

HİSTOLOJİK ÇALIŞMALAR İÇİN DOKU ÖRNEKLERİ ALMA VE İŞLEME PROSESİ

Sirin FİRİDİN – SUMAE

Histolojik çalışmalar, genel olarak çeşitli organlardan doku kesitleri alınarak bu örneklerin histo-patolojik yönden değerlendirilmesini kapsamaktadır. Diğer canlıların dokularında olduğu gibi balıklarda da hastalıklı doku örnekleri histoloji laboratuvarlarında bir dizi işlem neticesinde incelenmektedir.

Histoloji canlıyı oluşturan elemanların yapısını mikroskopik düzeyde inceleyen ve değerlendiren bilim dalıdır. Terim Yunanca olup Türkçeye “doku bilimi” olarak çevrilmektedir.

Histolojide, öncelikle organizmanın en küçük canlı birimi olan hücrenin temel yapısal özellikleri ve fonksiyonları incelenmektedir. Bunu takiben doku, organ ve sistemlerin mikroskopik yapısı ele alınmaktadır. Yapılacak çalışmalarda hayvan türleri arasındaki farklılıklar göz önüne alınarak hücrelerin yapısal ve fonksiyonel önemine göre işlemlere yön verilir.

Histoloji laboratuvarlarında dokuların incelenmek üzere hazırlanması için yapılan gereken işlemler genel olarak yedi aşamadan oluşur. Bunlar;

- Tespit (Fiksasyon)
- Suyunu alma (Dehidratasyon)
- Saydamlaştırma
- Parafinle muamele (Parafinizasyon)
- Blok hazırlama
- Kesit hazırlama ve
- Boyama işlemleridir.

Tespit

Histolojik preperasyon için alınacak doku örneğinde özellikle dikkat edilmesi gereken faktörlerden birisi, örneğin alınıp fiksasyona konma sürecidir. Tespit işleminde öncelikli hedef, dokuyu olabildiğince hızlı ve bozmadan stabil hale getirmektir.

Tespit işleminde çeşitli amaçlara göre farklı solüsyonlar kullanılır. Rutin olarak en çok kullanılan solüsyon formalin solüsyonudur. İdeal tespit için %10'luk konsantrasyonda kullanılması yeterlidir. Formalin dışında

kullanılan diğer bazı solüsyonlar şunlardır:

- * %2'lik gluteraldehit solüsyonu
- * %70–90 etanol solüsyonu
- * Bouin solüsyonu
- * Zenker solüsyonu

Solüsyon seçimi dokunun özelliğine bağlı olarak değişebilir. Örneğin yağ bakımından zengin dokuların tespitinde alkol uygun değildir.

İdeal bir tespit için;

Dokunun hacminin 10 katı miktarda tespit solüsyonuna gereksinim vardır. Materyalin konulduğu kabın hacminin buna göre belirlenmesi gerekmektedir. Ayrıca, tespit olan dokular sertleşeceklerinden, bunların konulduğu kapların ağız kısımlarının materyalin sertleştikten sonra, parçalanmadan, kolaylıkla çıkarılmasına olanak verecek genişlikte olması gerekir. Materyallerin konulduğu kapların, tespit solüsyonunun buharlaşmasını ve dökülmesini önleyecek şekilde kapaklı olması gerekmektedir. Büyük materyaller solüsyon üzerinde yüzecek şekilde bırakılmamalı, bunların bütün yüzeylerinin solüsyonla temas etmesini sağlamalıdır. Bunun için gerekirse üzerlerine dokuya zarar vermeyecek şekilde ağırlık konularak bekletilmesi gerekmektedir. Bu aşamanın süresinin bir gecedan az olmaması gerekmektedir.

Suyunu Alma (Dehidratasyon)

Dokuların mikrotom yardımıyla birkaç mikron kalınlığında kesilebilmesi, dokunun sert olması halinde mümkün olur. Bu amaçla öncelikle doku içindeki suyun alınıp su yerine alkolün geçmesi sağlanmalıdır. Daha sonra alkol alınıp yerine ksilol ve en son olarak ksilol alınıp yerine parafin geçirilir. Her bir basamakta tutma süresi doku türüne ve uygulanacak boyama yöntemine göre değişmektedir. Bu süre 15 dakika ile 1 saat arasındadır.

Saydamlaştırma

Kesit alma öncesi uygulanan ikinci aşama dokudaki alkolü alıp yerine ksilol

geçirme işlemidir. Ksilol yağları eritir ve dokuyu saydamlaştırır. Biz çalışmalarımızda balık dokusuna daha uygun olduğunu gördüğümüz creostat adı verilen maddeyi ksilolle karıştırarak bu uygulamayı yapmaktayız. Bu aşamada da süre dokunun özelliğine bağlı olarak değişmektedir.

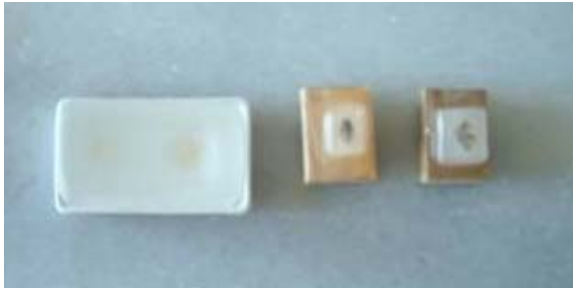
Parafinizasyon

Bu aşamada dokular kullanılan parafinin özelliğine bağlı olarak 58-65 °C sıcaklıktaki parafin içinde en az 2 saat bekletilir. Böylece dokulardaki ksilol yerine parafin geçirilir.

Kemik örnekleri bu işlemlerden geçirmeden önce içerindeki kalsiyum alınarak yumuşatılmalıdır. Bu işlem için özel olarak hazırlanmış %5'lik formik asit veya %8'lik HCL + %10'luk formik asit karışımı kullanılır. Bu işleme *dekalsifikasyon* denir.

Blok hazırlama

Sertleştirilen dokuların kesilecek yüzleri alt tarafa gelecek şekilde parafin içine gömülerek bloklar hazırlanır. Hazırlanan bloklar soğuduktan sonra kesilmeye hazır hale gelir.



Kesit hazırlama

İçerisinde doku bulunan parafin blok, mikrotom olarak adlandırılan dilimleyici alete monte edilerek kesilir. Bloktan kesilen kesitler

35–40°C sıcaklıktaki su banyosuna (benmari) atılır ve kesilme esnasında kıvrılan dokunun düzgün bir şekilde yayılması sağlanır. Düzgün doku lam yardımıyla sudan alınır. Lamlar etüvde bekletilir. Bu sırada doku içindeki parafin erir ve akar. Lam üzerinde sadece doku kesiti kalır.

Boyama

Lam üzerine alınan doku kesitinin boyanabilmesi için öncelikle parafinden kurtarılması gerekmektedir. Bu amaçla preparatlar tüm parafini temizlemek ve dokuyu saydamlaştırmak üzere en az 1,5 saat ksilolde tutulur. Daha sonra absolu alkolden başlamak suretiyle alkol serilerinden geçirilir. Bundan sonra gerekli boyama yöntemleri uygulanır.

Boyanmamış parafin kesitlerde çoğu doku elemanı renksizdir. Işık mikroskobu ile histolojik yapıyı ayırt etmek oldukça güçtür. Bu nedenle doku kesitlerinin boyanması gerekir. Boyama, çeşitli hücre ve doku kısımlarının boyaları farklı şekilde tutmaları esasına dayanır.

Boyaların çoğu suda, bazıları ise alkol veya asetonda eritilerek hazırlanır. Tek bir boyama yöntemi ya da çoğu zaman birkaç boyama yöntemi bir arada kullanılarak boyama gerçekleştirilir. Histoloji ve patoloji laboratuvarlarında rutin olarak genellikle hematoksilin-eosin birleşik boyama yöntemi kullanılmaktadır. Ama dokunun özelliğine bağlı olarak da farklı boyamalar yapılabilir.

Biz kendi laboratuvarımızda bu boyama yönteminin dışında PAS, AZAN, May-Giemsa gibi birleşik boyama yöntemleri de kullanılmaktayız. Bu yöntemlerden hangisinin kullanılacağına dokunun özelliğine ve araştırılan doku kesimine bağlı olarak karar verilmektedir.

Burada anlatılan işlemler genel olarak yapılan histolojik çalışma prosesi olmakla birlikte balık dokusu üzerinde bazı değişiklikler de içermektedir. Dokunun takibi ve kullanılan boyalar balık dokusuna uygun olarak seçilmelidir. Genellikle kullanılan farklı olarak balık dokularının boyanmasında kullanılan eosin boyası içeriğinde Ploxine B ve Eosin Y boya da bulunmalıdır.

Boyanan örnekler daha sonra entellan adı verilen özel bir madde ile kapatılarak kurumaya bırakılır.

Dokulardan alınan kesitler üzerinde uygulanan bu işlemler dizisi neticesinde hazırlanan preparatlar mikroskop altında incelenmeye hazır hale gelmiş olur.

