

SAĞLIK BİLİMLERİ SERİSİ VII

Patoloji ve Histoloji Laboratuvarı Uygulama Kitabı

Tayfun Ceylan & Mehmet Alparslan Ünal



KAPADOKYA
ÜNİVERSİTESİ
YAYINLARI



SAĞLIK BİLİMLERİ SERİSİ VII

PATOLOJİ VE HİSTOLOJİ LABORATUVARI
UYGULAMA KİTABI

Yazarlar

Tayfun CEYLAN

Mehmet Alparslan ÜNAL



2020

Kapadokya Üniversitesi Yayınları: 15
Sağlık Kitapları Serisi: 7
ISBN: 978-605-80032-4-8 (basılı)
ISBN: 978-605-80032-2-4 (elektronik)
DOI: <https://dx.doi.org/10.35250/kun/9786058003224>
URL: <https://hdl.handle.net/20.500.12695/327>
© Ocak 2020

PATOLOJİ VE HİSTOLOJİ LABORATUVARI UYGULAMA KİTABI
YAZARLAR: TAYFUN CEYLAN & MEHMET ALPARSLAN ÜNAL

© Copyright, 2021, KAPADOKYA ÜNİVERSİTESİ YAYINLARI
Sertifika No: 43348



Bu eser [Creative Commons "BY-NC-SA" \(Atıf-GayriTicari-AynıLisanslaPaylaş\) Lisansı](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/) ile lisanslanmıştır. Bu lisans, kullanıcıların eser sahibine atıf vermek koşuluyla eseri sadece ticari olmayan amaçlar için kullanmalarına ve uyarlamalarına izin verir. Buna ek olarak kullanıcıların eseri uyarlamaları halinde uyarlamayı aynı veya uyumlu bir lisans kapsamında başkalarıyla paylaşmaları koşulunu getirir.

Seri Editörü: Vesile Şenol
Hakem: Esra Balcıoğlu
Redaktör: Elif Özge Koç
Kapak Tasarım: Nazile Arda Çakır
Sayfa Tasarımı: Adem Şenel

Ceylan, Tayfun. & Ünal, Mehmet Alparslan. *Patoloji ve Histoloji laboratuvarı uygulama Kitabı*
Nevşehir: Kapadokya Üniversitesi Yayınları.
126 s, 195x270 mm.
ISBN: 978-605-80032-2-4 (elektronik)
DOI: <https://dx.doi.org/10.35250/kun/9786058003224>
Anahtar Kelimeler: 1. Patoloji, 2. Histoloji, 3. Laboratuvar, 4. Uygulama, 5. Sağlık teknikeri.



KAPADOKYA
ÜNİVERSİTESİ

50420 Mustafapaşa, Ürgüp, Nevşehir
yayinevi@kapadokya.edu.tr
kapadokyayayinlari.kapadokya.edu.tr
0(384) 353 5009
www.kapadokya.edu.tr

ÖN SÖZ.....	9
1. BÖLÜM: PATOLOJİ LABORATUVAR UYGULAMALARI	11
1. LABORATUVARDA UYULMASI GEREKEN KURALLAR.....	11
2. IŞIK MİKROSKOBUNUN TANIMI ve KULLANIMI.....	12
2.1. Laboratuvar konusu : Hücreyi Tanıma	13
3. IŞIK MİKROSKOBU İÇİN RUTİN PREPARAT HAZIRLAMA TEKNİĞİ	15
3.1. Parça alınması	15
3.2. Tespit (Fiksasyon).....	15
3.3. Sudan kurtarma (Dehidratasyon)	19
3.4. Şeffaflandırma (Clearing).....	19
3.5. Parafine gömme	20
3.6. Kesit alma	21
3.7. Boyama	27
3.8. Kapatma	27
4. DOKU TAKİP YÖNTEMLERİ.....	28
4.1. Elle Doku Takibi	28
4.2. Doku Takip Cihazı ile Doku Takibi.....	29
4.3. Kapalı sistem doku takip cihazlarının özellikleri ve avantajları	30
4.4. Doku takip cihazında doku takip uygulaması	30
5. DOKULARIN PARAFİNE GÖMÜLMESİ	30
5.1. Parafin Serilerinin Hazırlanması.....	30
5.2. Parafin Kalıplarının Hazırlanması	31
5.3. Doku Gömme Maddeleri	31
5.4. Dokuları gömme yöntemleri.....	31
5.5. Parafin ile Bloklama	34
6. ETÜV	35
7. FROZEN KESİT	35
8. DİSTİLE SU	38
9. DOKU TAKİBİ AŞAMALARI.....	39
9.1. Canlı dokudan parça alma	39
9.2. Tespit (fiksasyon).....	39
9.3. Sudan kurtarma (dehidratasyon).....	39
9.4. Şeffaflandırma.....	39
9.5. Parafinizasyon.....	39
9.6. Blok Hazırlama.....	39
9.7. Kesit Hazırlama.....	39

10. ARTİFAKT.....	42
11. KEMİK DOKUSU VE DEKALSİFİKASYON	44
11.1. Dekalsifikasyon.....	44
11.2. Asit Dekalsifikasyon Sıvıları	45
11.3. Elektrolitik Dekalsifikasyon	46
11.4. Kelatlama Ajanları.....	46
11.5. Dekalsifikasyonu Test Etmek	47
11.6. Dekalsifikasyon Sonrası İşlemler	47
11.7. Yüzey Dekalsifikasyonu	48
11.8. Dekalsifiye Edilmemiş Kesitlerin Hazırlanışı	48
11.9. Testereleme ve Bileme Yöntemi	49
11.10. Selofan Bant Yöntemi.....	49
11.11. Dekalsifiye Dokuda Osteold'in Gösterimi	51
11.12. Kemik İliği.....	52
12. KESİTLERDE KULLANILAN BOYAMA YÖNTEMLERİ ve ÖZELLİKLERİ.....	52
12.1. Laboratuvar konusu : Epitel hücresinin boyanması.....	53
13. HEMATOKSİLEN & EOZİN BOYAMA.....	55
14. MASSON TRİKROM BOYAMA.....	62
15. PAS (PERİODİK ASİT SCHIFF REAKSİYONU)	66
16. MALLORY AZAN.....	69
17. VERHOEFF BOYASI (elastik dokular için).....	71
18. VAN GIESON	73
19. ALCIAN BLUE & VAN GIESON	76
20. GIEMSA.....	78
21. PAPANICOLOAU BOYAMA (PAP).....	80
2. BÖLÜM: HİSTOLOJİ UYGULAMALARI.....	85
1. EPİTEL DOKUSU (Örtü epiteli).....	85
1.1. Tek Katlı Yassı Epitel	85
1.2. Tek Katlı Kübik Epitel	86
1.3. Tek Katlı Prizmatik Epitel.....	87
1.4. Yalancı çok katlı prizmatik epitel.....	88
1.5. Çok Katlı Yassı Epitel	89
1.6. Çok katlı yassı epitel (Keratinsiz)	90
1.7. Çok katlı prizmatik epitel	91
1.8. Çok katlı değişici epitel.....	92
2. BEZ EPİTELİ.....	93
2.1. Tek hücreli bez (goblet hücresi).....	93
2.2. Basit Tübüler Bez.....	94
2.3. Seröz Bez.....	95
2.4. Müköz Bez (Serö-müközbezler).....	96
2.5. Bileşik Tübuloalveoler Bez	97
2.6. Yağ bezi	98
2.7. Tat tomurcukları.....	99

3. BAĞ DOKU	100
3.1. Müköz Bağ doku	100
3.2. Gevşek Bağ Doku	101
3.3. Düzensiz Sıkı Bağ Doku	102
3.4. Düzenli Sıkı Bağ Doku.....	103
3.5. Elastik Bağ Doku	104
3.6. Yağ Doku.....	105
4. KAN DOKUSU	106
4.1. İnsan kanı	106
4.2. Kurbağa kanı (yayma preparat)	107
5. KIKIRDAK DOKUSU.....	108
5.1. Hyalin kıkırdak.....	108
5.2. Elastik kıkırdak.....	109
5.3. Fibröz kıkırdak.....	110
6. KEMİK DOKUSU	111
6.1. Kompakt kemik	111
6.2. Süngerimsi kemik.....	112
6.3. Kondral kemikleşme	113
6.4. Desmal kemikleşme	114
7. KAS DOKU	115
7.1. İskelet Kası.....	115
7.2. Kalp Kası.....	116
7.3. Düz Kas.....	117
8. SİNİR DOKU	118
8.1. Piramidal Hücreler	118
8.2. Purkinje Hücreleri	119
8.3. Periferik Sinir	120
8.4. Ganglion	121
8.5. Meisner Korpuskülü.....	122
8.6. Pacini Korpuskülü	123
9. DERİ VE EKLERİ	124
9.1. Kılılı Deri, Kılısız Deri	124
9.2. Ter Bezi, Yağ Bezi.....	125
KAYNAKÇA	126

Resim 1: Işık mikroskobu	12
Resim 2: Işık mikroskobu üzerinde preparat.....	12
Resim 3: Işık mikroskobunu oluşturan temel yapılar	13
Resim 4: Parça alınması	15
Resim 5: Doku gömme cihazı ile parafine gömme	21
Resim 6: Mikrotom ile kesit alma	22
Resim 7: Mikrotom	23
Resim 8: Su banyosu.....	26
Resim 9: Lam ve lamel	27
Resim 10: Doku takip cihazı	29
Resim 11: Pens	33
Resim 12: Parafin aktarım kavanozu.....	33
Resim 13: Blok L demirleri.....	33
Resim 14: Blok kalıpları.....	33
Resim 15: Etüv	35
Resim 16: Frozen kesit cihazı	36
Resim 17: Distile su cihazı.....	38
Resim 18: Takibi yapılmakta olan dokular.....	39
Resim 19: Takibi yapılmakta olan dokular.....	39
Resim 20: Ayrılmış doku	42
Resim 21: Katlanmış doku.....	42
Resim 22: Katlanmış doku.....	42
Resim 23: Boyama hatalı preparat	43
Resim 24: Hava kabarcığı oluşmuş preparat.....	43
Resim 25: Üst üste gelmiş lameller	43
Resim 26: Hematoksilen-Eozin boyama	56
Resim 27: Hematoksilen-Eozin boyama	56
Resim 28: Hematoksilen-Eozin boyama	56
Resim 29: Tendon, Hematoksilen-Eozin boyama.	57
Resim 30: Kompakt Kemik, Hematoksilen-Eozin boyama.	57
Resim 31: Yağ Doku, Hematoksilen-Eozin boyama	58
Resim 32: İskelet kası, Hematoksilen-Eozin boyama	58
Resim 33: Masson Trikrom boyama	63
Resim 34: Masson Trikrom boyama.....	63
Resim 35: Masson Trikrom boyama.....	63
Resim 36: Göbek kordonu, Masson Trikrom boyama.....	64
Resim 37: Fibröz kıkırdak, Masson Trikrom boyama	64
Resim 38: PAS boyama.....	67

Resim 39: PAS boyama.....	67
Resim 40: Mallory Azan boyama.....	69
Resim 41: Van Gieson boyama.....	73
Resim 42: Van Gieson boyama.....	74
Resim 43: Alcian Blue -Van Gieson boyama	77
Resim 44: Kan yayma.....	78
Resim 45: Giemsa boyama.....	78
Resim 46: PAP boyama	81
Resim 47: Smear örneđi	82

Sevgili öğrenciler,

Patoloji laboratuvarı, doku ve vücut sıvılarının mikroskopik incelemeye hazır hale gelmesine kadar tüm teknik hizmetlerin yürütüldüğü ve gerekli teknolojinin uygulandığı özel laboratuvar alanlarıdır. Bu amaçla yapılan teknik çalışmalar olası patolojik durumların tanısında kolaylık sağlayıcı olacaktır. Laboratuvarında görev alan bireylerin bu teknikleri en iyi şekilde yerine getirmeleri için gerekli çalışmaları yapmaları; organ, doku ve hücreleri mikroskopik düzeyde tanımları patolojinin olmazsa olmazlarıdır. Bu çalışmalarını yerine getirecek olan bireylerin yeterli bilgi ve donanıma sahip olması gerekmektedir.

Histoloji; hücre, doku ve organların mikroskopik yapısını tanımlayan görsel bir eğitim disiplini. Bu dersin eğitiminde teorik bilgiyle birlikte laboratuvar uygulamaları önemli bir yer tutmaktadır. Teorik derslerde öğrenilen bilgiler uygulamalar yoluyla pekişerek anlam kazanacaktır.

Hazırlanan bu kılavuzda doku takip aşamaları ile doku tiplerine ait bilgiler verilmiş ve aynı zamanda mikroskopta incelenen dokuların çizimlerinin yapılacağı boş tablolar hazırlanmıştır. Bu uygulamalar hem öğrenme açısından kolaylık sağlayacak hem de öğrenilenlerin daha anlamlı ve kalıcı olmasını sağlayacaktır. Bununla birlikte, öğrencilerin laboratuvarlara olan ilgileri de kontrol edilebilecektir.

Patoloji laboratuvarları ve benzer laboratuvarlar için hazırlanan bu kılavuzun sizlere faydalı olması en büyük temennimizdir.

Tayfun CEYLAN & Mehmet Alparslan ÜNAL

1.BÖLÜM: PATOLOJİ LABORATUVAR UYGULAMALARI

1. LABORATUVARDA UYULMASI GEREKEN KURALLAR

- Laboratuvar çalışmalarında önlük ve kapalı ayakkabı giyilmesi zorunludur. Çalışmanın niteliğine göre gerektiğinde koruyucu gözlük, eldiven ve maske takılmalıdır.
- Laboratuvarda kullanılan önlük, eldiven vs. malzemeler ile laboratuvar dışına çıkılması yasaktır.
- Laboratuvarda yemek, içmek, gıda malzemelerini bulundurmak ve laboratuvar ekipmanlarını bu amaçla kullanmak yasaktır.
- Kişisel eşyalar laboratuvar dışında tutulmalıdır.
- Çalışma esnasında saçlar uzunsa mutlaka toplanmalıdır.
- Klinik örneklerle (kan, idrar, balgam vb), kontamine ekipmana veya kontamine yüzeylere asla eldivensiz dokunulmamalıdır.
- Eldivenlerinizi çıkardıktan sonra ve laboratuvarı terk etmeden önce mutlaka eller yıkanmalıdır.
- Cam malzeme kullanımında çatlak ya da hasarlı malzemenin kullanılmaması olabilecek kesici yaralanmaların önlenmesi açısından önemlidir. Cam kırıkları asla elle temizlenmemelidir. Kırık parçaları kesici-delici kutusuna atılmalıdır.
- Laboratuvar personeli haricindekilerin laboratuvara giriş çıkışları engellenmelidir.
- Laboratuvar kapıları güvenlik açısından her zaman kapalı tutulmalıdır.
- Deri yoluyla hastalıkların bulaşma riskinden dolayı laboratuvar ortamında çalışırken açık yaralar mutlaka yara bandı ile kapatılmalıdır.
- Hiçbir kimyasal madde koklanmamalı ve tadılmamalıdır.
- Laboratuvarda çalışırken kesinlikle ağız yoluyla pipetaj yapılmamalı, puar kullanılmalıdır.
- Laboratuvar atıkları evsel atıklar ile karıştırılmamalıdır. Tüm kesici-delici aletler kesici-delici kutusuna atılmalıdır.
- Çalışma alanlarının temizlenmesi ve temizliğin yapılmasının sağlanması ilgili bölümdeki görevli teknisyenin sorumluluğundadır.
- Kullanılan malzemeleri kesinlikle kirli ve içinde kimyasal madde ile bırakmayınız.
- Laboratuvar çalışmalarından çıkan atıkları tıbbi atık kutusuna atınız.
- Laboratuvar malzemelerinin temizliği sırasında eldiven ve gerekli olması durumunda gözlük kullanınız.

2. IŞIK MİKROSKOBUNUN TANIMI ve KULLANIMI

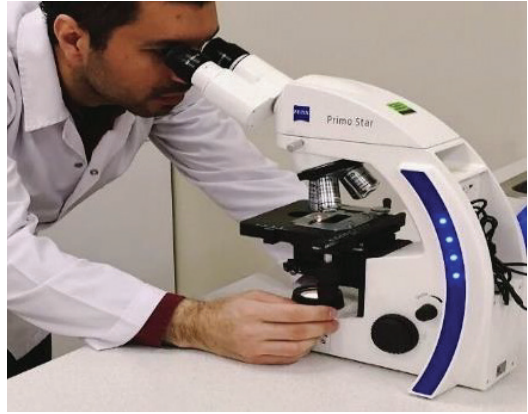
Histolojide kullanılan inceleme aracı mikroskop, aydınlatma kaynağına göre ışık ve elektron mikroskobu olmak üzere iki tiptedir. Bu uygulamada ışık mikroskobu ele alınacaktır (Özdamar ve ark., 2012).

Işık mikroskobu mekanik ve optik kısımlardan oluşmuştur. Mekanik kısım optik kısımlara destek olan parçalardan kuruludur. Mikroskop kaidesi, mikroskop gövdesi, gözlem tüpü, roveler, mikroskop tablası, makro ve mikro ayar düğmeleri, kesiti tabla üzerinde sağa, sola ve öne, arkaya hareket ettirip incelenecek dokunun objektif alanına gelmesini sağlayan **hareket kolu** mikroskopun mekanik kısımlarını oluşturur (Özdamar ve ark., 2012).

Optik kısım ise ayna veya ışık kaynağı, diyafram, kondansör, objektif ve okulerden oluşan, cismi uygun şekilde aydınlatıp büyütülmüş görüntüsünün elde edilmesini sağlayan parçalardan meydana gelmiştir (Özdamar ve ark., 2012).

Diyafram ışık kaynağından gelen ışınları toplayıp tutar ve ışık demeti haline getirir. **Kondansör** ışık demetini kırar ve cisim üzerine gönderir. Cismin büyütülmesinde esas görev objektif ve okuler merceklerine aittir. **Objektif mercekleri** çok sayıdadır ve hepsi tüpün alt ucundaki dönebilir bir bölüm üzerine yerleştirilmiştir. Her bir objektifin büyütme gücü birbirinden farklıdır. Objektif üzerinde, örneğin 20/0.65-160/0.17 sayıları bulunabilir. Bu sayıların anlamları şöyledir; 20: objektifin büyütme gücü; 0.65: nesnedeki yapıların ayırım gücü; 160: objektifin kullanıldığı tüpün uzunluğu (mm); 0.17: kesitte kullanılması gereken lamelin kalınlığı (mm). Üzerinde X100 yazan objektif **immersiyon objektifidir**. İmmersiyon objektifi kullanılırken, preparat ile objektif arasına immersiyon yağı damlatılır. Böylece, cisimden geçip objektife gelmeden sapan kenar ışınlarının objektifte toplanarak cismin daha fazla büyütülmesi sağlanır. **Okulerler**, tüpün göze gelen tarafında bulunan mercek sisteminden oluşur. Okulerin sayısına göre mikroskoplar monokuler (tek okulerli) ve binokuler (çift okulerli) gibi adlarla anılırlar (Özdamar ve ark., 2012).

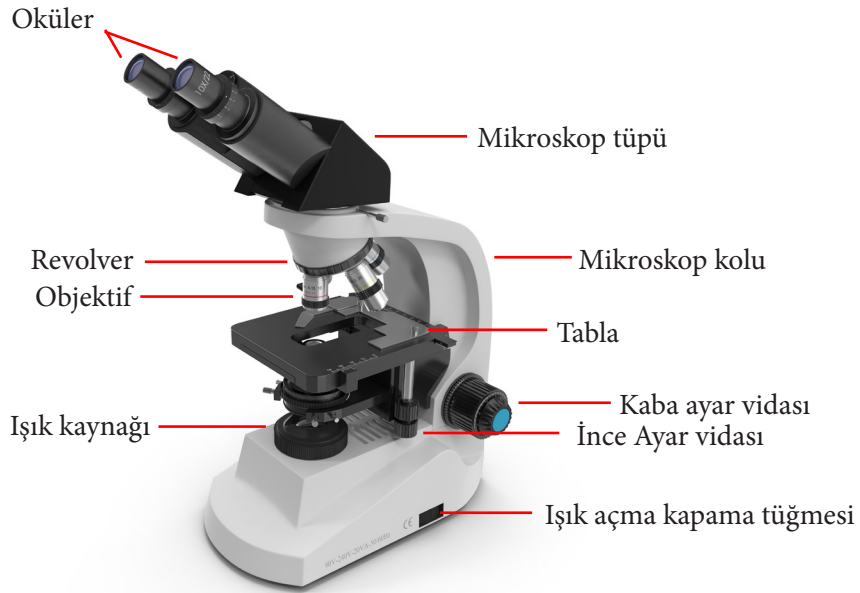
Bir cismin büyütülme miktarı, kullanılan objektifin büyütme gücü ile okulerin büyütme gücünün çarpımıyla elde edilir. Örneğin objektif 20, okuler 10 büyütme gücünde ise, final büyütme $20 \times 10 = 200$ 'dür ve büyütme X200 olarak gösterilir (Özdamar ve ark., 2012).



Resim 1: Işık mikroskobu
(Yazarın kendi çektiği fotoğraf)



Resim 2: Işık mikroskobu
üzerinde preparat
(Yazarın kendi çektiği fotoğraf)



Resim 3: Işık mikroskopunu oluşturan temel yapılar
(Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel)

2.1. Laboratuvar konusu : Hücreyi Tanıma

İncelenecek doku veya organ : Soğan zarı

Amaç:

Bu laboratuvarın amacı hücrenin genel yapısını tanımaktır. Ayrıca diğer bir amaç hipotonik, izotonik ve hipertonic ortamda hücre şeklindeki farklılıkları ayırt etmektir.

Beceri:

Gözlem, karşılaştırma, preparat hazırlama, mikroskop kullanımı

Gerekli malzemeler:

Lam, lamel, damlalık, pens, bıçak, su, tuz.

Yöntem:

- 1- Lam üzerine bir damla distile su damlatılır.
- 2- Soğan kesilerek katmanlarındaki zar pens yardımıyla ayrılır.
- 3- Küçük bir parça soğan zarı lamdaki su üzerine koyulur.
- 4- Mikroskopta inceleme yapılır.
- 5- Daha sonra soğan zarı hipertonic ve hipotonik ortamlarda bekletildikten sonra aynı işlemler tekrarlanır.
- 6- Mikroskop altında, izotonik, hipotonik ve hipertonic ortamlarda bekletilmiş soğan zarında bulunan hücrelerin membran ve genel şekilleri karşılaştırılır.

Tablo 1: Soğan zarına ait hücreleri izotonik, hipotonik ve hipertonic ortamda incelenmesi

3. IŞIK MİKROSKOBU İÇİN RUTİN PREPARAT HAZIRLAMA TEKNİĞİ

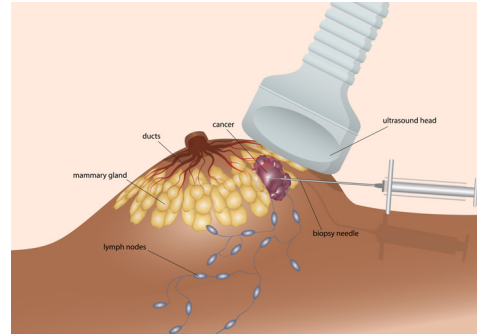
Birçok histolojik tekniğin bulunmasına karşın, histolojide en çok kullanılan teknik cansız (ölü) dokuların incelenmesini sağlayan parafin tekniğidir. Bu teknikte, doku ve hücrelerin incelenmesi tespit edilmiş ve boyanmış ince doku kesitleri üzerinde yapılır. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğrenci laboratuvarında kullanılan preparatlar bu teknikle hazırlanmaktadır.

Bu teknikte sırası ile;

1. Parça alınması
2. Tespit (fiksasyon)
3. Sudan kurtarma (dehidratasyon)
4. Şeffaflandırma (clearing)
5. Parafine gömme
6. Kesit alma
7. Boyama
8. Kapatma işlemleri uygulanır.

3.1. Parça alınması

İnsandan veya deney hayvanlarından biyopsi, otopsi veya operasyondan sonra elde edilen dokular en kısa sürede tespit solüsyonu içine alınmalıdır. Eğer dokular uzun süre fiksatife konmadan bekletilirse, postmortem (ölüm sonrası) bozukluklara neden olan otoliz ve bakterilerin üremesi görülecektir. Ayrıca, alınan doku parçaları keskin bir bistüri ile dikkatlice kesilip küçültülerek fiksatife konmalıdır.



Resim 4: Parça alınması (Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel)

3.2. Tespit (Fiksasyon)

Dokuları tespit etmek için kullanılan maddelere fiksatif adı verilir. Dokuların fiksatife konmasının nedeni canlı haldeki yapılarına en yakın şekilde korunmasını sağlamaktır. Bu, kimyasal bileşikler yardımıyla hücresel yapıların çözünmez duruma getirilmesiyle elde edilir. Bu nedenle fiksatif, doku içine çok çabuk difüze olmalı ve otolitik değişiklikleri engellemelidir. Ayrıca, fiksatif dokudaki kokuşmayı önlemeli, dokuyu sertleştirmeli ve boya elemanlarına karşı dokunun affinitesini artırmalıdır. Histolojik tekniklerde pek çok fiksatif kullanılmaktadır. Bunlar genellikle vücut pH'sına yakındır ve izotoniktir. En çok kullanılan fiksatifler %10'luk formalin, tamponlanmış nötralformalin, Carnoy, Zenker, Bouin, B5 ve alkol-formol karışımlarıdır.

3.2.1. Tespitin (Fiksasyonun) amacı

- 1- Hücre ve dokuların canlı hale en yakın biçimde muhafaza etmektir. Ancak bu tam gerçekleştirilemez.
- 2- Otolizi, bakteriyel çürümeyi önlemek.

- 3- Kolaylıkla difüze olan maddelerin kaybını önlemek.
- 4- Sağlığa zararlı kötü etkilere karşı dokuyu kuvvetlendirmek.
- 5- Dokunun boya ile ve diğer reaktiflerle boyanmasını kolaylaştırmak.

Fiksasyonda doku proteinleri ve yapı taşları koagüle olur. Böylece takip sırasında madde kayıpları ve diffüzyonları en aza iner. Ancak koagülasyon, dokularda artifakta yol açacaktır. Bir fiksatif, takip sırasındaki harap edici etkilere karşı koruyucu olmalıdır. Taze dokular suda yıkanırsa hücreler patlar. Önce tespit uygulanırsa yıkamanın etkisi olmaz.

Fiksasyonla proteinler, tuzlar, karbohidratlar veya lipidler çöktürülür ve doku sertleşir, katılaştır. Doku sertleştiğinden ince kesitlerin alımı kolaylaşır. Fiksatifteki kimyasalların etkisiyle enzimler inaktifleşir veya muhafaza edilir. Fiksatif seçilirken, dokunun boyutu, tipi, tazeliği ve uygulanacak boya bilinmelidir. Bir fiksatif bütün dokular ve boyalar için ideal değildir.

3.2.2. İyi Bir Fiksatifin Özellikleri

- 1- Hücre ölümü sonrası bozulmalarını önlemek için hücre içine çabuk difüze olmalıdır.
- 2- Hücre içeriğini (sitoplazmadaki protein, lipid, karbonhidrat ve diğer maddeleri) erimeyen maddeler biçiminde ve çok iyi çöktürmelidir.
- 3- Dokuyu daha sonra yapılması gerekli işlemler sırasında büzülmeden korumalıdır
- 4- Bazı hücre kısımlarının boya ile özel olarak boyanabilmesini sağlamalıdır.

3.2.3. Başarılı Fiksasyon İçin Nelere Dikkat Edilmelidir?

1. Ölümünden ve operasyondan sonra alınan örnekler hemen fiksatife atılmalıdır. Örnekler, ışık mikroskopi için kalp durmasından en geç 30 dakika, elektron mikroskopide ise 4 dakika sonra fiksatife alınmalıdır.
2. Fiksatifde kullanılan kimyasallar taze olmalı, titizlikle tartılmalı ve karıştırılmalıdır.
3. Doku parçaları mümkün olduğu kadar küçük olmalıdır.
4. Fiksatif, doku hacminin en az 10 katı, formalin için 20 katı olmalıdır.
5. +4°C'de fiksasyon önerilir. Düşük ısılar fiksatifin dokuya işleyişini azaltırsa da otolizi önlediğinden doku iyi tespit edilir.
6. İçi boş organlar tespit çözeltisi ile doldurulmalıdır. Böylece tespit çözeltisi dokuya her iki yüzden işler ve iç yüzün düzgün yüzey şekli korunmuş olur.
7. Kırışma ve katlanma olasılığı olan dokular mantar plakalar üzerine gerilmelidir.
8. Kaba önce fiksatif konmalı, parçalar sonra daldırılmalıdır. Yoksa dokular kaba yapışır ve yapışma yerinden tespit çözeltisi dokuya işlemez.
9. Yağdan ve havadan zengin dokular tespit çözeltisinde yüzdükleri için kaset içine alınarak tespit çözeltisine batması sağlanmalıdır.

10. Tespit çözeltilisinin dokuya işleyişini hızlandıran işlemlerden kaçınılmalıdır. Yüksek ısı tespit çözeltilisinin dokuya işleyişini hızlandırırken aynı zamanda otolizi de hızlandırır.
11. Kullanılan tespit çözeltilisinin dokulara işleme hızı bilinmelidir. Alkol 5 mm kalınlığındaki bir dokuyu 5 saatte, % 4'lük formalin 4 mm'lik dokuyu + 4 °C'de 5 saatte tespit eder.
12. Özel amaçlar dışında doku 24 saatten fazla tespit edilmemelidir.
13. Tespit çözeltisi ne hipotonik ne de hipertonic olmalıdır. Osmolaritesi canlı dokunun osmolaritesi (300 mosl) ve ölü dokudakine (450 mosl) uygun olmalıdır. Tespit edilmeyen doku su ile kesinlikle yıkanmamalıdır.
14. Tespit çözeltilisinin pH'sı dokunun pH'sına yakın olmalıdır (pH=6-8). Bu nedenle tamponlanmış formalinle dokuların tespit edilmesi daha uygun olur.
15. Fiksasyonda kullanılan kaplar dar boğazlı olmamalı, düz hatlı olmalıdır.
16. Doku çok sertleşmemelidir. Doku aşırı derecede sertleşirse kesit alımı zorlanır. Uzun zaman tespit çözeltilisinde kalan ve tespit çözeltilisinin buharlaşması ile sertleşen örnekler **antiformin çözeltisine** (1 g antiformin + 5 cc su veya 20 cc konsantre çözelti + 80 cc su) konarak veya doku tamamen kuruyorsa **dimetilsülfoksit** içinde yumuşatılarak tekrar çalışılabilir.

3.2.4. Histolojide En Çok Kullanılan Fiksatifler

I. %10'luk Formalin

Formaldehit	100 cc
Distile su	900 cc

II. %10'luk Formal-Salin

Formaldehit	100 cc
NaCl	8.5 g
Distile su	900 cc

III. %10'luk Tamponlanmış Nötral Formalin (pH=7.0)

Formaldehit	100 cc	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	4 g
Distile su	900 cc	Na ₂ HPO ₄	6.5 g

Formalinin nötral olması önerilir. Tampon tuzları ile nötralizasyon sağlanır. Kalsiyum karbonat kullanımı dokularda pseudokalsifikasyona yol açabilir. Ticari formaldehit bazen paraformaldehit oluşumu ile bulanıklaşır ve çözeltilinin gücü azalır. Filtre edilirse kullanılabilir.

Formalin renksiz olmalıdır. Sarı çözeltilerde kullanılan demir kaplar nedeni ile kirlenmiştir ve Prusya mavisi reaksiyonu pozitifdir. Formalin % 10'luk olarak hazırlanır. Hazırlama için çeşme suyu, serum fizyolojik veya tamponlar kullanılır. Bu çözeltiler % 4 oranında formaldehit içerir. Formalinde dokular aylarca hatta yıllarca kalabilir. Dokunun

bazık boyalarla boyanmasında biraz kayıp olur. Bazı gümüş çöktürme yöntemlerinde ise sonuçlar daha iyi olabilir.

İnce bloklar 24-48 saatte iyi fikse olabilir ancak optimum fiksasyon 7-10 gündür. Kandan zengin dokularda kanla asit formalinin etkileşmesi sonucu kahve renkli ekstraselüler **formalin pigmenti** artifaktı oluşabilir. Nötral tamponlanmış çözeltiler kullanarak pigmentten kurtulunur. Genellikle ölü dokularda görülür ve saklandıkça artar. Kesitleri pikrik asitin alkolde doyurulmuş çözeltisinde 20 dakika bırakarak uzaklaştırılabilir.

Formalin mikro-anatomik fiksatifdir ve birçok boyama yöntemine uygundur. Nadiren Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyanmış kesitlerde çekirdeklerin hematoksilen ile kısmen veya tamamen boyanmaması, bunun yerini eozinin alması ve çekirdek kenarlarında kayıp görülebilir. Daha çok fiksasyonu iyi yapılmış lenfoid ve epitel dokusunda nadiren post-mortem dokularda görülür. **Pembe hastalık** olarak bilinir. Bu durum %10'luk formalindeki %2'lik asetik asit kullanımı ile önlenir. Pembe hastalık oluşmuşsa kesitlerin hematoksilene aktarılmadan absolu alkolde %1'lik HCl içinde 1 saat bırakılması ile sorun çözülecektir.

Formalin buharı, bazı kişilerde gözü, solunum yolları epitellerini etkiler. Bu nedenle laboratuvarlar iyi havalandırılmalıdır. Saklama kaplarının ağzı sıkıca kapatılmalıdır, korezyona dirençli kaplar kullanılmalıdır. Eldiven veya etkili krem bariyer kullanımı formalin dermatitini önler.

Formalin, ideal bir fiksatif olarak önerilse de çekirdek şişmeleri oluşabilir. Asetik asit formalini ile ikinci fiksasyon uygulanırsa bu olumsuz etki ortadan kaldırılır ve H&E ile parlak boyanma sağlanır. Formalin, kromatları formik asitle oksitleyeceğinden kromatlarla kullanılmamalıdır.

Formalinden çıkan bloklar %70'lik alkole alınabilir veya frozen kesitler alınabilir.

IV. Alkol Formalin Çözeltisi

Nötralize edilmiş formalin	10 cc
%95'lik alkol	90 cc ¹

Bu fiksatifte parçalar 2-4 saatte tespit olur. Doku kalınsa buzdolabında 24 saatte tespit önerilir. **Polisakkaritler** için iyi bir fiksatifdir.

V. Zenker Fiksatif (Zenker-1894)

Civa klorür	5 g
Potasyum dikromat	2.5 g
Sodyum sülfat	1 g
Distile su	100 cc
Asetik asit	5 cc (kullanımdan hemen önce eklenir)

Sitoplazma ve fibriller iyi korunur. Taze materyel için daha uygundur. Eritrositleri iyi korumazlar. Bloklar 3-8 saatte tespit olur. Fazla dikromatı uzaklaştırmak için çeşme suyuyla yıkanır. Civa pigmenti önceden açıklandığı gibi uzaklaştırılabilir.

VI. Bouin Fiksatif (Bouin-1897)

Suda doyurulmuş pikrik asit	75 cc
Formaldehit	25 cc
Asetik asit	5 cc

VII. Carnoy Fiksatif (Carnoy-1887)

Absolü alkol	60 cc
Kloroform	30 c
Asetik asit	10 cc

3.3. Sudan kurtarma (Dehidratasyon)

Fiksasyonu tamamlanmış dokuların ilk takip aşamasına dehidrasyon (dehidratasyon) denir. Tespitten sonra suyun ve bazı sıvıların uzaklaştırılması gerekir. Dehidrasyonda genellikle alkol ve aseton kullanılır. Dokular genellikle fazla miktarda su içerir. Bu suyun çıkarılmasıyla erimiş parafin doku parçalarının boşluklarına girebilir. Tespitten çıkarılan dokular genellikle yıkanır. Ardından %30-50'lik etil alkolle başlayarak %60-70-80-96-100'lük etil alkolden birer saat geçirilir. Böylelikle dokular büzülmeden sudan kurtarılır. Embriyonik dokular gibi hassas dokularda dehidrasyonun %30'luk etil alkol basamağından başlaması önerilir.

Doku takibinde dehidrasyon işleminin yetersiz olması, doku takibi işlemlerinin kalitesini düşürür ve sonuçta yumuşak dokular elde edilir. Aşırı dehidrasyon ise sert, kırılğan, zor kesit alınan dokular elde edilmesine neden olur (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2013).

3.3.1. Dehidrasyonda kullanılan maddeler

Etil alkol: En çok kullanılan dehidrasyon maddesidir. Berrak, renksiz, kolay alev alabilen, orta derece toksik ve organik çözeltiler ile karışabilen bir sıvıdır. Hızlı etkili ve hidrofilik bir maddedir. Etil alkol, dehidrasyon için yükselen konsantrasyonlarda kullanılmalıdır (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2013).

Metanol: Biraz pahalı ve tehlikeli bir dehidranttır (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2013).

Aseton: Şeffaf, renksiz, yanıcı, keskin kokulu ve diğer dehidrantlara göre daha uçucudur. Etanol ve metanolden daha hızlı hareket eder. Dokuların asetonda uzun süre bırakılması, dokuları gevrekletirir (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2013).

Bu maddelerle çalışırken muhakkak kişisel koruyucu güvenlik önlemleri alınmalıdır.

3.4. Şeffaflandırma (Clearing)

Bu terim, dehidratlayıcı ajanı uzaklaştırmak için seçilmiş sıvının uygulanmasından sonra dokuların görünümünü ifade etmektedir. Doku bu işlemle yarı şeffaf hale getirilir. Bir şeffaflayıcı ajandan esas beklenen hem dehidrantla hem gömme ajanı ile karışabilir olma özelliğidir.

3.4.1. Şeffaflandırıcı ajanı seçerken şunlara dikkat edilmelidir:

1. Alkolü uzaklaştırma hızı
2. Erimiş gömme ortamı ile uzaklaştırılmasının kolaylığı
3. Dokulara karşı nezaketi
4. Yanıcılık
5. Toksikite
6. Fiyat

Yanıcı olduklarından dikkatli kullanılmalıdır. Otomatik takip aletleriyle işlemde geniş ve dens bloklar için süre uzatılmalı ancak küçük parçalar etkilenmemelidir. Şeffaflandırmada, ksilen, toluen, kloroform, benzen, karbontetraklorür, propilen oksit, karbondisülfid, amilasetat, sedir yağı, karanfil yağı trikloroetilen kullanılabilir. Genellikle 2-3 değişim bu sıvılardan geçirilerek dokular şeffaflandırılır ve parafinin işlemesine uygun hale getirilir.

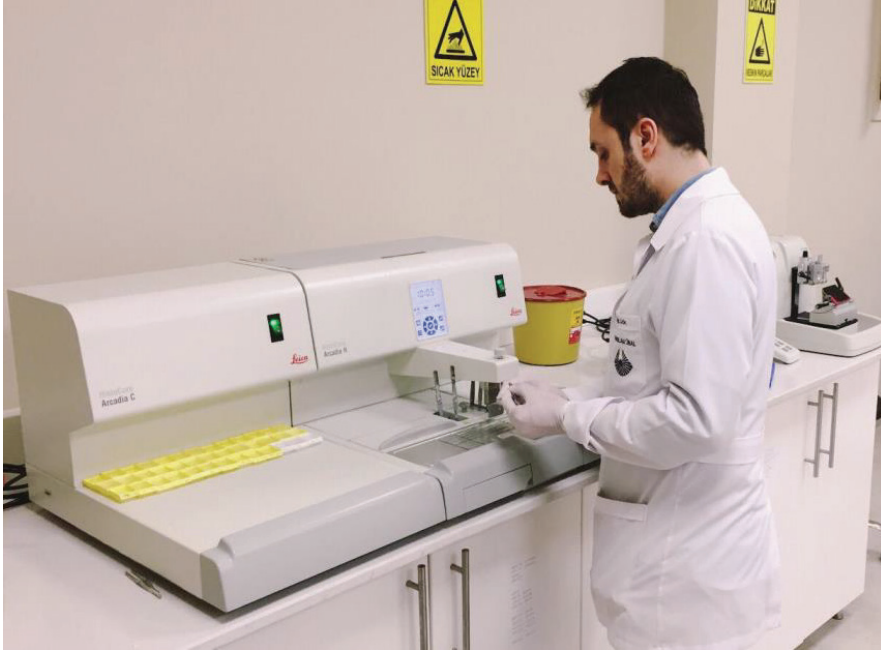
3.5. Parafine gömme

Gömme ortamı olarak parafin, selloidin, selloidin-parafin kullanılabilir. Amaç, dokuları yarı sert ve kolayca kesilen materyal içine yerleştirmek ve şeffaflandırıcı ajanı dokudan uzaklaştırmaktır. Parafin en çok kullanılan gömme ajanıdır. Uygun takip hızı ve seri kesit için uygun kıvamı vardır. İstenilen kalınlıkta kesit alınabilir. Erime derecesi 45-50 °C olan parafin yumuşaktır. 55-58°C'lik ise daha serttir. Ortam ısısı, gömülecek materyelin yapısı ve kesit kalınlığına uygun parafin seçilmelidir. Sıcak iklimde 45°C'lik parafinle 3-5 µm lik kesit almak zordur.

55-58°C'lik parafin etüvündeki 3 kap erimiş parafinden geçirilen örnekler cam veya fayans üzerinde L-biçimli **Leuckhart plakları** ile hazırlanan kalıplara yerleştirilir. Kalıba önce erimiş parafin, ardından istenilen yönde doku yerleştirilir ve tekrar kalıp parafinle doldurulur. Bir etiket yerleştirilerek soğumaya bırakılır.

3.5.1. Gömme Hataları:

1. Parafin dokuya işlememişse bloklar iyi kesilemez, yırtılır.
2. Sıvı parafin çok sıcak ise doku büzülür.
3. Hızlı hareket edilmezse hava kabarcıkları, kristaller oluşabilir.



Resim 5: Doku gömme cihazı ile parafine gömme
(Yazarın kendi çektiği fotoğraf)

3.6. Kesit alma

Mikrotom cihazıyla doku parçasını içeren parafin bloklarından 5-10 mm kalınlıklarında kesitler alınır. Bunun için, mikrotomda kullanılan bıçağın çok keskin olması ve uygun açıda kullanılması şarttır. Kesitler, jelatin solusyonu ihtiva eden 40-50 °C'lik su banyosuna atılırlar.

Jelatin, kesitlerin lamlara yapışmasına yardım eder. Böylece su banyosuna atılan kesitler ısının tesiri ile açılırlar. Sonra birer birer lamlara alınarak kurumaya terk edilirler.

3.6.1. Dokuların kesilmesi sırasında dikkat edilmesi gereken kurallar

- 1- Bloklar tıraşlanmış (trimlenmiş) olmalıdır.
- 2- Ilık suya alınmış kesitler buruşmuş olmamalıdır. Bir boyama kabına distile su ve %95'lik alkol (5 ml %95'lik alkol, 95 ml su) karışımı koyup, sıcak suya almadan önce kesit bu solusyonda yüzdürülürse buruşma engellenebilir.
- 3- Su banyosunun ısısı gömme maddesinin erime derecesinin biraz altında olmalıdır (47-51°C). Bu şekilde, hem dokunun su banyosundan kolayca alınması hem de dokunun açılmaması sağlanmış olur.
- 4- Dokunun, boyanması sırasında lamdan düşmemesi sağlanmalıdır. Yumurta akı ve gliserinden oluşan bir karışım, doku sudan alınmadan önce lam üzerine ince bir tabaka halinde sürülürse, bu, dokunun lama sıkıca yapışmasını sağlar. Ancak boyamadan önce bu solüsyon kurursa yumurta akı koagüle olur ve dokuyu sertleştirir.

- 5- Alınan bütün kesitlerin aynı kalınlıkta olmasına dikkat edilmeli, ondülalı, çok kalın ve çok ince kesitlerden sakınılmalıdır.
- 6- Su banyosu temiz olmalı, kesilen her bloktan sonra dikkatlice temizlenmelidir.
- 7- Kesit belirli bir hızda alınmalıdır. Hızlı kesilme kalın kesitlerin alınmasına neden olabilir.

3.6.2. Dokudan Kesit Alınması

Bloklanmış dokulardan kesit alınması mikrotom adı verilen cihazlar ile gerçekleştirilir.



Resim 6: Mikrotom ile kesit alma (Yazarın kendi çektiği fotoğraf)

3.6.3. Parafin Bloğun Tıraşlanması

Bazen bloklar geniş çaplı hazırlanmış olabilir. Bu durumda kesit şeridi geniş çıkar ve kesit almayı zorlaştırabilir. Bu durumda, bloklar yanlarından jilet veya bistüri ile tıraşlanabilir.

3.6.4. Mikrotomda doku kesitinin alınması

Mikrotom, incelenecek materyallerin görünür ışık altında (ışık mikroskobu) veya elektron ışınımı altında (transmisyonel elektron mikroskobu) incelenebilmesi için hazırlık aşamasında kullanılan önemli bir araçtır.

Mikrotom kızaklı veya rotary olabilir. Uygun şekilde mikrotoma yerleştirilen bloklardan önce üst parafin uzaklaştırılır. Sonra doku ile düzgün kesitler elde edilir.

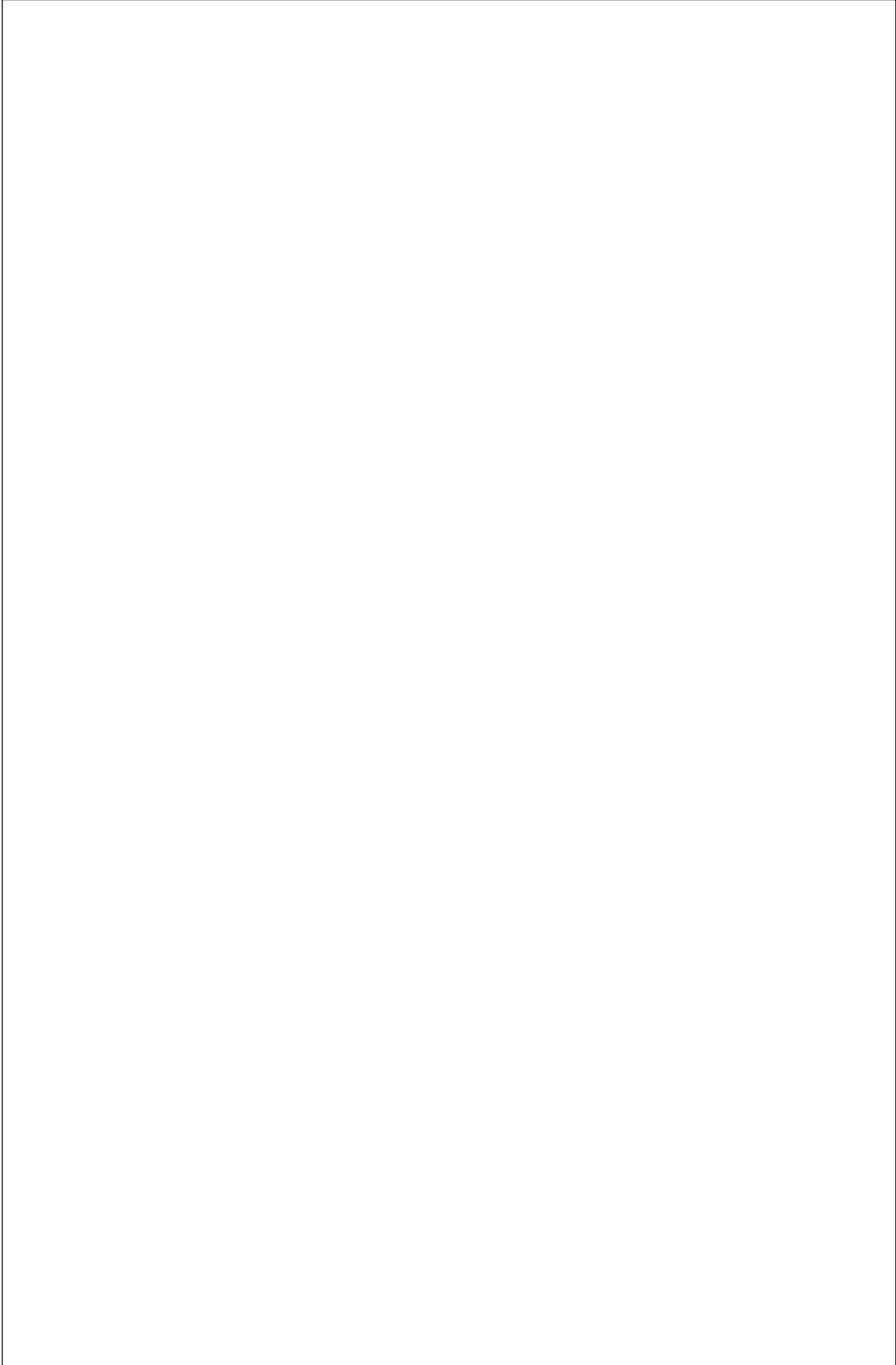
Mikrotom, alınan örneklerin son derece ince bir şekilde kesilerek incelenmesine imkân tanıyan kesme aracıdır.



Resim 7: Mikrotom (Yazarın kendi çektiği fotoğraf)

Notlar:

Notlar:



3.6.5. Kesitlerin Suya Alınması

Mikrotomda elde edilen kesitlerin lam üzerine üzerine aktarılması için önce 40-50°C'lik su banyosuna aktarılması gereklidir. Bu işlem aynı zamanda kesitteki kırışıklıkların giderilmesini de sağlar.



Resim 8: Su banyosu
(Yazarın kendi çektiği fotoğraf)

3.6.6. Kesitlerin Lam Üzerine Alınması

İncelenecek materyalimiz, sudan alındıktan sonra lam üzerinde doku ve parafin içeren kesit görünümündedir. Dokunun lama sabitlenmesi ve parafinin dokudan uzaklaştırılması için, kesitler bir gece 60°C'lik etüvde tutulur. Bu işlem sırasında bir miktar parafinde, ısının etkisi ile lam üzerinden uzaklaştırılır.

3.6.7. Kesit sırasında karşılaşılabilecek sorunlar ve olası nedenleri:

1- Bloklardan kesit alamama:

- Bıçak blok kenarına paralel değildir
- Bıçak kör olabilir
- Parafin sert olabilir
- Bıçak eğimi fazla olabilir
- Kesitler çok kalın olabilir

2- Kesitler pürüzlü ve kıvrık çıkarsa

- Blok yüzeyi üçgen şekilli veya yamuk olabilir
- Blok kenarı bıçak kenarına paralel olmayabilir
- Bıçak ucu kör olabilir
- Parafin homojen değildir.

3- Kesitler pürüzlü ve kıvrık çıkarsa

- Bıçak kör olabilir
- Parafin blok oda ısısından dolayı yumuşak olabilir
- Bıçağın kenarında parafin kalabilir
- Kesit mikronu çok inceye ayarlanmış olabilir
- Mikrotom setinin vidaları gevşek olabilir

4- Kesitlerde yırtılma veya dökülme oluyorsa

- Doku tespiti yetersiz olabilir
- Yetersiz dehidratasyon ve şeffaflandırma olabilir
- Parafin dokuya yeteri kadar penetre olmamış olabilir
- Parafin ısısı infiltrasyon ve gömme için çok sıcak olabilir

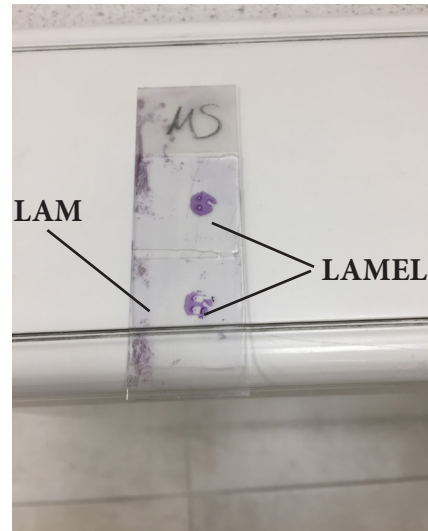
- 5- **Şeritlerde yarıklar veya uzunlamasına tırtıklar oluşuyorsa**
 - Bıçak ucu çentikli olabilir
 - Bıçak ucu kirli olabilir
 - Bıçak çok fazla eğimli olabilir
 - Parafin veya doku içinde yabancı cisimler (kum, cam v.s.) bulunabilir
- 6- **Kesitler bıçaktan yukarı kalkıyorsa**
 - Bıçak eğimi çok dik olabilir
 - Bıçak kör olabilir
 - Parafin çok yumuşak veya oda sıcak olabilir
- 7- **Kesitler bıçağa yapışuyorsa**
 - Statik elektriklenmeden olabilir
 - Bıçak kenarı kirli veya kör olabilir
 - Bıçak eğimi çok dik olabilir
- 8- **Çeşitli kalınlıklarda kesitler çıkıyorsa**
 - Blokler çok geniş olabilir
 - Blokler çok sert olabilir
 - Mikrotom ayarı doğru olmayabilir
 - Bıçak tutucu setin vidaları veya bıçak tutucu vidalar sıkı olmayabilir
 - Bıçak gerekli eğim açısında olmayabilir

3.7. Boyama

Boyanmamış doku elemanları renksizdir ve detaylar ayırt edilemez. Farklı morfolojik elemanların ışık mikroskopunda ayırt edilebilir hale gelmesi için dokuların boyanması gereklidir. Boyama işlemine geçmeden önce parafinin uzaklaştırılması ve dokunun rehidrate edilmesi sağlanır. Parafinin uzaklaştırılması için dokular önce birkaç kapta ksilol içerisinde geçirilir; rehidratasyon için de %100'lük alkolden başlayıp %50'ye inen alkol serilerinden geçirilip suya alınır. Daha sonra boyama işlemine başlanır. Histolojide doku elemanlarını boyamak üzere pek çok teknik vardır. En çok kullanılan boyama yöntemi H&E dir. Bu teknik ile nükleus mavi-mor, sitoplazma pembe-kırmızıya boyanır. Ayrıca periodik asit-Schiff (PAS), Van Gieson, Masson Trikrom, Mallory Azan boyaları da sıklıkla kullanılmaktadır.

3.8. Kapatma

Boyanmış preparatların korunabilmesi için lamel ile kapatılması, bu işlemin son basamağıdır. Önce doku üzerine Kanada balzamu (entellan) damlatılır,



Resim 9: Lam ve lamel
(Yazarın kendi çektiği fotoğraf)

sonra üzerine hava kabarcığı kalmayacak ve dokuyu zedelemeyecek şekilde lamel kapatılarak kurumaya bırakılır.

4. DOKU TAKİP YÖNTEMLERİ

Doku takip işlemleri, manuel (el takibi) ve ototeknikon (doku takip cihazı) cihazlarında otomatik olarak yapılır (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2015).

4.1. Elle Doku Takibi

Etüvde ısıtılmış takip çözeltileriyle dehidratasyon, seffaflaştırma ve parafinizasyon etüvde yapılır. Doku, bir önceki işlemde yapısına diffüze olan kimyasalı bir sonraki basamaktaki solüsyon kabına taşır. Bu nedenle takip basamaklarındaki ilk kimyasallar, bir önceki basamakta kullanılan kimyasallarla fazla kirlenir. Doku takibinde kullanılan dehidratasyon (alkol), seffaflaştırma (ksilen) ve sertleştirme (parafin) solüsyonları en az iki kapta hazırlanır. Basamaklardaki son kimyasalların küçük miktarda bile kontamine olmayacak şekilde temiz olması gerekir. Dokular, solüsyonlar arası geçişlerinde iyi bir şekilde süzdürüldükten sonra bir sonraki solüsyona nakledilmelidir. Büyük dokular hacimleriyle orantılı olarak yapılarında daha fazla kimyasal bulundurur. Bu dokular nakledildiği yeni kimyasalları daha fazla kirletir. Küçük dokularda basamaklarda iki ksilen, iki parafin solüsyonu yeterli görülürken büyük doku takiplerinde bu solüsyon sayısı daha fazla olmalıdır (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2015).

Dokunun türüne ve büyüklüğüne göre;

- Basamaklarda kullanılacak kimyasal hacmine
- Kaç adet solüsyon basamağı oluşturacağına
- Basamaklarda kimyasallara uygulanacak ısı derecesine
- Basamaklarda bekleme süresine
- Doku takip süresine karar verilir.
- Kimyasal solüsyonlar hazırlanır.

Dehidrasyon işlemi için %70'lik, %90'lık ve %100'lük etil alkol serileri hazırlanır. Hassas dokular için daha düşük konsantrasyonlu etil alkol serileri hazırlanır. Daha sonra bu dokular etüvde ısınmaya bırakılır.

Şeffaflandırma işlemi için ksilen hazırlanır. En az iki ksilen kabında planlanır, doku büyüklüğüne göre bu sayı daha fazla olmalıdır. Takip işleminde ısı uygulamasına karar verilmişse etüvde ısınmaya bırakılır.

Sertleştirme işlemi için yeterli miktarda katı parafin, uygun bir kaba konarak etüvde erimesi için bırakılır.

Doku kasetleri, uygun bir sepete konur. Sepetin hazırlanan solüsyon kaplarıyla uyumlu, geniş gözenekli olmasına dikkat edilir.

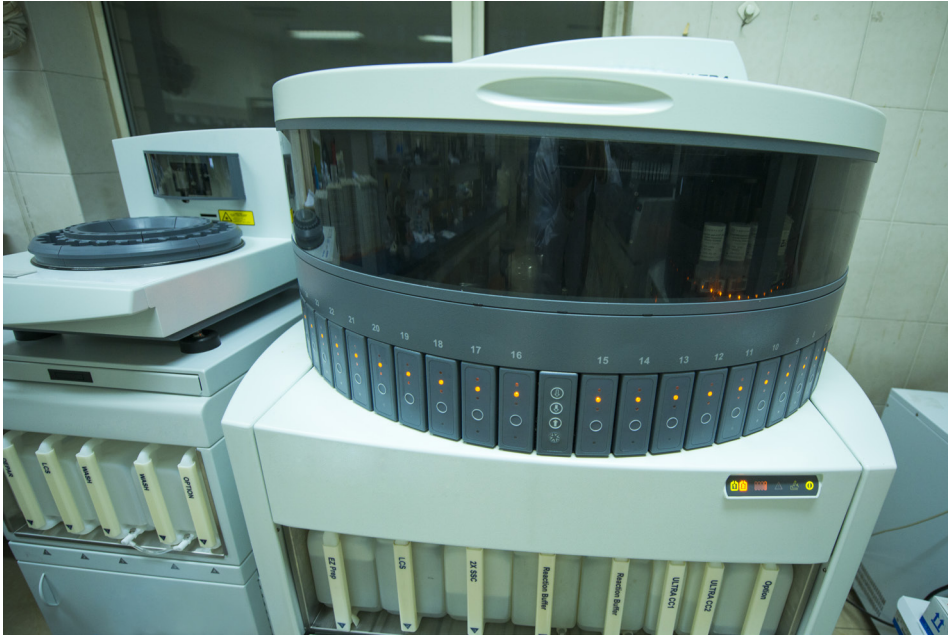
Programlanan süreye uyarak dokular solüsyonlarda sırayla bekletilir. Doku sepeti, solüsyonlarda bekletme süreleri içinde periyodik aralıklarla çalkalanır.

Doku sepeti bekleme süresi sonunda bir sonraki kimyasala nakledilir. Sepetteki solüsyonlar, nakletmeden önce iyice süzülür.

Doku sepeti, son parafinde bekletme süresi bitiminde parafinler iyice süzdürüldükten sonra çıkarılır ve doku takibi sonlandırılır. Daha sonra sepet blokama bölümüne verilir (3).

4.2. Doku Takip Cihazı ile Doku Takibi

Otomatik doku takip cihazlarında yapılan doku takibidir. Ototeknikonlar çok çeşitli olmakla birlikte genel olarak yarı kapalı ve kapalı sistem doku takip cihazları olmak üzere ikiye ayrılır (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2015).



Resim 10: Doku takip cihazı (Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel)

4.2.1. Yarı kapalı sistem doku takip cihazları

Sepet içindeki dokuların kimyasal solüsyon kaplarına otomatik transferi ile yapılır. Bu cihazlarda genellikle 9-10 kimyasal solüsyon kabı ile 2-3 parafin kabı bulunur. Cihaz, doku kasetlerini istenen sürelerde bu solüsyonlar içinde bekleterek gerçekleştirir. Bu takip sisteminde çalkalama hareketi dikey veya daireseldir. Bazı modellerinde parafin kaplarına istenirse vakum ünitesi eklenebilir (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2015).

4.2.2. Kapalı sistem otomatik doku takip cihazları

Doku takibi, cihazın reaksiyon haznesinde gerçekleşir. Doku kasetleri cihazın sepetine dizilerek bu hazneye yerleştirilir. Dokular bu haznede sabit kalır. Cihazın kimyasal

saklama haznesinde 10-12 takip solüsyon kabı, 3-4 parafin kabı bulunmaktadır. Cihaz otomatik olarak kimyasal sıvıları reaksiyon haznesine transfer ederek doku takibini gerçekleştirir. Çalkalama hareketi gel-git şeklindedir (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2015).

4.3. Kapalı sistem doku takip cihazlarının özellikleri ve avantajları

- Çok sayıda dokunun takip işlemini yapabilme
- Kullanılan kimyasallarla oluşan toksik gazların zararını ortadan kaldırması
- Yükleme boşaltmanın kolay ve temiz yapılması
- Vakum, basınç, ısı, mekanik karıştırma işlemlerini uygulayabilmesi
- Bilgisayar programları sayesinde çok sayıda ve değişik doku takip programlarını uygulayabilmesi (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2015).

4.4. Doku takip cihazında doku takip uygulaması

- Cihazın kimyasal solüsyonları (alkol, ksilen, parafin ve yıkama solüsyonları) ve seviyeleri kontrol edilir. Eksik olan sıvılar tamamlama çizgilerine kadar tamamlanır. Kirli kimyasallar yenilerek cihaza yüklemesi yapılır.
- Cihaza flush programı uygulanıp uygulanmadığı kontrol edilir. Cihaza flush işlemi her doku takibi bitiminde yapılmalıdır.
- Doku sepetleri hazırlanır.
- Reaksiyon haznesinin kapağı açılır.
- Doku sepetlerinin reaksiyon haznesine yüklemesi yapılır.
- Reaksiyon haznesinin kapağı kapatılır.
- Monitörden fonksiyon butonlarıyla program girişi yapılır ve cihaz çalıştırılır.
- Cihaz çalışmaya başladığında reaksiyon haznesi kontrol edilir.
- Doku takip süresi dolduğunda cihaz reaksiyon haznesi kapağı açılır.
- Doku kaset sepetleri çıkarılarak bloklama bölümüne alınır.
- Cihaza flush programı uygulanır (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2015).

5. DOKULARIN PARAFİNE GÖMÜLMESİ

Doku bloklaması, gömme ya da bloklama olarak adlandırılır. Dokuların infiltrasyon ortamı ile kaplanmasıdır. Parafin, doku içine girdikten sonra blok yapılmaya başka bir deyişle parafin içine gömülmeye hazırdır. Parafin bloklama işlemleri laboratuvar olanaklarına göre elle doku bloklama ve doku bloklama cihazında bloklama şeklinde gerçekleştirilir (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2015).

5.1. Parafin Serilerinin Hazırlanması

Gömme materyalini iyice emmiş olan doku örnekleri yine aynı materyal içerisine gömülür. Bu amaçla özel kalıplar içerisine emdirme materyali doldurulur. Sıvı durumdaki bu materyalin içine kesit yapılacak yüzleri tabana gelecek şekilde doku örnekleri yerleştirilir. Eğer parafin kullanılıyorsa işlem çok hızlı yapılmalıdır. Zira oda ısısında parafin

hızla sertleşir. Bu işlem, farklı bir teknikle desikatör içerisinde yapılır. Plastik madde (akrilik, epoksi) kullanılıyorsa emdirmede kullanılan saf plastik madde sertleştirici katılarak özel kalıplara doldurulur içerisinde doku örnekleri gömülür ve bu halleriyle polimerizasyona bırakılır (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2015).

5.2. Parafin Kalıplarının Hazırlanması

Günümüzde neredeyse tüm patoloji laboratuvarlarında gömme aleti bulunmaktadır. Bu alette parafini sıvı halde tutan hazne, gömmenin yapıldığı parafinin donmasını önleyen sıcak tabla ve blokları sertleştirmek için soğuk tabladan oluşur. Parafini sıvı halde tutan haznedeki sıvı parafin kasete akıtılır. Penset kullanılarak rutin histolojik basamaklardan geçirilen doku örneklerinin gözlenmek istenen yüzeyleri zemine gelecek şekilde yerleştirilir. Kasetin kenarına protokol kayıt numaraları yazılarak soğuk tablaya aktarılır. Ondan sonra bu bloklar mikrotomla kesit alınmaya kadar buzdolabında daha da sertleşmesi için saklanır (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2015).

5.3. Doku Gömme Maddeleri

Mumlar, epoksi reçineler, selloidin, histoplast, parafin vb. maddeler, doku bloklamasında kullanılan maddelerdir. Ancak rutin histopatolojik çalışmalarda en sık parafin kullanılır. Parafinler, kolay kullanılabilmesi, dokuya az zarar vermesi, kısa sürede bloklana bilmesi ve doku özel işlemlerinin yapılmasına olanak sağlaması nedeniyle tercih edilir. Mikrotomda doku kesiti sırasında performansı iyileştirmek için bloklamada kullanılan parafine ilaveten bal mumu, kauçuk, plastik vb. ticari maddeler katılabilir. Bu maddeler, donmuş parafin bloka şu özellikleri kazandırır:

- Bal mumu; sertlik ve kesit slaytlarının birbirine yapışkanlığını artırarak uzun kesit şeridi elde etme özelliğini artırma
- Kauçuk; kırılabilirliği azaltma ve kolay seri kesit yapma
- Plastikler; blokun sertlik ve destekliğini artırma

Parafinin özellikleri, erime noktasına göre değişir. Erime noktası arttıkça parafin sertleşmektedir; bu da özellikle küçük dokularda seri kesit alınmasını zorlaştırmakta, sert dokularda ise daha iyi desteklik sağlamasına neden olmaktadır. Patolojide rutin işlemlerde kullanılan parafinin erime noktası 55-58°C'dir. Sıcaklık derecesi fazla olan parafin döküm sırasında blok demiri arasından sızmasına; ısı düşük parafin ise blokta hava kabarcığı oluşmasına neden olur. Parafin kazanının derecesi, parafinin erime noktasına göre ayarlanır. Parafin kazanındaki ve dispenserdeki parafin miktarları kontrol edilir ve eksiğe yeterli miktarda parafin eklenerek döküm işleminden önce erimesi sağlanır (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2015).

5.4. Dokuları gömme yöntemleri

Doku bloklaması, gömme ya da bloklama olarak adlandırılır. Dokuların infiltrasyon ortamı ile kaplanmasıdır. Parafin doku içine girdikten sonra blok yapılmaya başka bir

deyişle parafin içine gömülmeye hazırdır. Parafin bloklama işlemleri laboratuvar olanaklarına göre elle doku bloklama ve doku bloklama cihazında bloklama şeklinde gerçekleştirilir (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2015).

5.4.1. Elle Parafine Gömme

Elle doku bloklama aşağıdaki araç ve gereçler kullanılarak gerçekleştirilir.

I. Dispenser

Parafin eritme cihazıdır. Isı ayarlı katı parafin eritme haznesine sahiptir. Isı ayarı, kullanılan parafinin erime derecesinin üzerinde ayarlanır ve dökümde devamlı sıcak parafin sağlar. Katı parafinin cihaza yüklemesi yapılarak dökümden önce erimesi sağlanmalıdır (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2015).

II. Parafin dağıtma kabı

Dispenser'den alınan sıcak parafini nakletmede kullanılan kulplu kaptır (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2015).

III. Pens

Dokunun kasetten alınması, bloklara nakledilmesi ve pozisyon verilmesinde kullanılır (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2015).

IV. Blok L demirleri ve kalıplar

Parafin blok kalıbı oluşturmada kullanılan 'L' şeklinde veya kalıp şeklindeki demirlerdir (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2015).



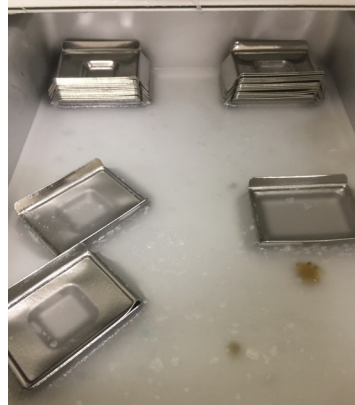
Resim 11: Pens



Resim 12: Parafin aktarım kavanozu



Resim 13: Blok L demirleri



Resim 14: Blok kalıpları

Bloklamada dikkat edilecek hususlar:

- Demir kalıp içine parafin dikkatsizce dökülürse donmuş blokta hava kabarcıkları meydana gelir. Kesit alırken parafin ufalanır ve dokular parçalanır.
- Bloklar katılaşmadan blok demirlerinden çıkarılması, blokların şeklinin bozulmasına yol açar.
- Aynı blok içinde birbirine uzak mesafelerde gömülmüş doku parçaları, kesit almada zorluk oluşturur (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2015).

5.4.2. Doku Gömme Cihazı ile Parafine Gömme

5.4.2.1. Doku gömme cihazının bölümleri

Parafin tankı: Bloklama sırasında erimiş parafin temin edilen tanktır. Çalışmaya başlamadan önce tank parafinle doldurulur.

Parafin dispenser: Bloklamada sıvı parafin akıtan musluk ve valf sistemidir. Valf açıldığında parafinin akması sağlanır.

Doku kasetlerini bekletme tankı: Doku takibinden çıkmış doku kasetlerinin konulduğu ısıtmalı alandır.

Base mould saklama tankı: Bloklamada kullanılacak basemould'ların konulduğu ve ön ısıtmasını sağlayan alandır.

Base mould: Doku yerleştirilmesinde kullanılan değişik ebatlardaki kaplardır.

Sıcak plaka: Bloklamanın yapıldığı ısıtılmış alandır. Kalıplara akan parafinin katılaşmasını önler.

Sıcak plaka lambası: Çalışmada iyi görüş sağlamak amacıyla sıcak plaka yüzeyini aydınlatan lambadır.

Mercek: Doku incelemesi ve yerleştirme sırasında görülebilirliği artırır.

Soğuk alan: Dökümü bitmiş blokların soğumasını sağlayan alandır. Ayrıca dokuya pozisyon aldırma basemould'un tabanındaki sıvı parafin biraz katı hâle getirmek için kullanılan alandır.

Forseps: Doku tutmada kullanılan cihaza bağlı ısıtmalı penstir.

Forseps yerleri: Elektrikli forseps veya penslerin ısıtıldığı alandır (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2015).

5.5. Parafin ile Bloklama

En yaygın kullanılan sertleştirici maddedir. Kolay kullanılabilir olması, dokuya az zarar vermesi nedeniyle tercih edilmektedir. Parafin, petrolden elde edilmektedir. Patolojide rutin işlemlerde parafinin erime noktası 58-60°C'dir. İyi bir infiltrasyon için;

- Doku, parafinde optimum sürede kalmalıdır. Fazla kalırsa dokuda sertleşme ve büzüşmeler meydana gelir.
- Parafinin erime derecesi kaliteli bir doku takibi için her gün kontrol edilmelidir.
- Doku takibinde üç ayrı parafin kabı bulunmalı, son parafin kabında şeffaflandırıcı madde kokusu alınmamalıdır. Parafin infiltrasyonu sonunda dokuda az miktarda şeffaflandırıcı madde kalması, mikrotom kesiti sırasında dokunun ufalanmasına neden olur. Bunun için kaplardaki parafin, iş yüküne bağlı olarak sık sık değiştirilmelidir.
- Takip süresini kısalttığı için parafin ile infiltrasyon genellikle vakum ile yapılmaktadır. Ancak küçük dokularda vakum ve ısı dokulara zarar verebildiğinden küçük ve büyük dokular ayrı ayrı takip edilmelidir. Parafin takipte uygulanan vakum 400 mm/hg basıncını geçmemelidir (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2015).

6. ETÜV

İçinde belirli bir sıcaklık elde edilerek kurutma, mikrop üretme ve dezenfekte veya sterilizasyon gibi gayelerle kullanılan aletin genel adıdır etüv. Cihazlar iki kat saçtan olup, hava geçirmez özelliktedir, bir de kapağı vardır. Kurutma ve nem alma gibi fizikî hâdiseler yanında bâzı kimyevi reaksiyonlar için lüzumlu yüksek sıcaklık derecelerini elde etmek için de etüvlerden faydalanılır. Sabit sıcaklık imkânı sağlayan etüvler, parafin eritmek ve doku boyamadan önce lam üzerindeki parafinli dokudan parafinin uzaklaşmasını sağlamak içinde kullanılır.



Resim 15: Etüv

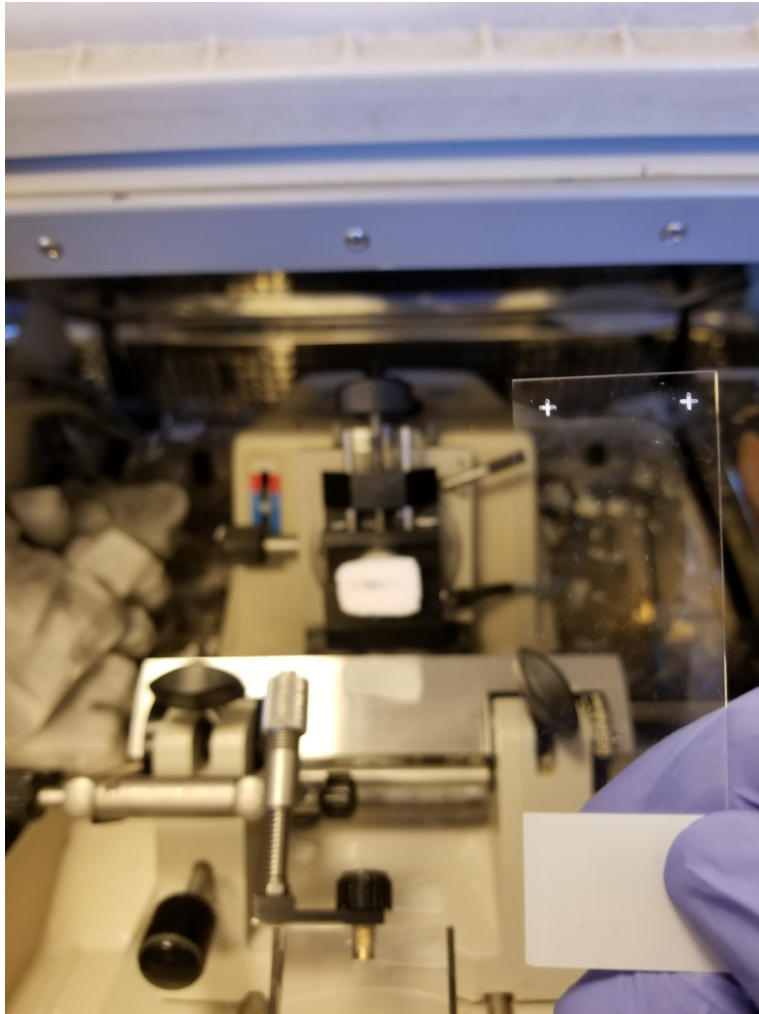
7. FROZEN KESİT

Rutin histopatolojik işlemlerin sağlıklı olarak yapılabilmesi için en az 10-15 saatlik bir süreye ihtiyaç vardır. Buda, rutin patolojik incelemeye alınan bir örneğin tanısının en iyi olasılıkla ancak bir gün sonra verilebileceği anlamına gelir. Oysa, ameliyat sırasında hastada ameliyatın gidişini değiştirebilecek bir durumla karşılaşıldığında, dakikalar içinde verilecek bir tanıya gereksinme duyulabilir. Hastanın anestezi alma süresini uzatmamaya ve yeniden ameliyata alınmasına engel olmaya yönelik bir uygulama olarak “frozen section” (dondurarak kesme) büyük hastanelerde sıkça başvurulur. Bu yöntem, dokuların istenilen incelikte kesilebilmeleri için dondurulmaları temeline dayanır. Özel bir aygıt (kriyostat) yardımıyla dokular -20°C sıcaklıkta kesilir ve hazırlanan kesitler hızlandırılmış yöntemle boyanırlar. Patolog, bu kesitleri inceleyerek vardığı sonucu ameliyatı yapan cerraha bildirir. Bütün bu işlemler, ameliyathaneye komşu bir patoloji bölümünde yapıldığında, 10-15 dakika kadar sürer. Bazı patoloji bölümlerinin ameliyathaneye içinde bu amaçla çalışan bir birimi bulunmaktadır. Dondurarak kesme yöntemiyle hazırlanan kesitlerin değerlendirilmesi güçtür ve bu işlem ancak deneyimli patoloğlar tarafından yapılabilir. Cerrahlar patoloğlardan “intraoperatif histolojik inceleme” istediklerinde, bu isteklerini mümkünse operasyondan önce, değilse operasyon sırasında

ve hasta hakkındaki tüm önemli bilgileri sunarak iletmelidirler. İletişim eksikliği, intraoperatif histolojik incelemeden istenilen verimin alınmasını engeller ve bu uygulamanın hastaya zarar vermesine bile yol açabilir (Celasun, 2015).

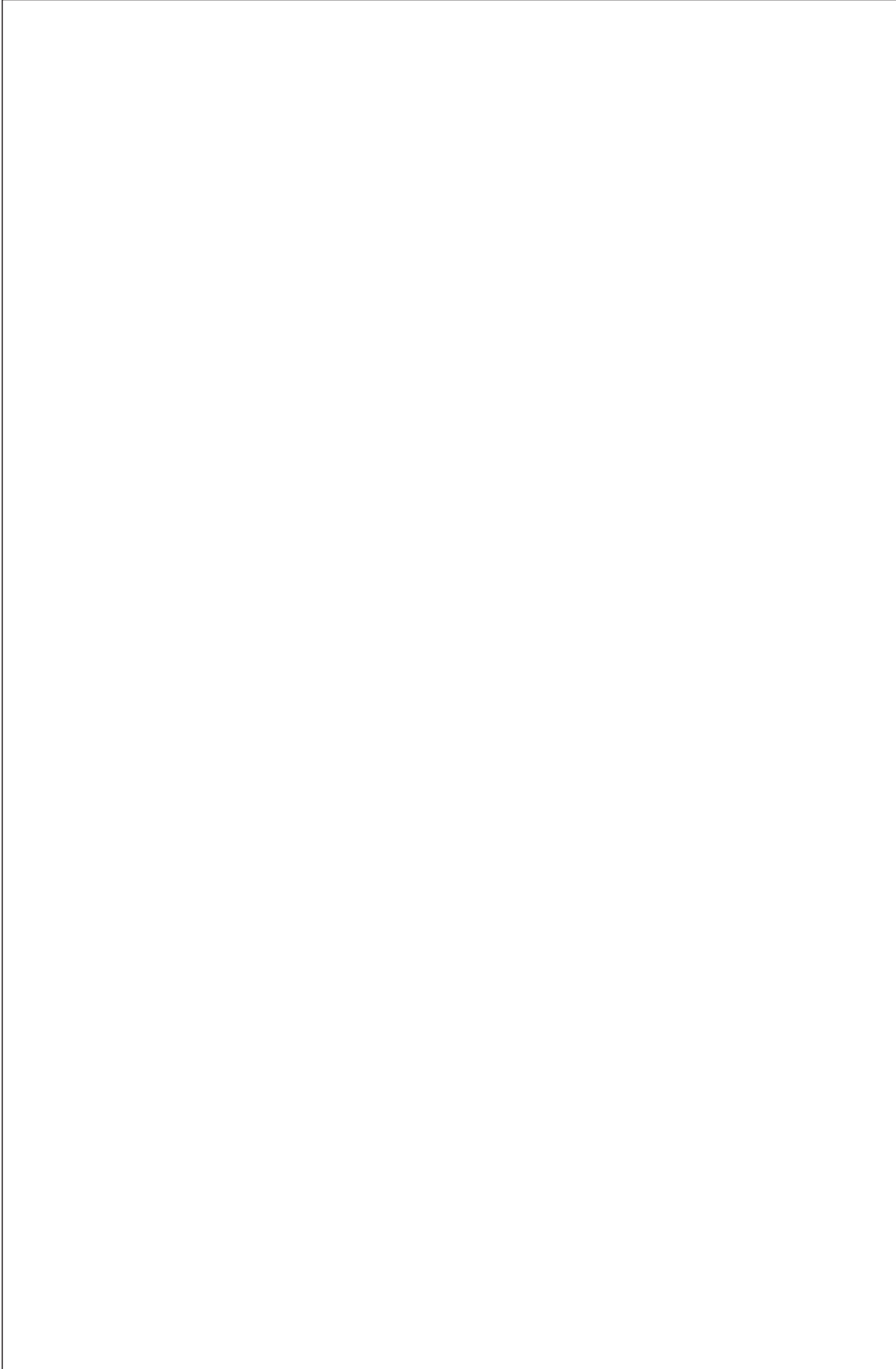
İntraoperatif tanı amacıyla frozen kesit, ince iğne aspirasyon biyopsisi ve imprint sitolojisi kullanılmaktadır. Bunlardan frozen kesit, intraoperatif tanı tekniklerinin klasığı olup 19. yüzyıl başlarından beri uygulanmaktadır. İntraoperatif tanı, patolojinin tek acilini oluşturmaktadır. Doğru tanı koymayı etkileyen faktörler; patoloğun bilgisi, laboratuvarın teknik yeterliliği ve cerrah tarafından yeterli bilgilendirme ile birlikte, uygun ve yeterli materyalin gönderilmiş olmasıdır. Literatür bilgileri, frozen kesitlerin uygun şartlarda yapıldığı ve cerrah patoloğ iş birliğinin yeterli olduğu durumlarda, %90'nın üzerinde güvenilirliğe sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Kösem ve ark., 2003).

Cryostat cihazında dondurulmuş kesit alabilmek için doku cryomatrix frozen dolgu maddesi ile kaplanır. Aşırı soğuk ortamda donması sağlanır. Dondurulmuş dokudan alınan kesitler lama aktarılır.



Resim 16: Frozen kesit cihazı
(Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel)

Notlar:



8. DİSTİLE SU

Distile su, normal çeşme suyunun belirli bir sıcaklıkta kaynatılarak içinde ki patojen maddeler ayrılıp tıbbi açıdan kullanılabilir olan su haline getirilmesi işlemidir. Aynı zaman da distile suyun kaynatılması işleminde içindeki mineral miktarı (Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi iyonlar) yani suyun sertliği de azaltılmaktadır. Distile su mineral yoğunluğu ve ph seviyesi açısından insan hayatı için damardan ya da ağızdan kullanılabilir bir su anlamına gelmemektedir. Bu suyun damardan kullanılması veya ağız yoluyla çok kullanılması halinde ölümcül sonuçlar doğurabilmektedir.



Resim 17: Distile su cihazı (Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel)

Distile Su, tıp alanının da genel de içinde patojen (vücut için zararlı olabilecek madde) olmaması nedeniyle yara temizliğinde, ilaç yapımının da kullanılır. Distile su ile deiyonize su kavramı literatür de sürekli karıştırılmakta olmasına rağmen aynı anlama gelmemektedir.

Notlar:



9. DOKU TAKİBİ AŞAMALARI

9.1. Canlı dokudan parça alma

9.2. Tespit (fiksasyon):

Formaldehitte 48 saat bekletilir (1 saat sonra trimle).

9.3. Sudan kurtarma (dehidratasyon):

Tespit edilen dokuların artan alkol serilerinde tutulması ile gerçekleştirilir (Ceylan, 2017).

Çeşme suyunda yıkama ... 2 saat

%50'lik alkol..... 1 saat

%70'lik alkol..... 1 saat (1 gece)

%80'lik alkol..... 1 saat

%90'lık alkol..... 1 saat

%96'lık alkol..... 1 saat

%100'lük alkol 1 saat

%100'lük alkol 1 saat

%100'lük alkol 2 saat



Resim 18: Takibi yapılmakta olan dokular
(Yazarın kendi çektiği fotoğraf)

9.4. Şeffaflandırma:

Ksilen..... 20 dk

Ksilen..... 20 dk

Ksilen..... 20 dk

9.5. Parafinizasyon:

Parafin (65°C) 1gece etüv içinde bekletilerek hazırlanır. Doku etüvdeki parafin serilerine alınır (Ceylan, 2017).

Parafin..... 30 dk

Parafin..... 30 dk

Parafin..... 30 dk



Resim 19: Takibi yapılmakta olan dokular
(Yazarın kendi çektiği fotoğraf)

9.6. Blok Hazırlama:

Dokular kalıplara dökülmüş eriyik parafine gömülür ve parafinin oda ısısında katılaşması sağlanır. Bloklar -20 °C'de bekletilir (Ceylan, 2017).

9.7. Kesit Hazırlama:

Mikrotomu ile 5-6 mikron kalınlığında kesitler alınır. Kesitler su banyosuna alınır (35-45 °C).

Kesitler lama yerleştirilip oda sıcaklığında kurutulur (Ceylan, 2017).

Notlar:

Notlar:



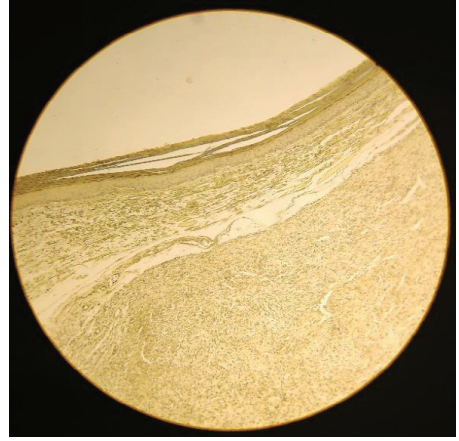
10. ARTİFAKT

Ölü dokulardan histolojik kesitlerin hazırlanması sırasında canlı dokular ile tıpatıp aynı yapıda olamayacağını unutmamak gerekir ve histolojik tekniklerin uygulanması sırasında istenmeyen değişiklikler ortaya çıkar. Bu değişiklikler **artifakt** olarak adlandırılır. Artifaktlar uygulanan tekniğin herhangi bir işlem basamağında ortaya çıkabilir. Bu yüzden, uygulanan yöntemin seçiminde, dokuda en az hasar oluşturması gerektiğine dikkat edilmelidir.

Resimde büzölmeye örnek görölmekte. Deriye ait keratin tabaka alttaki epidermisten ayrılmış ve kendi içinde parçalanmış. Derinin epidermisindeki açık alanlar artifaktır ve normal yapıda bulunmaz.

Testis dokusunda katlantılar

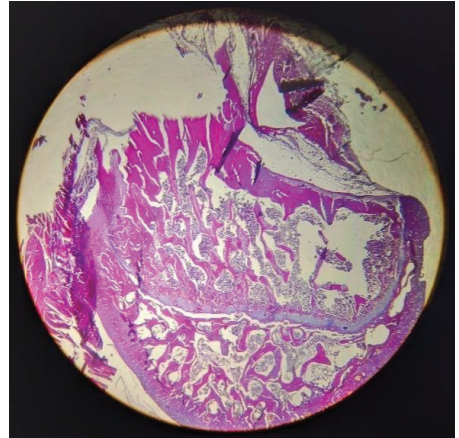
Kemik dokuda katlantı ve ayrılmalar



Resim 20: Ayrılmış doku
(Yazarın kendi çektiği fotoğraf)



Resim 21: Katlanmış doku
(Yazarın kendi çektiği fotoğraf)



Resim 22: Katlanmış doku
(Yazarın kendi çektiği fotoğraf)

Yetersiz rehidratasyon ve düzensiz boyama



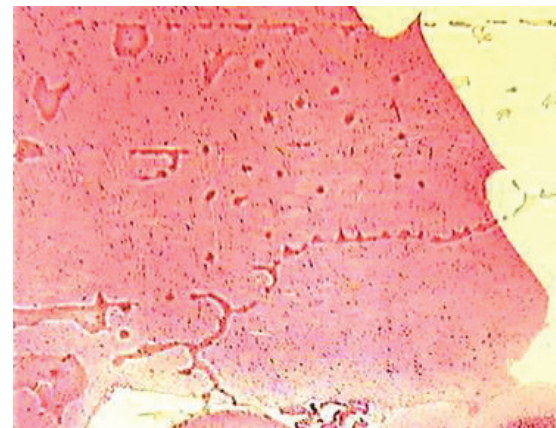
Resim 23: Boyama hatalı preparat
(Yazarın kendi çektiği fotoğraf)

Hava kabarcığı



Resim 24: Hava kabarcığı oluşmuş preparat
(Yazarın kendi çektiği fotoğraf)

Aşırı entellan ve iki lamelle kapatma



Resim 25: Üst üste gelmiş lameller
(Yazarın kendi çektiği fotoğraf)

11. KEMİK DOKUSU VE DEKALSİFİKASYON

Kemiğin mineral içeriği nedeni ile yumuşak dokular için kullanılan yöntemlerin modifikasyonlarının uygulanması gereklidir. En uygun teknik, parçanın ebatı ve yapısı, amaç, zaman ve elde mevcut olan aletlere göre değişebilmektedir.

Kemik ve patolojik olarak kalsifiye olmuş yumuşak dokuların genellikle kesit almadan önce kalsiyum tuzlarının uzaklaştırılması gerekirken dekalsifiye edilmemiş kemiklerin ve dişlerin preperasyonunun özel yöntem ve aletlerle yapılması mümkündür. Herhangi bir yöntemle dekalsifikasyon başlamadan önce, dokular iyice tespit edilmelidir. Aynı anda dokuyu tespit ettiği ve dekalsifiye ettiği farzedilen asit- fiksatif karışımları tatmin edici değildir. Histolojik araştırma için seçilen kemik hemen ince parçalara ayrılmalıdır. Bu iki nedenden dolayı gereklidir (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

- Dens doku içine fiksatifin girişine izin vermek için,
- Dekalsifiye için gerekli süreyi azaltmak için (çünkü asit çözeltilerdeki uzun süreli immersiyon daha sonraki boyamayı ciddi biçimde zayıflatır).

3-5 mm'lik kemik parçaları ince diş testeresi ile motorlu testere ile kolaylıkla kesilebilir. Hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın dokunun kesit yüzeyinde veya daha derininde küçük kemik parçaları, kırıldak veya yumuşak dokular birikecektir. Mikroskopik olarak kemik tozları 2 formda görülebilir. Birincisi, kesitin kenarlarında çok sık rastlanan kemik veya parçacıkları; diğeri ise 200-700 µm çapında yuvarlak döküntüler şeklinde az rastlanan bir artifaktır. Kemik tozlarının hiç oluşmaması pek mümkün değildir ancak keskin testereleler kullanılarak kemiği fazla hırpalamadan azaltılabilir (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

%10'luk nötralfomal-salinde kalsifikasyondan önce yeterlidir. Yassı, sert kemikler en azından 48 saat ya da daha fazla fikse edilmelidir. Dokuları radyo opak yaparak dekalsifikasyon için bir test olan x-ray kullanımını da engellese de formal-sublimat da primer-fiksatif olarak tavsiye edilmektedir (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

Eğer kemikteki ve diğer dokulardaki kalsiyum tuzları gösterilmek istenirse tüm asit çözeltilerin kullanılmasından kaçınılması gereklidir ve fiksasyon uygulaması, nötral formalinde veya alkolde yapılmalıdır. Kemik blokları, diğer bloklarla birlikte tespit edilmelidir. Çünkü kopan kemik parçaları, yumuşak dokuları zedeleyebilir (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

11.1. Dekalsifikasyon

Birçok dekalsifikasyon sıvısı vardır. Tatmin edici bir dekalsifikasyon sıvısı;

- Kalsiyum tuzlarını tamamen uzaklaştırmalı
- Hücrelerin ve bağ dokusunda az büzülme oluşturmalı
- Boyama reaksiyonlarına zararlı etkilerinin az olması
- Bu kriterlere ilave olarak, dekalsifikasyon hızı da histopatolojide önem taşır.

Dokuların dekalsifikasyonu sırasında ajitasyonun, kalsiyum tuzlarının uzaklaştırılması hızında herhangi bir fark olup olmadığına dair şüpheler vardır. Dekalsifikasyonu

hızlandırmak için ısının kullanımında dikkatli olunmalıdır. 37°C'nin üstü ısılar sadece acil durumda kullanılmalıdır. Dekalsifikasyon sıvısının, dekalsifikasyon boyunca 25°C'lik benmaride tutulması da önerilmektedir (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

Dekalsifikasyon sıvısı, dokudan en azından 50-100 kat fazla hacimde olmalıdır. Bloklar dekalsifikasyon sıvısından süreç tamamlanır tamamlanmaz çıkartılmalıdır. Aksi takdirde kesim ve boyama aşaması zorlaşacaktır. X-ray incelenmesi ile dekalsifikasyon tamamlanıp tamamlanmadığı kesin olarak karar verilebilir (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

11.2. Asit Dekalsifikasyon Sıvıları

En çok kullanılan yöntem, kalsiyum tuzlarını asit çözeltisinde çözmektir. Birçok yöntem olmasına karşın en çok nitrik asit, formik asit ve trikloroasetik asit karışımları kullanılmaktadır.

I. Nitrik Asit

Çok hızlı dekalsifiye eder fakat dokuda harabiyete yol açar ve uygulama uzun olduğunda çekirdek boyamasını inhibe eder. Bu nedenle küçük parçaların hızlı dekalsifikasyonunda kullanılırlar (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

Tespit edilmiş küçük kemik parçaları distile su ile taze hazırlanmış %5-10 'luk nitrik aside konurlar. 4 saat sonra ve kısa aralıklarla dekalsifikasyon kontrol edilir. Bazen formalin, maserasyona ve şişmeye karşı dokuyu korumak amacı ile nitrik aside eklenir. Dekalsifikasyondan sonra dokular direkt olarak %70'lik alkole aktarılırlar. Su ile yıkamaya gerek yoktur çünkü fazla asit dehidratasyon sırasında uzaklaşacaktır. Daha az etkili fakat rutin amaçlar için yararlı bir dekalsifikasyon sıvısı Perenyi'nin nitrik asit, kromik asit ve alkol karışımıdır (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

Perenyi sıvısının hazırlanışı:

- %10'luk nitrik asit.....40 cc
- Absolü alkol.....30 cc
- %0,5'lik kromik asit.....30 cc

Çözeltisi taze olarak kullanılmalıdır ve dekalsifikasyondan sonra direkt olarak %70'lik alkole aktarılmalıdır (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

II. Formik Asit

Nitrik asitten daha yavaş etki yapar, dokuya daha az zarar verir ve boyamayı fazla etkilemez. Rutin kullanım için distile su ile hazırlanmış %10'luk formik asit tavsiye edilir. Daha yüksek kontrasyonlar (%30'luga kadar) daha hızlı dekalsifikasyonu sağlarken, boyamada bozulma olabilir. Dekalsifikasyon sıvısı çok bol olmalı ve 48 saatte bir yenilenmelidir. Küçük süngerimsi kemik parçaları 2 günde, daha büyük, dens kompakt kemikler ise 20 günde dekalsifiye olurlar. Dekalsifikasyondan sonra parçalar direkt olarak %70'lik alkole aktarılırlar.

Evans ve Krajian'ın formik asitli çözeltisi daha hızlıdır ve iyi bir boyanabilirlik sağlamaktadır. Kısmen modifiye edilmiş formülü aşağıdaki gibidir. Dokular dekalsifikasyondan hemen sonra %70'lik alkole aktarılır (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

- Formik asit 35 cc
- %20 'lik sodyum sitrat 65 cc

III. TrikloroasetikAsit

Özellikle dişlerin dekalsifikasyonu için önerilmektedir. Trikloroasetikasitin %5'lik sulu çözeltisi taze olarak hazırlanır. Aynı konsantrasyondaki formik asitten kısmen daha hızlı hareket eder. Parçalar dekalsifikasyondan sonra direkt olarak %70'lik alkole aktarılır (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

IV. Kemik Preparatlar İçin Dekalsifikasyon Çözeltisi

Formik asit	100 cc
HCl	80 cc
Distile su	1000 cc

11.3. Elektrolitik Dekalsifikasyon

Hidroklorik asit ve formik asitli çözeltinin kullanıldığı bir banyo, kemiğin dekalsifikasyonu için elektrolitik bir ortam olarak kullanılır. Araştırmacılar sitolojik ayrıntıya ve boyamaya zarar vermeksizin daha hızlı bir dekalsifikasyon olduğunu iddia etmişlerdir. Birçok araştırmacı tarafından yöntemle ortaya çıkan ısının artan dekalsifikasyon hızından büyük ölçüde sorumlu olduğu fakat spesimenin kavrulma riskinin bulunduğu gösterilmiştir (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

11.4. Kelatlama Ajanları

EDTA (etilendiamin-tetra-asetik asit), beyaz renkli suda %20 oranında çözülen kristal bir kelatlama ajanıdır. Bir dekalsifikasyon sıvısı olarak, kalsiyum iyonları ile çözünebilir non-iyonize bileşikler oluşturmak üzere birleşir. Demir tortuları ve diğer metaller de EDTA ile uzaklaştırılabilir. Çözelti nötral pH'da etkili olduğundan boyama genellikle mükemmeldir. Herhangi bir dekalsifiye ajanından daha iyi sonuçlar vermektedir. Doku, EDTA ile dekalsifikasyondan sonra sertleşmez aksine kemik daha kolaylıkla kesilebilir. EDTA, diş dokuları, reaktif kemik ve kalsifiye dokular için başarı ile kullanılabilir. Kullanılan EDTA'nın dokudan 150 hacim daha fazla olması gereklidir. Rutinde aşağıda formülü verilen çözelti uygundur ve dekalsifikasyon sırasında her 5-7 günde bir yenilenmelidir. Daha zayıf bir çözelti ise daha sık değiştirilmelidir (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

Nötral EDTA Dekalsifikasyon Çözeltisi

EDTA (di-sodyum tuzu)	250 gr
Distile su	1750 cc

Çözeltinin pH'sı yaklaşık 26 gr sodyum hidroksit eklenerek 7'ye ayarlanır. Dekalsifikasyon, örneğin yapısına bağlı olarak 4-40 günlük zaman alır. Uzun süre EDTA'ya maruz bırakma dokuların boyanmasına zarar verir. Test için X-ray önerilir. Frozen kesitler hariç kesitler direkt olarak %70'lik alkole aktarılırlar. Frozen tekniğinde ise kesitler mikrotom bıçağının haraplanmaması için suyla yıkanmalıdır, Dekalsifikasyon süresi ikincil olarak düşünüldüğünde, dokunun korunma kalitesi ve boyamaya bakıldığında EDTA'nın günümüzde mevcut olan en iyi dekalsifikasyon ajanı olduğuna dair hiçbir şüphe yoktur (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

11.5. Dekalsifikasyonu Test Etmek

Dekalsifikasyon testi X-ray ile yapılmaktadır. Ancak histoloji laboratuvarlarında olmadığından genellikle X-ray denemesi yapılamaz. Bunun yerine dekalsifiye edilmiş sıvı içinde kalsiyum tuzunu arama kimyasal testi yapılabilir. Negatif bir sonuç dekalsifikasyonun iyi gerçekleştiğini gösterir (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

5 cc dekalsifikasyon sıvısına turnosol alkali oluncaya kadar damla damla güçlü amonyum eklenir. 0.5 cc doymuş amonyum oksalat eklenir. Amonyum eklemesinden sonra eğer çözelti bulanırsa, bu kalsiyum varlığını gösterir ve çözelti test için uygun değildir. Spesimen taze, kalsiyumsuz sıvı içersine konur. Spesimenin konmasından sonra hem amonyum hem de amonyum oksalat yeniden eklenir. Eğer 30 dakika sonra sıvı hala berraksa dekalsifikasyon başarılı demektir. Kemik yüzeyinde kuvvetli asidik dekalsifikasyon sıvılarının gaz baloncukları oluşabilir. Eğer işlem sallanarak yapılırsa, genellikle balonlar hareket eder ve böylece dekalsifikasyon daha sağlıklı olur (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

11.6. Dekalsifikasyon Sonrası İşlemler

Selüloz nitrat dehidratasyonu veya parafin işleminin 1. basamağındaki %70'lik alkole dokular direkt olarak alınır. Eğer, frozen kesit preparatları yapılacaksa suda yıkanır ve depolayarak bekletmek için %10'luk formal-salin kullanılabilir (7).

Frozen kesitler, kemik ve kemik tümörleri için kullanışlıdır, Dekalsifiye kompakt kemiğin küçük parçaları kriyotomda kesilir ve herhangi bir destek ortamına gerek yoktur. Ancak süngerimsi kemik trabeküllerinin ve kemik iliği hücrelerinin işlem sırasında kaybolmaması için gömülebilir. Frozen kesit yöntemi ile daha çabuk preparasyon yapılabilir (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

Parafin bloklara gömme, sakıncalarına rağmen kemik patolojisinde rutin metoddur. Çift gömme, parafin ve selüloz nitrat kombinasyonu daha avantajlı bir gömme ortamıdır. Özellikle süngerimsi kemik gibi hem sert hem de yumuşak doku içeren yapılarda, plastik materyellerde bu çift materyele gömme gibi avantaj sağlarlar. Gömme ortamı seçildiğinde, dehidratasyondan sonra impregnasyon işlemine geçilir. Gömme materyeli ile kemikler gömülür. Otomatik doku takip makinesi ile 16-24 saatlik kısa işlem spongios kemiğin küçük parçaları ve kemik iliği için uygun değildir. Parafin impregnasyonu için vakum fırınının kullanılması önerilmektedir. Selüloz nitrat (celloidin veya LVN), kemikte

2 önemli amaç için kullanılan değerli bir gömme ortamıdır (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

1. Vertebralar gibi değişik yoğunluktaki geniş doku kitleleri ve femurun orta sütunu gibi dens, kortikal kemik preparasyonlarındaki kolaylığı,

2. Orta kulaktaki daha hassas kemiksi yapılarda oluşan büzülme, biçim bozulmalarını önemli ölçüde azaltır. Bu avantajlarına karşın sürecin yavaşlığı ve kesit kalınlığının 15-20 mikron olması dezavantajlarıdır.

Kemik preparatları çok keskin bıçaklı ağır mikrotomla kesilir. Kesit kalınlığı 6-8 mikron olmalıdır. Alınan kesitlerin yapıştırıcılı bir lama alınması ve dikkatli olarak kurutulması gereklidir.

11.7. Yüzey Dekalsifikasyonu

Bazen, sıklıkla da blokların trimlenmesi esnasında kesitler arasında beklenmeyen kalıfifikasyon alanlarına rastlanır. Bu alanlar bıçağa dirençlidir. Böyle alanlar bir bıçak ya da iğne yardımı ile kazınarak çıkarılır ya da bloklar mikrotomdan alınarak ya %10'luk distile su ile hazırlanmış formik asit veya %5'lik nitrik asitte 1 saat ya da daha fazla bırakılır. Progressif bir dekalsifikasyon daha sonraki boyama basamağını ya az etkileyerek ya da hiç etkilemeden oluşacaktır. Blok, suda biraz yıkandıktan sonra kurutulur ve mikrotoma yerleştirilir (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

11.8. Dekalsifiye Edilmemiş Kesitlerin Hazırlanışı

Dekalsifiye edilmemiş kemik kesitlerine 2 temel amaç için gereksinim vardır.

1-Normal kemik yapısını ve kemik mineralinin dağılımını çalışmak için.

2-Osteomalazi ve rickets gibi osteoid dokuda bir artışla sonuçlanan normal kalsifikasyon sürecinin bozulduğu metabolik kemik hastalıklarının teşhisi için.

Rutin olarak dekalsifiye edilmiş, parafine gömülmüş kemik kesitlerindeki osteoidin differansiyel boyaması yeterli derecede güvenilir değildir veya teşhis için doğru değildir. Dekalsifiye edilmemiş kemik kesitleri aynı zamanda kemik büyüme merkezlerine lokalize olan tetrasiklin ve ilişkili antibiyotiklerin araştırılmasında da kullanılmaktadır ve kesitlerde floresans mikroskopi ile görülebilirler. Dekalsifiye edilmemiş kemiğin haraplanmamış kesitlerinin hazırlanmasındaki teknik zorluklar, bu amaç için birçok yöntem açıklanmasına rağmen henüz tam olarak aşılammıştır. Bunlar 3 grupta düşünülebilir:

- 1- Resine gömülmüş veya gömülmemiş kemiğin testere ile kesilmesi ve bilenecek öğütülmesi,
- 2- Selüloz nitrat-parafin çiftli gömme materyeline gömülmüş materyalin selofan bantlı veya selofan bantsız kesit alınması,
- 3- Ağır bir mikrotom ve bıçağı kullanarak resine gömülmüş kemiğin kesitinin alınması,

İkinci ve üçüncü yöntemler sadece küçük süngerimsi kemik parçaları için uygulanabilir (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

11.9. Testereleme ve Bileme Yöntemi

Bu prosedürlerin bir kombinasyonu, erişkin uzun kemiğinin veya bir dişin transvers kesiti gibi denskortikal kemik kesitlerinin hazırlanması için gereklidir. En basit formunda, yöntem ince bir testere ile kemikten ince bir dilim kesilmesi ve ardından bir bileme taşı veya %70'lik alkol veya sulu brillant olarak kullanarak silikon carbide cilası ile önceden keskinleştirilmiş (pürüzsüzleştirilmiş) cam plaka tabakaları arasında elle bilmekten ibarettir. Kesit daha sonra yıkanır, kurutulur ve lama aktarılarak kapatılır (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

Daha emekli işlemlerde ise diş ve kemik kesitleri, mühendislerin torna-freze makinalarıyla veya bir mekaniksel bileme aygıtı ile sentetik resine gömülmüş veya gömülmemiş bloklardan hazırlanır. İstenilen özel aletlerden daha önemlisi kesitin final kalınlığının preperasyon sırasında 10 katı (ve bazen daha fazla) kaybolarak israf olmasıdır. Bununla beraber, böylesi bir yöntemin uygulanması (günümüzde) dekalsifiye edilmemiş kompakt kemiğin ince kesitlerinin ve olgun dişlerin preperasyonları için gereklidir (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

11.10. Selofan Bant Yöntemi

Bu yöntem laboratuvarlarda daha gönül rahatlığı ile uygulanabilir ve herhangi bir özel aygıta gereksinim de yoktur. Sadece spongiöz kemiğin küçük parçaları için (10x5x3 mm) için uygundur ve sıklıkla iliak biyopsileri için histopatolojide kullanılmaktadır. Yöntem detransparan bir selofan bant şeriti, dekalsifiye edilmemiş kemiğin kırılmasını ve bükülmesini önlemek için parafin bloğun yüzeyine yapıştırılır. Selofan bant kesitten, lama monte ettikten sonra ve boyamadan önce uzaklaştırılır. Plastik selofan bant yerine zamklı kâğıtta kullanılabilir (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

Selofan Bant Yöntemi (Ball tarafından modifiye edilmiş-1957)

%10'lük nötralformal-salin ile 12-24 saat yapılır,
%70, %90 ve üç değişim absolu alkol ile dehidre edilir.

Metil benzoat ile hazırlanmış %3'lük LVN 'de herbirinde 4 saat olmak üzere iki değişimi ile impregne edilir.

Metil benzoat ile %20'lik LVN'de bir gece bırakılır. Dokunun etrafından selüloz nitratın fazlası uzaklaştırılır ve 3 değişim tolüende her birinde ikişer saat bırakılır.

Parafin banyosuna (56° C) aktarılır, iki değişim yapılır ve herbirinde 1 saat tutulur. Üçüncü parafinde ise 1 gece bırakılır. Ertesi sabah taze parafinle gömülür.

Blok ağır bir mikrotoma dikkatli olarak yerleştirin ve trim bıçağı ile yüzeyini açın. Trim bıçağını çıkarıp çok keskin, D-profil tipindeki bir bıçağı yerleştirin. Mikrotomu 8 µm ye ayarlayın. Selofan bantın dar olan yapışkan kısmının 25 mm lik bölümünü bloğun üzerine spesimenin ilerisine doğru uygulayın. Selofan bantın bu serbest ucunun kaldırılması bıçağın ağzını temizler sonrasında ise kesit kıpırdatmadan fakat kuvvetli bir hareketle alınır. Selofan bant bloğa tekrar uygulanır ve daha sonraki kesit alınır ve böyle

böyle tekrarlanarak kesitler alınır. Selofan bantın bir kısmına yapışmış olan kesitler selofan bant şeritinden bir makas yardımıyla kesilir ve yumurta akı sürülmüş lam üzerine sıkıca yapıştırılır. Kesitlerin lama yapışması için 20-30 dakika sıcak plaka üzerinde tutulur. Selofan bantın yapışkansız kısmı suda çözünür ve ıslak kurutma kâğıt şeritleri ile kısa bir zaman sonra uzaklaştırılır. Bandın yapışkan kısmı ise daha zor uzaklaştırılır ve lamın ılık benzen veya tolüen ile ya da bunların 60°C de kapalı şişedeki karışımı ile batırıp ıslatmaya gereksinimi vardır. Yapışkan kesitten çözünüp ayrıldığında kesit, boyama için hazırdır fakat ince bir selüloz nitrat filmi ile kaplanması ayrılmaya karşı bir önlem olarak avantaj olabilir (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

Açıklamalar

- 1- Bant kullanımı çiftli gömme yapılmış materyele bir avantaj sağlamaz.
- 2- Dekalsifiye edilmemiş kemik kesitlerinin incelenmesi için özellikle yararlıdır.

Bunlar:

- a- Polarize ışık ile inceleme için boyanmamış bir kesit
- b- H&E ile boyanmış kesit,
- c- Kalsiyumu göstermek için Von Kossa boyası

Resine Gömülmüş Dekalsifiye Edilmemiş Kemikten Kesit Alma

Kemik trabeküllerinin bazı çatlaklarının ortaya çıkmasına rağmen parafine gömmeye nazaran doku desteği ve korunması daha iyidir. Aşağıda açıklanan basit metil meta crylat gömme tekniği güvenilirdir ve başarıyla geniş bir kullanıma sahiptir. Yöntem, mikrotom yönteminden başka testereleme ve bileme yapılacak dokular içinde uygulanabilir. %10'luk nötralfomal-salin ile en az 24 saat, tercihen ise 48 saat tespit edilir (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

Metil Meta Crylatın Hazırlanması

Ticari olarak bulunan metil metacrylat monomeri inhibitör olarak hidrokinon (quinol) içermektedir ve hidrokinon, kullanımdan önce eşit miktardaki metil metacrylat ile %5' lik sodyum hidroksit bir ayırma hunisinde birkaç dakika çalkalayarak uzaklaştırılır. Bu işlem 2 kez tekrarlanır ve daha sonra 3 kez distile su ile yıkanır. Yıkanmış monomeri-anhidros kalsiyum klorür içinden geçirerek filtre edilir. + 4 C'de buzdolabında ağzı sıkıca kapalı bir şişede tek tabakalı olarak saklanır. Gömme için meta crylatı kısmen polimerize etmek için, 100 cc' ye 1 gr kuru benzoyl peroksit eklenir ve geniş bir erlene aktararak sıcak su banyosuna yerleştirilir ve şurup kıvamına gelene kadar devamlı çalkalanarak dikkatli olarak ısıtılır. Kesinlikle ısının 85 °C'nin üstüne çıkmasına müsaade edilmemelidir. Meta crylat kalınlaştığında, erlen hemen soğuk su altına konularak soğutulmalıdır. Sonra şişeye aktarılıp buzdolabında saklanmalıdır. Aşağıdaki işlemler 20x10x5 mm'ye kadar olan küçük süngerimsi kemik parçaları için uygundur. Daha büyük örnekler için daha uzun işlemlere gereksinim olacaktır (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

- 1- %70'lik alkolde 8 saat
 - 2- %90'lık alkolde 1 gece
 - 3- Bir gün boyunca 3 değişim absolü alkol
 - 4- Metil meta crylat ile absolü alkol eşit hacimlerde karıştırılır ve 1 gece bu karışımında bekletilir.
 - 5- Metil meta crylat monomerinde bir gün boyunca bekletilir.
 - 6- Doku, ince duvarlı, tıpalı cam tüpteki kalınlaşmış monomere aktarılır. Tüp küçük bir su tabağına yerleştirilerek 35-40 °C de 2-3 günde polimerize edilir.
 - 7- Meta crylat sertleştiğinde, inkübatörden çıkarılarak cam tüp kırılır, blok bir kesici ile trimlenir.
 - 8- Kesit almak için keskin, kalın bir bıçak ve vibrasyonsuz bir mikrotom gereklidir. Jung KM mikrotomu ve 4 nolu bıçak özellikle uygundur. Bilinen mikrotomlarda ise W-edge veya D-profil bıçaklar kullanılmalıdır.
- a- Bloklar direkt olarak mikrotom takozuna tutturulmalı,
 - b- Kesitler, 6-8 mikron olarak yavaş, sarsmadan kesilmeli,
 - c- Hem bıçak hem de blok için lubrikant olarak % 70' lik alkol kullanılmalıdır.
 - d- Kesitler boyanmadan önce % 70'lik alkole alınmalı ve orada saklanmalıdır.
 - e- Blok kuru olarak saklanmalıdır (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

11.11. Dekalsifiye Dokuda Osteold'in Gösterimi

Tespitte absolü alkol önerilmektedir fakat nötralfomal-salin de kullanılmaktadır. Ancak gümüş nitrat çözeltisine aktarılmadan önce distile suda serbest formaldehitin uzaklaştırılması için yıkanmalıdır. İnce, 1-2 mm'lik kemik parçaları gereklidir (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

Teknik

- Doku birçok değişimler yaparak distile suda 4 saat yıkanır.
- %2'lik sulu gümüş nitrat içinde tamamen karanlıkta 4-8 saat tutulur.
- Üç değişim distile suda herbirinde 15-20 saniye çalkalanır.
- 4 saat akarsuda yıkanır.
- 48 saat indirgeme çözeltisinde bırakılır (sodyum hipoposfit 5 gr, 0.1 N sodyum hidroksit 0.2 cc, distile su 100 cc)
- Çeşme suyunda 1 saat yıkanır.
- %5'lik sodyum thiosülfatta (anhidros) 24- saat bırakılır.
- Akarsuda 1 saat yıkanır.
- %10'luk formik asitte dekalsifiye edilir.
- Sudan kurtarılıp rutin parafine gömme işlemleri ile gömülür.
- Kesitleri 5 mikron kesilir ve bir yapıştırıcı ile lama kapatılır.
- Kesitler suya indirilir ve Van Gieson boyası ile 2 dakika boyanır.
- Dehidre edilip, şeffaflandırarak sentetik resinli bir ortam ile kapatılır (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

Sonuçlar

Osteoid kırmızı, minarilize alanların sınırları siyah, kemik matriksi sarıdan kahve-rengi-siyaha kadar farklı renkte boyanabilir (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

11.12. Kemik İliği

Kemik iliği filmlerinden ve smearlerinden, kesitlere göre daha fazla bilgi edinilir. Filmlerdeki gibi kesitleri boyamak kolay değildir. Kesitlerdeki hücreler daha küçüktür. Tanımak ve Romanowsky renklerini de elde etmek zordur. Kesitlerin avantajları, daha fazla titizlikle ilik hücreliliğini ölçümleyebilmek ve hücrelerin yapılarını koruyabilmektir (Kemik Dokusu ve Dekalsifikasyon, 2019).

12. KESİTLERDE KULLANILAN BOYAMA YÖNTEMLERİ ve ÖZELLİKLERİ

Öğrenci laboratuvarında incelenen preparatlarda kullanılan boyama yöntemleri ve kısaltmaları

<u>Boyama yöntemleri</u>	<u>Kısaltmalar</u>
Hematoksilen ve eozin	H+E
Demirli hematoksilen	DH
Masson Trikrom	MT
Van Gieson	VG
Mallory azan	MA
Periyodik asit-Schiff	PAS
Wright boyası	W

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. Boya, doku elemanlarının tümünü boyuyorsa **genel boya**; boya, doku elemanlarının özel yapılarını boyuyorsa **seçici (özel) boya** olarak ifade edilir. Ayrıca bazik boyalarla farklı boyuyorsa (Bazı doku bileşenleri boyalarla birleştiğinde boyanın orijinal renginden ve dokunun diğer bölümlerinde oluşan renkten farklı bir renk oluşturur.) **metakromatik boya** olarak adlandırılır (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2013).

Genellikle dokular **asit** ve **bazik boya** ile boyanır. Bazik boya ile boyanan doku elemanları **bazofilik**, asit boya ile boyananlar ise **asidofilik** olarak adlandırılır. Genel olarak bazik boyalar dokuları mavi-mor, asit boyalar ise pembe-kırmızı renklerde boyar. Örneğin, eozin asit boyadır ve sitoplazmayı pembe-kırmızı boyar. Hematoksilen bazik boyadır ve nükleusu mavi-mor boyar (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2013).

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 incelemeler için genellikle

hematoksilen-eozin birleşik boyama yöntemi kullanılır. Ama dokunun özelliğine bağlı olarak da farklı boyamalar yapılabilir. Genel yapısal özelliklerin belirlenmesi için de çoğunlukla Masson'nuntrikrom boyama yöntemleri kullanılır (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2013).

Boyanan örnekler daha sonra ksilol ile uyum sağlayan, entellan (Kanada balsamı) adı verilen sentetik bir madde ile kapatılarak kurumaya bırakılır. Dokulardan alınan kesitler üzerinde uygulanan bu işlemler sonucunda hazırlanan preparatlar mikroskop altında incelenmeye hazır hâle gelmiş olur (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2013).

12.1. Laboratuvar konusu : Epitel hücresinin boyanması

İncelenecek doku veya organ: Yanak epiteli

Uygulanan boyalar: Metilen mavisi

Amaç:

Bu laboratuvarın amacı insana ait bir hücrenin incelenmesini ve aynı zamanda boyanmış ve boyanmamış hücrelerin karşılaştırılmasını sağlamaktır. Bu işlem için yanağın ağız içi bölgesinden alınacak hücreler incelenecektir.

Araç ve Gereçler:

Lam, lamel, damlalık, metilen mavisi boyası, kürdan (yassı tip), su, kanada balsamı.

Yöntem:

- 1- Lam üzerine ayrı iki damla distile su damlatılır.
- 2- İki defa olmak üzere, iki ayrı kürdan ile yanağın ağız içi bölgesinden hasar vermeden kazıyarak epitel hücresinin alınması sağlanır.
- 3- Kürdanları lamdaki su damlaları içinde çevirerek hücrelerin suya geçmesi sağlanır.
- 4- Hafif ısıtarak suyu uzaklaştır ve hücrelerini lama tespit edilir. Fazla ısı hücrelerin yıkımına neden olacağından dikkatli olunur.
- 5- Oda ısısında lam soğutulur.
- 6- Bir damladaki hücrelerin üzerine bir damla %1'lik metilen blue damlatır, 30 saniye boyanması sağlanır, böylece bir grup hücre boyanmaz iken diğer grup hücre boyanmış olur.
- 7- Lamı akarsuda iyice yıkanır ve havada kurutulur.
- 8- Kanada balsamı damlatarak lamelle kapatılır.
- 9- Mikroskop altında, boyanmış ve boyanmamış hücreleri farklı büyüklüklerde inceleyin ve karşılaştırılması sağlanır. Boyanmamış hücreleri mikroskopun diyaframını kısarak incelemeye çalışılır.
- 10- Her iki grup hücreyi farklı büyüklüklerde inceleyerek şeklini çizin. Hücrelerin şeklini, sitoplazmalarını ve çekirdek yapılarını çizim üzerinde gösterin (1).

Tablo 2: Yanak epiteli hücreleri (boyanmamış ve boyanmış hücreler)

--

13. HEMATOKSİLEN & EOZİN BOYAMA

Hematoksilen solüsyonları, asit hematoksilenler ve alüminyum hematoksilenler olarak iki sınıfa ayrılır. Rutinlerde kullanılanlar alüminyum hematoksilenler olup bunların başlıca örnekleri; Ehrlich's haematoxylin, Harris's haematoxylin ve Mayer's haematoxylin'dir.

Hematoksilen genellikle nukeusu mavi-siyah renkte boyanarak intra-nukleer detayı iyi gösterir. Eozin ise hücre sitoplazmasını ve bağ dokusu elemanlarını çeşitli varyasyonlarda pembe, turuncu ve kırmızı renkte boyar (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2013).

Hematoksilen & eozin boyası ile hücre ve doku elemanları çekirdek mavi; sitoplazma, pembe; eritrosit, kiremit kırmızı; kas, kırmızı; fibröz, doku açık pembe; kıkırdak, açıktan koyu maviye kadar renk tonlarında; müköz, mavimtrak; kalsifiye doku, koyu mavi; protein çökelekleri pembe; bakteri toplulukları koyu mavi boyanır (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2013).

I. Harris hematoksilen boya

Araç ve Gereçler

- Harris'salum hematoksilen 5 g
- Absolu alkol 50 cc
- Alüminyum amonyum sülfat 100 g
- Distile su 1000 cc
- Civa oksit 2,5 g

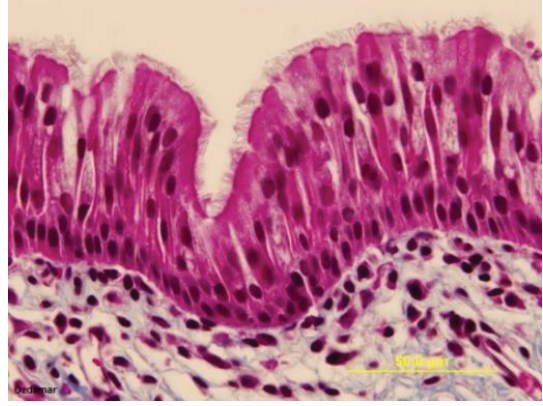
Yapılışı

- Hematoksilen alkol içinde hafif ısıda eritilir.
- Alüminyum amonyum sülfat ısı yardımıyla distile su içinde eritilir.
- İki geniş bir erlenmayerde karıştırılır.
- Hızla kaynatılır, ısıdan alınır.
- Kabarcıklar çıkarken civa oksit azar azar ilave edilir.
- Çözelti koyu mor renk alınca cam kap dıştan soğuk suya tutularak soğutulur.
- Böylece boyamaya hazır hâle gelir. Fakat 2-3 gün bekletilirse daha olgunlaşır. Olgunlaşmış çözelti koyu renkli şişelere alınıp ağzı sıkıca kapatılarak karanlık yerde saklanır. Boya kullanılacağı zaman %4 oranında glasiyal asetik asit eklenir (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2013).

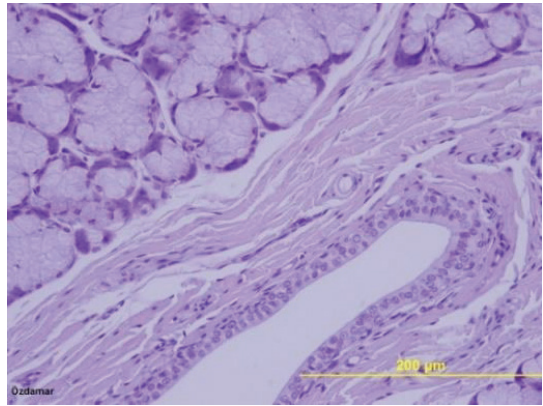
Hematoksilen & Eozin Boyama Yöntemi**Yapılışı**

Ksilen.....	10 dk
Ksilen.....	10 dk
Ksilen.....	10 dk
%100'lük alkol.....	5 dk
%100'lük alkol.....	5 dk
%90'lık alkol.....	5 dk
%80'lık alkol.....	5 dk
%70'lık alkol.....	5 dk
%50'lık alkol.....	5 dk
Distile su	5 dk
Hematoksilen.....	8 dk
Çesme suyunda yıkama	2 kez
Asit-alkol.....	3 sn
Çesme suyunda yıkama	2 kez
Eozin.....	4 dk
Çesme suyu	batır-çıkart
%50'lık alkol.....	30 sn
%70'lık alkol.....	30 sn
%96'lık alkol.....	60 sn
%100'lık alkol.....	60 sn
%100'lık alkol.....	60 sn
%100'lık alkol.....	120 sn
Ksilen.....	10 dk
Ksilen.....	10 dk
Ksilen.....	10 dk

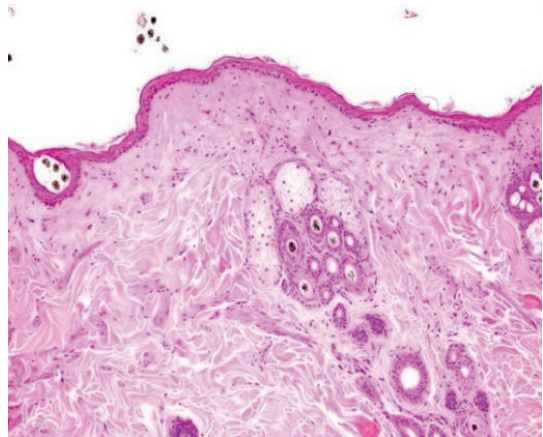
Lam üzerine entellan damlatma
 Lamel ile kapatma
 Kurumaya bırakma
 Mikroskopta inceleme



Resim 26: Hematoksilen-Eozin boyama
 (Yazarın kendi çektiği fotoğraf)



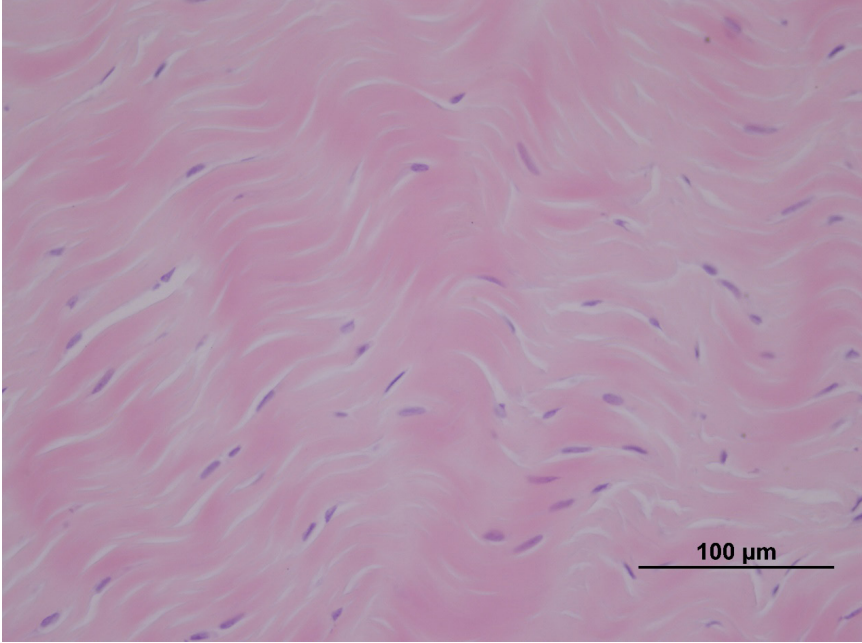
Resim 27: Hematoksilen-Eozin boyama
 (Yazarın kendi çektiği fotoğraf)



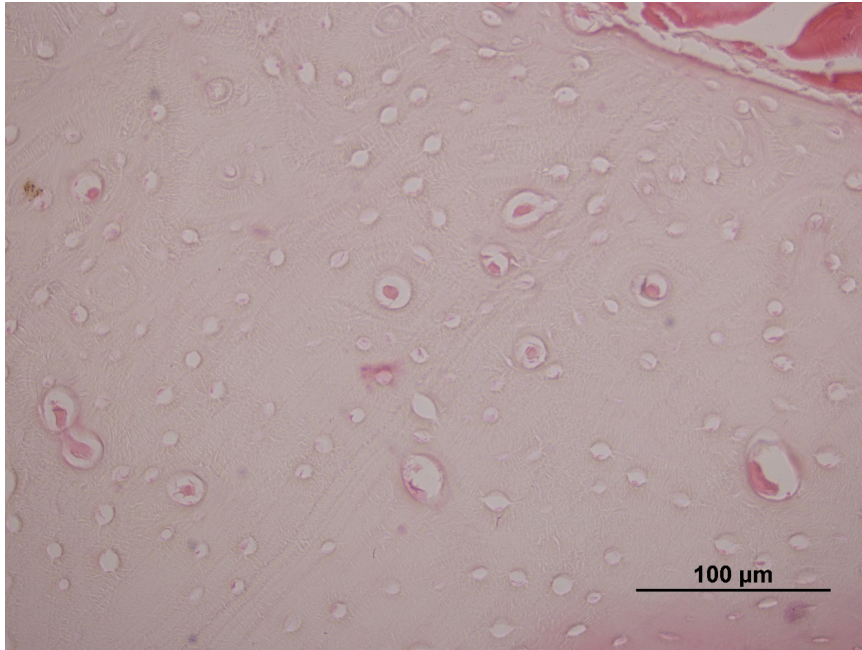
Resim 28: Hematoksilen-Eozin boyama
 (Yazarın kendi çektiği fotoğraf)

Sonuç

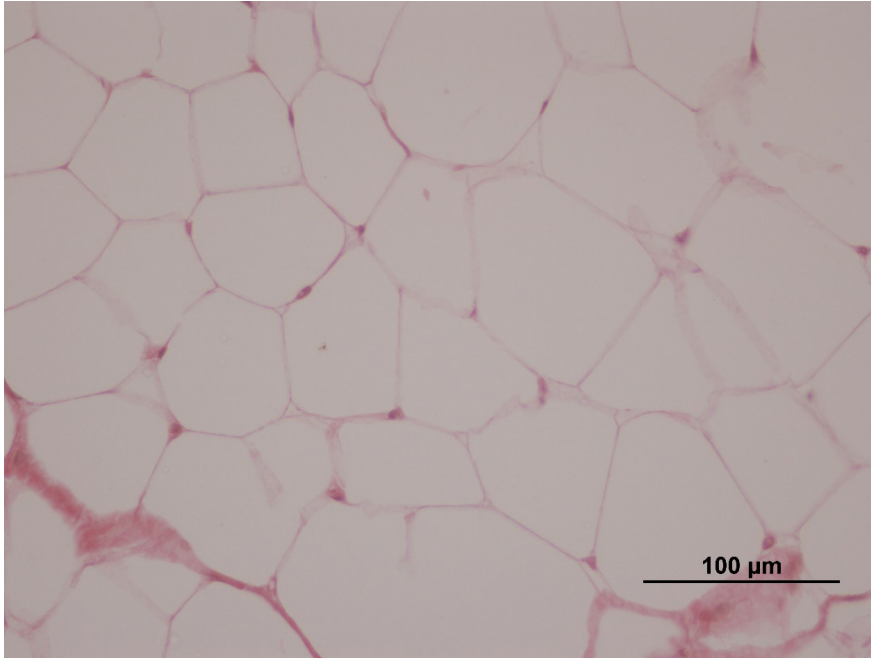
Çekirdek mavi-mor, sitoplazma pembe renkte boyanır (6).



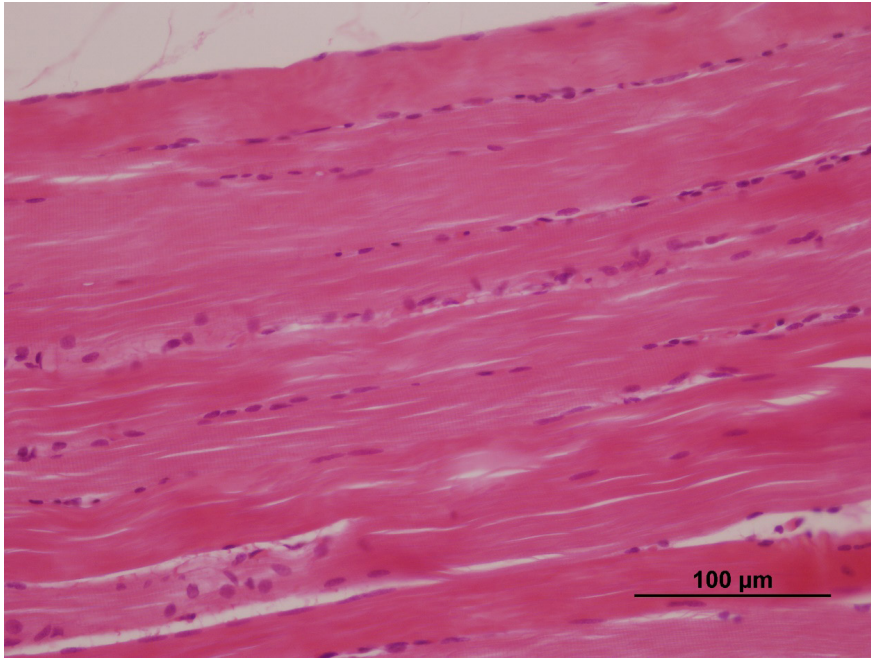
Resim 29: Tendon, Hematoksilen-Eozin boyama
(Yazarın Olympus mikroskopta çektiği fotoğraf)



Resim 30: Kompakt Kemik, Hematoksilen-Eozin boyama
(Yazarın Olympus mikroskopta çektiği fotoğraf)

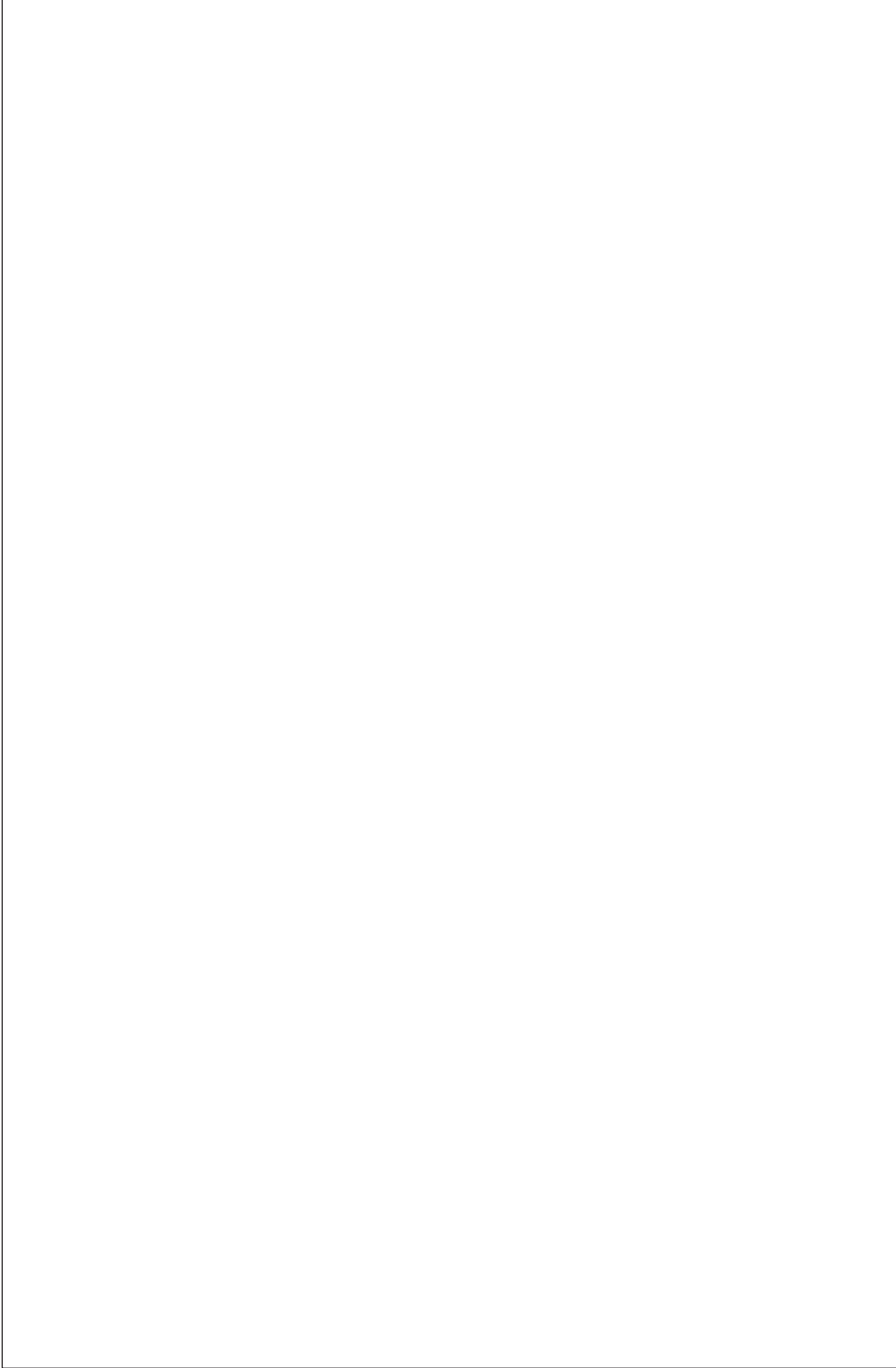


Resim 31: Yağ Doku, Hematoksilen-Eozin boyama
(Yazarın Olympus mikroskopta çektiği fotoğraf)



Resim 32: İskelet kası, Hematoksilen-Eozin boyama
(Yazarın Olympus mikroskopta çektiği fotoğraf)

Notlar:



II. Delafield Hematoksilen Boyama

Eozin Y'li delafield hematoksileni boyamada gösterilmek istenen oluşumlar, embriyolar ve böbreklerdir.

Fiksasyonda; bouin veya %10'luk formalin ya da zenker kullanılır.

Bloklamada parafin kullanılır (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2013).

Boya ve çözeltilerin hazırlanması

- 4 g hematoksilin, 25 ml %95'lik etil alkol içinde çözünür.
- 400 ml doymuş sulu alüminyum amonyum sülfat eklenir.
- Karışım 7 gün süreyle açık havada ve ışıktaki bekletilir.
- Süzülür ve üzerine 100 ml gliserin, 100 ml metil alkol eklenir.
- Solüsyon koyulaşmaya kadar (6-8 hafta) koyu bir şişede bekletilir.
- Solüsyon kullanılmadan hemen önce eşit oranda distile su ile dilüe edilir (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2013).

Yapılışı

- Kesitler suya indirilir.
- Dilüe edilmiş delafieldhematoksileni ile 15 dakika boyanır.
- Çeşme suyunda yıkanır.
- Akan suda 10 dakika bekletilir.
- Eğer kesit hâlâ mavi ise kesitin üzerine 2 damla asit alkol konur (asit alkol, 50 ml %50'lik alkole 3 damla HCl eklenerek hazırlanır.).
- Sonra tekrar çeşme suyunda yıkanır.
- Akar sudan alınan kesit üzerine birkaç damla eozin Y konur ve 2-5 dakika boyanır.
- Distile suda hızlıca yıkanır.
- %95'lik ve %100'lük alkollerden geçirilir
- Ksilol ile şeffaflaştırılır, balsam ile kapatılır (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2013).

Sonuç

Nukleuslar mavi, sitoplazmik yapılar pembe renkte boyanır (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2013).

Notlar:

14. MASSON TRİKROM BOYAMA

Bağ ve destek dokularını incelemek için kullanılan bir boyama tekniğidir.

Boya ve çözeltilerin hazırlanması

Asit fuksin solüsyonu

Asit fuksin	0.5 gr
Glasial asetik asit	0.5 ml
Distile su	100 ml

Fosfomolibdik asit solüsyonu

Fosfomolibdik asit	1 gr
Distile su	100 ml

Anilin blue solüsyonu

Anilin Blue	2 gr
Glasial asetik asit	2.5 ml
Distile su	100 ml

Yapılışı

- 1- Ksilen ve alkol serilerinden sonra kesitler suya getirilir ve akan suda bekletilir.
- 2- Nukleusları demirli hematoksilin ile 8 dk. boyanır.
- 3- Tekrar yıkanır.
- 4- %1 lik asit alkole batırılır.
- 5- Çeşme suyunda yıkanır.
- 6- Asit fuksin solüsyonunda 5 dk. bekletilir.
- 7- Distile su ile yıkanır.
- 8- Fosfomolibdik asit solüsyonunda 5 dk. bekletilir.
- 9- Yıkandıktan sonra çıkarılıp kurumaya bırakılır.
- 10- Anilin blue solüsyonunda 2-5 dk. bekletilir.
- 11- Distile suda yıkanır.
- 12- %1 lik asetik asit ile 2 dk. yıkanır.
- 13- Alkol ve ksilen serilerinden geçirilip kapatılır.

Sonuç

Çekirdek mavi – siyah, sitoplazma kırmızı renkte boyanır. Kollajen liflerden zengin bağ doku mavi – yeşil renkte boyanır.

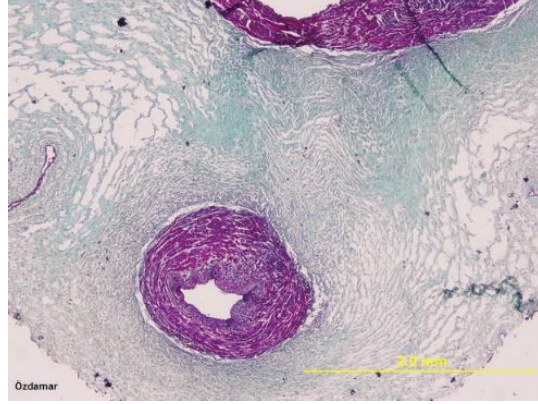
Masson's Trikróm Boyama

Yapılışı

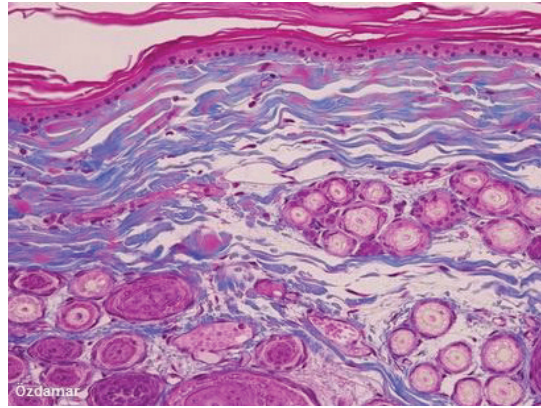
Ksilen.....	5 dk
Ksilen.....	5 dk
Ksilen.....	5 dk
%100'lük alkol.....	5 dk
%100'lük alkol.....	5 dk
%90'lık alkol.....	5 dk
%80'lık alkol.....	5 dk
%70'lık alkol.....	5 dk
%50'lık alkol.....	5 dk
Çesme suyunda yıkama	2 kez
Hematoksilen.....	6 dk
Çesme suyunda yıkama	2 kez
Asit-alkol (%1'lik).....	1 sn
Çesme suyunda yıkama	2 kez
Asit fuksin	20 sn
Distile suda yıkama	2 kez
Fosfomolibdik asit.....	5 dk
Kurutma	5 dk
Aniline blue	3 dk
Distile suda yıkama	2 kez
Asetik asit	2 dk
%96'lık alkol.....	1 dk
%100'lık alkol.....	1 dk
%100'lık alkol.....	1 dk
Ksilen.....	10 dk
Ksilen.....	10 dk
Ksilen.....	10 dk
Lam üzerine entellan damlatma	
Lamel ile kapatma	
Kurumaya bırakın	

Sonuç

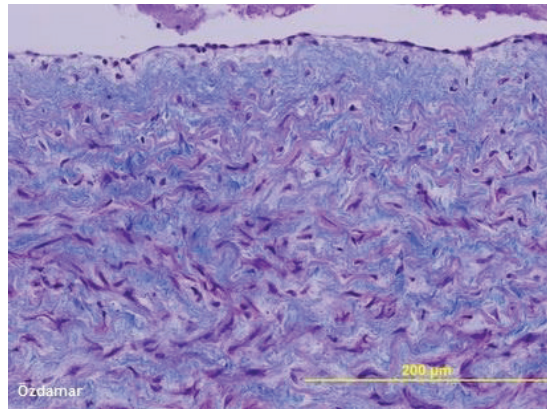
Kas yapısı, kırmızı kan hücrelerine bazı sitoplazmik granüller kırmızı renkte boyanırken kollajen lifler ile bazı retiküler lifler amiloid ve mucin fibril boyası için anilin blue kullanılmışsa mavi; lightgreen kullanılmışsa yeşil olarak boyanır.



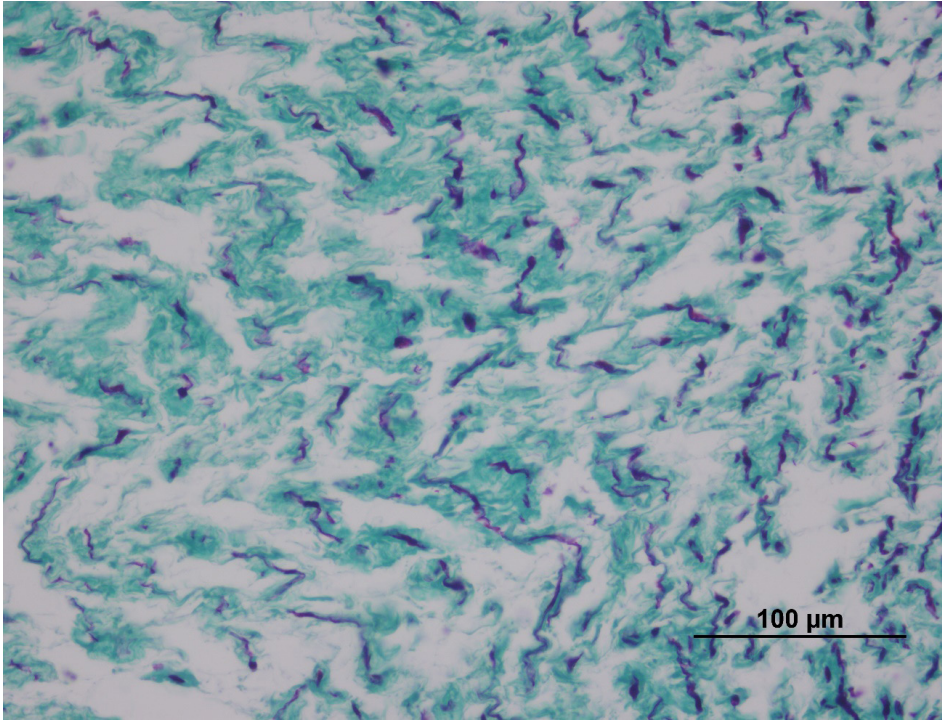
Resim 33: Masson Trikróm boyama
(Yazarın kendi çektiği fotoğraf)



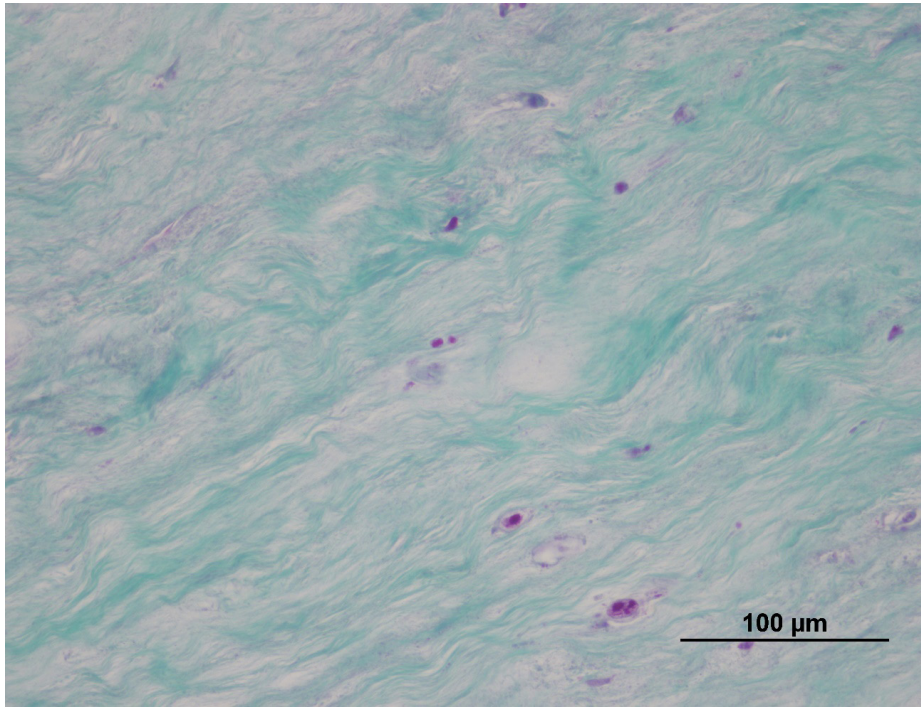
Resim 34: Masson Trikróm boyama
(Yazarın kendi çektiği fotoğraf)



Resim 35: Masson Trikróm boyama
(Yazarın kendi çektiği fotoğraf)

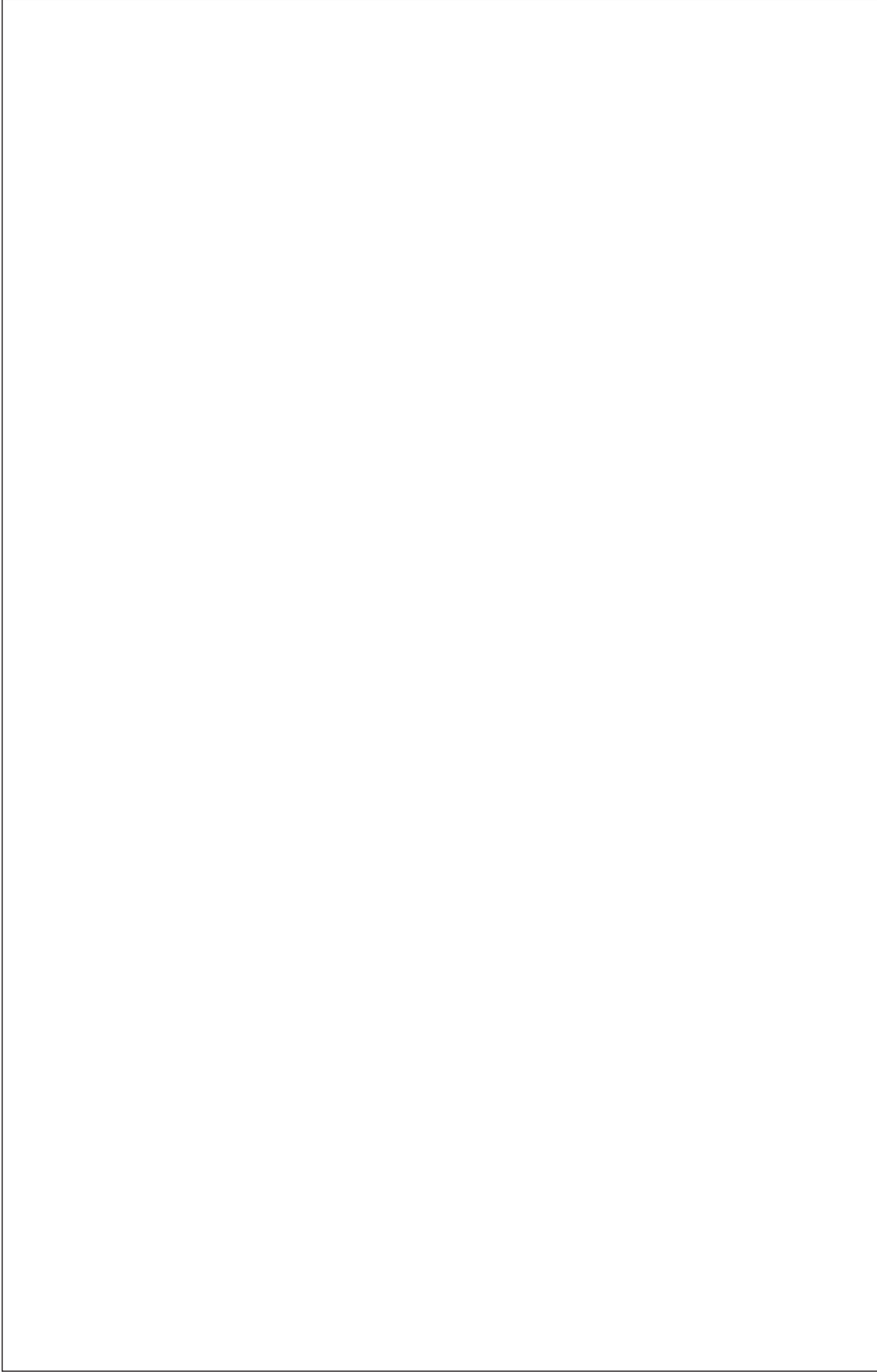


Resim 36: Göbek kordonu, Masson Trikrom boyama
(Yazarın Olympus mikroskopta çektiği fotoğraf)



Resim 37: Fibröz kıkırdak, Masson Trikrom boyama
(Yazarın Olympus mikroskopta çektiği fotoğraf)

Notlar:



15. PAS (PERİODİK ASİT SCHIFF REAKSİYONU)

Boya ve çözeltilerin hazırlanışı

Periyodik asit solüsyonu

Periyodik asit	1 gr
Distile Su	100 ml

Schiff ayıracı

Bazik fuksin	1 gr
Kaynamış Distile su	200 ml

1 gr bazik fuksin 200 ml kaynamış suda çözdürülür.

- 1- Solüsyonun ısısı 50 dereceye düşürülür.
- 2- 2 gr potasyum metabisülfite eklenip karıştırılarak eritilir.
- 3- Solüsyon oda ısısına düşürülür. 2 ml HCl ilave edilir, karıştırılır.
- 4- 2 gr Aktif kömür ilave edilir. Bir gece karanlıkta bırakılır.
- 5- Watmann kâğıdı aracılığıyla filtre edilirken solüsyon açık veya soluk sarı renk alır.
- 6- Solüsyon 4 derecede saklanır.

Yapılışı

- 1- Kesitler ksilen alkol serilerinden geçirilerek distile suya getirilir.
- 2- 5 dk. Periyodik asitte bekletilir.
- 3- Distile su ile yıkanır.
- 4- 15. Dkschiff solüsyonunda tutulur.
- 5- 5-10 dk. Çeşme suyunda yıkanır.
- 6- Nükleusları harris hematoksilen yöntemi ile boyanır.
- 7- Asit alkolde mavileşinceye kadar diferansiye edilir.
- 8- Suda yıkanır.
- 9- Absolü alkolle çalkalanır.
- 10- Ksilenden geçirilir kapatılır.

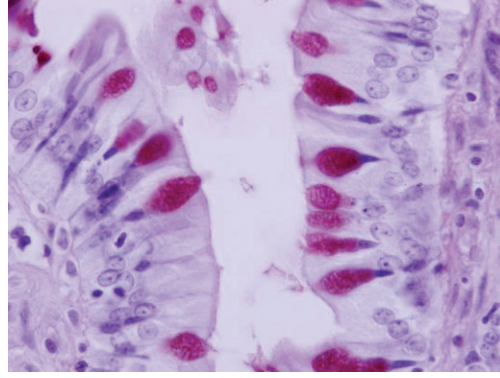
Sonuç

Nükleuslar mavi, glikojen ve diğer periodat reaktif karbonhidratlar mora yakın renkte boyanır.

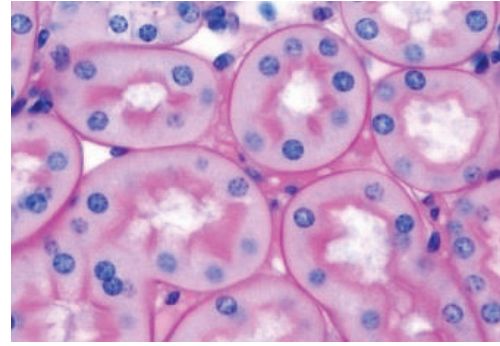
Pas Boyama

Yapılışı

Ksilen.....	5 dk
Ksilen.....	5 dk
Ksilen.....	5 dk
%100'lük alkol.....	5 dk
%100'lük alkol.....	5 dk
%90'lık alkol.....	5 dk
%80'lık alkol.....	5 dk
%70'lik alkol.....	5 dk
%50'lik alkol.....	5 dk
Distile su ile yıkanır.	
Periyodik asitte bekletilir.....5 dk	
Distile suda yıkanır	
Schiff solüsyonunda tutulur...15dk	
Çeşme suyunda yıkanır.....5-10 dk	
Harrishematoksilen.....5 dk	
Asit alkol.....batır-çıkart.	
Suda yıkanır	
%96'lik alkol.....	1 dk
%100'lik alkol.....	1 dk
%100'lik alkol.....	1 dk
Ksilen.....	10 dk
Ksilen.....	10 dk
Ksilen.....	10 dk



Resim 38: PAS boyama
(Yazarın kendi çektiği fotoğraf)



Resim 39: PAS boyama
(Yazarın kendi çektiği fotoğraf)

Sonuç

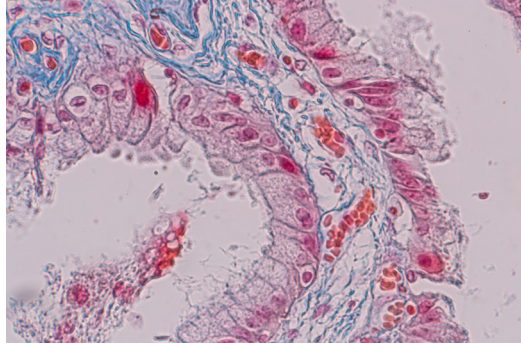
Karbonhidrat yapıları pembe, magenta renğinde boyanır.

Notlar:

16. MALLORY AZAN

Yapılışı

Ksilen.....	5 dk
Ksilen.....	5 dk
Ksilen.....	5 dk
%100'lük alkol.....	5 dk
%100'lük alkol.....	5 dk
%90'lık alkol.....	5 dk
%80'lık alkol.....	5 dk
%70'lik alkol.....	5 dk
%50'lik alkol.....	5 dk
Distile su ile çalkalanır.	



Resim 40: Mallory Azan boyama
(Shutterstock.com'dan alınan lisansla
kullanılan görsel)

Azokarmin G solüsyonunda 58 °C'de 15–20 dk. bekletilir. 5 dk. oda ısısında soğumaya bırakılır.

Distile suda çalkalanır.

Anilin alkolde, sitoplazma ve bağ dokusu soluk pembe ve nükleuslar belirgin hale gelinceye kadar diferansiye edilir. Kesitler %1 lik glasiel asitte çalkalanıp mikroskopta kontrol edilir. Eğer kesitler çok kırmızı ise tekrar anilin alkole dönülür. Sonra yine %1 lik glasiel asetik alkolde çalkalanır.

%5 lik fosfotungustik asit solüsyonunda bağ dokusu tamamen renksizleşinceye kadar tutulur. 15 dk. – 1 saat arası 15 dk'da bir mikroskopta kontrol edilir.

Hızlı bir şekilde distile suda çalkalanır.

Anilin blue çalışma solüsyonunda 5 – 30 dk. bağ dokusu fibrilleri keskince boyayınca kadar boya yapılır. Zaman zaman mikroskop altında incelenir.

Distile suda çalkalanır.

Çabucak %95 alkolde sonra 2 defa absölu alkolde dehidrate edilir.

2-3 defa ksilende şeffaflandırılır ve kapatılır.

Sonuç

Kromatin ve nöroglia	Kırmızı
Sitoplazma	Pembeden navi
Kollajen ve retikulum	Mavi
Kas	Oranj
Alfa hücreleri	Kırmızı parlak
Beta hücreleri	Kahverengi turuncu
Delta hücreleri	Mavi

Notlar:

17. VERHOEFF BOYASI (elastik dokular için)**Boya ve çözeltilerinin hazırlanışı:**

A- Hematoksilen	5 gr
Absolü alkol	100 cm ³
B- Ferriklorid	10 gr
Distile su	100 cm ³
C- Lugolüiodin solüsyonu	
İodin	1 gr
Potasyum iodin	2 gr
Distile Su	100 cm ³

Yapılışı

Ksilen.....	5 dk
Ksilen.....	5 dk
Ksilen.....	5 dk
%100'lük alkol.....	5 dk
%100'lük alkol.....	5 dk
%90'lık alkol.....	5 dk
%80'lık alkol.....	5 dk
%70'lik alkol.....	5 dk
%50'lik alkol.....	5 dk

Kesitler suya alınır.

Boyama solüsyonunda10 -15 dk

Akan suda yıkanır.

Elastik lifler gri arka zeminde siyah renkte görününceye kadar %2 sulu ferriklorid içerisinde diferansiye edilir.

Akan suda yıkanır.

%95 alkolde çalkalanır.

Zıt boyama yapılır.

Fazla boyayı uzaklaştırması için kurutma kağıdında artıklar emdirilir. Absolü alkolde hızlıca dehidrate edilir.

Ksilenle temizlenir ve kapatılır.

Sonuç

Kalın fibriller koyu siyah boyanırken, ince fibriller çok iyi gösterilemez. Boya yıllarca bozunmadan kalabilir.

Notlar:

18. VAN GIESON

Boya çözeltilerinin hazırlanışı

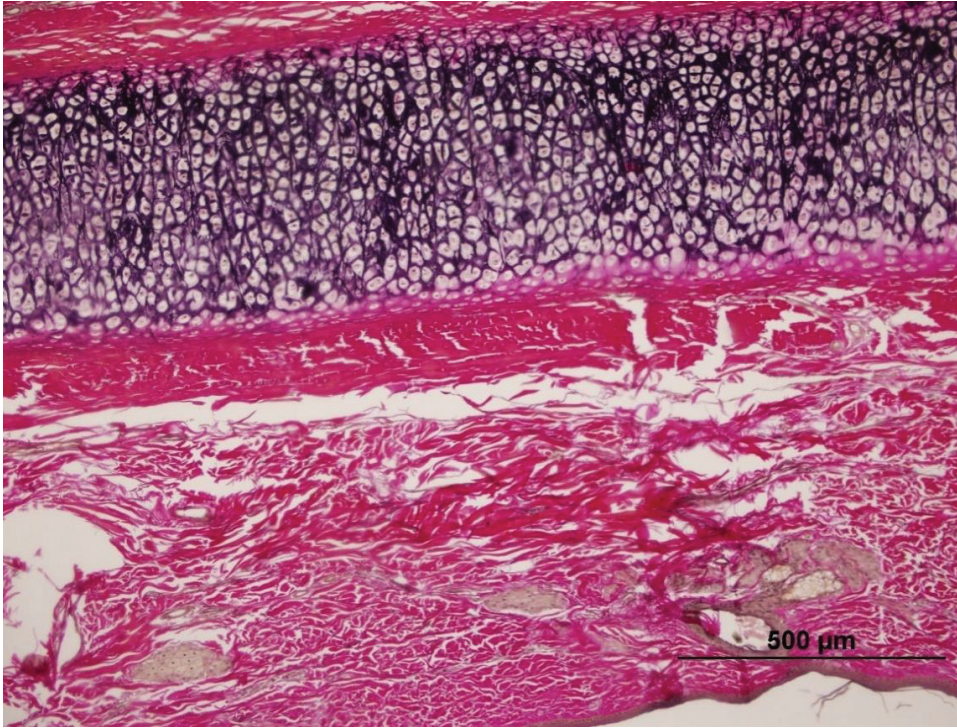
Van Gieson solüsyonu

Suda doymuş pikrik asit solüsyonu	50 cc
%1 lik asit fuksin solüsyonu	9 cc
Distile su	50 cc

Celestineblue solüsyonu

Celestineblue	2,5 gr
Ferrik amonyum sülfat	25 gr
Gliserin	70 cc
Distile su	500 cc

Ferrik amonyum sülfat soğuk suda karıştırarak eritilir bu solüsyona selestineblue eklenerek birkaç dakika kaynatılır. Soğuduktan sonra boya sürülür ve gliserin eklenir.



Resim 41: Van Gieson boyama (Yazarın kendi çektiği fotoğraf)

Yapılışı

Ksilen.....	5 dk
Ksilen.....	5 dk
Ksilen.....	5 dk
%100'lük alkol.....	5 dk
%100'lük alkol.....	5 dk
%90'lık alkol.....	5 dk
%80'lık alkol.....	5 dk
%70'lık alkol.....	5 dk
%50'lık alkol.....	5 dk

Kesitler suya getirilir.

Celestineblue solüsyonunda 5 dk. bekletilir.

Akan suda çalkalanır.

Hematoksilen ile 5 dk. boyanır.

Akan suda yıkanır.

Asit alkolde diferansiye edilir.

Akan suda yıkanır.

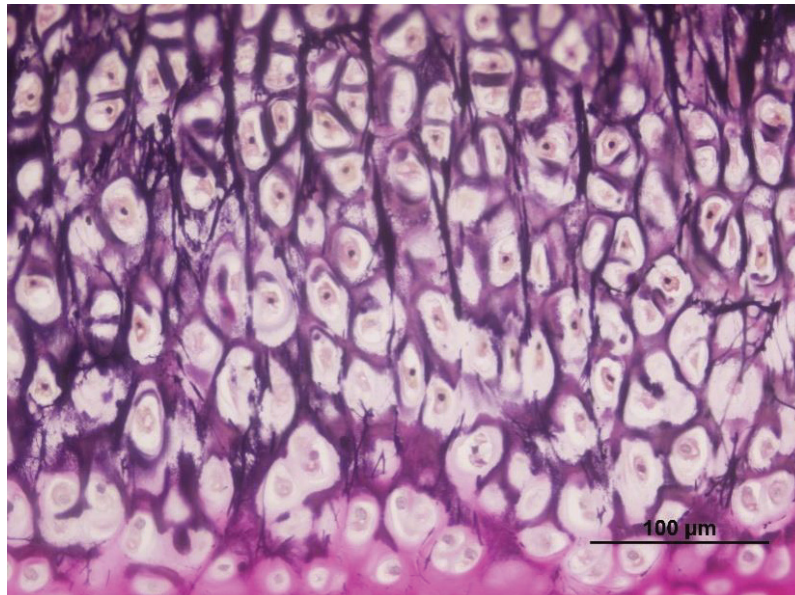
Van Gieson ile 3 dk. boyanır.

Kurutulur.

Alkolde dehidrate edilir.

Ksilen

Temizlenir kapatılır.



Resim 42: Van Gieson boyama (Yazarın kendi çektiği fotoğraf)

Sonuç

Çekirdek mavi-siyah boyanırken kollajen lifler kırmızı boyanır.

Notlar:

19. ALCIAN BLUE & VAN GIESON

Boya çözeltilerinin hazırlanışı

• Alcian blue solüsyonu ph 3.1

Alcian blue	1 gr
%0,5 asetik asit	100 ml

• Alcian blue solüsyonu ph 1.0

Alcian blue	1 gr
0.1 M Hidroklorik asit	100 ml

• Alcian blue solüsyonu ph 0.2

Alcian blue	1 gr
%10 Sülfirik asit	100 ml

• %0,1 Nuclear fast red solüsyonu

Nuklear fast red	0.1 gr
Alüminyum sülfat	2.5 gr
Distile su	100 ml

• Van Gieson solüsyonu

Suda doymuş pikrik asit solüsyonu	50 cc
%1'lik asit fuksin solüsyonu	9 cc
Distile su	50 cc

• Celestine blue solüsyonu

Celestine blue	2,5 gr
Ferrik amonyum sülfat	25 gr
Gliserin	70 cc
Distile su	500 cc

Ferrik amonyum sülfat soğuk suda karıştırarak eritilir bu solüsyona celestineblue eklenecek birkaç dakika kaynatılır. Soğuduktan sonra boya süzülür ve gliserin eklenir.

Yapılışı

Ksilen.....	5 dk
Ksilen.....	5 dk
Ksilen.....	5 dk
%100'lük alkol.....	5 dk
%100'lük alkol.....	5 dk
%90'lık alkol.....	5 dk
%80'lık alkol.....	5 dk
%70'lik alkol.....	5 dk
%50'lik alkol.....	5 dk

Kesitler suya getirilir.

Ph 0.2 de 10 dk. bekletilip akan suda yıkanır.

Ph 1 de 10 dk. bekletilip akan suda yıkanır.

Ph 3.1 de 10 dk. bekletilip akan suda yıkanır.

%1 nuklear fastte 10 dk bekletilip akan suda yıkanır.

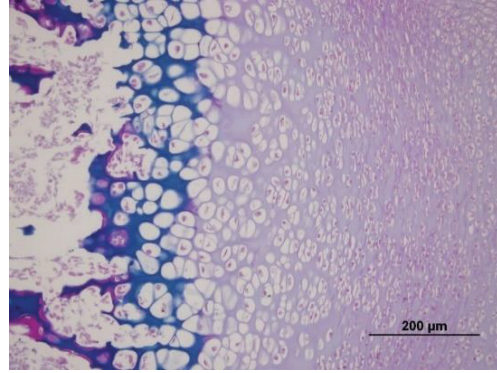
Celestine blueda 10 dk beklenir ve akan suda yıkanır.

Hematoksilen ile 5 dk boyanır ve akan suda yıkanır.

Van Gieson ile 15 dk boyanır ve akan suda yıkanır.

%100 lük alkollerde 1'er dk'de dehidrate edilir.

Ksilen serisinden geçirilip, temizlenip kapatılır.



Resim 43: Alcian Blue - Van Gieson boyama (Yazarın kendi çektiği fotoğraf)

Sonuç

Alcian blue asit özellikteki karbonhidratları ve hücre dışı matriksteki glikozaminoglikanları maviye boyarken, Van Gieson kollajen lifleri kırmızı-pembe, çekirdeği mavi, eritrosit ve sitoplazmayı sarı renkte boyar.

Notlar:

20. GIEMSA

Kan dokusunun boyamasında kullanılır.

Yapılışı

Parmak ucu alkol ile temizlenir.

Sterilize iğne ile kan çıkarılır.

Kan, lam üzerine alınır.

45° lik açıyla lamel kullanılarak; kan, lam üzerine yayılır.

Oda sıcaklığında kuruması için bekletilir.

3 dk metil alkolde tutulur.

Lam üzerine distile su damlatılır.

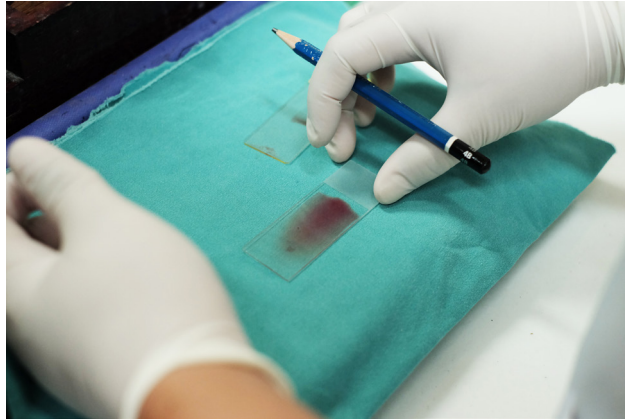
Biraz bekletilir ve suyu akıtılır.

30 dk giemsa boyasında tutulur.

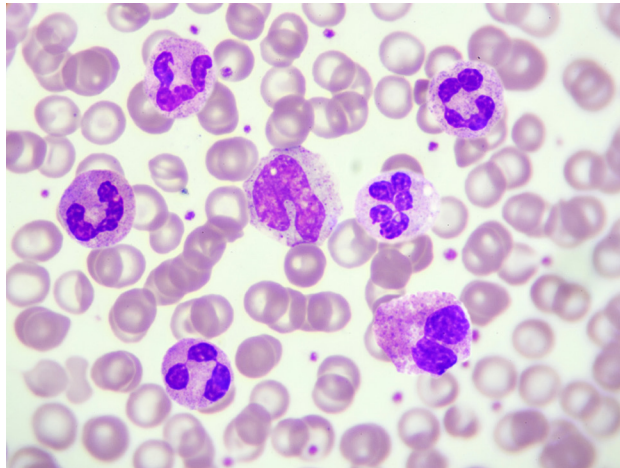
Çeşme suyunda yıkanır.

Oda sıcaklığında kurutulur.

Preparat mikroskopta incelenir.

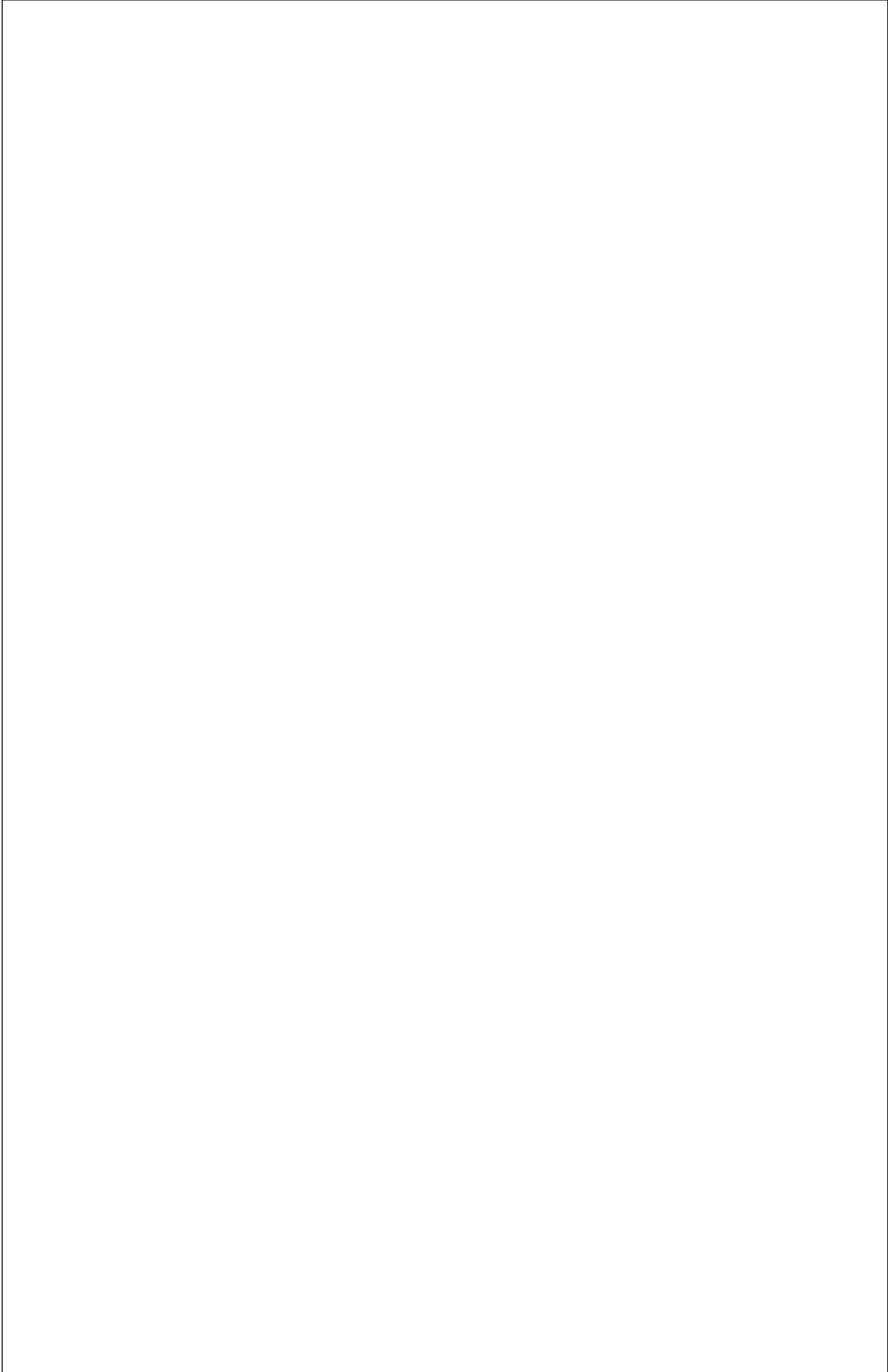


Resim 44: Kan yayma (Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel)



Resim 45: Giemsa boyama (Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel)

Notlar:



21. PAPANICOLOAU BOYAMA (PAP)

Jinekolojik ve nonjinekolojik sitolojik yaymalarda en fazla kullanılan boyama yöntemi papanicolaou boyasıdır (PAP). PAP, SVS için temel boyama yöntemi olup diğer tüm sitolojik materyal tiplerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. George Papanicolaou tarafından geliştirilmiştir. Papanicolaou boyama yöntemi, Pap-smear ya da pap-test adlarıyla da anılır. Papanicolaou boyama yöntemi, hücrelerdeki kötü huylu değişimlerin erken evrede saptanmasını sağlar (9).

PAP boyası, belirtilen sitolojik materyallerden hazırlanan ve alkolle fiksasyonu yapılan yaymaların boyanmasında kullanılır. Sitolojik materyaller; jinekolojik smear, beyin-omurilik sıvısı (BOS), balgam, bronşial yıkama / fırçalama, plevra, periton ve perikard sıvıları, idrar ve ince iğne aspirasyon sıvısıdır (İİAS).

Boya ve çözeltilerin hazırlanması

PAP boyası; Papanicolaou'nun geliştirdiği multikromatik boyama tekniğidir ve harishematoksilen, orange G ve EA (eozin, azure) boyalarından oluşur (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2013).

Yapılışı

%95'lik etil alkolde tespit edilmiş yaymalar, azalan konsantrasyonlu alkollerden geçirilir. Hematoksilen çözeltisi hazırlamada çözücü madde olarak su kullanılır ve su oranı yüksek bir boyadır.

Alkolle fikse edilmiş hücre öncelikle boyayla uyum sağlaması için kademeli olarak su seviyesine getirilmelidir (rehidre). Bu amaçla %95'lik etil alkolden çıkarılan preparatlar sırayla;

%85'lik alkol,

%75'lik alkol,

%50'lik alkollerden geçirilir.

Yaymalar musluk suyunda 3-5 dakika yıkanır.

Harris hematoksilende 45 saniye-2 dakika bekletilir.

Lamlar, çeşme suyunda yıkanarak fazla boya giderilir.

Lamlar, asit alkolde 10 saniye çalkalanır. Diferansiyasyonla hücrelerin almış olduğu fazla boya uzaklaştırılır.

Lamlar, hızlıca çeşme suyundan geçirilerek diferansiyasyon durdurulur.

Yaymalar artan konsantrasyonlu alkollerden sırayla geçirilir.

%50'lik alkol,

%75'lik alkol,

%85'lik alkol,

%95'lik etil alkol içine 10 -12 kez daldırılıp çıkarılır. Hücrelerin almış olduğu hematoksilen tespit edilir.

Lamlar iyice süzülerek orange G boyasında 3 dakika bekletilir.

Boyası süzülerek orange G boyasından çıkarılır.

Üç ayrı kaptaki %95'lik etil alkol içinde 10-12 kez daldırılıp çıkarılır. Preparattaki fazla boya çıkarılarak orange G tespit edilir.

İyice süzölen preparatlar EA-50 boyasında 3 dakika bekletilir. Smearlar 5 dakika bekletilir.

Üç ayrı kaptaki %95'lik etil alkol içinde 10-12 kez daldırılıp çıkarılır. Preparattaki fazla boya çıkarılarak EA-50 boyası tespit ve hücreler dehidre edilir.

Üç ayrı ksilol kabından geçirilir. Hücreler saydamlaştırılır.

Prepatların yayma/smear olmayan yüzü gazlı bezle silinir.

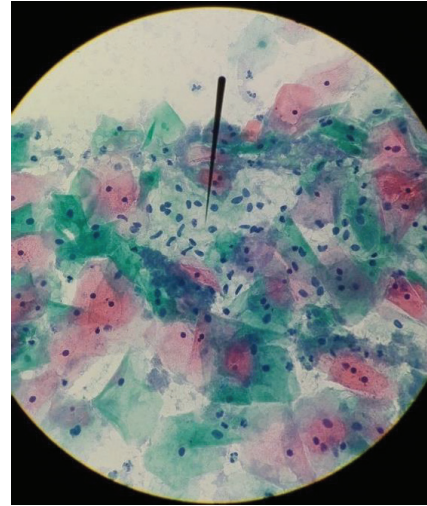
Yayma üzerine 1-2 damla Kanada balsamı/entellan damlatılarak hava kabarcığı oluşturmadan lamelle kapatılır (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2013).

Sonuç

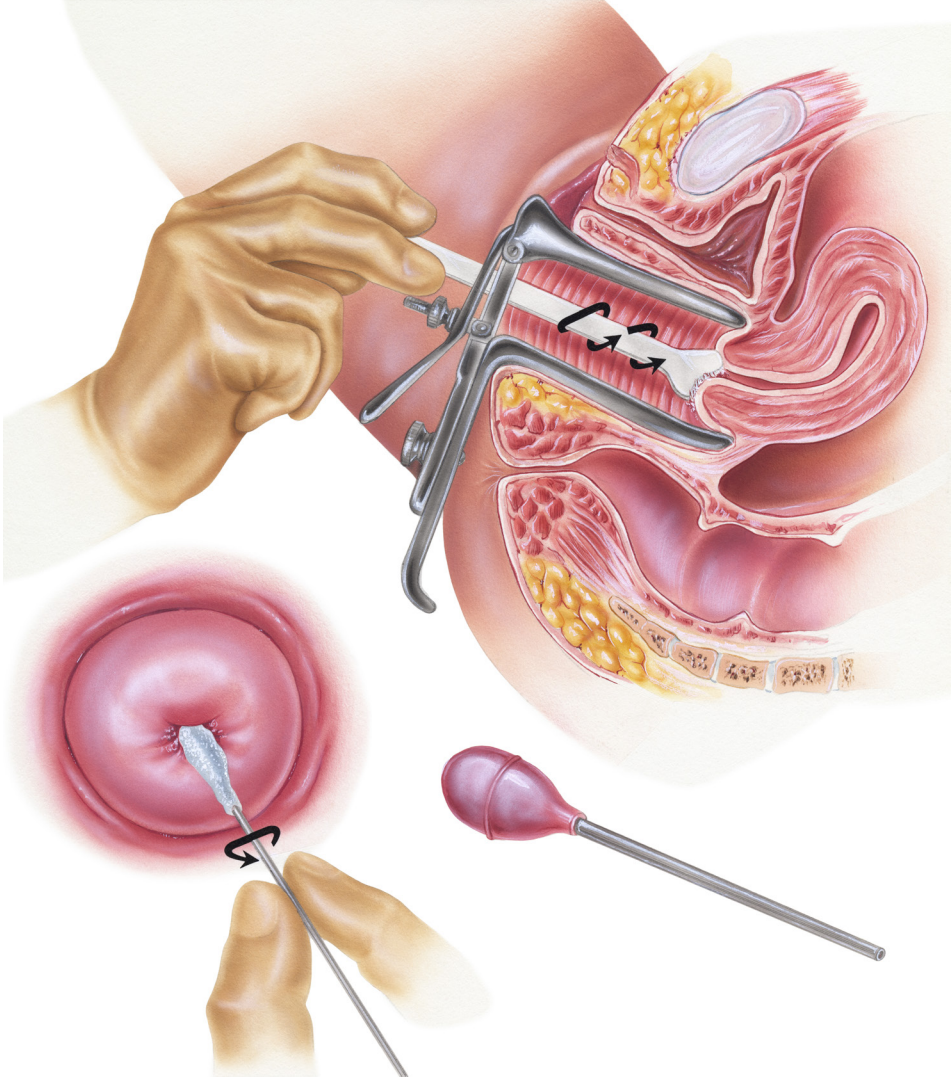
Hematoksilen; nükleous boyası olup kromatin ile nükleer membranları mavi-mora, nükleölü kırmızı, pembe ya da oranj renge boyar.

Orange G; stoplazmaya kolay penetre olan bir boyadır. Keratin mevcutiyyetinde stoplazmayı sarı ya da portakal rengi boyar.

AE; eozin Y, lightgreen ve bismarc browndan oluşan polikrom bir karışımıdır. İçeriğini oluşturan boyaaların kombinasyonlarına göre AE-36, AE-50 ve AE -65 olarak üç çeşidi vardır (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2013).



Resim 46: PAP boyama
(Yazarın kendi çektiği fotoğraf)



Resim 47: Smear örneđi
(Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel)

Notlar:



2. BÖLÜM: HİSTOLOJİ UYGULAMALARI

1. EPİTEL DOKUSU (Örtü epiteli)

İncelenecek Epitel Tipi : Tek katlı yassı epitel

İncelenecek doku veya organ : Elastik arter

Preparat Numarası : 1

1.1. Tek Katlı Yassı Epitel

Tek katlı yassı epitelde, tek kat halindeki hücreler çok ince, yassılaşıp şekilde bazal membran üzerine oturmuşlardır. Hücre çekirdekleride yassılaşıpştır. Elastik arterde, damarın en iç duvarında yer alan ve lümeni çevreleyen epitel tabakasına **endotel** adı verilir (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 3: Tek Katlı Yassı Epitel



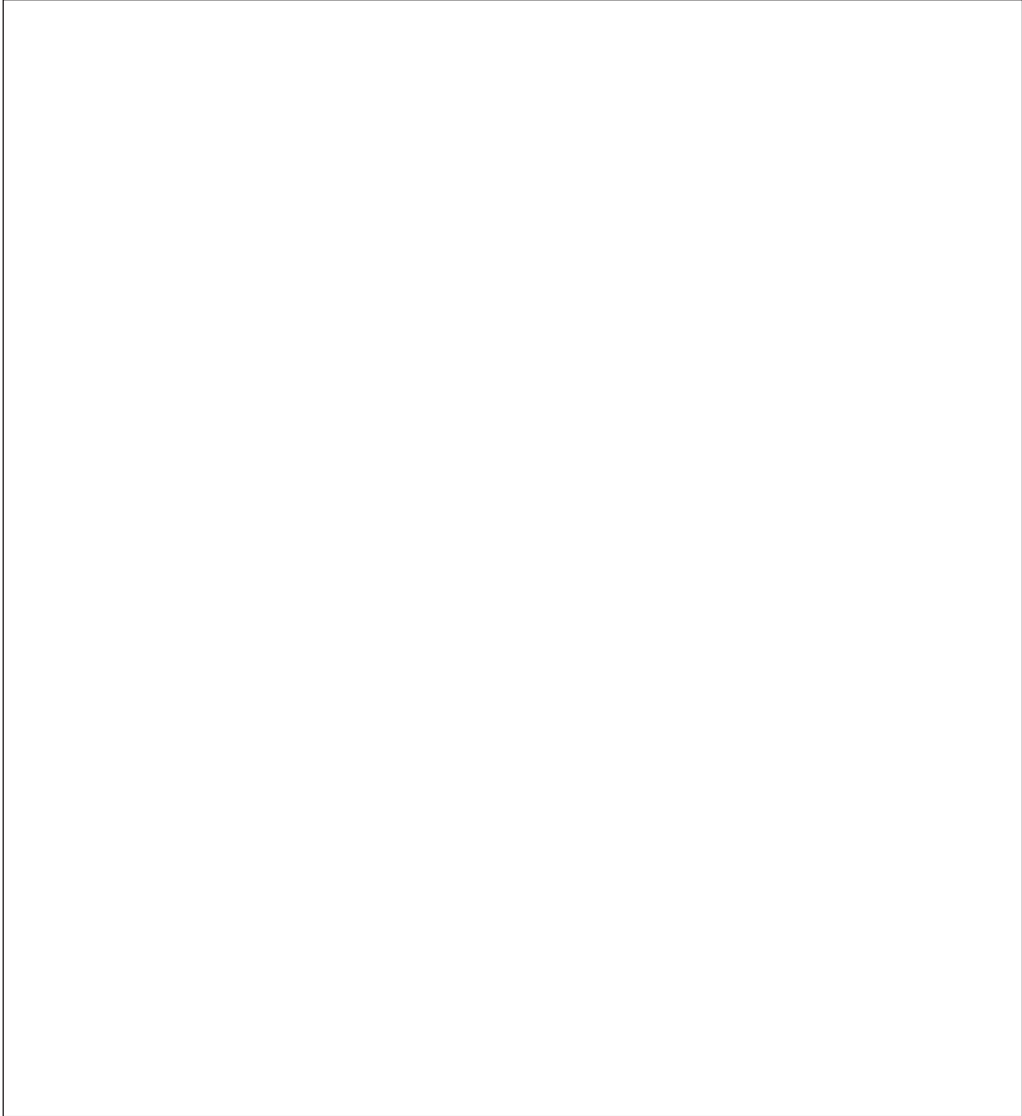
1. EPİTEL DOKUSU (Örtü epiteli)

İncelenecek epitel tipi	: Tek katlı kübik epitel
İncelenecek doku veya organ	: Tiroid
Preparat Numarası	: 2

1.2. Tek Katlı Kübik Epitel

Tek katlı kübik epitel, bir bazal membran üzerine oturmuş ve tek sıra halinde düzenlenmiş kübik veya küboidal hücrelerden oluşmuştur. Çekirdek yuvarlak şekillidir ve hücrenin orta kısmına yerleşmiştir. Tek katlı kübik epitele en iyi örnek olarak tiroid bezinin folliküler hücreleri verilebilir (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 4: Tek Katlı Kübik Epitel



1. EPİTEL DOKUSU (Örtü epiteli)

İncelenecek epitel tipi	: Tek katlı prizmatik epitel
İncelenecek doku veya organ	: Duedonum, Jejunum
Preparat Numarası	: 9, 3

1.3. Tek Katlı Prizmatik Epitel

Tek katlı prizmatik epitel, bazal membran üzerine tek kat halinde sıralanmış prizmatik hücrelerden meydana gelmiştir. Prizmatik hücrelerin çekirdekleri hücre sekline uygun olarak uzun veya oval yapıdadırlar ve genel olarak hücrenin bazal sitoplazmasında yerleşim gösterirler (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 5: Tek Katlı Prizmatik Epitel



1. EPİTEL DOKUSU (Örtü epiteli)

İncelenecek epitel tipi	: Yalancı çok katlı prizmatik epitel
İncelenecek doku veya organ	: Trakea (Soluk Borusu)
Preparat Numarası	: 4

1.4. Yalancı çok katlı prizmatik epitel

Yalancı çok katlı prizmatik titrek tüylü epitel iki farklı boydaki hücrelerden oluşmuştur. Her iki hücre grubu da bazal membran üzerine oturur ancak kısa hücrelerin apikal yüzeyleri lümeneye kadar ulaşmadan aşağı seviyelerde sonlanırken diğer uzun boylu hücreler lümeneye kadar uzanırlar. Gerçekte tek katlı olmasına rağmen çekirdeklerinin farklı seviyelerde bulunmalarından dolayı çok katlıymış gibi görüldüğü için bu tip epitele yalancı çok katlı epitel adı verilir (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 6: Yalancı çok katlı prizmatik epitel



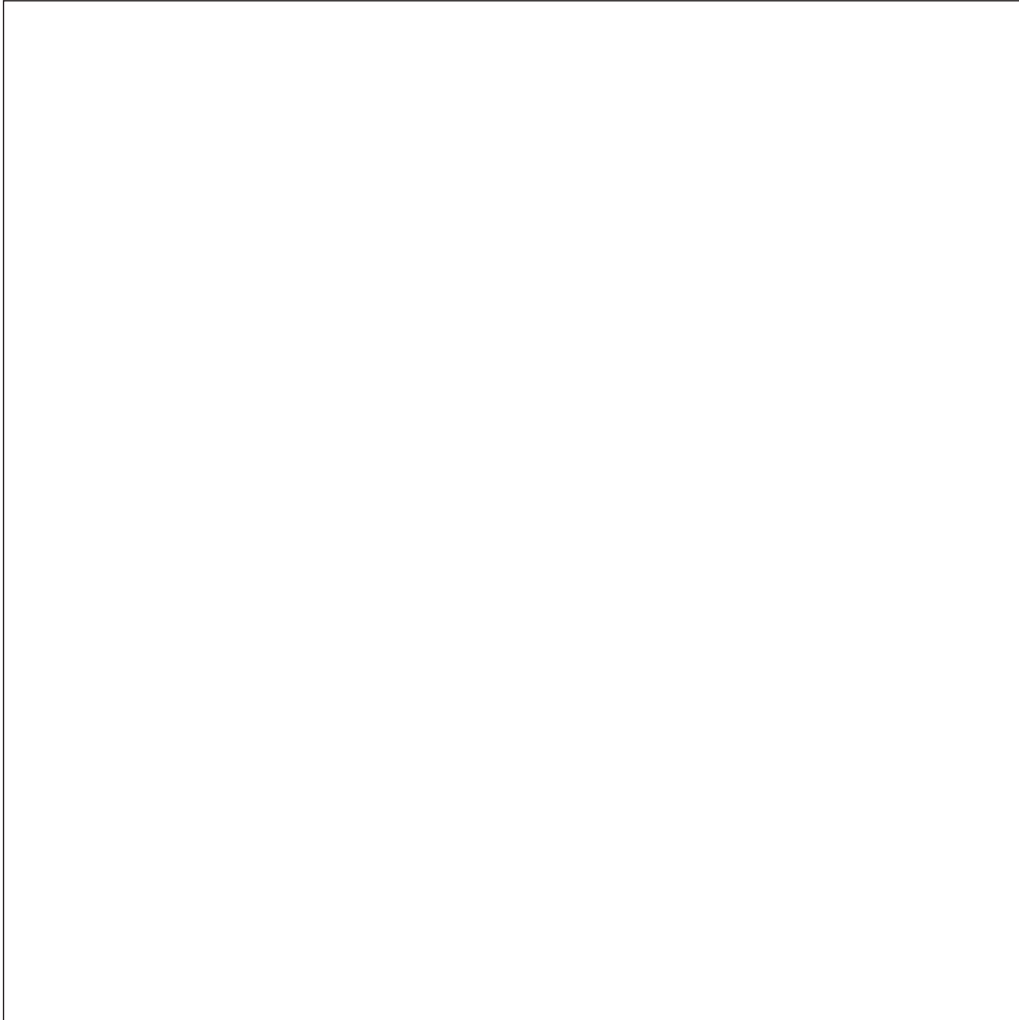
1. EPİTEL DOKUSU (Örtü epiteli)

İncelenecek epitel tipi	: Çok Katlı Yassı Epitel (Keratinli)
İncelenecek doku veya organ	: Deri
Preparat Numarası	: 5

1.5. Çok Katlı Yassı Epitel

Çok katlı yassı epitel birbiri üzerine sıralanmış ve en altta bazal membran üzerine oturan hücrelerden meydana gelmiştir. Keratinize çok katlı yassı epitelde en üst sıradaki hücreler çekirdeklerini kaybetmiş ölü hücrelerdir. Bu tabakaya **keratin tabakası** denir. Çok katlı yassı epitelde, epitelin üst katlarındaki hücrelerin beslenebilmesi için, alttaki damardan zengin olan bağ dokusundan ibaret lamina propria, epitel içerisine doğru **papilla** adı verilen parmak şekilli girintiler yapar (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 7: Çok Katlı Yassı Epitel (Keratinli)



1. EPİTEL DOKUSU (Örtü epiteli)

İncelenecek epitel tipi	: Çok katlı yassı epitel (Keratinsiz)
İncelenecek doku veya organ	: Özofagus (Yemek Borusu)
Preparat Numarası	: 6

1.6. Çok katlı yassı epitel (Keratinsiz)

Çok katlı yassı epitel de olduğu gibi birbiri üzerine sıralanmış hücrelerden oluşur. Hücrelerde keratinleşme gözlenmez. Epitel içerisine doğru bağ dokusu **papilla** adı verilen parmak şekilli girintiler yapar (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 8: Çok katlı yassı epitel (Keratinsiz)



1. EPİTEL DOKUSU (Örtü epiteli)

İncelenecek epitel tipi	: Çok katlı prizmatik epitel
İncelenecek doku veya organ	: Gl. Submandibularis (Çenealtı Tükürük Bezi)
Preparat Numarası	: 7

1.7. Çok katlı prizmatik epitel

Çok katlı prizmatik epitel sadece nadir gözlenir. Tükürük bezlerinin interlobüller (lobüller arası) boşaltım kanallarındaki epitel hücrelerin lümeneye bakan kısımlarında prizmatik hücreler, bazalde ise kübik hücreler yer alır (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 9: Çok katlı prizmatik epitel



1. EPİTEL DOKUSU (Örtü epiteli)

İncelenecek epitel tipi	: Çok katlı değişici epitel
İncelenecek doku veya organ	: Mesane (İdrar kesesi)
Preparat Numarası	: 8

1.8. Çok katlı değişici epitel

Bu tip epitel, idrar bosaltım yollarının karakteristik epitel tipidir. Bulunduğu yerde, organın idrar ile dolu veya boş oluşuna göre lüminal basıncın etkisiyle epitel yüksekliği ve buna bağlı olarak epitel hücrelerinin şekli değiştiği için çok katlı değişici epitel adını alır. Organ boş iken lümeneye bakan hücreler prizmatik, dolu iken yassıdır (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 10: Çok katlı değişici epitel



2. BEZ EPİTELİ

İncelenecek doku veya organ : Duodenum

Preparat Numarası : 9

2.1. Tek hücreli bez (goblet hücresi)

Tek hücreli bez olan goblet hücreleri endoepitelyal bezler olup örtücü epitel hücreleri arasına dağılmış olarak bulunurlar. Bu tip bezlere bağırsaklarda ve üst solunum yollarında bol miktarda rastlanılmaktadır. Goblet hücrelerinin müköz tipteki salgı granülleri hücrenin apikal sitoplazmasında birikerek, bu bölgenin genişlemesine ve balon gibi şişmesine neden olmaktadır. Hücrelerin bu görünümü bir kadehi andırdığından bunlara kadeh hücreleri adı verilmiştir (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 11: Tek Hücreli Bez (goblet hücresi)



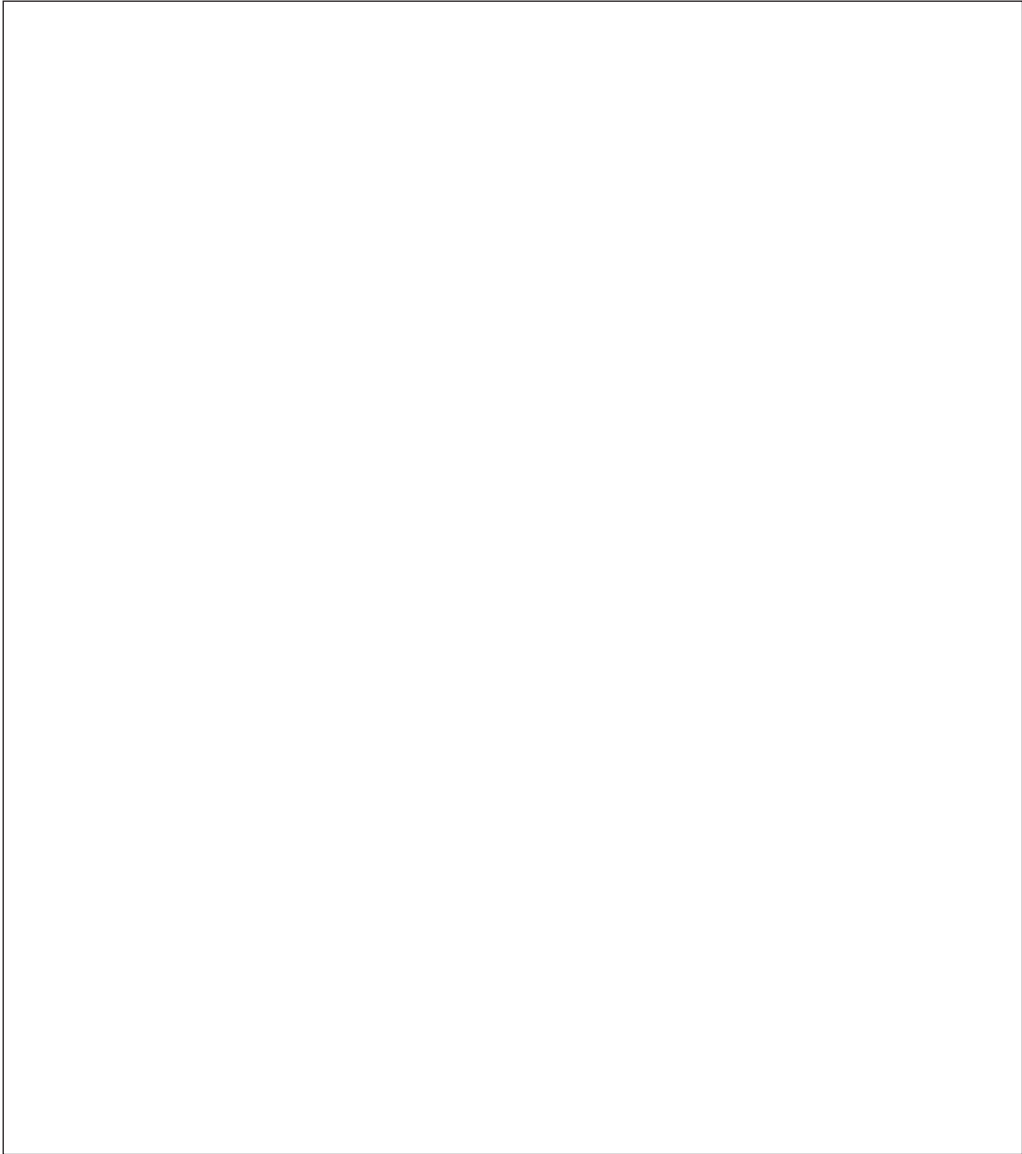
2.2. Basit Tübüler Bez

İncelenecek doku veya organ : Kolon

Preparat Numarası : 10

Kolon mukozası tek katlı prizmatik fırçamsı kenarlı epitel ile döşenmiştir. Epitel, lamina propria içerisine doğru parmak şeklinde bezleri oluşturmak üzere girintiler yapmıştır; bunlara Lieberkühn kriptaları veya intestinal bezler adı verilir. Lieberkühn kriptalarının iç yüzeyinin epiteli yüzey epiteli ile devam eder ve bez hücrelerinin arasında bol miktarda goblet hücresi bulunur (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 12: Basit Tübüler Bez

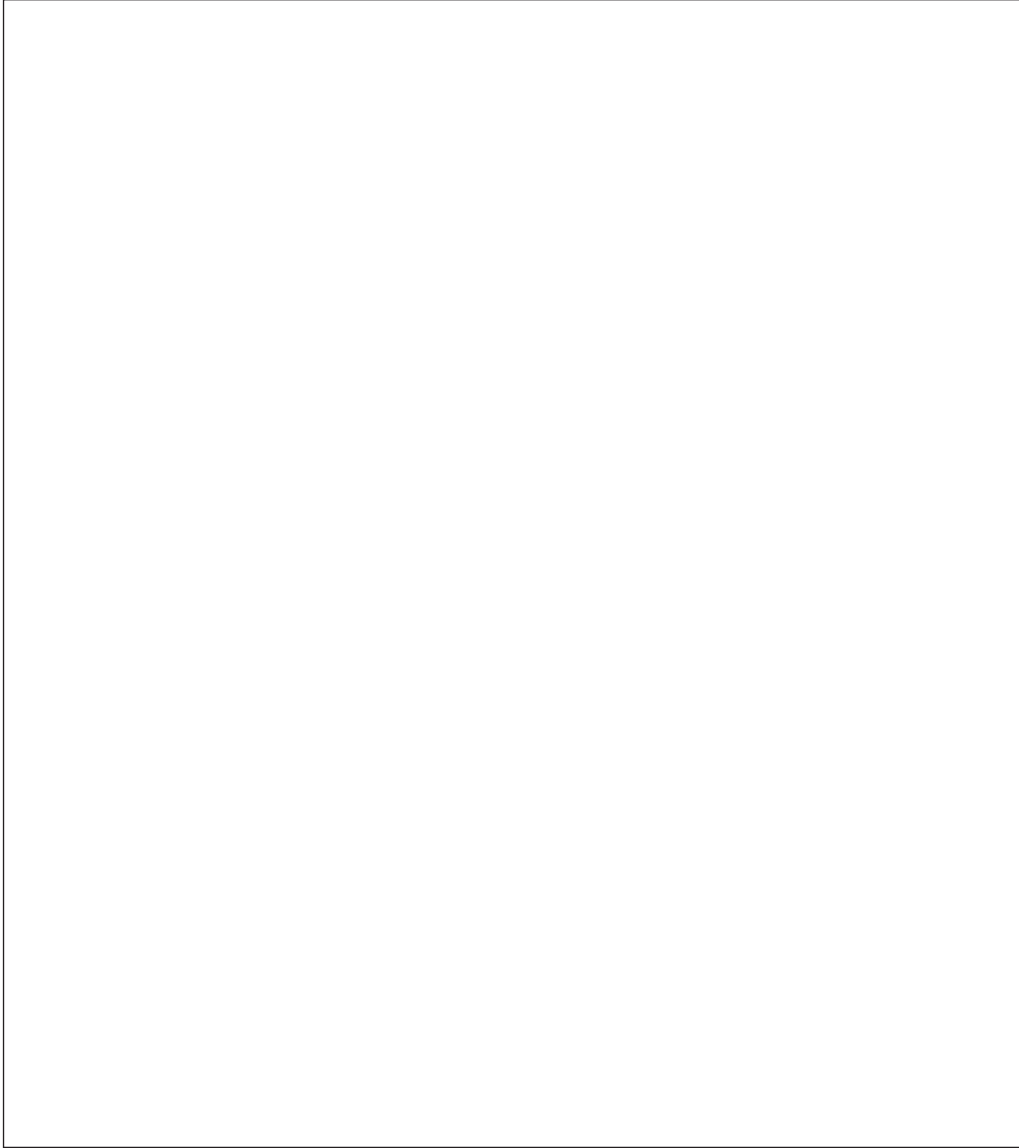


2.3. Seröz Bez

İncelenecek doku veya organ : GlandulaParotis
Preparat Numarası : 11

Glandula parotis ve pankreas saf seröz salgı yapan ekzokrin bezler için iyi birer örnektir. Seröz salgı yapan bezlerin müköz bezlere göre en önemli ayırt edici özellikleri, hücrelerinin boyaya affiniteleri ve nukleus yapılarıdır. Seröz salgı yapan asinusların hücrelerinin sitoplazmaları koyu renkte boyanırlar. Hücreler yüksek piramidal şekillidir ve bundan dolayı asinusların lümenleri dardır. Nukleusları yuvarlak şekillidir ve bir miktar bazale yakın yerleşim gösterirler (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 13: Seröz Bez



2.4. Müköz Bez (Serö-müközbezler)

İncelenecek doku veya organ : Glandula Submandibularis

Preparat Numarası : 7

Glandula submandibularis hem seröz hem de müköz tipte salgı yapan karışık (miks) bir bezdir, ancak seröz salgı yapıcı asinüsler müközlere göre daha fazla sayıdadır. Müköz salgı yapan hücreler, seröz salgı yapan hücrelere göre daha kısa boyludur ve nukleusları yassı şekilli görünüşleriyle hücrelerin bazaline yerleşmişlerdir. Sitoplazmik bölgesi açık renkli boyanır. Asinusların lümeni hücre boylarının seröz hücrelere göre daha kısa olmasından dolayı daha geniş görülür (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 14: Serö-müköz bez (müköz ağırlıklı)



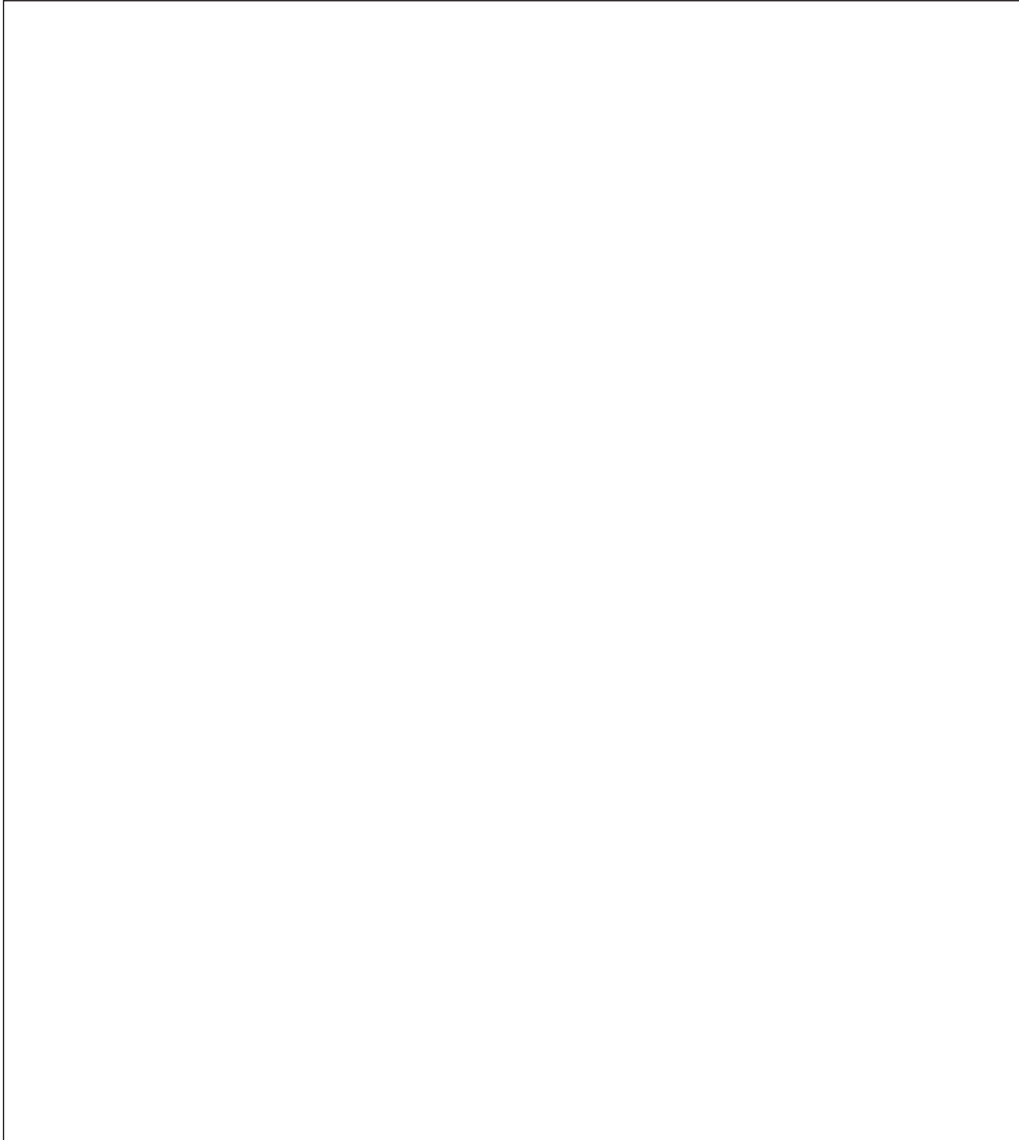
2.5. Bileşik Tübuloalveoler Bez

İncelenecek doku veya organ : Prostat

Preparat Numarası : 12

Bileşik tübulo-alveoler bezler hem tübüler hem de alveoler salgı yapıcı son kısımları içeren bir bez yapısına sahiptirler ve vücutta çok yaygın olarak görülürler. Prostat-taki bileşik tübulo-alveoler bezlerin salgı yapıcı kısımları çok sayıdadır ve farklı genişliklerde görülürler. Prostatın salgı yapıcı son kısımlarının epiteli, bir bazal membran üzerine oturmuştur. Epitel hücreleri prizmatik şekillidir ancak yer yer kübik şekilli hücrelere de rastlanır (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 15: Bileşik Tübuloalveoler Bez



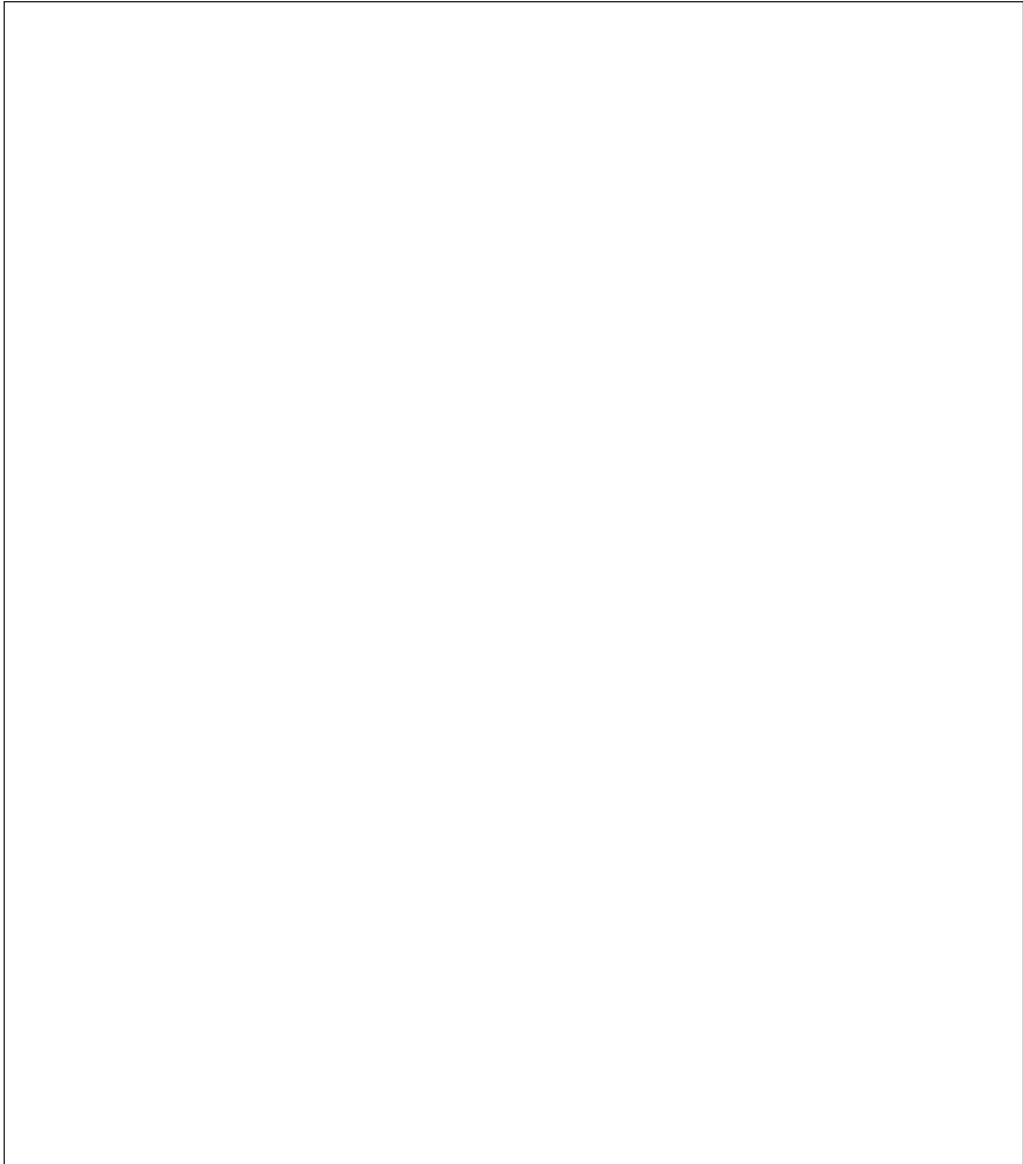
2.6. Yağ bezi

İncelenecek doku veya organ : Kulap Kepçesi

Preparat Numarası : 13

Derinin yağ bezleri (sebaceous gland) deride epidermisin altında yer alan dermis tabakası içine yerleşmişlerdir. Yağ bezleri genellikle kısa bir kanala açılan alveoler tipte birkaç asinusa sahip asinar bezlerdir. Bu kanal genellikle bir kıl follikülünün üst kısmında sonlanır. Yağ bezini oluşturan hücreler poligonal şekillidir ve sitoplazmaları soluk boyanır. Nukleusları yuvarlaktır ve merkezi olarak yerleşmiştir (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 16: Yağ Bezi



2.7. Tat tomurcukları

İncelenecek doku veya organ : Dil

Preparat Numarası : 14

Epitel dokusu, dil yüzeyinde girinti ve çıkıntılar şeklinde papilla adı verilen yapıları oluşturur. Tat tomurcukları (tat goncaları) dildeki sirkumvallat, foliat ve fungiform papillaların yan duvarında yer alan çok katlı yassı epiteli içinde bulunurlar. Tat tomurcukları epitel içerisinde, bazal laminadan yüzeye kadar uzanıp dar bir delikle (por) lümene açılırlar. Tat tomurcuklarında destek hücreleri, nöroepitel hücreleri ve bazal hücreleri olmak üzere üç farklı tip hücreden oluşmuştur (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 17: Tat Tomurcukları



3. BAĞ DOKU

İncelenecek Bağ Doku Tipi	: Müköz Bağ Doku
İncelenecek Doku veya organ	: Göbek Kordonu
Preparat Numarası	: 15

3.1. Müköz Bağ doku

Müköz bağ doku kollajen, elastik ve retiküler liflerden oluşur. Hücre ve lif yönünden fakirdir. Göbek kordonunda iki umbilikal arter ve bir umbilikal ven gözlenir, bunun dışında kalan alan müköz bağ dokusu ile kaplıdır (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 18: Müköz Bağ Doku



3. BAĞ DOKU

İncelenecek Bağ Doku Tipi : Gevşek Bağ Doku

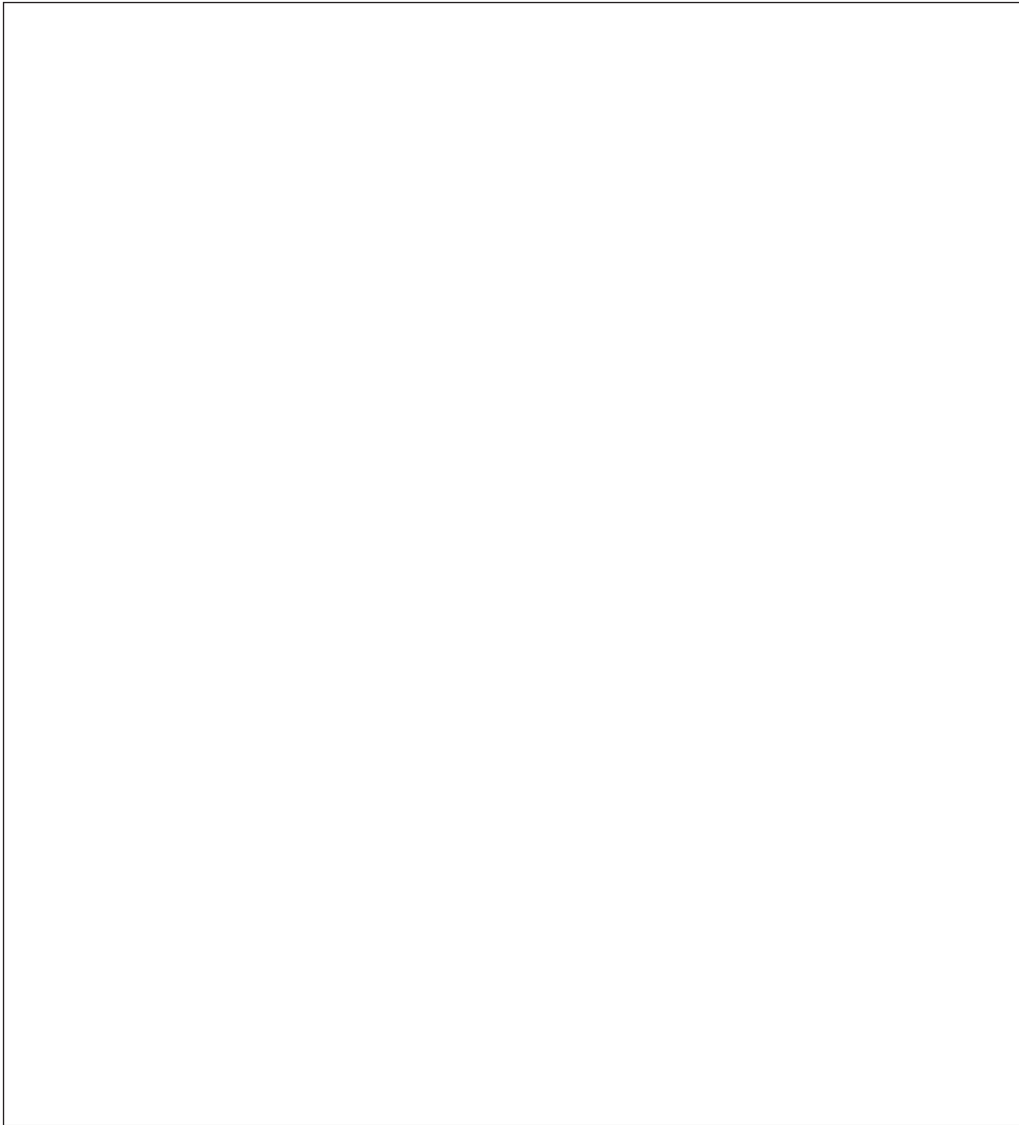
İncelenecek Doku veya Organ : Trakea

Preparat Numarası : 4

3.2. Gevşek Bağ Doku

Fibroblastlar ve makrofajlar başta olmak üzere tüm bağ doku hücrelerini içeren gevşek bağ dokuda kollajen, elastik, retiküler lifler ve şekilsiz ara maddeler de gözle görülür. Çoğunlukla da şekilsiz ara madde mevcuttur. Retiküler fibriller diğer liflere göre daha düşük oranda bulunur ve iyi damarlanma gösterir (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 19: Gevşek Bağ Doku



3.3. Düzensiz Sıkı Bağ Doku

İncelenecek Bağ Doku Tipi	: Düzensiz Sıkı Bağ Doku
İncelenecek Doku veya Organ	: Deri, Parmak Ucu
Preparat Numarası	: 5

Yoğun olarak bir arada bulunan kollajen lifler ve daha aza oranda hücreden meydana gelir. Gevşek bağ dokuda bulunan yapıların tümü burada da bulunur. Dayanıklı olup esnekliği azdır (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 20: Düzensiz Sıkı Bağ Doku



3. BAĞ DOKU

İncelenecek Bağ Doku Tipi : **Düzenli Sıkı Bağ Doku**

İncelenecek Doku veya Organ : **Tendon**

Preparat Numarası : **16**

3.4. Düzenli Sıkı Bağ Doku

Yoğun kollajen lifleri demetler oluşturur. Bu lifler belirli yönde dizilim gösterir. Lifler arasında az miktarda şekilsiz ara madde bulunur. Liflere paralel uzanan nukleusları ile ayırt edilebilecek fibroblast hücreleri gözlenir (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 21: Düzenli Sıkı Bağ Doku



3. BAĞ DOKU

İncelenecek Bağ Doku Tipi : Elastik Bağ Doku

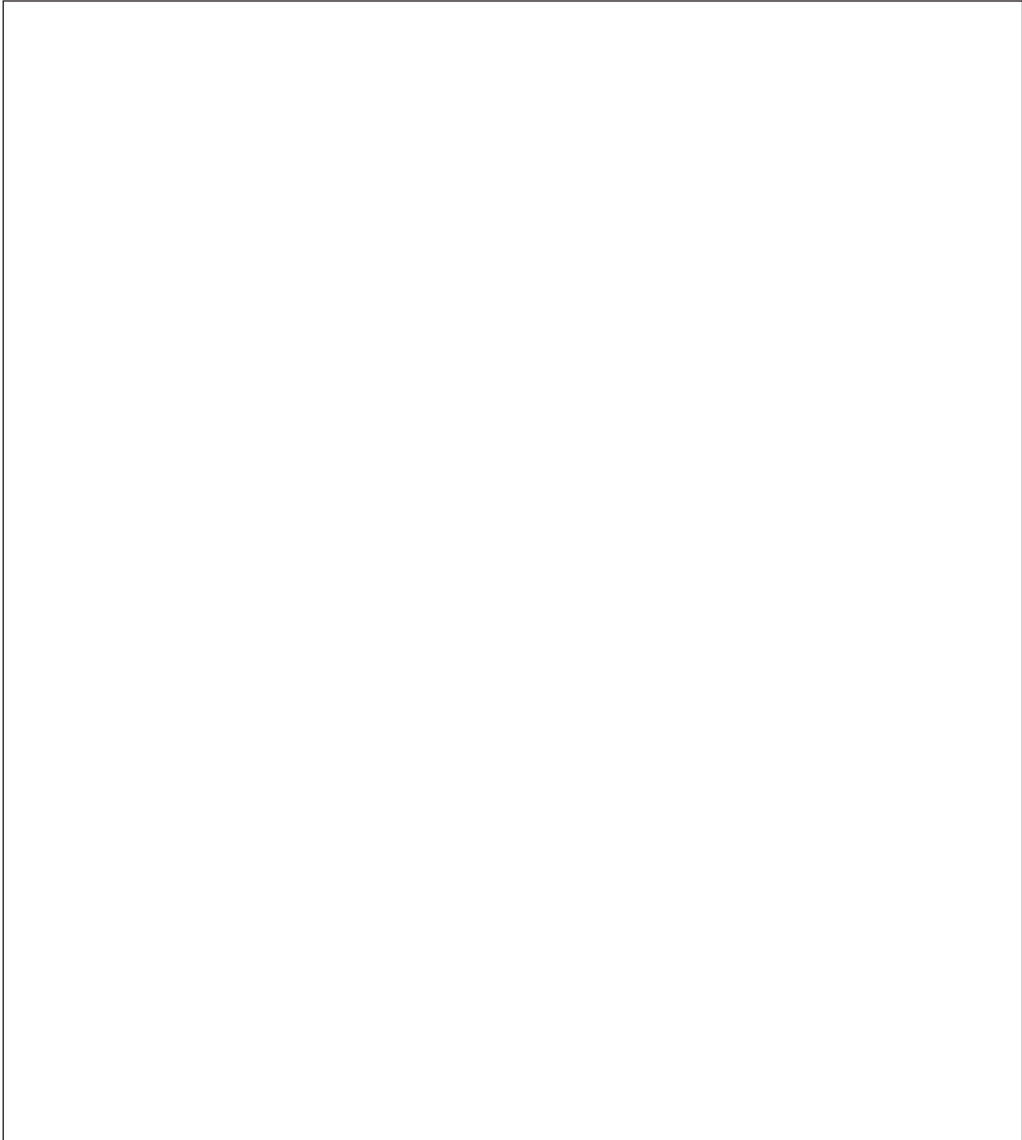
İncelenecek Doku veya Organ : Elastik Arter

Preparat Numarası : 1

3.5. Elastik Bağ Doku

Birbirine paralel, kalın boyutta elastik liflerin oluşturduğu bağ doku tipidir. Liflerin arasında kollajen fibriller, yassı fibroblastlar ve şekilsiz ara maddeler bulunur (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 22: Elastik Bağ Doku



3.6. Yağ Doku

İncelenecek Bağ Doku Tipi : Yağ Doku

İncelenecek Doku veya Organ : Yağ Doku

Preparat Numarası : 17

Belli bir organda lokalize olmamakla birlikte başta deri altı olmak üzere vücudun pek çok bölgesinde bulunur. Liposit adı verilen esas yağ hücreleri ile retiküler fibriller gözlemlenir. Lipositlerin dizilimi sıkı olup çok köşeli bir hücre tabakası şeklinde görülür. Hücreler yağ ile dolmaya başlayınca çekirdek kenara itilip yassı bir hal alır (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 23: Yağ Doku



4. KAN DOKUSU

İncelenecek doku veya organ : İnsan kanı (yayma preparat)

Preparat Numarası : 18

4.1. İnsan kanı

Kan dokusu, şekilli elemanlar ve hücrelerin içinde yüzdüğü sıvı kısımdan (plazma) olmak üzere iki kısımdan oluşmuştur. Kanın şekilli elemanları eritrositler, lökositler ve trombositlerdir. **Eritrositler** bikonkav disk şeklinde, periferik kısımları kalın, merkezi kısımları ince çekirdeksiz hücrelerdir. Preparatlarda çok sayıda ve mavimsi gri renkleri ile ayırt edilirler (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 24: İnsan kanı



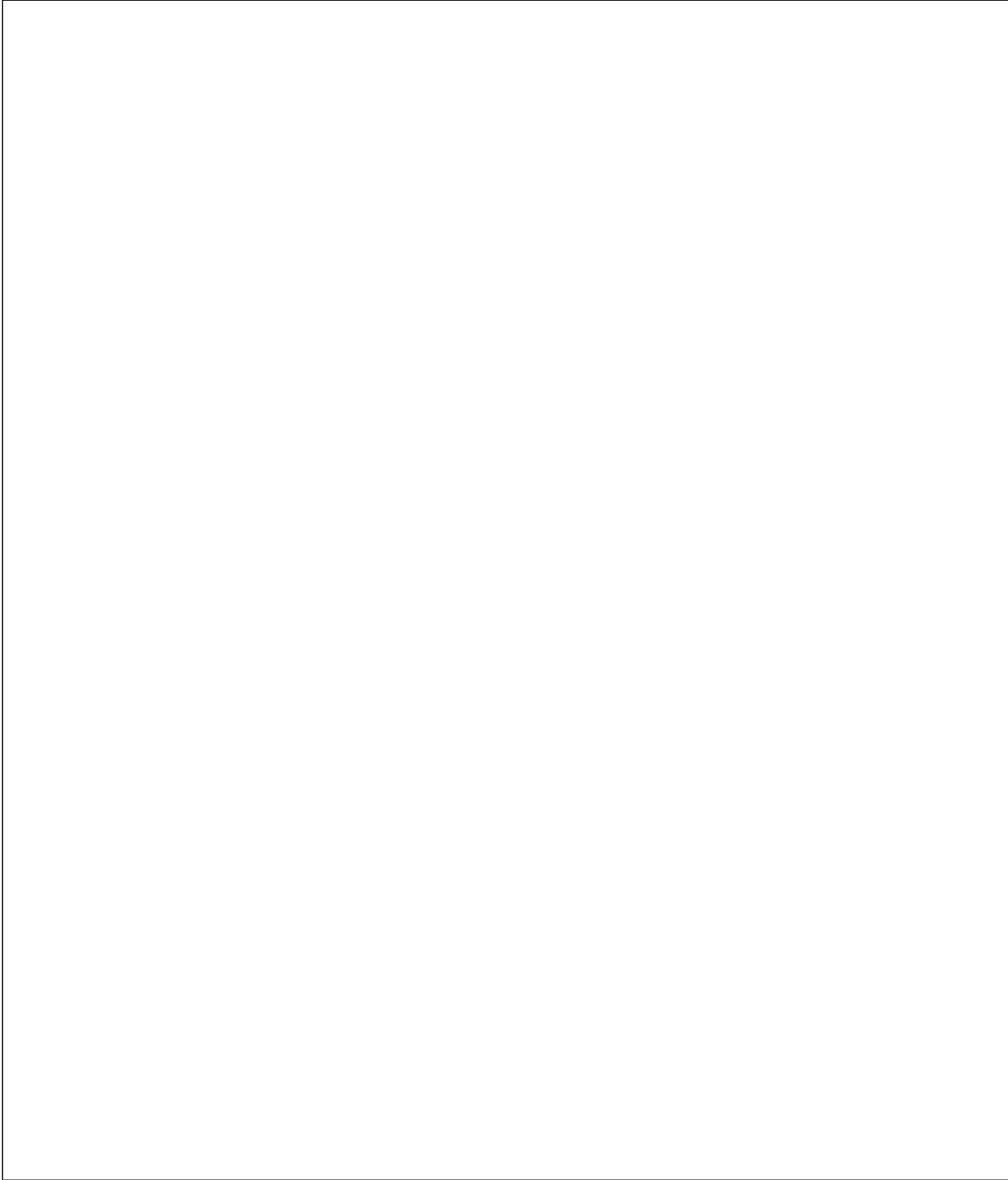
4.2. Kurbağa kanı (yayma preparat)

İncelenecek doku veya organ : Kurbağa kanı (yayma preparat)

Preparat Numarası : 19

İnsanlarda ve memelilerde eritrositlerin çekirdeksiz olmasına rağmen alt sınıf canlıların çoğunda eritrositler çekirdek içerir. Kurbağa kanındaki eritrositler de çekirdek içeren hücrelerdendir. Kurbağa kanından elde edilen kan yayma preparatlarında eritrositlerin oval veya yuvarlak şekilli olduğu görülür (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 25: Kurbağa kanı



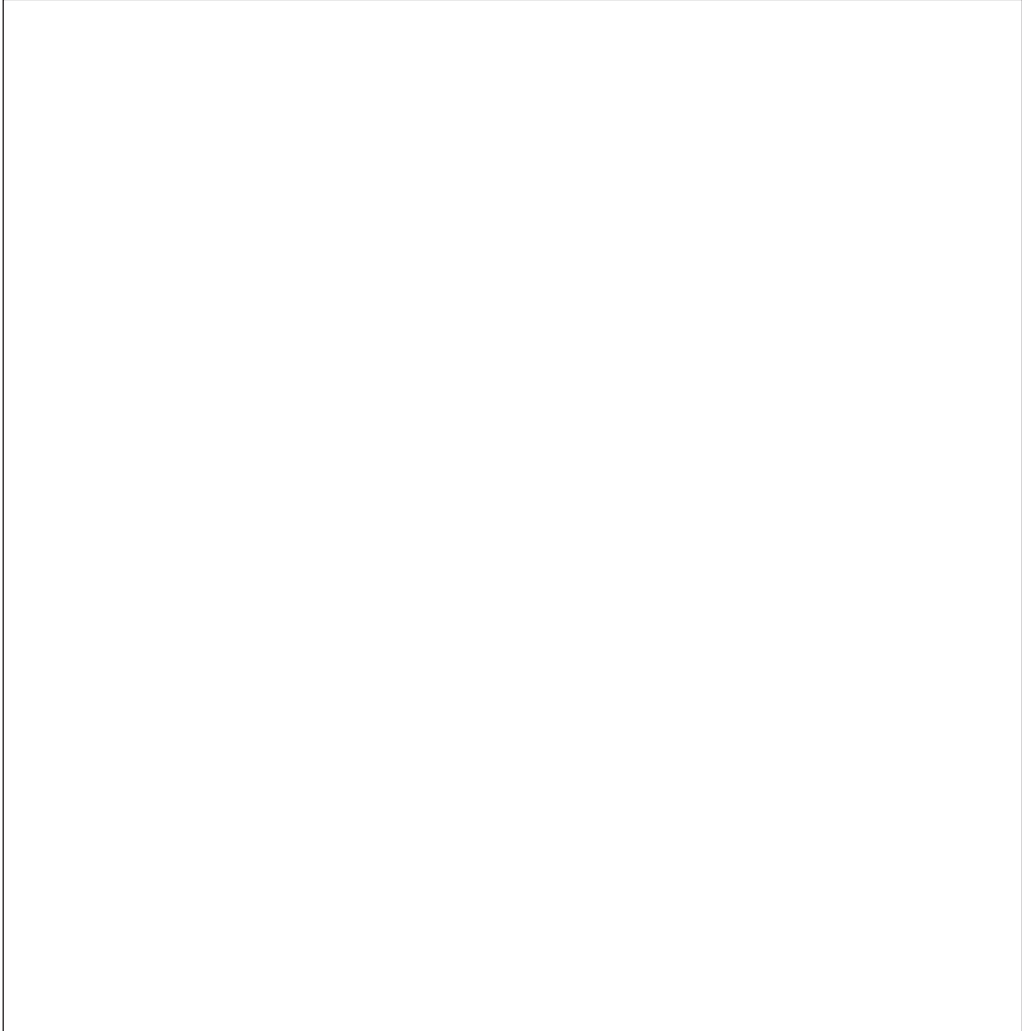
5. KIKIRDAK DOKUSU

İncelenecek doku tipi	: Hyalin kıkırdak
İncelenecek doku veya organ	: Trakea
Preparat Numarası	: 4

5.1. Hyalin kıkırdak

Hyalin kıkırdak vücutta en yaygın bulunan kıkırdak tipidir ve bağ dokusundan oluşmuş perikondrium ile çevrelenmiştir. Periferde, perikondriumun altındaki kıkırdak hücreleri (kondrosit) küçük, uzun ve yassı biçimlidir, kıkırdak yüzeyine paralel ve lakünalar içinde tek tek yerleşmişlerdir. Daha iç bölgelerde ise, hücreler yuvarlaklaşır ve bir laküna içerisinde birden fazla kondrosit bulunabilir. Bir laküna içinde, bir ana hücreden oluşmuş hücre gruplarına *izogen grup* adı verilir (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 26: Hyalin kıkırdak



5. KIKIRDAK DOKUSU

İncelenecek doku tipi : Elastik kıkırdak

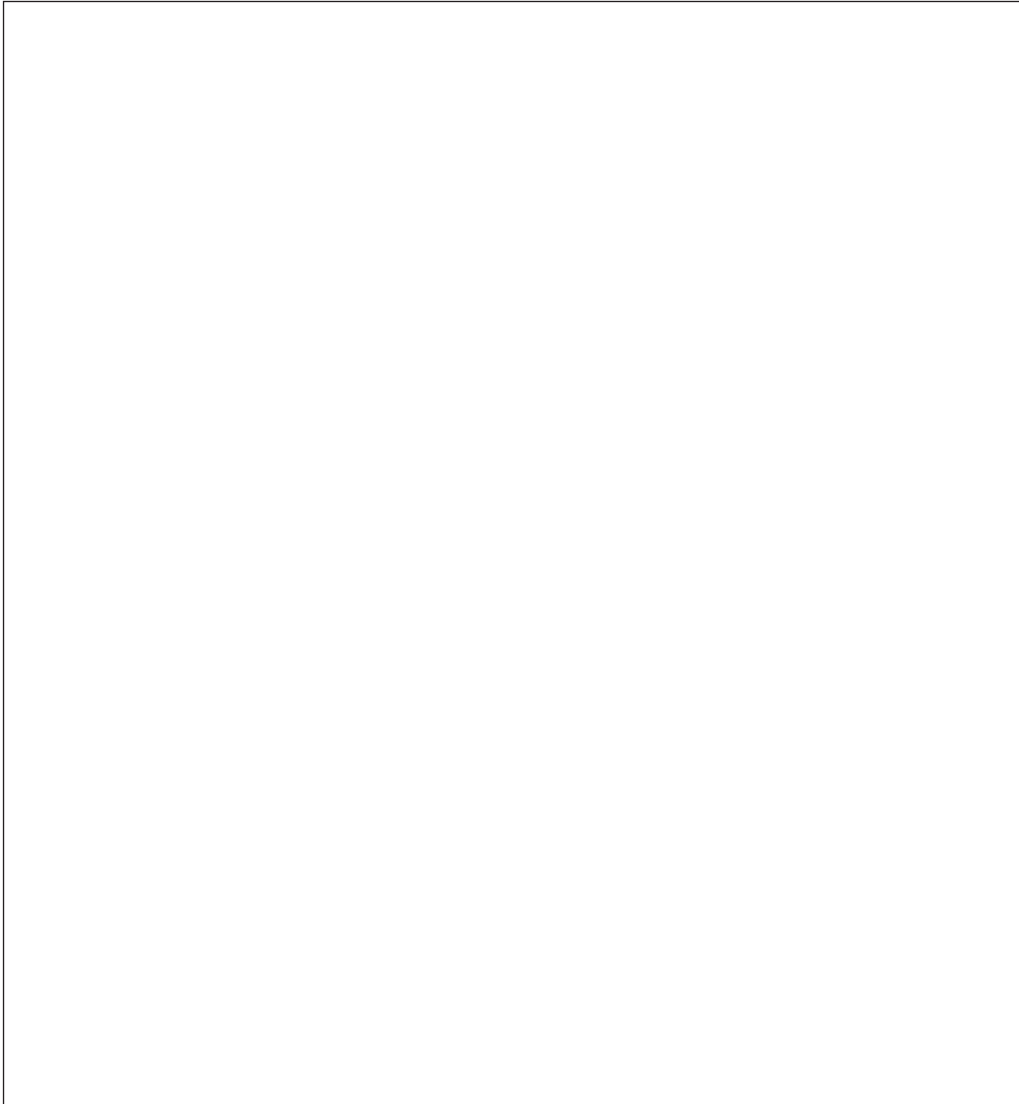
İncelenecek doku veya organ : Kulak kepçesi

Preparat Numarası : 13

5.2. Elastik kıkırdak

Temel olarak hyalin kıkırdağa benzemesine rağmen, taze halde iken daha opak renkte görülmesiyle ayırt edilen elastik kıkırdak kollagen fibriller (tip II) yanında bol elastik fibrillere sahiptirler. Elastik kıkırdakta kondrositler laküna içinde genelde tek olarak bulunurlar, seyrek olarak da ikili gruplara rastlamak mümkündür (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 27: Elastik kıkırdak



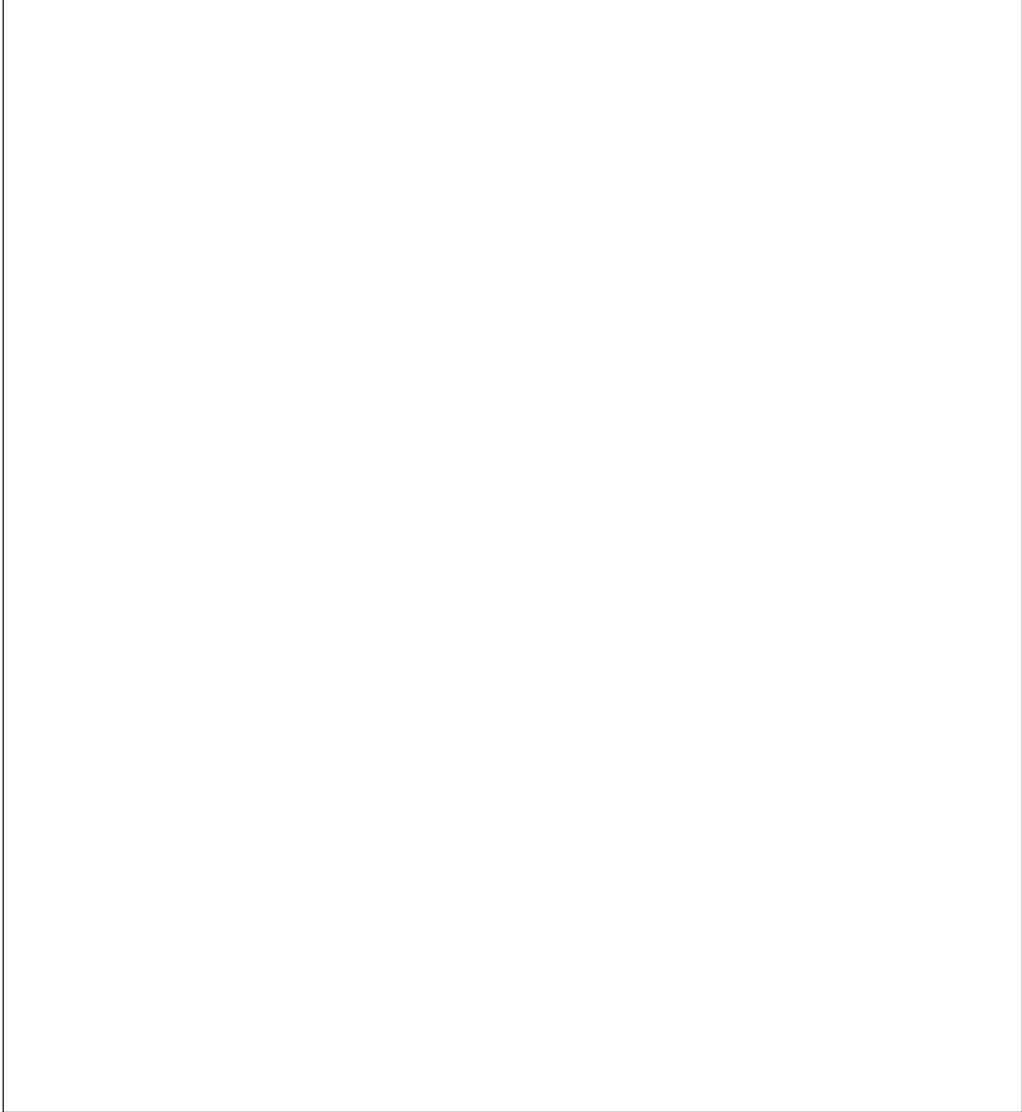
5. KIKIRDAK DOKUSU

İncelenecek doku tipi	: Fibröz kıkırdak
İncelenecek doku veya organ	: İntervertebral disk
Preparat Numarası	: 20

5.3. Fibröz kıkırdak

Fibröz kıkırdak her zaman yoğun bağ dokusu ile ilişkidir ve ligamentlerin kemiğe tutunma yerlerinde olduğu gibi bir geçiş dokusu olarak görev alırlar. Bu yapısı ile hyalin kıkırdak ile bağ dokusu arasında bir yapıya sahiptir. Fibröz kıkırdağın bir başka özelliği de hiçbir zaman perikondriuma sahip olmamasıdır (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 28: Fibröz kıkırdak



6. KEMİK DOKUSU

İncelenecek doku tipi	: Kompakt kemik
İncelenecek doku veya organ	: Kemik doku
Preparat Numarası	: 21

6.1. Kompakt kemik

Kemik insan vücudunun en sert dokularından biridir. Özel bir bağ dokusu tipidir ve ara madde kalsifiye olmuştur. Kompakt kemiğin en belirgin özelliği kanallar ve lamellerden oluşmasıdır. Kanallar kan damarlarını, sinirleri ve bağ dokusunu içerir. Lameller bu kanallar etrafında organize olmuştur. Kanallar iki farklı pozisyonda bulunur; **Havers kanalları** kemiğin uzun eksenine paralel uzanırken, **Wolkmann kanalları** Havers kanallarına dik uzanır ve bunları birbirine bağlar (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 29: Kompakt kemik



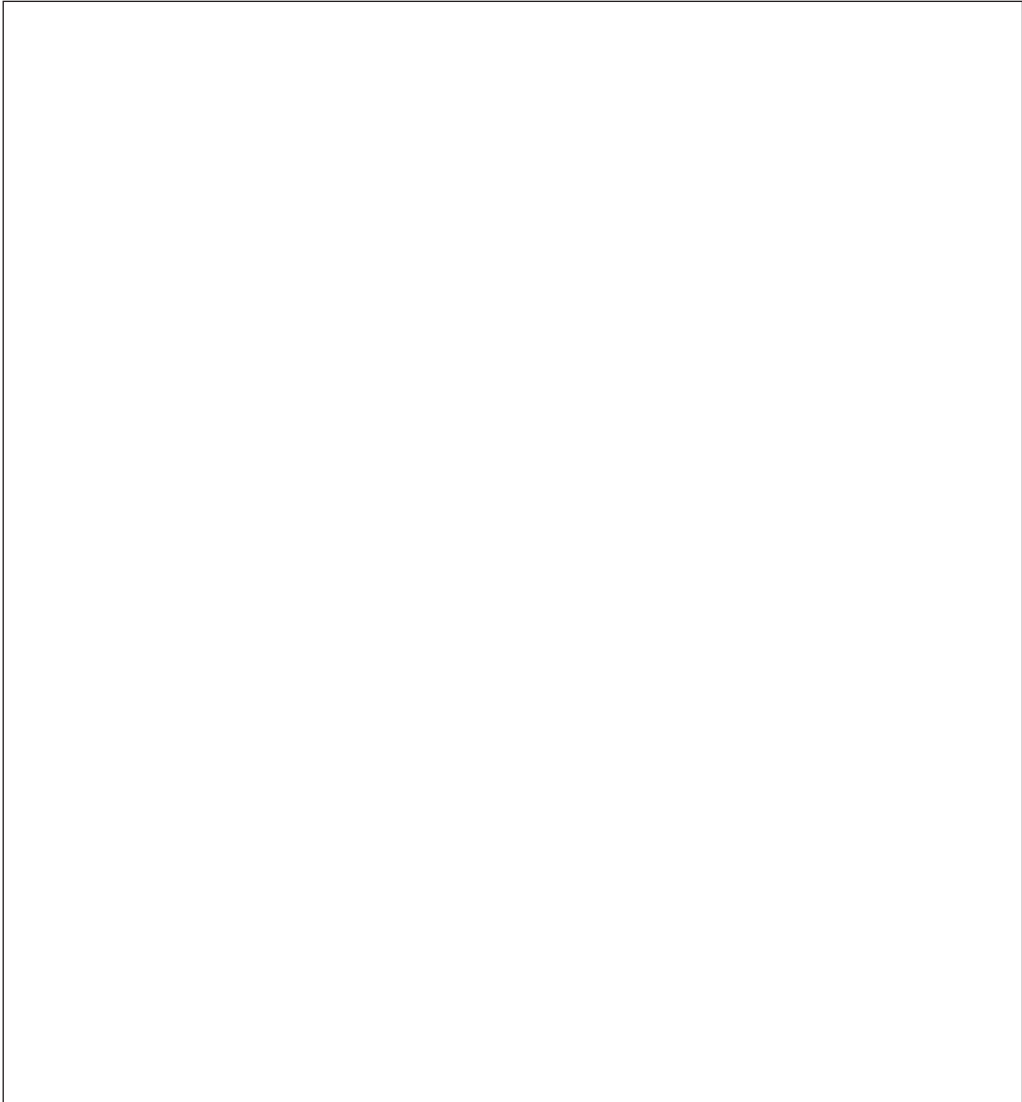
6. KEMİK DOKUSU

İncelenecek doku tipi	: Süngerimsi kemik
İncelenecek doku veya organ	: Kemik doku
Preparat Numarası	: 22

6.2. Süngerimsi kemik

Süngerimsi kemik dokusu, birbiriyle anastomozlaşarak bir ağ yapan kemik trabeküllerinden oluşmuştur ve osteositler bu trabeküller içine düzensiz olarak yerleşmiştir. Kemik trabekülleri oldukça incedir ve bunlarda, kompakt kemikte görülen lameller yoktur. Trabeküllerin arasındaki boşluklar (kemik iliği kaviteleri) kırmızı veya sarı kemik ile doldurulmuştur (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 30: Süngerimsi kemik



6. KEMİK DOKUSU

İncelenecek doku tipi	: Kondral kemikleşme
İncelenecek doku veya organ	: Gelişmekte olan kemik doku
Preparat Numarası	: 23

6.3. Kondral kemikleşme

Gelişmekte olan bir insan fetusuna ait parmak kemiğinden hazırlanan bu kesitte kondral kemikleşme görülmektedir. Gelişimin başlangıç safhasında kemik taslağı tamamen hyalin kıkırdak yapısındadır. Daha sonra kıkırdak yıkılır ve yerine kemik dokusu oluşturulur. Yıkım bir taraftan devam ederken diğer taraftan epifiz bölgesindeki kıkırdak hücreleri mitozla çoğalarak kıkırdağın uzunlamasına büyümesini sağlar. Bütün bu olaylar devam ederken kıkırdak dokusu ve kemikleşme bölgelerinde tabakalaşmalar ortaya çıkar (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 31: Kondral kemikleşme



6. KEMİK DOKUSU

İncelenecek doku tipi	: Desmal kemikleşme
İncelenecek doku veya organ	: Gelişmekte olan kemik doku
Preparat Numarası	: 24

6.4. Desmal kemikleşme

Desmal kemikleşme, kırkırdak gibi bir ara doku oluşmadan direkt olarak bağ dokusundan gelişen bir kemikleşme tipidir. Bu tip kemikleşme kafatası gibi yassı kemiklerin gelişmesi sırasında görülür. Kemikleşmenin gerçekleşeceği bölgelerde, önce bağ dokusu içinde kemikleşme merkezleri ortaya çıkar. Mezenşimal doku damarların etrafında sık hücreli bir yapı oluşturur; mezenşimal hücreler önce osteojenik hücrelere ve sonra osteoblastlara dönüşürler (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 32: Desmal kemikleşme



7. KAS DOKU

İncelenecek Kas Doku Tipi	: İskelet Kası
İncelenecek Doku veya Organ	: İskelet Kası
Preparat Numarası	: 25

7.1. İskelet Kası

İskelet kası hücreleri çok çekirdeklidir. Hücreler birbiri üzerine bindikleri için sınırları ayırt edilemeyip çok hücreli tek bir hücre görünümünde olurlar buna sinsisyum denir. Çekirdekleri periferde yerleşimlidir (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 33: İskelet Kası



7. KAS DOKU

İncelenecek Kas Doku Tipi : Kalp Kası

İncelenecek Doku veya Organ : Kalp

Preparat Numarası : 26

7.2. Kalp Kası

Enine çizgilenme gösterirler. Nukleusları hücrenin merkezinde yer alır. Nukleus oval ve iridir, birden fazla sayıda olabilir. Miyofibriller iskelet kaslarındaki gibi çizgilenme gösterirler ancak daha kalındırlar (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 34: Kalp Kası



7. KAS DOKU

İncelenecek Kas Doku Tipi	: Düz Kas
İncelenecek Doku veya Organ	: Uterus, Kolon
Preparat Numarası	: 27, 10

7.3. Düz Kas

Her bir hücre, bazal lamina ve retiküler lif ağı ile kuşatılmış olup çizgilenme göstermezler. Bu hücreler ince, uzun ve mekik şeklindedir. Nükleuslar her hücrede bir tanedir (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 35: Düz Kas



8. SİNİR DOKU

İncelenecek Sinir Doku tipi	: Piramidal Hücreler
İncelenecek Doku veya Organ	: Beyin
Preparat Numarası	: 28

8.1. Piramidal Hücreler

Beyin gri madde(korteks) ve ak madde(medulla) olmak üzere iki kısımdan oluşur. Gri maddede birbirinden ayırt edilemeyen tabakalar mevcuttur. Bu tabakalar içerisinde piramidal ve granüler hücreler seçilebilir. Piramidal hücrelerin perikaryon kısmı oldukça gelişmiştir, nukleusları yuvarlak ve büyük olup perikaryonun merkezindedir. Bu hücreler multipolar tipte nöronlardır. Aralarında bağ dokusu tipinde glia hücreleri bulunur (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 36: Piramidal Hücreler



8. SİNİR DOKU

İncelenecek Sinir Doku tipi : Purkinje Hücreleri

İncelenecek Doku veya Organ : Beyincik

Preparat Numarası : 29

8.2. Purkinje Hücreleri

Gri ve Beyaz cevher adını verdiğimiz beynin korteks ve medulla yapıları beyincikte de görülür. Gri cevherde dıştan içe moleküler tabaka, ganlion tabaka ve granüler tabaka bulunur. Moleküler tabakada hücre sayısı azdır. Beyaz cevhere en yakın olan granüler tabakada granüler hücreler ve golgi tipi nöronlar görülür. Orta tabaka (ganglion tabaka) purkinje hücrelerinden meydana gelir. Bu hücreler büyük ve merkezinde iri çekirdekleri olan multipolar tipte sinir hücreleridir. Bunların dentritleri moleküler tabakaya dönük olup aksonları granüler tabakaya hatta beyaz cevhere kadar girer (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 37: Purkinje Hücreleri



8. SİNİR DOKU

İncelenecek Sinir Doku Tipi	: Periferik Sinir
İncelenecek Doku veya Organ	: Periferik Sinir
Preparat Numarası	: 30

8.3. Periferik Sinir

Merkezi sinir sistemini terk eden sinir lifleri bağ dokusu ile birlikte sinir adını alır. Tek bir sinir lifinin etrafı schwan hücresi ile kuşatılmıştır, schwan hücrelerinin etrafı ise retiküler fibrillerden oluşur. Retiküler liflerden oluşan bu bağ doku kılıfına endonörium denir. Sinir lifi ve schwan hücrelerini içeren endonöriumlar bir araya gelerek sinir demetini oluşturur. Bu demeti dıştan perinörium sarar. Sinir demetlerini bir arada tutarak bunları dıştan saran kılıfa epinörium adı verilir, fibröz bir kılıftır (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 38: Periferik Sinir



8. SİNİR DOKU

İncelenecek Sinir Doku Tipi : Ganglion

İncelenecek Doku veya Organ : Ganglion

Preparat Numarası : 31

8.4. Ganglion

Periferik sinir sisteminde sinir hücrelerinin perikaryonları belli bölgelerde yan yana gelerek grup oluştururlar. Bu grupların her birine ganglion adı verilir. Ganglionların etrafı bağ dokudan oluşan kapsülle çevrilidir. Ganglionun içerisindeki perikaryonlar iri olup merkezinde iri çekirdekler ihtiva ederler. Perikaryonların etrafı küboid biçimli satellit hücreleriyle sarılıdır. Satellit hücrelerin dışını ise fibröz bağ doku tabakası örter (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 39: Ganglion



8. SİNİR DOKU

İncelenecek Sinir Doku Tipi : Meisner Korpuskülü

İncelenecek Doku veya Organ : Deri, Parmak ucu

Preparat Numarası : 5

8.5. Meisner Korpuskülü

Dermisin epidermise doğru yaptığı bağ doku papillalarının içerisinde gözlemlenir. Bu korpuskül, schwann hücreleri ve sinir sonlanmalarından oluşan bir çekirdek ile bunları saran fibroblastlar ve kollajen fibrillerden oluşur (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 40: Meisner Korpuskülü



8. SİNİR DOKU

İncelenecek epitel tipi : Pacini Korpuskülü

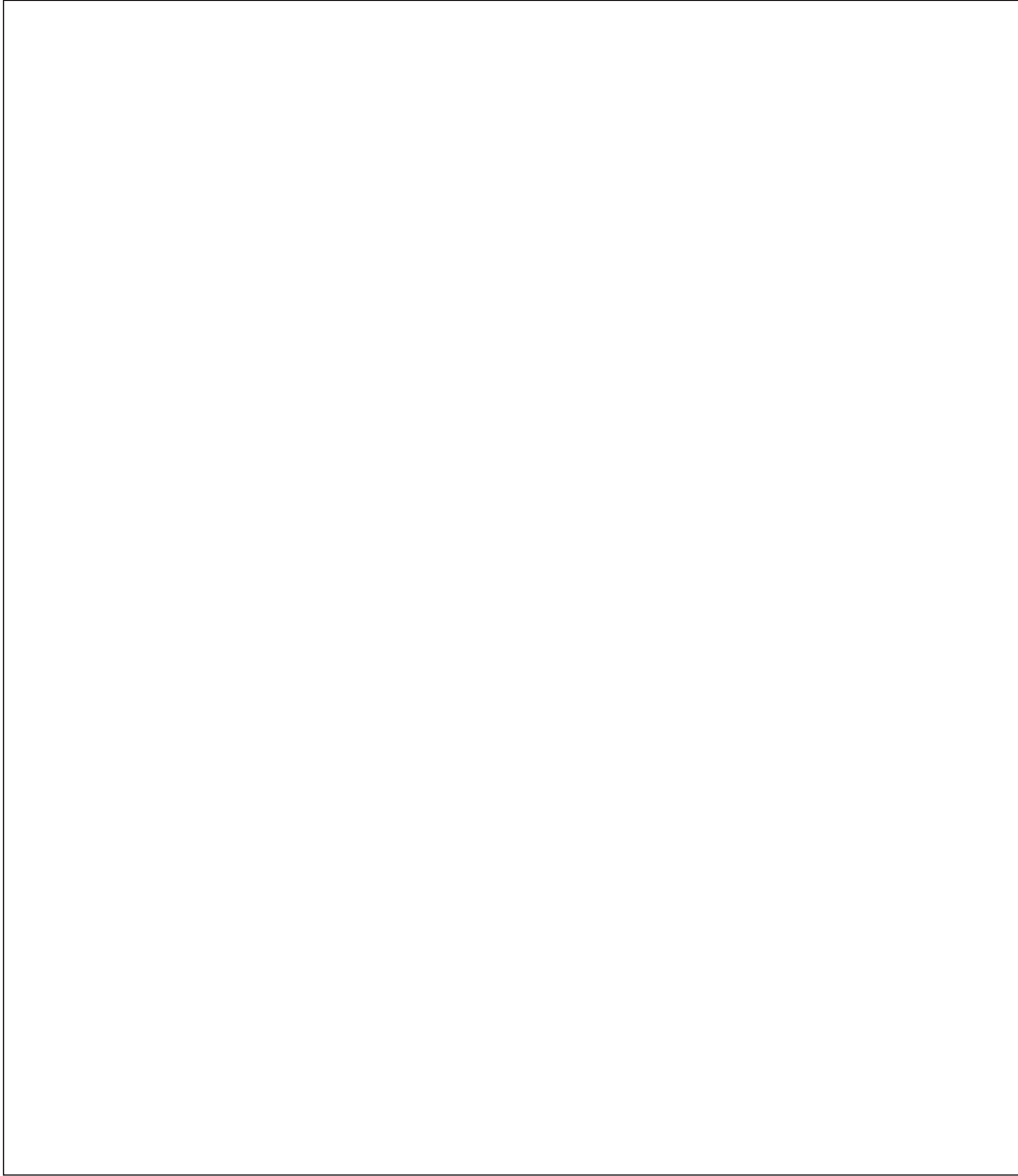
İncelenecek doku veya organ : Deri

Preparat Numarası : 5

8.6. Pacini Korpuskülü

Deride dermis ve hipodermis bölümlerinde bulunan duyu algılayıcılarıdır. Yumurta biçimlidir. Dıştan ince bir kapsül ile çevrilidir. Miyelinsiz afferent sinir barındırır (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 41: Pacini Korpuskülü



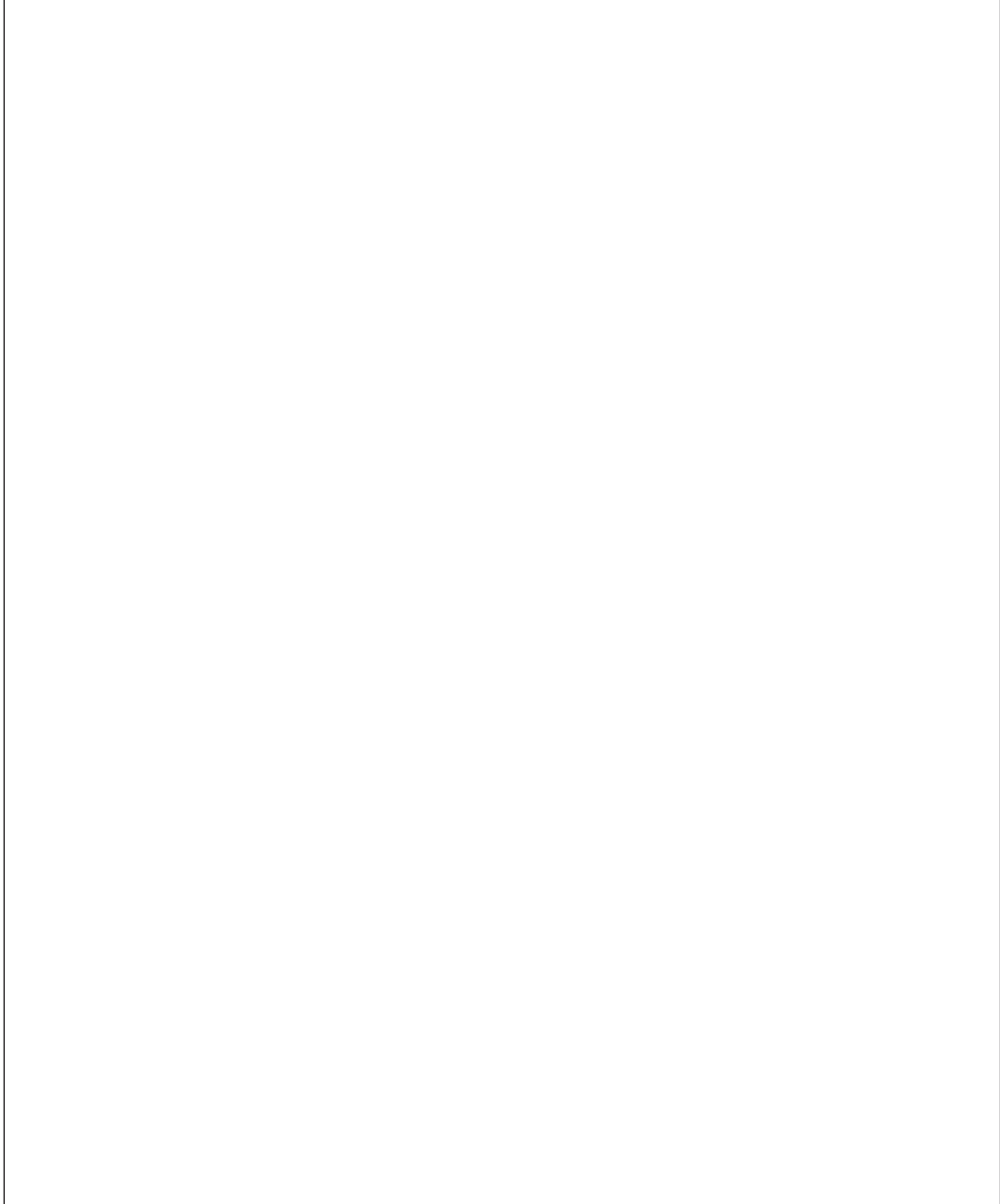
9. DERİ VE EKLERİ

İncelenecek Deri Tipleri	: Kılılı deri, Kılısız deri
İncelenecek Doku veya Organ	: Parmak ucu
Preparat Numarası	: 5

9.1. Kılılı Deri, Kılısız Deri

Epidermiste keratinize çok katlı yassı epitel bulunur (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 42: Kılılı Deri, Kılısız Deri



9. DERİ VE EKLERİ

İncelenecek Deri Eki Tipi : Ter bezi, Yağ bezi

İncelenecek Doku veya Organ : Kulak kepçesi

Preparat Numarası : 13

9.2. Ter Bezi, Yağ Bezi

Basit kıvrıntılı tübüler bezler olup dermisin derinliklerine veya hipodermisin üst bölümüne kadar uzanır. Yağ bezleri kıl foliküllerine yakın lokalize olmuştur. Burada basit ya da dallı alveoler bezler göze çarpar. Yağ bezi etrafı bağ dokusu ile çevrelenmiştir (Özdamar ve ark., 2012).

Tablo 43: Ter Bezi, Yağ Bezi



- CELASUN, B. (2015), Patoloji Nedir?, 04.08.2019 tarihinde <http://www.patoloji.gen.tr> adresinden alındı.
- CEYLAN, T., (2017). Sisplatin'in Oluşturduğu Testis Hasarı Üzerine Kafeik Asit Fenetil Ester'in Koruyucu Etkisinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- KEMİK DOKUSU VE DEKALSİFİKASYON. 05.08.2019 tarihinde <https://www.biyologlar.com> adresinden alındı.
- KÖSEM, M., ORAL, H., İBİLOĞLU, İ. (2003). Cerrahi Patolojide Frozen Kesitin Yeri, Van Tıp Dergisi, 10 (4):113-117.
- REZANKO, T., "Sitolojik Yaymalarda Rutin Boyama Yöntemleri". 05.08.2019 tarihinde <http://www.turkpath.org.tr> adresinden alındı.
- ÖZDAMAR, S., SÖNMEZ, MF., YAY, A. (2012). Histoloji Laboratuvar Kılavuzu, Kayseri: Erciyes Üniversitesi Yayınları.
- TC MİLLİ EĞİTİM BAKANLIĞI, (2013). Laboratuvar Hizmetleri Doku Preparatını Boyama, Ankara.
- TC MİLLİ EĞİTİM BAKANLIĞI, (2013). Laboratuvar Hizmetleri Doku Preparatı-2, Ankara.
- TC MİLLİ EĞİTİM BAKANLIĞI, (2015). Laboratuvar Hizmetleri Doku Preparatı, Ankara.

Patoloji ve Histoloji Laboratuvarı Uygulama Kitabı

Tayfun Ceylan & Mehmet Alparslan Ünal

Patoloji ve Histoloji Laboratuvarı Uygulama Kitabı, temelde üniversitelerin Patoloji Laboratuvar Teknikleri programında okuyan öğrenciler için hazırlanmıştır. Patoloji laboratuvarı uygulamalarında sık kullanılan takip ve boyama yöntemleri, takip aşamalarında ortaya çıkan hatalar ve bu hataların giderilmesine yönelik pratik çözümlerin yanı sıra pek çok farklı uygulamanın prosedürünü bir arada bulabileceğiniz bu kitap, aynı zamanda halen mesleğini icra etmekte olan tüm patoloji teknikerlerinin faydalanabileceği bir kaynak niteliğindedir. Kitap içerisinde rutin doku takip prosedürü, 7 farklı fiksatif solüsyonu hazırlama prosedürü, 4 farklı dekalsifikasyon solüsyonu hazırlama prosedürü ve 10 farklı doku boyama prosedürüne ek olarak histolojik dokulara ait çizim alanları ve laboratuvar uygulama çalışmaları için not alma alanları hazırlanmıştır. Prosedür uygulamalarının takibi ile teknikerlerin patoloji ya da histoloji laboratuvarlarında gereksinim duyacağı temel uygulama bilgileri kazandırılacaktır.

Bu kutsal mesleğe gönül veren, geleceğin sağlık emekçileri olan sizlere; bu kitabın tüm eğitim ve meslek hayatınızda faydası olması dileğiyle.



KAPADOKYA
ÜNİVERSİTESİ

Nevşehir Yerleşkeleri:
Mustafapaşa - Uçhisar - Ürgüp
Tel: 0384 353 5009 (pbx) Faks: 0384 353 5125
İstanbul Yerleşkesi:
Sabiha Gökçen Uluslararası Havalimanı
Tel: 0216 588 0010 (pbx) Faks: 0216 588 0012
info@kapadokya.edu.tr

