

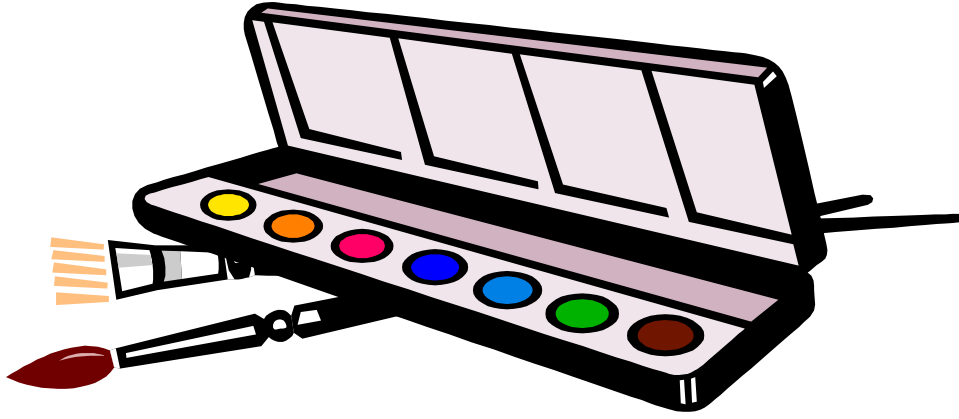
Hücre ve dokuların boyanması

DR. ÖĞR. ÜYESİ Ferda Topal Çelikkan

15.10.2020

Özel tekniklerin Uygulanması

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



Dokuların Boyanması

Histokimyasal Teknikler

- ✓ 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 çöz

Hematoxylin ile boya- mavi

yıka

Eosin ile boya - kırmızı

yıka

Nukleus - mavi

Sitoplazma-
kırmızı

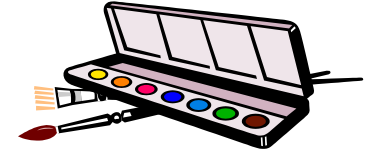


Non-vital boyamada kullanılan boyalar kimyasal yapılarına göre **inorganik** ya da **organik** olarak sınıflandırılır.

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

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

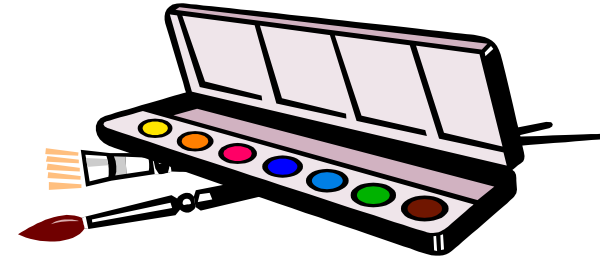
-Sentetik boyalar



Boyama

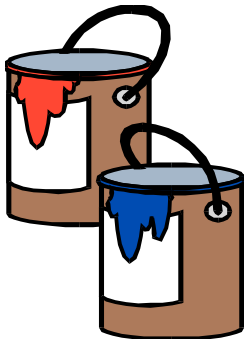
- ✓ Amaç doğal kontrastı arttırmak, farklı hücre ve doku yapılarıyla hücre dışı materyalleri daha belirgin hale getirmektir.
- ✓ Doku ve organ yapılarını boyamada kullanılan metodlar, çeşitli doku komponentlerini farkedilir hale getirerek, aralarında kıyaslama yapabilme olanakları sağlar.

- ✓ 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** 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.

İmmuno(sito)histokimya

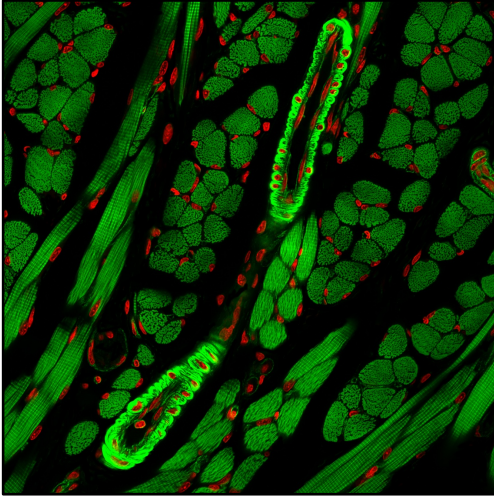
- ✓ Antikor-antijen eşleşmesine dayanır.
- ✓ İşaretlenmiş antikorlar dokuda spesifik antijenlere bağlanır.
- ✓ Bu antikor-antijen kompleksi yerleşimleri ışık ve ya elektron mikroskopuyla incelenebilir.

İmmünohistokimya basamakları

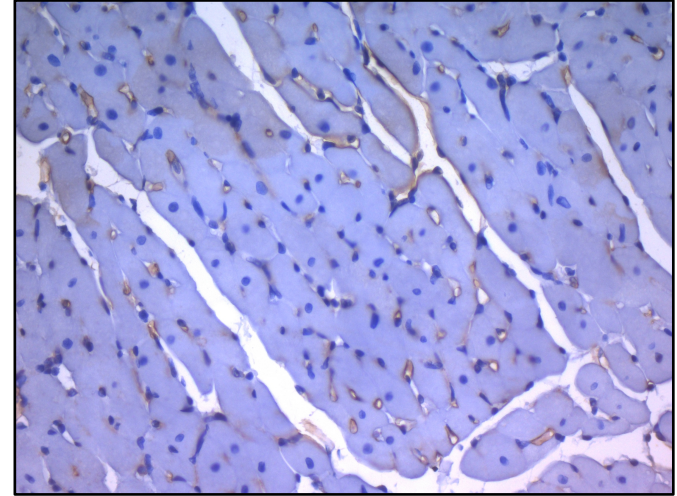
- ✓ Doku kesitlerinin alınması
- ✓ Antijenin ortaya çıkarılması (antigen retrieval)
- ✓ Primer antikor
- ✓ Sekonder antikor
- ✓ Kromojen substrat
- ✓ Karşıt boyama (counterstain)
- ✓ Kapatma (mounting)
- ✓ Mikroskopik inceleme

Antikora Baęlanan İřaretleyiciler

- ✓ Peroksidaz
- ✓ Alkale fosfataz
- ✓ Florokromlar



Sıęan dili; anti-actin,
konfokal mikroskobu



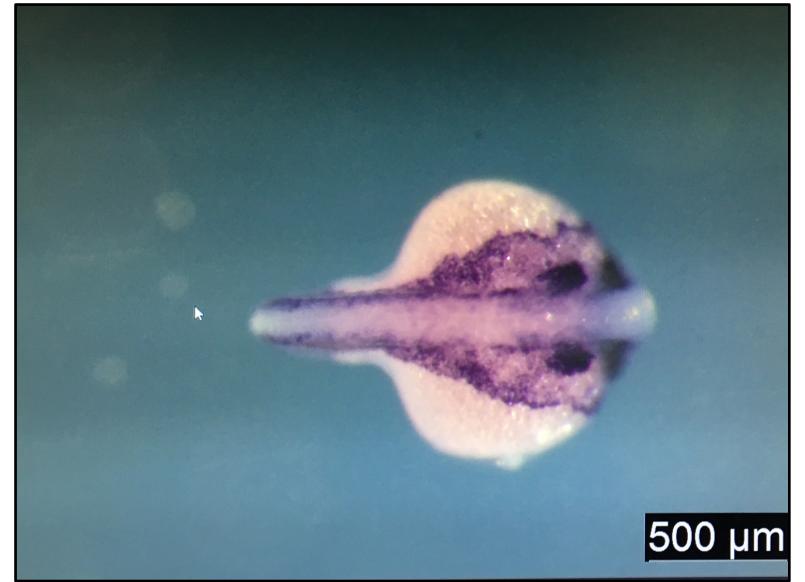
Sıęan kalbi; anti-CD31,
Işık mikroskobu

İmmuno(sito)histokimyasal teknikler

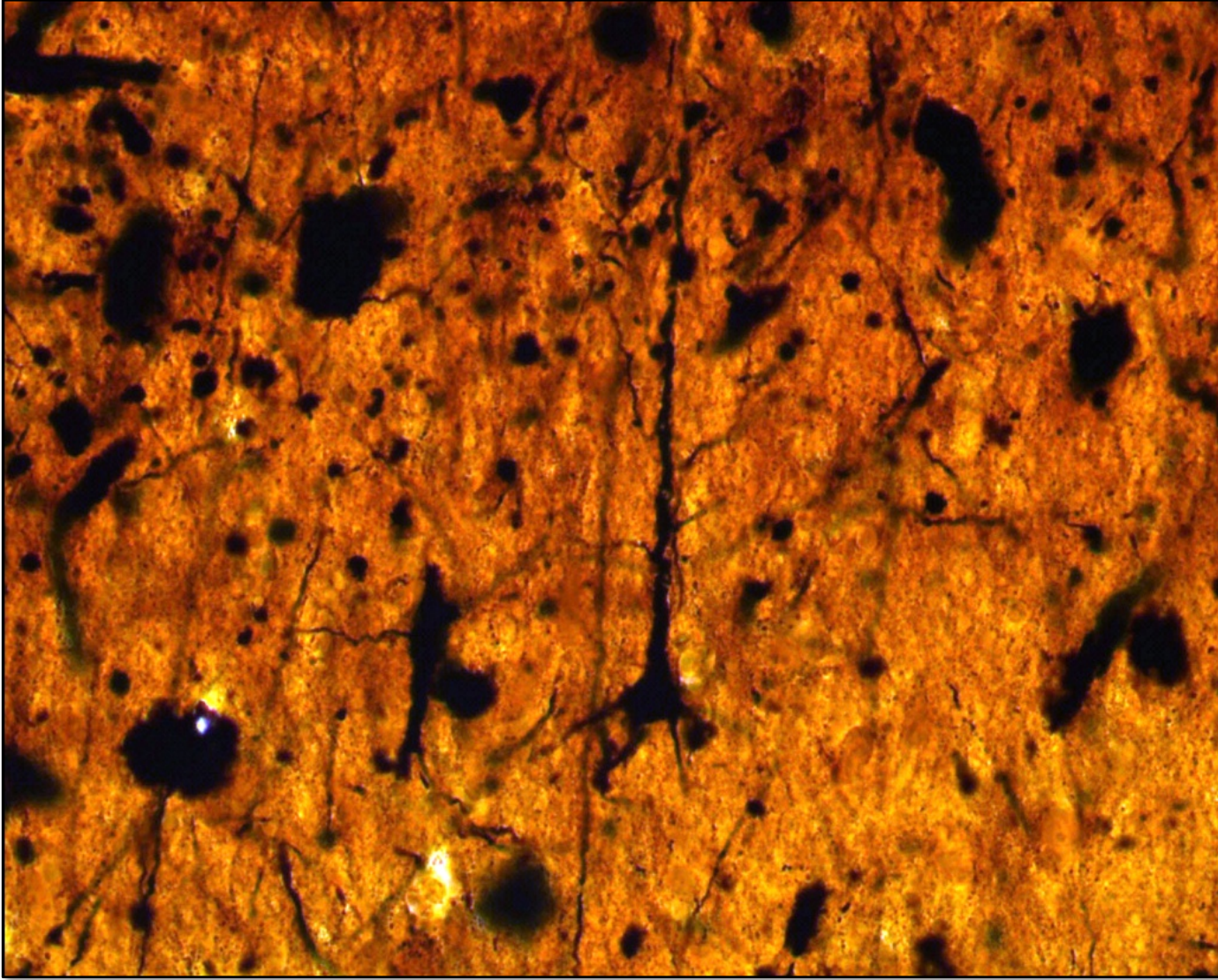
İn situ hibridizasyon

- ✓ 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.

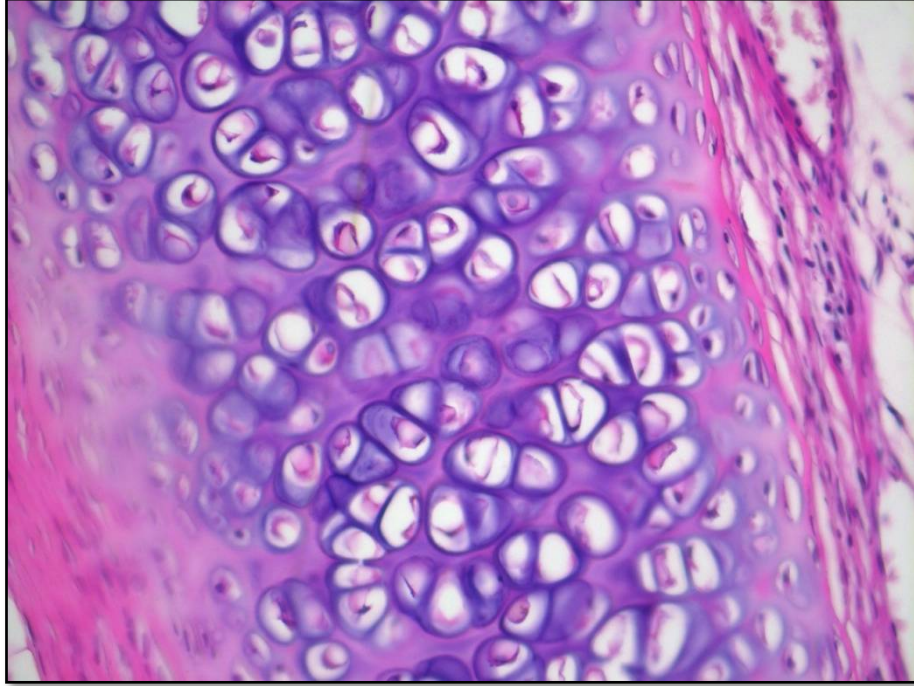
İn situ hibridizasyon



Zebra balığı, Anti-Prrx1-a, ISH



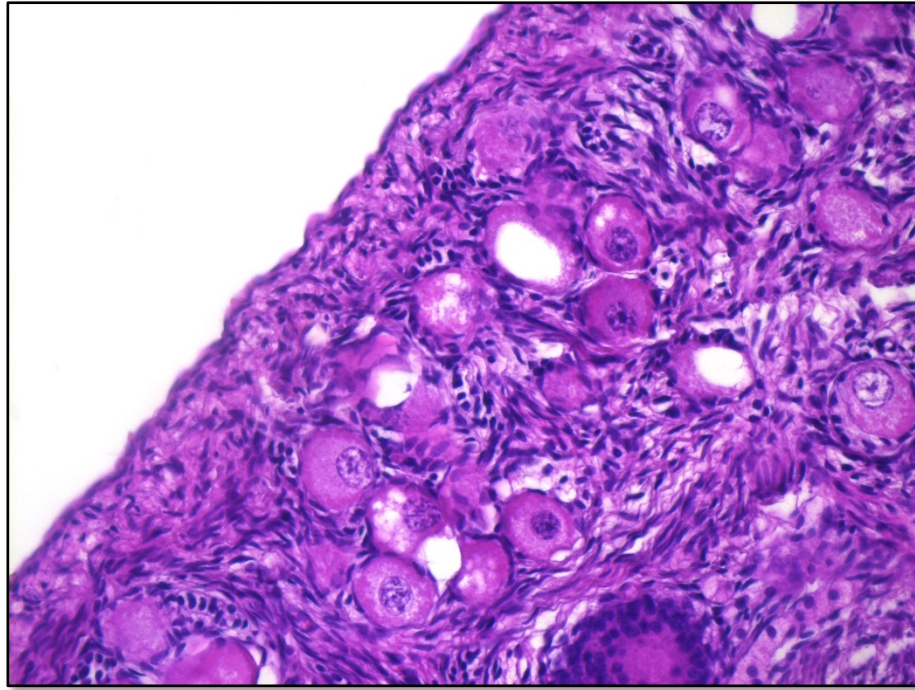
Beyin, Gümüşleme



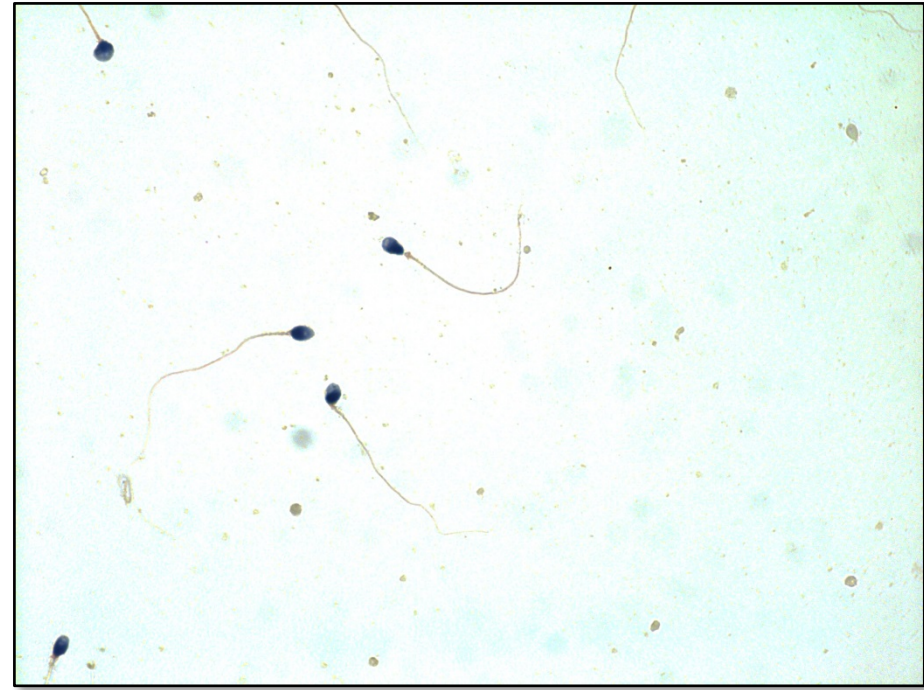
Trakea-Hiyalin kıkırdak, Hematoksilin Eozin



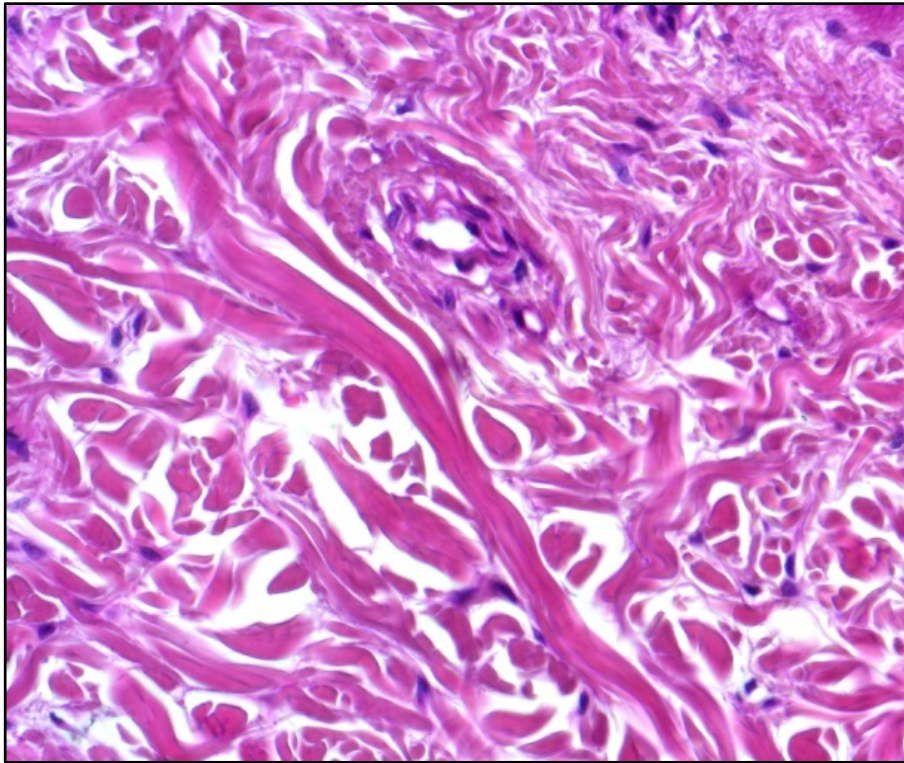
Epiglottis- Elastik kıkırdak, Orsein



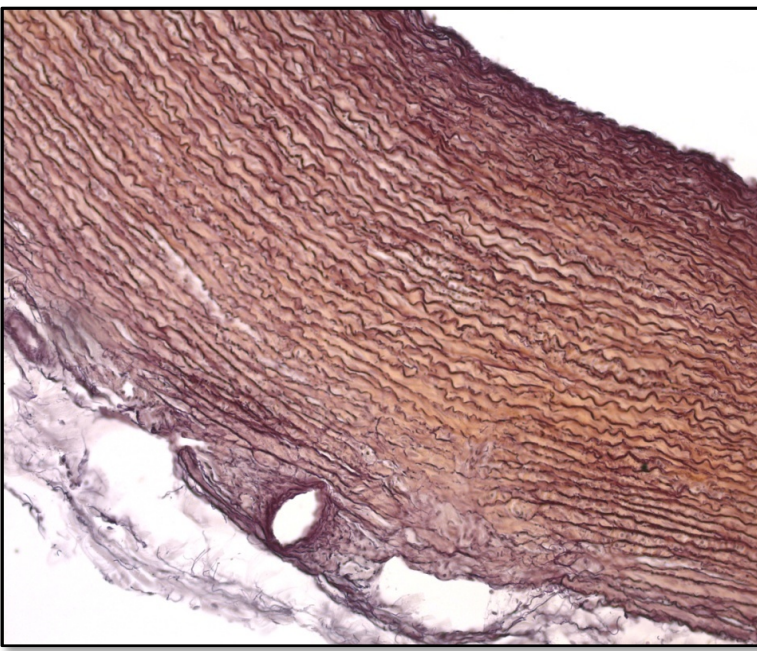
Ovaryum, Hematoksilin Eozin



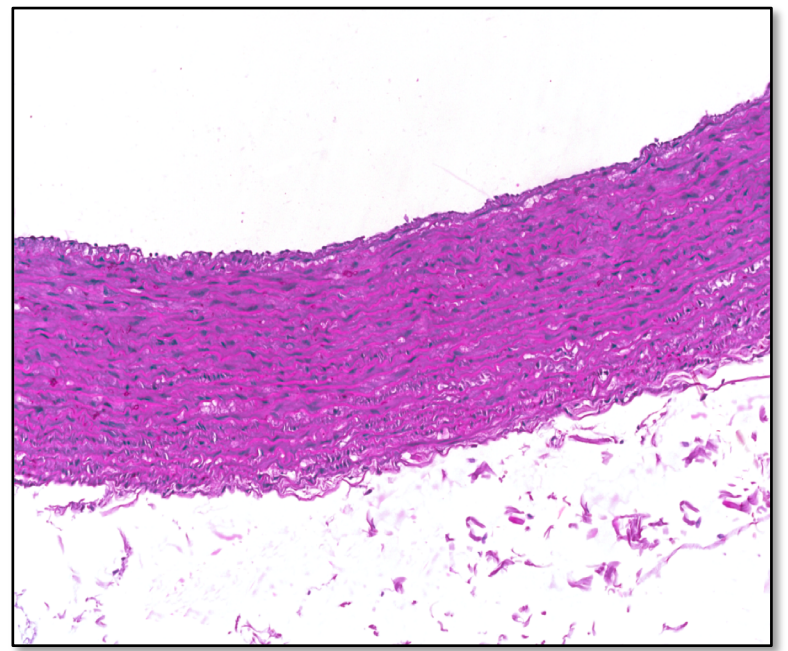
Sperm Yayması, Papanicolaou Boyası



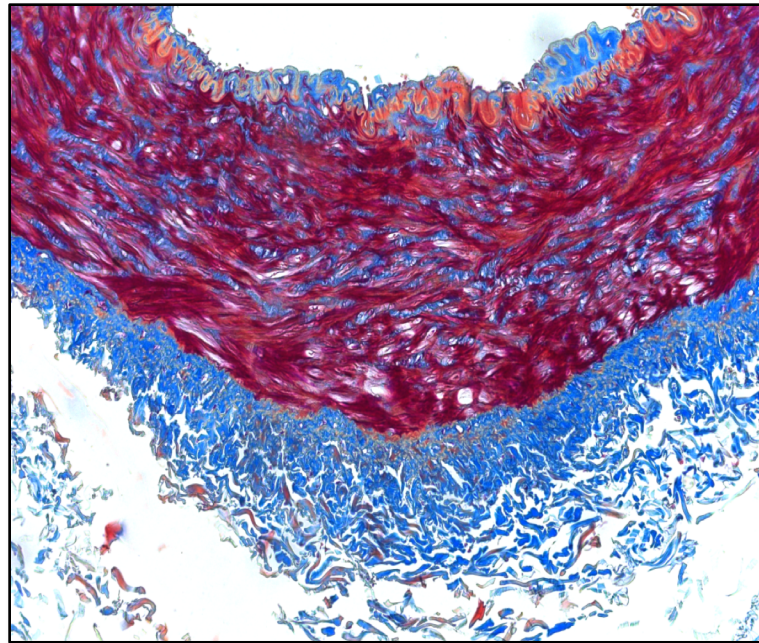
Deri, Hematoksilin Eozin - Mallory Azan



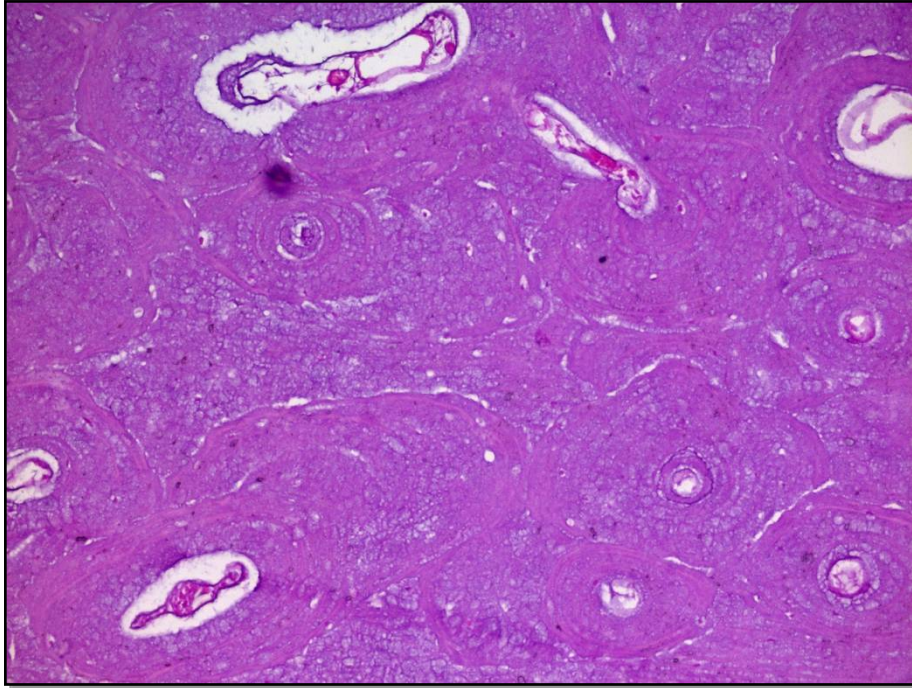
Büyük Arter, Orsein



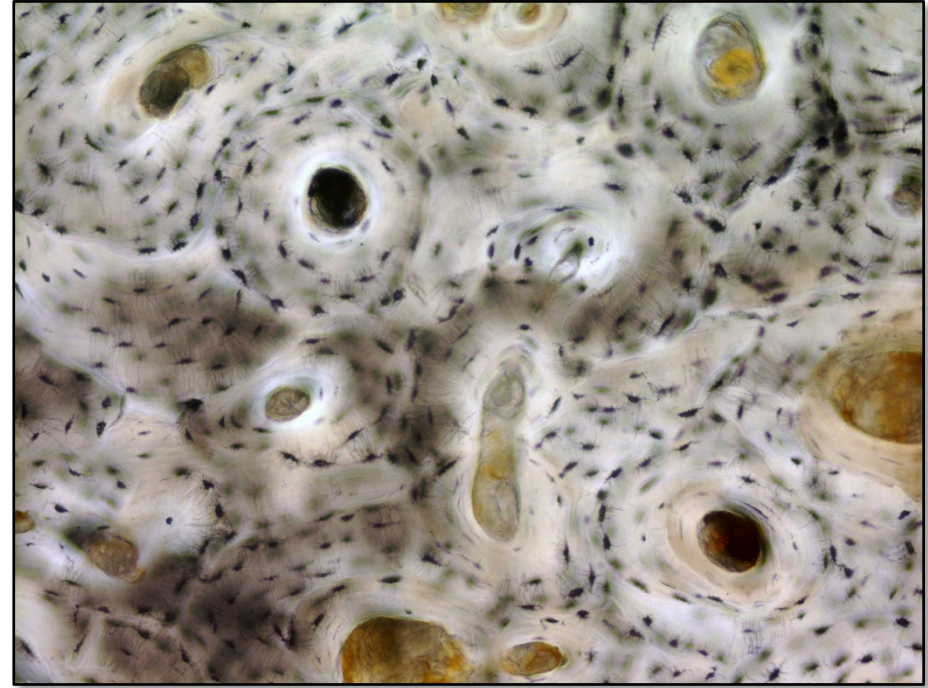
Büyük Arter, Hematoksilin-Eozin



Orta Arter, Mallori Azan



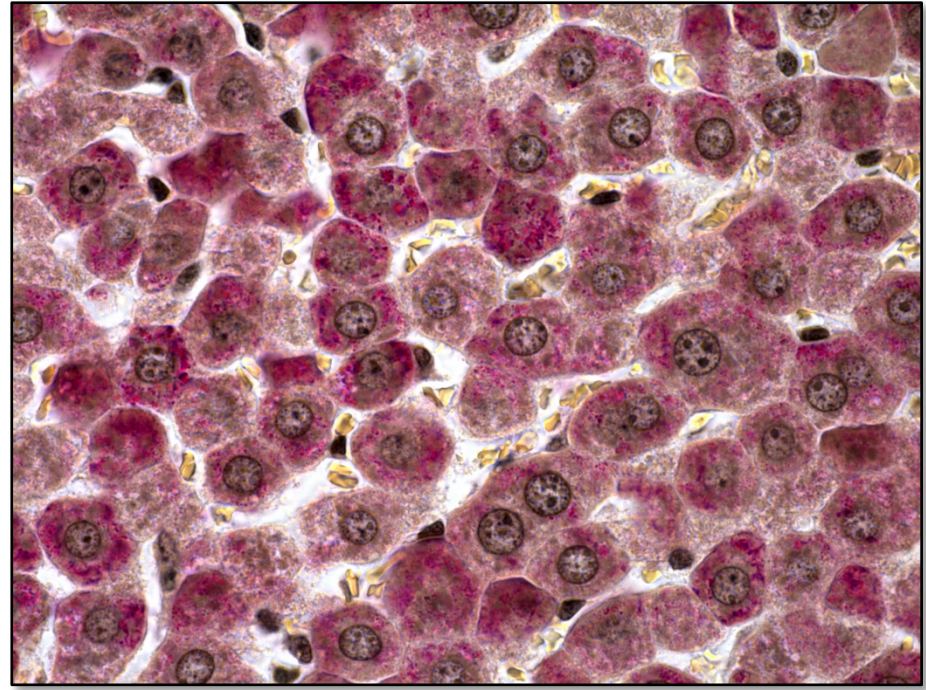
Dekalsifiye Kemik



Massere Kemik



Tiroid, PAS (Periodic acid schiff)



Karaciğer, Best'in Karmin



Fetüs, 3,5 aylık, Hematoksilin-Eozin