boyar (eozinofili).
- **Bazofili:** Asit yapıdaki bir doku yapısının bazik bir boya ile boyanması özelliğine bazofili denir, çekirdeği mavi-mor renge boyar.
- **Monokromazi:** Doku yapısının boyanın gerçek renginde boyanması özelliği
- **Metakromazi:** Bir doku yapısının kullanılan boya solusyonunun renginden farklı bir renge boyanmasına denir.

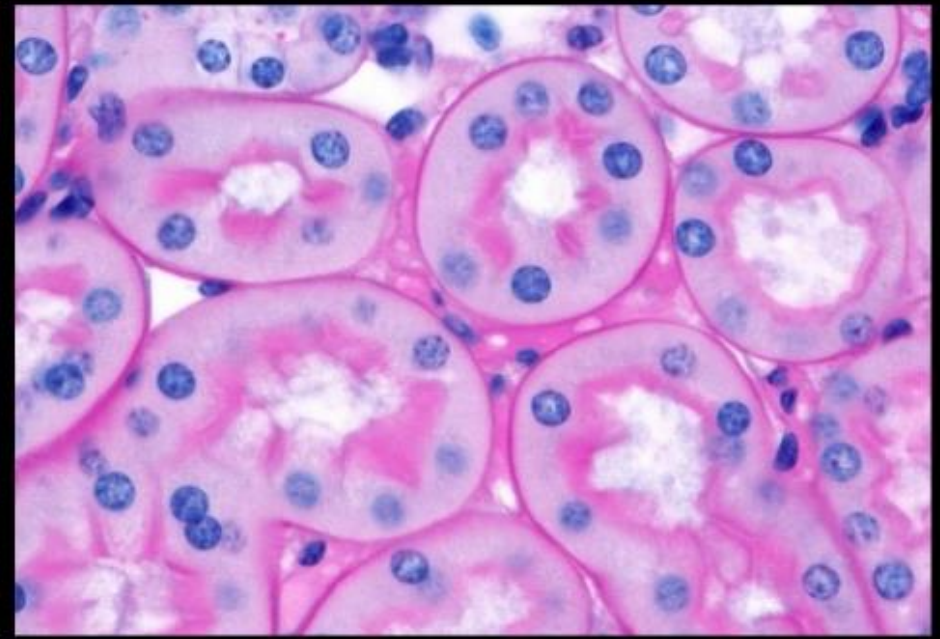
- **GIEMSA VEYA WRİGHr**

- Bunlar kan ve kemik iliği yaymalarının boyanmasında sıklıkla kullanılan yöntemlerdir.
- Nukleus: kırmızı-menekşe
- Sitoplazma: soluk mavi
- Eritrositler: soluk pembe boyanır.



- **PERİODİK ASİT-SCHİFF REAKSİYONU (PAS)**

- PAS glikojen gibi doku karbonhidratlarının gösterilmesinde kullanılan bir tekniktir.
- Örneğin sindirim ve solunum sistemlerindeki goblet hücreleri (sol şekil), kıkırdak matriksi ve böbrek tübüllerinin epitel hücrelerinin mikrovillus-ları (fırçamsı kenar) ve bazal membranları (sağ şekil) PAS (+) olarak adlandırılan menekşe renginde boyanırlar.



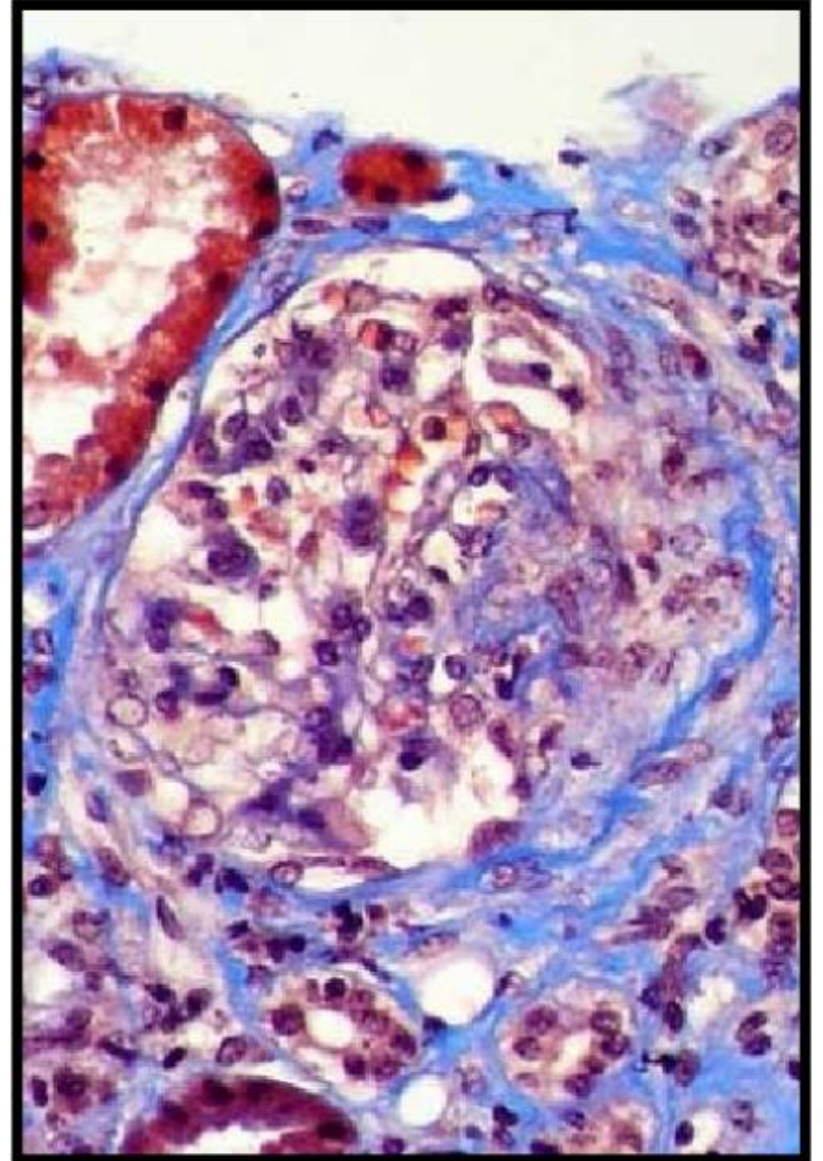


- **MASSON TRİKROM**

- Üç farklı boyanın kullanıldığı bu teknik ile bağ dokusunun boyanması sağlanır.

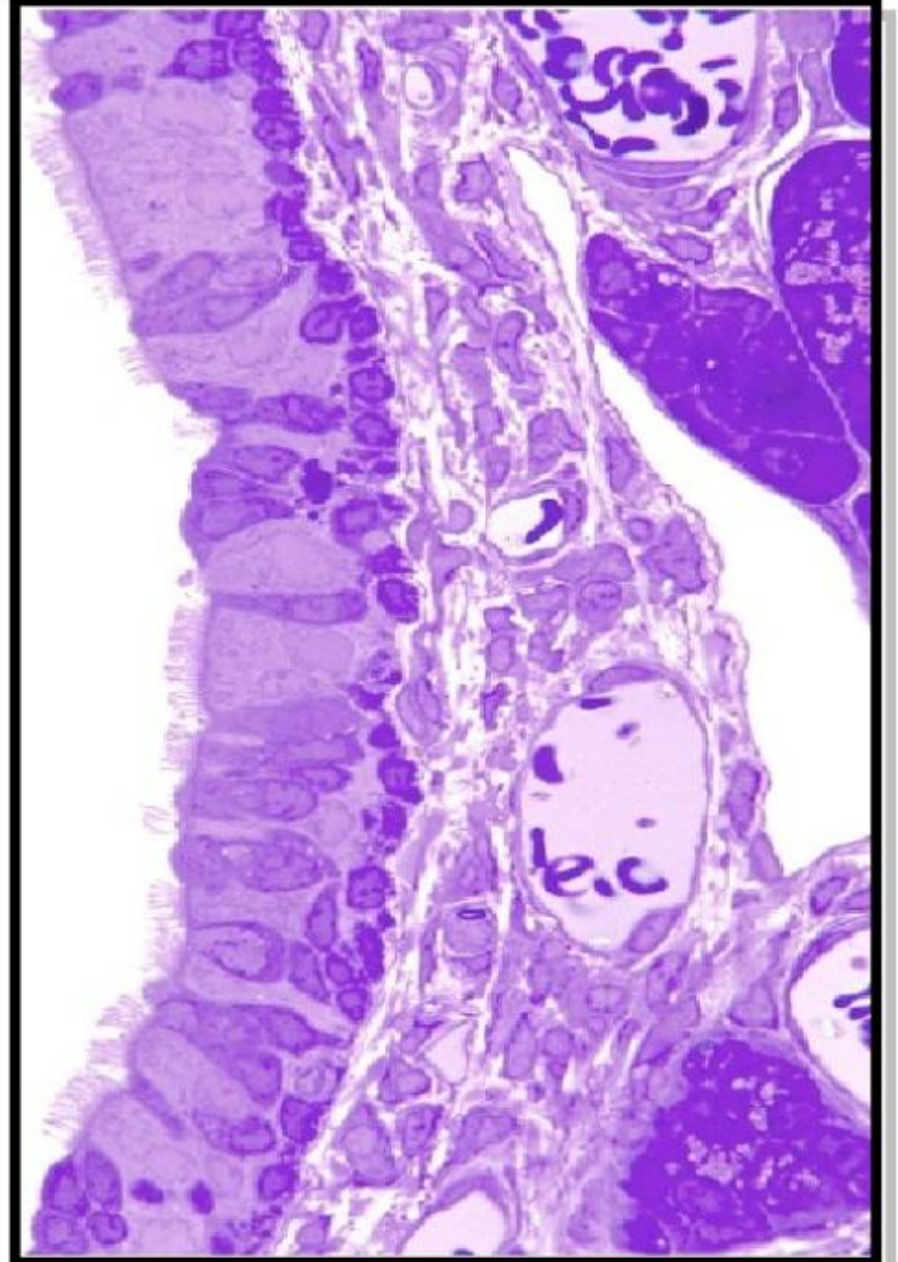
Sonuçta:

- Nukleus: mavi
- Bazofilik yapılar: mavi
- Sitoplazma: kırmızı
- Kas hücreleri: kırmızı
- Eritrositler: kırmızı
- Bağ dokusu: mavi veya yeşil



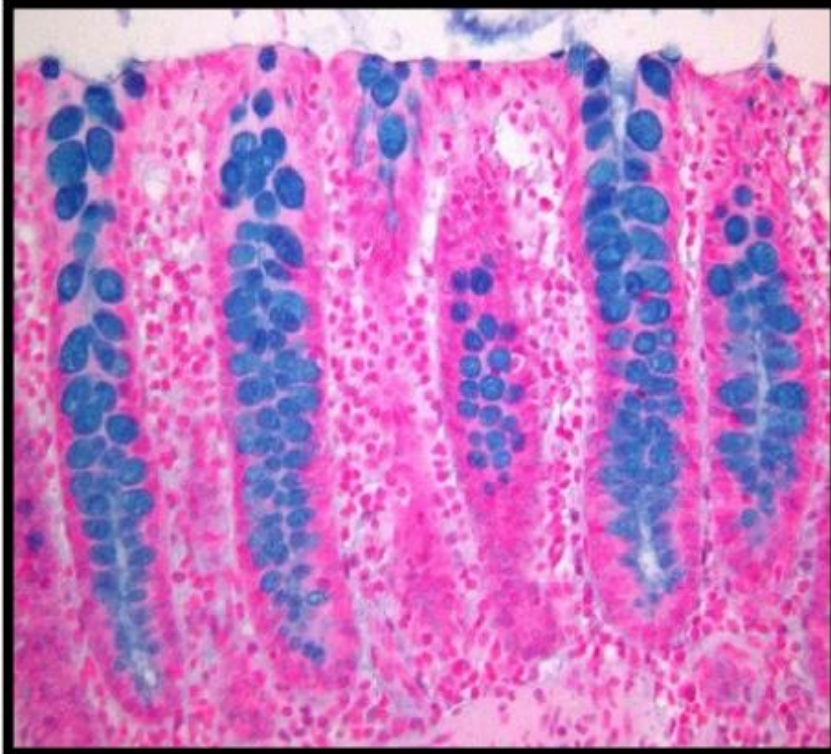
- **TOLUIDİN BLUE**

- Bazik bir boyadır.
- Asidik doku yapılarını mavinin değişik tonlarında boyar.
- Elektron mikroskobu için hazırlanmış ve rezine gömülmüş yarı ince doku kesitlerinin boyanmasında sıklıkla kullanılır.
- Bazı doku yapılarını metakromatik olarak boyar.



- **Alcian blue**

- Asit mukopolisakkaritleri ve glikozaminoglikanları maviye boyar.



- **Van Gieson:**

- Bağ dokusunu boyama tekniklerinden biridir;
  - kollajeni kırmızıya,
  - nukleusu maviye,
  - eritrosit ve sitoplazmayı sarıya boyar.
- Bir elastik boyası ile kombine edildiğinde elastin mavi-siyaha boyanır.
- Bu boyama teknigi özellikle kan damarları ve deri için faydalıdır.

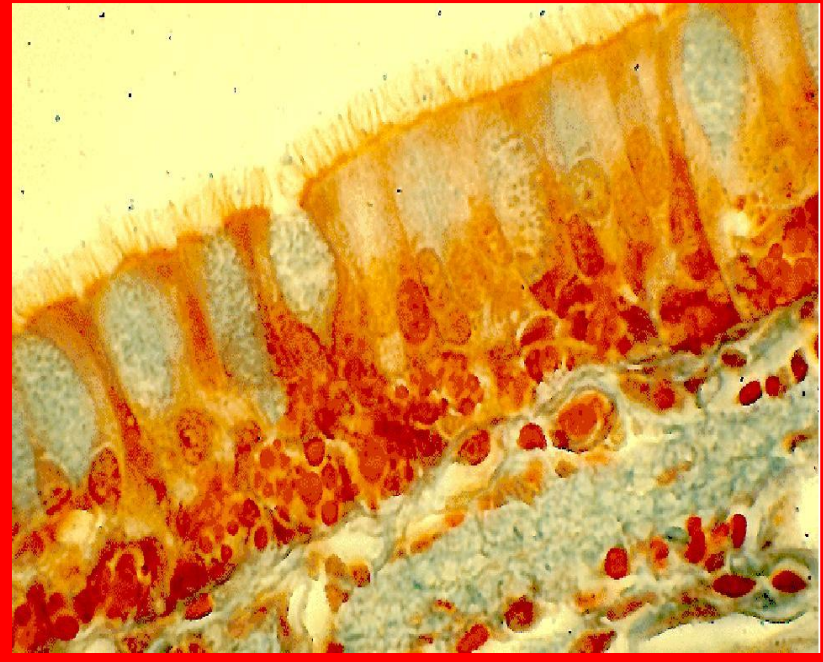
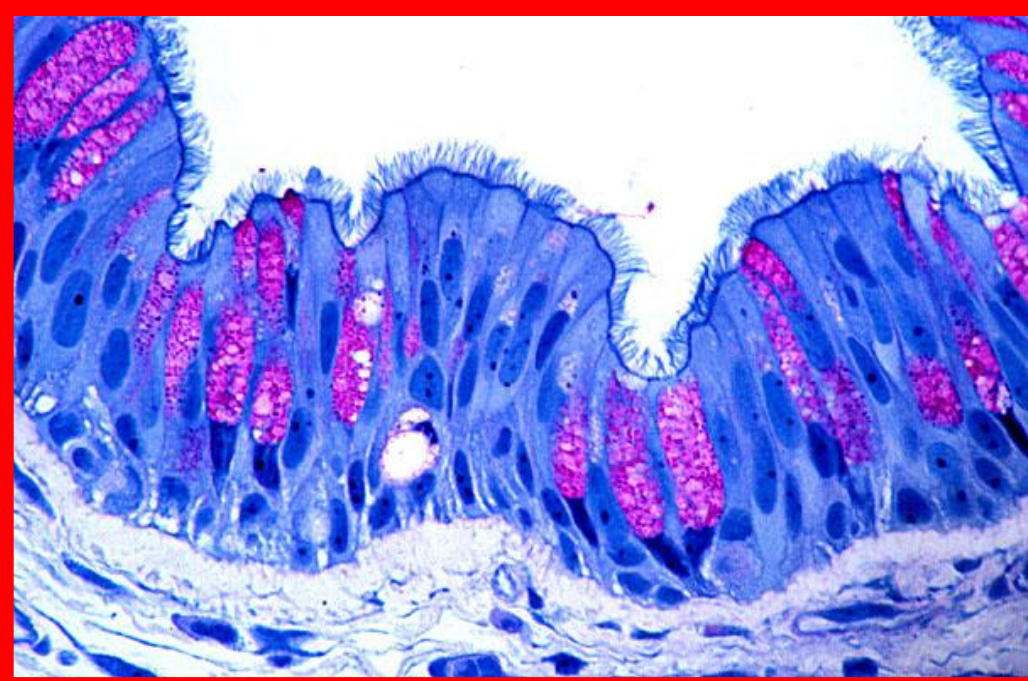


# BOYAMA

**Bir kesit icindeki bütün yapıları tek bir boyama metodu ile ayırt etmek mümkün değildir.**

**istenilen yapıları görebilmek için onlara özgün boyama metodlarını uygulamak zorundayız.**

# SOLUNUM EPİTELİ YALANCI ÇOK KATLI PRİZMATİK EPİTEL



# BOYAMA

- ▶ 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,**
- ▶ Sonra 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 kurumması sağlanır. Bundan sonra preperatlar ışık mikroskop altında incelenmeye hazırdır.

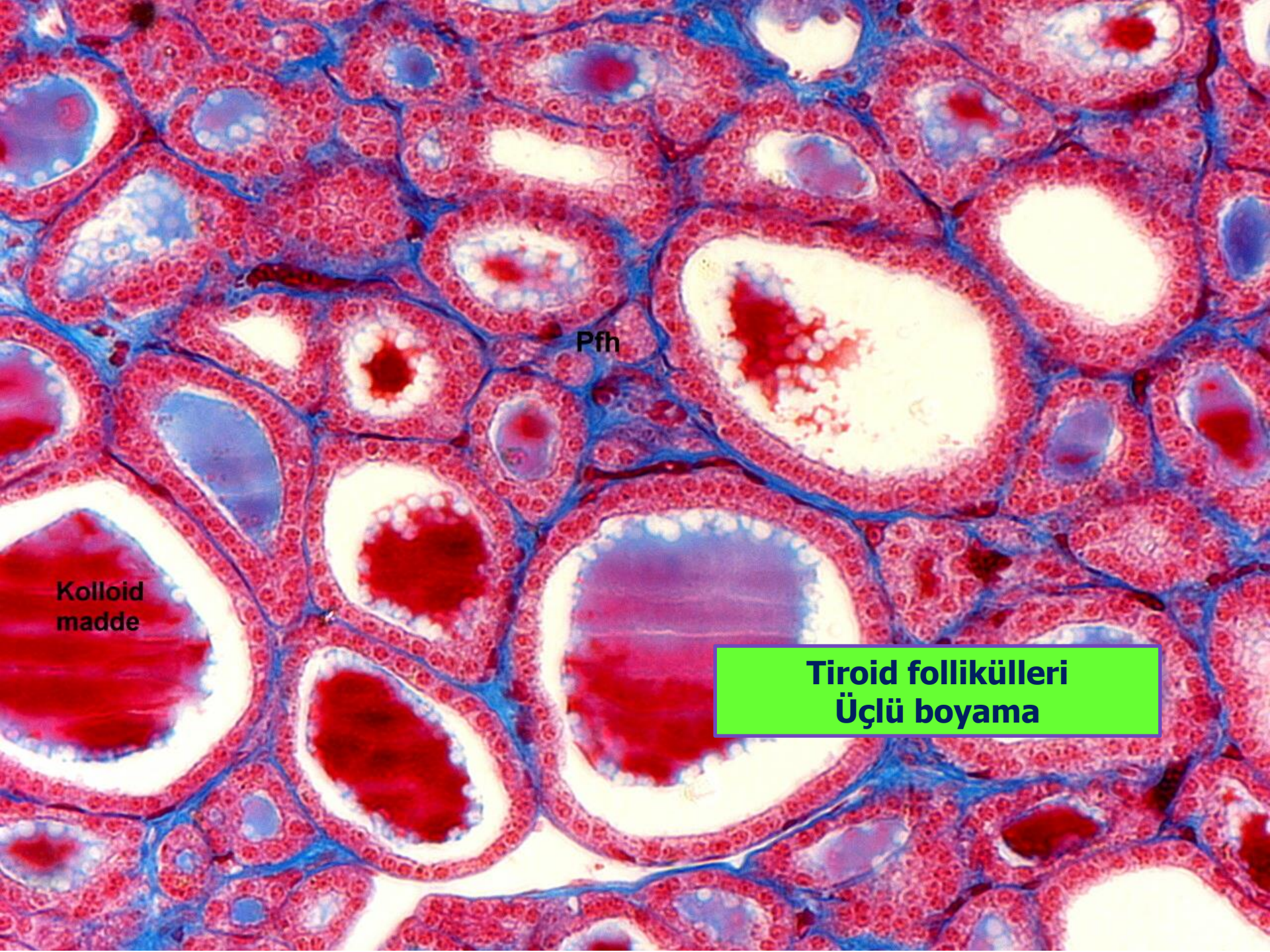
- Işıık mikroskopide rutin histolojik boyama dışında histokimya, immunhistokimya gibi metodları kullanmak istediğimiz zaman tespit ve onu takiben kullandığımız süreçlerde bazı farklılıklar gerekir. Bunun nedeni tespit ve takiben kullandığımız süreç sırasında dokulardaki bazı madde ve enzimlerin inaktive 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.

**Yaygın olarak kullanılan diğer bir trikrom metodu da Masson'un boyama metodudur. Bunda ise bağ dokusu lifleri mavi, cekirdek siyah veya mor, sitoplazmik yapılar kırmızıya boyanır.**

Elastik lifler secici olarak **Orcein** veya **Resorcin fuchsin** ile boyanırlar

Retikuler lifler bir alkali solusyon icerisinde gümüs ile presipite edilirler, dolayısı ile bu lifler **Argyrophil** olarak tanımlanır.





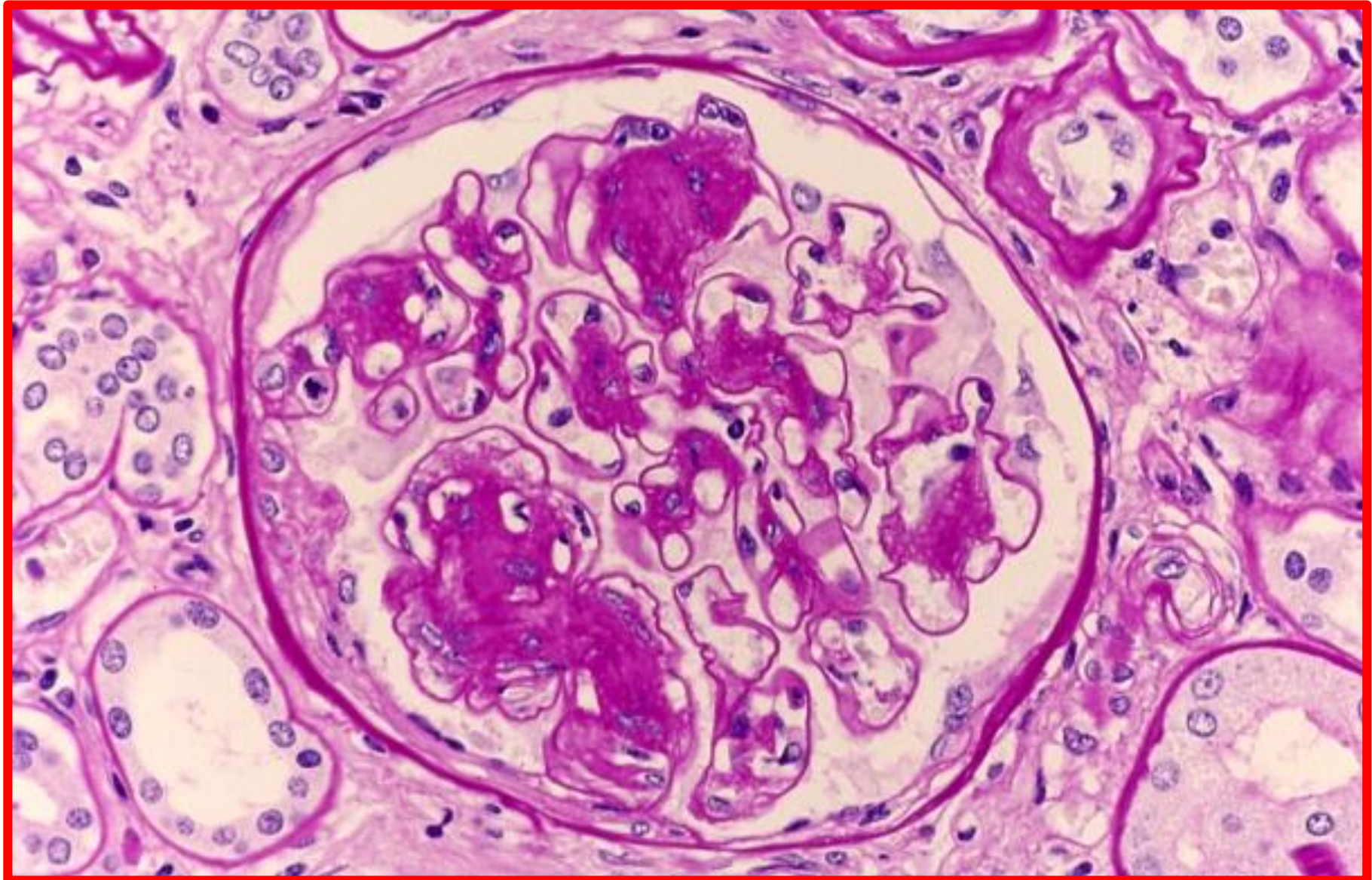
Pfh

Kolloid  
madde

**Tiroid follikülleri  
Üçlü boyama**

**BOYANIN  
HAZIRLANMASINDA  
ÖLÇÜLERE,**

**PREPERATLARIN BOYAMASI  
SIRASINDA SÜREYE DİKKAT  
ETMEK GEREKLİDİR !**



# Tripple Boyama Tekniđi

- ▶ Xylol I.....5 dk.
- ▶ Xylol II.....5 dk.
- ▶ Absolu alkol I.....3 dk.
- ▶ Absolu alkol II.....3 dk.
- ▶ % 96 Alkol.....3 dk.
- ▶ %80 Alkol.....3 dk.
- ▶ %70 Alkol.....3 dk.
- ▶ İodin Alkol solusyonu..... 3 dk.
- ▶ Sodyum Tiyosülfat sol. ....30 sn.
- ▶ Distile suda çalkalama.....2 şale
- ▶ Akarsuda yıkama.....5 dk.

- ▶ **Weigert Hematoxylin.....8 dk.**  
(boyanın tazelik derecesine göre)
- ▶ Akarsuda çalkalama.....5 dk.
- ▶ Metil alkolde çalkalama.....1 dk.  
(yarıyarıya metil alkol ve su karışımına biraz sodyum karbonat ilave edilerek hazırlanır veya asit alkol)
- ▶ Akarsuda yıkama.....5 dk.
- ▶ Distile suda çalkalama.....5 dk.
- ▶ **Asit Fuksin.....1 dk.**  
( 5-10 sn kafidir)
- ▶ Distile suda çalkalama.....( 2 kez )
- ▶ Fosfotungstic asitle dekolere.....15 dk.  
( bağ doku beyazlaşınca kadar)
- ▶ Distile suda çalkalama .....7 dk.
- ▶ Distile suda çalkalama .....7 dk.

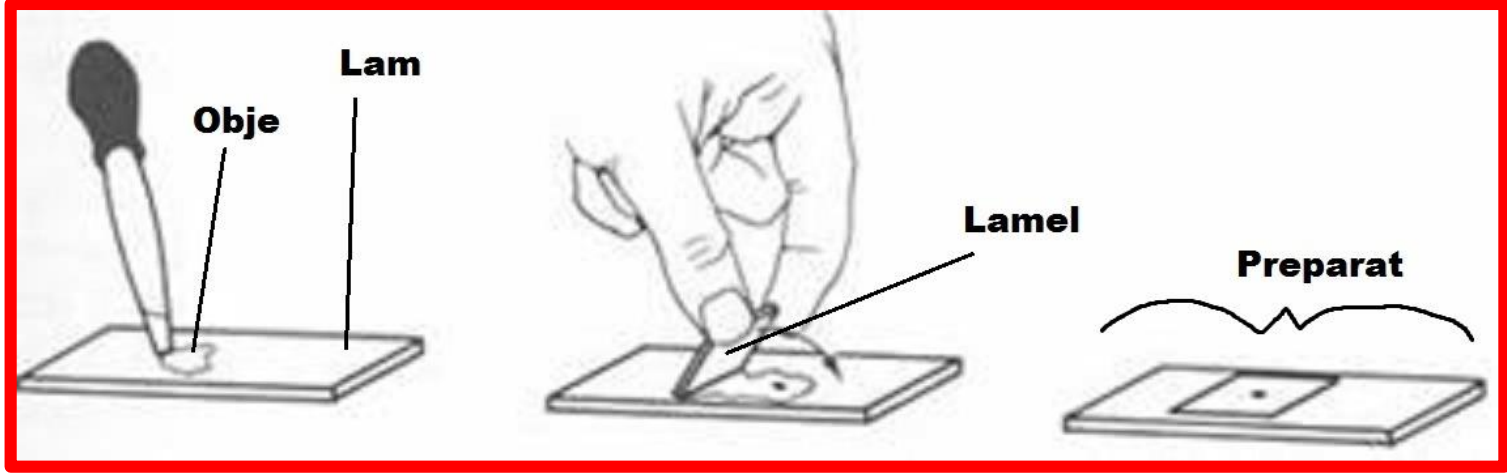
- ▶ Anilin-Blue ( Light Gren) de boyama.....1 dk.
- ▶ Distile suda çalkalama.....10-15 sn.
- ▶ %2 Asetik asitte.....1-5 dk.
- ▶ Distile suda çalkalama.....10-15 sn.
- ▶ %96 alkolde çalkalama.....2 şale
- ▶ %100 alkolde çalkalama.....3 şale
- ▶ Xylolde çalkalama.....2 şale
- ▶ Entellan ve lamelle kapatma



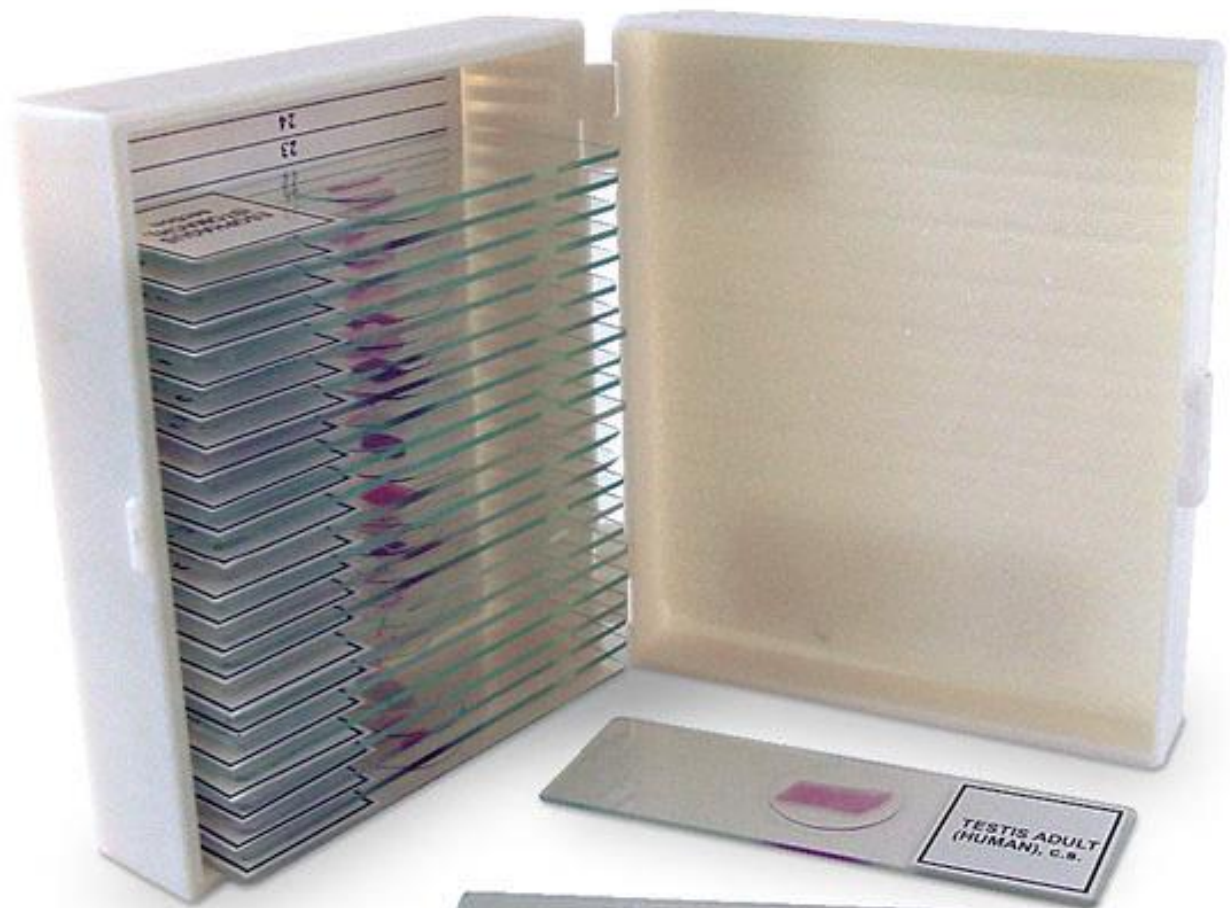
► **Kapatici** ya da örtücü medyum, su ile bağdaşmaz. Bu yüzden suyun giderilmesi gerekir. Böylece, sudaki preparat dereceli alkollerden geçirilir. Ancak, düşük dereceli alkoller boyayı dokulardan söker alır. Bu özellikten, sitoplazmadaki boyanın fazlasını atmak için yararlanır. Kontrollü bir şekilde boyanın fazlası giderilince hemen, daha yukarı alkol kademesine geçilir. Genellikle sudan sonra % 96'lık alkole gelmek, preparatı burada birkaç kez çalkalayıp absolu alkollere geçmek uygundur; 2-3 kez tekrarlanan absolu alkolden sonra, yine 2-3 kez tekrarlanan Xylol serisine gelinir. Bu bölümde, boyanmış olan kesitler uzunca süre kalabilirler. Xylol hem kapatici medyumla uyuşur, hem de dokuları parlattır, saydamlaştırır.



- Xylo'l'den çıkan kesitlerin üzerine bir damla kapatıcı medyum damlatılır ve bunun üzerine de bir lamel konur. Lameli koyduktan 2-3 dakika sonra bunun da üzerine bir kurşun ağırlık konur.

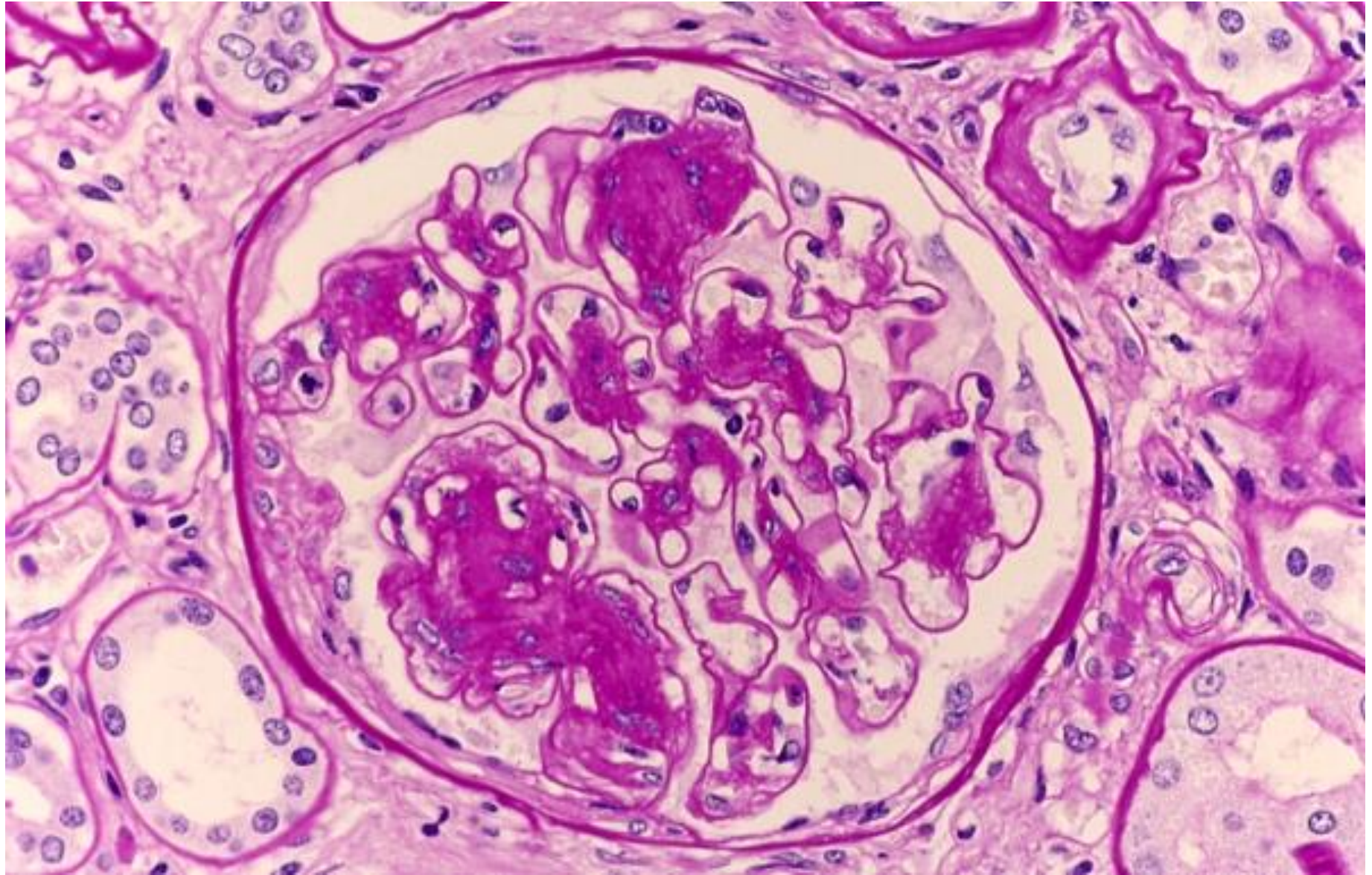


- Bu sırada preparatın, zemini tamamen düz bir yerde kurumaya bırakılması gerekir. Aksi taktirde ağırlığın etkisiyle lamel, kesitin üzerinden kayar. Ağırlık, kapatıcı medyum sertleşinceye kadar lamelin üzerinde kalır. Böylece, boyanmış olan kesitte dalgalı bir durum şekillenmeden düzgün bir yüzey elde edilmiş olur ; artık preparat tamamlanmıştır ve mikroskop altında incelenmeye hazırdır.



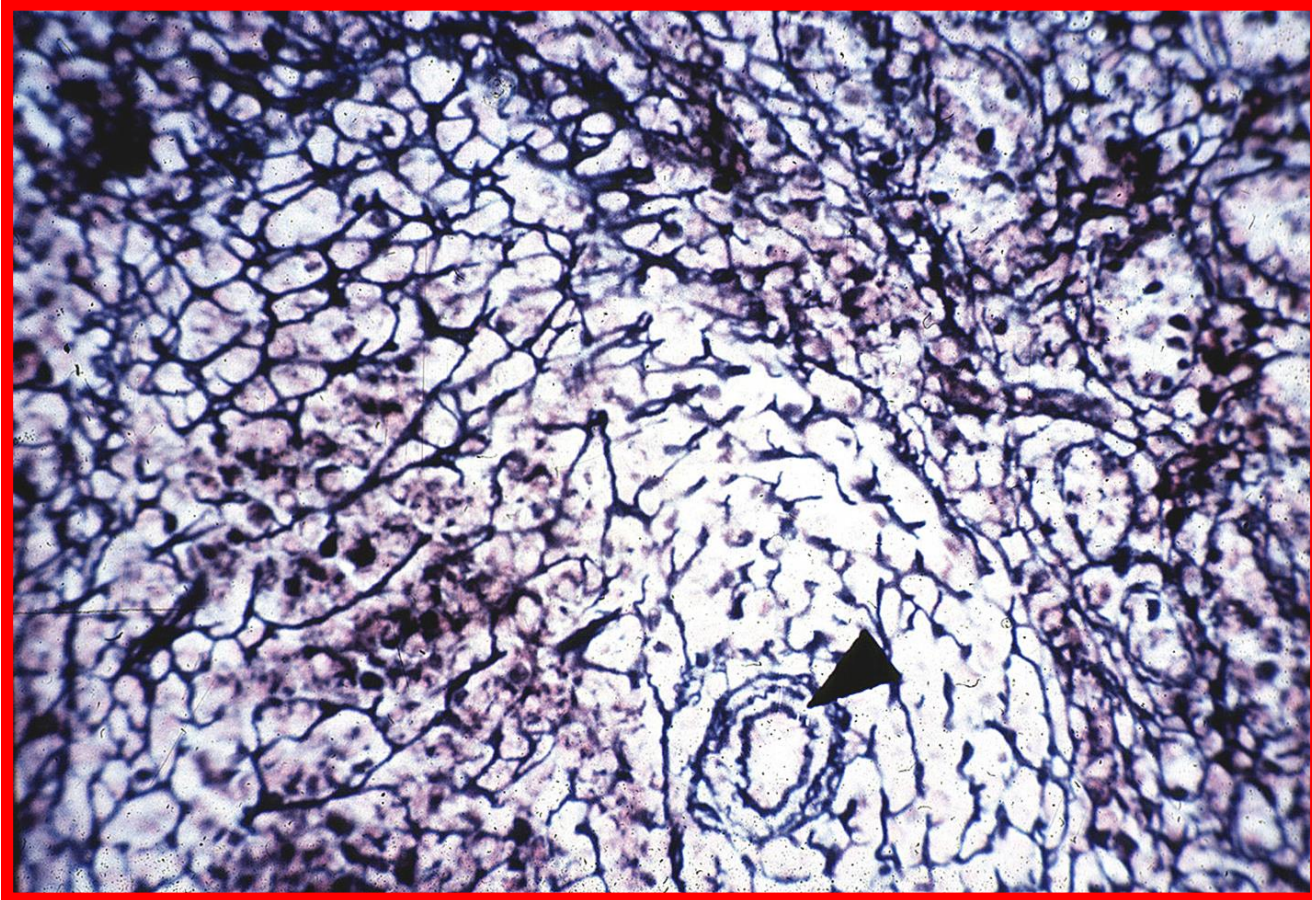
# Boyama - PAS

- ▶ Polisakkaritler: Glikojen, nişasta ve selüloz
- ▶ Nötral mukopolisakkaritler: Mide mütünü, bazal membran salgıları, hipofizin gonadotrop hormon salgılayan hücreleri, tiroid bezinde mevcut olan tiroglobulin gibi glikoproteinler.
- ▶ Glikolipitler: Pek çok hücre zarının öğesidirler ve sinir hücrelerinin plazma zarının önemli bileşen kısmını oluştururlar.
- ▶ Doymamış lipit ve fosfolipitler
- ▶ Bazal membran
- ▶ Glikokaliks
- ▶ Goblet hücrelerince üretilen müköz salgı
- ▶ Kollajenler



# RETİKULUM İPLİKLERİ

gümüş seven (argirofil) iplikler



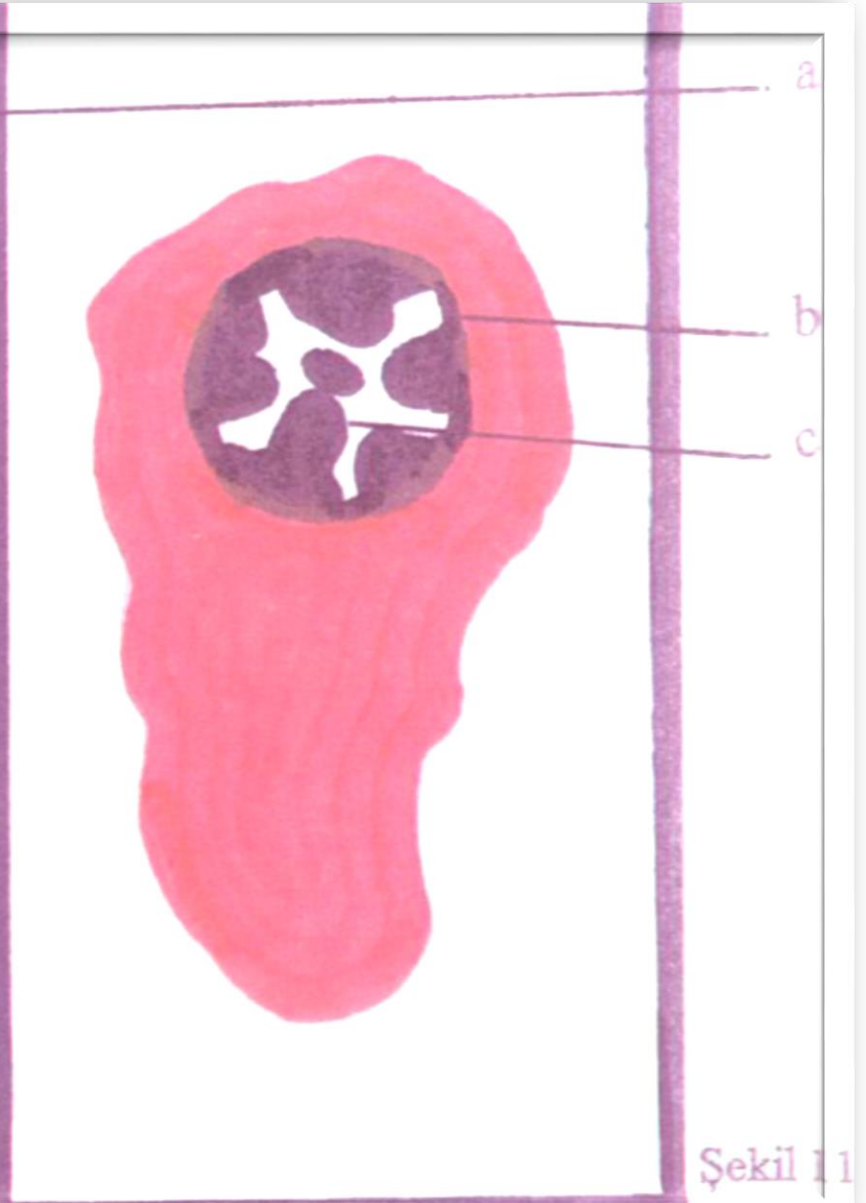
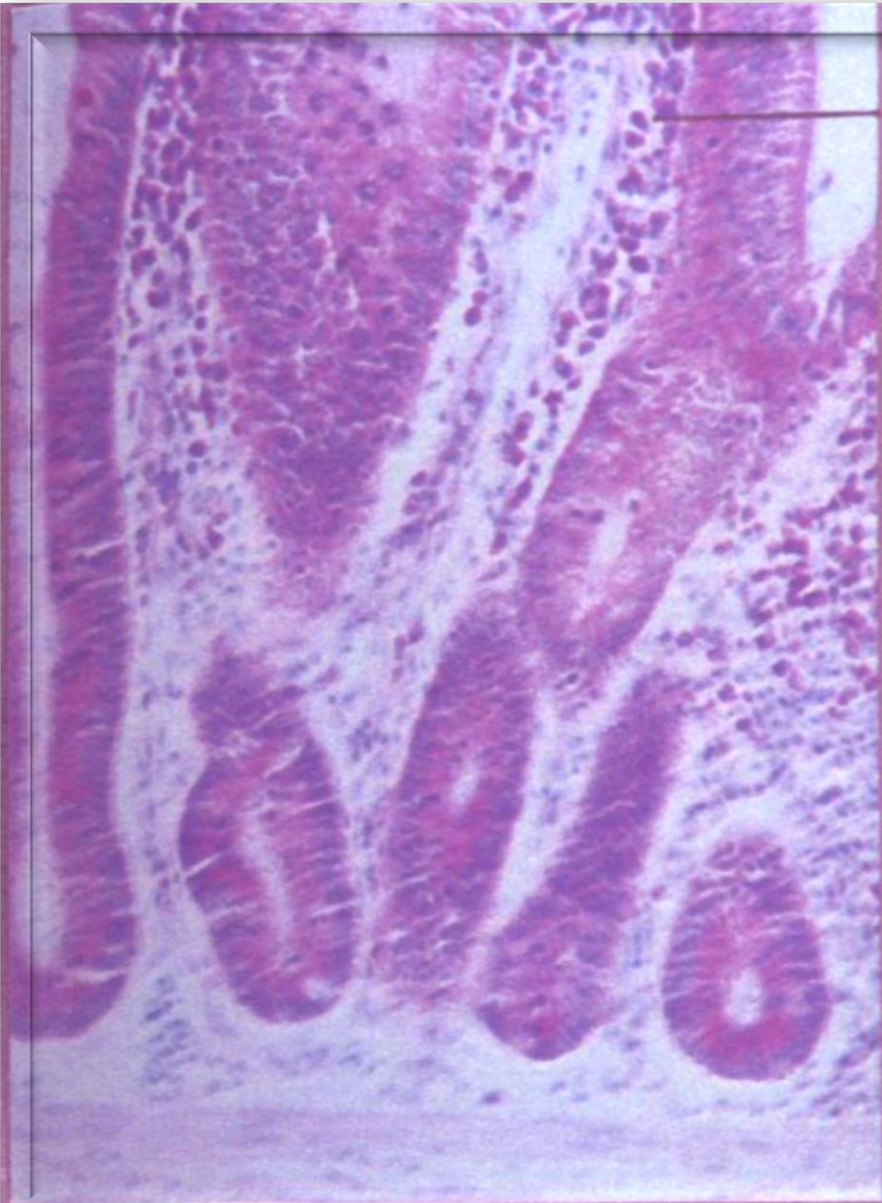
# Boyama - Feulgen

- Çekirdek *DNA'sını* göstermek için kullanılır. *DNA kırmızı renk* alır.



# BOYAMA = *Metil green–Pironin*

- ▶ *DNA ve RNA, birbirlerinden **metil green–pironin boyası** kullanılması yoluyla ayırt edilebilir. RNA pironin ile *kırmızı*, DNA ise metil yeşiliyle *mavimsi - yeşil renkte* boyanır.*
- ▶ **ÖRNEK , PLAZMA HÜCRESİ**



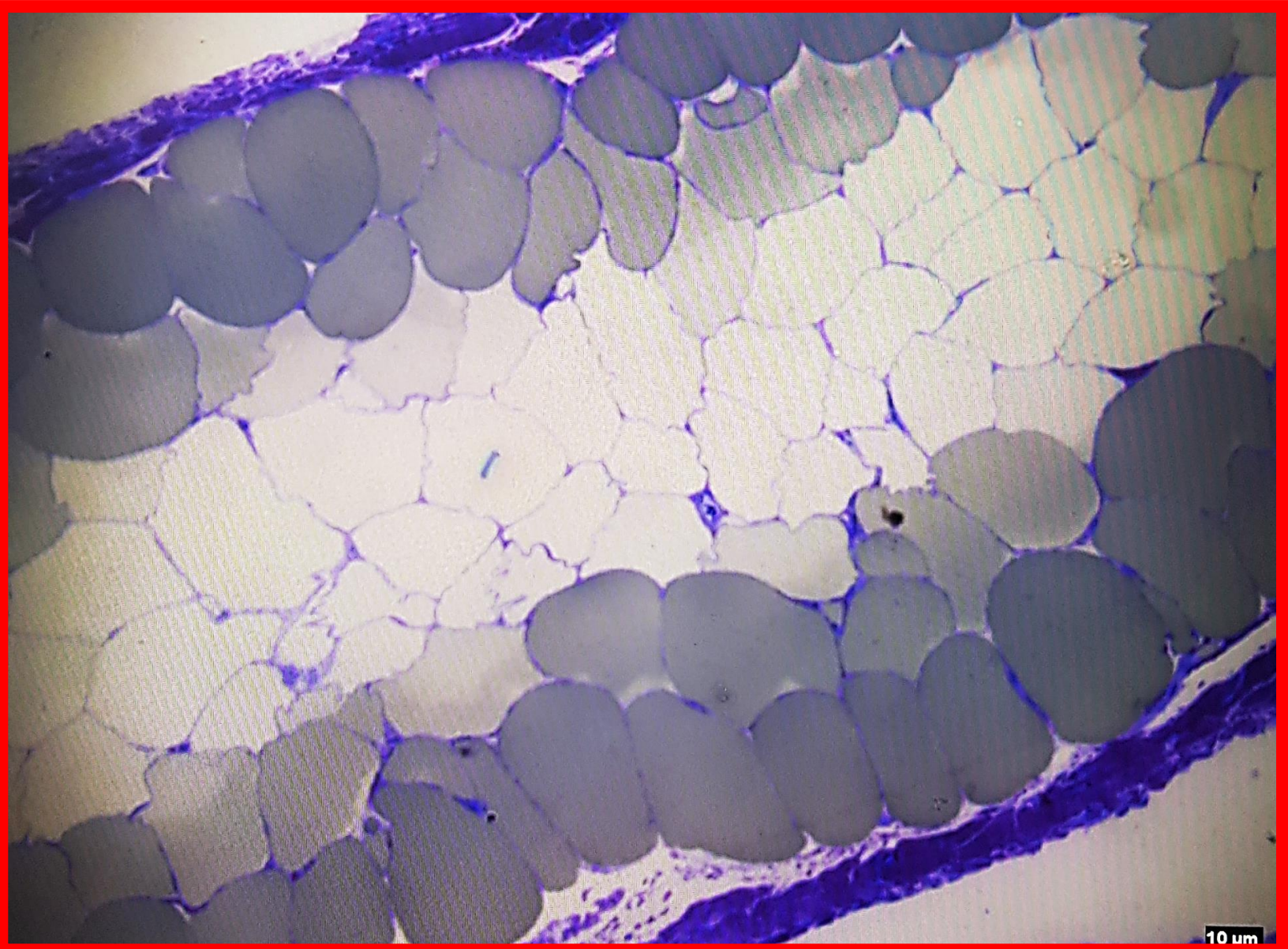
Şekil 1



# Boyama - Lipit

- ▶ Lipitler, xylol'un normal kesitlere girmesi durumunda erirler ve dolayısıyla, % 10'luk veya *nötral formalinle* tespit edilirler. Doku dondurulur ve dondurma mikrotomunda kesitler alınır.
- ▶ Eğer yağ dokusu **osmiyum tetraoksitle** tespit edilirse, siyah renkli osmiyum yağ dokusuna çöker ve oksidasyon reaksiyonu meydana gelir. Sonuçta, osmiyum dioksit açığa çıkar ve dokulara siyah renk verir.
- ▶ **LİPİT BOYALARI** ,*Sudan III, Sudan IV, şarlak kırmızısı* ve *Oil Red O* ile **kırmızıya**, *Sudan Black* ve *osmiyum tetraoksitle* de **siyaha** boyanır.

***osmiyum tetraoksitle* tespit edilmiş**



# Boyama - Metakromazi

- ▶ Bazı boyalar dokuları veya doku elemanlarını boyanın renginden daha farklı bir renge boyarlar. Bu olaya **metakromazi**, bu boyalara da **metakromatik boyalar** denir.
- ▶ Bunlar **toluidin mavisi, thionin, metilen mavisi** ve **azure A** boyalarıdır.
- ▶ Örnek: Toluidin mavisinin **Mast hücrelerinin** granüllerini mor-kırmızı boyaması metakromatik boyanmadır.

