

1-Preparasyon Yöntemleri

Taze hücre ve Dokular:

- Zarlar gibi çok ince yapılar, kan ve lenf gibi sıvısal örnekler, derialtı bağ dokusu hücreleri direkt olarak incelenebilir.
- Doku kalın ise veya katı ise izotonik çözeltide parçalara ayrılarak incelenebilir. Taze preparatlarda hücreler gerçek yapılarını yitirmeden incelenebilir ancak kontrast azlığından dolayı vital boya uygulanmalı ya da faz kontrast mikroskop kullanarak incelenmelidir.
- **Vital boyama** ile hücrelerin sitoplazmasına renk ve kontrast kazandırılır. Vital boya çözeltisine canlı hücrelerin katılması ile (supravital boyama) ile canlıya vital boyanın injeksiyonu (intravital boyama) ile uygulanabilir. Vital boyama ile sitoplazmik yapılar gösterilir.

2-Sitolojik Yöntemler:

- Hücre içeren sıvılar, aspire kemik iliği gibi ince doku parçaları lam üzerine alınarak tespit edilir. Organların veya dokuların lama sürünmesi ile veya vaginal ve burun sürüntülerinin lama yayılması ile hücrelerin yapısı ortaya konabilir.
- Dalak ve kemik iliği gibi organların kesi yüzeyine veya organın bir parçasına lam değdirilerek uygulanan **baskı yöntemi** (impression yöntemi) ile dokunun yapısı hakkında bilgi edinilebilir

Smearlerde hücreler canlı hale göre daha büyüktür ve hücresel ayrıntı daha rahat izlenir. Kesitsel tekniklere ek olarak smearler kullanılabilir.

3-Kesitsel Yöntemler:

- Birçok kesitsel yöntem vardır. Seri kesitlerin alınması ile dokunun üç boyutlu yapısı hakkında bilgi edinilebilir. Doku büyük ise belli aralıklarla kesit alınır. Bu yöntem **basamaklı kesit alma** olarak bilinir.
- Taze veya tespit edilmiş dokulardan jilet ile mikrotomsuz kesit alınabilir, boyanabilir.

- Mikrotom kullanarak uygulanan kesitsel yöntemlerde uygun kıvama getirilen dokular parafin, selloidin veya sentetik rezinlere gömülür.
- Ya da dondurma uygulanabilir. Dondurma kesitler taze dokulardan alındığı için tespit gerekli değildir.
- Histolojik kesitler genellikle 4-7 μm kalınlığında alınır.
- Yağ damlacıkları, sinir lifleri ve kan damarları gibi büyük yapılar için 10-25 μm lik kesitler alınabilir.
- Rezinlere gömülen dokulardan 1 μm lik kesitler alınabilir.
- Elektron mikroskopik gözlemler için 50-100 nm'lik çok ince kesitler alınırken eğitim için özel mikrotomlarla 300-400 μm lik çok kalın kesitler de alınabilir.

- Dişler, kemik gibi sert dokuların kesit alınmadan önce dekalsifiye edilmeleri gerekir.
- Matriks bileşeni çalışılacaksa dekalsifiye edilmemiş örnekler gömme ortamlarına gömülerek ağır mikrotomlarla kesit alınarak incelenir.
- Mikroskobik inceleme için kesitlerin boyanması gerekir.
- Dokuların renklendirilmesi, renkli boyalar veya floresansı artıran boya ile, renkli son ürünler oluşturan kimyasal reaksiyonlarla veya ağır metal tuzları dokuya çöktürülerek yapılabilir.

RUTİN HİSTOLOJİK TAKİP

- 1-Parça alma
- 2-Tespit
- 3-Sudan kurtarma
- 4-Şeffaflandırma
- 5-Gömme
- 6-Kesit alma
- 7-Boyama
- 8-Kapatma

PARÇA ALMA:

Parçalar ölümden, biyopsiden ve cerrahi işlemde hemen sonra veya en kısa zamanda alınmalıdır. Büyük parçalar, dokunun ezilmesini önlemek için çok keskin bistüri veya jiletle daha küçük parçalara ayrılmalıdır. Parçaların kalınlığı 2-4 mm'yi (1 mm³) geçmemelidir.

- **TESPİT:**

- Canlı öldüğünde içerdiği katabolik enzimler nedeniyle otoliz olmaya başlar. Bu olay, ölüm sonrası bozulma (postmortem dejenerasyon) olarak bilinir.
- Otolizde hücre içi enzim hareketleri değiştiğinden proteinler yıkılarak hücreler sıvı hale geçer. Otoliz, soğukta geçiktirilir, 37 °C'de hızlanır. 57 °C'de otoliz tamamen durur. Otolizde beyin, böbrek gibi iyi farklılaşmış organlar, elastik ve kollajen fibrillere göre daha çok etkilenir.

Tespitin (fiksasyonun) amacı:

- 1-Hücre ve dokuların canlı hale en yakın biçimde muhafaza etmektir. Ancak bu tam gerçekleştirilemez.
- 2-Otolizi, bakteriyel bozuma ve çürümeyi önlemek.
- 3-Kolaylıkla diffüzyon olan maddelerin kaybını önlemek.
- 4-Sağlığa zararlı kötü etkilere karşı dokuyu kuvvetlendirmek.
- 5-Dokunun boyalarla ve diğer reaktiflerle boyanmasını kolaylaştırmak.

FİKSASYONUN UYGULANMASI:

- Fiziksel (ısı, kurutma ve dondurma) ve kimyasal yolla yapılabilir. **Isı ile fiksasyon**, bozulmaya yol açtığından artık kullanılmamaktadır. **Kurutma ile fiksasyon**, kan ve kemik iliği yaymalarında kullanılır. **Dondurma ile fiksasyon**, lipitler, enzimler ve ameliyat parçalarının hızlı tespitinde kullanılır. Dondurulan örnekler aynı zamanda sertleştiğinden hemen dondurma mikrotomu ile kesit alınır.
- Kimyasal fiksasyon en çok uygulanan yöntemdir. Çeşitli kimyasal maddeler kullanarak **fiksatif** adı verilen çözeltiler hazırlanır. Alınan örnekler ya fiksatife atılır (daldırma=immersiyon yöntemi) ya da anestezi altında organı besleyen arter yolu ile önce serum fizyolojik verilerek damardaki kan boşaltılır ardından fiksatif verilerek organ daha vücutta iken kısmen tespit edilir.

TESPİT AJANLARI

A-Sıvı Tespit Ajanları

- **Absolu etil alkol:** Glikojeni iyi korur ancak çekirdek ayrıntıları kaybolur ve sitoplazma büzülür.
- **Soğuk aseton:** Lipazlar ve fosfatazlar gibi enzimlerin çalışılmasında kullanılır. Çekirdek ayrıntıları kaybolur ve sitoplazma büzülür ve glikojen iyi korunmaz.
- **Formaldehit:** Ticari olarak % 40'lık formaldehit olarak bulunur. Proteinleri presipite etmez diğer hücre bileşenlerini ise kısmen presipite eder

- **Gluteraldehit:** Formaldehitten daha yavaş etkiler ve daha pahalıdır. Elektronmikroskopi ve enzim histokimyasında çok kullanılır. Elektronmikroskopide OsO_4 'den önce 1. fiksatif olarak kullanılır. Fikse edilen örnekler çözeltide aylarca saklanabilir. **Trikloroasetik asit:** Sülfür grubu amino asitleri iyi korur. Dekalsifiye ajanı olarak kullanırlar.
- **Asetik asit:** Tek olarak kullanılmaz. Dokuya hızlı ve iyi işler ancak alyuvarların lizisine yol açar, kollajen fibrilleri şişirir. Nükleoproteinleri çöktürür. Bazı sitoplazmik granüller üzerine çözücü bir etkiye sahiptir.

B-KATI TESPİT AJANLARI

- **Civa Klorür:** Çok zehirli ve metallere korozivdir. Kaplar ve kapaklar kesinlikle metal olmamalıdır. Metal aletler parafine daldırılarak kullanılmalıdır. Dokuya hızla etki eder ve dokuyu sertleştirir. Dokuyu biraz büzer. Proteinler üzerine etkilidir. Hem çekirdeği hem de sitoplazmayı iyi tespit eder.

- **Potasyumdikromat:** Çözeltinin pH'sı fiksasyonu etkiler. pH=3.4-3.8 iken sitoplazma ve mitokondri iyi korunurken, nükleoproteinler iyi korunmaz. Daha asidik olduğunda hem çekirdek hem sitoplazma mitokondri harabiyeti ile birlikte presipite olur.
- **Kromik Asit:** % 2'lik çözeltileri kullanılır. karbohidratları tespit eder.

- **Pikrik Asit:** Isıtılırsa patlayıcı özelliği vardır. Suda oda ısısına % 1 oranında çözünür. Fiksasyonda suda doymun çözeltisi kullanılır. Fiksasyondan sonra alkole alınmalıdır.
- **Osmyum tetroksit:** 0.25-0.5 ve 1 g lık ampüllerde satılan sarı renkli kristalli bir maddedir. Kristalin ve çözeltinin dumanı göze ve solunum yollarına zararlıdır. Çalışmalar çeker ocakta yapılmalıdır ve sıkı gözlük kullanılmalıdır. Isı ve ışık etkisi ile çözelti siyahlaşır