



# HISTOLOJIDE BOYAMA YÖNTEMLERİ

Dr . Yasemin Sezgin

*yasemin sezgin*

# HÜRESEL BOYAMANIN TEMEL PRENSİPLERİ



Hem fiziksel hem kimyasal  
faktörler hücresele  
boyamayı etkilemektedir



## BOYAMA MEKANİZMASI

- Temelde boyanın hücreSEL komponentlere tutunması ile gerçekleşmektedir.
- Boya dokuya iyonik, hidrojen veya kovalent bağlar ile bağlanabilir.



## İYONİK BAĞLAR

- İyonik veya elektrostatik bağlanma boya ve boyanacak materyal farklı elektriksel yüke sahip olduğu zaman gerçekleşir.
- Farklı elektriksel yük nedeni ile aralarında bir çekim oluşur. Örneğin stoplazmik proteinler pozitif yüklü ise negatif yüklü bir boya kullanarak boyama yapmak mümkün olur.



## HİDROJEN BAĞLARI

- Hidrojen bağları ise kovalent bağlı hidrojenin elektronegatif yüklü atomlar tarafından çekilmesi ile olur.
- Bu bağlar genellikle hidrojen ile oksijen ve hidrojen ile nitrojen arasında gerçekleşir.
- Hidrojen bağları zayıftır ve boya ile boyanın çözündüğü su arasında bu bağlar doğal olarak oluşabilir. Sıvı bazlı boyama reaksiyonlarının çoğunda görülen bu bağlar önemsizdir.



## KOVALENT BAĞLAR

- Bu tip bağlanmada atomlar elektron paylaşmaktadır.
- Bu tip bağ genellikle organik kimyasallarda görülür çünkü karbon, hidrojen ve oksijen genellikle kovalent bağlar oluşturur

## NÜKLEER BOYANMA

- Mekanizması henüz tam olarak anlaşılammamakla birlikte iki değişik mekanizma ile çalıştığı düşünölmektedir
- Boyama bazik (katyonik veya pozitif yüklü) boyalar ile gerçekleşir.
- Metal mordant ile birlikte kullanılan veya takiben metal mordant kullanılan boyalar ile gerçekleşir





## SİTOPLAZMIK BOYANMA

- Mekanizması daha iyi anlaşılmıştır.
- Non-nükleer boyanma proteinler veya proteinleri oluşturan amino asit zincirlerinde bulunan yüklü gruplar ile gerçekleşir.



## SİTOPLAZMIK BOYANMA

- Proteinler veya polimer amino asit zincirleri bir ucunda terminal amino( $\text{NH}_2$ ) grubu diğer ucunda terminal karboksil grubu ( $\text{COOH}$ ) taşırlar.
- Buna ek olarak amino asitler yan zincirlerinde  $-\text{NH}_2$  ve  $-\text{COOH}$  grubu taşıyabilirler.
- Bu iki grup nedeniyle proteinler pozitif veya negatif yüklü olarak bulunabilir.



Proteinler pH bağımlı olarak pozitif(+) veya negatif(-) yüklenebilir. Bu özellikteki proteinlere “**amphoteric**” proteinler denir.



Net yüküne göre madde elektriksel alan içinde hareket eder.

Pozitif yüklü proteinler (-) e doğru hareket eder,

Negatif yüklü proteinler (+) e doğru hareket eder.

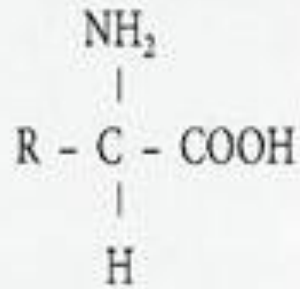


Pozitif ve negatif yükler eşit olduğunda hareket olmaz bu noktaya “**izoelektrik nokta**” adı verilir.

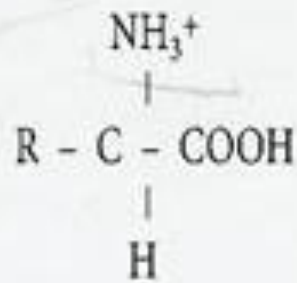


Nükleus dışındaki  
elementlerin boyanmasında  
pH'nın protein  
iyonizasyonunu ve izoelektrik  
noktayı nasıl etkilediğini  
bilmemiz gerekir.

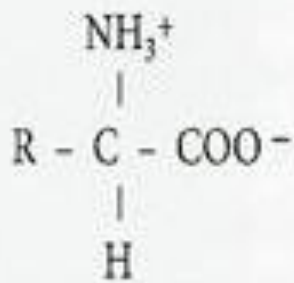




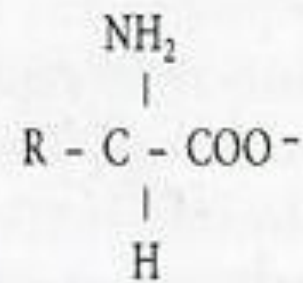
undissociated amino acid



basic (+)



zwitterion



acidic (-)

(electrically neutral)

pH 1.0 ←————— pH 6.0 —————→ pH 14.0

IEP

**[f6.1]** The effect of pH on the amino acids of proteins.

- Proteinler için izoelektrik nokta yaklaşık pH 6 da olmaktadır.
- Ph 6 nın altında ise non-nükleer proteinlerin yükü (+) olur ve (-) yüklü boyalar ile boyanır .
- Bunlar asitik boyalardır ve asidofilik boyanma görülür.
- İzoelektrik noktanın üzerinde ise net yük (-) olur ve (+) yüklü boyalar ile boyanır.
- Bunlar bazik boyalardır ve bazofilik boyanma görülür.





# BOYALAR

Boyalardan bahsederken iki soruyu cevaplamak gerekir

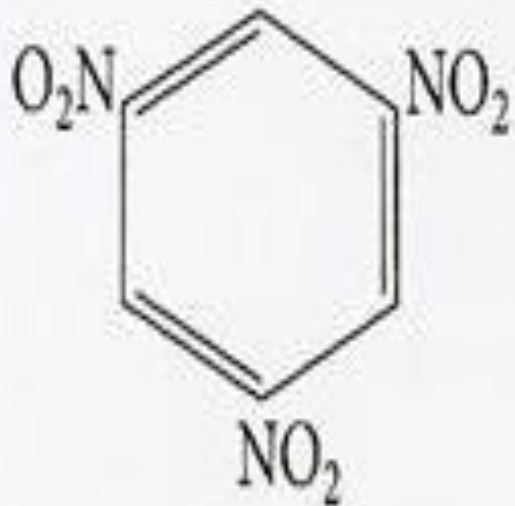
- Materyali boya yada renkli yapan nedir?
- Boya ve boyanan kısım arasında nasıl bir ilişki vardır?



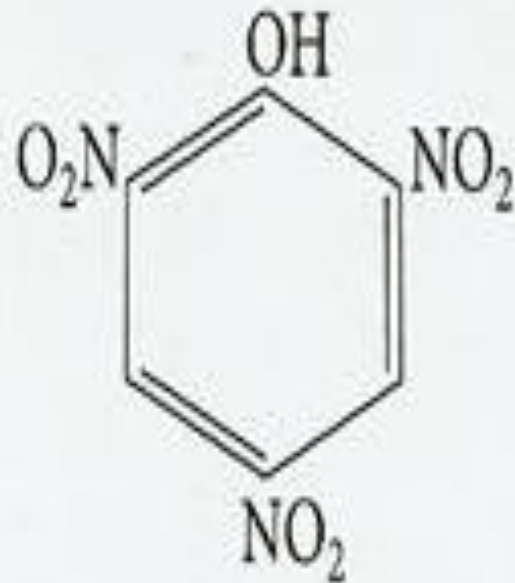
## BOYALAR

- Bütün boyalar organik bileşiklerdir
- Çoğu kömür veya benzen bileşikleridir.
- Bu bileşiklerde moleküldeki çift bağın yeniden düzenlenmesi ile renkli bir bileşik oluşur.
- Benzen halkasındaki iki hidrojen ( H ) atomu, oksijen veya iki değerlikli başka bir atomla yer değiştirebilir.





Trinitrobenzene  
(a chromogen)



Picric acid  
(a dye)

Renk oluřturma özelliđi  
olan gruplara” **kromofor**”  
adı verilir.



- Kromoforlarda bulunan temel gruplar
- $C=C$ ,  $C=O$ ,  $C=S$ ,  $C=N$ ,  $N=N$ ,  $N=O$  ve  $NO_2$  dir.
- Bu gruplardan birkaçı aynı bileşik içinde yer alabilir bu durumda renk daha şiddetli olur.



- Kromoforik grup ihtiva eden benzen kaynaklı bileşiklere “**kromojen**” adı verilir.



Kromofor veya kromojen ihtiva eden bileşikler renkli olsa da boya gibi davranabilir yada davranmayabilirler yada boyanacak madde ile bağ kurabilir veya kurmayabilirler.



Boyanın hücreye sıkıca  
bağlanması için  
**“auksokrom”** denilen  
iyonik grup gereklidir





- En temel aoksokrom amino ( $\text{NH}_2$ ) grubudur.
- Anilin boyaları bu grubu içerir ve pek çok boya anilin türevidir.
- Sulfonik asit ( $\text{SO}_3\text{H}$ ), karboksil ( $\text{COOH}$ ), hidroksil grupları ise asidik aoksokromlardır.



# BOYA BAĞLANMASINI ETKILEYEN FAKTÖRLER

- 1. Solusyonun pH'sı** boyanın belli hücre elementlerine bağlanmasını etkiler. Bu etki hücre komponenti ve boya molekülü üzerindeki elektriksel yüklerle ilişkilidir.
- 2. Isı artışı** boyanma miktarını artırır. Bu etki boya moleküllerinin difüzyonunun artışı ile olmaktadır. Boyanın daha fazla tutunmasında hücre komponentlerinin artan ısıdan dolayı şişmesi de etkili olmaktadır.



# BOYA BAĞLANMASINI ETKILEYEN FAKTÖRLER

- 3. Boya moleküllerinin konsantrasyonunun artması boyanın bağlanmasını artıran diğer bir faktördür.**
- 4. Boya haricinde boyanın içinde çözünmüş bulunan tuzlar bazı hücrelerin boyanma yoğunluğunu artırıp eksiltebilir. Muhtemelen tuz iyonları ile boya iyonları aynı bağlar için rekabet eder.**



# BOYA BAĞLANMASINI ETKILEYEN FAKTÖRLER

**5-Fiksatifler** hücrenin boyanma karakterini hücrede belli kimyasal gruplar ile tepkimeye girerek değiştirebilir.

Örneğin formaldehit amino grupları ile tepkimeye girer.



- Eozini bağlamak için ana grup olan amino grubu ile tepkimeye girdiği için formalinle fikse hücreye daha az eozin bağlanacaktır.
- Potasyum dikromat içeren solusyonlarla fikse edilmiş hücreler daha az hematoksilen daha fazla eozin almaya eğilimlidir.
- Potasyum dikromat karboksil ve hidroksil grupları ile reaksiyona girer



## DIFFERANSIASYON

Sık duyacağımız kavramlar

- Progresif ve regresif boyama kavramlarıdır.
- Boyanın tam istenen düzeyde olması, maturasyonu ,(differansiasyonu) için kullanılır



## PROGRESIF BOYAMA

- Progressif boyama; birçok zıt boyama ve sitoplazmik boyamada kullanılır.
- Bu tür boyamada istenilen renk yoğunluğuna ulaşana kadar boyama devam eder, istenen yoğunluğa ulaşınca boyama durdurulur.



## REGRESIF BOYAMA

- Daha çok regressif boyama tercih edilir.
- Regressif boyamada hücre fazladan boyanır daha sonra differansiasyona uğratılarak de-colorize edilir.
- İstenen element boyalı kalana kadar boya ayrıştırılır ve decolorize edilir.





## MORDANTLAR

Mordantlar hücre ile boya arasında bir bağ gibi hareket eden maddeler veya metallerdir.

Boya rengini sabitlemek için kullanılır



## MORDANTLAR

- Mordantlar boyaların çoğunda istenilen yapının diferansiyel boyanması için kullanılır.
- Ayrıca mordantlar rutin nükleer boyamada da kullanılır.

