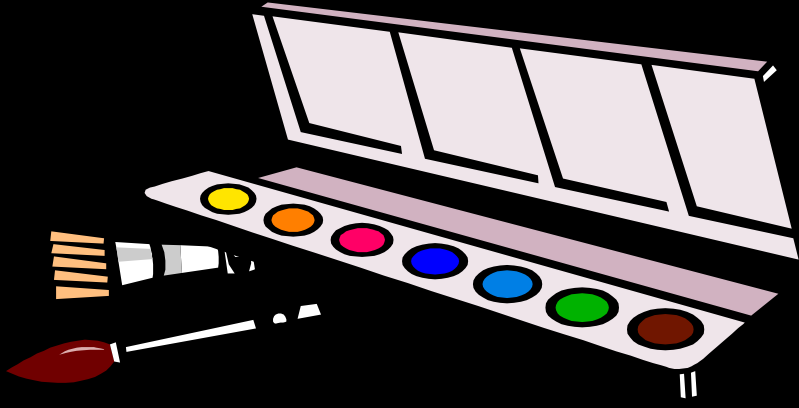


# HİSTOLOJİK YÖNTEMLER-2

DR. ÖĞR. ÜYESİ FERDA TOPAL ÇELİKKAN

08.10.2021



# Dokuların Boyanması

# Özel tekniklerin Uygulanması

- ✓ Histokimyasal Teknikler
- ✓ İmmuno(sito)histokimyasal teknikler
- ✓ İn situ hibridizasyon

- ✓ Tespit (fiksasyon)
- ✓ Yıkama
- ✓ Suyunu giderme (dehidratasyon)
- ✓ Saydamlaştırma
- ✓ Emdirme (embedding)
- ✓ Gömme (bloklama)
- ✓ Kesme
- ✓ Deparafinizasyon
- ✓ **Boyama**
- ✓ Kapatma

# Deparafinizasyon

Kesitlerin boyanabilmesi için ilk aşamada parafinden kurtarılmaları gerekir.

Etüv ( 55-60 °C de )

2-4 saat

Ksilen

1-1/2 saat

Ksilen

1-1/2 saat

Bu işlemlerden sonra doku kesitleri boyamaya hazır hale gelmiş olur.

**Kuruduktan sonra parafini uzaklařtır ve kesiti boya**

Parafini öz



Hematoxylin ile boya- mavi



yıka

Eosin ile boya - kırmızı



yıka

Nukleus - mavi

Sitoplazma-  
kırmızı



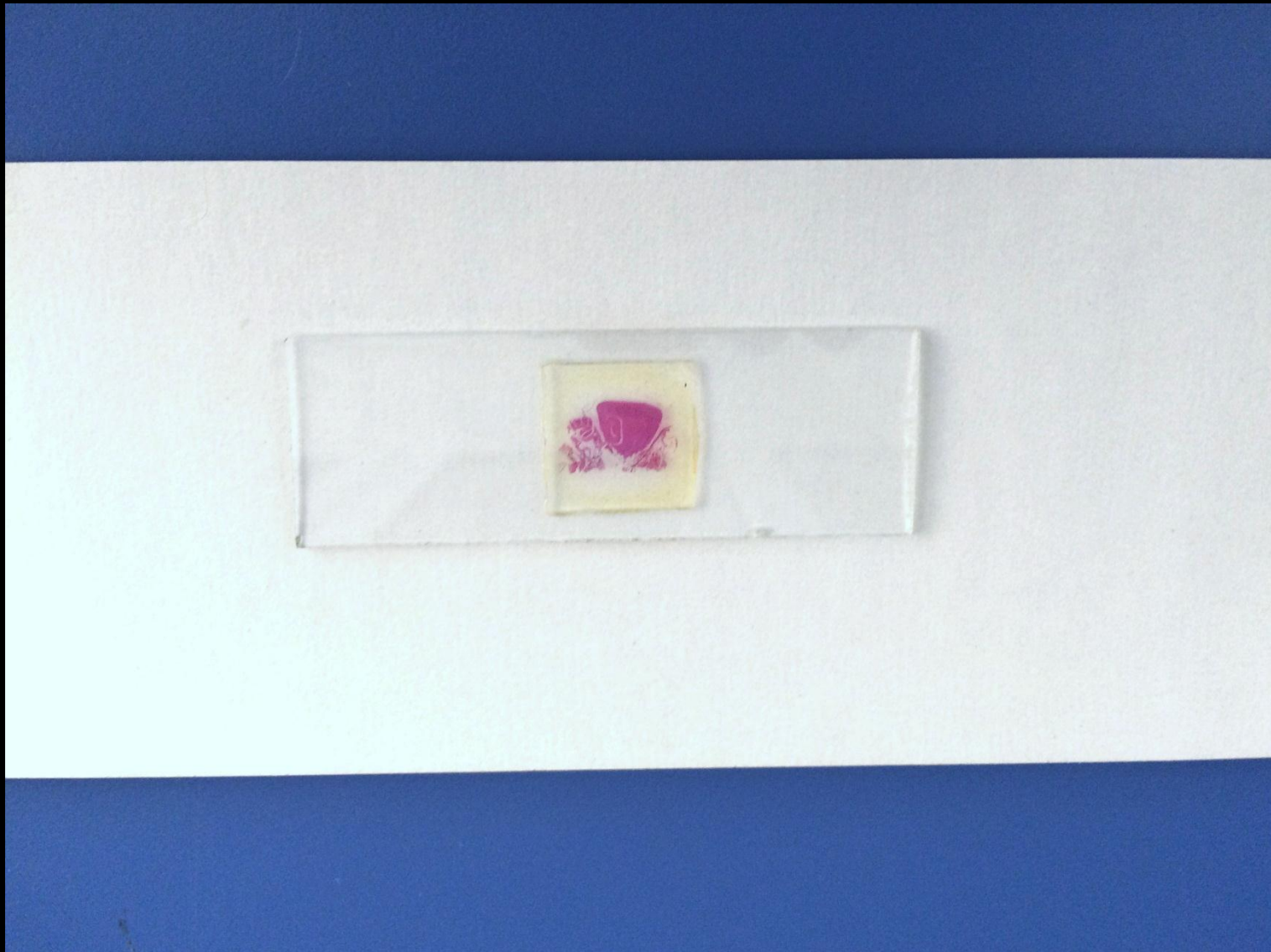


*Histokimyasal Teknikler*



*Histokimyasal Teknikler*



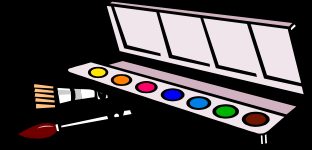


**Non-vital boyamada** kullanılan boyalar kimyasal yapılarına göre **inorganik** ya da **organik** olarak sınıflandırılır.

**İnorganik Boyalar:** Metal çöküntüleri, metalik oksitler, sülfidler veya diğer organik tuzlardır.

**Organik Boyalar:** Doğal boyalar  
(Hematoksilin, karmin, orsein )

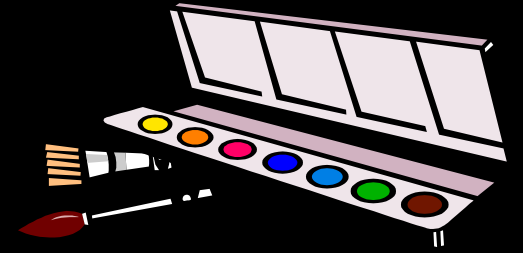
Sentetik boyalar



# Boyama

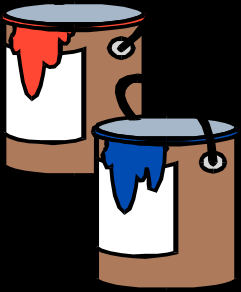
- ✓ Amaç doğal kontrastı arttırmak, farklı hücre ve doku yapılarıyla hücre dışı materyalleri daha belirgin hale getirmektir.
- ✓ Doku ve organ yapılarını boyamada kullanılan metotlar, çeşitli doku bileşenlerini fark edilir hale getirerek, aralarında kıyaslama yapabilme olanakları sağlar.

- ✓ Boyama işleminde dokuların görülebilirliğini arttıran ajanlar kullanılır.
- ✓ Histolojik boyalar; sulu ortamda sahip oldukları asit ve bazik kökleri ayrılabilen nötral tuzlardır.
- ✓ Boyalar **asit** ve **bazik** boyalar olmak üzere iki grupta toplanır.
- ✓ Dokudaki bazik yapılar asit boyalarla,
- ✓ Asit yapılar da bazik boyalarla iyi boyanır.



- ✓ Boyama olayı dokudaki uygun grupla, boyanın kromojen grubunu içeren kısmının kimyasal reaksiyona girmesiyle tuz oluşumudur.
- ✓ Asit boyalarla boyanan kısımlara **asidofil**
- ✓ **Kollajen teller, mitokondriyonlar, lizozomlar** asit boya olan eozinle iyi boyanır yani asidofildir.

- ✓ Bazik boyalarla boyanan kısımlara **bazofil** yapılar denir.
- ✓ **DNA içeren çekirdek, ribozomlar, granüllü endoplazma retikulumu** bazik boya olan hematoksilenle iyi boyanır yani bazofildir.



# Boyalar

## Asit Boyalar

- ✓ Eozin
- ✓ Asit fuksin
- ✓ Orange G
- ✓ Pikrik asit
- ✓ Kongo kırmızısı
- ✓ Anilin mavisi

## Bazik Boyalar

- ✓ Hematoksilin
- ✓ Bazik fuksin
- ✓ Metilen mavisi
- ✓ Safranin
- ✓ Karmin
- ✓ Toluidin mavisi



## Hematoksilen- Eozin Boyama Basamakları

- |  |         |
|--|---------|
| 1- Ksilen  | 5-10 dk |
| 2- Absolu alkol  | 5-10 dk |
| 3- % 95 lik alkol  | 5-10 dk |
| 4-% 75 lik alkol   | 5-10 dk |
| 5- Suda yıkama   | 5-10 dk |
| 6- Hematoksilen  | 1 dk    |
| 7- Suda yıkama   | 1 dk    |
| 8- Eozin   | 1 dk    |
| 9- Suda yıkama   | 1 dk    |
| 10- % 75 lik alkol   | 5 dk    |
| 11-% 95 lik alkol  | 5 dk    |
| 12- Absolu alkol   | 5 dk    |
| 13- Ksilen   | 5-10 dk |
| 14- Preparatlar Kanada balsamı yada entellanla kapatılır ve etiketlenir. |         |





## Glikojen Boyaları

Periyodik asit Schiff (PAS)

Best Carmin

Alcian blue-PAS

Mayer in mucicarmin

Aldehit fuksin-alcian blue

## Enzim Boyaları

Asit fosfataz

Alkalen fosfataz

Kolin esteraz

Lipaz/esteraz

## Çoklu BOYALAR

Van Gieson

Masson un trikrom

Mallori Azan

## Metal Boyaları

Gümüş tuzları

Altın

Osmiyum

Civa

Kurşundur.

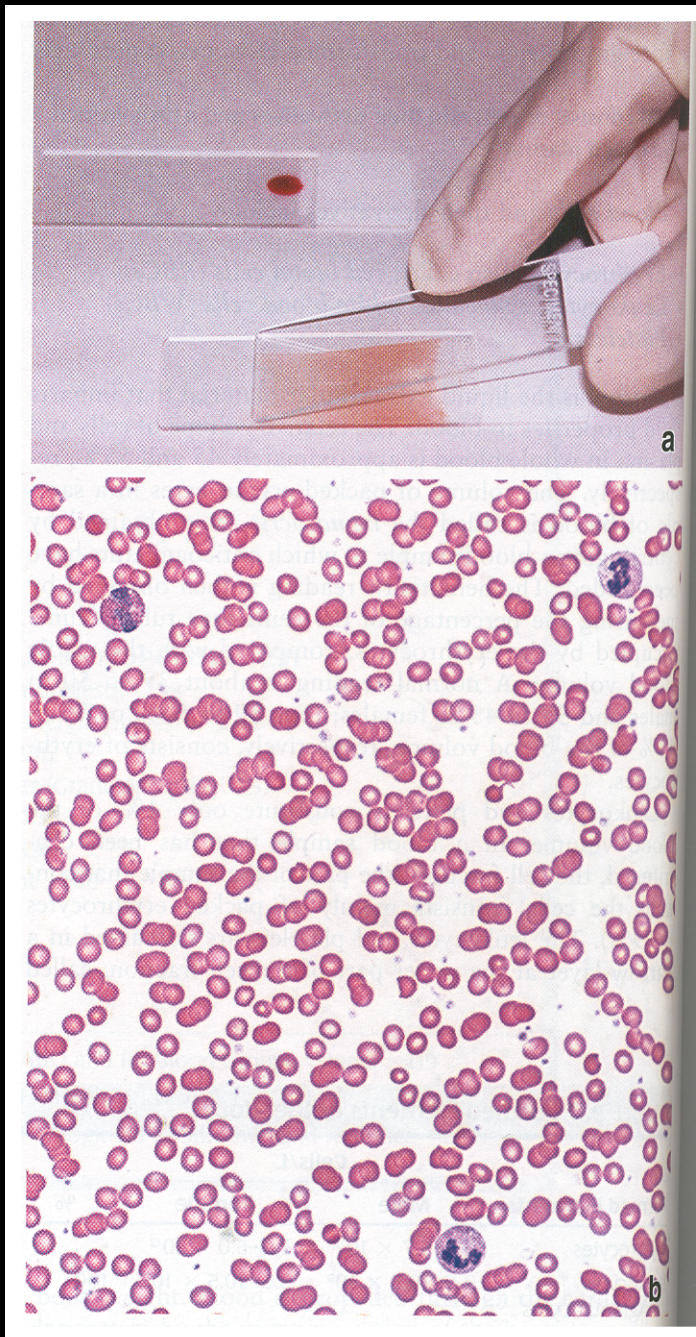
## Yağ Dokusu Boyaları

Sudan

Oil Red O

Nil mavisi

Scharlac kırmızısı



Kan Yaymaları  
Romanovsky  
boyaları  
(Wright,  
Giemsa) ile  
boyanarak  
incelenir.

# Metakromazi

Bazı bazik boyalar reaksiyona girdikleri doku bileşenlerini normal renklerinden farklı maviden kırmızı ve mora değişen tonlarda boyarlar. Bu absorpsiyon değişikliğine **metakromazi** denir.

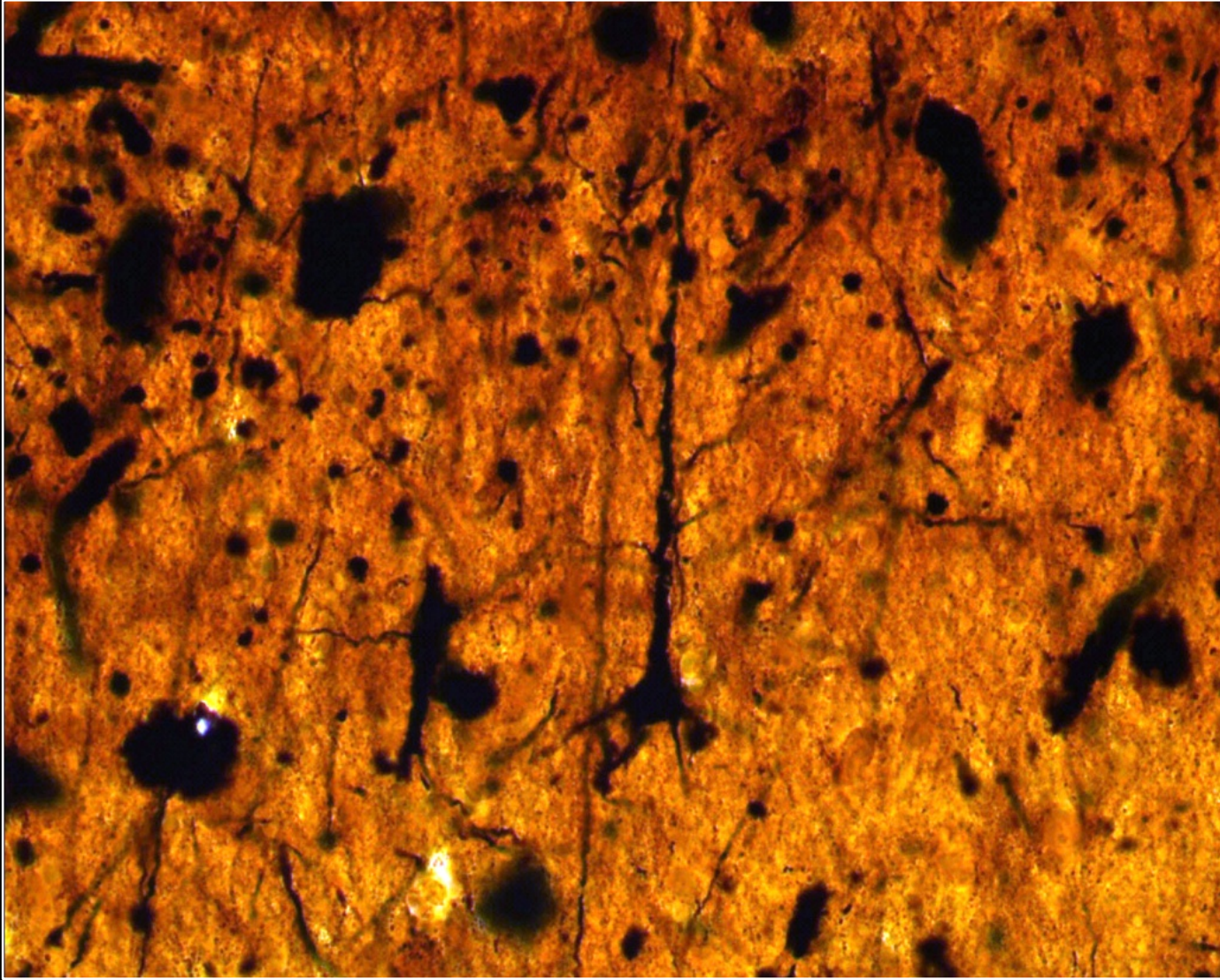
Metakromazi iyonize sülfat ve fosfat gruplarının yüksek konsantrasyonlarına sahip hücre ve dokularda görülür.

Örneğin; kıkırdak dokusu, mast hücresi, plazma hücresi.

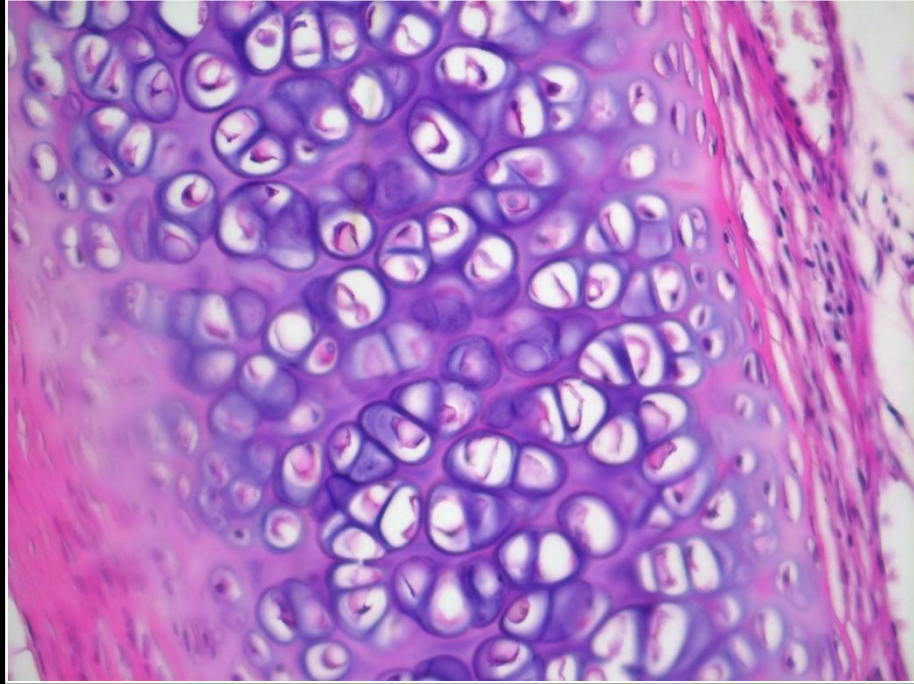
Metakromatik boyalar:

- ✓ Toluidin mavisi
- ✓ Tiyonin
- ✓ Metilen mavisi
- ✓ Azure A

Bazik boya mor-kırmızı renkte ortaya çıkar.



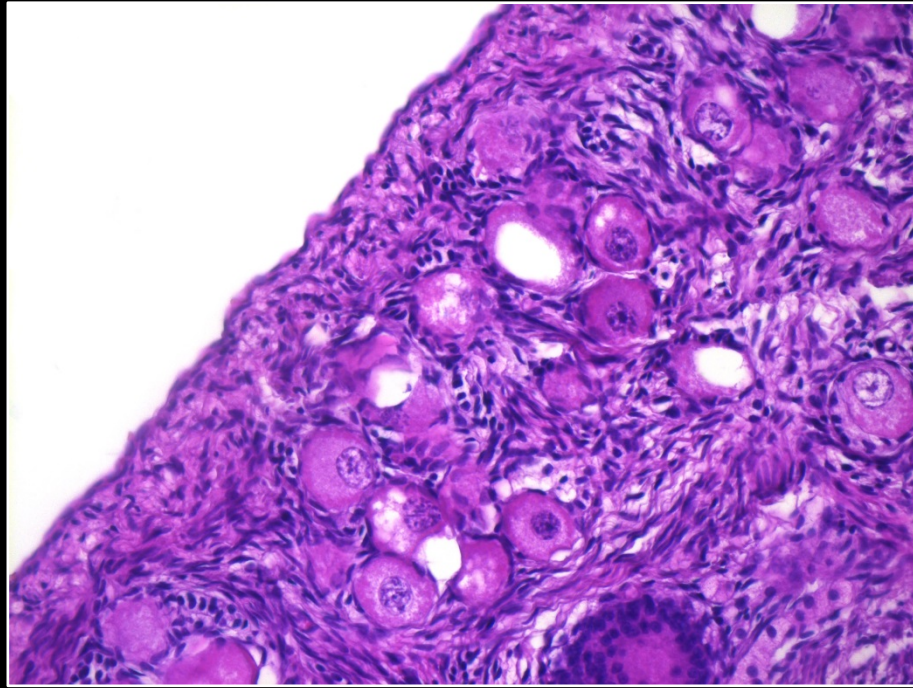
Beyin, Gümüşleme



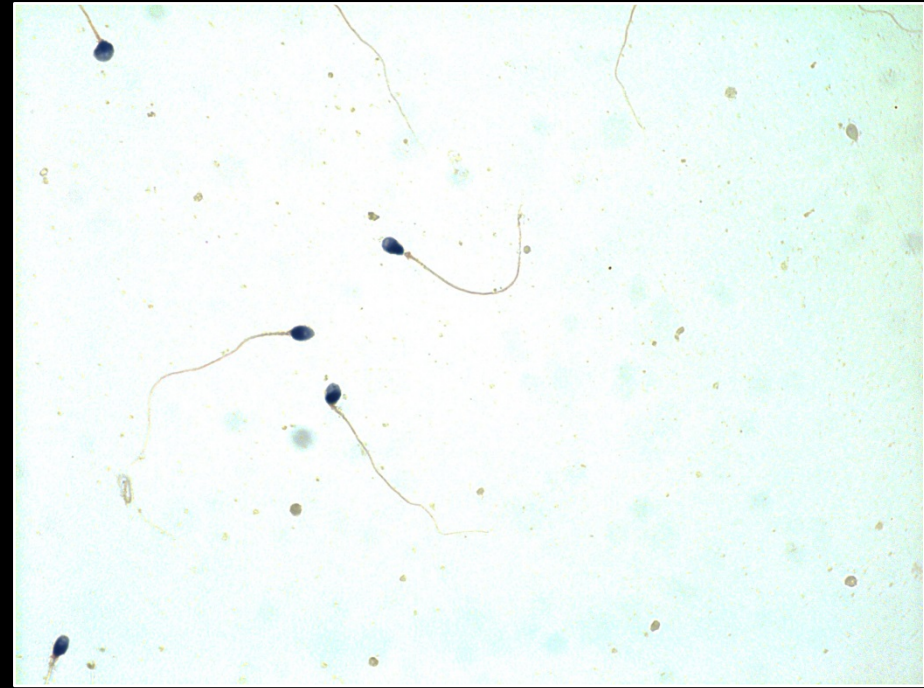
Trakea-Hyalin kıkırdak, Hematoksilin Eozin



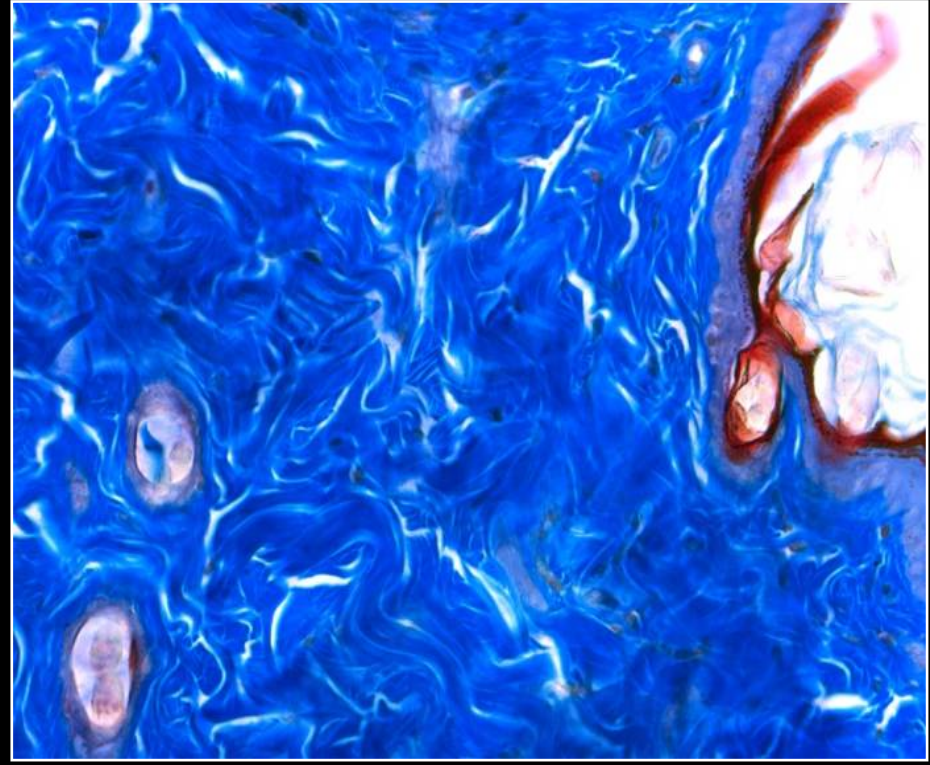
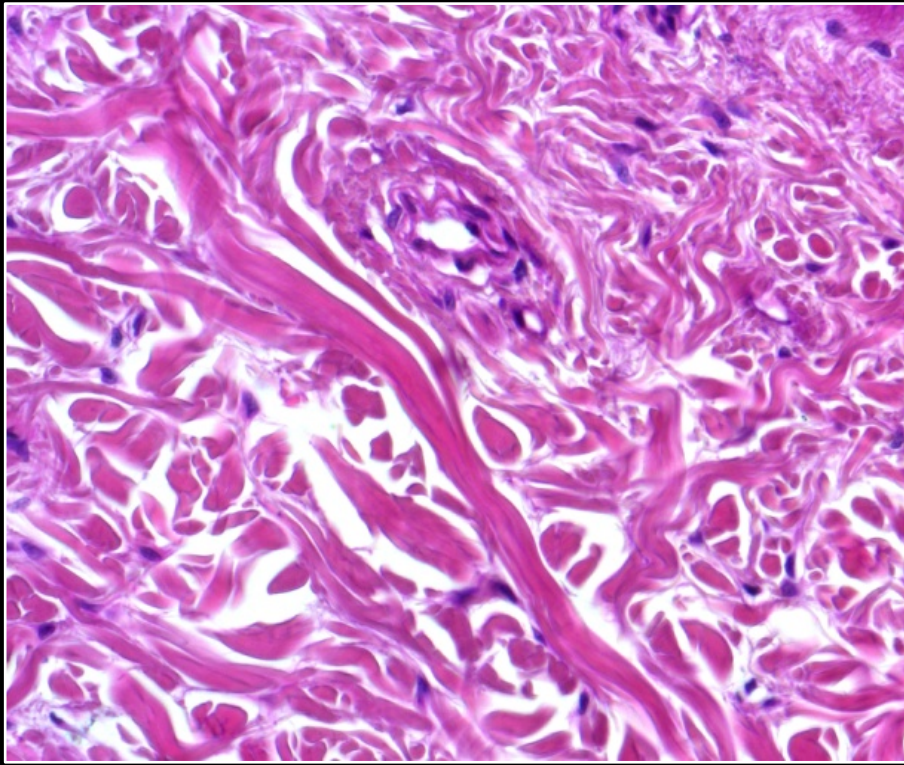
Epiglot- Elastik kıkırdak, Orsein



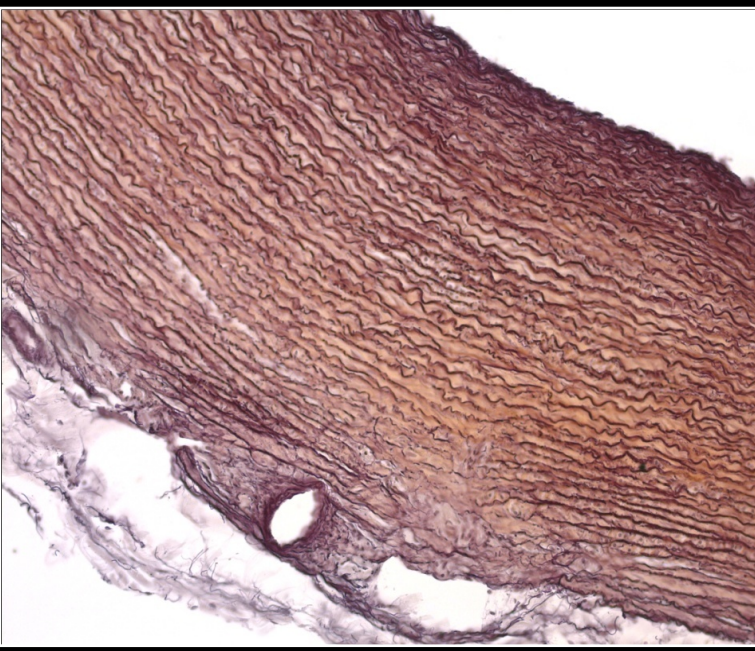
Ovaryum, Hematoksilin Eozin



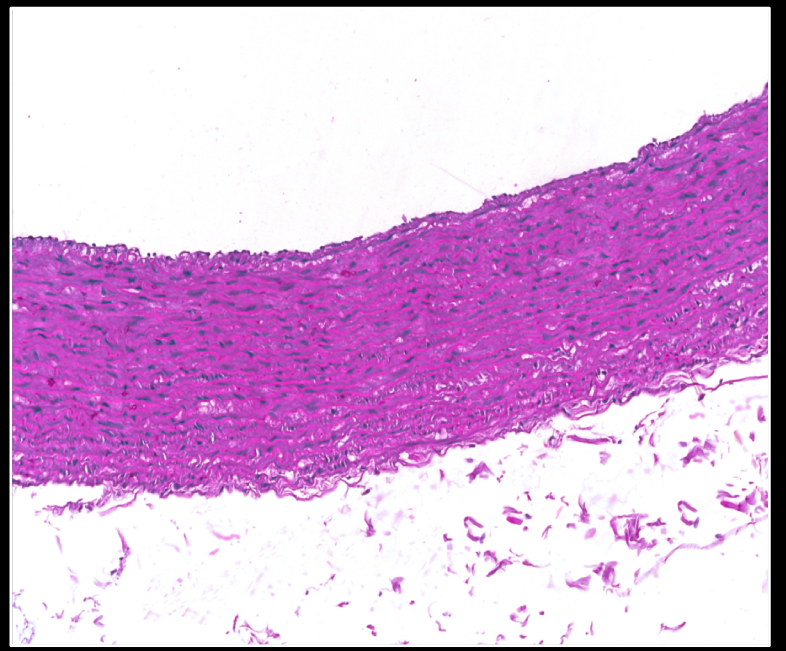
Sperm Yayması, Papanicolaou Boyası



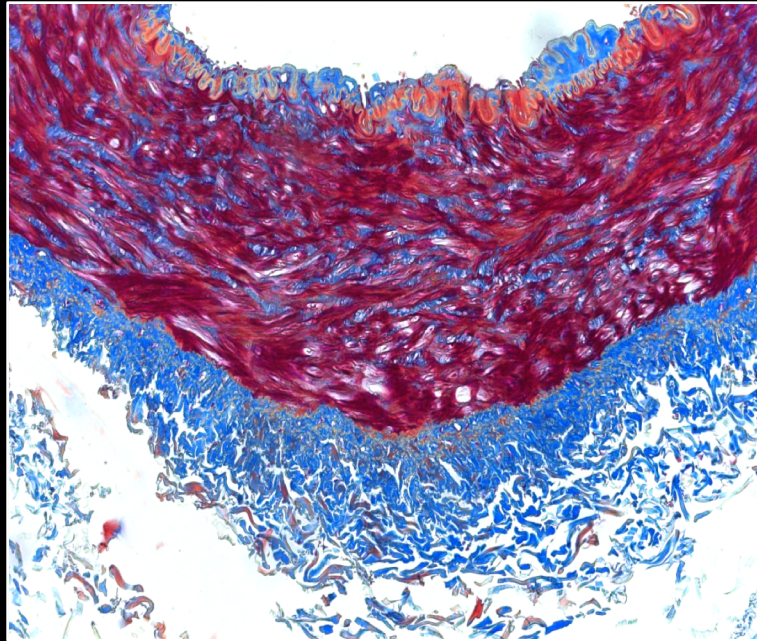
Deri, Hematoksilin Eozin - Mallory Azan



Büyük Arter, Orsein

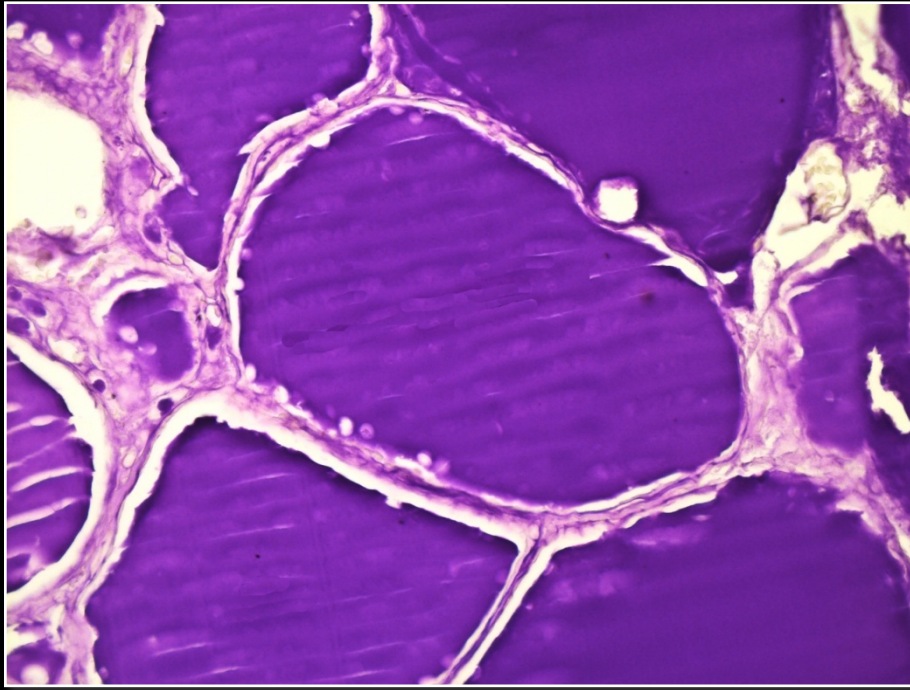


Büyük Arter, Hematoksilin-Eozin

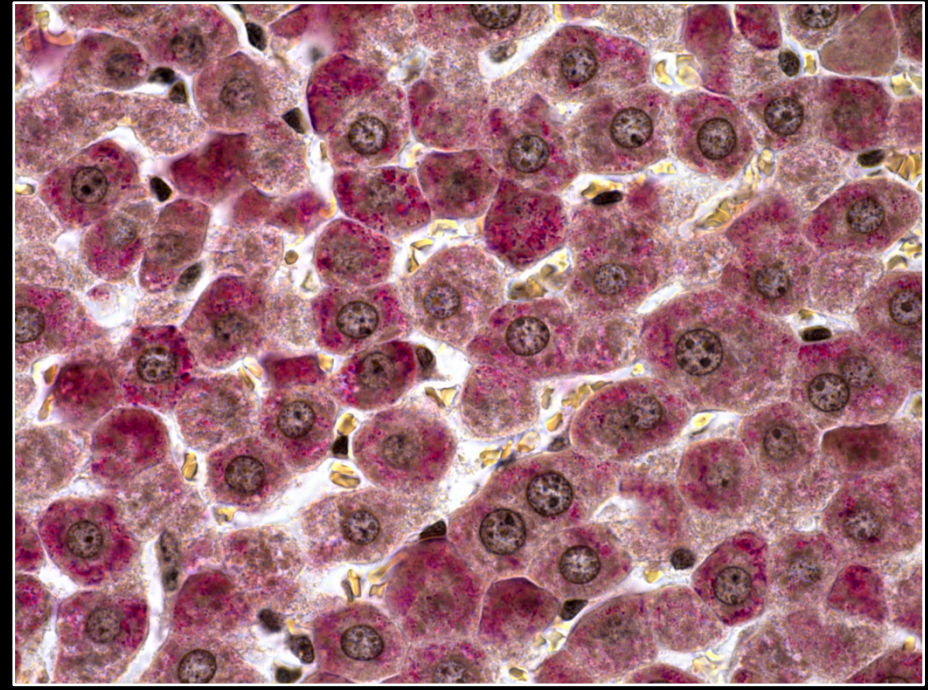


Orta Arter, Mallori Azan

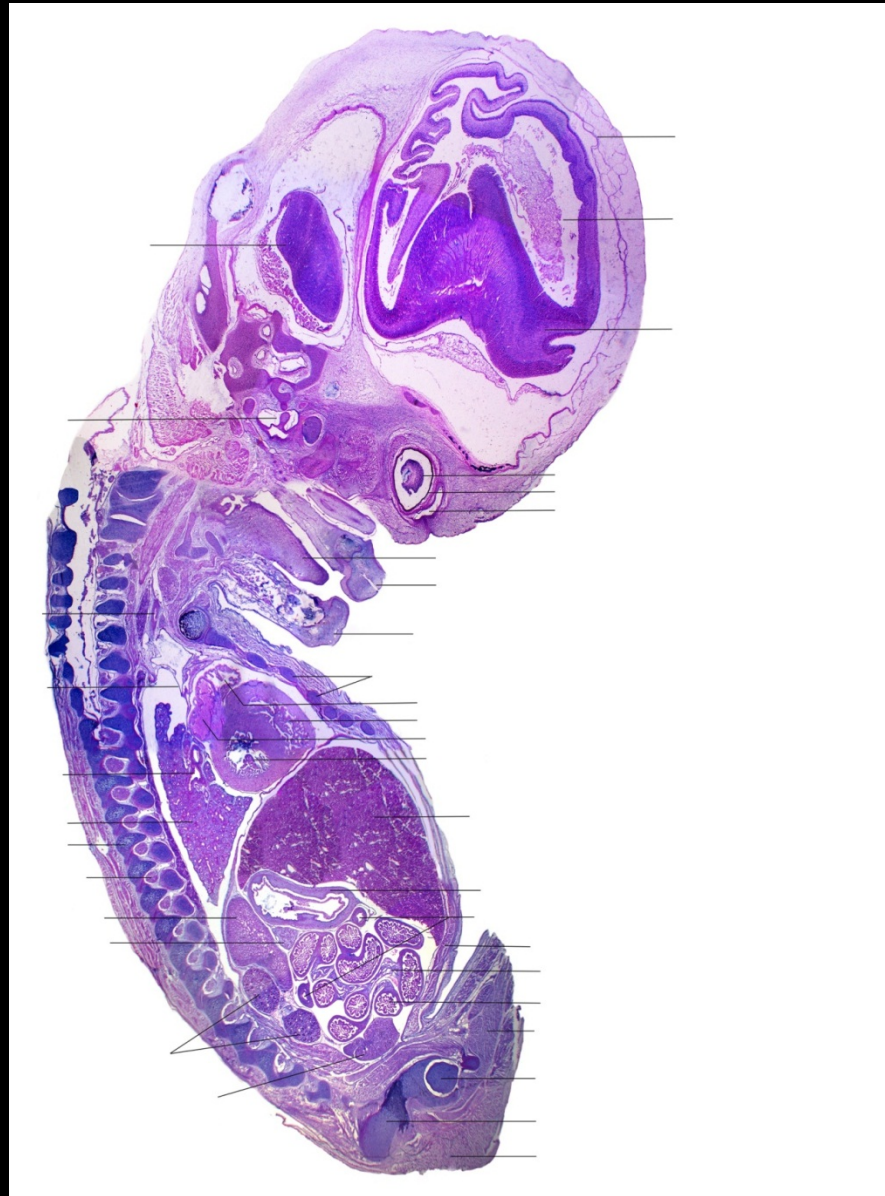




Tiroid, PAS (Periodic acid schiff)



Karaciğer, Best'in Karmin



Fetüs, 3,5 aylık, Hematoksilin-Eozin

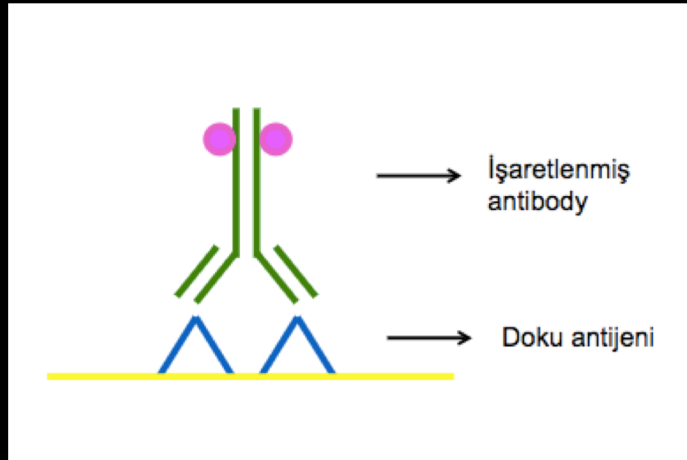
# İmmuno(sito)histokimya

- ✓ Antijen-antikor eşleşmesine dayanır.
- ✓ İşaretlenmiş antikorlar dokuda spesifik antijenlere bağlanır.
- ✓ Bu antijen-antikor kompleksi yerleşimleri ışık ve ya elektron mikroskopuyla incelenebilir.

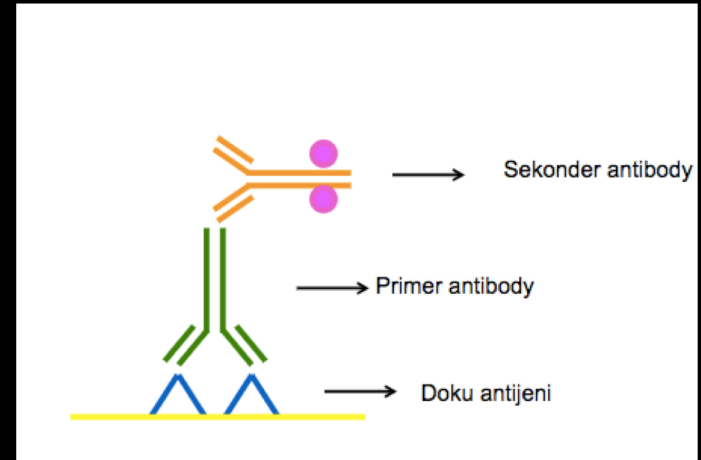
# İmmünohistokimya basamakları

- ✓ Doku kesitlerinin alınması
- ✓ Antijenin ortaya çıkarılması (antigen retrieval)
- ✓ Primer antikor
- ✓ Yıkama
- ✓ Sekonder antikor
- ✓ Kromojen substrat
- ✓ Karşıt boyama (counterstain)
- ✓ Kapatma (mounting)
- ✓ Mikroskopik inceleme

# Direkt-İndirekt İmmün Boyama



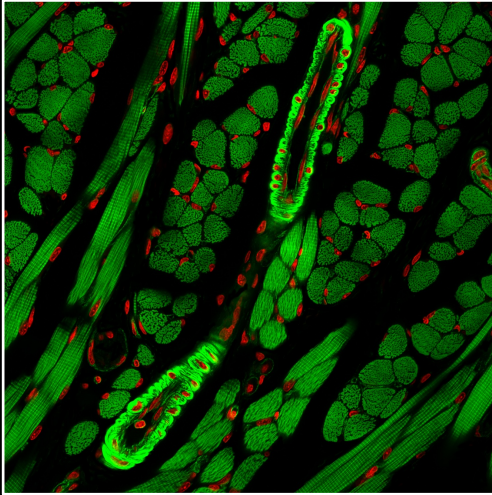
*Direkt immün boyama*



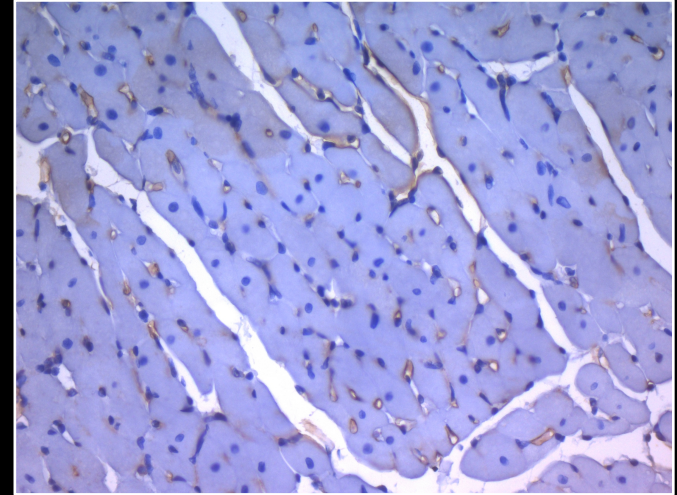
*İndirekt immün boyama*

# Antikora Baęlanan İřaretleyiciler

- ✓ Peroksidaz
- ✓ Alkalen fosfataz
- ✓ Florokromlar



Sıęan dili; anti-actin,  
konfokal mikroskobu



Sıęan kalbi; anti-CD31,  
Işık mikroskobu

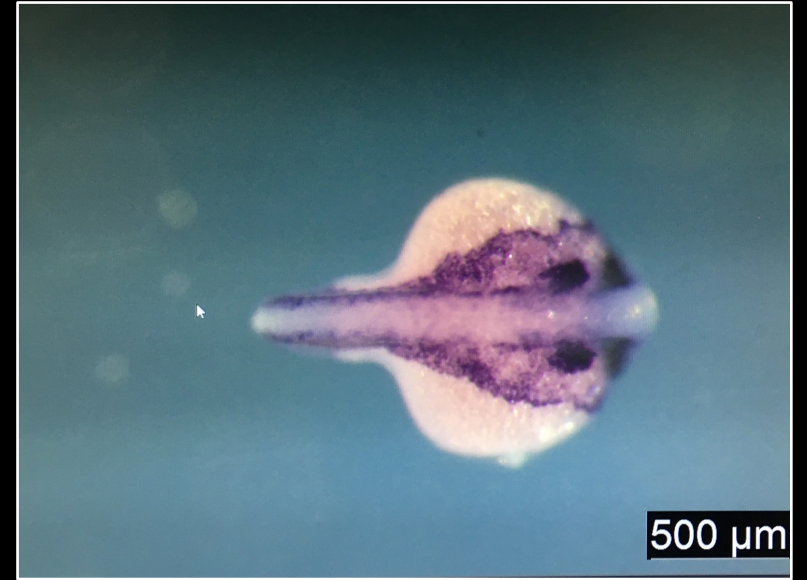
# İn situ hibridizasyon

- ✓ Nükleik asitlerin eşleşmesine dayanır.
- ✓ DNA-DNA, RNA-RNA, DNA-RNA
- ✓ Genomdaki yapısal değişiklikleri veya gen ifadesindeki mRNA seviyelerini saptamak için uygulanır.
- ✓ Radyoaktif veya kimyasal bir madde ile işaretlenmiş nükleotid dizisinde oluşan tek iplikli DNA veya RNA parçası hedeflediğimiz zincir ile eşleşir.

# İn situ hibridizasyon



İn Situ Hibridizasyon : İşaretili prob ile sinyal alınması



Zebra balığı, Anti-Prrx1-a, ISH