

# LİPİDLERİN GÖSTERİMİ

- Basit tekniklerle gösterilebilen lipid miktarı genellikle kimyasal analizle gösterilen miktardan çok daha azdır.
- Karaciğer, böbrek ve kalp gibi organların kesitlerinde bulunan lipidler gösterilemiyebilir.
- Var olan fakat basit tekniklerle gösterilemeyen böylesi lipidler maskelenmiş veya bağlı lipidler olarak bilinmektedir.
- Bu lipid, özellikle protein gibi diğer doku bileşenleri ile kombine edilir ve bu durumda parafin gömmesinde korunabilirler.
- Tamponlanmış formalin veya % 1' lik  $\text{CaCl}_2$ ' deki % 10' luk formalinle fiksasyon, genel amaçlar için tavsiye edilmektedir.

## Lipidleri Boyama Yöntemleri

**1-Yağda Çözünür Boyalar:** Bunlar zayıf asidik boyalardır ve suda çözünmeyen ve sadece alkolde ayrılabilen boyalardır.

Lipidlerin çoğunda çözünürler ve bu nedenle dokulardaki lipidlerin gösteriminde çok kullanılırlar.

Çözünürlükleri ile lipidleri renklendirdiklerinden **lizokrom** lar olarak adlandırılırlar. Bu boyalar:

- 1-Sudan III
- 2-Sudan IV( daha siyah)
- 3-Sudan Black B (en hassası)
- 4-Oil red O

**2-Floresans Mikroskopisi;** lipofuksinler olarak bilinen lipidlerin oksidasyon ürünleri ve lipidlerde çözünen karotenoid pigmentler tarafından oluşturulur.

**3-Osmiyum tetroksit:** Dejenere miyelinin gösterilmesi için özellikle uygundur.

#### **4-Kolesterol gösterim yöntemleri**

- a-Digitonin reaksiyonu: Formalin veya formal kalsiyum fiksasyonu yapılır. Frozen kesitler, işlemi takiben polarizasyon mikroskobu ile incelenir.
- b-Schulz reaksiyonu: Kolesterol esterleri için kullanılmaktadır.

## **5-Fosfolipidlerin gösterim yöntemleri**

- a-Baker' in asit hematein yöntemi
- b-Plasmal reaksiyon (Feulgen ve Voit, 1924)
- c-PAS yöntemi: Karbohidrat içeren lipidlerin (cerebrosidler ve gangliosidler) ve aynı zamanda aldehit içeren doymamış lipidlerin ve fosfolipidlerin gösteriminde kullanılır.

## **6-Asidik lipidler için yöntemler**

- a-Nötral ve asidik lipidler için Nile blue yöntemi
- b-Feyrter' in inklüzyon yöntemi

## **PROTEİNLERİN GÖSTERİMİ**

- Proteinler organizmada ya saf proteinler olarak veya karbohidratlar veya lipidlerle kombine olarak bulunurlar.
- Hayvansal dokulardaki proteinler **basit proteinler ve konjuge proteinler** olarak ikiye ayrılır.

### **Basit proteinler**

- Globuler Proteinler: Albumin, globulin, histonlar
- Fibröz Proteinler: Kollajen, retikülin, elastin, keratin, fibrin

**Konjuge proteinler:**Nükleroproteinler, gikoproteinler ve lipoproteinler

## Proteinlerin Saptanması ve Boyanması

- Proteinlerin ve protein içeren bileşiklerin boyanma reaksiyonları amino asit yapısına ve boyama çözeltisinin pH' sına dayanmaktadır.
- Eğer protein karboksil gibi asidik gruplu çok sayıda aminoasitlerden oluşmuşsa, bazik boyalarla boyanan bir asit protein olacaktır.
- Eğer çok sayıda amino grupları(-NH<sub>2</sub>) varsa asit boyalara affiniteye sahip bazik bir proteindir.
- Bazı amino asitler 1 amino ve 1 karboksil grubuna sahiptir ve nötral proteinlerdir.

- Proteinlerin birçok bileşenden oluşmuş çok kompleks yapılar oldukları unutulmamalıdır.
- Bu yöntemler, proteinlerin yapısı hakkında çok az bilgi verirler.
- Ayrıca fiksasyon da korunmayı ve reaktif son grupların gösterimini etkileyebilir.
- Bu nedenle fiksasyon, yöntemine uygun olmalıdır.
- Formalin fiksasyonu kısa olmalıdır ve osmiyum tetroksit zararlıdır, kullanılmamalıdır.
- Enzimler de spesifik aktiviteleri ile gösterilebilir. Immunglobulinler de doku kesitlerinde küçük hacimlerde olmalarına rağmen kesin olarak saptanabilirler.
- Antibodiler ve antijenler için immünofloresans ve immünoenzim yöntemleri uygulanabilir.
- Çok az miktardaki proteinler kesitlerde immünolojik tekniklerle gösterilebilir.

## **NÜKLEİK ASİTLER VE NÜKLEOPROTEİNLER**

- Nükleoproteinler, nükleik asitlerin ve bazik proteinin kombinasyonlarıdır
- DNA esas nükleer bileşendir diğeri ise RNA' dır ve hem çekirdekte hem de sitoplazmada bulunur.



- **Nükleik Asitlerin Boyanması:**
- Nükleik asitler, fosfat–pentoz–purin/pirimidin baz bileşikleridir ve bu bileşenlerin herbiri histolojik yöntemlerle gösterilmelidir.
- Asidik fosfat radikalleri bazofiliden sorumludur ve bazik boyalar rutinde nükleik asitler için çok kullanılmaktadır.
- Bunlar NA'ya ek olarak diğer maddelerle de birleştiklerinden spesifik olmayacaklardır.
- Metil green'in DNA'ya özel bir affinitesi vardır.
- Purin ve pirimidinler için geliştirilen **Tetrazonium** reaksiyonunun nükleoproteinler için non–spesifik olduğu gösterilmiştir.
- DNA'nın şeker yapısı asit hidrolizinden sonra, aldehit–Schiff reaksiyonu ile saptanabilir.
- Feulgen reaksiyonu DNA için tam ve spesifik bir testtir.

- RNA ise pyronin ve metil green pyronin tekniği ile bazı teknik zorluklara karşın gösterilebilir ve hem DNA hem de RNA için spesifik bir yöntemdir.
- RNA'ya özel bir affinitesi olan toluidin blue gibi (ph 5 de RNA'ya özel bir affinitesi vardır), safranin ve nötral red gibi bazı bazik boyalar nükleik asitlerin genel boyanması için kullanılırlar.

- Nükleoluslar, bazofilik ve asidofiliktirler.
- Asidik ve bazik boylarla boyanma reaksiyonu, nükleik asitler ve proteinlerin birbirlerine oranlarına bağıdır.
- Nükleoluslar, hematoksilen ve toluidin blue gibi bazik boylarla boyanabilirler fakat Feulgen (-) tirler.
- Zıt boyama ile de yeşil olarak renklenirler.

- Nukleoluslar akrinidin orange ile kırmızı floresans verirler fakat ayrıntılar iyi değildir.
- Kromozomlar, histolojik kesitlerde görülebilir, fakat genellikle smearlerde çalışılır.
- **Kromozom boyaları:**
  - a- Giemsa
  - b-Orcein
  - c- Heidenhein demirli hematoksilen

## **Kromozom bantlama boyları:**

- a- Quenn acrin
- b- Acridin orange
- c- Giemsa
- d- Orcein
- e- Baryum hidroksit
- **Y kromozomu:** Floresans mikroskopta, özel boyamalar ile floresans vermesi ile saptanır.

## **1- DNA için Feulgen reaksiyonu:**

- DNA için en güvenilir ve en spesifik tekniktir.
- Reaksiyon, asit hidroliz ile purin-deoksiriboz bağlarının kırılması ile aktif aldehit gruplarının serbest kalması esasına dayanmaktadır.
- Aldehitler, Schiff reaktifini (leucofuksin, fuksin sülfuroz asidi) tekrar renklendirerek, çekirdek kromatinine mor-menekşe renk verir.
- Bu reaksiyon, PAS reaksiyonunun analogudur.

- **Yöntemler**
- **A-DNA için Feulgen reaksiyonu**
- DNA morumsu - kırmızı
- Sitoplazmayeşil
- **B-DNA için naphtoik asit hidrazit-Feulgen reaksiyonu**
- DNA mavimsi – menekşe
- Sitoplazma ve diğer proteinler pembemsi – kırmızı