

Ayşe AKBAŞ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

2021



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



**FARKLI BOYAMALARIN ÇEŞİTLİ DOKULARIN PARAFİN
VE YARI İNCE EPON KESİTLERİNE UYGULANMASININ
IŞIK MİKROSKOBİK DÜZEYDE KARŞILAŞTIRILMASI**

Ayşe AKBAŞ
0000 0002 0091 9012

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2021



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



**FARKLI BOYAMALARIN ÇEŞİTLİ DOKULARIN PARAFİN
VE YARI İNCE EPON KESİTLERİNE UYGULANMASININ
IŞIK MİKROSKOBİK DÜZEYDE KARŞILAŞTIRILMASI**

Ayşe AKBAŞ
0000 0002 0091 9012

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN:
Prof. Dr. Semiha ERSOY

BURSA-2021

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum

“Farklı Boyamaların Çeşitli Dokuların Parafin ve Yarı İnce Epon Kesitlerine Uygulanmasının Işık Mikroskopik Düzeyde Karşılaştırılması” adlı çalışmamın, proje sahhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğum belirtir ve beyan ederim.

Adı Soyadı

Tarih ve İmza

AYŞE AKKAS


TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

05/02/2021

Adı Soyadı: Ayşe AKBAŞ

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Konusu: Farklı Boyamaların Çeşitli Dokuların Parafin ve Yarı İnce İpon Kesitlerine Uygulanmasının Işık Mikroskopik Düzeyde Karşılaştırılması

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Semiha ERSOY

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYAN	II
KABUL ONAY	III
TEZ KONTROL BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
TÜRKÇE ÖZET	X
İNGİLİZCE ÖZET	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Histolojik Yöntemler ve Boyamalar Hakkında Genel Bilgiler.....	4
2.1.1. Işık Mikroskopik Yöntemlerde Boyalar, Boyanmalar ve Mekanizmalar ...	4
2.1.2. Asidik (Anyonik), Bazik (Katyonik), Nötr ve Amfoterik Boyalar	4
2.1.3. Bazofilik ve Asidofilik Boyanma	5
2.1.3.1. Bazik (Katyonik) Doku Komponentleri.....	5
2.1.3.2. Asidik (Anyonik) Doku Komponentleri.....	5
2.1.3.3. Bazik-Asidik-Amfoterik Doku Bileşenleri.....	6
2.1.4. Metakromazi ve Metakromatik Boyanma	8
2.2. Işık ve Elektron Mikroskopisinde Kullanılan Boyalar Hakkında Genel Bilgi	8
2.2.1. Hematoksilen	8
2.2.2. Eozin	9
2.2.3. Asit fuksin.....	9
2.2.4. Light green	9
2.2.5. Metil green.....	10
2.2.6. Nötral red	10
2.2.7. Toluidine blue.....	10
2.2.8. Bazı Özel Doku Komponentleri İçin Histokimyasal Boyamalar	11
2.2.8.1. Kollajen Lifler (Tip I Kollajen)	11
2.2.8.2. Elastik Lifler	11

2.2.8.3. Retiküler Lifler (Tip III Kollajen)	11
2.2.8.4. Mitokondri.....	11
2.3. Transmisyon Elektron Mikroskopide Fiksatifler ve Gömme Ortamları	12
2.3.1. Fiksatifler.....	12
2.3.1.1. Gluteraldehit.....	12
2.3.1.2. Osmiyum tetroksit	12
2.4. Reçine ile İnfiltrasyon	13
2.5. Polimerizasyon	13
2.6. Gömme Ortamları.....	13
2.6.1. Epoksi Reçineler	14
2.6.1.1. Epon	14
2.6.1.2. Araldit.....	15
2.6.1.3. Spurr	15
2.6.2. Polyester Reçineler	15
2.6.2.1. Vestopal W.....	15
2.6.3. Akrilik Reçineler	15
2.6.3.1. Metakrilatlar	16
2.6.3.2. Lowicryller.....	16
2.6.3.3. LR Reçineler	17
2.7. Kesit Alma	17
2.8. Etching ve Deosmikasyon	18
2.9. Yarı İnce Kesitlerin Boyanması.....	20
2.9.1. Monokromatik Boyamalar.....	20
2.9.2. Polikromatik Boyamalar.....	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	23
3.1. Doku Disseksiyonu, Takip, Bloklama ve Kesit Alımı	23
3.1.1. Doku Disseksiyonu	23
3.1.2. Doku Takibi, Bloklama ve Kesit Alımı.....	23
3.1.2.1. Parafin Doku Takibi, Bloklama ve Kesit Alımı.....	23
3.1.2.2. TEM Doku Takibi, Bloklama ve Kesit Alımı	23
3.2. Etching Yöntemi.....	24
3.2.1. NaOH ile Etching	24
3.2.2. %2,5 Periyodik Asit ile Etching.....	24
3.2.3. Aseton ile Etching.....	25
3.3. Boyama Yöntemleri.....	25
3.3.1. Monokromatik Boyama Solüsyonları ve Boyama Yöntemleri	25

3.3.1.1. Hematoksilen Boyaması	25
3.3.1.2. Eozin Boyaması	26
3.3.1.3. Toluidine blue Boyaması	27
3.3.1.4. Asit fuksin Boyaması	27
3.3.1.5. Metil green Boyaması	28
3.3.1.6. Nötral red Boyaması	28
3.3.2. Dikromatik Boyama Solüsyonları ve Boyama Yöntemleri	29
3.3.2.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması	29
3.3.2.2. Toluidine blue ile Kombinasyonlar	30
3.3.2.2.1. Toluidine blue-Eozin Boyaması	30
3.3.2.2.2. Toluidine blue-Asit fuksin Boyaması	30
3.3.2.2.3. Toluidine blue-Metil green Boyaması	31
3.3.2.2.4. Toluidine blue-Nötral red Boyaması	31
3.3.2.3. Asit fuksin ile Kombinasyonlar	32
3.3.2.3.1. Asit fuksin-Toluidine blue Boyaması	32
3.3.2.3.2. Asit fuksin-Metil green Boyaması	32
3.3.2.4. Metil green ile Kombinasyonlar	33
3.3.2.4.1. Metil green-Toluidine blue Boyaması	33
3.3.2.4.2. Metil green-Asit fuksin Boyaması	34
3.3.2.4.3. Metil green-Nötral red Boyaması	34
3.3.2.5. Nötral red ile Kombinasyonlar	35
3.3.2.5.1. Nötral red-Toluidine blue Boyaması	35
3.3.2.5.2. Nötral red-Metil green Boyaması	35
3.3. Özel Boyamalar	36
3.3.1. Verhoeff Boyaması	36
3.3.2. Gordon&Sweet Gümüşleme Boyaması	37
3.3.3. Toluidine blue-Light green (Tip I kollajen) Boyaması	38
3.3.4. Altmann Metodu (Mitokondri Boyaması	38
4. BULGULAR	40
4.1. MONOKROMATİK BOYANMA BULGULARI	40
4.1.1. Parafin kesitlerde Hematoksilen boyama sonuçları	40
4.1.2. Yarı ince epon kesitlerde Hematoksilen boyama sonuçları	40
4.1.3. Parafin kesitlerde Eozin boyama sonuçları	43
4.1.4. Yarı ince epon kesitlerde Eozin boyama sonuçları	43
4.1.5. Parafin kesitlerde Toluidine blue boyama sonuçları	46
4.1.6. Yarı ince epon kesitlerde Toluidine blue boyama sonuçları	47

4.1.7. Parafin kesitlerde Asit fuksin boyama sonuçları	51
4.1.8. Yarı ince epon kesitlerde Asit fuksin boyama sonuçları.....	52
4.1.9. Parafin kesitlerde Metil green boyama sonuçları	56
4.1.10. Yarı ince epon kesitlerde Metil green boyama sonuçları.....	57
4.1.11. Parafin kesitlerde Nötral red boyama sonuçları	61
4.1.12. Yarı ince epon kesitlerde Nötral red boyama sonuçları.....	62
4.2. DİKROMATİK BOYANMA BULGULARI.....	65
4.2.1. Hematoksilen-Eozin kombinasyonu	65
4.2.1.1.Parafin kesitlerde Hematoksilen-Eozin boyama sonuçları	65
4.2.1.2. Yarı ince epon kesitlerde Hematoksilen-Eozin boyama sonuçları	65
4.2.2. Toluidine blue kombinasyonları	67
4.2.2.1. Parafin kesitlerde Toluidine blue-Eozin boyama sonuçları.....	67
4.2.2.2. Yarı ince epon kesitlerde Toluidine blue-Eozin boyama sonuçları	67
4.2.2.3. Parafin kesitlerde Toluidine blue-Asit fuksin boyama sonuçları	69
4.2.2.4. Yarı ince epon kesitlerde Toluidine blue-Asit fuksin boyama sonuçları.....	69
4.2.2.5. Parafin kesitlerde Toluidine blue-Metil green boyama sonuçları	71
4.2.2.6. Yarı ince epon kesitlerde Toluidine blue-Metil green boyama sonuçları	71
4.2.2.7. Parafin kesitlerde Toluidine blue-Nötral red boyama sonuçları	73
4.2.2.8. Yarı ince epon kesitlerde Toluidine blue-Nötral red boyama sonuçları	73
4.2.3. Asit fuksin kombinasyonları	75
4.2.3.1. Parafin kesitlerde Asit fuksin-Toluidine blue boyama sonuçları	75
4.2.3.2. Yarı ince epon kesitlerde Asit fuksin-Toluidine blue boyama sonuçları.....	75
4.2.3.3. Parafin kesitlerde Asit fuksin-Metil green boyama sonuçları	77
4.2.3.4. Yarı ince epon kesitlerde Asit fuksin-Metil green boyama sonuçları.....	77
4.2.4. Metil green kombinasyonları	79
4.2.4.1. Parafin kesitlerde Metil green-Toluidine blue boyama sonuçları	79
4.2.4.2. Yarı ince epon kesitlerde Metil green-Toluidine blue boyama sonuçları	79
4.2.4.3. Parafin kesitlerde Metil green-Asit fuksin boyama sonuçları	81
4.2.4.4. Yarı ince epon kesitlerde Metil green-Asit fuksin boyama sonuçları.....	81
4.2.4.5. Parafin kesitlerde Metil green-Nötral red boyama sonuçları.....	83
4.2.4.6. Yarı ince epon kesitlerde Metil green-Nötral red boyama sonuçları	83
4.2.5. Nötral red kombinasyonları.....	85
4.2.5.1. Parafin kesitlerde Nötral red-Toluidine blue boyama sonuçları	85
4.2.5.2. Yarı ince epon kesitlerde Nötral red-Toluidine blue boyama sonuçları	85

4.2.5.3. Parafin kesitlerde Nötral red-Metil green boyama sonuçları.....	87
4.2.5.4. Yarı ince epon kesitlerde Nötral red-Metil green boyama sonuçları	87
4.3. SPESİFİK BOYAMALARA AİT BULGULAR	89
4.3.1. Elastik Liflerin İdentifikasyonu.....	89
4.3.2. Retiküler (Tip III Kollajen) Liflerin İdentifikasyonu	92
4.3.3. Tip I Kollajen Liflerin İdentifikasyonu	95
4.3.4. Mitokondri İdentifikasyonu	99
TARTIŞMA ve SONUÇ	101
6. KAYNAKLAR	124
7. SİMGELER ve KISALTMALAR.....	129
EK 1.....	130
TEŞEKKÜR.....	134
ÖZGEÇMİŞ	135

TÜRKÇE ÖZET

Histolojide mikroskopik değerlendirme amacıyla alınan doku örnekleri, parafine veya plastik ortamlara gömülür. Plastik yarı ince kesitler, ışık mikroskobu ile elektron mikroskobu arasında bir köprü görevi görür. Bu kesitler parafinden daha ince, ince kesitlerden daha kalındır. Bu sayede ışık mikroskopide yarı ince kesitler, parafine göre daha ileri detay sağlar. Ancak plastik kesitlerin çoğu hidrofobiktir ve birçok boya ile boyanmazlar. Bu çalışmada; parafin ve epon kesitlerde daha çok doku komponentinin ayırımına imkan verecek boyama metotlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada; çeşitli doku örnekleri ikili fiksasyon sonrası Epon ile bloklandı. Aynı dokuların diğer grubu, rutin takip sonrası parafin ile bloklandı. Toluidine blue, hematoksilin, eozin, asit fuksin, metil green ve nötral red boyaları hem tekli, hem ikili kombinasyonlar şeklinde her iki kesit grubunda denendi. Ayrıca elastik, retiküler ve kollajen lifler ile mitokondri boyamaları da çalışıldı. Epon kesitlere boyaların penetrasyonunu kolaylaştırmak amacıyla, üç ayrı etching ajanı (sodyum hidroksit, periyodik asit ve aseton) uygulandı. Sonuçlar ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Eponun uzaklaştırılmasında aseton en başarılı bulundu. Epon kesitlerde tekli boyamalarda en iyi sonuçlar toluidine blue ile sağlandı. Ayrıca asit fuksin ve metil green de olumlu bulundu. Tekli boyamalar parafin kesitlerde başarılı bulunmadı. Epon kesitlerde ikili boyamalarda; toluidine blue-eozin, toluidine blue-asit fuksin, toluidine blue-metil green ve asit fuksin-toluidine blue kombinasyonlarında başarılı sonuçlar elde edildi. Parafin kesitlerde hematoksilin-eozin ile en iyi sonuçlar alındı. Ayrıca; toluidine blue-eozin ve asit fuksin-metil green kombinasyonlarından da yararlanılabileceği düşünüldü. Parafin ve epon kesitlerde dört özel boyama ile elastik, retiküler ve kollajen lifler ile mitokondri demonstrasyonunda da başarılı sonuçlar elde edildi. Olumlu bulunan boyamaların rutinde kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: yarı ince epon kesit, etching, boyama, ışık mikroskopi

İNGİLİZCE ÖZET

Light Microscopic Comparison of the Different Staining Methods on the Staining of Paraffin or Semithin Epon Sections of Various Animal Tissues

Tissue samples received for microscopic evaluation in histology are embedded in paraffin or plastic media. Plastic semithin sections serve as a connection between light and electron microscopies. These sections are thinner than paraffin sections, and thicker than thin sections. This helps semi-thin sections in light microscopy provide more advanced details than paraffin sections do. Most plastic sections are hydrophobic, however, and cannot be stained with many stains. In this study, the aim is to develop staining methods that allow more tissue components to be differentiated in paraffin and epon sections.

Various tissue samples were subjected to double fixation and epon blocking in the study. Another group of the same tissues was subjected to routine tissue processing and paraffin blocking. Toluidine blue, hematoxylin, eosin, acid fuchsin, methyl green, and neutral red stains were tested in both section groups as single stains or dual combinations. Elastic, reticular, and collagen fiber stains and mitochondrial stains were tested additionally. Three different etching agents (sodium hydroxide, periodic acid, and acetone) were applied to facilitate the penetration of stains into the epon sections. The results were evaluated under a light microscope.

Acetone was found to be the most successful in removing epon. The best results in epon sections with single stains were attained with toluidine blue. Acid fuchsin and methyl green were also found satisfactory. Single stains were not successful in paraffin sections. Among the dual stainings in epon sections, toluidine blue-eosin, toluidine blue-acid fuchsin, toluidine blue-methyl green, and acid fuchsin-toluidine blue combinations yielded successful results. The best results in paraffin sections were obtained with hematoxylin-eosin. Toluidine blue-eosin and acid fuchsin-methyl green combinations were also considered useful. Four special stainings yielded good results in demonstration of elastic, reticular, and collagen fibers and mitochondria in paraffin and epon sections. It was concluded that the stainings that are found successful can be used routinely.

Key Words: Semithin epon section, etching, staining, light microscopy

1. GİRİŞ

Histolojide alınan doku örnekleri uygun fiksasyon ve takip işlemlerinin ardından parafine veya plastik gömme ortamlarına gömülerek blok haline getirilir. Parafin bloklardan alınan kesitler (3-5 µm) ışık mikroskobu ile incelenirken, elektron mikroskopik ön incelemede kullanılan plastik yarı ince kesitler (0,2-2 µm) ışık mikroskobu ile, ince kesitler (80 nm) ise transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile incelenir. Işık mikroskopik düzeyde kesit inceliği sayesinde yarı ince kesitler, parafin kesitlere göre daha ileri identifikasyona imkan verir.

TEM çalışmalarında; 1) epoksi reçineler (rezin), 2) polyester reçineler ve 3) akrilik reçineler olmak üzere başlıca üç grup gömme materyali kullanılmaktadır. Rutin elektron mikroskopide sahip oldukları avantajlar nedeniyle en yaygın olarak epoksi reçineler tercih edilmektedir. Araldit ve epon, en çok kullanılan epoksi reçinelerdir (Hayat, 2000; Robinson, & Gray, 1996). Rezin kesitler, plastik yapıda ve hidrofobik oldukları için histolojide birçok metotta kullanılan boyalara karşı affinite göstermezler ve bu boyalar ile boyanmazlar. Bu karakterde olan epon da, ışık mikroskopik değerlendirme amaçlı boya ajanlarının dokulara geçişini sınırlandırmaktadır. Bu sınırlamayı azaltmak veya yok etmek amacıyla boyama öncesinde kesitlerden eponun uzaklaştırılmasına (etching) yönelik asit ve alkali uygulamaları gibi teknikler kullanılabilir (Hayat, 2000; Horobin, 1983; Robinson et al., 1996). Değişik epon solventleri kullanılarak etching sonrası yapılan birçok boyama çalışması bulunmaktadır (Cai, Manavis, Cash, Thompson, & Blumbergs, 2005; Erenpreisa, & Enkuzens, 1980; Grimley, 1964; Haraguchi, & Yokota, 2002; Krueger, Phillips, Frederick, & Johnson, 1999; Roberts, & Hutcheson, 1975; Tzitsikas, Rdzok, & Vatter, 1962; Zhai, Kristoffersen, & Christensen, 2007).

Işık mikroskopide histopatoloji laboratuvarlarında Hematoksilen-Eozin (H&E) metodu, parafin kesitlerde uygulanan, toluidine blue metodu ise yarı ince kesitlerde uygulanan rutin iki temel boyama protokolüdür. Bu bağlamda; genel doku morfolojisinin ayırımına imkan veren H&E ve toluidine blue boyamaları, histolog ve patologlar için altın standart metotlardır. Asit karakterdeki boyalar, plastik kesitlerde

sonuç vermemektedir. Amfoterik karakterde olan hematoksilen de epon kesit boyamalarında istenen düzeyde başarı sağlamamıştır. Bu nedenle bazik karakterdeki toluidine blue, metilen blue, bazik fuksin ve azur B, hidrofobik plastik kesitlerin boyanmasında etching uygulanmadan kullanılan ve boyanma sağlayabilen en yaygın boyalardır (Hayat, 2000; Horobin, 1983; Robinson et al., 1996).

Önerilen bazik boyaların tek olarak daha pratik kullanılabilmelerine yönelik çalışmalar mevcuttur (Calkins, Pocius, Marracci, & Chaudhary, 2020; Feirabend, Choufoer, & Ploeger, 1998; Gevondian, & Avtandilov, 1982; Loginov, Sokolova, & Gromow, 1987; Lynn, 1965). Ayrıca, literatürde yarı ince kesit boyanmasına yönelik farklı boya ve/veya boya kombinasyonlarının kullanıldığı tekli ve çoklu boyama metotlarının denendiği birçok araştırmaya da rastlanmıştır (Aoki, & Gutierrez, 1967; Aparicio, & Marsden, 1969; D'Amico, 2005; Grill et al., 1995; Huber, Parker, & Odland, 1968; Humphrey, & Pittman, 1974; Iwadare, & Arai, 1995; Krueger et al., 1999; Manokhina, & Bakhtydaev, 1978; Manskikh, & Sheval, 2020; Oldmixon, 1988; Öztürk, 2003; Sato, & Shamoto, 1973; Schroeder, Rossinsky, & Müller, 1980; Smith, 1981; Tolivia, Navarro, & Tolivia, 1994; Van Reempts, & Borgers, 1975).

Çalışmaların bazılarında yarı ince plastik kesitler, parafin yerine daha fazla detay eldesi ve stereolojik değerlendirmeler gibi amaçlarla elektron mikroskopik seviyeye ilerletilmez. Bu durumda genellikle boyanma üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle osmiyum tetroksit postfiksasyonunun uygulanmadığı görülmektedir (Armas-Portela, Gutierrez-Gonzalvez, & Stockert, 1984; Cannon, McGuinn, & Stuth, 1992; Cerri, & Sasso- Cerri, 2003; Crivellato, Zweywr, Basa, & Mallardi, 1990; Morikawa, Sato, & Ezaki, 2018; Scala et al., 1993; Tato, Planes, Ramos, Stockert, & Ferrer, 1991). Bu çalışmaların dezavantajı; dokulardaki lipidlerin korunamaması, araştırmalardaki sonuçların ışık mikroskopi düzeyinde kalması, ince yapıya taşınamamasıdır.

Bu çalışmada; (a) epon kesitler için önerilen, (b) parafin kesitler için önerilen hem konvansiyonel asit/bazik/amfoterik karakterdeki boyalar ve kombinasyonlarının, hem de bazı özel boyamaların her iki tip kesit grubuna uygulanması planlanmıştır. Rutin TEM takibi ile elde edilecek epon kesitlerde boyama metotlarının etching yapılmadan uygulanmasının yanı sıra, farklı etching işlemleri sonrası da denenerek histolojik detayların artırılabilceği düşünülmüştür. Tüm bunların çıktısı olarak;

ayrımı sağlanan hücre ve doku bileşenlerinin lokalizasyon ve kuantifikasyonunun ışık mikroskobik düzeyde kolaylıkla yapılabilmesi, gerektiğinde ultrastrüktürel korelasyon için çalışmanın elektron mikroskobik düzeye de ilerletilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Histolojik Yöntemler ve Boyamalar Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1. Işık Mikroskopik Yöntemlerde Boyalar, Boyanmalar ve Mekanizmalar

Işık mikroskopik boyanmamış preparatlarda doku elemanlarının kırma indisleri birbirine yakın olduğundan ayrıntılar izlenemez. Farklı boyalar kullanarak dokular ve hücre bileşenleri birbirinden ayrılabilir. Doku bileşenlerinin ayırt edilmesi için kullanılan histolojik tekniklerde; ya doku kontrastında değişiklik ya da renkte değişiklik yapılır. Doku kontrastında değişiklikler; faz-kontrast ve polarizasyon mikroskobu ile veya, metal çöktürme yöntemleri ile gerçekleştirilir. Histolojik boyama yöntemlerinde; genellikle renkli bir boya ile boyanarak renk oluşturulur. Böylelikle boyanmış dokunun içinden geçen ışığın dalga boyu değiştirilir.

2.1.2. Asidik (Anyonik), Bazik (Katyonik), Nötr ve Amfoterik Boyalar

Bir boya renkli bileşikler oluşturmak üzere hazırlanan sulu çözeltilerde iyonize olarak anyon ve katyonlarına ayrılır. Boyaların renk verme özellikleri anyon ve katyonlardaki boya taşıyan organik gruplara bağlıdır. Asidik boya negatif (-) yüklüdür (anyonik), bazik bir boya pozitif (+) yüklüdür (katyonik). Asidik bir boya, renkli bölümü üzerinde net olarak negatif yük taşır ve $[Na^+ \text{ boya-}]$ genel formülü ile tanımlanır. Bazik bir boya ise, renkli bölümü üzerinde net olarak pozitif yük taşır ve $[\text{boya}^+ Cl^-]$ genel formülü ile tanımlanır. Nötr bir boya; bir asidik ve bir bazik boyanın belli oranlarda karıştırılması ile elde edilir, hem katyon hem de anyon grupları içerir. Boya molekülünün her iki kısmında renkli bir boya vardır. Büyük moleküller içerdiğinden çözeltileri sıklıkla kolloidaldir. Nötr boyalar alkolde kolayca çözünürken, suda nadiren çözünürler. Asidik ve bazik boyalar ise her ikisinde de çözünür. Nötr boyalar hücrelerdeki hem asidik hem de bazik yapılara ilgi duyarlar. Amfoterik boya; Ph değişikliğine göre asidik veya bazik davranabilme özelliğine sahiptir. .Hematein ve karminik asit, amfoterik boyalardır.

pH	3	4	5	6	7	8	9	10	
Kristal Viyole	+	+	+	+	+	+	+	+	Bazik boya (katyonik)
Orange G	-	-	-	-	-	-	-	-	Asidik boya (anyonik)
Hematein	+	+	+	+	-	-	-	-	Amfoterik boya

Bazik (Katyonik) boyalar Renk

Metil green	Yeşil
Metilen blue	Mavi
Pironin G	Kırmızı
Toluidine blue	Mavi
Alcian blue	Mavi

Asidik (Anyonik) boyalar Renk

Asit fuksin	Kırmızı
Anilin blue	Mavi
Eozin	Kırmızı
Orange G	Turuncu
Light green	Yeşil

2.1.3. Bazofilik ve Asidofilik Boyanma

Boyaların çoğu asidik veya bazik bileşiklerdir ve dokuların iyonize olabilen radikalleri ile elektrostatik bağlar oluştururlar. İyonize olan ve kompozisyonlarında asit karakterde yapılara sahip olan temel doku komponentleri, bazik boyalar ile reaksiyona girer. Dokulardaki bazik komponentler ise, asit boyalar ile boyanır. Anyonik doku gruplarının bazik bir boya ile reaksiyona girme özelliği “bazofili” (Gr., baz-seven), katyonik doku gruplarının asit bir boya ile reaksiyonu ise “asidofili” (Gr., asit-seven) olarak tanımlanır.

2.1.3.1. Bazik (Katyonik) Doku Komponentleri

Hücre içindeki ve ekstrasellüler matriksteki komponentlerin çoğu baziktir. Özellikle kas hücrelerindeki olmak üzere sitoplazmik filamentlerin çoğu, intrasellüler membranöz komponentlerin çoğu, sitoplazmanın özelleşmemiş geri kalan bölümleri ve ekstrasellüler liflerin çoğu bazik karakterdedir ve asidofilik boyanma eğilimindedirler.

2.1.3.2. Asidik (Anyonik) Doku Komponentleri

Hücrelerin içindeki komponentlerin sınırlı bir bölümü ve ekstrasellüler matriks bu özelliktedir. Nukleusların heterokromatini ve nukleolusları (her ikisinde de başlıca nükleik asitlerin iyonize fosfat grupları bulunması nedeniyle), ribozomlar ve granüler endoplazmik retikulum (GER) gibi sitoplazmik komponentler (ribozomal RNA’da da iyonize fosfat grupları vardır), kıkırdak matriksindeki kompleks karbonhidratlar gibi ekstrasellüler materyaller (iyonize sülfat gruplarına sahiptirler)

ve proteinlerin karboksil grupları, asidik karakterdeki doku komponentleridir ve bazofilik boyanma eğilimi gösterirler.

2.1.3.3. Bazik-Asidik-Amfoterik Doku Bileşenleri

BAZİK/KATYONİK (+)	ASİDİK/ANYONİK (-)	AMFOTERİK
Kollajen	DNA, RNA, kromatin	Sitoplazma
Eritrositler	Glikozaminoglikanlar (GAG)	Kas
Salgı granülleri	Kıkırdak matriksi	
Eozinofillerin granülleri	Asit glikoproteinler	
Mitokondri	Mast hücre granülleri	
Kontraktıl filamentler	Ribozom, GER	

Değişik boyama prosedürlerinin kimyasal temeli, bazofili ve asidofili mekanizmalarındaki elektrostatik etkileşimlerden daha komplike ve farklı olabilir. Doku komponentlerinin boyalar tarafından selektif boyanmasında; boya moleküllerinin boyutu ve agregasyon derecesi ile dokunun permeabilitesi ve kompaktlığı gibi faktörler etkilidir.

Çoğu boyama prosedüründe ilk olarak gösterilmesi istenen belli özel yapılar (örneğin; nukleuslar) işaretlenir, hücrenin diğer bölümleri genellikle görünmez. Bu durumda görünmeyen bölümlerle ilgili ilave bilgi elde etmek için “counterstain” olarak tanımlanan ilave boyama uygulanır. Counterstain; nukleusların veya hücredeki diğer yapıların daha iyi belirlenmesine imkan veren özel bir boyama metoduna ilave olarak, esas amacın dışında kalan diğer yapıların da boyanmasını sağlayacak bir başka boyanın kesitlere uygulanmasıdır. Böylece esas görülmesi hedeflenen yapı ile kontrast oluşturacak ikinci bir boya ile diğer yapıların boyanması anlamına gelen “kontur boyama (zıt boyama)” sağlanır.

Birçok asidik boyama tekniklerinde önce nukleusları boyamak için hematoksilen kullanılır, sonra sitoplazma ve ekstrasellüler lifleri selektif olarak boyamak için asit boyalar uygulanır. Hematoksilenden farklı olarak, gerçek bazik boyalarla, genellikle bazik boyadan sonra asit bir boya ile boyamaya devam edilmez. Çünkü çoğunlukla bazik boya, yıkama sırasında dokudan ayrılma/çıkma eğilimi gösterir.

SİTOPLAZMİK BOYALAR		
Kırmızı	Sarı	Yeşil
Eozin Y Eozin B Erythrosin B Phloxine B Biebrich scarlet Rose bengal	Pikrik asit Tartrazine Metanil yellow Aurantia Orange G	Light green SF Fast green FCF Lissamine green

NUKLEAR BOYALAR	
Kırmızı	Mavi
Nötral red Safranin O Karmin	Metilen blue Toluidine blue Celestine blue Hematoksilen

Fikse dokunun permeabilitesi ve por büyüklüğü, boyaların dokuya penetrasyonunda ve yerleşerek boyanma sağlamasında önemlidir. Bu konuda farklı molekül büyüklüğünde olan anyonik boyaların boyama reaksiyonundan yola çıkılarak bazı sonuçlara varılabilir. Fikse bir kesit, tek tek sulu olarak hazırlanmış anyonik boya solüsyonlarına ya da bu solüsyonların kombinasyonuna batırılırsa; eritrositlerin küçük moleküllü ve kollajenin yalnızca büyük moleküllü boylarla boyandığı görülür. Bu da, eritrositlerin boyalara karşı daha impermeabl (daha küçük porlu), kollajenin ise daha permeabl (daha büyük porlu) olduğunu gösterir.

Boyanın nisbi moleküler büyüklüğü de önemlidir. Örneğin; asit fuksin boyası ile pikrik asit (asit fuksine göre küçük moleküllü bir boya) kullanılırsa kollajen asit fuksin ile kırmızı boyanır. Asit fuksin, metil blue (asit fuksine göre büyük moleküllü bir boya) ile kombine edilirse, diğer dokular asit fuksin ile kırmızı boyanırken, kollajen metil blue ile mavi boyanır. Diğer deyişle; ilk olarak dokuya küçük moleküllü boya penetre olur ve boyanma oluşturur. Daha büyük moleküllü boya aynı dokuya penetre olunca, ilk boyanın yerini alır. Boyaların molekül büyüklüğü genellikle bilinemeyebilir, ancak boyanın molekül ağırlığı, molekül büyüklüğüne ilişkin bir fikir verebilir. Çoklu boyamalarda ayrıca daha az gözenekli olan dokuların, daha küçük moleküllü boyalar tarafından boyandığı da bilinmektedir.

2.1.4. Metakromazi ve Metakromatik Boyanma

Doku komponentleri ile reaksiyona giren bazı bazik boyaların beklenen mavi boyama rengine ek olarak, bazı komponentlerde kırmızı ya da morumsu renkte boyanma da ortaya çıkar. Bu absorbans değişikliği “metakromazi” olarak tanımlanır. Metakromatik boyanmada dokudaki polianyonlar rol oynar. Bu tip dokular konsantre bir bazik boya solüsyonu ile (örneğin; toluidine blue) ile boyandığında, boya molekülleri dimerik ve polimerik agregatlar oluşturmak üzere birbirine yaklaşır. Bu agregatların absorpsiyon özellikleri, agregat olmayan boya moleküllerinin absorpsiyon özelliklerinden farklıdır. Yüksek konsantrasyonlarda iyonize sülfat ve fosfat gruplarına sahip olan hücre ve doku yapıları (örneğin; kıkırdak ara maddesi, mast hücrelerinin heparin-içeren granülleri) metakromazi gösterir. Bu yüzden toluidine blue boyamasından sonra bu komponentler mor-kırmızı renkte boyanırken, diğer komponentler mavi renkte boyanır. Toluidine blue, thionin ve metil viyole metakromatik boyalar olarak kullanılmaktadır (Clark, Dougherty, & Kasten, 1981; Drury, & Wallington, 1967; Green, 1991; Ross, & Pawlina, 2011).

2.2. Işık ve Elektron Mikroskopisinde Kullanılan Boyalar Hakkında Genel Bilgi

2.2.1. Hematoksilen

Hematoksilen, doğal bir löko bileşimidir (MW: 302,29). Boyar özelliğini ancak oksidasyonu sonrası hematein'e dönüşmesi ile kazanır. Hematoksilen tam bazik bir boya tanımını karşılamaz, amfoterik karakterdedir. Ancak sahip olduğu özellikler bazik bir boyaya benzerlik gösterir ve asidofilik doku komponentlerini boyar. Bir mordant ile kullanılır ve bu amaçla genellikle demir tuzları tercih edilir. Mordant, doku komponentleri ile boya arasındaki bağlanmanın kalıcı olmasını sağlar. Bazik bir boyaya benzer boyanmayı, mordant sağlar. Değişik amaçlar ile kullanılan çeşitli hematoksilen tipleri ve boyama metotları bulunmaktadır. En yaygın kullanım amacı, nuklear boyamadır. Bu amaçla kullanıldığında hematoksilenden sonra genellikle asit boyaların sulu solüsyonları ile boyamaya devam edilir. Harris hematoksileni (Harris, 1900); civa oksit ile kimyasal olarak olgunlaştırılmış şaplı bir hematoksilendir. Genel amaçlar için yaygın olarak kullanılır ve özellikle iyi bir nuklear boyanma sağladığı için, histolojide en yaygın kullanılan hematoksilendir.

2.2.2. Eozin

Floresan özelliği de gösteren anyonik (asit) bir boyadır (MW: 691,88). Eozin, dokunun genel histolojik yapısını göstermek için bir şaplı hematoksilen ile kombine edilebilen en uygun sitoplazmik boyadır. Değişik tipleri arasında Eozin Y, en yaygın kullanılanıdır ve alkolde de eriyebilir. Sitoplazmik bir boya olarak genellikle su ile hazırlanmış %1'lik solüsyonları kullanılır. Farklı amaçlar için azur II ve metil blue gibi boyalar ile kombine edilerek kullanımı da söz konusudur.

Hematoksilen ve eozin (H&E), en yaygın kullanılan genel amaçlı ikili boyama yöntemidir. Çok yaygın kullanılmasının nedeni, çok sayıda farklı doku yapılarını belirgin olarak gösterebilmesi, farklı şekilde hazırlanmış ve farklı yerlerden alınmış dokulara uygulanabilmesidir. Hematoksilen hücre nükleusunun DNA'sını ve diğer asidik yapıları (sitoplazmanın RNA'dan zengin bölümleri ve kıkırdak matriksi gibi) mavi-lacivert boyar. Özellikle iyi nuklear detay sağlar. Kontrast oluşturacak şekilde eozin ise, hücre sitoplazmasını ve bağ dokusu liflerini, pembeden oranj/kırmızıya değişen tonlarda boyar. Bununla beraber hematoksilen, eozin ile kombine kullanılmasının dışında farklı amaçlar için tek olarak veya başka boyalarla kombine edilerek de kullanılır.

2.2.3. Asit fuksin

Asit fuksin, bazik fuksin (pararosanilin)'in kontrollü sulfonasyonu ile elde edilen anyonik (asit) bir boyadır (MW: 579,65). Biyolojik uygulamalarda yaygın olarak sitoplazma, doku ve kollajen boyamaları amacıyla tercih edilir. Bağ doku protokolleri olan Van Gieson, Mallory ve modifikasyonu olan Masson trikrom boyamalarında kullanılır.

2.2.4. Light green

Light green, anyonik (asit) bir boyadır (MW: 792,86). Twort, Twort boyası olarak bilinen nötral boyayı oluşturmak için light green ile nötral red'i kombine etmiştir. Bu boya ilk olarak hayvan parazitlerini, mikroorganizmaları ve dokuları boyamak için kullanılmıştır. Sonraları çeşitli yöntemlerle bakteri, yosun ve mayaları boyamak için de kullanılmaya başlanmıştır. Light green, hematoksilen veya safranin gibi zıt bir nuklear boya ile sitoplazmik boyama için önemli bir kontrast boyadır. Lillie, light green'in, Mallory yönteminin modifikasyonu olan Masson trikrom metodunda anilin blue yerine kullanıldığında, kollajen lifleri çok tatmin edici şekilde

boyadığını bildirmiştir. Papanicolau boyamasında Bismarck brown, eozin ve fosfotungstik asit ile birlikte kullanılır. Light Green, bazı protokollerde fast green yerine de kullanılmaktadır.

2.2.5. Metil green

Dikasyonik (bazik) karakterde nuklear bir boyadır, ancak nukleolusları boyamaz (MW: 472,51). Benzer karakterdeki Bismarck brown ile kombine edilerek embriyonik dokular, trake ve bağırsaklardaki musinin boyanmasında yararlanılmıştır. Pironin Y ile mükemmel sinerji sağlar. Metil green ile boyanmayan nukleoluslar ve birçok doku komponenti, pironin Y ile boyanarak kontrast sağlar.

2.2.6. Nötral red

Su ve etanol içinde az çözünür olan bu katyonik azin boya, vital boyamalar da dahil biyolojik boyama uygulamalarında yaygın olarak kullanılan zayıf nuklear bir boyadır (MW: 288,78). Nötral red taze kan yaymalarının supravital boyamasında, "olgunlaştırılmış" solüsyonları ise Nissl boyası olarak kullanılmıştır, ancak krezil viyole kadar kalıcı olmamıştır. Twort ise light green ile birleştirilerek nötr bir boya kompleksi olan, Twort boyasını geliştirmiştir.

2.2.7. Toluidine blue

Toluidine blue ilk olarak 1856'da William Henry Perkin adlı İngiliz bir kimyager tarafından bulunmuştur (Vidal, & Mello, 2019). Biyolojik boyama uygulamalarında sıklıkla thionin ve metilen blue yerine kullanılan metakromatik, katyonik bir tiazin boyadır (MW: 305,83). Azur B'ye benzer bir nuklear boyadır. Toluidine blue, in vitro biyolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kromatin DNA-protein komplekslerinin, nukleolus lokalizasyonunun ve ekstrasellüler matriks proteoglikan komplekslerinin identifikasyonu amacıyla en yaygın kullanılan boyadır. Nissl granüllerinin boyanmasında, memeli iç organlarındaki ganglion hücrelerini ortokromatik çevre dokunun metakromatik olarak boyanmasında kullanılmıştır. Toluidine blue, malahit yeşili ve bazik fuksin'den oluşan tribazik boya karışımının; elektron mikroskopi için osmiyum tetroksit ile fikse edilen ve plastiğe gömülü doku kesitlerinde, ışık mikroskobu ile mükemmel detaylar sağladığı bildirilmiştir. Metakromazisi değişkendir. Boyanma sonucunda metakromatik maddeler kırmızı-pembe veya mor, çekirdek ve diğer bileşenler mavi renkte görünür. Sitoplazmik granüllerdeki heparin sayesinde mast

hücrelerini tanımlamak için, kıkırdak gibi dokularda proteoglikanları boyamak için kullanılır (Clark et al., 1981; Drury et al., 1967; Green, 1991).

2.2.8. Bazı Özel Doku Komponentleri İçin Histokimyasal Boyamalar

2.2.8.1. Kollajen Lifler (Tip I Kollajen)

“Trikrom boyamaları”; üç boyanın kullanıldığı, kas ile kollajen lifleri birbirinden ayırt etmek için geliştirilmiş tekniklerdir. Üç boyadan birisi nuklear boyadır, ikincisi sitoplazmik boyadır ve üçüncüsü de kollajen lif boyasıdır. Van Gieson ve Masson trikrom metotları, günümüzde de yararlanılan kollajen boyamalarıdır. Kollajen lifler van Gieson metodunda asit fuksin tarafından kırmızı renkte, Masson metodunda ise kullanılan boyaya göre yeşil/mavi renkte boyanarak diğer komponentlerden ayırt edilir.

2.2.8.2. Elastik Lifler

Elastik liflerin boyanmasında kullanılan çok sayıda teknik vardır, fakat en çok kullanılanları; Verhoeff, orcein, Weigert'in rezorsin fuksin'i ve aldehit fuksin'dir. Verhoeff'in hematoksileni (1908); demirli bir hematoksilendir. Elastik lifleri siyaha boyar.

2.2.8.3. Retiküler Lifler (Tip III Kollajen)

Retiküler liflerin gösterilmesi teknikleri; renklendirme için kullanılan boyamalar ve metal impregnasyon metotları olarak gruplandırılabilir. Boyama teknikleri, retiküler lifleri göstermek için tam olarak güvenilir değildir. Boyanmanın yoğunluğu ince lifleri göstermek için yeterli olmaz, bu nedenle kollajen ve retiküler liflerin ayrımını iyi bir şekilde sağlamaz. Metal impregnasyon teknikleri kaprisli ise de, kontrast sağlayarak en ince liflerin bile görülmesini mümkün kılar. Gordon&Sweet ile Gomori'nin retiküler lif metotları, bu amaçla en yaygın kullanılan metotlardır. Retiküler lifler siyah renkte boyanır.

2.2.8.4. Mitokondri

Mitokondrionlar ışık mikroskopunda parafin kesitlerde ancak özel teknikler uygulandığında identifiye edilebilir. Champy-Kull metodu iyi sonuçlar vermekle birlikte teknik olarak zordur. Altmann tekniği bu alanda iyi sonuç veren daha kolay bir tekniktir. Mitokondrionlar ve nukleuslar, sarı zemin dokusunda kırmızı renkte boyanarak kolaylıkla ayırt edilir (Clark et al., 1981; Drury et al., 1967).

2.3. Transmisyon Elektron Mikroskopide Fiksatifler ve Gömme Ortamları

2.3.1. Fiksatifler

Elektron mikroskopik çalışmalarda gluteraldehit fiksasyonundan sonra genellikle osmiyum tetroksit ile postfiksasyon yapılarak ikili fiksasyon uygulanır.

2.3.1.1. Gluteraldehit

Düşük viskozite ile karakterize gluteraldehit, suda ve/veya organik çözücülerde kolaylıkla çözünür. Doku örnekleri bu fiksatif içinde belirgin bir bozunmaya uğramadan uzun süre bırakılabilir. Ön işlemin bu esnekliği gluteraldehitin sağladığı en önemli avantajlardan biridir. İnce yapının korunmasında bilinen tüm fiksatiflerden üstün olan gluteraldehit; proteinleri, karbonhidratları özellikle glikojeni çapraz bağlar oluşturarak korur. Buna karşılık fosfolipidler dışında lipidleri koruyamaz. Gluteraldehit ve osmiyum tetroksit ikili fiksasyonu; aldehit fiksasyonundan sonra önemli ölçüde hareket edebilen membran lipidlerinin, özellikle negatif yüklü sıvı lipidlerin hareketini önleyerek lipidlerin korunmasını ve boyanmasını sağlar.

2.3.1.2. Osmiyum tetroksit

Osmiyum tetroksit ışık mikroskopide doymamış lipidlerin ve dejenere myelinin gösterilmesi gibi özel amaçlar dışında, elektron mikroskopiye nazaran daha az kullanılır. Bunun sebebi, fikse ettiği dokuyu siyahlaştırma etkisidir. Ayrıca ışık mikroskopide kullanımı ekonomik değildir.

Osmiyum tetroksit elektron mikroskopisinde sadece fiksatif olarak değil, aynı zamanda bir elektron boyası olarak da hareket eder ve bu, bilinen diğer fiksatiflerin çoğuna göre en büyük avantajdır. Düşük konsantrasyonlardaki osmiyum, numunedeki osmiyofilik yapılarda yüksek kontrast sağlar. Aynı zamanda bir mordant görevi görür. Genellikle su veya tampon içinde %1-%2 konsantrasyonlarda kullanılır. Osmiyum tetroksit proteinlerin yapısal özelliklerinin çoğunu bozmadan stabilize eden bir fiksatifdir. Bu reaktifle stabilize edilen doku proteinleri dehidrasyon sırasında alkoller tarafından çöktürülmez. Osmiyum tetroksit, lipidlerin çoğunu muhafaza ettiği ve hücre bileşenlerine elektron yoğunluğu kazandırdığı için elektron mikroskopide postfiksatif olarak tercih edilir.

Osmiyum tetroksit'in elektron mikroskopi alanındaki birincil rolü, güvenilir bir fiksatif olmasıdır. Lipidlere ek olarak membranlı yapıları, ribozomları, Golgi

kompleksini de boyama özelliğine sahiptir. Boyanma, osmiyumun dokuda birikmesinden kaynaklanmaktadır. Fakat bu işlem aynı zamanda dokularda siyah pigment çökeltisi de oluşturur. Bu dezavantajdan dokuları korumak maksadıyla bazı çalışmalarda osmikasyon aşaması atlanmaktadır. Osmiyum tetroksitin diğer dezavantajı, çoğu dokuya yavaş penetre olması, çoğu proteini çapraz bağlayamaması ve karbonhidratları koruyamamasıdır. Doku bloklarının boyutu 0,5 ile 1 mm arasında değişse bile nukleuslar tam olarak fikse olmayabilir. Sonuç olarak osmiyum tetroksit elektron mikroskopide birincil fiksatif olarak kullanılmaz. Diğer taraftan hücre yapısı zaten glutaraldehit ile kısmen stabilize edildiği için postfiksasyon sırasında osmiyum tetroksitin yavaş penetrasyon hızı zararlı değildir. Gluteraldehit ile fiksasyon ve ardından osmiyum tetroksit ile elde edilen doku koruma kalitesi, günümüzde halen başka bir fiksasyon kombinasyonu ile aşılamamıştır.

2.5. Reçine ile İnfiltrasyon

Fiksasyonu izleyen ideal bir dehidrasyondan sonra dokular infiltrasyona tabi tutulur. Uygun bir gömme ortamına doku örneklerinin tam ve homojen bir şekilde nüfuz etmesi, başarılı bir kesit için ön koşuldur. İnfiltrasyon esas olarak, dehidrasyon ajanının bir gömme ortamı ile kademeli ve sürekli olarak değiştirilmesini içerir ve dokunun saf gömme ortamına gömülmesiyle son bulur. İnfiltrasyonun süresi kullanılan doku ve gömme ortamının özelliklerine bağlıdır.

2.6. Polimerizasyon

Reçineler ısıyla ve bazen de ultraviyole (UV) ışınımı ile polimerize edilir. En yaygın olarak kullanılan gömme ortamı olan epon ve türevleri, ısı ile polimerize olurlar. Isı ile polimerizasyon yüksek sıcaklıklarda, çoğunlukla da 35-60°C'de gerçekleşir. Çoğu epoksi reçinesi ise, önce 45°C'de 18-24 saat ve daha sonra 60°C'de 24 saat etüvde bekletmek suretiyle polimerize edilir (Hayat, 2000).

2.7. Gömme Ortamları

Rutin ışık mikroskopik histopatolojide parafin, dokuların çoğu için hala en uygun gömme ortamıdır. Doku ve gömme ortamı sertlik açısından önemli ölçüde farklılık gösterdiğinden bazı durumlarda parafin yeterli desteği veremeyebilir (Örneğin; dekalsifiye edilmemiş kemik dokusunda olduğu gibi). Bu gibi durumlarda numuneye daha güçlü bir şekilde yapışan, daha sert ve daha destekleyici bir gömme

ortamı gereklidir. Reçine gömme ortamları ışık mikroskopide kullanılmakla birlikte, daha çok elektron mikroskopisinde kullanılan gömme ortamlarıdır.

TEM'nun çalışma prensibi, elektronların kesitten geçirilerek numune görüntüsünün elde edilmesine dayanır. Elektron ışını maksimum 100 nm inceliğe nüfuz edebildiğinden dolayı, yüksek kaliteli bir görüntü elde edebilmek için dokuların 60-80 nm inceliğinde kesilmesi gerekir. Bu incelikte kesit alınabilmesi için de dokuların son derece sert bir gömme ortamına gömülmesi gerekir. Parafin, elektron bombardımanına karşı dayanıklı olmadığı için kullanımı uygun değildir. Parafinin aksine birçok reçine gömme ortamı, özellikle epoksi reçineler elektron ışınımı karşısında son derece kararlı bir yapı sergilerler. Bu özellik, hacim kaybı ve boyut değişikliklerini en aza indirir. Bu durum elektron mikroskopisi için oldukça önemlidir çünkü bu şekilde hücrenin üç boyutlu yapısı ve moleküler bileşenlerinin bütünlüğü korunmuş olur. Dolayısıyla kesit hasarı en aza indirgenerek, yüksek verimli sonuç eldesi sağlanır. Rutin TEM preparasyonunda TEM'daki vakum ve elektronların yaydığı ısıya dayanabilen hidrofobik plastik reçineler (rezin) tercih edilmektedir. Gömme ortamı olarak kullanılacak reçineler, çalışmanın amacına uygun olarak seçilmelidir. Elektron mikroskopisi için kullanılan gömme ortamları kimyasal bileşimlerine göre epoksi, polyester ve akrilik olarak sınıflandırılır.

2.7.1. Epoksi Reçineler

Epoksi reçineler numune ile çapraz bağlantı sağladıkları, mükemmel ultrastrüktürel koruma sağladıkları ve elektron ışınımı karşısında stabil kalabildikleri için rutin elektron mikroskopisinde en çok tercih edilen gömme ortamlarıdır (Woods, & Stirling, 2013). Epoksi reçineler birçok açıdan diğer gömme ortamlarından üstündür. Bu reçineler, molekül ağırlıklarına bağlı olarak viskoz sıvılardan, eriyebilir katılara kadar değişir. En istenmeyen özellikleri arasında ışığa maruz kalındığında bozunma ve nispeten yüksek viskoziteleridir. Epoksi reçineler moleküller arası çapraz bağlar sağlar, böylece bazı proteinler ve nükleik asitler için sabitleyici görevi görürler. Elektron bombardımanı altında epoksi kesitlerinin dikkat çekici stabilitesi, elde edilen görüntünün mükemmel netliğinin temel nedenidir.

2.7.1.1. Epon

Epon 812, ticari olarak en yaygın olarak kullanılan epoksi reçine çeşididir. TEM'deki yoğun ısı ve ışınımına, güçlü vakuma dayanıklıdır. Doku örneklerine

araldit'den daha hızlı nüfuz eder ve araldite göre daha yoğun bir kontrast oluşturur. Çünkü bu ortam fosfolipid kaybına daha az sebep olur.

2.7.1.2. Araldit

Araldit; ilk olarak Glauert (1958) tarafından elektron mikroskopisi için gömme ortamı olarak tanıtılmıştır. Polimerizasyondan sonra çok az büzülme gösteren gliserol bazlı aromatik bir epoksi reçinedir. Çok viskozdur ve oldukça düşük bir yumuşama sıcaklığına sahiptir. Eponla kıyaslandığında daha az kontrast verir.

2.7.1.3. Spurr

Spurr rezin, ilk olarak Spurr (1969) tarafından elektron mikroskopisi için gömme ortamı olarak tanıtılmış epoksi reçinedir. TEM'de kullanılan gömme ortamları içinde en düşük viskoziteye sahiptir. Özellikle sert, odunlaşmış hücre duvarlarına sahip bitki dokularının ve kemik dokularının penetrasyonu için uygundur. Elektron ışınımına karşı çok dirençlidir.

2.7.2. Polyester Reçineler

Polyester reçineler monomer formunda, diğer maddelerle çok çeşitli karışabilirlik sergiler. Epoksi reçinelere benzerler, hidrofobiktirler. Polimerizasyon sırasında büzülmenin çok az olması, kabarcık oluşumunun olmaması numunenin zarar görmesini büyük oranda engeller. Bu reçineler, üç boyutlu çapraz bağlı yapıları nedeniyle elektron bombardımanı altında çok az bozunmaya uğrarlar. Vestopal W ve Rigolac, en yaygın kullanılan iki polyester reçine olmakla birlikte, günümüzde çok tercih edilmemektedirler.

2.7.2.1. Vestopal W

Vestopal W, diğer polyester reçinelerden ve metakrilat reçinelerden daha üstündür. Hızlı penetrasyon ve polimerizasyon ile karakterizedir. Vestopal, metakrilatlardan üç önemli yönden farklıdır: (1) belirgin bir büzülme olmaksızın sertleşir, (2) düzensiz polimerizasyon göstermez ve (3) elektron bombardımanı altında stabildir. Yüksek kontrast sağladığı için, yüksek çözünürlüklü çalışmalar için kullanışlıdır (Hayat, 2000).

2.7.3. Akrilik Reçineler

Akrilik reçineler daha çok ışık mikroskopisinde tercih edilen ancak birçok çeşidi elektron mikroskopisinde de kullanılan gömme ortamlarıdır. Özellikle

sitokimyasal çalışmalarda düşük sıcaklıkta polimerize olabilmelerinden dolayı protein bozunmasını ve hücre sel yapı lara verilen zararı en aza indiren reçinelerdir. Akrilik reçinelerin epoksi reçinelere göre en büyük avantajı, hidrofilik oldukları için kesitlere etching işle mi yapılmasına gerek kalmadan boyanma imkanı sunmalarıdır. Epoksi reçinelerde kullanılan alkali toluidine blue boyaması, bu reçinelere de uygulanabilir. Parafin kesitlere uygulanan yöntemlerde de ğişiklik yapılmadan H&E, PAS, Alcian blue, elastin boyaları da yapılabilir. Akrilik reçineler; metakrilatlar, lowicryl ve LR reçineler olmak üzere 3 gruptur (Hayat, 2000; Woods et al., 2013).

2.7.3.1. Metakrilatlar

Metakrilatlar, çok fazla bü zülme ve gaz kabarcıklarının eşlik etti ği düzensiz polimerizasyon ile karakterizedirler. Ayrıca elektron bombardımanı altında stabiliteden yoksundur. Bazı prosedürler metakrilatlarla gömülü dokudaki hasarı azaltmaya yardımcı olsa da, ince yapının bozulmasını ortadan kaldırmak mümkün de ğildir. Geleneksel gömme işleminde, metakrilatlar tatmin edici sonuçlar vermez ve bu nedenle genellikle epoksi reçineler tercih edilir.

Metil metakrilat, istenen sertlikte blok eldesine imkan verir. Mineralize ve demineralize dokuların ışık mikroskopisinde gömme ortamı olarak yaygın bir şekilde kullanılır.

Glikol metakrilat (GMA), elektron mikroskopi için ve günümüzde ışık mikroskopi için yaygın olarak kullanılmaktadır. 0,5-4 µm aralığında tatmin edici morfolojik ayrıntılar ve tekrarlanabilir kesitler rahatlıkla elde edilebilir. Glikol metakrilatın metil veya butil metakrilat ile kombinasyonu, dekalsifiye kemiğin ışık mikroskopisinde ideal gömme ortamı olarak önerilmektedir. Işık mikroskopide enzimatik aktiviteyi ve kararsız doku antijenlerini lokalize etmek için özellikle yararlıdır. Bu reçine aynı zamanda yumuşak dokularda elektron mikroskobik immüno sitokimya için de gömme ortamı olarak kullanılmaktadır. GMA su iç erdi ğinden suda çözünen boyaların dokuya kolay nüfuz etmesini sağlar.

2.7.3.2. Lowicryller

Lowicryller, akrilat-metakrilat karışımlarıdır. Bu reçineler temel olarak, dokunun moleküler yapısının daha iyi korunması için düşük sıcaklıklarda kullanılabilen, düşük viskoziteli gömme ortamı olarak tercih edilmektedir. İmmüno sitokimya da epoksi reçinelere alternatif tirler. Lowicryl içine gömme

antijenik verimi arttırmaz, immünlökalisierungu güvenilir olarak sağlar. Lowicryller polimerizasyon sırasında numunenin küçülmesi, düzensiz polimerizasyon, blokta kabarcık oluşumu, ısı oluşumu ve tekrarlanamayan sonuçlar gibi bazı dezavantajlara sahiptirler.

2.7.3.3. LR Reçineler

LR Gold, büyük doku örneklerinin immünositokimyasında gömme ortamı olarak kullanılan bir akrilik reçinedir.

LR White, immünositokimya için etching gerektirmemesi avantajına sahiptir. Etching, doku antijenlerini olumsuz etkiler. Sitokimyasal reaktiflerin sulu çözeltileri (örneğin; immüoglobulinler, kolloidal altın ve lektinler) LR White'a kolayca nüfuz eder. Diğer bir avantajı, nonspesifik boyanmanın minimal olmasıdır. LR White, gömme sonrası immünoaltın metotlarda epoksi reçinelerden üstündür. Hem ışık hem elektron mikroskopide sitokimya ve immünositokimyada kullanılabilir.

2.8. Kesit Alma

Yarı ince kesitlerin kullanımı histolojik ve klinik tanı çalışmalarında önemli bir yere sahiptir. Yarı ince kesitler, ışık mikroskopuyla elde edilen görüntülerle elektron mikroskopu ile elde edilen görüntüler arasında bir köprü görevi görür. Yarı ince kesitler (1 µm) parafin kesitlerden (5 µm) daha ince; ince kesitlerden (60-80 nm) ise daha kalındır. Reçineye gömülen dokulardaki hücresel bileşenlerin parafin kesitlere nazaran daha iyi korunması ve dokularda daha az büzülme olması, yarı ince kesitlerin en büyük avantajıdır. Parafin kesitlere kıyasla dezavantajı ise numune boyutunun küçüklüğü ve çalışma zorluğudur. 60 mm'lik parafin kesitler kolaylıkla kesilebilirken bir ultramikrotomda kesilen yarı ince kesitler yaklaşık 1 mm boyutlarındadır ve kesit eldesi oldukça zordur. Yarı ince kesitlerdeki hücresel bileşenler arasındaki uzamsal ilişkiler, oldukça iyi korunur. Yarı ince kesitler boyandıktan sonra standart bir ışık mikroskopu altında incelenir. İnce kesitten önce alınan yarı ince kesitlerle, ilgi alanı kesin olarak belirlenerek çalışmanın doğruluğu artırılır ve zamandan önemli ölçüde tasarruf edilir. Hücresel detaylar yarı ince kesitte açıkça görülebildiğinden, blok tam olarak istenilen alanı görmek amacıyla trimlenerek, elektron mikroskopu ile incelenmek üzere ince kesit düzeyine ilerletilir. Bu iki evreli işlem, korelatif çalışmalara izin vermesi açısından oldukça önemlidir.

Yarı ince kesit kalınlığı, öncelikle uygulanacak boyama da dahil olmak üzere çalışmanın amacına ve gömme ortamının türüne göre belirlenir. Genel olarak 0,2 μm 'den daha ince kesitlerin alınması oldukça zordur. Bu incelikte bir kesitte boya ile reaksiyona girecek kısım da az olduğundan boyanma yeterli olmaz ve zayıf boyanır. 0,5- 2,0 μm 'lik kesit kalınlığı aralığı çoğu amaç için uygundur. Ultramikrotomlar ile ve daha çok elmas bıçak tercih edilmesine rağmen cam bıçaklar kullanılarak da kaliteli kesit eldesi sağlanabilmektedir (Hayat, 2000).

2.9. Etching ve Deosmikasyon

Elektron mikroskopisinde kullanılan gömme ortamlarının en büyük dezavantajı; hidrofobik yapılarından dolayı hidrofilik boyama ajanlarının dokuya penetre olmasını sınırlayarak, boyama kalitesini düşürmeleri ve boyanın dokulara ulaşmasını engellemeleridir. Işık mikroskopide bu sorun yoktur çünkü deparafinizasyon işleminden sonra doku ile boya arasında boyanmayı engelleyecek bir engel kalmaz. Parafin kesitlere monokromatik veya polikromatik boyamalar herhangi bir ön işleme gerek kalmadan kolaylıkla uygulanabilir ve stabil sonuçlar elde edilir. Elektron mikroskopisinde kullanılan gömme ortamı olan reçinede ise, çapraz bağlanmanın artışı boyanma özelliğini düşürür. Çapraz bağ oluşturmeyen metil metakrilat ile reçinelerde daha iyi bir boyanma gerçekleşirken, glikol metakrilat ve özellikle epoksi reçinelerde çapraz bağlanmanın çok sayıda olması nedeniyle boyanma kalitesi düşmekte ve reçinenin dokudan uzaklaştırılması zorlaşmaktadır. Reçine kesitlerde parafin kesitlerdeki gibi homojen bir boyanma görüntüsü elde etmek oldukça zordur. Çünkü reçine ile tamamen infiltre olan doku bölümleri, boya ajanlarının dokuya ulaşmasına izin vermez. Bununla birlikte mitokondri, mitotik kromozomlar, eritrositler, nukleolus ve salgı granülleri gibi fiziksel olarak yoğun olan doku komponentleri, reçineyi daha az infiltre ettiği için daha iyi boyanırlar. Ayrıca PAS (Periyodik asit-Schiff) (+) yapılar da daha az infiltrasyonun olduğu yapılardır ve nispeten daha iyi boyanırlar. Bunun sebebi şudur: PAS (+) yapılar karbonhidrat açısından zengindir ve suyu çekerek hidrofilik karakter kazanırlar. Bu durumda hidrofobik karakterdeki gömme ortamları dokuya infiltre olamaz. Yoğun yapılara boyanın difüzyonu yavaş olduğundan daha uzun sürede boyanmakla birlikte, boyanma daha kalıcı olur. Bu nedenle polikromatik boyamalarda ilk boyanın baskınlığı, daha sonra uygulanan boyanın dokuya ulaşmasını kısmen engelleyebilir.

Reçine kesitlerde görülen bu kısmi infiltrasyon, parafin kesitlerde elde edilen homojen görüntünün eldesini zorlaştıran en önemli faktördür.

Plastik gömme ortamlarının yarattığı bu problemlerin çözümü için; (a) gömme öncesi dokuyu boyamak ya da (b) boyama işleminden önce dokulardaki boyamayı zorlaştıran gömme ortamını uzaklaştırmak (etching/deepozisyon) önerilmektedir. Yarı ince plastik kesitler, doğrudan boyanabilecekleri gibi, gömme ortamı uygun bir çözücü ile uzaklaştırıldıktan sonra boyanabilir. Kesitlerden gömme ortamının uygun çözücü ile uzaklaştırılması işlemine “etching” denir. Reçinenin uzaklaştırıldığı kesitlerin daha parlak boyandığı ve hücresel ayrıntıların daha iyi ortaya çıktığı kabul edilmektedir.

Polimerize epoksi reçineler standart organik çözücüler içinde çözülemediğinden, epoksi reçineleri çözebilen özel çözücülere ihtiyaç vardır. Bu amaçla genellikle sodyum metoksit, benzen ve metil alkol karışımı kullanılır. Bu tür çözücülerin saptanabilir sitolojik bozulmaya neden olmaksızın reçineyi etkili bir şekilde çıkardığı kanıtlanmıştır. Ayrıca asit veya alkali hidrolizi, halojen veya perasidler ile oksidasyon gibi çeşitli yöntemler önerilmektedir. Genellikle alkalik/bazik solüsyonlar olarak mutlak etanol içinde doymuş potasyum hidroksit (KOH) veya sodyum hidroksit (NaOH) solüsyonu, epoksi kesitlerde reçineyi uzaklaştırmada kullanılan güvenilir çözücülerdir. Sodyum metilat da birçok reçineyi ortamdan uzaklaştırmak için kullanılan bir başka güvenilir çözücüdür ve metil alkol içinde çözdürülerek hazırlanır. Epoksi reçineleri kesitlerden uzaklaştırmak için iyot veya brom da kullanılabilir. Kesitler 30-60 saniye iyot/brom buharına maruz bırakıldıktan sonra asetonla yıkanarak reçine yumuşatılır ve çıkarılır. Etching işleminin aşındırıcı etkisinden dolayı reçine ile doku arasındaki bağları kopartabileceği ve boyanma kalitesini olumsuz yönde etkileyebileceği de unutulmamalıdır.

Postfiksatif olarak osmiyum tetroksit kullanıldığında, boyamayı kolaylaştırmak ve osmiyumun verdiği grimsi rengi soldurmak için bazı durumlarda osmiyumun da dokudan uzaklaştırılması gerekmektedir (deosmikasyon). Hidrojen peroksit (H₂O₂), periodik asit veya performik asit gibi güçlü oksidan solüsyonlarına kısa süreli maruz kalma, doku kesitlerinden indirgenmiş osmiyumun uzaklaştırılması için yeterlidir. Sonrasında ise genellikle asidifiye potasyum dikromat yardımı ile boyalar

ile renklendirme sağlanır. Bu işlemleri yapmak oldukça kritiktir çünkü konsantrasyonları ve işlem süresini ayarlamak zordur. İşlem sırasında diğer hassas gruplar da zarar görüp tahrip olabilir. Örneğin hematoksilenin H₂O₂ işlemini takiben zayıf bir boyanma gösterdiği gözlenmiştir. Bu nedenle perasetik asit, potasyum peroksimonosülfat ve potasyum permanganat-okzalik asit karışımı da gibi hafif etkili oksidanlar da indirgenmiş osmiyumu dokudan uzaklaştırmak amacıyla kullanılabilir. (Hayat, 2000; Horobin. 1983; Robinson et al., 1996).

2.10. Yarı İnce Kesitlerin Boyanması

2.10.1. Monokromatik Boyamalar

Epon kesitlerde monokromatik boyama için en çok bazik boyalar olan toluidine blue, metilen blue, bazik fuksin, azur II, kristal viyole, safranin O ve thionin boya ları kullanılır. Alkalinitenin artırılması, boya ların plastik kesitlerdeki dokuya penetrasyonunu artırır.

Toluidine blue çeşitli doku bileşenleriyle kimyasal olarak nasıl bağlandığına bağlı olarak farklı renklere boyama özelliği gösteren metakromatik, biyolojik boyama uygulamalarında sıklıkla thionin veya metilen blue yerine kullanılan, dokudaki asidik bileşenlere karşı yüksek afinite gösteren katyonik bir tiazin boyadır. Elektron mikroskopisinde, yarı ince kesitlerde ışık mikroskopisindeki rutin H&E boyaması yerine kullanılır. Toluidine blue boyaması yarı ince kesitlerde ışık mikroskopik görüntü eldesinin yanında, sonraki elektron mikroskopik düzeyde yapılacak olan çalışmanın devamı için doku oryantasyonunu da sağlar. Toluidine blue'nun alkali çözeltileri, özellikle rezine gömülü dokuların yarı ince kesitlerini (0,5-2 µm) boyamak için kullanılır. Yüksek pH'da (genellikle 10) nükleik asitlere ve tüm proteinlere bağlanır. Kesitlerin inceliğinden dolayı ayrıntılı yapısal detay verir. Solüsyonun kolay hazırlanması, uzun süre bozulmadan muhafaza edilmesi özellikleri ile de tercih sebebidir. En verimli boyanma ise solüsyon hazırlandıktan 1 hafta sonra yapılan boyamadır.

2.10.2. Polikromatik Boyamalar

Rutin olarak kullanılan toluidine blue boyaması transmisyon elektron mikroskopisi öncesinde yarı ince kesitlerin hızlı bir şekilde gözlenmesi için yeterli olsa da, monokromatik olması nedeniyle ışık mikroskopunda farklı doku bileşenlerinin doğru tanımlanması için yetersiz kalmaktadır. Bu ihtiyaç

doğrultusunda zaman içerisinde epon kesitlere polikromatik boyamalar da denenmiş fakat hidrofobik karakterde oldukları için toluidine blue boyamasından elde edilen verim alınmamıştır. Oysa dikromatik ya da polikromatik boyamalar, epoksi reçinelere göre hidrofilik oldukları için akrilik reçinelerde uygulanabilmektedir. Polikromatik boyama yöntemleri sayısız karmaşık reaktife ihtiyaç duyulması, uzun inkübasyon süresi, renk tonu dengeleme zorluğu, boya solüsyonlarının kullanım sürelerinin kısa olması ve en önemlisi son boyanın baskınlığı nedeniyle epon kesitlerde çok fazla tercih edilir olamamıştır. Bu temel sebeplere ek olarak kesitlerin birkaç basamaklı işleme dayanıklı olmayıp dökülmesi, kesitler üzerinde kırıksıklıklar ve presipitat oluşması gibi sebeplerle de epon kesitlerde çoklu boyamaların rutinde kullanımını yaygınlaşamamıştır.

Çeşitli boyama kombinasyonları ile reçine kesitlerde ana hücre bileşenlerinin farklı boyanmaları sağlanabilir. Anilin, asit fuksin, periyodik asit-Schiff, alcian blue'nun kullanıldığı çeşitli boyama kombinasyonları bilinmektedir. Bununla birlikte diferansiyel boyama elde etmedeki başarı birçok faktöre bağlıdır. Kullanılan fiksatifler, tamponlar, pH, sıcaklık, boyama çözeltisinin konsantrasyonu, boyama süresi, kesit kalınlığı, kullanılan gömme ortamının özellikleri boyanmayı etkileyen faktörlerdendir. Çoklu boyanma eldesi için temel boyaların bağlanma kapasitesi pH ile ilişkilidir. Bu nedenle çoklu boyamalar farklı pH seviyelerinde maksimum bağlanma gösteren iki veya daha fazla bazik boyanın kombinasyonunun kullanılmasıyla elde edilebilir. Farklı boyanmalar elde etmek için boyama sıcaklığı da önemlidir. Boyama sırasında optimum sıcaklığın korunması önemlidir. Optimum sıcaklıktaki dalgalanmalar, aşırı boyanmaya ve yetersiz boyanmaya neden olabilir. Çeşitli boyama yöntemleri, sıcaklıktaki değişikliklere duyarlılıkları açısından farklılık gösterebilir. Tüm hücre yapıları eşit hızda boyanmadığından, boyanma yoğunluğu değerlendirilmeli ve uygun görüldüğünde boyanma sonlandırılmalıdır. Boyama süresi kısmen boya solüsyonunun konsantrasyonu ve kesit kalınlığına da bağlıdır. Ayrıca sabitleyici olarak kullanılan tampon türü, kullanılan fiksatif tipi de kesitlerin boyanma yoğunluğunu etkileyen faktörlerdendir.

Aldehitlerle fikse edilmiş dokuların dehidrasyonu, lipidlerin ekstraksiyonuna ve boyanmamasına neden olur. Osmiyum tetroksit ile fikse edilmiş dokularda farklı renkte boyanmalar elde etmek de oldukça zordur. İndirgenmiş osmiyum varlığı,

boyaların kesite nüfuz etmesini zorlaştırmaktadır. Ayrıca osmiyum dokudaki belirli reaktif grupları bloke edebilir, özellikle hematoksilen boyamasında düzensiz boyanmaya neden olur. Tüm bu nedenlerden dolayı lipid tutulumunun önemli olmadığı durumlarda genellikle gluteraldehit fiksasyonu tercih edilir. Osmiyumla postfiksasyon yapılmadan yalnızca gluteraldehit fiksasyonunun hematoksilen boyanmasını arttırdığı bilinmektedir.

Hidrofobik plastik kesitlerin çoklu boyama protokollerinde; (1) bazik bir boyayı takiben, farklı bir bazik boya kullanımı, (2) iki ayrı bazik boyadan oluşan karışımı takiben, farklı üçüncü bir bazik boya kullanımı ve (3) bazik bir boyayı takiben, farklı bir bazik boya kullanımı ve sonrasında asidik bir boya kullanımı bazı alternatif uygulamalardan yararlanılmaktadır (Hayat, 2000; Horobin, 1983; Robinson et al., 1996).

Çalışmamızda; epon ve parafin kesitler asit/bazik/amfoterik karakterdeki boyalar ile tekli (monokromatik) ve ikili (dikromatik) kombinasyonlar oluşturularak boyanacaktır. Bilinen klasik boya ve boyama metotları, kontrol değerlendirmeleri için kullanılacaktır. Planlanan diğer boya ve boyama denemeleri, daha önce farklı amaçlar ile kullanılmış veya hiç çalışılmamıştır, bu nedenle her iki kesit grubunda da uygulanacaktır. Ayrıca bazı özel histokimyasal boyamalar her iki tip kesit grubunda çalışılacaktır. Rutin TEM takibi ile elde edilecek epon kesitlerde boyama metotları bir grup kesitte epon uzaklaştırılmadan, diğer kesit gruplarında etching amaçlı üç farklı ajan sonrası denenecektir. Bu ajanlardan sodyum hidroksit ve periyodik asit, klasik kitaplarda önerilmektedir. Literatürde asetonun bu amaç ile kullanılmasına yönelik bir bilgi ve çalışmaya rastlanmadı. Aseton, TEM laboratuvarlarında bazı yarı ince epon kesit boyamalarında ksilen yerine şeffaflandırma aşamasında önerilmektedir. Ayrıca epon bulaşıklarının temizliği amacıyla da kullanılmaktadır. Çalışmamızda asetonun boyama öncesi kesitlerdeki eponu da uzaklaştırabileceği düşüncesinden yola çıkılarak, üçüncü etching ajanı olarak aseton kullanılması düşünüldü.

Bu planlar sonucunda; ayrımı sağlanan hücre ve doku bileşenlerinin lokalizasyon ve kuantifikasyonunun ışık mikroskopik düzeyde kolaylıkla yapılabilmesi, gerektiğinde ultrastrüktürel korelasyon için çalışmanın elektron mikroskopik düzeye de ilerletilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma; Bursa Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden eğitim amaçlı kullanım için temin edilen Wistar albino türü erişkin sıçan kullanılarak, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Parafin Laboratuvarı ve Elektron Mikroskopisi Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.1. Doku Disseksiyonu, Takip, Bloklama ve Kesit Alımı

3.1.1. Doku Disseksiyonu

Çalışmada kullanılan deney hayvanları eter anestezisi altında uyutulduktan sonra disseke edildi. Sonrasında ince bağırsak, pankreas, karaciğer, aort ve deri dokularından parafin incelemeler için 1x1x1 cm, elektron mikroskopi incelemeleri için 1x1x1 mm boyutlarında örnekler alındı.

3.1.2. Doku Takibi, Bloklama ve Kesit Alımı

3.1.2.1 Parafin Doku Takibi, Bloklama ve Kesit Alımı

Parafin incelemeler için alınan doku örnekleri %10 formalin (EK 1) çözeltisi ile 5 gün fikse edildi. Süre sonunda akarsuda yıkanan dokular, takip işlemine alındı. Dehidrasyon için dokular %50, %70 ve %90'lık alkol serilerinden 2'şer saat süreyle geçirildikten sonra, tüm gece boyunca absölu alkolde bekletildi. Daha sonra ksilen ile 3 saat saydamlaştırma işlemine tabi tutulan dokular, 4 saat 55°C'lik etüvde parafinde bekletildi. Takip işlemi biten dokular döküm cihazı (Diapath) ile parafin bloklar haline getirildi. Elde edilen parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2245) ile 2µm kalınlığında kesitler alındı.

3.1.2.2. TEM Doku Takibi, Bloklama ve Kesit Alımı

Alınan doku örnekleri 0,13M Sörensens'in fosfat tamponu (EK 1) ile hazırlanmış %5 glutraldehit ile (EK 1) 1 gece +4°C'de fikse edildi. Süre sonunda fosfat tamponu ile yıkanan örneklere daha sonra 1 saat %1 osmiyum tetroksit (EK 1) ile postfiksasyon işlemi uygulandı. Fiksasyon sonrası tampon solüsyonu ile yıkanan dokular elektron mikroskopik incelemeler için takibe alındı. Öncelikle dehidrasyon için 10'ar dk. % 50, %70, %96'lık alkollerde ve iki kez 15'er dk. absölu alkolde

tutuldu. Daha sonra dokular 2 kez 30'ar dk. propilen oksit (EK 1) solüsyonunda bekletildi. Bir sonraki gömme ortamına hazırlık aşaması için dokular 1:1 oranında karıştırılmış Propilen oksit:Epon karışımında 5-6 saat bekletildi. Bu işlemin ardından saf epona (EK 1) alınan dokular gece boyu bekletildikten sonra Epon 812 (EK 1) ile bloklandı. Polimerizasyon işleminin gerçekleşmesi için bloklar 60°C'lik etüvde 48 saat bekletildi. Süre sonunda elde edilen epon bloklar Ultratrim (Reichert) cihazı ile trimlenerek, yarı ince kesit alımına hazır hale getirildi. Trimlenen dokulardan Ultramikrotom (Reichert Supernova) ile cam bıçaklar kullanılarak 2 µm kalınlığında yarı ince kesitler alındı. Tüm kesitler dökülme riskini en aza indirmek için jelatin kaplı lamlara (EK 1) alındı. Alınan tüm doku örneklerine kontrol grubu olarak rutin toluidine blue boyaması yapıldı.

İnce bağırsak ve pankreas kesitlerine Toluidine blue, Hematoksilin, Eozin, Asit fuksin, Metil green, Nötral red ve bunların ikili kombinasyonları uygulandı. Karaciğer kesitlerine Altmann metodu ve Gordon-Sweet gümüşleme boyaması, aort kesitlerine Verhoeff boyaması, deri kesitlerine ise Toluidine blue-Light green boyaması yapıldı.

3.2. Etching Yöntemi

Etching işlemi yalnızca epon kesitlere uygulandı. Bu işlem 3 farklı solüsyon (Solvent I, II, III) ile tüm doku kesitlerinde çalışıldı.

3.2.1. NaOH ile Etching

Solvent I: Absolü alkolde sature NaOH solüsyonu (EK 1)

Metot:

- 1- Solvent I (RT [Room Temperature]/2-10 dk.)
- 2- Filtre kağıdına emdirme
- 3- Absolü alkol (5 dk.)*
- 4- Filtre kağıdına emdirme
- 5- Akarsuda yıkama (5 dk.)**
- 6- Kurutma
- 7- Boyama (Hayat, 2000).

*%70 alkol (3 dk.)

** Akarsuda yıkama (3 dk.) olarak uygulandı.

3.2.2. %2,5 Periyodik Asit ile Etching

Solvent II: %2,5 Periyodik asit solüsyonu (EK 1)

Metot:

- 1- Solvent II (60°C/5 dk.)*
- 2- Filtre kağıdına emdirme
- 3- Akarsuda yıkama (5 dk.)**
- 4- Kurutma
- 5- Boyama (Hayat, 2000).

*Solvent II (80°C/2 dk.)

** Akarsuda yıkama (2 dk.) olarak uygulandı.

3.2.3. Aseton ile Etching

Solvent III: Aseton (EK 1)

Metot:

- 1- Aseton (damlatma-şalede/60°C/5-60 dk. veya RT/12-18 saat)*
- 2- Kurutma
- 3- Akarsuda suyunda yıkama (5 dk.)**
- 4- Kurutma
- 5- Boyama

*Şalede (5 dk.)

** Distile suda (2 dk.) olarak uygulandı.

Etching işlemi öncesinde; dökülmeyi en aza indirmek için lamalar, 60°C'de hotplate üzerinde 1 dk. ısıtılıp oda ısısına getirildikten sonra kullanıldı.

Etching işlemi sonrasında en iyi sonucun aseton ile alındığı konusunda karar verilerek sonraki tüm işlemlerde epon kesitlere boyama öncesinde aseton ile etching işlemi uygulandı.

3.3. Boyama Yöntemleri

3.3.1. Monokromatik Boyama Solüsyonları ve Boyama Yöntemleri

Parafin ve epon kesitlere; Hematoksilen, Eozin, Toluidine blue, Asit fuksin, Metil green ve Nötral red monokromatik boyamaları yapıldı. Boyamalardan önce tüm epon kesitlere aseton ile etching işlemi uygulandı.

3.3.1.1. Hematoksilen Boyaması:

Çalışmada Harris hematoksileni kullanıldı (EK 1).

Parafin kesitler için metot:

- 1- Deparafinizasyon ve kurutma
- 2- Hidrasyon (absolü alkol, %90, %70 alkol x3 dk.)
- 3- Akarsuda yıkama (3 dk.)
- 4- Hematoksilen solüsyonu (8-10 dk.)
- 5- Akarsuda yıkama (kesitler mavileşinceye kadar)
- 6- %1 Asit alkol (1-2 dips.)
- 7- Akarsuda yıkama (kesitler mavileşinceye kadar)
- 8- %1 Amonyaklı su (7-10 dips.)
- 9- Akarsuda yıkama
- 10- Dehidrasyon (%70, %90 ve absolü alkol x10 dips.)
- 11- Kurutma, ksilen ile şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

Epon kesitler için metot:

- 1- Hematoksilen solüsyonu (60°C/12-24 saat)
- 2- Distile suda yıkama (15 dk.)
- 3- Emdirme ve oda ısısında kurutma
- 4- Absolü alkol ile yıkama
- 5- Ksilen: Absolü alkol karışımında (1:1) bekletme (2 dk.)
- 6- Ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

3.3.1.2. Eozin Boyaması:

Çalışmada alkolik Eozin Y solüsyonu kullanıldı (EK 1).

Parafin kesitler için metot:

- 1- Deparafinizasyon ve kurutma
- 2- Hidrasyon (Absolü alkol, %90 ve %70 alkol x3 dk.)
- 3- Akarsuda yıkama (3 dk.)
- 4- Eozin solüsyonu (1-5 dk.)
- 5- Akarsuda yıkama
- 6- Dehidrasyon (%70, %90 ve Absolü alkol x10 dips.)
- 7- Kurutma, ksilen ile şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

Epon kesitler için metot:

- 1- Eozin solüsyonu (RT/5-10 dk.)*
- 2- Akarsuda yıkama (2 dk.)
- 3- Absolü alkol (3-4 dips.)

4- Kurutma, aseton ile şeffaflandırma (2 dk.)^{**}, DPX ve lamel ile kapatma

* Eozin 2 dk.

^{**} Ksilol 5 dk. olarak uygulandı.

3.3.1.3. Toluidine blue Boyaması:

Çalışmada toluidine blue solüsyonu kullanıldı (EK 1).

Parafin kesitler için metot:

1- Deparafinizasyon ve hidrasyon

2- Akarsuda yıkama

3- Toluidine blue solüsyonu (10 sn.)^{*}

4- Distile suda yıkama

5- Dehidratasyon

6- Kurutma, ksilolde şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma (Drury et al., 1967)

* 1dk. olarak uygulandı.

Epon kesitler için metot:

1- Toluidine blue solüsyonu (60-70°C/10-30 sn.)^{*}

2- Sıcak distile su ile yıkama^{**}

3- Kurutma, DPX ve lamel ile kapatma (Robinson et al., 1996).

* 80°C ve 1 dk.

^{**} Sıcak distile su dökülme riskini artırdığı için akarsuda 1 dk. yıkama olarak uygulandı. Ayrıca kurutma öncesinde %50 alkolden geçirildi.

3.3.1.4. Asit fuksin Boyaması:

Çalışmada asit fuksin solüsyonu kullanıldı (EK 1)

Parafin kesitler için metot:

1- Deparafinizasyon ve hidrasyon

2- Akarsuda yıkama

3- %0,5 Asit fuksin solüsyonu (5 dk.)^{*}

4- Distile suda yıkama

5- Fosfomolibdik asit solüsyonu (5 dk.) (EK 1)

6- Drene edildikten sonra alkollerde dehidratasyon

7- Kurutma, ksilolde şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

* 1 dk. olarak uygulandı.

Epon kesitler için metot:

- 1- %1 Asit fuksin solüsyonu (RT/15 sn.-5 dk.)
- 2- Distile suda yıkama
- 3- Oda sıcaklığında kurutma
- 4- Aseton ile şeffaflandırma (2 dk.)*
- 5- Kurutma, DPX ve lamel ile kapatma (Clark, 1981).

*Ksilen ile şeffaflandırıldı.

3.3.1.5. Metil green Boyaması:

Çalışmada metil green solüsyonu kullanıldı (EK 1)

Parafin kesitler için metot:

- 1- Deparafinizasyon ve hidrasyon
- 2- Akarsuda yıkama
- 3- %0,5 Metil green solüsyonu (kesitler koyu yeşil oluncaya kadar)
- 4- Dehidrasyon*
- 5- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma (Clark, 1981).

*Dehidrasyon sadece %50 alkol ile uygulandı.

Epon kesitler için metot:

- 1- %1 Metil green solüsyonu (RT/15-20 dk.)*
- 2- Distile su ile yıkama**
- 3- Kurutma (70°C)***
- 4- DPX ve lamel ile kapatma**** (Hayat, 2000).

*80°C ve 5 dk.

**Distile su ile yıkamanın ardından %50 alkol uygulandı.

*** RT

****Kurutmanın ardından ksilen ile şeffaflandırıldı.

3.3.1.6. Nötral red Boyaması:

Çalışmada nötral red solüsyonu kullanıldı (EK 1)

Parafin kesitler için metot:

- 1- Deparafinizasyon ve hidrasyon
- 2- Akarsuda yıkama
- 3- %1 Nötral red solüsyonu (RT/5-30 dk.)
- 4- Distile su ile yıkama
- 5- Diferansiyasyon (%95 alkol)

6- Kurutma, ksilen ile şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma (Drury et al., 1967)

Epon kesitler için metot:

- 1- %1 Nötral red solüsyonu (60°C/5-30 dk.)*
- 2- Distile su ile yıkama
- 3- Diferansiyasyon (%95 alkol)**
- 4- Oda ısısında kurutma
- 5- Aseton ile şeffaflandırma (2 dk.)***
- 6- Kurutma, DPX ve lamel ile kapatma (Drury et al., 1967)

*80°C/5 dk.

**%50 alkol

***Ksilen ile şeffaflandırma uygulandıktan sonra DPX ve lamel ile kapatıldı.

3.3.2. Dikromatik Boyama Solüsyonları ve Boyama Yöntemleri

3.3.2.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması:

Parafin kesitler için metot:

- 1- Deparafinizasyon ve kurutma
- 2- Hidrasyon (absolü alkol, %90, %70 alkol x3 dk.)
- 3- Akarsuda yıkama (3 dk.)
- 4- Hematoksilen solüsyonu (8-10 dk.)
- 5- Akarsuda yıkama (kesitler mavileşinceye kadar)
- 6- %1 Asit alkol (1-2 dips.)
- 7- Akarsuda yıkama
- 8- %1 Amonyaklı su (7-10 dips.)
- 9- Akarsuda yıkama
- 10- Eozin solüsyonu (1-5 dk.)
- 11- Akarsuda yıkama
- 12- Dehidrasyon (%70, %90, absolü alkol x 10 dips.)
- 13- Kurutma, ksilen ile şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma.

Epon kesitler için metot:

- 1- Hematoksilen solüsyonu (60°C/12-24 saat)
- 2- Distile suda yıkama (6x15 dk.)
- 3- Eozin solüsyonu (1-5 dk.)
- 4- Distile su ile yıkama

- 5- Absolü alkolden hızlıca geçirme
- 6- Ksilen:Absolü alkol karışımı (1:1) (2 dk.)
- 7- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

3.3.2.2. Toluidine blue ile Kombinasyonlar

3.3.2.2.1. Toluidine blue-Eozin Boyaması:

Parafin kesitler için metot:

- 1- Deparafinizasyon, hidrasyon
- 2- Akarsuda yıkama
- 3- Toluidine blue solüsyonu (5 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama
- 5- Eozin solüsyonu (1 dk.)
- 6- Akarsuda yıkama
- 7- %70 alkol
- 8- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

Epon kesitler için metot:

- 1- Toluidine blue solüsyonu (80°C/1 dk.)
- 2- Distile suda yıkama
- 3- Eozin solüsyonu (1 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama
- 5- %50 alkol
- 6- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

3.3.2.2.2. Toluidine blue-Asit fuksin Boyaması:

Parafin kesitler için metot:

- 1- Deparafinizasyon, hidrasyon
- 2- Akarsuda yıkama
- 3- Toluidine blue solüsyonu (5 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama
- 5- %0,5 Asit fuksin solüsyonu (1 dk.)
- 6- Fosfomolibdik asit solüsyonu (1 dk.)
- 7- Akarsuda yıkama
- 8- %70 alkol
- 9- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

Epon kesitler için metot:

- 1- Toluidine blue solüsyonu (80°C/1 dk.)
- 2- Distile su ile yıkama
- 3- %1 Asit fuksin solüsyonu (80°C/1 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama
- 5- Fosfomolibdik asit solüsyonu (RT/1 dk.)
- 6- Akarsuda yıkama
- 7- %50 alkol
- 8- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

3.3.2.2.3. Toluidine blue-Metil green Boyaması:

Parafin kesitler için metot:

- 1- Deparafinizasyon, hidrasyon
- 2- Akarsuda yıkama
- 3- Toluidine blue solüsyonu (1 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama
- 5- %0,5 Metil green solüsyonu (1 dk.)
- 6- Akarsuda yıkama
- 7- %70 alkol
- 8- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

Epon kesitler için metot:

- 1- Toluidine blue solüsyonu (80°C/1 dk.)
- 2- Distile suda yıkama
- 3- %1 Metil green solüsyonu (80°C/1 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama
- 5- %50 alkol
- 6- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

3.3.2.2.4. Toluidine blue-Nötral red Boyaması:

Parafin kesitler için metot:

- 1- Deparafinizasyon, hidrasyon
- 2- Akarsuda yıkama
- 3- Toluidine blue solüsyonu (1 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama

- 5- Nötral red solüsyonu (1 dk.)
- 6- Akarsuda yıkama
- 7- %70 alkol
- 8- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

Epon kesitler için metot:

- 1- Toluidine blue solüsyonu (80°C/1 dk.)
- 2- Distile suda yıkama
- 3- Nötral red solüsyonu (80°C/1 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama
- 5- %50 alkol
- 6- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

3.3.2.3. Asit fuksin ile Kombinasyonlar

3.3.2.3.1. Asit fuksin-Toluidine blue Boyaması:

Parafin kesitler için metot:

- 1- Deparafinizasyon, hidrasyon
- 2- Akarsuda yıkama
- 3- %0,5 Asit fuksin solüsyonu (1 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama
- 5- Fosfomolibdik asit solüsyonu (1 dk.)
- 6- Akarsuda yıkama
- 7- Toluidine blue solüsyonu (1 dk.)
- 8- Akarsuda yıkama
- 9- %70 alkol
- 10- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

Epon kesitler için metot:

- 1- %1 Asit fuksin solüsyonu (80°C/1 dk.)
- 2- Distile suda yıkama
- 3- Fosfomolibdik asit solüsyonu (RT/1dk.)
- 4- Distile suda yıkama
- 5- Toluidine blue solüsyonu (80°C/1 dk.)
- 6- Akarsuda yıkama
- 7- %50 alkol

8- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

3.3.2.3.2. Asit fuksin-Metil green Boyaması:

Parafin kesitler için metot:

- 1- Deparafinizasyon, hidrasyon
- 2- Akarsuda yıkama
- 3- %0,5 Asit fuksin solüsyonu (1 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama
- 5- Fosfomolibdik asit solüsyonu (1 dk)
- 6- Akarsuda yıkama
- 7- %0,5 Metil green solüsyonu (5 dk)
- 8- Akarsuda yıkama
- 9- %70 alkol
- 10- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

Epon kesitler için metot:

- 1- %1 Asit fuksin solüsyonu (80°C/1 dk.)
- 2- Distile suda yıkama
- 3- Fosfomolibdik asit solüsyonu (RT/1 dk.)
- 4- Distile suda yıkama
- 5- %1 Metil green solüsyonu (80°C/2 dk.)
- 6- Akarsuda yıkama
- 7- %50 alkol
- 8- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

3.3.2.4. Metil green ile Kombinasyonlar

3.3.2.4.1. Metil green-Toluidine blue Boyaması:

Parafin kesitler için metot:

- 1- Deparafinizasyon, hidrasyon
- 2- Akarsuda yıkama
- 3- %0,5 Metil green solüsyonu (5 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama
- 5- Toluidine blue solüsyonu (1 dk.)
- 6- Akarsuda yıkama
- 7- %70 alkol

8- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

Epon kesitler için metot:

1- %1 Metil green solüsyonu (80°C/5 dk.)

2- Distile suda yıkama

3- Toluidine blue solüsyonu (80°C/1 dk.)

4- Akarsuda yıkama

5- %50 alkol

6- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

3.3.2.4.2. Metil green-Asit fuksin Boyaması:

Parafin kesitler için metot:

1- Deparafinizasyon, hidrasyon

2- Akarsuda yıkama

3- %0,5 Metil green solüsyonu (5 dk.)

4- Akarsuda yıkama

5- %0,5 Asit fuksin solüsyonu (1 dk.)

6- Akarsuda yıkama

7- Fosfomolibdik asit solüsyonu (1 dk.)

8- Akarsuda yıkama

9- %70 alkol

10- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

Epon kesitler için metot:

1- %1 Metil green solüsyonu (80°C/5 dk.)

2- Distile suda yıkama

3- %1 Asit fuksin solüsyonu (80°C/1 dk.)

4- Distile suda yıkama

5- Fosfomolibdik asit solüsyonu (RT/1 dk.)

6- Akarsuda yıkama

7- %50 alkol

8- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

3.3.2.4.3. Metil green-Nötral red Boyaması:

Parafin kesitler için metot:

1- Deparafinizasyon, hidrasyon

- 2- Akarsuda yıkama
- 3- %0,5 Metil green solüsyonu (5 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama
- 5- Nötral red solüsyonu (1 dk.)
- 6- Akarsuda yıkama
- 7- %70 alkol
- 8- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

Epon kesitler için metot:

- 1- %1 Metil green solüsyonu (80°C/5 dk.)
- 2- Distile suda yıkama
- 3- Nötral red solüsyonu (80°C/1 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama
- 5- %50 alkol
- 6- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

3.3.2.5. Nötral red ile Kombinasyonlar

3.3.2.5.1. Nötral red-Toluidine blue Boyaması:

Parafin kesitler için metot:

- 1- Deparafinizasyon, hidrasyon
- 2- Akarsuda yıkama
- 3- Nötral red solüsyonu (1 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama
- 5- Toluidine blue solüsyonu (1 dk.)
- 6- Akarsuda yıkama
- 7- %70 alkol
- 8- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

Epon kesitler için metot:

- 1- Nötral red solüsyonu (80°C/1 dk.)
- 2- Distile suda yıkama
- 3- Toluidine blue solüsyonu (80°C/1 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama
- 5- %50 alkol
- 6- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

3.3.2.5.2. Nötral red-Metil green Boyaması:

Parafin kesitler için metot:

- 1- Deparafinizasyon, hidrasyon
- 2- Akarsuda yıkama
- 3- Nötral red solüsyonu (1 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama
- 5- %0,5 Metil green solüsyonu (5 dk.)
- 6- Akarsuda yıkama
- 7- %70 alkol
- 8- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

Epon kesitler için metot:

- 1- Nötral red solüsyonu (80°C/1 dk.)
- 2- Distile suda yıkama
- 3- %1 Metil green solüsyonu (80°C/1 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama
- 5- %50 alkol
- 6- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

3.3. Özel Boyamalar

Özel boyamalar; aort kesitlerine Verhoeff boyaması, karaciğer kesitlerine Gordon&Sweet gümüşleme boyaması ve Altmann boyaması, deri kesitlerine Toluidine blue-Light green boyaması şeklinde gerçekleştirildi.

3.3.1. Verhoeff Boyaması (EK 1):

Parafin kesitler için metot:

- 1- Deparafinizasyon, hidrasyon
- 2- Akarsuda yıkama
- 3- Verhoeff solüsyonu (15 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama
- 5- %2 Ferric chloride ile diferansiyasyon (elastik lifler gri zemin üzerinde siyah renkte görününceye kadar)
- 6- Akarsuda yıkama
- 7- %70 alkol
- 8- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

Epon kesitler için metot:

- 1- Verhoeff solüsyonu (80°C/5 dk.)
- 2- Akarsuda yıkama
- 3- %2 Ferric chloride ile differansiyasyon (80°C/elastik lifler gri zemin üzerinde siyah renkte görününceye kadar))
- 4- Akarsuda yıkama
- 5- %95 alkolden geçirme (zemindeki iyodin boyası uzaklaştırılıncaya kadar)
- 6- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

3.3.2. Gordon&Sweet Gümüşleme Boyaması (EK 1):

Parafin kesitler için metot:

- 1- Deparafinizasyon, hidrasyon
- 2- Akarsuda yıkama
- 3- %1 Potasyum permanganat solüsyonu 5 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama
- 5- %1 Oksalik asit solüsyonu ile ağartma
- 6- Akarsuda yıkama
- 7- %2 Iron alum solüsyonu (en az 15 dk.)
- 8- Distile su ile yıkama
- 9- Gümüş solüsyonu (2 dk.)
- 10- Distile su ile yıkama
- 11- %10 Formalin ile indirgeme (2 dk.)
- 12- Akarsuda yıkama
- 13- %5 Sodyum tiyosülfat solüsyonu (3 dk.)
- 14- Akarsuda yıkama
- 15- Dehidrasyon
- 16- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

Epon kesitler için metot:

- 1- %1 Potasyum permanganat solüsyonu (80°C/5 dk.)
- 2- Distile suda yıkama
- 3- %1 Oksalik asit solüsyonu ile ağartma (80°C)
- 4- Distile suda yıkama
- 5- %2,5 Iron alum solüsyonu (80°C, en az 15 dk.)

- 6- Distile su ile yıkama
- 7- Gümüş solüsyonu (80°C/2 dk.)
- 8- Distile su ile yıkama
- 9- %10 Formalin ile indirgeme (80°C/2 dk.)
- 10- Akarsuda yıkama
- 11- %5 Sodyum tiyosülfat solüsyonu (80°C/3 dk.)
- 12- Akarsuda yıkama
- 13- Dehidrasyon
- 14- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

3.3.3. Toluidine blue-Light green (Tip I kollajen) Boyaması (EK 1):

Paraşin kesitler için metot:

- 1- Deparafinizasyon, hidrasyon
- 2- Akarsuda yıkama
- 3- Toluidine blue solüsyonu (1 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama
- 5- Light green solüsyonu (5 dk.)
- 5- Akarsuda yıkama
- 8- %70 alkol
- 10- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

Epon kesitler için metot:

- 1- Toluidine blue (80°C/1 dk.)
- 2- Distile suda yıkama
- 3- Light green solüsyonu (80°C/5 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama
- 5- %50 alkol
- 6- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

3.3.4. Altmann Metodu (Mitokondri Boyaması) (EK 1):

Paraşin kesitler için metot:

- 1- Deparafinizasyon, hidrasyon
- 2- Akarsuda yıkama
- 3- Anilin-Asit fuksin solüsyonu (5 dk.)
- 4- Akarsuda yıkama

- 5- Differansiyatör-I (boyanın fazlası giderilinceye kadar)
- 6- Differansiyatör-II (mikroskopik kontrol, differansiyasyon tamamlanıncaya kadar)
- 7- Absolü alkolde differansiyasyon x2
- 8- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma (Bancroft, J. D., & Stevens, A. 1996; Drury et al., 1967)

Epon kesitler için metot:

- 1- Anilin-Asit fuksin solüsyonu (80°C/5 dk.)
- 2- Soğutma (5 dk.)
- 3- Akarsuda yıkama
- 4- Differansiyatör-I (boyanın fazlası giderilinceye kadar)
- 5- Differansiyatör-II (mikroskopik kontrol, differansiyasyon tamamlanıncaya kadar)
- 6- Absolü alkolde differansiyasyon x2
- 7- Kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma.

Sonuçlar ışık mikroskobu (Zeiss-Primostar) ile değerlendirildi ve fotomikroskop (Olympus BX50) kullanılarak özel boyamalar için 20x, 40x ve 100x; diğer tüm boyamalar için 40x ve 100x büyütmelede görüntüler elde edildi.

4. BULGULAR

4.1. MONOKROMATİK BOYANMA BULGULARI

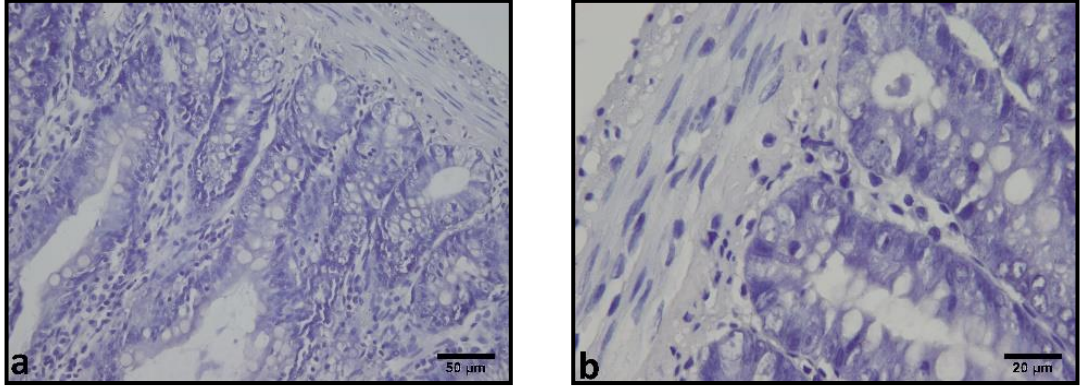
4.1.1. Parafin kesitlerde Hematoksilen boyama sonuçları

Sadece hematoksilen ile boyanan ince bağırsak (Şekil 1a,b) ve pankreas (Şekil 3a,b) dokularına ait parafin kesitlerde; karakteristik mavi-lacivert renklerde nuklear boyanmaya ek olarak, bazofilik sitoplazmik komponentlerin boyandığı görüldü.

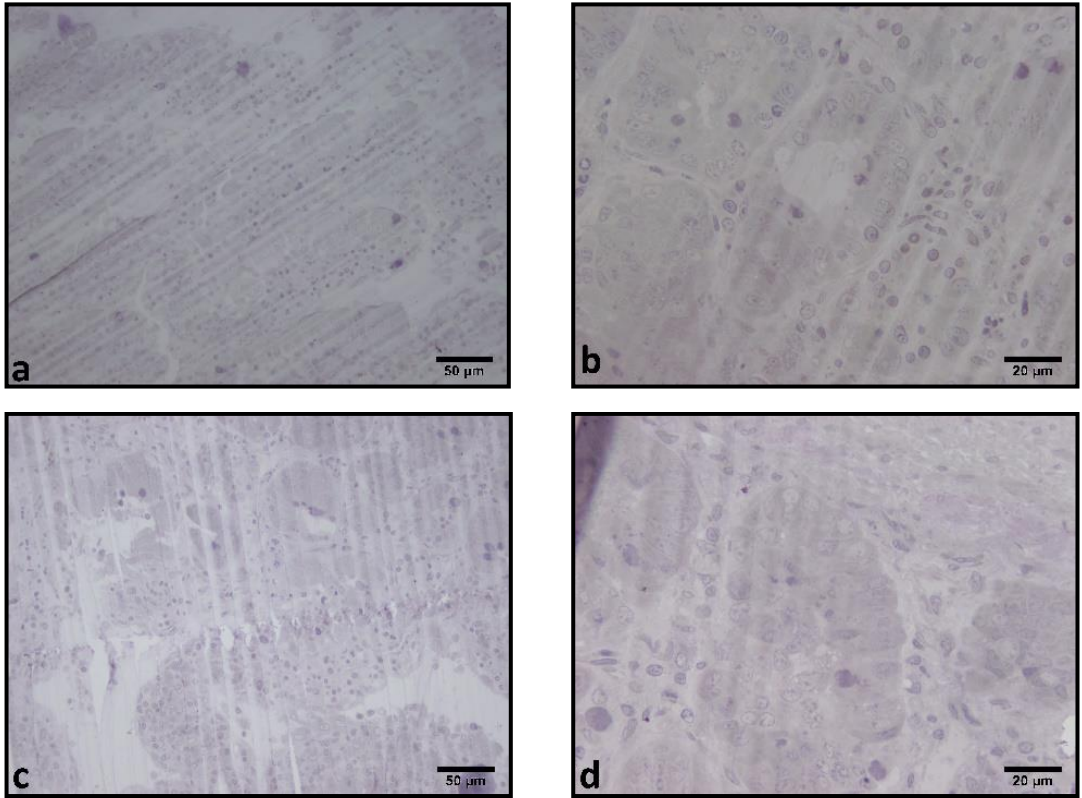
4.1.2. Yarı ince epon kesitlerde Hematoksilen boyama sonuçları

Etching uygulaması yapılmadan hematoksilen ile boyanan ince bağırsak boyamasında sadece soluk bazofilik tonda nukleus boyanmaları görüldü (Şekil 2a,b). Aseton etchingi sonrası yapılan boyamada, epon uzaklaştırılması sonucu daha şeffaf ve açık zemin sayesinde hematoksilenin boyadığı nukleuslar biraz daha belirgin olarak izlendi (Şekil 2c,d). Pankreas dokusunda epon etchingi yapılmadan hematoksilen ile boyanan kesitlerde (Şekil 4a,b) soluk olmakla birlikte nuklear boyanmaların yanısıra sitoplazmik boyanmalar da izlendi. Aseton etchingini izleyen boyama sonuçlarının da benzer olduğu görülmekle birlikte renkler daha bazofilik tonlardaydı, histolojik detaylar daha belirgindi (Şekil 4c,d).

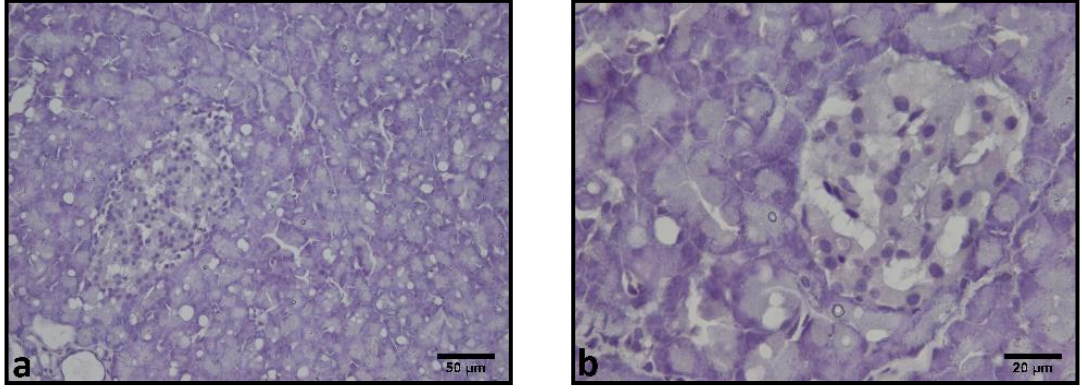
Bu bulgular doğrultusunda hematoksilen ile tekli boyama; (a) parafin kesitlerde kontur boyanma olmamakla birlikte, klasik bilgilerle paralel olarak nuklear boyanma ve detayları sağlamasına ek olarak genel morfoloji ve doku ayrımını da imkan vermektedir. Parafin kesitlerde bu amaçla yararlanılabileceği düşünüldü. (b) Yarı ince epon kesitlerde her iki dokuda da sağladığı detaylar, sadece nukleuslar düzeyinde ve parafin kesitlere göre çok zayıf olduğundan olumlu bulunmadı.



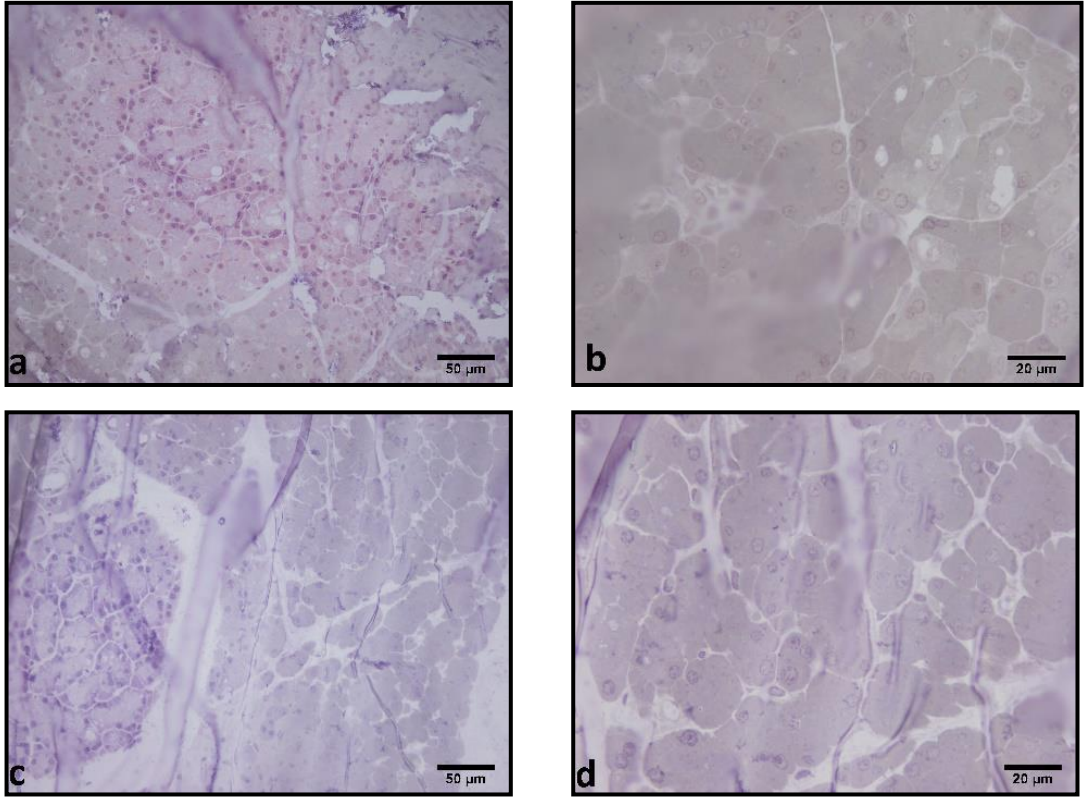
Şekil 1. İnce bağırsağın parafin kesitlerinde Hematoksilen boyaması (a,b).



Şekil 2. İnce bağırsağın yarı ince epon kesitlerinde; etching uygulanmadan (a,b) ve aseton ile etching sonrası (c,d) Hematoksilen boyaması.



Şekil 3. Pankreas dokusunun parafin kesitlerinde Hematoksilen boyaması (a,b).



Şekil 4. Pankreas dokusunun yarı ince epon kesitlerinde; etching uygulanmadan (a,b) ve aseton ile etching sonrası (c,d) Hematoksilen boyaması.

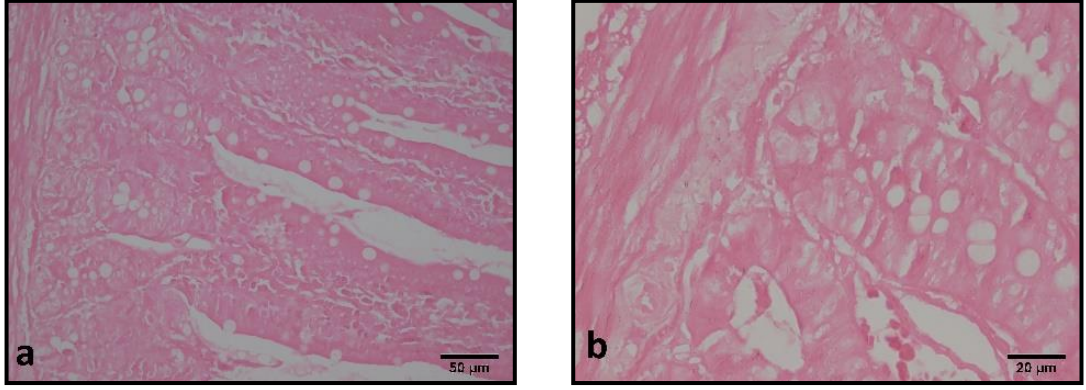
4.1.3. Parafin kesitlerde Eozin boyama sonuçları

Sadece eozin ile boyanan ince bağırsak (Şekil 5a,b) ve pankreas (Şekil 7a,b) dokularına ait parafin kesitlerde; tekdüze karakteristik pembe renkte sitoplazmik boyanma gözlendi.

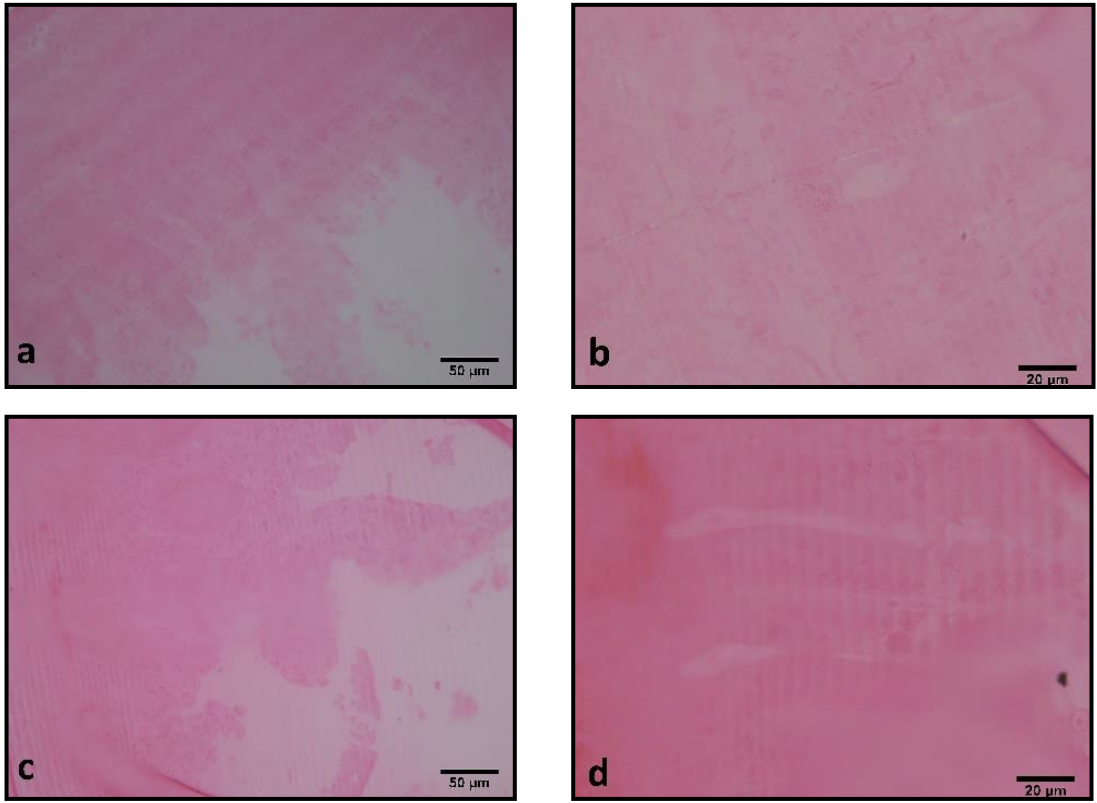
4.1.4. Yarı ince epon kesitlerde Eozin boyama sonuçları

Eponun uzaklaştırılmadan (Şekil 6a,b) ve aseton ile uzaklaştırma sonrası (Şekil 6c,d) eozin ile boyanan ince bağırsak kesitlerinde; iki uygulamada da yoğun eozinofili nedeniyle detaylar seçilemedi. Eponun uzaklaştırılmadan (Şekil 8a,b) ve aseton ile uzaklaştırma sonrası (Şekil 8c,d) eozin ile boyanan pankreas kesitlerinde; açık pembe sitoplazmik boyanmalara ek olarak daha koyu ve canlı eozinofilik boyanan zimojenik granüller ayırt edildi. Aseton ile eponun uzaklaştırılması sonrası boyama sonuçları çok daha berrak ve net olarak izlenirken, nuklear yapılar da pembe tonlarında olmakla birlikte ayırt edildi (Şekil 8c,d).

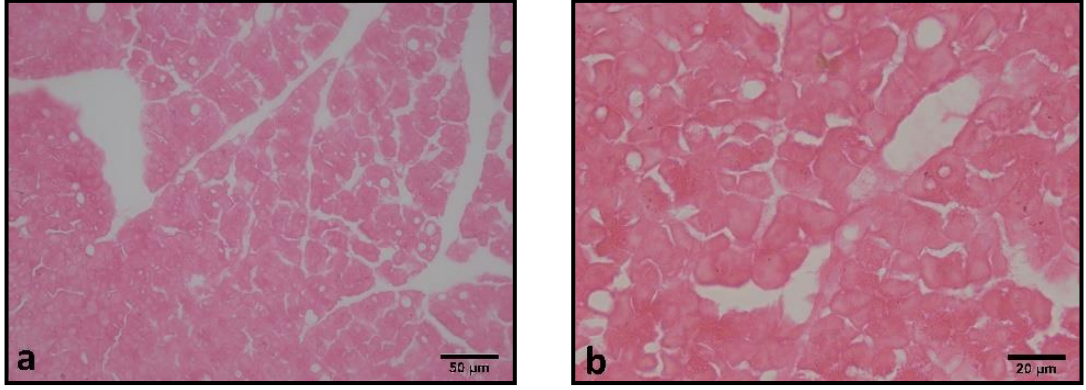
Bu bulgular ışığında eozin ile tekli boyama; (a) parafin kesitlerde genel morfoloji ve doku ayırımında yeterli bulunmadı. (b) Yarı ince epon kesitlerde ince bağırsakta hiç detay sağlamadı. Aseton ile eponun uzaklaştırıldığı pankreas dokusunda, verdiği detaylar doğrultusunda tercih edilebileceği düşünüldü.



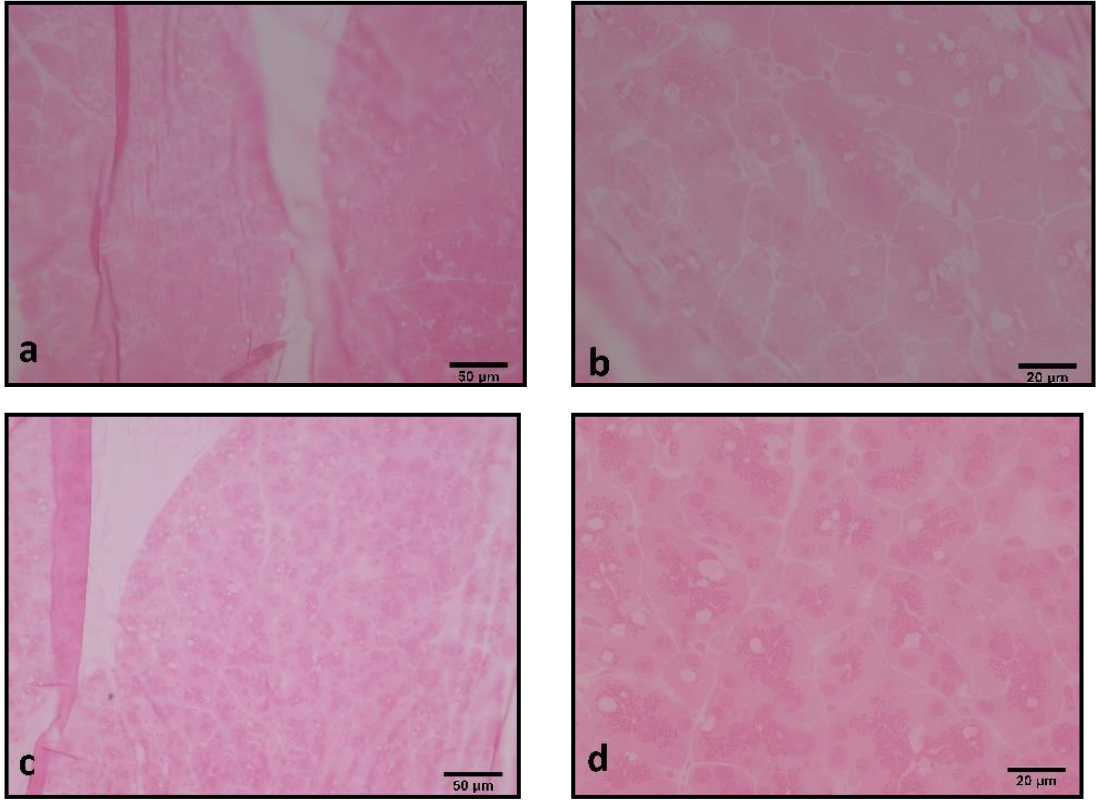
Şekil 5. İnce bağırsağın parafin kesitlerinde Eozin boyaması (a,b).



Şekil 6. İnce bağırsağın yarı ince epon kesitlerinde; etching uygulanmadan (a,b) ve aseton ile etching sonrası (c,d) Eozin boyaması.



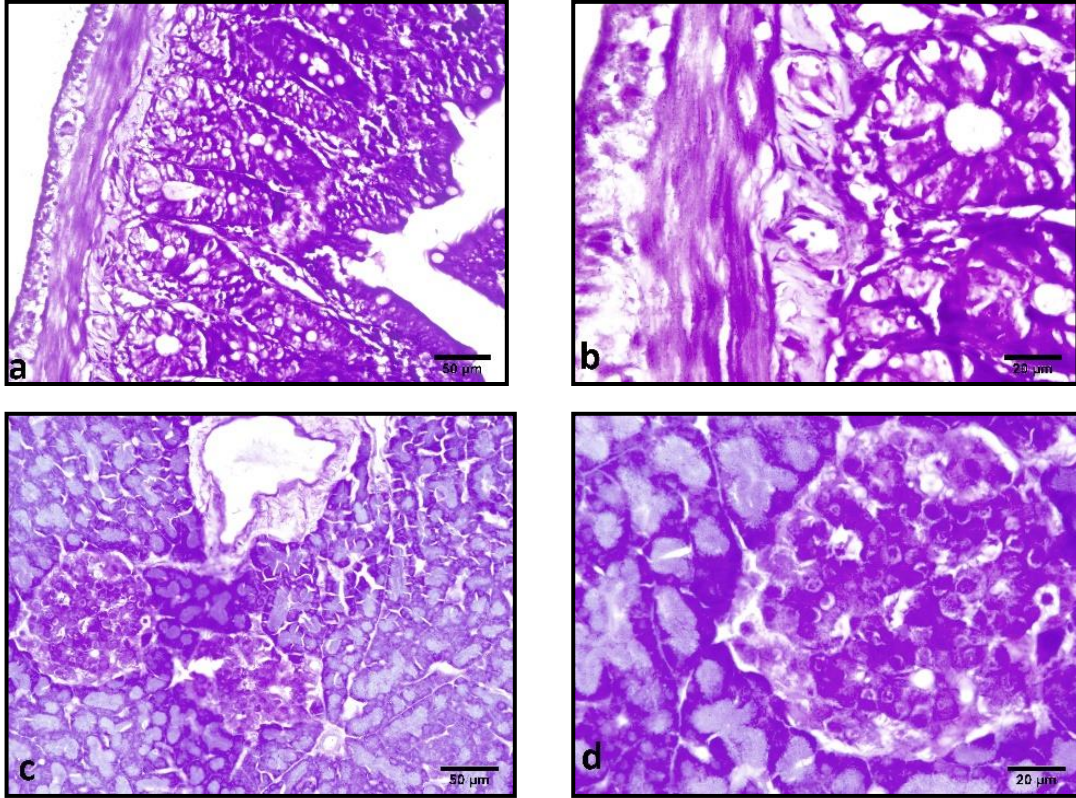
Şekil 7. Pankreas dokusunun parafin kesitlerinde Eozin boyaması (a,b).



Şekil 8. Pankreas dokusunun yarı ince epon kesitlerinde; etching uygulanmadan (a,b) ve aseton ile etching sonrası (c,d) Eozin boyaması.

4.1.5. Parafin kesitlerde Toluidine blue boyama sonuçları

İnce bağırsak parafin kesitlerinin toluidine blue ile boyaması sonrası; tek düze morumsu-lacivert boyanma gözlemlendi. Hücresel ve nuklear detaylar seçilemedi (Şekil 9a,b). Pankreasa ait toluidine blue ile boyanan parafin kesitlerde; açık mavi, lacivert ve mor renklerden oluşan heterojen boyanmaya bağlı olarak endokrin ve ekzokrin alanların ayrımı mümkün oldu. Ekzokrin asinar hücrelerdeki koyu bazofilik sitoplazma ile soluk mavi granüllerin bulunduğu apikal sitoplazma kontrastı söz konusuydu. Ancak nuklear ayırım yapılamadı (Şekil 9c,d).



Şekil 9. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) parafin kesitlerinde Toluidine blue boyaması.

4.1.6. Yarı ince epon kesitlerde Toluidine blue boyama sonuçları

I. Grup kapsamında ince bağırsak ve pankreas dokularına ait etching uygulanmadan yarı ince epon kesitlerde çalışılan toluidine blue boyamalarında sırasıyla; boraksız toluidine blue solüsyonu ile boyama sonuçları (Şekil 10a,b) (Şekil 11a,b), konvansiyonel borakslı toluidine blue boyaması (Şekil 10c,d) (Şekil 11c,d) ile karşılaştırıldığında genel olarak bilindik mavi-lacivert-mor ve tonlarındaki boyanmalar, borakslı grupta daha bazofilik olarak izlendi. Sitoplazma ve nukleus ayrımı, ekzokrin pankreastaki seröz asinar hücre granülleri boraksız boyamalarda daha belirgindi. Her iki tip solüsyon ile; ince bağırsaktaki mor-viyole renkteki goblet hücreleri ile Paneth hücreleri, pankreastaki soluk pembe boyanan endokrin bölümler ile ekzokrin komponentler kolaylıkla ayırt edildi.

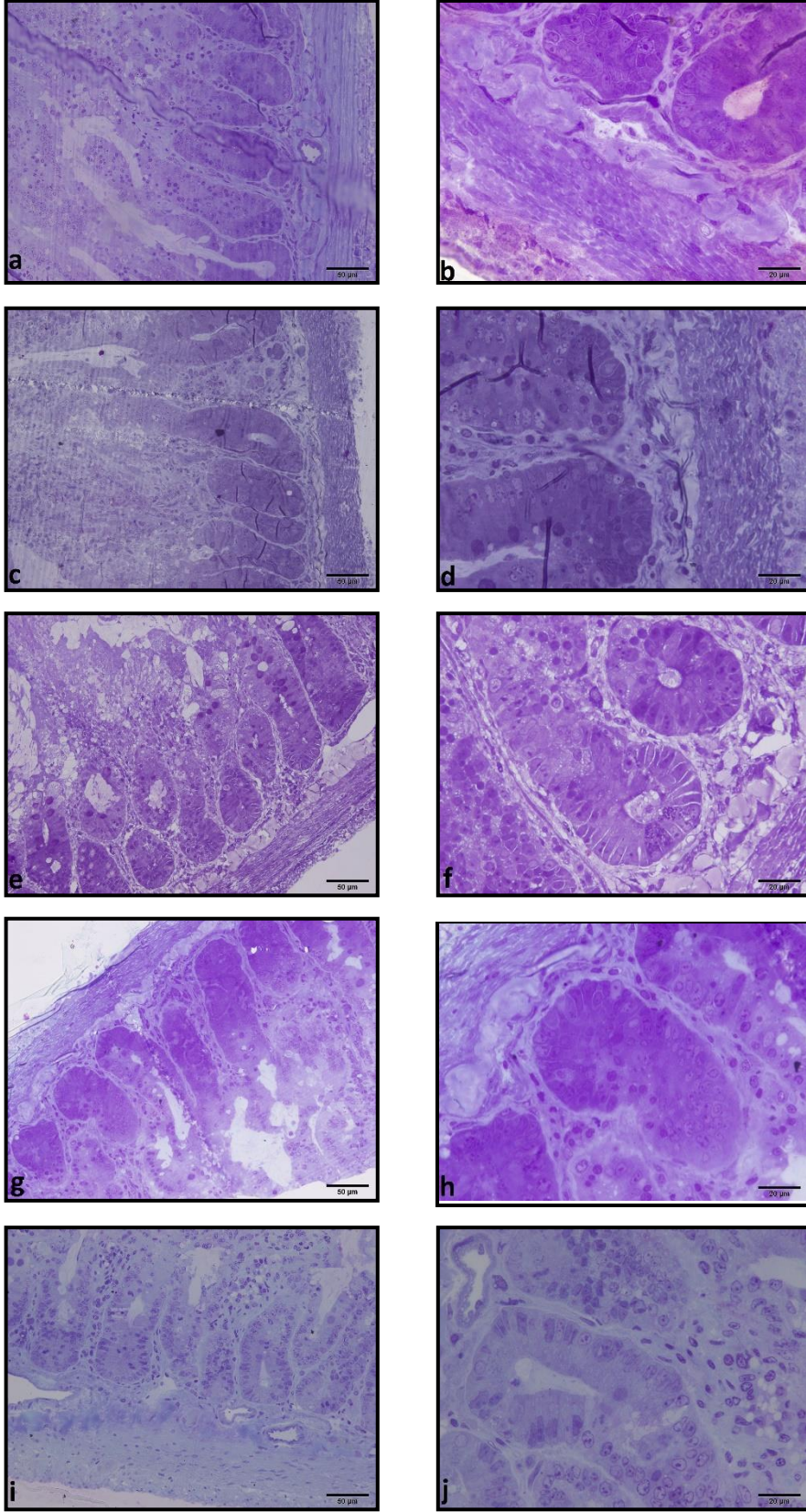
II. Grup kapsamında sodyum hidroksit ile etching sonrası yarı ince epon kesitlerde çalışılan ince bağırsak (Şekil 10e,f) ve pankreas (Şekil 11e,f) dokularına ait toluidine blue (borakslı) boyamalarında; her iki dokuda da litik dejenerasyon benzeri görüntüler izlendi. Mavi-mor ve tonlarında boyanan sitoplazma ve nukleus ayrımı belirgin değildi. Nuklear detaylar seçilemedi. İnce bağırsaktaki mor-viyole renkteki goblet hücreleri ile Paneth hücrelerinin ayrımı mümkün oldu. Pankreastaki endokrin bölümler, ekzokrin komponentlerden ayırt edilmekle birlikte hücrelerde şişme olduğu görüldü. Ekzokrin seröz asinar hücre granülleri ayırt edilemedi.

III. Grup kapsamında peryodik asit ile etching sonrası yarı ince epon kesitlerde çalışılan ince bağırsak (Şekil 10g,h) ve pankreas (Şekil 11g,h) dokularına ait toluidine blue (borakslı) boyamalarında; her iki dokuda da litik dejenerasyon ve bulanıklaşma şeklindeki görüntüler nedeniyle mavi-mor ve tonlarında boyanan hücrel ve nuklear detaylar net olarak seçilemedi. İnce bağırsaktaki goblet hücreleri ayırt edilebilmekle birlikte Paneth hücreleri ve ekzokrin pankreastaki seröz asinar hücre granülleri net olarak izlenemedi.

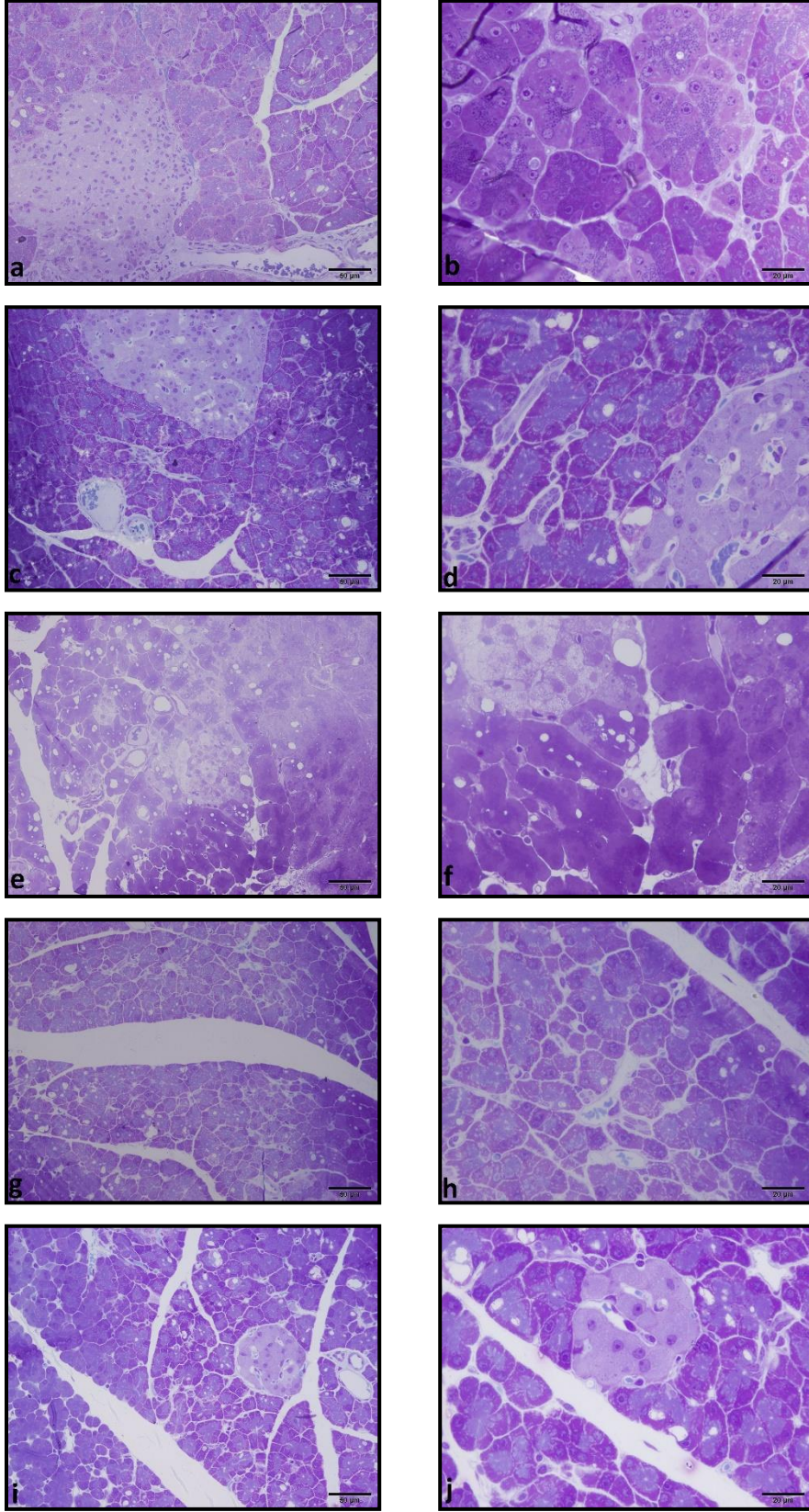
IV. Grup kapsamında aseton ile etching sonrası yarı ince epon kesitlerde çalışılan ince bağırsak (Şekil 10i,j) ve pankreas (Şekil 11i,j) dokularına ait toluidine blue (borakslı) boyamalarında; konvansiyonel borakslı toluidine blue boyaması sonuçlarına benzer görüntüler izlendi. Mavi-mor ve tonlarında boyanan sitoplazma ve nukleus ayrımı, nuklear detaylar, pankreastaki endokrin bölümler kolaylıkla ayırt

edildi. Ekzokrin seröz asinar hücre granülleri çok net ayırt edilemedi. Mor-viyole renkte boyanan mukus içeriği ile ince bağırsaktaki goblet hücreleri ve Paneth hücrelerinin ayrımı mümkün oldu.

Bulgularımız doğrultusunda toluidine blue ile tekli boyama; (a) parafin kesitlerde pankreasta genel morfoloji hakkında az da olsa histolojik detay vermekle birlikte ince bağırsakta olumsuz olarak değerlendirildi. İki dokuda da ek bir avantaj sağlamadığı düşünüldü. (b) Yarı ince epon kesitlerde her iki dokuda beş ayrı uygulamada da; konvansiyonel epon kesit boyası olarak çok üstün histolojik detaylar sağladı. Toluidine blue'nun epon kesitlerdeki monokromatik beş deneme sonucunda her iki dokuda da; aseton ile etching sonrası yapılan borakslı toluidine blue boyamalarının, etching uygulanmadan konvansiyonel borakslı boyamalara eşdeğer olduğu hatta daha berrak ve detay sağladığı şeklinde değerlendirildi.



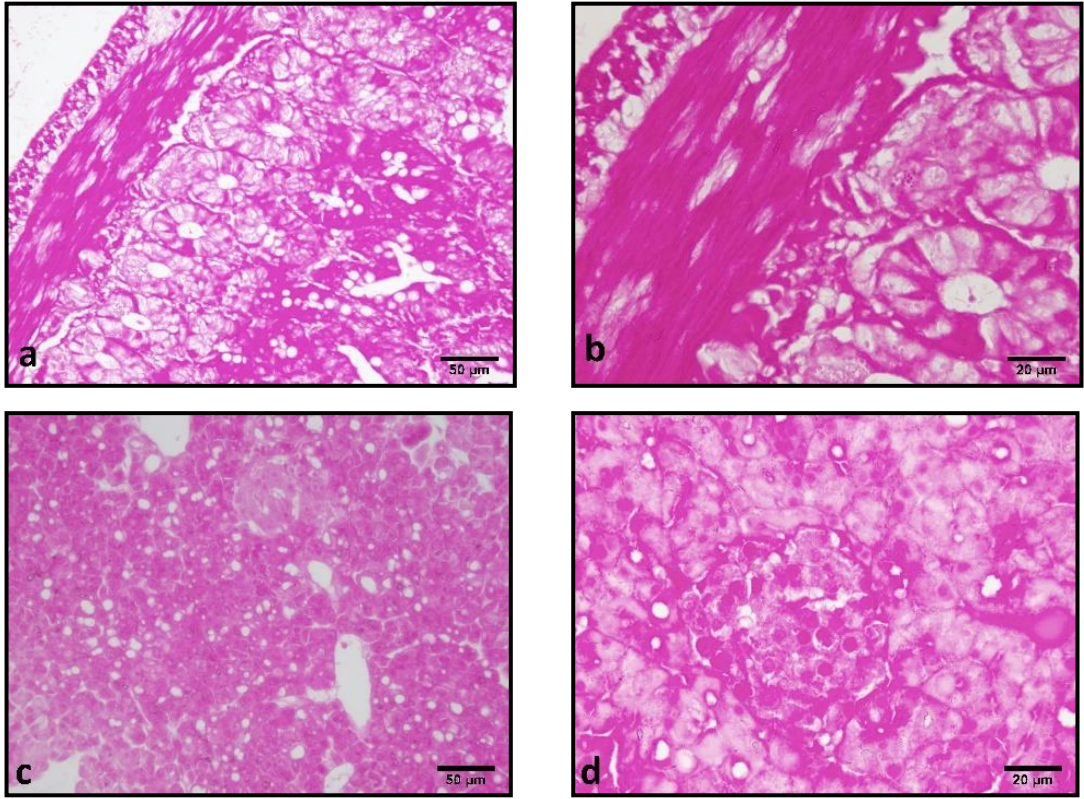
Şekil 10. İnce bağırsağın yarı ince epon kesitlerinde non-etching ve boraksız (a,b), non-etching ve boraklı (c,d), NaOH ile etching ve boraklı (e,f), Peryodik asit ile etching ve boraklı (g,h), Aseton ile etching ve boraklı (i,j) Toluidine blue boyamaları.



Şekil 11. Pankreas dokusu yarı ince epon kesitlerinde non-etching ve boraksız (a,b), non-etching ve boraklı (c,d), NaOH ile etching (e,f), Peryodik asit ile etching (g,h), Aseton ile etching (i,j) sonrası Toluidine blue boyamaları.

4.1.7. Parafin kesitlerde Asit fuksin boyama sonuçları

Asit fuksin ile boyanan ince bağırsak kesitlerinde; tekdüze sklamen renkte-fuksinofilik boyanma gözlemlendi. Ancak daha parlak renkte boyanan granülleri ile Paneth hücreleri ayırt edilebildi (Şekil 12a,b). Pankreasa ait asit fuksin ile boyanan parafin kesitlerde; pembe ile sklamen tonlarındaki heterojen boyanma sonucu endokrin ve ekzokrin alanların ayrımı mümkün oldu (Şekil 12c,d). Ancak iki dokuda da nuklear ayırım yapılamadı.



Şekil 12. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) parafin kesitlerinde Asit fuksin boyaması.

4.1.8. Yarı ince epon kesitlerde Asit fuksin boyama sonuçları

I. Grup kapsamında ince bağırsak ve pankreas dokularına ait etching uygulanmadan yarı ince epon kesitlerde çalışılan asit fuksin boyamalarında sırasıyla; boraksız asit fuksin solüsyonu ile boyamaları (Şekil 13a,b) (Şekil 14a,b), borakslı asit fuksin boyama sonuçları (Şekil 13c,d) (Şekil 14c,d) ile karşılaştırıldı. Pembe ve tonlarında boyanma hakimdi. Boraksız hazırlanan asit fuksin boyama sonuçlarının nukleus-nukleolus yapıları da dahil, daha net detay verdiği görüldü. Özellikle pankreasta sitoplazma ve nukleus ayrımı, nuklear detaylar, endokrin bölümler kolaylıkla ayırt edildi. Ekzokrin seröz asinar hücre granülleri parlak ve canlı sklamen renkte çok net ayırt edildi. İnce bağırsakta her iki tip solüsyon ile soluk boyanmalar elde edildi. Goblet hücreleri boyanmamış görünürken, Paneth hücreleri granülleri sayesinde net olmasa da seçilebildi.

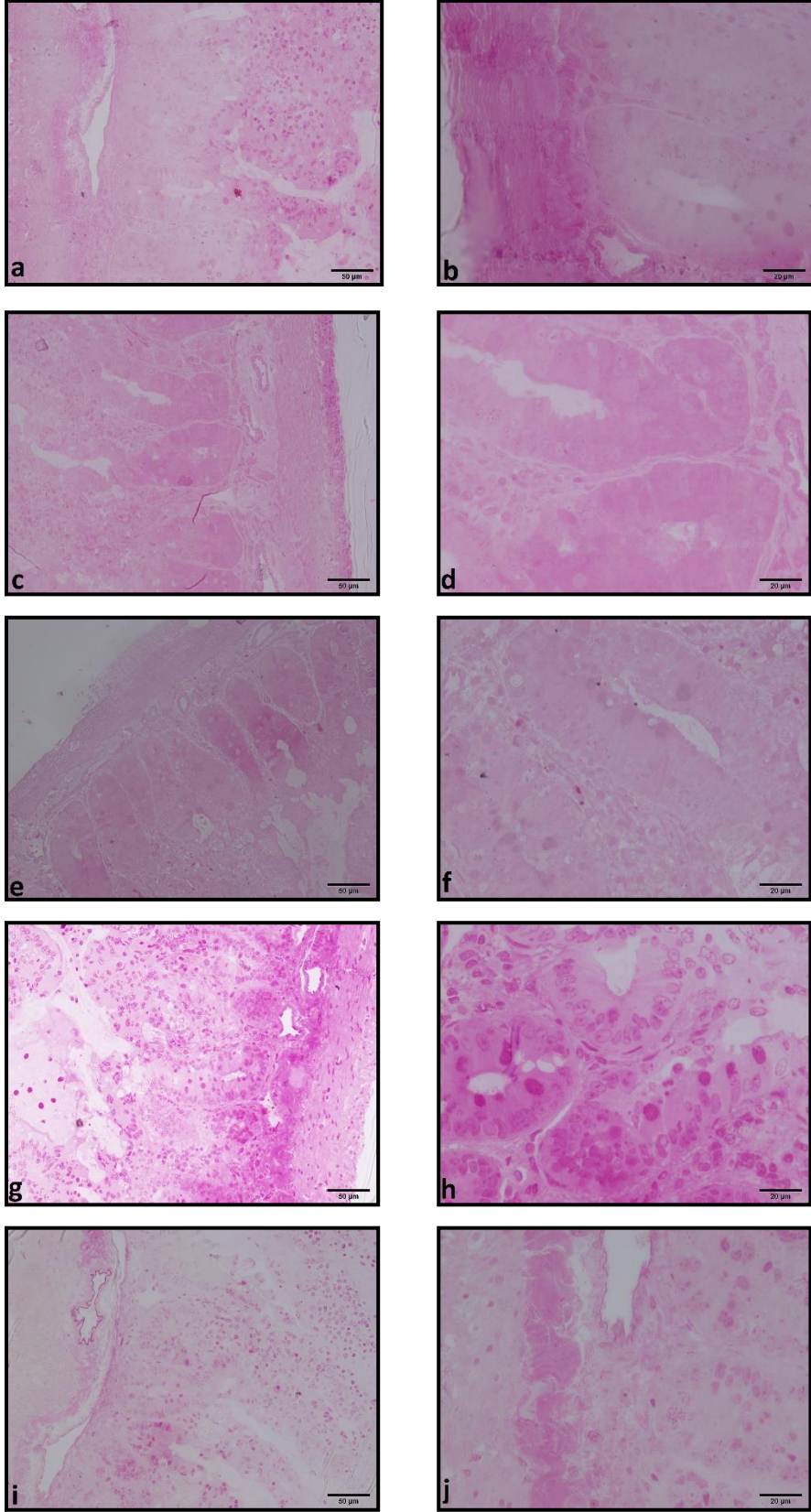
II. Grup kapsamında sodyum hidroksit ile etching sonrası yarı ince epon kesitlerde çalışılan ince bağırsak (Şekil 13e,f) ve pankreas (Şekil 14e,f) dokularına ait asit fuksin boyamalarında; pembe ve tonlarında boyanan her iki dokuda da litik dejenerasyon benzeri görüntüler izlendi. Sitoplazma ve nukleus ayrımı belirgin değildi. Pankreastaki endokrin bölümler, ekzokrin komponentlerden ayırt edilmekle birlikte hücrelerde şişme olduğu görüldü. Ekzokrin seröz asinar hücre granüllerinin kesitin her alanında homojen boyanmadığı izlendi. İnce bağırsaktaki goblet hücreleri ve Paneth hücreleri net olarak seçilemedi.

III. Grup kapsamında peryodik asit ile etching sonrası yarı ince epon kesitlerde çalışılan ince bağırsak (Şekil 13g,h) ve pankreas (Şekil 14g,h) dokularına ait asit fuksin boyamalarında; pembe ve tonlarında boyanan sitoplazma ve nukleus ayrımı ve nuklear detaylar net olarak gözlemlendi. İnce bağırsakta goblet hücreleri, ekzokrin pankreastaki seröz asinar hücre granülleri parlak ve canlı sklamen renkte spesifik olarak kolaylıkla ayırt edildi.

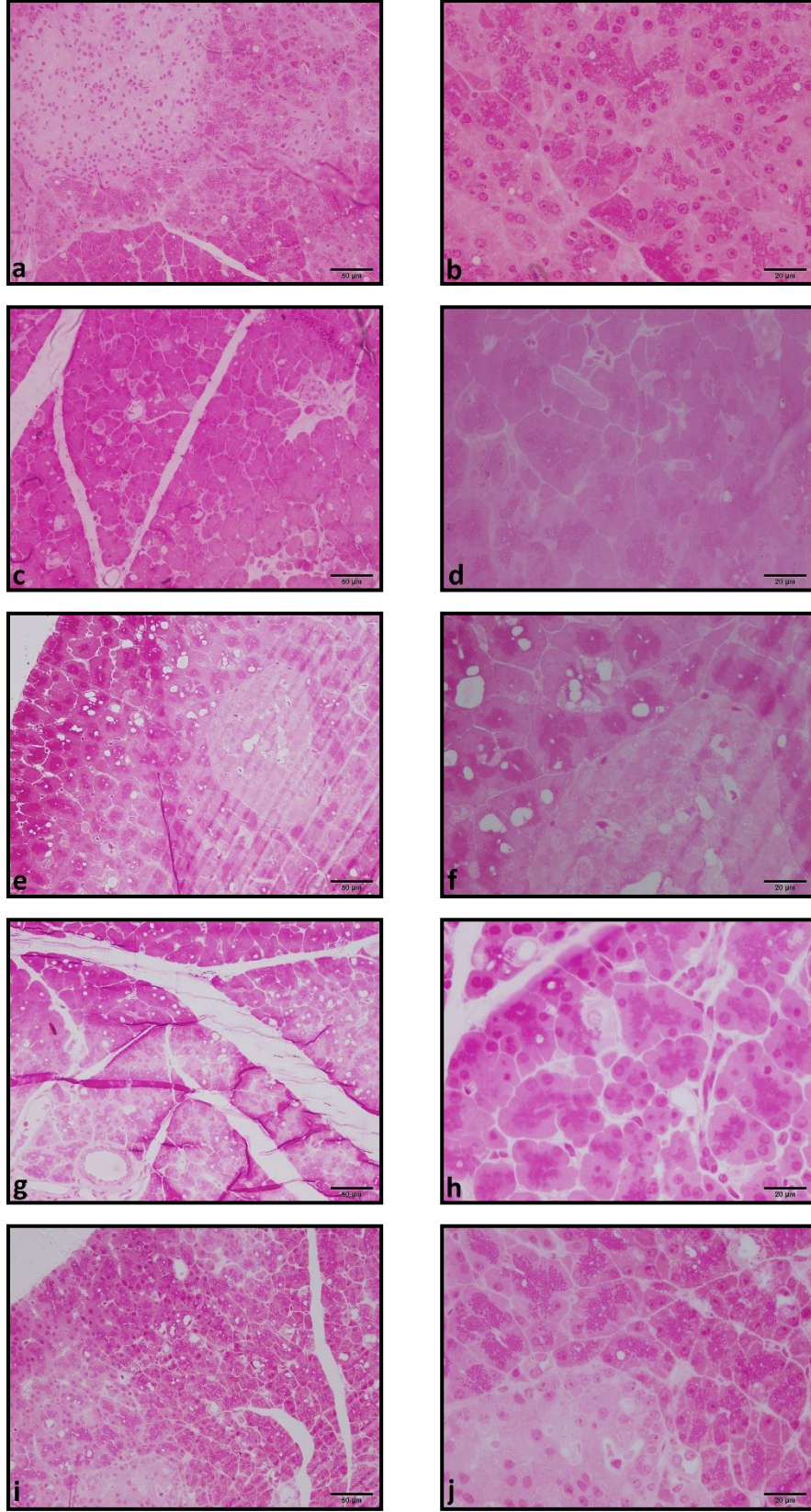
IV. Grup kapsamında aseton ile etching sonrası yarı ince epon kesitlerde çalışılan ince bağırsak (Şekil 13i,j) ve pankreas (Şekil 14i,j) dokularına ait asit fuksin boyamalarında; pembe ve tonlarında boyanan sitoplazma ve nukleus ayrımı yapılabildi. Özellikle pankreasta sitoplazma ve nukleus ayrımı, nuklear detaylar, endokrin bölümler kolaylıkla ayırt edildi. Ekzokrin seröz asinar hücre granülleri

parlak ve canlı sklamen renkte çok net ayırt edildi. İnce bağırsakta daha soluk boyanma elde edildi. Goblet hücreleri seçilemediği halde Paneth hücreleri ayırt edilmekteydi.

Bu sonuçlar doğrultusunda asit fuksin ile tekli boyama; (a) parafin kesitlerde eozin sonuçlarına benzer olarak, genel morfoloji ve doku ayırımında yeterli bulunmadı. (b) İnce bağırsak yarı ince epon kesitlerinde, peryodik asit sonrası boyama özellikle goblet hücre ayırımını sağlamada başarılı olarak değerlendirildi. Pankreas kesitlerinde ise; etching uygulanmadan boraksız asit fuksin boyaması, peryodik asit ve aseton etchingi sonrası verdiği detaylar doğrultusunda kullanılabileceği düşünüldü.



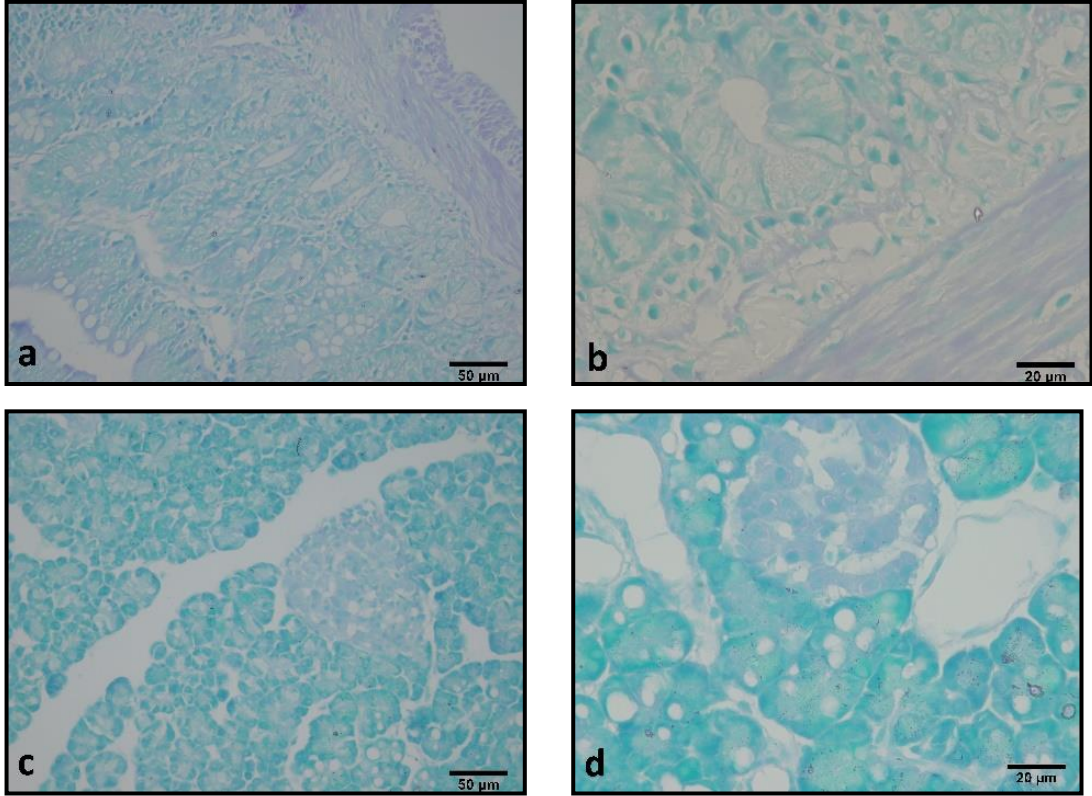
Şekil 13. İnce bağırsağın yarı ince epon kesitlerinde non-etching ve boraksız (a,b), non-etching ve boraklı (c,d), NaOH ile etching (e,f), Peryodik asit ile etching (g,h), Aseton ile etching (i,j) sonrası Asit fuksin boyamaları.



Şekil 14. Pankreas dokusu yarı ince epon kesitlerinde non-etching ve boraksız (a,b), non-etching ve borakslı (c,d), NaOH ile etching (e,f), Peryodik asit ile etching (g,h), Aseton ile etching (i,j) sonrası Asit fuksin boyamaları.

4.1.9. Parafin kesitlerde Metil green boyama sonuçları

Metil green ile boyanan ince bağırsak görüntülerinde; epitelyal komponentler ve lifler yeşil renkte, düz kas hücreleri ise soluk viyole renkte izlendi. Yeşil refle veren granülleri ile Paneth hücre ayrımı yapılırken, beklenen nuklear boyanma tüm hücre tiplerinde görülmedi (Şekil 15a,b). Pankreas kesitlerinde; ekzokrin asinar hücrelerde canlı yeşil bazal sitoplazma, açık yeşil apikal sitoplazmik boyanma gözlemlendi, nukleus boyanması seçilemedi. Endokrin adacık hücrelerinde soluk viyole sitoplazmalar içinde yeşil nuklear boyanma söz konusuydu (Şekil 15c,d).



Şekil 15. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) parafin kesitlerinde Metil green boyaması.

4.1.10. Yarı ince epon kesitlerde Metil green boyama sonuçları

I. Grup kapsamında ince bağırsak dokusuna uygulanan metil green boyamasında; boraksız solüsyon ile genel morfoloji çok net olmamakla birlikte, yeşil-mavi tonlarında boyanan mukus içeriği ile goblet hücrelerinin ayrımı çok belirgindi (Şekil 16a,b). Borakslı metil green ile boyanan ince bağırsak, mavi tonlarında soluk boyanmış toluidine blue boyamasına benzer olarak değerlendirildi. Goblet hücreleri seçilemezken, Paneth hücreleri ayırt edilebildi (Şekil 16c,d). Pankreas dokusuna uygulanan metil green boyamasında ise; yine borakslı boyama sonuçları toluidine blue renklerine benzerlik göstermekteydi. Seröz hücrelerdeki zimojenik granüller koyu mavi boyanmaları ile, soluk mavi sitoplazma içinde belirgin olarak seçilebildi (Şekil 17c,d). Boraksız solüsyon ile boyanan pankreas kesitlerinde, açık yeşil boyanan asinar hücre sitoplazmasında apikal lokasyonlu ve kontrast oluşturan morumsu-viyole renkteki zimojenik granüller çok çarpıcı olarak izlendi (Şekil 17a,b). Her iki doku ve her iki boyamada nuklear boyanma yetersizdi.

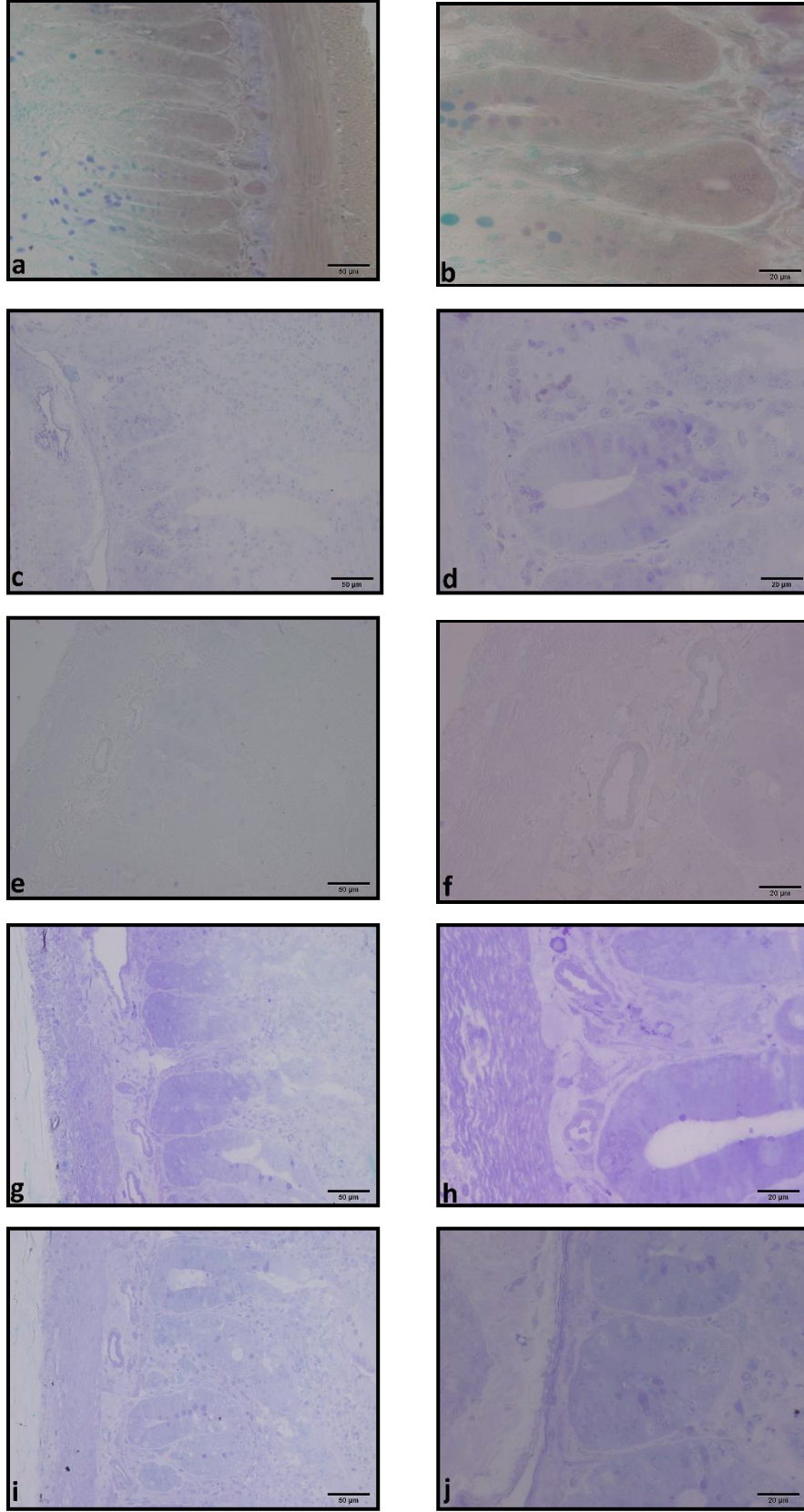
II. Grup kapsamında sodyum hidroksit ile etching sonrası yarı ince epon kesitlerde çalışılan ince bağırsak (Şekil 16e,f) ve pankreas (Şekil 17e,f) dokularına ait metil green boyamasında; çok soluk pembe ve yeşil tonlarındaki yetersiz boyanma nedeniyle doku detayları değerlendirilemedi.

III. Grup kapsamında peryodik asit ile etching sonrası yarı ince epon kesitlerde çalışılan ince bağırsak (Şekil 16g,h) ve pankreas (Şekil 17g,h) dokularına ait metil green boyamasında; yeşil ve mavi-mor tonlarında boyanmalar izlendi. İnce bağırsak soluk boyanmış toluidine blue gibi değerlendirildi. Pankreasta açık yeşil boyanan asinar hücre sitoplazmasında apikal lokasyonlu ve kontrast oluşturan morumsu-viyole renkteki zimojenik granüller belirgin olarak izlenmekle birlikte homojen boyanma görülmedi. Nuklear boyanmalar iki dokuda da yetersizdi.

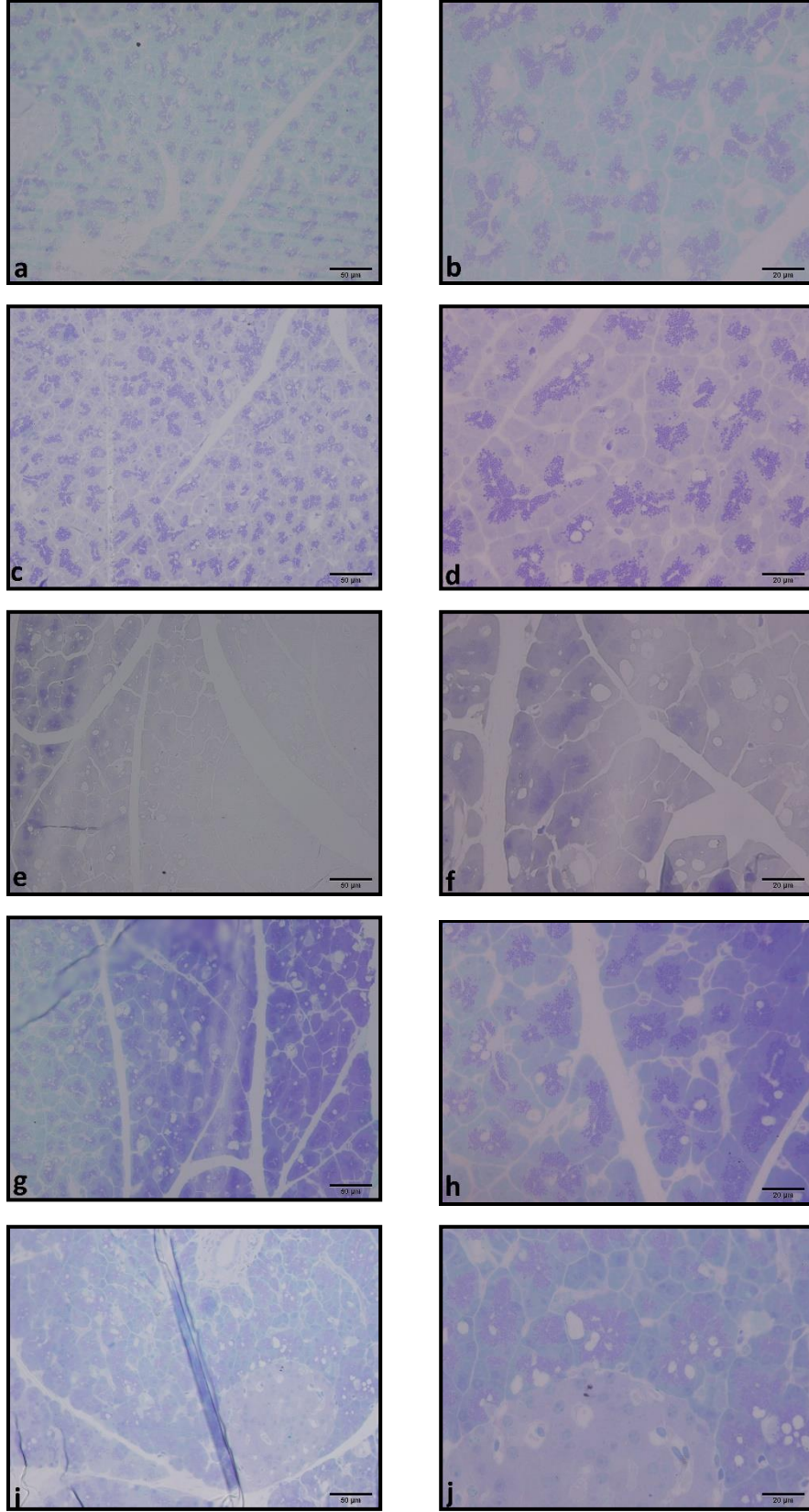
IV. Grup kapsamında aseton ile etching sonrası yarı ince epon kesitlerde çalışılan ince bağırsak (Şekil 16i,j) ve pankreas (Şekil 17i,j) dokularına ait metil green boyamalarında; ince bağırsak soluk boyanmış toluidine blue gibi değerlendirildi. Goblet hücrelerinin mukus içeriği mor-viyole tonlarında izlendi. Pankreasta açık yeşil boyanan asinar hücre sitoplazmasında apikal lokasyonlu ve kontrast oluşturan morumsu-viyole renkteki zimojenik granüller belirgindi. Soluk

pembe renkte boyanmış endokrin adacıklar rahatlıkla ayırt edildi. İki dokuda da mavi-lacivert tonlarında nukleus boyanması ve detayları gözlemlendi. Sonuç olarak pankreasta bu monokromatik boyama ile trikromatik sonuç elde edildi.

Bu gözlemler sonucunda metil green ile tekli boyama; (a) ince bağırsak parafin kesitlerinde genel morfoloji ve doku ayırımına imkan verse de yeterli bulunmadı. Pankreastaki boyanma daha da yetersizdi. (b) İnce bağırsak epon kesitlerinde, peryodik asit ve aseton etchingi sonrası verdiği detaylar doğrultusunda metil green tekli boyamasının tercih edilebileceği düşünüldü. Pankreas kesitlerinde ise; sodyum hidroksit uygulaması sonrası yapılan boyama olumsuz bulundu. Aseton dışındaki diğer uygulamaların, nuklear detaylar eksik olmak üzere kullanılabileceği düşünüldü. Aseton etchingi sonrası ise, soluk olmakla birlikte üç renkte sağladığı detaylar sayesinde tercih edilebileceği düşünüldü.



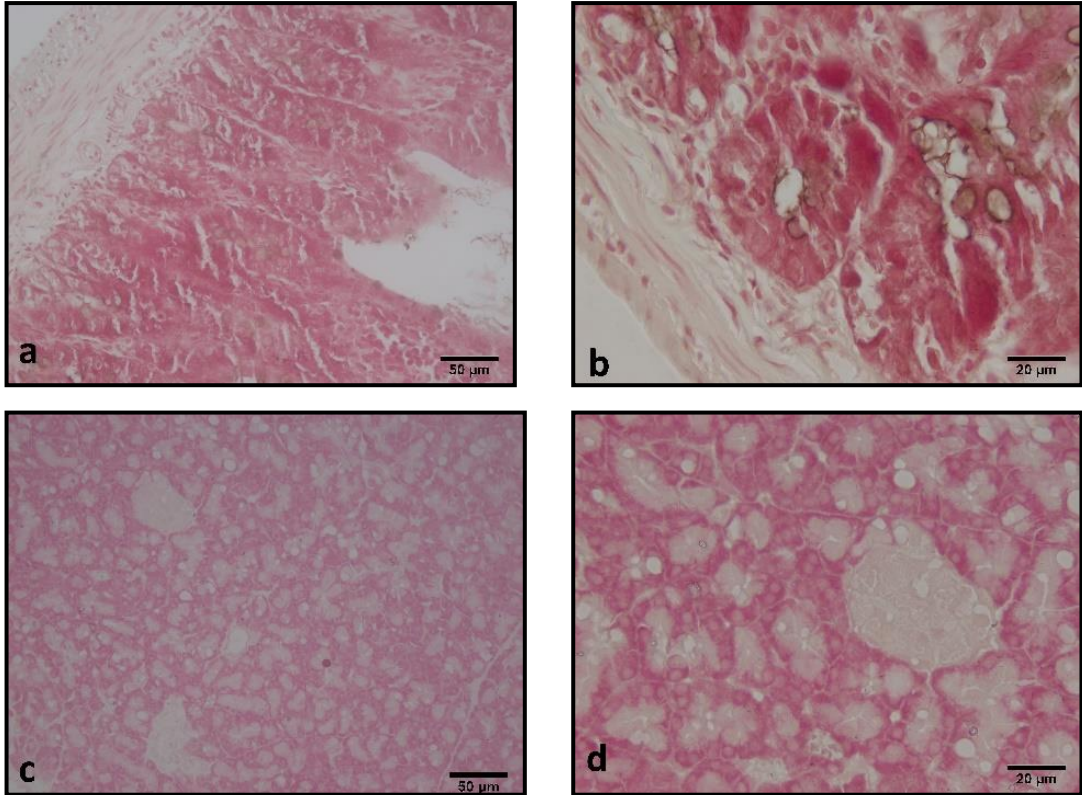
Şekil 16. İnce bağırsağın yarı ince epon kesitlerinde non-etching ve borakssız (a,b), non-etching ve borakslı (c,d), NaOH ile etching (e,f), Peryodik asit ile etching (g,h), Aseton ile etching (i,j) sonrası Metil green boyamaları.



Şekil 17. Pankreas dokusu yarı ince epon kesitlerinde non-etching ve boraksız (a,b), non-etching ve boraklı (c,d), NaOH ile etching (e,f), Peryodik asit ile etching (g,h), Aseton ile etching (i,j) sonrası Metil green boyamaları.

4.1.11. Parafin kesitlerde Nötral red boyama sonuçları

Nötral red ile boyanan ince bağırsak görüntülerinde; epitelyal komponentler koyu kırmızı renkte, düz kas hücrelerinin sitoplazması soluk pembe, nukleusları koyu kırmızı renkte izlendi. Kahverengimsi boyanmaları ile goblet hücre ayırımı yapılabilmekteydi (Şekil 18a,b). Pankreas kesitlerinde soluk pembe endokrin alanlara karşılık, ekzokrin asinar hücrelerde apikal açık pembe ve koyu kırmızımsı bazal sitoplazmik boyanma söz konusuydu. Koyu boyalı bazal sitoplazma içinde detayları görünmemekle birlikte soluk pembe renkteki nukleus ayırımı yapılabilmekteydi (Şekil 18c,d).



Şekil 18. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) parafin kesitlerinde Nötral red boyaması.

4.1.12. Yarı ince epon kesitlerde Nötral red boyama sonuçları

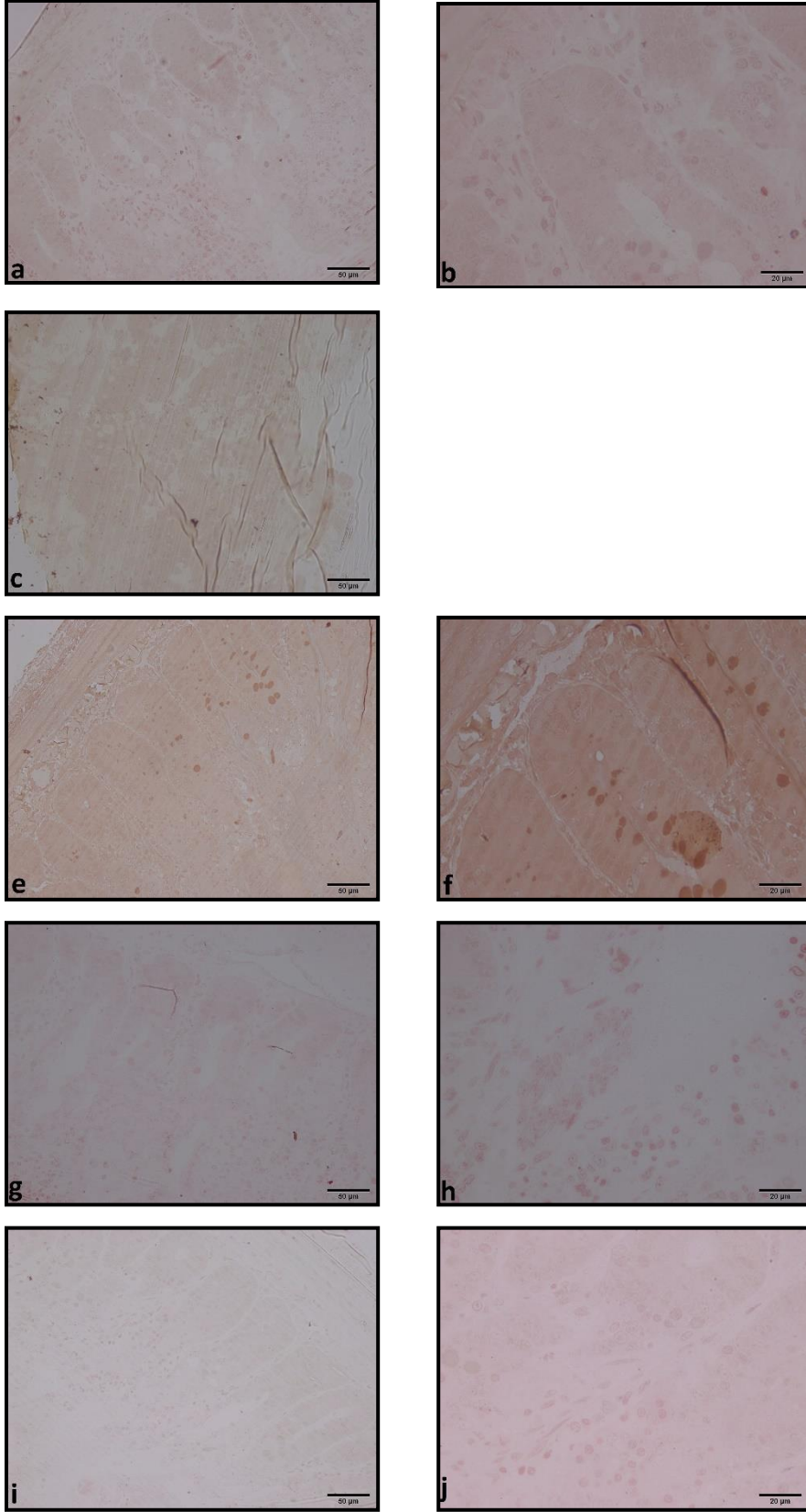
I. Grup kapsamında nötral red boyamasında; boraksız solüsyon ile hem ince bağırsak (Şekil 19a,b), hem de pankreasta (Şekil 20a,b) çok soluk tonda pembe boyanma elde edildi. İnce bağırsakta genel morfoloji ve goblet hücre ayrımı, pankreasta endokrin alan ile ekzokrin asinar yapıların ayrımı izlendi. Borakslı nötral red solüsyonu ile her iki dokuda da (Şekil 19c; Şekil 20c,d) boyanmalar ve morfoloji olumsuz olarak değerlendirildi. İki tip solüsyon ile iki dokuda da nuklear ve sitoplazmik ayrımlar değerlendirilemedi.

II. Grup kapsamında sodyum hidroksit ile etching sonrası yarı ince epon kesitlerde çalışılan nötral red boyamasında; ince bağırsakta soluk kahverengimsi-pembe genel boyanma içerisinde Paneth hücreleri ve özellikle kahverengi boyanan goblet hücreleri çok belirgin olarak ayırt edildi (Şekil 19e,f). Pankreas dokusundaki boyanmalar ve morfoloji olumsuz olarak değerlendirildi (Şekil 20e,f). İki dokuda da nuklear ve sitoplazmik ayrımlar değerlendirilemedi.

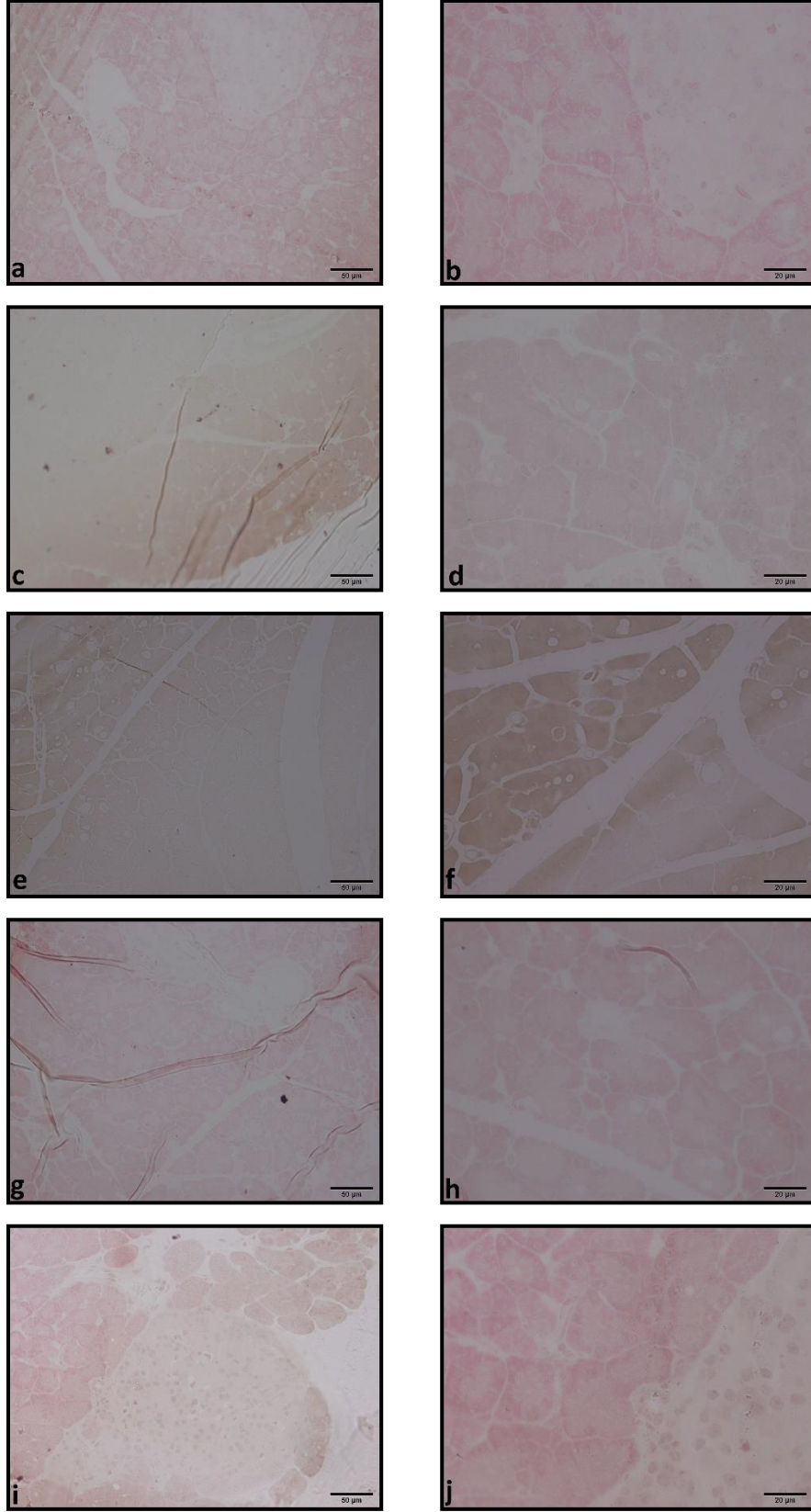
III. Grup kapsamında peryodik asit ile etching sonrası yarı ince epon kesitlerde çalışılan nötral red boyamasında; hem ince bağırsak (Şekil 19g,h), hem de pankreasta (Şekil 20g,h) çok soluk tonda pembe boyanma sağlandı. Doku ayrımı yapılabilmekle birlikte, detaylar belirgin olarak görülemedi.

IV. Grup kapsamında aseton ile etching sonrası yarı ince epon kesitlerde çalışılan nötral red boyamasında; her iki dokuda çok soluk tonda pembe boyanma elde edildi. İnce bağırsakta genel morfoloji ve goblet hücre ayrımı (Şekil 19i,j), pankreasta endokrin alan ile ekzokrin asinar yapıların ayrımı (Şekil 20i,j) yapılabildi. Soluk olmakla birlikte iki dokuya ait nukleuslar seçilebildi.

Sonuçlarımız doğrultusunda nötral red ile tekli boyama; (a) ince bağırsak parafin kesitlerinde genel morfoloji ve doku ayrımını yeterince sağlamadığı için olumlu bulunmadı. Pankreasta daha fazla histolojik detay izlenmekle birlikte rutinde kullanılmasının uygun olmadığı düşünüldü. (b) İnce bağırsak epon kesitlerinde, tüm uygulamaların sonuçları olumsuz olarak değerlendirildi. Pankreas kesitlerinde ise; aseton etchingi sonrası soluk olmakla birlikte detaylar seçilebilmekteydi. Buna rağmen histolojik açıdan ek bir katkısı olmadığı düşünüldü.



Şekil 19. İnce bağırsağın yarı ince epon kesitlerinde non-etching ve boraksız (a,b), non-etching ve boraklı (c), NaOH ile etching (e,f), Peryodik asit ile etching (g,h), Aseton ile etching (i,j) sonrası Nötral red boyamaları.



Şekil 20. Pankreas dokusu yarı ince epon kesitlerinde non-etching ve borakssız (a,b), non-etching ve borakslı (c,d), NaOH ile etching (e,f), Peryodik asit ile etching (g,h), Aseton ile etching (i,,j) sonrası Nötral red boyamaları.

4.2. DİKROMATİK BOYANMA BULGULARI

Epon kesitlerde kombinasyon uygulamaları, tüm boyamalarda aseton ile epon uzaklaştırıldıktan sonra gerçekleştirildi.

4.2.1. Hematoksilen-Eozin kombinasyonu

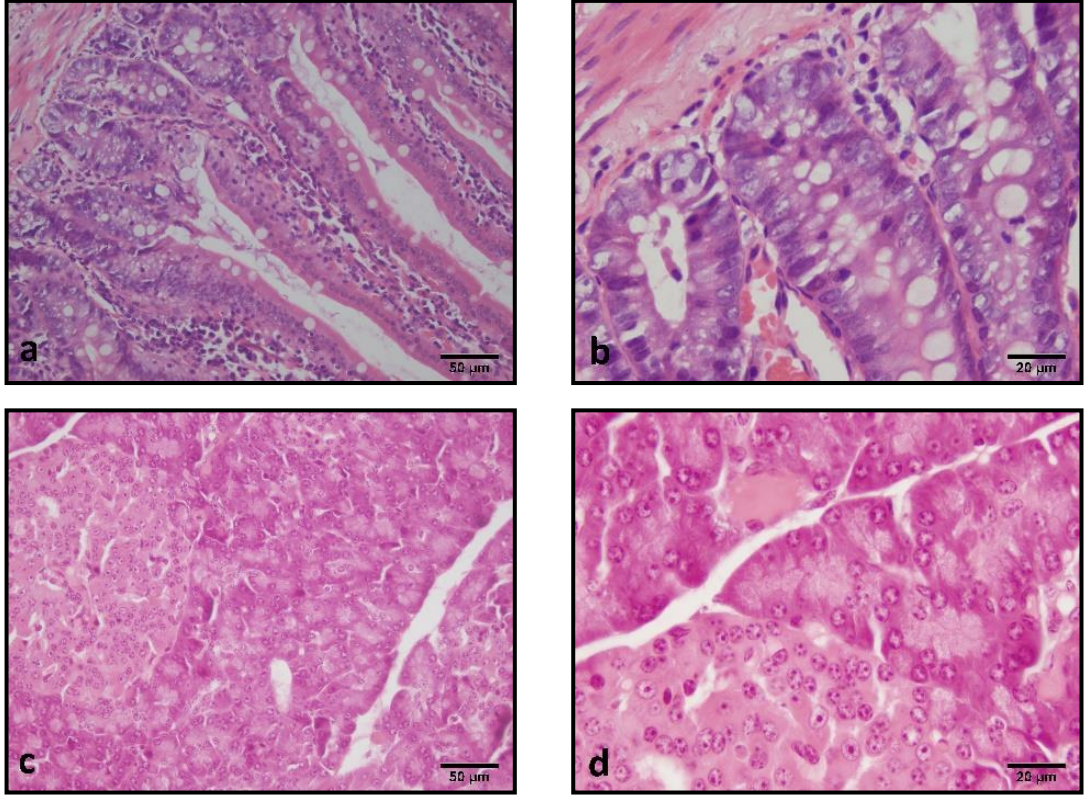
4.2.1.1. Parafin kesitlerde Hematoksilen-Eozin boyama sonuçları

Hematoksilen-eozin kombinasyonu ile boyanan ince bağırsak (Şekil 21a,b) ve pankreas (Şekil 21c,d) dokularında; hematoksilenin nuklear bazofili ve sitoplazmik bazofilik komponentleri klasik beklenti ve bilgilere paralel olarak mavi-lacivert tonlarında boyadığı gözlemlendi. Eozinin ise; asidofilik karakterdeki intra- ve ekstrasellüler komponentlerin pembe ve tonlarında boyanmasını istenen düzeyde sağladığı görüldü. Her iki dokuda da genel morfoloji net olarak ayırt edildi.

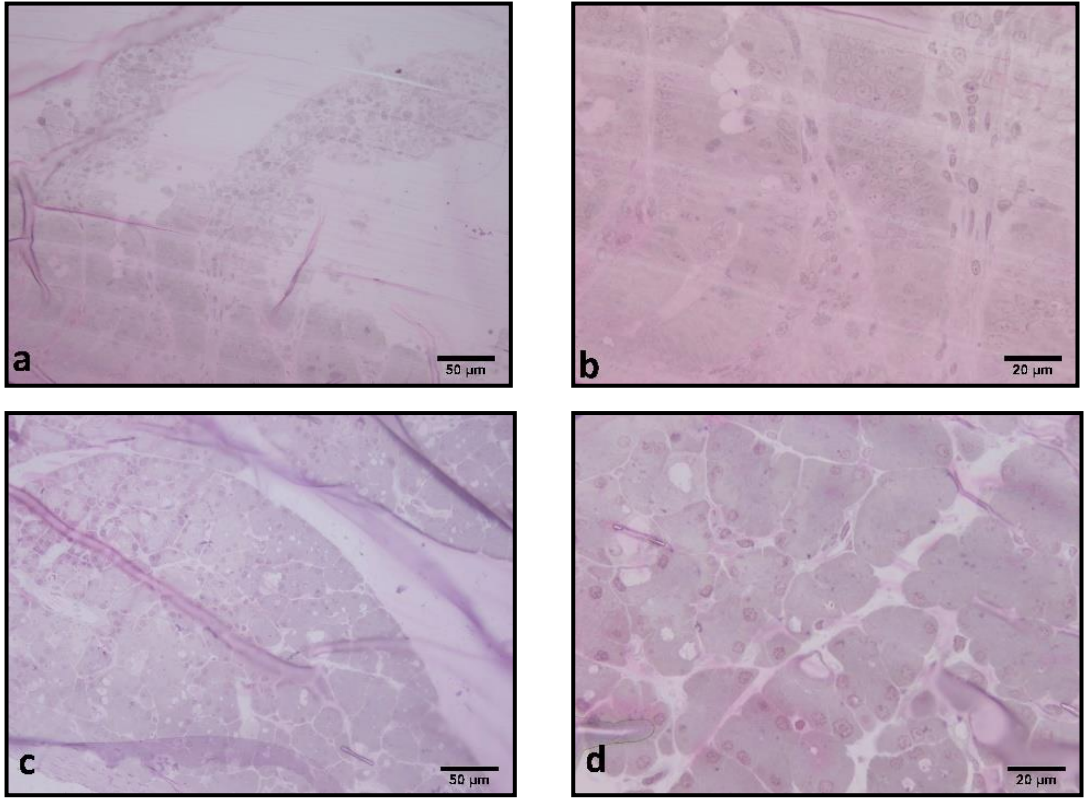
4.2.1.2. Yarı ince epon kesitlerde Hematoksilen-Eozin boyama sonuçları

İnce bağırsak boyamalarında istenen kontrast ve detaylar gözlenmedi (Şekil 22a,b). Pankreas boyamalarında ise; eozinin çok etkinlik gösteremediği görüldü. Parafin kesitlerdeki Hematoksilen&Eozin boyanmasının daha soluk tonları şeklinde değerlendirildi (Şekil 22c,d).

Bu sonuçlar doğrultusunda Hematoksilen-Eozin kombinasyonu ile boyamada; (a) ince bağırsak ve pankreasa ait parafin kesitlerde genel morfolojiyi değerlendirmek anlamında tamamen klasik bilgilerle paralellik söz konusuydu. (b) İnce bağırsak epon kesitlerinde, boyama olumsuz bulundu. Pankreas dokusunda da çok soluk tonlar nedeniyle kontrast ve detay vermediği düşünüldü. Epon kesit boyamasında bir avantaj sağlamadığı şeklinde yorumlandı.



Şekil 21. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) parafin kesitlerinde Hematoksilen-Eozin boyaması.



Şekil 22. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) yarı ince epon kesitlerinde Hematoksilen-Eozin boyaması.

4.2.2. Toluidine blue kombinasyonları

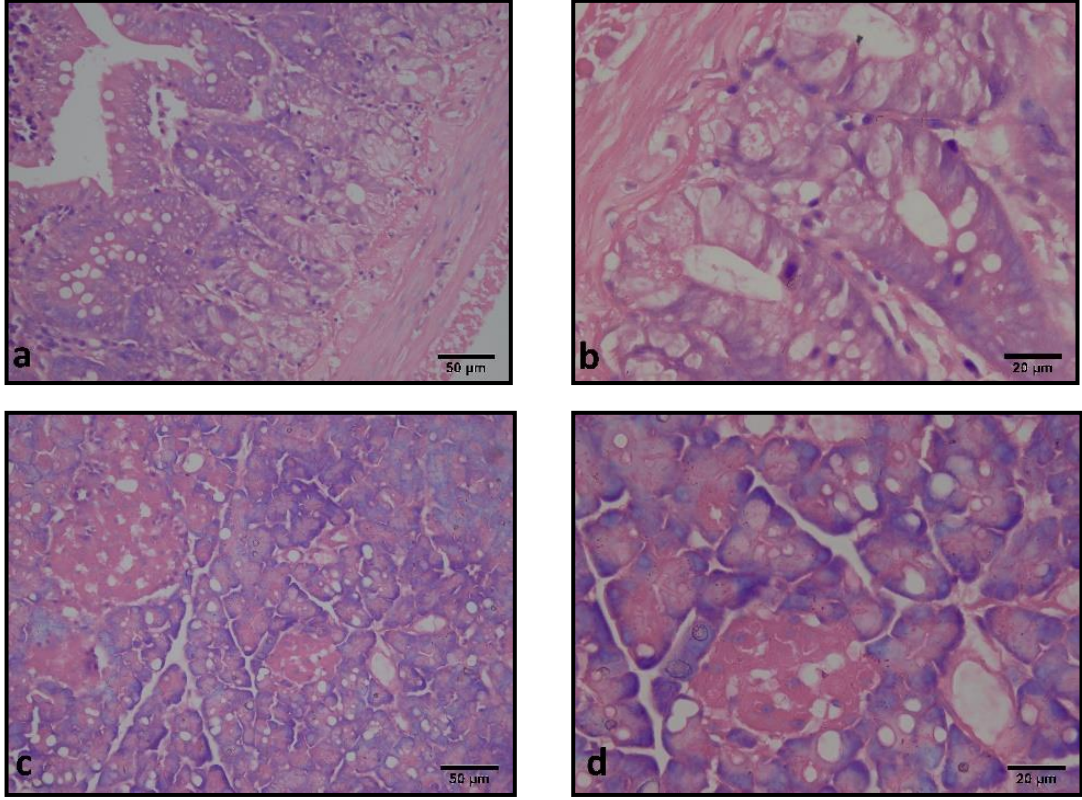
4.2.2.1. Parafin kesitlerde Toluidine blue-Eozin boyama sonuçları

İnce bağırsak yapısında genel görünüm, hematoksilen-eozin boyamasına eşdeğer bulundu. Toluidine blue'nun hematoksilen yerine davranan boya olarak nukleus ve bazofilik komponentlerde lacivert renkte boyanma sağladığı görüldü. Diğer sitoplazmik ve ekstrasellüler matriks komponentleri ise eozin tarafından pembe tonlarında boyanmıştı (Şekil 23a,b). Pankreas yapısında; endokrin bölümler eozin ile canlı pembe alanlar olarak ayırt edildi. Ekzokrin asinuslarda ise; toluidine blue tarafından boyanmış bazal sitoplazmadaki dar bir lacivert şerit, eozin ile pembe renkte sitoplazmik boyanma izlendi. Pankreasta tüm nukleusların toluidine blue ile lacivert boyandığı görüldü (Şekil 23c,d).

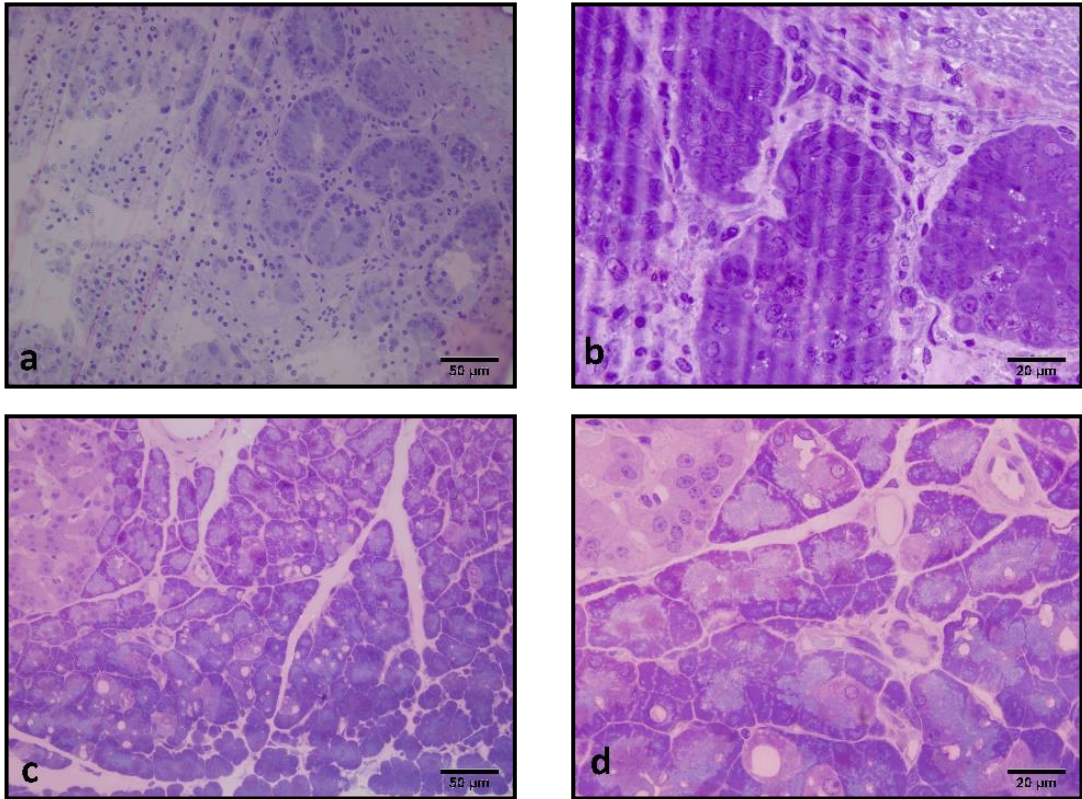
4.2.2.2. Yarı ince epon kesitlerde Toluidine blue-Eozin boyama sonuçları

İnce bağırsak ve pankreas dokularına ait epon kesitlerin toluidine blue-eozin ikili boyamalarında; toluidine blue ile morumsu lacivert ile ona eşlik eden eozinin pembe-viyole renk etkisi izlendi. İnce bağırsakta; mavi-viyole tonlarında sitoplazmik boyanmalar, mor-lacivert nukleuslar ve detayları gözlemlendi (Şekil 24a,b). Soluk pembe boyanan sitoplazma ile lacivert-mor renkteki nuklear detaylar sayesinde pankreastaki endokrin bölümler kolaylıkla ayırt edildi. Ekzokrin asinar hücrelerde; mor-viyole renkte boyanan bazal sitoplazmik alan, burada lokalize lacivert nukleuslar ve mavimsi-pembe refle veren zimojenik granüllerin yerleştiği apikal sitoplazma birbirinden çok net olarak ayırt edildi (Şekil 24c,d).

Bu bulgular sonucunda toluidine blue-eozin kombinasyonu ile boyamanın; (a) ince bağırsak ve pankreasa ait parafin kesitlerde hematoksilen-eozin kombinasyonu yerine kullanılabilmesi sonucu çıkarıldı. (b) İnce bağırsak epon kesitlerinde, toluidine blue ile tekli boyama sonuçlarına bir üstünlük sağlamadığı düşünüldü. Bununla birlikte pankreas dokusunda toluidine blue'ya kontur boyama etkisi ile eozin tarafından sağlanan pembe eozinofili, anlamlıydı. Hematoksilen-eozin ile boyanmış pankreas parafin kesitlerine eşdeğer renkler ve daha ince detaylar sağlanması sayesinde, bu kombinasyonun pankreas dokusunda kullanılmasının yararlı olacağı sonucuna varıldı.



Şekil 23. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) parafin kesitlerinde Toluidine blue-Eozin boyaması.



Şekil 24. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) yarı ince epon kesitlerinde Toluidine blue-Eozin boyaması.

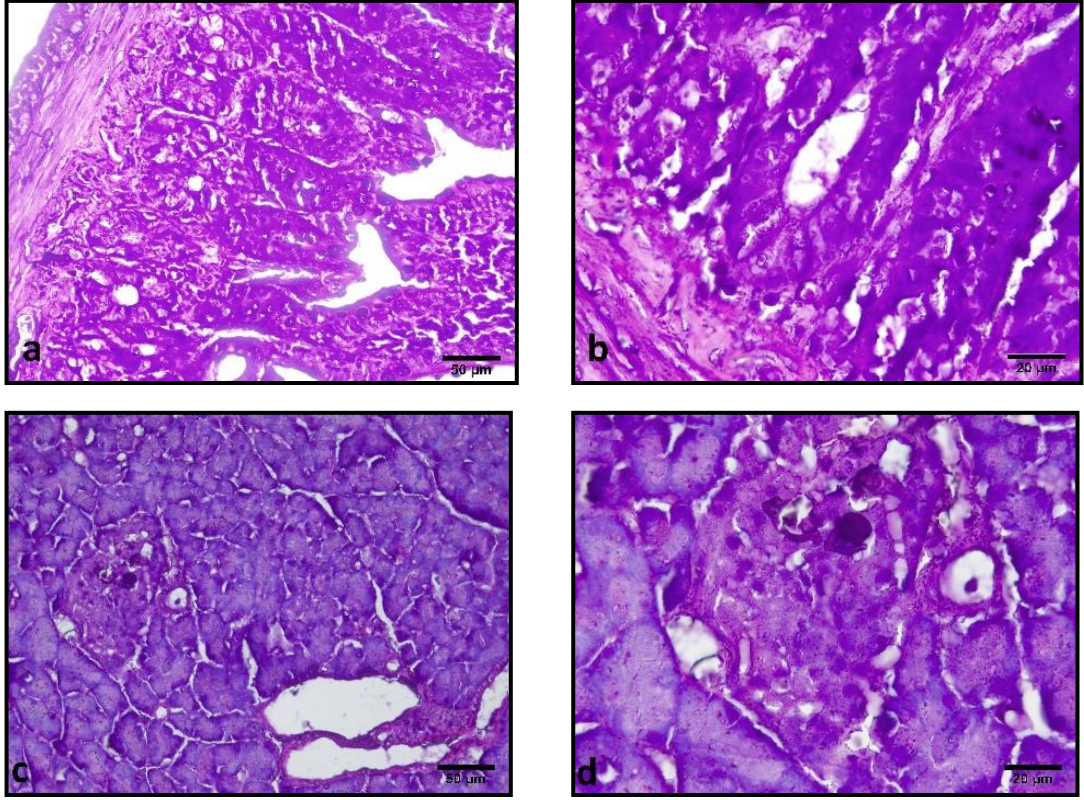
4.2.2.3. Parafin kesitlerde Toluidine blue-Asit fuksin boyama sonuçları

Bu kombinasyon ile boyanan ince bağırsak (Şekil 25a,b) ve pankreas (Şekil 25c,d) dokularında; asit fuksinin dominans gösterdiği ve sklamen rengin hakimiyeti gözlemlendi. Toluidine blue'nun ince bağırsakta goblet hücrelerinin, pankreasta bazal sitoplazmanın bazofilik boyanmasına neden olduğu düşünüldü. İki dokuda da nuklear ayırım net olarak yapılamadı.

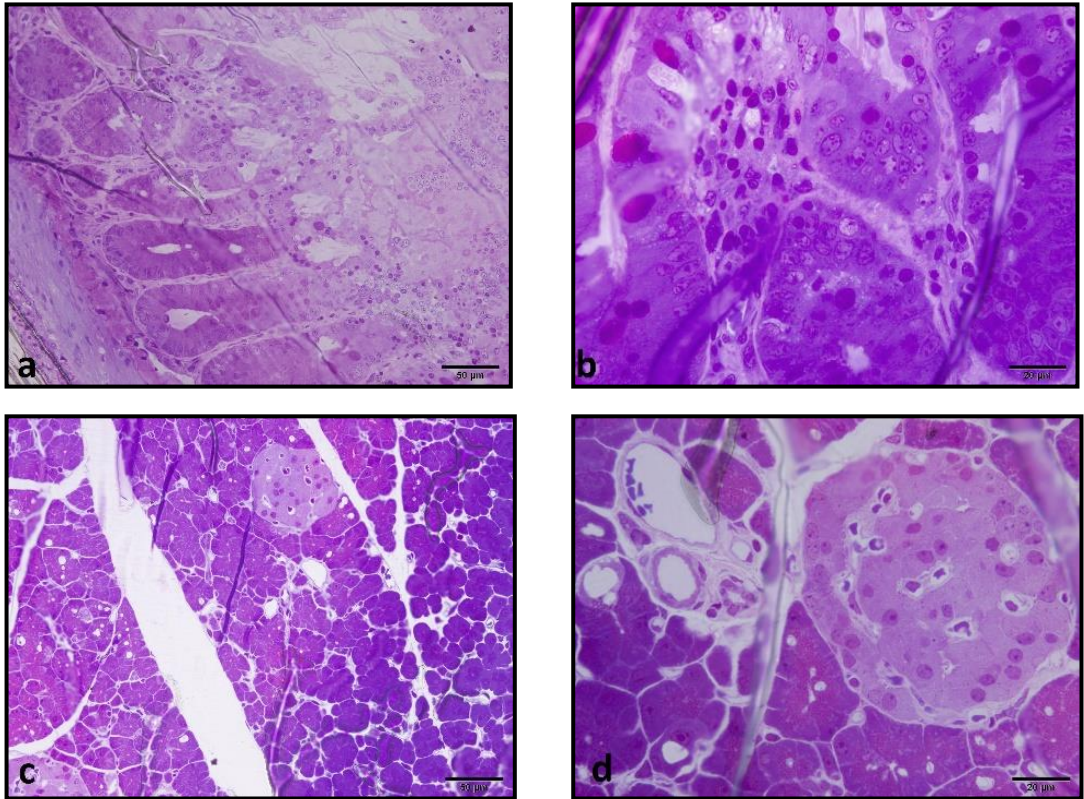
4.2.2.4. Yarı ince epon kesitlerde Toluidine blue-Asit fuksin boyama sonuçları

İnce bağırsak ve pankreas dokularına ait epon kesitlerin toluidine blue-asit fuksin ikili boyamalarında; genel olarak toluidine blue boyaması sonuçlarına benzer görüntüler izlendi. Ancak morumsu lacivert yerine asit fuksine bağlı olarak sklamen renginin de etkisi izlendi. İnce bağırsakta; sklamen-mor tonlarında sitoplazmik boyanmalar, mor-viyole nukleuslar ve detayları ve de canlı sklamen rengi mukus içeriği ile kolaylıkla ayırdedilen goblet hücreleri gözlemlendi (Şekil 26a,b). Soluk viyole-pembe boyanan sitoplazma ve nukleus ayırımı, nuklear detaylar ile pankreastaki endokrin bölümler kolaylıkla ayırt edildi. Ekzokrin seröz asinar hücre granülleri sklamen renkleri ile çok net ayırt edildi. Mor-viyole renkte boyanan bazal sitoplazmik alan ve burada lokalize nukleuslar arasında kontrast olmadığından ayırımları çok net yapılamadı (Şekil 26c,d).

Bu bulgulara bağlı olarak toluidine blue-asit fuksin ikili kombinasyonu; (a) ince bağırsak ve pankreasa ait parafin kesitlerde özel bir avantaj sağlamadığı için, kullanılmasının anlamlı olmadığı şeklinde yorumlandı. (b) Her iki dokunun epon kesitlerinde toluidine blue'ya kontur boyama etkisi ile asit fuksin tarafından sağlanan pembe-sklamen tonlarındaki eozinofili, kombinasyonun üstünlüğü olarak değerlendirildi. Kontrast renkleri ve daha ince detaylar sağlanması sayesinde, bu kombinasyonun epon kesitlerde kullanılmasının yararlı olacağı düşünüldü.



Şekil 25. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) parafin kesitlerinde Toluidine blue-Asit fuksin boyaması.



Şekil 26. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) yarı ince epon kesitlerinde Toluidine blue-Asit fuksin boyaması.

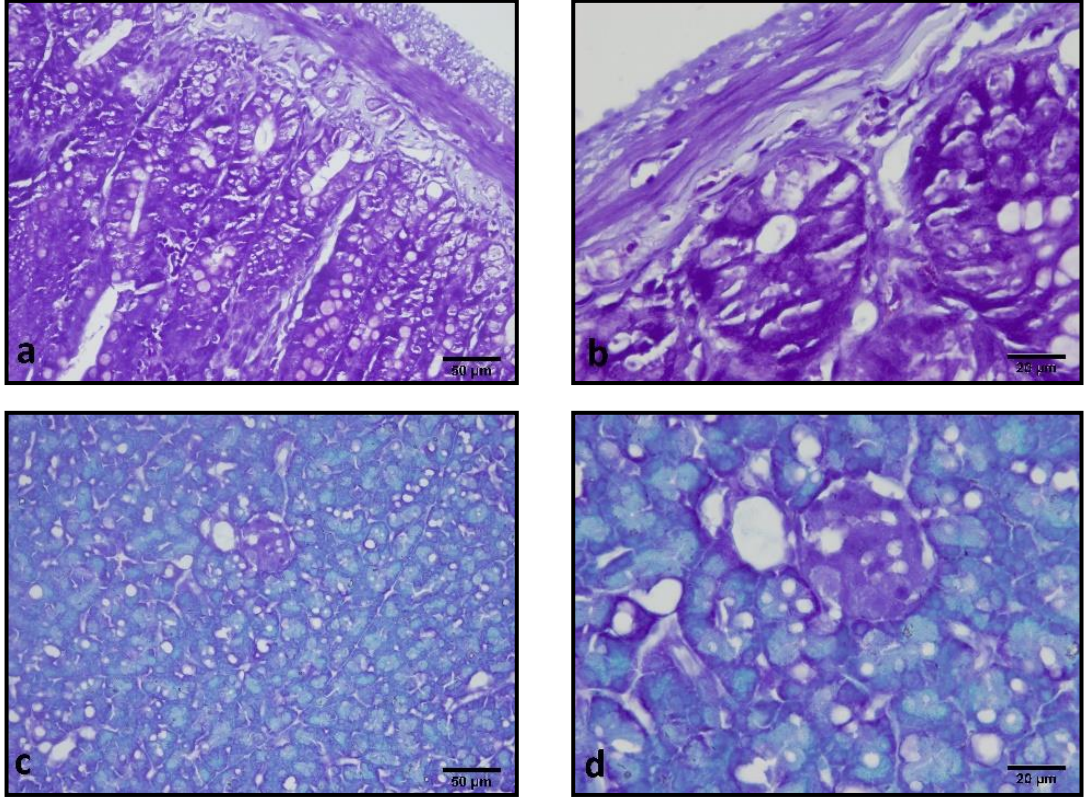
4.2.2.5. Parafin kesitlerde Toluidine blue-Metil green boyama sonuçları

Bu kombinasyon ile boyanan ince bağırsak yapısında; toluidine blue'nun morumsu-lacivert renk hakimiyetine karşılık, metil green ile çok soluk yeşil tonda bağ doku komponentlerinin renklendiği gözlemlendi (Şekil 27a,b). Pankreas yapısında; endokrin bölümlerde toluidine blue ile koyu tonda nukleuslar, daha açık tonda sitoplazmik boyanma görüldü. Ekzokrin asinuslarda ise; toluidine blue tarafından boyanmış bazal sitoplazmadaki dar bir lacivert şerit dışında, metil green tarafından açık yeşil boyanmış sitoplazmik ve nuklear boyanma izlendi (Şekil 27c,d).

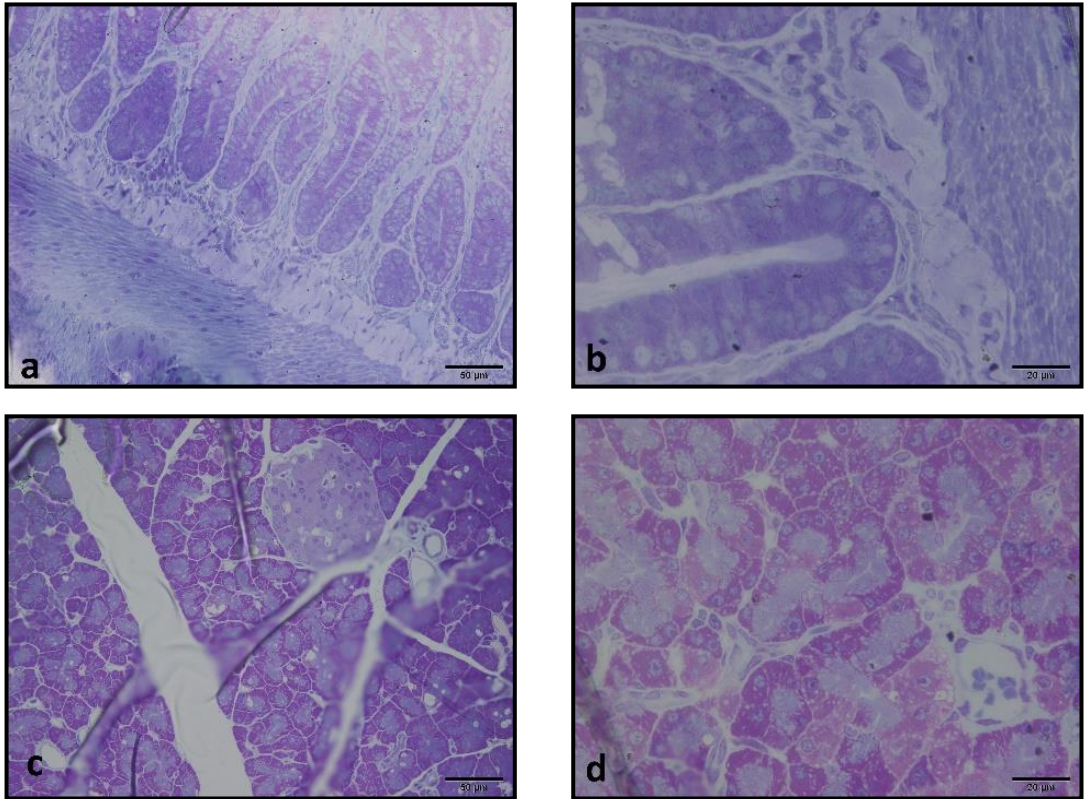
4.2.2.6. Yarı ince epon kesitlerde Toluidine blue-Metil green boyama sonuçları

Bu kombinasyon ile boyanan ince bağırsak yapısında; toluidine blue'nun morumsu-lacivert renk hakimiyetine karşılık, metil green ile çok soluk açık yeşil boyanmış bağ doku komponentleri ile goblet hücreleri gözlemlendi (Şekil 28a,b). Pankreas yapısında; endokrin bölümlerde toluidine blue ile koyu tonda nukleuslar, daha eflatun tonda sitoplazmik boyanma görüldü. Ekzokrin asinuslarda ise; canlı morumsu-pembe boyanmış bazal sitoplazma, metil green tarafından açık mavi-yeşil boyanmış zimojenik granüller ile lacivert ve tonlarında nuklear boyanma izlendi (Şekil 28c,d).

Bu sonuçlar doğrultusunda toluidine blue-metil green ikili kombinasyonunun; (a) ince bağırsak parafin kesitlerinde toluidine blue renginin baskınlığında olup, hematoksilin-eozin kombinasyonuna üstünlük sağlamadığı düşünüldü. Pankreasa ait parafin kesitlerde her ne kadar kontrast ikili boyanma gözlense de ek bir avantaj sağlamadığı sonucuna varıldı. (b) Epon kesitlerde ince bağırsakta bir avantaj sağlamadığı düşünülmeyle birlikte, pankreas dokusunda toluidine blue'ya metil green tarafından sağlanan mavi-yeşil renk kontrastı sayesinde detayların daha rahat identifikasyonuna imkan verdiği için yararlanılabileceği düşünüldü.



Şekil 27. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) parafin kesitlerinde Toluidine blue-Metil green boyaması.



Şekil 28. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) yarı ince epon kesitlerinde Toluidine blue-Metil green boyaması.

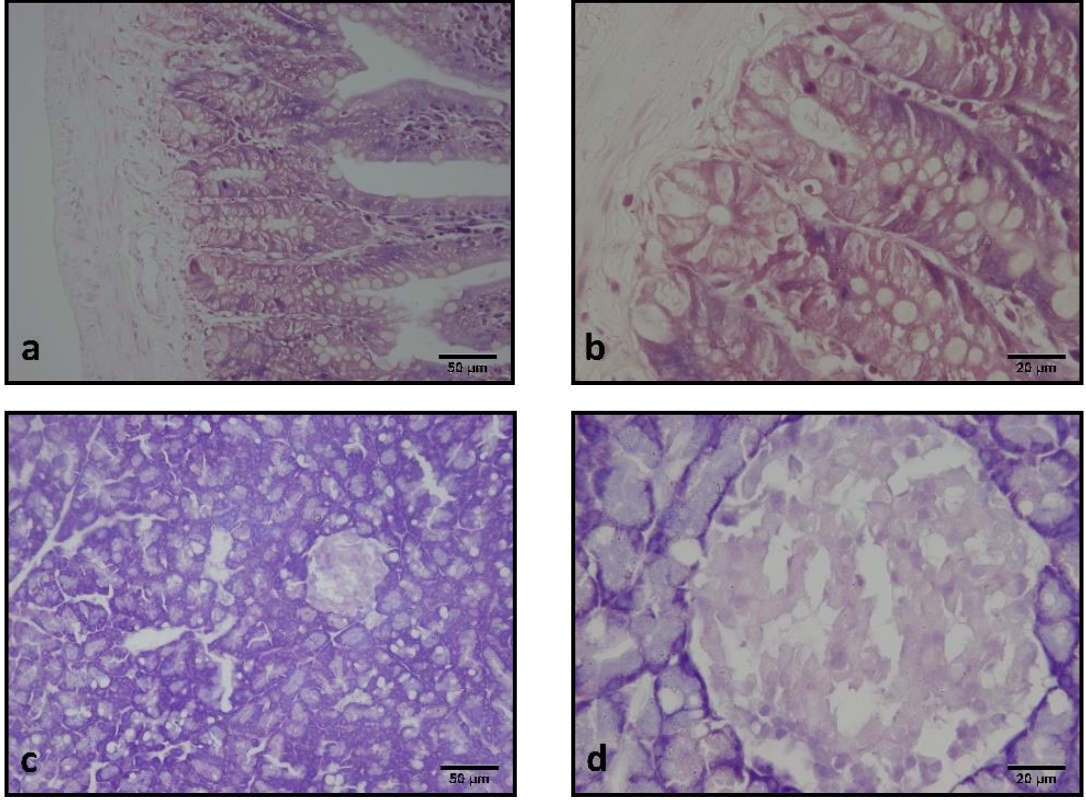
4.2.2.7. Parafin kesitlerde Toluidine blue-Nötral red boyama sonuçları

Bu kombinasyon ile genel görünüm, hematoksilen-eozin boyamasına benzer bulundu. İnce bağırsak yapısında; toluidine blue ile nötral red'in nuklear boya olarak birbirlerine üstünlük sağlayamadıkları ve net bir nuklear boyanmanın olmadığı gözlemlendi. Sitoplazmik boyanmanın nötral red ile ortaya çıktığı ve buna bağlı olarak pembe tonlarında renklenme olduğu görüldü (Şekil 29a,b). Pankreas yapısında; endokrin bölümler nötral red ile soluk pembe alanlar olarak ayırt edildi. Ekzokrin asinuslarda ise; toluidine blue tarafından boyanmış bazal sitoplazmadaki dar bir lacivert şerit dışında, nötral red ile soluk pembe renkte sitoplazmik ve nuklear boyanma izlendi (Şekil 29c,d).

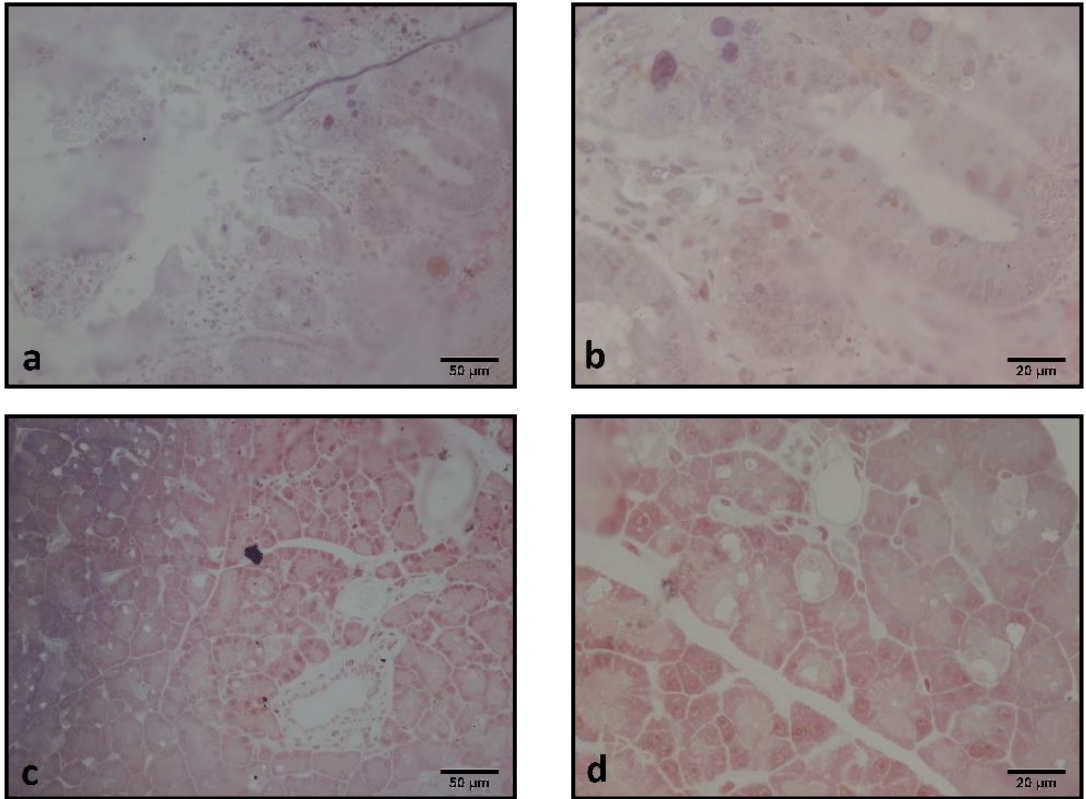
4.2.2.8. Yarı ince epon kesitlerde Toluidine blue-Nötral red boyama sonuçları

Toluidine blue'nun nötral red ile kombinasyonunda ince bağırsak yapısında; iki boyanın nuklear boya olarak birbirlerine üstünlük sağlayamadıkları ve net bir nuklear boyanmanın olmadığı gözlemlendi. Sitoplazmik boyanmanın nötral red ile soluk pembe tonlarında, goblet hücrelerinin ise kırmızımsı-mor boyandığı görüldü (Şekil 30a,b). Pankreas yapısındaki ekzokrin asinar hücrelerde; toluidine blue'nun boyanmada etkisi olmadığı, nötral red ile nuklear komponentlerin kırmızı-bordo, bazal sitoplazmanın kırmızı, apikal sitoplazmanın soluk pembe renkte boyandığı izlendi (Şekil 30c,d).

Bu bulgular doğrultusunda toluidine blue-nötral red kombinasyonunun; (a) ince bağırsak ve pankreasa ait parafin kesitlerde hematoksilen-eozin kombinasyonuna üstünlük sağlamadığı düşünüldü. (b) Epon kesitlerde ince bağırsakta bir avantaj sağlamadığı, pankreas dokusunda da nötral red ile tekli boyama sonuçlarına benzer olduğu için toluidine blue ile kombinasyon olarak uygulanmasına gerek olmadığı sonucuna varıldı.



Şekil 29. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) parafin kesitlerinde Toluidine blue-Nötral red boyaması.



Şekil 30. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) yarı ince epon kesitlerinde Toluidine blue-Nötral red boyaması.

4.2.3. Asit fuksin kombinasyonları

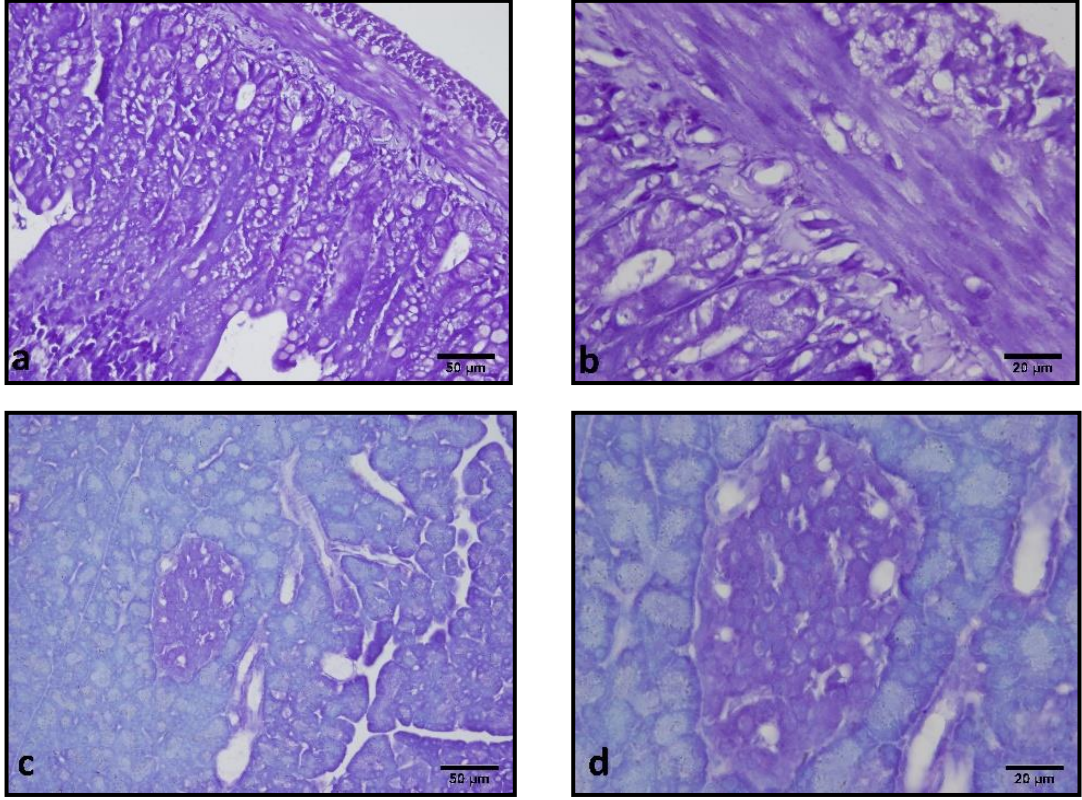
4.2.3.1. Parafin kesitlerde Asit fuksin-Toluidine blue boyama sonuçları

Bu kombinasyon ile boyanan ince bağırsak kesitlerinde; asit fuksinin toluidine blue tarafından maskelenerek varlığını gösteremediği gözlemlendi. Tüm yapıların toluidine blue tarafından oluşturulan morumsu-lacivert ve daha soluk renkte boyandığı görüldü (Şekil 31a,b). Pankreastaki endokrin adacıklar ile ekzokrin seröz hücre bazal sitoplazmalarının toluidine blue ile morumsu-lacivert, diğer alanların soluk mavi boyandığı izlendi (Şekil 31c,d).

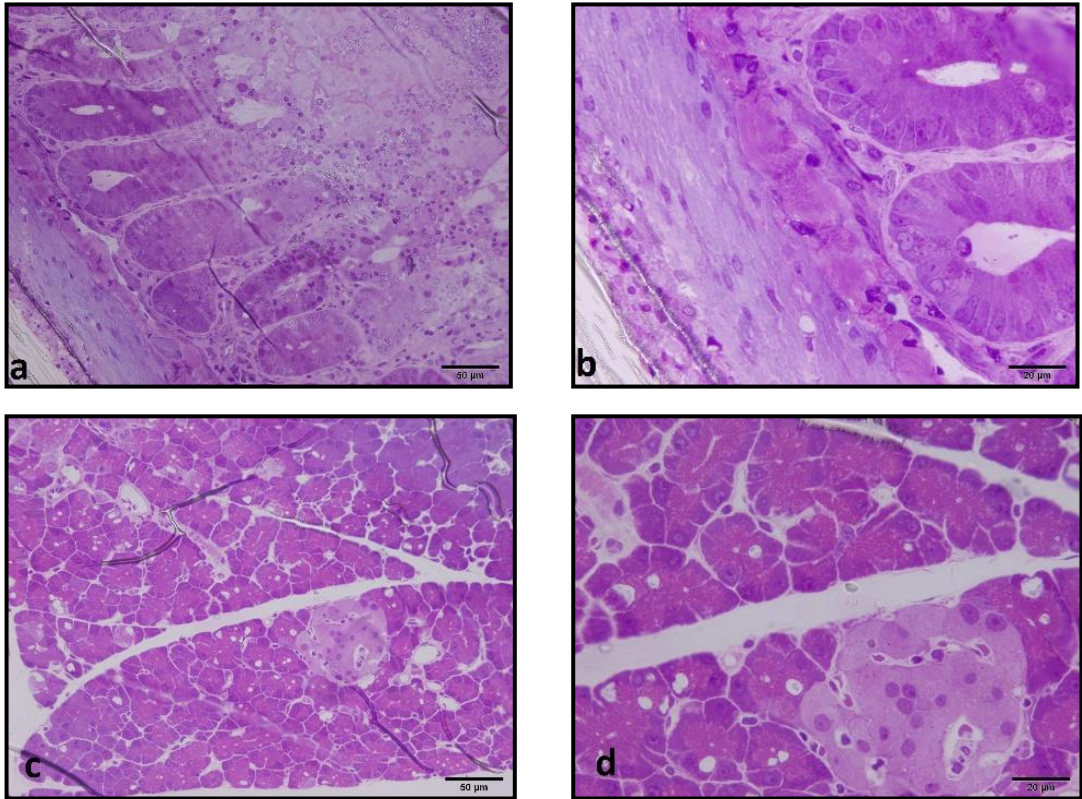
4.2.3.2. Yarı ince epon kesitlerde Asit fuksin-Toluidine blue boyama sonuçları

Asit fuksin-toluidine blue ikili boyamasında; ince bağırsakta; pembe-sklamen tonlarında sitoplazmik boyanmalar, mor-viyole nukleuslar, canlı sklamen rengi mukus içeriği ile goblet hücreleri ve aynı renkteki granülleri ile Paneth hücreleri kolaylıkla ayırt edildi (Şekil 32a,b). Endokrin pankreatik alanlarda açık pembe sitoplazma ve mor-viyole nuklear boyanmalar söz konusuydu. Ekzokrin seröz asinar hücre granülleri canlı sklamen renkleri ile çok net ayırt edildi. Mor-viyole renkte boyanan bazal sitoplazmik alan ve burada lokalize lacivert nukleusların ayırımı yapılabildi (Şekil 32c,d).

Bu bulgular ışığında asit fuksin-toluidine blue kombinasyonunun; (a) ince bağırsak parafin kesitlerinde toluidine blue renginin baskınlığında olup, hematoksilen-eozin kombinasyonuna üstünlük sağlamadığı düşünüldü. Pankreasa ait parafin kesitlerde kontrast ikili boyanma gözlenmekle birlikte ek bir avantaj sağlamadığı düşünüldü. (b) Her iki dokunun epon kesitlerinde asit fuksin'in pembe-sklamen tonlarındaki eozinofilisi ile toluidine blue'nun kontrast düzeyinin, toluidine blue-asit fuksin kombinasyonuna göre daha keskin olduğu düşünüldü. Kontrast renkler ve daha ince detaylar sağlaması üstünlüğü nedeniyle, bu kombinasyonun epon kesitlerde kullanılmasının yararlı olacağı sonucuna varıldı.



Şekil 31. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) parafin kesitlerinde Asit fuksin-Toluidine blue boyaması.



Şekil 32. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) yarı ince epon kesitlerinde Asit fuksin-Toluidine blue boyaması.

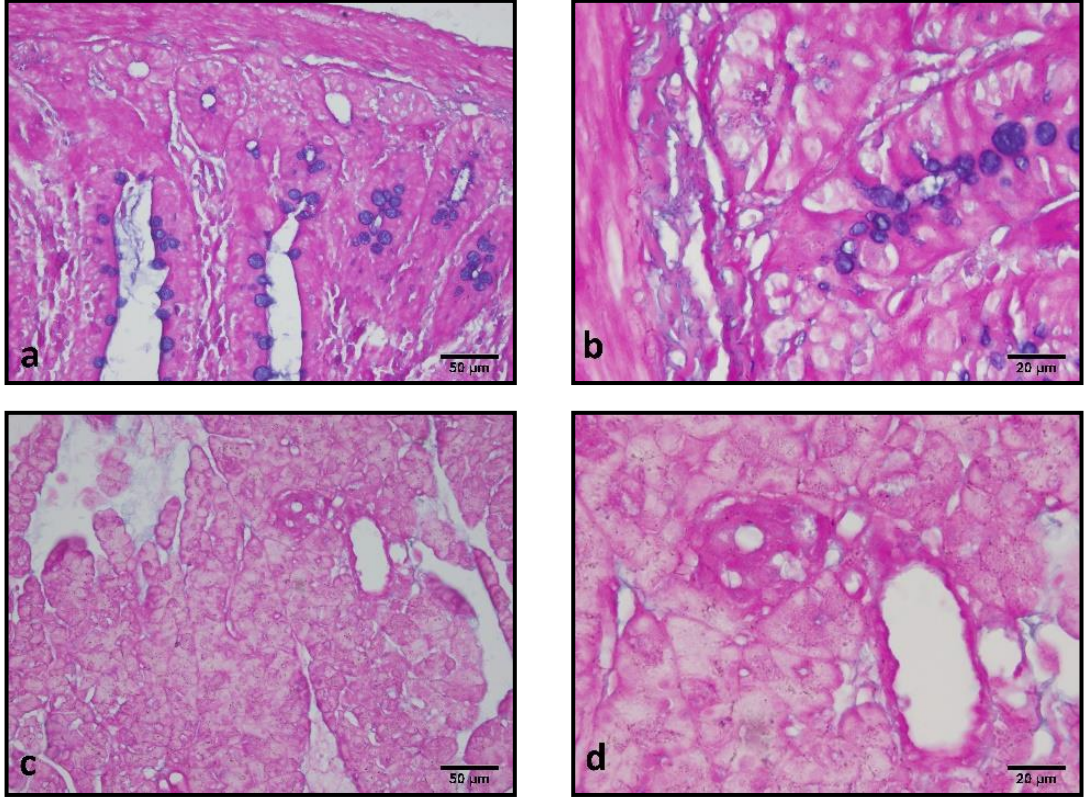
4.2.3.3. Parafin kesitlerde Asit fuksin-Metil green boyama sonuçları

Asit fuksin-metil green kombinasyonu ile boyanan ince bağırsak kesitlerinde; asit fuksinin canlı sklamen renginin baskın olduğu, metil green ile sadece goblet hücrelerinin yeşilimsi-lacivert renkte boyandığı görüldü (Şekil 33a,b). Pankreasta metil green boyanmasının hiç olmadığı, sadece asit fuksinin hakim olduğu; endokrin adacıkların daha canlı sklamen renginde, geri kalan tüm parankimin detay vermeyen daha açık pembe renkte boyanmış olduğu gözlemlendi (Şekil 33c,d).

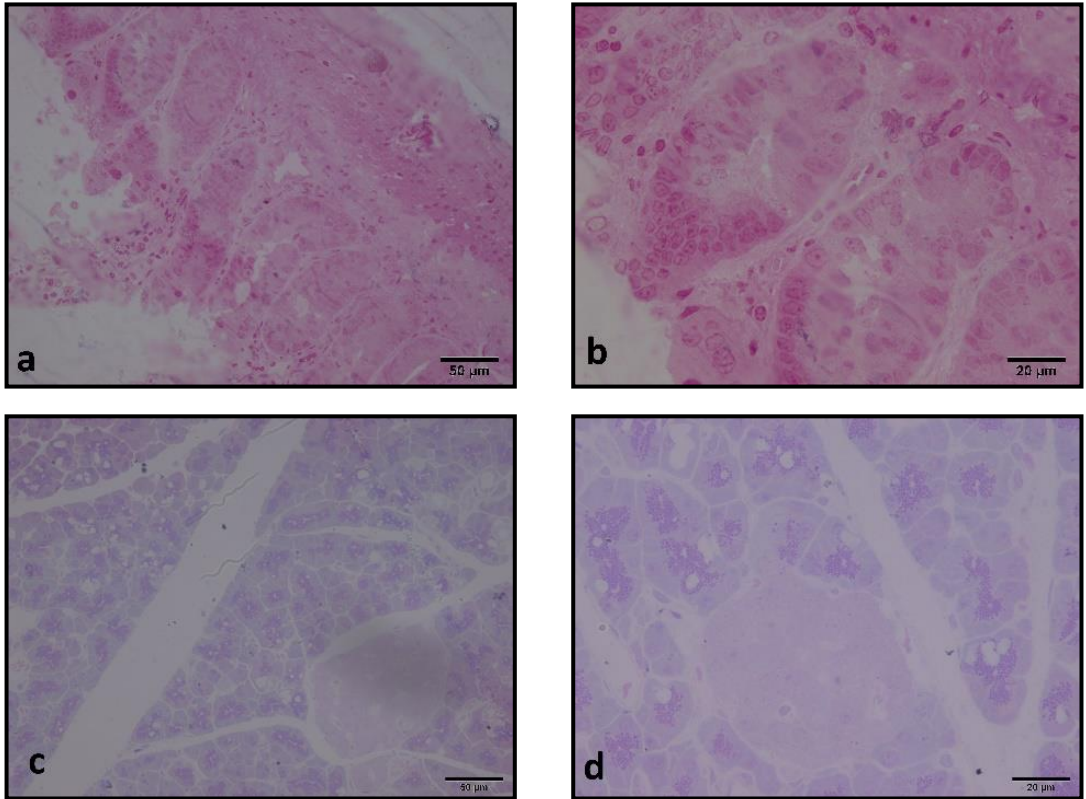
4.2.3.4. Yarı ince epon kesitlerde Asit fuksin-Metil green boyama sonuçları

Asit fuksin-metil green ikili boyamasında ince bağırsakta; pembe-sklamen tonlarında sitoplazmik boyanmalar, mor-viyole nukleuslar, canlı sklamen rengi mukus içeriği ile goblet hücreleri ayırt edildi (Şekil 34a,b). Pankreasta endokrin adacıklar açık pembe renkte kolaylıkla ayırt edilmekteydi. Ekzokrin seröz asinar hücre granülleri morumsu renkte çok net ayırt edildi. Pembe-viyole renkte boyanan bazal sitoplazmik alandaki nukleuslar da görülebilmekteydi (Şekil 34c,d).

Bulgularımıza göre asit fuksin-metil green kombinasyonunun; (a) ince bağırsak parafin kesitlerinde asit fuksin renginin baskınlığında olmakla birlikte, metil green ile boyanan goblet hücrelerinin spesifik çalışmalarında yararlanılabileceği şeklinde yorumlandı. Pankreasta ise; eozinin ve asit fuksinin tekli boyamaları ile aynı hatta daha kötü olduğu ve hiç detay vermediği için kombinasyonun kullanılmaması sonucuna varıldı. (b) İnce bağırsak epon kesitlerinde asit fuksin'in pembe-sklamen tonlarındaki hakimiyeti, periyodik asit etchingi sonrası uygulanan tekli asit fuksin ile eşdeğer olarak değerlendirildi. Bu nedenle metil green ile kombinasyonu çok anlamlı bulunmadı. Pankreasta da etchingsiz borakslı metil green ile eşdeğer bulunduğu için kombinasyonun avantaj sağlamadığı düşünüldü.



Şekil 33. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) parafin kesitlerinde Asit fuksin-Metil green boyaması.



Şekil 34. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) yarı ince epon kesitlerinde Asit fuksin-Metil green boyaması.

4.2.4. Metil green kombinasyonları

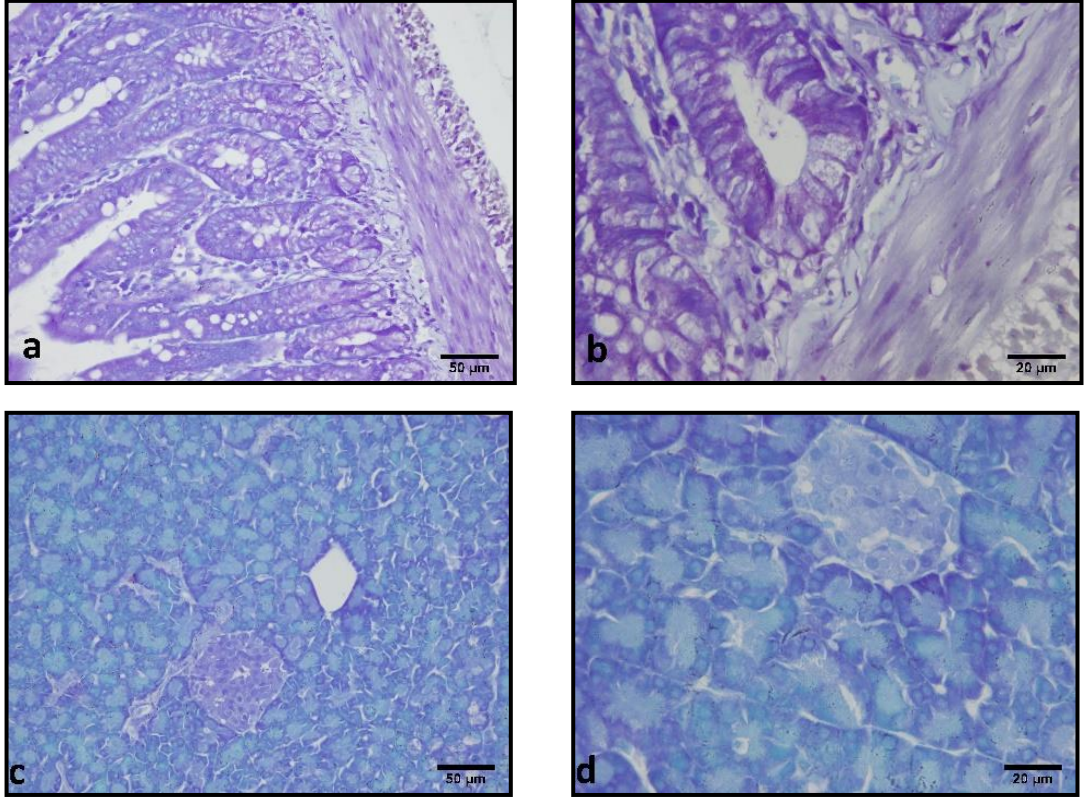
4.2.4.1. Parafin kesitlerde Metil green-Toluidine blue boyama sonuçları

Bu kombinasyon ile boyanan ince bağırsak yapısında; toluidine blue'nun morumsu-lacivert renginin, metil green boyanmasını tamamen baskıladığı görüldü (Şekil 35a,b). Pankreas yapısında; endokrin bölümlerde toluidine blue ile nukleusların mavi, sitoplazmaların daha açık mavi boyandığı görüldü. Ekzokrin asinüslerde ise; toluidine blue tarafından boyanmış bazal sitoplazmadaki dar bir lacivert şerit dışında, metil green ile açık yeşil boyanmış sitoplazmik ve nuklear boyanma izlendi (Şekil 35c,d).

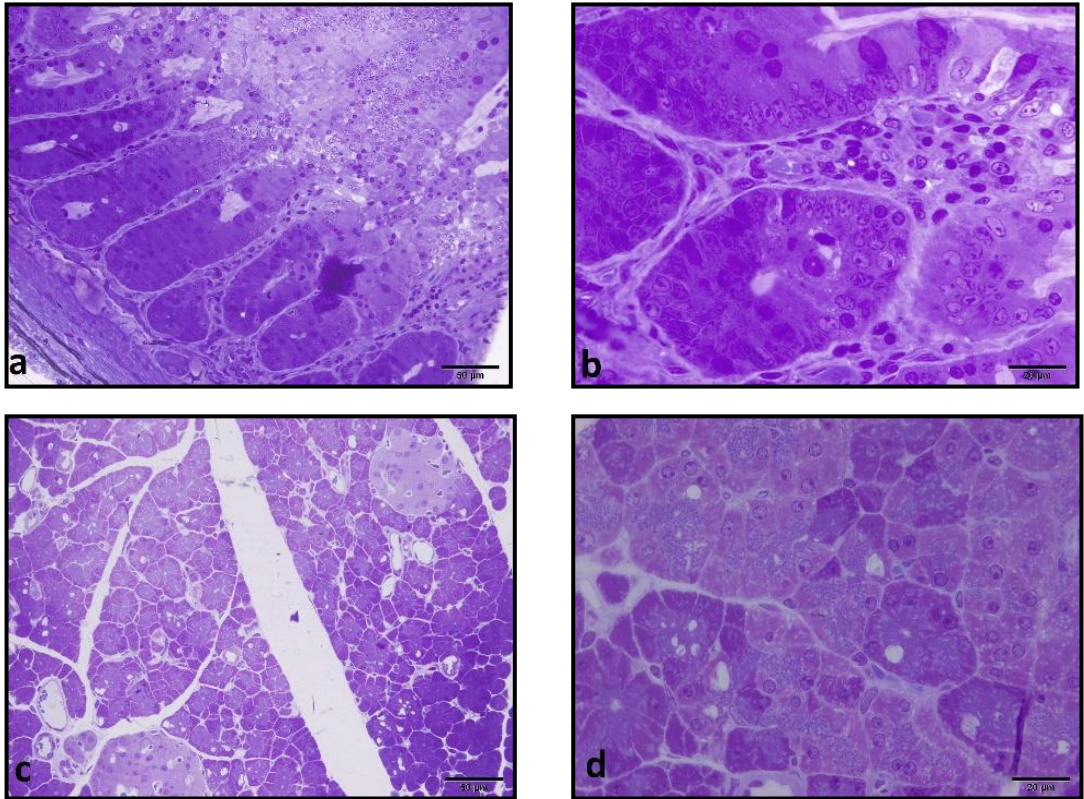
4.2.4.2. Yarı ince epon kesitlerde Metil green-Toluidine blue boyama sonuçları

Metil green-toluidine blue ile boyanan ince bağırsak yapısında; metil green'in hiçbir komponenti boyamadığı, toluidine blue'nun morumsu-lacivert renginin hakim olduğu gözlemlendi. Morumsu-kırmızı renkteki içerikleri ile goblet hücre ayırımı da yapılabilmekteydi (Şekil 36a,b). Pankreas yapısında da sadece toluidine blue'nun baskın olduğu ve metil green'i baskıladığı görüldü. Endokrin bölümlerde toluidine blue ile koyu tonda nukleuslar, daha pembe-eflatun tonda sitoplazmik boyanma görüldü. Ekzokrin asinüslerde ise; canlı morumsu-pembe boyanmış bazal sitoplazma, mor-lacivert boyanmış zimojenik granüller ile lacivert tonlarında nuklear boyanma izlendi (Şekil 36c,d).

Gözlemlerimiz doğrultusunda metil green-toluidine blue kombinasyonunun; (a) ince bağırsak parafin kesitlerinde toluidine blue renginin baskınlığında olup, hematoksilin-eozin kombinasyonuna üstünlük sağlamadığı düşünüldü. Pankreasa ait parafin kesitlerde, toluidine blue-metil green şeklindeki kombinasyonunda olduğu gibi kontrast ikili boyanma gözlemlense de ek bir avantaj sağlamadığı sonucuna varıldı. (b) Epon kesitlerde toluidine blue ile tekli boyama sonuçlarına benzer olduğu için kombinasyon olarak uygulanmasına gerek olmadığı sonucuna varıldı.



Şekil 35. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) parafin kesitlerinde Metil green-Toluidine blue boyaması.



Şekil 36. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) yarı ince epon kesitlerinde Metil green-Toluidine blue boyaması.

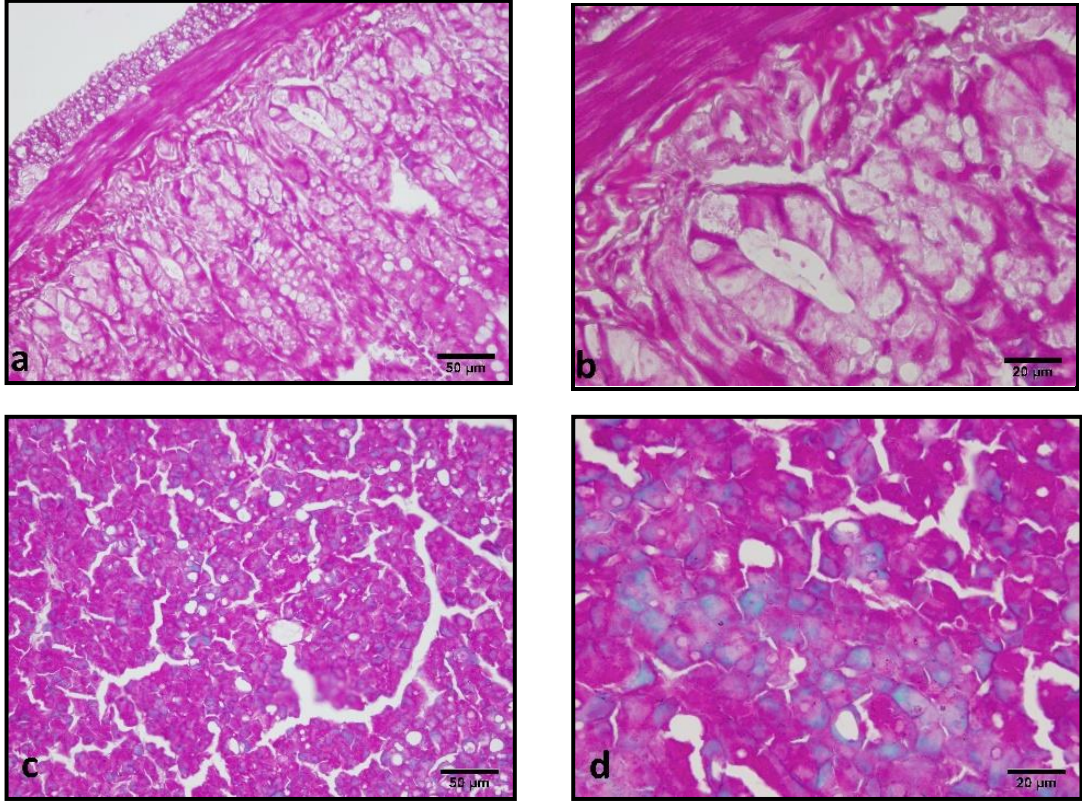
4.2.4.3. Parafin kesitlerde Metil green-Asit fuksin boyama sonuçları

Metil green-asit fuksin kombinasyonu ile boyanan ince bağırsak kesitlerinde; asit fuksinin canlı sklamen renginin baskın olduğu, metil green ile bir boyanma sağlanamadığı görüldü (Şekil 37a,b). Pankreasta ise metil green ile özel bir komponentin homojen bir şekilde boyanmadığı, tüm parankimin asit fuksin ile detay vermeyen canlı pembe renkte boyanmış olduğu gözlemlendi (Şekil 37c,d).

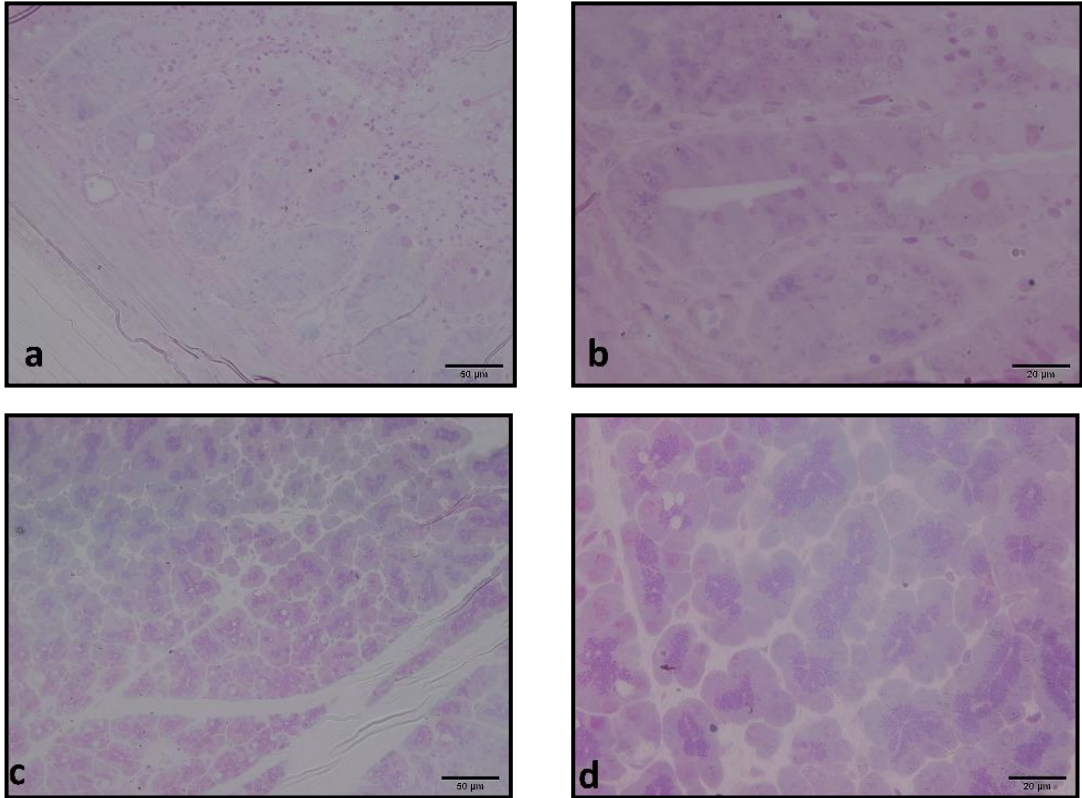
4.2.4.4. Yarı ince epon kesitlerde Metil green-Asit fuksin boyama sonuçları

Metil green-asit fuksin ikili boyamasında ince bağırsakta; pembe sitoplazmik boyanmalar, eflatun-viyole nukleuslar, sklamen rengi mukus içeriği ile goblet hücreleri ve mor granülleri ile Paneth hücreleri ayırt edildi (Şekil 38a,b). Pankreasta seröz asinar hücre granülleri morumsu renkte çok net ayırt edildi. Yeşil-pembe boyanan bazal sitoplazmik alandaki pembe renkteki nukleuslar da görülebilmekteydi (Şekil 38c,d).

Değerlendirmelerimiz doğrultusunda metil green-asit fuksin kombinasyonunun; (a) ince bağırsak parafin kesitlerinde asit fuksin ile tekli boyama sonuçlarına benzer olduğu için kombinasyon olarak uygulanmasına gerek olmadığı ve hematoksilen-eozin kombinasyonuna üstünlük sağlamadığı düşünüldü. Pankreas parafin kesitlerinde de, metil green tonları görülmekle birlikte, spesifik boyanma olmadığı düşünüldü. Asit fuksin dominansı ve detay sağlamaması nedeniyle başarılı bulunmadı. Epon kesitlerde asit fuksin-metil green şeklindeki kombinasyonuna benzer olarak; (b) ince bağırsakta peryodik asit etchingi sonrası uygulanan tekli asit fuksin ile eşdeğer olarak değerlendirildi. Bu nedenle kombinasyon çok anlamlı bulunmadı. Pankreasta da etchingsiz borakslı metil green ile eşdeğer bulunduğu için kombinasyonun avantaj sağlamadığı düşünüldü.



Şekil 37. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) parafin kesitlerinde Metil green-Asit fuksin boyaması.



Şekil 38. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) yarı ince epon kesitlerinde Metil green-Asit fuksin boyaması.

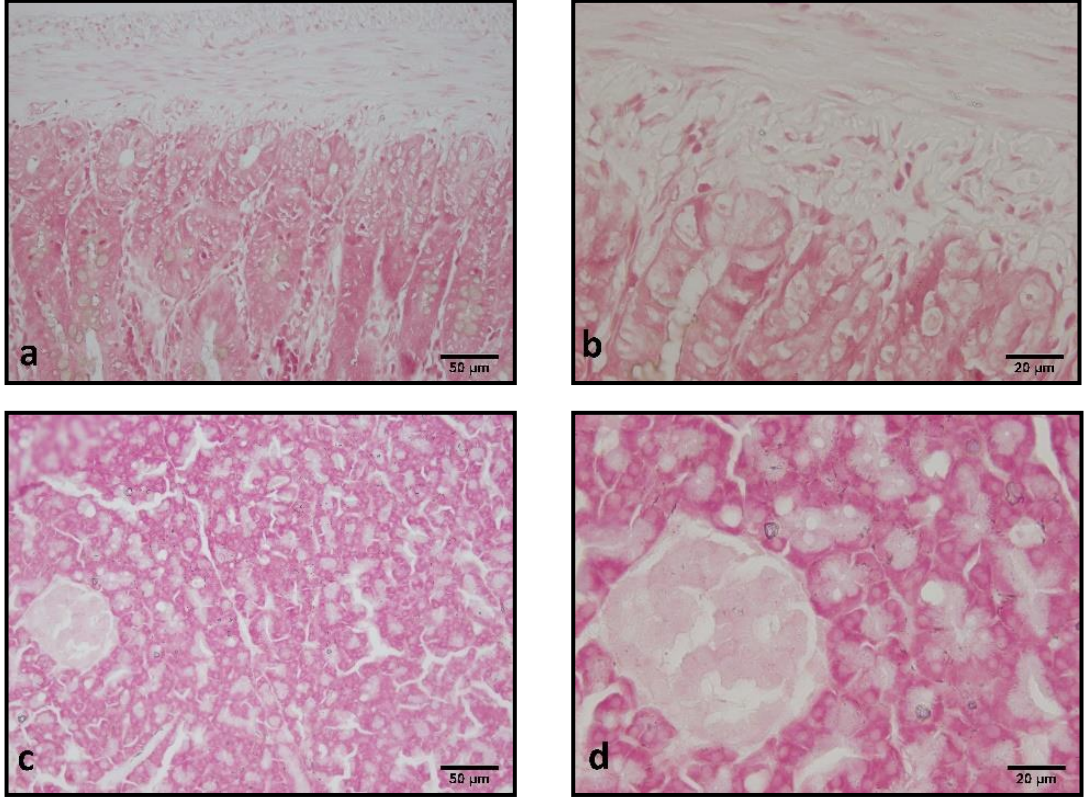
4.2.4.5. Parafin kesitlerde Metil green-Nötral red boyama sonuçları

Metil green-nötral red ile boyanan kesitlerde her iki dokuda da; metil green etkinliği hiç görülmedi, sadece nötral red ile yapılan boyama sonuçları ile eşdeğer görüntüler izlendi. İnce bağırsakta; epitelyal komponentler bordomsu-kırmızı renkte, düz kas hücrelerinin sitoplazması soluk pembe renkte, nukleusları bordomsu-kırmızı renkte izlendi. Kahverengimsi boyanmaları ile goblet hücre ayırımı yapılabilmekteydi (Şekil 39a,b). Pankreas kesitlerinde soluk pembe endokrin alanlara karşılık, ekzokrin asinar hücrelerde açık pembe ve koyu kırmızımsı apikal ve bazal sitoplazmik boyanma söz konusuydu. Koyu boyalı bazal sitoplazma içinde detayları görünmemekle birlikte soluk pembe renkteki nukleus ayırımı yapılabilmekteydi (Şekil 39c,d).

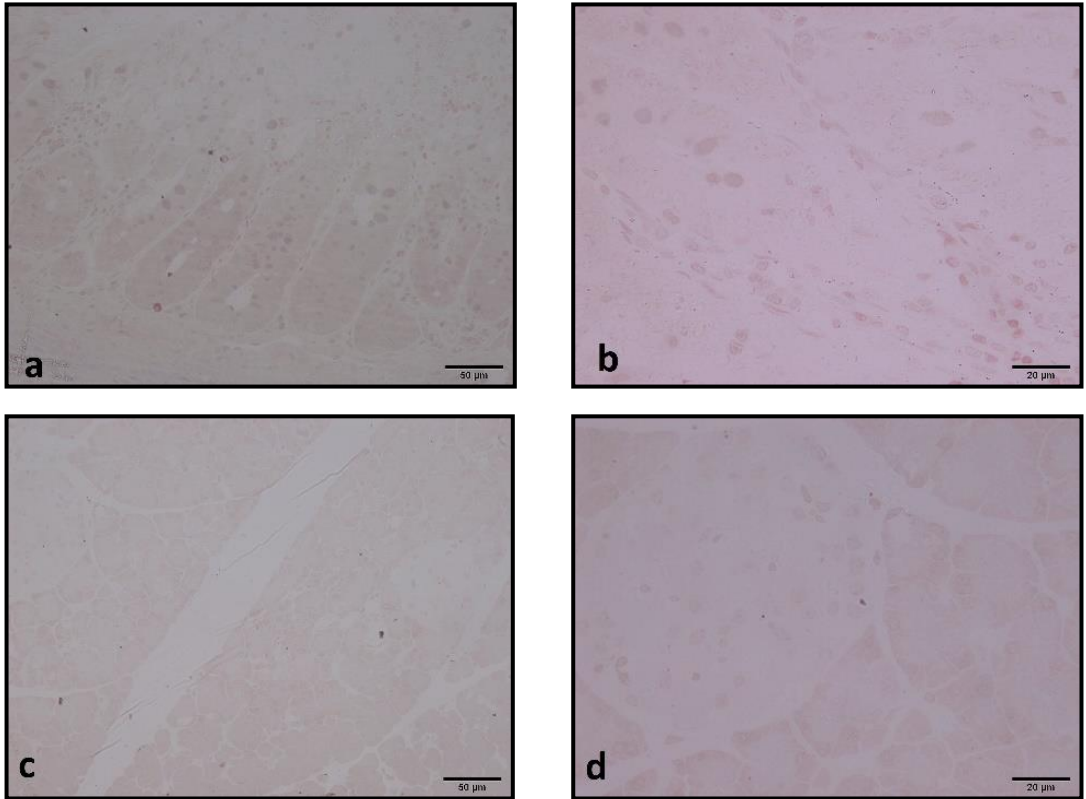
4.2.4.6. Yarı ince epon kesitlerde Metil green-Nötral red boyama sonuçları

Bu kombinasyonda ince bağırsak yapısında; metil green'in etkili olmadığı, soluk pembe ve kırmızı renklere nötral red boyamasının gerçekleştiği izlendi. Goblet hücreleri bordo renkte görüldü (Şekil 40a,b). Pankreas yapısında da aynı şekilde soluk pembe endokrin adacıklar; kırmızı-bordo nukleuslar, bazal sitoplazmanın kırmızı, apikal sitoplazmanın soluk pembe renkte boyandığı seröz asinuslar izlendi (Şekil 40c,d).

Bu bulgular doğrultusunda metil green-nötral red kombinasyonunun; (a) her iki dokunun parafin kesitlerinde ve (b) epon kesitlerinde, nötral red ile tekli boyama sonuçlarına benzer olduğu için bu kombinasyonun üstünlük sağlamadığı düşünüldü.



Şekil 39. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) parafin kesitlerinde Metil green-Nötral red boyaması.



Şekil 40. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) yarı ince epon kesitlerinde Metil green-Nötral red boyaması.

4.2.5. Nötral red kombinasyonları

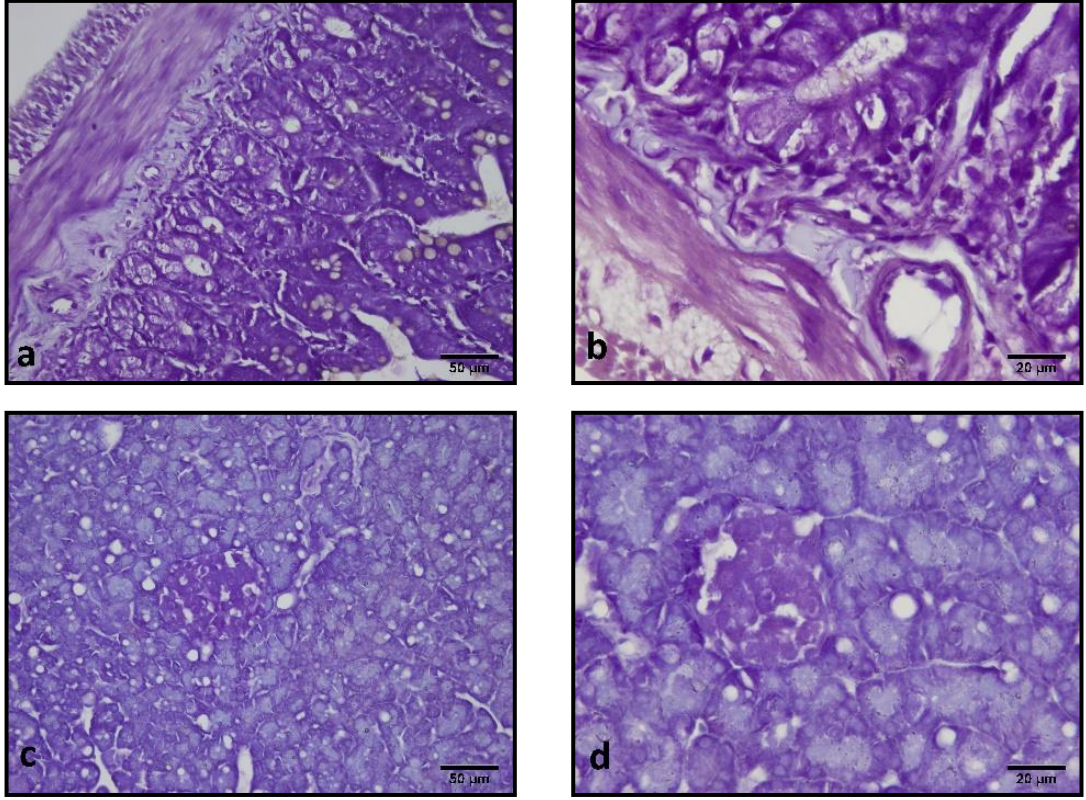
4.2.5.1. Parafin kesitlerde Nötral red-Toluidine blue boyama sonuçları

İnce bağırsak parafin kesitlerinin nötral red-toluidine blue ile boyaması sonrası; koyu morumsu-lacivert boyanma gözlemlendi. Hücresel ve nuklear detaylar seçilemedi (Şekil 41a,b). Pankreasa ait parafin kesitlerde; eflatun ve mor renklerden oluşan heterojen boyanma izlendi. Çok koyu mor renkteki endokrin alanların ayrımı çok rahat yapılamadı. Ekzokrin asinar hücrelerdeki koyu mor bazal sitoplazma ile eflatun nukleuslar ve apikal sitoplazma ayrımı yapılabilmekteydi (Şekil 41c,d).

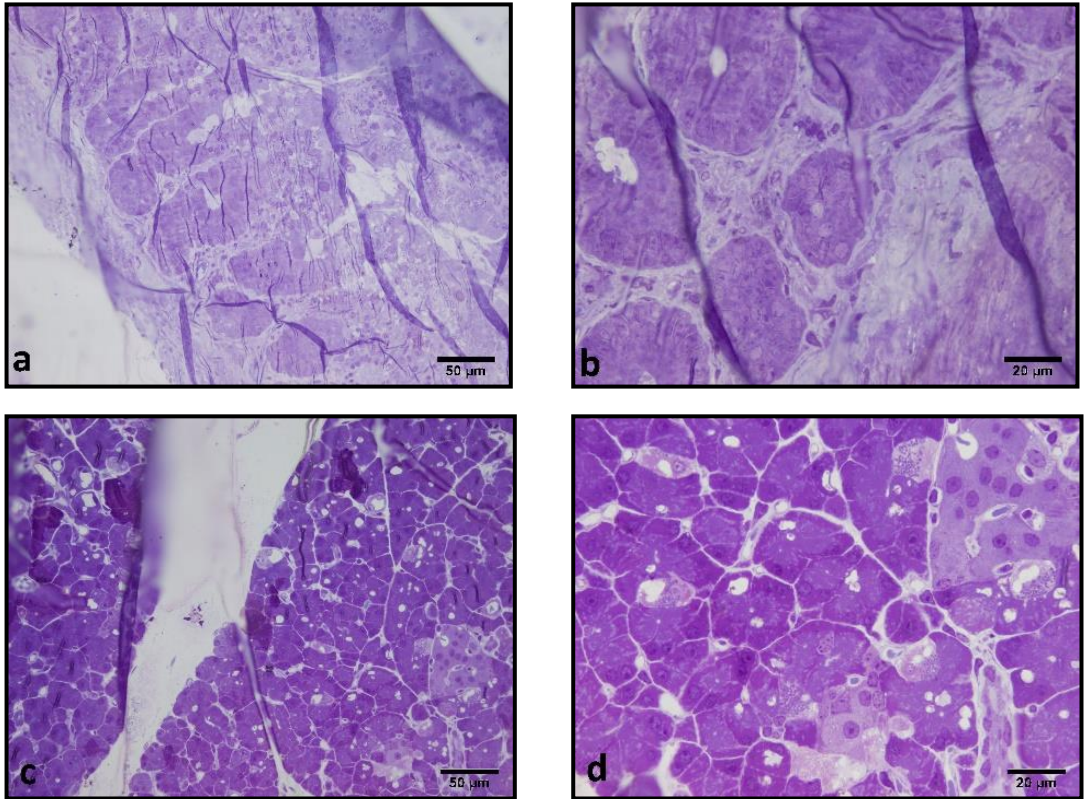
4.2.5.2. Yarı ince epon kesitlerde Nötral red-Toluidine blue boyama sonuçları

Nötral red-toluidine blue ile boyanan ince bağırsak yapısında; nötral red'in hiçbir komponenti boyamadığı, toluidine blue'nun morumsu-lacivert renginin hakim olduğu gözlemlendi. Morumsu renkteki içerikleri ile goblet hücre ayrımı da yapılabilmekteydi (Şekil 42a,b). Pankreas yapısında da sadece toluidine blue'nun baskın olduğu ve nötral red'i baskıladığı görüldü. Endokrin bölümlerde toluidine blue ile koyu tonda nukleuslar, daha pembe-eflatun tonda sitoplazmik boyanma görüldü. Ekzokrin asinüslerde ise; canlı mor boyanmış bazal sitoplazma, mor boyanmış zimojenik granüller ile lacivert tonlarında nuklear boyanma izlenmekle birlikte detaylar çok net değildi (Şekil 42c,d).

Sonuçlara göre nötral red-toluidine blue kombinasyonunun; (a) her iki dokunun parafin kesitlerinde hematoksilin-eozin kombinasyonuna üstünlük sağlamadığı düşünüldü. (b) Her iki dokunun epon kesitlerinde, toluidine blue tekli boyama sonuçlarına benzer boyanmalar görüldüğü için bu kombinasyon başarılı olarak değerlendirilmedi.



Şekil 41. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) parafin kesitlerinde Nötral red-Toluidine blue boyaması.



Şekil 42. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) yarı ince epon kesitlerinde Nötral red-Toluidine blue boyaması.

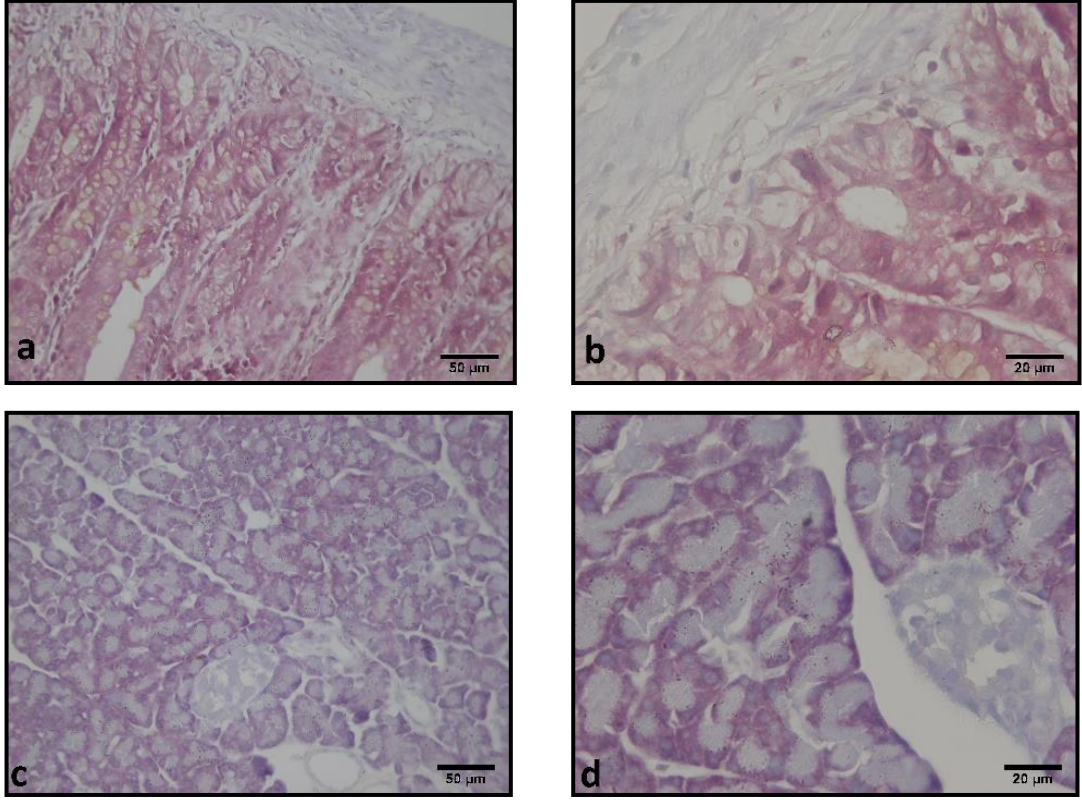
4.2.5.3. Parafin kesitlerde Nötral red-Metil green boyama sonuçları

Bu kombinasyon ile ince bağırsakta; epitelyal komponentler bordomsu-kırmızı renkte, düz kas hücrelerinin sitoplazması çok soluk renkte, nukleusları kırmızımsı-mavimsi renkte izlendi. Kahverengimsi boyanmaları ile goblet hücre ayrımı yapılabilmekteydi. Metil green ile herhangi bir yapı boyanmamıştı (Şekil 43a,b). Pankreas kesitlerinde soluk mavi endokrin alanlara karşılık, ekzokrin asinar hücrelerde açık mavi ve koyu kırmızımsı apikal ve bazal sitoplazmik boyanma söz konusuydu. Koyu boyalı bazal sitoplazma içinde detayları görünmemekle birlikte mavimsi renkte nukleus ayrımı yapılabilmekteydi (Şekil 43c,d).

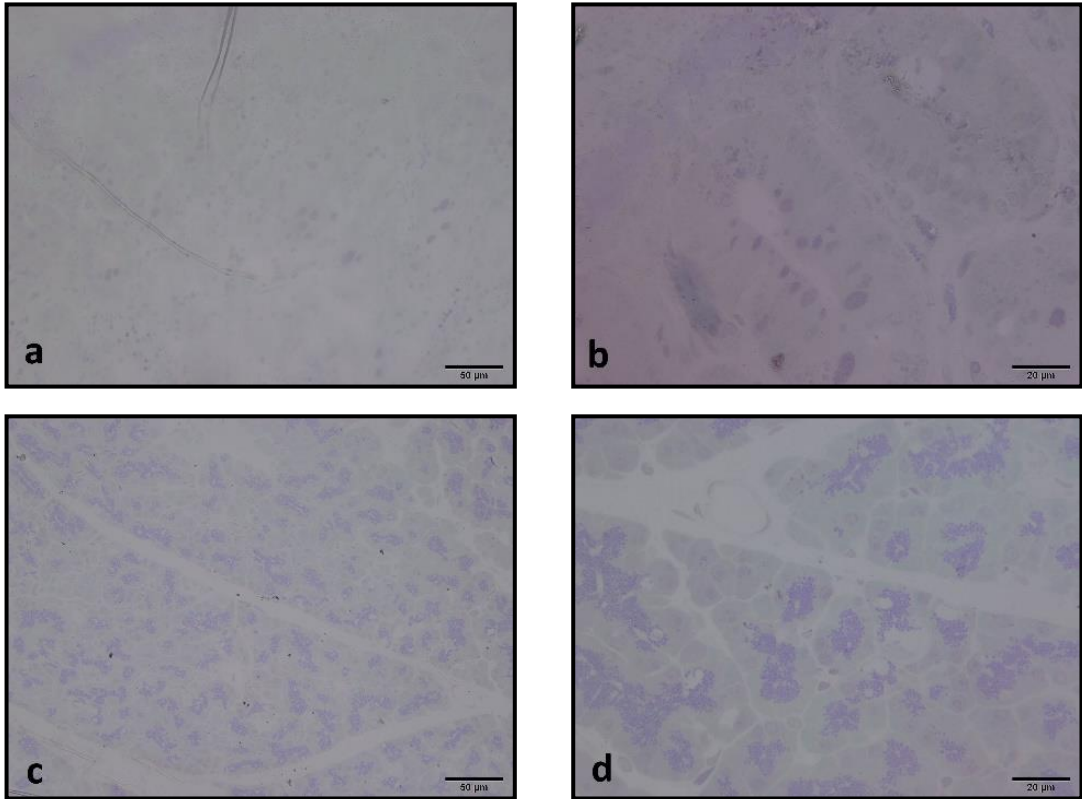
4.2.5.4. Yarı ince epon kesitlerde Nötral red-Metil green boyama sonuçları

Bu kombinasyon ile ince bağırsak yapısında; iki boyanın da etkili olamadığı, sadece mor renkteki içerikleri ile goblet hücreleri zorlukla seçilebildi (Şekil 44a,b). Pankreas yapısında da soluk kırmızımsı nukleuslar, açık yeşil bazal sitoplazma, mor renkte boyanan zimojenik granüller ile dolu apikal sitoplazmaya sahip asinar hücreler gözlemlendi (Şekil 44c,d).

Bulgularımız doğrultusunda nötral red-metil green kombinasyonunun; (a) ince bağırsak parafin kesitlerinde iki boyanın kontrast yaratamadığı ve sadece nötral red'in etkili olduğu, pankreasta kontrast renkler izlenmekle birlikte hematoksileneozin kombinasyonuna üstünlük sağlamadığı düşünüldü. (b) İnce bağırsak epon kesitlerinde Nötral red ile yapılan tekli boyama sonuçlarına benzer boyanma gözlemlendi. Pankreasta ise metil green tekli boyama sonuçlarına eşdeğer sonuçlar elde edildi. Üstünlük görülmediği için, kombinasyonun avantaj sağlamadığı sonucuna varıldı.



Şekil 43. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) parafin kesitlerinde Nötral red-Metil green boyaması.



Şekil 44. İnce bağırsağın (a,b) ve pankreas dokusunun (c,d) yarı ince epon kesitlerinde Nötral red-Metil green boyaması.

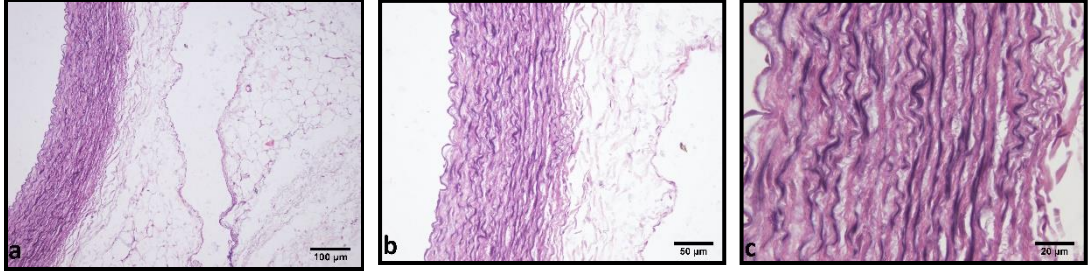
4.3. SPESİFİK BOYAMALARA AİT BULGULAR

Parafin kesitlerde hematoksilen-eozin boyaması ile bağ dokusu lif tipleri, eozin ile pembe tonlarda boyanır ve birbirinden spesifik olarak tanımlanamaz. Bu nedenle elastik, retiküler (Tip III kollajen) ve Tip I kollajen lifleri özgün olarak ayırt etmek üzere spesifik boyamalar önerilmektedir. Yine rutin hematoksilen-eozin ile boyanmış parafin kesitlerde spesifik olarak ayırt edilemeyen mitokondri demonstrasyonu için de bazı özel boyamalar önerilmektedir, Altmann metodu da bunlardan birisidir.

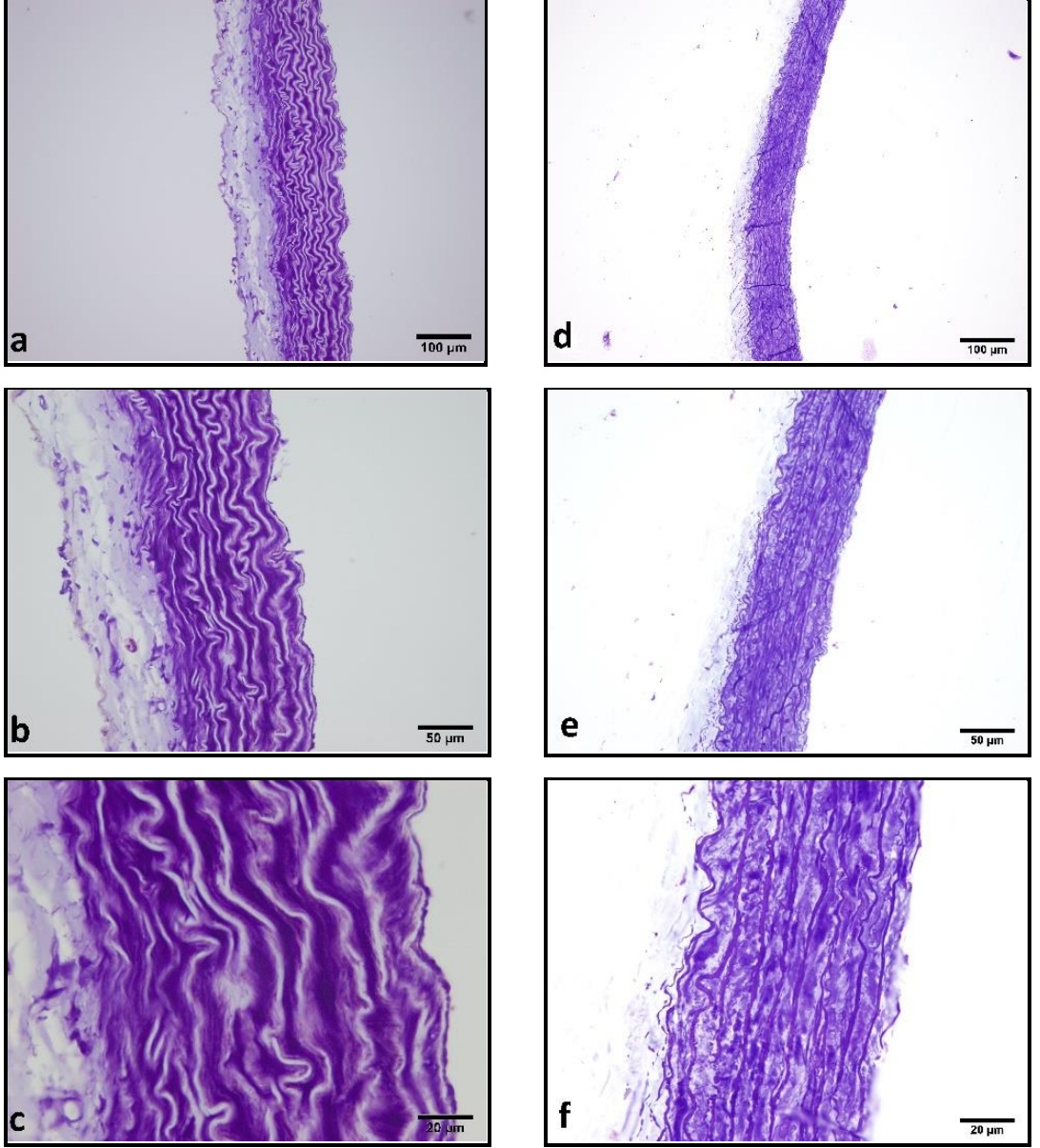
4.3.1. Elastik Liflerin İdentifikasyonu

Elastik lifler, aort duvarında hematoksilen-eozin boyamasında birbirine paralel pembe renkte demetler şeklinde görülmektedir (Şekil 45a,b,c). Aort parafin kesitlerinin toluidine blue ile boyanması sonrası mor demetler şeklinde görülen elastik lifler (Şekil 46a,b,c), epon kesitlere eşdeğer hatta daha net görüntüler sağladı. Aseton ile etching sonrası konvansiyonel toluidine blue ile boyanan aort yarı ince epon kesitlerinde ise; klasik boyama renkleri olan koyu mavi-mor demetler olarak gözlemlendi (Şekil 46d,e,f). Ancak hematoksilen-eozin boyamasına benzer şekilde, toluidine blue protokolü elastik liflerin ayırımını sağlamada önerilen özgün bir boyama değildir. Verhoeff hematoksileni ile boyama metodu, parafin kesitlerde elastik liflerin identifikasyonu için önerilen spesifik boyamalardan birisidir. Bu metodun uygulandığı aort parafin kesitlerinde; elastik lifler gri-siyah renkte boyanan demetler şeklinde görülmektedir (Şekil 47a,b,c). Aseton ile etching sonrası Verhoeff hematoksileni ile boyanan aort yarı ince epon kesitlerinde ise; berrak zemin üzerinde siyah demetler şeklinde ve parafin kesitlere göre çok daha net olarak ayırt edilmektedir (Şekil 47d,e,f).

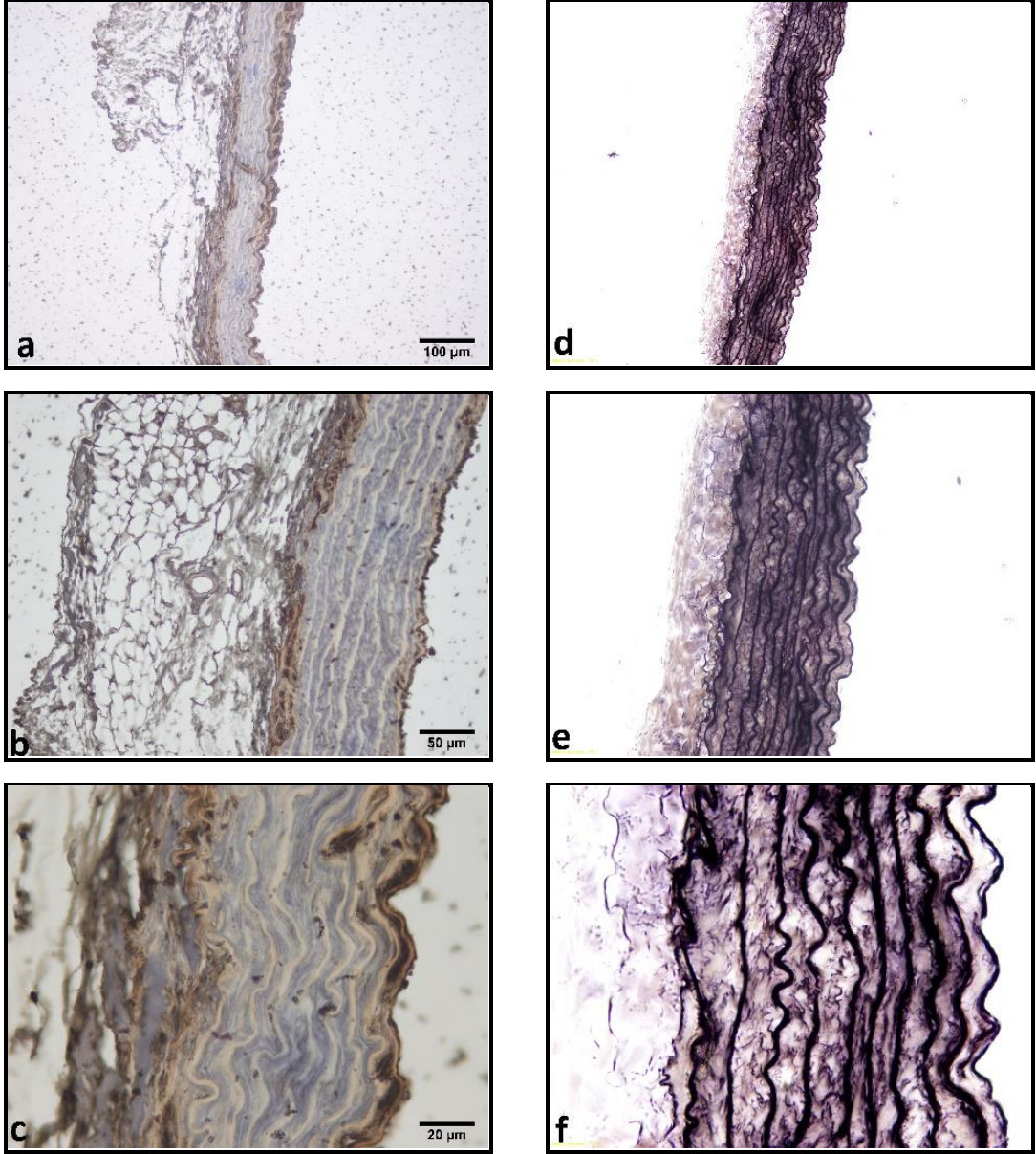
Bu bulgular doğrultusunda, elastik liflerin demonstrasyonunda; (a) parafin kesitlerde çok özgün olmamakla birlikte toluidine blue metodundan yararlanılabileceği, (b) yarı ince epon kesitlerde Verhoeff hematoksileni metodundan yararlanılabileceği düşünüldü.



Şekil 45. Aort parafin kesitlerinde H-E (a,b,c) boyaması.



Şekil 46. Aort parafin kesitlerinde (a,b,c) ve yarı ince epon kesitlerinde (d,e,f) Toluidine blue boyaması.

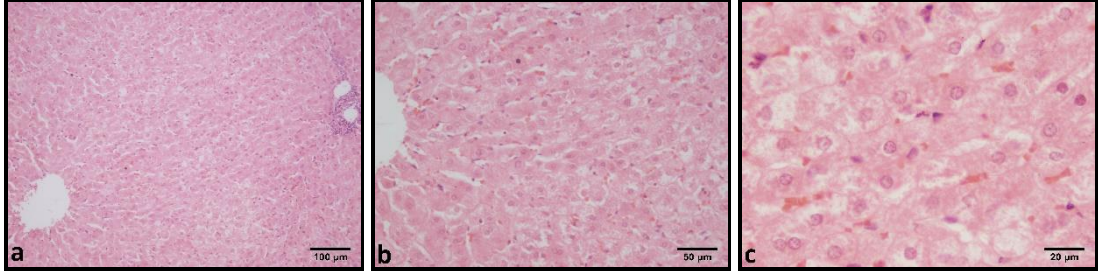


Şekil 47. Aort parafin kesitlerinde (a,b,c) ve yarı ince epon kesitlerinde (d,e,f) Verhoeff hematoksileni boyaması.

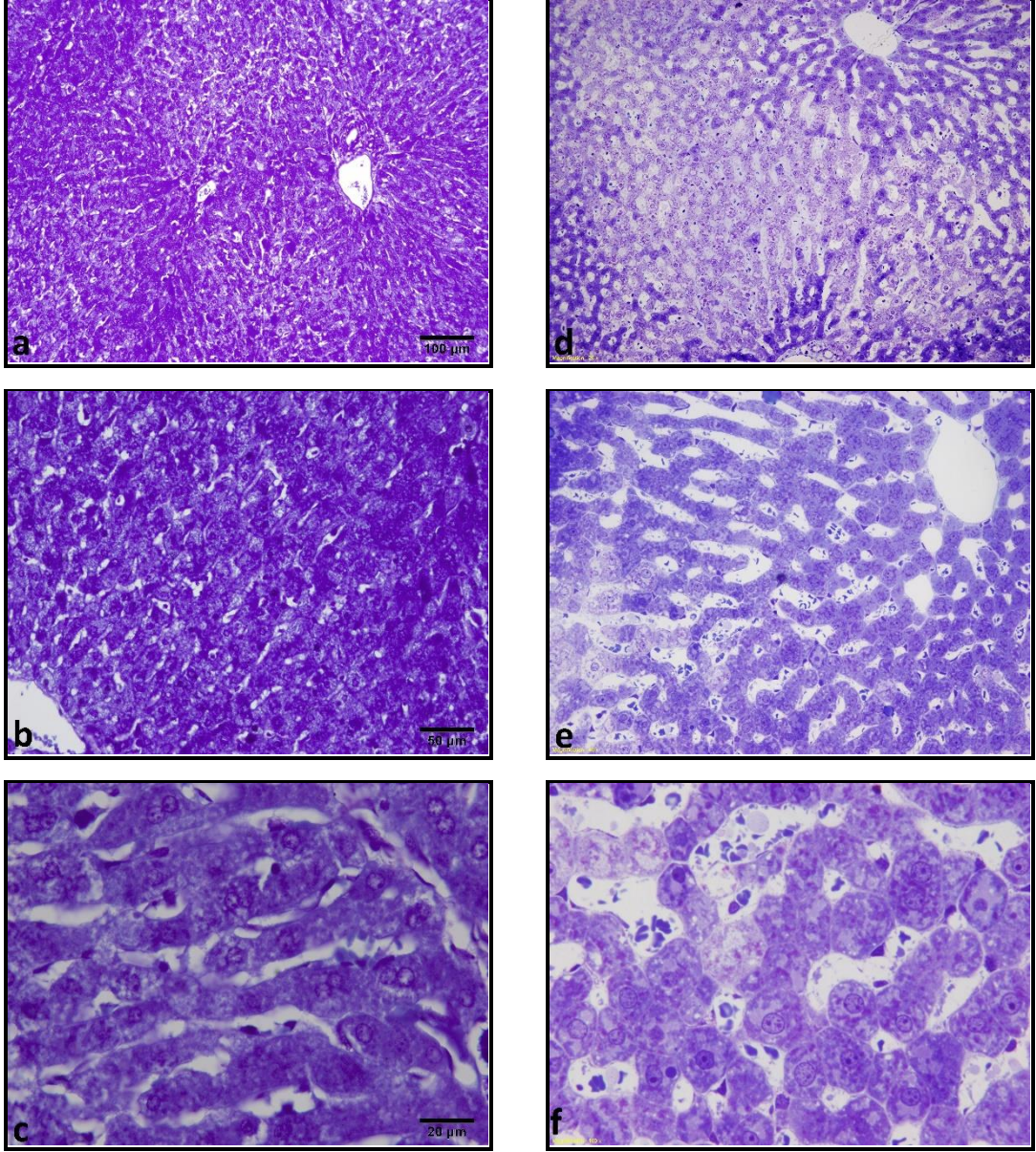
4.3.2. Retiküler (Tip III Kollajen) Liflerin İdentifikasyonu

Karaciğer stromasında da bulunan retiküler (Tip III kollajen) lifler de elastik liflere benzer şekilde parafin kesitlerin rutin hematoksilin-eozin ile boyanması sonrası ayırt edilememektedir (Şekil 48a,b,c). Toluidine blue boyamasının karaciğer parafin kesitlerine uygulanması ile, epon kesitlere eşdeğer sonuçlar elde edilmiştir ve retiküler liflerin ayırımı yapılamamıştır (Şekil 49a,b,c). Aseton ile etching sonrası konvansiyonel toluidine blue ile boyanan karaciğere ait yarı ince epon kesitlerde de, retiküler lif ayırımı yapılamamaktadır (Şekil 49d,e,f). Gordon-Sweet gümüşleme protokolü, parafin kesitlerde retiküler liflerin identifikasyonu için önerilen spesifik boyamalardan birisidir. Bu metodun uygulandığı karaciğer parafin kesitlerinde retiküler lifler; siyah renkte boyanmış, ağsı düzenlenimdeki ince ipliksi yapılar şeklinde kolaylıkla ayırt edilmektedir (Şekil 50a,b,c). Gordon-Sweet gümüşleme protokolü, aseton ile etching sonrası karaciğer yarı ince epon kesitlerine uygulandığında; retiküler lifler parafin kesitlere eşdeğer veya daha net olarak seçilebilmiştir (Şekil 50d,e,f,g).

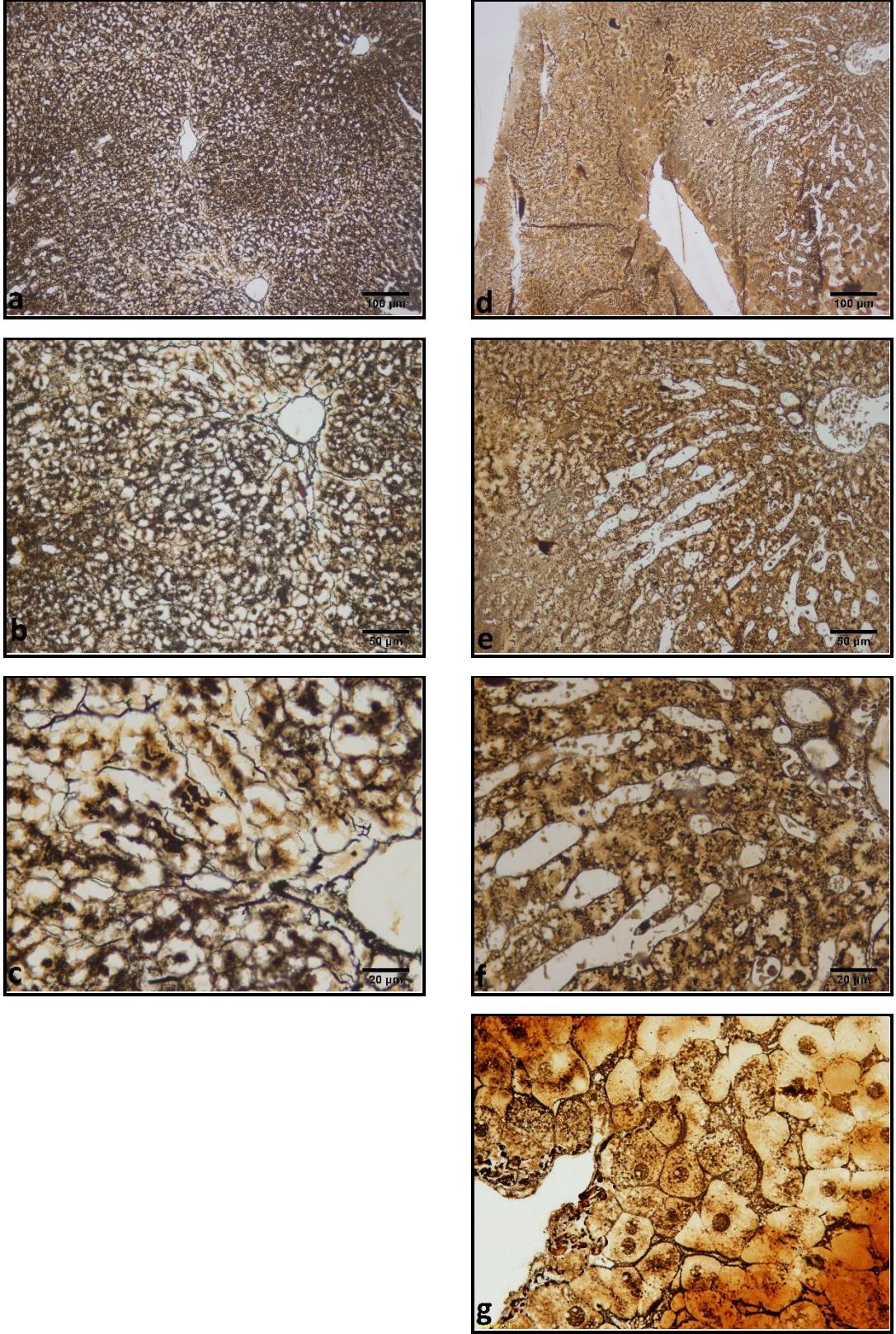
Elde edilen sonuçlar doğrultusunda retiküler liflerin demonstrasyonunda; parafin kesitler için önerilen Gordon-Sweet gümüşleme protokolünün, yarı ince epon kesitlerde de uygulanabileceğine karar verildi.



Şekil 48. Karaciğer parafin kesitlerinde; H-E (a,b,c) boyaması.



Şekil 49. Karaciğer parafin kesitlerinde (a,b,c) ve yarı ince epon kesitlerinde (d,e,f) Toluidine blue boyaması.



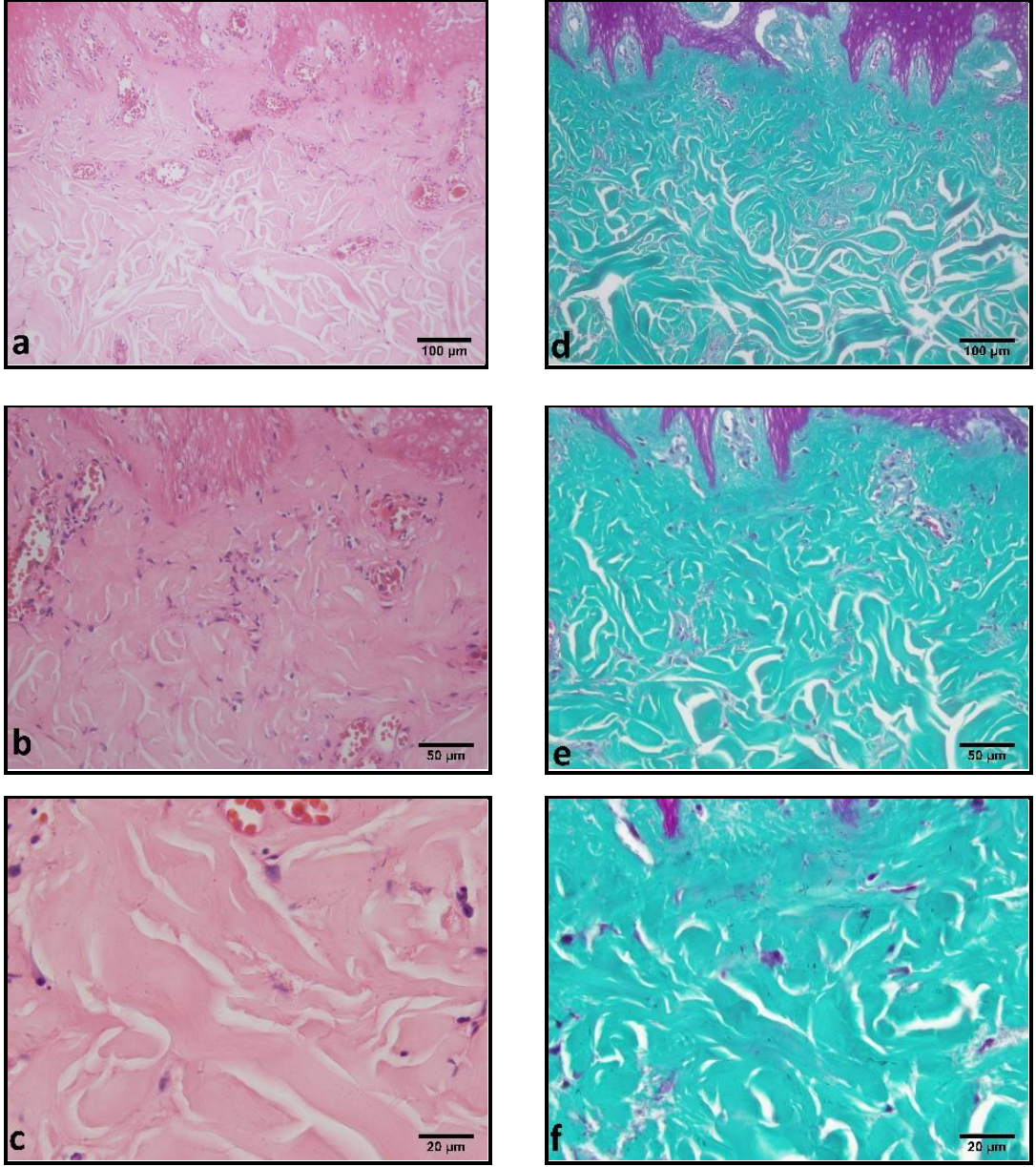
Şekil 50. Karaciğer parafin kesitlerinde (a,b,c) ve yarı ince epon kesitlerinde (d,e,f,g) Gordon-Sweet gümüşleme boyaması.

4.3.3. *Tip I Kollajen Liflerin İdentifikasyonu*

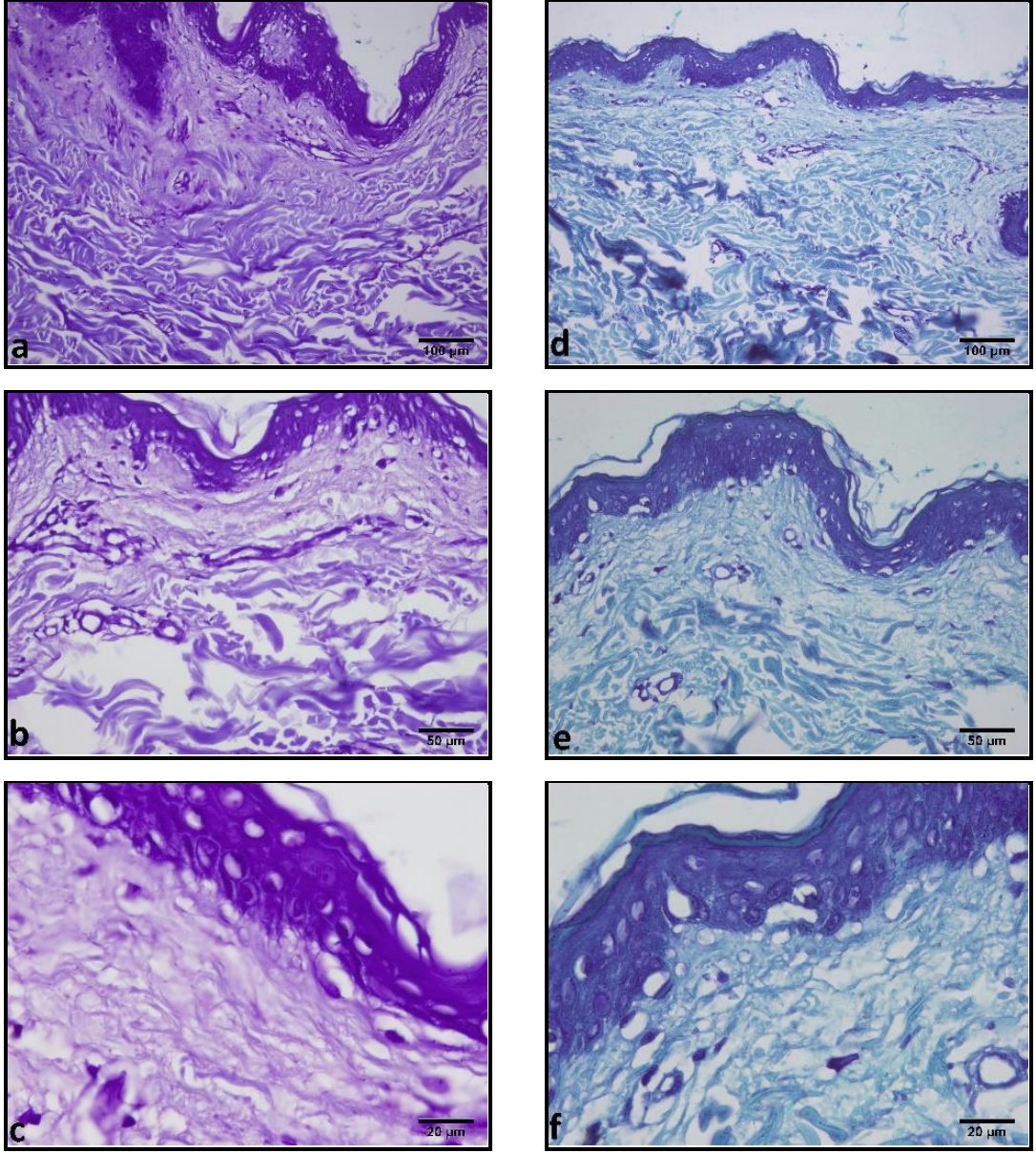
Derinin dermis (stratum reticulare) tabakasında düzensiz kompakt bağ dokusu yapısında yer alan Tip I kollajen lifler, parafin kesitlerin rutin hematoksil-eozin ile boyanması sonrası pembe tonlarında boyandığı için diğer eozinofilik komponentlerden spesifik olarak ayırt edilememektedir (Şekil 51a,b,c). Tip I kollajenin parafin kesitlerde identifikasyonu için önerilen spesifik boyamalardan birisi Masson trikrom metodudur. Bu metodun uygulandığı kesitlerdeki kollajen lifler; light green tarafından parlak yeşil renkte boyanarak, epitel ve kas gibi diğer komponentlerden kolaylıkla ayırt edilir (Şekil 51d,e,f). Toluidine blue boyaması deri parafin kesitlerine uygulandığında (Şekil 52a,b,c); epon kesitlere eşdeğer, daha koyu viyole tonda demet görselleri elde edildi. Aseton ile etching sonrası konvansiyonel toluidine blue ile boyanan deri yarı ince epon kesitlerinde de; Tip I kollajen lifler açık eflatun tonda düzensiz demetler olarak gözlendi (Şekil 53a,b,c,d). Ancak hematoksil-eozin boyamasına benzer şekilde, önerilen özgün bir boyama olmadığı için toluidine blue boyaması ile Tip I kollajen liflerin spesifik ayrımı sağlanamadı.

Parafin kesitlerde Tip I kollajenin identifikasyonu için önerilen trikrom teknikleri; üç boyanın kullanıldığı, çok sayıda solüsyonun uygulandığı uzun ve zor protokollerdir. Masson trikrom tekniğinde Tip I kollajen boyanmasının yeşil/mavi boya tarafından sağlandığı bilindiğinden, toluidine blue ile light green kombinasyonunun hem parafin hem de epon kesitlerde çalışılması düşünüldü. Deriye ait kesitlerin bu kombinasyon ile boyanması sonrası parafin kesitlerdeki kollajen lifler light green ile yeşil renkte, diğer komponentler ise toluidine blue ile morlacivert renkte kontrast oluşturduğu için birbirinden kolaylıkla ayırt edilebildi (Şekil 52d,e,f). Aseton ile etching sonrası aynı kombinasyon ile boyanan epon kesitlerde de Tip I kollajen lifler berrak zemin üzerinde canlı yeşil renkte, toluidine blue ile morlacivert boyanarak kontrast oluşturan diğer yapılardan kolaylıkla ayırt edildi. Parafin kesitlere göre çok daha net detaylar izlendi (Şekil 53e,f,g,h).

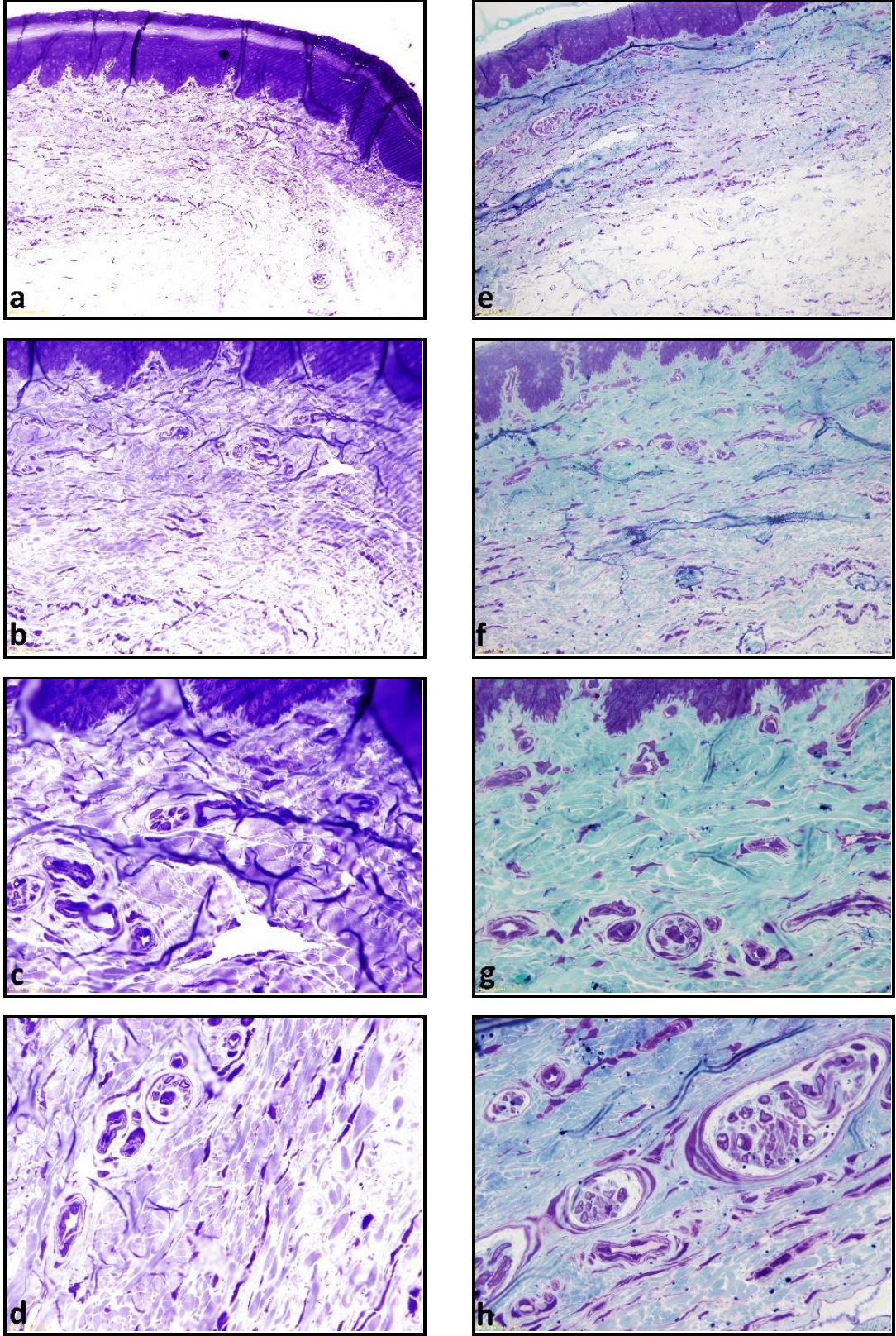
Bulgularımızın sonucunda, Tip I kollajen liflerin demonstrasyonunda; hem parafin kesitlerde hem de yarı ince epon kesitlerde, trikrom tekniklerine alternatif olarak toluidine blue ile light green kombinasyonundan yararlanılabileceği düşünüldü.



Şekil 51. Deri parafin kesitlerinde; H-E (a,b,c), Masson trikromu (d,e,f) boyamaları.



Şekil 52. Deri parafin kesitlerinde; Toluidine blue (a,b,c), Toluidine blue-Light green (d,e,f) boyamaları.

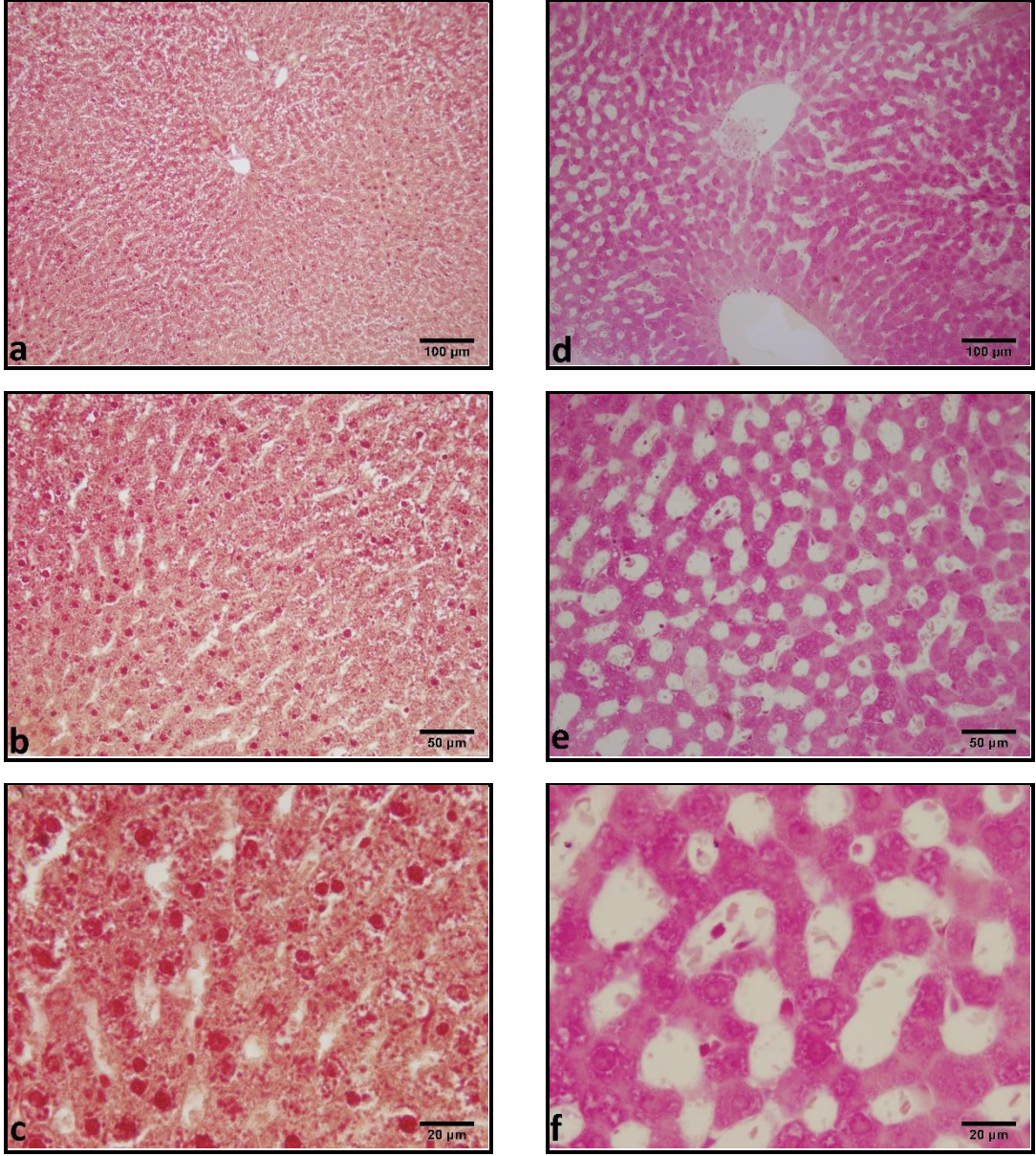


Şekil 53. Deri yarı ince epon kesitlerinde; Toluidine blue (a,b,c,d), Toluidine blue-Light green (e,f,g,h) boyamaları.

4.3.4. Mitokondri İdentifikasyonu

Hücreesel organellerden olan mitokondri, parafin kesitlerin rutin hematoksilin-eozin ile boyanması sonrası ayırt edilemez. Karaciğere ait hematoksilin-eozin ile boyanmış parafin kesitlerdeki hepatositlerde de bu ayırım yapılamamaktadır (Şekil 48a,b,c). Benzer olarak aseton ile etching sonrası konvansiyonel toluidine blue ile boyanan karaciğere ait yarı ince epon kesitlerde de, mitokondrial ayırım çok spesifik olarak yapılamamaktadır (Şekil 49d,e,f). Altmann protokolü, parafin kesitlerde mitokondrial identifikasyon için önerilen spesifik boyamalardandır. Bu metodun uygulandığı karaciğer parafin kesitlerinde mitokondrionlar; sarımsı sitoplazmik zemin üzerinde kontrast oluşturan canlı kırmızı renkte boyanan granüler yapılar şeklinde kolaylıkla ayırdedilmiştir (Şekil 54a,b,c). Protokol, aseton ile etching sonrası karaciğer yarı ince epon kesitlerine uygulandığında; mitokondri profili soluk pembemsi-sarı sitoplazmik zemin üzerinde kontrast oluşturan canlı sklamen renkte granüler yapılar olarak net olarak seçilebilmiştir (Şekil 54d,e,f).

Bu bulgular doğrultusunda mitokondri demonstrasyonunda; (a) parafin kesitler için önerilen Altmann protokolünün, yarı ince epon kesitlerde de uygulanabileceği sonucuna varıldı.



Şekil 54. Karaciğer parafin kesitlerinde (a,b,c) ve yarı ince epon kesitlerinde (d,e,f) Altmann tekniği boyaması.

TARTIŞMA ve SONUÇ

1960'lı yıllarda başlayan plastik kesitlerin boyanması alanında; klasik olarak kullanılmakta olan bazik boyaların tek olarak daha pratik kullanılabilmelerine yönelik pH, ısı, mikrodalga ışınımı gibi etkenlerin araştırıldığı birçok çalışma yapılmıştır. Mevcut metotların veya yeni geliştirilecek metotların daha hızlı, kolay, pratik ve güvenilir özellikte olması, en üstün histolojik detayların elde edilmesine imkan vermesinin hedeflendiği bu alandaki araştırmalara günümüzde halen devam edildiği görülmektedir.

Plastik kesitlerde monokromatik boyama alanında; toluidine blue ilk olarak bir grup araştırmacı tarafından (Trump, Smuckler, & Benditt, 1961) osmiyum tetroksit fiksasyonu sonrası yarı ince epon kesitlerin boyanmasında denenmiştir. Toluidine blue'nun yüksek alkali solüsyonu ile yaptıkları boyama ve aldıkları olumlu sonuçlar, protokolün ve boyanın günümüzde de tüm laboratuvarlarda bu alanda yaygın olarak kullanılmasının miladı olmuştur. Bu boya plastiğe gömülü tüm dokularda genel olarak mavi tonlarında boyanma sağlarken, bazı hücrelerde ve doku komponentlerinde kırmızimsı-mor renkte metakromatik boyanmaya neden olur. Alkali özelliği, solüsyon içerisine eklenen sodyum tetraborat (boraks) tarafından sağlanır.

Lynn (1965); yarı ince epon kesitleri güçlü alkali olan sodyum karbonat ile hazırladığı toluidine blue ile boyamış ve doyurucu sonuçlar aldığını rapor etmiştir. Metot, elektron mikroskopik oryantasyon için de uygun bulunmuştur.

Diğer bir çalışmada yarı ince epon kesitler alkalik toluidine blue ile boyandıktan sonra kesitler ağarınca kadar yağ içinde bekletilmiştir. Bazı hücrelerin oldukça koyu renkte kaldığı ve yağ uygulamasının olasılıkla diferansiyasyon etkisi gösterdiği düşünülmüştür (Stockert, & Colman, 1978).

Bir başka çalışmada, yarı ince kesitlerde metilen blue ve sodyum tetraborat uygulanması sonrası kardiyomiyositlerdeki mitokondri morfolojisi çalışılmıştır. Çalışmanın elektron mikroskopi düzeyine iletmesine gerek olmayacak kadar başarılı olduğu bildirilmiştir (Gevondian, & Avtandilov, 1982).

Araldite gömülen dokuların yarı ince kesitlerinin hafif ısıtılmış metilen blue ile 1-3 dakika boyanması araştırıldığı çalışmada; hızlıca gerçekleşen polikromatik kontrastlar sağlandığı, ayrıca elektron mikroskopik olarak da karşılaştırmalı analiz yapılabileceği belirtilmiştir (Loginov et al., 1987).

Bir başka çalışmada aldehit kullanılan ve aldehit kullanılmayan iki fiksasyon kategorisini izleyen mutlak osmikasyon sonrası myelinli sinir liflerinin korunması ve boyanması araştırılmıştır. Yarı ince epon kesitlerde toluidine blue boyamasında mikrodalga desteğinden yararlanılmış ve doyurucu sonuçlar elde edildiği ifade edilmiştir (Feirabend et al., 1998). Mikrodalga ışınımından yararlanan bir diğer çalışmada; sinir sistemi dokularının gluteraldehit ve osmiyum tetroksit ile ikili fiksasyonu, doku takibi ve plastiğe gömme aşamalarında mikrodalga ışınımı uygulanmıştır. Araştırmacılar konvansiyonel toluidine blue ile boyadıkları yarı ince epon kesitlerde yapıların oldukça iyi korunup boyandığını, elektron mikroskopik düzeyde de kaliteli görüntüler elde ettiklerini bildirmişlerdir (Calkins et al., 2020).

Alkalinitenin artırılmasının amaçlandığı bir boyama araştırmasında; yarı ince epon kesitler bazik fuksin-metilen blue-borik asit-sodyum hidroksit karışımından oluşan solüsyon ile 45-50°C'de 4-5 saniye boyanmış ancak sonuçlar yetersiz olduğu için protokolde değişiklikler yapılması gerektiği rapor edilmiştir (Sato, & Shamoto, 1973).

2018 yılında yayınlanan bir çalışmada, yarı ince epon kesitlerde kolay ve tek aşamalı polikromatik boyama metodu değerlendirilmiştir. Azur B ve bazik fuksin karışımından hazırlanan boya solüsyonu karışımı kesitlere farklı şekillerde uygulanmıştır. Alkalinizasyon için kullandıkları boraks solüsyonunun boyalara ayrı ayrı değil, boya karışımına ve boyama işleminden 20 dakika önce eklendiğinde; ayrıca epon kesitlerin hot plate üzerinde 50°C yerine 100°C'de boyandığında en iyi sonuçları aldıklarını saptamışlardır (Morikawa et al., 2018).

Çalışmamızda epon kesitlerdeki dokulara boyaların penetrasyonunu arttırmak amacıyla literatür bilgisi doğrultusunda hem bazik hem de asidik karakterdeki boya solüsyonlarına alkalinite sağlamak/yükseltmek için boraks ilavesi yapılarak tekli boyama denemeleri çalışıldı. Ancak toluidine blue dışında çalışılan diğer tüm bazik ve asidik boyalar ile başarılı sonuçlar alınmadı. Bu nedenle ikili boyamalara boraks ilavesiz sulu solüsyonlar ile devam edildi. Bir araştırmadaki olumsuz bulgular

sonrası ifade edildiği gibi (Sato, & Shamoto, 1973); farklı formülasyonlar, farklı alkali düzeyleri, ısı gibi boyanmayı etkileyen faktörlerde yapılacak değişik denemeler ile sonuçların iyileştirilebileceği düşünüldü.

Çalışmamız kapsamında glutraldehit-osmiyum tetroksit ikili fiksasyonu sonrası ince bağırsak ve pankreas dokularına ait yarı ince epon kesitlere altı farklı monokromatik boyama uygulandı.

Hematoksilen ile tekli boyama her iki dokuda da, sadece nukleuslar düzeyinde detaylar sağladığı için olumlu bulunmadı ve kullanılması uygun bulunmadı. Harris hematoksileni epon kesitlerde tekli boyama olarak ilk kez çalışıldı, ancak olumlu bulunmadı. Taranan literatürde de yarı ince epon kesitlerde ve osmikasyonun atlandığı hidrofilik rezin kesitlerde hematoksilen boyamasından, nuklear kontur boya olarak farklı boyalar ile farklı metotlarda yararlanıldığı görüldü (Iwadare, Harada, Yoshino, & Arai, 1990; Scala et al., 1993).

Epon kesitlerde tekli boyama olarak ilk kez çalışılan eozin, ince bağırsakta hiç detay sağlamadı. Literatürde de yarı ince epon kesitlerde eozin boyamasının, farklı boyalar ile kombine edilerek kullanıldığı görülmüştür (Scala et al., 1993).

Toluidine blue ile monokromatik denemelerde hem ince bağırsak hem de pankreasta; tüm boyamalarda konvansiyonel epon kesit boyası olarak klasik bilgilere paralel çok üstün histolojik detaylar izlendi.

Literatürde yarı ince epon kesitlerde asit fuksin, farklı boyalar ile kombine edilerek kullanılmıştır (Smith, 1981; Van Reempts, & Borgers, 1975). Anyonik boya olduğu için daha önce epon kesitlerde çalışılmadığı düşünülen asit fuksin, çalışmamızda ilk kez denenmiştir ve pankreas dokusunda kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Taranan literatürde metil green tekli boyaması yerine, fosfotungstik asit ile karışım olarak kullanıldığı görülmüştür (Tato et al., 1991). Metil green bu formülasyonda ilk kez çalışıldı ve pankreas için başarılı olduğu düşünüldü.

Nötral red, fast green ile karışım olarak kullanılmıştır (Manskikh, & Sheval, 2020). Monokromatik boyamasına taranan literatürde rastlanmamıştır. Bu alanda ilk kez çalışılmıştır, ancak olumlu bulunmamıştır.

Renkli parafin kesit boyamalarında monokromatik tekli boyamalar yerine yaygın olarak kontur boyamanın da olduğu ikili veya üçlü boya solüsyonunun kullanıldığı polikromatik boyamalar tercih edilir. Kullanılan boya solüsyonları su ile

veya bazen alkol ilavesi ile hazırlanır. Hematoksilen ve eozin kombinasyonunda görülen histolojik detaylardan hangi komponent/lerin hangisi tarafından boyandığının değerlendirilebilmesi amacıyla bu iki boya tekli olarak da çalışılmıştır ve sonuçlar histoloji ve histoloji teknikleri alanında temel ve klasik bilgi olarak yerini almıştır (Clark et al., 1981; Drury et al., 1967; Green, 1991; Ross et al., 2011). Olumlu sonuçlar alma konusunda beklentimiz yüksek olmamakla birlikte, çalışmamızda epon kesitlere kontrol oluşturmak ve karşılaştırma yapmak amacıyla parafin kesitlere tekli boyamalar da uygulanmıştır.

Parafin kesitlerdeki hematoksilen tekli boyama sonuçları, klasik bilgiler ile tamamen paraleldir. Nuklear boyanma ve detayları sağlamasına ek olarak, genel morfoloji ve doku ayrımını da imkan vermektedir.

Eozin ile parafin kesitlerde tekli boyama; literatür ile uyumlu olarak genel morfoloji ve doku ayrımında detay sağlamamıştır.

Katyonic ve metakromatik özellikli toluidine blue ile parafin kesitlerde tekli boyama; mast hücre granülleri ile kıkırdak matriksi için, ayrıca polarizasyon mikroskopunda amiloid depozitlerinin gösterilmesi için önerilmektedir (Clark et al., 1981; Drury et al., 1967; Green, 1991). Bu komponentlerden farklı olarak çalışmamızda kullandığımız dokulardan pankreasta toluidine blue genel morfoloji hakkında az da olsa histolojik detay vermekle birlikte, ince bağırsakta olumsuz bulundu. Literatür ile paralel olan sonuçlarımız ışığında, çalışılan iki dokuda da ek bir avantaj sağlamadığı düşünülmüştür.

Mitokondri identifikasyonu amacıyla özel metot kapsamında farklı formülasyonda kullanımı önerilen asit fuksinin, parafin kesitlerde tekli anyonik bir boya olarak kullanım alanı yoktur (Clark et al., 1981; Drury et al., 1967; Green, 1991). Bu bilgi ile paralel olarak, bu boyanın ince bağırsak ve pankreasta tekli uygulama sonuçları genel morfoloji ve doku ayrımında detay vermemiştir.

Metil green, bazik karakterde nuklear bir boyadır ancak genellikle başka bir boya ile kombine olarak kullanılır (Clark et al., 1981; Drury et al., 1967; Green, 1991). Çalışmamızda da ikinci bir kontur boyamanın olmaması ve yaygın olarak yeşil tonlarında boyanma olması nedeniyle detay sağlamamıştır. Bu sonuç, literatür bilgisi ile uyumludur.

Nötral red, katyonik zayıf nükleer bir boyadır ve parafin kesitlerde kontur boya olarak önerilir (Clark et al., 1981; Drury et al., 1967; Green, 1991). Bu bilgi ile uyumlu olarak çalışmamızda tekli olarak yaptığımız boyamalarda, ikinci bir kontur boyamanın olmaması ve yaygın olarak kırmızı tonlarında boyanma olması nedeniyle detay elde edilememiştir.

Değişik boya ve kombinasyonlarının epon kesitlerde kolaylıkla uygulanmasına imkan vermek üzere çeşitli ajanlar ve protokoller (alkali hidrolizi, halojenizasyon, asit aracılı-oksidasyon) ile de-eponizasyon (etching) ve de-osmikasyon mekanizmaları üzerinden öneriler ve araştırmalar bulunmaktadır. Bu solvent ve ajanların rezin kesitler üzerindeki etkisi çok fazla bilinmemektedir (Hayat, 2000; Robinson et al., 1996). Ancak kesitlerde hasarlanmadan kalan kısımlarda ışık mikroskopi düzeyinde birçok klasik ve özel boyamaların uygulandığı, özellikle immünohistokimya için etching sonrası başarılı sonuçlar elde edildiğine dair çalışmalar bulunmaktadır.

Bir çalışmada, yarı ince epon kesitler tek aşamalı Mallory-Heidenhain boyası ile boyanmıştır. Kısa bir hidrojen peroksit muamelesi, celestine blue ile nükleer boyama ve son olarak modifiye Cason solüsyonu (sodyum bikarbonat) uygulanan kesitlerde; birçok yapının farklı renklerde boyandığı bildirilmiştir (Van Reempts, & Borgers, 1975).

Osmiyum tetroksit fiksasyonu sonrası yarı ince epon kesitlere boyama öncesinde aseton ile hazırlanan potasyum permanganat uygulanan bir çalışmada, kesitler toluidine blue-malahit green karışımından oluşan solüsyon ile boyanmıştır. Kontur boyama için bazik fuksin kullanılmıştır ve birçok komponentte ayırt edici boyanma sağlandığı bildirilmiştir (Grimley, 1964).

Bir başka araştırmada, insan parazitlerinin boyanması için geliştirilmiş Stevenel's blue karışımı, farklı dokulara ait yarı ince epon kesitlerde denenmiştir. Potasyum permanganat ile metilen blue karışımının 60°C'de 10 dakika süre ile tek aşama şeklinde uygulanması sonrası; nükleer, sitoplazmik ve ekstrasellüler komponentlerin canlı ve kontrast oluşturan boyanma sağladığı ifade edilmiştir (del Cerro, Cogen, & del Cerro, 1980).

Yarı ince epon kesitlerde farklı boyamaların çalışıldığı bir diğer araştırmada; Azan boyaması için öncesinde potasyum dikromat muamelesinin gerekliliği, H&E

boyaması için deosmikasyon gerekliliği, PAS-methenamin silver boyaması için herhangi bir modifikasyona gerek olmadığı bildirilmiştir (Iwadare, & Arai, 1995).

Bir diğer boyama çalışmasında; gluteraldehit-paraformaldehit ile fikse ve osmiyum tetroksit ile postfikse dokuların üç farklı epon tipine gömülmesi ile elde edilen yarı ince kesitlere boyama öncesi oksidasyon ve ağartma işlemi uygulanmıştır. Sonrasında karbol metilen blue-karbol gentian violet solüsyonu ile boyama ve pararosanilin ile kontur boyaması yapılmıştır. Farklı epon tiplerinde standart boyanma sağlayan bir metot geliştirildiği rapor edilmiştir (Tolivia et al., 1994).

Alkalic ajanlarla yapılan çalışmalar arasında; insan periferik sinir dokularının gluteraldehit ve osmiyum tetroksit ikili fiksasyonu sonrası yarı ince kesitlerine potasyum hidroksit ile epon uzaklaştırma işlemi uygulanmıştır. Sonrasında hidrojen peroksit ile de-osmikasyon uygulanan kesitler, mikrodalga aracılı antijen retrieval'a tabi tutulmuş ve immünohistokimyasal uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Zemin boyanmasının olmadığı ifade edilen çalışmada, immün boyamalar son derece başarılı bulunmuştur (Cai et al., 2005).

Gluteraldehit ile fikse fare ve sıçan böbrek dokularında yapılan bir araştırmada, osmiyum tetroksit postfiksasyonu uygulanan ve uygulanmayan yarı ince epon kesitlerde bazı membran proteinlerinin immünohistokimyası çalışılmıştır. Potasyum hidroksit ile epon uzaklaştırması işleminin ardından mikrodalgada antijen retrieval uygulaması sonrası gerçekleştirilen immünooperoksidaz ve immünofloresan işaretlemelerde olumlu sonuçlar alındığı bildirilmiştir (Zhai et al., 2007).

Sıçanlara ait sinir dokularında myelinli liflerin gösterilmesi amaçlanan bir çalışmada, gluteraldehit ve osmiyum tetroksit ikili fiksasyonu sonrası yarı ince kesitlere alkali etching ajanlarından sodyum etoksit ile etching uygulanmıştır. Sonrasında diaminobenzidin (DAB) solüsyonu ile muamele edilen kesitlerde myelinli lifler kolaylıkla izlenebilmiştir. Metot, osmiyum ile DAB'ın reaksiyona girme mekanizmasına dayandığı için, osmiyum fiksasyonunun şart olduğu belirtilmiştir (Krueger et al., 1999).

Yine bir araştırma çalışmasında gluteraldehit ile fiksasyon sonrası osmikasyon uygulanmadan epona gömülen sıçan böbrek ve karaciğer dokularından 100-1000 nm arasında yarı ince kesitlere immünofloresan teknik uygulanmıştır. Araştırmacılar sodyum etoksit ile epon etching işlemi sonrası yapılan immün boyamalarda en net

floresan görüntünün 100-250 nm kalınlıktaki kesitlerde elde edildiğini bildirmişlerdir (Haraguchi, & Yokota, 2002).

Loeffler'in metilen blue metodu, periyodik asit-methenamine silver boyaması, Giemsa, PAS ve hematoksilen kontur boyamalarının böbrek biyopsisi yarı ince epon kesitlerine uygulanmasının denendiği bir çalışmada; boyama öncesi düşük alkali solüsyon amaçlı dimetil sülfoksit içinde eritilen crown eter ile epon uzaklaştırması ve sonrasında boyamalar uygulanmış, tanısal anlamda oldukça tatminkar sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Iwadare et al., 1990).

Çalışmamızda da yukarıdaki araştırmalara benzer olarak; gluteraldehit-osmiyum tetroksit ikili fiksasyonu sonrası ince bağırsak ve pankreas dokularına ait yarı ince epon kesitlerde dört monokromatik boyamada alkali ajan olarak sodyum hidroksit ile etching uygulanmış ve sadece toluidine blue boyamasında başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Diğer boyamalarda olumlu sonuçlar sağlanamamıştır. Alkali ajan ile etching uygulanan diğer çalışmalar ile bulgularımızın uyumlu olmayışı, kullandığımız boya ve dokuların farklı olması nedeniyle olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Asit ajanların etching amacı ile kullanıldığı araştırmalardan birinde, yarı ince epon kesitlerin toluidine boyaması öncesi HCl ile muamele edildiğinde çok daha iyi kontrast olduğu bildirilmiştir (Erenpreisa, & Enkuzens, 1980).

Bir başka çalışmada elektron mikroskopi için hazırlanan epon bloklardan alınan yarı ince kesitler, lamel üzerine toplanarak seri kesitler şeklinde boyanmıştır. Hot plate üzerinde kurutulan kesitler periyodik asit muamelesi sonrası bazik fuksin ve alkalik metilen blue ile boyanmıştır. Kesit almaya ara vermeksizin seri kesit eldesi ve boyanması başarılı bir şekilde sağlanmıştır (Roberts, & Hutcheson, 1975).

Çalışmamız kapsamında dört monokromatik boyamada asit etching ajanı olarak periyodik asit uyguladığımız kesitlerde; toluidine blue boyamasında, konvansiyonel boyamaya göre daha iyi kontrast elde edilmiştir.

İnce bağırsak kesitlerinde periyodik asit etchingi sonrası asit fuksin boyamasında, goblet hücrelerinin sklamen tonda boyanması ve ayrımı dikkat çekiciydi. Etching amacıyla kullanılmakla birlikte, periyodik asitin PAS reaksiyonundaki etkisinin bu boyamada benzer bir rol oynamış olabileceği, asit fuksinin de Schiff ayracında kullanılan bazik fuksinin bir türevi olarak ona benzer boyama davranışı göstermiş

olabileceği düşünöldü. Bu nedenle periyodik asit etchingi sonrası asit fuksin boyamasının bazı modifikasyonlar ile PAS (+) komponentler içeren farklı dokularda da çalışılarak geliştirilmesine karar verildi.

Metil green tekli boyamasında periyodik asit etchingi, sağladığı detaylar nedeniyle başarılı bulundu, ancak nötral red tekli boyama sonuçları olumlu değildi.

Boyama öncesi asit etchingi yapılan ve olumlu sonuçların alındığı çalışmalar ile paralel olarak, çalışmamızda da toluidine blue, asit fuksin ve metil green boyamalarındaki sonuçlarımız oldukça tatminkar bulunmuştur. Sadece nötral red sonuçları yetersiz olup, bunun da zaten zayıf nuklear bir boya olan nötral red'in tekli kullanımda zayıf penetrasyonu ve etkinliği nedeniyle olabileceği düşünöldü.

Bir çalışmada, yarı ince epon kesitlere boyama öncesinde aseton uygulanmıştır. Oil red O boyaması sonrası thionin ve azur B ile kontur boyama uygulanan kesitlerde, intrasellöler lipidler kırmızı renkte çok belirgin olarak izlenmiştir. Ancak renklerin kalıcı olmadığı ifade edilmiştir (Tzitsikas et al., 1962).

İyot/brom buharına maruz bırakıldıktan sonra asetonla yıkanarak eponun kesitlerden uzaklaştırılması bilgisinin haricinde, asetonun tek olarak uygulanması ve sonrasında üçlü boyamanın yapıldığı bu çalışmadan başka aseton kullanımının olduğu literatüre rastlanmamıştır. Çalışmamız kapsamında; üçüncü etching ajanı olarak uyguladığımız aseton sonrası yapılan tüm monokromatik boyama sonuçları, alkali ve asit etchingi sonrası boyamalara ve etching uygulanmadan yapılan boyamalara göre çok daha başarılı olarak değerlendirildi. Aseton etchingi sonrası toluidine blue boyamaları, özellikle pankreasta etching uygulanmadan konvansiyonel boyamalara eşdeğer hatta daha berraktı ve daha çok detay sağladı. Taranan literatürde aseton ile etching uygulamasının, toluidine blue ve diğer üç boyamada denendiğine rastlanmamıştır. Bu anlamda bulduğumuz sonuçlar hem ilk, hem olumludur. Bu bulgularımız nedeniyle epon kesitlerdeki kombinasyon uygulamalarının, tüm boyamalarda aseton ile epon uzaklaştırıldıktan sonra gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

Epon kesitlerde daha çok renk ile kontrast yaratma ve daha çok doku komponentinin identifikasyonunu sağlamak düşüncesi ile iki (dikromatik) veya daha çok (polikromatik) boya solüsyonunun karıştırılarak veya kombine edilerek ardışık kullanılmasına yönelik pek çok çalışma yapılmıştır.

İkili boyama araştırmaları arasında 1967’de yapılan bir çalışmada; sıçan ve hamster testis, epididimis dokularının epon ve araldit yarı ince kesitlerinde spermilerin hücrenel komponentlerinin diferansiyal boyanması amaçlanmıştır. Toluidine blue ve onu izleyen bazik fuksin uygulanması sonrasında spermiumlarda akrozom, orta parçadaki mitokondrial kılıf ve kuyruğun farklı boyanması ve ayrımı sağlanmıştır. Protokole fosfotungstik asit ve light green ile devam edilmesi durumunda ise epon kesitlerde kollajenin de ayrı renkte boyanmasını sağlayan polikromatik bir metot geliştirilebileceği belirtilmiştir (Aoki, & Gutierrez, 1967).

Yarı ince epon kesitlerin bazik fuksin ve alkali metilen blue ile boyandığı araştırmada; hızlı ve kolay olduğu ifade edilen tekniğin, özellikle hücre ve bağ doku ayrımını iyi sağladığı bildirilmiştir (Huber et al., 1968).

Dikromatik bir boyama çalışmasında; insan, kobay ve sıçanlardan elde edilen farklı dokulara ait epon, araldit ve glikol metakrilat yarı ince kesitler borakslı metilen blue ve bazik fuksin ile boyanmıştır. Birçok yapıda izlenen boyanmalar sonucu metot, özellikle periferik sinir ve damar incelemeleri için önerilmiştir (Aparicio, & Marsden, 1969).

Jha (1976); fare meme dokusuna ait epon kesitlerde iki farklı pH’da iki boya olan bazik fuksin-metilen blue karışımından oluşan tek solüsyon ile polikromatik boyanma sonuçları elde etmiştir. Meme dokusundaki epitelyal hücreler, bağ dokusu ve yağ hücrelerinin kontrast renklerde boyandığını; mide, adrenal bez, meme tümörü ve arter dokularında da polikromatik boyanmalar gözlendiğini bildirmiştir.

Bir başka ikili boyama çalışmasında, rutin toluidine blue boyamasını izleyen bazik fuksin uygulaması ile sinir dokusundaki kollajenöz bağ dokusunun kolaylıkla seçilebilmiştir (Menovsky, & van den Bergh Weerman, 1999).

2020 yılında yayınlanan bir çalışmada araştırmacılar, yarı ince epon kesitlere Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin ayrımı için kullanılan Twort’un boyama metodunu (nötral red ve fast green FCF karışımı) adapte ederek uygulamışlardır. Araştırmacılar konvansiyonel monokromatik metilen blue boyaması ile yaptıkları karışılaştırmada, uyguladıkları metot ile birçok yapının farklı renklerde kolaylıkla birbirinden ayırt edilebildiğini belirtmişlerdir. Basit ve kolay bir dikromatik boyama uyguladıkları çalışmanın, osmiyum postfiksasyonu sayesinde elektron mikroskopi ile

devamına ve böylece ışık ve elektron mikroskopi korelasyonuna da imkan sağladığını vurgulamışlardır (Manskikh, & Sheval, 2020).

Üç ya da daha fazla boya veya metodun kullanıldığı polikromatik yarı ince kesit boyama araştırmaları da denenmiştir. Bunlardan birinde; çeşitli rezinlere gömülüp elde edilen yarı ince epon kesitler 65°C'de metilen blue-azur II solüsyonu ile boyandıktan sonra bazik fuksin kontur boyaması uygulanmıştır. Beklemiş eski epon blok kesitlerinin yeni olanlara göre daha az boyandığı gözlenmiştir. Hızlı ve kolay olan bu teknik, fotoğraflama ve elektron mikroskopik oryantasyon için uygun bulunmuştur (Humphrey, & Pittman, 1974).

Bir başka polikromatik boyama denemesinde; çeşitli dokulara ait yarı ince epon kesitler tek aşamalı Mallory-Heidenhain boyası ile boyanmıştır. Celestine blue ile nuklear boyama uygulanan kesitlerde birçok komponentin farklı renklerde boyandığı bildirilmiştir (Van Reempts, & Borgers, 1975).

Retina tabakalarındaki hücresel yapıların sitolojik özelliklerinin analizinin amaçlandığı bir çalışmada, yarı ince epon kesitler bazik karakterdeki toluidine blue, metilen blue ve thionin ile konvansiyonel olarak boyanmıştır. Işık mikroskobik düzeyde retinanın 3x8mm'lik nispeten geniş segmentinde sitolojik analize imkan veren üçlü boyama, oldukça basit ve uygun bulunmuştur. Dokuların ultrastrüktürel incelemeye devam imkanı da önemli bir avantaj olarak belirtilmiştir (Manokhina, & Bakhtybaev, 1978).

1980 yılında yapılan bir araştırmada; yarı ince epon kesitlerde PAS boyamasına kontrast oluşturmak amacıyla sonrasında uygulanan metilen blue-azur II boyaması denenmiştir. Elde edilen başarılı ışık mikroskobik sonuçlara ek olarak, ultrastrüktürel incelemeye devam imkanı da önemli bir avantaj olarak görülmüştür (Schroeder et al., 1980).

Smith (1981); rutin parafin boyama protokollerinden olan Masson trikrom metodunu modifiye ederek glikol metakrilat kesitlerine uygulamıştır. Sırasıyla demirli hematoksilen, Biebrich scarlet-asit fuksin ve anilin blue boyamasını izleyen 2-butoksietanol yıkaması sonrası oldukça başarılı sonuçlar elde ettiğini ifade etmiştir.

Oldmixon (1988); büyük boyutlu epoksi kesitlerin boyanmasında önerilen Mallory'nin phloxin B-metilen blue-azur II tekniğinin bir versiyonunu akciğer dokusunda araştırmıştır.

Polikromatik bir diğere boyama çalışmasında; yarı ince kesitlerde karbol metilen blue-karbol gentian violet solüsyonu ile boyama ve pararosanilin ile kontur boyaması yapılmıştır. Oda sıcaklığında ve on dakika kadar bir sürede oldukça sabit ve homojen sonuçlar elde edilmiştir. Polikromatik boyamalar literatürde karmaşık ve uzun zaman gerektiren metotlar olarak belirtilmekle birlikte, bu çalışmada kolay, kısa süreli ve farklı epon tiplerinde de standart boyanma sağlayan bir metot geliştirildiği ifade edilmiştir (Tolivia et al., 1994).

Fare fetüslerinden elde edilen vertebral kırık ve kemiklerin plastiğe gömülü yarı ince epon kesitlerinde üçlü boyama çalışmasında; Metilen blue ve Azur A boyamalarını izleyen Pararosanilin kontur boyaması (MAP) uygulanmıştır. Sonuçlar, toluidine blue boyaması ile karşılaştırılmıştır. MAP boyaması uygulanan kesitlerde encondral kemikleşme sürecinde vertebral kemikleşme merkezlerindeki gerek kırık ve kemik dokusu hücrelerinin, gerekse ekstrasellüler matriks yapısının ayrımı çok rahat sağlanmıştır. Uygulaması kolay ve kısa süreli olan bu protokol, ultrastrüktürel incelemeye devam imkanı da sağladığından başarılı olarak değerlendirilmiştir (Grill et al., 1995).

Başka bir çalışmada; çeşitli dokularda iron alum hematoksilen boyaması, H&E boyaması, metilen blue-bazik fuksin ikili boyaması ve metilen blue-azur II-bazik fuksin boyamaları ile toluidine blue boyamaları karşılaştırılmıştır. Uygulanan metotlar ile başarılı sonuçlar sağlanmakla birlikte; toluidine blue'nun yine de hızlı, kolay ve histolojik detayların eldesine imkan veren üstünlüğünü ifade etmişlerdir (Öztürk, 2003).

D'Amico (2005); yarı ince epon kesitlerde üçlü boyama çalışmıştır. Metilen blue-azur B'nin iki farklı konsantrasyon karışımının uygulandığı kesitlere bazik fuksin de uygulamıştır ve sonuçların olumlu olduğunu bildirmiştir.

Yarı ince plastik kesitlerin boyanarak ışık mikroskopik düzeyde değerlendirilmesinden; stereoloji, klinikte patoloji ve tanısal alanlarda da yararlanılmaktadır.

Bir çalışmada epona gömülmüş büyük boyutlu normal ve patolojik insan dokularına ait yarı ince kesitler bazik fuksin ve metilen blue ile boyanarak değerlendirilmiştir. Hematoksilen-eozin sonuçlarına benzer boyanmalara ek olarak, ultrastrüktürel incelemeye devam imkanı da sağladığından, metot genel histoloji ve tanısal cerrahi

patoloji alanında yararlanılacak bir çalışma olarak değerlendirilmiştir (di Sant' Agnese, & De Mesy Jensen, 1984).

Korneal hasar ve iyileşme mekanizmasının ışık mikroskopik düzeyde araştırıldığı bir çalışmada; epona gömülmüş yarı ince korneal kesitlerde modifiye bir trikrom boyaması denenmiştir. Azur II-metilen blue-bazik fuksin kombinasyonundan oluşan metot ile korneal hücrelerin ve onları kuşatan ekstrasellüler matriksin kontrast renklerde net ayrımı yapılabildiği rapor edilmiştir. Protokol, ultrastrüktürel incelemeye devam imkanı da sağladığından başarılı olarak değerlendirilmiştir (Rock, Anderson, & Binder, 1993).

Spurr plastik yarı ince kesitlerde yapılan bir çalışmada; metilen blue-azur II-bazik fuksin boyamaları ile toluidine blue boyamaları karşılaştırılmıştır. Tanısal patoloji ve araştırma alanları için uygulanabilir sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Graham, & Orenstein, 2007).

Diğer bir klinik çalışmada, insan karotid arterine ait yarı ince epon kesitlerde farklı boya karışımları denenmiştir. Bir grupta metilen blue-azur B ile alizarin red (Von Kossa) boyaları uygulanmıştır. İkinci grupta metilen blue-azur B-bazik fuksin ile alizarin red (Von Kossa) boyaları uygulanmıştır. Üçüncü gruba ise metilen blue-azur B-bazik fuksin-alizarin red dördü karışımı uygulanmıştır. Aterosklerotik plaklardaki mikrokalsifikasyonlar değerlendirildiğinde, dördü boya karışımının çalışmanın amacına yönelik en başarılı sonuçlar sağladığı bildirilmiştir. Son derece kolay ve kısa süren boyama, oldukça başarılı bulunmuştur (Relucenti et al., 2010).

Sıçanlarda spinal kord hasarlarında Schwann hücrelerinin remyelasyonunun araştırıldığı morfolojik araştırma çalışması kapsamında plastik yarı ince kesitler metilen blue ve azur II ile boyanmış ve morfometrik sonuçlar kolaylıkla değerlendirilebilmiştir (Li et al., 2013).

Köpeklerde diz eklemi sinoviyal membranında histomorfometrik analiz amacıyla hazırlanan yarı ince epon kesitlerde toluidine blue ve ayrıca metilen blue ve bazik fuksin polikromatik boyama metotları uygulanarak değerlendirmeler gerçekleştirilmiştir (Stupina, Shchudlo, & Stepanov, 2017).

Bir diğer klinik araştırma çalışmasında; çeşitli katarakt ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen insan lens kapsülü örnekleri epona gömülmüştür. Metilen blue ve bazik fuksin ile boyanan yarı ince kesitlerde, lens kapsülündeki morfolojik değişikliklerin

ayrımının yapılabildiği belirtilmiştir.(Avetisov, Gamidov, Fedorov, & Rozinova, 2016).

Elektron mikroskopik çalışmalarda gluteraldehit fiksasyonundan sonra lipidleri fikse etmek için postfiksasyon amacıyla kullanılan osmiyum tetroksit, ince kesitlere yönelik bir fiksatiftir. Aynı zamanda elektron boyası olarak da kullanılır ve dokularda siyah pigment çökeltisi oluşturur. Yine osmiyum fiksasyonu yarı ince kesit boyamalarını da olumsuz etkiler. Bu dezavantajdan dokuları korumak ve daha başarılı boyamalar elde etmek amacıyla bazı çalışmalarda osmikasyon aşaması atlanmaktadır. Ancak bu durumda lipid fiksasyonu eksik kalacaktır. Önemli bir dezavantaj olarak, çalışmanın ince kesit ve elektron mikroskopi düzeyine ilerletilmesi mümkün olmayacaktır.

Böyle bir çalışmada; gluteraldehit ile fiksasyon sonrası osmikasyon uygulanmadan epona gömülen yarı ince epon kesitler, ortokromatik ve metakromatik boyanma sağlamak için farklı konsantrasyonlardaki pyronin Y ile boyanmıştır. Mukopolisakkarit içeren goblet hücrelerindeki musin ile diğer doku komponentleri ve kromatin birbirinden kolayca ayırt edilebilmiştir (Armas-Portela et al., 1984).

Osmikasyon uygulanmayan bir başka çalışmada; gluteraldehit ile fiksasyon sonrası epona gömülen yarı ince epon kesitler rutenyum red ile boyanmıştır. Polianyon içeren yapılar ve reaktif hücre komponentlerinin, basit ve hızlı bir şekilde ışık- ve elektron mikroskopik düzeyde görünür hale geldiği ifade edilmiştir (Gutierrez-Gonzalvez, Stockert, Ferrer, & Tato, 1984).

Fritsch (1989), formaldehit ile fiksasyon sonrası osmikasyon ve dekalsifikasyon uygulanmadan epona gömülen insan fetuslarına ait kesitleri 90°C'de üç dakika metilen blue-azur II solüsyonu ile boyamıştır. Bazik fuksin ile aynı sıcaklıkta yapılan kontur boyama sonrası; birçok komponentin birbirinden farklı renklerde boyandığını belirtmiştir.

Asit mukopolisakkaritlerin hücrelerin yüzeyinde bir kılıf şeklinde birikmesini önlemek amacıyla TEM fiksatiflerine eklenen rutenyum red, bir çalışmada osmikasyon uygulanmadan epona gömülen kas dokusu yarı ince kesitlerinde direkt boyama ajanı olarak kullanılmıştır. Toluidine blue ile kontur boyama uygulanan bu iki evreli protokol; son derece hızlı, kolay ve güvenilir olarak değerlendirilmiştir (Crivellato et al., 1990).

Başka bir çalışmada, gluteraldehit ile fiksasyon sonrası osmikasyon uygulanmadan epona gömülen sıçan kalın bağırsak yarı ince epon kesitlerinde goblet hücrelerindeki musin granüllerinin diferansiyel boyanması araştırılmıştır. Fosfotungstik asit-metil green ile 60°C'de beş dakika süre ile boyama sonrası bazı musin granülleri ve glikokaliks aynı renkte boyanırken diğer musin granülleri, luminal musin ve kollajen liflerin farklı ve kontrast bir renkte boyandığı izlenmiştir. Musin granüllerinde gözlenen renk farkının ultrastrüktürel düzeye de farklı dansiteler şeklinde yansıdığı ve ışık-elektron mikroskobik korelasyonun anlamlı olduğu belirtilmiştir (Tato et al., 1991).

Osmiyum tetroksit postfiksasyonu uygulanmayan ve glikol metakrilata gömme sonrası elde edilen sinir dokusu ve bağ dokusu kesitlerinde mikrodalga ışınımı aracılı boyamalar denenmiştir. Bodian gümüşlemesi, rezorsin fuksin ve sonrasında picrosirius red F3BA boyamalarının mikrodalga ışınımı sayesinde sürelerinin çok kısaldığı; farklı renklere boyanan birçok yapının ayrımının kolaylaştığı bildirilmiştir (Cannon et al., 1992).

1993 yılında yapılan bir denemede, osmiyum tetroksit postfiksasyonu uygulanmayan insan dokularının hidrofilik rezin (Bioacryl)'e gömülmesi sonrası elde edilen yarı ince kesitlerde aynı kesit üzerinde sırasıyla Harris hematoksileni, silver methenamine, light green, eozin ve safranin boyaları uygulanmıştır. Bulgular doğrultusunda tüm hücresel doku mimarisinin oldukça spesifik identifikasyonuna imkan veren histolojik, histokimyasal ve immünohistokimyasal bir metot olarak değerlendirilmiştir (Scala et al., 1993).

İnsan periferik sinir dokularında myelinsiz akson kuantifikasyonu amaçlanan bir çalışmada, gluteraldehit ile fiksasyon sonrası osmikasyon uygulanmadan yarı ince epon kesitler Bodian-Luxol tekniği ile boyanmıştır. Boyama öncesi eponun uzaklaştırıldığı çalışmada amaç doğrultusunda akson sayımlarının kolaylıkla değerlendirildiği rapor edilmiştir (Deprez, Ceuterick-de Groote, Fumal, Reznik, & Martin, 1999).

Bir diğer çalışmada, formaldehit ile fiksasyon sonrası osmikasyon uygulanmadan glikol metakrilata gömülen çeşitli dokuların 2-3 mikrometre kalınlıktaki kesitlerine farklı boyama protokolleri uygulanmıştır. H&E, picrosirius red, Sudan black, toluidine blue, periyodik asit-Schiff (PAS) metodu, alcian blue (AB)-PAS

kombinasyonu, AB-picrossirius red kombinasyonu ile pekçok intra- ve ekstrasellüler doku komponentinin farklı renk ve tonlarda boyanması gerçekleştirilmiştir. Parafin kesitlerde önerilen bu metotların teknik artefaktlar nedeniyle sorun oluşturduğu halde, bu gömme ortamının kullanıldığı kesitlerde artefakt oluşmadığı ve bu protokolden histopatoloji alanında yararlanılabileceği ifade edilmiştir (Cerri, & Sasso-Cerri, 2003).

Myelinli sinir liflerinin ışık mikroskopisinde toluidine blue ile boyanmış yarı ince epon kesitler, altın standarttır. Ancak myelin kılıfların çok koyu boyanması da sözkonusudur ve bu durumun osmiyum tetroksit ile postfiksasyon sonucu olduğu düşünülmüştür. Bu doğrultuda paraformaldehid ile fikse edilen sinir örneklerine üç farklı protokol uygulanmıştır: (1) Gömme öncesi osmiyum tetroksit ile postfiksasyon-yarı ince epon kesitler-toluidine blue boyaması, (2) Gömme öncesi osmiyum tetroksit ile postfiksasyon-parafin kesitler-hematoksilen&eoizin boyaması-Masson trikrom boyaması, (3) Gömme öncesi osmiyum tetroksit ile postfiksasyon uygulanmadan-parafin kesitler-hematoksilen&eoizin boyaması-Masson trikrom boyaması. Araştırmacılar, 2. protokole ait kesitlerin, özellikle Masson trikromu uygulanan kesitlerin çok iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir (Di Scipio, Raimondo, Tos, & Geuna, 2008).

Yayınlanan bir diğer çalışmada, dokularda osmiyum tetroksit postfiksasyonu uygulamadan sadece paraformaldehit ve glutraldehit fiksasyonu sonrası yarı ince epon kesitlerde tek aşamalı polikromatik boyama metodu denemeleri değerlendirilmiştir. Araştırmacılar konvansiyonel toluidine blue sonuçlarına göre birçok komponentin ayrımını sağladıklarını belirtmişlerdir (Morikawa et al., 2018).

Osmikasyonun atlandığı yukarıdaki literatürlerde, boyama sonuçlarının neredeyse tamamının başarılı olduğu belirtilmektedir. Çalışmamızda kullandığımız tüm boyamalar, glutraldehit-osmiyum tetroksit ikili fiksasyonu uygulanan ve deosmikasyon yapılmadan gerçekleştirmiştir. Başarısız ya da çok olumlu bulunmayan sonuçlarımızın buna bağlı olabileceği düşünüldü.

Hidrofobik plastik kesitlerin çoklu boyamalarına ait farklı boya ve protokollerin az sayıda çalışmada araştırıldığı, buna karşılık çalışmaların çoğunda önerilen klasik boyalar olan toluidine blue, metilen blue, bazik fuksin ve azur II ile denemeler yapıldığı görülmektedir. Bazik bir boyayı takiben, farklı bir bazik boya

kullanımı bilgisi ışığında (Hayat, 2000; Horobin, 1983; Robinson et al., 1996); çalışmamızda daha önce denenmemiş, ardışık iki bazik boya denemeleri yapıldı. Tercih edilen bazik boyalar kontrast renklerde olacak şekilde seçildi (örneğin; nötral red-metil green kombinasyonu). İkili boyamalar öncesinde epon kesitlerde aseton etchingi uygulanmasına karar verildiği için bazik boya-asit boya ve asit boya-bazik boya denemeleri de çalışıldı (örneğin: metil green-asit fuksin kombinasyonu, asit fuksin-metil green kombinasyonu). Ayrıca ikili boyamalarda tüm kombinasyonlarda kombine edilen boyaların sırasının değiştirilmesi ile; boyaların ilk ya da son boya olarak ve ayrıca moleküler ağırlıklarının boyanma üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi düşünüldü.

Çalışmamızda ikili kombinasyonlarda kullandığımız asit fuksin, metil green ve nötral red'in, az sayıdaki çalışmada farklı amaç ve farklı şekillerde uygulandığı görüldü.

Asit fuksinin kombine edilerek kullanıldığı bir çalışmada Mallory-Heidenhain boyamasındaki solüsyon karışımında kullanılmıştır (Van Reempts, & Borgers, 1975). Masson trikrom metodunun modifiye edilerek glikol metakrilat kesitlere uygulandığı bir diğer çalışmada (Smith, 1981); sırasıyla demirli hematoksilen, Biebrich scarlet-asit fuksin ve anilin blue dördü boyamasında üçüncü sırada yer almıştır. Bir başka çalışmada ise paraformaldehit fiksasyonu sonrası osmiyum tetroksit ile post-fiksasyon uygulanan ve uygulanmayan sinir örneklerinin parafin kesitlerinde Masson trikrom boyaması kapsamında kullanılmıştır (Di Scipio et al., 2008).

Metil green, glutraldehit ile fiksasyon sonrası osmikasyon uygulanmadan yarı ince epon kesitlerde goblet hücrelerindeki musin granüllerinin diferansiyel boyanması amacıyla fosfotungstik asit-metil green karışımı olarak kullanılmıştır (Tato et al., 1991).

Nötral red'in kombine edilerek kullanıldığı bir çalışmada, epon kesitlere nötral red ve fast green FCF karışımından oluşan Twort'un boyama metodu adapte edilerek uygulanmıştır (Manskikh, & Sheval, 2020).

Çalışmamızda hem parafin hem de yarı ince epon kesitlerde denediğimiz; Toluidine blue-Eozin, Toluidine blue-Asit fuksin, Toluidine blue-Metil green, Toluidine blue-Nötral red, Asit fuksin-Toluidine blue, Asit fuksin-Metil green, Metil green-Toluidine blue, Metil green-Asit fuksin, Metil green-Nötral red, Nötral red-

Toluidine blue, Nötral red-Metil green ikili kombinasyonlarına taranabilen literatürde rastlanmadığı için sonuçlarımızın tartışılması mümkün olmadı.

Hematoksilen-Eozin kombinasyonu ile parafin kesitlerin boyanmasında; her iki doku için genel morfolojiyi değerlendirmek anlamında tamamen klasik bilgilerle paralellik söz konusuydu. Epon kesitlerde her iki dokuda da detay vermediği izlendiği için, epon kesit boyamasında metodun bir avantaj sağlamadığı düşünüldü. Epon kesitlerde çoklu boyamalarda bazik bir boyayı izleyen asit boya alternatifi klasik kitaplarda önerilmediği için, olumsuz sonuçlarımız bu bilgi ile uyumludur. Bir araştırmada epon etchingi uygulanan yarı ince epon kesitlerde H&E boyaması için deosmikasyon gerekliliği rapor edilmiştir (Iwadare, & Arai, 1995). Çalışmamızda, gluteraldehit-osmiyum tetroksit ikili fiksasyonu sonrası hazırlanan bloklardan alınıp deosmikasyon uygulanmadan epon kesitlerde boyama gerçekleştirildiği için sonucun yetersizliği, literatür bilgisi ile uyumlu görünmektedir. Bir başka araştırmada (Öztürk, 2003); toluidine blue kadar kolay ve iyi sonuçlar vermemekle birlikte epon kesitlerde H&E boyamasının kullanılabileceği rapor edilmiştir. Çalışmalarında periyodik asit etchingi sonrası kendi hazırladıkları boya solüsyonlarını kullandıkları görülmüştür. Bizim uyguladığımız aseton etchingi ve sonrasında kullanmayı tercih ettiğimiz hazır boya solüsyonları, aynı sonuçların elde edilemeyişinin nedeni gibi görünmektedir. Parafin kesitlerde önerilen H&E boyamasının denendiği bir diğer çalışmada, osmikasyon uygulanmadan glikol metakrilata gömülen kesitler kullanılmıştır ve bu gömme ortamı ile başarılı sonuçlar elde edildiği ifade edilmiştir (Cerri, & Sasso-Cerri, 2003). Glikol metakrilat, hidrofilik olduğu için suda çözünen boyaların dokulara penetrasyonuna imkan veren bir gömme ortamıdır. Çalışmamızda osmikasyona ek olarak gömme ortamı olarak kullandığımız eponun, hidrofobik olması ve boyaların dokuya girişine imkan vermemesi nedeniyle sonuçlarımızın paralellik göstermediği düşünüldü. Diğer bir çalışmada paraformaldehit fiksasyonu sonrası osmiyum tetroksit ile post-fiksasyon uygulanan sinir örneklerinin parafin kesitlerinde H&E boyaması denenmiştir. Aynı protokol ile hazırlanan yarı ince epon kesitlerdeki toluidine blue sonuçlarına göre çok başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Di Scipio et al., 2008). Bu çalışmada elde edilen başarılı sonuçların, H&E boyamasının parafin kesitlerde uygulandığı için alındığı, bizim boyamamızın epon kesitlerde uygulanması nedeniyle benzer sonuçların alınmadığı düşünüldü.

Reçine kesitlerin boyanmasında yoğun yapılara boyanın difüzyonu yavaş olduğundan daha uzun sürede boyanmakla birlikte, boyanma daha kalıcı olur. Bu nedenle polikromatik boyamalarda ilk boyanın baskınlığı, daha sonra uygulanan boyanın dokuya ulaşmasını kısmen engelleyebilir. Reçine kesitlerde görülen bu kısmi infiltrasyon, önemlidir. Diğer taraftan çoklu boyamalarda boyaların moleküler ağırlıkları ve son boyanın dokuda kalıcılık derecesi de boyanma sonuçları üzerinde etkilidir (Hayat, 2000; Horobin, 1983; Robinson et al., 1996). Çalışmamızda hem epon kesitler hem de parafin kesitlerde denediğimiz ikili kombinasyonların sonuçları bu açılardan da değerlendirildi.

Toluidine blue-Asit fuksin/Asit fuksin-Toluidine blue boyamalarında; parafin kesitlerde son uygulanan boyanın hakimiyeti izlendi. Epon kesitlerde ise, ilk uygulanan boyanın dokulardaki baskınlığının devam ettiği gözlemlendi.

Toluidine blue-Metil green/Metil green-Toluidine blue sonuçlarında; parafin kesitlerde ince bağırsakta toluidine blue'nun baskınlığını koruduğu gözlemlendi. Pankreasta toluidine blue'nun yerini metil green'in aldığı görüldü. Epon kesitlerde ise, son uygulanan boyanın dokulardaki baskınlığı gözlemlendi.

Toluidine blue-Nötral red/Nötral red-Toluidine blue sonuçlarında; parafin kesitlerde ince bağırsakta son boyanın baskınlığını koruduğu, pankreasta ise toluidine blue'nun nötral red'in yerini aldığı gözlemlendi.

Asit fuksin-Metil green/Metil green-Asit fuksin sonuçlarında; hem parafin hem de epon kesitlerde asit fuksin'in baskın olduğu izlendi.

Metil green-Nötral red/Nötral red-Metil green sonuçlarında; parafin kesitlerde ince bağırsaklarda nötral red'in baskınlığını koruduğu gözlemlendi. Pankreasta ise metil green'in nötral red'in yerini aldığı gözlemlendi. Nötral red'in baskın olduğu epon kesitlerde ise; metil green'in ilk ya da son boya olarak etkinlik sağlayamamakla birlikte, pankreasta son boya olarak mavi tonlarında kontrast yarattığı gözlemlendi.

Denediğimiz ikili kombinasyonlardaki boyanma sonuçları ile boyaların moleküler ağırlıkları, ilk ya da son boya olarak baskınlıkları açısından bir standart ve korelasyon saptanmadı. Bu durumun, boyaların birbiri ile yarışması ve ve doku tipine göre boyama davranışlarının farklılık göstermesi nedeniyle olabileceği düşünüldü.

Parafin kesit boyamalarında; -hematoksilenden farklı olarak- gerçek bazik boyalar kullanıldığında, genellikle bazik boyadan sonra asit bir boya ile boyamaya

devam edilmez. Çünkü çoğunlukla bazik boya, yıkama sırasında dokudan ayrılma/çıkma eğilimi gösterir (Robinson et al., 1996). Çalışmamız kapsamına dahil ettiğimiz anyonik boya olan asit fuksin kombinasyonlarında (Toluidine blue-Asit fuksin ve Metil green-Asit fuksin); bu bilgi ile paralel olarak parafin kesitlerde bazik boyalar olan toluidine blue ile metil green'in dokulardan uzaklaştığı ve asit fuksin'in hakim olduğu gözlemlendi.

Çalışmamız kapsamında demonstre etmeye çalıştığımız bağ doku lifleri (elastik, tip I ve tip III kollajen) ve mitokondri özgün boyamalarına (Verhoeff hematoksileni, Toluidine blue, Toluidine blue-Light green kombinasyonu, Gordon-Sweet gümüşlemesi, Altmann protokolü) yönelik olarak; taranabilen literatürde epon kesitlere ait araştırmalara rastlanmamıştır. Ancak genel ya da farklı amaçlarla yapılan boyamalar kapsamında, bu komponentlere ait boyanma sonuçları ve ayrımlarından da söz edildiği görülmüştür.

Yarı ince plastik kesitlerde yapılan çalışmalardan birinde toluidine blue ve onu izleyen bazik fuksin uygulanması sonrasında spermiumlarda akrozom, orta parçadaki mitokondrial kılıf ve kuyruğun farklı boyanması ve ayrımı sağlanmıştır. Protokole fosfotungstik asit ve light green ile devam edilmesi durumunda ise kollajenin de ayrı renkte boyanmasının da sağlandığı bildirilmiştir (Aoki, & Gutierrez, 1967).

Dikromatik bir boyama çalışmasında; yarı ince kesitler borakslı metilen blue ve bazik fuksin ile boyanmıştır. Nukleus, sitoplazma, kollajen, elastin, myelin ve aksoplazmada izlenen boyanmalar sonucu metot, özellikle periferik sinir ve damar incelemeleri için önerilmiştir (Aparicio, & Marsden, 1969).

Diğer bir araştırmada; çeşitli dokulara ait yarı ince epon kesitler tek aşamalı Mallory-Heidenhain boyası ile boyanmıştır. Celestine blue ile nuklear boyama sonrası; çekirdek, sitoplazma, kollajen ve elastik liflerin, glikojen ve mukus gibi intrasitoplazmik komponentlerin farklı renklerde boyandığı bildirilmiştir (Van Reempts, & Borgers, 1975).

Mallory'nin phloxin B-metilen blue-azur II tekniğinin bir versiyonunun araştırıldığı bir çalışmada; bu üçlü kombinasyon ile, phloxin B çıkarılarak uygulanmasının sonuçlarını karşılaştırmıştır. Phloxin B'nin sadece kollajen ve elastik lif boyanmasını sağladığı belirtilmiştir (Oldmixon, 1988).

Fritsch (1989), epon kesitleri metilen blue-azur II solüsyonu ile boyamıştır. Bazik fuksin ile yapılan kontur boyama sonrası; kemik, kıkırdak, kollajen lifler, elastik lifler ve kas liflerinin farklı renklerde boyanarak birbirinden kolaylıkla ayırt edilebildiğini belirtmiştir.

Başka bir çalışmada, yarı ince epon kesitlerde fosfotungstik asit-metil green ile boyama sonrası bazı musin granülleri ve glikokaliks aynı renkte boyanırken diğer musin granülleri, luminal musin ve kollajen liflerin farklı ve kontrast bir renkte boyandığı izlenmiştir (Tato et al., 1991).

Bir araştırmada; glikol metakrilata gömme sonrası elde edilen sinir dokusu ve bağ dokusu kesitlerinde Bodian gümüşlemesi, rezorsin fuksin ve sonrasında picrosirius red F3BA boyamalarında mikrodalga ışınımından yararlanılmıştır. Sürelerin çok kısaldığı; sinir lifleri, elastik ve kollajen liflerin farklı renklerde boyanarak ayrımlarının kolaylaştırıldığı bildirilmiştir (Cannon et al., 1992).

1993 yılında yapılan bir denemede, yarı ince kesitlerde aynı kesit üzerinde sırasıyla Harris hematoksileni, silver methenamine, light green, eozin ve safranin boyaları uygulanmıştır. Bulgular doğrultusunda tüm hücresel doku mimarisinin oldukça spesifik identifikasyonuna imkan veren histolojik, histokimyasal ve immünohistokimyasal bir metot olarak değerlendirilmiştir (Scala et al., 1993).

Karbol metilen blue-karbol gentian violet solüsyonu ile boyama ve pararosanilin ile kontur boyama sonrası damarlardaki bağ dokusu ve elastik laminaların farklı renklerde boyandığı için kolaylıkla ayırt edilebildiği belirtilmiştir (Tolivia et al., 1994).

Periferik sinirlerdeki kollajen kompozisyonunun yarı ince epon kesitlerde demonstrasyonunun amaçlandığı ikili boyama çalışmasında, toluidine blue boyamasını izleyen bazik fuksin uygulaması ile enine ve boyuna kesitlerde sinir dokusundaki kollajenöz bağ dokusunun miktarı ve oryantasyonu kolaylıkla seçilebilmiştir (Menovsky, & van den Bergh Weerman, 1999).

D'Amico (2005); yarı ince epon kesitlerde metilen blue-azur B karışımı ve sonrasında bazik fuksin uygulamıştır. Sitoplazma, nukleus, kollajen, elastin, mukus ve lipid komponentlerde ayrımı sağlayan farklı renkler elde etmiş ve sonuçları olumlu olarak değerlendirmiştir.

Yine bir çalışmada, yarı ince epon kesitlerde azur B ve bazik fuksin karışımı ile birçok intra- ve ekstrasellüler (kollajen ve elastik lifler) komponentin farklı renk ve

tonlarda ayırımının sağlandığı ve metodun patolojik dokular için de yararlı olacağı bildirilmiştir (Morikawa et al., 2018).

Yarı ince epon kesitlerde Twort'un boyama metodunun (nötral red ve fast green FCF karışımı) adapte edildiği çalışmada; birçok intrasellüler yapıya ek olarak, ekstrasellüler kollajen ve elastik liflerin de farklı renklerde kolaylıkla birbirinden ayırt edilebildiğini belirtmişlerdir (Manskikh, & Sheval, 2020).

Bir diğer çalışmada; toluidine blue-malahit green karışımından oluşan solüsyon, kontur boyama için de bazik fuksin kullanılmıştır. Nükleus, eritrosit, mitokondri, kollajen ve elastik lifler ile kıkırdak yapılarda ayırt edici boyanma sağlandığı bildirilmiştir (Grimley, 1964).

Kalp kasına ait yarı ince kesitlerde metilen blue ve sodyum tetraborat uygulanması sonrası kardiyomiyositlerdeki mitokondri morfometrisinin araştırıldığı çalışmada; ışık mikroskopik sonuçlar, elektron mikroskopik sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Çalışmanın elektron mikroskopi düzeyine ilerletilmesine gerek olmayacak kadar başarılı olduğu bildirilmiştir (Gevondian, & Avtandilov, 1982).

Taranabilen literatürde özgün boyamalarımıza karşılık tam eşdeğer boyamalara rastlanmadığı için sonuçlarımızın birebir tartışılması mümkün olmadı. Ancak tip I kollajeni boyadığı bilinen light green, fast greenFCF ve bunların da kullanıldığı teknikler -özellikle trikrom teknikleri- kapsamında kollajen ve elastik lif (bağ dokusu) ayırımının yapılabildiğinden söz edilmiştir (Aoki, & Gutierrez, 1967; Manskikh, & Sheval, 2020; Scala et al., 1993; Van Reempts, & Borgers, 1975) ve bu sonuçlar ile çalışma sonuçlarımız uyumludur.

SONUÇLAR:

İnce bağırsak ve pankreas dokularının altı ayrı tekli boyanmasında; Parafin kesitlerde intrasellüler ve ekstrasellüler histolojik özelliklerin değerlendirilmesinde genel amaç için kullanılmasının uygun olmadığı, beklenen sonuç olarak teyit edildi.

Epon kesitlerde aseton etchingi uygulaması sonrası sonuçlar daha başarılı olarak değerlendirildi. Denenen diğer beş tekli boyamanın, toluidine blue'dan daha iyi bir alternatif olmadığı düşünüldü. Bununla birlikte pankreas dokusunun epon kesitlerinde toluidine blue yerine, komponentlerin tanımlanan boyanma özellikleri ile

amaç doğrultusunda “asit fuksin” ve “metil green” boyamalarından yararlanılabileceği sonucuna varıldı.

İnce bağırsak ve pankreas dokularının ikili boyamalarında;

Hematoksilen-Eozin kombinasyonunun; parafin kesitlerde klasik bilgilerle paralel olarak genel morfolojiyi değerlendirmek anlamında tartışmasız, çok başarılı bir yöntem olduğu teyit edildi. Epon kesit boyamasında bir avantaj sağlamadığı şeklinde yorumlandı.

Toluidine blue-Eozin kombinasyonunun, parafin kesitlerde hematoksilen-eozin kombinasyonu yerine kullanılabileceği düşünüldü. Epon kesitlerde pankreas dokusunda H&E boyamasına eşdeğer renkler ve daha ince detaylar sağladığı için, kullanılmasının yararlı olacağı sonucuna varıldı.

Toluidine blue-Asit fuksin boyamasının; toluidine blue tekli boyamasına göre daha kontrast renkler ve daha ince detaylar sağlaması sayesinde epon kesitlerde kullanılmasının yararlı olacağı düşünüldü.

Toluidine blue-Metil green ikili boyamasından; epon kesitlerde özellikle pankreas dokusunda renk kontrastı sayesinde detayların daha rahat identifikasyonuna imkan verdiği için yararlanılabileceği düşünüldü.

Asit fuksin-Toluidine blue kombinasyonunun; kontrast renkler ve daha ince detaylar sağlaması üstünlüğü nedeniyle, epon kesitlerde kullanılmasının yararlı olacağı sonucuna varıldı.

Asit fuksin-Metil green kombinasyonundan; ince bağırsak parafin kesitlerinde metil green ile boyanan goblet hücrelerinin spesifik çalışmalarında yararlanılabileceği düşünüldü.

Özel histokimyasal boyamalar ile ilgili olarak:

Elastik liflerin demonstrasyonunda; parafin kesitlerde çok özgün olmamakla birlikte toluidine blue metodundan yararlanılabileceği, epon kesitlerde ise parafin kesitler için önerilen Verhoeff hematoksileni metodundan yararlanılabileceğine,

Retiküler liflerin demonstrasyonunda; parafin kesitler için önerilen Gordon-Sweet gümüşleme protokolünün, yarı ince epon kesitlerde de uygulanabileceğine,

Tip I kollajen liflerin demonstrasyonunda; hem parafin kesitlerde hem de yarı ince epon kesitlerde, trikrom tekniklerine alternatif olarak Toluidine blue-Light green kombinasyonundan yararlanılabileceğine,

Mitokondri demonstrasyonunda; parafin kesitler için önerilen Altmann protokolünün, yarı ince epon kesitlerde de uygulanabileceği sonucuna varıldı.

Çalıştığımız dokuların epon kesitlerinde aseton etchingini izleyen boyama sonuçlarının, alkali ve asitlere göre daha başarılı olduğu görüldüğünden, kullandığımız doku ve boyama metotlarında eponu uzaklaştırmak ve daha iyi boyamalar elde etmek amacıyla asetondan yararlanılabileceği düşünüldü.

İnce kesit düzeyinde ultrastrüktürel korelasyonun gerekmediği çalışmalarda yararlanmak amacıyla; epon kesitlerde çalışılan boyama sonuçlarının osmiyum fiksasyonu yapılmadan denenerek daha iyiye ilerletilebileceği düşünüldü.

Olumlu sonuçlar elde ettiğimiz boyamalar sayesinde çalışmamızın hedefleri olan;

*hücre ve doku bileşenlerinin lokalizasyon, kuantifikasyon ve boyanma yoğunluklarının ışık mikroskopik düzeyde kolaylıkla ayırımı sağlayabilecek,

*osmiyum postfiksasyonuna bağlı olarak epon blokların, ultrastrüktürel düzeylere de ilerletilerek ışık- ve elektron mikroskopik korelasyonuna imkan verebilecek,

*bilimsel araştırmalar, histopatolojik tanısal değerlendirmeler ve eğitsel alanlarda yararlanılabilecek,

*konvansiyonel metotlara alternatif olabilecek protokoller geliştirildiği kanısına varıldı.

6. KAYNAKLAR

- Aoki, A., & Gutierrez, L. S. (1967). A simple toluidine blue-basic fuchsin stain for spermatozoa in epoxy sections. *Stain Technology*, 42(6), 307-310. DOI: 10.3109/10520296709115030.
- Aparicio, S. R., & Marsden, P. (1969). A rapid methylene blue-basic fuchsin stain for semi-thin sections of peripheral nerve and other tissues. *Journal of Microscopy*, 89(1), 139-141. DOI: 10.1111/j.1365-2818.1969.tb00659.x.
- Armas-Portela, R., Gutierrez-Gonzalvez, M. G., & Stockert, J. C. (1984). Ortochromatic and metachromatic staining reactions by pyronin Y on epon semithin sections. *Acta Histochemica*, 74(1), 1-4. DOI: 10.1016/S0065-1281(84)80016-1.
- Avetisov, S. E., Gamidov, A. A., Fedorov, A. A., & Rozinova V. N. (2016). Morphological assessment of lens capsule after different techniques of cataract extraction. *Vestnik Oftalmologii*, 132(1), 47-52. DOI: 10.17116/oftalma2016132147-52.
- Bancroft, J. D. & Stevens, A. (1996). Electron Microscopy: Practical procedures. In J. D. Bancroft, & A. Stevens (Eds.), *Theory and practice of histological techniques*. (4th Edition, pp. 388). Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Cai, Z., Manavis, J., Cash, K., Thompson, P. D., & Blumbergs, P. C. (2005). Immunohistochemical staining of epoxy resin sections of peripheral nerve. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, 13(3), 292-294. DOI: 10.1097/01.pai.0000140016.83608.ed.
- Calkins, E., Pocius, E., Marracci, G., & Chaudhary, P. (2020). A microwave method for plastic embedding of nervous tissue for light and electron microscopy. *Heliyon*, 6(1), e03036. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e03036.
- Cannon, M. S., McGuinn, D., & Stuth, N. R. (1992). Combined microwave stain for plastic embedded sections of nerve and connective tissue. *The Journal of Histotechnology*, 15(2), 113-115. DOI: 10.1179/his.1992.15.2.113.
- Cerri, P. S., & Sasso-Cerri, E. (2003). Staining methods applied to glycol methacrylate embedded tissue sections. *Micron*, 34(8), 365-372. DOI: 10.1016/S0968-4328(03)00098-2.
- Clark, G (Ed.). (1981) *Staining Procedures*. (4th Edition, pp. 1-129). Williams & Wilkins, Baltimore, London.
- Crivellato, E., Zweyer, M., Basa, M., & Mallardi, F. (1990). A ruthenium red-toluidine blue procedure for staining epoxy sections in the light microscopy. *Zeitschrift für Mikroskopisch-Anatomische Forschung*, 104(5), 769-778.
- D'Amico, F. (2005). A polychromatic staining method for epoxy embedded tissue: a new combination of methylene blue and basic fuchsine for light microscopy. *Biotechnic and Histochemistry*, 80(5-6), 207-210. DOI: 10.1080/10520290600560897.
- del Cerro, M., Cogen, J., & del Cerro, C. (1980). Stevenel's Blue, an excellent stain for optical microscopical study of plastic embedded tissues. *Microscopica Acta*, 83(2), 117-121.

- Deprez, M., Ceuterick-de Groote, C., Fumal, A., Reznik, M., & Martin, J. J. (1999). A new combined Bodian-Luxol technique for staining unmyelinated axons in semithin, resin-embedded peripheral nerves: a comparison with electron microscopy. *Acta Neuropathologica*, 98(4), 323-329. DOI: 10.1007/s004010051088.
- di Sant' Agnese, P. A., & De Mesy Jensen, K. L. (1984). Dibasic staining of large epoxy tissue sections and applications to surgical pathology. *American Journal of Clinical Pathology*, 81(1), 25-29. DOI: 10.1093/ajcp/81.1.25.
- Di Scipio, F., Raimondo, S., Tos, P., & Geuna, S. (2008). A simple protocol for paraffin-embedded myelin sheath staining with osmium tetroxide for light microscope observation. *Microscopy Research and Technique*, 71(7), 497-502. DOI: 10.1002/jemt.20577.
- Drury, R.A.B. & Wallington, E. A.(Eds.), (1967). *Charleton's histological technique*. 4th Edition, (pp. 33-182). New York: Oxford University Press.
- Erenpreişsa, E. A., & Enkuzens, A. K. (1980). Improved method of staining semithin sections with toluidine blue. *Arkhiv Patologii*, 42(8), 82-83.
- Feirabend, H. K. P., Choufoer, H., & Ploeger, S. (1998). Preservation and staining of myelinated nerve fibers. *Methods*, 15(2), 123-131. DOI: 10.1006/meth.1998.0615.
- Fritsch, H. (1989). Staining of different tissues in thick epoxy resin-impregnated sections of human fetuses. *Stain Technology*, 64(2), 75-79. DOI: 10.3109/10520298909108049.
- Gevondian, T. A., & Avtandilov, G. G. (1982). Method for the finding and morphometry of cardiomyocyte mitochondria in semithin sections. *Biulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*, 93(5), 111-113.
- Graham, L., & Orenstein J. M. (2007). Processing tissue and cells for transmission electron microscopy in diagnostic pathology and research. *Nature Protocols*, 2(10), 2439–2450. DOI: 10.1038/nprot.2007.304.
- Green, F.J. (1991). *The Sigma-Aldrich handbook of stains, dyes and indicators*. 2nd Edition, (pp. 19-715). Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wisconsin.
- Grill, V., Zwyer, M., Bareggi, R., Martelli, A. M., Basa, M., & Narducci, P. (1995). A simple and rapid staining technique for plastic embedded cartilage and bone. *Biotechnic and Histochemistry*, 70(2), 75-80. DOI: 10.3109/10520299509108321.
- Grimley, P. M. (1964). A tribasic stain for thin sections of plastic-embedded, OsO₄-fixed tissues. *Stain Technology*, 39(4), 229-233. DOI: 10.3109/10520296409061235.
- Gutierrez-Gonzalvez, M. G., Stockert, J. C., Ferrer, J. M., & Tato, A. (1984). Ruthenium red staining of polyanion containing structures in sections from epoxy-resin embedded tissues. *Acta Histochemica*, 74(1), 115-120. DOI: 10.1016/S0065-1281(84)80038-0.
- Haraguchi, C. M., & Yokota, S. (2002). Immunofluorescence technique for 100-nm-thick semithin sections of epon-embedded tissues. *Histochemistry and Cell Biology*, 117(1), 81–85. DOI: 10.1007/s00418-001-0363-1.
- Hayat, M.A. (2000). Rinsing, dehydration and embedding. In M. A. Hayat (Eds), *Principles and techniques of electron microscopy*. 4th Edition, (pp. 85-137). Cambridge: Cambridge University Press.
- Hayat, M.A. (2000). Staining of semithin sections. In M. A. Hayat (Ed.), *Principles and techniques of electron microscopy* 4th Edition, (pp. 360-366). Cambridge: Cambridge University Press.

- Hayat, M.A. (2000). Chemical fixation. In M. A. Hayat (Eds), *Principles and techniques of electron microscopy* 4th Edition, (pp. 4-61). Cambridge: Cambridge University Press.
- Hayat, M.A. (2000). Sectioning. In M. A. Hayat (Eds.), *Principles and techniques of electron microscopy* 4th Edition, (pp. 139-209). Cambridge: Cambridge University Press.
- Horobin R.W. (1983). Staining plastic sections: a review of problems, explanations and possible solutions. *Journal of Microscopy*, 131(2), 173-186.
- Huber, J. D., Parker, F., & Odland, G. F. (1968). A basic fuchsin and alkalized methylene blue rapid stain for epoxy-embedded tissue. *Stain Technology*, 43(2): 83-87. DOI: 10.3109/10520296809115048.
- Humphrey, C. D., & Pittman, F. E. (1974). A simple methylene blue-azure II-basic fuchsin stain for epoxy-embedded tissue sections. *Stain Technology*, 49(1), 9-14. DOI: 10.3109/10520297409116929.
- Iwaware, T., & Arai, T. (1995). Staining etched epoxy resin sections for light microscopy. *Biotechnic and Histochemistry*, 70(2), 53-56. DOI: 10.3109/10520299509108317.
- Iwaware, T., Harada, E., Yoshino, S., & Arai, T. (1990). A solution for removal of resin from epoxy sections. *Stain Technology*, 65(4), 205-209. DOI: 10.3109/10520299009108071.
- Jha, R. K. (1976). An improved polychrome staining method for thick epoxy sections. *Stain Technology*, 51(3), 159-162. DOI: 10.3109/10520297609116692.
- Krueger, S. K., Phillips, D. E., Frederick, M. M., & Johnson, R. K. (1999). Diaminobenzidine as a myelin stain in semithin plastic sections. *Biotechnic and Histochemistry*, 74(2), 105-109. DOI: 10.3109/10520299909066485.
- Li, Y., Zhang, L., Zhang, J.-Y., Liu, Z., Duan, Z.-X., & Li, B.-C. (2013). Morphological study of Schwann cells remyelination in contused spinal cord of rats. *Chinese Journal of Traumatology*, 16(4), 225-229. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1008-1275.2013.04.008.
- Loginov, E. V., Sokolova, I. I., & Gromov, A. I. (1987). A rapid method for staining semithin tissue sections embedded in araldite. *Tsitologiya*, 29(11), 1314-1317.
- Lynn, J. A. (1965). Rapid toluidine blue staining of epon-embedded and mounted "Adjacent" sections. *American Journal of Clinical Pathology*, 44(1), 57-58. DOI: 10.1093/ajcp/44.1.57.
- Manokhina, M. S., & Bakhtybaev, O. E. (1978). Use of semithin sections from epoxy blocks in the cytological analysis of the retina. *Arkhiv Patologii*, 40(11), 66-69.
- Manskikh, V. N., & Sheval E. V. (2020). An adaptation of Twort's method for polychromatic staining of epoxy-embedded semithin sections. *Histochemistry and Cell Biology*, 153(2), 121-127. DOI: 10.1007/s00418-019-01836-x.
- Menovsky, T., & van den Bergh Weerman, M. (1999). A modified staining method for connective tissue in semi-thin histological sections of peripheral and cranial nerves. *Acta Chirurgiae Plasticae*, 41(4), 120-122.
- Morikawa, S., Sato, A., & Ezaki, T. (2018). A simple, one-step polychromatic staining method for epoxy-embedded semithin tissue sections. *Microscopy*, 67(6), 331-344. DOI: 10.1093/jmicro/dfy037.
- Oldmixon, E. H. (1988). Mallory's Phloxine B-Methylene blue-Azure II stain emphasizes elastin and collagen bundles in epoxy embedded lung. *Stain Technology*, 63(3), 165-170. DOI: 10.3109/10520298809107178.

- Öztürk. N.P. (2003). Yarı ince kesitlerin polikromatik boyanması. [Yayınlanmamış uzmanlık tezi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı]
- Relucenti, M., Heyn, R., Petruzzello, L., Pugliese, G., Taurino, M., & Familiari, G. (2010). Detecting microcalcifications in atherosclerotic plaques by a simple trichromic staining method for epoxy embedded carotid endarterectomies. *European Journal of Histochemistry*, 54(3):e33, 143-147. DOI: 10.4081/ejh.2010.e33.
- Roberts, I. M., & Hutcheson, A. M. (1975). Handling and staining epoxy resin sections for light microscopy. *Journal of Microscopy*, 103(1), 121-126. DOI: 10.1111/j.1365-2818.1975.tb04543.x.
- Robinson, G., & Gray, T. (1996). Electron Microscopy: Practical procedures. In J. D. Bancroft, & A. Stevens (Eds.), *Theory and practice of histological techniques*. 4th Edition, (pp. 585-626). Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Rock, M. E., Anderson, J. A., & Binder, P. S. (1993). A modified trichrome stain for light microscopic examination of plastic-embedded corneal tissue. *Cornea*, 12(3), 255-260. DOI: 10.1097/00003226-199305000-00012.
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2011). *Histology a text and atlas: With correlated cell and molecular biology*. In 6th Edition. (pp. 1-21). (Philadelphia: Wolters Kulwer Lippincott Williams & Wilkins.
- Sato, T., & Shamoto, M. (1973). A simple rapid polychrome stain for epoxy-embedded tissue. *Stain Technology*, 48(5), 223-227. DOI: 10.3109/10520297309116628.
- Scala, C., Preda, P., Cenacchi, G., Martinelli, G. N., Manara, G. C., & Pasquinelli, G. (1993). A new polychrome stain and simultaneous methods of histological, histochemical and immunohistochemical stainings performed on semithin sections of Bioacryl-embedded human tissues. *The Histochemical Journal*, 25(9), 670-677. DOI: 10.1007/BF00157881.
- Schroeder, H. E., Rossinsky, K., & Müller, W. (1980). An established routine method for differential staining of epoxy-embedded tissue sections. *Microscopica Acta*, 83(2), 111-116.
- Smith, D. J. (1981). Improved Masson trichrome stain on plastic-embedded tissue. *Journal of Histotechnology*, 4(3), 132-133. DOI: 10.1179/his.1981.4.3.132.
- Stockert, J. C., & Colman, O. D. (1978). Toluidine blue staining on epon semithin sections: effect of an oil differentiation. *Microscopica Acta*, 80(2), 97-105.
- Stupina, T., Shchudlo, M., & Stepanov, M. (2017). Electron probe microanalysis of experimentally stimulated osteoarthritis in dogs. *World Journal of Orthopedics*, 8(9), 681-687. DOI: 10.5312/wjo.v8.i9.681.
- Tato, A., Planes, M., Ramos, A., Stockert, J. C., & Ferrer, J. M. (1991). Differential staining of mucin granules from epoxy resin sections by a Phosphotungstic Acid-Methyl Green Procedure. *Biotechnic and Histochemistry*, 66(3), 139-144. DOI: 10.3109/10520299109110568.
- Tolivia, J., Navarro, A., & Tolivia, D. (1994). Polychromatic staining of epoxy semithin sections: a new and simple method. *Histochemistry*, 101(1), 51-55. DOI: 10.1007/BF00315831.
- Trump, B. F., Smuckler, E. A., & Benditt, E. P. (1961). A method for staining epoxy sections for light microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*, 5, 343-348. DOI: 10.1016/s0022-5320(61)80011-7.

- Tzitsikas, H., Rdzok, E. J., & Vatter, A. E. (1962). Staining residual lipids in ultrathin sections of tissues embedded in polyester resin. *Stain Technology*, 37(5), 299-301. DOI: 10.3109/10520296209114489.
- Van Reempts, J., & Borgers, M. (1975). A simple polychrome stain for conventionally fixed epon-embedded tissues. *Stain Technology*, 50(1), 19-23. DOI: 10.3109/10520297509117026.
- Vidal, B. C., & Mello, M. L. S. (2019). Toluidine blue staining for cell and tissue biology applications. *Acta Histochemica*, 121(2), 101-112. DOI: 10.1016/j.acthis.2018.11.005.
- Woods, A. E., & Stirling, J. W. (2013). Transmission electron microscopy. In Suvarna, K., Layton, C., & Bancroft, J.D (Eds.), *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. 7th Edition, (pp. 493-538). China: Churchill Livingstone.
- Zhai, X.-Y., Kristoffersen, I. B., & Christensen, E. I. (2007). Immunocytochemistry of renal membrane proteins on epoxy sections. *Kidney International*, 72(6), 731–735. DOI: 10.1038/sj.ki.5002403.

7. SİMGELER ve KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
DAB	: Diaminobenzidin
dk	: Dakika
g	: Gram
GER	: Granüler Endoplazmik Retikulum
GMA	: Glikolmetakrilat
HCL	: Hidroklorik asit
H&E	: Hematoksilen-Eozin
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
KOH	: Potasyum hidroksit
l	: Litre
µm	: Mikrometre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
MW	:Moleküler ağırlık
NaOH	: Sodyum hidroksit
nm	: Nanometre
PAS	: Periyodik Asit Schiff
RT	: Room Temperature (Oda Sıcaklığı)
sn	: Saniye
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskopu
UV	: Ultraviyole ışınımı
%	: Yüzde

EK 1

Solvent I: Absolü alkolde satüre NaOH solüsyonu

Solüsyonun hazırlanışı:

100 ml alkolde doymuş hale ulaşıncaya kadar NaOH çözdürüldü. Hazırlanan solüsyon oda sıcaklığında 2-3 gün bekletildi. Solüsyon rengi koyu kahverengi olduğunda kullanıldı.

Solvent II: %2,5 Periyodik asit solüsyonu

Solüsyonun hazırlanışı:

Periyodik asit (H ₅ IO ₆)	2,5 g
Distile su	100 ml

Solvent III: Aseton

Çalışmada kimyasal aseton (BDH, Technical) kullanıldı.

Hematoksilen solüsyonu

Papanicolaou's solution 1a Harris hematoxylin solution (Merck) kullanıldı.

Eozin

Eosin Y (Histomed) solüsyonu kullanıldı.

Toluidine blue solüsyonu

Parafin kesitler için solüsyonun hazırlanışı:

Toluidine blue (C.I. 52040, Merck)	1g
Distile su	100 ml

En az 2-3 hafta olgunlaşması beklendi. Boyamadan önce filtre edilerek kullanıldı.

Epon kesitler için solüsyonun hazırlanışı:

Toluidine blue (C.I. 52040, Merck)	1 g
Distile su	100 ml
Sodyum tetraborat	1 g

Çözününce koyu renk şişede saklandı ve filtre edilerek kullanıldı.

Asit fuksin solüsyonu

Parafin kesitler için solüsyonun hazırlanışı:

Asit fuksin (C.I. 42685, Merck)	0,5 g
Distile su	100 ml
Glacial asetik asit	0,5 ml

Distile su içinde çözdürülen asit fuksin solüsyonu üzerine glasiyal asetik asit eklenerek hazırlandı.

Epon kesitler için solüsyonun hazırlanışı:

Asit fuksin (C.I. 42685, Merck)	1 g
Distile su	100 ml

Fosfomolibdik asit solüsyonu

Fosfomolibdik asit	1 g
Distile su	100 ml

Metil green solüsyonu

Parafin kesitler için solüsyonun hazırlanışı:

Metil green (C.I. 42585, Merck)	0,5 g
Distile su	100 ml

Epon kesitler için solüsyonun hazırlanışı:

Metil green (C.I. 42585, Merck)	1 g
Distile su	100 ml

Nötral red solüsyonu

Parafin ve Epon kesitler için solüsyonun hazırlanışı:

Nötral red (C.I. 50040, Merck)	1 g
Distile su	100 ml

Verhoeff Boyaması

Solüsyonların Hazırlanışı:

Solüsyon A:

Hematoksilen (C.I. 75290, Merck)	5 g
Absolü alkol	100 ml

Solüsyon B:

Ferric chloride	10 g
Distile su	100 ml

Solüsyon C:

Iodine	1 g
Potassium iodide	2 g
Distile su	100 ml

%2 Ferric chloride Solüsyonu:

Ferric chloride	2 g
Distile su	100 ml

Çalışma solüsyonu:

Solüsyon A	20 ml
Solüsyon B	8 ml
Solüsyon C	8 ml

Sırayla ve karıştırılarak birleştirilir.

Gordon&Sweet Gümüşleme Boyaması

Solüsyonların Hazırlanışı:

A- Gümüş solüsyonu:

Silver nitrat	10 g
Distile su	100 ml

Hazırlanan solüsyondan 5 ml alınır ve üzerine 5 ml %3'lük Sodyum hidroksit solüsyonu eklenir. Bu karışım çökelti oluşturur. Oluşan çökeltinin üzerine damla damla konsantre amonyak eklenerek karıştırılır. Çökelti eriyip solüsyon berrak hale gelince kullanılır. Koyu renk şişede saklanır ve kullanmadan önce filtre edilir.

B- %1 Potasyum permanganat solüsyonu:

Potassium permanganat	1g
Distile su	100 ml

C- %1'lik Oksalik asit solüsyonu:

Oxalic acid	1 g
Distile su	100 ml

D- %2,5 Iron alum solüsyonu

Iron alum	2,5 g
Distile su	100 ml

E- %10 Formalin solüsyonu:

Formalin	10 ml
Distile su	90 ml

F- %5 Sodyum tiyosülfat solüsyonu:

Sodium thiosulphate	5 g
Distile su	100 ml

Light green solüsyonu

Parafin ve epon kesitler için solüsyonun hazırlanışı:

Light green (C.I. 42095, Sigma)	2 g
Glacial asetik asit	2,5 ml
Distile su	100 ml

Altmann Metodu Solüsyonları

Anilin-Asit fuksin solüsyonu:

Aniline oil	5 ml
Distile su	100 ml

Bu solüsyon yavaş yavaş eklenen ve yaklaşık 24 saat süren asit fuksin ile sature edilir. Yaklaşık %15 olduğunda saturasyon tamamlanır.(100 ml Anilin solüsyonuna ~15-20 g Asit fuksin eklenir.) Solüsyon kullanılmadan önce filtre edilir.

Differansiyatör I:

Sature alkolik (absolü alkol ile) pikrik asit	10 ml
%30 alkol	40 ml

Diferansiyatör II:

Sature alkolik(absolü alkol ile) pikrik asit	5 ml
%30 alkol	40 ml

Sörensen'in Fosfat Tamponu

Solüsyon A: Na₂ HPO₄12H₂O (0,13M) 23,28 g/lt

Solüsyon B: KH₂PO₄ (0,13M) 18,6 g/lt

Her iki solüsyon distile su ile hazırlandı. Tampon solüsyonu, Solüsyon A üzerine Solüsyon B pH=7,2 oluncaya kadar yavaş yavaş eklenerek oluşturuldu.

%5 Gluteraldehit

%25'lik Gluteraldehit	5 ml
Fosfat tamponu	20 ml

İşlem öncesinde taze hazırlanır.

%1 Osmiyum tetroksit

OsO ₄	100 mg (1 ampul)
Fosfat tamponu	10 ml

Alüminyum folyoya sarılı OsO₄ ampülü kırılarak, içinde tampon solüsyonu olan koyu renkli şişeye aktarıldı. Tam olarak çözünmenin gerçekleşmesi için uygulamadan 1 gün önce hazırlandı. Alüminyum folyoya sarılarak, buzdolabında muhafaza edildi.

Epon

Solüsyon A:

Epon 812	18,6 g
DDSA (C ₆ H ₂₆ O ₃)	24 g

Solüsyon B:

Epon 812	24,8 g
MNA (C ₁₀ H ₁₀ O ₃)	21,7 g

Hava kabarcığı olmayacak şekilde yavaşça karıştırılarak elde edildi ve kullanım öncesinde hazırlandı.

Lamların Kaplanması

Jelatin:	1 g
Distile su	1000 ml

Lamlar solüsyona daldırılarak jelatin ile kaplandı. Oda ısısında kurutuldu.

TEŞEKKÜR

Çalışma hayatım ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana her zaman yol gosteren, tezimin oluőturulması s¼recinde bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen, dikkati, disiplini ve sabrıyla tezimde benden çok emeği olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Semiha ERSOY'a, bana elektron mikroskopunu oğreten hocam Prof. Dr. İlkin ÇAVUŐOđLU'na, bölüm hocalarım Prof. Dr. Özhan EYİGÖR'e, Prof. Dr. Zehra MİNBAY'a, Prof. Dr. Berrin AVCI'ya; asistan arkadaşlarım Senem E. ÇAYIR, Doruk BAŐAR ve Aynur AğAYEVA'ya, hayattaki en büyük zenginliğim canım ailem ve özellikle artık aramızda olmayan halam Fatma AKBAŞ'a manevi destekleri, yardım ve katkıları için teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

İlk öğrenimimi Bursa 1.Murat İlkokulu'nda, orta ve lise öğrenimimi Bursa Cumhuriyet Lisesi'nde tamamladım. Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldum. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda biyolog olarak çalışıyorum.