

HÜCRE VE DOKULARIN KARBOHİDRAT İÇERİĞİNİN HİSTOKİMYASAL YAPILARI VE ÖZEL GÖSTERİLME YÖNTEMLERİ

Dr. Birkan YAKAN (x)

ÖZET :

Review niteliğinde olan bu çalışmada karbohidratların kimyasal yapıları, grupları ve organizmadaki şekilleri ile doku ve hücrelerde histolojik gösterilme yöntemleri incelendi ve orjinal preparasyonlarda gösterildi. Son verilerin doğrultusunda bu konuda yararlı clabilecek yöntemler saptanmaya çalışıldı.

Karbohidratlar karbon, hidrojen ve oksijenden oluşan basit moleküller veya bunların polimerizasyonu ile protein bileşiklerinden oluşan kompleks makromoleküller olarak bulunurlar. Genelde sakkaritler, polisakkarit-protein kompleksi, glikoproteinler ve glikolipidler olarak 4 grupta toplanabilirler(5). Organizmadaki monosakkaritlerin en önemlileri nükleik asidlerin yapısına katılan riboz, dezoksiriboz veya enerji kaynağı olan glikoz'dur. Disakkaritlere laktoz, maltoz; polisakkaritlere ise glikojen örnek olarak gösterilebilir. Makromoleküler veya kompleks karbohidratlar ise organizmanın yapısına katılır (bağ ve destek dokusunda olduğu gibi), bir yüzeyi ıslak ve kaygan tutmak üzere örter (gastrointestinal sistemde olduğu gibi) ve enerji maddesi olarak depolanırlar veya salgı olarak sentez edilir veya salgılanırlar (5).

Mukopolisakkaridler; molekül ağırlığı yüksek olan azotlu karbohidratlardır. Asit ve nötral mukopolisakkaritler olarak iki gruba ayrılabilirler. Asit mukopolisakkaritlere hyaluronik asit, mukoidin sülfat asidi, kondroitin sülfat asidi veya heparin, nötral mukopolisakkaritlere ise mide mukusu örnek olarak gösterilebilir. Mukoprotein ve glikoproteinler bir proteine bağlı mukopolisakkaritlerdir. Örnek olarak hipofizin gonadotrop ve tirerotrop hormonları ile hücre yüzeyinin glikokaliksi gösterilebilir (5).

Mukolipidler ise polisakkarit ile yağ bileşikleridir.

Bu üç grup, dokuların hemen her yerinde dağılmıştır. Genellikle saf olarak değil de karışım halinde bulunurlar. Dokudaki karbohidratı göstermek için iki te-

x) Atatürk Üniv. Tıp Fak. Histoloji-Embriyoloji Bilim Dalı Araş. Görv.

mel özellik gözönüne alınır, glikojen ve musinler (eş anlamlı olarak mukopolisakkaritler, mukoid maddeler ve günümüzde ise glikokonjugatlar terimi kullanılır) (2).

GLİKOJEN: Enerji kaynağı olan D-glukoz birimlerinin dallanmış veya düz bir zincir şeklinde birleşmesinden oluşan basit yapılı bir polisakkarittir. Normal şartlar altında hücre içinde bulunur.

Gösterilmesi: Glikojen rutin hematoksilen solusyonları ile boyanmaz ve sadece zayıf olarak boyanır, eosinle hiç boyanmaz. Pratikte bol miktarda glikojen içeren hücreler, daha az glikojen içeren hücrelerden daha zayıf boyanır. Glikojenin boyanması iodin veya Best's karmin gibi iki klasik metodla başarılabılır, bunlar diastaz kontrolü ile birlikte olan periyodik asid Schiff tekniğinin yerini almıştır. Glikojen, Langhans'ın iodin metoduyla maun rengi, doku elemanları ise sarı boyanır. Best'in karmin metoduyla glikojen, parlak kırmızı granüller şeklinde, hücre nükleusu mavi boyanır. Diastaz kontroluyla birlikte PAS reaksiyonunda işleme tabi tutulmayan kesit PAS (+), glikojeni sindirerek üzerine alan kesit ise PAS (—) reaksiyon verir (3).

MUSİNLER: Bunlar; değişik miktarlardaki proteinlere kovalent bağla bağlanmış heksozamin içeren polisakkaritlerdir(2).

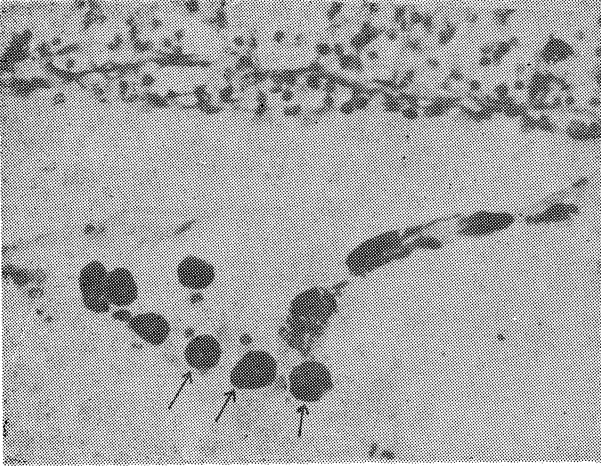
Musin terimi Carpenter tarafından kullanılmıştır(2,4). Daha sonra musinler, mukopolisakkaritler, glikozaminoglikanlar, mukoid maddeler ve en son olarak glikokonjugatlar terimi gibi ifadelerle anlatıldılar. Hücrede musin sentezi agranüller endoplazmik retikulumda başlar ve Golgi apparatus'ta tamamlanır. Heksozamin molekülünün sülfatlanmasının da Golgi bölgesinde meydana geldiği gösterilmiştir(2,4). Musinler histokimyasal olarak aşağıdaki gibi ayrılabilir.

1. Asidik musinler;

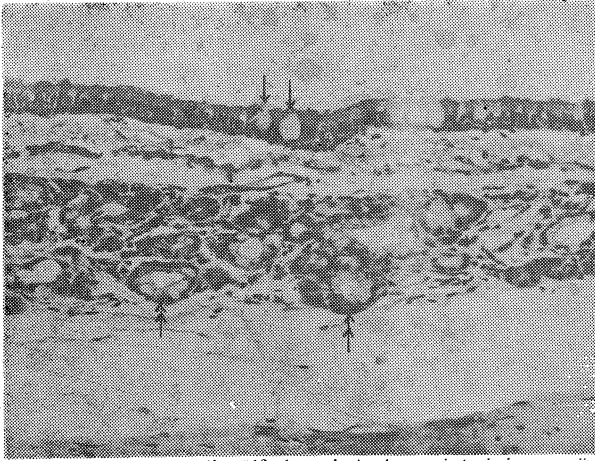
A) Kuvvetli sülfatlı müsiner: 1-Kuvvetli sülfatlı bağ ve destek dokusu müsineri ve heparin: Bunlar katyonik boyalarla düşük pH değerlerinde reaksiyona girerler ve genellikle PAS-negatif boyanırlar. Kıkırdak dokusu, acıta, kalp kapakçıkları, derinin dermis tabakası, göbek bağı ve mast hücrelerinde bulunurlar (Resim 1).

2. Kuvvetli sülfatlı epitelyal müsiner: Esas olarak seröz bronşial bezlerde ve daha az olarak incebarsak goblet hücrelerinde gösterilebilir. Histokimyasal olarak kuvvetli sülfatlı bağ dokusu musinleri gibi düşük pH değerlerinde katyonik boyalarla reaksiyona girer fakat onlardan farklı olarak PAS pozitif boyanırlar. (Resim 2).

B) Zayıf sülfatlı müsiner(sülfomusinler): Epitelyal tip içindedirler ve glukozamin gibi çeşitli heksozaminlere bağlı sülfat radikali içindeki polisakkarit-sülfat esterleri yapısındadırlar. Dokuda geniş bir dağılım gösterirler ve çoğunlukla kolon goblet hücrelerinde bulunurlar. Kuvvetli sülfatlı musinlerden katyonik boyalarla biraz daha yüksek pH değerlerinde reaksiyona girerek ayrılırlar.



Resim 1- Kuvvetli sülfatlı musinleri içeren, bazofili ve metakromazi gösteren mast hücreleri (okla işaretli görülüyor. Toluidin mavisi) X 900.

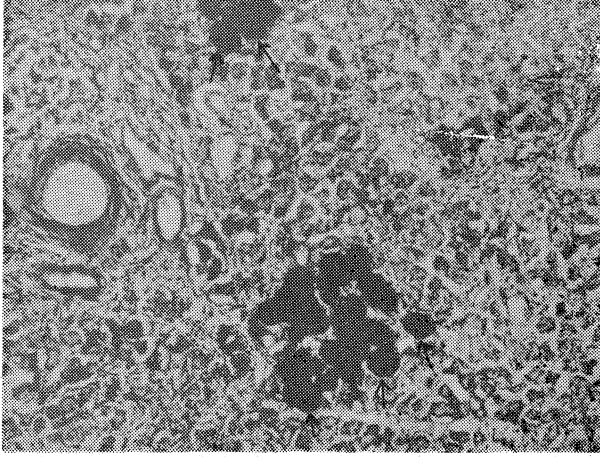


Resim 2- Trakea duvarında kuvvetli sülfatlı epitelyal musinleri içeren örtü epitelinin goblet hücreleri (tek oklar) ve lamina propriyadaki müköz bezler (çift oklar) görülüyor. Hematoksilen-Eozin X 300.

C) Histokimyasal olarak atipik sülfatlı müsünler: Alcian blue ile boyanırlar ve sülfatlı müsünler için kullanılan olağan tekniklerle boyanmazlar. Trakeobronşial bezlerdeki musinler örnek verilebilir.

D) Karboksilatlı musinler (siyalomusinler): İkiye ayrılırlar. Siyalidaz ile eriyebilen tip ve siyalidaza dirençli tip. Siyalidazla eriyebilen tip prensip olarak epitelyal kökenlidir ve hem tek başına, hem de asidik ve nötral musinlerin diğer

tipleriyle karışım halinde yaygın bir dağılım gösterirler. Bronşial submüköz bezler, submandibuler tükürük bezleri (Resim 3) ve incebarsakların goblet hücrelerinde bulunurlar. Siyalidaza dirençli tip PAS-negatif reaksiyon verir, dağılımı azdır, kalın barsak mukozası, mide ve bronşta bulunur.



Resim 3- G1. submandibularis'in mukoz son kısımları PAS-pozitif görünüyor (oklar) Periodik asit Schiff X 150,

E) Sülfatlı siyalomusinler: Zayıf sülfatlı musinler için beklenen reaksiyonları verir, siyalidaz enzimiyle denatürasyon yapılmışsa bunu önler, Prostat kanserinde, koyun kalınbarsağında ve malign sinovioma'da gösterilmiştir.

F) Hyaluronik Asid (Karboksilatlı sülfatsız üronik asid): Bağ dokusu musinlerinin geniş bir kısmını oluşturur. Genellikle fibroblastlardan sentezlenir. Histokimyasal olarak katyonik boyalarla siyalik aside benzer reaksiyon verir. Enzim kullanılarak (hyaluronidaz ve siyalidaz) birbirinden ayrılır. Hyaluronik asid sinovial sıvının önemli bir unsurudur, ayrıca göbek bağı, kalbin bağ dokusu, derinin dermis tabakası, aorta, kemik ve kıkırdakta bulunur.

II. Nötral musinler: Asidik reaktif grupları olmayan bu tip musin, serbest heksoz gruplarıyla birleşmiş çeşitli heksozaminlerden oluşur. Epitelyal tiptedir ve en çok Brunner bezlerinde ve midneyi döşeyen epitel hücrelerinin salgıladığı, mukus (mukoid madde) içinde bulunur (Resim 4). Bazik boyalarla bazofil boyanır, metakromazi göstermez (Resim 5).

KARBOHİDRATLARIN TESPİTİ VE BOYANMASI :

Kısmen geniş bir dağılıma sahip olan karbohidratların demonstre edilmesi onların iyi tespit edilmesine bağlıdır. Kitin, nişasta ve sellüloz gibi polisakkaritlerin



Resim 4- Nötral musinlerin en iyi örneği olan mide mukozası, örtü epiteli (tek oklar) ve boyun mukus hücreleri (çift oklar) PAS pozitif görülüyor Periyodik asid-Schiff X 600.



Resim 5- Mide örtü epiteli hücreleri nötral musinleri nedeniyle boyanmazken, aradaki terminal tıkaç asid musin yapısı nedeniyle metakromatik boyanmış olarak görülüyor. Toluidin mavisi X 550.

gösterilmesi için fiksasyona gerek yoktur. Bu durum, glikojen ve daha az dağılıma sahip olan musinler için geçerli değildir. Glikojenin fiksasyonu için en uygun fiksatifler genellikle alkol veya pikrik asit içerirler, örneğin Bouin ve Rossman solusyonu gibi. Glikojenin fiksasyonu en iyi şekilde, dokunun ölümünden sonra veya vücuttan uzaklaştırıldıktan sonra mümkün olan en kısa sürede alınan materiyalin tespit solusyonuna atılmasıyla başılır (1,2,3).

Genelde musinlerin en uygun fiksasyonu alt gruplarıyla ilgilidir. Kullanılan pek çok işlemde çabuk fiksasyona daha az ihtiyaç gösterirler ve formalin gibi fiksatiflerle iyi sonuç alınabilir. Pek çok metakromatik boyamada doku fiksasyonunda civa klorid kullanıldığında metakromazi artar. Pek çok hayvanda mast hücreleri Carnoy solusyonu ile fiksasyondan sonra ardışık olarak Alcian blue ile boyanırsa faydalı olur, eğer aldehid fuksin boyası kullanılacaksa formalinle fiksasyon tercih edilir. Karbohidrat histokimyasında birbirini izleyen kesit hazırlama işlemi oldukça önemlidir. Dondurma-kurutma metodu en iyi sonucu verir.

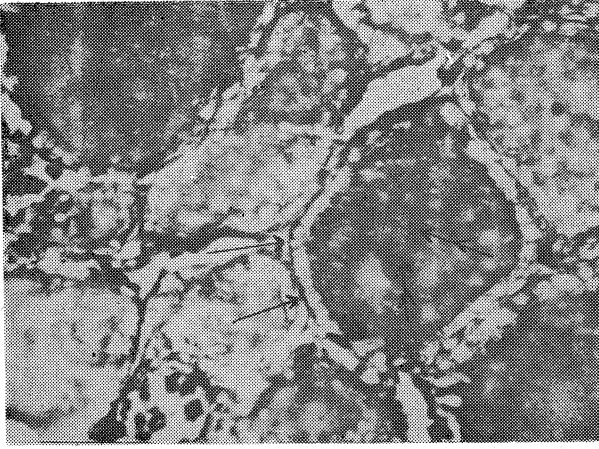
MUSİNLERİN GÖSTERİLMESİ

Musinler genellikle Hematoksilin Eosin (H.E) ile eosini alarak asidofilik boyanırlar, fakat boyanma zayıftır.

Periyodik Asid Schiff Reaksiyonu: Temeli karbohidratlardaki 1:2 glikol gruplarının gerçek ürünlerinin periyodik asid tarafından aldehitlere çevrilmesiyle PAS reaktif gruplarının olduğu sahalarda renksiz Schiff ajanı tarafından aldehidlerin yeniden renklendirilip kırmızı olarak görülmesidir. Sonuçta PAS-pozitif materyal mor olarak, nukleus mavi veya soluk mavi olarak boyanır. PAS-reaksiyonu normal ve patolojik pekçok doku kısmını demonstratif olarak gösterir. En önemlileri şunlardır (1,2,3,6).

Bazal membran (Resim 6), amiloid, kıkırdak, sellüloz, mide mukozası boyun örtü epiteli ve boyun hücreleri (Resim 4), epitelyal musinler, serebrosidler, hyalin dejenerasyon, glikojen, hipofiz ön lob mukoid hücreleri, pankreasın Zymogen granülleri, nişasta, tiroid kolloid maddesi (Resim 6), elastin, fibrin, melanin.

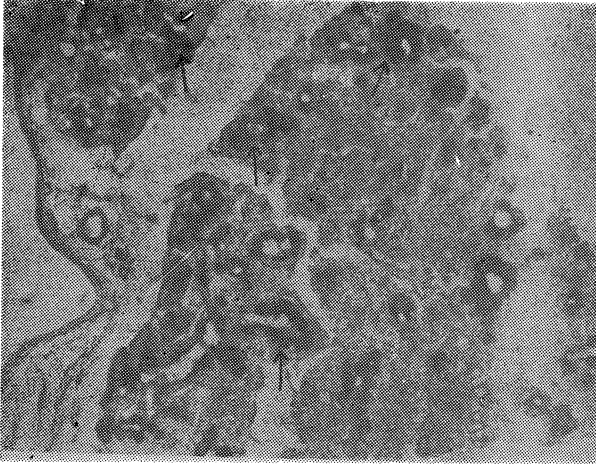
Musinler PAS pozitif boyanan reaktif bir heksoz grubu içerirler ve buna nötral musinler (Resim4) ve siyalidazla eriyen siyalomusinler (Resim 3) de dahildir. Sülfatlı grup kuvvetli PAS negatif boyanırken, siyalidaza dirençli siyalomusinler değişken olarak PAS-pozitif olurlar. Hyaluronik asid ve bağ dokusu musinleri kuvvetli olarak PAS-pozitif reaksiyon verirler, fakat keratan sülfat yapısında üronik, asid olmadığı için PAS-pozitif boyanmaz.



Resim 6- Troid follikül epitelinin bazal membranı (tek oklar ve kolloid maddesi (çift oklar) PAS-pozitif görülüyor. Periyodik asid Schiff X 600.

ASİDİK MUSİNLER İÇİN KULLANILAN METODLAR

Alcian Blue Tekniği: Alcian boyaları içinde alcian blue, alcian yellow ve bunların bir karışımı olan alcian green vardır. Bunlar katyonik boyalardır ve pozitif olarak yüklüdürler. Hem karboksil hemde sülfat gruplarını taşıyan belirli doku anyonlarıyla bağlı elektrostatik bağlar şeklinedirler. Alcian blue en önce tanımlanan ve bakır ftalosiyanın bileşiminde bir alcian boyasıdır. Asid musinler alcian blue ile koyu olarak boyanırlar. Bu boya düşük pH değerlerinde asidik grupların tuz bağlantısıyla, sülfat içeren asidik musinleri boyar (1,2,3,6,7). Sonuçta asidik musinler mavi, nukleus kırmızı renkte boyanır.(Resim 7) Alcian green ile asidik musinler yeşil, hücre nukleusu kırmızı,zemin sarı renkte boyanır.



Resim 7- G1. submandibularisin müköz son kısımları (oklar) görülüyor. Alcien blue X 300.

Kullanılan alcian blue solusyonlarının değişik pH larda sunulması, farklı asidik musinlerin tanınmasında yardımcı olabilir. Genel olarak sülfat esterleri karboksilatlardan daha düşük pH larda reaksiyona girer. Kuvvetli sülfatlı musinler devamlı düşük pH değerlerinde reaksiyona girerler pH 1,0'in üzerinde pozitiften negatife kadar kararsız reaksiyonlar gösterecek şekilde boyanırlar. Zayıf sülfatlı musinler çoğunlukla pH 2,5-1,0 arasında iyi boyanır. Hyaluronik asid ve siyalidazla eriyen siyalumusin pH 3,2-1,7 arasında iyi boyanır. Siyalidaza direncli siyalomusin daha düşük pH larda (pH 1,5'a kadar) iyi boyanır.

Diyalize Demir Tekniği: Bu teknik düşük pH'da kolloidal demir ile asidik grupların karşılıklı etkileşimine bağlıdır. Demirin şelat formuyla reaksiyona giren asidik musinlerin asid gruplarıdır, bu prusya mavisi reaksiyonuyla gösterilir. Sonuçta asid musinler ve hemosiderin koyu mavi, kollagen açık mavi, hücre nukleusu kırmızı boyanır (1,3).

NÖTRAL MUSİNLER İÇİN KULLANILAN METODLAR

Nötral musinler epitelyal orijinli olup karbohidratların geniş bir kısmını oluşturlar. Histokimyasal olarak anyonik radikalleri demonstre edilemez ve bu sebeple alcian blue ile reaksiyona girmezler. Fakat gayet iyi PAS pozitif reaksiyon verirler. Nötral musinler için fenilhidrazin-PAS tekniği; aldehidler, nötral musinleri fenilhidrasin vasıtasıyla bloklerler, böylece ardışık olarak Schiff negatif olurlar. Asid musinler bloklanmaz. Glikojen ve mukoproteinler gibi diğer normal PAS-pozitif mddeler bloklanırlar. Sonuçta nötral musinler negatif, periyodik asid reaktifi olan asid musinler mor ve hücre nukleusu mavi boyanır.

Nötral musinler için karmin tekniği: Epitelyal musinin gösterilmesi için kullanılan klasik histolojik tekniklerden birisidir ve halâ tavsiye edilir. Sonuçta nötral musin ve glikojen kırmızı, hücre nukleusu, keratin ve elastin soluk kırmızı, asid musinler mavi boyanır (1,2,3,6).

ASİD VE NÖTRAL MUSİNLERİN AYRILMASI

Kombine Alcian Blue-PAS Tekniği: Bu teknikle asid ve nötral musinler iyi bir şekilde ayrılır. Bütün asid musinler alcian blue ile ilk boyanmalarında iyi sonuç verirler, keza PAS-pozitif reaksiyon veren bu asid musinler ardışık PAS reaksiyonlarında reaksiyona girmez ve PAS pozitif boyanmaz. Sadece nötral musinler PAS-pozitif reaksiyon verirler. Sonuçta asid musinler mavi, nötral musinler kırmızı, bunların karışımı mor renkte ve hücre nukleusu soluk mavi renkte boyanır (1,2,3).

MUSİNLER İÇİN METAKROMAZİNİN KULLANILMASI

Metakromazi 1875'de değişik araştırmacılar tarafından keşfedildi. Metakromatik terimini 1876'da Ackroyd buldu. Kromotroplar olarak bilinen bazı doku

yapıları veya doku maddeleri negatif olarak yüklü ve aralarındaki komşuluk 0,5 nm'den büyük olmayan minimum yüzey yoğunluğuna sahip asidik gruplar taşırlar. Bu kromotroplar aldığı boyanın renginden farklı bir renk oluşturmak üzere metakromatik boyalarla reaksiyona girerler. Boyalar normal monomerik (ortokromatik) form ve potansiyel polimerik (metakromatik) form gösterirler, metakromatik form kromotroplar üzerindeki negatif yüklü gruplar ile boya molekülleri üzerindeki yeterince pozitif yüklü polar grupların reaksiyona girmesiyle agregatlar oluşturması ve polimerize olmasıyla meydana gelir. Boya polimerleri hipsokromik bir etki gösterirler yani ışığın absorpsiyonu kısa dalga boyuna doğru yer değiştirir. Örneğin toluidin mavisi normal olarak monomerik formda mavi rengi gösterir ve kromotropsuз olarak mavi renktedir. Öte yandan kromotroplar boyaların polimerize olmasıyla mor veya kırmızı renkte boyama yaparlar. Örneğin Azur A, tiyonin, metilen mavisi gibi boya örnekleri bu hipsokromik yer değiştirmeyi yaparlar (1,2,6).

Karbohidratların metakromatik boyanmasıyla kuvvetli ve zayıf sülfatlı musinlerle, karboksilatlı musinler metakromatik boyanırken, (Resim 1,5,7) nötral musinler beklendiği gibi metakromatik boyanmazlar. Genellikle metakromatik boyalar çok kullanışlı ve faydalıdır, farklı pH ve elektrolit konsantrasyonlarında mevcut musin tipini ayırmamızda yardımcı olurlar. Örneğin sülfatlı musinler pH 3,0'un altında metakromazi göstererek karboksilatlı musinlerden ayrılırlar. Sonuçta metakromatik boyanmanın musinlerin ayrılmasında çok cazip bir metod olduğu söylenebilir.

SUMMARY

HISTOCHEMICAL STRUCTURE OF THE CELL AND TISSUE CARBOHYDRATES AND SPECIAL DEMONSTRATION METHODS.

In this study carbohydrate structure, group and organisation were examined in animal tissues. Histological demonstration methods were assessed on paraffin sections. As a result useful demonstration methods were obtained, comparable to recent studies relevant to this subject.

KAYNAKLAR

- 1- Bancroft J.D., Cook H.C.: Manual of Histological Techniques First edition, Churchill Livingstone, Edinburgh-London-Melbourne-and New York, 1984, p. 100-123.
- 2- Bancroft J.D., Stevens A.: Theory and Practice of Histological Techniques. Second edition. Churchill Livingstone, Edinburg-London-Melbourne and New York, 1982 p. 180-201.

- 3- Drury R.A.B., Wallington E.A.: Carleton's Histological Technique. Fourth edition. Oxford University Press, New York-Toronto, 1967, p. 201-219.
- 4- Fawcett D.W.: Bloom and Fawcett. A Textbook of Histology. Eleventh edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia-London-Toronto-Mexico City-Rio de Janeiro-Sydney-Tokyo-Hong Kong, 1986, p. 6-9, pp. 83-91.
- 5- Kelly D.E., Wood R.L., Enders A.C. : Bailey's Textbook of Microscopic Anatomy. Eighteenth edition. Williams and Wilkins, Baltimore-London, 1984, p. 16-17.
- 6- Pearse, A.G.E.: Histochemistry Theoretical and Applied. Third edition. Volume 1. Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1968, p. 307-322.
- 7- Tuckett F., Kay G. M.: Alcian Blue staining of glycosaminoglycans in embryonic material: effect of different fixatives, Histochemical Journal 20, p. 174-182, 1988.