

## Histokimya

Figen Doran

Department of Pathology, Cukurova University, Faculty of Medicine, Adana, Turkey

Accepted for publication on 22 December 2004

Histochemistry is a special chemical procedure of which substances within cells or tissues become visible for subsequent microscopic examination. Besides developing new techniques, many of the traditional histochemical dyes remain useful for diagnostic utility since they were discovered.

**Keywords:** Histochemistry

Histokimya, maddeleri hücre veya doku içinde mikroskopik inceleme için görünür hale getiren özel bir kimyasal prosedürdür. Tanısal amaçlı kullanım için geliştirilen yeni teknikler yanı sıra, geleneksel histokimyasal boyaların pekçoğu da keşfedildiklerinden bu yana yararlılıklarını sürdürmektedir.

**Anahtar sözcükler:** Histokimya

### Histokimya

Histokimya Pears'ın tanımı ile, maddeleri hücre ve doku düzeyinde ayırt etmeye, yerleşimlerini ve miktarlarını saptamaya yarayan kimyasal tekniklerin ortak adıdır. Bu amaçla spesifik maddeler, reaktif gruplar ve enzim katalizörleri kullanılabilir.

Raspail ve Pears doku ve hücrenin mikroskopik incelenmesi amacıyla kimyasal reaksiyonların kombinasyonunu 1825'te gerçekleştirmiş olmalarına karşın, tekniğin histoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanılması 1860'larda başlamış ve vazgeçilmez olarak nitelendirilmesi 1930'ları bulmuştur. Histokimyasal analizlerin kimyasal zemininin değerlendirilip açıklandığı ilk kitap 1930'da basılmış, ardından 40 yıllık bir duraksama dönemi yaşanarak nihayet 1970'de bu bilgiler geliştirilerek güncelleştirilmiştir.

Bundan sonra immünohistokimyasal prosedürler geliştirilmiş, in situ hibridizasyon ve moleküler biyolojik teknikler histokimyaya eklenmiştir. Patolojik tanı için hemotoksilen-eosin boyası çoğu zaman yeterli

iken, nadir olmayarak ek histokimyasal boyalara ihtiyaç duyulur. Son yıllarda sıklıkla karşımıza çıkan "Non-immünojenik, nükleik asit temeli olmayan prosedürlerin günümüzde değeri var mıdır?" Sorusuna verilecek yanıt ise tek kelime ile "Evet" olmalıdır. Çünkü histokimya daha ucuzdur, tanısal önemini korumaktadır, geliştirilebilir ve daha çok uzun yıllar patolojinin önemli bir yardımcısı olmayı sürdürecektir.

### Histokimyanın ilkeleri

Histokimyasal prosedürler doku ya da hücrelerin temel özellikleri esas alınarak uygulanır. Tüm boyama yöntemleri için şu sorulara yanıt verilebilmelidir:

- Boya hangi doku komponenti için yapılmaktadır?
- Niçin bazı komponentler boya alır, bazı komponentler ise almaz?
- Her doku komponenti için boya yapılabilir mi?

Klasik olarak histokimyasal reaksiyonlar 4 temele dayanır:

1. Basit iyonik etkileşimler
2. Aldehitlerin Schiff rejanı veya gümüş bileşikleri ile reaksiyonları.
3. Aromatik diazonyum taşlarının proteinler veya hormonlardaki aromatik tuzlar ile birleşmesi
4. Enzimlerin primer reaksiyon ürünlerinin renklendirilmiş çökeltiye dönüştürülmesi

Bazı maddeler yukarıdaki reaksiyonlar ile direkt olarak ayırt edilmezler. Bu durumda oksidasyon gibi indirekt kimyasal değişiklikler gerekir. Histokimyasal reaksiyonların özgünlüğü bazı modifiye reaksiyonlarla; örneğin oldukça spesifik substratlar veya inhibitörlerin kullanımı ile pH 'ın değiştirilmesi gibi tekniklerle kontrol edilebilir. Çünkü tüm histokimyasal metodlar rejanların selektif olarak doku içine alımı ya da dokudan uzaklaşması faktörlerine bağlıdır.

İdeal histokimyasal boyamanın gerçekleşebilmesi için;

1. Test edilen komponentin dokudaki yerleşimi veya korunmasında bir yetersizlik olmamalı;
2. Tüm rejanlar hücre veya dokuya aynı oranda penetre olabilmeli;
3. Reaksiyon rölatif olarak spesifik olmalı;
4. Son renklendirilmiş reaksiyon ürünü tespit edilebilmeli ve bu boya kalıcı olmalıdır.

Bu durumda histokimyada iki fazın gerekliliğinden söz edilebilir:

- a. Doku kurduğunda boyayı kuvvetle almış olmalıdır.
- b. Afinite zorlamalar ile mutlaka geliştirilmiş olmalıdır.

Her bir hücre için geçerli değişik biyokimyasal maddeler vardır. Ancak bazı özel hücreler görece özgün bir yapı içerebilir veya her hücre için değişik miktarlarda kimyasal madde kullanımı gerekebilir. Genel olarak hücre içindeki şu komponentlerin histokimyasal analizleri yapılabilir:

1. Nükleik asitler.
2. Proteinler ve peptidler (enzimler ve hormonlar)
3. Mukosubstanslar
4. Lipidler
5. İnorganik tuzlar

Bu maddelerin pek çoğu geleneksel histokimyasal prosedürler kullanılarak gösterilebilir. İmmünojenik reaksiyonlar veya in situ hibridizasyon ise özgün

proteinlerin veya nükleik asitlerin ayırt edilmesini sağlar. Ayrıca bazı maddelerin değişik karbonhidrat gruplarına seçici bağlanmasını sağlayan teknikler de vardır.

## Spesifik organlarda uygulama

### Sinir sistemi

Sinir sisteminin hastalıklarının, özellikle demiyelinizan, dejeneratif ve depo hastalıklarının saptanmasında histokimyanın önemli bir rolü vardır.

Örneğin aksonlarda zedelenmeye yol açan sekonder demiyelinizan hastalıklarda (Wallerian) veya miyelin kılıfın selektif olarak zedelenmesi primer demiyelinizan hastalıklarda tanıda histokimyasal tekniklerden önemli ölçüde yararlanır. Her ne kadar bu hastalıklarda etyoloji ve patogenezi oldukça değişkense de, miyelin üzerindeki etkileri aynıdır ve gösterilebilir. Normal miyelin hidrofildir, zedelenmeden sonra hidrofobik lipid damlacıklarına çevrilir. Bu değişiklik zedelenmeden yaklaşık 10 gün sonra görülebilir hale geçer; lizozomal enzim ve nötral lipid boyaları ile frozen kesitlerde gösterilebilir. Bazen bu reaksiyonlar  $\beta$ -galaktosidaz ve oil red O gibi boyalarda kombine edilebilir.

Fikse edilmiş dokularda ise miyelinin durumu luxol fast blue ile gösterilir. Bu boya normal miyeline kuvvetle bağlanır, miyelin yıkımı olan alanlar ise boya almazlar.

Histokimyasal reaksiyonlar nöronal dejenerasyonu göstermede daha az yararlıdır. Kromotolizis nöronal dejenerasyonu göstermede karakteristiktir ve rutin boyalarla izlenebilir. Parkinson hastalığında "Lewy cisimcikleri", NaOH-dikromat asit-hematin reaksiyonu ile izlenebilir. Alzheimer hastalığında görülen plaklar ise Congo red boyası ile gösterilebilir.

Lipid ya da mukopolisakkarit metabolizmasında bozukluğa yol açan metabolik sinir sistemi hastalıklarının pek çoğu enzim eksiliği sonucu herediter olarak meydana gelir. Her ne kadar histokimyasal metodlar depo ürünlerini ayırt etmekte çok başarılı değilse de, klinik öykü, histolojik değişiklikler ve histokimyasal reaksiyonlar kombine edilerek sonuca ulaşılabilir. Daha ince ayrıntılar için özel laboratuvarlarda biyokimyasal analiz prosedürlerine ihtiyaç duyulur.

Gangliosidozis'de (Tay-Sachs ve diğerleri) farklı enzim defektlerinin oluşturduğu benzer değişiklikler görülür. Hem santral hem periferik sinir sisteminde fazla miktardaki gangliosidin varlığı nedeni ile nöronlar balonlaşmış şekilde izlenir. Bu materyal diastaza dirençli PAS pozitif boyanma gösterir. Feyter's thionin metodu da bir metakromatik reaksiyondur.

Batten hastalığında (ceroid lipofuscinosis) lipofusine benzer bir maddenin nöronal depolanması söz konusudur. Bu maddeyi içeren nöronlar PAS ve Sudan black ile koyu boyanır. Eğer bir kloroform/metanol solüsyonu ile materyal muamele edilirse gangliosidoziste solma, Batten hastalığında ise rezistans görülür. Bu hastalıkta rektal biyopsi örneğindeki ganglion hücrelerinde histokimyasal tanı mümkündür.

Demiyelinizan bir konjenital hastalık olan Krabbe lökodistrofisinde ise (galaktoserebrosidaz eksikliği) globoid hücrelerde beyaz bir madde birikir. Bu hücreler kuvvetli PAS (+)'dir, Sudan-Black ile zayıf boyanırlar, asit fosfataz ile reaksiyonları ise güçlüdür. Globoid hücreler periferik sinir sisteminde izlenmezler, ancak Schwann hücrelerinin asit fosfataz ile kuvvetli boyanması tanıyı oldukça destekler.

Aryl sulfataz A'nın bir defekti sonucu galaktoserebrosid sülfat makrofajlarda ve farklı dokulardaki bazı hücrelerde birikir. Bu madde kristal viole, toluidine blue gibi bazı boyalarla metakromatik boyandığından ötürü bu hastalığa metakromatik lökodistrofi de denir. Deride ve Schwann hücrelerinde biriken bu madde böbrek tübüllerinde de izlenir ve buralarda santral sinir sisteminden daha kolay gösterilir.

Nöronal balonlaşma yalnızca Tip A ve Tip C'de izlenir. Sifingomiyelin, kolesterol ve gangliosid Tip A'da birikir; PAS ve ferrik hemotoksilen ile pozitif boyanma gösterir. Feyter's thionin ise metakromatik boyanma sağlar. Aynı reaksiyon makrofajlar için de söz konusudur. Kemik iliği ya da diğer bölgelerdeki makrofajlarda bu maddeyi göstermek daha kolaydır. Tip C'de ise suda çözünen oligosakkaridin nöronal birikimi söz konusudur ve bu madde frozen kesitlerde kuvvetli PAS pozitif boyanır. Hücreler ayrıca asit fosfataz ile kuvvetli, Feyter's thionin ile ise metakromatik boyanma gösterir. Sudan black

negatiftir. Gastrointestinal sistemdeki nöronlar da aynı değişiklikleri gösterdiklerinden bunların incelenmesi santral sinir sistemine göre daha uygundur.

Pompe hastalığı (Asit  $\alpha$ -glukosidaz eksikliği) glikojenin nöronlar ve astrositler pek çok farklı hücrede birikimi sonucu oluşur. Gastrointestinal sistemden alınan biyopsi örnekleri tanı için yeterlidir. Bu hastalığın erişkin formunda ise sinir sistemi genellikle etkilenmez.

Mukopolisakkaridozların bazı tiplerinde nöronlar balonlaşma gösterirler ancak depo materyali gangliosidlerin bir karışımı olup mukopolisakkarid özelliğinde değildir. Nöronlar frozen kesitlerinde PAS, Sudan black ve Luxol fast blue ile pozitif boyanır. Mukopolisakkaridler frozen kesitlerinde toluidin blue ile perivasküler bölgelerde gösterilebilir.

### İskelet kası

Kas biyopsi örneklerinde histokimyasal teknikler hala tanınal önemlerini korumaktadır. Değişik kas lifleri arasındaki morfolojik benzerliklere rağmen aslında bunlar heterojendir. Bu farklılıklar histokimyasal teknikler kullanılarak ortaya çıkarılabilir ve kas hastalıkları böylece aydınlatılabilir. Enzim aktivitesinin rutin takipte yok olmasını engellemek için hemen tüm tekniklerde dokuların buz kristal formasyonunu koruyan sıvı azot ile  $-150^{\circ}\text{C}$ 'ta dondurulması ve kriyostatla kesilmesi gerekir. Boyamada temel kas fibrillerinin tipleri özellikle önemlidir, asidik ve bazik preinkübasyonlar ile miyofibriler ATP'azlar bu amaçla uygulanan yararlı tekniklerdir. Kas fibrilleri genel olarak kontraktıl yapılarına göre iki temel gruba ayrılır. Yavaş (Tip I) ve hızlı (Tip II) fibrillerden Tip I olanları düşük düzeyde ATPaz ile yüksek miktarda mitokondrial oksidatif enzim içerirler. Tip II fibriller ise düşük orandaki mitokondrial oksidatif enzimlerine karşın yüksek miyofosforilaz aktivitesi gösterirler ve bu nedenle anaerobik glikolizisi kullanırlar. Kullanılan enzime göre histokimyasal olarak boyanan fibriller iki temel ve ikincisi üç alt tipe ayrılırlar (Tablo 1).

Kas histokimyasal prosedürlerinin ikinci amacı belirleyici enzimlerle sağlıklı kas liflerini tespit etmektir. Mitokondrianın incelenmesi için süksinat dehidrogenaz (SDH) en elverişli enzimdir, ancak NADH dehidrogenaz da kullanılabilir. Miyofibriler ATPaz miyofibrillerdeki anomalileri belirleyen bir

**Tablo 1.** Enzim boyanma özelliğine göre kas fibrilleri.

	Kas fibril tipleri			
	Tip I	Tip IIA	Tip IIB	Tip IIC
ATPase pH 10.2	-	++	+++	+
ATPase pH 4.3	+++	-	-	+
Succinate dehydrogenase	+++	++	+	++
Myophosphorylase	+	++	+++	+

enzimdir. Asit fosfataz ya da  $\alpha$ -naftil asetat esteraz inflamasyona uğramış kastaki fagositik hücrelerin tespiti için kullanılabilir.

Yaygın metabolik hastalıkların taranmasında glikojen veya lipidlerin tespiti için kullanılan histokimyasal teknikler PAS ve Sudan black boyasıdır. Pek çok spesifik enzim defekti, miyofosforilaz, fosfofrüktokinaz, sitokrom oksidaz ve miyoadelinat deaminaz gibi enzimlerin katalitik aktivitelerinin görülmesiyle ortaya çıkarılır.

Kas biyopsi örneklerinin seri kesitleri yapılmalı, en azından asidik ve bazik preinkübasyonla ATPaz, SDH ve miyofosforilaz çalışılmalıdır. Ayrıca kesitler hemotoksilen eosin ve Masson trikrom ile boyanmalı, histokimyasal bulgular ile histolojik görünüm korele edilmelidir.

Kas biyopsi incelemeleri denervasyon hastalıkları konusunda da bilgi verir. Normal kas fibrilleri düzgün düzenlenmiştir. Eğer birkaç motor sinir etkilenmişse atrofik fibriller dağınık görünür ve etkilenmiş birim kolayca fark edilir. Sinirin reinnervasyonu gerçekleşmişse, biyopsi örneğinde atrofi kısmen maskelenebilir. Reinnervasyon Tip II C fibrillerinde artma ile sonuçlanır, bu durumda mitokondrial enzim aktivitesi değişeceğinden hedef (target) fibriller oluşur. Müsküler distrofiler de histokimyasal tekniklerle incelenebilir. Duchenne tipi müsküler distrofide tip I fibrilleri artar, Tip I ve Tip II fibrilleri arasındaki ATPaz farklılığı kaybolur, Tip IIB fibrilleri ise azalır. Hastalığın erken dönemlerinde miyosit nekrozu olur, bu da lizozomal enzim teknikleri ile demonstre edilebilir. Becker müsküler distrofide de tip I fibrillerinin baskındır.

Myotonik distrofi Tip I fibrillerinde atrofi ve Tip IIA ve IIB fibrillerinde hipertrofi yanısıra çok sayıda

halka lif (ring fiber) ile karakterizedir. Burada sarkoplazmik kitle halkanın dışına çıkmıştır. Myotonia congenita'da fibril tiplerinden Tip IIB'de büyük oranda kayıp meydana gelir.

Kas histokimyası birkaç konjenital miyopatide de tanınal önem taşır. Bunlar içinden santral kor hastalığında NADH dehidrogenaz boyası ile santral bölgede boyanma olmadığı gösterilebilir. Santronükleer miyopatilerde Tip I fibrilleri anormaldir ve histokimyasal olarak gösterilebilir.

Metabolik miyopatilerin tanısı için de histokimyasal tekniklere gereksinim vardır. Glikojenosisde kas lifleri glikojen birikimi nedeniyle vakuolizasyon gösterir ve bu durum PAS boyası ile kolayca gösterilebilir. Bu değişiklikler özellikle glikojenozis tip II ve tip III'de belirgindir (McArdle Hastalığı). Bu hastalıkta miyofosforilazın yokluğu histokimyasal olarak izlenebilir. Lipid depo hastalıklarında, lipidin iskelet kasında nonspesifik intrasellüler birikimi söz konusudur. Respiratuar zincirdeki enzim defektleri mitokondrial miyopatilerin önemli bir kısmında gözlenir. Bu grupta morfolojik olarak "kırmızı paçavra lif" ("ragged red fiber") denilen bir görünüm oluşur ve Gomori'nin trikrom boyasıyla mitokondrilerin periferde akümüasyonu şeklinde izlenir; daha demonstratif olarak da SDH ve NADH dehidrogenaz reaksiyonları ile gösterilir. Pek çok spesifik enzim defektinin söz konusu olduğu bu hastalıklarda enzim defektlerini göstermek ise zordur. İçlerinde sitokrom oksidaz eksikliği Seligman'ın tekniği kullanılarak tanımlanabilir.

Enzim histokimyasal teknikleri endokrin miyopatilerin tanısında nadiren yararlı olur. Cushing sendromunda ve eksojen glukokortikoid alımında selektif tip II atrofi genellikle gösterilebilir. Burada

aynı fibriller miyofosforilazını kaybetmiştir. Bu tür değişiklikler diabette de izlenir. Tiroid anomalilerinde tip I ve tip II fibrillerinin oranları değişir çünkü ATPaz üzerine hormonun belirgin bir etkisi bulunmaktadır.

Lizozomal enzimlerin gösterilmesi inflamatuvar miyopatilerin tanınmasında yararlıdır. Jüvenil dermatomiyozitide perivasküler zedelenme vardır, ancak bunun aktif inflamasyonun olmadığı bir dönemde tanınması zor olabilir. Kas liflerinin zedelenmesi sonucu santral bölgede ATPaz'ın ve mitokondrial enzim aktivitesinin kaybı görülür. Hastalığın geç dönemlerinde rejenerasyon tipik görünümü gölgeler, fakat rejenere liflerin dağılımı farklıdır ve methyl-green-pyronin boyası ile gösterilebilir. Aynı görünüm erişkin dermatomiyozitisinde de izlenir.

Kas fibrillerinin zedelenmesinin gösterilmesi polimiyopatilerden ayırıcı tanıda da önemlidir. Polimiyopatilerde inflamasyon kas zedelenmesi ile birlikte görülmez.

### Hemopoetik sistem

Histokimyasal tekniklerin hemopoetik hastalıkların değerlendirilmesinde kullanımları giderek azalmakta, bu tekniklerin yerini immünohistokimyasal analizler almaktadır. Yine de histokimya lösemilerin tanısında kritik bir önem taşır ve diğer hastalıkların ayırıcı tanısında da yararlıdır. Histokimyasal teknikler immünohistokimyasal prosedürler ile kombine edilerek kullanılır. Böylece normal yapı ile patolojik durumlar arasındaki fark daha belirgin olarak izlenebilir. Enzim histokimyası frozen kesitlerde hatta fikse edilmiş parafin ya da plastiğe gömülmüş dokularda da kullanılabilir.

İnsan kemik iliği hemopoetik prokürsörler ile yağ hücrelerinin bir karışımı şeklindedir. Bu hücrelerin organizasyon şemaları histokimyasal tekniklerle açığa çıkarılabilir. Normal koşullar altında ilik dokusu bir miktar retikülün lifi de içerebilir. Alkalın fosfataz ile stromal hücreler ve bunların uzantıları daha net olarak gözlenir. Makrofajlar asit fosfotaz ve  $\alpha$ -naftilbutirat esteraz gibi lizozomal enzim metodları ile gösterilir. Miyeloid hücreler klorasetat esteraz ile boyanır, hatta bu boyama parafin kesitlerde de başarılıdır. Klorasetat esteraz, bu hücrelerin dağılımını ve dağılımın bozulduğu alanları göstermekte kullanılan yararlı bir tekniktir.

Kemik iliğinde olduğu gibi, lenf nodlarının yapısal çatısı ve burada meydana gelebilecek tanısal önemi olan değişiklikler de histokimya ile gösterilebilir. Lenf nodunda retikülün fibrilleri kemik iliğine göre daha boldur. Enzim histokimyası destek hücrelerin dağılımını izlemekte de önemlidir. Alkalın fosfataz pozitif boyanan dallanmış retiküler hücreler parakortekste bulunur. Folliküler stromal hücreler (dendritik retikülün hücreleri) ise 5 $\square$ -nükleosidaz ile kuvvetli pozitif boyanma gösterir. Makrofajlar her iki kompartmanda ve sinüslerde lizozomal enzimler ile fark edilir.

Vasküler yapılar ise spesifik enzim profilleri sergilerler.

Metabolik hastalıklarda hücre ürünlerinin anormal birikimi görülür, bu birikim en çok makrofajlarda izlenir. Lenfoid hücreler ve granülositler de metabolik hastalık tarafından tutulabilir. Bunun klasik örneği Gaucher's hastalığıdır. Anormal glukoserebrositlerin makrofaj içinde bulunması PAS (+) bir reaksiyon ile sonlanır. Sudan-black ile bu boyanma zayıftır, oysa asit fosfotaz ile beklenen boyanma şiddeti yüksektir. Bu görünüm yalnızca kemik iliğinde değil lenf nodu ve dalakta da izlenir.

Makrofajların Niemann-Pick Hastalığındaki morfolojileri de görece karakteristiktir. Bu hücreler büyük miktarda sifingomiyelin, kolesterol, gangliosid içerir ve bu nedenle Sudan black ile soluk mavi boyanır, polarize ışıkta ise kırmızı refle verir. Aynı hücreler ferrik hematoksilin metodu ile koyu mavi bir renk alırlar. PAS reaksiyonu değişkendir, fakat asit fosfataz reaksiyonları hücrenin köpüksü yapısını ilik dokusunda, lenf nodunda ve dalakta belirgin biçimde ortaya çıkarır. Bu hastalığın erişkin tipinde deniz mavisi histiositler Romanowsky ile boyanmış ve havada kurutulmuş materyallerde çok daha fazla sayıda izlenebilir. Bu hücreler Sudan-black ile koyu gri ve asit fosfotaz ile pozitif boyanırlar.

GM1-gangliosidozis Tip I'de çok sayıda geniş, köpüksü depo hücreleri, hemopoetik dokuda ve lenfositlerde, sitoplazmik vakuelleri olan hücreler şeklinde periferik kanda izlenirler. Spesifik depo materyali sergilenemez, fakat depo hücreleri asit fosfataz ile gösterilebilir. Depo hücreleri tip II'de daha azdır, vakuolize lenfositler de bu tipte daha az izlenir. Depo hücreleri Gaucher Hastalığından farklı olduğu

halde aynı histokimiyayı sergilerler. Her iki hastalıkta da □-galaktosidaz eksikliği gösterilmiştir.

Wolman hastalığı (kolesteril ester depo hastalığı) asit esteraz eksikliği ile karakterizedir. Bu hastalıkta köpüksü makrofajlar bol miktarda nötral yağ içerirler ve Oil red O ve Sudan black ile boyanırlar. Küçük yağ vakuolleri periferik kan lenfositlerindeki gibidir. Doku kesitlerinde enzim defekti eğer nonspesifik esteraz eksikliği varsa gösterilebilir.

Sistin kristalleri sistinozis hastalığında alkol ile fikse edilmiş smearlerde alkolik bazik fuksin boyası ile makrofajlar içerisinde gösterilebilir. Polarizasyon ile karakteristik olarak refle veren kristaller izlenir.

Mukopolisakkaridosis dokuda ya da kanda kolayca gösterilemez. Metakromatik boyama reaksiyonları ile vakuolize lenfositlerin gösterilmesi bazı durumlarda mümkün olabilir. Tip VII'de spesifik □-glukoronidaz eksikliği histokimyasal olarak hem lenfositlerde hem nötrofillerde periferik kanda izlenebilir.

Depo hücreleri, nispeten yaygın olmayan diğer bazı hastalıklarda da izlenebilir. Ancak en önemlisi, köpüksü makrofajların, hiperlipidemi, bazı hematolojik hastalıklar ve bazı infeksiyon hastalıklarında, hatta bazı ilaç tedavilerinden sonra da görülebileceklerinin akılda tutulmasıdır.

### Gastrointestinal sistem

Histokimyasal prosedürler gastrointestinal sistemin inflamatuvar hastalıklarının ortaya çıkarılmasında sınırlı bir yere sahiptir. Bu genellemeyi bakteriyolojik, parazitolojik ile hastalıklar bozar. Çünkü bakteri ya da parazit boyalarla gösterilebilir.

Gastrointestinal kanalda müsinler hem nötral hem asidik karakterdedir(sialomüsin ve sulfomüsin). PAS-Alcian blue boyası nötral müsinleri koyu mor, asit müsinleri mavi veya pembemsi mavi boyar. Midede, müsinler hemen her zaman nötraldir, eser miktarda asidik müsinler vardır. İnce barsakta ise baskın olan asidik sulfomüsindir ve alt 2/3 kriptlerde bulunur. 1/3 üst kısımda ise sialomüsin yer alır.

Sialomüsinler PAS-Alcian blue ile eflatunumsu mavi boyanır, çünkü hem PAS hem Alcian blue ile reaksiyona girer; sulfomüsinler ise baskın olarak mavi boyanır, çünkü PAS reaksiyonu oldukça zayıftır. Eğer gerekirse sialomüsünün sulfomüsünden ayırımında pH 0.5'de Alcian blue boyası veya high iron diamine

boyası kullanılmalıdır. Her iki reaksiyonda da sulfomüsinler boyanır, sialomüsinler ise negatiftir.

Müsin boyanma paterni inflamatuvar barsak hastalıklarının ayırıcı tanısında önemlidir. Crohn hastalığında normal boyanma paterni ile müsin sekresyonu gösterilebilir, hatta bu durum belirgin kronik inflamasyonda bile sürer. Ülseratif kolitte ise müsin sekresyonu sıklıkla kaybolmuştur.

Soliter rektal ülser sendromunda müsinlerin dağılımı değişir ve sialomüsin baskın hale geçer. Son yıllarda barsağın bazı displastik hastalıklarında müsin karakterinin değiştiği konusunda yayımlar yapılmaktaysa da bunların klinik değerleri kanıtlanmamıştır.

Metaplastik ve reaktif değişiklikler histokimyasal tekniklerle gösterilebilir. Özefagusta reflü genelde bazal zon hiperplazisi ile birliktedir. PAS reaksiyonları ile matür skuamöz hücrelerde glikojenin boyanması sayesinde gerçek bazal zon boyanmadığı için net olarak gösterilebilir. Barrett özefagusunda inkomplet intestinal metaplazi en iyi PAS Alcian Blue boyası ile gösterilebilir (pH 2.5). Bu yaklaşımla PAS pozitif nötral müsinlerin ve Alcian blue pozitif asit müsinlerin karışımı izlenebilir. Barrett özefagusunda yeterli bir ayırım çok önemlidir, çünkü adenokarsinom bu odaklardan kaynaklanır. İnce barsağın, kalın barsağın ya da mikst tip metaplazinin midede gösterilmesi atrofik gastrit veya gastrik atrofiyi işaret edebilir. Müsin boyanma paterni morfolojik patern ile korele edilmeli ve histolojik tanı teyid edilmelidir. Gastrin hücre hiperplazisi (primer veya sekonder) argyrophyllic/argentaftin (örn: Grimelius) boyası ile gösterilebilir, bu boya da immünolojik boyalar ile desteklenmelidir.

Kollajenöz kolit tanısı için kollajen boyamada kullanılan trikrom boyası oldukça yararlı olabilir. Bu boya, hastalık için karakteristik olan subepitelyal kollajen tabakasındaki kalınlaşmayı net olarak gösterir.

Hirschsprung hastalığının tanısı içinse ganglion hücrelerinin kolonun distalinde yokluğunun dökümante edilmesi gerekir. Pek çok patolojik tanı için 50 kesitlik bir seride hematoksilen eosin boyalı örneklerde inceleme yapmayı tercih etmektedir. Oysa ki frozen kesitlerde çalışılan enzim histokimyasal tekniklerle, örneğin asetilkolinesterazla, definitif olarak tek bir kesit sonuca ulaşmak için yeterlidir. Bu

enzim ile pozitif boyanan sinir lifleri ve ganglion hücreleri muskularis mukoza ve submukozada gösterilebilir. Normal biyopsi örneklerinde ganglion hücreleri hatta immatür ganglion hücreleri bu boya ile kuvvetli boyanır ve kolayca fark edilir.

Psödoobstrüksiyonlar ise yaygın olmayan motilite hastalıkları olup hem sinirleri hem de düz kası tutarlar. Nöral anomaliler en yaygın olarak hiperganglionosis ve hipoganglionosistir. Artmada da azalmada da sinir fibrilleri ve ganglion hücreleri en iyi asetilkolinesteraz boyası ile gösterilir. Anomaliler ayrıca gümüş boyalarından Smith tekniğinin kullanımı ile ortaya çıkabilir. Düz kastaki değişiklikler artmış bağ dokusu ile birliktedir ve bu durum bağ dokusu boyları ile gösterilebilir.

Histokimya geleneksel morfolojik yaklaşımlara bir destek olarak intestinal malabsorbsiyon sendromlarında da özel bir önem taşır. Kriyostat kesitlerde ince barsak mukozasında en iyi boya metodu PAS'tır. Whipple hastalığı, goblet hücrelerinin artımının bu boya ile gösterilmesi sayesinde tanınır. Aynı durum celiac hastalığında, protein intoleransında ve kistik fibrozis'te de izlenir. Fırçamsı kenar mukozal enzimlerinin izlenmesi ise özellikle önemlidir. Histokimyasal teknikler kullanılarak disakkaridozların (laktaz, sükroz ve trehalaz) semikantitatif tayini olasıdır. Bu teknikler disakkaridaz enzim eksiklerinin yanıtı olarak da gösterilebilir.

### **Karaciğer**

Histokimyasal boyalar karaciğerin histolojik incelenmesi için standarttır. Retikülin boyları ve kollajen boyları karaciğerin yapısal çatısını ve patolojik durumlardaki fibrotik reaksiyonları gösterir. PAS boyası diastazla muameleden önce karaciğerin glikojen depolama durumunu, sitoplazmik inklüzyonların dağılımını ve ceroid pigmentinin hepatosit içindeki varlığını gösterir. Perls reaksiyonu ise demirin varlığı ve dağılımı işaretlemeye özel bir önem taşır.

Bakırın varlığı direkt p-dimethylaminobenzylidene rhodamine veya copper-associated proteinlerinin orsein metodu ile boyanması sayesinde gösterilebilir. Bakır safra içinde ekskrete edilir ve karaciğerin bilier obstrüksiyonlarında birikir. Hem copper-associated protein hem bakır siroz veya primer sklerozan kolanjitte periferel bölgede izlenebilir. Bu

depozitlerin yoğunluğunun artması hastalığın evresi ile ilişkilidir. Siroza yol açan diğer hastalıkların pek çoğunda sirozun ortaya çıkmasından önce bakır depozisyonu çok azdır ya da yoktur. Siroz oluştuktan sonra ise bakır depozitleri artar ve yamasal bir dağılım sergiler. Nadir hastalıklardan Hindistan çocukluk çağı sirozunda yoğun ve diffüz bir bakır depozisyonu mevcuttur. Yamasal depozitler Wilson'un sirotik evresinde de görülmesine rağmen daha erken dönemlerde izlenmez.

Alfa-1-Antritripsin eksikliğinde hepatositlerden bu anormal proteinin eksportu yoktur. Rutin parafin kesitlerde değişik boyutlarda ve kuvvetle PAS pozitif, diastaza dirençli eosinofilik globüller görülür. Bu cisimcikler immünohistokimyasal olarak da gösterilebilir. Karaciğerde amiloid depozitleri en iyi Kongo red veya kristal violet boyları ile gösterilir. Primer (AL tip) amiloidozis potasyum permanganat ile muamelede solmaz, bu madde genellikle sinüzoidal bir dağılım gösterir. Sekonder amiloidoz da (AA tip) ise congo red reaksiyonu solma gösterir ve dağılım genellikle vaskülerdir.

Reye sendromunun tanısı histokimyasal olarak kanıtlanmalıdır. Karaciğer panlobüler mikroveziküler yağlı infiltrasyon gösterir ve bu durum Oil-red O ile boyanarak izlenebilir. Glikojenin belirgin bir kaybı mevcuttur, bu da PAS ile izlenebilir. Daha spesifik olarak, süksinat dehidrogenaz aktivitesinin tümüyle yok olduğu karaciğer dokusunda frozen kesitlerde izlenebilir. Bu durum mitokondrilerin zedelenmesine eşlik eder. Jamaica kusma hastalığında ve valproic asit zehirlenmelerinde de bu değişikliklere benzer kombinasyonlar izlenebilir. Gebeliğin akut yağlı karaciğerinde, alkolik yağlı karaciğerde ve lipid depo hastalıklarında süksinat dehidrogenaz aktivitesi kaybı olmaksızın mikroveziküler yağlanma izlenir. Süksinat dehidrogenaz aktivitesi mantar zehirlenmesi gibi toksik durumlarda da görülür, çünkü bu durumda mitokondrial zedelenme gerçekleşmiştir.

Viktorya blue B ve benzer boylar Hepatit B yüzey antijeninin (HBsAg) gösterilmesinde çoğunlukla immünohistokimyasal metodların uygulanmadığı durumlarda kullanılır.

Karaciğer bir çok metabolik hastalığın da aynasıdır. Çünkü hem hepatositlerin anormal birikim ürünleri mevcuttur hem de hepatik sinüzoidleri

döşeyen hücrelerin depo görevleri mevcuttur. Histokimyasal teknikler sıklıkla tanıya yardımcı olur, ancak biyokimyasal analizler kesin tanı için vazgeçilmezdir.

Glikojen depo hastalığında karaciğer glikojenin tipi ve dağılımında değişiklikler izlenir. Rutin histolojik süreçler glikojenin değişikliklerini gösterir böylece glikojen depo hastalığı şüphesi doğar. Tip 0 (Glikojen sentez eksikliği) glikojen depo hastalığında ve tip I (Glukoz-6-fosfataz eksikliğinde) karaciğer büyük ve yağlıdır, fakat tip 0 glikojende belirgin azalma ve kayıp gösterirken tip I de normal glikojen artmıştır. İnfanitil form tip II glikojen depo hastalığında (Pompe hastalığı) artmış monopartikül (daha solubl) glikojen hepatositler ve Kupffer hücreleri içinde birikir. Glikojenin oldukça insolubl formu (amylopectin) tip IV'de hepatositlerde birikir. Bu tipte soluk sitoplazmik inklüzyon cisimcikleri vardır ve PAS, Lugol's iodine ve kolloidal demir ile boyanırlar. Tip VI (Karaciğer fosforilaz kinaz eksikliği) glikojen depo hastalığında ise karakteristik olarak normal glikojenin hücreden dışı çıkışı söz konusudur. Tip V ve Tip VII'de ise karaciğerde bir anomali görülmez.

Glukoz 6 fosfataz (Glikojen depo hastalığı Tip I) histokimyasal olarak Tip IA'da gösterilemez. Lizozomal asit fosfataz ise histokimyasal olarak normal veya yalnızca hafif glikojen depo hastalığında izlenebilir.

Lipid depo hastalıkları da karaciğeri tutar. Gaucher hastalığında büyük Gaucher'e benzeyen değişiklikler Kupffer hücrelerinde görülür. Aynı iri hücreler portal alanlarda da karşımıza çıkar. Boyama reaksiyonları diğer bölgelerdeki gibidir. Hepatositler tutulmamıştır. Niemann-Pick hastalığında hepatositler gibi Kupffer hücreleri de geniş ve köpüksüdür. Yağ, kolesterol ve sfingomyelin için yapılan boyalar pozitifdir. Oysa asit fosfataz reaksiyonu köpüksü hücrelerin karakterini belirgin kılar. Kolesterol ester depo hastalıklarında, karaciğer büyümüştür, turuncu renktedir, hepatositler lipid ile doludur. Hücreler lipid boyaları ile pozitif boyanır, frozen kesitlerde asit esteraz aktivitesi izlenmez.

GM1 gangliosidozda  $\beta$ -galaktosidaz enzimi indoksil metodu ile frozen kesitlerde gösterilebilir. Karaciğer değişiklikleri juvenil formda pek belirgin değilken enzim yoktur. İnfanitil formda ise belirgin

hepatosit ve Kupffer hücre vakuolizasyonu vardır, fakat yağ demonstre edilemez.

Asit mukopolisakkaridler mukopolisakkaridozda hepatositlerde ve Kupffer hücrelerinde bulunur ve Haust ve Landing metodu ile frozen kesitlerde gösterilebilirler. Suda çözünme yeteneği çok fazla olan bu maddelerin histokimyasal olarak gösterilmesi zordur.

### Deri

Histokimyasal prosedürler deri patolojisi için de rutin olarak kullanılmaktadır. PAS reaksiyonu fungal elemanları, bazal membranı, (lupus eritematosusda kalın bazal membran) profirya ve diabette depositleri göstermek için kullanılır. Ayrıca granüler hücreli tümör ve Paget hastalığı bazı neoplazmlarda da PAS pozitifliği önemlidir. Bazı durumlarda (folliküler müsinozis, mikşödem ) deride müsin birikimi izlenir. Bunlar genelde glikozaminoglikanlardır ve alcian blue reaksiyonu ile demonstre edilebilirler. Amiloid boyaları, pigment ve mineral reaksiyonları yararlı olabilir. Ürtikerya pigmentozada mast hücreleri choloracetat esteraz metodu ile gösterilebilir. Ayrıca bu hastalıkta toluidin blue ve pH 1 Alcian blue da kullanılabilir.

### Kardiovasküler sistem

Aterosklerozun gelişimini anlamada histokimyadan yararlanılabilir, fakat bu gün nadiren bu metod kullanılmaktadır. Bazı histokimyasal tekniklerin gross düzeyde otopsi patolojisinde yeri vardır. Oil red O reaksiyonu ile damarlarda erken ateromatöz değişiklikler gösterilebilir. Bu özellikle genç hastalarda pulmoner hipertansiyonu ortaya koymak için önemli olabilir. Nitroblue tetrazolium reaksiyonu erken myokardial infarktüsü ortaya koyabilir. Miyokardın endojen dehidrogenazı hızlıca bir reaksiyonla koyu mavi bir alan yaratır. İskemi alanında ise boyanma yoktur, infarktüs böylece izlenebilir. Amiloid depozitleri kalpde kongo red reaksiyonu ile veya diğer amiloid boyaları ile gösterilir. PAS boyası glikojenin myokardial depozitlerinin glikojen depo hastalığında gösterilmesinde oldukça yararlıdır. Bazı metabolik kardiomyopatilerde (ilaç ve alkol) trigliseritlerin miyokardda birikimi izlenir ve oil red O veya sudan black B reaksiyonu ile gösterilebilir.



### Genitoüriner sistem

Histokimyasal teknikler rutin olarak glomerüler hastalıkların tanısında kullanılmaktadır. Pek çok renal patolog gümüş (Jones), PAS, Masson's trikrom boyalarını standart hematoksilen eosin boyalarına ek olarak istemektedir. Gümüş boyaları bazal membranı gösterir. PAS reaksiyonu ile glomerüler depozitler, trikrom ile fibrozis izlenebilir.

### Respiratuar sistem

Histokimyasal teknikler pulmoner neoplazmlar ve infeksiyonların ayırıcı tanısında önemlidir. Ayrıca bazı pnömokonyozislerde örneğin nophthochrom B metodu ile berilyumun gösterilmesinde, Perls ve alizarin reaksiyonu ile demir ve kalsiyumun gösterilmesinde, Morin yöntemi ile zirkonyumun gösterilmesinde yine Pure black B ile alüminyum ve dimetil glikoksin metodu ile nikelin gösterilmesinde histokimya kullanılabilir. Pulmoner alveoler proteinosisde ise homojen PAS pozitif protein alveoler boşluklarda birikir.

### Tümör tanısı

İmmünohistokimyadan sonra tümör tanısında histokimya popülaritesini yitirmiştir. Yine de bazal membran – kollajen boyaları dokunun ya da neoplazmin temel yapısını ortaya koymada özel bir değer taşır. Bu boyalar immünohistokimyasal yaklaşıma zemin hazırlar. PAS, retikülin, van Gieson veya trikrom bu amaçla kullanılabilir. Yine müsin ve glikojenin gösterilmesi bazı tümörlerde önemlidir. Nöroendokrin tümörlerde dens granüller argyrophilic'tir ve indirekt gümüş boyaları ile tanınabilirler. Melanin soldurma yöntemleri ile, karsinoidler ve Masson fantona ile melanositik tümörler gösterilebilir. Bazı mezenkimal tümörlerde kollajen ve yağın gözlenmesi önemli olabilir. PTAH boyası ise kas tümörleri için değerlidir. Enzim histokimyasal prosedürleri ise en çok hematopatolojide kullanılır.

### Referanslar

1. Damjanov I, Linder J. Anderson's Pathology, Volume 1, Chapter 9, 1996, Mosby.
2. High OBB. Degenerative diseases of central and peripheral nervous system. In Filipe MI, Lakel BD editors: Histochemistry in Pathology. Edinburg 1983; Churchill Livingstone.

3. Dubowitz V, Brooke MH: Muscle biosy: a modern approach. London 1973; WB Saunders.
4. Fujimori T, Mochino T, Miura M, Kafayama I: Enzyme histochemistry on paraffin embedded tissue sections. Stain Technol 1981; 56, 355.
5. Mowery RW: Alcian blue technigues for histochemical study of acidic carbohydrates. J. Histochem Cytochem 1958; 6, 82.
6. Lojda Z: The importance of protease histochemistry in pathology. Histochem Cytochem 1981; 29, 481.